

己烷雌酚抗原合成和多克隆抗体制备

李 宁,张 巍,张治成

(哈尔滨市兽药饲料监察所,黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:为了对己烷雌酚进行检测,采用混合酸酐法,合成具有己烷雌酚基本分子结构特性的半抗原。以己烷雌酚-牛血清白蛋白为抗原免疫家兔,获得了特异性的己烷雌酚多克隆抗体。结果表明:己烷雌酚半抗原与牛血清白蛋白偶联的摩尔比为 12.93:1。今后可将所得抗体用于间接竞争性酶联免疫吸附分析法用于己烷雌酚的检测。

关键词:己烷雌酚;多克隆抗体;酶联免疫吸附分析

中图分类号:S859.84 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)10-0083-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.10.0083

己烷雌酚(hexoestrol, HES),为人工合成的二苯乙烯类雌激素药,其化学名称为 3,4-二(4-羟基苯基)己烷,分子式为 $C_{18}H_{22}O_2$,分子量为 270.37。HES 作为一种雌性激素,能够维持生物体雌性特征,促进生殖器官生长发育,对丘脑下部及垂体能起正、负反馈作用。在养殖生产中通过蛋白质的同化作用,能提高饲料转化率并促进动物生长,因此被广泛地应用于畜禽养殖、水产养殖中^[1-2]。

从 20 世纪 50 年代中期开始,美国和英国就已分别对牛采用己烷雌酚和己烯雌酚作为饲料添加剂或植入物,由于效果显著,养殖场对这两种药物的使用数量日益增加^[3]。然而,研究证明,长期使用激素类药物,动物体内容易造成药物残留,对人类健康将造成严重的威胁。我国制定《动物性食品中兽药最高残留限量》以及《饲料药物添加剂使用规范》,已禁止其在动物生产中使用,不得检出。然而,由于巨大经济利益的驱使,滥用己烷雌酚的现象依然存在,研究人员发展了许多检测方法用以测定 HES 在饲料中及动物源性食品中的残留,主要有高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱-质谱法(GC-MS)、毛细管电色谱技术(Capillary electrochromatography, CEC)、薄层色谱法(TLC)等^[4-7],但这些理化方法前处理比较复杂,而且对待测物蒸气压、热稳定性、卤素、发色团等理化性质有一定限制,使检测的灵敏度降低。酶联免疫吸附分析法(ELISA)^[8]简便、快速、灵敏

度高,足以弥补这些不足,尤其适用于现场监控和大规模样本的快速筛选,目前许多兽药残留已建立免疫测定法,如己烯雌酚、链霉素、磺胺二甲嘧啶、莫能菌素等^[9-11]。但是目前关于己烷雌酚的 ELISA 研究方法的文献未见有报道,还有待进一步的研究探讨。本研究旨在将合成的己烷雌酚多克隆抗体用于研究快速检测己烷雌酚的 ELISA 试剂盒,对食品安全监督以及技术储备都有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料己烷雌酚标准品购于中国药品生物制品检定所;包被原(DES-OVA)、己烷雌酚多克隆抗体由北京维德维康生物技术有限公司制备;羊抗兔酶标抗体 IgG-HRP 购于 Sigma 公司;其它试剂均为国产分析纯。所用试剂有二甲基甲酰胺(DMF)、氢氧化钠、4-溴丁酸乙酯、四氢呋喃(THF)、氢氧化锂、盐酸、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、牛血清白蛋白(BSA)、磷酸盐缓冲液(PBS)、卵清蛋白(OVA)、包被液:0.05 mol·L⁻¹ pH9.6 碳酸盐缓冲液、洗涤液:0.01 mol·L⁻¹ pH7.4 PBST、封闭液:含 5% OVA 的 0.1 mol·L⁻¹ PBS、抗体稀释液:含 6% 山羊血清的 0.2 mol·L⁻¹ PBS、A 液:2% 过氧化脲的水溶液、B 液:1% 四甲基联苯胺的水溶液、终止液:2 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 溶液。试验所用仪器为双显恒温磁力加热搅拌器(SH-3 型,北京金紫光科技发展有限公司)、电子分析天平(BSA124S 型,赛多利斯科学仪器公司)、酶标仪(MK3 型, Thermo 公司)、超纯水仪(Milli-Q 型,美国 Millipore 公司)、高速冷冻离心机(GL-20G-II 型,上海安亭科学仪器厂)和高效

