



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108752463 A

(43)申请公布日 2018.11.06

(21)申请号 201810529182.X

(22)申请日 2018.05.29

(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 马振

(74)专利代理机构 上海伯瑞杰知识产权代理有

限公司 31227

代理人 胡永宏

(51)Int.Cl.

C07K 14/765(2006.01)

C07K 1/107(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

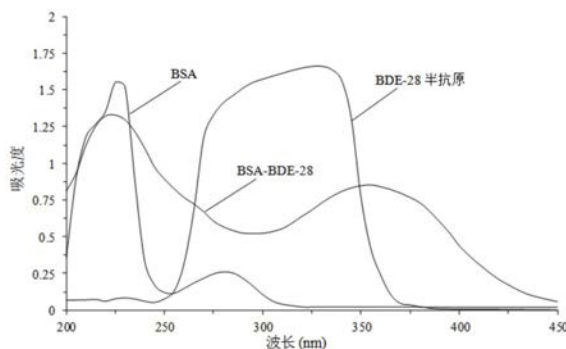
权利要求书2页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

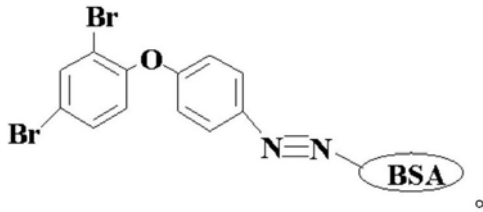
一种2,4,4'-三溴联苯醚免疫原的制备方法及其用途

(57)摘要

本发明公开了一种2,4,4'-三溴联苯醚免疫原的制备方法及其用途,以2,4-二溴苯酚与对氟硝基苯为原料进行亲电取代反应,合成4-硝基-2',4'-二溴联苯醚,然后通过加氢还原反应制备含氨基活性基团的2,4,4'-三溴联苯醚半抗原,再用重氮化法将2,4,4'-三溴联苯醚半抗原与牛血清蛋白偶联,制备2,4,4'-三溴联苯醚免疫原;本发明中2,4,4'-三溴联苯醚免疫原制备方法快速,简单,可用于制备2,4,4'-三溴联苯醚人工多克隆抗体,对2,4,4'-三溴联苯醚相关免疫分析方法的建立具有重要作用。

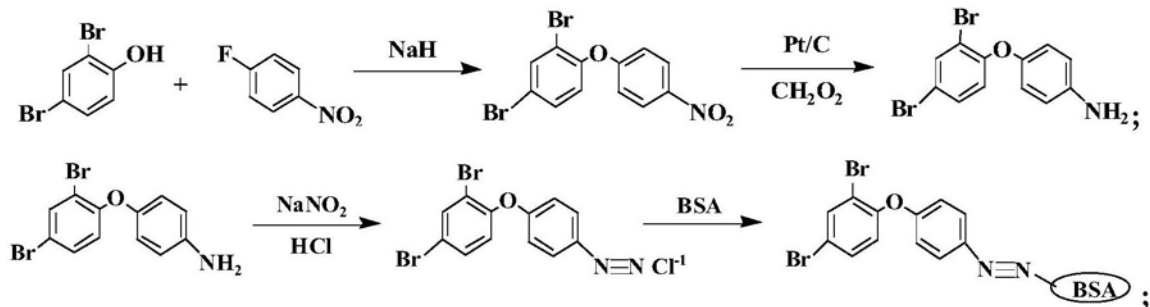


1. 一种2,4,4'-三溴联苯醚免疫原, 结构式如式(I)所示,



(I)

2. 如权利要求1所述2,4,4'-三溴联苯醚免疫原的制备方法, 其特征在于, 合成路线如式(II)所示,



(II)

包括以下步骤:

(1) 用2,4-二溴苯酚和对氟硝基苯进行亲电取代反应, 得4-硝基-2',4'-二溴联苯醚;

(2) 以甲酸为还原剂、铂金碳为催化剂, 通过加氢还原反应将步骤(1)中4-硝基-2',4'-二溴联苯醚苯环上的硝基还原为氨基, 得2,4,4'-三溴联苯醚半抗原;

(3) 以BSA为载体蛋白, 经重氮化法将步骤(2)中2,4,4'-三溴联苯醚半抗原与BSA偶联, 得2,4,4'-三溴联苯醚免疫原。

3. 如权利要求2所述2,4,4'-三溴联苯醚免疫原的制备方法, 其特征在于, 所述制备方法过程为:

(1-1) 将1.04g 2,4-二溴苯酚溶于8mL干燥的N,N-二甲基甲酰胺中, 冰浴中降温至0℃, 分次加入0.199g氢化钠, 冰浴中搅拌20min后室温下放置10min, 缓慢加入0.583g对氟硝基苯, 90℃下搅拌反应2h; 再向上述反应混合液中加入10mL超纯水, 轻微震荡数次后用25mLCH₂Cl₂萃取三次, 再合并有机萃取液, 经无水MgSO₄干燥、旋蒸浓缩和硅胶层析柱分离净化, 得橘黄色油状产物4-硝基-2',4'-二溴联苯醚;

