



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106589024 A

(43)申请公布日 2017.04.26

(21)申请号 201611125939.6

C07K 14/765(2006.01)

(22)申请日 2016.12.09

C07K 14/795(2006.01)

(71)申请人 深圳市绿诗源生物技术有限公司

C07K 16/44(2006.01)

地址 518000 广东省深圳市大鹏新区大鹏  
办事处布新社区布新村工业大道2号D  
栋101.201.301

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

(72)发明人 宁波 李隆军 刘明如 赖启隆  
朱永利 蒋永青 吴育春

(74)专利代理机构 广州市越秀区海心联合专利  
代理事务所(普通合伙)  
44295

代理人 王海曼

(51)Int.Cl.

C07H 17/08(2006.01)

C07H 1/00(2006.01)

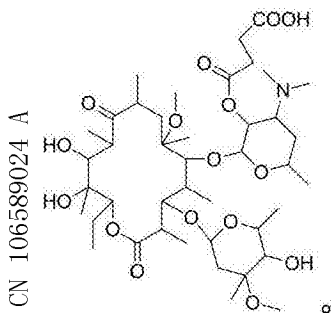
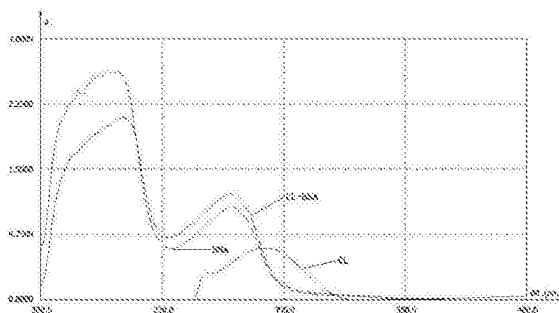
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

克拉霉素半抗原、人工抗原和抗体及其制备  
方法应用

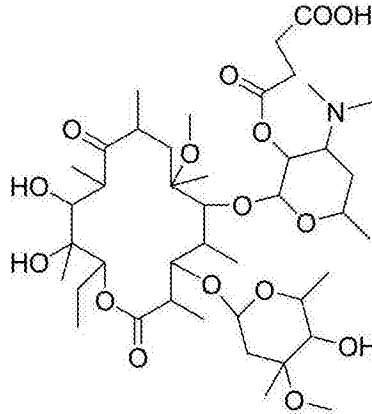
(57)摘要

本发明公开了一种克拉霉素半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法应用,旨在提供既能最大程度保留了克拉霉素的特征结构,又具有可以与载体蛋白发生偶联的活性基团的克拉霉素半抗原,并且以克拉霉素半抗原制备人工抗原和抗体,用来检测检测大环内酯类化合物中,其技术方案,所述克拉霉素半抗原,所述结构如下式所示:所述克拉霉素人工抗原为所述克拉霉素半抗原与载体蛋白偶联制得的;属于生物技术领域;



CN 106589024 A

1. 一种克拉霉素半抗原,其特征在于,所述结构如式I所示:



式 I

2. 制备权利要求1所述克拉霉素半抗原的方法,其特征在于,依次包括下述步骤包括如下步骤:

1) 称取克拉霉素置于反应瓶,加入有机溶剂使其溶解,再称取丁二酸酐置于反应瓶,再向反应瓶加入三乙胺,在下室温,磁力搅拌反应3~5小时;

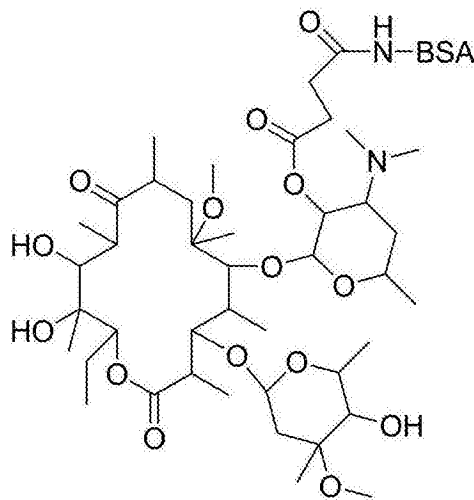
2) 将反应的产物后减压旋蒸,浓缩,加入去离子水,调节pH为4.5-5.5,析出灰白色固体,过滤,取滤饼,用混合溶剂(2) 15mI结晶,过滤,干燥,得到产物;

其中:所述的克拉霉素和丁二酸酐摩尔比1:1.0~1.5。

3. 根据权利要求1所述的克拉霉素半抗原的制备方法,其特征在于,所述的催化剂为三乙胺;

4. 根据权利要求1所述的克拉霉素半抗原的制备方法,其特征在于,所述的混合溶剂为体积比1:2的乙酸乙酯和正己烷。

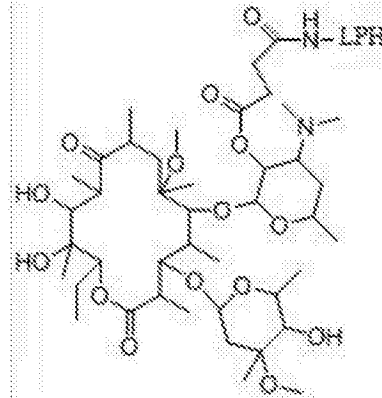
5. 一种由权利要求1所述的克拉霉素半抗原制备的克拉霉素包被原,其特征在于,所述的克拉霉素包被原由所述克拉霉素半抗原与牛血清白蛋白偶联制得的,结构式如式II所示:



式 II。

6. 一种由权利要求1所述的克拉霉素半抗原制备的克拉霉素免疫原,其特征在于,所述

的克拉霉素免疫原由所述克拉霉素半抗原与鲑血蓝蛋白偶联制得的,结构式如式III所示:



式 III。

7. 一种克拉霉素单克隆抗体,其特征在于,依次通过下述步骤制得:

1) 动物免疫

将权利要求5所述的克拉霉素免疫原免疫BaIb/c小鼠;

