



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102435727 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 30

(21) 申请号 201110279487. 8

(22) 申请日 2011. 09. 20

(73) 专利权人 王利兵

地址 410004 湖南省长沙市湘府中路 188 号  
湖南出入境检验检疫局检验检疫技术  
中心

专利权人 胥传来  
许宙

(72) 发明人 王利兵 胥传来 许宙

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所  
32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101117325 A, 2008. 02. 06, 全文.

CN 101392067 A, 2009. 03. 25, 全文.

张志刚, 王东军, 王月辉等. 螺旋聚合物的研究进展(综述). 《河北科技师范学院学报》. 2009, 第 23 卷(第 2 期), 50-55.

EIJI YASHIMA, KATSUHIRO MAEDA, YOSHIO FURUSHO. Single- and Double-Stranded Helical Polymers: Synthesis, Structures,

and Functions. 《ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH》. 2008, 第 41 卷(第 9 期), 1166-1180.

Eiji Yashima \* & # 8224

, Katsuhiko Maeda, Hiroki Iida, et al.. Helical Polymers: Synthesis, Structures, and Functions. 《Chemical Reviews》. 2009, 第 119 卷(第 11 期), 6102-6211.

Erik Schwartz, Matthieu Koepf, Heather J. Kitto, et al.. Helical poly(isocyanides): past, present and future. 《Polymer Chemistry》. 2010, 33-47.

杨利国. 功能性螺旋聚合物的合成与性质研究. 《中国博士学位论文全文数据库(工程科技 I 辑)》. 2010, 1-39.

尹秀丽. 用于功能手性分子识别的传感器研究. 《中国博士学位论文全文数据库(信息科技辑)》. 2007, 1-17.

审查员 赵晓明

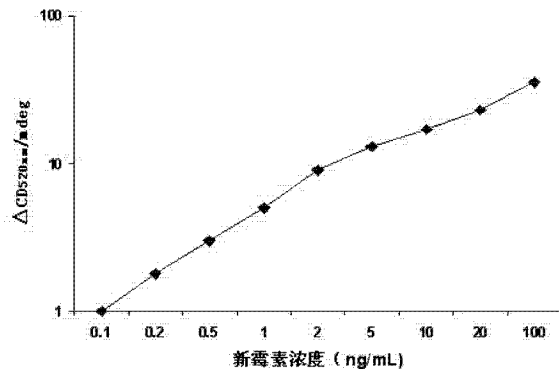
权利要求书 2 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种测定新霉素的螺旋免疫组装传感器的构建方法

(57) 摘要

一种测定新霉素的螺旋免疫组装传感器的构建方法,属于材料化学技术领域。本发明包括:水溶性螺旋聚合物的制备,半抗原修饰螺旋聚合物,抗体偶联金纳米粒子,新霉素传感器的建立。本发明提供一种水溶性螺旋聚合物聚 4- 异氰基苯甲酸,通过免疫识别(新霉素半抗原修饰螺旋聚合物)与金纳米粒子(偶联抗体)组装,通过组装后产生的圆二色谱(CD)信号对新霉素进行检测。



CN 102435727 B

1. 一种测定新霉素的螺旋免疫组装传感器的构建方法,其特征在于包括:水溶性螺旋聚合物的制备,半抗原修饰螺旋聚合物,金纳米粒子偶联抗体,新霉素传感器的建立;具体步骤为:

(1) 水溶性螺旋聚合物聚 4- 异氰基苯甲酸的制备

a、4- 氨基苯甲酸甲酯的制备

b、4- 甲酸氨苯甲酸甲酯的制备

c、4- 异氰基苯甲酸甲酯的制备

d、4- 异氰基苯甲酸钠的制备

e、聚 4- 异氰基苯甲酸钠的制备

f、聚 4- 异氰基苯甲酸的制备

(2) 半抗原修饰螺旋聚合物

1  $\mu$  L 碳化二亚胺 EDC 和 2.4mg N- 羟基琥珀酰亚胺 sulfo-NHS 加入到 0.5mL 100 mg/mL 的步骤(1)合成的聚 4- 异氰基苯甲酸水溶液中,反应 10-15 min 活化,活化后的聚 4- 异氰基苯甲酸加入 1mg 新霉素,室温反应 4h,透析除去未反应的药物小分子;得聚 4- 异氰基苯甲酸-新霉素复合物,即为半抗原修饰螺旋聚合物;

