



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109608479 A

(43)申请公布日 2019.04.12

(21)申请号 201811319490.6

C07K 16/44(2006.01)

(22)申请日 2018.11.07

G01N 33/535(2006.01)

(71)申请人 中国农业大学

地址 100083 北京市海淀区清华东路17号

(72)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

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限

公司 11002

代理人 王文君 陈征

(51)Int.Cl.

C07D 513/18(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 1/107(2006.01)

C07K 1/02(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页 附图6页

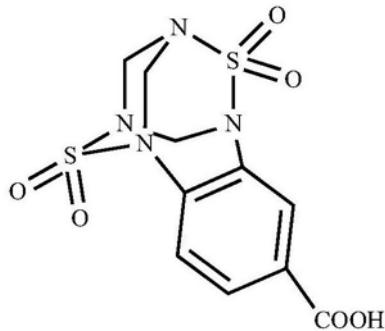
(54)发明名称

一种毒鼠强半抗原及单克隆抗体的制备方法与应用

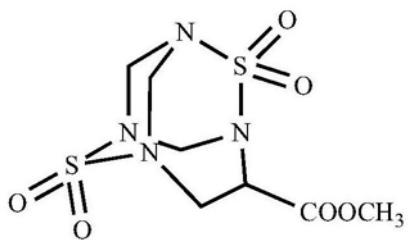
(57)摘要

本发明涉及生物化工技术领域,具体公开了一种毒鼠强半抗原及单克隆抗体的制备方法与应用。本发明以氯磺酰异腈酸酯、二磺酰胺为主要原料,合成毒鼠强半抗原;用活泼酯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毒鼠强的抗体,即所制得的偶联物为一种毒鼠强人工抗原。本发明所制备的毒鼠强人工抗原适合用于毒鼠强的酶联免疫分析。

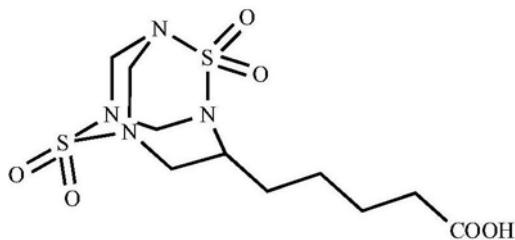
1. 一种毒鼠强半抗原, 其特征在于, 分子结构式如式(II)~式(IV)之一所示:



式 (II)



式 (III)



式 (IV) 。

2. 一种毒鼠强抗原, 其特征在于, 由权利要求1所述的毒鼠强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所述的毒鼠强抗原的制备方法, 其特征在于, 采用活泼酯法将载体蛋白偶联于权利要求1所述毒鼠强半抗原的羧基碳上。

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所述的毒鼠强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所述的毒鼠强半抗原溶解于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. 一种毒鼠强抗体，其特征在于，由权利要求2所述的毒鼠强抗原免疫动物后制备得到。

6. 根据权利要求5所述的毒鼠强抗体，其特征在于，所述抗体为毒鼠强单克隆抗体或多克隆抗体。

7. 分泌权利要求5或6所述毒鼠强抗体的杂交瘤细胞。

8. 权利要求5或6所述的抗体在检测毒鼠强类化合物中的应用。

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。

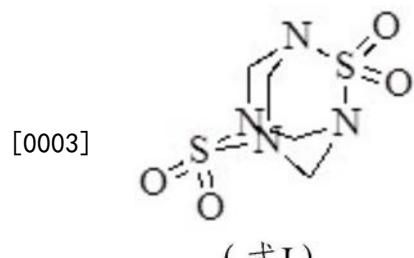
一种毒鼠强半抗原及单克隆抗体的制备方法与应用

技术领域

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

背景技术

[0002] 毒鼠强 (tetramethylenedisulfotetraamide), 学名: 四亚甲基二砜四胺(分子式: C₄H₈N₄O₄S₂, 分子量240.27) , 化学结构式如式I所示。20世纪中期研发的急性杀鼠药。立方晶型(由丙酮重结晶)。一种磺胺衍生物, 主要用途是杀鼠剂, 对各类动物、包括人类毒性都极高, 经常被人作毒药害人。又由于性质稳定, 不易分解容易造成积累TETS会遗留在被毒害的牲畜体内, 而食用这些动物的肉有中毒的危机, 有二次中毒的可能, 中国明令禁止生产、使用。易溶于苯、乙酸乙酯, TETS微溶于水、二甲基亚砜, 不溶于甲醇和乙醇。



[0004] TETS作为一种神经毒素能引起致命性的抽搐, 效果与印防己毒素相似, 是最危险的杀鼠剂之一。TETS的毒性比氰化钾强100倍, 它是可能比士的宁更强烈的痉挛剂。它是一种γ-氨基丁酸(GABA)的拮抗物, 与神经元GABA受体形成不可逆转的结合, 使氯通道和神经元丧失功能, 且尚未有确认的解毒剂。人类的致命剂量被认为是7~10mg。大鼠致死剂量为0.1~0.3mg/kg。小鼠致死剂量为0.2~0.5mg/kg。

[0005] 由于毒鼠强的剧毒、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毒鼠强对人类健康的危害。目前, 毒鼠强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。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。

[0006] 毒鼠强作为半抗原, 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。但由于毒鼠强是小分子物质, 相对分子量只有240, 不具有免疫原性, 此外, 毒鼠强由于结构稳定, 不易发生化学反应。这给研究毒鼠强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。

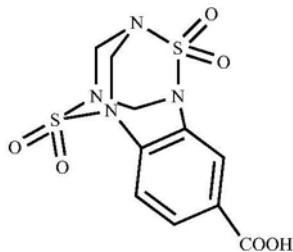
[0007] 综合上述原因, 研究毒鼠强偶联物制备方法是非常必要的。

发明内容

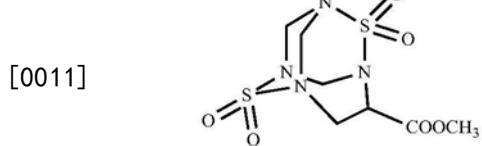
[0008] 为了解决现有技术中存在的问题,本发明的目的是提供一种毒鼠强半抗原及单克隆抗体的制备方法与应用。

[0009] 为了实现本发明目的,本发明的技术方案如下:

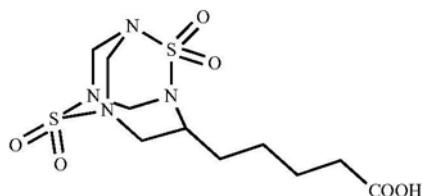
[0010] 第一方面,本发明对毒鼠强进行结构改造获得3种化合物,既保留毒鼠强的特征结构,又具有与载体蛋白发生偶联的活性基团。所获得的3种化合物即为本发明所提供的3种毒鼠强半抗原,分子结构式分别如式(II)~式(IV)所示:



式 (II)



式 (III)



式 (IV)

[0012] 更进一步地,基于前述半抗原的开发,本发明提供一种毒鼠强抗原,采用活化酯法将载体蛋白偶联于前述毒鼠强半抗原(TETS)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),所得毒鼠强抗原为TETS-KLH或TETS-BSA。

[0013] 在后续实验操作和试剂盒的制备中,以TETS-KLH作为免疫原,TETS-BSA作为包被原。

[0014] 所述毒鼠强抗原的制备方法具体包括如下步骤:

[0015] (1) 将前述毒鼠强半抗原溶解于二甲基甲酰胺(DMF)中,得到半抗原溶液;

[0016] (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;

[0017] (3) 将载体蛋白溶于PBS缓冲液中,得到蛋白溶液;

[0018] (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;

[0019] 作为优选,具体包括如下步骤:

- [0020] (1) 称取50mg所述毒鼠强半抗原溶解于1mL二甲基甲酰胺(DMF)中,得到半抗原溶液;
- [0021] (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;
- [0022] (3) 称取160mg载体蛋白溶于20mL PBS缓冲液中,得到蛋白溶液;
- [0023] (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;
- [0024] 上述步骤中涉及到的质量和体积可等比例扩大或缩小。
- [0025] 第二方面,本发明提供一种毒鼠强抗体,由本发明所述毒鼠强抗原免疫动物后制备得到。
- [0026] 所述毒鼠强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。
- [0027] 当将所述毒鼠强抗体应用于毒鼠强类化合物的检测时,优选所述抗体为毒鼠强单克隆抗体。
- [0028] 本发明进一步提供了所述毒鼠强抗体在检测毒鼠强类化合物中的应用。毒鼠强单克隆抗体,与布洛芬,三溴化环己烷四胺,N-(4-硝基苄基)-1-金刚烷胺氢溴酸,阿托品,六亚甲基胺样品的交叉反应率均小于0.1%,无交叉反应,说明毒鼠强单克隆抗体的特异性非常好。
- [0029] 优选地,以毒鼠强抗原TETS-KLH作为免疫原,本发明制备毒鼠强单克隆抗体的方法包括如下步骤:
- [0030] (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;
- [0031] (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;
- [0032] (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;
- [0033] (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;
- [0034] (5) 最后一次加强免疫后两周,摘眼球采血,收集小鼠抗血清。
- [0035] 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:
- [0036] (1) 动物免疫
- [0037] 利用免疫原免疫Balb/c小鼠,免疫原TETS-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;
- [0038] (2) 细胞融合与克隆化
- [0039] 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;
- [0040] 利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,得到可以分泌毒鼠强单克隆抗体的杂交瘤细胞;

[0041] (3) 单克隆抗体的制备与纯化

[0042] 增量培养法：

[0043] 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）；

[0044] 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）；

[0045] 单克隆抗体中的蛋白浓度（mg/mL）= $1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260}$

[0046] 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。

[0047] 腹水制备：

[0048] 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）。

[0049] 进一步地，所述杂交瘤细胞的冻存和复苏可采用如下方法：

[0050] 用冻存液将杂交瘤细胞制成1*10⁶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。

[0051] 进一步地，本发明提供了一种酶联免疫检测试剂盒，含有前述毒鼠强抗体，优选为毒鼠强单克隆抗体。

[0052] 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。

[0053] 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。

[0054] 作为优选，所述试剂盒中：

[0055] 上述包被原为TETS-BSA；

[0056] 上述包被液为0.05M碳酸盐缓冲液，其pH为9.6；

[0057] 上述封闭液为2%的脱脂牛奶；

[0058] 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）；

[0059] 上述洗涤液为PBST；即在0.01M的PBS中加入Twen-20配制而成；

[0060] 上述显色剂为2%四甲基联苯胺（TMB）和30%过氧化氢。

[0061] 上述终止液为2M H₂SO₄。

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] 本发明的有益效果在于：

[0065] 本发明首次提出了毒鼠强半抗原，并制备了毒鼠强的抗体，填补了国内外空白。在此之前没有毒鼠强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毒鼠强抗体，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

- [0066] 图1为实施例1中毒鼠强半抗原TETS-2j的合成路径图。
- [0067] 图2为实施例1中毒鼠强半抗原TETS-2c的合成路径图。
- [0068] 图3为实施例1中毒鼠强半抗原TETS-2d的合成路径图。
- [0069] 图4为实施例1中毒鼠强半抗原TETS-2j的¹H NMR谱图。
- [0070] 图5为实施例1中毒鼠强半抗原TETS-2c的¹H NMR谱图。
- [0071] 图6为实施例1中毒鼠强半抗原TETS-2d的¹H NMR谱图。
- [0072] 图7为实施例2中毒鼠强的人工抗原的飞行质谱图。
- [0073] 图8为实施例3中毒鼠强标准曲线图。

具体实施方式

[0074] 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。

- [0075] 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。
- [0076] 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。
- [0077] 实施例中所用PBS缓冲液为pH 7.4、0.01MPBS缓冲液，实施例中所用碳酸盐缓冲液为pH 9.6、0.05M碳酸钠缓冲液，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。毒鼠强购自坛墨质检标准物质中心公司，产品目录号位1024。血蓝蛋白简称KLH，牛血清白蛋白简称BSA。

[0078] 实施例1毒鼠强半抗原的制备与鉴定

[0079] 1. 毒鼠强半抗原TETS-2j的制备(如图1所示)

[0080] 1) 中间体8j的合成

[0081] 将氯磺酰异腈酸酯(1.42g, 10mmol, 1equiv)溶于20mL二氯甲烷，冷却到0度，向上述溶液中加入叔丁醇(0.74g, 10mmol, 1equiv)，搅拌反应30分钟；然后加入三乙胺(3.23g, 32mmol, 3.2equiv)和溶于20mL二氯甲烷的3,4-二氨基苯甲酸甲酯(5mmol, 0.5equiv)。反应混合物在室温下搅拌反应1小时，然后加入40水淬灭反应，并用浓盐酸调节pH值到3，反应混合物用乙酸乙酯萃取3次，每次50mL，合并有机相并用无水硫酸镁干燥，浓缩得到白色固体粗产物8j。该粗产物没有进一步纯化直接用于下一步反应。

[0082] 2) 中间体2j的合成

[0083] 将二磺酰胺8j(1mmol)溶于10mL三氟乙酸，向上述溶液中加入二甲氧基甲烷(228mg, 3mmol, 3equiv)，在室温搅拌反应3小时后浓缩反应液。向浓缩残留物中加入少量的甲醇，过滤得白色固体粗产物，进一步在甲醇中进行重结晶得到中间体2j，收率62%。¹H NMR (300MHz, DMSO-d6) δ 8.04 (dd, J=1.8, 8.1Hz, 1H), 7.87 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.58 (d, J=8.1Hz, 1H), 5.83 (s, 2H), 5.57 (dd, J=1.5, 15.0Hz, 2H), 5.41–5.48 (m, 2H), 3.87 (s, 3H).

