



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101153871 B

(45) 授权公告日 2011.05.11

(21) 申请号 200710134518.4

分析研究进展.《中国畜牧兽医》.2006,第33卷
(第10期),61-64.

(22) 申请日 2007.10.31

审查员 张丽颖

(73) 专利权人 江南大学

地址 214028 江苏省无锡市新区新华路94
号江南大学国家大学科技园

(72) 发明人 胥传来 谢会玲 彭池方 刘利强
胡拥明

(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)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 1/10(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1405563 A, 2003.03.26, 全文.

CN 1104216 A, 1995.06.28, 全文.

张智勇 等. beta- 内酰胺类抗生素残留免疫

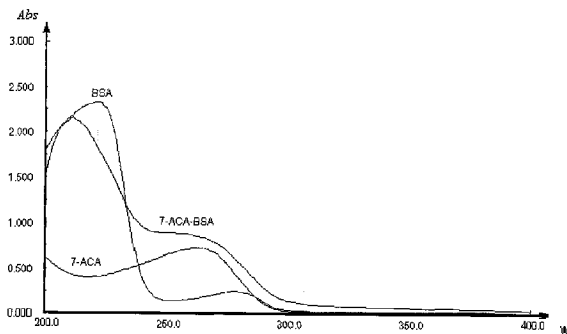
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种 β -内酰胺类药物通用人工抗原的合成方法

(57) 摘要

一种 β -内酰胺类药物通用人工抗原的合成方法,属于生物化工技术领域。本发明以7-氨基头孢烷酸为半抗原,用戊二醛法将其与载体蛋白BSA偶联,用紫外扫描仪测定偶联物的偶联比。本发明成功合成了7-氨基头孢烷酸的人工抗原,合成步骤简洁,有效,完全可用于免疫分析当中,为今后人们的研究提供了必需的人工抗原,可以满足国内对其研究的需要。



1. 一种头孢类抗生素中间体 7-氨基头孢烷酸人工抗原的合成方法,7-氨基头孢烷酸缩写为 7-ACA,其特征是以 7-ACA 为半抗原,用戊二醛法将其与载体蛋白牛血清蛋白偶联,用紫外扫描仪测定偶联物的偶联比;

(1) 人工抗原的合成:7-ACA、戊二醛、牛血清蛋白以摩尔比为 100 : 10 : 1 的比例反应,首先让戊二醛与半抗原 7-ACA 的氨基室温下反应 30min,然后加入牛血清蛋白室温下搅拌反应 3h,即得 7-氨基头孢烷酸人工抗原混合液;

透析袋前处理:取 10cm 的透析袋,于沸水中煮沸 5min,再用 60℃ 的去离子水冲洗 3min,保存在 4℃ 去离子水中备用;

将 7-氨基头孢烷酸人工抗原混合液移入透析袋中,用 2×2L 的 0.01M 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液和 2×2L 的去离子水透析 3 天,最后使用冻干法将透析袋中的液体制成粉末,即得到人工抗原:7-ACA-牛血清蛋白;

