



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109575123 A

(43)申请公布日 2019.04.05

(21)申请号 201811324738.8

G01N 33/53(2006.01)

(22)申请日 2018.11.08

C07C 233/47(2006.01)

(71)申请人 中国农业大学

C07C 233/54(2006.01)

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

C07C 231/02(2006.01)

(72)发明人 王战辉 沈建忠 温凯 江海洋

C07C 231/12(2006.01)

杨玲 史为民 张西亚 张素霞

C07C 53/18(2006.01)

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

C07C 51/09(2006.01)

代理人 王文君 陈征

C07C 53/40(2006.01)

(51)Int.Cl.

C07C 51/60(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07C 229/42(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07C 227/18(2006.01)

C07K 1/02(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图5页

C07K 16/44(2006.01)

C12N 5/20(2006.01)

(54)发明名称

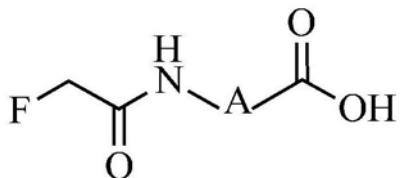
一种氟乙酰胺半抗原及单克隆抗体的制备

方法与应用

(57)摘要

本发明涉及生物化工技术领域,具体公开了一种氟乙酰胺半抗原及单克隆抗体的制备方法与应用。本发明以氟乙酸乙酯、对氨基苯乙酸为主要原料,合成氟乙酰胺半抗原;用活泼脂法将其与载体蛋白牛血清白蛋白(BSA)或血蓝蛋白(KLH)偶联制备偶联物。经试验验证表明,本发明制得的偶联物可使生物体产生针对氟乙酰胺的抗体,即所制得的偶联物为一种氟乙酰胺人工抗原。本发明所制备的氟乙酰胺人工抗原适合用于氟乙酰胺的酶联免疫分析。

1. 一种氟乙酰胺半抗原, 其特征在于, 分子结构式如式(I)所示:



式(I);

其中, A选自苯环或 $(\text{CH}_2)_n$; $n=1\sim 20$ 。

2. 一种氟乙酰胺抗原, 其特征在于, 由权利要求1所述的氟乙酰胺半抗原与载体蛋白偶联得到, 所述载体蛋白为血蓝蛋白或牛血清白蛋白。

3. 权利要求2所述的氟乙酰胺抗原的制备方法, 其特征在于, 采用活泼酯法将载体蛋白偶联于权利要求1所述氟乙酰胺半抗原的羧基碳上。

4. 根据权利要求3所述的制备方法, 其特征在于, 具体包括如下步骤:

(1) 将权利要求1所述的氟乙酰胺半抗原溶解于二甲基甲酰胺中, 得到半抗原溶液;

(2) 在上述半抗原溶液中, 加入二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺, 搅拌反应;

(3) 将载体蛋白溶于PBS缓冲液中, 得到蛋白溶液;

(4) 将步骤(2)的液相逐滴加入到步骤(3)制备的蛋白溶液中, 边滴加边搅拌;

作为优选, 具体包括如下步骤:

(1) 称取50mg权利要求1所述的氟乙酰胺半抗原溶解于1mL二甲基甲酰胺中, 得到半抗原溶液;

(2) 在上述半抗原溶液, 加入80mg二环己基碳二亚胺和60mg N-羟基琥珀酰亚胺, 室温搅拌反应2h;

(3) 称取160mg载体蛋白溶于20mL PBS缓冲液中, 得到蛋白溶液;

(4) 将步骤(2)的液相逐滴加入到步骤(3)制备的蛋白溶液中, 边滴加边搅拌;

上述步骤中涉及到的质量和体积可等比例扩大或缩小。

5. 一种氟乙酰胺抗体, 其特征在于, 由权利要求2所述的氟乙酰胺抗原免疫动物后制备得到。

6. 根据权利要求5所述的氟乙酰胺抗体, 其特征在于, 所述抗体为氟乙酰胺单克隆抗体或多克隆抗体。

7. 分泌权利要求5或6所述氟乙酰胺抗体的杂交瘤细胞。

8. 权利要求5或6所述的抗体在检测氟乙酰胺类化合物中的应用。

9. 一种酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于, 含有权利要求5或6所述的抗体。

10. 根据权利要求9所述的试剂盒, 其特征在于, 将血蓝蛋白作为载体蛋白的抗原作为免疫原, 免疫动物制备抗体, 将牛血清白蛋白作为载体蛋白的抗原作为包被原。

一种氟乙酰胺半抗原及单克隆抗体的制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物化工技术领域,具体地说,涉及一种氟乙酰胺半抗原及单克隆抗体的制备方法与应用。

背景技术

[0002] 氟乙酰胺 (fluoroacetamide) ,又称2-氟乙酰胺、敌蚜胺、邱氏灭鼠药。纯品为无味、无臭白色针状结晶或白色粉末,易溶于水 (1:5) ,在酸性、中性水溶液中水解为氟乙酸 (fluoroacetic acid) ,在碱性水溶液中水解为氟乙酸钠 (sodiumfluoroacetate) 。制作工艺简单,由氯乙酰胺氟化而得。氟乙酰胺可通过皮肤、呼吸道和消化进入体内,造成中毒事件,若抢救不及时引发死亡,影响三磷酸腺苷的生成以及中间产物代谢过程,生成的氟乙酰和氟柠檬酸可造成心、脑、肺、肝等多脏器的损伤,氟乙酰胺阻止三羧酸循环的过程又导致高活性氧自由基激增,ATP生成的减少,细胞膜结构松散,电子结构不稳定,因此,极容易被氧自由基夺去电子,所以细胞膜容易被自由基攻击。由于其强神经毒性,且具有二次带毒现象,对大白鼠急性口服致死中量 (LD50) ,氟乙酰胺为5.3mg/kg,氟乙酸钠为0.22mg/kg,还易被皮肤吸收,又无警戒性,且易造成二次中毒。猫吃了用氟乙酰胺或氟乙酸钠杀死的老鼠会中毒致死,鸟吃了用氟乙酰胺杀死的害虫会被毒死,猫和狗吃了被毒死的鸟也会中毒致死。

