

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710014457.8

[51] Int. Cl.

C07K 14/76 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/77 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008年5月7日

[11] 公开号 CN 101173007A

[22] 申请日 2007.5.23

[21] 申请号 200710014457.8

[71] 申请人 山东大学

地址 250100 山东省济南市历下区山大南路
27号

[72] 发明人 郝日沫 刘 围 赵承彪 张玉兰
卢圣欣

[74] 专利代理机构 济南金迪知识产权代理有限公司
代理人 王绪银

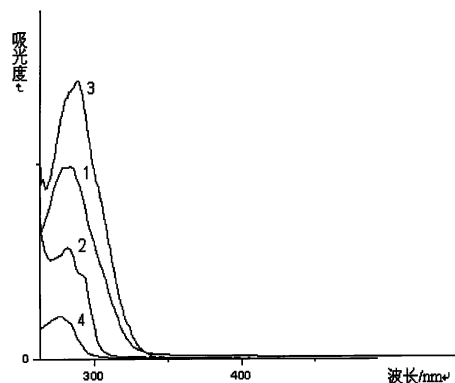
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

[54] 发明名称

1-氨基-乙内酰脲的免疫原及其制备方法与
应用

[57] 摘要

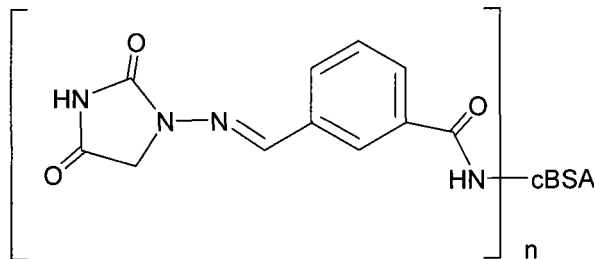
本发明公开了一种通式(I)的1-氨基-乙内酰脲的免疫原,由3-羧基苯甲醛与1-氨基-乙内酰脲形成的偶联物半抗原与产生免疫原性的载体物质牛血清蛋白或卵清蛋白连接制成。本发明还公开了所述的免疫原的制备方法,即将3-羧基苯甲醛与1-氨基-乙内酰脲形成偶联物与产生免疫原性的载体物质连接起来,结合为具有诱发动动物免疫系统产生抗体的免疫原。本发明的1-氨基-乙内酰脲的免疫原通过免疫新西兰大白兔,制备了效价达1:1,024,000以上的抗血清,其最低检测限为0.1ppb, IC₅₀(转化为AHD)为10ppb。本发明具有方法简便,快速,特异,准确的特点,为制备1-氨基-乙内酰脲的酶联免疫检测试剂盒提供了基础。



1. 一种1-氨基-乙内酰脲的免疫原，由3-羧基苯甲醛与1-氨基-乙内酰脲形成的偶联物半抗原与产生免疫原性的载体物质牛血清蛋白或卵清蛋白连接制成。

2. 如权利要求1所述1-氨基-乙内酰脲的免疫原，其特征是：所述产生免疫原性的载体物质是活化牛血清蛋白。

3. 如权利要求2所述1-氨基-乙内酰脲的免疫原，其结构如通式（I）



(I)

式中：cBSA 为活化牛血清蛋白，其分子量范围是 6.7~6.8 KDa；

n 为与一个牛血清蛋白分子结合的 3-羧基苯甲醛与 1-氨基-乙内酰脲形成的偶联物的分子数；所述 n 为整数 1~10；

上述免疫原显示出如下物化特征：

- (1) 外观：白色粉末固体；
- (2) 紫外吸收光谱：284 nm。

4. 如权利要求 3 所述 1-氨基-乙内酰脲的免疫原，其特征是：所述 n 为整数 5~8，cBSA 分子量是 6.8 Kda。

5. 权利要求 1~4 中任一项所述 1-氨基-乙内酰脲的免疫原的制备方法，其特征是：将 3-羧基苯甲醛与 1-氨基-乙内酰脲形成偶联物与产生免疫原性的载体物质连接起来，结合为具有诱发动动物免疫系统产生抗体的免疫原，并保持该免疫原的生物活性不变。

6. 如权利要求 5 所述 1-氨基-乙内酰脲的免疫原的制备方法，由如下步骤完成：

(1) 3-羧基苯甲醛与 1-氨基-乙内酰脲的偶联物的制备：将 1-氨基-乙内酰脲的盐酸盐与间羧基苯甲醛按 1:1~3:1 溶于 20~30mL 无水甲醇中，在 $65 \pm 5^\circ\text{C}$ 下回流反应 18~24 小时，蒸干后用无水乙醇洗涤抽滤、干燥，得 3-羧基苯甲醛与 1-氨基-乙内酰脲的偶联物，备用；

(2) 活化牛血清蛋白的制备：在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 条件下，先将乙二胺溶于 pH 为 7.38~7.56、浓度为 0.01 M~0.02 M 磷酸缓冲溶液中，用浓盐酸调 pH 为 7.38~7.50，备用；称取牛血清蛋白和乙基[3-(二甲胺基)丙基]碳二亚胺，然后以乙二胺：牛血清蛋白：乙基[3-(二甲胺基)丙基]碳二亚胺的摩尔比为 15~25 : 1 : 15~25 的量依次加入上述溶液中，在 $20^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ 条件下搅拌反应 2~4h；将反应溶液在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 条件下，用上述磷酸缓冲液搅拌透析 70~80h，然后改用蒸馏水透析 20~30h，每 6h 更换一次透析液；在 $0 \sim 4$