(2) 人工抗原的鉴定:7-ACA-牛血清蛋白采用紫外扫描仪测定其偶联比,分别在 262nm、278nm 处测吸光值,并计算其偶联比。

一种 β -内酰胺类药物通用人工抗原的合成方法

技术领域

[0001] 一种 β -内酰胺类药物通用人工抗原的合成方法,属于生物化工技术领域。

背景技术

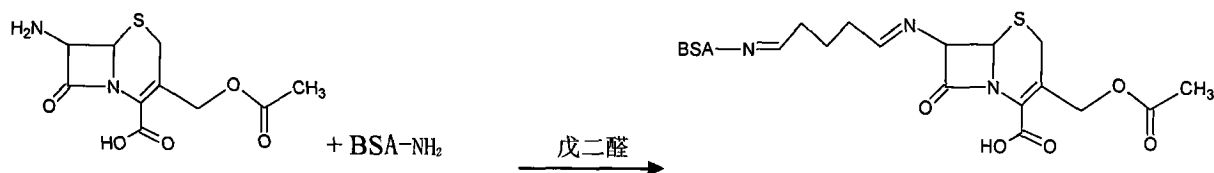
[0002] 7-氨基头孢烷酸,英文名称:7-Amino Cephalosporanic Acid(7-ACA),CAS号957-68-6,分子式为 $C_{10}H_{12}N_2O_5S$,是 β -内酰胺类中头孢类抗生素中间体。 β -内酰胺类抗生素是指化学结构中含有 β -内酰胺环的一类抗生素,主要包括青霉素类和头孢菌素类,其作用特点是能够抑制细菌黏肽转肽酶的活性,从而阻止细菌细胞壁的合成,呈现杀菌活性。在畜类动物饲养中, β -内酰胺类抗生素广泛用于控制奶牛的乳房炎,治疗动物尿道、胃肠道和呼吸道感染等。但由于其使用方法不当或不遵守休药期规定等原因,均可造成它在畜产品中的残留,给人类健康带来严重危害,如产生过敏反应、破坏胃肠道菌群平衡和增强细菌耐药性等。因此其在乳制品中的残留也越来越引起了国内外的重视。其中头孢类抗生素由于具有抗菌谱广等优点被广泛用于人畜疾病的防治。且头孢类抗生素种类繁多,现有的微生物检测法和仪器检测法很难实现对所有头孢类抗生素进行快速、准确的检测,有必要研究快速、便携的免疫检测技术——胶体金免疫技术。这就需要合成能产生簇特异性抗体的免疫原。目前为止,国内尚没有针对头孢类抗生素的胶体金免疫检测方法的报道,为了弥补这一空白,设计合成了以头孢类抗生素的中间体7-氨基头孢烷酸为半抗原的用于头孢类抗生素检测的完全抗原。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种 β -内酰胺类药物通用人工抗原的合成方法。所制备的产品用于头孢类抗生素的免疫分析方法研究。为今后人们的研究提供了必需的人工抗原。

[0004] 本发明的技术方案:一种头孢类抗生素中间体7-氨基头孢烷酸人工抗原的合成方法,7-氨基头孢烷酸缩写为7-ACA,以7-氨基头孢烷酸为半抗原,用戊二醛法将其与载体蛋白牛血清蛋白(BSA)偶联,用紫外扫描仪(UNICO,UV-2802pcs)测定偶联物的偶联比。其反应方程式为:

[0005]



[0006] (1) 人工抗原的合成:7-ACA、戊二醛、牛血清蛋白以摩尔比为100:10:1的比例反应,首先让戊二醛与半抗原7-ACA的氨基室温下反应30min,然后加入牛血清蛋白室温下搅拌反应3h,即得7-氨基头孢烷酸人工抗原混合液。因为7-ACA分子量为272,作为半抗原相对较小,采用戊二醛作为交联剂,戊二醛既是交联剂又是连接臂,省去了加入连接臂的半抗原合成步骤。

[0007] 透析袋前处理:取 10cm 的透析袋,于沸水中煮沸 5min,再用 60℃的去离子水冲洗 3min,保存在 4℃去离子水中备用。

[0008] 将人工抗原混合液移入透析袋中,用 2×2L 的 0.01M 的 PBS 溶液和 2×2L 的去离子水透析 3 天。最后使用冻干法将透析袋中的液体制成粉末,即得到人工抗原:7-ACA-牛血清蛋白。

[0009] (2) 人工抗原的鉴定:7-ACA-牛血清蛋白采用紫外扫描仪测定其偶联比,分别在 262nm、278nm 处测吸光值,并计算其偶联比。

[0010] 偶联比测定:是估算偶联物中被偶联的两种分子的比率(偶联比率)的方法,虽然测定方法种类很多,但都是依据检测偶联物中被偶联的两种分子含量(或相对含量)的原理建立起来的。分光光度法是利用物质对光的吸收与其浓度呈比例关系的原理分别测定被偶联的两种分子浓度。在大分子与小分子偶联物中,两种分子均有各自不同的紫外扫描光谱,并表现出光谱图迭加的性质。

[0011] 摩尔吸收系数 ϵ :配制 7-氨基头孢烷酸(7-ACA)浓度为 0, 10, 20, 30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的超纯水溶液,通过紫外扫描可知 7-氨基头孢烷酸的最大吸收波长为 262nm,牛血清白蛋白的最大吸收波长为 278nm,分别在 262nm、278nm 处测其吸光值,每个浓度做平行样。摩尔吸光系数计算为: $\epsilon_A = \text{吸光值} / \text{摩尔浓度}$ 。本发明计算得 $\epsilon_{A262} = 9850\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、 $\epsilon_{A278} = 6177\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

[0012] 配制浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的牛血清蛋白(BSA),通过紫外扫描可知 BSA 的最大吸收波长为 278nm,分别在 278nm、262nm 测吸光值,每个浓度做平行样。本发明计算得摩尔吸光系数分别为: $\epsilon_{B278} = 40293\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、 $\epsilon_{B262} = 24954\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

