



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104017070 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 03

(21) 申请号 201410291378. 1

C07K 16/44 (2006. 01)

(22) 申请日 2014. 06. 26

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 徐丽广 胥传来 严会娟 匡华
马伟 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 14/795 (2006. 01)

C07K 14/77 (2006. 01)

C07K 1/107 (2006. 01)

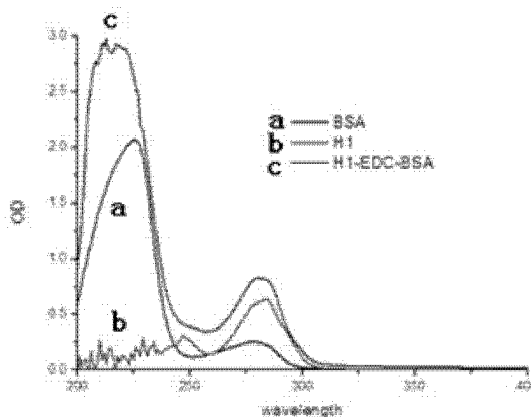
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种高灵敏度的多菌灵完全抗原的合成方法

(57) 摘要

一种高灵敏度的多菌灵完全抗原的合成方法,属于生物化工技术领域。本发明中合成了由多菌灵的类似物 2- 氯苯并咪唑和 6- 氨基己酸反应得到的具有羧基的半抗原 H1,与载体蛋白偶联制备免疫原;基于异源包被可以进一步提高抗体的灵敏度,所以在 ELISA 操作中,用多菌灵的类似物氨基氯苯并咪唑和 6- 氨基己酸反应得到半抗原 H2 与 OVA 偶联得到偶联物作为包被原。本发明制备的完全抗原呈现出特异性的多菌灵抗原决定簇,使得筛选出高特异性的多菌灵单克隆抗体成为可能。产生的抗体特异性高、灵敏度高,可用于建立酶联免疫吸附分析方法和胶体金试纸快速检测法,从而用于快速检测食品中的多菌灵残留。



1. 一种多菌灵完全抗原的合成方法,其特征在于步骤如下:

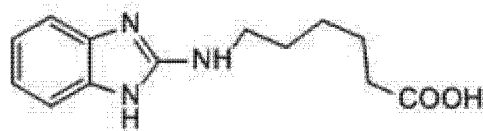
(1) 前体 261 的合成:将氨基己酸甲酯盐酸盐与等摩尔量的 2- 氯苯并咪唑混合,于二异丙基乙基胺中微波 150℃ 过夜反应 13h,得到产物,经纯化,即得到前体 261,产率为 10%;

(2) 多菌灵半抗原 H1 的合成:将步骤(1)制备的前体 261 溶于四氢呋喃中,室温搅拌反应过夜,60℃ 旋蒸除去四氢呋喃,以 1mol/L 的 HCl 溶液调节 pH 至 6~7,制备色谱纯化得多菌灵半抗原 H1;

(3) 多菌灵完全抗原的制备:将多菌灵半抗原 H1 与载体蛋白上的氨基进行偶联,即得到多菌灵完全抗原。

2. 根据权利要求 1 所述多菌灵完全抗原的合成方法,其特征在于步骤(1)所述的氨基己酸甲酯盐酸盐由氨基己酸和氯化亚砷在甲醇中回流制得。

3. 根据权利要求 1 所述多菌灵完全抗原的合成方法,其特征在于:步骤(2)所述多菌灵半抗原 H1,其结构简式如下所示:



H1。

4. 根据权利要求 1 所述多菌灵完全抗原的合成方法,其特征在于:步骤(3)

所述载体蛋白为牛血清白蛋白 BSA、匙孔血蓝蛋白 KLH、血蓝蛋白 LPH、鸡卵清白蛋白 OVA 或人血清白蛋白 HAS 中的一种。

5. 根据权利要求 1 所述多菌灵完全抗原的合成方法,其特征在于步骤(3)多菌灵完全抗原的制备具体步骤为:

1) 半抗原 H1 溶液的活化:取多菌灵半抗原 H1 35mg,加入 2mL DMF 溶解,再分别加入 N- 羟基琥珀酰亚胺 NHS 和 1- 乙基-(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 EDC,其中多菌灵半抗原 H1 : NHS : EDC 的摩尔比为 1 : 1.5 : 2,室温搅拌反应 12h,即得活化的半抗原 H1 溶液;

2) 蛋白溶液的制备:取 160mg 载体蛋白,再加入 10mL 0.1M pH9.6 碳酸盐缓冲液,即得蛋白溶液;

3) 反应:将步骤 1) 制备的活化的半抗原 H1 溶液慢速滴加到步骤 2) 制备的蛋白溶液中,室温下反应 8h;用 PBS 缓冲液透析 3 天,期间换水 6 次,即得到多菌灵完全抗原。

6. 用权利要求 5 所述方法制备的多菌灵完全抗原的应用,其特征在于:采用多菌灵半抗原 H1 制备的完全抗原免疫动物得到多克隆抗体或单克隆抗体,并应用于快速检测食品中的多菌灵残留。

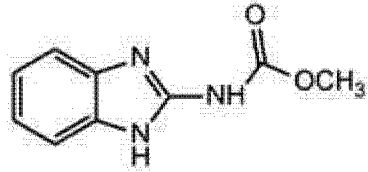
一种高灵敏度的多菌灵完全抗原的合成方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种高灵敏度的多菌灵完全抗原的合成方法,属于生物化工技术领域。

背景技术

[0002] 多菌灵是一种广谱、高效、低毒内吸性苯并咪唑类杀菌剂。其化学结构式如下：



其作用机理是,通过干扰细胞纺锤体的形成从而干扰细胞分裂,对植物具有良好的保护和治疗作用。广泛应用于各类农产品中,对多种作物由真菌(如半知菌、多子囊菌)引起的病害有防治效果。可用于叶面喷雾、种子处理和土壤处理等。多菌灵对动物肝、肾和生殖系统具有潜在的破坏作用。

[0003] 目前检测多菌灵的方法主要是气相色谱法(GC),液相色谱法(HPLC),分光光度法、导数同步荧光法、薄层层析-分光光度法、气质联用法等紫外仪器方法,但是这些方法存在操作繁琐,耗时,费用比较贵等缺点,不能实现大量样品的快速检测,因此建立一种快速简便的多菌灵检测方法具有重要意义。

[0004] 酶联免疫法(ELISA)是一种极为高效、敏感、快速的检测方法,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。然而得到高亲和力和高特异性的单克隆抗体是免疫学检测的前提,其中人工抗原的合成是其中重要的一步。

[0005] 由于多菌灵是小分子物质(分子量 $M_w < 1000 Da$),本身不具有诱导机体产生抗体的能力,需要和蛋白载体偶联后,才能具有免疫原性。但是多菌灵结构中没有可以直接利用的活性基团如 $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 或 $-SH$ 等,因此,要实现多菌灵和载体蛋白的偶联,首先要进行多菌灵半抗原的设计和合成。

[0006] 根据相关报道,为了保证半抗原和大分子载体蛋白偶联后能够最大限度的被识别,需要在目标分子和载体之间有一定的连接臂;同时要求连接臂应尽量远离半抗原分子的特征性基团,目的是突出半抗原的特征性结构,突出其抗原决定簇。一般选择4-6个碳链长度的手臂。根据上述原则,本发明设计了多菌灵半抗原及完全抗原的合成方法,为建立多菌灵的酶联免疫分析方法提供了有利条件。

