

[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 200810219299.4

[51] Int. Cl.

C07C 281/10 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

G01N 33/536 (2006.01)

[43] 公开日 2009年4月15日

[11] 公开号 CN 101407480A

[22] 申请日 2008.11.21

[21] 申请号 200810219299.4

[71] 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路483号

[72] 发明人 沈玉栋 张世伟 孙远明 雷红涛
王弘 肖治理 杨金易 蔡肇婷

[74] 专利代理机构 广州粤高专利代理有限公司

代理人 林丽明 任重

权利要求书3页 说明书10页

[54] 发明名称

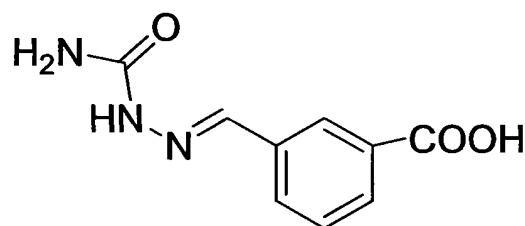
氨基脲衍生物半抗原、抗原和抗体的制备方法

[57] 摘要

本发明公开了氨基脲衍生物半抗原、抗原和抗体的制备方法，氨基脲与带羧基的苯甲醛氨醛缩合后得到氨基脲衍生物半抗原，所述半抗原和氨基脲衍生物结构相似，突出了此兽药分子特异性抗原决定簇，并可通过活泼酯法偶联载体蛋白制备抗原；使用该抗原免疫实验动物可获得效价高、特异性好的针对氨基脲衍生物的抗体。所述抗体可用于动物源性食品中氨基脲残留量的快速检测，检测下限可达0.09ng/mL。

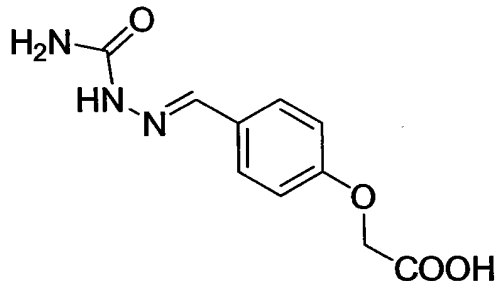
1、一种氨基脒衍生物半抗原的制备方法，其特征在于将氨基脒与过量的带羧基的苯甲醛衍生物在室温条件下于甲醇中进行氨醛缩合反应，反应产生的沉淀经洗涤、干燥得到半抗原。

2、一种权利要求 1 所述制备方法制备得到的氨基脒衍生物半抗原，其特征在于具有式 (I) 所示结构：



(I)

3、一种权利要求 1 所述制备方法制备得到的氨基脒衍生物半抗原，其特征在于具有式 (II) 所示结构：



(II)

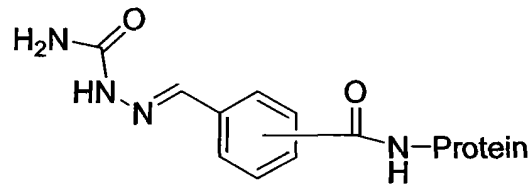
4、一种氨基脒衍生物抗原的制备方法，其特征在于包括以下步骤：

(1) 将权利要求 1 所述氨基脒衍生物半抗原与缩合剂 N,N'-二环己基碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺反应形成活泼酯；

(2) 将活泼酯滴加入蛋白溶液中反应；

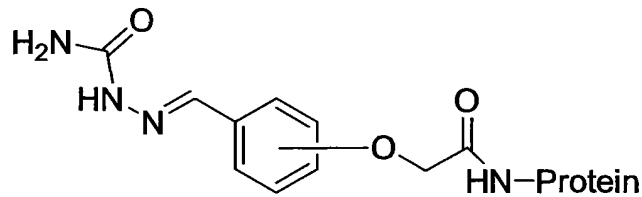
(3) 步骤(2)反应得到的偶联有氨基脒衍生物半抗原的蛋白经透析纯化得到目标抗原。

