



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105085662 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201510514925. 2

(22) 申请日 2015. 08. 20

(71) 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

(72) 发明人 庄惠生 孙瑞艳

(74) 专利代理机构 上海汉声知识产权代理有限公司

公司 31236

代理人 郭国中 陈少凌

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 1/10(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

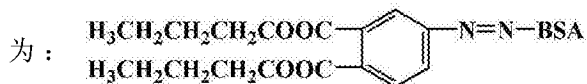
权利要求书2页 说明书10页 附图5页

(54) 发明名称

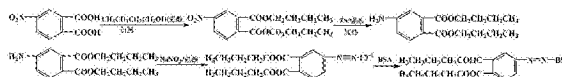
邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原 DBP-BSA 制备及用途

(57) 摘要

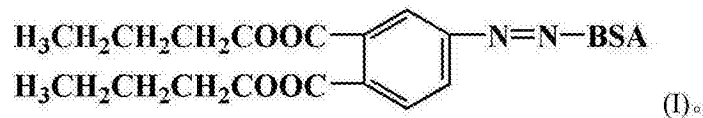
本发明公开了一种邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原 DBP-BSA 制备及用途,所述 DBP-BSA 的结构式



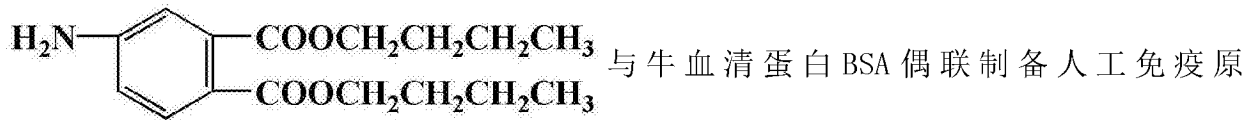
其制备方法为通过将 DBP 半抗原与蛋白质分子 BSA 偶联制备获得。本发明免疫原制备方法简单,稳定性好,成本低,易于工业化生产。邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原 DBP-BSA 通过免疫动物后制备成特异性抗体,为建立亲和素-生物素化酶联免疫吸附分析方法奠定基础。



1. 一种邻苯二甲酸二丁酯的人工免疫原 DBP-BSA, 其特征在于, 结构式如式 (I) 所示:



2. 一种如权利要求 1 所述的邻苯二甲酸二丁酯的人工免疫原 DBP-BSA 的制备方法, 其特征在于, 所述方法包括采用重氮化法将 DBP 半抗原



DBP-BSA。

3. 如权利要求 2 所述的邻苯二甲酸二丁酯的人工免疫原 DBP-BSA 的制备方法, 其特征在于, 所述方法具体包括如下步骤:

S1、将所述 DBP 半抗原溶于非质子有机溶剂中, 形成 DBP 半抗原溶液;

S2、向所述 DBP 半抗原溶液中依次滴加强酸、亚硝酸钠溶液, 控制 pH 为 2.0 ~ 3.0, 反应结束后去除未反应的亚硝酸钠, 生成重氮盐溶液;

S3、将牛血清蛋白 BSA 溶于 0.01 ~ 0.05M pH 9.18 硼酸钠缓冲液中, 形成牛血清蛋白溶液;

S4、在所述重氮盐溶液加入所述牛血清蛋白溶液, 用强碱溶液调节 pH 直至溶液逐渐呈橙红色, 搅拌进行偶联反应, 即得所述人工免疫原 DBP-BSA。

4. 如权利要求 3 所述的邻苯二甲酸二丁酯的人工免疫原 DBP-BSA 的制备方法, 其特征在于, 所述 DBP 半抗原、强酸、亚硝酸钠、牛血清蛋白 BSA 的摩尔比为 1:4 ~ 5:4 ~ 5:0.005 ~ 0.008。

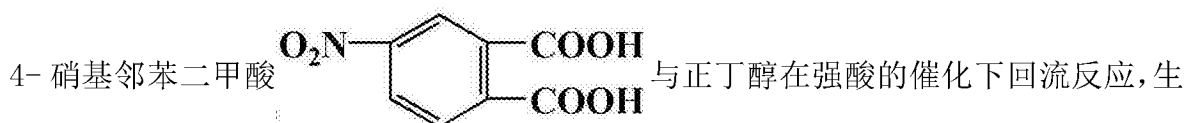
5. 如权利要求 3 所述的邻苯二甲酸二丁酯的人工免疫原 DBP-BSA 的制备方法, 其特征在于, 所述强酸选自浓盐酸、浓硫酸或浓硝酸; 所述强碱为氢氧化钠或氢氧化钾。

6. 如权利要求 3 所述的邻苯二甲酸二丁酯的人工免疫原 DBP-BSA 的制备方法, 其特征在于, 步骤 S1 中, 所述去除未反应的亚硝酸钠是加入尿素以去除未反应的亚硝酸钠, 所述尿素与 DBP 半抗原的摩尔比为 150 ~ 160:1。

7. 如权利要求 3 所述的邻苯二甲酸二丁酯的人工免疫原 DBP-BSA 的制备方法, 其特征在于, 步骤 S4 中, 所述偶联反应是在 0 ~ 4°C 低温磁力搅拌下进行; 所述搅拌时间为 12 ~ 18 小时。

8. 如权利要求 3 所述的邻苯二甲酸二丁酯的人工免疫原 DBP-BSA 的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 S4 还包括偶联反应结束后, 离心分离, 将上清液装入透析袋中透析, 离心分离沉淀即得所述人工免疫原 DBP-BSA 的步骤。

9. 如权利要求 2 或 3 所述的邻苯二甲酸二丁酯的人工免疫原 DBP-BSA 的制备方法, 其特征在于, 所述 DBP 半抗原是通过包括如下步骤的方法制备而得:



成 4- 硝基邻苯二甲酸二丁酯；

以苯或甲苯为溶剂,所述 4- 硝基邻苯二甲酸二甲酯和锌粉、强酸发生还原反应,生成所述 DBP 半抗原。

10. 一种如权利要求 1 所述的邻苯二甲酸二丁酯的人工免疫原 DBP-BSA 在用于痕量塑化剂邻苯二甲酸二丁酯检测中的用途,其特征在于,所述检测采用免疫检测法。

邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原 DBP-BSA 制备及用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原 DBP-BSA 的制备及用途,具体是一种用于新兴持久性有机污染物——塑化剂类免疫检测的邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原 DBP-BSA 及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 邻苯二甲酸酯类塑化剂(缩写为 PAEs),又称酞酸酯类,是一类由邻苯二甲酸与含有 4-15 个碳的醇发生费歇尔(Fischer)酯化反应所形成的酯的重要衍生物的统称。这类物质有特殊气味,毒性较大,一般情况下状态为粘稠液体;液态条件下温度范围宽,流动性大,挥发性低,不溶于水,易溶于大多数有机溶剂。这类物质用途广泛,它不仅可作为食品包装材料、玩具、农药载体、驱虫剂、润滑剂、乙烯地板和壁纸、去泡剂、清洁剂、医用材料(如人工心脏瓣膜等人工器官、血袋、注射器和胶管)和个人护理用品(主要有化妆品、香味品、指甲油、头发喷雾剂、香皂和洗发液)等近千种产品的生产原材料,还常作为塑料增塑剂被用于改造塑料制品性能。