[0003] 由于氟乙酰胺的剧毒、速效、合成简单、价格便宜和不易产生耐药性等特点,被用于投毒事件时有发生,因此,完善快速检测机制和采用对症的治疗方法可以在最大程度上降低氟乙酰胺对人类健康的危害。目前,氟乙酰胺的检测方法主要有基于理化和免疫的分析方法,前者包括薄层色谱法、化学显色法、气相色谱法、高效液相色谱法等。化学显色法是目前常用的快速检测方法,氟乙酰胺遇到强碱性的奈氏试剂水解生成氨,与奈氏试剂作用生成黄棕色沉淀,最低检出量0.5 μ g,阳性率:51.57%,虽然操作简便,成本低廉,检测迅速,但由于是化学半定量检测方法,灵敏度低,阳性率低等,已经难以满足检测限的需要;而其他仪器分析方法虽然灵敏度高、重现性好,但同时存在耗时、检测仪器昂贵、操作复杂等特点,不能满足现场快速检测的需求;而酶链免疫吸附反应、免疫芯片等免疫学检测方法由于节省时间、成本低、操作简便,适合现场检测,正逐步受到我国各质检相关部门的重视。

[0004] 氟乙酰胺作为半抗原,需将其与载体蛋白偶联后,才能具备刺激动物产生抗体的免疫原性。但由于氟乙酰胺是小分子物质,相对分子量只有76,不具有免疫原性,此外,虽然氟乙酰胺有裸露的氨基,但由于构成酰胺键,不易发生化学反应。这给研究氟乙酰胺的免疫学检测方法带来很大困难,也在一定程度上阻碍了免疫学方法的应用和推广。

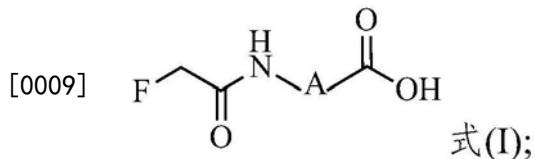
[0005] 综合上述原因,研究氟乙酰胺偶联物制备方法是非常必要的。

发明内容

[0006] 为了解决现有技术中存在的问题,本发明的目的是提供一种氟乙酰胺半抗原及单克隆抗体的制备方法与应用。

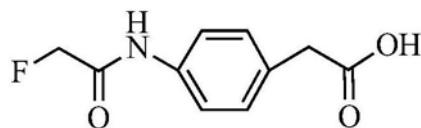
[0007] 为了实现本发明目的,本发明的技术方案如下:

[0008] 第一方面,一种氟乙酰胺半抗原,分子结构式如式I所示:



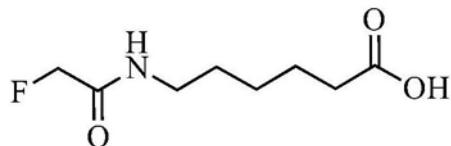
[0010] 其中,A选自苯环或 $(CH_2)_n$;n=1~20。

[0011] 在本发明的具体实施方式中,以A为苯环,和A为 $(CH_2)_4$ 作为示例性说明,二者的化学结构式如式II和式III所示:



式 (II)

[0012]



式 (III)

[0013] 更进一步地,基于前述半抗原的开发,本发明提供一种氟乙酰胺抗原,采用活泼酯法将载体蛋白偶联于前述氟乙酰胺半抗原(FLU)的羧基碳上而得到,所述载体蛋白为血蓝蛋白(KLH)或牛血清白蛋白(BSA),所得氟乙酰胺抗原为FLU-KLH或FLU-BSA。

[0014] 在后续实验操作和试剂盒的制备中,以FLU-KLH作为免疫原,FLU-BSA作为包被原。

[0015] 所述氟乙酰胺抗原的制备方法具体包括如下步骤:

[0016] (1) 将前述氟乙酰胺半抗原溶解于二甲基甲酰胺(DMF)中,得到半抗原溶液;

[0017] (2) 在上述半抗原溶液中,加入二环己基碳二亚胺(DCC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),搅拌反应;

[0018] (3) 将载体蛋白溶于PBS缓冲液中,得到蛋白溶液;

[0019] (4) 将步骤(2)的液相逐滴加入到步骤(3)制备的蛋白溶液中,边滴加边搅拌;

[0020] 作为优选,具体包括如下步骤:

[0021] (1) 称取50mg所述氟乙酰胺半抗原溶解于1mL二甲基甲酰胺(DMF)中,得到半抗原溶液;

[0022] (2) 在上述半抗原溶液,加入80mg二环己基碳二亚胺(DCC)和60mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温搅拌反应2h;

[0023] (3) 称取160mg载体蛋白溶于20mL PBS缓冲液中,得到蛋白溶液;

[0024] (4) 将步骤(2)的液相逐滴加入到步骤(3)制备的蛋白溶液中,边滴加边搅拌;

[0025] 上述步骤中涉及到的质量和体积可等比例扩大或缩小。

[0026] 第二方面,本发明提供一种氟乙酰胺抗体,由本发明所述氟乙酰胺抗原免疫动物后制备得到。

[0027] 所述氟乙酰胺抗体可为采用本领域常规制备抗体手段制备得到的单克隆抗体或多克隆抗体。

[0028] 当将所述氟乙酰胺抗体应用于氟乙酰胺类化合物的检测时,优选所述抗体为氟乙酰胺单克隆抗体。

[0029] 本发明进一步提供了所述氟乙酰胺抗体在检测氟乙酰胺类化合物中的应用。氟乙酰胺单克隆抗体,与4-氨基苯基乙酸,溴乙酸,氯乙酰胺,1-氯-3-氟异丙醇,二氟乙酸,1,3-二氟-2-丙醇,乙基(4-氨基苯基)乙酸酯,碘乙酸,碘乙酰胺,氯乙酸钠,硫代氨基脲和2,2,2-三氟乙酰胺样品的交叉反应率均小于0.1%,无交叉反应,说明氟乙酰胺单克隆抗体的特异性非常好。

[0030] 优选地,以氟乙酰胺抗原FLU-KLH作为免疫原,本发明制备氟乙酰胺单克隆抗体的方法包括如下步骤:

[0031] (1) 免疫原用等体积的弗氏完全佐剂乳化后首次免疫Balb/c小鼠,再将首次免疫中所用的免疫原剂量减半,并用等体积的弗氏不完全佐剂乳化后对首次免疫的Balb/c小鼠进行加强免疫;

[0032] (2) 上述首次免疫的所述免疫原的剂量为0.1mg/只,乳化好后每只Balb/c小鼠的免疫剂量为0.2ml/只,免疫方式为颈背部免疫4-8点;

[0033] (3) 上述加强免疫次数为3次,每次免疫后一周,眼球采血,收集抗血清,用酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)测定小鼠抗血清效价及抑制情况;

[0034] (4) 上述加强免疫具体为在首次免疫后第21天各进行一次加强免疫;

[0035] (5) 最后一次加强免疫后两周,摘眼球采血,收集小鼠抗血清。

[0036] 作为本发明的优选实施方式,上述单克隆抗体的制备具体包括如下步骤:

[0037] (1) 动物免疫

[0038] 利用免疫原免疫Balb/c小鼠,免疫原FLU-KLH的单次免疫剂量为100 μ g,共免疫4次,每次间隔2周,前三次的免疫方式为颈背部皮下多点注射,后一次的免疫方式为腹膜内注射;

[0039] (2) 细胞融合与克隆化

[0040] 第四次免疫3天后,取脾细胞,按照5:1(数量比)比例与SP2/0骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争ELISA测定细胞上清液,筛选阳性孔;

[0041] 利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,得到可以分泌氟乙酰胺单克隆抗体的杂交瘤细胞;

[0042] (3) 单克隆抗体的制备与纯化

[0043] 增量培养法:

[0044] 细胞培养基的制备方法:向PRIM-1640培养基中添加小牛血清和碳酸氢钠,小牛血清终浓度为20%(质量百分含量)和碳酸氢钠终浓度为0.2%(质量百分含量);

[0045] 将杂交瘤细胞置于培养基中,37℃培养2天,用辛酸-饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化,得到单克隆抗体溶液(-20℃保存);

[0046] 单克隆抗体中的蛋白浓度(mg/mL) = 1.45*OD280-0.74*OD260

[0047] 采用以上公式计算单克隆抗体中的蛋白质浓度,同时可监测杂交瘤细胞的生长状况。

[0048] 腹水制备:

[0049] Balb/c小鼠腹腔注射灭菌石蜡油(0.5mL/只)。7天后腹腔注射杂交瘤细胞(5*105个/只),7天后采集腹水,用辛酸-饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化,得到单克隆抗体溶液(-20℃保存)。

[0050] 进一步地,所述杂交瘤细胞的冻存和复苏可采用如下方法:

[0051] 用冻存液将杂交瘤细胞制成 1×10^6 个/mL细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时,取出冻存管,立即放入37℃水浴锅中速溶,离心后去除冻存液后移入培养瓶内培养。

[0052] 进一步地,本发明提供了一种酶联免疫检测试剂盒,含有前述氟乙酰胺抗体,优选为氟乙酰胺单克隆抗体。

[0053] 所述试剂盒还进一步包括本领域常规使用的试剂/成分,例如包被原、包被液、封闭液、生物酶标记的第二抗体、洗涤液、显色剂和终止液。

[0054] 优选将血蓝蛋白(KLH)作为载体蛋白的抗原作为免疫原,免疫动物制备抗体,将牛血清白蛋白(BSA)作为载体蛋白的抗原作为包被原。

[0055] 作为优选,所述试剂盒中:

[0056] 上述包被原为FLU-BSA;

[0057] 上述包被液为0.05M碳酸盐缓冲液,其pH为9.6;

[0058] 上述封闭液为2%的脱脂牛奶;

[0059] 上述生物酶标记的第二抗体为羊抗鼠IgG,生物酶为辣根过氧化物酶(HRP);

[0060] 上述洗涤液为PBST;即在0.01M PBS中加入Twen-20配制而成;

[0061] 上述显色剂为2%四甲基联苯胺(TMB)和30%过氧化氢。

[0062] 上述终止液为2M H₂SO₄。

[0063] 本发明涉及到的原料或试剂均为普通市售产品,涉及到的操作如无特殊说明均为本领域常规操作。

[0064] 在符合本领域常识的基础上,上述各优选条件,可以相互组合,得到具体实施方式。

[0065] 本发明的有益效果在于:

[0066] 本发明首次提出了氟乙酰胺半抗原,并制备了氟乙酰胺的抗体,填补了国内外空白。在此之前没有氟乙酰胺抗体制备及相关免疫分析方法的相关信息。利用本发明提供的半抗原与载体蛋白的偶联物制备氟乙酰胺抗体,制备过程简单、经济、灵敏度高、实用价值高。利用本发明制备的多克隆抗体制备的试剂盒具有良好的应用前景。

附图说明

[0067] 图1为实施例1中氟乙酰胺半抗原对氟乙酰苯乙酸(氟乙酰胺phe)的合成路径图。

[0068] 图2为实施例1中氟乙酰胺半抗原氟乙酰己烷酸(氟乙酰胺liner)的合成路径图。

[0069] 图3为实施例1中氟乙酰胺半抗原对氟乙酰苯乙酸(氟乙酰胺phe)的¹H NMR谱图。

[0070] 图4为实施例1中氟乙酰胺半抗原氟乙酰己烷酸(氟乙酰胺liner)的¹H NMR谱图。

[0071] 图5为实施例3中BSA的飞行质谱图。

[0072] 图6为实施例3中BSA与氟乙酰胺半抗原对氟乙酰苯乙酸(氟乙酰胺phe)的偶联产物的飞行质谱图。

[0073] 图7为实施例3中BSA与氟乙酰胺半抗原氟乙酰己烷酸的偶联产物的飞行质谱图。

[0074] 图8为实施例3中BSA与氟乙酸的偶联产物的飞行质谱图。

[0075] 图9为实施例4中氟乙酰胺人工抗原制备的单克隆抗体的灵敏度检测。

具体实施方式

[0076] 下面将结合实施例对本发明的优选实施方式进行详细说明。需要理解的是以下实施例的给出仅是为了起到说明的目的,并不是用于对本发明的范围进行限制。本领域的技术人员在不背离本发明的宗旨和精神的情况下,可以对本发明进行各种修改和替换。

[0077] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0078] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0079] 以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。血蓝蛋白简称KLH,牛血清白蛋白简称BSA。

[0080] 实施例1氟乙酰胺半抗原(氟乙酰胺phe)和合成与鉴定

[0081] 1、氟乙酰胺phe的合成(如图1所示)

[0082] 1) 氟乙酰氯的合成

[0083] 室温下,KOH(19g,0.339mol)的水溶液(34mL)缓慢滴加到氟乙酸乙酯(30g,0.283mol)的乙醇(300mL)中,形成白色沉淀。混合液在室温下(30~35℃)搅拌过夜。旋干溶剂,所得的钠盐重新溶于盐酸中(3M,200mL),加入NaCl固体使溶液饱和,然后用乙醚萃取4~5次,合并的有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,滤液旋干,即得到氟乙酸(15g)。

[0084] 在插有温度计、冷凝管的三口瓶中,加入PCl₅(44g,0.211mol,1.1eq),冰浴冷却至0~5℃,缓慢滴加氟乙酸,滴加完,反应液在室温下搅拌0.5h,然后升温至80℃反应1h。反应液转移至单口烧瓶中进行常压蒸馏,收集70~72℃的馏分(12g,44% yield)无色透明液体。