2) 细胞融合与筛选

取冲击免疫后第三天的小鼠脾脏与SP2/O骨髓瘤细胞融合,融合后第七天采用间接竞争ELISA测定细胞上清,筛选阳性且有抑制孔进行亚克隆,经过3次以上克隆化培养,直至克隆阳性率为100%,得到一株可分泌克拉霉素单克隆抗体的杂交瘤细胞,命名为抗克拉霉素单克隆抗体杂交瘤细胞CLF3;

3) 腹水单抗的制备与纯化

用步骤2) 制备的抗克拉霉素单克隆抗体杂交瘤细胞CLF3注射BaIb/c小鼠,待小鼠腹部明显膨大,采取腹水,采用Protein A蛋白亲和层析柱对腹水进行纯化,纯化后的腹水保存于-20℃;测定单克隆抗体浓度的蛋白浓度为3.6mg/mL,并且对单克隆抗体鉴定。

8. 权利要求7所述的克拉霉素单克隆抗体在检测克拉霉素中的应用

9. 利要求7所述的克拉霉素单克隆抗体在检测在检测大环内酯类化合物中的应用。

## 克拉霉素半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及克拉霉素半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法应用。

### 背景技术

[0002] 克拉霉素属于大环内酯类抗生素,对大多数革兰阳性菌、部分革兰阴性菌及一些非典型致病菌(支原体、衣原体等)均有效。是红霉素的第二代衍生物之一。红霉素的第二代衍生物主要成员有罗红霉素、阿奇霉素、克拉霉素、地红霉素等。由于其第二代衍生物避免了被胃酸破坏,提高了吸收率,抗菌活性更强,因而广泛用于治疗呼吸道感染的一线药物。

[0003] 但近来有报道,红霉素第二代衍生物长期、持续的给药,对肝脏有毒害;对前庭系统有影响,能引起耳鸣、听觉障碍等;还能引起药热、药疹、荨麻疹等过敏反应以及部分药物可引起腹痛、腹泻、恶心等胃肠道反应;其中,克拉霉素、阿奇霉素等可能发生幻觉、失眠、意识模糊等中枢神经系统副作用,以及易透过胎盘屏障。因此,国际上有关大环内酯类抗生素的最高残留限量有着非常严格的规定,我国也出台了相应的法规来规范大环内酯类抗生素的使用。我国出台的蜂蜜产品中大环内酯类药物残留定量限为 $1.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下。为了打击非法用药,保护消费者的健康与安全,迫切需要健全相关的检测方法。

[0004] 目前,兽药残留检测常用的方法有气相色谱、高效液相色谱以及气质联用等理化分析方法。虽然这些方法特异性强、灵敏度高,但是样品前处理操作步骤繁琐,成本较高,也不适用于大批量样品的筛选检测。免疫化学分析鉴于在抗原抗体的定性定量方面独特的优势和操作简便快捷、成本低、灵敏度较高、分析样本量大的优点弥补了理化分析的不足。因此,建立免疫化学分析法检测克拉霉素的残留具有重要的经济意义和社会意义。

### 发明内容

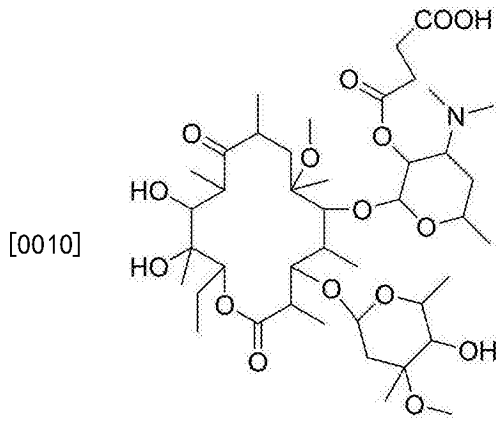
[0005] 针对上述问题,本发明的第一个目的是提供一种既能最大程度保留了克拉霉素的特征结构,又具有可以与载体蛋白发生偶联的活性基团的克拉霉素半抗原及其制备方法。

[0006] 本发明的第二个目的是提供含克拉霉素半抗原的人工抗原。

[0007] 本发明的第三个目的是提供上述人工抗原及其单克隆抗体的应用。

[0008] 为此,本发明的第一个技术方案是这样的:

[0009] 一种克拉霉素半抗原,所述结构如式I所示:



式 I

[0011] 本发明提供的第二个技术方案是这样的：

[0012] 上述克拉霉素半抗原的制备方法，依次包括下述步骤包括如下步骤：

[0013] 1) 称取克拉霉素置于反应瓶，加入有机溶剂使其溶解，再称取丁二酸酐置于反应瓶，再向反应瓶加入三乙胺，在下室温，磁力搅拌反应3~5小时；

[0014] 2) 将反应的产物后减压旋蒸，浓缩，加入去离子水，调节pH为4.5-5.5，析出灰白色固体，过滤，取滤饼，用混合溶剂(2) 15ml结晶，过滤，干燥，得到产物；