[0003] 邻苯二甲酸二丁酯(英文名称:Dimethyl phthalate,简称 DBP),又名酞酸二丁酯、避蚊酯、驱蚊油等,CAS 号为 131-11-3,分子式为 $C_{10}H_{10}O_4$,分子量为 194.19,无色透明微黄色油状液体,稍具芳香味,能与乙醇、乙醚等一般有机溶剂混溶,不溶于水和石油醚;高度易燃,遇明火、高热、氧化剂有燃烧的危险。该物质微毒,对眼睛粘膜有较强的刺激性;可能对胎儿造成伤害,对水生生物有极高毒性;有损害生育能力的危险性;吸入、皮肤接触及吞食有毒;人体组织内可蓄积,从而抑制中枢神经系统。由于其具备良好的塑膜性、粘着性和防水性,故常被用于制作醋酸纤维素的薄膜、清漆涂料、透明纸和成模塑料粉等;还可用作驱蚊油、聚氟乙烯涂料以及杀虫剂的溶剂¹。近些年来,由于频频发现该物质在食品、水体中的含量过高,因此,该物质含量的检测便备受关注。

[0004] 目前,关于邻苯二甲酸二丁酯的研究主要集中在水体、沉积物、大气等环境领域和生物体的毒性方面,但样品的检测方法方面研究较少。目前对邻苯二甲酸二丁酯的检测手段主要为气相色谱和高效液相色谱等仪器检测方法,这些方法虽然准确可靠,但对样品的预处理方法和操作人员的专业性有很高的要求。正因为这些方法的处理复杂、耗时、仪器价格昂贵而不适合推广使用,也不利于在环境污染事故现场快速检测。为克服这些缺点,寻求一种快速、简便、灵敏且经济实用的分析方法就成为环境监测领域的主要研究方向。

[0005] 20 世纪 60 年代发展起来的免疫分析(Immunoassay, IA)是基于抗原和抗体的特异性、可逆性结合反应的分析技术。免疫分析具有常规理化分析技术无可比拟的选择性和高灵敏性,非常适合复杂介质中痕量组分的分析。因此免疫分析具有的特异性强、灵敏度高、方法快捷简单、分析通量大、检测成本低等优点,使得该类方法可以满足简单、快速、灵敏地检测持久性有机污染物的要求。1971 年 Engvail, VanWeerman 等报道了检测体液中微量物质的固相免疫分析技术,即酶联免疫吸附分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。目前,ELISA 方法已经成为免疫分析方法中重要的组成部分。ELISA 方法是

将抗原-抗体之间的免疫反应与酶的高效催化特性有机结合而发展起来的一种免疫分析方法。其中,以亲和素-生物素信号放大系统为基础的亲和素-生物素化酶联免疫吸附分析法,以生物素标记抗体(抗原),并以酶标亲和素代替 ELISA 方法中酶标抗体。亲和素是卵白蛋白中的一种碱性糖蛋白,分子量约为 68kDa。一个亲和素分子由 4 个亚单位组成,每个亚单位都可以与一个生物素分子(分子量为 244)特异性结合。生物素与亲和素结合特异性强,其亲和力比抗原抗体反应大得多,亲和常数高达 $10^{15}M^{-1}$ 。由于一个亲和素能与 4 个生物素分子结合,因此在检测中可提高被固相结合酶的数量,进而提高检测方法的灵敏度。

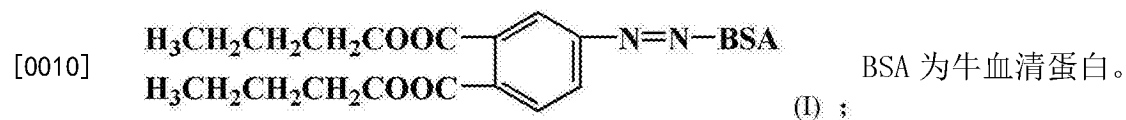
[0006] 目前,尚没有亲和素-生物素化酶联免疫吸附分析方法检测邻苯二甲酸二丁酯的相关报道。而制备合格的邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原是建立邻苯二甲酸二丁酯生物免疫分析检测方法的关键,更是建立 DBP 免疫检测分析方法的关键,这将具有重要的应用价值和理论研究意义。

发明内容

[0007] 针对现有技术中的缺陷,本发明的目的是提供一种步骤简单,速度快,产率高的邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原(DBP-BSA)的制备方法和用途,为免疫得到特异性抗体和利用人工抗原、抗体建立免疫检测方法奠定基础。

[0008] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

[0009] 第一方面,本发明涉及一种邻苯二甲酸二丁酯的人工免疫原 DBP-BSA,结构式如式(I)所示:



[0011] 第二方面,本发明涉及一种邻苯二甲酸二丁酯的人工免疫原 DBP-BSA 的制备方法,所述方法包括采用重氮化法将 DBP 半抗原



牛血清蛋白 BSA 偶联制备人工免疫原 DBP-BSA。

[0012] 优选的,所述方法具体包括如下步骤:

[0013] S1、将所述 DBP 半抗原溶于非质子有机溶剂(包括 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)或二甲亚砜)中,形成 DBP 半抗原溶液;

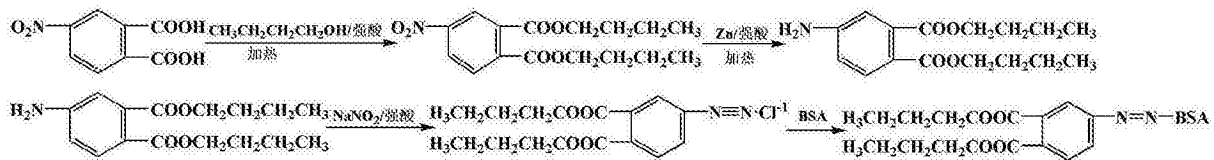
[0014] S2、向所述 DBP 半抗原溶液中依次滴加(逐滴加入,就是一滴一滴的滴入,每滴之间没有间隔,DBP 半抗原溶液加入速度过快容易导致重氮盐制备效率降低)强酸、亚硝酸钠溶液(1M),控制 pH 为 2.0 ~ 3.0,反应结束后去除未反应的亚硝酸钠,生成重氮盐溶液;

[0015] S3、将牛血清蛋白 BSA 溶于 0.01 ~ 0.05M pH 9.18 (pH 过大或过小,都不利于本发明人工免疫原的制备)硼酸钠缓冲液中,形成牛血清蛋白溶液;

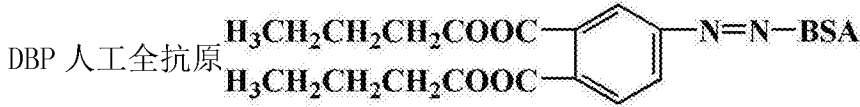
[0016] S4、在所述重氮盐溶液加入所述牛血清蛋白溶液,用强碱溶液调节 pH 直至溶液逐渐呈橙红色,搅拌进行偶联反应,即得所述人工免疫原 DBP-BSA。

[0017] 本发明采用重氮化法合成邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原,其反应方程式如下:

[0018]



[0019] 上述反应方程式中,中间产物重氮盐与牛血清蛋白 BSA 结合,偶联脱氮,生成了



[0020] 优选的,所述 DBP 半抗原、强酸、亚硝酸钠、牛血清蛋白 BSA 的摩尔比为 1:4 ~ 5:4 ~ 5:0.005 ~ 0.008。

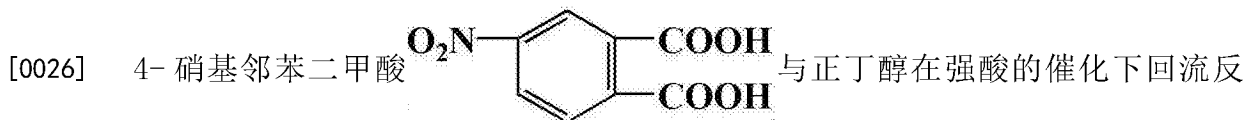
[0021] 优选的,所述强酸选自浓盐酸、浓硫酸或浓硝酸;所述强碱为氢氧化钠或氢氧化钾。

