



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104119277 B

(45)授权公告日 2016.08.17

(21)申请号 201410338095.8

C07K 16/06(2006.01)

(22)申请日 2014.07.16

C07K 16/18(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

(73)专利权人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路483号

(56)对比文件

CN 103288741 A,2013.09.11,权利要求1-10、实施例1-5.

US 2372066 A,1945.03.20,全文.

WO 2006135280 A1,2006.12.21,全文.

CN 101230048 A,2008.07.30,全文.

CA公司.RN:1540966-84-4.《STN Registry数据库》.2014,

CA公司.RN:1540966-84-4.《STN Registry数据库》.2014,

审查员 刘健颖

(72)发明人 孙远明 罗林 徐振林 沈玉栋
王弘 雷红涛 杨金易 肖治理

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 林丽明

(51)Int.Cl.

C07D 233/64(2006.01)

C07K 1/107(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图2页

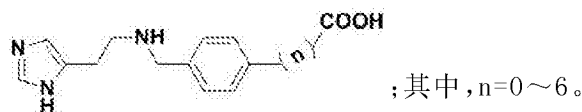
(54)发明名称

一种直接针对组胺的半抗原、人工抗原、抗体及其制备方法与应用

准。

(57)摘要

本发明属于食品安全免疫检测技术领域,具体公开了一种直接针对组胺的半抗原、人工抗原、抗体及其制备方法与应用。所述半抗原的分子结构如(I)所示:



(I)

由上述半抗原与载体蛋白结合获得人工抗原,由上述人工抗原免疫动物获得的抗体能直接识别组胺,对其他结构类似物均不存在明显的交叉反应;基于此抗体建立的组胺免疫分析方法,较之前报道的间接衍生的方法,省去了对样品进行前处理的衍生步骤,节省有机试剂的消耗和分析时间,降低检测成本。所得多克隆抗体的效价为1:64000,半抑制浓度为56.3 mg/L,其组胺的最低检测限可达25.8 mg/L低于各国规定的限量标

一种直接针对组胺的半抗原、人工抗原、抗体及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全免疫检测技术领域,更具体地,涉及一种直接针对组胺的半抗原、人工抗原、抗体及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 组胺又名组织胺,化学名称为4-(5)-(2-氨基乙基)咪唑,是一种广泛存在于各生物体组织中的胺类物质。生物体中的组氨酸经过组胺酸脱羧酶的作用形成组胺,组胺是生物胺中对人体健康影响最大的物质。组胺一般很容易代谢,但如果摄入由于细菌的污染导致食物中组胺的含量水平超过人体对其代谢能力时,就会对机体产生危害。组胺中毒是水产食品存在的主要安全问题之一,世界各地尤其是沿海地区组胺中毒事件时有发生。组胺可引起头痛、瘙痒性皮炎、低血压等一系列过敏反应,对消化道有强烈的刺激作用,可造成肠胃出血、糜烂,其在动物源性食品中的残留直接威胁到人类身体健康。鉴于此,美国FDA要求进口水产品组胺不得超过50 mg/kg;欧盟规定鲭科鱼类中组胺含量不得超过100 mg/kg;我国规定鲑鱼中组胺不得超过1000 mg/kg;其他海水鱼不得超过300 mg/kg。目前国内外检测组胺的常用方法主要集中在仪器方法如高效液相色谱-质谱联用、毛细管电泳等方法,这些方法样品预处理要求高、步骤复杂、操作需专业人员、检测费用高、所依赖仪器昂贵复杂、费时费力,很难满足在许多场合中快速检测组胺的需要,在应用上不能得到有力的推广。

[0003] 基于抗原-抗体特异性结合的免疫分析法具有样品前处理简便、操作简单、快速、灵敏、高通量等特点,被誉为是21世纪最具竞争和挑战的快速检测技术,在食品安全领域具有广阔的应用前景。但是,对于免疫分析法而言,抗体作为核心是决定整个方法性能的重要基础,而抗体的效果很大程度上又取决于引起相应动物发生免疫反应的抗原结构。由于组胺分子质量非常小(111.14 Da),得到高特异性且针对组胺的抗体一直是有关学者致力解决的难题。