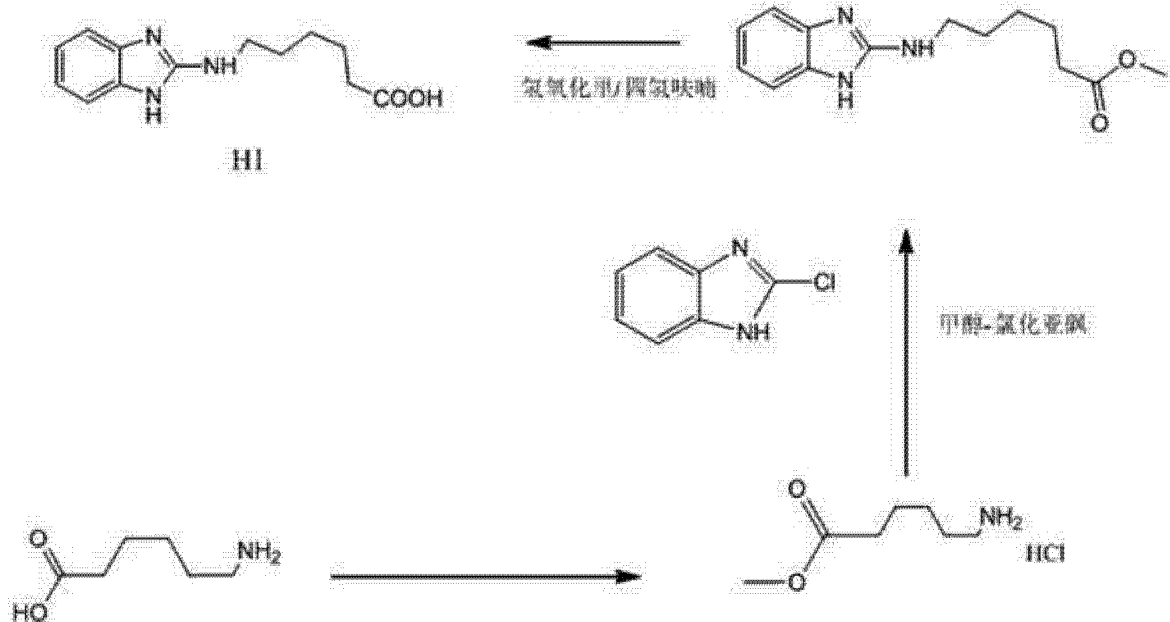
[0007] 影响免疫分析方法的关键因素在于特异性的抗原和抗体。本发明中合成了由多菌灵类似物2-氯苯并咪唑和6-氨基己酸反应得到具有羧基的半抗原H1,半抗原H1与载体蛋白偶联制备免疫原;基于异源包被可以进一步提高抗体的灵敏度,另一种半抗原H2由多菌灵类似物氨基氯苯并咪唑和6-氨基己酸反应得到,H2与OVA偶联得到包被原,这两种半抗原目前尚无文献报道。

发明内容

[0008] 本发明的目的是克服现有技术的不足之处,提供一种多菌灵半抗原 H1 及其完全抗原的制备方法。

[0009] 本发明的技术方案,

半抗原 H1 的合成路线如下所示:



一种多菌灵完全抗原的制备方法,步骤如下:

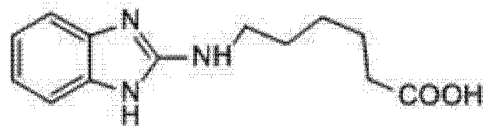
(1) 前体 261 的合成:将氨基己酸甲酯盐酸盐与等摩尔量的 2-氯苯并咪唑混合,于二异丙基乙基胺中微波 150℃ 过夜反应 13h,得到产物,经纯化,即得到前体 261,产率为 10%;

(2) 多菌灵半抗原 H1 的合成:将步骤(1)制备的前体 261 溶于四氢呋喃中,室温搅拌反应过夜,60℃ 旋蒸除去四氢呋喃,以 1mol/L 的 HCl 溶液调节 pH 至 6~7,制备色谱纯化得多菌灵半抗原 H1;

(3) 多菌灵完全抗原的制备:将多菌灵半抗原 H1 与载体蛋白上的氨基进行偶联,即得到多菌灵完全抗原。

[0010] 步骤(1)所述的氨基己酸甲酯盐酸盐由氨基己酸和氯化亚砷在甲醇中回流制得。

[0011] 步骤(2)所述多菌灵半抗原 H1,其结构简式如下所示:



H1。

[0012] 步骤(3)所述载体蛋白为牛血清白蛋白 BSA、匙孔血蓝蛋白 KLH、血蓝蛋白 LPH、鸡卵清白蛋白 OVA 或人血清白蛋白 HAS 中的一种。

[0013] 所述多菌灵完全抗原的制备方法,其具体步骤为:

1) 半抗原 H1 溶液的活化:取多菌灵半抗原 H1 35mg,加入 2mL DMF 溶解,再分别加入 N-羟基琥珀酰亚胺 NHS 和 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 EDC,其中多菌灵半抗原 H1 : NHS : EDC 的摩尔比为 1 : 1.5 : 2,室温搅拌反应 12h,即得活化的半抗原 H1 溶液;

2) 蛋白溶液的制备 :取 160mg 载体蛋白,再加入 10mL 0. 1M pH9. 6 碳酸盐缓冲液,即得蛋白溶液 ;

3) 反应 :将步骤 1) 制备的活化的半抗原 H1 溶液慢速滴加到步骤 2) 制备的蛋白溶液中,室温下反应 8h ;用 PBS 缓冲液透析 3 天,期间换水 6 次,即得到多菌灵完全抗原。

[0014] 制备的多菌灵完全抗原的应用,采用多菌灵半抗原 H1 制备的完全抗原免疫动物得到多克隆抗体或单克隆抗体,并应用于快速检测食品中的多菌灵残留。

[0015] 上述多菌灵半抗原 H1 或完全抗原化合物在制备多菌灵抗体中的应用也属于本发明的保护范围。

[0016] 上述多菌灵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。

[0017] 本发明的有益效果 :本发明是新型的多菌灵抗原合成方法,完全抗原呈现出的特异性的多菌灵抗原决定簇,使得筛选出高特异性的多菌灵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 6000,半抑制浓度为 20ng/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建立酶联免疫吸附分析方法和胶体金试纸快速检测法,从而用于快速检测食品中的多菌灵残留。

附图说明

[0019] 图 1 多菌灵半抗原 H1 制备的完全抗原紫外光谱图。

[0020] 图 2 多菌灵半抗原 H2 制备的包被原紫外光谱图。

具体实施方式

[0021] 实施例 1 多菌灵半抗原 H1 的制备

(1) 前体 261 的合成 :将氨基己酸甲酯盐酸盐(由氨基己酸和氯化亚砷在甲醇中回流所得)与等摩尔量的 2- 氯苯并咪唑混合,于二异丙基乙基胺中微波微波 150℃ 过夜反应 13h 得到 10% 左右的产物,经制备纯化得到该中间体。

[0022] (2) 半抗原 H1 的合成 :将上述中间体溶于四氢呋喃(THF)中,室温搅拌反应过夜,旋蒸除去四氢呋喃,以 1mol/L HCl 溶液调 pH 至 6~7,制备色谱纯化得产物。

[0023] 实施例 2 多菌灵半抗原 H1 制备完全抗原

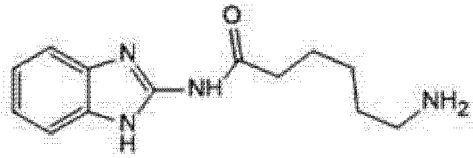
1) 半抗原 H1 的活化 :取 35mg 多菌灵半抗原 H1,加入 2mL DMF 溶解,再分别加入 NHS, EDC (半抗原、NHS、EDC 的摩尔比为 1: 1. 5: 2),室温搅拌反应 12h。

[0024] 2) 蛋白溶液的制备 :取 160mg 牛血清蛋白(半抗原 H1 与牛血清蛋白的摩尔比为 60:1),加入 10mL 0. 1M pH9. 6 碳酸盐缓冲液。

[0025] 3) 反应 :将步骤 1) 制备的活化的半抗原 H1 溶液慢速滴加到步骤 2) 制备的蛋白溶液中,室温下反应 8h。用 PBS 缓冲液透析 3 天,期间换水 6 次,即得到多菌灵完全抗原。