(3) 金纳米粒子偶联抗体

10mL 20nM 8nm 金纳米粒子溶液,加入 200  $\mu$  L 100  $\mu$  g/mL 新霉素抗体,0.1M  $K_2CO_3$  调节 pH 值为 8.0,反应 1h;得金纳米粒子偶联抗体;

(4) 新霉素传感器的建立

1mL 20nM 步骤(3)合成的金纳米粒子偶联抗体加 10  $\mu$  L 100mg/mL 步骤(2)合成的半抗原修饰螺旋聚合物,加入 0.1-100ng/mL 新霉素标准品,反应 1h 后,取组装好的体系 100  $\mu$  L 于比色皿中,用水做空白对照,圆二色谱仪扫描波长 200-800nm CD 值。

2. 根据权利要求 1 所述的测定新霉素的螺旋免疫组装传感器的构建方法,其特征在于:(1) 水溶性螺旋聚合物聚 4- 异氰基苯甲酸的制备:

a、4- 氨基苯甲酸甲酯的制备

2.6g 4- 溴苯甲酸甲酯,113mg 三丁基膦,321g 双(二亚苄基丙酮)钼和 3.75g 双-(三甲基硅基)胺锂,放入 50mL 锥形瓶中,氩气保护,加入 26mL 无水甲苯,橡胶塞密封锥形瓶,室温下搅拌混合物,薄层色谱监控反应物,反应两天后,粗产物加入 100mL 乙醚稀释,同时加入少量盐酸,再加入 300mL 乙醚搅拌,4- 氨基苯甲酸甲酯沉淀用乙醚洗涤,空气中干燥后,再加入 100mL 2M NaOH 溶液,并将混合物用 100mL  $CH_2Cl_2$  萃取,再向其中加入 100mL 饱和  $NH_4Cl$  溶液稀释,将有机层用  $MgSO_4$  除水,再蒸干;粗产物用硅胶色谱纯化,正己烷:乙酸乙酯体积比 1:4 的混合溶剂作洗脱液,最终得 4- 氨基苯甲酸甲酯;

b、4- 甲酸氨苯甲酸甲酯的制备

氮气保护条件下将 1.02g 4- 氨基苯甲酸甲酯溶于 3.4mL 甲酸和 8.51mL 乙酸,在 50 $^{\circ}C$  下搅拌 2h 后,反应物减压干燥;产物用乙醚和正己烷洗涤,室温下真空干燥过夜,得产物 4- 甲酸氨苯甲酸甲酯;

c、4- 异氰基苯甲酸甲酯的制备

1.07g 4- 甲酸氨苯甲酸甲酯,1mL 无水三乙胺和 3mL 无水  $CH_2Cl_2$  置入带有回流冷凝气的三口烧瓶中,温度维持在 -30 $^{\circ}C$ ,0.2mL 氯甲酸三氯甲酯溶于  $CH_2Cl_2$  加入反应物中,0 $^{\circ}C$

搅拌反应 1h, 再在 20°C 反应 0.5h, 加入 50mL 质量浓度 7.5% 碳酸氢钾水溶液, 将有机层用  $\text{MgSO}_4$  除水, 再蒸干, 粗产物用硅胶色谱纯化, 正己烷: 乙酸乙酯体积比 3:1 作洗脱液, 最终得 4- 异氰基苯甲酸甲酯;

d、4- 异氰基苯甲酸钠的制备

4- 异氰基苯甲酸甲酯棕色固体 0.654g 溶解于 1.8mL 乙醇, 再加入 8.3mL 1M NaOH 溶液, 混合物于氮气保护下 0°C 反应 1.5h, 收集沉淀, 乙醇洗涤, 室温下真空干燥过夜, 最终得 4- 异氰基苯甲酸钠;

e、聚 4- 异氰基苯甲酸钠的制备

4- 异氰基苯甲酸钠 1.00g 置于反应瓶中, 氮气保护下加入 11.8mL 超纯水、0.2mL 0.3M  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 过夜反应, 沉淀用甲醇洗涤, 真空干燥, 得聚 4- 异氰基苯甲酸钠;

