

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610103897.6

[51] Int. Cl.
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
G01N 33/02 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年12月23日

[11] 授权公告号 CN 100572395C

[22] 申请日 2006.8.8

[21] 申请号 200610103897.6

[73] 专利权人 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街12号

[72] 发明人 杨曙明 于洪侠

[56] 参考文献

CN1069172A 1993.2.24

CN1452885A 2003.11.5

三黄鸡饲料中添加喹乙醇对其生长的影响.
刘利林等. 塔里木农垦大学学报, 第15卷第3期. 2003

数种常用药物对雏鸡体液免疫产生的影响.
曹殿军等. 中国畜禽传染病, 第70卷第3期. 1993

审查员 丁海

[74] 专利代理机构 北京汇泽知识产权代理有限公司

代理人 李浩成

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

[54] 发明名称

一种合成喹乙醇人工抗原的方法

[57] 摘要

本发明提供了一种新的合成喹乙醇 (Olaquinox) 人工抗原的方法。该方法是将喹乙醇溶解于碱性有机溶剂 (DMF、无水吡啶或三丁胺) 中, 然后用有机溶剂溶解的固体光气 (BTC) 与喹乙醇的有机溶剂溶液混合, 在适宜的条件下反应适当的时间, 将活化的喹乙醇与载体溶液混合, 合成喹乙醇的免疫原和包被原。所用的固体光气比传统的光气不挥发, 毒性低。本发明属国际首创。该抗原用于动物免疫, 获得的抗体能用于喹乙醇的快速检测。

1. 一种合成噻乙醇人工抗原的方法，该方法包括下列步骤：

(a) 称取噻乙醇溶于吡啶和 DMF 的 1:1 混合溶液中，称取固体光气 (BTC) 溶于二氯甲烷中，在冰浴条件下先将少许 BTC 溶液滴加入噻乙醇溶液中，反应几分钟后将剩余的 BTC 溶液全部加入，转入室温搅拌反应 1 小时，得到混合溶液 A；

称取载体蛋白溶于弱碱性的硼酸钠缓冲液中，向其中加入 1 ml DMF 得到载体蛋白溶液 B；

(b) 将溶液 A 逐滴加于载体蛋白溶液 B 中，缓慢滴加，半小时内加完，室温下反应 4 小时得噻乙醇-载体蛋白偶联物；

其中所述的载体蛋白为牛血清白蛋白，其与噻乙醇之间的偶联比为 1：10。

一种合成喹乙醇人工抗原的方法

技术领域

本发明涉及以小分子化合物作为半抗原合成人工抗原的方法。具体而言，本发明涉及一种新的合成喹乙醇（Olaquinox）人工抗原的方法。更具体地说，本发明所述方法使用固体光气作为偶联剂（或称连接臂），偶联喹乙醇与载体蛋白从而合成喹乙醇的人工抗原。

技术背景

喹乙醇(Olaquinox)，又名：快育灵、倍育诺(Bayonox)、奥拉金、喹酰胺醇、Fedan。分子式： $C_{12}H_{13}N_3O_4$ 。由2-甲基喹噁啉-1、4-二氧化物与乙醇胺缩合而成的淡黄色结晶性粉末，微溶于水。

喹乙醇抗菌效力好，促进生长发育，增加瘦肉率，价格便宜。因此曾经被作为抗菌促生长作用的饲料添加剂大量使用。

然而，喹乙醇在被大量使用后，人们也发现了许多问题，如鸡等禽类对喹乙醇敏感。人们对使用喹乙醇添加剂的鸡进行病理解剖时，发现鸡的脏器有药物致损的现象。喹乙醇在动物体内的残留时间长，蓄积毒性大，不仅能使动物中毒或死亡，而且残留在肉中对人体也有较大危害。由于喹乙醇是由2-甲酸甲酯-3-甲基喹噁啉-1、4-二氧化物与乙醇胺缩合而成的，有人认为喹乙醇在动物体内代谢后会生成甲基喹噁啉-1、4-二氧化物，这种物质能抑制脱氧核糖核酸的合成，对染色体畸变有影响，是一种致癌物。