收稿日期:2016-09-05

基金项目:哈尔滨市科技攻关计划资助项目(2014AB3BN041)

第一作者简介:李宁(1979-),女,黑龙江省哈尔滨市人,硕士,高级兽医师,从事饲料及兽药检测研究。E-mail:lining-catherine@163.com。

液相色谱-质谱联用仪(XE VAB430 型,Waters 公司)。供试动物新西兰雌性大白兔,体重约 2 kg。

1.2 方法

1.2.1 己烷雌酚半抗原合成 从图 1 可知,在 50 mL 圆底烧瓶中加入己烷雌酚原料药 540 mg,加入 5 mL 的 DMF 搅拌 15 min 后 20~24 °C 加入 70% 的氢氧化钠 82.3 mg,20~24 °C 磁力搅拌反应 1 h。20~24 °C 滴加 4-溴丁酸乙酯 468 mg,磁力搅拌反应 1 h,将反应液滴加到 45 mL 冰水中析出类白色固体,过滤,滤饼用 10 mL 水洗,收集

滤饼 50 °C 鼓风干燥 5~6 h 得己烷雌酚丁酸乙酯 520 mg 中间体。

在 50 mL 圆底烧瓶中加入己烷雌酚丁酸乙酯中间体 500 mg,THF 10 mL,20~24 °C 磁力搅拌 15~30 min 后滴加 1 mol·L⁻¹ 氢氧化锂水溶液 3.25 mL,20~24 °C 磁力搅拌 3~4 h 后 35~40 °C 减压浓缩,残留物中加入 20 mL 水,1 mol·L⁻¹ 盐酸调 pH 到 5.0~6.5,析出类白色固体,过滤,滤饼用 10 mL 水洗,收集滤饼 50 °C 鼓风干燥 5~6 h 得到 400 mg 己烷雌酚丁酸半抗原。

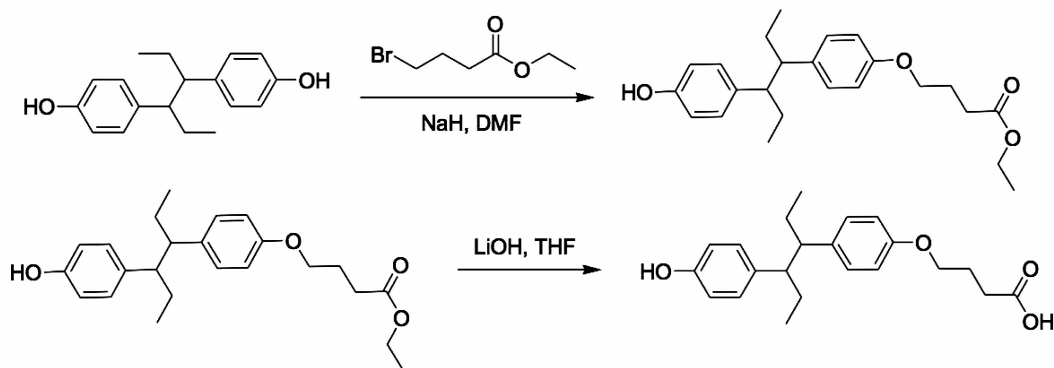


图 1 己烷雌酚半抗原合成反应方程式

Fig. 1 The synthesis hapten reaction equation of HES

1.2.2 己烷雌酚免疫原制备 将 15.95 mg 己烷雌酚半抗原用 1.5 mL DMF 溶解,200 r·min⁻¹ 搅拌 10 min,加入 EDC 21.5 mg,溶解后再加入 NHS 13 mg,室温搅拌(500 r·min⁻¹)活化 2~3 h。

称取 BSA 50 mg 溶于 3.5 mL 0.1 mol·L⁻¹ 碳酸氢钠溶液中,200 r·min⁻¹ 搅拌 10 min,使其充分溶解,将步骤 1 反应液在反应盒中冰浴(<4 °C)搅拌(1 000 r·min⁻¹)中逐滴加入(1 mL·min⁻¹),搅拌(500 r·min⁻¹)反应 24 h。将反应产物装入蒸馏水冲洗干净透析袋(10 cm),1 L 0.01 mol·L⁻¹ PBS(1 L,pH7.2)4 °C 搅拌(100 r·min⁻¹)透析 3 d,每天换液 3 次(早中晚各 1 次),共计换液 9 次,将透析产物 5 000 r·min⁻¹ 离心 6 min,每管分装 1.5 mL,将抗原编号,-20 °C 保存备用。