[0013] 偶联物蛋白浓度测定:配制浓度为 0, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的牛血清蛋白溶液 1.5mL,加入 5mL 考马斯亮蓝染色液,立即混匀,30℃水浴温热 5 分钟,每个浓度做平行样。在 595nm 处测吸光值,绘制牛血清蛋白浓度与吸光值的关系曲线。将抗原溶液按一定比例稀释,在 595nm 处测定抗原溶液的吸光值,从曲线上得到抗原溶液的相应的蛋白浓度。本发明计算得抗原溶液的蛋白浓度为 4.7916 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0014] 偶联比测定:将偶联产物用超纯水稀释到 150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,测 262nm、278nm 波长处的吸光值,以超纯水作空白对照,测出的吸光值为 A_1 , A_2 ,则偶联比率 C_a/C_b 为: $C_a/C_b = (A_1 \times \epsilon_{B278} - A_2 \times \epsilon_{B262}) / (A_2 \times \epsilon_{A262} - A_1 \times \epsilon_{A278})$,本发明计算得 $r \approx 16$ 。其中 ϵ 为摩尔吸光系数 ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$),65000 为牛血清蛋白的分子量,150×10⁻³ 为牛血清蛋白浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

[0015] 本发明的有益效果:本发明成功合成了 7-ACA 的人工抗原,合成步骤简洁,有效,完全可用于免疫分析当中,为以后人们的研究提供了方便的途径,可以满足国内对其研究的需要。

附图说明

[0016] 图 1 7-ACA、BSA 及其偶联物的紫外扫描组合图。

具体实施方式:

[0017] 实施例 1

[0018] (1) 人工抗原的制备

[0019] 称取 7-氨基头孢烷酸 27.2mg (0.1mmol) 溶于 8mL PBS (0.01mol/L) 溶液中,充分溶解后逐滴加入 40 μ L 25%的戊二醛 (0.01mmol),反应 30min。另称取 BSA68mg (0.001mmol) 溶于 2mL PBS (0.01mol/L) 溶液中后逐滴加入上述反应液,室温下搅拌反应 3h。即得人工抗原混合液。

[0020] 透析袋前处理:取 10cm 的透析袋,于沸水中煮沸 5min,再用 60°C 的去离子水冲洗 3min,保存在 4°C 去离子水中备用。

[0021] 将人工抗原混合液移入透析袋中,用 2 \times 2L 的 0.01M pH7.4 的 PBS 缓冲液和 2 \times 2L 的去离子水透析 3 天。最后使用冻干法将透析袋中的液体制成粉末,即得到人工抗原: 7-ACA-牛血清蛋白。

[0022] (2) 7-氨基头孢烷酸人工抗原的鉴定

[0023] 偶联比测定:估算偶联物中被偶联的两种分子的比率(偶联比率)的方法,虽然方法很多,但都是依据检测偶联物中被偶联的两种分子含量(或相对含量)的原理建立起来的。分光光度法是利用物质对光的吸收与其浓度呈比例关系的原理分别测定被偶联的两种分子浓度。在大分子与小分子偶联物中,两种分子均有各自不同的紫外扫描光谱,并表现出光谱图迭加的性质。

[0024] 摩尔吸收系数 ϵ :配制 7-氨基头孢烷酸 (7-ACA) 浓度为 0, 10, 20, 30 μ g \cdot mL⁻¹ 的超纯水溶液,通过紫外扫描可知 7-ACA 的最大吸收波长为 262nm,分别在 262nm、278nm 处测吸光值,每个浓度做平行样。摩尔吸光系数计算为: $\epsilon_A = \text{吸光值} / \text{摩尔浓度}$ 。本发明计算得 $\epsilon_{A262} = 9850 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、 $\epsilon_{A278} = 6177 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

[0025] 配制浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mg \cdot mL⁻¹ 的牛血清蛋白 (BSA),通过紫外扫描可知 BSA 的最大吸收波长为 278nm,分别在 278nm、262nm 测吸光值,每个浓度做平行样。本发明计算得摩尔吸光系数分别为: $\epsilon_{B278} = 40293 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、 $\epsilon_{B262} = 24954 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

[0026] 偶联物蛋白浓度测定:配制浓度为 0, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 200 μ g \cdot mL⁻¹ 的牛血清蛋白溶液 1.5mL,加入 5mL 考马斯亮蓝染色液,立即混匀,30°C 水浴温热 5 分钟,每个浓度做平行样。在 595nm 处测吸光值,绘制蛋白浓度与吸光值的关系曲线。将抗原溶液按一定比例稀释,在 595nm 处测定 7-ACA-牛血清蛋白抗原溶液的吸光值,从曲线上得到抗原溶液的相应的蛋白浓度。本发明计算得抗原溶液的蛋白浓度为 4.7916mg \cdot mL⁻¹。

