

己烯雌酚人工抗原的合成及其抗体制备^{*}

邴爱英¹, 成连贵², 朱建华³, 牛钟相^{1*}

(1. 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018; 2. 滨州职业学院生物工程系, 滨州 256624;

3. 齐鲁动物保健品有限公司, 济南 250100)

摘要: 以己烯雌酚(DES)、琥珀酸酐和牛血清白蛋白(BSA)等为主要原料, 采用混合酸酐反应(氯甲酸异丁酯法)将半抗原己烯雌酚与载体蛋白BSA联接制备成人工免疫原。用此免疫原免疫家兔, 并以间接ELISA法测定抗体效价。结果表明, 人工合成的抗原具有很强的免疫原性, 被免疫血清中的抗DES抗体效价高达 2^8 。本试验为下一步制备抗DES单克隆抗体及研制快速检测DES残留的免疫试剂盒奠定了基础。

关键词: 己烯雌酚; 混合酸酐反应; 人工抗原; 抗体

中图分类号: S852.4⁺3

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2006)05-0017-04

Synthesis of Artificial Antigen of Diethylstilbestrol and the Preparation of Its Antibody

BING Ai ying¹, CHENG Lian gui², ZHU Jian hua³ and NIU Zhong xiang^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China;

2. Department of Bioengineering, Binzhou Vocational College, Binzhou 256624, China;

3. Qilu Animal Health Products Co., LTD, Ji'nan 250100, China)

Abstract: Using diethylstilbestrol(DES), succinic anhydride and bovine serum albumin(BSA) as main stuff, the artificial immunogen has been obtained by the mixed acid anhydride reaction (isobutyl chloroformate method) to connect hapten DES with carrier protein BSA. Six female rabbits were immunized subcutaneously with this artificial immunogen, the serum value of antibody were measured with indirect ELISA test. Animal immune test demonstrated that there were antibody against DES in rabbits serum, and the value of the antibody was 2^8 . This study laid the basis of further research on the immune test kit for the DES remnant and Monoclonal antibody against the DES.

Key words: Diethylstilbestrol; Mixed acid anhydride reaction; Artificial antigen; Antibody

己烯雌酚(diethylstilbestrol, DES)为人工合成的二苯乙烯类雌激素药, 曾经作为促生长剂广泛应用于畜牧业, 以促进动物生长, 提高产量^[1]。但国内外研究表明, 己烯雌酚具有很强的副作用, 可以破坏机体遗传物质, 导致基因突变而引发机体肿瘤^[2]。目前, 世界上许多国家已规定在畜禽及水产养殖中禁用DES。我国于1999年制定的《中华人民共和国动物及动物源食品残留监控计划》中规定其最大残留检测量(MRL)为不得检

出。为了确保人类安全与健康, 建立快速、准确检测食品中DES等有毒有害物质的残留是十分必要的。传统的残留分析方法包括气相色谱、液相色谱、质谱、薄层层析等, 这些方法往往需要复杂昂贵的仪器, 而且需要经过烦琐的前处理, 很难达到快速、简便的现场检测要求。免疫检测分析方法由于具有特异性强、灵敏度高、简便、快速等优点, 近年来备受人们的关注^[3]。因此, 建立DES的免疫快速检测方法, 对于实践中批量化测定样

* 收稿日期: 2005-12-26 修回日期: 2006-03-25

基金项目: 山东省财政资助项目(SDGP2004-54-0)。

作者简介: 邴爱英(1977), 女, 山东即墨市人, 在读硕士, 主要从事兽医微生物学与免疫学的研究。

* 通讯作者。

品中 DES 残留意义重大, 本试验制备成功的 DES 人工抗原及抗该抗原的高效价抗体, 为建立快速检测 DES 残留的免疫试剂盒提供了可靠保证。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂和仪器

