



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104280541 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 14

(21) 申请号 201410563668. 7

(22) 申请日 2014. 10. 21

(71) 申请人 南京师范大学

地址 210046 江苏省南京市亚东新城区文苑路 1 号

(72) 发明人 邵科峰 赵波 张红琳 任鹏飞 常其沛

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207 代理人 韩朝晖

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/68 (2006. 01)

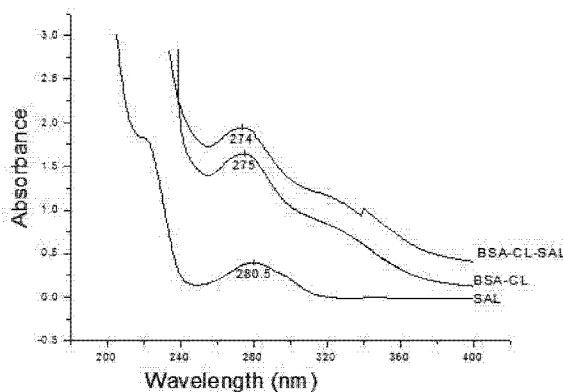
权利要求书2页 说明书6页 附图4页

(54) 发明名称

β-肾上腺素受体激动剂多簇抗原及宽谱特异性抗体及其制备

(57) 摘要

本发明公开了用于 β-肾上腺素受体激动剂多残留检测的多簇抗原、抗体及其制备方法。本发明包括八种 β-激动剂多簇抗原,分别为克伦特罗-莱克多巴胺-牛血清白蛋白、克伦特罗-沙丁胺醇-牛血清白蛋白、沙丁胺醇-莱克多巴胺-牛血清白蛋白、克伦特罗-沙丁胺醇-莱克多巴胺-牛血清白蛋白、克伦特罗-莱克多巴胺-卵清蛋白、克伦特罗-沙丁胺醇-卵清蛋白、沙丁胺醇-莱克多巴胺-卵清蛋白及克伦特罗-沙丁胺醇-莱克多巴胺-卵清蛋白,并采用所述的多簇抗原通过动物免疫制备了四种可用于 β-肾上腺素受体激动剂多残留检测的宽谱特异性抗体。



1. 一种 β -肾上腺素受体激动剂多簇抗原,其特征在于,所述的多簇抗原是两种以上 β -肾上腺素受体激动剂与载体蛋白的偶联物,所述的载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白,所述的 β -肾上腺素受体激动剂选自克伦特罗、沙丁胺醇和莱克多巴胺。

2. 根据权利要求1所述的 β -肾上腺素受体激动剂多簇抗原,其特征在于:系克伦特罗-沙丁胺醇-牛血清白蛋白或克伦特罗-沙丁胺醇-卵清蛋白偶联物,以克伦特罗和沙丁胺醇为半抗原,以牛血清白蛋白或卵清蛋白为载体,按以下步骤制备得到:

1) 在牛血清白蛋白或卵清蛋白上以重氮法偶联克伦特罗半抗原,再进行纯化:

将 0.2mmol 盐酸克伦特罗溶于 1~5ml 稀盐酸中,加入 0.2~2mol/L 的亚硝酸钠溶液至淀粉碘化钾试纸变为紫色,继续反应 1~3h 后将反应液加入到 5~10ml 含有 5~10mg/ml 载体蛋白的碳酸钠缓冲溶液中,再继续反应 3~5h;将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3~6 次,冷冻干燥即可得到克伦特罗-载体蛋白偶联物冻干粉;

2) 在步骤 1) 的产物上以混合酸酐法偶联沙丁胺醇半抗原,再进行纯化:

将 0.2mmol 硫酸沙丁胺醇溶于 5~10ml 无水乙醇中,加入 0.2mmol 戊二酸酐,室温下反应 3~5h,离心,将下层固体溶于 5~10ml N,N-二甲基甲酰胺,加入 0.2mmol 三正丁胺和 0.2mmol 氯甲酸异丁酯,继续反应 1~3h;将上述反应液加入到 5~10ml 含有 5~10mg/ml 克伦特罗-载体蛋白偶联物的磷酸缓冲溶液中,室温反应过夜;将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3~6 次,冷冻干燥即可得到克伦特罗-沙丁胺醇-载体蛋白偶联物冻干粉。

3. 根据权利要求1所述的 β -肾上腺素受体激动剂多簇抗原,其特征在于:系克伦特罗-莱克多巴胺-牛血清白蛋白或克伦特罗-莱克多巴胺-卵清蛋白偶联物,以克伦特罗和莱克多巴胺为半抗原,以牛血清白蛋白或卵清蛋白为载体,按以下步骤制备得到:

1) 在牛血清白蛋白或卵清蛋白上以混合酸酐法偶联莱克多巴胺半抗原,再进行纯化:

将 0.2mmol 戊二酸酐溶于 5ml 吡啶中,加入 0.2mmol 盐酸莱克多巴胺,室温反应 10~20h,蒸干溶剂,将所得油状物溶于 5~10ml N,N-二甲基甲酰胺,加入 0.2mmol 三正丁胺和 0.2mmol 氯甲酸异丁酯,继续反应 1~3h;将上述反应液加入到 5~10ml 含有 5~10mg/ml 载体蛋白的磷酸缓冲溶液中,室温反应过夜;将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3~6 次,冷冻干燥即可得到莱克多巴胺-载体蛋白偶联物冻干粉;

2) 在步骤 1) 的产物上以重氮法偶联克伦特罗半抗原,再进行纯化:

将 0.2mmol 盐酸克伦特罗溶于 1~5ml 稀盐酸中,加入 0.2~2mol/L 的亚硝酸钠溶液至淀粉碘化钾试纸变为紫色,继续反应 1~3h 后将反应液加入到 5~10ml 含有 5~10mg/ml 莱克多巴胺-载体蛋白偶联物的碳酸钠缓冲溶液中,再继续反应 3~5h;将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3~6 次,冷冻干燥即可得克伦特罗-莱克多巴胺-载体蛋白偶联物冻干粉。

4. 根据权利要求1所述的 β -肾上腺素受体激动剂多簇抗原,其特征在于:系沙丁胺醇-莱克多巴胺-牛血清白蛋白或沙丁胺醇-莱克多巴胺-卵清蛋白偶联物,以沙丁胺醇和莱克多巴胺为半抗原,以牛血清白蛋白或卵清蛋白为载体,按以下步骤制备得到:

1) 在牛血清白蛋白或卵清蛋白上以混合酸酐法偶联沙丁胺醇半抗原,再进行纯化:

将 0.2mmol 硫酸沙丁胺醇溶于 5~10ml 无水乙醇中,加入 0.2mmol 戊二酸酐,室温下反应 3~5h,离心,将下层固体溶于 5~10ml N,N-二甲基甲酰胺,加入 0.2mmol 三正丁胺和 0.2mmol 氯甲酸异丁酯,继续反应 1~3h;将上述反应液加入到 5~10ml 含有 5~10mg/ml

载体蛋白的磷酸缓冲溶液中,室温反应过夜;将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3~6 次,冷冻干燥即可得到沙丁胺醇-载体蛋白偶联物冻干粉;

2) 在步骤 1) 的产物上继续以混合酸酐法偶联莱克多巴胺半抗原,再进行纯化:

将 0.2mmol 戊二酸酐溶于 5ml 吡啶中,加入 0.2mmol 盐酸莱克多巴胺,室温反应 10~20h,蒸干溶剂,将所得油状物溶于 5~10ml N,N-二甲基甲酰胺,加入 0.2mmol 三正丁胺和 0.2mmol 氯甲酸异丁酯,继续反应 1~3h;将上述反应液加入到 5~10ml 含有 5~10mg/ml 沙丁胺醇-载体蛋白偶联物的磷酸缓冲溶液中,室温反应过夜;将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3~6 次,冷冻干燥即可得到沙丁胺醇-莱克多巴胺-载体蛋白偶联物冻干粉。

5. 根据权利要求 1 所述的 β -肾上腺素受体激动剂多簇抗原,其特征在于:系克伦特罗-沙丁胺醇-莱克多巴胺-牛血清白蛋白或克伦特罗-沙丁胺醇-莱克多巴胺-卵清蛋白偶联物,以克伦特罗、沙丁胺醇和莱克多巴胺为半抗原,以牛血清白蛋白或卵清蛋白为载体,按以下任意一种方法制备得到:

1) 在克伦特罗-莱克多巴胺-载体蛋白偶联物上以混合酸酐法偶联沙丁胺醇,再进行纯化:

将 0.2mmol 硫酸沙丁胺醇溶于 5~10ml 无水乙醇中,加入 0.2mmol 戊二酸酐,室温下反应 3~5h,离心,将下层固体溶于 5~10ml N,N-二甲基甲酰胺,加入 0.2mmol 三正丁胺和 0.2mmol 氯甲酸异丁酯,继续反应 1~3h;将上述反应液加入到 5~10ml 含有 5~10mg/ml 克伦特罗-莱克多巴胺-载体蛋白偶联物的磷酸缓冲溶液中,室温反应过夜;将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3~6 次,冷冻干燥即可得到克伦特罗-沙丁胺醇-莱克多巴胺-载体蛋白偶联物冻干粉;

2) 在克伦特罗-沙丁胺醇-载体蛋白偶联物上以混合酸酐法偶联莱克多巴胺,再进行纯化:

将 0.2mmol 戊二酸酐溶于 5ml 吡啶中,加入 0.2mmol 盐酸莱克多巴胺,室温反应 10~20h,蒸干溶剂,将所得油状物溶于 5~10ml N,N-二甲基甲酰胺,加入 0.2mmol 三正丁胺和 0.2mmol 氯甲酸异丁酯,继续反应 1~3h;将上述反应液加入到 5~10ml 含有 5~10mg/ml 克伦特罗-沙丁胺醇-载体蛋白偶联物的磷酸缓冲溶液中,室温反应过夜;将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3~6 次,冷冻干燥即可得到克伦特罗-沙丁胺醇-莱克多巴胺-载体蛋白偶联物冻干粉;

3) 在沙丁胺醇-莱克多巴胺-载体蛋白偶联物上以重氮法偶联克伦特罗,再进行纯化:

将 0.2mmol 盐酸克伦特罗溶于 1~5ml 稀盐酸中,缓慢加入 0.2~2mol/L 的亚硝酸钠溶液至淀粉碘化钾试纸变为紫色,继续反应 1~3h,将反应液加入到 5~10ml 含有 5~10mg/ml 沙丁胺醇-莱克多巴胺-载体蛋白偶联物的磷酸缓冲溶液中,室温反应过夜;将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3~6 次,冷冻干燥即可得到克伦特罗-沙丁胺醇-莱克多巴胺-载体蛋白偶联物冻干粉。

6. 根据权利要求 1 所述的多簇抗原制得的多簇抗原宽谱特异性抗体。

7. 根据权利要求 6 所述的 β -肾上腺素受体激动剂宽谱特异性抗体,其特征在于,所述的宽谱特异性抗体由 β -肾上腺素受体激动剂多簇抗原 CL-RAC-BSA、CL-SAL-BSA、SAL-RAC-BSA 或 CL-SAL-RAC-BSA 通过动物免疫获得。

β-肾上腺素受体激动剂多簇抗原及宽谱特异性抗体及其制备

技术领域

[0001] 本发明属于免疫化学和分析技术领域,具体涉及一种 β-肾上腺素受体激动剂(以下简称 β-激动剂)多簇抗原及宽谱特异性抗体及其制备。

背景技术

[0002] β-肾上腺素受体激动剂,简称 β-激动剂,是动物源性食品中检出率最高、危害最严重的化学性残留危害物,其中最著名的就是克伦特罗(clenbuterol, CL),俗称“瘦肉精”。上世纪 80 年代,美国脂胺公司的科研人员意外发现,“瘦肉精”能增强动物脂肪分解,促进蛋白质合成,大大缩短肉品上市周期,显著提高胴体瘦肉率、饲料回报率和经济效益。随后在世界各地迅速推广,80 年代后期,传入我国并在许多地区的饲料加工企业和养殖业推广使用,很快成为养殖业应用最广泛的“添加剂”。