[0022] 优选的,步骤 S1 中,所述去除未反应的亚硝酸钠是加入尿素以去除未反应的亚硝酸钠,所述尿素与 DBP 半抗原的摩尔比为 150 ~ 160:1。

[0023] 优选的,步骤 S4 中,所述偶联反应是在 0 ~ 4℃低温磁力搅拌下进行;所述搅拌时间为 12 ~ 18 小时。所有需要保持蛋白活性的长时间反应都需要在低温情况下进行,经验表明 0 ~ 4℃最合适。此外,为充分反应,根据经验,当半抗原与强酸、亚硝酸钠、尿素、BSA 的摩尔比为 1:4:4:150:0.005 时搅拌反应 12 小时就可以,当半抗原与与强酸、亚硝酸钠、尿素、BSA 的摩尔比为 1:5:5:160:0.008 时反应就需要 18 小时。

[0024] 优选的,所述步骤 S4 还包括偶联反应结束后,离心分离,将上清液装入透析袋中透析,离心分离沉淀即得所述人工免疫原 DBP-BSA 的步骤。

[0025] 优选的,所述 DBP 半抗原是通过包括如下步骤的方法制备而得:

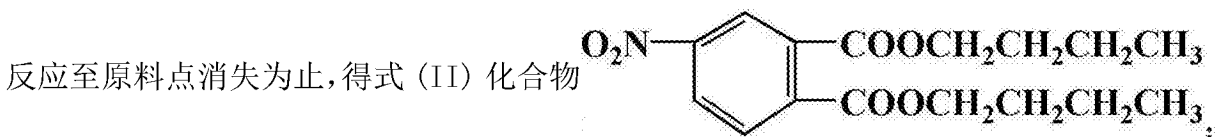


应,生成 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯;

[0027] 以苯或甲苯为溶剂,所述 4-硝基邻苯二甲酸二甲酯和锌粉、强酸发生还原反应,生成所述 DMP 半抗原。

[0028] 具体步骤如下:

[0029] A1、将 4-硝基邻苯二甲酸溶于正丁醇后再逐滴滴加强酸 A 形成反应液 a,加热回流



[0030] A2、将所得式 (II) 化合物溶于苯或甲苯中形成反应液 b,先向反应液 b 中加入锌粉,再反应液 b 中逐滴加入强酸 B 溶液,保持还原回流反应,至反应完全,即得 DBP 半抗原。DBP 半抗原化学名称为 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯,分子式 :C₁₆H₂₃N₁O₄;分子量 :293.35。

[0031] 所述强酸 A 选自浓盐酸或浓硫酸;所述强酸 B 选自浓盐酸或浓硫酸。

[0032] 优选的,所述步骤 A1 中,4-硝基邻苯二甲酸、正丁醇、强酸 A 的摩尔比为为 1:(6 ~ 7):(0.5 ~ 0.7),反应温度为 120 ~ 130℃,酯化反应时间为 6 ~ 6.5 小时;所述步骤 A2 中,

式 (II) 化合物与强酸 B、苯或甲苯、和锌粉的摩尔比为 1:(21 ~ 22):(560 ~ 570):(18 ~ 19) (其中苯或甲苯作为基质溶液并不参与反应), 还原反应反应液 b 的温度为 25 ~ 30℃, 还原反应时间为 10 ~ 12 小时。

[0033] 理想状态下, 4- 硝基邻苯二甲酸、正丁醇的摩尔比是 1:2, 但为了反应顺利进行, 一般正丁醇的用量是 4- 硝基邻苯二甲酸的摩尔量的 6 倍以上, 但不能超过 4- 硝基邻苯二甲酸的摩尔量的 7 倍; 此外, 强酸 A 作为酯化反应的催化剂, 所用量一般是原料 4- 硝基邻苯二甲酸摩尔量的 0.5 倍以上, 但不超过原料 4- 硝基邻苯二甲酸摩尔量的 0.7 倍; 正丁醇在 120℃ 处于沸腾状态, 那么 130℃ 更处于沸腾状态, 反应向右进行。

[0034] 理想状态下, 4- 硝基邻苯二甲酸二丁酯、强酸 B 和纯锌粉的摩尔比是 1:10:10, 为确保反应顺利向右进行, 一般纯锌粉的用量是原料 4- 硝基邻苯二甲酸二丁酯摩尔量的 18 倍以上, 但不能超过原料 4- 硝基邻苯二甲酸二丁酯摩尔量的 19 倍; 此外, 强酸 B 作为还原反应的强氧化剂, 所用量一般是原料纯锌粉摩尔数的 1 倍以上, 但不超过原料纯锌粉摩尔数的 1.2 倍, 而非质子性有机溶剂的摩尔数需要是强氧化剂的摩尔数的 25 倍以上, 但不超过强氧化剂摩尔数的 28 倍。

[0035] 优选的, 所述步骤 A1 还包括酯化反应完全后, 蒸馏除去未反应的正丁醇和生成的水, 再趁热将液体倒入冰水中, 下层的黄色油状粗品用 10% Na_2CO_3 溶液洗涤至水层呈无色, 重结晶 DBP 半抗原中间体的步骤。

[0036] 优选的, 所述步骤 A2 还包括还原反应完全后, 用冰水和强碱溶液以终止反应, 萃取反应液, 分离, 除杂质, 干燥, 层析柱分离纯化 DBP 半抗原的步骤。

[0037] 第三方面, 本发明还涉及一种邻苯二甲酸二丁酯的人工免疫原 DBP-BSA 在用于痕量塑化剂邻苯二甲酸二丁酯检测中的用途, 所述检测采用免疫检测法。

[0038] 优选的, 所述检测体系的建立包括:

[0039] 所述人工免疫原通过生物体免疫反应法制备得到抗邻苯二甲酸二丁酯的特异性抗体;

[0040] 所述邻苯二甲酸二丁酯半抗原偶联载体蛋白制得人工包被原; 检测时, 该人工包被原和邻苯二甲酸二丁酯与抗邻苯二甲酸二丁酯特异性抗体免疫球蛋白 IgG 发生特异性识别的反应, 形成直接竞争关系, 进而实现对痕量塑化剂邻苯二甲酸二丁酯检测。

[0041] 本发明的邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原 DBP-BSA 的应用, 通过免疫动物制备抗邻苯二甲酸二丁酯特异性抗体, 能与邻苯二甲酸二丁酯发生特异性免疫反应的免疫球蛋白 IgG 反应, 用于水体、土壤、大气等环境样品和各类食品中痕量塑化剂邻苯二甲酸二丁酯的检测。

[0042] 由于邻苯二甲酸二丁酯是小分子物质, 只具有反应原性而没有免疫原性, 而且该分子上没有能与蛋白质分子直接结合的氨基、仲氨基等官能团, 故本发明通过选择 4- 硝基邻苯二甲酸为原料, 经两步反应制备带有氨基活性基团的 DBP 半抗原, 然后用重氮化法将这个含氨基的半抗原与蛋白质分子偶联制备人工免疫原, 在将制备的免疫原对新西兰大白兔免疫, 得到高特异性的抗邻苯二甲酸二丁酯多克隆抗体, 此抗体将用于建立针对邻苯二甲酸二丁酯的亲素-生物素化酶联免疫吸附分析方法。