℃，以 10000~13000r/min 离心上述透析后的溶液 10~15min，取上清液；冻干上清液，得到白色粉末固体即活化的牛血清蛋白，备用；

(3) 1-氨基-乙内酰脲的制备：

① 溶液 A 的制备：称取 3-羧基苯甲醛与 1-氨基-乙内酰脲的偶联物溶于 N,N'-二甲基甲酰胺中，以 3-羧基苯甲醛与 1-氨基-乙内酰脲的偶联物、三正丁胺与氯甲酸异丁酯的摩尔比为 1:1~1.5:4~6 的量加入三正丁胺搅拌 10min，在冰浴条件下再加入氯甲酸异丁酯，反应 1~2h，得溶液 A，备用；

② 溶液 B 的制备：称取活化的牛血清蛋白溶于 N,N'-二甲基甲酰胺的水溶液中，得溶液 B，其中：以质量比计，N,N'-二甲基甲酰胺:水=1:1~1:3；

③ 溶液 C 的制备：将 A 溶液缓慢加入到 B 溶液中，于 0~4℃ 条件下搅拌反应 2~4h，得溶液 C，其中：3-羧基苯甲醛与 1-氨基-乙内酰脲的偶联物与活化的牛血清蛋白的摩尔比为 100:1~150:1；

(4) 用 pH 为 7.30~7.50、浓度为 0.01M~0.02M 的磷酸缓冲液在 0~4℃ 下，搅拌透析溶液 C 70~80 小时，然后改用蒸馏水透析 20~30 小时，每 6~7 小时更换一次透析液；以 12000~15000r/min 离心透析后的溶液 10~15min，取上清液，备用；

(5) 将步骤 (4) 所述上清液以常规方式冻干，得到 1-氨基-乙内酰脲的免疫原粗品。

7. 如权利要求6所述1-氨基-乙内酰脲的免疫原的制备方法，其特征是：步骤 (1) 所述1-氨基-乙内酰脲的盐酸盐与间羧基苯甲醛的摩尔比为1:1。

8. 如权利要求6所述1-氨基-乙内酰脲的免疫原的制备方法，其特征是：步骤 (3) 之③所述3-羧基苯甲醛与1-氨基-乙内酰脲的偶联物与活化的牛血清蛋白的摩尔比为120:1。

9. 如权利要求6所述1-氨基-乙内酰脲的免疫原的制备方法，其特征是：步骤 (2)、(4) 所述磷酸缓冲液的pH为7.4，磷酸缓冲液的浓度为0.01 M。

10. 权利要求1~4中任一项所述1-氨基-乙内酰脲的免疫原在制备邻硝基苯甲醛与1-氨基-乙内酰脲的偶联物特异反应抗体中的应用。

1-氨基-乙内酰胺的免疫原及其制备方法与应用

技术领域

本发明涉及一种硝基呋喃类抗生素代谢物的免疫原及其制备方法,尤其涉及一种呋喃妥因(Nitrofurantoin)代谢物1-氨基-乙内酰胺的免疫原及其制备方法与应用。属硝基呋喃类抗生素药免疫检测领域。

背景技术

下列定义适用于整个说明书和权利要求书:

牛血清蛋白(Bovine Serum Albumin, 简称BSA): Sigma 公司产品

卵清蛋白(简称OVA): Sigma 公司产品

磷酸缓冲液(Phosphate Buffered SaLine, 简称PBS): (0.01 M, pH =7.40)

1-氨基-乙内酰胺(1-aminohydantoin, 简称AHD): Sigma 公司产品

3-羧基苯甲醛(3-carboxybenzaldehyde, 简称CBA): 上海点耀精细化工有限公司产品

3-羧基苯甲醛与1-氨基-乙内酰胺的偶联物(简称CPAHD): 实验室合成

邻硝基苯甲醛(2-nitrobenzaldehyde, 简称NBA): 北京百灵威化学技术有限公司

邻硝基苯甲醛与1-氨基-乙内酰胺的偶联物(简称NPAHD): 实验室合成

乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺(简称EDC): Sigma 公司产品

三正丁胺: 中国医药集团上海化学试剂公司产品

氯甲酸异丁酯: 上海飞翔化工厂产品

乙二胺: 广东·汕头西陇化工产品

透析膜: biosharp 公司产品

N,N'-二甲基甲酰胺(DMF): 天津市广成化学试剂有限公司产品

呋喃妥因(Nitrofurantoin)是一种重要的硝基呋喃类抗感染药,而1-氨基-乙内酰胺(1-aminohydantoin)为呋喃妥因的代谢物。由于优良的抗菌性能和动力学性质,呋喃类药物早已被广泛地应用于家畜、家禽和水产等养殖业的传染病预防与治疗,是一类广谱抗菌药。但经过长期的动物实验研究结果表明,硝基呋喃类药物及其代谢产物具有致癌和致突变的特性。动物长期或大剂量服用呋喃类药物能引起毒性反应,表现为兴奋,惊厥,瘫痪的急性神经症状以及全身出血和反刍消化障碍等慢性中毒反应。对于人体的不良反应主要是胃肠反应,溶血性贫血,血小板减少性紫癜,多发性神经炎,眼部损害,急性肝坏死和嗜酸性白细胞增多等过敏反应。