己烯雌酚, 纯度 99%, Sigma 公司; 吡啶, 分析纯, 天津市四通化工厂; 琥珀酸酐, 国药集团上海化学试剂公司; 二氧六环, 分析纯, 天津巴斯夫化工有限公司; 氯甲酸异丁酯, CP, 上海天莲精细化工有限公司; 三正丁胺, CP, 国药集团化学试剂有限公司; 牛血清白蛋白(BSA), 上海伯奥生物科技有限公司; 羊抗兔酶标抗体, 北京鼎国生物技术有限公司; 邻苯二氨(OPD), Sigma 公司; 标准阳

性血清, 北京国安兴业科技有限公司; 酶标板, Costor 公司产品。

1.2 试验动物

成年健康家兔, 雌性, 体重 2.5 kg 左右, 购自泰安生物制品研究所实验动物中心。

1.3 己烯雌酚半琥珀酸酯(DES HS)的合成^[4,5]

将 70 mg DES 溶于 5 mL 吡啶中, 搅拌至完全溶解, 再加入琥珀酸酐 27.5 mg, 置于通风橱中, 室温下搅拌 30 h。反应完成后, 将反应液移入 30 mL 冰蒸馏水与 5 mL 浓盐酸组成的混合液中静置过夜, 以中和吡啶及除去过剩的酸酐。抽滤析出的沉淀, 并以蒸馏水洗至 pH5.5 左右, 真空干燥即得粗产品。合成路线如图 1 所示。

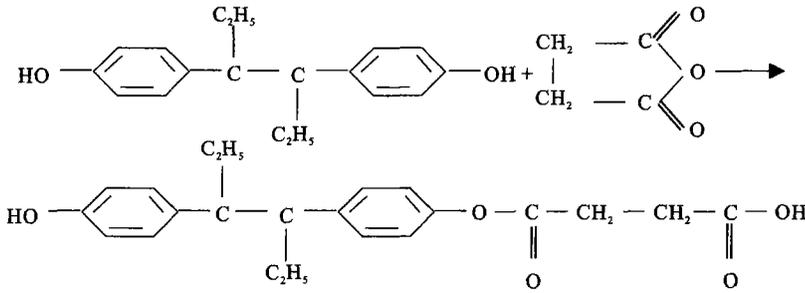


图 1 DES-HS 合成路线

Fig. 1 Synthesis of DES-HS

1.4 DES HS BSA 的合成

将已制备的 DES HS 粗产品溶于二氧六环中, 置 4 °C 环境中 10 min, 然后加入 20 μL 三正丁胺, 混匀; 再加入 15 μL 氯甲酸异丁酯, 4 °C 条件下搅拌 30 min, 此为甲液。另取 150 mg BSA 溶于

20 mL 70%二氧六环水溶液中, 此为乙液。将甲液与乙液合并, 4 °C 下搅拌过夜。将反应液流水透析 2 h, 然后换成 pH7.0 的 PBS 溶液继续透析 48 h。浓缩透析液, 冷冻干燥。合成路线见图 2。