5、一种权利要求4所述制备方法制备得到的氨基脒衍生物抗原，其特征在于所述具有式(III)所示结构：



(III)

6、一种权利要求4所述制备方法制备得到的氨基脒衍生物抗原，其特征在于具有式(IV)所示结构：



(IV)

7、一种氨基脒衍生物抗体的制备方法，其特征在于包括以下步骤：

- (a) 将氨基脒衍生物抗原与弗氏佐剂免疫实验动物；
- (b) 免疫后抽取血液，分离血清；
- (c) 血清经辛酸硫酸铵纯化得到抗体。

8、根据权利要求7所述氨基脒衍生物抗体的制备方法，其特征在于步骤(a)所述氨基脒衍生物抗原浓度为1mg/mL，氨基脒衍生物抗原与弗氏佐剂按1:1比例免疫实验动物。

9、一种氨基脒衍生物抗体的应用，其特征在于应用于呋喃西林

及其代谢物氨基脒的 ELISA 方法免疫化学分析中。

氨基脲衍生物半抗原、抗原和抗体的制备方法

技术领域

本发明属于免疫化学技术领域，具体涉及一种氨基脲衍生物的半抗原、抗原和抗体的制备方法，以及制备得到的半抗原、抗原和抗体及抗体的应用。

背景技术

呋喃西林作为一种硝基呋喃类药物，曾用于治疗 and 预防由埃希氏菌和沙门氏菌引起的哺乳动物消化道疾病。由于呋喃西林及其代谢物氨基脲(SEM)具有致癌作用，欧盟已于1995年禁止在食用动物中使用硝基呋喃类药物，我国也于2002年颁布了禁止使用该类兽药的禁令。目前，呋喃西林是国际动物源性食品贸易的必检项目，成为发达国家限制第三国出口的技术贸易壁垒。呋喃西林对光敏感，代谢快速，在动物体内主要以代谢物SEM形式存在较长时间。因此，呋喃西林残留的分析方法主要以其代谢SEM为标志物进行检测。

目前，国内外报道的检测方法主要是通过对SEM进行邻硝基苯甲醛的衍生前处理后，使用液-质联用(LC-MS)、高效液相-质谱联用法(HPLC-MS)等仪器测定其衍生产物NPSEM。仪器法是一种精确，稳定的确证方法，但具有成本高，样品通量低，前处理烦琐，操作复杂等缺点，不易实现现场快速筛查。酶联免疫分析技术(ELISA)具有操作步骤简单、样品通量高、成本低、易于实现自动化控制和现场快速筛查等优点，为呋喃西林大批量样品的快速筛查，提供了新方法。

建立 ELISA 方法首先需要制备针对目标药物的特异性抗体。多数药物、毒素、环境污染物分子质量小于 1000u，属于仅有反应原性而无免疫原性的半抗原。目前制备小分子半抗原抗体的常规方法为：选择具有毒理学意义的代谢产物或原形药物作为待测物，设计合成保留待测物分子结构特征并带有活性基团的半抗原，通过共价键使半抗原与大分子蛋白质载体偶联，制备人工免疫原，经动物免疫程序制备针对半抗原的特异性抗体。

半抗原合成是免疫化学分析中最为困难的关键步骤。近年来，国内外科研人员在小分子半抗原的设计与合成做了大量工作。Goodrow 等认为在半抗原的设计中须遵循以下原则：①免疫原中的半抗原应在分子结构立体化学和电子分布上与待测物分子尽可能相似；②半抗原结构中的连接臂应不易于诱导产生“臂抗体”，最好使用一定长度的碳链；③半抗原分子应具有便于与蛋白载体偶联的活性基团，且活性基团的存在对待测物分子的电子分布应没有影响；④半抗原与蛋白偶联后仍应保留待测物分子的基本结构。由于小分子农兽药无免疫原性，通常需与大分子载体蛋白偶联制备完全抗原，借助载体蛋白的 T 细胞表位获得免疫原性，以便刺激机体产生抗体。制备完全抗原时常用的载体有牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清蛋白(OVA)、钥孔血蓝蛋白(KLH)、兔血清白蛋白(RSA)、人血清白蛋白(HSA)、多聚赖氨酸(PLL)等。制备的人工抗原经动物免疫，抗血清的纯化等程序得到可用于 ELISA 检测的抗体。