由于这些毒害作用,世界上很多国家都对硝基呋喃类药物的使用和残留实施了严格

的规定。美国 21CFR530.41 规定：食源性动物禁止使用呋喃妥因；澳大利亚于 1992 年禁止在养殖业中使用硝基呋喃类药物；欧盟 EEC2377/90 规定：动物食源性食品中不得检出硝基呋喃（包括呋喃妥因）；欧盟在 1995 年 6 月开始规定动物源食品中不得检出硝基呋喃（Commission Regulation 1442/95）；在我国，硝基呋喃类药物是农业部严禁的抗菌素。尽管如此，硝基呋喃类药物由于药效显著，价格低廉，难以检测，在我国的畜禽水产养殖业中使用非常普遍，这给人们的健康安全带来巨大的隐患。我国出口欧盟的鱼，虾，禽肉，兔肉，和肠衣均被检出过含有硝基呋喃类药物，尤其是兔肉和禽肉，常常导致出口食品被迫就地销毁。这已严重影响我国动物源食品的出口，对国际贸易带来极大的威胁。所以，硝基呋喃类药物残留的检测方法的开发研究已刻不容缓。

硝基呋喃类药物在动物体内代谢迅速，通过检测母体化合物并不能得知这类药物的滥用情况。检测硝基呋喃类药物残留以杜绝使用这种违禁药物的最佳方法是检测其代谢物而非母体化合物本身，因此，检测硝基呋喃类药物的残留就变成了检测这些与蛋白组织结合在一起的代谢物的残留。

在抗生素药物残留的检测中，仪器法如液相色谱和质谱以及液相质谱联用是应用最广泛的方法。这些方法准确，稳定，可靠，可以作为标准方法。但仪器法价格昂贵，费时较长，需要大型仪器设备，需要专门的技术人员，所以难于用于现场操作。酶联免疫检测法（ELISA）提供了一种极好的扫描手段。该法具有快速，准确，简易，不需要专门人员操作等优点，这使得 ELISA 法成为一种理想的，可用于常规扫描的检测方法。酶联免疫检测法的核心是需要高质量的抗体。大多数抗生素包括硝基呋喃类药物都是小分子有机化合物，不具有免疫原性，称之为半抗原。所以，必须把这些化合物转变成能引发动物免疫系统产生抗体的免疫原（又称之为完全抗原）。

经检索，目前世界上尚未有关于呋喃妥因（Nitrofurantoin）代谢物 1-氨基-乙内酰脲的免疫原的合成的报道，基于 1-氨基-乙内酰脲的免疫原（CPAHD-cBSA Conjugate）可用来制备邻硝基苯甲醛与 1-氨基-乙内酰脲的偶联物（NPAHD）特异反应抗体，因此研究 1-氨基-乙内酰脲的免疫原的合成及抗体制备有着重要的意义。

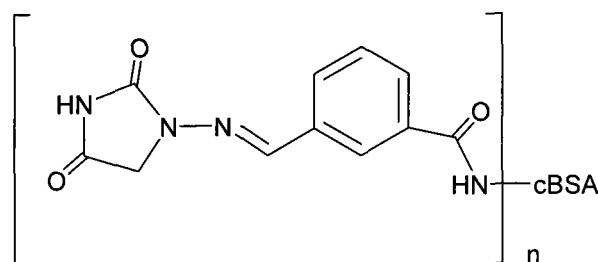
发明内容

针对现有技术的不足，本发明要解决的问题是提供一种能引发动物免疫系统产生针对邻硝基苯甲醛与 1-氨基-乙内酰脲的偶联物（NPAHD）有特异反应的抗体的免疫原，即 1-氨基-乙内酰脲的免疫原（CPAHD-cBSA Conjugate）及其制备方法。同时，本发明还提供了所述的 1-氨基-乙内酰脲的免疫原（CPAHD-cBSA Conjugate）在制备邻硝基苯甲醛与 1-氨基-乙内酰脲的偶联物（NPAHD）特异反应抗体中的应用。

本发明所述 1-氨基-乙内酰脲的免疫原，由 3-羧基苯甲醛与 1-氨基-乙内酰脲形成的偶联物半抗原与产生免疫原性的载体物质牛血清蛋白或卵清蛋白连接制成。

其中：所述产生免疫原性的载体物质优选活化牛血清蛋白。

上述 1-氨基-乙内酰脲的免疫原，优选的结构如通式（I）



(I)

式中：cBSA 为活化牛血清蛋白 (Cationized Bovine Serum Albumin)，其分子量范围是 6.7~6.8 KDa；

n 为与一个牛血清蛋白分子结合的 3-羧基苯甲醛与 1-氨基-乙内酰脲形成的偶联物(CPAHD)的分子数；所述 n 为整数 1~10；

上述免疫原显示出如下物化特征：

- (1) 外观：白色粉末固体；
- (2) 紫外吸收光谱：284 nm。

上述的 1-氨基-乙内酰脲的免疫原结构通式中：所述 n 优选整数 5~8，cBSA 分子量优选 6.8 Kda。

本发明所述 1-氨基-乙内酰脲的免疫原的制备方法，其特征是：将 3-羧基苯甲醛与 1-氨基-乙内酰脲形成偶联物 (CPAHD) 与产生免疫原性的载体物质连接起来，结合为具有诱发动动物免疫系统产生抗体的免疫原，并保持该免疫原的生物活性不变。