(2-1) 取0.485g步骤(1-1)中橘黄色油状产物溶解于8mL正丁胺, 依次加入0.770g铂金碳催化剂、0.4mL甲酸, 90℃下搅拌反应2h; 待反应液冷却后加入2mLCH₂Cl₂, 反应混合物经过滤、无水MgSO₄干燥和硅胶层析柱分离净化, 得黄色固体产物4-氨基-2',4'-二溴联苯醚;

(3-1) 取0.0343g步骤(2-1)中黄色固体产物, 在搅拌下加入1.5mL超纯水, 缓缓加入0.05mL浓盐酸, 加热搅拌反应20min后置于冰浴中冷却, 再向反应液中加入1mol/L的亚硝酸钠溶液, 同时用淀粉碘化钾试纸显色, 试纸由白色变为灰蓝色时停止滴加, 4℃下搅拌反应1h; 然后加入2.0g尿素, 4℃、5000rpm离心15min, 取上清液逐滴加入到10mL经0.01M、pH9.18硼酸钠缓冲液溶解得到的0.08mMBSA溶液直到混合物变成橙色, 4℃继续反应2h, 4℃下用

0.01M、pH7.40PBS缓冲液透析3d,即得。

4.如权利要求3所述2,4,4'-三溴联苯醚免疫原的制备方法,其特征在于,步骤(1-1)中,所述硅胶层析柱中的淋洗液为正己烷:乙醚=2:3(v/v)。

5.如权利要求3所述2,4,4'-三溴联苯醚免疫原的制备方法,其特征在于,步骤(1-1)中,所述橘黄色油状产物4-硝基-2',4'-二溴联苯醚的分子式为 $C_{12}H_6O_3NBr_3$,产率为66.1%。

6.如权利要求3所述2,4,4'-三溴联苯醚免疫原的制备方法,其特征在于,步骤(2-1)中,所述硅胶层析柱的淋洗液为正己烷:乙酸乙酯=2:3(v/v)。

7.如权利要求3所述2,4,4'-三溴联苯醚免疫原的制备方法,其特征在于,步骤(2-1)中,所述黄色固体产物4-氨基-2',4'-二溴联苯醚的分子式为 $C_{12}H_8ONBr_3$,产率为61.7%。

8.如权利要求3所述2,4,4'-三溴联苯醚免疫原的制备方法,其特征在于,步骤(2-1)中,所述铂金碳催化剂的碳负载量为5%。

9.如权利要求1所述2,4,4'-三溴联苯醚免疫原在制备2,4,4'-三溴联苯醚人工多克隆抗体的应用。

10.如权利要求1所述2,4,4'-三溴联苯醚免疫原作为痕量2,4,4'-三溴联苯醚免疫分析检测的用途。

一种2,4,4'-三溴联苯醚免疫原的制备方法及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物化学领域,具体涉及一种2,4,4'-三溴联苯醚免疫原的制备方法及其用途。

背景技术

[0002] 2,4,4'-三溴联苯醚(BDE-28)是环境介质中分布最广、对生物体毒性最强的PBDEs同系物之一,与BDE-47、BDE-209等市面上几种商用多溴联苯醚不同,BDE-28作为低溴取代联苯醚,没有商业化产品,BDE-28具有疏水性、持久性和生物富集性,已有研究证明BDE-28容易对动物肝脏、肾脏、甲状腺的内分泌以及神经系统的发育造成危害,会诱导有机体产生突变,即使微量BDE-28进入环境介质也会通过呼吸作用或皮肤接触进入生物体内,并通过生物放大作用使生物体受到毒害;在复杂的环境介质中高溴取代联苯醚在高温、强紫外光照或微生物降解的条件下可生成低溴代联苯醚产物,高溴取代联苯醚的分解转化成为环境介质中BDE-28的关键来源。目前,常用的检测PBDEs方法有高分辨气相色谱质谱法、高效液相色谱法等,环境中BDE-28的含量极低且同系物较多,需要高灵敏度的分析检测设备、特异性的分离方法以及良好的净化技术以满足分析需求。

[0003] 气相色谱法是目前最常用的PBDEs分析检测方法,也是大多数国家检测PBDEs所采用的标准检测方法,具有较高的可靠性,但其耗时长且成本高,耗时长来自于样品复杂的前处理过程,高成本是因为仪器昂贵。免疫分析方法是一种基于抗原抗体间的特异性结合来检测各种物质的技术,具有特异性强、灵敏度高、分析容量大,成本低,操作简便,能够实现快速检测等优点,被广泛应用在生物、医学、环境、食品等领域。酶联免疫分析方法(ELISA)由于其灵敏度高、特异性强、在现场筛选和大量样本的快速检测已成为环境介质中残留污染物检测方法研究、相关产品开发使用的热点,如Feng等以BDE-121为研究对象,设计合成了BDE-121免疫原及多克隆抗体,建立了检测BDE-121的间接竞争ELISA免疫分析方法,检测限为0.644ng/mL。