[0003] “瘦肉精”除克伦特罗外,还包括沙丁胺醇(salbutamol, SAL)、莱克多巴胺(ractopamine, RAC)等 20 多个结构和性质相类似的化合物。这类化合物进入体内后选择性作用于腺苷酸环化酶,导致人体产生低敏感现象,哮喘发生率和发病程度升高;还可导致内分泌紊乱,诱发染色体畸变及恶性肿瘤,严重时可致人死亡。因此我国和世界上大多数国家都明文禁止“瘦肉精”用作饲料添加剂。

[0004] 目前,β-激动剂类兽药残留的检测方法主要包括高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)、酶联免疫法(ELISA)和荧光免疫法(FIA)等。

[0005] 色谱法是 β-激动剂兽药残留的主要检测方法,但是色谱法检测成本高、操作复杂、大量的阴性样品重复检测;而酶联免疫法具有特异性强、样品前处理简单等优点,但特异性强的特点同时也决定了它的致命缺点:一种酶联免疫试剂盒或试纸条只能检测一种兽药残留,而无法检测其它的同类兽药残留,这就是容易出现漏检的原因(如 2011 年轰动全国的“双汇瘦肉精”事件);此外,随着 β-激动剂多种替代品的出现,如果进行完全检测,一个样品需要使用多种检测产品,大大提高了检测成本和工作时间,失去了快速筛选的意义。

[0006] 多残留免疫分析能同时检测一类药物残留,其低成本、高通量、快速现场的优点是现有的色谱法和特异性免疫方法无法比拟的,是未来食品安全检测领域的关键技术之一,逐渐引起人们的重视。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种 β-肾上腺素受体激动剂多簇抗原及宽谱特异性抗体及其制备方法。

[0008] 本发明采用以下技术方案:

[0009] 一种 β-肾上腺素受体激动剂多簇抗原,其特征在于,所述的多簇抗原是两种以上 β-肾上腺素受体激动剂与载体蛋白的偶联物,所述的载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清

蛋白,所述的 β -肾上腺素受体激动剂选自克伦特罗、沙丁胺醇和莱克多巴胺。

[0010] 本发明所述的多簇抗原是在载体蛋白上,依次偶联两种以上的 β -肾上腺素受体激动剂半抗原得到,半抗原选自克伦特罗、沙丁胺醇和莱克多巴胺,其中克伦特罗半抗原采用重氮法偶联,沙丁胺醇和莱克多巴胺采用混合酸酐法偶联。

[0011] 本发明所述多簇抗原包括八种 β -激动剂多簇抗原,具体为克伦特罗-莱克多巴胺-牛血清白蛋白 (CL-RAC-BSA)、克伦特罗-沙丁胺醇-牛血清白蛋白 (CL-SAL-BSA)、沙丁胺醇-莱克多巴胺-牛血清白蛋白 (SAL-RAC-BSA)、克伦特罗-沙丁胺醇-莱克多巴胺-牛血清白蛋白 (CL-SAL-RAC-BSA)、克伦特罗-莱克多巴胺-卵清蛋白 (CL-RAC-OVA)、克伦特罗-沙丁胺醇-卵清蛋白 (CL-SAL-OVA)、沙丁胺醇-莱克多巴胺-卵清蛋白 (SAL-RAC-OVA) 及克伦特罗-沙丁胺醇-莱克多巴胺-卵清蛋白 (CL-SAL-RAC-OVA)。

[0012] 其中,克伦特罗-沙丁胺醇-牛血清白蛋白 (CL-SAL-BSA) 或克伦特罗-沙丁胺醇-卵清蛋白 (CL-SAL-OVA) 是以克伦特罗和沙丁胺醇为半抗原,以牛血清白蛋白或卵清蛋白为载体,按以下步骤制备得到:

[0013] 1) 在牛血清白蛋白或卵清蛋白上以重氮法偶联克伦特罗半抗原,再进行纯化:

[0014] 将 0.2mmol 盐酸克伦特罗溶于 1~5ml 稀盐酸中,缓慢加入 0.2~2mol/L 的亚硝酸钠溶液至淀粉碘化钾试纸变为紫色,继续反应 1~3h 后将反应液缓慢加入到 5~10ml 含有 5~10mg/ml 载体蛋白的碳酸钠缓冲溶液中,再继续反应 3~5h。将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3~6 次,冷冻干燥即可得到克伦特罗-载体蛋白偶联物冻干粉。

[0015] 2) 在步骤 1) 的产物上以混合酸酐法偶联沙丁胺醇半抗原,再进行纯化:

[0016] 将 0.2mmol 硫酸沙丁胺醇溶于 5~10ml 无水乙醇中,加入 0.2mmol 戊二酸酐,室温下反应 3~5h,离心。将下层固体溶于 5~10ml N,N-二甲基甲酰胺,加入 0.2mmol 三正丁胺和 0.2mmol 氯甲酸异丁酯,继续反应 1~3h。将上述反应液缓慢加入到 5~10ml 含有 5~10mg/ml 克伦特罗-载体蛋白偶联物的磷酸缓冲溶液中,室温反应过夜。将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3~6 次,冷冻干燥即可得到克伦特罗-沙丁胺醇-载体蛋白偶联物冻干粉。

[0017] 克伦特罗-莱克多巴胺-牛血清白蛋白 (CL-RAC-BSA) 或克伦特罗-莱克多巴胺-卵清蛋白 (CL-RAC-OVA) 是以克伦特罗和莱克多巴胺为半抗原,以牛血清白蛋白或卵清蛋白为载体,按以下步骤制备得到:

[0018] 1) 在牛血清白蛋白或卵清蛋白上以混合酸酐法偶联莱克多巴胺半抗原,再进行纯化:

[0019] 将 0.2mmol 戊二酸酐溶于 5ml 吡啶中,加入 0.2mmol 盐酸莱克多巴胺,室温反应 10~20h,蒸干溶剂,将所得油状物溶于 5~10ml N,N-二甲基甲酰胺,加入 0.2mmol 三正丁胺和 0.2mmol 氯甲酸异丁酯,继续反应 1~3h。将上述反应液缓慢加入到 5~10ml 含有 5~10mg/ml 载体蛋白的磷酸缓冲溶液中,室温反应过夜。将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3~6 次,冷冻干燥即可得到莱克多巴胺-载体蛋白偶联物冻干粉。