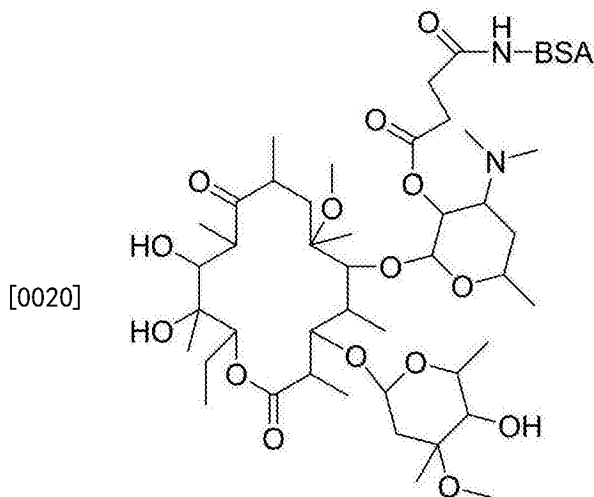
[0015] 其中：所述的克拉霉素和丁二酸酐摩尔比1:1.0~1.5。

[0016] 进一步的，上述的克拉霉素半抗原的制备方法，所述的催化剂为三乙胺。

[0017] 进一步的，上述的克拉霉素半抗原的制备方法，所述的混合溶剂为体积比1:2的乙酸乙酯和正己烷。

[0018] 本发明提供的第三个技术方案是这样的：

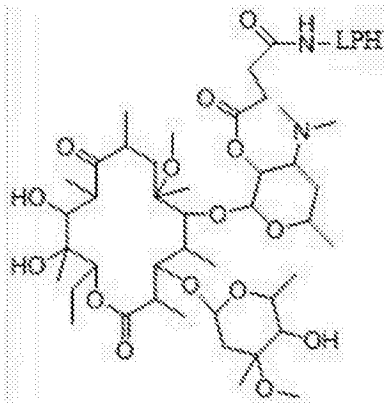
[0019] 一种由上述的克拉霉素半抗原的制备的克拉霉素包被原，所述的克拉霉素包被原由所述克拉霉素半抗原与牛血清白蛋白偶联制得的，结构式如式(II)所示：



式(II)。

[0021] 一种由上述的克拉霉素半抗原的克拉霉素免疫原，所述的克拉霉素免疫原由所述克拉霉素半抗原与鲑血蓝蛋白偶联制得的，结构式如式III所示：

[0022]



式 III。

[0023] 本发明提供的第四个技术方案是这样的：

[0024] 一种克拉霉素单克隆抗体，依次通过下述步骤制得：

[0025] 1) 动物免疫

[0026] 将权利要求5所述的克拉霉素免疫原免疫BaIb/c小鼠；

[0027] 2) 细胞融合与筛选

[0028] 取冲击免疫后第三天的小鼠脾脏与SP2/O骨髓瘤细胞融合，融合后第七天采用间接竞争ELISA测定细胞上清，筛选阳性且有抑制孔进行亚克隆，经过3次以上克隆化培养，直至克隆阳性率为100%，得到一株可分泌克拉霉素单克隆抗体的杂交瘤细胞，命名为抗克拉霉素单克隆抗体杂交瘤细胞CLF3；

[0029] 4) 腹水单抗的制备与纯化

[0030] 用步骤2) 制备的抗克拉霉素单克隆抗体杂交瘤细胞CLF3注射BaIb/c小鼠，待小鼠腹部明显膨大，采取腹水，采用Protein A蛋白亲和层析柱对腹水进行纯化，纯化后的腹水保存于-20℃；测定单克隆抗体浓度的蛋白浓度为3.6mg/mL，并且对单克隆抗体鉴定。

[0031] 本发明提供的最后一个技术方案是上述克拉霉素单克隆抗体在检测克拉霉素中的应用或者在检测大环内酯类化合物中的应用。

[0032] 与现有技术相比，本发明提供的技术方案具有如下优点：

[0033] 1、本发明提供的克拉霉素半抗原既能最大程度保留了克拉霉素的特征结构，又具有可以与载体蛋白发生偶联的活性基团；

[0034] 2、本发明提供的人工抗原和抗体定性定量准备，操作简便快捷、成本低、灵敏度较高、分析样本量大的优点。

[0035] 3、本发明提供的克拉霉素人工抗原作为包被原，可以检测克拉霉素药物残留，也可以检测红霉素药物残留，用途广泛。

### 附图说明

[0036] 图1是克拉霉素包被原紫外光谱扫描结果；

[0037] 图2是克拉霉素免疫原紫外光谱扫描结果；

[0038] 图3是单克隆抗体在不同浓度标准品溶液的吸光值。

### 具体实施方式

[0039] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0040] 下述实施例中所用的实验材料,如无特殊说明,均为常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量实验,均设置三次重复实验,结果取平均值。克拉霉素购自湖北威得利化学科技有限公司。实施例中所用的PBS缓冲液均为pH为7.4、0.01M的PBS缓冲液。鲎血蓝蛋白,简称LPH。牛血清白蛋白,简称BSA。

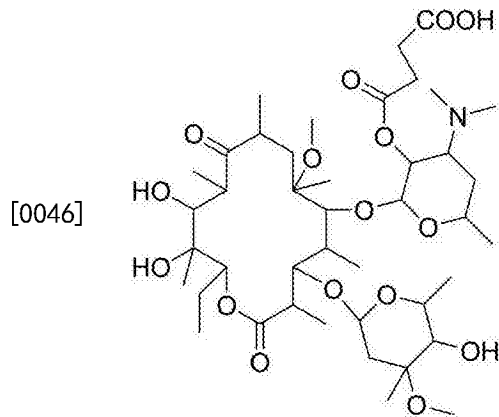
[0041] 实施例1

[0042] 本发明提供的克拉霉素半抗原一种制备方法是:将克拉霉素748.3mg (1mmol) 加入50mL反应瓶中,加入10mL无水乙腈使其溶解。称取丁二酸酐120.4mg (1.2mmol) 加入反应瓶,量取1mL三乙胺加入反应瓶。室温,磁力搅拌,反应4小时。后减压旋蒸,浓缩,加入50mL水,用冰醋酸调节pH为5左右,析出灰白色固体,过滤,取滤饼,用混合溶剂(V乙酸乙酯:V正己烷=1:2) 15mL结晶,过滤,干燥,得到237.6mg产物,结构式为式(I)。实施例2

[0043] 本发明提供的克拉霉素半抗原一种制备方法是:将克拉霉素748.3mg (1mmol) 加入50mL反应瓶中,加入10mL无水乙腈使其溶解。称取丁二酸酐100.2mg (1mmol) 加入反应瓶,量取1mL三乙胺加入反应瓶。室温,磁力搅拌,反应3小时。后减压旋蒸,浓缩,加入50mL水,用冰醋酸调节pH为5左右,析出灰白色固体,过滤,取滤饼,用混合溶剂(V乙酸乙酯:V正己烷=1:2) 15mL结晶,过滤,干燥,得到216.2mg产物,结构式为式(I)。

