

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103159852 A

(43) 申请公布日 2013.06.19

(21) 申请号 201310103592.5

G01N 33/68(2006.01)

(22) 申请日 2013.03.28

G01N 33/53(2006.01)

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800号江南大学

(72) 发明人 胥传来 刘丽强 王利兵 匡华
徐利广 马伟 胡拥明

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

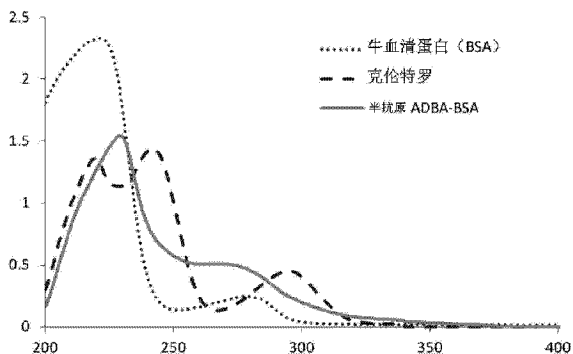
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种特异性克伦特罗人工抗原的合成方法

(57) 摘要

一种特异性克伦特罗人工抗原的合成方法，属于生物化工技术领域。本发明包括如下步骤：选择4-氨基-3,5-二氯苯甲酸作为克伦特罗的半抗原，该分子与克伦特罗分子的同源性大于50%，将该半抗原与载体蛋白进行偶联，得到克伦特罗人工抗原。实验结果表明，用本发明的抗原免疫动物得到的抗血清效价可达32000，检测限为1ng/mL，半抑制浓度IC₅₀为10ng/mL。产生的抗体特异性高、灵敏度高。本发明的抗原或抗体可用于建立酶联免疫吸附分析方法和胶体金试纸快速检测法，从而用于快速检测食品中的克伦特罗残留，具有广阔的应用前景。



1. 一种特异性克伦特罗人工抗原的合成方法,其特征在于以 4-氨基-3,5-二氯苯甲酸为半抗原,将 4-氨基-3,5-二氯苯甲酸上的羧基通过 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺 EDC 与 N-羟基琥珀酰亚胺 NHS 活化、或者通过三正丁胺与氯甲酸异丁酯活化,再与载体蛋白进行偶联得到克伦特罗人工抗原,将人工抗原透析,工艺为:

(A) 将 4-氨基-3,5-二氯苯甲酸用 N,N-二甲基甲酰胺 DMF 溶解,4-氨基-3,5-二氯苯甲酸与 N-羟基琥珀酰亚胺 NHS,1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺 EDC 的摩尔比为 1:1.5:2,在 4℃ 避光搅拌反应 1h,再在室温反应 12h,得活化的半抗原溶液;

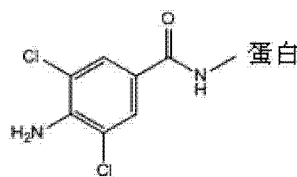
取牛血清白蛋白,半抗原与牛血清白蛋白的摩尔比为 80:1,牛血清白蛋白用 0.1M pH9.6 碳酸盐缓冲液溶解,其中溶解后的牛血清白蛋白浓度大于 3mg/mL,且碳酸盐缓冲液与 N,N-二甲基甲酰胺 DMF 的体积比例为 5:1;将活化的半抗原溶液慢速滴加到牛血清白蛋白溶液中,室温反应 24h,用 PBS 缓冲液透析 2 天,期间更换 PBS 缓冲液 4 次,得到克伦特罗人工抗原;

或(B) 将 4-氨基-3,5-二氯苯甲酸用 N,N-二甲基甲酰胺 DMF 溶解,4-氨基-3,5-二氯苯甲酸与三正丁胺,氯甲酸异丁酯的摩尔比为 1:1.2:1.2,0℃ 反应 1h,得活化的半抗原溶液;

取牛血清白蛋白,半抗原与牛血清白蛋白的摩尔比为 80:1,牛血清白蛋白用 0.1M pH9.6 碳酸盐缓冲液溶解,0℃ 预冷 30min,其中溶解后的牛血清白蛋白浓度大于 3mg/mL,且碳酸盐缓冲液与 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 的体积比例为 5:1;在 0℃ 条件下,将活化的半抗原溶液慢速滴加到牛血清白蛋白溶液中,0℃ 条件下反应 1h,然后室温反应 24h;用 PBS 缓冲液透析 2 天,期间更换 PBS 缓冲液 4 次,得到克伦特罗人工抗原。

