

己烯雌酚人工抗原的合成及多克隆抗体的制备

张书杰¹, 雷雅静¹, 徐晓倩¹, 施卫星², 陈枢青¹

(1. 浙江大学药学院药理毒理与生化药学研究所, 浙江 杭州 310058;

2. 浙江大学医学院公共卫生学院, 浙江 杭州 310058)

[摘要] **目的:**合成己烯雌酚人工抗原,制备效价高、特异性好的己烯雌酚多克隆抗体。**方法:**以己烯雌酚(DES)、溴乙酸乙酯、牛血清白蛋白(BSA)和鸡卵清蛋白(OVA)等作为合成的主要原料,采用亲核取代反应,合成己烯雌酚衍生物(DES-HS),用电喷雾电离质谱(ESI-MS)鉴定合成是否成功;然后,将DES-HS与BSA(OVA)偶联合成人工抗原,并用紫外扫描法以及高效液相色谱鉴定人工抗原是否制备成功。最后,用DES人工抗原动物免疫以获得DES多克隆抗体。**结果:**成功合成了偶联率为22:1的己烯雌酚人工抗原。利用已合成的人工抗原制备出了效价为1:25 600、 IC_{50} 为10.81 ng/ml的己烯雌酚多克隆抗体。**结论:**建立了己烯雌酚人工抗原合成和鉴定以及制备己烯雌酚多克隆抗体的方法。

[关键词] 乙底酚/免疫学;血清白蛋白,牛;双香豆乙酯;色谱法,高压液相;光谱法,质量,电喷雾电离;免疫学技术

[中图分类号] R 392-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2013)01-0025-07

Synthesis of artificial diethylstilbestrol antigen for preparation of polyclonal antibodies

ZHANG Shujie¹, LEI Yajing¹, XU Xiaoqian¹, SHI Weixing², CHEN Shuqing¹ (1. *Institute of Pharmacology, Toxicology and Biological Pharmaceutics; College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China*; 2. *Department of Public Health, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China*)

[Abstract] **Objective:** To synthesize artificial diethylstilbestrol (DES) antigen and to prepare DES polyclonal antibody with high titer and sensitivity. **Methods:** The derivative of DES (DES-HS) was synthesized from diethylstilbestrol, ethyl bromoacetate, bovine serum albumin (BSA) and chicken ovalbumin (OVA) with the nucleophilic substitution reaction; the compound was identified by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). The DES-HS and the carrier proteins (BSA, OVA) were cross-linked to prepare the artificial antigen; the UV absorption spectrophotometry and high performance liquid chromatography (HPLC) were used to identify the prepared artificial antigen. The rabbits were immunized with the DES artificial antigen to prepare the DES polyclonal antibodies. **Results:** The DES-HS was synthesized. The DES artificial antigen was prepared successfully with a

收稿日期:2012-10-25 修回日期:2012-11-29

基金项目:浙江省重大科技专项基金(2010C13006);浙江省卫生科研基金(2011KYA044)。

作者简介:张书杰(1987-),女,硕士生。从事环境污染物质的检测研究。

通讯作者:陈枢青(1961-),男,教授,从事生化毒理学研究;E-mail:chenshuqing@zju.edu.cn

coupling rate of 22:1. The DES polyclonal antibodies with a titer of 1:25 600 and IC_{50} of 10.81 ng/ml were prepared with DES artificial antigen. **Conclusion:** A set of methods to synthesize DES artificial antigen and to prepare the DES polyclonal antibodies has been developed successfully.

[**Key words**] Diethylstilbestrol/immunology; Serum albumin, bovine; Ethyl biscoumacetate; Chromatography, high pressure liquid; Spectrometry, mass, electrospray ionization; Immunologic techniques

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2013, 42(1):25-31.]

己烯雌酚(DES)是人工合成的非甾体类雌激素,化学名为(E)-4,4-(1,2-二乙基-1,2-亚乙基)双苯酚,能产生与天然雌二醇相同的药理作用,应用于妇科病的治疗。另外,DES能促进蛋白质的代谢,常用作动物饲料添加剂以提高饲料的利用率。但是,DES可以通过食物链在人体内富集,使人正常的生理功能紊乱。国内外大量研究显示,DES可以使动物和人致癌、致畸,妊娠期间用药还会殃及到下一代,严重威胁着人们的健康。1972年,FAO/WHO禁止使用DES,随后,包括我国在内的世界各国对DES的使用都严格控制或禁止将其用作动物饲料的添加剂^[1]。