[0044] 实施例3

[0045] 本发明提供的克拉霉素半抗原一种制备方法是:将克拉霉素748.3mg (1mmol) 加入50mL反应瓶中,加入10mL无水乙腈使其溶解。称取丁二酸酐150.7mg (1.5mmol) 加入反应瓶,量取1mL三乙胺加入反应瓶。室温,磁力搅拌,反应5小时。后减压旋蒸,浓缩,加入50mL水,用冰醋酸调节pH为5左右,析出灰白色固体,过滤,取滤饼,用混合溶剂(V乙酸乙酯:V正己烷=1:2) 15mL结晶,过滤,干燥,得到241.5mg产物,结构式为式(I)。



[0047] 式 (I)

[0048] 实施例4、制备克拉霉素人工抗原

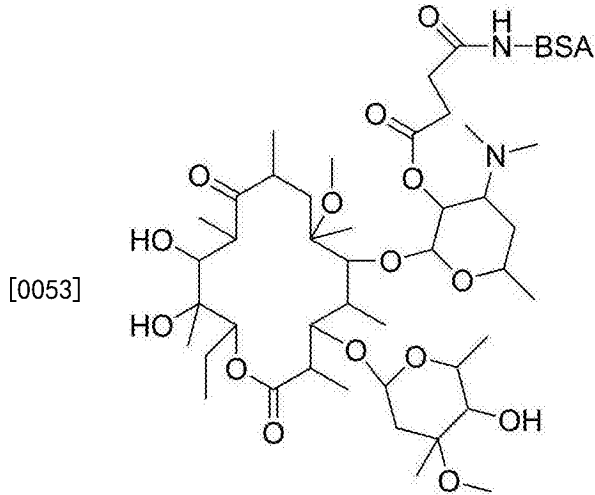
[0049] 一、克拉霉素包被原的合成

[0050] (1) 将27.7mg实施例1或2或3任意一种方法制备得到的式(I)所示化合物溶于2mL N,N-二甲基甲酰胺中,加入10mg N-羟基琥珀酰亚胺和10mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐,室温下磁力搅拌2h,得到溶液a。

[0051] (2) 将66mg牛血清白蛋白加入8mL去离子水中,室温下磁力搅拌,充分溶解,即为溶

液b。

[0052] (3) 将溶液a滴加至溶液b中,室温缓慢搅拌8h,后入透析袋,在PBS中,4℃透析72h(中间换水5次),然后于4℃条件下,4000rpm离心10min,取上清,即克拉霉素包被原溶液,分装于安培瓶中,-20℃保存,克拉霉素包被原简称CL-BSA(结构式如式(II)所示,克拉霉素包被原溶液简称CL-BSA溶液。



式(II)。

[0054] (4) 将CL-BSA溶液用PBS缓冲溶液稀释后,测定280nm和260nm的分光光度值,按公式计算稀释溶液中的蛋白浓度,将测得的蛋白浓度值乘以其稀释倍数后即为原CL-BSA溶液中的CL-BSA浓度。蛋白质浓度(mg/ml) = 1.45\*OD<sub>280</sub> - 0.74\*OD<sub>260</sub>。CL-BSA溶液中的CL-BSA浓度为8.6mg/ml。

[0055] 二、克拉霉素包被原的表征

[0056] 将CL-BSA溶液用PBS缓冲溶液稀释(使CL-BSA的浓度为5mg/ml),作为溶液甲;将含5mg/ml克拉霉素的PBS缓冲溶液作为乙;将含5mg/ml BSA的PBS缓冲溶液作为丙。分别将溶液甲、乙、丙,进行紫外(200-400nm)光谱扫描。紫外光谱扫描结果见图1。与溶液丙相比,溶液甲的紫外图谱发生了变化,说明化合物与BSA成功偶联。

[0057] 溶液乙的最大吸收波长值为224nm,溶液丙的最大吸收波长值为278nm。根据公式 $K = A/CL$ (A为最大吸收波长值下的吸光度,C为溶液浓度,L为液层的厚度)计算各个化合物的消光系数(K)。

[0058] 分别采用溶液乙和溶液丙的最大吸收波长值对溶液甲进行紫外光谱扫描,并根据已经计算出的该化合物的消光系数反向计算该化合物在溶液甲中的浓度,用浓度值除以分子量得到该化合物的摩尔浓度,计算偶联比,式(I)所示化合物和BSA的偶联比为8:1,即8个式(I)所示化合物结合1个BSA。

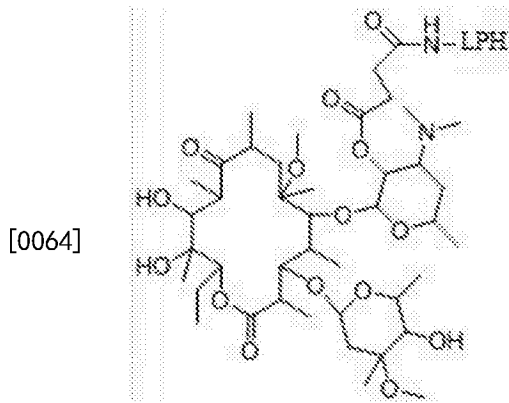
[0059] 三、克拉霉素免疫原的合成

[0060] (1) 将27.7mg实施例1制备得到的式(I)所示化合物溶于2ml N,N-二甲基甲酰胺中,加入10mg N-羟基琥珀酰亚胺和10mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐,室温下磁力搅拌2h,得到溶液c。

[0061] (2) 将93.7mg鲑血蓝蛋白加入8ml去离子水中,室温下磁力搅拌,充分溶解,即为溶液d。

[0062] (3) 将溶液c滴加至溶液d中, 室温缓慢搅拌8h, 后入透析袋, 在PBS中, 4℃透析72h (中间换水5次), 然后于4℃条件下, 4000rpm离心10min, 取上清, 即克拉霉素免疫原溶液, 分装于安培瓶中, -20℃保存, 克拉霉素免疫原简称CL-LPH, 结构式如式III所示, 克拉霉素免疫原的溶液简称CL-LPH溶液。

