



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104031142 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201410254563. 3

C07K 16/44 (2006. 01)

(22) 申请日 2014. 06. 10

G01N 33/53 (2006. 01)

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道  
1800 号江南大学食品学院

(72) 发明人 马伟 胥传来 孔德昭 匡华

徐丽广 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所

(普通合伙) 32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

C07K 14/765 (2006. 01)

C07K 14/77 (2006. 01)

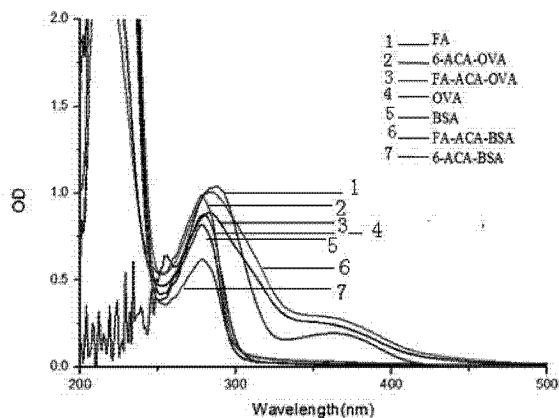
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种高特异性的叶酸完全抗原合成方法及其应用

(57) 摘要

一种高特异性的叶酸完全抗原合成方法及其应用,属于生物化工技术领域。本发明是在载体蛋白溶液中加入 6-氨基己酸与水溶性碳二亚胺后室温下反应,透析后得到修饰了连接臂的载体蛋白 B。叶酸(N-{4-[(2-氨基-1,4-二氢-4-氧代-6-嘧啶)甲氨基]苯甲酰基}-L-谷氨酸)溶解于二甲亚砜,加入二环己基碳二亚胺与羟基琥珀酰亚胺,反应生成叶酸衍生物,再与载体蛋白 B 连接臂上的氨基进行偶联,得到完全抗原。结果表明,用本发明的抗原免疫动物得到的抗血清效价达 81000,检测限 0.042ng/mL,半抑制浓度 0.3ng/mL。产生的抗体特异性高、灵敏度高。本发明的抗原或抗体用于免疫亲和柱的制备及建立酶联免疫吸附分析方法和胶体金试纸快速检测法,用于检测叶酸残留。



1. 一种高特异性的叶酸完全抗原合成方法,其特征在于步骤为:在载体蛋白溶液中加入 6-氨基己酸  $\epsilon$ -ACA 与水溶性碳二亚胺 EDC,在室温下反应,透析后得到修饰了连接臂的载体蛋白 B;将叶酸 N-{4-[(2-氨基-1,4-二氢-4-氧代-6-嘧啶)甲氨基]苯甲酰基}-L-谷氨酸溶解于二甲亚砜 DMSO 中,加入二环己基碳二亚胺 DCC 与 N-羟基丁二酰亚胺 NHS,反应生成叶酸衍生物,再加入载体蛋白 B,调节反应 pH 值 7.4,与载体蛋白 B 上的氨基进行偶联,透析,得到高特异性的叶酸完全抗原。

2. 根据权利要求 1 所述高特异性的叶酸完全抗原合成方法,其特征在于:所述载体蛋白为牛血清白蛋白 BSA 或鸡卵清白蛋白 OVA。

3. 根据权利要求 1 所述高特异性的叶酸完全抗原合成方法,其特征在于具体步骤如下:

(1) 修饰载体蛋白:取载体蛋白 50mg 溶解于 5mL pH9.6 碳酸盐缓冲溶液中,再加入 100mg 6-氨基己酸,30mg 水溶性碳二亚胺;调节体系 pH 值于 6~8,室温下反应 4h;用 PBS 缓冲液透析 2 天,期间换水 4 次,即得到修饰了连接臂的载体蛋白 B;

(2) 叶酸完全抗原的制备:

取 25mg 叶酸,加入 2.5mL DMSO 溶解,调节 pH 值为 7.4,再分别加入 10mg N-羟基丁二酰亚胺 NHS,23mg DCC,室温下避光混匀,搅拌反应 4h,将步骤(1)制备的载体蛋白 B 100mg 加入反应液中,调节 pH 值为 8.5,在室温 25℃下避光反应 2h;用 PBS 缓冲液透析 2 天,期间换水 4 次,即得到叶酸完全抗原。

4. 权利要求 1 所述高特异性的叶酸完全抗原的应用,其特征在于:通过叶酸完全抗原化合物免疫动物得到多克隆抗体或单克隆抗体,并应用于检测叶酸中。

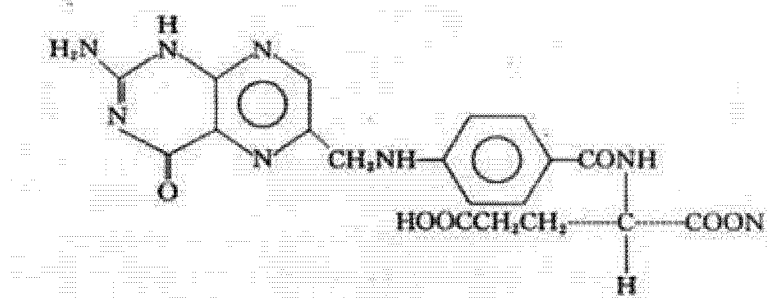
## 一种高特异性的叶酸完全抗原合成方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种高特异性的叶酸完全抗原合成方法及其应用,属于生物化工技术领域。

### 背景技术

[0002] 叶酸(folic acid 或 folate)又名喋酰谷氨酸,B族维生素之一,是氨基酸、嘧啶和嘌呤代谢中单碳转移的载体,对核蛋白的合成起辅酶作用;同时,叶酸也是许多细胞内酶反应的辅酶;叶酸的缺乏,会导致 dTMP 的合成受到限制,使 DNA 合成受阻,而产生巨幼细胞贫血。目前的研究已经证实,妇女孕前或妊娠早期缺乏叶酸是神经管畸形发生的重要病因之一。叶酸与同型半胱氨酸代谢关系密切,对预防心脑血管疾病的发生具有重要的生物学意义。而且,也有研究表明,叶酸与许多癌症的发生、预防以及治疗相关。在我国,叶酸作为一种食品添加剂可以按照食品安全国家标准合法添加至食品中。



[0003] 叶酸,化学名称 N-{4-[ (2-氨基-1,4-二氢-4-氧代-6-喋啶) 甲氨基 ] 苯甲酰基 }-L-谷氨酸,分子式  $C_{19}H_{19}N_7O_6$ ,分子量 441.40(按 2007 年国际相对原子质量),由喋呤啶、对氨基苯甲酸和 L-谷氨酸结合合成。

[0004] 目前,根据检测对象的不同,我国对叶酸的检测方法主要有比色法薄层层析法、气相色谱-质谱法(GC/MS)、高效液相色谱法(HPLC)、微生物法、同位素放射免疫法、酶联免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、胶体金试纸条法等。

[0005] 仪器分析方法存在样品须经多步稀释、过滤、亲和柱富集等前处理过程,存在制备复杂、繁琐的缺点,其检测成本高,周期长,无法满足大批量样本快速筛查,以及现场快速检测的要求。ELISA 和胶体金试纸条法属于免疫分析技术,具有较高的灵敏度和特异性,检测时对样本的纯度要求不高而且操作简便,适用于大量样本的现场快速检测。而无论是仪器分析方法前处理过程中的亲和柱富集还是免疫分析方法的检测过程中,其至关重要的影响因素还是高特异性的抗原和抗体。

[0006] 传统的叶酸人工抗原一般采用混合酸酐法,小分子中的氨基可以在三级胺的作用下与氯甲酸异丁酯反应,生成活泼中间体混合酸酐,然后与载体蛋白上的伯氨基反应,形成酰胺交联键。而叶酸小分子载体蛋白直接耦联,由于载体蛋白与小分子之间的空间位阻关系,最终通过免疫动物得到的抗体往往是针对小分子的部分结构的,抗体的特异性和灵敏度会受到很大影响,尤其是对喋呤、喋酸、四氢叶酸、二氢叶酸和对氨基苯甲酸等物质的交