[0043] 与现有技术相比, 本发明具有如下的有益效果:

[0044] (1) 抗原实用性强: 邻苯二甲酸二丁酯抗原制备和抗体制备具有重要的实用价

值和现实意义。利用本专利中的方法,首次成功制备了邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原 DBP-BSA。该人工免疫原保留了邻苯二甲酸二丁酯的结构,具有针对邻苯二甲酸二丁酯的抗原决定簇,为制备特异性好、效价高的抗体和建立亲和素-生物素化酶联免疫吸附分析方法提供了保障。

[0045] (2) 抗原稳定性好:此法合成的邻苯二甲酸二丁酯人工抗原具有较好的稳定性,在 0 ~ 4℃ 环境下可保存 1 年不变性, -20℃ 环境下可保存 3 年。

[0046] (3) 抗原制备技术简便可行:抗原的整个制备过程无需特别的仪器设备,成本低廉,容易工业化规模生产。

附图说明

[0047] 通过阅读参照以下附图对非限制性实施例所作的详细描述,本发明的其它特征、目的和优点将会变得更明显:

[0048] 图 1 为邻苯二甲酸二丁酯半抗原和邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原的合成路线图;

[0049] 图 2 为邻苯二甲酸二丁酯半抗原红外光谱;

[0050] 图 3 为邻苯二甲酸二丁酯半抗原的核磁共振谱图;

[0051] 图 4 为邻苯二甲酸二丁酯半抗原、载体蛋白和人工免疫原紫外吸收光谱图;

[0052] 图 5 为免疫新西兰大白兔产生的抗 DBP 抗体效价的变化;

[0053] 图 6 为间接竞争亲和素-生物素化酶联免疫吸附分析方法检测邻苯二甲酸二丁酯的标准工作曲线。

具体实施方式

[0054] 下面结合具体实施例对本发明进行详细说明。以下实施例将有助于本领域的技术人员进一步理解本发明,但不以任何形式限制本发明。应当指出的是,对本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进。这些都属于本发明的保护范围。

[0055] 实施例 1、邻苯二甲酸二丁酯半抗原的制备与表征

[0056] 邻苯二甲酸二丁酯半抗原的合成路线图如图 1 所示:

[0057] (1) 邻苯二甲酸二丁酯半抗原的制备

[0058] 称取 10g(0.0474mol) 4-硝基邻苯二甲酸加入到圆底烧瓶中,随后缓慢加入 26.1mL(0.2850mol) 正丁醇,边搅拌边加入 1.65mL(0.0304mol) 浓 H_2SO_4 催化,逐渐升温至 120℃ 回流加热 6.5 小时,直至薄板层析法 (TLC) 检测原料点消失为止 (显色剂:丙酮溶剂中溶解少量的高锰酸钾;展开剂,正己烷:乙酸乙酯 = 5:1);反应结束后将反应液转移至旋转蒸发器中减压蒸馏除去未反应的正丁醇和生成的水,再趁热将液体倒入冰水中,磁力搅拌 5min 后静置一段时间分层,将下层黄色油状液体用 10% Na_2CO_3 溶液洗涤至水层呈无色 (pH 7.0-8.0),再用无水 Na_2SO_4 脱水干燥,得到黄色油状液体 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯即 DBP 半抗原中间体。

[0059] 称取 1.5g(0.0046mol) DBP 半抗原中间体 (4-硝基邻苯二甲酸二丁酯) 装入容积为 500mL 三口圆底烧瓶底部,随后向瓶底边搅拌边加入 230mL(2.5871mol) 苯,待 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯被苯溶解后再加入 2.80g(0.0428mol) 纯锌粉,搅拌均匀后分次加入 8.2mL

浓 HCl (0.0984mol), 室温搅拌 15min 后再次加入 2.80g (0.0428mol) 纯锌粉, 室温搅拌反应 12h, 薄板层析法 (TLC) 监测反应直至反应完全; 反应结束后, 将 280mL 冷水加入反应体系, 并用 1M NaOH 溶液中和至弱碱性 (pH 7.0-8.5); 静置 1h 后分离并保留苯层, 再用苯萃取水层, 合并萃取液, 有机相经水洗后用无水 Na_2SO_4 脱水干燥以除去多余的水分; 有机相减压蒸馏以除去苯, 得到的粗品再用硅胶柱层析 (洗脱剂为乙酸和正己烷的混合液 (V/V = 1:10)) 后减压蒸馏, 得到淡黄色晶体 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯即 DBP 半抗原。邻苯二甲酸二丁酯半抗原分子式: $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_4$; 分子量 293.35; 产率 89.8%; 熔点: $68 \sim 69^\circ\text{C}$, 纯度 99%。

[0060] (2) 邻苯二甲酸二丁酯半抗原的鉴定

[0061] 将制得的半抗原经红外光谱 (图 2)、核磁共振光谱 (图 3) 鉴定, 结果为: IR(KBr) ν/cm^{-1} : 3451.79, 3362.77 ($-\text{NH}_2$), 1716.12 ($\text{C}=\text{O}$), 1290.51, 1142.57 ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$), 2956.59, 2871.60 ($-\text{CH}_3$), 1458.28 ($\text{d}-\text{OCH}_2-$), 1602.04, 1565.54, 1476.69 ($\text{C}=\text{C}$), 1682.88, 850.77 ($\text{C}-\text{H}$, Ar); ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 7.71 (d, 1H, ArH), 7.24 (d, 1H, ArH), 6.96 (d, 1H, ArH), 4.28 (t, 2H, OCH_2), 4.24 (t, 2H, OCH_2), 4.22 (b, 2H, $-\text{NH}_2$), 1.69-1.64 (m, 4H, OCH_2CH_2), 1.43-1.38 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 0.93 (t, 6H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ppm。红外、核磁表征结果表明, DBP 半抗原具有 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、苯环等基团的特征吸收峰, 证明制备的 DBP 半抗原分子中含有氨基官能团, 最终实验中成功制备了 DBP 半抗原。

[0062] 从以上分析可知, 所合成的产物为目标物。

[0063] 实施例 2、邻苯二甲酸二丁酯半抗原的合成

[0064] 邻苯二甲酸二丁酯半抗原的合成路线图如图 1 所示:

[0065] (1) 邻苯二甲酸二丁酯半抗原的制备

[0066] 称取 10g (0.0474mol) 4-硝基邻苯二甲酸加入到圆底烧瓶中, 随后缓慢加入 26.0mL (0.2844mol) 正丁醇, 边搅拌边加入 1.28mL (0.0237mol) 浓 H_2SO_4 催化, 逐渐升温至 130°C 回流加热 6 小时, 直至薄板层析法 (TLC) 检测原料点消失为止 (显色剂: 丙酮溶剂中溶解少量的高锰酸钾; 展开剂, 正己烷: 乙酸乙酯 = 5:1); 反应结束后将反应液转移至旋转蒸发仪中减压蒸馏除去未反应的正丁醇和生成的水, 再趁热将液体倒入冰水中, 磁力搅拌 5min 后静置一段时间分层, 将下层黄色油状液体用 10% Na_2CO_3 溶液洗涤至水层呈无色 (pH 7.0-8.0), 再用无水 Na_2SO_4 脱水干燥, 得到黄色油状液体 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯即 DBP 半抗原中间体。

