



(12) 发明专利申请

(10) 授权公告号 CN 103073633 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 01

(21) 申请号 201110325900. X

(22) 申请日 2011. 10. 25

(71) 申请人 天津科技大学

地址 300222 天津市河西区大沽南路 1038

(72) 发明人 方国臻 张燕 王俊平 王硕

吕燕颜

(51) Int. Cl.

*C07K 14/765* (2006. 01)

*C07K 16/06* (2006. 01)

*C07D 307/46* (2006. 01)

*G01N 33/535* (2006. 01)

权利要求书2页 说明书5页

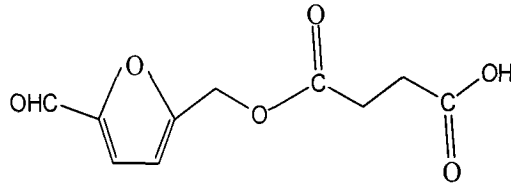
(54) 发明名称

一种抗 5-羟甲基糠醛的抗体

(57) 摘要

5-羟甲基糠醛的人工抗原和抗体的制备涉及具有 5-羟甲基糠醛基本结构的半抗原、人工抗原和抗体的制备。本发明以简便的方法制备了特异性良好的 5-羟甲基糠醛的抗体。该抗体是以 5-羟甲基糠醛与琥珀酸酐合成半抗原,然后分别与 KLH 和 HRP 连接合成人工抗原和酶标抗原。人工抗原再经动物免疫,取血,分出抗血清,纯化制的抗体。该抗体稳定,具有良好的特异性和灵敏度,且合成方法简单,可用于食品中 5-羟甲基糠醛的快速免疫检测,具有良好的应用前景。

1. 5-羟甲基糠醛的人工抗原和抗体其特征在于使用分子式为



的半抗原与牛血清白蛋白连接合成人工抗原,与辣根过氧化物酶连接合成酶标抗原,其中人工抗原再经过免疫新西兰大白兔,取血,分离出抗血清纯化制得抗体;

2. 权利要求1所述的5-羟甲基糠醛人工抗原的制备方法,其特征在于是用下述步骤制得:

(1) 半抗原的合成

将 144.9mg 5-羟甲基糠醛加入少量新制的四氢呋喃溶液中使其溶解,再依次加入 4-二甲基吡啶 140.3mg,三乙胺 0.317ml,琥珀酸酐 230mg,在 60℃油浴中搅拌反应 9 个小时,溶剂在减压条件下被除去,而残留物用体积比为 1 : 9.5 : 0.05 的甲醇 / 二氯甲烷 / 冰乙酸溶解,初级产物通过色谱柱用体积比为 1 : 9.5 : 0.05 的甲醇 / 二氯甲烷 / 冰乙酸纯化,所得到的产物经过收集,真空条件下旋转蒸发而得到相对纯净的淡黄色半抗原;

(2) 半抗原活化酯的合成

精确称取半抗原 3.42mg 溶于 200  $\mu$ l N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中,溶解后再加入 31.21mg 的 :N,N'-二环己基碳二亚胺 (DCC) 和 8.71mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS),混合后于室温避光条件下反应 24h,取反应液于 4000r/min,4℃条件下离心 10min,取上清液作为含有活化酯的溶液 1;

(3) 人工抗原的合成

载体蛋白牛血清白蛋白 (BSA) 20mg 溶于 4ml pH 值为 7.4 的 0.01mol/ml 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中,然后在冰浴条件下将含有活化酯的溶液 1 缓慢逐滴加入到 BSA 中,滴加完毕后放于 4℃冰箱内过夜,将反应液装入透析袋后,4℃下 pH = 7.4 的 0.01mol/ml 的 PBS 中透析 3 天,每天换透析液 3-4 次,透析完后,精确量取蛋白质偶联物溶液的体积,测定浓度,分装,-20℃保存;