[0085] 2) 对氨基苯乙酸乙酯(1-010-A2)的合成

[0086] SOCl₂(17.3g,0.146mol)缓慢滴加到对氨基苯乙酸(11g,0.0728mol)的乙醇(90mL)中,冰浴冷却条件下。升温至回流反应1h。降至室温,旋掉溶剂,剩余物用Na₂CO₃溶液调pH至8~9,EtOAc萃取2~3次,合并的有机相用水和饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥。过滤,滤液旋干,得黄色液体(13.0g,100%)产物干净,无需进一步纯化。

[0087] 3) 1-010-A3的合成

[0088] 化合物1-010-A2(13g,0.075mol)的THF溶液(100mL)冷却至0~5℃,缓慢滴加氟乙酰氯(9.45g,0.098mol),滴加完毕,转室温(30~35℃)反应2~3h。加适量水,EtOAc萃取2~3次,合并的有机相,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液旋干,柱色谱分离(DCM/MeOH=80:1)得淡黄色粉末化合物1-010-A2(12.5g,72%)。

[0089] 4) EN0-1-010的合成

[0090] KOH(2.53g,0.045mol)的水溶液(25mL)缓慢滴加到1-010-A3(7.2g,0.03mol)的乙醇(70mL)中,混合液在室温下(32~35℃)搅拌1h。用15%HOAc调pH至5左右,旋蒸掉乙醇,有黄色粉末沉淀析出,搅拌0.5h。过滤,滤饼干燥得淡黄色晶体(3.7g,59%)。

[0091] 2、氟乙酰胺phe的鉴定

[0092] 用氢核磁共振谱确定其结构:

[0093] ¹H NMR(DMSO-d₆,400MHz),δ3.52(s,2H),4.92(s,1H),5.03(s,1H),7.21(d,J=4.2Hz,2H),7.57(d,J=4.2Hz,2H),10.07(br,1H)。

- [0094] 该氟乙酰胺phe的结构式如式(II)所示,氟乙酰胺phe的¹H NMR谱图3所示。
- [0095] 实施例2氟乙酰胺半抗原(氟乙酰胺liner)和合成与鉴定
- [0096] 1、氟乙酰胺liner的合成(如图2所示)
- [0097] 将6-氨基己酸10g(76mmol)加入到100ml无水甲醇中,溶液浑浊,加入23g(227mmol)三乙胺,室温搅拌10min,滴加12g(113mmol)氟乙酸乙酯,回流反应过夜,溶液变清澈,冷却至室温,加醋酸调节pH至5-6,反应液浓缩,油泵拉干,得油状液体,加入EtOAc溶解,饱和食盐水洗涤EA两次,干燥,旋干,油泵拉干,得产品7g,收率约48%。
- [0098] 2、氟乙酰胺liner的鉴定
- [0099] 用氢核磁共振谱确定其结构:
- [0100] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ: 6.48 (bs, 1H, NH) ; 4.87 (s, 1H, CH₂) ; 4.75 (s, 1H, CH₂) 3.35 (q, 2H, CH₂, J=6.8Hz) ; 2.36 (t, 2H, CH₂, J=8.4Hz) ; 1.67 (m, 2H, CH₂) , 1.59 (m, 2H, CH₂) , 1.40 (m, 2H, CH₂) 。
- [0101] 该氟乙酰胺liner的结构式如式(III)所示,氟乙酰胺liner的¹H NMR谱如图4所示。
- [0102] 实施例3制备氟乙酰胺人工抗原
- [0103] 1、氟乙酰胺包被原的制备和鉴定
- [0104] 1.1氟乙酰胺包被原的制备
- [0105] 50mg氟乙酰胺半抗原(式II或式III所示)溶于1ml N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,N,N'-二环己基碳化二亚胺(DCC)80mg,N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)60mg加入到上述氟乙酰胺半抗原溶液中,室温搅拌反应2h;BSA 160mg溶于20ml的PBS缓冲液(0.01mol/L PH=7.4)中,搅拌状态下将活化药物逐滴加入到蛋白溶液中,4℃反应过夜;然后将反应液装入透析袋,4℃生理盐水溶液透析48h,换水4次;将透析液分装在离心管中,-20℃保存。
- [0106] 1.2氟乙酰胺包被原的鉴定
- [0107] 氟乙酰胺人工抗原用PBS配成溶液进行飞行质谱分析,以BSA作为对照(如图5所示)。飞行质谱结果表明:氟乙酰胺半抗原与BSA发生了偶联反应(偶联个数氟乙酰胺phe,氟乙酰胺liner,氟乙酸acid分别为36,34,78),生成了氟乙酰胺半抗原BSA结合物,氟乙酰胺phe,氟乙酰胺liner和氟乙酸acid与BSA结合物的飞行质谱如图6-8所示。2、氟乙酰胺免疫原的制备和鉴定
- [0108] 2.1氟乙酰胺免疫原的制备
- [0109] 用血蓝蛋白(KLH)代替牛血清白蛋白(BSA),其他同步骤1的1.1,得到氟乙酰胺半抗原KLH结合物,即为氟乙酰胺免疫原。
- [0110] 氟乙酰胺免疫原简称FLU-KLH,氟乙酰胺包被原溶液简称FLU-BSA溶液。FLU-KLH溶液中的FLU-KLH浓度为1mg/mL。
- [0111] 实施例4氟乙酰胺类化合物单克隆抗体的制备
- [0112] Balb/c小鼠:购自北京维通利华实验动物技术有限公司;
- [0113] SP2/0骨髓瘤细胞:购自sigma-aldrich公司,产品目录号08060101。
- [0114] 一、动物免疫
- [0115] 分别以式II和式III所示的半抗原按照实施例3制备氟乙酰胺免疫原,将FLU-KLH溶液免疫Balb/c小鼠,每只小鼠单次免疫100μg FLU-KLH,共免疫4次,每次间隔2周,前三次

的免疫方式为颈背部皮下多点注射,后一次的免疫方式为腹膜内注射。

[0116] 二、细胞融合与克隆化

[0117] 1、第四次免疫3天后,取脾细胞,按照5:1(数量配比)比例与SP2/0骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争ELISA测定细胞上清液,筛选阳性孔。

[0118] 2、利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,得到可以分泌氟乙酰胺单克隆抗体的杂交瘤细胞,依据所用免疫原的不同,分别得到两种半抗原结构抗氟乙酰胺单克隆抗体杂交瘤细胞,分别命名为FLU-B6和FLU-C11。