目前,DES残留的检测方法有:气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱(LC/MS)联用技术、毛细管电泳法、薄层色谱法(TLC)、荧光分析法、免疫分析法等,其中以免疫分析方法中酶联免疫检测方法(ELISA)应用最多。ELISA与仪器分析技术相比具有快速、简便和灵敏度高等特点^[2]。目前国内所用的检测试剂盒大部分依赖进口,价格昂贵,因此研制DES的检测试剂盒十分有必要。然而,ELISA方法建立的关键是有灵敏度高、特异性好的抗体。抗体的制备是一个复杂的过程,首先要有理想的人工抗原,其次动物免疫的剂量和间隔周期也是一个重要的影响因素。本实验旨在研究DES人工抗原的合成和鉴定方法以及DES多克隆抗体的制备,为进一步研究商品化的DES残留检测试剂盒奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 己烯雌酚(DES)、溴乙酸乙酯、乙腈、牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清蛋白(OVA)、N-羟基琥珀酰亚胺(sulfo-NHS)、

1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)等阿拉丁试剂均购于上海晶纯实业有限公司;N,N-二甲基甲酰胺(DMF)购于杭州化学试剂有限公司;弗氏完全佐剂CFA、弗氏不完全佐剂IFA购于美国SIGMA;新西兰大白兔(雄)购于浙江大学动物实验中心;辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG抗体购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 主要仪器 JMS-700质谱仪购于日本电子株式会社;WATERS-515高效液相色谱仪购于美国Waters公司;UV-265FW紫外分光光度计购于日本岛津公司;酶标仪(BIO-RAD Model 680)购于北京成志科为生物科技有限公司。

1.3 试剂和材料的处理

1.3.1 无水乙腈的制备 量取一定量的分析纯乙腈,加入到圆底烧瓶,再加入适量的CaH₂,在N₂保护下,加热回流6h,用分子筛干燥,即可得到无水乙腈,密封保存放在干燥器中备用。

1.3.2 溴乙酸乙酯的处理 量取一定量的分析纯溴乙酸乙酯,加入一定量的CaCl₂,在N₂保护下,加热回流8h,收集馏分,即可得到无水溴乙酸乙酯,密封保存放在干燥器中备用。

1.3.3 反应试剂的干燥 将待反应的固体试剂(DES、K₂CO₃、EDC、sulfo-NHS)置于真空干燥器中进行干燥,密封保存备用。

1.4 己烯雌酚完全抗原的合成 称取己烯雌酚白色粉末268mg、K₂CO₃690mg及少量的KI,放入三颈瓶中氮气保护,加入5ml乙腈,60℃下回流30min,用微量注射器缓慢加入溴乙酸乙酯20~30μl,反应3h后TLC点板显示溴乙酸乙酯反应完全后,再加入20~30μl溴乙酸乙酯,溴乙酸乙酯共加入110μl。反应完全后,蒸干溶剂,加适量稀盐酸除去K₂CO₃,乙酸乙酯萃取3次,取有机相蒸干,加入少量的甲

醇溶解,滴加稍过量的5%的NaOH溶液,回流24 h,待碱水解完全后,用稀盐酸酸化,乙酸乙酯萃取4次,有机相蒸干即得粗产物^[3]。TLC点板显示,粗产物中有3个点,从下向上依次为原料点、一端添加了羧基的DES衍生物、两端都添加了羧基的DES衍生物(图1)。

1.5 TLC点板摸索分离条件 当石油醚:乙酸乙酯:乙酸=24:20:2时,中间对应点的 R_f 值在0.3左右,按此条件配制展开剂,分离出中间的点,将有机溶剂蒸干即可得到一端添加了连接臂的DES-HS,计算收率。收率=目的产物生成量/反应物进料量 $\times 100\%$ 。

1.6 人工抗原的制备 采用EDC/sulfo-NHS

法^[4]将一端添加羧基的DES-HS和载体蛋白BSA(OVA)进行偶联。称取4 mg的DES,按照EDC:sulfo-NHS:DES-HS=1:2:2的摩尔比,用尽量少的乙醇溶解,37℃活化2 h。称取3 mg的BSA,用8 ml的1 $\times$ PBS溶解,搅拌均匀,4℃预冷。将活化好的DES-HS尽量缓慢地滴加到BSA溶液中,4℃反应过夜后,过膜,装入透析膜中,用1 $\times$ PBS透析4 d,换透析液大约10次,透析完全后得到纯化后的DES完全抗原(BSA-DES,图2)^[5],分装后置于-20℃冷冻保存。然后,采用同样的方法制得包被原OVA-DES,置-20℃冷冻保存。