3. 权利要求1所述的5-羟甲基糠醛酶标抗原的制备方法,其特征在于是用下述步骤制得:

取 5-羟甲基糠醛半抗原 1.03mg 溶于 200  $\mu$ l DMF 中,再加入 9.4mg DCC 和 2.62mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS),磁力搅拌避光反应 24h 合成活化酯。采用上述合成的活化酯 4℃,4000r/min 离心后取上清液作为溶液 A,冰浴条件下将溶液 A 逐滴加入含 5mg 辣根过氧化物酶 (HRP) 的浓度为 130mmol/L,pH = 8.1 的 2ml 碳酸氢钠缓冲液中,4℃反应过夜,最后将反应液置入透析袋中,再在 4℃下 pH = 7.4 的 0.01mol/ml PBS 中透析 3 天,每天换透析液 3-4 次,透析完后即可得到酶标抗原,用于显色反应;

4. 权利要求1所述的5-羟甲基糠醛抗体的制备方法,其特征在于是用下述步骤制得:

免疫动物选用雄性新西兰大白兔,免疫方法采用皮下和肌肉注射法,初免后进行四次加强免疫,加强免疫分别于初次免疫后 2 周、4 周、6 周和 8 周后免疫四次,免疫后 10 天由兔子的耳缘静脉取血,进行效价检测,具体做法是:

初次免疫:取 1mg 按照权利要求 2 所述方法合成的人工抗原溶于 0.9% 的 NaCl 溶液和

弗氏完全佐剂等体积所配制的溶液中,进行动物免疫;

加强免疫:用 1.0mg 上述人工抗原溶于 0.9%的 NaCl 溶液和弗氏不完全佐剂等体积所配制的溶液,进行动物免疫;

抗体纯化:定时监测动物抗体效价,当抗体对一定的包被抗原达到适宜效价时,采集血液,并离心获得抗血清,使用 G-Sepharose 蛋白亲和层析柱对抗血清进行纯化,获得抗 5-羟甲基糠醛的特异性抗体。

## 一种抗 5-羟甲基糠醛的抗体

### 技术领域

[0001] 本发明涉及选择一种具有 -COOH 的、又最大可能包含 5-羟甲基糠醛原有结构的化合物作为 5-羟甲基糠醛半抗原,并将半抗原制成抗原、进而产生抗体;以及此类半抗原、抗原的合成与抗体制备方法。本发明属于生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 近年来,随着生活水平的提高,油炸食品中的有害致癌物质已经引起人们的广泛关注。5-羟甲基糠醛是油炸食品中的一种普遍存在的物质。它是具有一个呋喃环结构的糠醛化合物,主要是由己糖在酸和加热条件下分解而产生的。它广泛存在于含有糖类物质的食品中,如面包、薯片、苹果汁、速溶咖啡、婴儿乳制品、蜂蜜、牛奶等。有关研究表明 5-HMF 可能会引发并促进结肠小囊异常生长 (ACF),具有一定程度的基因毒性,并且对眼、粘膜或皮肤有刺激性,食之过多会引起中毒,造成动物横纹肌麻痹和内脏损害。尽管关于 5-羟甲基糠醛的毒副作用还存在着一定争议,但是它的研究及检测对医学领域同样有着重要的参考依据。按照 GB18796-2005 中规定蜂蜜中 5-羟甲基糠醛最大含量不得超过 40ug/g,国际果汁加工联合会 (IFFJP) 建议果汁中 5-羟甲基糠醛的最大残留限量为 5~10ug/ml,浓缩果汁中最大残留限量为 25ug/ml。

[0003] 然而,由于 5-羟甲基糠醛的分子量为 126.1,小于 1000dalton(道尔顿),一般传统上采用液相色谱 (HPLC)、气相色谱 (GC) 或质谱等物化方法对其残留进行检测。虽然这些传统的理化分析方法灵敏度较高,而且较为准确,但由于它们普遍操作繁琐复杂、成本较高、分析速度慢,所以难以满足实际分析的需要,因此迫切需要发展一种简单、快速、灵敏的分析技术。

