



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104744294 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 01

(21) 申请号 201410336370. 2

G01N 33/53(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 07. 15

(71) 申请人 广州城市职业学院

地址 510405 广东省广州市广园中路 248 号

(72) 发明人 张挺 谭龙飞 江津津 彭述辉

黎海彬

(74) 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司

44202

代理人 张超

(51) Int. Cl.

C07C 239/20(2006. 01)

C07C 231/02(2006. 01)

C07C 233/54(2006. 01)

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/77(2006. 01)

C07K 16/44(2006. 01)

权利要求书2页 说明书5页

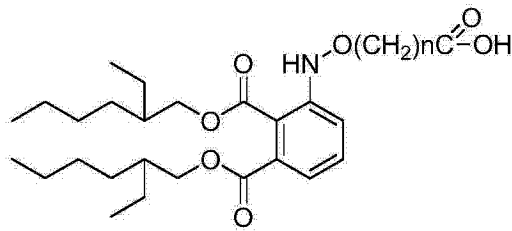
(54) 发明名称

邻苯二甲酸二(α-乙基己)酯半抗原、人工抗原及其抗体制备方法及应用

(57) 摘要

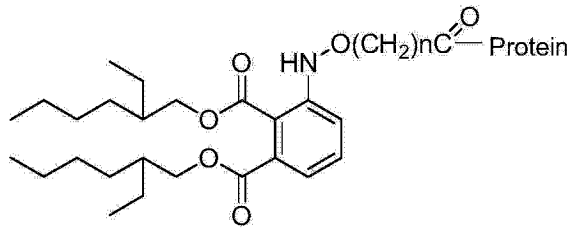
本发明公开邻苯二甲酸二(α-乙基己)酯(英文缩写 DEHP) 半抗原、人工抗原和抗体制备及应用,属于食品安全领域。本发明中以 DEHP 为原料,经硝化反应和还原反应,制得带氨基基团的中间产物,再与丁二酸酐、戊二酸酐等试剂反应生成带羧基基团的半抗原;然后通过活泼脂法或者混合酸酐法与蛋白质偶联制备人工抗原。将人工抗原免疫动物后产生对 DEHP 的特异性抗体。用该抗体建立免疫检测可用于 DEHP 的现场快速检测,对实现食品安全的快速检测具有重要现实意义。

1. 一种 DEHP 半抗原,其特征在于,分子结构式为:



n 为 4 或 5。

2. 一种 DEHP 人工抗原,是由权利要求 1 所述的 DEHP 半抗原与载体蛋白结合而成,其特征在于:所述 DEHP 人工抗原分子结构式为:



n 为 4 或 5 ;所述的载体蛋白为牛血清白蛋白 (BSA) 或卵清蛋白 (OVA)。

3. 一种 DEHP 抗体,是能与权利要求 2 所述的 DEHP 人工抗原发生特异性免疫反应的免疫球蛋白。

4. 如权利要求 1 所述 DEHP 半抗原的合成方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 按投料比为 2:1 ~ 3:1 将浓硝酸与 DEHP 置于圆底烧瓶中,冰浴条件下滴加到 2 倍于浓硝酸量的浓硫酸中,磁力搅拌,反应至室温,再 60℃ 回流反应 5h,期间用 TLC 监控。用 1mol/L 的氢氧化钠溶液中和反应液至弱碱性,乙酸乙酯萃取 3 次,有机相于旋转蒸发仪上减压蒸干得到粗的硝化产物 DEHP-NO₂,过硅胶柱,收集洗脱液为 V/V 为 2:1 ~ 3:1 的氯仿 / 环己烷洗脱相,洗脱液浓缩至干,得到纯化的硝化产物 DEHP-NO₂;