[0020] 2) 在步骤 1) 的产物上以重氮法偶联克伦特罗半抗原,再进行纯化:

[0021] 将 0.2mmol 盐酸克伦特罗溶于 1~5ml 稀盐酸中,缓慢加入 0.2~2mol/L 的亚硝酸钠溶液至淀粉碘化钾试纸变为紫色,继续反应 1~3h 后将反应液缓慢加入到 5~10ml 含有 5~10mg/ml 莱克多巴胺-载体蛋白偶联物的碳酸钠缓冲溶液中,再继续反应 3~5h。

将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3 ~ 6 次,冷冻干燥即可得克伦特罗 - 莱克多巴胺 - 载体蛋白偶联物冻干粉。

[0022] 沙丁胺醇 - 莱克多巴胺 - 牛血清白蛋白 (SAL-RAC-BSA) 或沙丁胺醇 - 莱克多巴胺 - 卵清蛋白 (SAL-RAC-OVA) 是以沙丁胺醇和莱克多巴胺为半抗原,以牛血清白蛋白或卵清蛋白为载体,按以下步骤制备得到:

[0023] 1) 在牛血清白蛋白或卵清蛋白上以混合酸酐法偶联沙丁胺醇半抗原,再进行纯化:

[0024] 将 0.2mmol 硫酸沙丁胺醇溶于 5 ~ 10ml 无水乙醇中,加入 0.2 mmol 戊二酸酐,室温下反应 3 ~ 5h,离心。将下层固体溶于 5 ~ 10ml N, N- 二甲基甲酰胺,加入 0.2mmol 三正丁胺和 0.2mmol 氯甲酸异丁酯,继续反应 1 ~ 3h。将上述反应液缓慢加入到 5 ~ 10ml 含有 5 ~ 10mg/ml 载体蛋白的磷酸缓冲溶液中,室温反应过夜。将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3 ~ 6 次,冷冻干燥即可得到沙丁胺醇 - 载体蛋白偶联物冻干粉。

[0025] 2) 在步骤 1) 的产物上继续以混合酸酐法偶联莱克多巴胺半抗原,再进行纯化:

[0026] 将 0.2mmol 戊二酸酐溶于 5ml 吡啶中,加入 0.2 mmol 盐酸莱克多巴胺,室温反应 10 ~ 20h,蒸干溶剂,将所得油状物溶于 5 ~ 10ml N, N- 二甲基甲酰胺,加入 0.2mmol 三正丁胺和 0.2mmol 氯甲酸异丁酯,继续反应 1 ~ 3h。将上述反应液缓慢加入到 5 ~ 10ml 含有 5 ~ 10mg/ml 沙丁胺醇 - 载体蛋白偶联物的磷酸缓冲溶液中,室温反应过夜。将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3 ~ 6 次,冷冻干燥即可得到沙丁胺醇 - 莱克多巴胺 - 载体蛋白偶联物冻干粉。

[0027] 克伦特罗 - 沙丁胺醇 - 莱克多巴胺 - 牛血清白蛋白 (CL-SAL-RAC-BSA) 或克伦特罗 - 沙丁胺醇 - 莱克多巴胺 - 卵清蛋白 (CL-SAL-RAC-OVA) 是以克伦特罗、沙丁胺醇和莱克多巴胺为半抗原,以牛血清白蛋白或卵清蛋白为载体,可按以下步骤中任意一种制备得到:

[0028] 1) 在克伦特罗 - 莱克多巴胺 - 载体蛋白偶联物上以混合酸酐法偶联沙丁胺醇,再进行纯化:

[0029] 将 0.2mmol 硫酸沙丁胺醇溶于 5 ~ 10ml 无水乙醇中,加入 0.2mmol 戊二酸酐,室温下反应 3 ~ 5h,离心。将下层固体溶于 5 ~ 10ml N, N- 二甲基甲酰胺,加入 0.2mmol 三正丁胺和 0.2mmol 氯甲酸异丁酯,继续反应 1 ~ 3h。将上述反应液缓慢加入到 5 ~ 10ml 含有 5 ~ 10mg/ml 克伦特罗 - 莱克多巴胺 - 载体蛋白偶联物的磷酸缓冲溶液中,室温反应过夜。将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3 ~ 6 次,冷冻干燥即可得到克伦特罗 - 沙丁胺醇 - 莱克多巴胺 - 载体蛋白偶联物冻干粉。

[0030] 2) 在克伦特罗 - 沙丁胺醇 - 载体蛋白偶联物上以混合酸酐法偶联莱克多巴胺,再进行纯化:

[0031] 将 0.2mmol 戊二酸酐溶于 5ml 吡啶中,加入 0.2mmol 盐酸莱克多巴胺,室温反应 10 ~ 20h,蒸干溶剂,将所得油状物溶于 5 ~ 10ml N, N- 二甲基甲酰胺,加入 0.2mmol 三正丁胺和 0.2 mmol 氯甲酸异丁酯,继续反应 1 ~ 3h。将上述反应液缓慢加入到 5 ~ 10ml 含有 5 ~ 10mg/ml 克伦特罗 - 沙丁胺醇 - 载体蛋白偶联物的磷酸缓冲溶液中,室温反应过夜。将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3 ~ 6 次,冷冻干燥即可得到克伦特罗 - 沙丁胺醇 - 莱克多巴胺 - 载体蛋白偶联物冻干粉。

[0032] 3) 在沙丁胺醇-莱克多巴胺-载体蛋白偶联物上以重氮法偶联克伦特罗,再进行纯化:

[0033] 将 0.2mmol 盐酸克伦特罗溶于 1~5ml 稀盐酸中,缓慢加入 0.2~2mol/L 的亚硝酸钠溶液至淀粉碘化钾试纸变为紫色,继续反应 1~3h,将反应液缓慢加入到 5~10ml 含有 5~10mg/ml 沙丁胺醇-莱克多巴胺-载体蛋白偶联物的磷酸缓冲溶液中,室温反应过夜。将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3~6 次,冷冻干燥即可得到克伦特罗-沙丁胺醇-莱克多巴胺-载体蛋白偶联物冻干粉。