[0084] 3) 产物2j-酸的合成

[0085] 中间体2j(346mg, 1mmol)溶于20mL甲醇和水的混合溶剂(甲醇:水=3:1)，然后加入氢氧化钠(60mg, 1.5mmol)，室温搅拌过夜。用3M的盐酸调节pH到3，乙酸乙酯萃取三次，每次50mL。合并有机相并用无水硫酸镁干燥，过滤后，浓缩的白色固体产物2j-酸，98%收率。

[0086] 2. 毒鼠强半抗原TETS-2j的鉴定(如图4所示)

[0087] 用氢核磁共振谱确定其结构:

[0088] ^1H NMR (300MHz, DMSO-d6) δ 13.55 (s, br, 1H), 8.02 (dd, $J=2.1, 8.1\text{Hz}$, 1H), 7.83 (d, $J=1.8\text{Hz}$, 1H), 7.54 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 5.83 (s, 2H), 5.57 (dd, $J=2.4, 15.0\text{Hz}$, 2H), 5.40-5.48 (m, 2H); ^{13}C NMR (75MHz, DMSO-d6) δ 165.86, 144.12, 140.75, 133.66, 132.17, 131.98, 131.92, 71.57, 69.10, 69.00;

[0089] HRMS (m/z) calc. 对于C₁₀H₁₀N₄O₆S₂Na (+) 368.9939, 分子量是368.9932.

[0090] 3. 毒鼠强半抗原TETS-2c的制备(如图2所示)

[0091] 1) 中间体8c的合成

[0092] 将氯磺酰异腈酸酯(1.42g, 10mmol, 1equiv)溶于20mL二氯甲烷, 冷却到0度, 向上述溶液中加入叔丁醇(0.74g, 10mmol, 1equiv), 搅拌反应30分钟; 然后加入三乙胺(3.23g, 32mmol, 3.2equiv)和溶于20mL二氯甲烷的2,3-二氨基丙酸甲酯(5mmol, 0.5equiv)。反应混合物在室温下搅拌反应1小时, 然后加入40水淬灭反应, 并用浓盐酸调节pH值到3, 反应混合物用乙酸乙酯萃取3次, 每次50mL, 合并有机相并用无水硫酸镁干燥, 浓缩得到白色固体粗产物8c。该粗产物没有进一步纯化直接用于下一步反应。

[0093] 2) 产物2c的合成

[0094] 将二磺酰胺8c(1mmol)溶于10mL三氟乙酸, 向上述溶液中加入二甲氧基甲烷(228mg, 3mmol, 3equiv), 在室温搅拌反应3小时后浓缩反应液。向浓缩白色粗产物2c, 2c为异构体混合物, 收率38%。

[0095] 4. 毒鼠强半抗原TETS-2c的鉴定(如图5所示)

[0096] 2c为异构体混合物, 可以通过硅胶柱层析来分离出两个异构体, 正己烷和乙酸乙酯的混合溶剂作为洗脱溶剂进行梯度洗脱(正己烷/乙酸乙酯, 5/1到2/1)分别得到两个异构体2c-1和2c-2。

[0097] 2c-1的结构表征: ^1H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 5.54-5.70 (m, 3H), 4.82-4.94 (m, 3H), 4.47 (dd, $J=1.5, 13.8\text{Hz}$, 1H), 4.31-4.39 (m, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.62 (dd, $J=2.4, 13.8\text{Hz}$, 1H); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 169.5, 79.83, 67.92, 60.43, 57.91, 53.25, 49.99; HRMS (m/z) calc. C₇H₁₂N₄O₆S₂Na (+) 335.0096, 分子量335.0085.

[0098] 2c-2的结构表征: ^1H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 5.42 (t, $J=1.8\text{Hz}$, 2H), 5.26 (d, 15.0Hz, 1H), 5.13 (d, 15.0Hz, 1H), 4.64-4.72 (m, 2H), 4.49 (t, $J=8.7\text{Hz}$, 1H), 4.22 (dd, $J=8.1, 15.0\text{Hz}$, 1H), 4.02 (dd, $J=8.7, 15.0\text{Hz}$, 1H), 3.85 (s, 3H); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 167.9, 71.63, 68.75, 68.11, 63.47, 53.94, 53.22; HRMS (m/z) calc. C₇H₁₂N₄O₆S₂Na (+) 335.0096, 分子量335.0083.

[0099] 5. 毒鼠强半抗原TETS-2d的制备(如图3所示)

[0100] 1) 中间体2的合成

[0101] 在100mL单口瓶, 加入5.42g NaN₃和20mL CH₃CN, 冰浴降温至0~5°C, 称取6.76g IC1溶于40mL CH₃CN滴加到单口瓶中, 然后将3g原料1的20mL CH₃CN溶液滴加到单口瓶中, 滴加完成后缓慢升到室温, 搅拌过夜。加入50mL水淬灭反应, 用乙醚(3×40mL)萃取, 合并有机相, 然后依次用5%的Na₂S₂O₃溶液和食盐水反洗有机相, 有机相用无水Na₂S₂O₃干燥, 旋干后得到粗产物2, 该粗产物无需进一步纯化, 直接用于下一步反应。

[0102] 2) 中间体2的合成

[0103] 在100mL单口瓶中,加入中间体2和20mL DMF,然后加入2.71g NaN₃,55℃搅拌过夜。反应完毕后,冷却至室温,加入50mL水,用乙醚(3×40mL)萃取,合并有机相,然后依次用5%的Na₂S2O₃溶液和食盐水反洗有机相,有机相用无水Na₂SO₄干燥,旋干后得到粗产物3,该粗产物无需进一步纯化,直接用于下一步反应。