[0063] (4) 将CL-LPH溶液用PBS缓冲溶液稀释后, 测定280nm和260nm的分光光度值, 按公式计算稀释溶液中的蛋白浓度, 将测得的蛋白浓度值乘以其稀释倍数后即为原CL-LPH溶液中的CL-LPH浓度。蛋白质浓度 (mg/ml) = 1.45\*OD<sub>280</sub>-0.74\*OD<sub>260</sub>。CL-LPH溶液中的CL-LPH浓度为9.3mg/ml。



式 III。

[0065] 二、克拉霉素免疫原的表征

[0066] 将CL-LPH溶液用LPH缓冲溶液稀释 (使CL-LPH的浓度为5mg/ml), 作为溶液甲; 将含5mg/ml克拉霉素的LPH缓冲溶液作为乙; 将含5mg/ml BSA的PBS缓冲溶液作为丙。分别将溶液甲、乙、丙, 进行紫外 (200-400nm) 光谱扫描。紫外光谱扫描结果见图2。与溶液丙相比, 溶液甲的紫外图谱发生了变化, 说明化合物与BSA成功偶联。

[0067] 溶液乙的最大吸收波长值为224nm, 溶液丙的最大吸收波长值为278nm。根据公式  $K = A/CL$  (A为最大吸收波长值下的吸光度, C为溶液浓度, L为液层的厚度) 计算各个化合物的消光系数 (K)。

[0068] 分别采用溶液乙和溶液丙的最大吸收波长值对溶液甲进行紫外光谱扫描, 并根据已经计算出的该化合物的消光系数反向计算该化合物在溶液甲中的浓度, 用浓度值除以分子量得到该化合物的摩尔浓度, 计算偶联比, 式 (I) 所示化合物和LPH的偶联比为12:1, 即12个式 (I) 所示化合物结合1个LPH。

[0069] 实施例5、克拉霉素单克隆抗体的制备

[0070] 一、动物免疫

[0071] 用实施例4二中制备的免疫原CL-LPH免疫Ba1b/c小鼠 (购于广东省实验动物中心) 每只小鼠单次免疫150μg, 免疫程序为: 第一次将免疫原与等量弗氏完全佐剂充分乳化, 小鼠皮下多点、腹腔或四只足垫免疫, 第二次佐剂换为弗氏不完全佐剂, 方法及剂量同一免, 免疫间隔为两周; 融合前三天不加佐剂半量腹腔注射加强免疫。

[0072] 二、细胞融合与筛选

[0073] 1、取冲击免疫后第三天的小鼠脾脏与SP2/O骨髓瘤细胞融合 (公司自有), 融合比例为1:5-10, 融合后第七天采用间接竞争ELISA测定细胞上清, 筛选阳性且有抑制孔。

[0074] 2、利用有限稀释法对阳性且有抑制孔进行亚克隆,经过3次以上克隆化培养,直至克隆阳性率为100%,最终得到一株可分泌克拉霉素单克隆抗体的杂交瘤细胞,命名为抗克拉霉素单克隆抗体杂交瘤细胞CLF3。

[0075] 三、腹水单抗的制备与纯化

[0076] 1、BaIb/c小鼠腹腔注射弗氏不完全佐剂或灭菌石蜡油,每只小鼠0.5mL。七天后腹腔注射杂交瘤细胞( $1 \times 10^5$ 个/只)。待小鼠腹部明显膨大,即可采取腹水。采用Protein A蛋白亲和层析柱对腹水进行纯化,纯化后的腹水保存于 $-20^\circ\text{C}$ 。

[0077] 2、单克隆抗体浓度的测定

[0078] 单克隆抗体的蛋白浓度(mg/mL) =  $1.45 \times \text{OD}_{280} - 0.74 \times \text{OD}_{260}$

[0079] 经计算得到单克隆抗体的蛋白浓度为3.6mg/mL。

[0080] 四、单克隆抗体的鉴定

[0081] 将步骤三得到的单克隆抗体溶液分别进行如下鉴定:

[0082] 1、单克隆抗体亚型的测定:采用单克隆抗体亚型鉴定试剂盒(购于Sigma公司)检测单克隆抗体的亚型,单克隆抗体CLF3的亚型为IgG1。

[0083] 2、抗体效价的测定

[0084] (1) 包被:采用实施例4步骤一制备的CL-BSA,采用Ph9.6的碳酸盐缓冲液进行包被,100 $\mu\text{L}$ /孔,包被浓度为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;4 $^\circ\text{C}$ 过夜包被。

[0085] (2) 洗板并封闭:PBST洗板一次,拍干后200 $\mu\text{L}$ /孔封闭液37 $^\circ\text{C}$ 封闭两小时。

[0086] (3) 弃去封闭液,拍干

[0087] (4) 每孔加入50 $\mu\text{L}$ 抗体稀释液(采用PBS进行梯度稀释),及50 $\mu\text{L}$ 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗,室温孵育30min。

[0088] (5) PBST洗板三次

[0089] (6) 加入TMB显色液,避光显色15min。

[0090] (7) 每孔加入50 $\mu\text{L}$ 2mol/L硫酸终止反应; $\text{OD}_{450}$ 及 $\text{OD}_{630}$ 双波长读数。

[0091] 以OD值达到1.0左右时判定为阳性。抗体效价测定为:1:20000。

[0092] 3、单克隆抗体灵敏度的测定

[0093] (1) 包被:采用实施例4步骤一制备的CL-BSA,采用Ph9.6的碳酸盐缓冲液进行包被,100 $\mu\text{L}$ /孔,包被浓度为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;4 $^\circ\text{C}$ 过夜包被。

[0094] (2) 洗板并封闭:PBST洗板一次,拍干后200 $\mu\text{L}$ /孔封闭液37 $^\circ\text{C}$ 封闭两小时。

[0095] (3) 弃去封闭液,拍干;