鉴于喹乙醇的毒性和存在的潜在危害，因而人们重新对喹乙醇的安全性进行评价，对喹乙醇的使用也做出了新的规定。美国没有批准使用；欧盟也从1999年开起始全面禁止使用喹乙醇；我国对喹乙醇使用的限制也更加严格。我国农业部颁布的《动物性食品兽药最高残留限量》中也列入了喹乙醇。国家进出口检验检疫局制定了肉中喹乙醇残留量的检验方法《：中华人民共和国进出口商品检验行业标准——出口肉中喹乙醇饲料添加剂质量监督检测实施细则》也把鸡饲料、饮水及鱼饲料中的喹乙醇作为违禁药物进行监督检验。

现有的喹乙醇检测方法多为色谱法，但是这些方法的灵敏度受样品的净化、浓缩等步骤的影响较大；再者这些方法需要复杂的仪器，且过程繁琐，不适应现场大量样本的筛查。基于抗原抗体免疫反应的免疫学检测技术为小分子残留物的分析检测提供了一个新的途径。该技术研究的关键是半抗原分子的设计、合成和人工全抗原及抗体的制备。

因为喹乙醇是小分子化合物，本身没有免疫原性，必须将其与大分子载体蛋白偶联得到具有免疫原性的人工抗原。喹乙醇人工抗原和特异性抗体以及在此基础上建立免疫分析方法尚未见报道。并且本发明首次用固体光气作为连接剂用于制备喹乙醇的人工抗原。

发明内容

本发明的目的在于提供噻乙醇（Olaquinox）人工抗原及合成方法。

一方面，本发明提供了一种合成噻乙醇人工抗原的方法。

噻乙醇是有机小分子半抗原，必须与大分子载体偶联后才成为完全抗原。

本发明使用固体光气（BTC）（学名双-三氯甲基碳酸酯）作为偶联试剂。固体光气以前主要用作有机化合物合成过程中的偶联剂，本发明将其作为合成免疫原的偶联剂。固体光气与以往合成免疫原中常用的偶联剂相比，其作为固体，因而使用方便，能准确称量，从而可以避免偶联剂过量使用产生的副反应，并且固体光气与光气相比，毒性低，容易储存。

本发明所述的合成噻乙醇人工抗原的方法包括：

（a）称取噻乙醇溶于吡啶和 DMF 混合（1:1）溶液中，称取固体光气（BTC）溶于二氯甲烷中，在冰浴条件下先将少许 BTC 溶液滴加入噻乙醇溶液中，反应几分钟后将剩余的 BTC 溶液全部加入，转入室温搅拌反应 1 小时，得到混合溶液 A。

称取载体蛋白溶于弱碱性的硼酸钠缓冲液中，向其中加入 1 ml DMF 得到载体蛋白溶液 B。

（b）将溶液 A 逐滴加于载体蛋白溶液 B 中，缓慢滴加，半小时内加完，室温下反应 4 小时得噻乙醇-载体蛋白偶联物。

在一个优选实施方案中，所述合成噻乙醇人工抗原的方法的具体操作为：

称取 26.3mg 噻乙醇溶于 3ml 的吡啶和 DMF 混合（1:1）溶液中，称取固体光气（BTC）9.9mg 溶于 1 ml 二氯甲烷中，在冰浴条件下先将少许 BTC 溶液滴加入噻乙醇溶液中，反应几分钟后将剩余的 BTC 溶液全部加入，转入室温搅拌反应 1 小时，得到混合溶液 A。