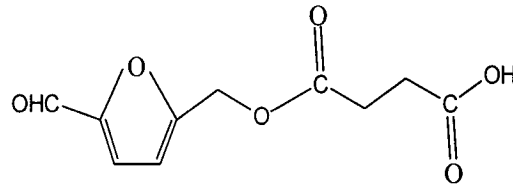
[0004] 而免疫分析技术正是一种快速、灵敏、操作简单、费用低的检测技术。其基本原理认为:抗原抗体的免疫反应涉及分子间的立体结构,电荷、氢键及范德华引力作用等诸多因素,具有极高特异性和灵敏性,遵循质量作用定律,不仅可体内进行,也可体外进行,这些特点使其能被利用建立免疫分析方法,可达到传统理化分析技术无法达到的选择性和灵敏度。所以,免疫分析为 5-羟甲基糠醛残留研究提供了一条新的分析检测途径。

### 发明内容

[0005] 本发明设计合成了小分子目标分析物半抗原,并与载体蛋白质偶联,制备有效人工抗原,免疫动物制备针对小分子分析物特异性抗体,利用抗原抗体的特异性免疫学反应和易被检测识别的标记物的放大作用,从而定性定量的检测样本中超微量小分子目标物,可用于样本测定。该技术研究的关键是半抗原的分子设计、合成和全抗原及抗体的制备。

[0006] 本发明为达到以上目的,所设计的技术方案是合成分子结构式如下图所示的 5-羟甲基糠醛半抗原,然后将半抗原与载体蛋白联接合成人工抗原,免疫动物,获得抗体。

[0007]



[0008] (1) 将 5-羟甲基糠醛加入少量新制的四氢呋喃溶液中使其溶解,再依次加入 4-二甲吡啶,三乙胺,琥珀酸酐,投料比为:1 : 1 : 2 ~ 5 : 2 ~ 5,在 60℃油浴中搅拌反应 9h。反应完毕后,在减压条件下除去溶剂得到初级半抗原产物,再经 200 ~ 300 目的硅胶柱纯化并减压蒸发溶剂后得到较纯的目标产物。

[0009] 通过配制适宜极性展开剂进行柱层析来进行纯化。其中展开剂配比为:甲醇:二氯甲烷= 1 : 8 ~ 10,再加入约 5%冰乙酸。

[0010] (2) 称取半抗原溶于适量的 N, N- 二甲基甲酰胺 (DMF) 中,溶解后再加入 DCC 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (即 NHS),投料比例为:1 : 5 ~ 10 : 2 ~ 5,混合后于室温避光条件下反应 24 ~ 48h,取反应液于 4000r/min,4℃条件下离心 10 ~ 20min,取上清液作为含有活化酯的溶液 1。

[0011] 本发明还提供了上述 5-羟甲基糠醛半抗原的用途,是用作动物免疫的抗原体系的原料。

[0012] (3) 人工抗原的合成:将载体蛋白 BSA 溶于磷酸盐缓冲液中 (溶液 2),然后在冰浴条件下将含有活化酯的溶液 1 缓慢加入到溶液 2 中。滴加完毕后 3 ~ 5℃下搅拌反应过夜,然后将反应液装入透析袋,用 0.01mol/L PBS 溶液充分透析,得到 5-羟甲基糠醛免疫原。

[0013] (4) 包被原的制备

[0014] 用 5-羟甲基糠醛活化酯与卵清白蛋白 (OVA) 连接即制成包被抗原,用于包被反应。

[0015] (5) 抗体的制备及纯化:

[0016] 免疫动物选择新西兰大白兔 2 只,月龄 3 个月,体重 1.5 公斤左右,分别编号为 1 号、2 号。免疫采取皮下和肌肉注射法共同进行。

[0017] 免疫程序:初次免疫:为提高抗原的免疫性,采用由弗氏完全佐剂乳化的免疫原,剂量为 1mg,溶于 1mL 0.9%的 NaCl,再与 1mL 的弗氏完全佐剂混合进行乳化。加强免疫:初次免疫后第 14 天和 28 天进行加强免疫,剂量为 1.0mg,溶于 1mL 0.9%的 NaCl,再与 1mL 的弗氏不完全佐剂混合进行乳化。以后每隔 14 天加强免疫一次,共免疫 6 次。从第 3 次加强免疫开始,每次免疫 10 天后对动物试采血进行血清效价测定和亲和力测定。末次免疫后采用股动脉采血法对动物采全血,经离心处理后收集全部血清,采取免疫亲和层析法进行抗体纯化,所得抗体添加 0.1% (W/V) 的叠氮钠后于 4℃储存备用。

[0018] 血清效价检测方法的步骤:

[0019] 1) 将制备好的 5-羟甲基糠醛包被原溶于 pH 9.6Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 的缓冲液中,将 5-羟甲基糠醛包被原稀释为 1.0 μg/100 μL 作为包被液,96 孔微孔板每孔各加入 100 μL,室温 (或 4℃) 放置过夜或者 37℃恒温温育 2 ~ 3 小时,用 PBST 即磷酸盐缓冲液 0.05% (V/V),Tween20 洗液洗涤三次;

[0020] 2) 每孔加入 200 μL 0.5%脱脂乳粉 /PBS 封闭液,室温封闭 1 小时,用洗液洗涤四次;

[0021] 3) 将各种稀释倍数的 5-羟甲基糠醛抗血清加入到各自的微孔中,要三孔平行加样,震荡混匀 5~10min,室温反应 1 小时;

[0022] 4) 用洗液洗微孔板 3~4 次,将孔内液体甩掉,用吸水纸扣干,向每微孔加 100 微升羊抗兔酶标二抗,室温反应 30 分钟;

[0023] 5) 用洗液洗微孔板 3~4 次,将孔内液体甩掉,用吸水纸扣干,加入底物 A 和底物 B 的混合液,该底物 A 和底物 B 的混合液的配比为 14.6 : 0.45,室温下反应 0.5 小时;

[0024] 6) 向各微孔中加入终止液以终止反应,用酶标仪读取吸光度值,根据吸光值为 1 时的血清稀释度为效价,绘制从免疫 24 天到第 120 天的 5-羟甲基糠醛抗体效价曲线。

[0025] 本发明的优点和积极效果是:

[0026] 1. 本发明最大程度地保留了 5-羟甲基糠醛的化学结构,为国内外首创的新化合物,用此半抗原制备的免疫抗原去免疫动物最大可能保留了原来 5-羟甲基糠醛的分子结构,这为获得对 5-羟甲基糠醛有高度特异性的抗体提供了保证。

[0027] 2. 在合成 5-羟甲基糠醛半抗原的基础上,合成其活化酯能大大提高半抗原与大分子蛋白的联结率。

[0028] 3. 本发明,具有特异、灵敏、准确、快速、廉价等特点,所设计、合成的半抗原为制备特异性良好的抗体奠定了基础。

[0029] 4. 经试验验证,上述半抗原,其合成方法简单,且所用主要原料如 5-羟甲基糠醛,四氢呋喃价格低廉、容易获得,在一般化学试剂公司均可购得。

[0030] 5. 本发明经试验验证上述半抗原,其合成方法简便,合成效率高,反应步骤少,提高了反应的可控性;另外,合成产物的提取、纯化方法简便,易于推广普及。

### 具体实施方式

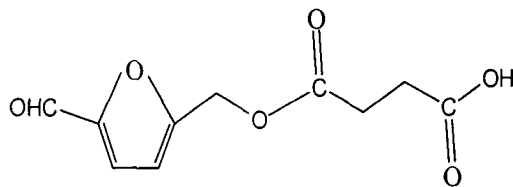
[0031] 下述实施例是说明性的,不是限定性的,不能以下述实施例来限定本发明的保护范围。