(2) 按投料比为 1:3:3 将 DEHP-NO₂、NH₄Cl、铁粉置于圆底烧瓶中,添加到适量的 70% 乙醇溶液中,磁力搅拌,50℃ 回流反应 5h,期间用 TLC 监控;反应结束后,向反应液中加入 100mL 无水乙醇,滤去铁粉,收集滤液,于旋转蒸发仪浓缩近干;向浓缩液中加 30mL 水,用乙酸乙酯萃取 3 次,收集有机相,蒸干,得到粗产物 DEHP-NH₂;过硅胶柱,收集洗脱液为 V/V 为 5:1 ~ 4:1 的氯仿 / 甲醇洗脱相,洗脱液浓缩至干,得到纯化的还原产物 DEHP-NH₂;

(3) 将 0.1mmol 纯化的 DEHP-NH₂ 与 0.15mmol 酸酐于无水吡啶中 40℃ 搅拌反应过夜,反应液旋转蒸发仪浓缩得到黏稠液体,过硅胶柱,收集洗脱液为 V/V 为 6:1 ~ 4:1 的氯仿 / 甲醇洗脱相,洗脱液浓缩至干,得到产物即为 DEHP 半抗原。

5. 如权利要求 4 所述 DEHP 半抗原的合成方法,其特征在于:浓硝酸为 65% 的硝酸,酸酐为丁二酸酐或戊二酸酐。

6. 权利要求 2 所述 DEHP 人工抗原的制备方法为活泼脂法与混合酸酐法,其特征在于:所述活泼酯方法为:

(1) 将 0.1mmol 的 DEHP 半抗原溶解于 1mL 的 DMF 中,然后在该溶液里加入等摩尔的 DCC 和 NHS,室温避光反应过夜;

(2) 4℃ 离心去除沉淀,取上清液,并将其缓慢加入到 5mL pH9.5 的碳酸缓冲液中,其缓

冲液含有载体蛋白 BSA 或 OVA,其中载体蛋白的浓度为 10 ~ 15mg/mL,在 4°C 下反应过夜;

(3) 将步骤 (2) 中的反应液装入透析袋,用 0.9% 的生理盐水透析 3d,得到人工抗原;
所述混合酸酐法为:

(1) 将 0.1mmol DEHP 半抗原溶于 1mL DMF 中,加入 80 μ L 正三丁胺,冰浴下缓慢滴加 0.15mmol 氯甲酸异丁酯,4°C 搅拌反应 1h,此为甲液;

(2) 将 60mg 载体蛋白 BSA 或 OVA 溶于 5mL 1mol/L pH9.6 的碳酸氢钠缓冲液中,此为乙液;

(3) 将甲液缓慢滴加到乙液中,4°C 磁力搅拌反应过夜,待反应完成后,装入透析袋,然后用 0.9% 的生理盐水透析 3d,得到人工抗原。

7. 如权利要求 3 所述 DEHP 抗体的制备方法,其特征在于:

(1) 实验选用 2 个月左右的健康雌性的 Balb/c 小鼠或新西兰兔作为实验对象,免疫剂量基础免疫为 0.25 ~ 1mg/Kg,加强免疫的剂量为 0.5 ~ 1mg/Kg。采用背部皮下多点注射,每隔 15d 加强免疫一次,第 4 次免疫后 8 ~ 10 天内,静脉采血,测定效价和特异性,待其血清效价和特异性合格后,兔子采用心脏采血,分离出抗血清;或用小鼠脾细胞进行细胞融合,获得杂交瘤细胞,进而获得单克隆 抗体;

(2) 采用辛酸-硫酸铵法或 Protein G/A 亲和层析纯化,得到兔抗血清或小鼠腹水中的免疫球蛋白,即使 DEHP 抗体。

8. 如权利要求 3 所述的 DEHP 抗体用于制备检测邻苯二甲酸二(α -乙基己)酯在食品中的残留量的免疫检测剂的应用。

邻苯二甲酸二(α-乙基己)酯半抗原、人工抗原及其抗体 制备方法及应用

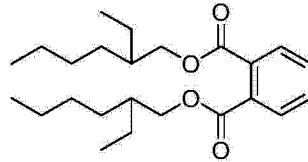
技术领域

[0001] 本发明属于食品安全领域,更具体的说,本发明涉及邻苯二甲酸二(α-乙基己)酯半抗原合成、人工抗原和抗体制备,还涉及上述邻苯二甲酸二(α-乙基己)酯半抗原及其相应的人工抗原和抗体的制备方法和应用。