[0096] (4) 每孔加入50 $\mu\text{L}$ 不同浓度的克拉霉素标准品溶液(由克拉霉素和PBS缓冲液组成),克拉霉素的浓度分别为0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、0.3 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、0.9 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、2.7 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、8.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ ;将只加入PBS缓冲液的孔作为对照空;每个浓度设置3个重复孔。

[0097] (5) 每孔加入50 $\mu\text{L}$ 步骤三得到的单克隆抗体溶液,

[0098] (6) 每孔加入50 $\mu\text{L}$ 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗,室温孵育30min。

[0099] (7) PBST洗板三次

[0100] (8) 加入TMB显色液,避光显色15min。

[0101] (9) 每孔加入50 $\mu\text{L}$ 2mol/L硫酸终止反应; $\text{OD}_{450}$ 及 $\text{OD}_{630}$ 双波长读数。

[0102] 将采用不同浓度标准品溶液得到的吸光值(三个重复孔的平均值)除以对照孔的

吸光值(平均值)再乘以100作为纵坐标,以各个标准品溶液中的克拉霉素浓度( $\mu\text{g/L}$ )的自然对数值为横坐标绘制曲线图,见图3。对照图,得到纵坐标值等于50%对应的克拉霉素浓度( $\mu\text{g/L}$ ),即为 $\text{IC}_{50}$ 值。单克隆抗体检测克拉霉素的 $\text{IC}_{50}$ 值为1.0ppb。

[0103] 4、交叉反应率的测定

[0104] (1) 包被:采用实施例4制备的CL-BSA,采用Ph9.6的碳酸盐缓冲液进行包被,100 $\mu\text{L}$ /孔,包被浓度为5 $\mu\text{g/mL}$ ;4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被。

[0105] (2) 洗板并封闭:PBST洗板一次,拍干后200 $\mu\text{L}$ /孔封闭液37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭两小时。

[0106] (3) 弃去封闭液,拍干;

[0107] (4) 每孔加入50 $\mu\text{L}$ 不同浓度的结构类似物标准品溶液(由结构类似物和PBS缓冲液组成),结构类似物的浓度分别为0.1 $\mu\text{g/L}$ 、0.3 $\mu\text{g/L}$ 、0.9 $\mu\text{g/L}$ 、2.7 $\mu\text{g/L}$ 、8.1 $\mu\text{g/L}$ ;将只加入PBS缓冲液的孔作为对照空;每个浓度设置3个重复孔。

[0108] 结构类似物为:红霉素、替米考星、阿奇霉素、泰乐菌素。

[0109] 红霉素:中检所产品,货号130307。阿奇霉素:中检所产品,货号130593。替米考星:Sigma产品,货号33864-100。泰乐菌素:Sigma产品,货号32298-25。

[0110] (5) 每孔加入50 $\mu\text{L}$ 步骤三得到的单克隆抗体溶液,

[0111] (6) 每孔加入50 $\mu\text{L}$ 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗,室温孵育30min。

[0112] (7) PBST洗板三次

[0113] (8) 加入TMB显色液,避光显色15min。

[0114] (9) 每孔加入50 $\mu\text{L}$ 2mol/L硫酸终止反应;OD<sub>450</sub>及OD<sub>630</sub>双波长读数。

[0115] 将采用各个浓度的结构类似物得到的吸光值(三个复孔的平均值)除以对照孔的吸光值(平均值)再乘以100作为纵坐标,以各个标准品溶液中的结构类似物浓度( $\mu\text{g/L}$ )的自然对数值为横坐标绘制曲线图。对照曲线图,得到纵坐标值等于50%对应的结构类似物浓度( $\mu\text{g/L}$ ),即为 $\text{IC}_{50}$ 值

[0116] 用以下公式计算单克隆抗体对其它结构类似物的交叉反应率。

[0117]

单克隆抗体检测克拉霉素的  $\text{IC}_{50}$  值

$$\text{交叉反应率}(\%) = \frac{\text{单克隆抗体检测结构类似物的 } \text{IC}_{50} \text{ 值}}{\text{单克隆抗体检测克拉霉素的 } \text{IC}_{50} \text{ 值}} \times 100\%$$

单克隆抗体检测结构类似物的  $\text{IC}_{50}$  值

[0118] 结果见表1。

[0119] 表一 单克隆抗体特异性

	药物	IC <sub>50</sub> 值 (μg/L)	交叉反应率 (%)
	克拉霉素	1.0	100
[0120]	阿奇霉素	2000	0.045
	替米考星	> 10000	< 0.01
	泰乐菌素	> 10000	< 0.01
	红霉素	200	0.45

[0121] 结果表明本发明制备的CL单克隆抗体特异性较好,与大环内酯类的红霉素及阿奇霉素有一定的交叉反应,与其它结构类似物无交叉反应。

[0122] 5、稳定性

[0123] 将步骤三得到的单克隆抗体溶液-20℃放置,不同时间取样,用PBS缓冲液稀释后检测效价,具体步骤同步骤2抗体效价的测定。

[0124] OD<sub>450</sub>及OD<sub>630</sub>值见表2。结果表明,在-20℃保存16周单克隆抗体效价不变。

[0125] 表2 单克隆抗体的稳定性

[0126]

抗体稀释 取样时间	抗体稀释倍数 (×10 <sup>4</sup> )				
	1	2	4	8	16
第0周	2.859	2.487	2.277	1.837	1.463
第4周	2.936	2.584	2.336	1.946	1.602
第8周	2.753	2.435	2.228	1.879	1.403
第12周	2.844	2.552	2.298	1.806	1.398
第16周	2.744	2.329	2.098	1.739	1.301

[0127] 6、非竞争酶免疫法测定亲和常数

[0128] (1) 用CL-BSA作为包被原包被酶标板

[0129] 采用实施例1制备的CL-BSA溶液用碳酸盐缓冲液进行包被,100μL/孔;分别设置以下包被浓度:10μg/mL、5μg/mL、2.5μg/mL、1.25μg/mL。4℃过夜包被。