[0004] 1984年,Mital等人在《Agents and Actions》发表题为An attempt to produce an antibody of histamine and histamine derivatives的文章,他们首先尝试了用牛血清蛋白(BSA)-丁二酰组胺偶联物作为免疫原去免疫大白兔,得到的血清含有抗BSA的抗体,没检测到识别半抗原(组胺)的抗体;接着,他们又将BSA与对-[2-(N-三氟乙酰组胺)偶氮基]苯甲酸偶联免疫兔子,得到了对三氟乙酰组胺有一定识别的抗体,然而该抗体对含三氟乙酰基的化合物都有一定的识别,不适合用于建立免疫分析方法。1986年,Guesdon等人在《Journal of Immunological Methods》发表题为Monoclonal anti-histamine antibody: preparation, characterization and application to enzyme immunoassay of histamine的文章,他们选择通过对苯醌将组胺与BSA偶联免疫Balb/c小鼠得到一株分泌针对组胺与苯醌复合物的单克隆抗体的杂交瘤细胞;所述杂交瘤细胞产生的抗体对组胺苯醌复合物的亲和力达到约 1.3×10^9 L/mol。但是,采用对苯醌与组胺衍生化副反应很多,反应过程不好控制,且产物稳定性不好,导致重复性差。1988年,Morel等人在《Journal of

Allergy and Clinical Immunology》发表题为Immunoanalysis of histamine through a novel chemical derivatization的文章,他们用琥珀酰甘氨酸亚胺作衍生试剂,衍生组胺,并制备了针对该衍生物的单克隆抗体,该抗体与衍生物的亲和力比组胺本身高 5×10^5 倍,并与其他类似物不存在交叉反应,但是该衍生方法的步骤多,操作复杂,产物纯化难度很大。申请号为201310197597.9的发明专利公开了一种组胺半抗原、人工抗原、抗体及其制备方法与应用,但该制备得到的组胺半抗原所产生的抗体仅针对组胺衍生物(例如苯甲酰化组胺),还不能直接用于检测组胺。

[0005] 现有的组胺检测技术以仪器法居多,而仪器法操作繁复,前处理复杂,成本高,不应用现场大批量样品的检测。现有的免疫检测方法分为:直接法,即检测组胺本身,间接法,即检测组胺的衍生物。直接法所采用的抗体是直接针对组胺本身,但是由于组胺分子量太小。间接法一般是将组胺衍生化增大其分子量,制备出针对其衍生物的抗体,所用的抗体,是针对组胺衍生物,在检测时先将组胺衍生为相应的组胺衍生物,通过检测组胺衍生物从而间接地实现对组胺的检测。其灵敏度较直接法所用抗体高,但是检测时,衍生步骤的引入加重了样品前处理的负担,有悖于快速检测的理念。

发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题是克服传统组胺检测技术中抗体仅针对组胺衍生物,组胺检测时需要先进行衍生化处理等缺陷,提供一种直接针对组胺的半抗原、人工抗原、抗体。

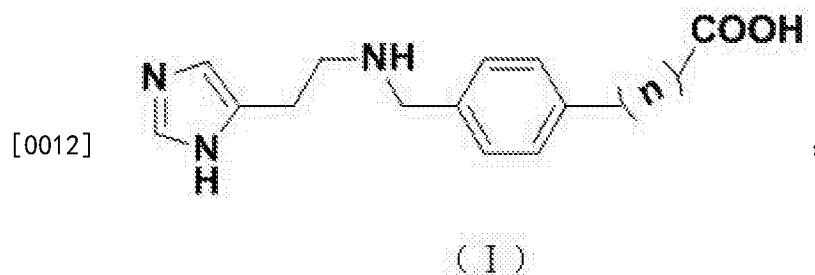
[0007] 本发明的第二个目的是提供上述直接针对组胺半抗原、人工抗原和特异性抗体的制备方法。