f、聚 4- 异氰基苯甲酸的制备

0.9g 聚 4- 异氰基苯甲酸钠置于 1M HCl 溶液中, 得聚 4- 异氰基苯甲酸。

## 一种测定新霉素的螺旋免疫组装传感器的构建方法

### 技术领域

[0001] 一种测定新霉素的螺旋免疫组装传感器,属于材料化学技术领域。

### 背景技术

[0002] 螺旋广泛存在于自然界中,天然大分子如 DNA、蛋白质、胶原等都会呈现出神奇的螺旋结构,科学家们发现螺旋结构是这些分子能够表现出生物活性的重要因素。被这些神奇的螺旋结构所吸引,科学家们设计合成了一些螺旋聚合物。具有螺旋结构的大分子对高分子科学家有着独特的吸引力,因为合成的螺旋聚合物有着独特的性质以及广泛的用途。螺旋大分子的潜在用途包括:分子识别、手性分离、手性催化、数据存储、显示材料等。

[0003] 纳米颗粒 (nanoparticles, Nas) 一般是指尺寸至少有一维在 1-100 nm 间的粒子。纳米尺度是处在原子簇和宏观物体交界的过渡区域,处于这个区域的材料具有一些独特性质,如小尺寸效应、表面、界面效应和量子尺寸效应等。空气中纳米颗粒虽然浓度很低,但具有很高的颗粒物数目。将宏观物体细分成纳米颗粒后,它的光学、热学、电学、磁学、力学以及化学性质和大体积固体相比将会显著不同。纳米材料的小尺寸、化学成分、表面结构、溶解性、外形和聚集情况决定着它们特殊的物理化学性质,这些性质使得纳米材料在将来有着广泛的用途。

[0004] 随着纳米科技的发展,纳米粒子组装体系的研究变得日益活跃。纳米粒子的二维和三维有序组装结构也因其重要的物理和化学性质近年来受到人们的广泛重视,它们在许多领域如:传感器、催化剂、磁化材料、表面增强拉曼和光学材料等有着潜在的应用。

[0005] 金纳米材料与螺旋聚合物组装,可通过表面等离子共振介导及手性分子诱导等机理产生圆二色谱(CD)信号。但通过这种组装系统结合免疫识别原理用于构建小分子检测传感器尚属空白。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种水溶性螺旋聚合物,通过免疫识别与金纳米粒子组装,通过组装后产生的圆二色谱(CD)信号对新霉素进行检测。

[0007] 本发明的技术方案:一种测定新霉素的螺旋免疫组装传感器的构建方法,包括:水溶性螺旋聚合物的制备,半抗原修饰螺旋聚合物,金纳米粒子偶联抗体,新霉素传感器的建立;具体步骤为:

[0008] (1) 水溶性螺旋聚合物的制备

[0009] a、4-氨基苯甲酸甲酯的制备

[0010] 2.6g 4-溴苯甲酸甲酯,113mg 三丁基磷,321g 双(二亚苄基丙酮)钼和 3.75g 双-(三甲基硅基)胺锂,放入 50mL 锥形瓶中,氩气保护,加入 26mL 无水甲苯。橡胶塞密封锥形瓶,室温下搅拌混合物,薄层色谱监控反应物。反应两天后,粗产物加入 100mL 乙醚稀释,同时加入少量盐酸,再加入 300mL 乙醚搅拌。4-氨基苯甲酸甲酯沉淀用乙醚洗涤,空气中干燥后,再加入 100mL 2M NaOH 溶液,并将混合物用 100mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  萃取。再向其中加入

100mL 饱和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  溶液稀释。将有机层用  $\text{MgSO}_4$  除水,再蒸干。粗产物用硅胶色谱纯化,正己烷:乙酸乙酯(1:4 v/v)洗脱液,最终得 4-氨基苯甲酸甲酯。