2. 根据权利要求 1 所述的特异性克伦特罗人工抗原的合成方法,其特征在于,所述载体蛋白为:牛血清白蛋白 BSA、阳离子化的牛血清白蛋白 cBSA、匙孔血蓝蛋白 KLH、血蓝蛋白 LPH、鸡卵清白蛋白 OVA、人血清白蛋白 HSA 之一。

3. 根据权利要求 1 所述的特异性克伦特罗人工抗原的合成方法,其特征在于克伦特罗人工抗原的分子结构式如式 I 所示:



式 I。

4. 用权利要求 1 所述方法合成的特异性克伦特罗人工抗原的应用,其特征在于制备克伦特罗抗体,所述抗体为多克隆抗体和 / 或单克隆抗体。

5. 用权利要求 1 所述方法合成的特异性克伦特罗人工抗原的应用,其特征在于在检测克伦特罗中的应用,检测食品中的克伦特罗残留。

一种特异性克伦特罗人工抗原的合成方法

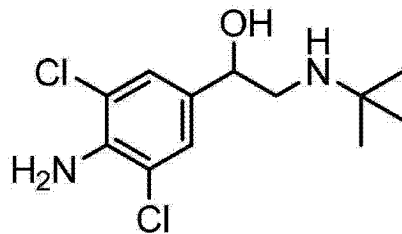
技术领域

[0001] 一种高特异性克伦特罗人工抗原的合成方法,属于生物化工技术领域。

背景技术

[0002] 盐酸克伦特罗(Clenbuterol),又称“瘦肉精”,是一种平喘药。是肾上腺类神经兴奋剂,20世纪80年代初,美国Cyanamid公司意外发现其有明显的促进生长、提高瘦肉率及减少脂肪的效果,于是其被畜牧业作为瘦肉精使用。但由于其副作用,欧共体于1988年1月1日起禁止盐酸克伦特罗物质当饲料添加剂使用。1991年被FDA禁止。1997年,中华人民共和国农业部下文严禁 β -肾上腺素类激素在饲料和畜牧生产中使用,盐酸克伦特罗列为第一位,2002年9月10起在中国境内禁止在饲料和动物饮用水中使用盐酸克伦特罗。

[0003]



[0004] 目前我国对克伦特罗的检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、液质联用法(LC/MS)、酶联免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、胶体金试纸条法等。仪器分析方法存在样品须经多步稀释、过滤、提取,制备复杂、繁琐的缺点。尽管仪器方法是克伦特罗检测的确证方法,但是由于其操作繁琐,以及长时间的样本前处理过程,导致检测成本高,周期长,无法满足大批量样本快速筛查,以及现场快速检测的要求。ELISA和胶体金试纸条法属于免疫分析技术,具有较高的灵敏度和特异性,检测时对样本的纯度要求不高而且操作简便,适用于大量样本的现场快速检测。

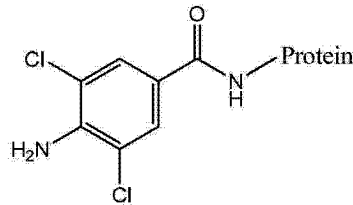
[0005] 影响免疫分析方法的关键因素在于特异性的抗原和抗体。传统的克伦特罗人工抗原一般通过重氮化反应将苯环上的氨基与载体蛋白进行偶联。由于克伦特罗的部分结构与沙丁胺醇的部分结构类似,而且通过重氮化反应后,暴露出的最外端的叔丁基部分正好与沙丁胺醇的结构相同,因此用该抗原免疫产生的抗体不可避免的会对沙丁胺醇产生较高的交叉反应。本发明从克伦特罗分子的另一侧着手,以克伦特罗的类似物4-氨基-3,5-二氯苯甲酸上的羧基为位点与载体蛋白偶联形成了完全抗原。

发明内容

[0006] 本发明的目的:针对现有克伦特罗抗原合成技术以及相应抗体的不足和缺陷,提供一种新型的克伦特罗人工抗原的合成方法,使得制备高特异性的克伦特罗单克隆抗体成为可能。