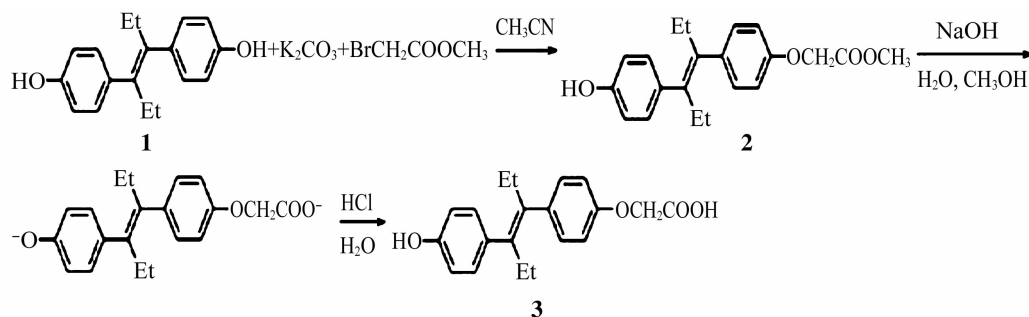


图1 己烯雌酚衍生物的合成

Fig.1 The synthesis of DES derivatives

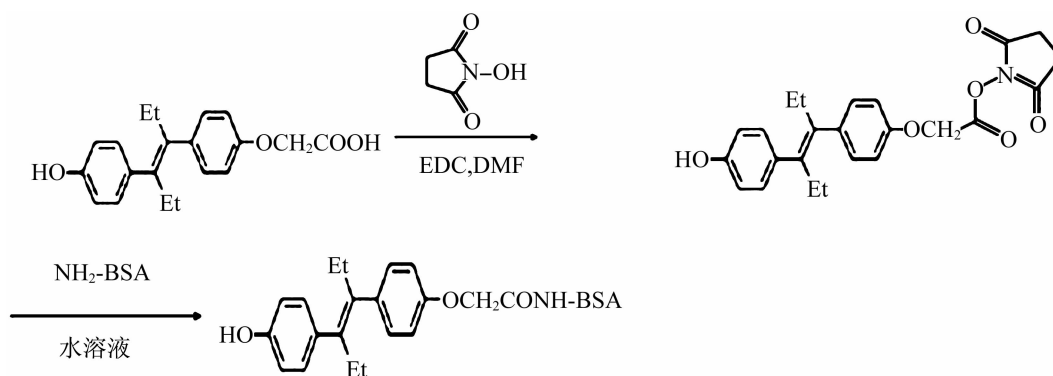


图2 DES人工抗原的合成

Fig.2 The synthesis of DES artificial antigen

1.7 人工抗原的鉴定^[7-8]

1.7.1 紫外扫描鉴定 将偶联前的BSA溶液与偶联后并透析完全的BSA-DES溶液以及小分子溶液(将DES用甲醇溶解,配制成1 mg/ml

的储备液,取20 μ l加入到1 ml的1 $\times$ PBS溶液中),在200 nm~350 nm波长范围内进行紫外扫描,根据特征吸收峰的变化来判断DES与BSA(OVA)是否成功偶联,并估算BSA(OVA)

与 DES-HS 的偶联率。

1.7.2 HPLC 鉴定 用相同质量浓度(1 mg/ml)的 BSA 与 DES-BSA,以甲醇和水做为流动相,分别选择 248 nm、252 nm 和 280 nm 波长进行检测。

1.8 多克隆抗体的制备^[9-11] 选取 3 只体重大约 2 kg 的新西兰雄性大白兔,采取背部皮下多点注射的方式进行免疫。基础免疫时,取一定量的 DES-HS-BSA 溶液与等量的 CFA 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)。第 2 次加强免疫开始 7 d 后,耳缘静脉取血测血清的效价,直到效价不再升高,最后一次采用颈动脉取血,离心得到血清。第 1 只兔子的免疫剂量是 200 μg ,加强免疫的时间间隔是 1 周;第 2 只兔子的免疫剂量是 100 μg ,加强免疫的时间间隔是 1 个月,第 3 只兔子的免疫剂量为 100 μg ,加强免疫的时间间隔是 2 个月。比较 3 只兔子抗血清的效价,取效价高、特异性好的血清采用辛酸-硫酸铵法^[7]纯化,将得到的多克隆抗体加入一定比例的甘油,置于 -20°C 保存。