叉现象不可避免。

[0007] 动物免疫抗体的产生是与载体分子的结构有关的。同样,载体分子不仅影响产生抗体的数量,还影响着抗体的类型和亲和力。有研究表明,半抗原与载体结构之间的多原子间隔空间的存在更容易产生具有高特异性和高亲和力的抗体。

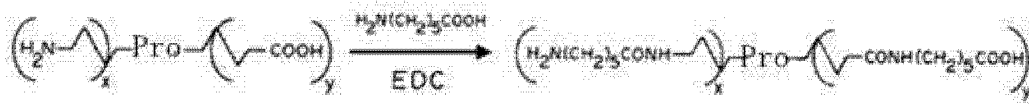
[0008] 本发明是在载体蛋白上修饰具有一定空间长度的 6-氨基己酸作为载体连接臂,将半抗原耦联到载体蛋白的连接臂上,形成载体与半抗原间具有一定空间间隔的完全抗原。

**发明内容**

[0009] 本发明的目的是针对现有叶酸抗原合成技术以及相应抗体的不足和缺陷,提供一种新型的叶酸完全抗原合成方法,使得制备高特异性的叶酸单克隆抗体成为可能,本发明的另一目的是提供叶酸完全抗原的应用。

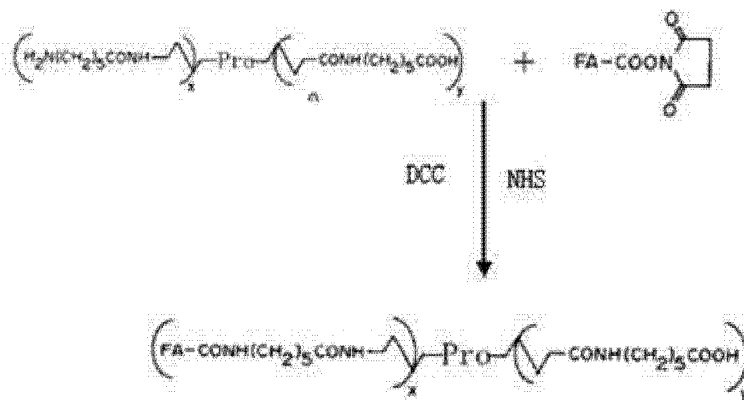
[0010] 本发明的技术方案,一种高特异性的叶酸完全抗原合成方法,步骤为:在载体蛋白溶液中加入 6-氨基己酸(ε-ACA)与水溶性碳二亚胺(EDC)后,室温下反应,透析后得到修饰了连接臂的载体蛋白 B(式 1 所示);叶酸(N-{4-[(2-氨基-1,4-二氢-4-氧代-6-嘧啶)甲氨基]苯甲酰基}-L-谷氨酸)溶解于二甲亚砜(DMSO)中,加入二环己基碳二亚胺(DCC)与 N-羟基丁二酰亚胺(NHS),反应生成叶酸衍生物,再加入载体蛋白 B,调节反应 pH 值 7.4,与载体蛋白 B 上的氨基进行偶联,透析,得到高特异性的叶酸完全抗原(式 2)。将完全抗原透析,然后进行紫外鉴定(图 1)。

[0011] 载体蛋白修饰路线为:



式 1

叶酸人工抗原合成路线为:



式 2

所述高特异性的叶酸完全抗原合成方法,具体步骤如下:

(1) 修饰载体蛋白:取载体蛋白 50mg 溶解于 5mL pH9.6 碳酸盐缓冲溶液中,再加入 100mg 6-氨基己酸,30mg 水溶性碳二亚胺;调节体系 pH 值于 6~8,室温下反应 4h;用 PBS 缓冲液透析 2 天,期间换水 4 次,即得到修饰了连接臂的载体蛋白 B;