[0007] 本发明提供的克伦特罗人工抗原化合物,具有式I所示分子结构。

[0008]

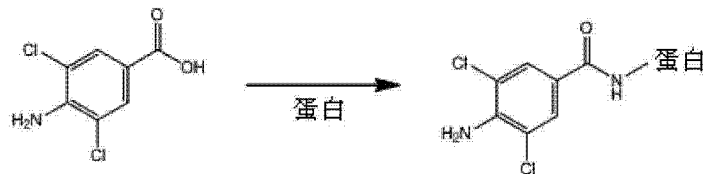


[0009] (式 I)

[0010] 本发明的技术方案：一种特异性克伦特罗人工抗原的合成方法，以 4-氨基-3,5-二氯苯甲酸为半抗原，将 4-氨基-3,5-二氯苯甲酸 (4-Amino-3,5-dichlorobenzoic acid,ADBA) 上的羧基通过 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺 (EDC) 与 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化、或者通过三正丁胺与氯甲酸异丁酯活化，再与载体蛋白上的氨基进行偶联，得到克伦特罗人工抗原，将人工抗原透析，然后进行紫外鉴定(图 1)。

[0011] 合成路线为：

[0012]



[0013] 工艺为：

[0014] (A) 将 4-氨基-3,5-二氯苯甲酸用 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解,4-氨基-3,5-二氯苯甲酸与 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS),1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺 (EDC) 的摩尔比为 1:1.5:2,在 4℃ 避光搅拌反应 1h,再在室温反应 12h,得活化的半抗原溶液；

[0015] 取牛血清白蛋白,半抗原与牛血清白蛋白的摩尔比为 80:1,牛血清白蛋白用 0.1M pH9.6 碳酸盐缓冲液溶解,其中溶解后的牛血清白蛋白浓度大于 3mg/mL,且碳酸盐缓冲液与 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 的体积比例为 5:1;将活化的半抗原溶液缓慢滴加到牛血清白蛋白溶液中,室温反应 24h,用 PBS 缓冲液透析 2 天,期间更换 PBS 缓冲液 4 次,得到克伦特罗人工抗原；

[0016] 或(B) 将 4-氨基-3,5-二氯苯甲酸用 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解,4-氨基-3,5-二氯苯甲酸与三正丁胺,氯甲酸异丁酯的摩尔比为 1:1.2:1.2,0℃ 反应 1h,得活化的半抗原溶液；

[0017] 取牛血清白蛋白,半抗原与牛血清白蛋白的摩尔比为 80:1,牛血清白蛋白用 0.1M pH9.6 碳酸盐缓冲液溶解,0℃ 预冷 30min,其中溶解后的牛血清白蛋白浓度大于 3mg/mL,且碳酸盐缓冲液与 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 的体积比例为 5:1;在 0℃ 条件下,将活化的半抗原溶液缓慢滴加到牛血清白蛋白溶液中,0℃ 条件下反应 1h,然后室温反应 24h;用 PBS 缓冲液透析 2 天,期间更换 PBS 缓冲液 4 次,得到克伦特罗人工抗原。

[0018] 所述的 4-氨基-3,5-二氯苯甲酸、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺 (EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 以及氯甲酸异丁酯纯度均大于 95%。

[0019] 所述的载体蛋白为：牛血清白蛋白 BSA、阳离子化的牛血清白蛋白 cBSA、匙孔血蓝蛋白 KLH、血蓝蛋白 LPH、鸡卵清白蛋白 OVA、人血清白蛋白 HSA 之一。