[0008] 本发明的第三个目的是提供上述半抗原、人工抗原或特异性抗体在组胺免疫检测方面的应用。

[0009] 本发明的第四个目的是提供一种直接检测组胺的免疫分析方法。

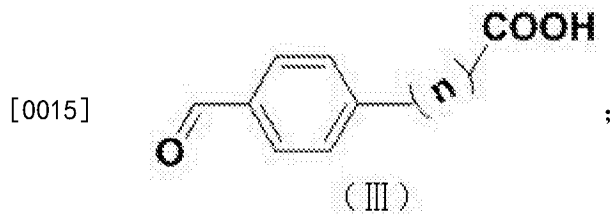
[0010] 本发明的目的通过以下技术方案予以实现:

[0011] 提供一种直接针对组胺的半抗原,所述组胺半抗原具有式(I)所示分子结构:



[0013] 其中, $n=0 \sim 6$ 。

[0014] 所述组胺半抗原的制备方法,包括如下步骤:将组胺二盐酸盐与具有式(III)所示分子结构的带羧基的苯甲醛衍生物缩合后用硼氢化钠将 $-C=N-$ 键还原得到具有式(I)所示分子结构的组胺半抗原;



[0016] 其中, $n=0\sim 6$ 。

[0017] 半抗原设计的目的是使半抗原刺激机体产生特异性免疫应答,并获得对待测物分子具有高亲和力的抗体,而半抗原设计的关键在于尽可能保留原待测物的特征结构,并在适当的位置引入合适的连接臂和与载体蛋白偶联的活性基团。

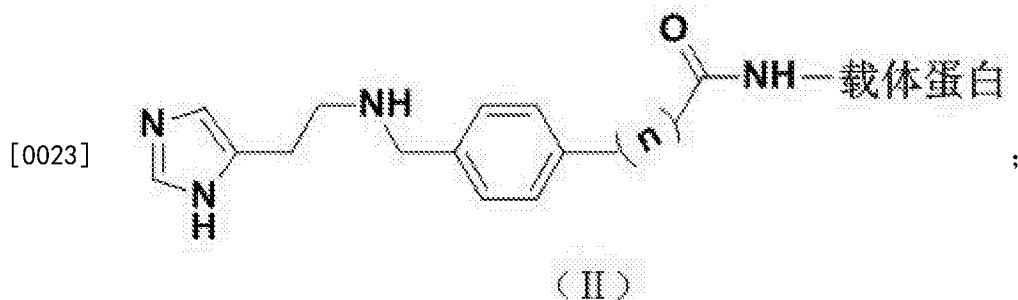
[0018] 申请人在前期研究中探索出了组胺检测时所用的新的衍生物苯甲酰氯或带羧基的苯甲醛衍生物,由该研究提供了一种可用于检测组胺的半抗原、人工抗原和抗体(申请号为201310197597.9),所述半抗原的分子结构与本发明所述半抗原的分子结构的区别为:前者组胺与带羧基的苯甲醛通过-C=N-键相连,而后者组胺与带羧基的苯甲醛通过-C-N-键相连。前者所述人工抗原免疫动物制备得到的抗体只能通过检测组胺衍生物来间接得到组胺的浓度,不仅操作繁杂,成本高,也容易产生较大的误差。

[0019] 本发明在遵循半抗原设计原理的基础上首先选择在待测物组胺的伯胺基上引入一个带苯环的手臂,所述苯环只是抗体的弱识别区,主要起应激作用,所制得的半抗原由于苯环结构的引入,加强了免疫原应激反应;其次通过还原-C=N-键,使组胺与带羧基的苯甲醛通过-C-N-键相连,最小程度的改变半抗原中组胺结构的带电特性,确保免疫原中组胺结构与待检测的组胺最高程度的相似性。从而大大提高抗体对组胺检测灵敏度和特异性,达到直接检测组胺的目的。

[0020] 优选地,上述半抗原的制备方法具体通过以下步骤来实现:

[0021] 将组胺与具有式(III)结构的带羧基苯甲醛衍生物以1:1~2的摩尔比加入到甲醇溶液中,室温搅拌约1个小时,加1~2当量的硼氢化钠还原,继续反应0.5小时,反应混合物过硅胶柱,用氯仿:甲醇:氨水=10:5:1的比例洗脱后,所得到的纯化产物在冷乙醇溶液中结晶,得到具有式(I)结构的组胺半抗原。