[0130] (2) 洗板并封闭

[0131] (3) 每孔加入100 $\mu$ L单克隆抗体溶液的稀释液(用PBS缓冲液进行稀释);稀释液中的蛋白浓度分别为2.5、1.25、0.625、0.3125、 $1.5625 \times 10^{-1}$ 、 $7.8 \times 10^{-2}$ 、 $3.9 \times 10^{-2}$ 、 $1.95 \times 10^{-2}$ 、 $9.75 \times 10^{-3}$ 、 $4.88 \times 10^{-3}$ mg/L;室温孵育1h。

[0132] (4) 洗板,拍干。

[0133] (5) 每孔加入100 $\mu$ L辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG,室温孵育1h。

[0134] (6) 洗板拍干。

[0135] (7) 加入TMB显色液,避光显色15min。

[0136] (8) 每孔加入100 $\mu$ L2moI/L硫酸终止反应;读OD<sub>450</sub>及OD<sub>630</sub>双波长值。

[0137] 以单克隆抗体中的蛋白浓度(moI/L)的自然对数值为横坐标,以其对应的吸光值为纵坐标制作标准曲线。每个抗原包被浓度得到1条S型曲线,共得到4条S型曲线。找出S型曲线的顶部,对应的OD<sub>450</sub>及OD<sub>630</sub>双波长值设为ODMAX。分别找出各条曲线50%ODMAX对应的抗体浓度。将4个浓度两两一组,根据公式计算单克隆抗体的亲和常数

[0138] 
$$K_a = (n-1) / 2 (n [Ab]_{t_1} - [Ab]_{t_2})$$

[0139] 公式中,n为每组中两个包被浓度的倍数,[Ab]<sub>t<sub>1</sub></sub>、[Ab]<sub>t<sub>2</sub></sub>分别为每组中两个50%ODMAX对应的抗体浓度(moI/L)。最终取6个Ka值的平均值得出单克隆抗体的亲和常数为 $2.14 \times 10^9 M^{-1}$ 。

[0140] 实施例4克拉霉素多克隆抗体的制备及ELISA竞争抑制试验

[0141] 新西兰大白兔:购于广东省实验动物中心。

[0142] 将新西兰大白兔按实施例2制备的CL-LPH溶液进行免疫,免疫方式为脊柱两侧背部皮下多点免疫,免疫间隔为两周,每次免疫剂量为1mg/只,从第二次免疫开始,每次免疫后第七天,耳缘静脉采血检测血清效价及抑制,共免疫八次,八免后心脏采全血,离心收集血清即为多克隆抗体。将收集到的血清放于-20 $^{\circ}$ C保存。

[0143] 多克隆抗体的效价及灵敏度的检测同实施例3的步骤四的2和3,用倍比稀释后的血清代替单克隆抗体溶液。结果得出:克拉霉素多克隆抗体效价为1:5000;IC<sub>50</sub>为2.7ppb。

[0144] 以上所述的仅为本发明的较佳实施例,凡在本发明的精神和原则范围内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