[0011] b、4-甲酸氨苯甲酸甲酯的制备

[0012] 氮气保护条件下将 1.02g 4-氨基苯甲酸甲酯溶于 3.4mL 甲酸和 8.51mL 乙酸。在  $50^\circ\text{C}$  下搅拌 2h 后,反应物减压干燥。产物用乙醚和正己烷洗涤,室温下真空干燥过夜,得产物 4-甲酸氨苯甲酸甲酯。

[0013] c、4-异氰基苯甲酸甲酯的制备

[0014] 1.07g 4-甲酸氨苯甲酸甲酯,1mL 无水三乙胺和 3mL 无水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  置入带有回流冷凝气的三口烧瓶中,温度维持在  $-30^\circ\text{C}$ 。0.2mL 氯甲酸三氯甲酯溶于  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  加入反应物中, $0^\circ\text{C}$  搅拌反应 1h,再在  $20^\circ\text{C}$  反应 0.5h,加入 50mL 质量浓度 7.5% 碳酸氢钾水溶液。将有机层用  $\text{MgSO}_4$  除水,再蒸干。粗产物用硅胶色谱纯化,正己烷:乙酸乙酯(3:1v/v)洗脱液,最终得 4-异氰基苯甲酸甲酯。

[0015] d、4-异氰基苯甲酸钠的制备

[0016] 4-异氰基苯甲酸甲酯棕色固体 0.654g 溶解于 1.8mL 乙醇,再加入 8.3mL 1M NaOH 溶液,混合物于氮气保护下  $0^\circ\text{C}$  反应 1.5h。收集沉淀,乙醇洗涤,室温下真空干燥过夜。最终得 4-异氰基苯甲酸钠。

[0017] e、聚 4-异氰基苯甲酸钠的制备

[0018] 4-异氰基苯甲酸钠 1.00g 置于反应瓶中,氮气保护下加入 11.8mL 超纯水、0.2mL 0.3M  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,过夜反应,沉淀用甲醇洗涤,真空干燥,得聚 4-异氰基苯甲酸钠。

[0019] f、聚 4-异氰基苯甲酸的制备

[0020] 0.9g 聚 4-异氰基苯甲酸钠置于 1M HCl 溶液中,得聚 4-异氰基苯甲酸,即为水溶性螺旋聚合物。

[0021] (2) 半抗原修饰螺旋聚合物

[0022]  $1\ \mu\text{L}$  碳化二亚胺(EDC)和 2.4mg N-羟基琥珀酰亚胺(sulfo-NHS)加入到 0.5mL 100 mg/mL 的步骤(1)合成的聚 4-异氰基苯甲酸水溶液中,反应 10-15 min 左右活化。活化后的聚 4-异氰基苯甲酸加入 1mg 新霉素,室温反应 4h,透析除去未反应的药物小分子。得聚 4-异氰基苯甲酸-新霉素复合物,即为半抗原修饰螺旋聚合物;

[0023] (3) 金纳米粒子偶联抗体

[0024] 10mL 20nM 8nm 金纳米粒子溶液,加入  $200\ \mu\text{L}$  100  $\mu\text{g/mL}$  新霉素抗体,0.1M  $\text{K}_2\text{CO}_3$  调节 pH 值为 8.0,反应 1h;得金纳米粒子偶联抗体;

[0025] (4) 新霉素传感器的建立

[0026] 1mL 20nM 步骤(3)合成的金纳米粒子偶联抗体加  $10\ \mu\text{L}$  100mg/mL 步骤(2)合成的半抗原修饰螺旋聚合物,加入 0.1-100ng/mL 新霉素标准品,反应 1h 后,取组装好的体系  $100\ \mu\text{L}$  于比色皿中,用水做空白对照,圆二色谱仪扫描波长 200-800nm CD 值。

[0027] 所述 8nm 金纳米粒子的合成:用单宁酸和柠檬酸三钠还原氯金酸合成;8nm 金纳米粒子的合成方案为:洁净的三口烧瓶中加入 69mL 超纯水,0.9mL 质量浓度 1% 氯金酸溶液作为 A 液;取一洁净的小瓶子,加入 3.8mL 质量浓度 1% 柠檬酸三钠溶液,0.1mL 质量浓度 1% 单宁酸溶液,0.2mL 25mM 碳酸钾溶液和 17.8mL 超纯水作为 B 液;A、B 液均加热到  $60^\circ\text{C}$ ,然后在高速搅拌下把 B 液迅速加入 A 液中,反应液在  $60^\circ\text{C}$  下继续搅拌 30min 形成深红色溶液,然