[0022] 提供一种直接针对组胺的人工抗原,具有式(II)所示分子结构:



[0024] 其中, $n=0\sim 6$ 。

[0025] 所述组胺人工抗原的制备方案如下:采碳二亚胺法将具有式(I)所示分子结构的组胺半抗原与载体蛋白偶联制备得到。

[0026] 本发明的人工抗原由上述半抗原与载体蛋白偶联获得,待测物组胺与载体蛋白之间由于苯环结构的存在,使得组胺结构部分远离载体蛋白并处在关键识别区。由于免疫应答具有其复杂性,对于一个具体的待测物,其人工抗原的合成需要根据自身结构特征具体

[0044] 本发明获得的多克隆抗体的效价为1:64000,半抑制浓度为56.3 mg/L,最低检测限为25.8 mg/L;其组胺的最低检测限可达25.8 mg/L低于各国规定的限量标准。

附图说明

[0045] 图1为组胺半抗原HI(n=0)及其免疫抗原、载体蛋白紫外扫描图;

[0046] 图2为组胺半抗原HI(n=0)及其包被抗原、载体蛋白紫外扫描图;

[0047] 图3为以HI(n=0)为半抗原所制备的抗体对组胺的抑制曲线。

具体实施方式

[0048] 下面结合说明书附图和具体实施例,进一步阐述本发明。这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下例实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或按照制造厂商建议的条件。除非另行定义,文中所使用的所有专业与科学用语与本领域技术人员熟悉的意义相同。

[0049] 实施例1半抗原HI(n=0)的制备方法

[0050] 在50 mL的圆底烧瓶中加入0.92 g(5 mmol)组胺二盐酸盐,并缓慢加入甲醇直至溶解,然后加入0.54g(10mmol)甲醇钠,搅拌中加入对甲酰基苯甲酸0.75 g(5 mmol),室温搅拌1小时,加硼氢化钠 0.37g(10 mmol),继续反应0.5小时,反应混合物过硅胶柱纯化,用氯仿:甲醇:氨水=10:5:1的比例洗脱后,产物溶于乙醇,在4℃冰箱过夜,有晶体析出,过滤,用冷乙醇洗涤2次,烘干,得0.84g白色晶体即为半抗原,产率(69.4%)。ESI-MS analysis (positive) m/z 246 [M+H]⁺; ¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ = 8.48 (d, J=1.2, 1H), 7.72 (d, J=8.1, 2H), 7.36 (d, J=8.2, 2H), 7.22 (s, 1H), 4.20 (s, 2H), 3.32 (t, J=7.6, 2H), 3.08 (t, J=7.6, 2H)。

[0051] 实施例2 免疫原/包被原的制备

[0052] 所述免疫原与包被原的制备方法中,不同之处在于所使用的载体蛋白,所述免疫原载体蛋白采用牛血清蛋白(BSA),所述包被原载体蛋白采用卵清白蛋白(OVA),所用的偶联方法为有一定修改的碳二亚胺法。以下所述以免疫原的制备方法为例。

[0053] 碳二亚胺法:取实施例1制备得到的半抗原HI(n=0)24.6 mg(0.1 mmol)溶于4mL硼酸溶液(0.1M,pH4.5),搅拌加入38.4 mg (0.2 mmol) 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC),再加入68mg (0.001mmol)牛血清蛋白,4 °C下磁力搅拌反应过夜,pH保持在4.5~5.0。偶联反应后的混合物,4 °C下用生理盐水透析3 d,每天更换4次透析液。得到的免疫原HI-BSA。同时,通过将半抗原与载体蛋白的投料比(所述投料比为摩尔比)改为50:1与25:1,得到另外两个半抗原与载体蛋白不同结合比的免疫原;另外用同样的方法制备得到包被原HI-OVA。将免疫原HI-BSA或包被原HI-OVA以1 mg/mL的浓度分装于0.5 mL离心管中。冻存于-20 °C冰箱中,供免疫用。