称取 50mg 载体蛋白溶于 0.1mol/L pH 8.4 的 5 ml 硼酸钠缓冲液中，向其中加入 1 ml DMF 得到载体蛋白溶液 B。

将溶液 A 逐滴加于载体蛋白溶液 B 中，缓慢滴加，半小时内加完，室温下反应 4 小时得噻乙醇-载体蛋白偶联物。

本发明的一个优选实施方案中，所述载体蛋白为牛血清白蛋白（BSA），BSA 与噻乙醇之间的偶联比为 1：10。

另一个优选实施方案中，所述载体蛋白为匙孔咸血蓝蛋白（keyhole limpet hemocyanin, KLH），KLH 与噻乙醇之间的偶联比为 1：20。

另一方面，本发明提供了一种制备抗噻乙醇多克隆抗体的方法，该方法包括下列步骤：

1) 将本发明制备的噻乙醇-载体蛋白偶联物纯化；

2) 将纯化后的噻乙醇-载体蛋白偶联物与等量弗氏完全佐剂混合后制成乳化疫苗, 进行动物初次免疫, 再次免疫时以弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂, 两次免疫的间隔时间为三周, 从第三次免疫开始, 每次免疫后 10 天, 取血进行抗体效价监测, 最后一次免疫后 7 天取血, 室温凝固 2 h 后 4℃ 过夜, 8000 r/min 离心 10 分钟, 分离出全抗血清, 对全抗血清进行分离纯化后即得本发明所述的多克隆抗体。

在一个优选实施方案中, 所述的偶联物纯化具体操作为: 过 SephadexG-25M 凝胶层析纯化, 用 0.01M pH 7.4 PBS 三倍柱床体积平衡, 调节流速至 3ml/min, 样品浓缩至 5ml 加入到平衡好的层析柱中层析纯化偶联物, 液用 0.01M PBS (pH 7.4) 进行洗脱。

一个具体实施方案中, 动物免疫时使用的动物是兔。

一个具体实施方案中, 所述全抗血清分离纯化为: 用 50% 饱和硫酸铵溶液沉淀, 离心去上清液, 沉淀用磷酸盐缓冲液重悬, 再用 33% 饱和硫酸铵溶液沉淀两次, 沉淀物用尽可能少的磷酸缓冲液溶解, 经透析后再用 SephadexG-25M 层析除去硫酸铵, 即得本发明所述的多克隆抗体。

另一方面, 本方面提供了一种抗噻乙醇的多克隆抗体, 该多克隆抗体是一种以噻乙醇为半抗原制得的多克隆抗体, 也可以说本发明的多克隆抗体是一种以半抗原-载体蛋白偶联物免疫动物, 取学分离出全血清, 分离纯化得到的多克隆抗体。

本发明的多克隆抗体采用 pH 为 7.3 的磷酸缓冲液时, SDS-PAGE 电泳检测纯度为 98% 以上。

另一方面, 本发明提供了本发明所述多克隆抗体在检测噻乙醇中的用途。

本发明通过间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 试验, 对本发明制得的多克隆抗体进行了效价和特异性测定, 试验结果表明, 本发明的抗体效价在 6000 以上, 并且具有良好的抗噻乙醇特异性。因此, 本发明所述多克隆抗体可用于检测噻乙醇的残留, 或者用于制备检测噻乙醇残留的试剂。

附图说明

图 1 噻乙醇紫外扫描图。

图 2 牛血清白蛋白紫外扫描图。

图 3 噻乙醇人工抗原紫外扫描图。

提供下述实施例是为了更好地进一步理解本发明, 而决不对本发明的内容和保护范围构成任何限制。

实施例

实施例1 免疫原的合成及免疫血清的制备

1.1 试剂与仪器

噻乙醇（湖北中牧安达药业有限公司生产），固体光气（BTC）（购自北京耀北生物技术有限公司），吡啶（Pyridine, AR. WM=79.10, 含量>99.5%, 天津市科密欧化学试剂开发中心），N,N-二甲基甲酰胺(Dimethylformamide, DMF, 美国新泽西州 ACROSORGANICS 公司生产，购自百灵威化学试剂公司)，正三丁胺（Tributylamine, 美国新泽西州 ACROSORGANICS 公司生产，购自百灵威化学试剂公司），牛血清白蛋白（BSA），二氯甲烷（北京世纪红星化工有限责任公司生产）

双光束紫外可见分光光度仪（TU-1909, 北京普析通用仪器有限公司），层析装置（3057 型便携式记录仪，重庆川仪四厂；SBS 系列数控计滴器，恒流泵，自动部分收集器，层析柱，上海沪西分析仪器厂），磁力搅拌器（上海东荣丰科学仪器有限公司），台式离心机（Minispin 最大转速 13400 rpm 最大离心力 12100 rcf, 2ml×12），