后将溶液加热回流 2min 形成亮红色溶液,最后冷却到室温形成柠檬酸稳定的金纳米粒子,透射电镜显示 8nm。

[0028] 本发明的有益效果:本发明提供一种水溶性螺旋聚合物聚 4- 异氰基苯甲酸,通过免疫识别(新霉素半抗原修饰螺旋聚合物)与金纳米粒子(偶联抗体)组装,通过组装后产生的圆二色谱(CD)信号对新霉素进行检测。

#### 附图说明

[0029] 图 1 新霉素标准曲线。

#### 具体实施方式

[0030] 实施例 1

[0031] (1) 水溶性螺旋聚合物的制备

[0032] a、4- 氨基苯甲酸甲酯的制备

[0033] 2.6g 4- 溴苯甲酸甲酯,113mg 三丁基磷,321g 双(二亚苄基丙酮)钼和 3.75g 双-(三甲基硅基)胺锂,放入 50mL 锥形瓶中,氩气保护,加入 26mL 无水甲苯。橡胶塞密封锥形瓶,室温下搅拌混合物,薄层色谱监控反应物。反应两天后,粗产物加入 100mL 乙醚稀释,同时加入少量盐酸,再加入 300mL 乙醚搅拌。4- 氨基苯甲酸甲酯沉淀用乙醚洗涤,空气中干燥后,再加入 100mL 2M NaOH 溶液,并将混合物用 100mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  萃取。再向其加入 100mL 饱和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  溶液稀释。将有机层用  $\text{MgSO}_4$  除水,再蒸干。粗产物用硅胶色谱纯化,正己烷:乙酸乙酯(1:4)洗脱液,最终得 4- 氨基苯甲酸甲酯。

[0034] b、4- 甲酸氨苯甲酸甲酯的制备

[0035] 氮气保护条件下将 1.02g 4- 氨基苯甲酸甲酯溶于 3.4mL 甲酸和 8.51mL 乙酸。在 50°C 下搅拌 2h 后,反应物减压干燥。产物用乙醚和正己烷洗涤,室温下真空干燥过夜,得产物 4- 甲酸氨苯甲酸甲酯。

[0036] c、4- 异氰基苯甲酸甲酯的制备

[0037] 1.07g 4- 甲酸氨苯甲酸甲酯,1mL 无水三乙胺和 3mL 无水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  置入带有回流冷凝气的三口烧瓶中,温度维持在 -30°C。0.2mL 氯甲酸三氯甲酯溶于  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  加入反应物中,0°C 搅拌反应 1h,再在 20°C 反应 0.5h,加入 50mL 7.5% 碳酸氢钾水溶液。将有机层用  $\text{MgSO}_4$  除水,再蒸干。粗产物用硅胶色谱纯化,正己烷:乙酸乙酯(3:1)洗脱液,最终得 4- 异氰基苯甲酸甲酯。

[0038] d、4- 异氰基苯甲酸钠的制备

[0039] 4- 异氰基苯甲酸甲酯棕色固体 0.654g 溶解于 1.8mL 乙醇,再加入 8.3mL 1M NaOH 溶液,混合物于氮气保护下 0°C 反应 1.5h。收集沉淀,乙醇洗涤,室温下真空干燥过夜。最终得 4- 异氰基苯甲酸钠。

[0040] e、聚 4- 异氰基苯甲酸钠的制备

[0041] 4- 异氰基苯甲酸钠 1.00g 置于反应瓶中,氮气保护下加入 11.8mL 超纯水、0.2mL 0.3M  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,过夜反应,沉淀用甲醇洗涤,真空干燥,得聚 4- 异氰基苯甲酸钠。

[0042] f、聚 4- 异氰基苯甲酸的制备

[0043] 0.9g 聚 4- 异氰基苯甲酸钠置于 1M HCl 溶液中,得聚 4- 异氰基苯甲酸。

[0044] (2) 半抗原修饰螺旋聚合物

[0045] 1  $\mu$  L EDC 和 2.4mg sulfo-NHS 加入到 0.5mL 100 mg/mL 的步骤(1)合成的聚 4-异氰基苯甲酸水溶液中,反应 10-15 min 左右活化。活化后的聚 4-异氰基苯甲酸加入 1mg 新霉素,室温反应 4h,透析除去未反应的药物小分子。