[0054] 对载体蛋白、半抗原HI(n=0)及其相应的免疫原和包被原进行紫外扫描测定(200~400 nm),发现免疫原和包被原同时具备半抗原和载体蛋白的特征吸收峰(图1和图2),说明免疫抗原和包被抗原偶联成功。

[0055] 实施例3 抗体的制备及鉴定

[0056] 将三种不同结合比的免疫原分别与等剂量的免疫佐剂(第1次免疫用弗氏完全佐

剂,以后加强免疫均用弗氏不完全佐剂)用搅拌器乳化。完全乳化后,每一种结合比的免疫原分别采用背部皮下、各部位皮下、腿部肌肉和耳缘静脉多种注射方式免疫1只7周龄左右的BaIb/c雌性小鼠。第一次免疫隔4周后加强免疫,3周以后加强免疫一次。第4次加强免疫后1周耳缘静脉采血,并利用间接ELISA测定血清效价。当效价不再上升时,采用耳缘静脉加强免疫。1周后摘眼球采血,室温静置0.5~1 h,于4℃冰箱过夜后吸取上层析出的血清。抗血清采用硫酸铵沉淀法纯化得到多克隆抗体,透析后冷冻干燥成粉末,于-20℃下保存备用。

[0057] 间接非竞争ELISA测定抗体阳性滴度:以100微升每孔的量在96孔酶标板中加入用碳酸缓冲液(50 mM,pH 9.6)稀释的包被原HI-OVA(500 ng/mL),37℃下孵育过夜,用PBST(10mM,pH7.4,0.05%吐温)洗板两次,加120微升含5%脱脂奶粉的PBS缓冲液封闭1小时,弃去封闭液,在37℃烘箱烘1小时备用。在包被好的酶标板中每孔加50微升PBS(10 mM pH7.4)及50微升用PBST系列稀释的抗血清在37℃下温育40分钟,洗板5次,加100微升用PBST稀释5000倍的HRP酶标记的羊抗鼠37℃下温育40分钟,洗板5次,加100微升TMB溶液37℃下显色10分钟,用50微升10%硫酸终止显色反应,用酶标分析仪记录450nm处各孔的吸光值。以2.1倍于阴性血清(未经免疫的小鼠)的测定值所对应的抗血清稀释倍数为抗体的效价,结果表明以半抗原HI(n=0,半抗原与载体蛋白的摩尔比为100:1)对应的抗血清(Ab-HI)效价最高为1:64000;而半抗原HI(n=0,半抗原与载体蛋白的摩尔比为50:1)对应的抗血清(Ab-HI)效价与半抗原HI(n=0,半抗原与载体蛋白的摩尔比为25:1)对应的抗血清(Ab-HI)效价低于1:64000。

[0058] 实施例4抗体的特异性及灵敏度

[0059] 依据如上效果,使用实施例3制备得到的效价最为1:64000的抗血清(Ab-HI)绘制酶联免疫分析(ELISA)标准曲线;使用磷酸盐吐温缓冲液(PBST,10 mmol/L,pH 7.4,0.05%吐温)作为所有样品的稀释液;使用HI-OVA作为包被原;将50 μL系列浓度的组胺标准品和50 μL适当稀释倍数的 Ab-HI加入到如实施例3所述的已包被好的96孔酶标板中,37℃下温育40分钟,洗板5次,加100微升HRP酶标记的羊抗鼠,37℃下温育40分钟,洗板5次,加100微升TMB溶液37℃显色10分钟,10%硫酸终止显色反应,酶标分析仪测定450nm处吸光值(OD)。以OD值为纵坐标,相应标准品浓度对数值为横坐标,应用originPro 7.5 软件四参数对数函数进行曲线拟合:

$$[0060] \quad y = \frac{(A - D)}{[1 + (x/C)^B]} + D \quad (1)$$

[0061] 其中,A和D分别代表组胺标准品浓度最小和最大时的吸光值(OD),C为中点浓度;当标准品浓度等于C时的OD值为(A+D)/2,正处于曲线的拐点处,半数抑制量浓度为IC₅₀,B表示曲线的陡峭程度,称斜率因子;以IC₁₀为检测限,以IC₂₀~IC₈₀为检测范围。以组胺为标准品,建立ELISA的标准曲线,结果如图3,相关标准曲线参数见表1,结合附图及附表可知,以组胺为标准品建立的标准曲线具备典型的S型曲线,检测灵敏度较好。由于该特异性抗体能直接识别组胺,因此该方法可以用直接检测食品中组胺的含量