[0067] 称取 1.5g (0.0046mol) DBP 半抗原中间体 (4-硝基邻苯二甲酸二丁酯) 装入容积为 500mL 三口圆底烧瓶底部, 随后向瓶底边搅拌边加入 229mL (2.5760mol) 苯, 待 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯被苯溶解后再加入 2.71g (0.0414mol) 纯锌粉, 搅拌均匀后分次加入 8.1mL 浓 HCl (0.0966mol), 30°C 搅拌 15min 后再次加入 2.71g (0.0414mol) 纯锌粉, 室温搅拌反应 10h, 薄板层析法 (TLC) 监测反应直至反应完全; 反应结束后, 将 271mL 冷水加入反应体系, 并用 1M NaOH 溶液中和至弱碱性 (pH 7.0-8.5); 静置 1h 后分离并保留苯层, 再用苯萃取水层, 合并萃取液, 有机相经水洗后用无水 Na_2SO_4 脱水干燥以除去多余的水分; 有机相减压蒸馏以除去苯, 得到的粗品再用硅胶柱层析 (洗脱剂为乙酸和正己烷的混合液 (V/V = 1:10)) 后减压蒸馏, 得到淡黄色晶体 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯即 DBP 半抗原。邻苯二甲酸二丁酯半抗原分子式: $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_4$; 分子量 293.35; 产率 90.2%; 熔点: $68 \sim 69^\circ\text{C}$, 纯度 99%。

[0068] (2) 邻苯二甲酸二丁酯半抗原的鉴定

[0069] 将制得的半抗原经红外光谱(图2)、核磁共振光谱(图3)鉴定,结果为: IR(KBr) ν/cm^{-1} : 3451.79, 3362.77(-NH₂), 1716.12(C=O), 1290.51, 1142.57(C-O-C), 2956.59, 2871.60(-CH₃), 1458.28(d-OCH₂-), 1602.04, 1565.54, 1476.69(C=C), 1682.88, 850.77(C-H, Ar); ¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δ 7.71(d, 1H, ArH), 7.24(d, 1H, ArH), 6.96(d, 1H, ArH), 4.28(t, 2H, OCH₂), 4.24(t, 2H, OCH₂), 4.22(b, 2H, -NH₂), 1.69-1.64(m, 4H, OCH₂CH₂), 1.43-1.38(m, 4H, OCH₂CH₂CH₂), 0.93(t, 6H, OCH₂CH₂CH₂CH₃) ppm。红外、核磁表征结果表明, DBP 半抗原具有 -NH₂、-O-CH₂CH₂CH₂CH₃、苯环等基团的特征吸收峰, 证明制备的 DBP 半抗原分子中含有氨基官能团, 最终实验中成功制备了 DBP 半抗原。

[0070] 从以上分析可知, 所合成的产物为目标物。

[0071] 实施例 3、邻苯二甲酸二丁酯半抗原的制备与鉴定

[0072] 邻苯二甲酸二丁酯半抗原的合成路线图如图 1 所示:

[0073] 称取 10g(0.0474mol) 4-硝基邻苯二甲酸加入到圆底烧瓶中, 随后缓慢加入 30.3mL(0.3318mol) 正丁醇, 边搅拌边加入 1.54mL(0.0284mol) 浓 H₂SO₄ 催化, 逐渐升温至 125℃ 回流加热 6 小时, 直至薄板层析法(TLC) 检测原料点消失为止(显色剂: 丙酮溶剂中溶解少量的高锰酸钾; 展开剂, 正己烷: 乙酸乙酯=5:1); 反应结束后将反应液转移至旋转蒸发仪中减压蒸馏除去未反应的正丁醇和生成的水, 再趁热将液体倒入冰水中, 磁力搅拌 5min 后静置一段时间分层, 将下层黄色油状液体用 10% Na₂CO₃ 溶液洗涤至水层呈无色(pH 7.0-8.0), 再用无水 Na₂SO₄ 脱水干燥, 得到黄色油状液体 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯即 DBP 半抗原中间体。4-硝基邻苯二甲酸二丁酯分子式: C₁₆H₂₁NO₆; 分子量: 323.33; 产率: 90.1%; 纯度 98%。

[0074] 称取 1.5g(0.0046mol) DBP 半抗原中间体(4-硝基邻苯二甲酸二丁酯) 装入容积为 500mL 三口圆底烧瓶底部, 随后向瓶底边搅拌边加入 234mL(2.6220mol) 苯, 待 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯被苯溶解后再加入 2.86g(0.0437mol) 纯锌粉, 搅拌均匀后分次加入 8.4mL 浓 HCl(0.1012mol), 室温搅拌 15min 后再次加入 2.86g(0.0437mol) 纯锌粉, 室温搅拌反应 11h, 薄板层析法(TLC) 监测反应直至反应完全; 反应结束后, 将 286mL 冷水加入反应体系, 并用 1M NaOH 溶液中和至弱碱性(pH 7.0-8.5); 静置 1h 后分离并保留苯层, 再用苯萃取水层, 合并萃取液, 有机相经水洗后用无水 Na₂SO₄ 脱水干燥以除去多余的水分; 有机相减压蒸馏以除去苯, 得到的粗品再用硅胶柱层析(洗脱剂为乙酸和正己烷的混合液(V/V=1:10)) 后减压蒸馏, 得到淡黄色晶体 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯即 DBP 半抗原。邻苯二甲酸二丁酯半抗原分子式: C₁₆H₂₃NO₄; 分子量 293.35; 产率 90.3%; 熔点: 68~69℃, 纯度 99%。

[0075] (2) 邻苯二甲酸二丁酯半抗原的鉴定

[0076] 将制得的半抗原经红外光谱(图2)、核磁共振光谱(图3)鉴定,结果为: IR(KBr) ν/cm^{-1} : 3451.79, 3362.77(-NH₂), 1716.12(C=O), 1290.51, 1142.57(C-O-C), 2956.59, 2871.60(-CH₃), 1458.28(d-OCH₂-), 1602.04, 1565.54, 1476.69(C=C), 1682.88, 850.77(C-H, Ar); ¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δ 7.71(d, 1H, ArH), 7.24(d, 1H, ArH), 6.96(d, 1H, ArH), 4.28(t, 2H, OCH₂), 4.24(t, 2H, OCH₂), 4.22(b, 2H, -NH₂), 1.69-1.64(m, 4H, OCH₂CH₂), 1.43-1.38(m, 4H, OCH₂CH₂CH₂), 0.93(t, 6H, OCH₂CH₂CH₂CH₃) ppm。红外、核磁表征结果表明, DBP 半抗原具有 -NH₂、-O-CH₂CH₂CH₂CH₃、苯环等基团的特征吸收峰, 证明制备的 DBP 半抗原分子中含有氨基官能团, 最终实验中成功制备了 DBP 半抗原。

[0077] 从以上分析可知,所合成的产物为目标物。

[0078] 实施例 4、邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原的合成

[0079] 邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原的合成路线图如图 1 所示:

[0080] 采用重氮化法制备 DBP 免疫原 DBP-BSA,具体合成步骤:将 0.0294g(0.1mmol) DBP 半抗原用 100 μ L DMF 溶解,然后在不断搅拌的情况下逐滴加入到装有 40 μ L 浓盐酸(0.48mmol)和 900 μ L DMF 的混合液的 25mL 锥形瓶中,待混合物加热溶解后置冰浴中冷却;此时,在 4 $^{\circ}$ C 低温搅拌的情况下,逐滴滴加 1M 亚硝酸钠溶液 400 μ L(0.4mmol),用 pH 试纸控制反应酸度为 2.0-3.0,同时用淀粉碘化钾试纸显色,显色时间为滴加后的 1-3s,试纸由白色瞬间变成灰蓝色时停止滴加,再继续反应 60min,加 0.9g(0.015mol)的尿素以去除未反应的亚硝酸钠;然后,在 4 $^{\circ}$ C 低温搅拌的情况下,将上述重氮盐逐滴加入到 0.08mM 10mL(0.0008mmol)BSA 溶液(0.01M pH 9.18 硼酸钠缓冲液溶解)中,溶液用 1M 氢氧化钠溶液调节 pH 直至逐渐呈橙红色,继续反应 18h 后,将得到的抗原粗品装入透析袋,置于 0.01M pH7.40 磷酸盐缓冲液中透析 3d,每隔 8h 换水 1 次,最后将终产物 4000r \cdot min $^{-1}$ 离线 15min,取其上清液冷冻干燥、分装并于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

[0081] 实施例 5、邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原的合成

[0082] 邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原的合成路线图如图 1 所示:

[0083] 采用重氮化法制备 DBP 免疫原 DBP-BSA,具体合成步骤:将 0.0294g(0.1mmol)DBP 半抗原用 100 μ L DMF 溶解,然后在不断搅拌的情况下逐滴加入到装有 33 μ L(0.4mmol)浓盐酸和 900 μ L DMF 的混合液的 25mL 锥形瓶中,待混合物加热溶解后置冰浴中冷却;此时,在 4 $^{\circ}$ C 低温搅拌的情况下,逐滴滴加 1M 亚硝酸钠溶液 500 μ L(0.5mmol),用 pH 试纸控制反应酸度为 2.0-3.0,同时用淀粉碘化钾试纸显色,显色时间为滴加后的 1-3s,试纸由白色瞬间变成灰蓝色时停止滴加,再继续反应 60min,加 0.96g(0.016mol)的尿素以去除未反应的亚硝酸钠;然后,在 4 $^{\circ}$ C 低温搅拌的情况下,将上述重氮盐逐滴加入到 0.08mM 6.25mL(0.0005mmol)BSA 溶液(0.01M pH 9.18 硼酸钠缓冲液溶解)中,溶液用 1M 氢氧化钠溶液调节 pH 直至逐渐呈橙红色,继续反应 12h 后,将得到的抗原粗品装入透析袋,置于 0.01M pH7.40 磷酸盐缓冲液中透析 3d,每隔 8h 换水 1 次,最后将终产物 4000r \cdot min $^{-1}$ 离线 15min,取其上清液冷冻干燥、分装并于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

[0084] 实施例 6、邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原的合成

[0085] 邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原的合成路线图如图 1 所示:

[0086] 采用重氮化法制备 DBP 免疫原 DBP-BSA,具体合成步骤:将 0.0294g(0.1mmol)DBP 半抗原用 100 μ L DMF 溶解,然后在不断搅拌的情况下逐滴加入到装有 42 μ L(0.5mmol)浓盐酸和 900 μ L DMF 的混合液的 25mL 锥形瓶中,待混合物加热溶解后置冰浴中冷却;此时,在 4 $^{\circ}$ C 低温搅拌的情况下,逐滴滴加 1M 亚硝酸钠溶液 450 μ L(0.45mmol),用 pH 试纸控制反应酸度为 2.0-3.0,同时用淀粉碘化钾试纸显色,显色时间为滴加后的 1-3s,试纸由白色瞬间变成灰蓝色时停止滴加,再继续反应 60min,加 0.93g(0.0155mol)的尿素以去除未反应的亚硝酸钠;然后,在 4 $^{\circ}$ C 低温搅拌的情况下,将上述重氮盐逐滴加入到 0.08mM 7.5mL(0.0006mmol)BSA 溶液(0.01M pH 9.18 硼酸钠缓冲液溶解)中,溶液用 1M 氢氧化钠溶液调节 pH 直至逐渐呈橙红色,继续反应 15h 后,将得到的抗原粗品装入透析袋,置于 0.01M pH7.40 磷酸盐缓冲液中透析 3d,每隔 8h 换水 1 次,最后将终产物 4000r \cdot min $^{-1}$ 离线

15min, 取其上清液冷冻干燥、分装并于 -20°C 保存。

[0087] 实施例 7、邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原的鉴定

[0088] 可进行人工免疫原鉴定的方法有色谱法、红外光谱法、紫外光谱法、SDS-PAGE 凝胶电泳等。其中最常用的方法是紫外可见光谱法。一般来说, 只要人工免疫原的紫外-可见光谱与载蛋白和半抗原的紫外光谱不同, 即可间接说明半抗原成功与蛋白质偶联, 人工免疫原合成成功。因为根据朗伯-比尔定律, 当波长一定时, 混合物的紫外吸收具有加合性。采用全波长紫外分光光度计对半抗原、载体蛋白和人工免疫原进行扫描, 根据特征吸收峰的位置确定偶联是否成功。元素分析结果进一步证明了产物的结构和所设计的路线一致。

[0089] 人工免疫原的表征:

[0090] 将制备的人工免疫原适当稀释, 使其吸光度在 $0.1 \sim 2$ 之间, 以 PBS 为空白对照, 用紫外分光光度计在 $200 \sim 500\text{nm}$ 分别测定 DBP 半抗原和 DBP-BSA 吸光值, 绘制紫外吸收光谱图, 并根据以下公式计算偶联比:

[0091]

$$\text{偶联比} = \frac{\varepsilon_{\text{conjugate}} - \varepsilon_{\text{protein}}}{\varepsilon_{\text{hapten}}} = \frac{(OD_{\text{conjugate}} - OD_{\text{protein}}) \times C_{\text{hapten}} \times M_{\text{protein}}}{OD_{\text{hapten}} \times M_{\text{hapten}} \times C_{\text{protein}}}$$

[0092] 式中: $OD_{\text{conjugate}}$ —— 偶联物吸光度; OD_{protein} —— 蛋白质吸光值; OD_{hapten} —— 半抗原吸光值; C_{hapten} —— 半抗原浓度; C_{protein} —— 蛋白质浓度; M_{hapten} —— 半抗原分子量; M_{protein} —— 蛋白质分子量。

[0093] 由图 4 的紫外光谱图可知, DBP 半抗原 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯有两个紫外吸收峰即 281nm 和 308nm , 其中 308nm 处紫外吸收峰为特征峰; BSA 有两个紫外吸收峰, 分别位于 227nm 和 278nm 处, 其中 278nm 吸收峰处的吸收值很低; DBP 人工免疫原有两个紫外吸收峰, 分别位于 228nm 和 334nm 处。此外, 我们可以清晰发现, 半抗原在 308nm 处的紫外吸收峰发生红移后转移到 334nm 处, 这说明半抗原上的氨基发生了重氮化后已经成功与 BSA 相互偶联结合; 而 BSA 紫外吸收峰有所偏移, 由 227nm 处移至 228nm 处, 这说明有一部分氨基酸与 DBP 半抗原发生了偶联反应, 从而使 DBP 半抗原、BSA 与人工免疫原的紫外吸收光谱既有区别又有联系, 综合得知: 免疫原包含了 DBP 半抗原和蛋白质 BSA 的吸收特征, 说明 DBP 半抗原已顺利偶联到载体蛋白表面, 人工免疫原的合成制备成功。计算 DBP-BSA 中 DBP 与 BSA 的结合比为 $30.0:1$ 。