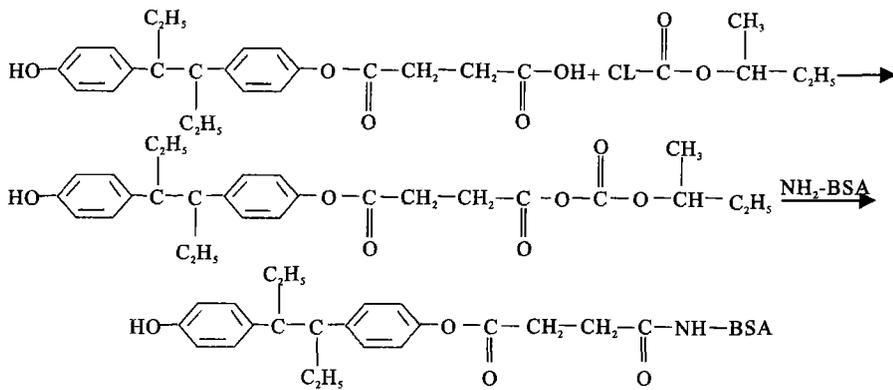


图 2 DES-HS-BSA 的合成

Fig. 2 Synthesis of DES-HS-BSA

1.5 动物免疫试验

用无菌 pH7.0 的 PBS 液将 DES HS BSA 溶解, 然后按人工抗原与弗氏佐剂 1 : 3 的比例充分乳化制成油乳剂疫苗。首次免疫用弗氏完全佐剂

疫苗, 每只兔免疫量为 1.6 mL(含 680 μg DES-HS BSA), 采用足掌及背部皮下多点注射; 10 d 后二免, 采用弗氏不完全佐剂苗, 免疫剂量为每只 2 mL, 背部皮下多点注射; 20 d 后三免, 弗氏不完

全佐剂, 免疫量为每只 2.4 mL, 免疫途径同上。30 d 后加强免疫, 不加佐剂, 免疫量为 2 mL, 背部皮下多点注射。加强免疫后 10 d, 经心脏无菌采血, 分离血清, 置 -20°C 冰箱保存备用。

1.6 间接 ELISA 测定抗 DES 抗体

1.6.1 包被抗原和酶标抗体最佳工作浓度的选择 抗原的包被量主要决定于抗原的免疫反应性和所要检测抗体的浓度。按参考文献[6], 将 1 g/mL 的己烯雌酚用包被液作 1:200~1:2000 稀释, 酶标抗体作 1:500~1:2000 稀释, 用方阵法检测抗原及酶标抗体工作浓度。结果以阳性血清 OD 值接近 1, P/N 值最大时相应的抗原及酶标抗体的稀释倍数为最佳工作浓度。

1.6.2 抗 DES 抗体效价测定 以预测定工作浓度的包被抗原包被酶标板, 然后加入用 pH7.0 的 PBS 液倍比稀释的高免血清, 再加入羊抗兔酶标抗体。并设标准阳性血清为阳性对照, 设未免疫家兔的血清为阴性对照、磷酸盐缓冲液为空白对照。为提高酶标反应板的吸附性能, 包被抗原之前先用 SPF 鸡的卵清蛋白包被酶标反应板, 其他实验步骤按常规方法进行^[7]。

试验结果的判定标准: $P/N = (\text{标本 OD}_{490\text{nm}} \text{值} - \text{空白对照 OD}_{490\text{nm}} \text{值}) / (\text{阴性对照 OD}_{490\text{nm}} \text{值} - \text{空白对照 OD}_{490\text{nm}} \text{值})$ 。 $P/N \geq 2.1$ 为阳性, $1.5 \leq P/N < 2.1$ 为可疑, $P/N < 1.5$ 为阴性^[8]。

2 结果与分析

2.1 包被抗原和酶标抗体最佳工作浓度的确定

经方阵试验确定, 包被抗原最佳稀释度为 1:1000, 即抗原每孔包被量为 $100 \mu\text{g}$ 。酶标二抗的最佳稀释度为 1:800。

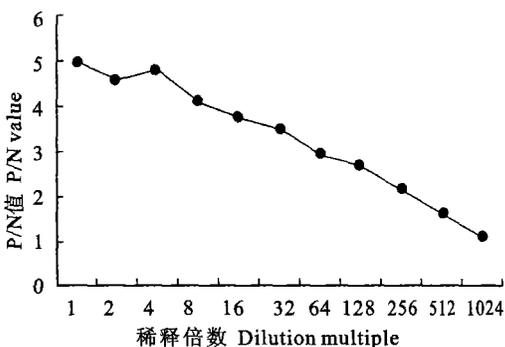


图3 抗 DES 抗体倍比稀释液间接 ELISA 试验结果

Fig. 3 The result of indirect ELISA test to DES antibody

2.2 间接 ELISA 试验检测结果

检测的一组 $\text{OD}_{490\text{nm}}$ 的值分别为 0.737、

0.695、0.718、0.641、0.605、0.578、0.522、0.495、0.439、0.384、0.327 (阳性对照 $\text{OD}_{490\text{nm}}$ 为 0.605, 阴性对照 $\text{OD}_{490\text{nm}}$ 为 0.321, 空白对照 $\text{OD}_{490\text{nm}}$ 为 0.216)。