1.2 噻乙醇人工抗原的合成

称取 26.3mg 噻乙醇溶于 3ml 的吡啶和 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)混合（1:1）溶液中，称取固体光气（BTC）9.9mg 溶于 1 ml 二氯甲烷中。

将上述噻乙醇和固体光气两溶液混合。具体方法为：在冰浴条件下先将少许 BTC 溶液滴加入噻乙醇溶液中，反应几分钟后将剩余的 BTC 溶液全部加入，转入室温搅拌反应 1 小时，得到混合溶液 A。

称取 50mg 载体蛋白 BSA 或 KLH 分别溶于 0.1mol/L pH 8.4 的 5 ml 硼酸钠缓冲液中，向其中加入 1 ml DMF 得到载体蛋白溶液 B。

将溶液 A 逐滴加于载体蛋白溶液 B 中，缓慢滴加，半小时内加完，室温下反应 4 小时。

然后，将偶联物过 SephadexG-25M 凝胶层析纯化，用 0.01M pH 7.4 PBS 三倍柱床体积平衡，调节流速至 3ml/min，样品浓缩至 5ml 加入到平衡好的层析柱中层析提纯偶联物，洗脱液用 pH 7.4 0.01M PBS。

通过紫外线扫描鉴定偶联物。具体操作为：将噻乙醇溶于 PBS(0.01M pH 7.4)，浓度为 15μg/ml；BSA 溶于 PBS(0.01M pH 7.4)，浓度为 1.03mg/ml；将纯化后的偶联物同样用 PBS(0.01M pH 7.4)作适当稀释，使其浓度与 BSA 浓度接近。将这三种溶液在 200 nm—400 nm 之间进行紫外扫描，得出各物质的紫外扫描波谱，如图 1-3 所示。从图 1-3 中可以看出噻乙醇与载体蛋白 BSA 偶联成功。

免疫及特异性抗体的制备

将上述噻乙醇-BSA 偶联物用生理盐水稀释成 1mg/ml 溶液备用。

选取 6 只体重 2~2.5Kg 健康雄性新西兰大白兔。将偶联物与等量弗氏完全佐剂通过注射器对抽法混合成油包水的乳浊液，按 1mg / Kg 体重的量进行首次免疫，采取背部皮下多点注射。每隔两周加强免疫一次，用弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂，剂量及方法同首次免疫。从第三次免疫开始，每次免疫后 10 天，耳缘静脉取血 1ml，进行抗体效价检测，当抗体效价不再升高时，不加佐剂进行最后一次(第 7 次)免疫，大腿肌肉注射，7 天后颈动脉放血，室温凝固 2 h 后 4℃ 过夜，8000 r/min 离心 10 分钟，除去血块，血清部分用 50% 饱和硫酸铵溶液沉淀，离心去上清液，沉淀用磷酸盐缓冲液重悬，再用 33% 饱和硫酸铵溶液沉淀两次，沉淀物用尽可能少的磷酸缓冲液溶解，经透析后用 SephadexG-25M 层析，即得多克隆抗体。

实施例 2 免疫检测方法的建立

2.1 ELISA 方法确定最佳包被浓度

将 1000 μ g/ml、100 μ g/ml、10 μ g/ml、5 μ g/ml、1 μ g/ml、0.25 μ g/ml 系列浓度的卵清蛋白(OVA)-噻乙醇偶联物按每孔 100 μ l 包被酶标板，4℃ 包被 24 h，洗涤 5 次，拍干，按每孔 200 μ l 封闭液 4℃ 下封闭 12 h，洗涤 3 次，拍干。加入 1:500 稀释的抗血清 100 μ l，室温作用 2h，洗涤三次，立即加入 100 μ l 酶标羊抗兔抗体，室温作用 30 min，洗涤三次，加 100 μ l 底物液，室温避光作用 15min,50 μ l 终止液终止反应，酶标仪检测 A 值(450nm)。同时设置空白对照孔(不加抗血清，只加其稀释液)和平行重复孔，取 OD 值为 1.0 左右时的包被浓度为最佳浓度。试验数据列于表 3。