1.8.1 间接 ELISA 方法测定抗血清的效价

采用棋盘滴度法确定抗体抗原最佳工作浓度:将兔血清按照 1:800、1:1 600...1:25 600...做倍比稀释,包被原溶液稀释为 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$,进行间接 ELISA 实验。选择 OD 值在 1.0 左右,空白吸收值小,抗原抗体用量最少的浓度,大致确定抗原抗体浓度,然后进一步优化抗原和抗体的工作浓度。以上步骤确定的最佳包被浓度作为抗原的包被浓度,用间接 ELISA 方法测定抗血清的效价。

1.8.2 抗体的特异性 将包被原抗体稀释到最佳工作浓度,标准品(己烯雌酚、雌二醇、雌酮、沙丁胺醇)稀释成 1 000 ng/ml、100 ng/ml、20 ng/ml、10 ng/ml、1 ng/ml、0.1 ng/ml、0 ng/ml,标准品与抗血清同时加入,做间接竞争 ELISA 实验。计算抗体对小分子的 IC_{50} 以及与其他小分子的交叉反应率,交叉反应率 = $\text{IC}_{50\text{DES}}/\text{IC}_{50\text{对照}} \times 100\%$ 。

2 结果和分析

以 DES 为原料,采用溴乙酸乙酯法合成己烯雌酚衍生物(DES-HS),产率为 47.3%。

2.1 DES-HS 的鉴定 采用电喷雾电离质谱(ESI-MS)来鉴定 DES-HS(图 3)。DES-HS 的

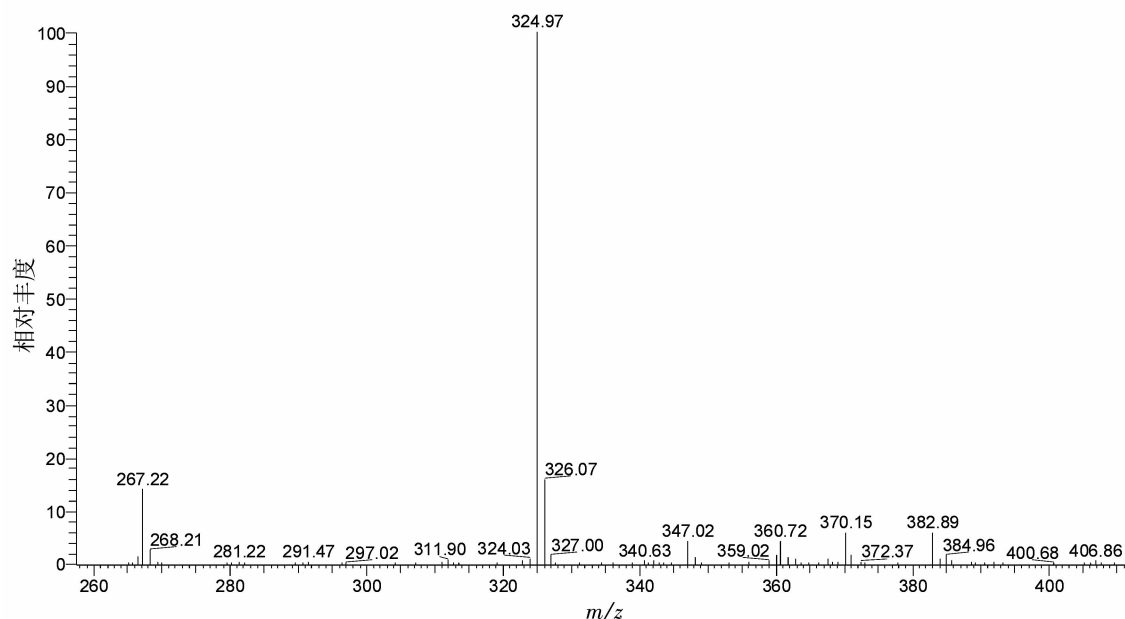


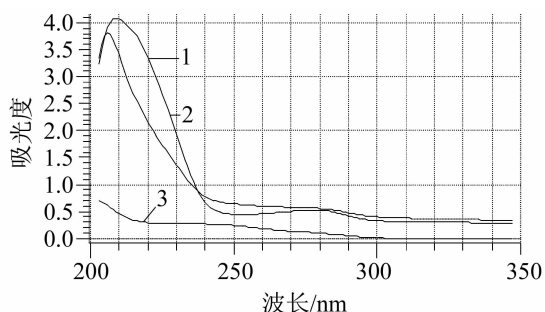
图 3 DES-HS 的质谱分析图

Fig.3 Mass spectrum of DES-HS

分子式为 $C_{20}H_{22}O_4$, 分子量为 326。图谱中特征离子 (m/z) 为 324.97、 $[M-H]^+$ 和 326.07, $[M]^+$, 说明分离后的产物与目标产物一致。另外, 得到的 DES-HS 纯度相对较高, 含有少量的原料杂质, 但不影响人工抗原的制备, 而且原料杂质可通过透析除去, 故合成的 DES-HS 可以用于下一步的偶联反应, 制备人工抗原。