背景技术

[0002] 邻苯二甲酸二(α-乙基己)酯(Di(2-ethylhexyl)phthalate),英文缩写 DEHP,又名邻苯二甲酸二辛酯,分子量为 390.5,25℃时该品在水中溶解度 <0.01%,溶于大多数有机溶剂和烃类,其结构式为:

[0003]



[0004] DEHP 属邻苯二甲酸酯类塑化剂,是一种工业原料,是目前使用最广和产量最大的塑化剂。DEHP 会被食物及水所吸收,与含有 DEHP 容器接触的食品也会受到污染,也有不法厂商将其作为添加剂用于食品生产。

[0005] 世界卫生组织指出邻苯二甲酸酯类进入人体和动物体内会有类似雌激素的作用,会干扰内分泌,会造成内分泌失调,阻害生物体生殖机能,包括生殖率降低、流产、天生缺陷、异常的精子数、睾丸损害,还会引发恶性肿瘤或造成畸形儿。临床研究表明服用或长期暴露于 DEHP 中也会对于心肌细胞有显著的影响,导致心脏不规则节律。因此,DEHP 在食品中属于违禁的工业原料。

[0006] 对食品中的邻苯二甲酸酯类塑化剂的检测主要以理化分析法(如 GC-MS、HPLC)为主。然而应用仪器方法时,其灵敏度受样品的净化、浓缩等步骤的影响很大,测定方法复杂、繁琐,检测通量小,需要培养专业人员进行检测,检测成本昂贵,不能实现大批量样品的快速检测分析。因此,有必要研制更加简单快捷方便的检测方法。

[0007] 免疫检测方法,是目前食品安全快速检测的重要方法之一,检测成本很低,使用简单,适合大量样品的筛选检测,已经在食品安全检测中发挥了重要作用。

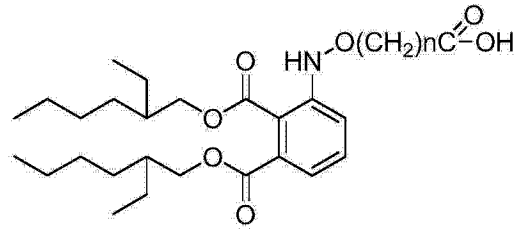
发明内容

[0008] 本发明解决的技术问题是提供一种邻苯二甲酸二(α-乙基己)酯半抗原合成、人工抗原和抗体制备,还涉及上述邻苯二甲酸二(α-乙基己)酯半抗原及其相应的人工抗原和抗体的制备方法和应用,以通过设计合成 DEHP 半抗原与人工抗原,免疫动物获得高特异性抗体并应用于免疫检测。

[0009] 为解决上述技术问题,本发明采用如下技术方案:

[0010] 一种 DEHP 半抗原的分子结构式为：

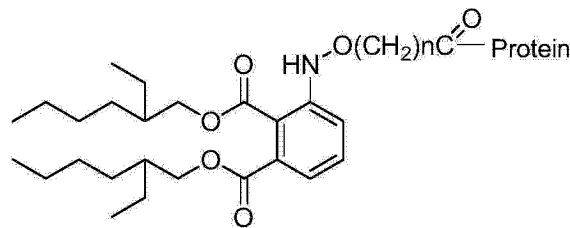
[0011]



[0012] n 为 4 或 5 ;所述的 n 优选为 4。

[0013] 所述的 DEHP 半抗原与载体蛋白结合,得到 DEHP 人工抗原,其分子结构式为：

[0014]