表 1 抗血清 (Ab-H I) 对组胺的检测参数

[0062]	免疫原	IC ₅₀ (mg/L)	线性范围(mg/L)	最低检测限(mg/L)	相关系数 R ²
	H I -BSA	56.3	27.2~116.2	25.8	0.99412

表 2 抗血清 (Ab-H I) 对半抗原 H I、组胺及其结构类似的交叉反应率

[0063]	竞争药物	交叉反应率
	组胺	100%
	组氨酸	<0.01%
	酪胺	<0.01%
	色胺	<0.01%
	苯乙胺	<0.01%
	4-羧基苯甲醛	<0.01%

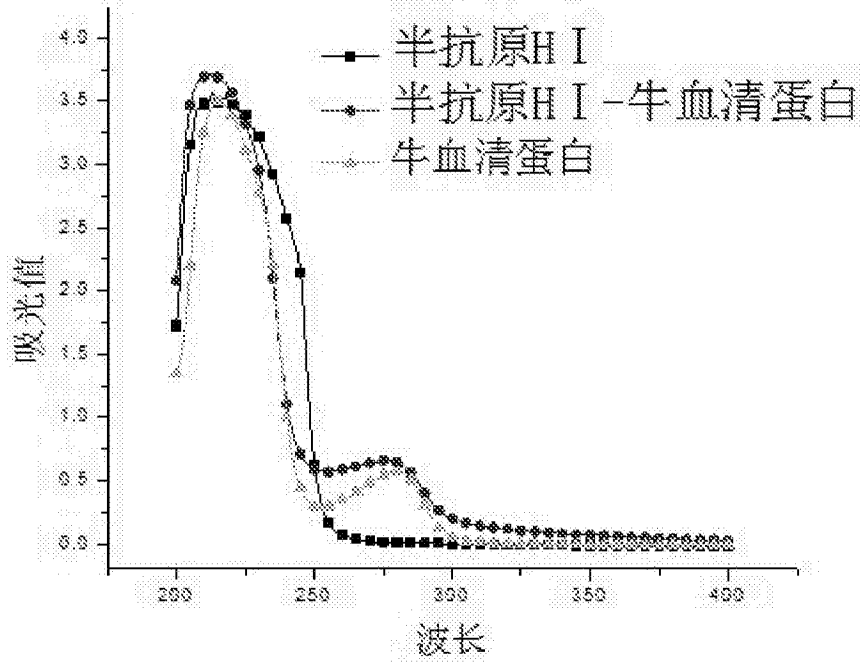


图1

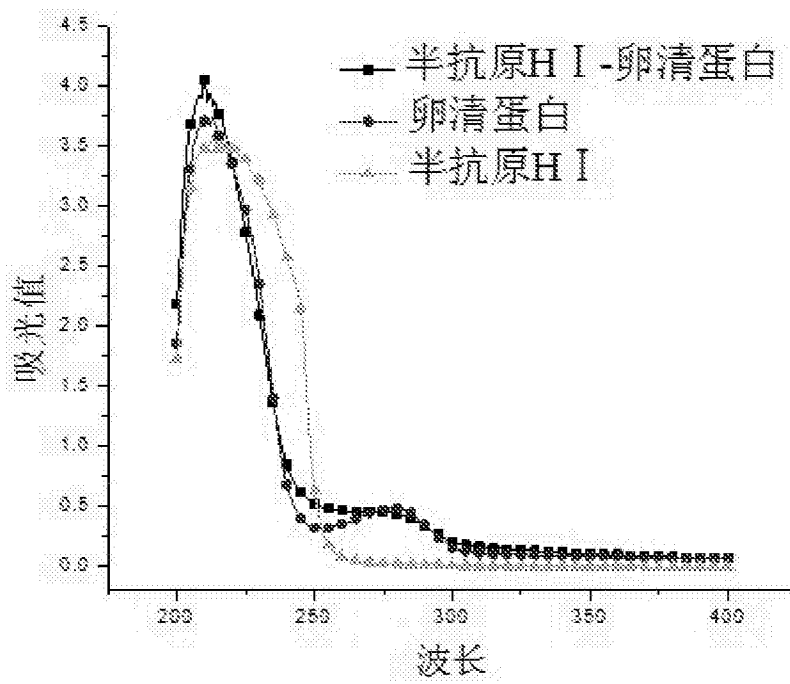


图2

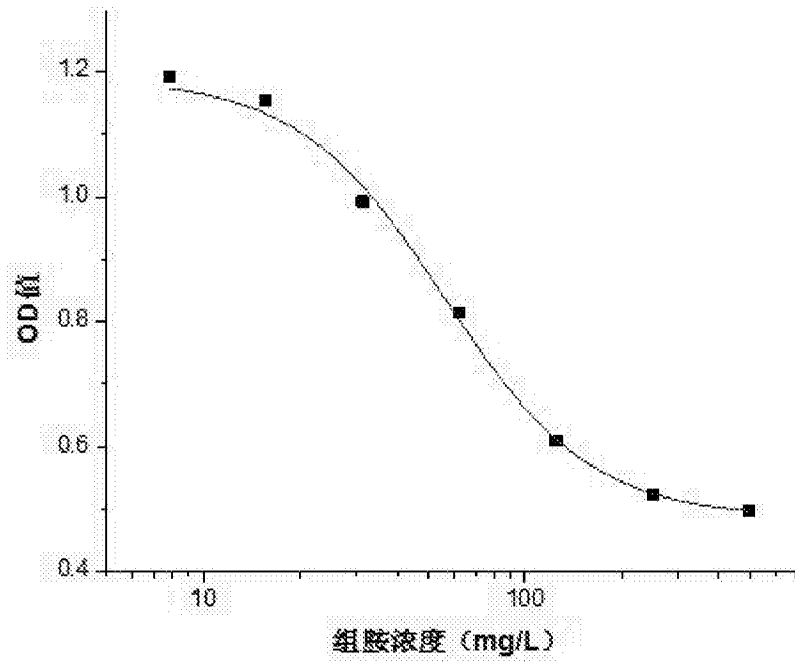


图3

专利名称(译)	一种直接针对组胺的半抗原、人工抗原、抗体及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN104119277B	公开(公告)日	2016-08-17
申请号	CN201410338095.8	申请日	2014-07-16
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	孙远明 罗林 徐振林 沈玉栋 王弘 雷红涛 杨金易 肖治理		
发明人	孙远明 罗林 徐振林 沈玉栋 王弘 雷红涛 杨金易 肖治理		
IPC分类号	C07D233/64 C07K11/107 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/06 C07K16/18 G01N33/535		
CPC分类号	C07D233/64 C07K11/1077 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/18 C07K19/00 G01N33/554		
代理人(译)	林丽明		
审查员(译)	刘健颖		
其他公开文献	CN104119277A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于食品安全免疫检测技术领域，具体公开了一种直接针对组胺的半抗原、人工抗原、抗体及其制备方法与应用。所述半抗原的分子结构如(1)所示：；其中， $n=0\sim 6$ 。由上述半抗原与载体蛋白结合获得人工抗原，由上述人工抗原免疫动物获得的抗体能直接识别组胺，对其他结构类似物均不存在明显的交叉反应；基于此抗体建立的组胺免疫分析方法，较之前报道的间接衍生的方法，省去了对样品进行前处理的衍生步骤，节省有机试剂的消耗和分析时间，降低检测成本。所得多克隆抗体的效价为1：64000，半抑制浓度为56.3 mg/L，其组胺的最低检测限可达25.8 mg/L低于各国规定的限量标准。