## (2) 叶酸完全抗原的制备：

取 25mg 叶酸，加入 2.5mL DMSO 溶解，调节 pH 值为 7.4，再分别加入 10mg N-羟基丁二酰亚胺 NHS，23mg DCC，室温下避光混匀，搅拌反应 4h，再将步骤(1)制备的载体蛋白 B 100mg 加入反应液中，调节 pH 值为 8.5，在室温 25℃ 下避光反应 2h；用 PBS 缓冲液透析 2 天，期间换水 4 次，即得到叶酸完全抗原；

所述高特异性的叶酸完全抗原的应用，其特征在于：通过叶酸完全抗原化合物免疫动物得到多克隆抗体或单克隆抗体，并应用于检测叶酸中。

[0012] 所述的 N-{-[(2-氨基-1,4-二氢-4-氧代-6-嘧啶)甲氨基]苯甲酰基}-L-谷氨酸，6-氨基己酸纯度均大于 95%。

[0013] 所述的载体蛋白为：牛血清白蛋白 BSA、鸡卵清白蛋白 OVA。

[0014] 上述叶酸完全抗原化合物在制备叶酸抗体中的应用也属于本发明的保护范围。

[0015] 上述叶酸完全抗原化合物免疫动物得到的抗体也属于本发明的保护范围，所述抗体为多克隆抗体或单克隆抗体。

[0016] 上述叶酸完全抗原化合物或抗体在检测叶酸中的应用也属于本发明保护的范畴。

[0017] 本发明的有益效果：本发明是新型的叶酸完全抗原合成方法，叶酸完全抗原呈现出的特异性的叶酸整体抗原结构，使得筛选出高特异性的叶酸单克隆抗体成为可能。

[0018] 实验结果表明，用本发明的抗原免疫动物得到的抗血清效价可达 81000，检测限为 0.042ng/mL，半抑制浓度为 0.3ng/mL。产生的抗体特异性高、灵敏度高。本发明的抗原或抗体可用于免疫亲和柱的制备及建立酶联免疫吸附分析方法和胶体金试纸快速检测法。

## 附图说明

[0019] 图 1、叶酸抗原紫外光谱图。

## 具体实施方式

[0020] 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。

[0021] 下述实施例中所使用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

### [0022] 实施例 1 修饰载体蛋白的制备

取牛血清白蛋白 50mg 溶解于 5mL pH9.6 碳酸盐缓冲溶液，再加入 100mg 6-氨基己酸，30mg 水溶性碳二亚胺。调节体系 pH 值于 6~8，室温下反应 4h。用 PBS 缓冲液透析 2 天，期间换水 4 次，即得到修饰了连接臂的牛血清白蛋白载体蛋白 B。

### [0023] 实施例 2 叶酸完全抗原的制备

取 25mg 叶酸，加入 2.5mL DMSO 溶解，调节 pH 值为 7.4，再分别加入 10mg NHS，23mg DCC，室温下避光混匀，搅拌反应 4h，再加入载体蛋白 B 100mg，调节 pH 值为 8.5，在室温 25℃ 下避光反应 2h。用 PBS 缓冲液透析 2 天，期间换水 4 次，即得到叶酸完全抗原。

### [0024] 实施例 3 叶酸包被原的制备

取 25mg 叶酸，加入 2.5mL DMSO 溶解，零度预冷 30 分钟。零度下，分别加入三正丁胺，氯甲酸异丁酯(半抗原叶酸、三正丁胺、氯甲酸异丁酯的摩尔比为 1:1.2:1.2)，0℃ 反应 1 小时。取 100mg 卵清白蛋白/牛血清蛋白，加入 10mL 0.1M pH9.6 碳酸盐缓冲液，0℃ 预冷 30 分钟。在 0℃ 条件下，将活化的半抗原溶液慢速滴加到蛋白溶液中，0℃ 条件下反应 1h，然后