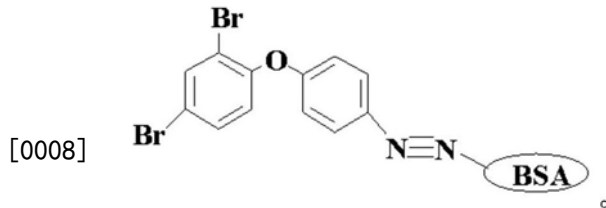
[0004] 目前,国内外有关于多溴联苯醚污染物免疫分析方法的报道较少,而且多数研究集中在检出率较高的四溴联苯醚BDE-47,而关于三溴联苯醚BDE-28免疫分析方法的研究非常少,BDE-28免疫原是建立免疫分析方法测定BDE-28的基础,BDE-28免疫原的制备具有重要的应用价值和理论价值。

发明内容

[0005] 本发明的发明人在前期研究的基础上发现,先以2,4-二溴苯酚与对氟硝基苯为原料,进行亲电取代反应,再通过加氢还原反应,得含氨基活性基团的BDE-28半抗原(BDE-28-NH₂),然后用重氮化法将BDE-28半抗原与牛血清蛋白(BSA)偶联得BDE-28免疫原(BSA-BDE-28);本发明的目的在于提供一种2,4,4'-三溴联苯醚免疫原的制备方法,用于制备BDE-28人工多克隆抗体和建立痕量2,4,4'-三溴联苯醚的免疫分析检测方法。

[0006] 本发明的上述目的通过以下技术方案实现:

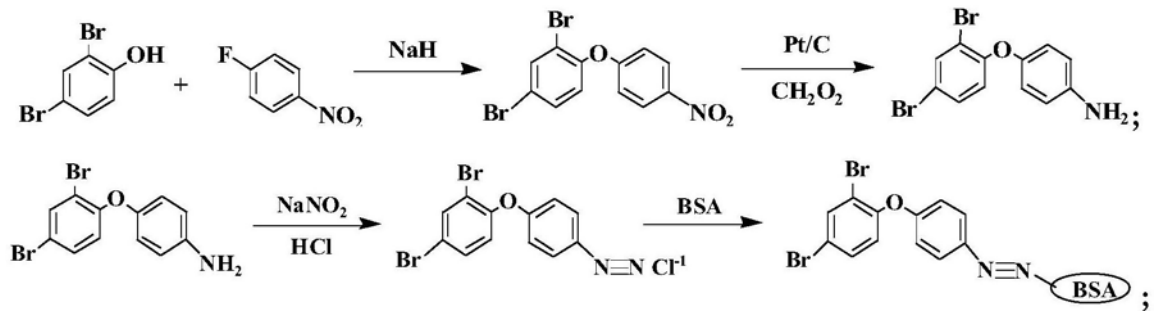
[0007] 一种2,4,4'-三溴联苯醚免疫原,结构式如式(I)所示,



(I)

[0009] 本发明的第二方面,上述2,4,4'-三溴联苯醚免疫原的制备方法,合成路线如式(II)所示,

[0010]



(II)

[0011] 具体地,包括以下步骤:

[0012] (1) 用2,4-二溴苯酚和对氟硝基苯进行亲电取代反应,得4-硝基-2',4'-二溴联苯醚;

[0013] (2) 以甲酸为还原剂、铂金碳为催化剂,通过加氢还原反应,将步骤(1)中4-硝基-2',4'-二溴联苯醚苯环上的硝基还原为氨基,得BDE-28半抗原;

[0014] (3) 以BSA为载体蛋白,经重氮化法将步骤(2)中BDE-28半抗原与BSA偶联,得BDE-28免疫原。

[0015] 优选地,上述2,4,4'-三溴联苯醚免疫原的制备方法,具体过程为:

[0016] (1-1) 将1.04g 2,4-二溴苯酚溶于8mL干燥的N,N-二甲基甲酰胺中,冰浴中降温至0℃,分批次加入0.199g氢化钠,冰浴中搅拌20min后室温下放置10min,缓慢加入0.583g对氟硝基苯,90℃下搅拌反应2h;再向上述反应混合液中加入10mL超纯水,轻微震荡数次后用25mLCH₂Cl₂萃取三次,再合并有机萃取液,经无水MgSO₄干燥、旋蒸浓缩和硅胶层析柱分离净化,得橘黄色油状产物;

[0017] (2-1) 取0.485g步骤(1-1)中橘黄色油状产物溶解于8mL正丁胺,依次加入0.770g碳负载量为5%的铂金碳催化剂、0.4mL甲酸,90℃下搅拌反应2h;待反应液冷却后加入2mLCH₂Cl₂,反应混合物经过滤、无水MgSO₄干燥和硅胶层析柱分离净化,得黄色固体产物;