[0034] 本发明还提供了所述的多簇抗原制得的 β -肾上腺素受体激动剂宽谱特异性抗体;特别是四种 β -激动剂宽谱特异性抗体,所述宽谱特异性抗体分别为由 β -肾上腺素受体激动剂多簇抗原 CL-RAC-BSA、CL-SAL-BSA、SAL-RAC-BSA 或 CL-SAL-RAC-BSA 通过动物免疫获得的。

[0035] 本发明的有益效果:本发明成功地合成了八种 β -激动剂多簇抗原,并基于动物免疫方法制备得到 β -激动剂宽谱特异性抗体。所述的 β -激动剂多簇抗原可用于构造免疫电化学传感器,基于 β -激动剂宽谱特异性抗体对 β -激动剂的交叉免疫反应,能实现对包括克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺、特步他林、马布特罗及妥布特罗在内的多种 β -激动剂的检测。由于采用的 β -激动剂宽谱特异性抗体对多种 β -激动剂都具有较高交叉反应率,因而能实现对 β -激动剂的共同检测,且多残留免疫分析具有快速、高效、灵敏度高的优点。

[0036] 下面结合具体实施例对本发明进行详细描述。本发明的保护范围并不以具体实施方式为限,而是由权利要求加以限定。

附图说明

[0037] 图 1 为 CL、BSA 以及 CL-BSA 偶联物的紫外可见光谱图。

[0038] 图 2 为 SAL、CL-BSA 偶联物以及 CL-SAL-BSA 偶联物的紫外可见光谱图。

[0039] 图 3 为 SAL、BSA 以及 SAL-BSA 偶联物的紫外可见光谱图。

[0040] 图 4 为 RAC、SAL-BSA 偶联物以及 SAL-RAC-BSA 偶联物的紫外可见光谱图。

[0041] 图 5 为 RAC、OVA 以及 RAC-OVA 偶联物的紫外可见吸收光谱图。

[0042] 图 6 为 CL、RAC-OVA 偶联物以及 CL-RAC-OVA 偶联物的紫外可见吸收光谱图。

[0043] 图 7 为 SAL、CL-RAC-OVA 偶联物以及 CL-SAL-RAC-OVA 偶联物的紫外可见吸收光谱图。

具体实施方式

[0044] 实施例 1CL-SAL-BSA 偶联物的制备

[0045] 1) 在 BSA 上以重氮法偶联 CL 半抗原,再进行纯化:

[0046] 将 0.2mmol 盐酸克伦特罗溶于 1~5ml 稀盐酸中,缓慢加入 0.2~2mol/L 的亚硝酸钠溶液至淀粉碘化钾试纸变为紫色,继续反应 1~3h 后将反应液缓慢加入到 5~10ml 含有 5~10mg/ml BSA 的碳酸钠缓冲溶液中,再继续反应 3~5h。将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3~6 次,冷冻干燥即可得到 CL-BSA 偶联物冻干粉。根据 CL、BSA 以及 CL-BSA 偶联物的紫外可见吸收光谱图(见附图 1)计算可得偶联比,BSA : CL = 1 : 28。

[0047] 2) 在步骤 1) 的产物上以混合酸酐法偶联 SAL 半抗原, 再进行纯化:

[0048] 将 0.2mmol 硫酸沙丁胺醇溶于 5 ~ 10ml 无水乙醇中, 加入 0.2mmol 戊二酸酐, 室温下反应 3 ~ 5h, 离心。将下层固体溶于 5 ~ 10ml N,N-二甲基甲酰胺, 加入 0.2mmol 三正丁胺和 0.2mmol 氯甲酸异丁酯, 继续反应 1 ~ 3h。将上述反应液缓慢加入到 5 ~ 10ml 含有 5 ~ 10mg/ml CL-BSA 偶联物的磷酸缓冲溶液中, 室温反应过夜。将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3 ~ 6 次, 冷冻干燥即可得到 CL-SAL-BSA 偶联物冻干粉。根据 SAL、CL-BSA 偶联物以及 CL-SAL-BSA 偶联物的紫外可见吸收光谱图 (见附图 2) 计算可得偶联比, BSA : CL : SAL = 1 : 28 : 17。

[0049] 实施例 2SAL-RAC-BSA 偶联物的制备

[0050] 1) 在 BSA 上以混合酸酐法偶联 SAL 半抗原, 再进行纯化:

[0051] 将 0.2 mmol 硫酸沙丁胺醇溶于 5 ~ 10ml 无水乙醇中, 加入 0.2mmol 戊二酸酐, 室温下反应 3 ~ 5h, 离心。将下层固体溶于 5 ~ 10ml N,N-二甲基甲酰胺, 加入 0.2mmol 三正丁胺和 0.2mmol 氯甲酸异丁酯, 继续反应 1 ~ 3h。将上述反应液缓慢加入到 5 ~ 10ml 含有 5 ~ 10mg/ml BSA 的磷酸缓冲溶液中, 室温反应过夜。将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3 ~ 6 次, 冷冻干燥即可得到 SAL-BSA 偶联物冻干粉。根据 SAL、BSA 以及 SAL-BSA 偶联物的紫外可见吸收光谱图 (见附图 3) 计算可得偶联比, BSA : SAL = 1 : 8.5。

[0052] 2) 在步骤 1) 的产物上继续以混合酸酐法偶联 RAC 半抗原, 再进行纯化:

[0053] 将 0.2mmol 戊二酸酐溶于 5ml 吡啶中, 加入 0.2mmol 盐酸莱克多巴胺, 室温反应 10 ~ 20h, 蒸干溶剂, 将所得油状物溶于 5 ~ 10ml N,N-二甲基甲酰胺, 加入 0.2mmol 三正丁胺和 0.2mmol 氯甲酸异丁酯, 继续反应 1 ~ 3h。将上述反应液缓慢加入到 5 ~ 10ml 含有 5 ~ 10mg/ml SAL-BSA 偶联物的磷酸缓冲溶液中, 室温反应过夜。将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3 ~ 6 次, 冷冻干燥即可得到 SAL-RAC-BSA 偶联物冻干粉。根据 RAC、SAL-BSA 偶联物以及 SAL-RAC-BSA 偶联物的紫外可见吸收光谱图 (见附图 4) 计算可得偶联比, BSA : SAL : RAC = 1 : 8.5 : 30。