[0027] 偶联比测定:将偶联产物 7-ACA-牛血清蛋白用超纯水稀释到 150 μ g \cdot mL⁻¹,测 262nm、278nm 波长处的吸光值,以超纯水作空白对照,测出的吸光值为 A_1 , A_2 ,则偶联比率 $r = C_a/C_b$ 为: $r = C_a/C_b = (A_1 \times \epsilon_{B278} - A_2 \times \epsilon_{B262}) / (A_2 \times \epsilon_{A262} - A_1 \times \epsilon_{A278})$,本发明计算得 $r \approx 16$ 。

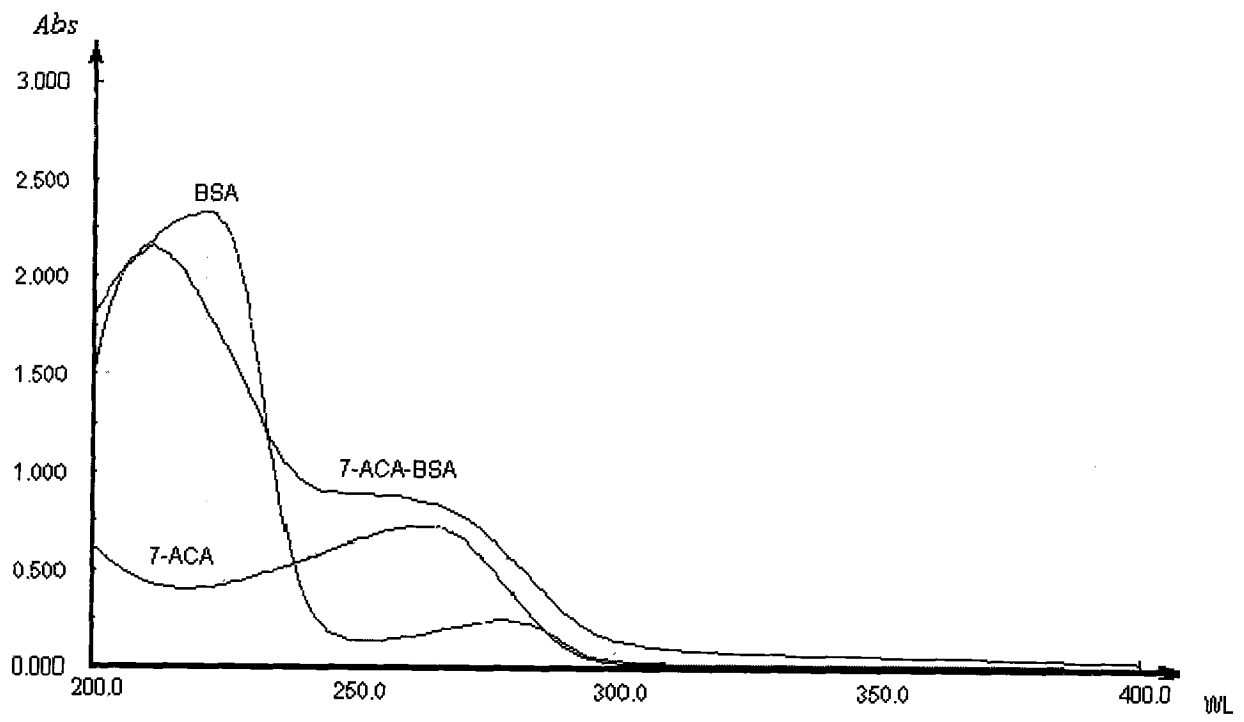


图 1

专利名称(译)	一种β-内酰胺类药物通用人工抗原的合成方法		
公开(公告)号	CN101153871B	公开(公告)日	2011-05-11
申请号	CN200710134518.4	申请日	2007-10-31
[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)	JIANGNAN UNIVERSITY		
[标]发明人	胥传来 谢会玲 彭池方 刘利强 胡拥明		
发明人	胥传来 谢会玲 彭池方 刘利强 胡拥明		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/765 C07K1/10		
审查员(译)	张丽颖		
其他公开文献	CN101153871A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种β-内酰胺类药物通用人工抗原的合成方法，属于生物化工技术领域。本发明以7-氨基头孢烷酸为半抗原，用戊二醛法将其与载体蛋白BSA偶联，用紫外扫描仪测定偶联物的偶联比。本发明成功合成了7-氨基头孢烷酸的人工抗原，合成步骤简洁，有效，完全可用于免疫分析当中，为今后人们的研究提供了必需的人工抗原，可以满足国内对其研究的需要。