[0119] 三、细胞冻存和复苏

[0120] 用冻存液将杂交瘤细胞制成 1×10^6 个/ml细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时,取出冻存管,立即放入37℃水浴锅中速溶,离心后去除冻存液后移入培养瓶内培养。

[0121] 四、单克隆抗体的制备与纯化

[0122] 1、增量培养法

[0123] 细胞培养基的制备方法:向PRIM-1640培养基中添加小牛血清和碳酸氢钠,小牛血清终浓度为20% (质量百分含量) 和碳酸氢钠终浓度为0.2% (质量百分含量)。

[0124] 将杂交瘤细胞置于培养基中,37℃培养2天,用辛酸-饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化,得到单克隆抗体溶液(-20℃保存)。

[0125] 单克隆抗体中的蛋白浓度 (mg/mL) = $1.45*OD280 - 0.74*OD260$

[0126] 采用以上公式计算单克隆抗体中的蛋白质浓度,同时可监测杂交瘤细胞的生长状况。

[0127] 2、腹水制备

[0128] Balb/c小鼠腹腔注射灭菌石蜡油(0.5mL/只)。7天后腹腔注射杂交瘤细胞(5×10^5 个/只),7天后采集腹水,用辛酸-饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化,得到单克隆抗体溶液(-20℃保存)。

[0129] 五、单克隆抗体的鉴定

[0130] 将按照步骤四中增量培养法制备得到的单克隆抗体溶液分别进行如下鉴定:

[0131] 1、采用ELISA单克隆抗体亚型检测试剂盒(sigma公司产品,产品目录号19285)检测单克隆抗体的亚型,单克隆抗体的免疫球蛋白亚类为kappa类,IgG1亚型。

[0132] 2、抗体效价的测定

[0133] (1)采用实施例3制备的FLU-BSA溶液(用碳酸盐缓冲液调节浓度)进行包被,100μL/孔,FLU-BSA包被液的浓度为1.0μg/mL。

[0134] (2)4℃孵育16小时。

[0135] (3)封闭并洗板。

[0136] (4)每孔加入100μL步骤四中增量培养法制备得到的单克隆抗体溶液或其稀释液(PBS缓冲液进行梯度稀释)

[0137] (5)室温孵育2h并洗板。

[0138] (6)每孔加入100μL辣根过氧化物酶标记的IgG,室温孵育2小时。

[0139] (7)洗板。

[0140] (8)加入TMB显色液,避光显色15min。

[0141] (9)每孔加入50μL2mol/L硫酸中止反应,读取OD450值。

[0142] 以OD值达到1.0左右为阳性孔。抗体效价为1:27000。

[0143] 3、单克隆抗体灵敏度的计算

[0144] 其中免疫原为KLH-FLU-phe采取BSA-FLU-liner包被, KLH-FLU-acid(氟乙酸)采取BSA-FLU-acid(氟乙酸)包被, KLH-FLU-liner采取BSA-FLU-phe包被, 灵敏度高。

[0145] (1) – (3) 同步骤2的(1) – (3)。

[0146] (4) 每孔加入50 μ l TETS标准品溶液(由TETS和PBS缓冲液组成, 只加入PBS缓冲液的孔作为对照孔); 每个孔设置3个复孔

[0147] (5) 每孔加入50 μ L步骤四中增量培养法制备得到的单克隆抗体溶液或其稀释液(PBS缓冲液进行梯度稀释)室温孵育2小时并洗板。

[0148] (6) 每孔加入100 μ L辣根过氧化物酶标记的IgG, 室温孵育2小时。

[0149] (7) 洗板

[0150] (8) 加入TMB显色液, 避光显色15min。

[0151] (9) 每孔加入50 μ L 2mol/L硫酸中止反应, 读取OD₄₅₀值。

[0152] 将采用各个浓度的标准品溶液得到的吸光值(三个复孔平均值)除以对照孔的吸光值再乘以100作为纵坐标, 以各个标准品溶液中的氟乙酰胺浓度的自然数的对数值为横坐标绘制曲线图。单克隆抗体的灵敏度检测结果显示, 免疫原为KLH-FLU-phe、KLH-FLU-liner的单克隆抗体均具有较高的灵敏度。其中, 免疫原为KLH-FLU-phe制备的单克隆抗体的灵敏度最高, 其灵敏度检测曲线如图9所示。

[0153] 对照图9, 得到纵坐标数值等于50%对应的氟乙酰胺浓度, 即为IC₅₀值。单克隆抗体检测氟乙酰胺的灵敏度(IC₅₀)值为1.5mg/mL。

[0154] 6、特异性测定

[0155] 采用包被缓冲液分别溶解4-氨基苯基乙酸, 溴乙酸, 氯乙酰氨, 1-氯-3-氟异丙醇, 二氟乙酸, 1,3-二氟-2-丙醇, 乙基(4-氨基苯基)乙酸酯, 碘乙酸, 碘乙酰胺, 氯乙酸钠, 硫代氨基脲和2,2,2-三氟乙酰胺分别制备成如下浓度梯度的溶液: 0、37、111、333、1000、3000和9000ng/mL, 按照步骤一中的操作方法分别计算4-氨基苯基乙酸, 溴乙酸, 氯乙酰氨, 1-氯-3-氟异丙醇, 二氟乙酸, 1,3-二氟-2-丙醇, 乙基(4-氨基苯基)乙酸酯, 碘乙酸, 碘乙酰胺, 氯乙酸钠, 硫代氨基脲和2,2,2-三氟乙酰胺样品对氟乙酰胺单克隆抗体(选择KLH-FLU-phe免疫制备的单抗, BSA-FLU-liner作为包被原)与氟乙酰胺包被原反应的半数抑制量(IC₅₀)及交叉反应率, 交叉反应率的公式为: 交叉反应率(%) = (引起氟乙酰胺单克隆抗体与氟乙酰胺包被原反应50%抑制的氟乙酰胺的浓度/引起氟乙酰胺单克隆抗体与氟乙酰胺包被原反应50%抑制的其它物质的浓度) × 100%。实验设3次重复。

[0156] 结果表明, 4-氨基苯基乙酸, 溴乙酸, 氯乙酰氨, 1-氯-3-氟异丙醇, 二氟乙酸, 1,3-二氟-2-丙醇, 乙基(4-氨基苯基)乙酸酯, 碘乙酸, 碘乙酰胺, 氯乙酸钠, 硫代氨基脲和2,2,2-三氟乙酰胺样品对氟乙酰胺单克隆抗体与氟乙酰胺包被原反应的半数抑制量(IC₅₀)均大于1000 μ g/mL, 氟乙酰胺与4-氨基苯基乙酸, 溴乙酸, 氯乙酰氨, 1-氯-3-氟异丙醇, 二氟乙酸, 1,3-二氟-2-丙醇, 乙基(4-氨基苯基)乙酸酯, 碘乙酸, 碘乙酰胺, 氯乙酸钠, 硫代氨基脲和2,2,2-三氟乙酰胺样品的交叉反应率均小于0.1%, 无交叉反应, 说明氟乙酰胺单克隆抗体的特异性非常好。