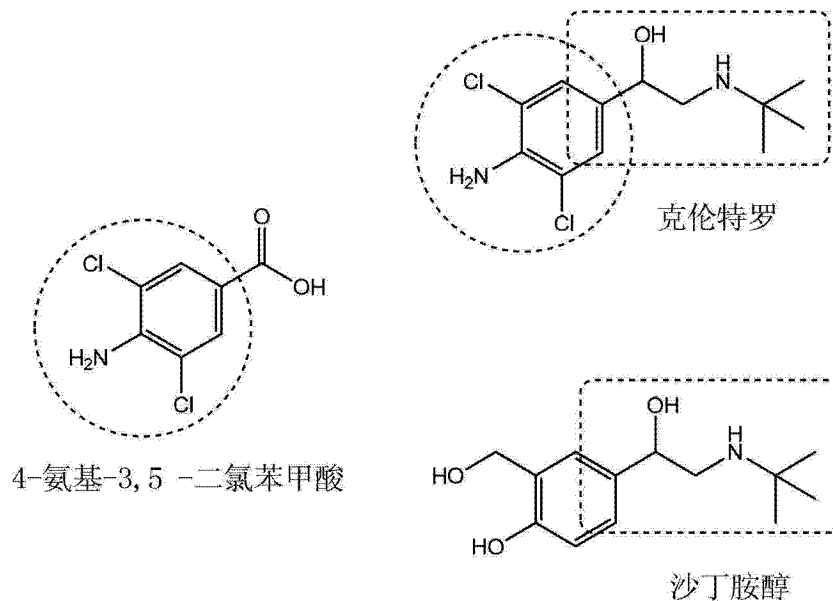
[0020] 上述克伦特罗人工抗原化合物在制备克伦特罗抗体中的应用也属于本发明的保护范围。

[0021] 上述克伦特罗人工抗原化合物免疫动物得到的抗体也属于本发明的保护范围,所述抗体为多克隆抗体和 / 或单克隆抗体。

[0022] 上述克伦特罗人工抗原化合物或抗体在检测克伦特罗中的应用,检测食品中的克伦特罗残留也属于本发明保护的范畴。

[0023] 克伦特罗、沙丁胺醇以及 4-氨基-3,5-二氯苯甲酸结构对比为:

[0024]



[0025] 本发明的有益效果:本发明是新型的克伦特罗人工抗原的合成方法,该人工抗原呈现出的特异性的克伦特罗抗原决定簇,使得筛选出高特异性的克伦特罗单克隆抗体成为可能。

[0026] 实验结果表明,用本发明的抗原免疫动物得到的抗血清效价可达 32000,检测限为 1ng/mL,半抑制浓度 IC₅₀ 为 10ng/mL。产生的抗体特异性高、灵敏度高。本发明的抗原或抗体可用于建立酶联免疫吸附分析方法和胶体金试纸快速检测法,从而用于快速检测食品中的克伦特罗残留。

附图说明

[0027] 图 1、克伦特罗人工抗原紫外光谱图。

具体实施方式

[0028] 下述实例中所使用的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0029] 下述实例中所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0030] 实施例 1、克伦特罗人工抗原的制备

[0031] 取 25mg (0.122mmol) 4-氨基-3,5-二氯苯甲酸,加入 2mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解,再分别加入 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS),1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺 (EDC) (半抗原、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳

酰二亚胺 (EDC) 的摩尔比为 1:1.5:2), 4℃下, 避光混匀, 搅拌反应 60min, 再在室温下反应 12h。取 104mg (0.0015mmol) 牛血清白蛋白(半抗原与牛血清白蛋白的摩尔比为 80:1), 加入 10mL 0.1M pH9.6 碳酸盐缓冲液。将活化的克伦特罗半抗原溶液慢速滴加到牛血清白蛋白溶液中, 室温下反应 24h。用 PBS 缓冲液透析 2 天, 期间更换 PBS 缓冲液 4 次, 即得到克伦特罗人工抗原。

[0032] 实施例 2、克伦特罗人工抗原的制备

[0033] 取 25mg (0.122mmol) 4-氨基-3,5-二氯苯甲酸, 加入 2mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解, 0℃预冷 30min。0℃下, 分别加入三正丁胺, 氯甲酸异丁酯(半抗原、三正丁胺、氯甲酸异丁酯的摩尔比为 1:1.2:1.2), 0℃反应 1h。取 104mg (0.0015mmol) 牛血清白蛋白(半抗原与牛血清白蛋白的摩尔比为 80:1), 加入 10mL 0.1M pH9.6 碳酸盐缓冲液, 0℃预冷 30min。在 0℃条件下, 将活化的半抗原溶液慢速滴加到牛血清白蛋白溶液中, 0℃条件下反应 1h, 然后室温下反应 24h。用 PBS 缓冲液透析 2 天, 期间更换 PBS 缓冲液 4 次, 即得到克伦特罗人工抗原。