[0026] 实施例 3、多菌灵半抗原 H2 制备包被原

H2 结构式为 :



取 20mg 多菌灵半抗原 H2, 加入 1mL DMF 溶解, 0°C 预冷 30 min。0°C 下, 分别加入戊二醛 (半抗原、戊二醛的摩尔比为 1: 1.2), 0°C 反应 20min。取 120mg 鸡卵清白蛋白 (半抗原与鸡卵清蛋白的摩尔比为 30:1), 加入 10mL 0.1M pH9.6 碳酸盐缓冲液, 0°C 预冷 30 min。在 0°C 条件下, 将活化的半抗原溶液慢速滴加到蛋白溶液中, 0°C 条件下反应 4h。用 PBS 缓冲液透析 3 天, 期间换水 6 次, 即得到多菌灵包被原。

[0027] 实施例 4 多菌灵抗血清的制备

以实施例 2 制得的完全抗原为免疫原, 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 4 只。

[0028] 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。

[0029] 应用实施例 1

多菌灵抗血清的测定

一、采用间接 ELISA 方法检测血清效价, 具体操作步骤如下:

(1) 包被: 将实施例 3 中的包被抗原用 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液从 2 μ g/mL 开始倍比稀释, 100 μ L/孔, 37°C 反应 2h;

(2) 洗涤: 将板内溶液倾去, 甩干, 并用洗涤液洗涤 3 次, 每次 3min;

(3) 封闭: 拍干后, 加入 200 μ L/孔封闭液, 37°C 反应 2h。洗涤后烘干备用;

(4) 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 μ L/孔, 37°C 反应 1h; 充分洗涤后, 加入 1:3000 稀释的 HRP-羊抗鼠 IgG, 100 μ L/孔, 37°C 反应 1h;

(5) 显色: 将酶标板取出, 充分洗涤后, 每孔加入 100 μ L 的 TMB 显色液, 37°C 避光反应 15min;

(6) 终止和测定: 每孔加入 50 μ L 终止液以终止反应, 然后用酶标仪测定各孔的 OD₄₅₀ 值;

(7) 结果判读: 以 OD₄₅₀ 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。

[0030] 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:

(1) 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 OD₄₅₀ 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;

(2) 包被: 将包被原用包被缓冲液稀释至最适工作浓度, 100 μ L/孔, 37°C 反应 2h;

(3) 洗涤和封闭: 方法操作同上述间接 ELISA 法;

(4) 配制多菌灵标准溶液: 将多菌灵标准品用二甲基甲酰胺 (DMF) 配制成 1mg/mL 的母液, 然后, 在加样前, 再用含有 10% 的甲醇 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 溶液倍比稀释成需要浓度;

(5) 加样:每孔加入 50 μ L 倍比稀释的多菌灵各浓度标准品,然后再加入 50 μ L/ 孔最适稀释倍数的抗血清,37 $^{\circ}$ C 反应 0.5h;充分洗涤后,加入 1:3000 稀释的 HRP- 羊抗鼠 IgG, 100 μ L/ 孔,37 $^{\circ}$ C 反应 1h;

(6) 显色反应:将酶标板取出,充分洗涤后,每孔加入 100 μ L 的 TMB 显色液,37 $^{\circ}$ C 避光反应 15min;

(7) 终止和测定:每孔加入 50 μ L 终止液以终止反应,然后用酶标仪测定各孔的 OD₄₅₀ 值;

(8) 数据处理:以多菌灵各浓度的对数为横坐标,以多菌灵各浓度对应的 OD₄₅₀ 值为纵坐标,绘制标准曲线,计算半数抑制浓度(IC₅₀,即 OD₄₅₀ 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),从而判定抗血清对多菌灵是否具有特异性。

[0031] 结果显示,四免后,小鼠抗血清效价可达 6000,多菌灵 IC₅₀ 为 20ng/mL。免疫小鼠的效价与抑制如表 1 所示。表 1 中数值为在 OD₄₅₀ 时测定的吸光值。