[0104] 3) 中间体4的合成

[0105] 50mL单口瓶依次加入700mg中间体3,10mL甲醇,0.6mL浓盐酸,350mg 10%的Pd/C,在氢气气氛下反应3天。反应完毕后过滤,并用甲醇冲洗滤饼,旋干滤液,得到棕黄色中间体粗产物4。结构测定:1H NMR (400MHz, CD3OD): δ 3.66 (s, 3H), 3.50–3.56 (m, 1H), 3.20–3.30 (m, 2H), 2.35–2.45 (m, 2H), 1.40–1.90 (m, 6H)。

[0106] 4) 中间体5的合成

[0107] 在50mL单口瓶依次加入803mg ClSO₂NC₀,5mL DCM,冰浴降温至0~5℃,然后加入421mg t-BuOH,在0~5℃搅拌30min,然后向反应体系中加入700mg中间体4、1.78g TEA和5mL DCM,然后缓慢升到室温,搅拌反应3h。反应完毕后,加入30mL水,用浓盐酸调pH值至3,分液,水相用乙酸乙酯萃取(2×40mL),合并有机相,用食盐水反洗,有机相用Na₂SO₄干燥,旋干后得到中间产物5,该粗产物无需进一步纯化,直接用于下一步反应。结构测定:1H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 3.67 (s, 3H), 3.50–3.60 (m, 1H), 3.15–3.35 (m, 2H), 2.30–2.40 (m, 2H), 1.50–1.90 (m, 6H), 1.35–1.50 (m, 18H)。

[0108] 5) 中间体6的合成

[0109] 在50mL单口瓶加入2.7g中间体5和10mL的三氟乙酸,然后滴加1.16g的CH₂(OCH₃)₂,室温搅拌3h。反应完毕后,浓缩反应液,得到的残留物经柱层析纯化(hexane/EA=5/1),得到600mg中间产物6。结构测定:1H NMR (500MHz, CDCl₃): δ 5.40–5.52 (m, 2H), 5.02–5.22 (m, 2H), 4.56–4.75 (m, 2H), 3.75–3.85 (m, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.60–3.65 (m, 1H), 3.30–3.35 (m, 1H), 2.30–2.40 (m, 2H), 1.50–1.80 (m, 6H); HRMS (m/z) calc. for C₁₁H₂₀N₄O₆S₂Na (+) 391.0722, found 391.0702.

[0110] 6) 目标产物TETS-2d的合成:

[0111] 在50mL单口瓶中加入600mg中间体6,9mL甲醇和3mL水,然后加入130mg的NaOH,室温搅拌过夜。反应完毕后,减压浓缩反应体系,加入30mL水,用乙酸乙酯萃取(3×20mL),取水相,有机相丢掉,将水相的pH值至2,用乙酸乙酯萃取(3×40mL),合并有机相,用无水Na₂SO₄干燥,旋干得450mg淡黄色油,加入2mL石油醚/乙醚混合溶剂搅拌1h,析出白色固体,过滤得380mg目标产物,白色固体。

[0112] 6. 毒鼠强半抗原TETS-2d的鉴定(如图6所示)

[0113] 用氢核磁共振谱确定其结构:

[0114] 1H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 5.40–5.52 (m, 2H), 5.02–5.22 (m, 2H), 4.56–4.75 (m, 2H), 3.95–4.25 (m, 1H), 3.30–3.85 (m, 2H), 2.30–2.40 (m, 2H), 1.55–2.05 (m, 6H)。

[0115] HRMS (m/z) calc. 对于C₁₀H₁₈N₄O₆S₂Na (+) 377.0565, 分子量是377.0559。

[0116] 实施例2毒鼠强人工抗原的制备与鉴定

[0117] 一、毒鼠强免疫原的制备和鉴定

[0118] 1. 毒鼠强包被原的制备

[0119] 10mg毒鼠强半抗原溶于1mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,N,N'-二环己基碳化二亚胺(DCC)40mg,N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)30mg加入到上述毒鼠强半抗原溶液中,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牛血清白蛋白溶液中,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。

[0120] 2.毒鼠强包被原的鉴定(如图7所示)

[0121] 毒鼠强免疫原用PBS配成溶液进行飞行质谱分析,以BSA作为对照。飞行质谱结果表明:毒鼠强半抗原与BSA发生了偶联反应(TETS-2j,TETS-2c,TETS-2d三者与BSA偶联时,物质的量之比为分别是5.98:1,11.3:1,9.03:1),生成了毒鼠强半抗原BSA结合物。

[0122] 二、毒鼠强免疫原的制备和鉴定

[0123] 1.毒鼠强免疫原的制备

[0124] 用血蓝蛋白代替牛血清白蛋白,其他同步骤一的1。

[0125] 毒鼠强包被原简称TETS-BSA,毒鼠强包被原溶液简称TETS-KLH溶液。

[0126] TETS-KLH溶液中的TETS-KLH浓度为1mg/mL。

[0127] 实施例3毒鼠强类化合物单克隆抗体的制备与鉴定

[0128] Balb/c小鼠:购自北京维通利华实验动物技术有限公司;

[0129] SP2/0骨髓瘤细胞:购自sigma-aldrich公司,产品目录号08060101。

[0130] 一、动物免疫

[0131] 将实施例2制备的TETS-KLH溶液免疫Balb/c小鼠,每只小鼠单次免疫100μg TETS-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。

[0132] 二、细胞融合与克隆化

[0133] 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。

[0134] 2、利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,得到可以分泌毒鼠强单克隆抗体的杂交瘤细胞,依据所用免疫原(式II—式IV所示的三种半抗原制备的免疫原)的不同,分别得到三种分泌抗毒鼠强单克隆抗体的杂交瘤细胞,分别命名为TETS-B4,TETS-C5,TETS-E1。

[0135] 三、细胞冻存和复苏

[0136] 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。

[0137] 四、单克隆抗体的制备与纯化

[0138] 1、增量培养法

[0139] 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)。

[0140] 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)。

[0141] 单克隆抗体中的蛋白浓度(mg/mL) = $1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260}$

[0142] 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。

[0143] 2、腹水制备

[0144] 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)。

[0145] 五、单克隆抗体的鉴定

[0146] 将步骤四步骤1制备的单克隆抗体溶液分别进行如下鉴定:

[0147] 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。

[0148] 2、抗体效价的测定

[0149] (1)采用实施例2制备的TETS—BSA溶液(用碳酸盐缓冲液调节浓度)进行包被,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,TETS—BSA包被液的浓度为1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0150] (2)4℃孵育16小时。