[0046] (3) 金纳米粒子偶联抗体

[0047] 10mL 20nM 8nm 金纳米粒子溶液,加入 200  $\mu$  L 100  $\mu$  g/mL 新霉素抗体(购于北京华安麦科生物技术有限公司,北京市昌平区科技园区超前路 6 号),0.1M  $K_2CO_3$  调节 pH 值为 8.0,反应 1h ;

[0048] (4) 新霉素传感器的建立

[0049] 1mL 20nM 步骤(3)合成的抗体修饰金纳米粒子加 10  $\mu$  L 100mg/mL 步骤(2)合成的半抗原修饰螺旋聚合物,加入 0.1-100ng/mL 新霉素标准品,反应 1h 后,取组装好的体系 100  $\mu$  L 于比色皿中,用水做空白对照,圆二色谱仪扫描波长 200-800nm CD 值。

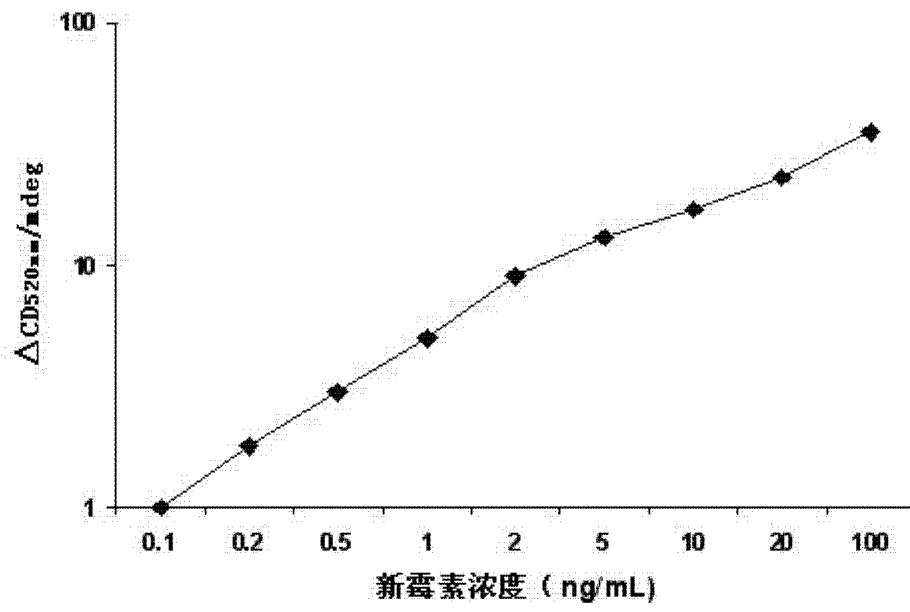


图 1

专利名称(译)	一种测定新霉素的螺旋免疫组装传感器的构建方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102435727B</a>	公开(公告)日	2013-10-30
申请号	CN201110279487.8	申请日	2011-09-20
[标]申请(专利权)人(译)	王利兵 胥传来 许宙		
申请(专利权)人(译)	王利兵 胥传来 许宙		
当前申请(专利权)人(译)	王利兵 胥传来 许宙		
[标]发明人	王利兵 胥传来 许宙		
发明人	王利兵 胥传来 许宙		
IPC分类号	G01N33/53		
审查员(译)	赵晓明		
其他公开文献	CN102435727A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种测定新霉素的螺旋免疫组装传感器的构建方法，属于材料化学技术领域。本发明包括：水溶性螺旋聚合物的制备，半抗原修饰螺旋聚合物，抗体偶联金纳米粒子，新霉素传感器的建立。本发明提供一种水溶性螺旋聚合物聚4-异氰基苯甲酸，通过免疫识别（新霉素半抗原修饰螺旋聚合物）与金纳米粒子（偶联抗体）组装，通过组装后产生的圆二色谱（CD）信号对新霉素进行检测。