[0054] 实施例 3CL-RAC-OVA 偶联物的制备

[0055] 1) 在 OVA 上以混合酸酐法偶联 RAC 半抗原, 再进行纯化:

[0056] 将 0.2mmol 戊二酸酐溶于 5ml 吡啶中, 加入 0.2mmol 盐酸莱克多巴胺, 室温反应 10 ~ 20h, 蒸干溶剂, 将所得油状物溶于 5 ~ 10ml N,N-二甲基甲酰胺, 加入 0.2mmol 三正丁胺和 0.2mmol 氯甲酸异丁酯, 继续反应 1 ~ 3h。将上述反应液缓慢加入到 5 ~ 10ml 含有 5 ~ 10mg/ml OVA 的磷酸缓冲溶液中, 室温反应过夜。将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3 ~ 6 次, 冷冻干燥即可得到 RAC-OVA 偶联物冻干粉。根据 RAC、OVA 以及 RAC-OVA 偶联物的紫外可见吸收光谱图 (见附图 5) 计算可得偶联比, OVA : RAC = 1 : 20。

[0057] 2) 在步骤 1) 的产物上以重氮法偶联 CL 半抗原, 再进行纯化:

[0058] 将 0.2mmol 盐酸克伦特罗于溶于 1 ~ 5ml 稀盐酸中, 缓慢加入 0.2 ~ 2mol/L 的亚硝酸钠溶液至淀粉碘化钾试纸变为紫色, 继续反应 1 ~ 3h 后将反应液缓慢加入到 5 ~ 10ml 含有 5 ~ 10mg/ml RAC-OVA 偶联物的碳酸钠缓冲溶液中, 再继续反应 3 ~ 5h。将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3 ~ 6 次, 冷冻干燥即可得 CL-RAC-OVA 偶联物冻干粉。根据 CL、RAC-OVA 偶联物以及 CL-RAC-OVA 偶联物的紫外可见吸收光谱图 (见附图 6) 计算可得偶联比, OVA : RAC : CL = 1 : 20 : 16。

[0059] 实施例 4CL-SAL-RAC-OVA 偶联物的制备

[0060] 将 0.2mmol 硫酸沙丁胺醇溶于 5 ~ 10ml 无水乙醇中,加入 0.2mmol 戊二酸酐,室温下反应 3 ~ 5h,离心。将下层固体溶于 5 ~ 10ml N,N-二甲基甲酰胺,加入 0.2mmol 三正丁胺和 0.2mmol 氯甲酸异丁酯,继续反应 1 ~ 3h。将反应液缓慢加入到 5 ~ 10ml 含有 5 ~ 10mg/ml CL-RAC-OVA 偶联物的磷酸缓冲溶液中,室温反应过夜。将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析 3 ~ 6 次,冷冻干燥即可得到 CL-SAL-RAC-OVA 偶联物冻干粉。根据 SAL、CL-RAC-OVA 偶联物以及 CL-SAL-RAC-OVA 偶联物的紫外可见吸收光谱图(见附图 7)计算可得偶联比, OVA :RAC : CL : SAL = 1 : 20 : 16 : 21。

[0061] 按照与实施例 1-4 相似的方法可分别制备 CL-RAC-BSA、CL-SAL-OVA、SAL-RAC-OVA 和 CL-SAL-RAC-BSA 偶联物。

[0062] 实施例 5 抗 CL-RAC-BSA、抗 CL-SAL-BSA、抗 SAL-RAC-BSA 以及抗 CL-SAL-RAC-BSA 抗体的制备

[0063] 用合成的偶联物(CL-RAC-BSA、CL-SAL-BSA、SAL-RAC-BSA 或 CL-SAL-RAC-BSA 中的一种)作为免疫原免疫体重约 2kg 的健康大白兔。首次免疫时将 0.25mg 免疫原与等量弗氏完全佐剂混合并充分乳化,背部皮下多点注射。两周后用同样剂量免疫原与等量弗氏不完全佐剂进行乳化并进行加强免疫,每两周加强免疫一次,共加强三次。最后一次免疫 10 天后对大白兔进行颈静脉采血,放在 4℃ 环境下静置 30min,再用硫酸铵多级沉淀法进行纯化,即可得到抗 CL-RAC-BSA、抗 CL-SAL-BSA、抗 SAL-RAC-BSA 以及抗 CL-SAL-RAC-BSA 多克隆抗体。

[0064] 实施例 6 抗体效价测定

[0065] 将纯化后的血清稀释不同的倍数,用间接 ELISA 法分别对抗 CL-RAC-BSA、抗 CL-SAL-BSA、抗 SAL-RAC-BSA 以及抗 CL-SAL-RAC-BSA 抗体进行效价测定,结果如下:

[0066] CL-SAL-BSA 抗血清的效价为 1 : 1600, CL-SAL-RAC-BSA 的抗血清效价为 1 : 6400, CL-RAC-BSA 抗血清的效价为 1 : 12800, SAL-RAC-BSA 的抗血清效价为 1 : 3200。