表 1 不同包被浓度的 OD 值

包被浓度 μ g/ml	1000	100	10	5	2.5	1	0.25	空白
OD 值	1.945	1.726	1.726	1.525	1.221	1.074	0.760	0.052

由表 3 的数据中可以确定，最佳包被浓度为 1 μ g/ml。

2.2 间接 ELISA 检测抗体效价

以 1 μ g/ml 浓度包被酶标板，从 400 倍开始倍比稀释抗血清，按 2.1 的 ELISA 步骤操作。以两倍于阴性血清 OD 值的抗血清 OD 值对应的抗血清稀释度为抗血清效价。抗血清效价检测结果见表 4。

表 2 抗血清效价检测结果

稀释倍 数	400	800	1600	3200	6400	12800	阴性血清	空白
OD 值	1.184	0.908	0.694	0.475	0.339	0.149	0.157	0.048

从表 4 的数据可以确定本发明制备的抗血清的效价在 6000 以上。

2.3 间接竞争 ELISA 检测抗体特异性

ELISA 操作方法同 2.1。不同的是每孔加入 50 μ l 不同浓度的游离喹乙醇与卵清蛋白 (OVA)-喹乙醇偶联物竞争抗体, 随后加入抗血清, 得出不同的 OD 值。根据 2.1 的结果, 所用抗血清最佳浓度为 1:500。喹乙醇系列浓度和试验孔的排列顺序见表 3, 同时设置平行重复孔和空白对照孔。以 0 抑制孔的 OD 值为最大值 B_0 , 其它抑制浓度孔 OD 值为 B, $B/B_0 = 50\%$ 时对应的喹乙醇浓度为此抗体的 IC_{50} 值。抗体的特异性检测结果的数据列于表 3。然后, 用所得数据绘制出喹乙醇抑制曲线 (图 2)。