[0018] (3-1) 取0.0343g步骤(2-1)中黄色固体产物,在搅拌下加入1.5mL超纯水,缓缓加入0.05mL浓盐酸,加热搅拌反应20min后置于冰浴中冷却,再向反应液中加入亚硝酸钠溶液,同时用淀粉碘化钾试纸显色,试纸由白色变为灰蓝色时停止滴加,4℃下搅拌反应1h;然后加入2.0g尿素,4℃、5000rpm离心15min,取上清液逐滴加入到10mL、0.08mMBSA溶液直到

混合物变成橙色,4℃继续反应2h,反应溶液装入透析袋中,4℃下用0.01M、pH7.40PBS缓冲液透析3d,-20℃下保存,即得。

[0019] 优选地,步骤(1-1)中所述硅胶层析柱中的淋洗液为正己烷:乙醚=2:3(v/v)。

[0020] 优选地,步骤(1-1)中所述橘黄色油状产物为4-硝基-2',4'-二溴联苯醚,分子式为 $C_{12}H_6O_3NBr_3$,产率为66.1%。

[0021] 优选地,步骤(2-1)中所述硅胶层析柱的淋洗液为正己烷:乙酸乙酯=2:3(v/v)。

[0022] 优选地,步骤(2-1)中所述黄色固体产物为4-氨基-2',4'-二溴联苯醚,分子式为 $C_{12}H_8ONBr_3$,产率为61.7%。

[0023] 本发明的第三方面,上述2,4,4'-三溴联苯醚免疫原在制备2,4,4'-三溴联苯醚人工多克隆抗体的应用,及作为痕量2,4,4'-三溴联苯醚免疫分析检测的用途。

[0024] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:

[0025] 本发明先用2,4-二溴苯酚中苯环上的羟基与4-氟硝基苯中苯环上的氟原子进行亲电取代反应,再通过加氢还原反应得含氨基活性基团的BDE-28半抗原,然后用重氮化法将BDE-28半抗原与牛血清蛋白偶联得BDE-28免疫原,合成方法简单、快速,产率高,用于制备BDE-28人工多克隆抗体,及建立免疫分析方法检测环境介质中痕量2,4,4'-三溴联苯醚。

附图说明

[0026] 图1为BDE-28半抗原的红外光谱图;

[0027] 图2为BDE-28半抗原的核磁共振氢谱图;

[0028] 图3为BDE-28半抗原、载体蛋白(BSA)和偶联物的紫外光谱图;

[0029] 图4为考马斯亮蓝法测定BSA浓度的标准曲线;

[0030] 图5为抗BDE-28抗体效价的变化。

具体实施方式

[0031] 下面结合附图详细说明本发明的技术方案,但本发明的保护范围不限于下述的实施例,以下实施例中的实验方法如无特殊说明均为常规方法,试剂与材料无特殊说明均市售可得。

[0032] 实施例1BDE-28免疫原的制备

[0033] 第一步、取1.04g2,4-二溴苯酚(4.13mmol)溶于8mL干燥的DMF中,冰浴中降温至0℃;分批次加入0.199g氢化钠(8.28mmol),冰浴中搅拌20min后,反应混合液室温下放置10min;然后缓慢加入0.583g对氟硝基苯(4.13mmol),90℃加热搅拌反应2h;向反应混合液中加入10mL超纯水(ddH₂O),轻微震荡数次后,用CH₂Cl₂萃取(25mL×3),合并有机萃取液,用无水MgSO₄干燥并旋蒸浓缩后,经过硅胶层析柱分离净化(淋洗液:正己烷:乙醚=2:3(v/v))后,得橘黄色油状产物4-硝基-2',4'-二溴联苯醚(1.018g)。

[0034] 第二步、取0.485g上述4-硝基-2',4'-二溴联苯醚(1.30mmol)溶解于8mL正丁胺,依次加入0.770g铂金碳催化剂(5%碳负载量)及0.4mL甲酸(10.4mmol),混合溶液90℃下,搅拌反应2h;待反应液冷却后,加入2mLCH₂Cl₂,反应混合物经过滤、无水MgSO₄干燥后,再经过硅胶层析柱分离净化(淋洗液:正己烷:乙酸乙酯=2:3(v/v)),得黄色固体产物4-氨基-2',4'-二溴联苯醚(0.275g)。

[0035] 第三步、取0.0343g上述4-氨基-2',4'-二溴联苯醚(0.1mmol),在搅拌下加入1.5mL超纯水,然后缓缓加入0.05mL浓盐酸,加热搅拌反应20min后置于冰浴中冷却;向反应液中加入亚硝酸钠溶液(1mol/L),用淀粉碘化钾试纸显色,试纸由白色变为灰蓝色时停止滴加;4℃下搅拌反应1h后加入2.0g尿素,去除多余的亚硝酸钠,低温高速离心(15min,5000rpm和4℃)后,取上清液逐滴加入到10mL、0.08mMBSA溶液(0.01MpH9.18硼酸钠缓冲液溶解)直到混合物变成橙色,4℃继续反应2h,反应溶液装入透析袋中,在4℃下用0.01M、pH7.40PBS缓冲液透析3d,得BDE-28免疫原,小量分装于-20℃下保存。