[0032] 实施例 1:

[0033] 1. 半抗原的合成

[0034] 本发明的半抗原分子量为 226,分子结构式为:

[0035]



[0036] 具体制备方法是:将 144.9mg(1.15mmol)5-羟甲基糠醛加入少量新制的四氢呋喃溶液中使其溶解,再依次加入 4-二甲基吡啶 140.3mg(1.15mmol),三乙胺(2.3mmol)0.317ml,琥珀酸酐(2.3mmol)230mg,在 60℃油浴中搅拌反应过夜(约 9 个小时)。溶剂在减压条件下被除去,而残留物用甲醇/二氯甲烷/冰乙酸(1:9.5:0.05V/V)溶解。初级产物通过色谱柱用甲醇/二氯甲烷/冰乙酸(1:9.5:0.05V/V/V)纯化。所得到的产物经过收集,真空条件下旋转蒸发而得到相对纯净的淡黄色半抗原。

[0037] 装柱采用 10g,200~300 目硅胶,并在办半抗原产物中加入 1.0g 同样规格硅胶后

旋蒸至干,以进行干法加样。目标产物分子量为 226,经质谱图分析,有该物质单体加钠峰及其二倍体加钠峰,证明已合成该物质。

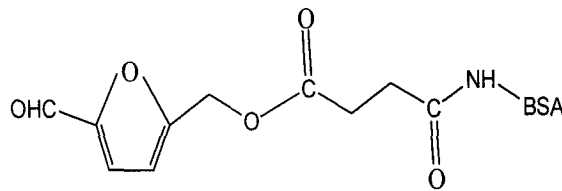
#### [0038] 2. 半抗原活化酯的合成

[0039] 具体制备方法是:精确称取半抗原 3.42mg 溶于 200  $\mu$ l N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中,溶解后再加入 31.21mg 的 DCC 和 8.71mg NHS,混合后于室温避光条件下反应 24h,取反应液于 4000r/min,4 $^{\circ}$ C 条件下离心 10min,取上清液作为含有活化酯的溶液 1。

#### [0040] 3、人工抗原的合成

[0041] 采用半抗原活化酯通过活化酯法连接到牛血清白蛋白 (BSA) 上,合成人工抗原,其分子结构式为:

[0042]



[0043] 具体制备方法是:载体蛋白 BSA 20mg 溶于 4ml pH 值为 7.4 的 0.01mol/ml 的 PBS 中 (溶液 2),然后在冰浴条件下将活化酯溶液 1 缓慢逐滴加入到溶液 2 中。然后放于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内反应过夜,将反应液装入透析袋,4 $^{\circ}$ C 下 pH = 7.4 的 0.01mol/mL 的 PBS 中透析 3 天,每天换透析液 3-4 次,透析完后,精确量取蛋白质偶联物溶液的体积,测定浓度,分装,-20 $^{\circ}$ C 保存。

[0044] 人工抗原的鉴定:

[0045] 按合成 5-羟甲基糠醛免疫抗原反应所用载体蛋白与偶联产物的比例,进行紫外 (200nm ~ 400nm) 扫描测定。偶联物在 215nm 处出现最大吸收峰,而 BSA 的最大吸收峰为 210,两者存在明显的变化,表明人工抗原的合成成功。

#### [0046] 4、包被抗原的合成

[0047] 用半抗原活化酯与卵清白蛋白连接即制成包被抗原,用于包被酶标板。其具体做法同人工抗原的合成。

#### [0048] 5、抗体的制备及纯化:

[0049] 免疫动物选择新西兰大白兔 2 只,月龄 3 个月,体重 1.5 公斤左右,饲养于标准试验动物房中,连续观察 7 天,确定身体状况正常后进行免疫。免疫采取皮下和肌肉注射法共同进行。