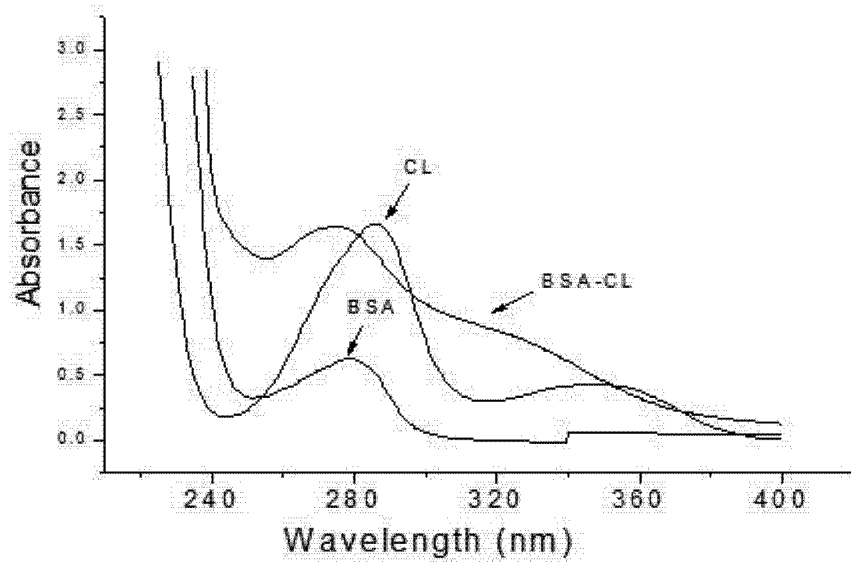


图 1

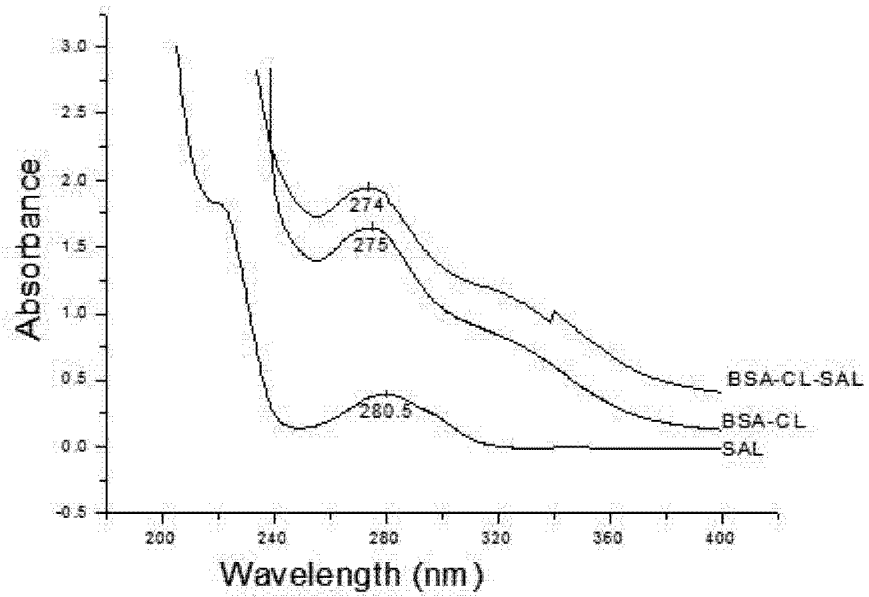


图 2

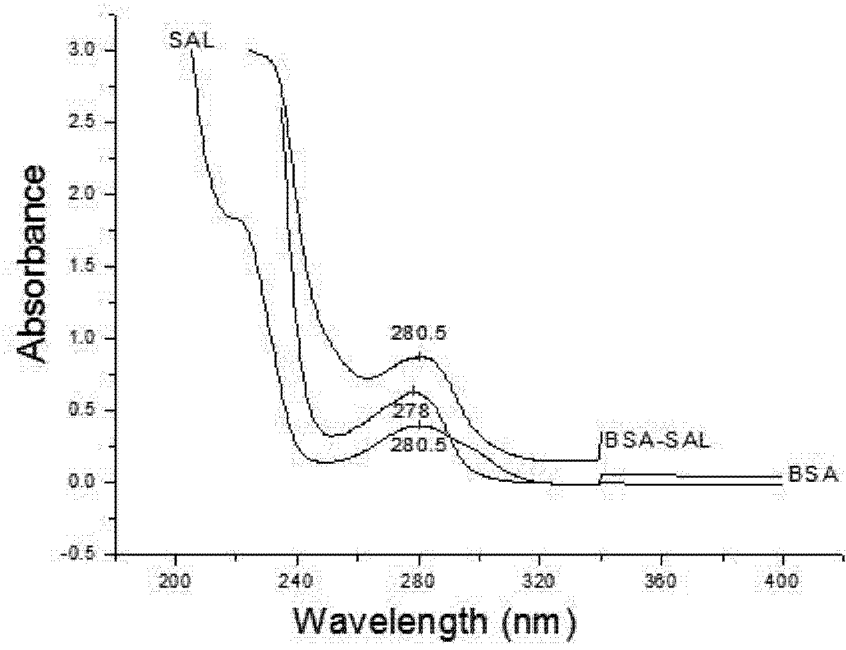


图 3

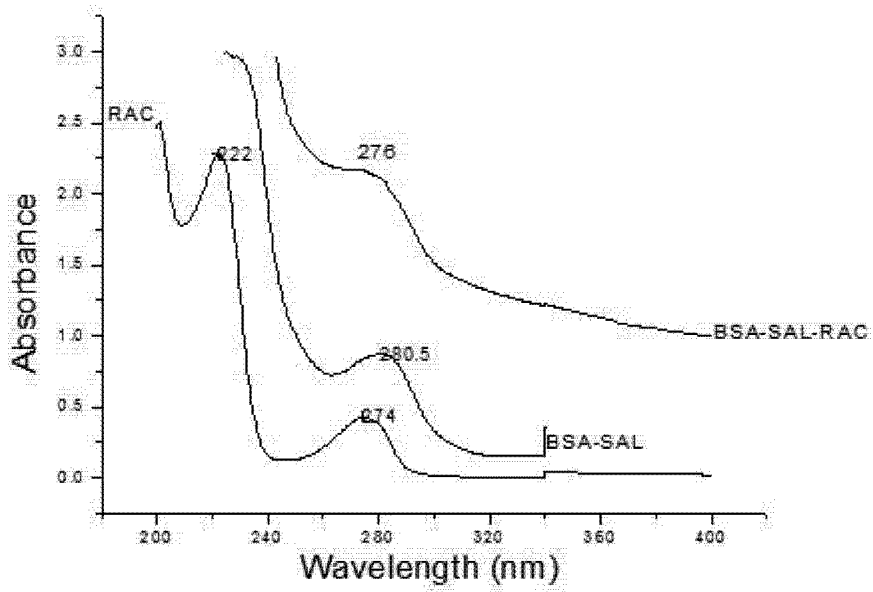


图 4

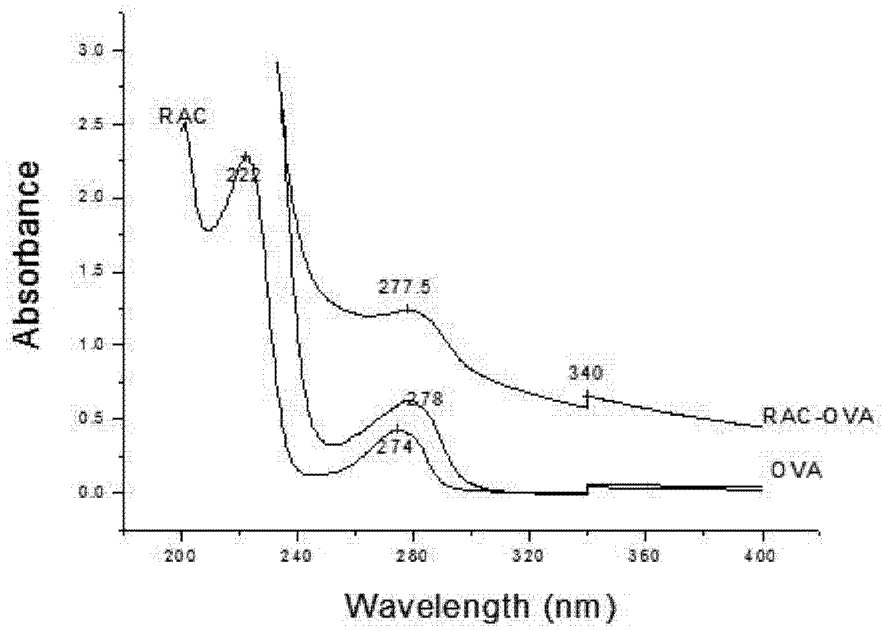


图 5

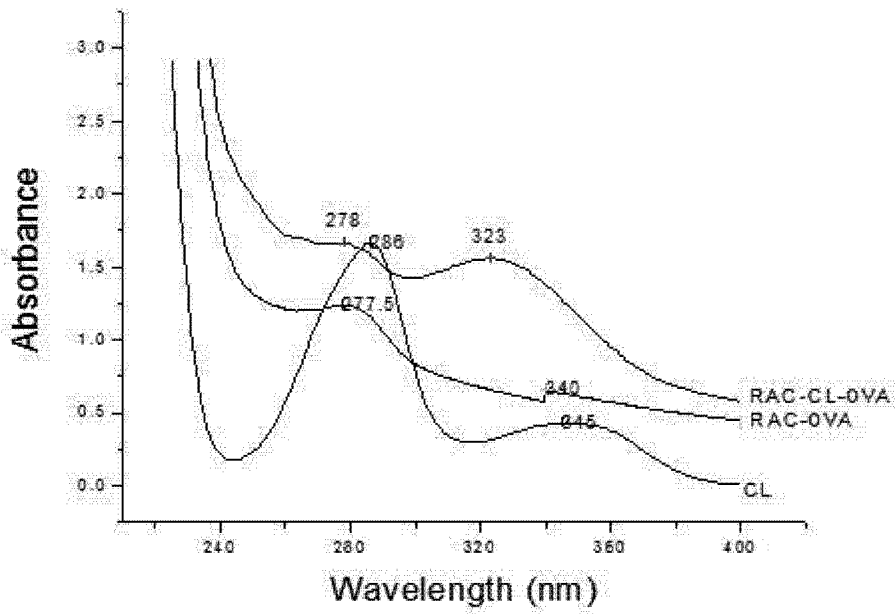


图 6

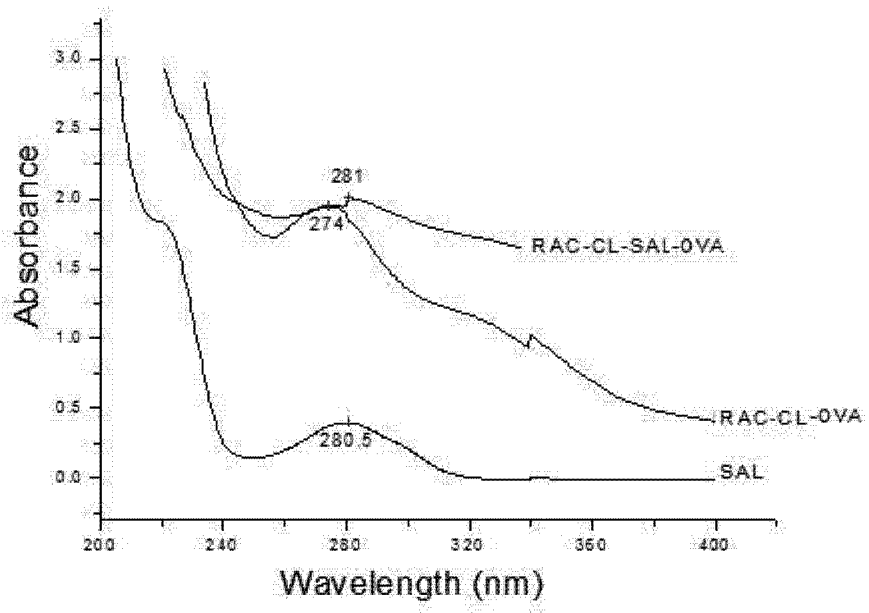


图 7

专利名称(译)	β-肾上腺素受体激动剂多簇抗原及宽谱特异性抗体及其制备		
公开(公告)号	CN104280541A	公开(公告)日	2015-01-14
申请号	CN201410563668.7	申请日	2014-10-21
[标]申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
[标]发明人	邵科峰 赵波 张红琳 任鹏飞 常其沛		
发明人	邵科峰 赵波 张红琳 任鹏飞 常其沛		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/566		
代理人(译)	韩朝晖		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了用于β-肾上腺素受体激动剂多残留检测的多簇抗原、抗体及其制备方法。本发明包括八种β-激动剂多簇抗原，分别为克伦特罗-莱克多巴胺-牛血清白蛋白、克伦特罗-沙丁胺醇-牛血清白蛋白、沙丁胺醇-莱克多巴胺-牛血清白蛋白、克伦特罗-沙丁胺醇-莱克多巴胺-牛血清白蛋白、克伦特罗-莱克多巴胺-卵清蛋白、克伦特罗-沙丁胺醇-卵清蛋白、沙丁胺醇-莱克多巴胺-卵清蛋白及克伦特罗-沙丁胺醇-莱克多巴胺-卵清蛋白，并采用所述的多簇抗原通过动物免疫制备了四种可用于β-肾上腺素受体激动剂多残留检测的宽谱特异性抗体。