[0036] 参见附图1-3,利用红外吸收光谱、核磁共振氢谱和紫外可见分光光度计对BDE-28半抗原、BDE-28免疫原进行表征鉴定。其中:

[0037] BDE-28半抗原的红外图谱如图1所示,IR(KBr) ν/cm^{-1} : 3429.16 (-NH₂伸缩), 3023.75 (C-H,Ar弯曲), 1592.37、1460.87 (C=C苯环骨架振动)(两个苯环), 1264.33 (C-H,Ar弯曲), 1223.59 (C-O-C), 716.92 (C-H,Ar弯曲), 597.15 (C-Br伸缩), BDE-28半抗原有明显的-NH₂基团特征峰。

[0038] BDE-28半抗原的核磁共振氢谱图如附图2所示,¹HNMR(δ , CDCl₃): 3.96 (br, 2H), 6.85 (d, 2H), 6.91 (d, 2H), 7.11 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 证明实施例1中成功制得BDE-28半抗原。

[0039] BDE-28半抗原、BSA和偶联物BSA-BDE-28的紫外吸收光谱如附图3所示,通过比较BSA-BDE-28、BDE-28半抗原以及载体蛋白紫外吸收光谱之间的区别和联系,判定是否成功制得BDE-28免疫原。可以看出在331nm处观察到BDE-28半抗原的特征吸收峰,BSA的特征吸收峰出现在227nm和279nm,BDE-28半抗原、偶联物及载体蛋白的特征峰之间存在显著的关系和差异,在紫外吸收光谱中偶联物包含BSA的特征峰,在356nm处观察到BSA-BDE-28的特征峰,证明实施例1成功制得BDE-28免疫原。

[0040] 参见附图4,采用考马斯亮蓝G250染色法测定免疫原中蛋白质的浓度,从BSA标准溶液的吸光度OD值随BSA标准溶液浓度变化的标准曲线可以得出,标准曲线方程: $y = 0.519x + 0.0327$,相关系数 $R^2 = 0.9964$;根据BDE-28半抗原和蛋白质在其最大吸收峰处的吸光度值,计算偶联物的偶联比,结果如表1所示。

[0041] 表1:人工抗原蛋白质含量

	名称	蛋白质浓度 (mg/mL)	偶联比
[0042]	BSA-BDE-28	7.56	21.9: 1

[0043] 实施例2BDE-28多克隆抗体的制备

[0044] 利用实施例1制得的免疫原BSA-BDE-28免疫健康新西兰大白兔制备BDE-28多克隆抗体。兔子初次免疫时,采用弗氏完全佐剂(CFA)与免疫原等比例的混合(蛋白质浓度为1mg/mL),随后加强免疫时均采用弗氏不完全佐剂(IFA)与免疫原等比例混合(蛋白质浓度为1mg/mL),大白兔的具体免疫方案如表2所示,采用间接竞争ELISA方法测定抗血清效价,BDE-28抗体效价的变化如附图5所示,抗血清效价的变化是纯种雄性新西兰大白兔体内再次免疫应答的过程,1号、2号兔子均以BSA-BDE-28作为免疫原,随着免疫次数的增加,1号兔子的抗血清效价升高略快,而2号兔子的抗血清效价增加稍慢,在第7次免疫后两种兔子的抗血清效价基本不变,1号兔子的抗血清效价达1:126000,2号兔子的抗血清效价达1:

96000,利用两只兔子制得的多克隆抗体均能满足免疫实验要求。

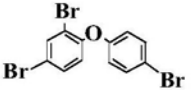

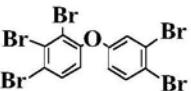
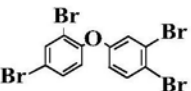
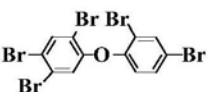
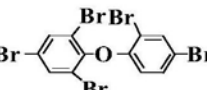
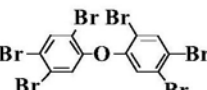
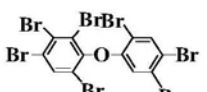
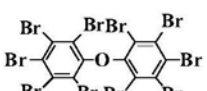
[0045] 表2:动物免疫方案

免疫次数	免疫部位	免疫剂量	免疫物质
1	颈背部皮下注射	0.2mL×5处	免疫原: CFA (1:1)
2	颈背部皮下注射	0.2mL×5处	免疫原: IFA (1:1)
3	腿部肌肉注射	0.5mL×2处	免疫原: IFA (1:1)
[0046] 4	颈背部皮下注射	0.2mL×5处	免疫原: IFA (1:1)
5	腿部肌肉注射	0.5mL×2处	免疫原: IFA (1:1)
6	颈背部皮下注射	0.2mL×5处	免疫原: IFA (1:1)
7	腿部肌肉注射	0.5mL×2处	免疫原: IFA (1:1)
8	颈背部皮下注射	0.2mL×5处	免疫原: IFA (1:1)
9	颈背部皮下注射	0.2mL×5处	免疫原: IFA (1:1)