[0151] (3)封闭并洗板。

[0152] (4)每孔加入100 μL 步骤四步骤1制备的单克隆抗体溶液或其稀释液(PBS缓冲液进行梯度稀释)

[0153] (5)室温孵育2h并洗板。

[0154] (6)每孔加入100 μL 辣根过氧化物酶标记的IgG,室温孵育2小时。

[0155] (7)洗板

[0156] (8)加入TMB显色液,避光显色15min。

[0157] (9))每孔加入50 μL 2mol/L硫酸中止反应,读取OD₄₅₀值。

[0158] 以OD值达到1.0左右为阳性孔。抗体效价为1:27000。

[0159] 3、单克隆抗体灵敏度的计算

[0160] 其中免疫原为KLH-TETS-2j和KLH-TETS-2d的采取BSA-TETS-2c包被,灵敏度高,免疫原为KLH-TETS-2c的采取BSA-TETS-2d包被,灵敏度高。

[0161] (1) — (3)同步骤2的(1) — (3)。

[0162] (4)每孔加入50 μL 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

[0163] (5)每孔加入50 μL 步骤四步骤1制备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。

[0164] (6)每孔加入100 μL 辣根过氧化物酶标记的IgG,室温孵育2小时。

[0165] (7)洗板

[0166] (8)加入TMB显色液,避光显色15min。

[0167] (9))每孔加入50 μL 2mol/L硫酸中止反应,读取OD₄₅₀值。

[0168] 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TETS浓度的自然数的对数值为横坐标绘制曲线图,见图8。

[0169] 对照图8,得到纵坐标数值等于50%对应的TETS浓度,即为IC50值。单克隆抗体检测TETS的灵敏度(IC50)值为4.39ppb。

[0170] 4、特异性测定

[0171] 采用包被缓冲液分别溶解布洛芬,三溴化环己烷四胺,七氯,N-(4-硝基苄基)-1-金刚烷胺氢溴酸,阿托品,六亚甲基胺,氟虫腈,毒杀芬,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布洛芬,三溴化环己烷四胺,七氯,N-(4-硝基苄基)-1-金刚烷胺氢溴酸,阿托品,六亚甲基胺,氟虫腈,毒杀芬样品对毒鼠强单克隆抗体(选择KLH-TETS-2j免疫制备的单抗,BSA-TETS-2c作为包被原)与毒鼠强包被原反应的半数抑制量(IC_{50})及交叉反应率,交叉反应率的公式为:交叉反应率(%)=(引起毒鼠强单克隆抗体与毒鼠强包被原反应50%抑制的毒鼠强的浓度/引起毒鼠强单克隆抗体与毒鼠强包被原反应50%抑制的其它物质的浓度) $\times 100\%$ 。实验设3次重复。

[0172] 结果如表1所示,结果表明,七氯、氟虫腈、毒杀芬样品对毒鼠强单克隆抗体与毒鼠强包被原反应的半数抑制量(IC_{50})均大于1000 $\mu g/mL$,毒鼠强与布洛芬,三溴化环己烷四胺,N-(4-硝基苄基)-1-金刚烷胺氢溴酸,阿托品,六亚甲基胺样品的交叉反应率均小于0.1%,无交叉反应,说明毒鼠强单克隆抗体的特异性非常好。

[0173] 表1 毒鼠强单克隆抗体的特异性检测

	中文名称	交叉反应率(%)
[0174]	布洛芬	<0.1
	三溴化环己烷四胺	<0.1
	七氯	$IC_{50}>1000ppb$
	N-(4-硝基苄基)-1-金刚烷胺氢溴酸	<0.1
[0175]	阿托品	<0.1
	六亚甲基胺	<0.1
	氟虫腈	<0.1
	毒杀芬	$IC_{50}>1000ppb$

[0176] 本发明提供了一种毒鼠强的人工抗原制备方法,属于生物化工技术领域。本发明合成三种毒鼠强半抗原;用碳二亚胺法将其与载体蛋白牛血清白蛋白(BSA)偶联制备偶联物,用飞行质谱法测定偶联物的偶联比。试验结果表明我们制得偶联物产生了针对毒鼠强的抗体,即是毒鼠强人工抗原。本发明成功合成了毒鼠强人工抗原,步骤简洁合理,效果理想。本发明所制备的毒鼠强人工抗原适合用于毒鼠强的酶联免疫分析。