1.2.3 己烷雌酚包被原制备 将 15.95 mg 己烷雌酚半抗原用 1.5 mL DMF 溶解,200 r·min⁻¹ 搅拌 10 min,加入 EDC 21.5 mg 溶解后再加入 NHS 13 mg,室温搅拌(500 r·min⁻¹)活化 2~3 h。称取 OVA 33.6 mg 溶于 3.5 mL 0.1 mol·L⁻¹ 碳酸氢钠溶液中,200 r·min⁻¹ 搅拌 10 min,使其充分溶解,将步骤 1 反应液在反应盒中冰浴(<4 °C)搅拌(1 000 r·min⁻¹)中逐滴加入(1 mL·min⁻¹),

搅拌(500 r·min⁻¹)反应 24 h。将反应产物装入蒸馏水冲洗干净透析袋(10 cm),1 L 0.01 mol·L⁻¹ PBS(1 L,pH7.2)4 °C 搅拌(100 r·min⁻¹)透析 3 d,每天换液 3 次(早中晚各一次),共计换液 9 次,将透析产物 5 000 r·min⁻¹ 离心 6 min,每管分装 1.5 mL,将抗原编号,-20 °C 保存备用。

1.2.4 多克隆抗体的制备 选取体重约 2 kg 的新西兰雌性大白兔,采取背部皮下多点注射的方式进行免疫。初次免疫时,取一定量的免疫原与等体积的弗氏完全佐剂混匀乳化,直至形成乳白色的油包水型乳浊液,然后进行注射。间隔一定时间后进行加强免疫(佐剂为 IFA)。加强免疫的第 7 天,耳缘静脉取血测血清效价,最后一次采用颈动脉取血,离心得到多抗血清。每种抗原的免疫剂量是每只兔子 1 000 μg,免疫的时间间隔是 21 d,将收集得到的己烷雌酚多抗血清用蛋白 A 亲和柱进行纯化。

1.2.5 ELISA 工作条件的确立 (1)包被原(DES-OVA)用包被液进行 1:16 000 稀释,加入 96 孔酶标板,每孔 50 μL,37 °C 恒温避光反应 2 h;(2)甩掉酶标板中液体,在每孔加入 260 μL 洗涤液,重复洗板 4 次,甩干;(3)每孔加入 200 μL

封闭液,于 37 ℃ 恒温避光反应 2 h,洗涤液洗涤 1 次,甩干;(4)标准品溶液 3 倍稀释(0.0、0.1、0.3、0.9、2.7、8.1 μg·kg⁻¹)后,用移液器吸每孔吸取 50 μL,用抗体稀释液将抗体进行 1:8 000 稀释,每孔吸取 50 μL,每个浓度做两个平行孔,25 ℃ 避光反应 30 min,用洗涤液洗板 4 次,甩干;(5)加入 1:10 000 稀释后的羊抗兔 IgG-HRP,每孔加入 100 μL,25 ℃ 避光反应 30 min,用洗涤液洗板 4 次,甩干;(6)加入终止液每孔吸取 50 μL 终止

显色反应;(7)用酶标仪测定 450 nm 波长下的 OD₄₅₀ 值。

2 结果与分析

2.1 己烷雌酚半抗原鉴定

图 2 是己烷雌酚提纯后的半抗原,对所得 400 mg 己烷雌酚丁酸半抗原进行质谱检测, mass=356.4。因此可以判定样品中含有目标水解产物己烷雌酚半抗原。