[0047] 实施例3BDE-28多克隆抗体的特异性

[0048] 分别采用2,2',4,4'-四溴联苯醚 (CAS:5436-43-1)、2,3',4,4'-四溴联苯醚 (CAS:189084-61-5)、2,3,3',4,4'-五溴二苯醚 (CAS:373594-78-6)、2,2',4,4',5-五溴联苯醚 (CAS:60348-60-9)、2,2',4,4',6-五溴联苯醚 (CAS:189084-64-8)、2,2',4,4',5,5'-六溴联苯醚 (CAS:67774-32-7)、2,2',3,4,4',5',6-七溴联苯醚 (CAS:68928-80-3)、十溴联苯醚 (CAS:1163-19-5) 作为BDE-28的结构类似物,用间接竞争ELISA来测定BDE-28多克隆抗体的特异性,计算pAb-BDE-28与BDE-28类似物的交叉反应 (CR) 来评价pAb-BDE-28的特异性,其中,BDE-28类似物的化学结构和交叉反应率结果如表3所示。可以得出,pAb-BDE-28与BDE-28结构类似的化合物之间的交叉反应率均小于6.44%,pAb-BDE-28具有较高的特异性,用于环境介质中痕量BDE-28的免疫分析检测。

[0049] 表3:BDE-28抗体与BDE-28结构类似物的交叉反应率

Analogues	Structure	IC ₅₀ (ng/mL)	Cross-reactivity (%)
BDE-28		0.62	100
BDE-47		10.49	5.91
BDE-105		96.56	0.64
BDE-66		9.62	6.44
[0050] BDE-99		41.99	1.48
BDE-100		32.97	1.88
BDE-153		113.27	0.55
BDE-183		501.65	0.12
BDE-209		>2070	<0.03

[0051] 以上所述为本发明的较佳实施例而已,但本发明不应该局限于该实施例所公开的内容。所以凡是不脱离本发明所公开的精神下完成的等效或修改,都落入本发明保护的范围内。

