



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110117286 A

(43)申请公布日 2019.08.13

(21)申请号 201910445688.7

(22)申请日 2019.05.27

(71)申请人 天津科技大学

地址 300457 天津市滨海新区第十三大街9号

(72)发明人 生威 王硕 赵秋霞 张燕

(74)专利代理机构 天津合正知识产权代理有限公司 12229

代理人 郭乐

(51)Int.Cl.

C07D 487/04(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 1/107(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

C07K 16/06(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

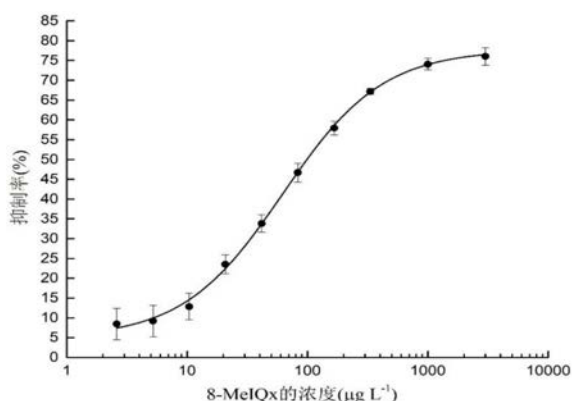
权利要求书3页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

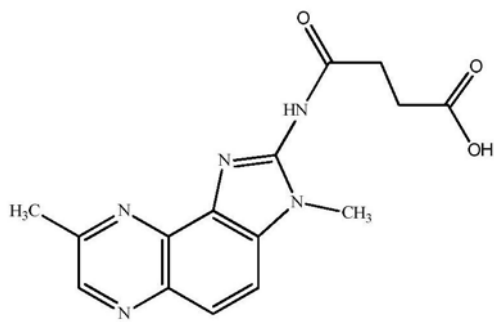
一种杂环胺8-MeIQ_x半抗原、抗体及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明提供了一种杂环胺8-MeIQ_x半抗原、抗体及其制备方法和应用,涉及杂环胺半抗原合成、人工完全抗原和抗体的制备及其酶联免疫分析方法的建立。本发明针对杂环胺检测的高通量和快速样品制备的要求,克服了已有理化分析方法繁琐复杂、成本较高、分析速度慢的问题,建立了灵敏、高效、快速、准确的免疫分析技术。使用该抗体建立的检测食品中杂环胺的方法具有良好的灵敏度并可以同时识别包括8-MeIQ_x在内的8种极性杂环胺,具有良好的广谱性,检测限(以8-MeIQ_x计算)为10.92 μg/L,并且检测方法成本低廉,操作简便,适合于食品中极性杂环胺总量的快速检测。



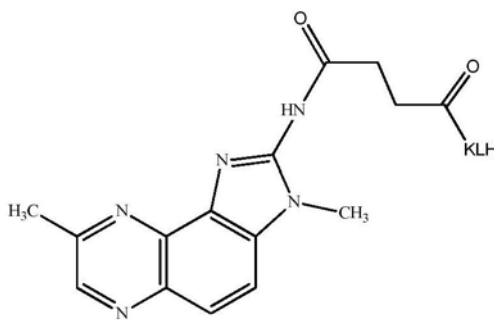
1. 一种杂环胺8-MeIQx半抗原,其特征在于,分子结构式为:



2. 权利要求1所述的杂环胺8-MeIQx半抗原的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

将20mg琥珀酸酐溶于5mL无水二氯甲烷,加入溶有21mg8-MeIQx的15mL无水二氯甲烷溶液中并在40℃下回流3h,并由薄层色谱监测,展开剂组分及比例为二氯甲烷:无水甲醇:氨水=9:1:0.1 (v/v),反应终止后,60℃减压旋蒸除去溶剂即得到杂环胺8-MeIQx半抗原,分子量:313.31。

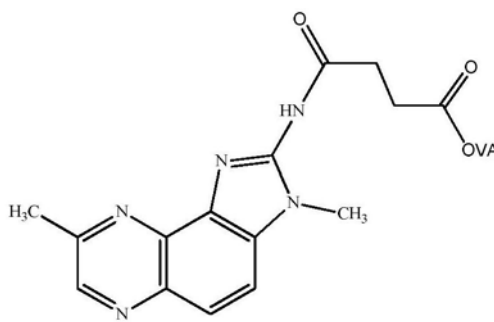
3. 一种杂环胺8-MeIQx免疫原,其特征在于,杂环胺8-MeIQx免疫原分子结构式为:



4. 一种权利要求3所述杂环胺8-MeIQx免疫原的制备方法,其特征在于,由权利要求1所述的杂环胺8-MeIQx半抗原与钥孔血蓝蛋白偶联制备而成,包括以下步骤:

- (1) 称取杂环胺8-MeIQx半抗原0.97mg于4mL棕色瓶中,用400 μ LDMF溶解;
- (2) 称取1.07mgNHS、0.9mgEDC加入到棕色瓶中,室温搅拌18h,进行活化;
- (3) 称取20mgKLH蛋白溶解在4mL的pH8.0的磷酸缓冲液中;
- (4) 将(2)制得的活化液缓慢滴加到蛋白质溶液中,5 μ L/2min,加完后,4℃反应12h;
- (5) 将步骤(4)所得反应溶液在4℃用pH7.4的0.01M的磷酸缓冲液中透析3d,每天换四次透析液,最后将透析液取出,得到杂环胺8-MeIQx免疫原。

5. 一种杂环胺8-MeIQx包被原,其特征在于,包被原分子结构式为:



6. 一种权利要求5所述杂环胺8-MeIQx包被原的制备方法,其特征在于,由权利要求1所

述的杂环胺8-MeIQx半抗原与卵清蛋白偶联制备而成,包括以下步骤:

- (1) 称取13.8mg杂环胺8-MeIQx半抗原于4mL棕色瓶中,用400 μ LDMF溶解;
- (2) 称取15.2mgNHS、12.6mgEDC加入到棕色瓶中,室温搅拌18h,进行活化;
- (3) 称取20mgOVA蛋白溶解在4mL的pH8.0的磷酸缓冲液中;
- (4) 将(2)制得的活化液缓慢滴加到蛋白质溶液中,5 μ L/2min,加完后,4 $^{\circ}$ C反应12h;
- (5) 将所得反应溶液在4 $^{\circ}$ C用pH7.4的0.01M的磷酸缓冲液中透析3d,每天换四次透析液,最后将透析液取出,得到杂环胺8-MeIQx包被原。

7. 一种杂环胺8-MeIQx抗体,其特征在于,所述杂环胺8-MeIQx抗体能与权利要求5包被原发生特异性免疫反应的多克隆抗体。

8. 权利要求7所述杂环胺8-MeIQx抗体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

免疫动物选用雌性大白兔,首次免疫采用背部多点皮下注射和腿部肌肉注射免疫,加强免疫采用背部多点皮下注射免疫;初免后进行四次加强免疫,具体做法分别是:

初次免疫:取1mg上述免疫原溶于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1mg上述免疫原溶于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;加强免疫分别于初次免疫后2、4和6周后免疫三次,此后加强免疫间隔为一个月;从第二次加强免疫开始,免疫后第9天时由兔子的耳缘静脉取血,进行效价检测;

抗体纯化:定时监测动物抗体效价,当抗体对权利要求5所述的杂环胺8-MeIQx包被原效价达到较高水平时,采集血液,并离心获得抗血清,使用ProteinA-Sepharose4B蛋白亲和层析柱对抗血清进行纯化,制备得到权利要求7所述的多克隆抗体。

9. 权利要求7所述杂环胺8-MeIQx抗体的应用,其特征在于,所述的杂环胺8-MeIQx抗体应用于喹啉类杂环胺,喹啉类杂环胺以及吡啶类杂环胺8种极性杂环胺总含量的免疫检测,所述喹啉类杂环胺为IQ或MeIQ;所述喹啉类杂环胺为IQx、8-MeIQx、4,8-DiMeIQx、7,8-DiMeIQx或4,7,8-TriMeIQx,所述吡啶类杂环胺为PhIP。

10. 根据权利要求9所述的杂环胺8-MeIQx抗体的应用,其特征在于包括如下步骤:

(1) 包被:用包被液把包被抗原稀释,然后以每孔100 μ L包被于96孔酶标板上,4 $^{\circ}$ C孵育过夜或37 $^{\circ}$ C孵育3h;

(2) 洗板:加入洗涤液PBST,每孔加入250 μ L,于振荡器上振荡2min,弃去PBST,重复洗板3次;