目前尚未有氨基脲衍生物半抗原、抗原和其特异性抗体的技术报

道。

发明内容

本发明的目的是克服现有技术的不足，提供一种氨基脒衍生物半抗原，同时提供由所述半抗原偶连载体蛋白制备的人工抗原，以及免疫实验动物后使机体产生特异的针对氨基脒衍生物的抗体。

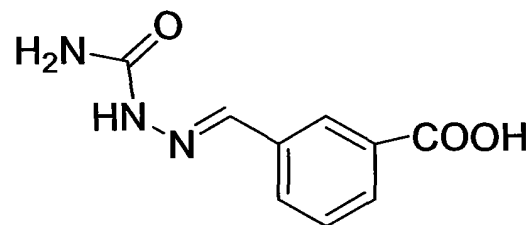
本发明的另一个目的是提供所述半抗原、抗原和特异性抗体的制备方法。

本发明的目的通过以下技术方案来予以实现：

提供一种氨基脒衍生物半抗原的制备方法，是将氨基脒与过量的带羧基的苯甲醛衍生物在室温条件下于甲醇中进行氨醛缩合反应，反应产生的沉淀经洗涤、干燥得到所述半抗原。氨醛缩合反应时间为16个小时左右。

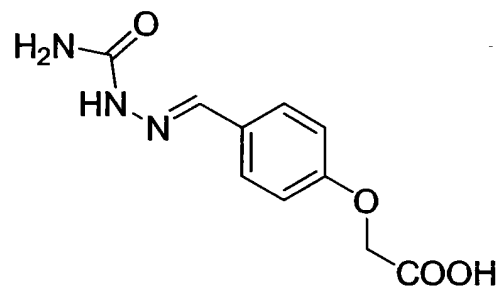
所述带羧基的苯甲醛衍生物优选间羧基苯甲醛或2-(4-甲酰基苯氧基)乙酸。

带羧基的苯甲醛衍生物采用间羧基苯甲醛制备得到的氨基脒衍生物半抗原具有式(I)所示结构：



(I)

带羧基的苯甲醛衍生物采用2-(4-甲酰基苯氧基)乙酸制备得到的氨基脒衍生物半抗原具有式(II)所示结构：



(II)

本发明提供了一种氨基脲衍生物抗原的制备方法，包括以下步骤：

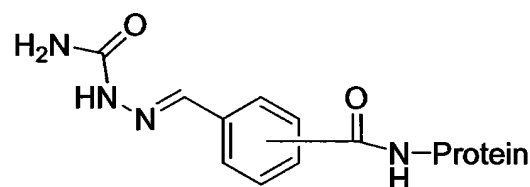
- (1) 将氨基脲衍生物半抗原与缩合剂 N, N' -二环己基碳二亚胺 (DCC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 反应形成活泼酯；
- (2) 将活泼酯滴加入蛋白溶液中反应；
- (3) 步骤 (2) 反应得到的偶联有氨基脲衍生物半抗原的蛋白经透析纯化得到目标抗原。

步骤 (1) 所述反应时间过夜；

步骤 (2) 所述蛋白溶液的浓度为 5mg/mL，反应时间为 12 小时；

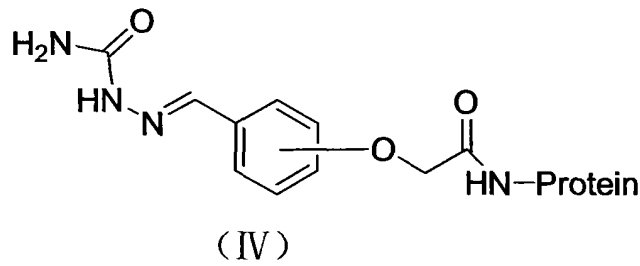
步骤 (3) 所述的透析纯化时间为 3 天。

选用式 (I) 所示半抗原制备得到的抗原具有式 (III) 所示结构：



(III)