上述 1-氨基-乙内酰脲的免疫原的具体制备方法，由如下步骤完成：

(1) 3-羧基苯甲醛与 1-氨基-乙内酰脲的偶联物 (CPAHD) 的制备：将 1-氨基-乙内酰脲的盐酸盐与间羧基苯甲醛按 1:1~3:1 溶于 20~30mL 无水甲醇中，在 $65 \pm 5^\circ\text{C}$ 下回流反应 18~24 小时，蒸干后用无水乙醇洗涤抽滤、干燥，得 3-羧基苯甲醛与 1-氨基-乙内酰脲的偶联物，备用；

(2) 活化牛血清蛋白(cBSA)的制备：在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 条件下，先将乙二胺溶于 pH 为 7.38~7.56、浓度为 0.01 M~0.02 M 磷酸缓冲溶液中，用浓盐酸调 pH 为 7.38~7.50，备用；称取牛血清蛋白 (BSA) 和乙基[3-(二甲胺基)丙基]碳二亚胺(EDC)，然后以乙二胺：牛血清蛋白：乙基[3-(二甲胺基)丙基]碳二亚胺的摩尔比为 15~25：1：15~25 的量依次加入上述溶液中，在 $20^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ 条件下搅拌反应 2~4h；将反应溶液在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 条件下，用上述磷酸缓冲液搅拌透析 70~80h，然后改用蒸馏水透析 20~30h，每 6h 更换一次透析液；在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ ，以 10000~13000r/min 离心上述透析后的溶液 10~15min，取上清液；冻干上清液，得到白色粉末固体即活化的牛血清蛋白 (cBSA)，备用；

(3) 1-氨基-乙内酰脲 (CPAHD-cBSA) 的制备：

①溶液A的制备:称取3-羧基苯甲醛与1-氨基-乙内酰脲的偶联物(CPAHD)溶于N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)中,以3-羧基苯甲醛与1-氨基-乙内酰脲的偶联物(CPAHD)、三正丁胺与氯甲酸异丁酯的摩尔比为1:1~1.5:4~6的量加入三正丁胺搅拌10min,在冰浴条件下再加入氯甲酸异丁酯,反应1~2h,得溶液A,备用;

②溶液B的制备:称取活化的牛血清蛋白(cBSA)溶于N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)的水溶液中,得溶液B,其中:以质量比计,N,N'-二甲基甲酰胺:水=1:1~1:3;

③溶液C的制备:将A溶液缓慢加入到B溶液中,于0~4℃条件下搅拌反应2~4h,得溶液C,其中:3-羧基苯甲醛与1-氨基-乙内酰脲的偶联物(CPAHD)与活化的牛血清蛋白(cBSA)的摩尔比为100:1~150:1;

(4)用pH为7.30~7.50、浓度为0.01M~0.02M的磷酸缓冲液在0~4℃下,搅拌透析溶液C 70~80小时,然后改用蒸馏水透析20~30小时,每6~7小时更换一次透析液;以12000~15000r/min离心透析后的溶液10~15min,取上清液,备用;

(5)将步骤(4)所述上清液以常规方式冻干,得到1-氨基-乙内酰脲的免疫原粗品。

上述1-氨基-乙内酰脲的免疫原的制备方法中,优选的实施方式是:

步骤(1)所述1-氨基-乙内酰脲的盐酸盐与间羧基苯甲醛的摩尔比为1:1。

步骤(3)之③所述3-羧基苯甲醛与1-氨基-乙内酰脲的偶联物(CPAHD)与活化的牛血清蛋白(cBSA)的摩尔比为120:1。

步骤(2)、(4)所述磷酸缓冲液的pH为7.4,磷酸缓冲液的浓度为0.01 M。

本发明所述1-氨基-乙内酰脲的免疫原在制备邻硝基苯甲醛与1-氨基-乙内酰脲的偶联物(NPAHD)特异反应抗体中的应用。

利用本发明的技术方案可以成功地把半抗原1-氨基-乙内酰脲与载体蛋白特别是牛血清蛋白偶联起来,从而制备成能够在动物体内引发免疫反应,产生抗体的完全免疫原即1-氨基-乙内酰脲的免疫原(CPAHD-cBSA)。

利用本发明所述的1-氨基-乙内酰脲的免疫原免疫新西兰大白兔,成功地获得了对邻硝基苯甲醛与1-氨基-乙内酰脲的偶联物(NPAHD)有特异反应的抗体。经酶联免疫检测实验鉴定,利用本发明所述的1-氨基-乙内酰脲免疫原制备的抗体对邻硝基苯甲醛与1-氨基-乙内酰脲的偶联物(NPAHD)有特异性反应,其抗血清效价达到1:1,024,000以上,其最低检测限为0.1ppb,IC₅₀(转化为AHD)为10ppb。