[0050] 初次免疫:称取剂量为 1mg,溶于 1mL 0.9% 的 NaCl,再与 1mL 的弗氏完全佐剂混合进行乳化,乳化液用于免疫。

[0051] 加强免疫:初次免疫后第 14 天和 28 天进行加强免疫,剂量为 1.0mg,溶于 1mL 0.9% 的 NaCl,再与 1mL 的弗氏不完全佐剂混合进行乳化。以后每隔 14 天加强免疫一次,共免疫 6 次。从第 3 次加强免疫开始,每次免疫 10 天后对动物试采血进行血清效价测定。末次免疫后采用股动脉采血法对动物采全血,经离心处理后收集全部血清,采取 proteinA-SepharoseCL-4B 免疫亲和层析柱进行抗体纯化,所得抗体添加 0.1% (W/V) 的叠氮钠后于 4 $^{\circ}$ C 储存备用。

#### [0052] 6、血清效价检测方法的步骤:

[0053] 包被 :将制备好的 5-羟甲基糠醛包被原溶于 pH 9.6 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  的缓冲液中,将 5-羟甲基糠醛包被原稀释为  $1.0 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  作为包被液,96 孔微孔板每孔各加入  $100 \mu\text{L}$ , 室温 (或  $4^\circ\text{C}$ ) 放置过夜或者  $37^\circ\text{C}$  恒温温育 2 ~ 3 小时,用 PBST 即磷酸盐缓冲液 0.05% (V/V), Tween20 洗液洗涤三次;

[0054] 封闭 :每孔加入  $200 \mu\text{L}$  0.5% 脱脂乳粉 /PBS 封闭液,室温封闭 1 小时,用洗液洗涤四次;

[0055] 加样 :将各种稀释倍数的 5-羟甲基糠醛抗血清加入到各自的微孔中,要三孔平行加样,震荡混匀 5 ~ 10min,室温反应 1 小时;

[0056] 加酶标二抗 :用洗液洗微孔板 3 ~ 4 次,将孔内液体甩掉,用吸水纸扣干,向每微孔加 100 微升羊抗兔酶标二抗,室温反应 30 分钟;

[0057] 加底物 :用洗液洗微孔板 3 ~ 4 次,将孔内液体甩掉,用吸水纸扣干,显色底物使用四甲基联苯胺 (TMB)。每孔加入 100 微升四甲基联苯胺 - 双氧水溶液 (5mg 四甲基联苯胺溶于 1ml 底物缓冲液),室温下反应 0.5 小时;

[0058] 终止 :向各微孔中加入终止液以终止反应,用酶标仪读取吸光度值,根据吸光值为 1 时的血清稀释度为效价。

专利名称(译)	一种抗5-羟甲基糠醛的抗体		
公开(公告)号	<a href="#">CN103073633A</a>	公开(公告)日	2013-05-01
申请号	CN201110325900.X	申请日	2011-10-25
[标]申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
[标]发明人	方国臻 张燕 王俊平 王硕 吕燕颜		
发明人	方国臻 张燕 王俊平 王硕 吕燕颜		
IPC分类号	C07K14/765 C07K16/06 C07D307/46 G01N33/535		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

5-羟甲基糠醛的人工抗原和抗体的制备涉及具有5-羟甲基糠醛基本结构的半抗原、人工抗原和抗体的制备。本发明以简便的方法制备了特异性良好的5-羟甲基糠醛的抗体。该抗体是以5-羟甲基糠醛与琥珀酸酐合成半抗原，然后分别与KLH和HRP连接合成人工抗原和酶标抗原。人工抗原再经动物免疫，取血，分出抗血清，纯化制的抗体。该抗体稳定，具有良好的特异性和灵敏度，且合成方法简单，可用于食品中5-羟甲基糠醛的快速免疫检测，具有良好的应用前景。