2.2 DES 完全抗原的鉴定

2.2.1 紫外扫描结果 将 DES、BSA 偶联前后的溶液在一定波长范围内扫描。DES 在 250 nm 左右有特征吸收峰, BSA 在 280 nm 处有特征吸收峰, DES-HS-BSA 与 BSA 相比, 在 250 nm 附近和 280 nm 处均有吸收 (图 4), 说明偶联成功。



1: BSA; 2: DES-BSA; 3: DES.

图4 己烯雌酚和牛血清白蛋白偶联前后的紫外扫描图

Fig.4 UV scans of DES and BSA before and after the synthesis

根据文献^[7]报道的方法, 以下公式计算偶联率:

$$C_a/C_b = (OD_{DES-BSA242} \times K_{BSA280} - OD_{DES-BSA280} \times K_{BSA242}) / (OD_{DES-BSA280} \times K_{DES242} - OD_{DES-BSA242} \times K_{DES280})$$

K 为消光系数, C 为各物质摩尔浓度, $K = OD/C$ 。估算 BSA 与 DES 偶联数目为 22:1, 以同样的方法计算 DES-OVA 的偶联率为 15:1。

2.2.2 BSA 与 DES-BSA 的液相色谱分析 采用 PLRP-S 1 000 A 8 μm 150 $\times$ 2.1 mm 色谱柱, 用甲醇和水做为流动相, 进样 20 μl , 检测波长为 252 nm。对比 DES-BSA 与 BSA 的液相色谱图 (图 5、图 6), 两者的出峰时间不同, 吸收峰

不同, 说明偶联成功。

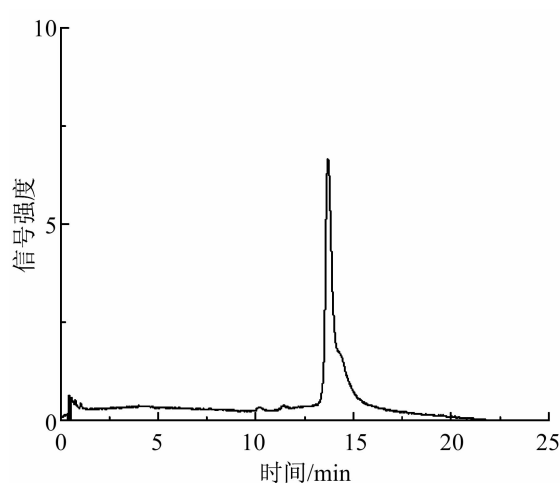


图5 牛血清白蛋白的液相色谱图

Fig.5 HPLC of BSA

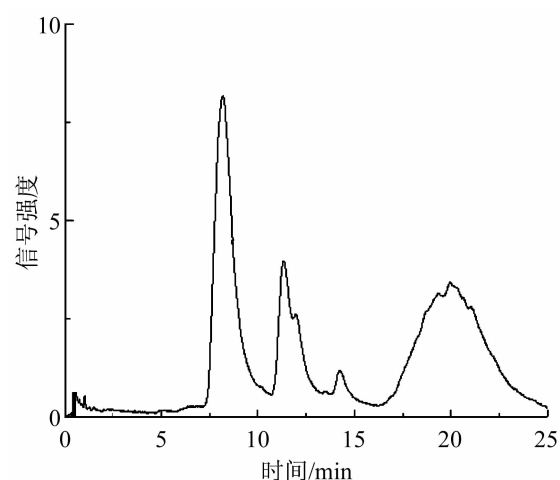


图6 己烯雌酚人工抗原的液相色谱图

Fig.6 HPLC of DES-BSA

2.3 多克隆抗体的制备 采用免疫剂量为 100 μg , 加强免疫时间间隔为 2 个月的免疫方式, 第 4 次加强免疫可以得到 IC_{50} 为 10.81 ng/ml 的抗血清。