[0015] n 为 4 或 5 ;所述的 n 优选为 4 ;所述的载体蛋白为牛血清白蛋白 (BSA) 或卵清蛋白 (OVA)。

[0016] 一种 DEHP 抗体能与 DEHP 人工抗原发生特异性免疫反应的免疫球蛋白。

[0017] 所述 DEHP 半抗原的合成方法,包括以下步骤：

[0018] (1) 按投料比为 2:1 ~ 3:1 将浓硝酸与 DEHP 置于圆底烧瓶中,冰浴条件下滴加到 2 倍于浓硝酸量的浓硫酸中,磁力搅拌,反应至室温,再 60℃ 回流反应 5h,期间用 TLC 监控。用 1mol/L 的氢氧化钠溶液中和反应液至弱碱性,乙酸乙酯萃取 3 次,有机相于旋转蒸发仪上减压蒸干得到粗的硝化产物 DEHP-NO₂,过硅胶柱,收集洗脱液为 V/V 为 2:1 ~ 3:1 的氯仿 / 环己烷洗脱相,洗脱液浓缩至干,得到纯化的硝化产物 DEHP-NO₂。

[0019] (2) 按投料比为 1:3:3 将 DEHP-NO₂、NH₄Cl、铁粉置于圆底烧瓶中,添加到适量的 70% 乙醇溶液中,磁力搅拌,50℃ 回流反应 5h,期间用 TLC 监控。反应结束后,向反应液中加入 100mL 无水乙醇,滤去铁粉,收集滤液,于旋转蒸发仪浓缩近干 ;向浓缩液中加 30mL 水,用乙酸乙酯萃取 3 次,收集有机相,蒸干,得到粗产物 DEHP-NH₂;过硅胶柱,收集洗脱液为 V/V 为 5:1 ~ 4:1 的氯仿 / 甲醇洗脱相,洗脱液浓缩至干,得到纯化的还原产物 DEHP-NH₂。

[0020] (3) 将 0.1mmol 纯化的 DEHP-NH₂ 与 0.15mmol 酸酐于无水吡啶中 40℃ 搅拌反应过夜,反应液旋转蒸发仪浓缩得到黏稠液体,过硅胶柱,收集洗脱液为 V/V 为 6:1 ~ 4:1 的氯仿 / 甲醇洗脱相,洗脱液浓缩至干,得到产物即为 DEHP 半抗原。

[0021] 所述的浓硝酸为 65% 的硝酸,酸酐为丁二酸酐或戊二酸酐。

[0022] 所述 DEHP 人工抗原的制备方法为活泼脂法与混合酸酐法。

[0023] 所述活泼酯方法包括以下步骤：

[0024] (1) 将 0.1mmol 的 DEHP 半抗原溶解于 1mL 的 DMF 中,然后在该溶液里加入等摩尔的 DCC 和 NHS,室温避光反应过夜；

[0025] (2) 4℃ 离心去除沉淀,取上清液,并将其缓慢加入到 5mL pH9.5 的碳酸缓冲液中,其缓冲液含有载体蛋白 BSA 或 OVA,其中载体蛋白的浓度为 10 ~ 15mg/mL,在 4℃ 下反应过

夜；

[0026] (3) 将步骤(2)中的反应液装入透析袋,用0.9%的生理盐水透析3d,得到人工抗原。

[0027] 所述混合酸酐法包括以下步骤：

[0028] (1) 将0.1mmol DEHP半抗原溶于1mL DMF中,加入80 μ L正三丁胺,冰浴下缓慢滴加0.15mmol 氯甲酸异丁酯,4 $^{\circ}$ C搅拌反应1h,此为甲液；

[0029] (2) 将60mg载体蛋白BSA或OVA溶于5mL1mol/L pH9.6的碳酸氢钠缓冲液中,此为乙液；

[0030] (3) 将甲液缓慢滴加到乙液中,4 $^{\circ}$ C磁力搅拌反应过夜,待反应完成后,装入透析袋,然后用0.9%的生理盐水透析3d,得到人工抗原。