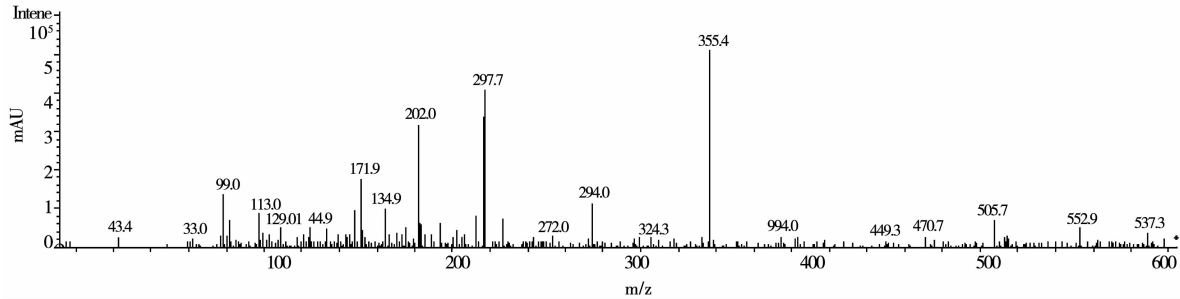


图 2 己烷雌酚半抗原质谱
Fig. 2 The hapten mass spectrometry of HES

2.2 载体蛋白的偶联结果

由图 3 看出:BSA 的分子量为 66 288.367 Da,己烷雌酚半抗原分子量为 356.46 Da,DES-BSA 的分子量为 70 895.5 Da,DES-BSA 偶联

比=(70 895.5-66 288.367)/356.46=12.93。即免疫原中,所述己烷雌酚半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联的摩尔比为 12.93:1。

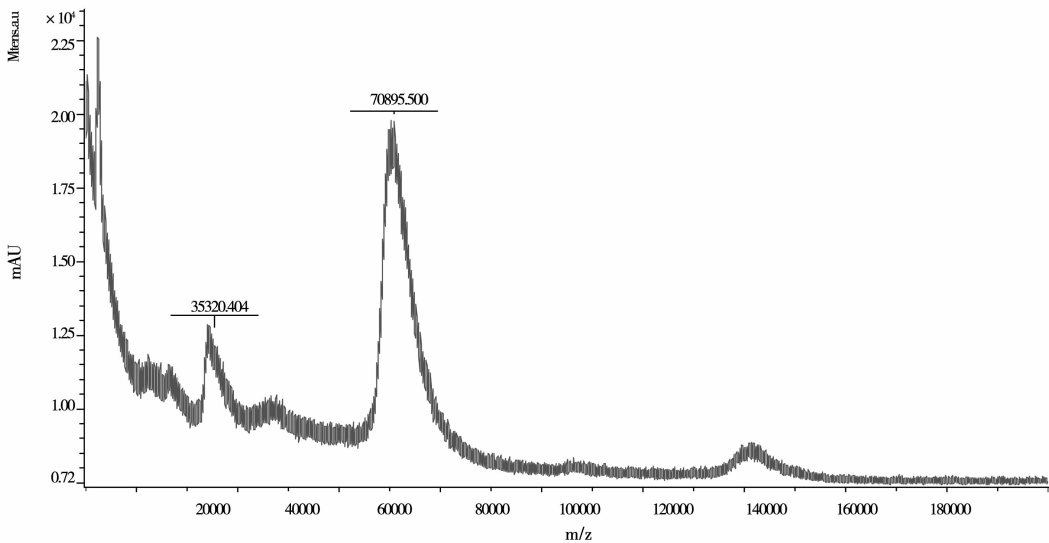


图 3 己烷雌酚免疫原 MALDI-TOF-MS
Fig. 3 The immunogen MALDI-TOF-MS of HES

2.3 多克隆抗体制备分析

将收集得到的己烷雌酚多抗血清用蛋白 A 亲和柱进行纯化,经 NANODROP 2000 检测,HEX 和 E3 抗体浓度分别为 4.5、6.4 mg·mL⁻¹,

将纯化后的抗体分别进行 SDS-PAGE,抗体重链 50 kDa,轻链 25 kDa,电泳图谱见图 4。

2.4 ELISA 工作条件的确立

根据试验结果,确定包被抗原稀释 500 倍 即

包被浓度为 $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 抗体稀释 10 000 倍时, OD 值较高, 抑制最好。确定最佳的工作浓度, 有助于保证标准曲线的灵敏度。