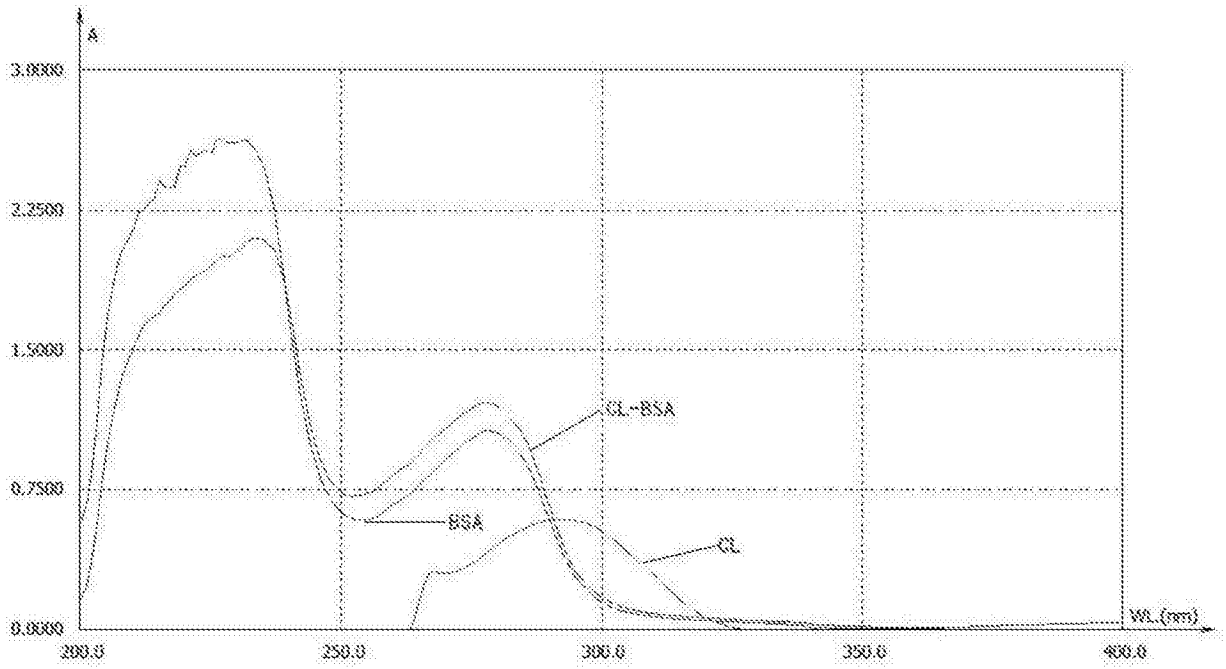


图1

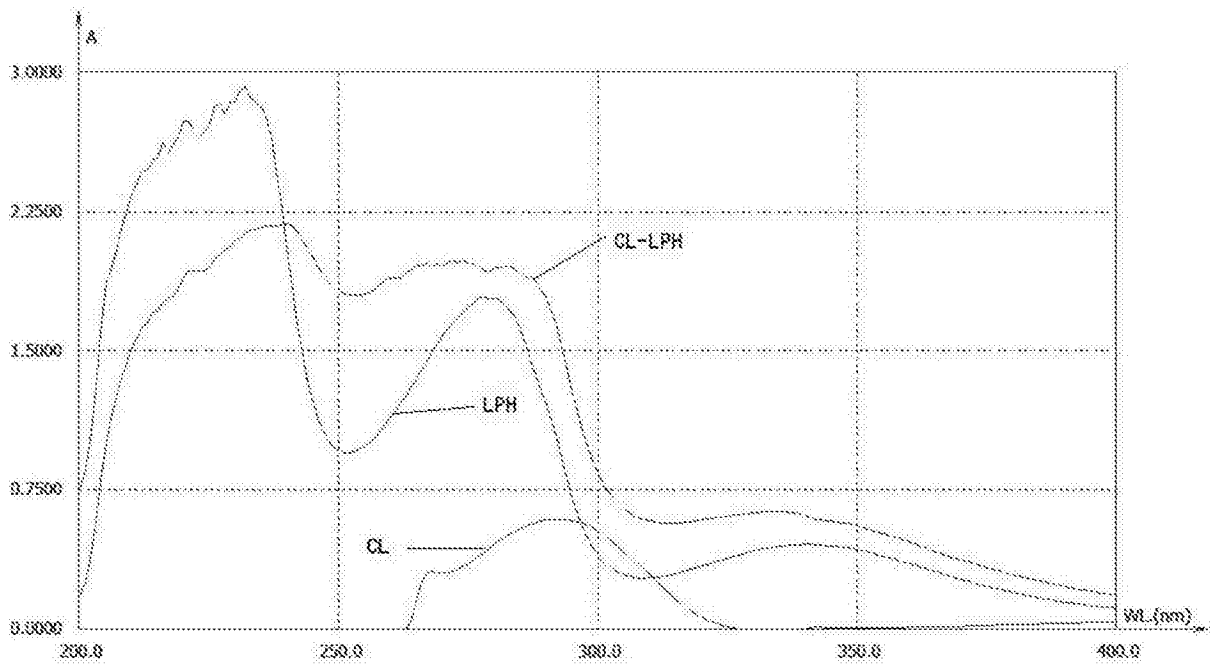


图2

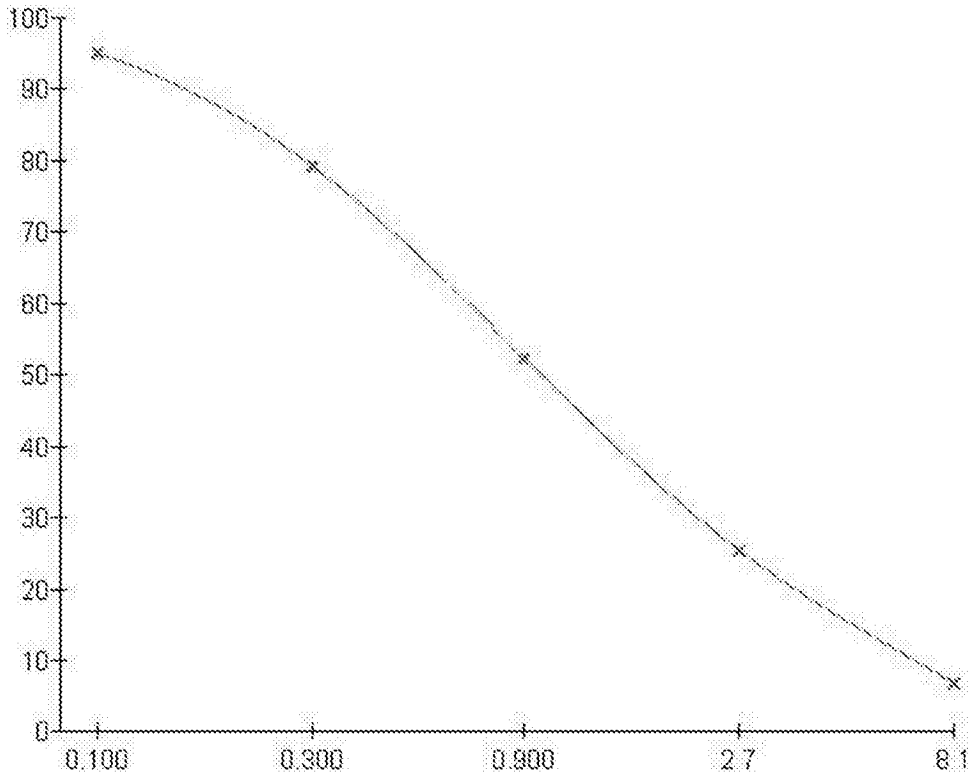


图3

专利名称(译)	克拉霉素半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN106589024A</a>	公开(公告)日	2017-04-26
申请号	CN201611125939.6	申请日	2016-12-09
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市绿诗源生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市绿诗源生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市绿诗源生物技术有限公司		
[标]发明人	宁波 李隆军 刘明如 朱永利 蒋永青 吴育春		
发明人	宁波 李隆军 刘明如 赖启隆 朱永利 蒋永青 吴育春		
IPC分类号	C07H17/08 C07H1/00 C07K14/765 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	C07H1/00 C07H17/08 C07K14/765 C07K14/795 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/53 G01N33/577		
代理人(译)	王海曼		
其他公开文献	CN106589024B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种克拉霉素半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法应用，旨在提供既能最大程度保留了克拉霉素的特征结构，又具有可以与载体蛋白发生偶联的活性基团的克拉霉素半抗原，并且以克拉霉素半抗原制备人工抗原和抗体，用来检测检测大环内酯类化合物中，其技术方案，所述克拉霉素半抗原，所述结构如下式所示：所述克拉霉素人工抗原为所述克拉霉素半抗原与载体蛋白偶联制得的；属于生物技术领域；