2.3 倍比稀释液的间接 ELISA 测定结果

从图 3 可以看出, 抗 DES 抗体的间接 ELISA 效价可达 28, 证明本试验合成的人工抗原能够刺激兔体分泌高效价的目的抗体。

3 讨论

小分子化合物 ($\text{MW} < 2500$) 一般不具备免疫原性, 而已烯雌酚的分子量只有 268, 所以不能刺激动物的免疫应答反应而产生抗体。但小分子化合物具有反应原性, 即能与相应抗体发生特异性结合反应。将己烯雌酚以半抗原的形式通过一定碳链长度的连接分子与分子量大的载体以共价键相偶联制备人工抗原, 联接在载体蛋白质上的己烯雌酚便成为特定的抗原决定簇。DES 能否与蛋白结合, 关键取决于能否给 DES 外部基团联接上可与载体蛋白发生结合反应的功能基团。通过本试验, 在 DES 分子上引入了一个 4 碳的直链手臂及一个羧基。手臂结构可减小整个半抗原的空间阻碍效应, 且使半抗原的分子结构远离载体而更加暴露, 使得在用半抗原载体蛋白复合物免疫动物时易被机体识别而产生免疫效应^[9]; 引入的羧基可以使半抗原与载体蛋白的氨基以肽键相联结而合成人工抗原。

在合成 DES HS 的反应中, 反应产物经酸水处理后, 未反应完的酸酐及吡啶均溶于水被除去, 因而剩余的沉淀以 DES HS 为主, 但有少量杂质存在。由于考虑到少量杂质的存在对后面的反应 (与载体蛋白的交联) 无明显影响, 故没有做进一步的纯化处理。

在合成 DES HS BSA 复合物的反应中, 反应液经流水透析和 PBS 溶液透析后, 小分子量的物质均被透析出去, 透析袋内剩余的透析液中只含有 DES HS BSA 和未联接的 BSA, 所以合成的人工抗原是含有 BSA 的人工抗原。

在动物免疫应答过程中, 首次进入机体的抗原剂量以 $200 \sim 1000 \mu\text{g}$ 为佳^[10]。本试验中 DES HS BSA 人工抗原的浓度为 1.7 mg/mL , 所以首次免疫抗原量采用 0.4 mL, 故抗原剂量为 $680 \mu\text{g}$ 。

在抗 DES 抗体的测定中, 考虑到 DES 与人

工合成抗原的分子量相差很大,故采用 ELISA 法测抗体。试验中,为提高酶标反应板的吸附性能,用 SPF 鸡的卵清蛋白包被酶标反应板之后再包被抗原。抗原的包被量主要决定于抗原的免疫反应性和所要检测抗体的浓度。一般纯化抗原所需包被量以每孔 20~200 μg 为宜。本试验将抗原以包被液作 1:200~1:2000 稀释,酶标抗体作 1:500~1:2000 稀释,用方阵法检测抗原及酶标抗体工作浓度,均取得了理想的结果。

参考文献:

[1] Heizman R J. Veterinary Drug Residues[M]. Report Eur. 15126 EN Published on behalf of European Communities, 1994. 24~26.
 [2] Nielsem M, Björnsson S, Høyer P E, *et al.* Ontogeny of oestrogen receptor in gonads and sexducts of fetal and newborn mice[J]. *Reprod Fertil* 2000, 118: 195~204.