[0157] 虽然, 上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述, 但在

本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。应当理解的是,对上述实施例所用试剂或原料的用量进行等比例扩大或者缩小后的技术方案,与上述实施例的实质相同。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

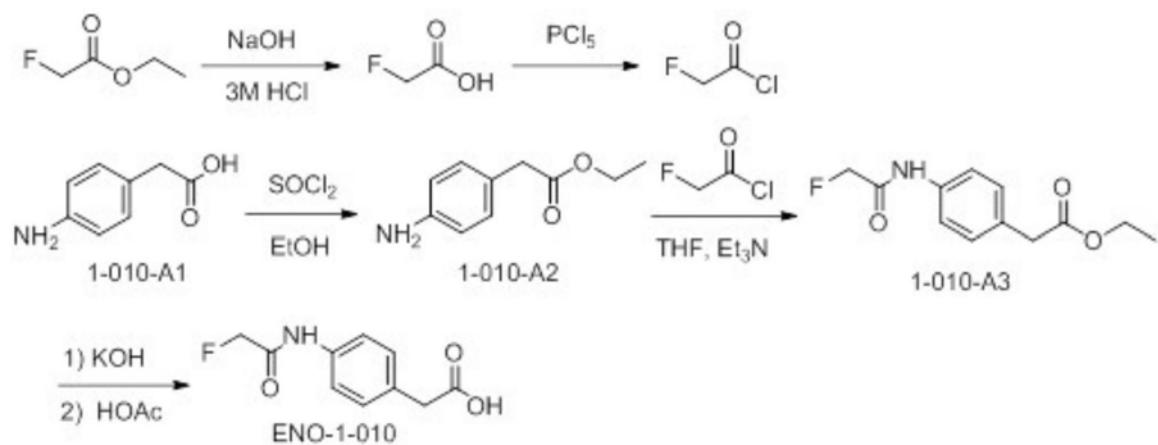


图1

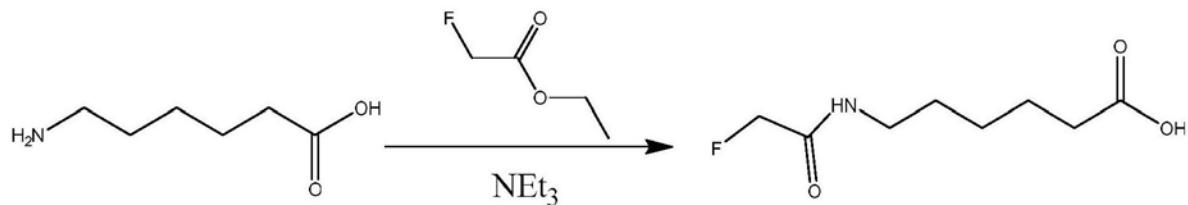


图2

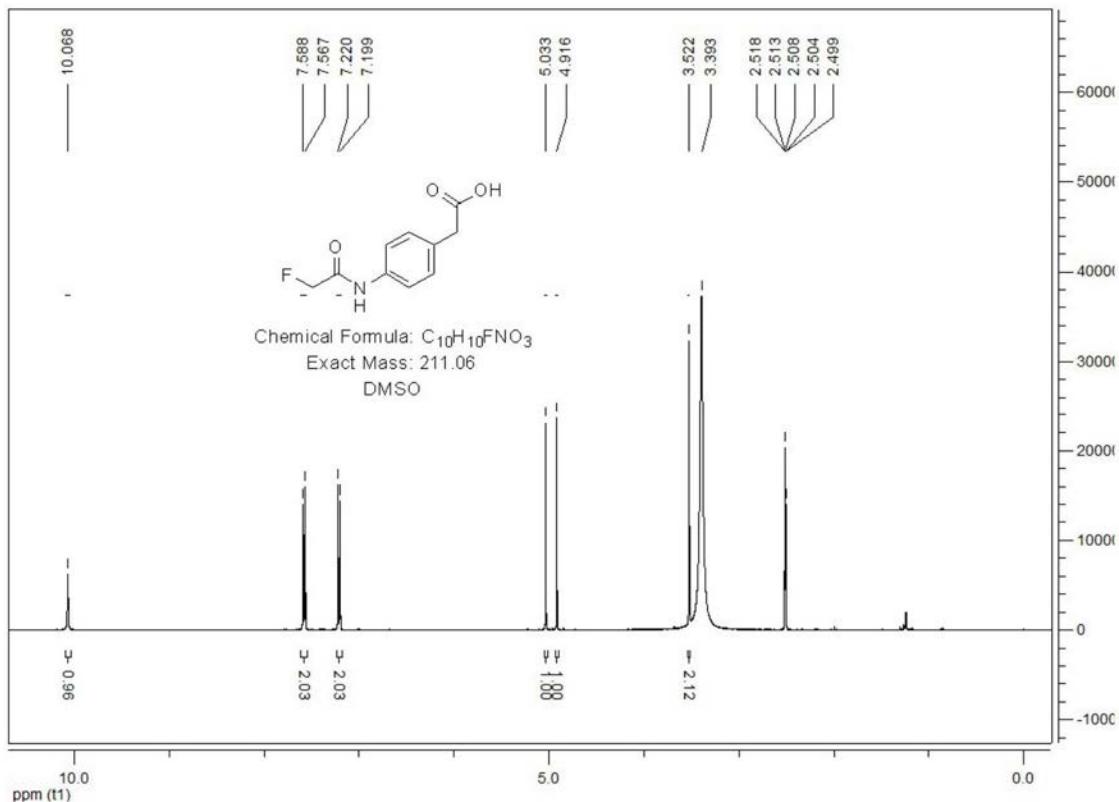


图3

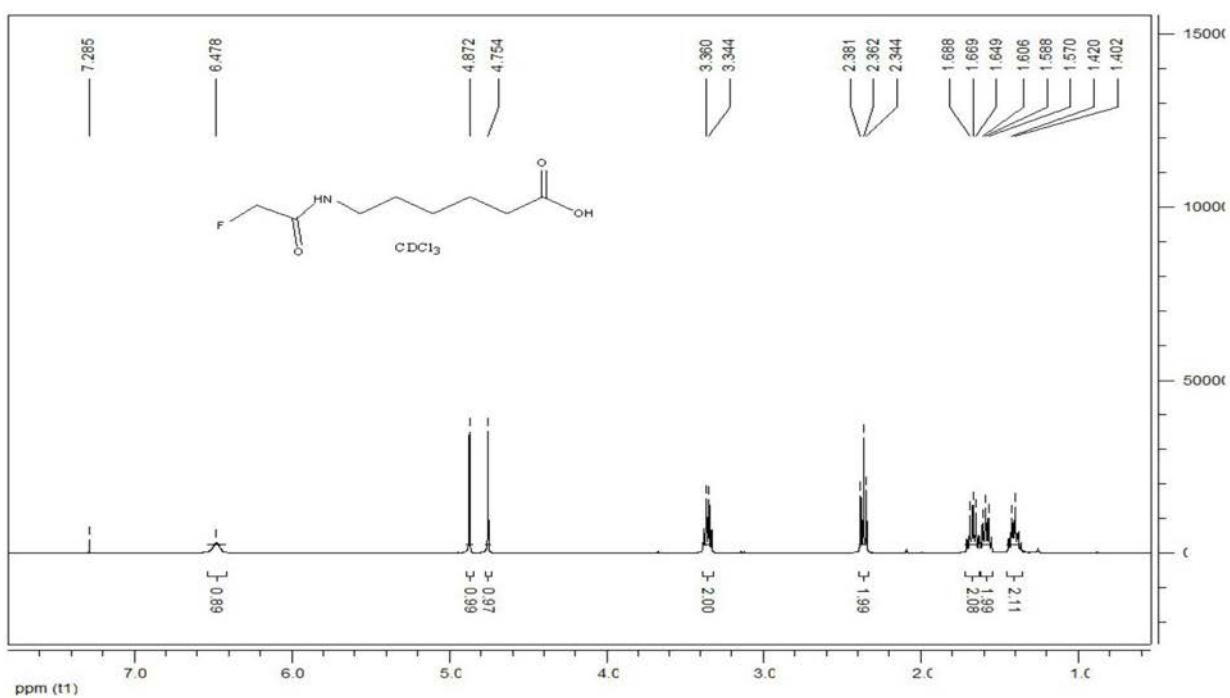


图4

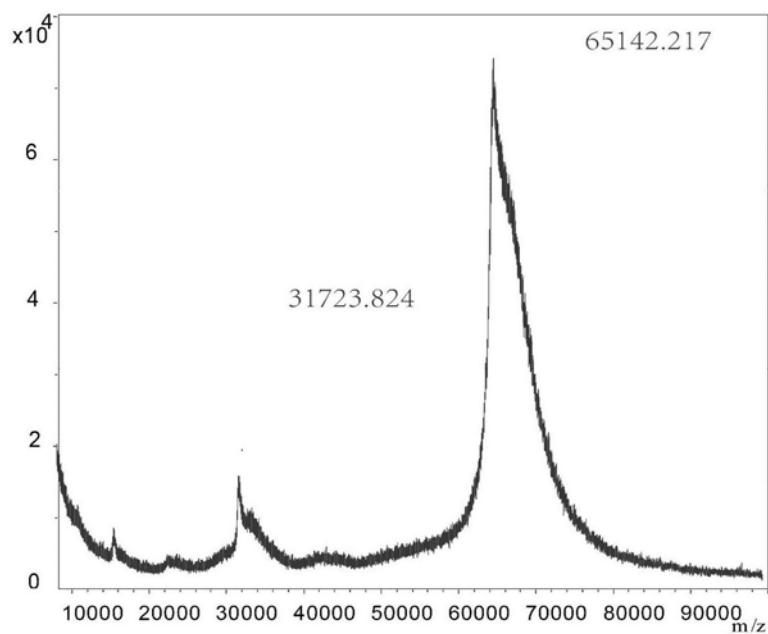


图5

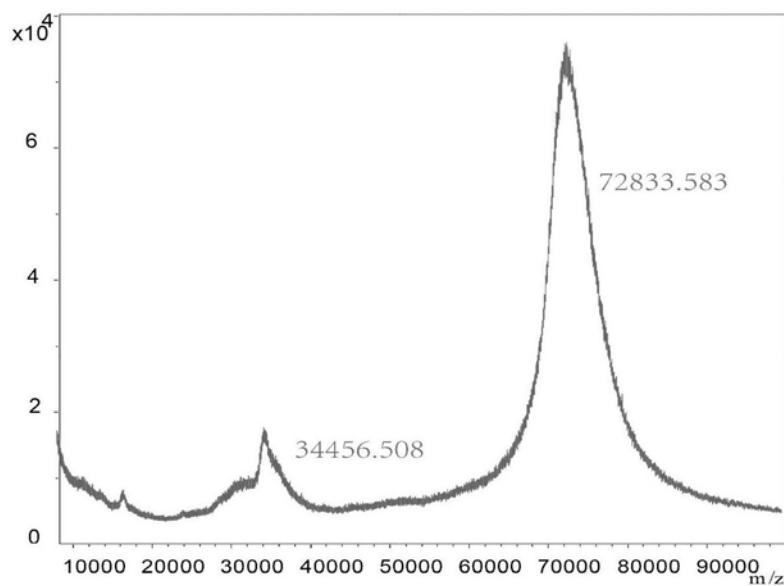