[0094] 实施例 8、邻苯二甲酸二丁酯免疫原蛋白质浓度的测定

[0095] 根据考马斯亮蓝 G250 法测定免疫原蛋白质浓度。考马斯亮蓝 G250 在游离时为红色, 与蛋白质结合后为青蓝色, 前者最大吸收值在 465nm , 后者在 595nm 处。以 BSA 为标准物质配置不同浓度标准溶液, 与一定量考马斯亮蓝 G250 反应后, 分别在 595nm 处测定溶液吸光度值。标准溶液在 $0-150 \mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。在稀释一定倍数的免疫原溶液中加入考马斯亮蓝染色, 在相同波长处测量吸光度值, 后与标准曲线比较, 得制备的免疫原蛋白质浓度为 3.46mg/mL 。这些 DBP 人工免疫原既可以用于免疫动物, 通过动物产生的免疫反应得到可以用来做免疫分析的单克隆或多克隆抗体, 又可以作为免疫竞争对象而使用。

[0096] 实施例 9、动物免疫实验验证

[0097] 为证实 DBP 半抗原偶联合成的人工免疫原具有免疫原性, 故通过生物体免疫反应制备抗 DBP 多克隆抗体, 具体如下: 选择 2 只成年健康雄性新西兰白兔, 合成出的人工免疫

原经过与弗氏完全佐剂充分混合后,对大白兔进行颈部和背部点状注射免疫,经过 7 次加强免疫后,采用间接酶联免疫分析法测定抗血清效价,其抗血清效价均已达到 180000,具体效价变化见图 5。试验显示交叉反应均不明显,说明其特异性较好。

[0098] 实施例 6、间接竞争 BA-ELISA 免疫分析方法检测环境样品中邻苯二甲酸二丁酯

[0099] 间接竞争 BA-ELISA 免疫分析方法检测环境样品中邻苯二甲酸二丁酯具体步骤如下:用包被缓冲液(0.05M pH 9.60 碳酸盐缓冲液)适当稀释人工包被原溶液,100 μ L/孔,加入 96 孔酶标板中,4 $^{\circ}$ C 包被过夜;次日倒掉包被液,每孔加入 200 μ L 洗涤液(0.01M pH 7.40PBST),重复洗涤三次,每次 3min;用吸水纸拍干酶标板后,每孔加入封闭液 200 μ L,37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时;倒掉封闭液,重复上述洗涤过程三次,生物素化抗 DBP 多克隆抗体(Bio-pAb-DBP)稀释至适当浓度,每孔依次加入 50 μ L 生物素化抗体及 50 μ L DBP 标准样品(用含 5%二甲亚砜(DMSO)的 PBS(v/v)梯度稀释),空白孔每孔加入 100 μ L PBS 缓冲液,37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟;倒掉抗原-抗体反应液,重复洗涤三次,用 PBST 适当稀释辣根过氧化酶(HRP)标记的链霉亲和素(HRP-SA),每孔加入 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时;倒掉 HRP-SA 溶液,重复洗涤五次,每孔加入新鲜配制的显色液(400 μ L 2.5mg/mL 3,3',5,5'-四甲基联苯胺底物溶液与 10mL 磷酸盐-柠檬酸底物缓冲液、10 μ L 30%的 H₂O₂混合形成显色液)100 μ L/孔,室温下避光反应 15min;每孔加入 50 μ L 终止液(2mol/L 硫酸溶液)以终止显色,然后用酶标仪测定各孔在 450nm 和 630nm 处吸光度值(OD 值),以 OD = OD₄₅₀-OD₆₃₀作为最终读数。实验结果用抑制率来表示,并以抑制率为纵坐标,标准样品浓度的对数值为横坐标绘制标准曲线,建立的标准工作曲线如图 6 所示。其中,抑制率(%) = (1-A/A₀) \times 100,其中 A 为有样品存在的孔的 OD 值,A₀为没有样品存在的孔的 OD 值。

[0100] 生物素化抗体的制备如下:用 0.05M pH 9.60 碳酸盐缓冲液将纯化后的抗 DBP 多克隆抗体稀释至 1.0mg/mL 左右,取 2mL 加入锥形瓶中;用 DMSO 配制 1.0mg/mL 生物素-N-琥珀酰亚胺基酯(BNHS)溶液,向上述锥形瓶中加入 BNHS 溶液,使 BNHS:抗 DBP 多克隆抗体的质量比为 1:10,室温下搅拌反应 4 小时;反应结束后将反应液装入透析袋中,用 PBS 缓冲液透析 3d,每天换水 3 次。离心分离去除少量沉淀后,即得相应的生物素化抗体溶液(Bio-pAb-DBP),抗体溶液小体积分装后,于 -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存。

[0101] 间接竞争 BA-ELISA 免疫分析方法检测邻苯二甲酸二丁酯的标准曲线方程为 $Y = 21.39\lg C_{DBP} + 59.52$,相关系数 $R^2 = 0.9815$,其中 IC₅₀表示检测方法的灵敏度,即抑制率为 50%时对应的分析物浓度 0.361 μ g/L;IC₁₀表示方法的检测下限,即抑制率为 10%时对应的分析物浓度 0.0053 μ g/L;IC₂₀-IC₈₀表示线性范围,即 0.015 μ g/L ~ 8.965 μ g/L。与传统仪器分析方法相比,灵敏度提高了 100-500 倍。

[0102] 以上对本发明的具体实施例进行了描述。需要理解的是,本发明并不局限于上述特定实施方式,本领域技术人员可以在权利要求的范围内做出各种变形或修改,这并不影响本发明的实质内容。