表 3 抗血清特异性检测结果

喹乙醇的抑制 浓度 (ng/ml)	0	0.3	1.25	5	25	100
OD 值	1.21	1.153	0.976	0.536	0.223	0.154

由表 3 中数据可知, 喹乙醇抗血清 IC_{50} 值在 5 ng/ml 左右, 表明本发明制备的抗血清是具有良好的特异性的抗喹乙醇多克隆抗体。

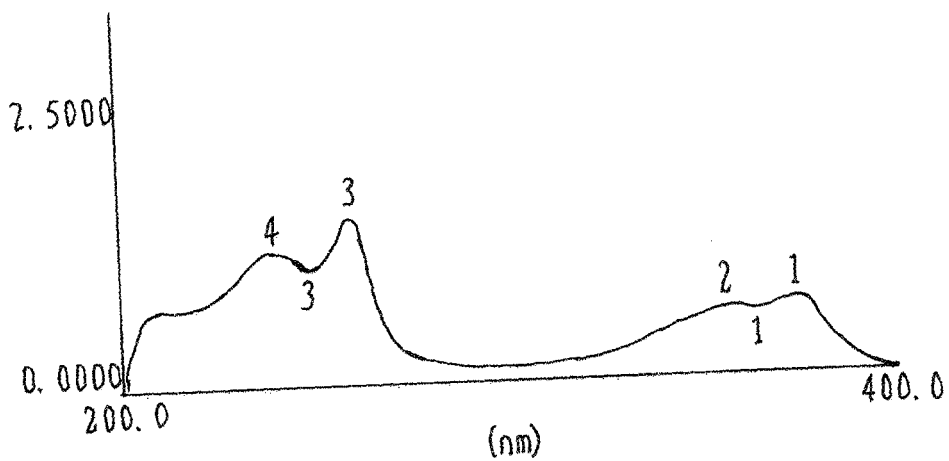


图1

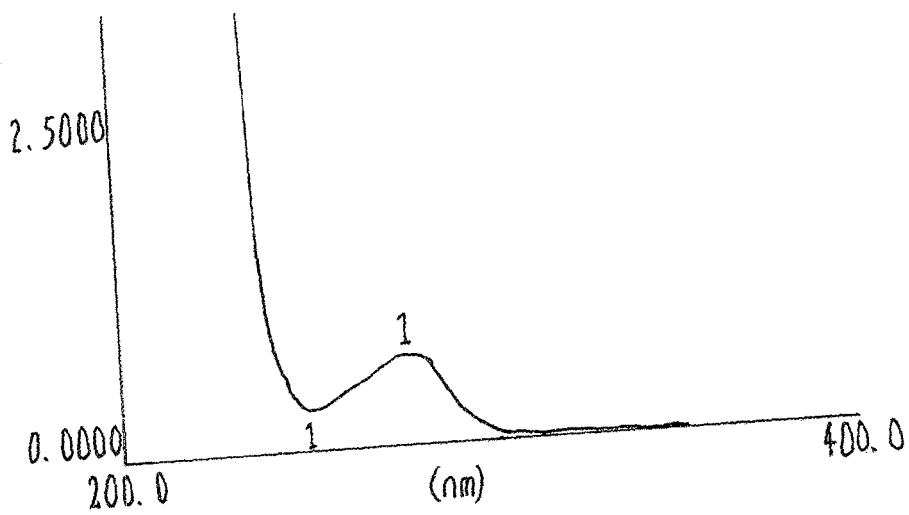


图2

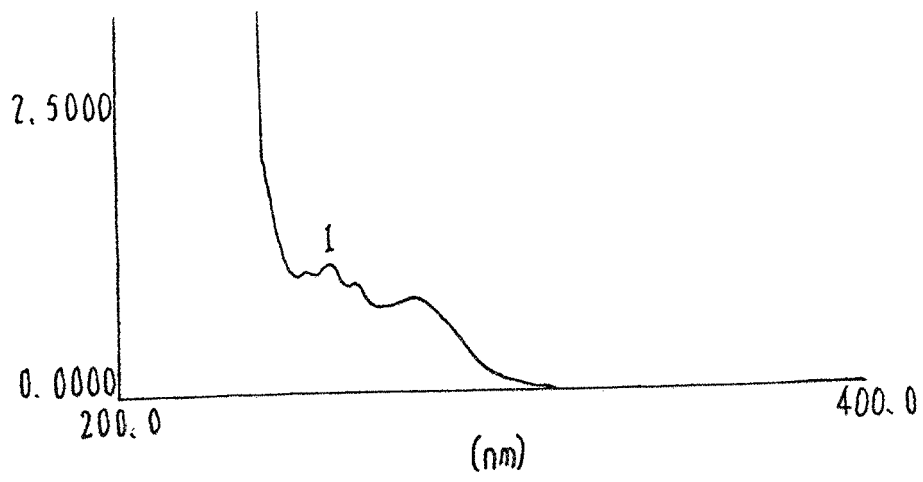


图3

专利名称(译)	一种合成噻乙醇人工抗原的方法		
公开(公告)号	CN100572395C	公开(公告)日	2009-12-23
申请号	CN200610103897.6	申请日	2006-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
[标]发明人	杨曙明 于洪侠		
发明人	杨曙明 于洪侠		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/15 G01N33/02 G01N33/53		
代理人(译)	李浩成		
审查员(译)	丁海		
其他公开文献	CN1887908A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种新的合成噻乙醇(Olaquinox)人工抗原的方法。该方法是将噻乙醇溶解于碱性有机溶剂(DMF、无水吡啶或三丁胺)中，然后用有机溶剂溶解的固体光气(BTC)与噻乙醇的有机溶剂溶液混合，在适宜的条件下反应适当的时间，将活化的噻乙醇与载体溶液混合，合成噻乙醇的免疫原和包被原。所用的固体光气比传统的光气不挥发，毒性低。本发明属国际首创。该抗原用于动物免疫，获得的抗体能用于噻乙醇的快速检测。

包被浓度 μg/ml	1000	100	10	5	2.5	1	0.25	空白
OD 值	1.945	1.726	1.726	1.525	1.221	1.074	0.760	0.052