[3] 王振国, 宋广义, 王君双. 食品农药残留免疫学检测技术[J]. *吉林农业大学报*, 1997, 19(3): 113~120.
 [4] Gosling J P. Immunoassays A practical approach[M]. Oxford University Press, 2000. 174.
 [5] 姜玲, 章文才, 柯云, 等. 抗斛皮素抗体的研制[J]. *免疫学杂志*, 2000, 16(5): 383~386.
 [6] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 上海: 人民军医出版社, 1997. 11~26.
 [7] 梁宋平, 生物化学与分子生物学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003, 126~138.
 [8] Bailey N C, Fidanza V, Mayer R, *et al.* Activation of clones producing self reactive antibodies by foreign antigen and anti idiotypic antibody carrying the internal image of the antigen[J]. *Clin Invest*, 1989, 84(3): 744~756.
 [9] 李俊锁, 钱传范. 兽药残留免疫分析及其进展[J]. *中国兽医学报*, 1998, 18(4): 411~413.
 [10] 崔治中, 崔保安. 兽医免疫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004. 247.

(上接第 16 页)

[6] 连珠, 张承忠, 李冲, 等. 蒙药广枣化学成分的研究[J]. *中药材*, 2003, 26(1): 23~24.
 [7] 陈孟兰, 阮金兰. 乌金草化学成分研究[J]. *医药导报*, 2005, 24(4): 270~272.
 [8] 苏亮, 楼凤昌, 郑卫平, 等. 银杏枝皮化学成分的研究[J]. *药物生物技术*, 1999, (4): 245~248.
 [9] 浮光苗, 余伯阳, 朱丹妮. 月腺大戟化学成分的研究[J]. *中国药科大学学报*, 2003, 34(4): 377~379.
 [10] 唐京生, 陈谨, 田军, 等. 峨眉海桐化学成分的研究[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2002, 39(3): 338~341.
 [11] 王恒山, 王光荣, 谭明雄, 等. 中药马骊卵的化学成分研究[J]. *广西植物*, 2004, 24(2): 155~157.
 [12] 刘法锦, 孙冬梅. 中药蜂蜡降血脂有效成分的研究[J]. *中国中药杂志*, 1996, 21(9): 553~554.
 [13] 中国科学院上海药物研究所植物化学研究室编译. 黄酮体化合物鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1981.
 [14] Tulyaganov TS, Nazarov O M, Makhmudov O E, *et al.* N-ALLYLISONITRARINE AND NARCISSIN FROM PLANTS OF THE Nitraria GENUS[J]. *Chemistry of*

Natural Compounds, 2001, 37(5): 470~473.
 [15] Hong Liang, Yan Jing Bai, Yu Ying Zhao, *et al.* The Chemical Constituents from the Roots of *Bupleurum chinense* DC[J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences* 1998 7(2): 98~99.
 [16] Yu Biao CHENG, Dong Ming ZHANG, Shi Shan YU. Chemical Constituents of *Smilaxperfoliata*[J]. *ActaBotanicaSinica*, 2004, 46(5): 618~620.
 [17] 彭江南, 冯孝章, 梁晓天. 耳草属植物的化学研究 VI. 黄毛耳草化学成分分离和鉴定[J]. *中草药*, 1999, 30(3): 34~36.
 [18] 柴兴云, 李萍, 唐力英. 山银花化学成分研究[J]. *中国中药杂志*, 2004, 29(9): 865~867.
 [19] 张雯洁, 刘玉清, 李兴从, 等. 云南“生态茶”的化学成分[J]. *云南植物研究*, 1995, 17(2): 204~208.
 [20] 斯建勇, 高光跃, 陈迪华. 云南山碴果化学成分的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 1994, 6(2): 49~51.
 [21] 梁侨丽, 丁林生. 枳椇叶的化学成分研究(I) [J]. *中草药*, 1996, 27(10): 581~583.