2.4 抗体的效价 以第 5 次免疫得到的血清作为抗血清, 在优化好的条件下测定抗体效价, P/N 值 ≥ 2.1 时, 抗体对应的最高稀释浓度为 1:25 600, 抗体的效价可达 1:25 600。

2.5 抗体的特异性 由表 1 可知, 己烯雌酚与其他结构类似的小分子交叉反应率 $< 0.10\%$ 。

表 1 抗血清的 IC_{50} 以及与其他小分子的交叉反应率

Table 1 The IC_{50} of antiserum and the cross-reactivity ratio with other small molecules

小分子	$IC_{50}/(ng \cdot ml^{-1})$	交叉反应率/%
己烯雌酚	10.81	100.00
雌二醇	> 1 000	< 0.10
雌酮	> 1 000	< 0.10
沙丁胺醇	> 1 000	< 0.10

3 讨论

ELISA 方法建立的关键是有灵敏度高、特异性好的抗体。抗体的制备是一个复杂的过程,其中关键步骤是理想的人工抗原的合成。人工抗原包含载体、小分子和连接臂 3 部分,其中连接臂的选择至关重要。连接臂要远离小分子的官能团,以保证半抗原的功能;长度也要合适,太短不容易让半抗原的官能团突出,太长会使半抗原发生疏水性折叠,故本研究采用溴乙酸乙酯法在小分子上添加连接臂,这样既保证了半抗原的功能又不引入其他刺激机体产生抗体的基团;再者,连接臂的长度也应适中^[6]。另外,人工抗原中小分子与 BSA 的偶联率也是抗体制备成功的关键,偶联率太低,不会刺激机体产生抗体;偶联率太高,会使机体产生免疫耐受。本实验参考文献^[7-8]选择人工抗原的最适偶联率为 20~25。DES 的结构中有 2 个对称的酚羟基官能团,若两端都添加了羧基,则与 BSA 偶联后会将 DES 包裹起来,不会刺激机体产生抗体,故需要把 DES 一端的酚羟基暴露,因此本实验将纯度相对较高的一端添加了连接臂的己烯雌酚衍生物。溴乙酸乙酯法与大多数文献报道的混合酸酐法^[7]以及氯乙酸钠法^[8]相比,可以通过控制溴乙酸乙酯的加入量来制备一端添加连接臂的半抗原,副产物较少,容易分离,并且产率可以到达 47.3%,原料分离后还可以继续使用。

另外,由于两端添加连接臂的小分子与一端添加了连接臂的小分子极性相差很小,分离条件的选择也很关键,本实验采用石油醚:乙酸

乙酯:乙酸=24:20:2 做为硅胶柱分离的展开剂分离出相对较纯的 DES 半抗原。

偶联反应受诸多因素的影响,如反应体系的 pH、溶液中的蛋白浓度、EDC 和小分子以及蛋白的比例等,这些因素直接影响着偶联反应的成败。故本实验将 BSA 稀释成 3 mg/8 ml,并将反应体系的 pH 维持在 7.5 左右,以保持 EDC 的反应活性。另外,本实验采用 sulfo-NHS 替代经常使用的 NHS,由于 sulfo-NHS 既可溶于乙醇,又可溶于水,可以增大 DES-HS 经活化后所形成的酯在水中的溶解度,与 EDC/NHS 偶联方法相比可以减少沉淀的产生。

本研究比较了 3 种不同免疫方式对于多克隆抗体制备的影响,结果显示采用小剂量长周期的免疫方式进行动物免疫,可以制备出灵敏度高、特异性好的抗体,这为进一步研究商品化的试剂盒奠定了基础。

References:

- [1] HUANG Fen, YE Shaohui, GONG Zhenming, et al (黄芬,叶绍辉,龚振明,等). The development of diethylstilbestrol [J]. **China Animal Husbandry & Veterinary Medicine**(中国畜牧兽医志),2007,34(2):51-54. (in Chinese)
- [2] DENG Shengliang, LI Ping, YU Hongxia, et al (邓省亮,李平,于洪侠,等). The research progress of diethylstilbestrol residue detection technique [J]. **Chinese Journal of Animal Science**(中国畜牧兽医杂志),2010,46(24):56-60. (in Chinese)
- [3] HIDAHA K, KIMURA T, RUBEN A J, et al. Antimalarial activity enhancement in hydroxymethylcarbonyl (HMC) isostere-based dipeptidomimetics targeting malarial aspartic protease plasmepsin [J]. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**,2008,(16):10049-10060.
- [4] BULPITT P, AESCHLIMANN D, et al. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels [J]. **Journal of Biomedical Materials Research**,1999,(47):152-169.
- [5] WISSINK M J B, BEERNINK R, PIEPER J S, et al. Immobilization of heparin to EDC/NHS-crosslinked collagen characterization and *in vitro* evaluation

- [J]. **Biomaterials**, 2001, (21): 151-163.
- [6] CHEN Dekun, ZHENG Zengren, LEI Lihui, et al (陈德坤, 郑增忍, 雷莉辉, 等). Synthesis of diethylstilbestrol and the preparation of its antibody [J]. **Chinese Journal of Veterinary Science** (中国兽医学报), 2004, 24 (4): 364-365. (in Chinese)
- [7] WU Yuping, WANG Bin, WANG Ziliang, et al (吴玉苹, 王宾, 王自良, 等). Identification of the artificially synthesized salbutamol antigen [J]. **Journal of Henan Agricultural Sciences** (河北农业科学), 2010(5): 94-97. (in Chinese)
- [8] WANG Bei, PENG Chifang, XU Chuanlai, et al. (王蓓, 彭池方, 胥传来, 等). Synthesis and analysis of complete antigen of diethylstilbestrol [J]. **Journal of Chemical Industry and Engineering** (化工学报), 2007, 58(6): 1524-1528. (in Chinese)
- [9] LE T, ZHAO Z W, WEI W, et al. Development of a highly sensitive and specific monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for determination of doxycycline in chicken muscle, liver and egg [J]. **Food Chemistry**, 2012, 134: 2442-2446.
- [10] GUO Ying, FAN Ruosong, YANG Jinqing, et al. Development of a class-specific polyclonal antibody-based indirect competitive ELISA for detecting fluoroquinolone residues in milk [J]. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**, 2012, 13(7): 545-554.
- [11] LU Huitian, LE Jiachang, CHEN Cunshe, et al (吕会田, 乐加昌, 陈存社, 等). A simple and efficient method to test the conjugation ratio for clenbuterol to protein [J]. **Feed Industry** (饲料工业), 2005, 26(3): 57-59. (in Chinese)
- [责任编辑 黄晓花]

《中国介入影像与治疗学》杂志 2013 年征订启事

《中国介入影像与治疗学》杂志创刊于 2004 年,是由中国科学院主管,中国科学院声学研究所主办,中国工程院医药卫生工程学部协办的国家级学术期刊,主编为邹英华教授。刊号:ISSN 1672-8475, CN 11-5213/R。是中国精品科技期刊、中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、中国科学引文数据库核心期刊、中国期刊全文数据库全文收录期刊、荷兰《医学文摘》收录源期刊、俄罗斯《文摘杂志》收录源期刊、波兰《哥白尼索引》收录源期刊。

《中国介入影像与治疗学》杂志以报道介入影像与治疗学、介入超声学、介入材料学、药物学与护理学等方面的临床研究、基础研究以及医、理、工结合的成果与新进展为主,在学术上追求高起点、创新性;在技术上追求先进性、实用性和规范化;信息报导上追求真实性、时效性、可读性。本刊是介入影像、治疗学工作者学习、交流的园地,也是图书馆必备的学术刊物。

《中国介入影像与治疗学》为月刊,64 页,大 16 开本,彩色印刷。单价:16 元,全年定价 192 元。订户可随时向当地邮局订阅,邮发代号:80-220;亦可向编辑部直接订阅,免邮寄费(欢迎通过银行转账,附言栏请注明订阅杂志名称)。

编辑部地址:北京市海淀区北四环西路 21 号大猷楼 502 室;邮编:100190;联系人:孟辰凤

编辑部网址:www.cjiit.com;E-mail:cjiit@mail.ioa.ac.cn;传真:010-82547903;联系电话:010-82547903

银行账户名:《中国医学影像技术》期刊社;开户行:招商银行北京分行清华园支行;账号:110907929010201