选用式 (II) 所示半抗原制备得到的抗原具有式 (IV) 所示结构：



本发明同时提供了一种氨基脲衍生物抗体的制备方法, 包括以下步骤:

- (a) 将氨基脲衍生物抗原与弗氏佐剂免疫实验动物;
- (b) 免疫后抽取血液, 分离血清;
- (c) 血清经辛酸硫酸铵纯化得到抗体。

步骤 (a) 所述氨基脲衍生物抗原浓度为 1mg/mL, 氨基脲衍生物抗原与弗氏佐剂按 1: 1 比例免疫实验动物。

步骤 (b) 所述免疫次数为 4 次。

本发明还提供了所述抗体的应用, 具体是应用于呋喃西林及其代谢物氨基脲 (SEM) 的 ELISA 方法免疫化学分析中。

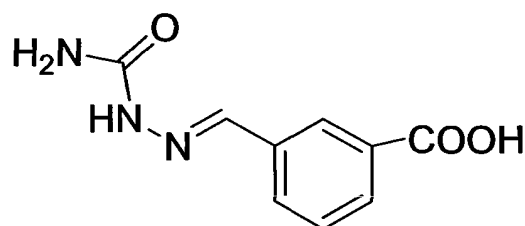
本发明是通过设计最适的半抗原制备相应的人工抗原, 从而获得对目标分析物具有特异性识别的抗体, 用于快速分析肉源性食品中氨基脲的残留量, 从而达到监控呋喃西林非法使用情况的目的。本发明的有益效果是: 所述半抗原和氨基脲衍生物结构相似, 突出了此兽药分子特异性抗原决定簇, 并可通过活泼酯法偶联载体蛋白制备抗原, 使用所述抗原免疫实验动物可获得效价高, 特异性好的针对氨基脲衍生物的抗体, 所述抗体可用于动物源性食品中氨基脲残留量的快速检测, 检测下限可达 0.09 ng/mL。

具体实施方式

下面结合具体实施例来进一步详细说明本发明。

实施例1 氨基脒衍生物半抗原 MCPSEM 的制备方法

在 50ml 圆底烧瓶中加入间羧基苯甲醛 1.15g，缓慢加入甲醇直至对间羧基苯甲醛完全溶解，搅拌中加入 0.3 g 氨基脒，室温搅拌过夜；反应结束，过滤，水洗两遍，甲醇洗两遍，干燥，得 0.62 g 白色粉末，其结构如式 (I) 所示。半抗原 MCPSEM 的 APCI-MS 分子离子峰为 207, HNMR(600MHz, d_6 -DMSO, TMS): δ 10.35(s, 1H); 8.14 (s, 1H); 8.03 (d, $J=7.8$ Hz, 1H); 7.93 (s, 1H); 7.90 (d, $J=7.8$ Hz, 1H); 7.52 (t, $J=7.2$ Hz, 1H,)。以上波谱数据均能正确归属，与 MCPSEM 结构一致，说明半抗原 MCPSEM 合成成功。

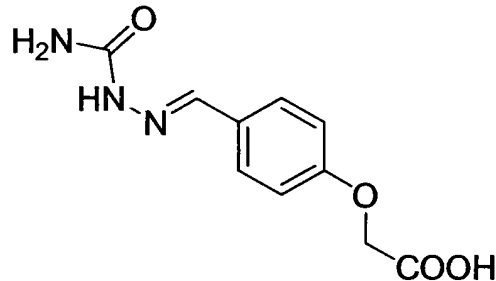


(I)