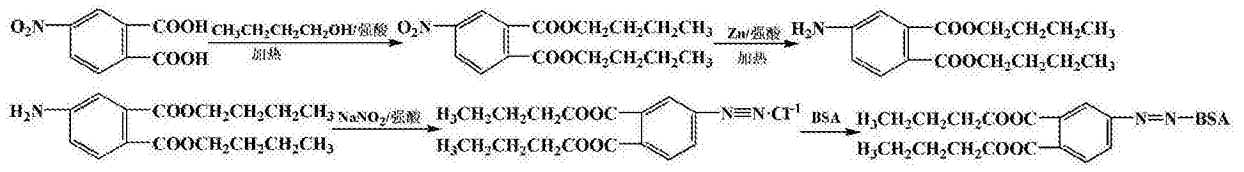


图 1

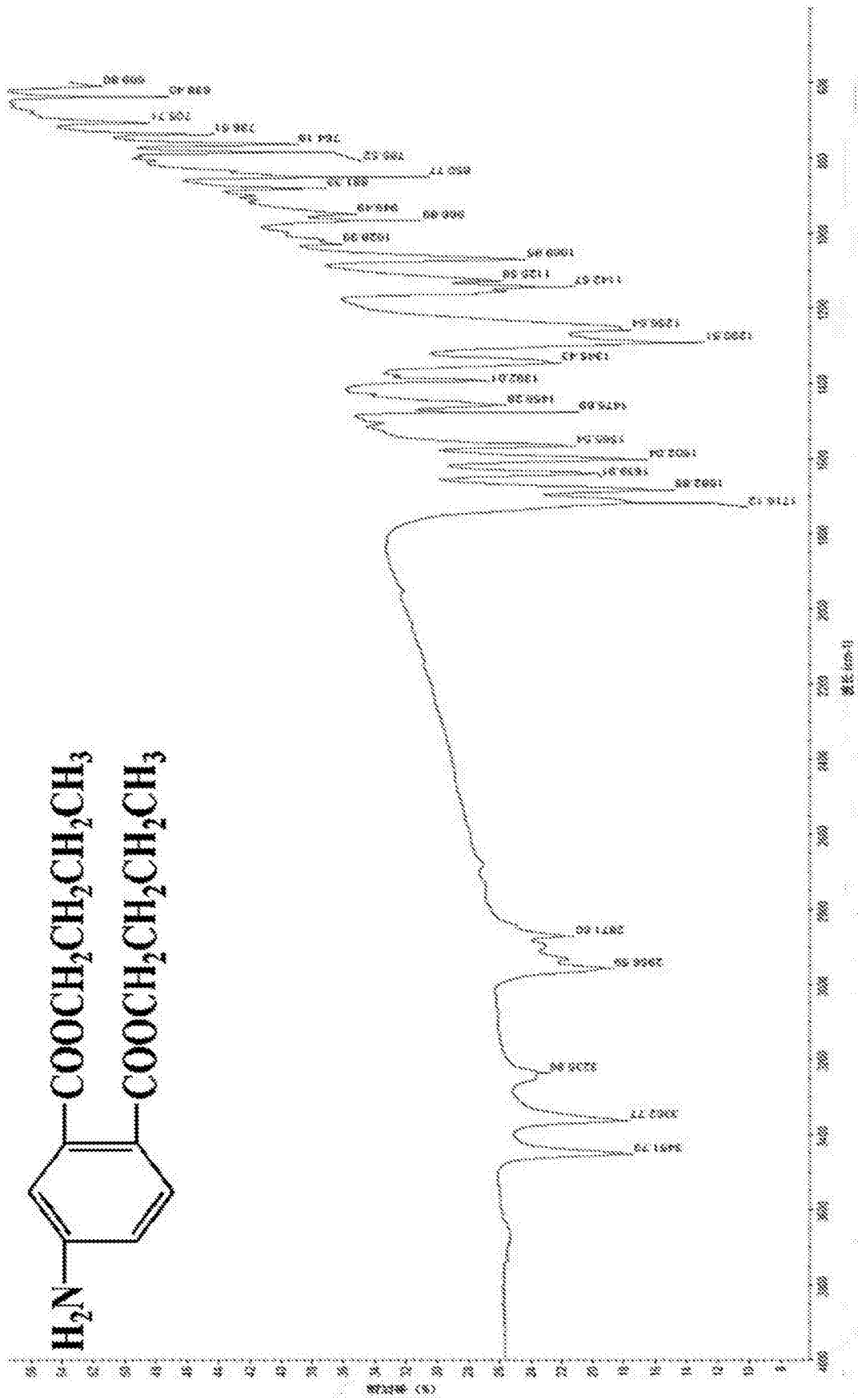


图 2

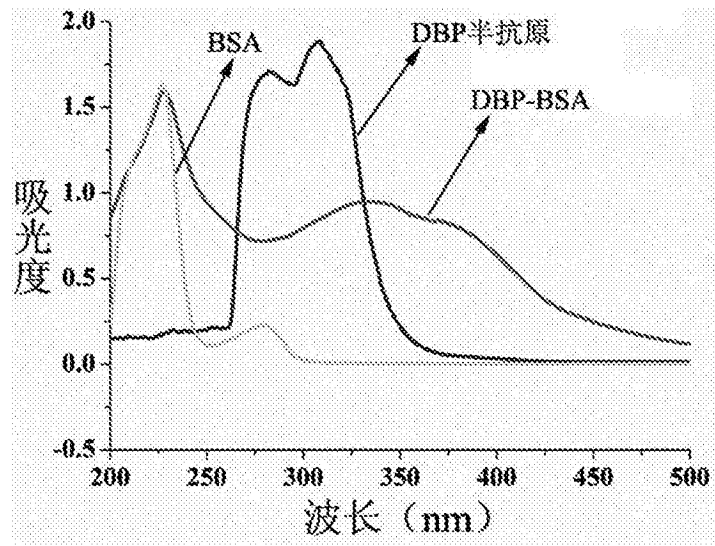


图 4

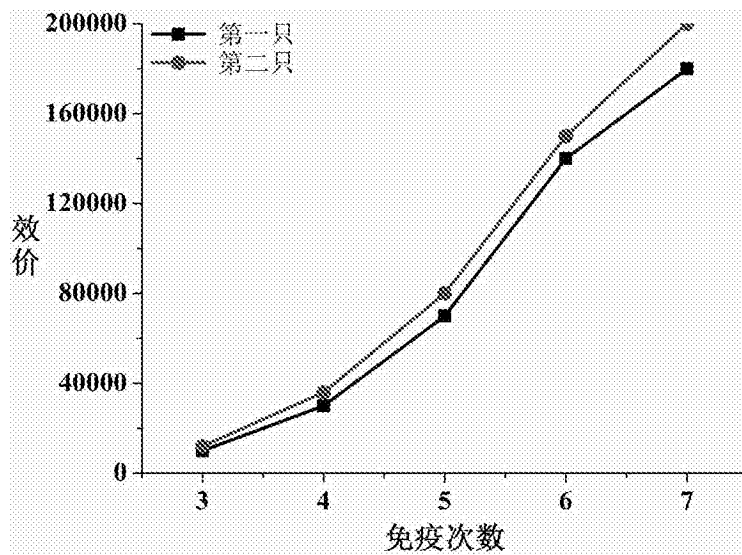


图 5

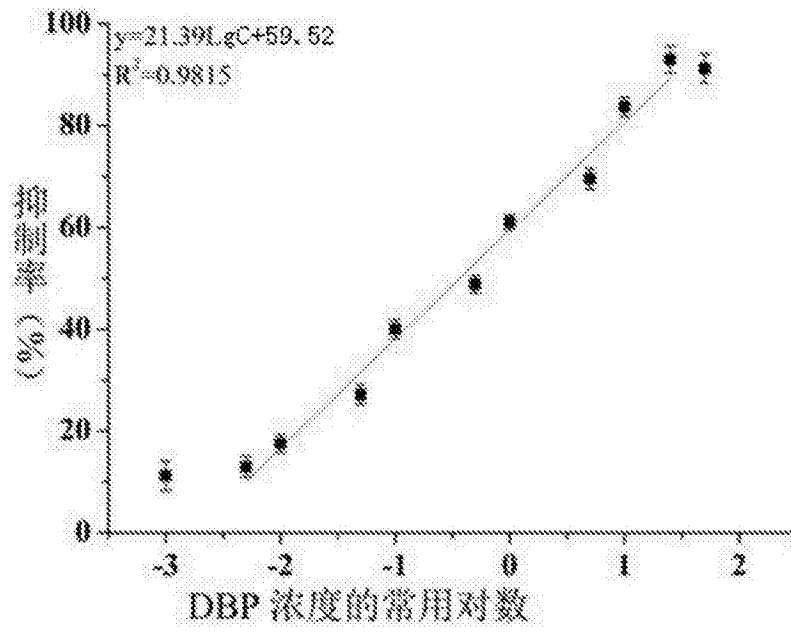


图 6

专利名称(译)	邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原DBP-BSA制备及用途		
公开(公告)号	CN105085662A	公开(公告)日	2015-11-25
申请号	CN201510514925.2	申请日	2015-08-20
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	庄惠生 孙瑞艳		
发明人	庄惠生 孙瑞艳		
IPC分类号	C07K14/765 C07K1/10 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/765 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原DBP-BSA制备及用途，所述DBP-BSA的结构式为：其制备方法为通过将DBP半抗原与蛋白质分子BSA偶联制备获得。本发明免疫原制备方法简单，稳定性好，成本低，易于工业化生产。邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原DBP-BSA通过免疫动物后制备成特异性抗体，为建立亲和素-生物素化酶联免疫吸附分析方法奠定基础。