[0177] 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。

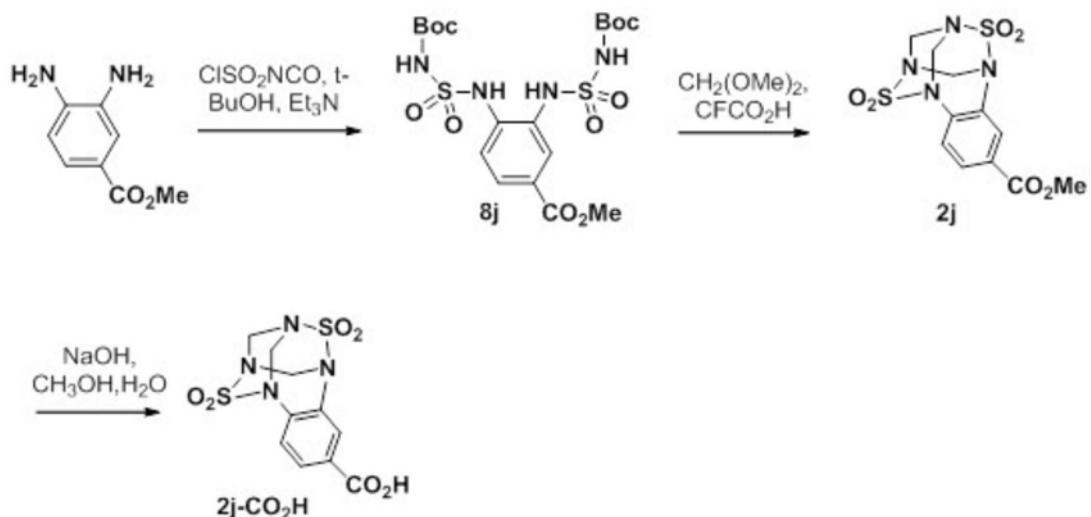


图 1

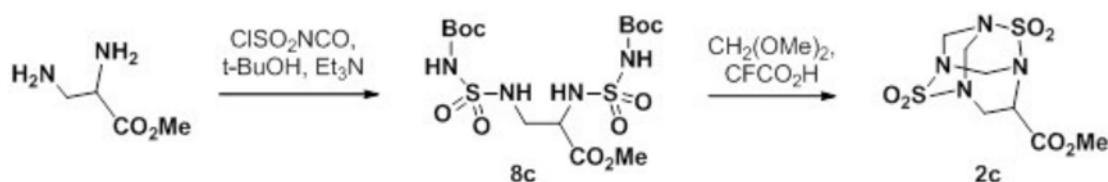
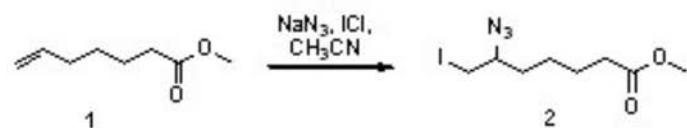
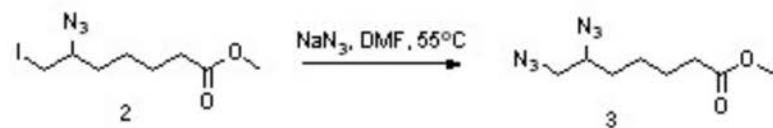