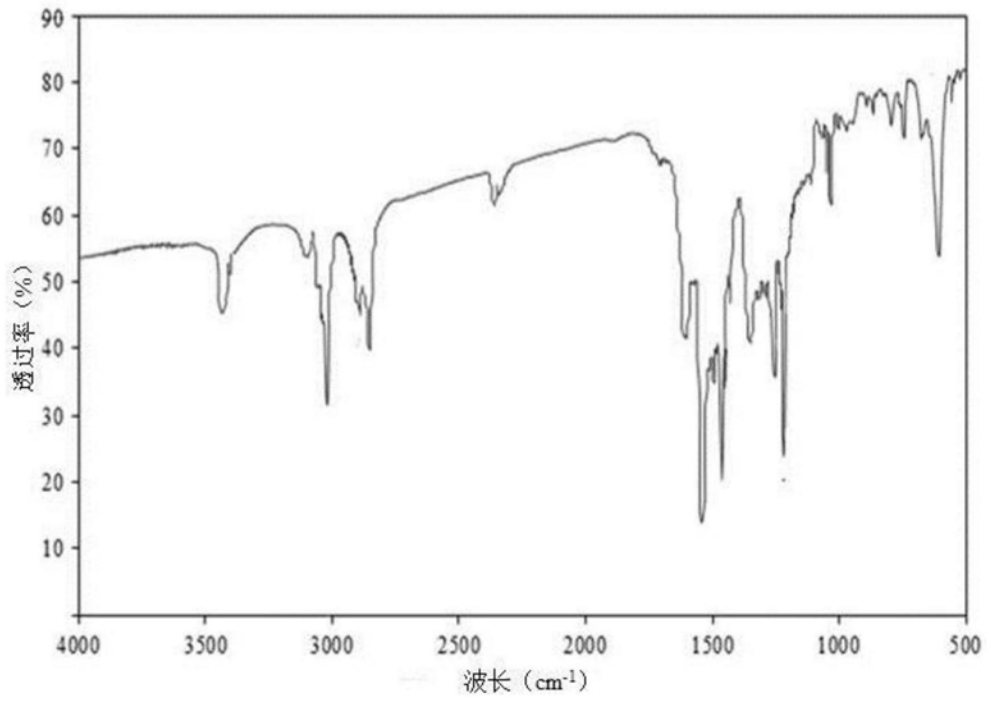


图1

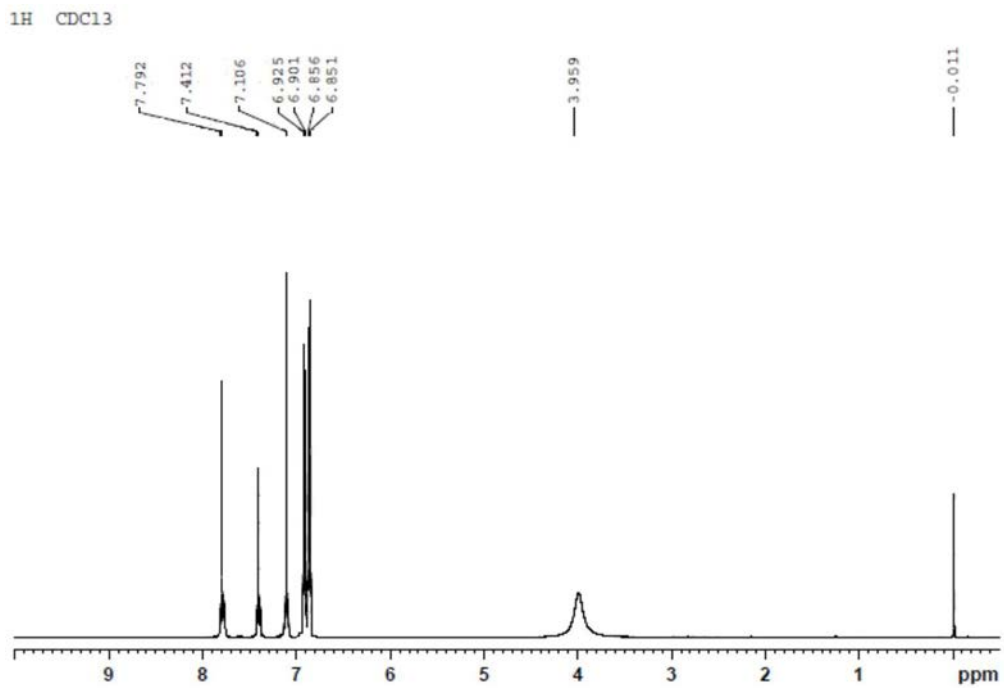


图2

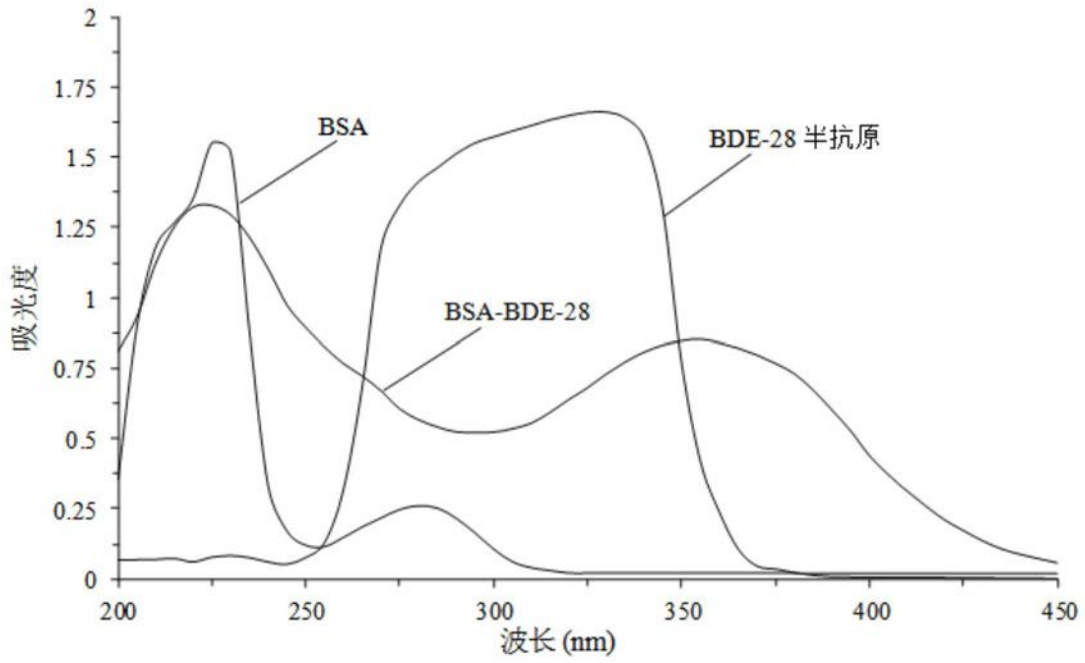


图3

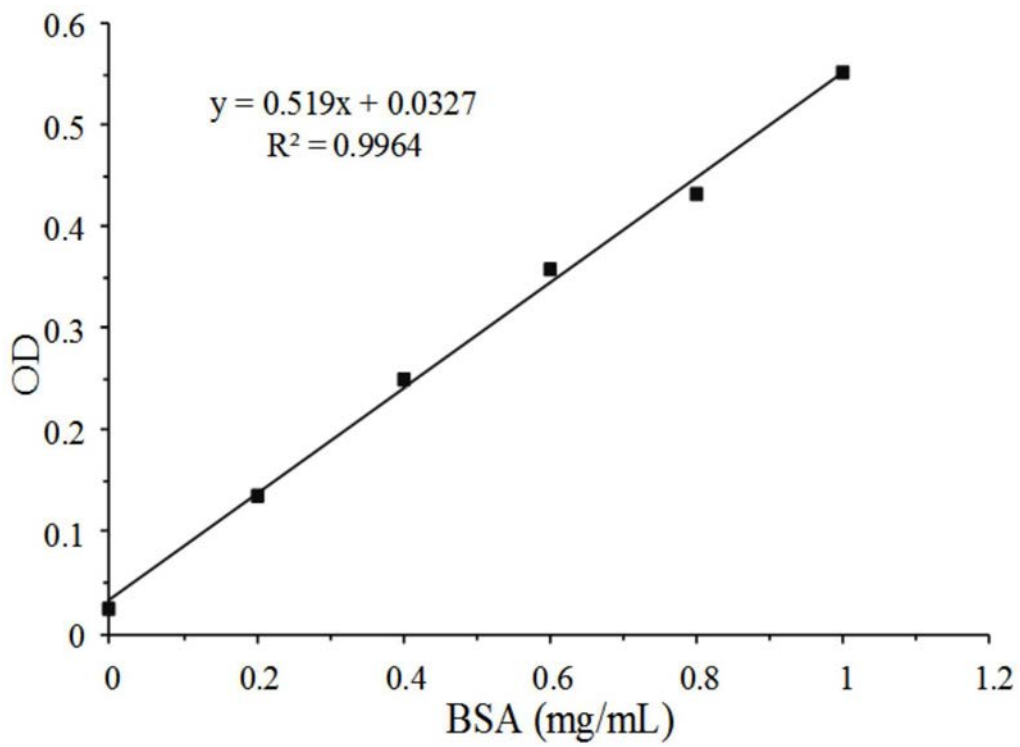


图4

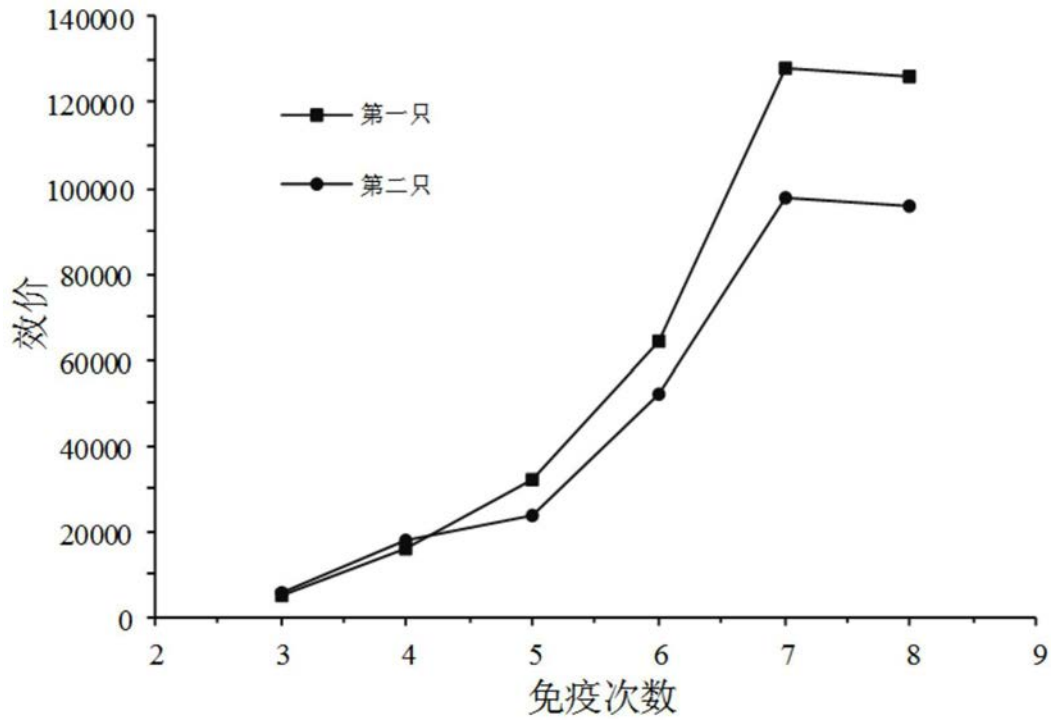


图5

专利名称(译)	一种2,4,4'-三溴联苯醚免疫原的制备方法及其用途		
公开(公告)号	CN108752463A	公开(公告)日	2018-11-06
申请号	CN201810529182.X	申请日	2018-05-29
[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 马振		
发明人	庄惠生 马振		
IPC分类号	C07K14/765 C07K1/107 C07K16/44 G01N33/531		
CPC分类号	C07K14/765 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/531 G01N33/68		
代理人(译)	胡永宏		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种2,4,4'-三溴联苯醚免疫原的制备方法及其用途，以2,4-二溴苯酚与对氟硝基苯为原料进行亲电取代反应，合成4-硝基-2',4'-二溴联苯醚，然后通过加氢还原反应制备含氨基活性基团的2,4,4'-三溴联苯醚半抗原，再用重氮化法将2,4,4'-三溴联苯醚半抗原与牛血清蛋白偶联，制备2,4,4'-三溴联苯醚免疫原；本发明中2,4,4'-三溴联苯醚免疫原制备方法快速，简单，可用于制备2,4,4'-三溴联苯醚人工多克隆抗体，对2,4,4'-三溴联苯醚相关免疫分析方法的建立具有重要作用。