本发明成功地把半抗原1-氨基-乙内酰脲与载体蛋白特别是牛血清蛋白偶联起来,合成了能够在动物体内引发免疫反应,产生抗体的完全免疫原。利用此免疫原免疫兔,鼠,鸡等动物可以得到对邻硝基苯甲醛与1-氨基-乙内酰脲的偶联物(NPAHD)有特异反应的抗体。把该抗体镀在微孔盘内,就可以用来检验动物源食品中呋喃妥因抗生素的残留。由于本发明方法具有简易,快速,特异,准确的特点,所以可以用于食品检验检疫中的初步扫描筛选之用。这样不但可以节省大量的检验时间,还可以用于现场操作,从而补充仪器法的缺点。

本发明所述半抗原1-氨基-乙内酰胺与载体蛋白牛血清蛋白免疫原的合成成为动物源食品中呋喃妥因抗生素的残留快速检验又提供了新的手段，为制备1-氨基-乙内酰胺的酶联免疫检测试剂盒提供了基础。

附图说明

图 1 紫外吸收光谱图：

其中：1：1-氨基-乙内酰胺的免疫原 2：3-羧基苯甲醛 3：3-羧基苯甲醛与1-氨基-乙内酰胺的偶联物（CPAHD） 4：活化牛血清蛋白（cBSA）

具体实施方式

实施例 1：

（1）3-羧基苯甲醛与1-氨基-乙内酰胺的偶联物（CPAHD）的制备：将1-氨基-乙内酰胺的盐酸盐与间羧基苯甲醛按1:1溶于20~30mL无水甲醇中，在 $65\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下回流反应20小时，蒸干后用无水乙醇洗涤抽滤、干燥，得3-羧基苯甲醛与1-氨基-乙内酰胺的偶联物，备用；

（2）活化牛血清蛋白（cBSA）的制备：在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 条件下，先将乙二胺溶于pH为7.46、浓度为0.01M磷酸缓冲溶液中，用浓盐酸调pH为7.46，备用；称取牛血清蛋白（BSA）和乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺（EDC），然后以乙二胺：牛血清蛋白：乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺的摩尔比为20：1：20的量依次加入上述溶液中，在 $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 条件下搅拌反应3h；将反应溶液在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 条件下，用上述磷酸缓冲液搅拌透析80h，然后改用蒸馏水透析30h，每6h更换一次透析液；在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ ，以13000r/min离心上述透析后的溶液15min，取上清液；冻干上清液，得到白色粉末固体即活化的牛血清蛋白（cBSA），备用；

（3）1-氨基-乙内酰胺（CPAHD-cBSA）的制备：

①溶液A的制备：称取3-羧基苯甲醛与1-氨基-乙内酰胺的偶联物（CPAHD）溶于N,N'-二甲基甲酰胺（DMF）中，以3-羧基苯甲醛与1-氨基-乙内酰胺的偶联物（CPAHD）、三正丁胺与氯甲酸异丁酯的摩尔比为1：1：5的量加入三正丁胺搅拌10min，在冰浴条件下再加入氯甲酸异丁酯，反应2h，得溶液A，备用；

②溶液B的制备：称取活化的牛血清蛋白（cBSA）溶于N,N'-二甲基甲酰胺（DMF）的水溶液中，得溶液B，其中：以质量比计，N,N'-二甲基甲酰胺:水=1:2；

③溶液C的制备：将A溶液缓慢加入到B溶液中，于 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 条件下搅拌反应4h，得溶液C，其中：3-羧基苯甲醛与1-氨基-乙内酰胺的偶联物（CPAHD）与活化的牛血清蛋白（cBSA）的摩尔比为120:1；

（4）用pH为7.45、浓度为0.01M的磷酸缓冲液在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 下，搅拌透析溶液C 80小时，然后改用蒸馏水透析30小时，每6小时更换一次透析液；以14000r/min离心透析后的溶液15min，取上清液，备用；

（5）将步骤（4）所述上清液以常规方式冻干，得到1-氨基-乙内酰胺的免疫原粗品。

(6) 通过紫外吸收光谱确定产物的吸收峰位于 284nm。

实施例 2:

(1) 3-羧基苯甲醛与 1-氨基-乙内酰脲的偶联物 (CPAHD) 的制备: 将 1-氨基-乙内酰脲的盐酸盐 (151mg) 与间羧基苯甲醛 (75mg) 溶于 20mL 无水甲醇中。在 65°C 下回流反应 20 小时。蒸干后用无水乙醇洗涤、抽滤、干燥, 备用。

(2) 活化牛血清蛋白 (cBSA) 的制备: 在 0~4°C 条件下, 先将乙二胺 (13.5mg) 溶于 pH 为 7.40, 浓度为 0.015 M 磷酸缓冲溶液中, 然后用浓盐酸调 pH 为 7.40, 备用; 称取牛血清蛋白 (1000mg) 和乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺 (42mg), 然后加入上述溶液中, 在 20°C 条件下搅拌反应 3h; 将乙二胺与 BSA 的反应溶液在 0~4°C 条件下, 用上述磷酸缓冲液搅拌透析 75h, 然后改用蒸馏水透析 25h, 每 6.5h 更换一次透析液; 在 0~4°C, 以 13000r/min 离心上述透析后的溶液 10min, 取上清液; 冻干上清液, 得到白色粉末固体—活化牛血清蛋白 (cBSA), 备用。