(3) 封闭:每孔加入200 μ L封闭液,于37 $^{\circ}$ C封闭1h,然后弃去封闭液,用PBST重复洗板3次;

(4) 加样:每孔先加入50 μ L的杂环胺8-MeIQx标准溶液或样品溶液,然后各加入50 μ L的抗体,加样完毕后,在37 $^{\circ}$ C下竞争反应1h,然后用PBST重复洗板4次;

(5) 加羊抗兔HRP标记二抗:把羊抗兔HRP标记二抗用PBS稀释适当浓度,每孔100 μ L加样,37 $^{\circ}$ C下孵育30min,用PBST重复洗板5次;

(6) 显色:每孔加入100 μ L混匀后的底物液,37 $^{\circ}$ C下反应15-20min;

(7) 终止:每孔加入50 μ L的硫酸终止液,终止显色反应;

(8) 读数:在双波长方式,450nm为测定波长,650nm为参比波长,下用酶标仪测定各孔的吸光度值;抑制率的计算公式如式所示:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{OD_{\text{对照}} - OD}{OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}}} \times 100\%$$

式中: $OD_{\text{对照}}$: 加PBS和抗体的微孔的吸光度值;

$OD_{\text{空白}}$: 只加PBS的微孔的吸光度值;

OD : 加了抗体和标准品或样品的微孔的吸光度值。

一种杂环胺8-MeIQx半抗原、抗体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于小分子化合物免疫化学和痕量残留分析技术领域;涉及有机合成,免疫化学,生物化学及物化测试技术等;特别涉及小分子化合物杂环胺8-MeIQx半抗原、人工抗原的设计合成和免疫动物特异性抗体的制备及其免疫分析方法的建立。

背景技术

[0002] 杂环胺(HAAs)是一类含有N杂环的多环芳香族化合物,由自由氨基酸、肌氨酸、肌酸酐与糖类高温反应产生,具有致癌、致突变活性。杂环胺广泛存在于煎炸食品、咖啡饮料、酒类、卷烟烟气、人体体液、河水和大气中。目前已经有超过25种杂环胺类物质被分离鉴定出来。杂环胺具有很高的致癌和致突变能力,动物实验研究表明,它能诱导啮齿类和灵长类动物的多种器官产生肿瘤,并能引起哺乳动物的基因突变、染色体畸变和姐妹染色体互换。1993年,国际癌症研究机构把MeIQ,MeIQx,PhIP,AaC,MeAaC,Trp-P-1,Trp-P-2和Glu-P-1这8种HAAs作为2B类致癌物(潜在致癌物),IQ作为2A类致癌物(可疑致癌物);美国卫生和人力资源服务部在10次(2002年)和11次(2004年)人类致癌物报告中将IQ、MeIQ、MeIQx、PhIP列为人类致癌物,一些杂环胺的致癌、致突变型甚至强于苯并吡和黄曲霉毒素B1;美国毒理学报告也把杂环胺类化合物列为人类的可能致癌物,建议减少其暴露量。

[0003] 杂环胺在烹调肉制品中仅以痕量水平存在,并且烹调后肉制品的组分相当复杂,常采用高效的分离富集和灵敏的检测方法,但是由于大部分杂环胺极性较大且难挥发,只有少数杂环胺经衍生化后可采用GC或GC-MS检测,但应用并不广泛。随着超高效液相色谱(UPLC)这种强有力的分离技术的发展,超高效液相色谱串联二级质谱(UPLC-MS-MS)也被应用于杂环胺的检测,但是该类方法对仪器依赖性很高,检测时的技术要求较高,过程繁琐。而酶联免疫分析技术(ELISA)是基于免疫学反应,通过简单的抗原和抗体特异性结合的原理,根据显色就可以检测目标物,检测方法快速、灵敏、准确、成本低且操作简单,比较适合对杂环胺进行痕量分析。

[0004] ELISA研究的关键是半抗原的分子设计、合成和人工全抗原及抗体的制备。

[0005] 杂环胺8-MeIQx分子量为213.24,属于小分子化合物($MW \leq 1000 \text{ dalton}$),小分子化合物一般不具有人工抗原性,不能直接免疫动物产生特异性抗体、必须合成突出分子立体结构特异性部位的半抗原,并与大分子载体连接构成接合物,才能免疫动物产生针对这一目标小分子化合物的特异性抗体。