[0034] 实施例 3、克伦特罗抗血清的制备

[0035] 以实施例 1 制得的克伦特罗人工抗原为免疫原, 选用 6-8 周龄, 雌性 BALB/C 小鼠为免疫动物, 采用弗氏佐剂进行免疫, 免疫小鼠 5 只。弗氏佐剂免疫方法为: 首免取适量免疫原与等体积弗氏完全佐剂混合, 乳化好后经颈背部皮下多点注射免疫, 每间隔 3 周加强免疫一次。

[0036] 实施例 4、克伦特罗抗血清的测定

[0037] 一、采用间接 ELISA 方法检测血清效价, 具体操作步骤如下:

[0038] 1、包被: 将实施例 1 中的克伦特罗人工抗原用 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液从 10 μg/mL 开始倍比稀释, 100 μL/孔, 37℃反应 2h。

[0039] 2、洗涤: 将板内溶液倾去, 甩干, 并用洗涤液洗涤 3 次, 每次 3min。

[0040] 3、封闭: 拍干后, 加入 200 μL/孔封闭液, 37℃反应 2h。洗涤后烘干备用。

[0041] 4、加样: 将实施例 3 所得克伦特罗抗血清从 1:1000 开始倍比稀释, 并加入到各稀释度的包被孔中, 100 μL/孔, 37℃反应 1h; 充分洗涤后, 加入 1:3000 稀释的 HRP-羊抗鼠 IgG, 100 μL/孔, 37℃反应 1h。

[0042] 5、显色: 将酶标板取出, 充分洗涤后, 每孔加入 100 μL 的 TMB 显色液, 37℃避光反应 15min。

[0043] 6、终止和测定: 每孔加入 100 μL 终止液以终止反应, 然后用酶标仪测定各孔的 OD₄₅₀ 值。

[0044] 7、结果判读: 以 OD₄₅₀ 值大于或等于阴性对照孔的 2.1 倍(即 P/N ≥ 2.1)所对应的血清最高稀释倍数即为血清的 ELISA 效价。

[0045] 二、最低检测限、半数抑制以及特异性的检测

[0046] 具体操作步骤如下:

[0047] 1、用上述的间接 ELISA 方阵滴定法确定包被原和抗体的工作浓度, 以 OD₄₅₀ 值在 1.5 左右时所对应的抗原和抗体浓度为最适工作浓度。

[0048] 2、包被: 将包被原用包被缓冲液稀释至最适工作浓度, 100 μL/孔, 37℃反应 2h。

[0049] 3、洗涤和封闭: 方法操作同上述间接 ELISA 法。

[0050] 4、配制克伦特罗标准溶液：将克伦特罗标准品用 0.01mol/L, pH7.4 的 PBS 溶液配制成 1mg/mL 的母液, 然后, 在加样前, 再用 0.01mol/L, pH7.4 的 PBS 溶液倍比稀释成需要浓度。

[0051] 5、加样：每孔加入 50 μ L 倍比稀释的克伦特罗各浓度标准品, 然后再加入 50 μ L/孔最适稀释倍数的抗血清, 37 $^{\circ}$ C 反应 1h。充分洗涤后, 加入 1:3000 稀释的 HRP-羊抗鼠 IgG, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 反应 1h。

[0052] 6、显色反应：将酶标板取出, 充分洗涤后, 每孔加入 100 μ L 的 TMB 显色液, 37 $^{\circ}$ C 避光反应 15min。

[0053] 7、终止和测定：每孔加入 100 μ L 终止液以终止反应, 然后用酶标仪测定各孔的 OD₄₅₀ 值。

[0054] 8、数据处理：以克伦特罗各浓度的对数为横坐标, 以克伦特罗各浓度对应的 OD 值为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算半数抑制浓度 (IC₅₀, 即 OD₄₅₀ 值从零标准溶液对应的 A0 下降到 50% 时所对应的标准品浓度), 从而判定抗血清对克伦特罗是否具有特异性。

[0055] 9、将克伦特罗的标准品换成莱克多巴胺、马步特罗、沙丁胺醇按上述方法测定 IC₅₀ 值, 并计算交叉反应率。

[0056] 交叉反应率 (%) = IC₅₀ (克伦特罗) / IC₅₀ (类似物)