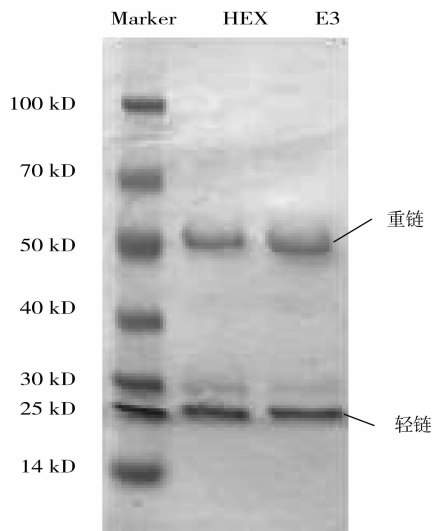


图4 己烷雌酚抗体电泳图

Fig. 4 The electrophoresis of HES antibody

3 结论

己烷雌酚是一个结构比较复杂的化合物,所以在抗体制备过程中,除了半抗原合成这一关键因素之外,抗原鉴定和包被原的偶联比率以及免疫程序都是至关重要的。在本试验免疫原的合成中,对混合酞酐法进行了适当的修改,通过调节反应液的pH、缓冲液的浓度等来控制参加偶联反应的游离基团数,从而达到控制偶联比率的目的。关于己烷雌酚的检测,我国主要依赖复杂繁琐的理化方法或从进口国外昂贵的试剂盒,因此发展己烷雌酚的抗体制备技术,并开发我国自己的检测试剂盒是非常

必要的。本课题研究现已成功制备了己烷雌酚的单克隆抗体,有望开发相应的试剂盒。

参考文献:

- [1] 贺家亮,李开雄,于见亮,等. 动物性食品兽药残留现状及对策[J]. 中国动物检疫, 2006, 23(7): 22-24.
- [2] 张建勋,崔玉兰,从玉艳. 兽药残留的危害与兽药残留监控对策[J]. 兽药与管理, 2004(7): 30-33.
- [3] Leighton J. European estradiol-17 β , progesterone and testosterone. In: the 52nd Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives [C]. World Health Organization, Geneva, 2000, 121-124.
- [4] 王凌云,李洁珍,黎敏,等. 高效液相色谱法测定水产品中4种雌激素的残留量[J]. 化学分析计量, 2005, 14(4): 38-4.
- [5] Williams A T, W in field A T. Dns derivatization of anabolic agents with high-performance liquid chromatographic separation and fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography, 1982, 240: 224-229.
- [6] Lagana A. General and selective isolation procedure for high-performance liquid chromatographic determination of anabolic steroids in tissues[J]. Journal of Chromatography, 1991, 588: 89-98.
- [7] Reuvers T H, Perogordo E, Jimenez R. Rapid screening method for the determination of diethylstilbestrol in edible animal tissue by column liquid chromatography with electrochemical detection [J]. Journal of Chromatography, 1991, 564: 477-484.
- [8] 胥传来,彭池方,郝凯,等. 己烷雌酚人工抗原的合成与分析[J]. 中国兽医科技, 2005, 35(7): 561-564.
- [9] Busico F, Moretti G, Cartoni G P. Determination of estrogens in animal tissues by GC-MS with negative ion chemical ionization[J]. Journal of High Resolution Chromatography, 1992, 15(2): 94-98.
- [10] 沈建忠,钱传范,杨汉春,等. 链霉素在鸡组织中残留检测方法的研究 I. 酶联免疫吸附测定(ELISA)[J]. 畜牧兽医学报, 1999, 2(30): 5-12.
- [11] Marcos V, Perogordo E, Espinosa P, et al. Multiresidue analysis of anabolic compounds in bovine hair by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Analytical Chemical Acts, 2004, 507: 219-227.

Synthesis of Antigen and Preparation of Multi-colonial Antibody Against Hexoestrol

LI Ning, ZHANG Wei, ZHANG Zhi-cheng

(Institute of Veterinary Drug and Food Control in Harbin, Harbin, Heilongjiang 150070)

Abstract: In order to detect hexoestrol, the antibody of HES was prepared with anhydride method for detecting HES residues later. Hapten with carboxylic that preserved the molecule structure character of diethylstilbestrol was synthesized. Polyclonal antibodies for diethylstilbestrol were obtained by immunizing rabbits with immune antigen that obtained by conjugated hapten with bovine serum albumin in DES-BSA. The results showed that hexoestrol hapten and bovine serum albumin (BSA) conjugated molar ratio was 12.93:1. In the future, the resulting antibodies could be used for the detection of indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assays for the hexoestrol.

Keywords: hexoestrol; multi-clonial antibody; ELISA