[0031] 所述DEHP抗体的制备方法,其具体步骤包括：

[0032] (1) 实验选用2个月左右的健康雌性的Ba1b/c小鼠或新西兰兔作为实验对象,免疫剂量基础免疫为0.25~1mg/Kg,加强免疫的剂量为0.5~1mg/Kg。采用背部皮下多点注射,每隔15d加强免疫一次,第4次免疫后8~10天内,静脉采血,测定效价和特异性,待其血清效价和特异性合格后,兔子采用心脏采血,分离出抗血清;或用小鼠脾细胞进行细胞融合,获得杂交瘤细胞,进而获得单克隆抗体；

[0033] (2) 采用辛酸-硫酸铵法或Protein G/A亲和层析纯化,得到兔抗血清或小鼠腹水中的免疫球蛋白,即使DEHP抗体。

[0034] 所述的DEHP抗体用于制备检测邻苯二甲酸二(α -乙基己)酯在食品中的残留量的免疫检测剂的应用。

[0035] 所述的免疫检测为酶联免疫吸附测定(ELISA)。

[0036] 所述的酶联免疫吸附测定法为间接竞争法。

[0037] 本发明具有如下有益效果：

[0038] 本发明中由于DEHP是小分子物质(分子量小于1000Da),本身不具备免疫原性,必须与大分子蛋白偶联制备为人工抗原,才能使动物产生抗体。由于DEHP本身不具备活性基团,不能与大分子蛋白偶联,因此需要对DEHP进行分子改造,引入-NH₂、-COOH等活性基团,合成DEHP半抗原。本发明以DEHP为原料,与硝酸、氯化铵、丁二酸酐反应制得DEHP半抗原;通过活泼酯法或混合酸酐法将DEHP半抗原与载体蛋白偶联制得DEHP人工抗原。将DEHP人工抗原免疫动物获得对DEHPD的特异性抗体。应用本发明所制备的DEHP人工抗原和抗体的免疫检测分析方法,与仪器方法相比较,该免疫检测方法成本低,不到仪器检测费用的10%;同时,应用本发明制备的DEHP人工抗原和抗体的免疫检测分析方法能够同时检测大批量的样品,速度快,操作简单,适用于食品中DEHP残留的现场快速检测。

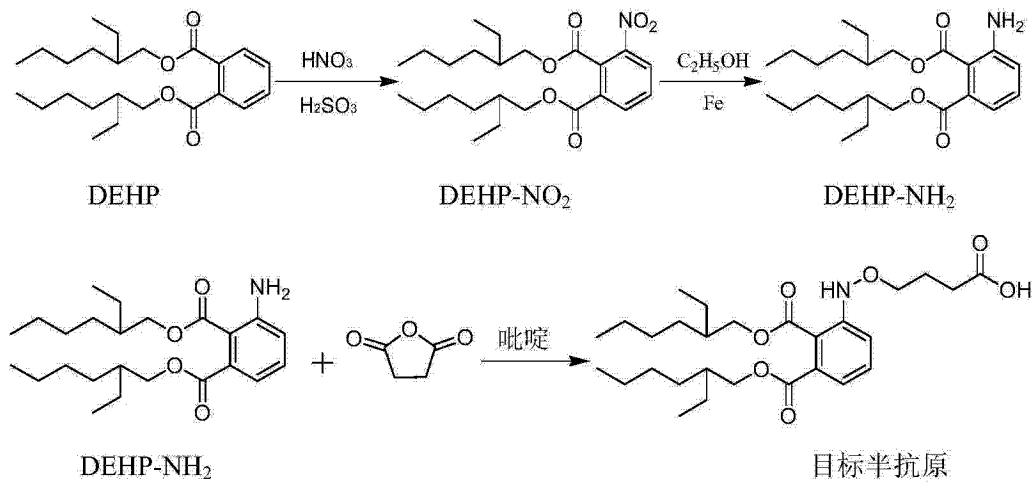
具体实施方式

[0039] 实施例1

[0040] DEHP半抗原合成

[0041] 当n=4时,DEHP半抗原制备的路线如下：

[0042]