[0006] 虽然小分子化合物不具有人工抗原性,但具有反应原性,即具有与相应抗体发生免疫学反应的能力,并可进行体外定量,遵循质量作用定律。所以可以使用免疫分析技术在目标分析物所对应抗原和抗体的特异性结合,通过体外对目标分析物的识别应用到痕量分析中。

发明内容

[0007] 本发明的目的是通过设计合成杂环胺8-MeIQx半抗原及制备相应的人工完全抗原

和抗体。

[0008] 本发明的另一个目的是提供杂环胺8-MeIQx的半抗原及相应的人工完全抗原和抗体的制备方法。

[0009] 本发明再一个目的是提供杂环胺8-MeIQx的半抗原及相应的人工完全抗原和抗体的应用,其中杂环胺8-MeIQx的人工完全抗原包括免疫原和包被原。

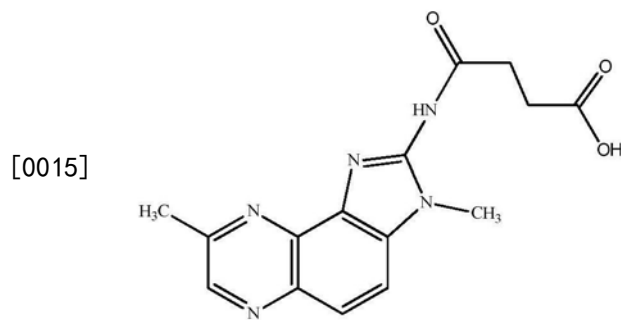
[0010] 本发明的独特之处在于选择具有喹啉类、喹喔啉类和吡啶类极性杂环胺通用结构的2-氨基-3,8二甲基咪唑[4,5-f]喹喔琳(8-MeIQx)的咪唑环氨基为合成作用位点,进一步将杂环胺8-MeIQx和琥珀酸酐合成了带有羧基活性基团的半抗原。通过对半抗原偶联蛋白制备了免疫原,免疫动物诱导产生亲合性高、可以广谱性识别多种极性杂环胺的多克隆抗体,并以此为基础建立了ELISA方法即快速免疫分析方法,准确检测食品中的喹啉类、喹喔啉类和吡啶类的多种极性杂环胺总量。

[0011] 本发明利用目标分析物半抗原与载体蛋白质偶联,制备有效免疫原,免疫动物制备对小分子分析物的多克隆抗体,利用抗原抗体的特异性免疫学反应,从而定性定量地检测样本中超微量小分子目标分析物,即可用于样本测定。其选择性决定于免疫学反应的特异性,其灵敏度取决于抗体的亲合性和标记物的可检性。因此可以快速准确地分析检测杂环胺在样本中的含量。该技术研究的关键是半抗原的分子设计、合成和人工完全抗原及抗体的制备。

[0012] 人工完全抗原是半抗原与载体蛋白的偶联物,若用于免疫动物,即为免疫原,若用于免疫分析中包被微孔板,即为包被原。对于同一种目标分子,免疫原和包被原通常不用同一种偶联物,目的是减少抗体对包被原的非特异性结合,提高分析的特异性和灵敏度。因为免疫原免疫动物所产生的抗体,不仅能识别半抗原,也能识别载体蛋白。因此,免疫原和包被原所用的载体蛋白一般是不相同的,载体蛋白的结构和分子质量差异越大,非特异性结合反应越弱,分析灵敏度越高。

[0013] 为达到上述目的,本发明的技术方案是这样实现的:

[0014] 一种杂环胺8-MeIQx半抗原,分子结构式为:

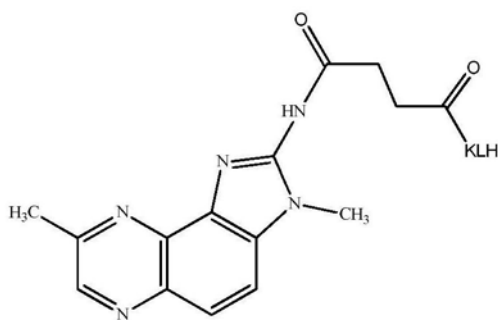


[0016] 所述的杂环胺8-MeIQx半抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0017] 将20mg琥珀酸酐溶于5mL无水二氯甲烷,加入溶有21mg 8-MeIQx的15mL无水二氯甲烷溶液中并在40℃下回流3h,并由薄层色谱(Thin Layer Chromatography, TLC)监测(展开剂组分及比例为二氯甲烷:无水甲醇:氨水=9:1:0.1, v/v),反应终止后,60℃减压旋蒸除去溶剂即得到杂环胺8-MeIQx半抗原(分子量:313.31)。