图2

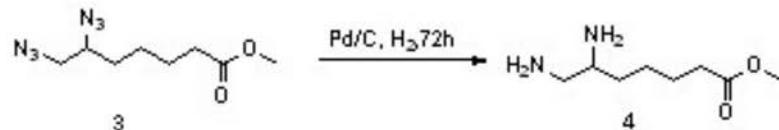
1. 中间体 2 的合成



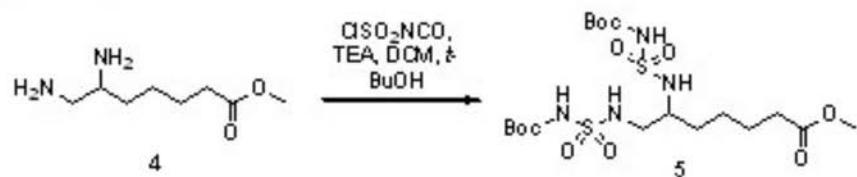
2. 中间体 3 的合成



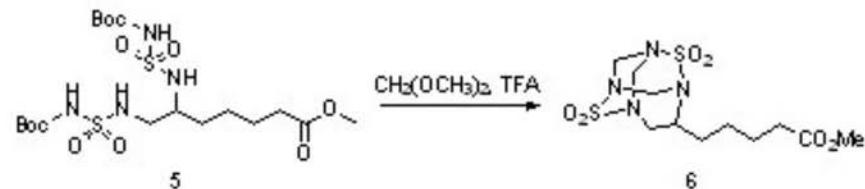
3. 中间体 4 的合成



4. 中间体 5 的合成



5. 中间体 6 的合成



6. 中间体 6 的合成

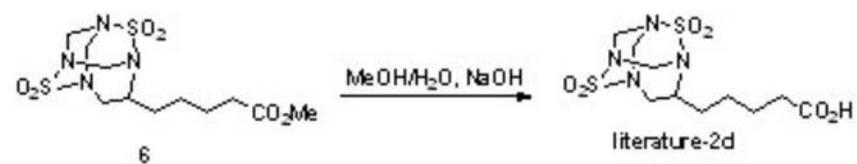


图3

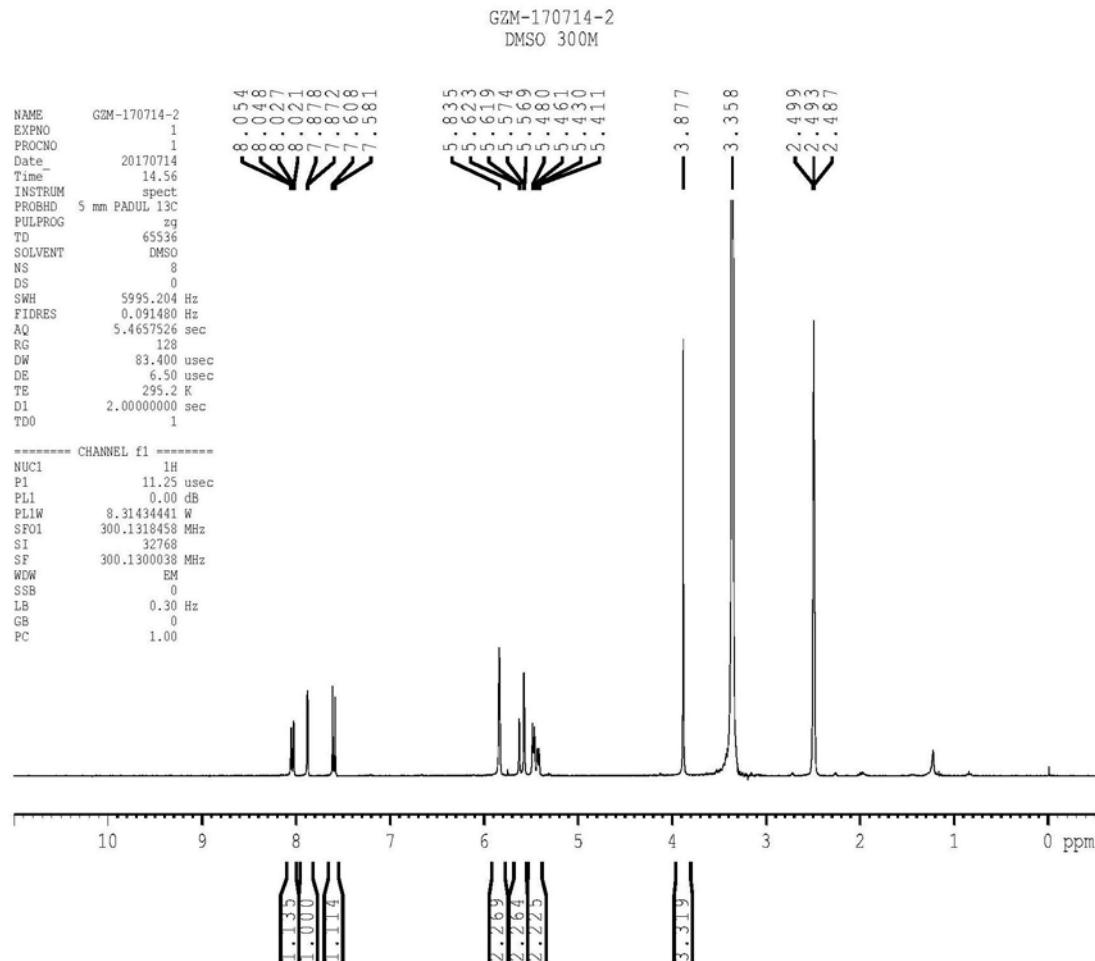


图4

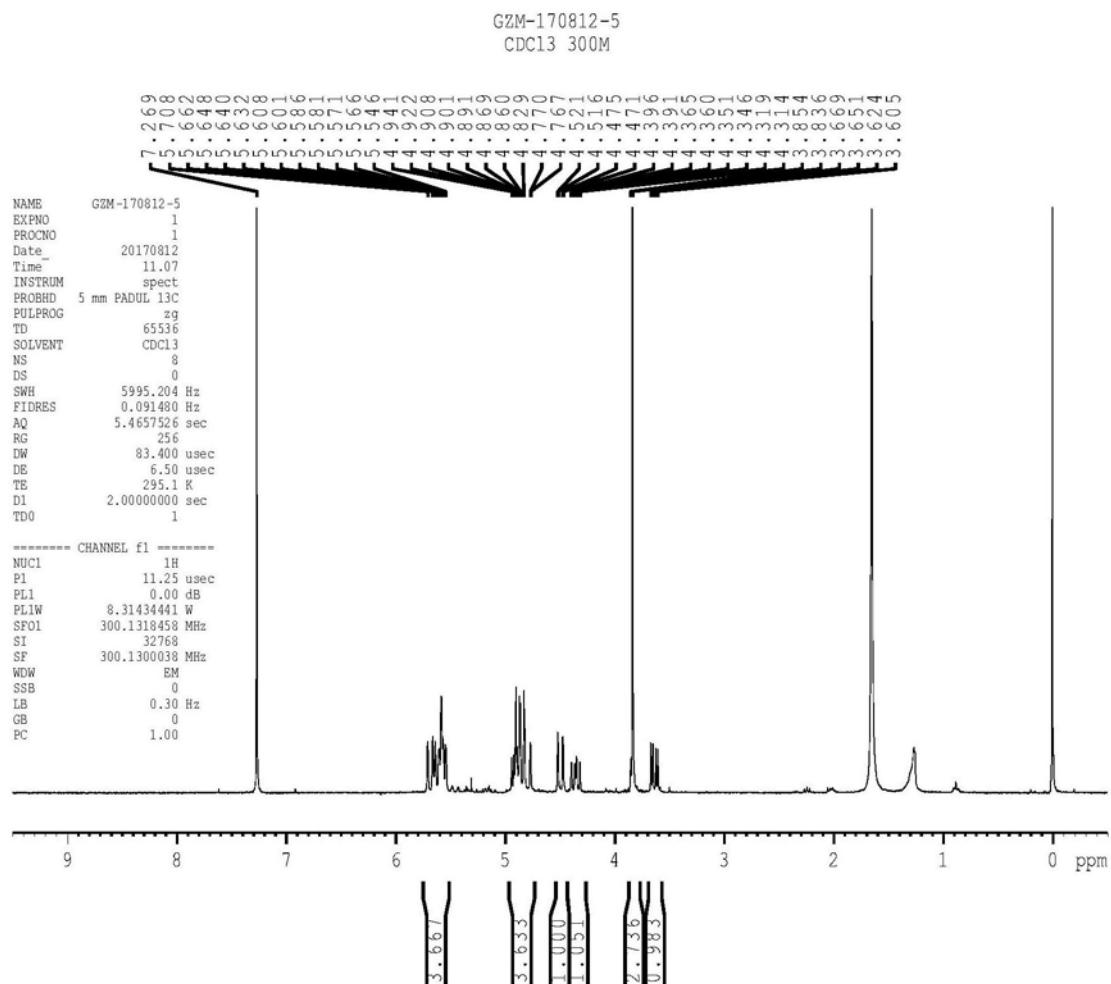


图5

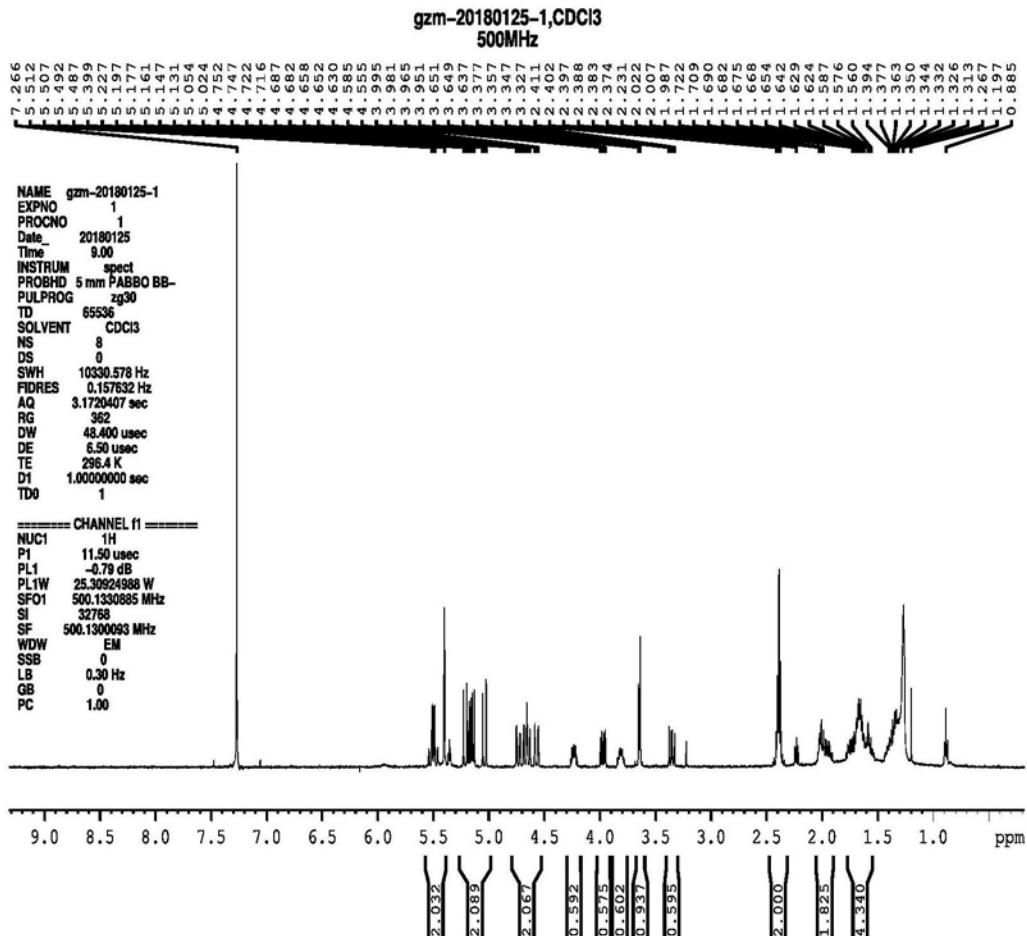


图6

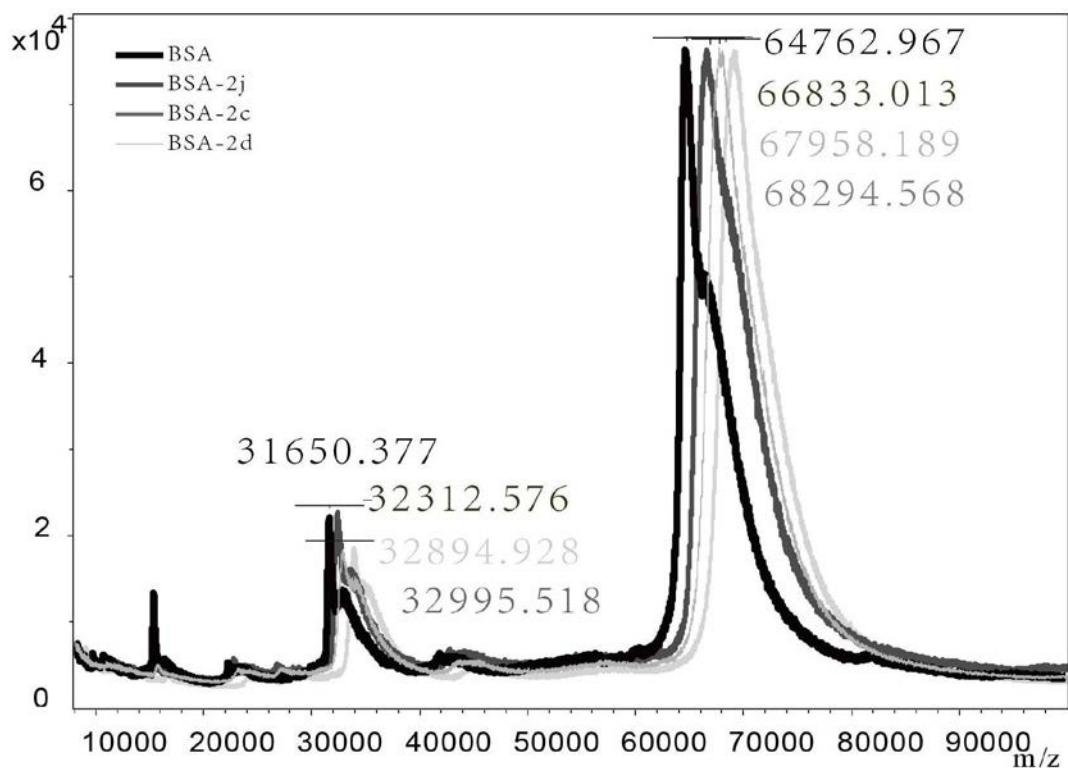


图7

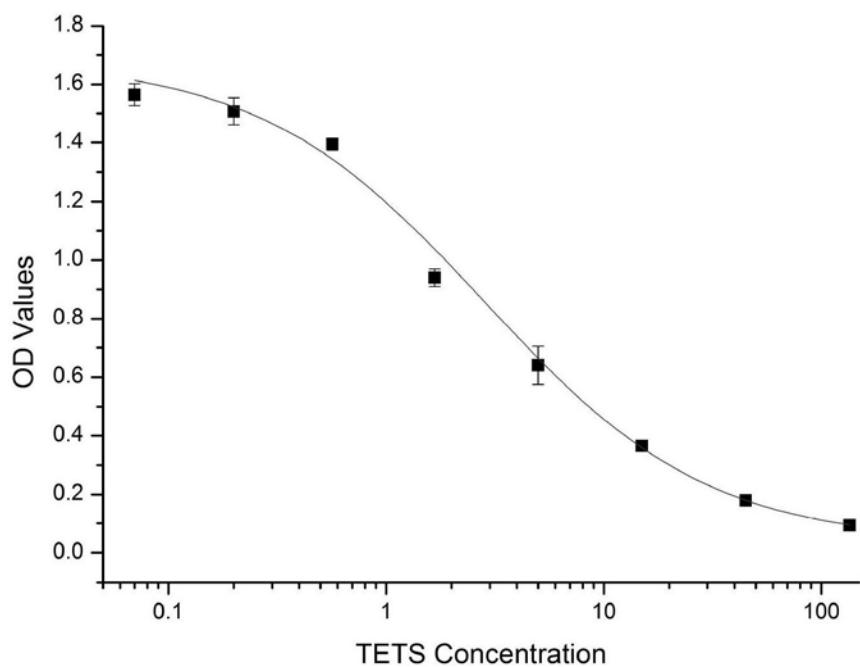
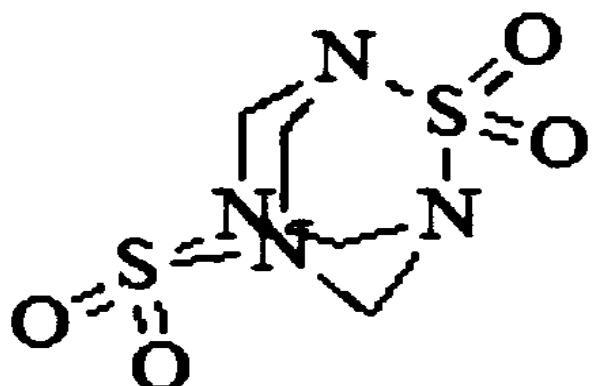


图8

专利名称(译)	一种毒鼠强半抗原及单克隆抗体的制备方法与应用		
公开(公告)号	CN109608479A	公开(公告)日	2019-04-12
申请号	CN201811319490.6	申请日	2018-11-07
[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	C07D513/18 C07K14/795 C07K14/765 C07K1/107 C07K1/02 C07K16/44 G01N33/535		
CPC分类号	C07D513/18 C07K14/765 C07K14/795 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/535		
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，具体公开了一种毒鼠强半抗原及单克隆抗体的制备方法与应用。本发明以氯磺酰异腈酸酯、二磺酰胺为主要原料，合成毒鼠强半抗原；用活泼酯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毒鼠强的抗体，即所制得的偶联物为一种毒鼠强人工抗原。本发明所制备的毒鼠强人工抗原适合用于毒鼠强的酶联免疫分析。



(式 I)