[0043] 将4mL DEHP (10mmol) 与1mL65%的浓硝酸 (20mmol) 置于圆底烧瓶中,冰浴条件下加入 5mL 浓硫酸,磁力搅拌,反应至室温,再 60℃回流反应 5h,期间用 TLC 监控。反应结束后,用 1mol/L 的氢氧化钠溶液中和反应液至弱碱性,乙酸乙酯萃取 3 次,有机相于旋转蒸发仪上减压蒸干得到粗的硝化产物 DEHP-NO₂,过硅胶柱,收集洗脱液为 V/V 为 2:1 ~ 3:1 的氯仿 / 环己烷洗脱相,洗脱液浓缩至干,得到纯化的硝化产物 DEHP-NO₂。

[0044] 1mmol DEHP-NO₂、3mmolNH₄Cl、3mmol 铁粉置于圆底烧瓶中,添加到 20mL70%的乙醇溶液中,磁力搅拌,50℃回流反应 5h,期间用 TLC 监控。反应结束后,向反应液中加入 100mL 无水乙醇,滤去铁粉,收集滤液,于旋转蒸发仪浓缩近干;向浓缩液中加 30mL 水,用乙酸乙酯萃取 3 次,收集有机相,蒸干,得到粗产物 DEHP-NH₂;过硅胶柱,收集洗脱液为 V/V 为 5:1 ~ 4:1 的氯仿 / 甲醇洗脱相,洗脱液浓缩至干,得到纯化的还原产物 DEHP-NH₂。

[0045] 将 0.1mmol 纯化的 DEHP-NH₂ 与 0.15mmol 丁二酸酐于无水吡啶中 40℃搅拌反应过夜,反应液旋转蒸发仪浓缩得到黏稠液体,过硅胶柱,收集洗脱液为 V/V 为 6:1 ~ 4:1 的氯仿 / 甲醇洗脱相,洗脱液浓缩至干,得到产物即为目标半抗原。

[0046] 实施例 2

[0047] 人工抗原的合成

[0048] 2.1 免疫抗原的合成与纯化:

[0049] 免疫抗原采用活泼酯法。将 50 μmol 的 DEHP 半抗原溶解于 1mL 的 DMF 中,然后在该溶液里加入等摩尔的 DCC 和 NHS,室温避光反应过夜,4℃离心去除沉淀,取上清液,并将其缓慢加入到 5mL pH9.5 的碳酸缓冲液中,其缓冲液含有载体蛋白 BSA,其中载体蛋白的浓度为 10mg/mL。将混合物在 4℃下反应过夜,待反应完成后,装入透析袋,然后用 0.9%的生理盐水透析 3d。得到透析好的溶液即为人工免疫抗原 DEHP-BSA。

[0050] 2.2 包被抗原的合成与纯化:

[0051] 包被抗原采用混合酸酐法。将 0.1mmol DEHP 半抗原溶于 1mL DMF 中,加入 80 μL 正三丁胺,冰浴下缓慢滴加 0.15mmol 氯甲酸异丁酯,4℃搅拌反应 1h,此为甲液。将 60mg 载体蛋白 OVA 溶于 5mL1mol/L pH9.6 的碳酸氢钠缓冲液中,此为乙液。将甲液缓慢滴加到乙液中,4℃磁力搅拌反应过夜,待反应完成后,装入透析袋,然后用 0.9%的生理盐水透析 3d。得到透析好的溶液即为人工包被抗原 DEHP-OVA。

[0052] 实施例 3:

[0053] 人工抗原的鉴定:

[0054] 按照分光光度法测定半抗原、载体蛋白以及偶联物的最大吸收值,计算偶联物的偶联比。在 200-400nm 之间分别对原料、BSA、OVA 及偶联物紫外吸收光谱进行扫描,鉴定半抗原与载体蛋白是否发生偶联。同时估算半抗原和载体蛋白偶联比:

[0055] 经计算结果如下:

[0056] DEHP-BSA 18.5:1 DEHP-OVA 6.8:1

[0057] 实施例 4:

[0058] 免疫动物及多克隆抗体制备

[0059] 4.1 免疫动物制备抗血清

[0060] 实验选用 3 月、体重 2 ~ 2.5kg 健康雌性的新西兰兔作为实验对象,同时免疫两只兔子,免疫剂量基础免疫为 0.25 ~ 1mg/kg,加强免疫的剂量为 0.5 ~ 1mg/kg。采用背部皮下多点注射,每隔 15d 加强免疫一次,第 4 次免疫后 8 ~ 10 天内,耳缘静脉采血,测定效价和特异性,待其血清效价和特异性合格后,兔子采用心脏采血,分离出康血清。

[0061] 4.2 抗体的纯化

[0062] 纯化抗体可以采用辛酸-硫酸铵盐析法,也可以采用 Protein G/A 亲和层析纯化。

[0063] 实施例 5:DEHP 酶联免疫方法建立

[0064] 5.1 包被:采用分装的 DEHP-OVA 进行包被,包被浓度为 0.1 μ g/mL 包被抗原。在 96 孔酶标板上每孔加入 100 μ L 含有包被抗原的包被液,4 $^{\circ}$ C 过夜。

[0065] 5.2 封闭:取出包被好的酶标板,使用洗液洗板两次,每孔加入 150 μ L 封闭液,与 37 $^{\circ}$ C 温箱中温育 3h。后将封闭液甩干,置于 37 $^{\circ}$ C 烘箱 1h。

[0066] 5.3 点板:在封闭好的半条中每孔加入经系列稀释制备的 DEHP 各浓度标准液 50 μ L,再加入稀释 8000 倍的抗体稀释液每孔 50 μ L。在 37 $^{\circ}$ C 恒温箱里反应 30min。使用洗液洗板 3 次。

[0067] 5.4 加酶标二抗每孔加入经 1:10000 稀释的羊抗兔辣根过氧化物酶稀释液 100 μ L,放在 37 $^{\circ}$ C 恒温箱里反应 30min。使用洗液洗板 3 次。

[0068] 5.5 显色:每孔加入底物 TMB-过氧化氢溶液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 显色 15min 后用 50 μ L 的 10%的 H₂SO₄ 终止反应。在酶标仪上测定 450nm 波长下的吸光值。根据百分吸光度值与 DEHP 浓度之间的半对数关系作图即得到标准曲线。

[0069] 所述百分吸光度值的计算式为:

[0070] 百分吸光度值 (%) = $(B/B_0) \times 100$

[0071] 其中,B 为标准溶液的平均吸光值,B₀ 为 0 浓度标准溶液的平均吸光度值。

[0072] 虽然本发明的较佳实施例已揭露如上,本发明并不受限于上述实施例,任何本技术领域内的技术人员,在不脱离本发明所揭露的范围内,当可作些许的改动与调整。

专利名称(译)	邻苯二甲酸二(α-乙基己)酯半抗原、人工抗原及其抗体制备方法及应用		
公开(公告)号	CN104744294A	公开(公告)日	2015-07-01
申请号	CN201410336370.2	申请日	2014-07-15
[标]申请(专利权)人(译)	广州城市职业学院		
申请(专利权)人(译)	广州城市职业学院		
当前申请(专利权)人(译)	广州城市职业学院		
[标]发明人	张挺 谭龙飞 江津津 彭述辉 黎海彬		
发明人	张挺 谭龙飞 江津津 彭述辉 黎海彬		
IPC分类号	C07C239/20 C07C231/02 C07C233/54 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 G01N33/53		
代理人(译)	张超		
其他公开文献	CN104744294B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开邻苯二甲酸二(α-乙基己)酯(英文缩写DEHP)半抗原、人工抗原和抗体制备及应用,属于食品安全领域。本发明中以DEHP为原料,经硝化反应和还原反应,制得带氨基基团的中间产物,再与丁二酸酐、戊二酸酐等试剂反应生成带羧基基团的半抗原;然后通过活泼脂法或者混合酸酐法与蛋白质偶联制备人工抗原。将人工抗原免疫动物后产生对DEHP的特异性抗体。用该抗体建立免疫检测可用于DEHP的现场快速检测,对实现食品安全的快速检测具有重要现实意义。