室温下反应 24h。用 PBS 缓冲液透析 2 天,期间换水 4 次,即得到叶酸包被原。

#### [0025] 实施例 4 叶酸抗血清的制备

以实施例 2 制得的抗原为免疫原,选用 6-8 周龄,雌性 BALB/C 小鼠为免疫动物,采用弗氏佐剂进行免疫,免疫小鼠 5 只。

[0026] 弗氏佐剂免疫方法为:首免取适量免疫原与等体积弗氏完全佐剂混合,乳化好后经颈背部皮下多点注射免疫,每间隔 3 周加强免疫一次。

#### [0027] 实施例 5 叶酸抗血清的测定

一、采用间接 ELISA 方法检测血清效价,具体操作步骤如下:

包被:将实施例 3 中的包被原用 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液从 1 $\mu$ g/mL 开始倍比稀释,100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C 反应 2h。

[0028] 洗涤:将板内溶液倾去,甩干,并用洗涤液洗涤 3 次,每次 3min。

[0029] 封闭:拍干后,加入 200 $\mu$ L/孔封闭液,37 $^{\circ}$ C 反应 2h。洗涤后烘干备用。

[0030] 加样:将抗血清从 1:1000 开始倍比稀释,并加入到各稀释度的包被孔中,100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C 反应 1h;充分洗涤后,加入 1:3000 稀释的 HRP-羊抗鼠 IgG,100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C 反应 1h。

[0031] 显色:将酶标板取出,充分洗涤后,每孔加入 100 $\mu$ L 的 TMB 显色液,37 $^{\circ}$ C 避光反应 15min。

[0032] 终止和测定:每孔加入 50 $\mu$ L 终止液以终止反应,然后用酶标仪测定各孔的 OD<sub>450</sub> 值。

[0033] 结果判读:以 OD<sub>450</sub> 值大于或等于阴性对照孔的 2.1 倍(即 P/N  $\geq$  2.1)所对应的血清最高稀释倍数即为血清的 ELISA 效价。

#### [0034] 二、最低检测限、半数抑制以及特异性的检测

具体操作步骤如下:

用上述的间接 ELISA 方阵滴定法确定包被原和抗体的工作浓度,以 OD<sub>450</sub> 值在 1.5 左右时所对应的抗原和抗体浓度为最适工作浓度。

[0035] 包被:将包被原用包被缓冲液稀释至最适工作浓度,100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C 反应 2h。

[0036] 洗涤和封闭:方法操作同上述间接 ELISA 法。

[0037] 配制叶酸标准溶液:将叶酸标准品用 DMSO 配制成 0.5mg/mL 的母液,然后,在加样前,再用含 10% 甲醇的 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 溶液倍比稀释成需要浓度。

[0038] 加样:每孔加入 50 $\mu$ L 倍比稀释的叶酸各浓度标准品,然后再加入 50 $\mu$ L/孔最适稀释倍数的抗血清,37 $^{\circ}$ C 反应 1h。充分洗涤后,加入 1:3000 稀释的 HRP-羊抗鼠 IgG,100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C 反应 1h。

[0039] 显色反应:将酶标板取出,充分洗涤后,每孔加入 100 $\mu$ L 的 TMB 显色液,37 $^{\circ}$ C 避光反应 15min。

[0040] 7)终止和测定:每孔加入 50 $\mu$ L 终止液以终止反应,然后用酶标仪测定各孔的 OD<sub>450</sub> 值。

[0041] 8)数据处理:以叶酸各浓度的对数为横坐标,以叶酸各浓度对应的 OD<sub>450</sub> 值为纵坐标,绘制标准曲线,计算半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>,即 OD<sub>450</sub> 值从零标准溶液对应的 A0 下降到 50% 时所对应的标准品浓度),从而判定抗血清对叶酸是否具有特异性。

[0042] 9) 将叶酸的标准品换成对氨基苯甲酸、泛酸、烟酸、谷氨酸、喋呤、蝶酸、VB1、VB12、甲氨喋呤、生物素、D-生育酚、四氢叶酸,按上述方法测定  $IC_{50}$  值,并计算交叉反应率。