(3) 1-氨基-乙内酰脲免疫原 (CPAHD-cBSA) 的制备:

a) 溶液 A 的制备: 称取 40mg CPAHD 溶于 10mL N,N'-二甲基甲酰胺 (DMF) 中。加入 66.7 μ L 三正丁胺搅拌 15min。在冰浴条件下加入 93 μ L 氯甲酸异丁酯, 反应 1.5h, 备用。

b) 溶液 B 的制备: 称取 65mg 活化牛血清蛋白 (cBSA) 溶于 15mL N,N'-二甲基甲酰胺 (DMF) 的水溶液中 (DMF:水=1:1)。

c) 溶液 C 的制备: 将 A 溶液缓慢加入到 B 溶液中, 于 0~4°C 条件下搅拌反应 4h。

(4) 用 pH 为 7.40, 浓度为 0.01M 的磷酸缓冲液在 0~4°C 下, 搅拌透析溶液 C 75h, 然后改用蒸馏水透析 25h, 每 6.5h 更换一次透析液; 15000r/min 离心透析后的溶液 15min, 取上清液。

(5) 冻干上清液, 得到 1-氨基-乙内酰脲免疫原粗品。

(6) 通过紫外吸收光谱确定产物的吸收峰位于 284nm。

实施例 3:

(1) 3-羧基苯甲醛与 1-氨基-乙内酰脲的偶联物 (CPAHD) 的制备: 1-氨基-乙内酰脲的盐酸盐 (151mg) 与间羧基苯甲醛 (50mg) 溶于 20mL 无水甲醇中。在 65°C 下回流反应 25 小时, 蒸干后用无水乙醇洗涤、抽滤、干燥, 备用。

(2) 活化牛血清蛋白 (cBSA) 的制备: 在 0~4°C 条件下, 先将乙二胺 (27mg) 溶于 pH 为 7.5, 浓度为 0.02 M 磷酸缓冲溶液中, 用浓盐酸调 pH 为 7.40, 备用; 称取牛血清蛋白 (1000mg) 和乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺 (84mg), 然后依次加入上述溶液中, 在 20°C 下搅拌反应 4h; 将乙二胺与 BSA 的反应溶液在 0~4°C 条件下, 用上述磷酸缓冲液搅拌透析 80h, 然后改用蒸馏水透析 30h, 每 7h 更换一次透析液; 在 0~4°C, 以 10000r/min 离心上述透析后的溶液 15min, 取上清液; 冻干上清液, 得到白色粉末固体 cBSA, 备用。

(3)1-氨基-乙内酰胺免疫原 (CPAHD-cBSA) 的制备:

a) 溶液 A 的制备: 称取 40mg CPAHD 溶于 10mL N,N'-二甲基甲酰胺 (DMF) 中。加入 66.7 μ L 三正丁胺搅拌 10min。在冰浴条件下加入 93 μ L 氯甲酸异丁酯, 反应 1.5h, 备用。

b) 溶液 B 的制备: 称取 70mg 活化牛血清蛋白 (cBSA) 溶于 15mL N,N'-二甲基甲酰胺 (DMF) 的水溶液中 (DMF:水=1: 1)。

c) 溶液 C 的制备: 将制备的 A 溶液缓慢加入到 B 溶液中, 于 0~4 $^{\circ}$ C 条件下搅拌反应 4h。。

(4) 用 pH 为 7.40, 浓度为 0.05M 的磷酸缓冲液在 0~4 $^{\circ}$ C 下, 搅拌透析溶液 C 80h, 然后改用蒸馏水透析 30h, 每 7h 更换一次透析液; 高速离心, 取上清液。

(5) 冻干上清液, 得到 1-氨基-乙内酰胺免疫原粗品;

(6) 通过紫外吸收光谱确定产物的吸收峰位于 284nm。

实施例 4:

(1) 3-羧基苯甲醛与 1-氨基-乙内酰胺的偶联物 (CPAHD) 的制备: 将 1-氨基-乙内酰胺的盐酸盐 (151mg) 与间羧基苯甲醛 (150mg) 溶于 20mL 无水甲醇中。在 65 $^{\circ}$ C 下回流反应 18 小时。蒸干后用无水乙醇洗涤、抽滤、干燥, 备用。

(2) 活化牛血清蛋白 (cBSA) 的制备: 在 0~4 $^{\circ}$ C 条件下, 先将乙二胺 (18mg) 溶于 pH 为 7.40, 浓度为 0.01 M 磷酸缓冲溶液中, 然后用浓盐酸调 pH 为 7.40, 备用; 称取牛血清蛋白 (1000mg) 和乙基 [3-(二甲胺基) 丙基] 碳二亚胺 (56mg), 依次加入上述溶液中, 在 20 $^{\circ}$ C 条件下搅拌反应 2h; 将乙二胺与牛血清蛋白的反应溶液在 0~4 $^{\circ}$ C 条件下, 用上述磷酸缓冲液搅拌透析 70h, 然后改用蒸馏水透析 20h, 每 6h 更换一次透析液; 在 0~4 $^{\circ}$ C, 以 13000r/min 离心上述透析后的溶液 15min, 取上清液; 冻干上清液, 得到白色粉末固体—活化牛血清蛋白 (cBSA), 备用。