实施例2 氨基脒衍生物半抗原 CEPSEM 的制备方法

圆底烧瓶中加入 2-(4-甲酰基苯氧基)乙酸 1.06g，缓慢加入甲醇直至对 2-(4-甲酰基苯氧基)乙酸完全溶解，搅拌中加入 0.4g 氨基脒，室温搅拌过夜，反应结束，过滤，水洗两遍，甲醇洗两遍，干燥，得 0.90g 白色粉末，其结构式如式 (II) 所示。CEPSEM 波谱数据: APCI-MS m/z : 237 [M+H]⁺; 1H NMR(600MHz, d_6 -DMSO, TMS): δ 10.09 (s, 1H); 7.78 (s, 1H); 7.64 (d, $J=9.0$ Hz, 2H); 6.91 (d, $J=9.0$ Hz, 2H); 4.71 (s,

2H)。以上波谱数据均能正确归属，与 CEPSEM 结构一致，说明半抗原 CEPSEM 合成成功。

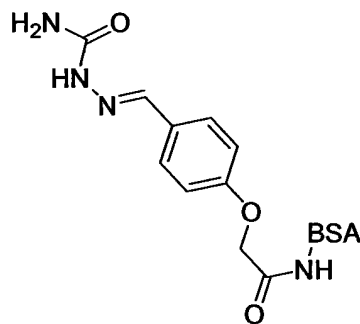


(II)

实施例3 免疫原 CEPSEM-BSA 的制备方法

取半抗原 CEPSEM 0.1mmol 溶于 2mlDMF 中，搅拌加入 DCC 27.5mg 和 NHS14.4mg。4℃下磁力搅拌反应过夜，离心后上清液为 A 液；称取 BSA 140mg 溶于 10ml 浓度为 0.1mol/L 的 PBS(PH8.0)中，加入 DMF1ml，搅拌溶解制备 B 液；磁力搅拌下，A 液逐渐滴入 B 液中，4℃下反应 12h，离心后，取上清液，4℃下用生理盐水透析 3d，每天更换 3 次透析液。得到的全抗原以 1mg/ml 的浓度分装于 0.5ml 离心管中，冻存于-20℃冰箱中，供免疫用。

制备的氨基脲衍生物免疫原具有式 (V) 所示结构：



(V)

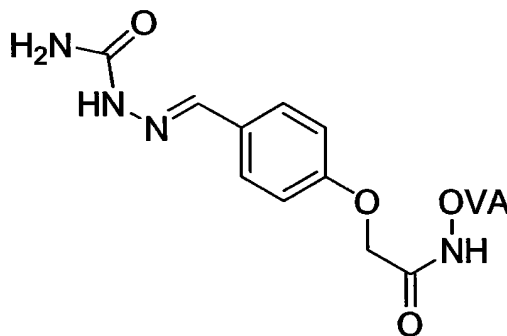
免疫原鉴定：对载体蛋白 BSA，半抗原 CEPSEM 和免疫原

CEPSEM-BSA 进行紫外扫描测定 (200 ~ 400nm), 发现免疫原 CEPSEM-BSA 与 BSA 和 CEPSEM 相比, 吸收曲线有明显改变, 说明半抗原 CEPSEM 与 BSA 偶联成功。三硝基苯黄酸法 (TNBS) 测得半抗原 IV 与 BSA 的偶联比为 16:1

实施例 4 包被原 CEPSEM-OVA 的制备方法

取半抗原 CEPSEM 0.1mmol 溶于 2ml DMF 中, 搅拌加入 DCC 27.5mg 和 NHS 14.4mg。4℃ 下磁力搅拌反应过夜, 离心后上清液为 A 液; 称取 OVA 140mg 溶于 10ml 浓度为 0.1mol/L 的 PBS (PH8.0) 中, 加入 DMF 1ml, 搅拌溶解制备 B 液; 磁力搅拌下, A 液逐渐滴入 B 液中, 4℃ 下反应 12h, 离心后, 取上清液, 4℃ 下用生理盐水透析 3d, 每天更换 3 次透析液, 得到的全抗原以 1mg/ml 的浓度分装于 0.5ml 离心管中, 冻存于 -20℃ 冰箱中, 供呋喃西林及其代谢物氨基脲 (SEM) 的 ELISA 方法免疫化学分析中包被酶标板用。

制备的包被原 CEPSEM-OVA 结构如式 (VI) 所示:



(VI)