[0057] 实验设 3 次重复, 结果取平均值。

[0058] 结果显示, 四免后, 小鼠抗血清效价可达 32000, 检测限为 1ng/mL, 克伦特罗 IC₅₀ 为 10ng/mL, 各类似物的交叉反应率均小于 0.1。

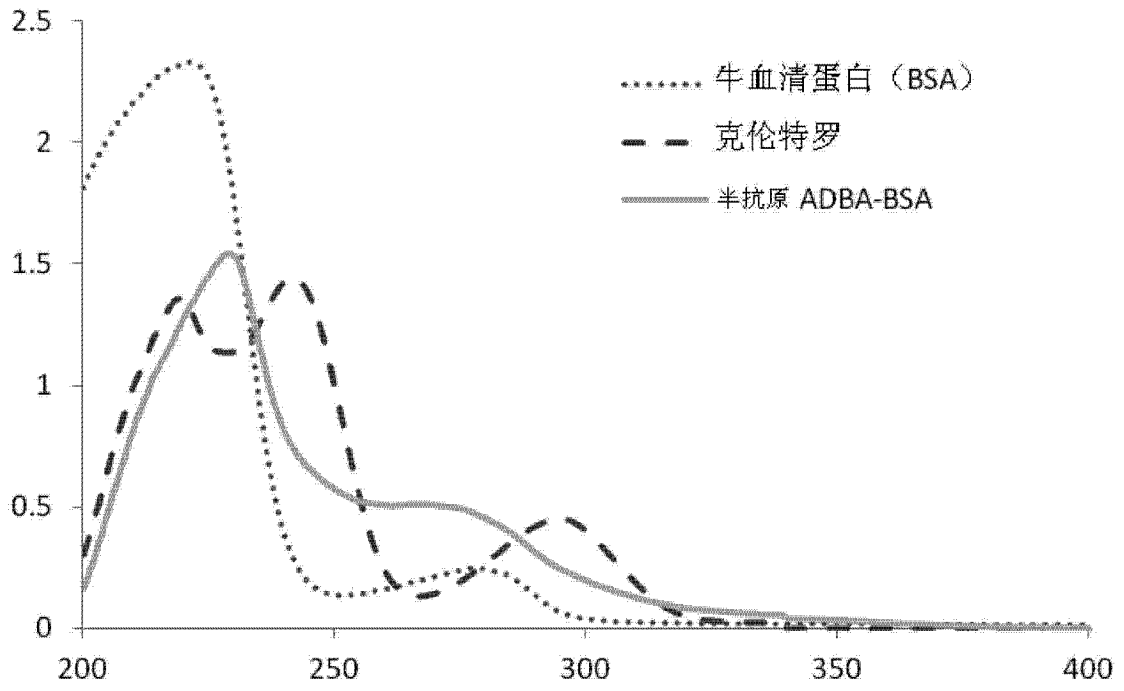


图 1

专利名称(译)	一种特异性克伦特罗人工抗原的合成方法		
公开(公告)号	CN103159852A	公开(公告)日	2013-06-19
申请号	CN201310103592.5	申请日	2013-03-28
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	胥传来 刘丽强 王利兵 匡华 徐利广 马伟 胡拥明		
发明人	胥传来 刘丽强 王利兵 匡华 徐利广 马伟 胡拥明		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/68 G01N33/53		
其他公开文献	CN103159852B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种特异性克伦特罗人工抗原的合成方法，属于生物化工技术领域。本发明包括如下步骤：选择4-氨基-3,5-二氯苯甲酸作为克伦特罗的半抗原，该分子与克伦特罗分子的同源性大于50%，将该半抗原与载体蛋白进行偶联，得到克伦特罗人工抗原。实验结果表明，用本发明的抗原免疫动物得到的抗血清效价可达32000，检测限为1ng/mL，半抑制浓度IC50为10ng/mL。产生的抗体特异性高、灵敏度高。本发明的抗原或抗体可用于建立酶联免疫吸附分析方法和胶体金试纸快速检测法，从而用于快速检测食品中的克伦特罗残留，具有广阔的应用前景。