图6

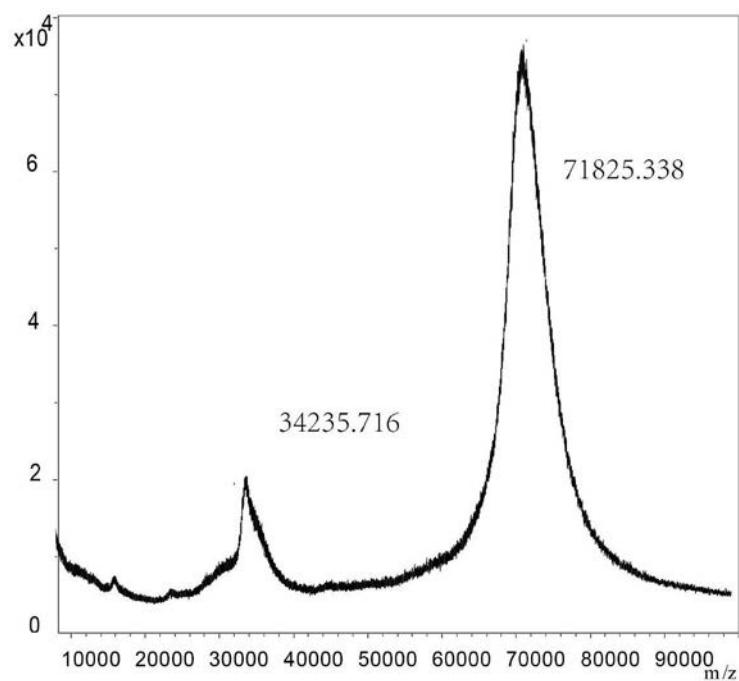


图7

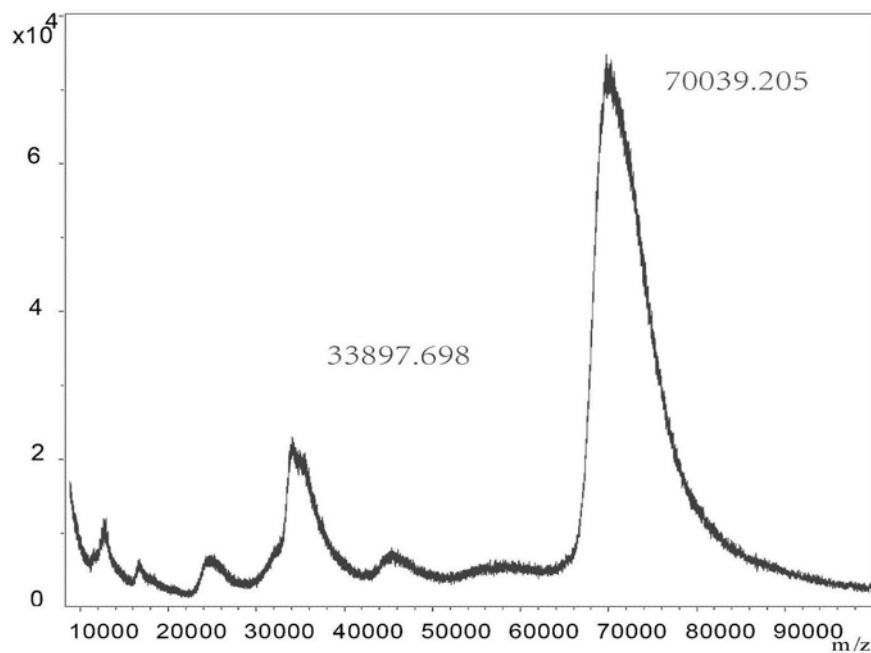


图8

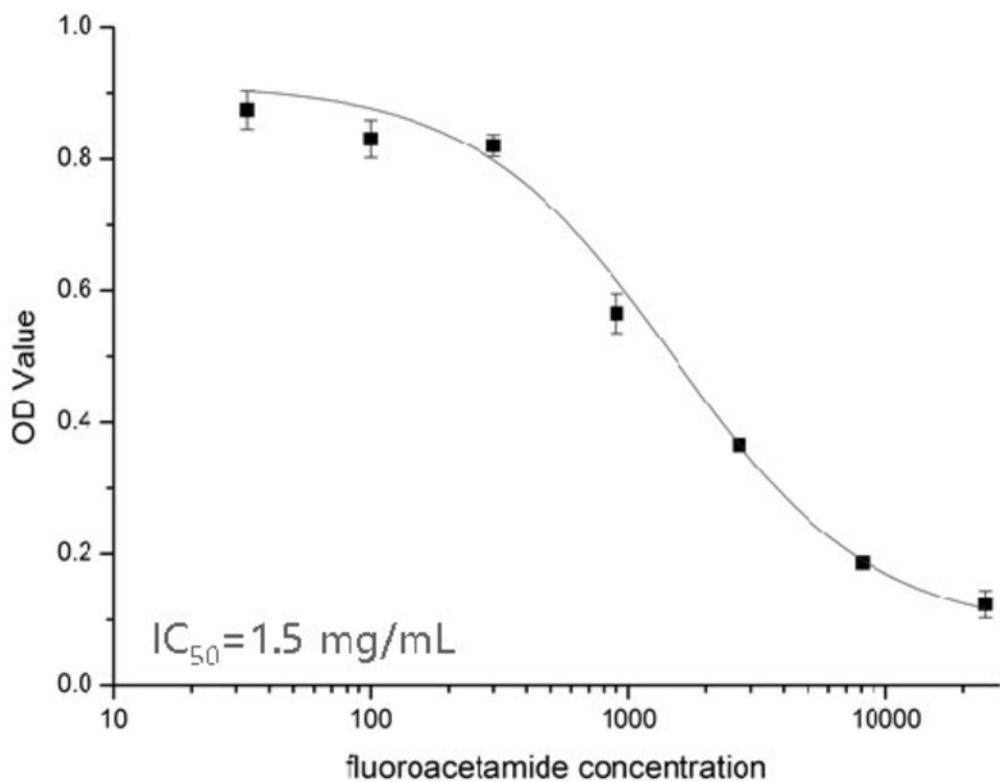


图9

专利名称(译)	一种氟乙酰胺半抗原及单克隆抗体的制备方法与应用		
公开(公告)号	CN109575123A	公开(公告)日	2019-04-05
申请号	CN201811324738.8	申请日	2018-11-08
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	王战辉 沈建忠 温凯 江海洋 杨玲 史为民 张西亚 张素霞		
发明人	王战辉 沈建忠 温凯 江海洋 杨玲 史为民 张西亚 张素霞		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/795 C07K1/02 C07K16/44 C12N5/20 G01N33/53 C07C233/47 C07C233/54 C07C231/02 C07C231/12 C07C53/18 C07C51/09 C07C53/40 C07C51/60 C07C229/42 C07C227/18		
CPC分类号	C07C51/09 C07C51/60 C07C227/18 C07C231/02 C07C231/12 C07C233/47 C07C233/54 C07K14/765 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/53 C07C53/18 C07C53/40 C07C229/42		
代理人(译)	王文君 陈征		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及生物化工技术领域，具体公开了一种氟乙酰胺半抗原及单克隆抗体的制备方法与应用。本发明以氟乙酸乙酯、对氨基苯乙酸为主要原料，合成氟乙酰胺半抗原；用活泼脂法将其与载体蛋白牛血清白蛋白(BSA)或血蓝蛋白(KLH)偶联制备偶联物。经试验验证表明，本发明制得的偶联物可使生物体产生针对氟乙酰胺的抗体，即所制得的偶联物为一种氟乙酰胺人工抗原。本发明所制备的氟乙酰胺人工抗原适合用于氟乙酰胺的酶联免疫分析。