包被原鉴定: 对载体蛋白 OVA, 半抗原 CEPSEM 和包被原

CEPSEM-OVA 进行紫外扫描测定 (200~400nm), 发被原 CEPSEM-OVA 与载体蛋白 OVA 及 CEPSEM 相比, 吸收曲线有明显改变, 说明半抗原 CEPSEM 与载体蛋白 OVA 偶联成功。TNBS 法测得半抗原 CEPSEM 与载体蛋白 OVA 的偶联比为 13:1。

实施例 5 多克隆抗体的制备方法及抗体效价测定

多克隆抗体的制备: 将免疫原慢慢解冻, 然后加入等量的佐剂(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)。完全乳化后, 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 6 只体重为 2.5~3 kg 的健康新西兰大白兔。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, 采用耳缘静脉免疫兔子。1 周后心脏采血, 室温静置 0.5~1h, 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。

抗体效价的检测: 间接竞争 ELISA 测定抗体阳性滴度以 2.1 倍于阴性血清的测定值为准, 测得抗体的阳性滴度为 1:640 000

实施例 6 抗体亲和性及特异性试验

将不同浓度的氨基脲的邻硝基苯甲醛的衍生物 NPSEM 与抗体一起进行间接竞争 ELISA 反应, 测定其抑制率, 以确定抗体对 NPSEM 的亲和性。其 IC_{50} 为 0.12 ng/mL, 检测限为 0.09 ng/mL。

将 NPSEM、邻硝基苯甲醛、苯甲醛、硝基苯、NPAOZ、NPAMOZ 和 NPAHD 配成不同浓度溶液, 测定其交叉反应率, 结果发现与同类药物

无交叉反应，见表 1。

以上实验结果说明由所设计半抗原制备的免疫原免疫产生的抗体具有灵敏度高，特异性好等优点。

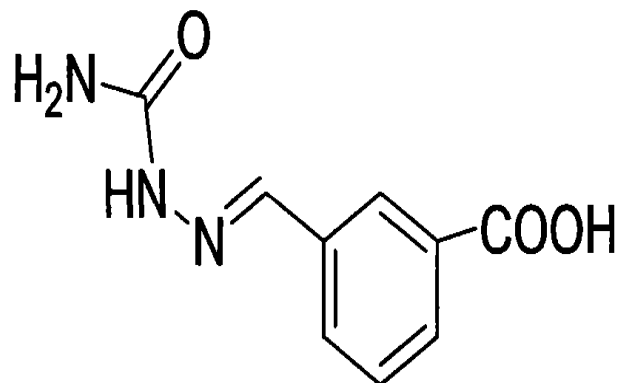
表 1 交叉反应试验结果

竞争药物	交叉反应率(%)
NPSEM	100%
邻硝基苯甲醛	<0.01
苯甲醛	<0.01
硝基苯	<0.01
NPAOZ	<0.01
NPAMOZ	<0.01
NPAHD	<0.01

专利名称(译)	氨基脲衍生物半抗原、抗原和抗体的制备方法		
公开(公告)号	CN101407480A	公开(公告)日	2009-04-15
申请号	CN200810219299.4	申请日	2008-11-21
[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	沈玉栋 张世伟 孙远明 雷红涛 王弘 肖治理 杨金易 蔡肇婷		
发明人	沈玉栋 张世伟 孙远明 雷红涛 王弘 肖治理 杨金易 蔡肇婷		
IPC分类号	C07C281/10 C07K16/06 G01N33/536		
代理人(译)	林丽明 任重		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了氨基脲衍生物半抗原、抗原和抗体的制备方法，氨基脲与带羧基的苯甲醛缩合后得到氨基脲衍生物半抗原，所述半抗原和氨基脲衍生物结构相似，突出了此兽药分子特异性抗原决定簇，并可通过活泼酯法偶联载体蛋白制备抗原；使用该抗原免疫实验动物可获得效价高、特异性好的针对氨基脲衍生物的抗体。所述抗体可用于动物源性食品中氨基脲残留量的快速检测，检测下限可达0.09ng/mL。



(I)