[0043] 交叉反应率(%) =  $IC_{50}$  (叶酸) /  $IC_{50}$  (交叉物)

实验设 3 次重复,结果取平均值。

[0044] 结果显示,四免后,小鼠抗血清效价可达 81000,检测限为 0.042ng/mL,叶酸  $IC_{50}$  为 0.3ng/mL,各类似物的交叉反应率均小于 0.1%。

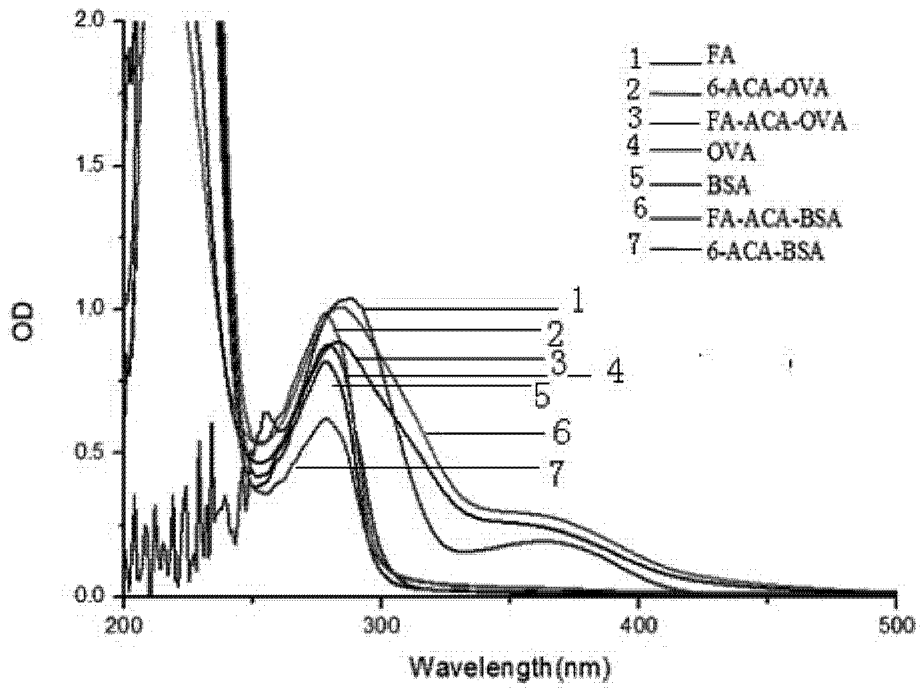


图 1

专利名称(译)	一种高特异性的叶酸完全抗原合成方法及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN104031142A</a>	公开(公告)日	2014-09-10
申请号	CN201410254563.3	申请日	2014-06-10
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	马伟 胥传来 孔德昭 匡华 徐丽广 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲		
发明人	马伟 胥传来 孔德昭 匡华 徐丽广 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 C07K19/00		
其他公开文献	CN104031142B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种高特异性的叶酸完全抗原合成方法及其应用，属于生物化工技术领域。本发明是在载体蛋白溶液中加入6-氨基己酸与水溶性碳二亚胺后室温下反应，透析后得到修饰了连接臂的载体蛋白B。叶酸（N-{4-[(2-氨基-1,4-二氢-4-氧代-6-喋啶)甲氨基]苯甲酰基}-L-谷氨酸）溶解于二甲亚砜，加入二环己基碳二亚胺与羟基琥珀酰亚胺，反应生成叶酸衍生物，再与载体蛋白B连接臂上的氨基进行偶联，得到完全抗原。结果表明，用本发明的抗原免疫动物得到的抗血清效价达81000，检测限0.042ng/mL，半抑制浓度0.3ng/mL。产生的抗体特异性高、灵敏度高。本发明的抗原或抗体用于免疫亲和柱的制备及建立酶联免疫吸附分析方法和胶体金试纸快速检测法，用于检测叶酸残留。