[0032] 表 1

	包被浓度					
		1号小鼠		2号小鼠		
		0.6 μ g/mL	0.2 μ g/mL	0.6 μ g/mL	0.2 μ g/mL	
血清稀释倍数	1: 3000	2.183	1.125	1.732	0.887	
	1: 6000	1.505	0.716	1.039	0.579	
	1: 12000	0.908	0.393	0.643	0.602	
	1: 24000	0.564	0.238	0.452	0.265	
	多菌灵标准品 20ng					
	1: 3000	1.286	0.511	1.054	0.473	
	1: 6000	0.845	0.303	0.642	0.285	
	1: 12000	0.557	0.214	0.4	0.194	
1: 24000	0.36	0.15	0.28	0.127		

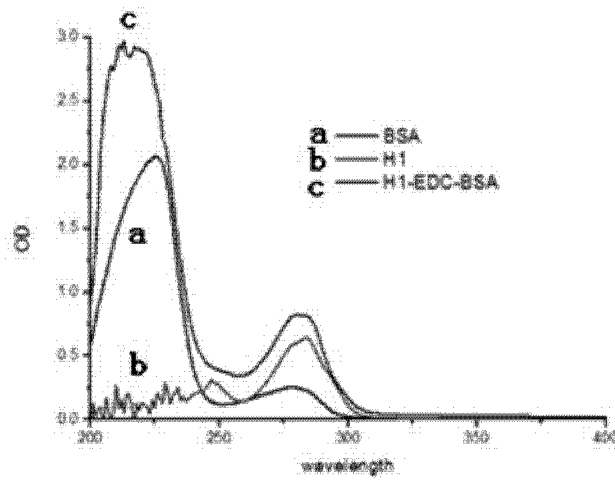


图 1

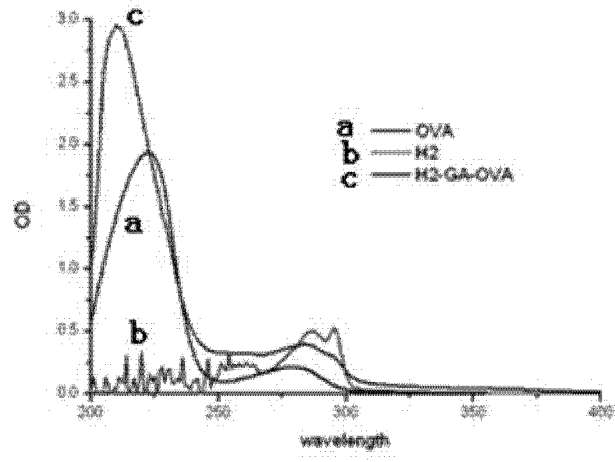


图 2

专利名称(译)	一种高灵敏度的多菌灵完全抗原的合成方法		
公开(公告)号	CN104017070A	公开(公告)日	2014-09-03
申请号	CN201410291378.1	申请日	2014-06-26
[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	徐丽广 胥传来 严会娟 匡华 马伟 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲		
发明人	徐丽广 胥传来 严会娟 匡华 马伟 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/795 C07K14/77 C07K1/107 C07K16/44 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 C07K19/00		
其他公开文献	CN104017070B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种高灵敏度的多菌灵完全抗原的合成方法，属于生物化工技术领域。本发明中合成了由多菌灵的类似物2-氯苯并咪唑和6-氨基己酸反应得到的具有羧基的半抗原H1，与载体蛋白偶联制备免疫原；基于异源包被可以进一步提高抗体的灵敏度，所以在ELISA操作中，用多菌灵的类似物氨基氯苯并咪唑和6-氨基己酸反应得到半抗原H2与OVA偶联得到偶联物作为包被原。本发明制备的完全抗原呈现出特异性的多菌灵抗原决定簇，使得筛选出高特异性的多菌灵单克隆抗体成为可能。产生的抗体特异性高、灵敏度高，可用于建立酶联免疫吸附分析方法和胶体金试纸快速检测法，从而用于快速检测食品中的多菌灵残留。