(3) 1-氨基-乙内酰胺免疫原 (CPAHD-cBSA) 的制备:

a) 溶液 A 的制备: 称取 40mg CPAHD 溶于 10mL N,N'-二甲基甲酰胺 (DMF) 中。加入 50 μ L 三正丁胺搅拌 10min。在冰浴条件下加入 87 μ L 氯甲酸异丁酯, 反应 1h, 备用。

b) 溶液 B 的制备: 称取 80mg 活化牛血清蛋白 (cBSA) 溶于 15mL N,N'-二甲基甲酰胺 (DMF) 的水溶液中 (DMF:水=1: 1)。

c) 溶液 C 的制备: 将制备的 A 溶液缓慢加入到 B 溶液中, 于 0~4 $^{\circ}$ C 条件下搅拌反应 4h。

(4) 用 pH 为 7.40, 浓度为 0.01M 的磷酸缓冲液在 0~4 $^{\circ}$ C 下, 搅拌透析溶液 C 70h, 然后改用蒸馏水透析 20h, 每 6h 更换一次透析液; 13000r/min 离心透析后的溶液 13min, 取上清液。

(5) 冻干上清液, 得到 1-氨基-乙内酰胺免疫原粗品;

(6) 通过紫外吸收光谱确定产物的吸收峰位于 284nm。

实施例 5:

抗体的制备纯化及检测

1. 抗体的制备

选择上述实施例1所制备的1-氨基-乙内酰胺免疫原进行动物免疫实验以制备抗体。取1mg/mL的1-氨基-乙内酰胺免疫原的溶液1mL,加入等体积的弗氏完全佐剂,充分乳化后,经皮下多点注射给四只体重2kg的雄性健康新西兰大白兔,1mL/只,15天后以同量抗原与弗氏不完全佐剂充分乳化后进行二免,二免以后,每隔15天加强免疫一次,抗原量减半,共免疫5次。最后一次免疫7天后,心脏采血,室温静置1h,0~4℃过夜,13000r/min离心15min,收集血清,-20℃保存,备用。

2. 抗体的纯化

搅拌状态下向上述制备的抗血清中加入饱和硫酸铵至硫酸铵溶液的终浓度为体积百分比是50%,0~4℃放置过夜,有沉淀物析出;以13000r/min离心15min,弃上清液,向沉淀物中加入0.01M、pH7.4的PBS至沉淀溶解,然后加入饱和硫酸铵溶液至硫酸铵溶液的终浓度为体积百分比是33%,0~4℃放置过夜,有沉淀物析出;以13000r/min离心15min,弃上清液,向沉淀物中加入0.01M、pH7.4的PBS至沉淀溶解。将上述纯化物用0.01M、pH7.4的PBS,0~4℃透析,换透析液3次,然后加入质量体积百分比为0.02%的叠氮化钠,-20℃保存,备用。

3. 抗体的酶联免疫检测

(1) 效价测定:方法采用常规的间接酶联免疫吸附检测法:

在96孔的酶标板上,用100 μL/孔的1-氨基-乙内酰胺的包被抗原(10 μg/mL)(戊二醛方法合成)包被,0~4℃放置过夜,然后用PBST(1000mL pH7.4、浓度0.01M的PBS+体积百分比是0.05%Tween20)洗板四次;用250 μL/孔封闭液(1000mL PBST+质量体积百分比是1%卵清蛋白)封闭,室温放置3h,洗板;在洗去封闭液后,加100 μL/孔的抗血清,室温放置2h,洗板;在洗去抗血清以后,每孔加入1:1000的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG 100 μL/孔,室温放置1h,洗板;加入底物邻苯二胺显色,室温放置10min,再加入2M HCl终止。酶标仪A492nm检测。

经测定:本发明所述1-氨基-乙内酰胺免疫原制备的抗体效价达1:1,024,000。

效价的判定以P/N大于2:1的血清最高稀释倍数为该抗体的酶联免疫检测效价。

其中:P为代测血清在某一稀释倍数测定的吸光度值,N为阴性对照在相应稀释倍数测定的吸光度值。

(2) 特异性测定:

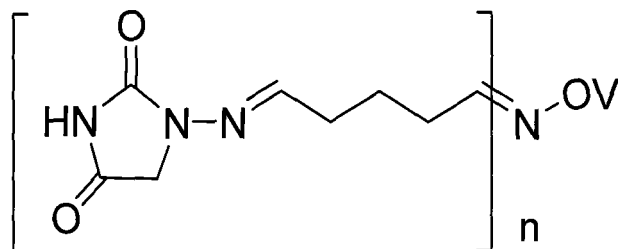
测定步骤与效价测定类似,在上述最佳的包被抗原与抗体浓度条件下,加抗体的同时加入邻硝基苯甲醛与1-氨基-乙内酰胺的偶联物(NPAHD)(从100ppm-0.1ppb),与包被抗原竞争结合有限的抗体,邻硝基苯甲醛与1-氨基-乙内酰胺的偶联物(NPAHD)的浓度越高,抗体与包被抗原就结合得越少,从而显色越浅,吸光度值越低。再与空白对照(只加抗体,未加邻硝基苯甲醛与1-氨基-乙内酰胺的偶联物(NPAHD)的吸光度值)相比较,以确定抗体特异性。

通过测定抗体特异性较好,其最低检测限可达到0.1ppb,IC₅₀(转化为AHD)为10ppb。

实施例6

制备上述酶联免疫检测中所用1-氨基-乙内酰脲与卵清蛋白的偶联物:

- (1) 称取 117mg 卵清蛋白溶于 10ml 硼砂缓冲液 (Ph=8.5) 中。
- (2) 称取 15.8mg 1-氨基-乙内酰脲加入 (1) 液中搅拌溶解。
- (3) 向 (2) 液中滴加 0.2ml 25% 的戊二醛, 于 0-4℃ 条件下搅拌反应 4 小时。
用 pH7.4、浓度 0.01M 的 PBS 缓冲液 0-4℃ 条件下, 搅拌透析步骤 (3) 制得的溶液 72 小时, 然后改用蒸馏水透析 30 小时, 每 6 小时更换一次透析液。
冻干上清液, 得到淡黄色固体, 即为 1-氨基-乙内酰脲与卵清蛋白的偶联物; 其结构图如下:



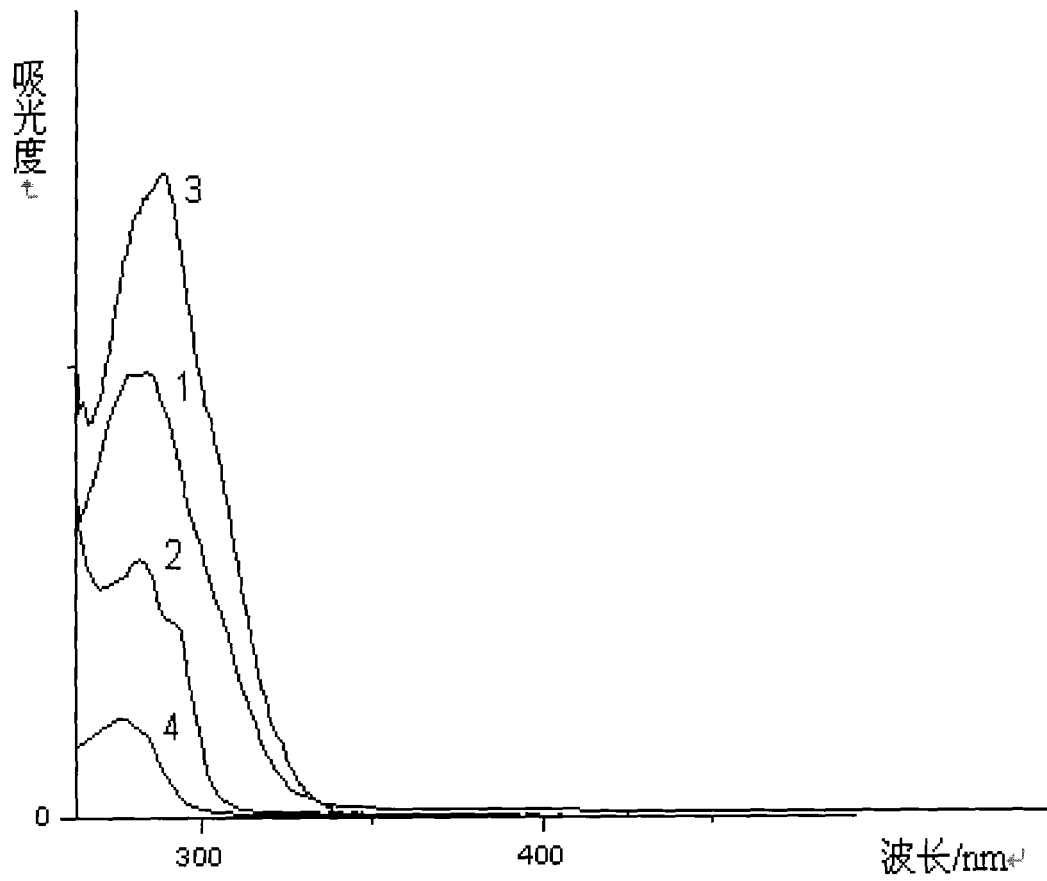


图 1

专利名称(译)	1 - 氨基 - 乙内酰胺的免疫原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN101173007A	公开(公告)日	2008-05-07
申请号	CN200710014457.8	申请日	2007-05-23
[标]申请(专利权)人(译)	山东大学		
申请(专利权)人(译)	山东大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东大学		
[标]发明人	郗日沐 刘围 赵承彪 张玉兰 卢圣欣		
发明人	郗日沐 刘围 赵承彪 张玉兰 卢圣欣		
IPC分类号	C07K14/76 C07K14/765 C07K14/77 G01N33/53		
其他公开文献	CN101173007B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种通式(I)的1 - 氨基 - 乙内酰胺的免疫原，由3 - 羧基苯甲醛与1 - 氨基 - 乙内酰胺形成的偶联物半抗原与产生免疫原性的载体物质牛血清蛋白或卵清蛋白连接制成。本发明还公开了所述的免疫原的制备方法，即将3 - 羧基苯甲醛与1 - 氨基 - 乙内酰胺形成偶联物与产生免疫原性的载体物质连接起来，结合为具有诱发动动物免疫系统产生抗体的免疫原。本发明的1 - 氨基 - 乙内酰胺的免疫原通过免疫新西兰大白兔，制备了效价达1:1,024,000以上的抗血清，其最低检测限为0.1ppb，IC50(转化为AHD)为10ppb。本发明具有方法简便，快速，特异，准确的特点，为制备1 - 氨基 - 乙内酰胺的酶联免疫检测试剂盒提供了基础。