[0018] 一种杂环胺8-MeIQx免疫原,杂环胺8-MeIQx免疫原分子结构式为:

[0019]



[0020] 一种杂环胺8-MeIQ_x免疫原的制备方法,由上述的杂环胺8-MeIQ_x半抗原与钥孔血蓝蛋白(KLH)偶联制备而成,包括以下步骤:

[0021] (1) 称取杂环胺8-MeIQ_x半抗原0.97mg于4mL棕色瓶中,用400μLDMF溶解;

[0022] (2) 称取1.07mgN-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、0.9mg1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)加入到棕色瓶中,室温搅拌18h,进行活化;

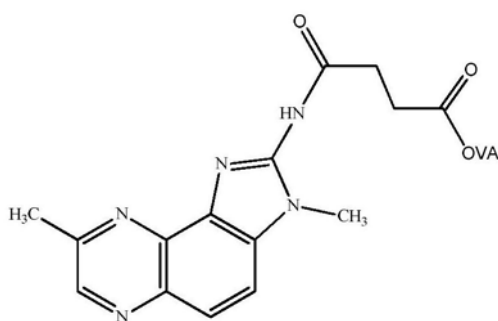
[0023] (3) 称取20mgKLH蛋白溶解在4mL的pH8.0的磷酸缓冲液中;

[0024] (4) 将(2)制得的活化液缓慢滴加到蛋白质溶液中,5μL/2min,加完后,4℃反应12h;

[0025] (5) 将步骤(4)所得反应溶液在4℃用pH7.4的0.01M的磷酸缓冲液中透析3d,每天换四次透析液,最后将透析液取出,得到杂环胺8-MeIQ_x免疫原。

[0026] 一种杂环胺8-MeIQ_x包被原,其特征在于,包被原分子结构式为:

[0027]



[0028] 一种杂环胺8-MeIQ_x包被原的制备方法,由上述的杂环胺8-MeIQ_x半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联制备而成,包括以下步骤:

[0029] (1) 称取13.8mg杂环胺8-MeIQ_x半抗原于4mL棕色瓶中,用400μLDMF溶解;

[0030] (2) 称取15.2mgNHS、12.6mgEDC加入到棕色瓶中,室温搅拌18h,进行活化;

[0031] (3) 称取20mgOVA蛋白溶解在4mL的pH8.0的磷酸缓冲液中;

[0032] (4) 将(2)制得的活化液缓慢滴加到蛋白质溶液中,5μL/2min,加完后,4℃反应12h;

[0033] (5) 将所得反应溶液在4℃用pH7.4的0.01M的磷酸缓冲液中透析3d,每天换四次透析液,最后将透析液取出,得到杂环胺8-MeIQ_x包被原。

[0034] 一种杂环胺8-MeIQ_x抗体,所述杂环胺8-MeIQ_x抗体能与上述包被原发生特异性免疫反应的多克隆抗体。

[0035] 杂环胺8-MeIQ_x抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0036] 免疫动物选用雌性大白兔,首次免疫采用背部多点皮下注射和腿部肌肉注射免疫,加强免疫采用背部多点皮下注射免疫;初免后进行四次加强免疫,具体做法分别是:

[0037] 初次免疫：取1mg上述免疫原溶于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；

[0038] 加强免疫：用1mg上述免疫原溶于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；加强免疫分别于初次免疫后2、4和6周后免疫三次，此后加强免疫间隔为一个月；从第二次加强免疫开始，免疫后第9天时由兔子的耳缘静脉取血，进行效价检测；

[0039] 抗体纯化：定时监测动物抗体效价，当抗体对权利要求5所述的杂环胺8-MeIQ_x包被原效价达到较高水平时，采集血液，并离心获得抗血清，使用ProteinA-Sepharose 4B蛋白亲和层析柱对抗血清进行纯化，制备得到权利要求7所述的多克隆抗体。

[0040] 杂环胺8-MeIQ_x抗体的应用，所述的杂环胺8-MeIQ_x抗体应用于喹啉类杂环胺(IQ、MeIQ)、喹喔啉类杂环胺(IQ_x、8-MeIQ_x、4,8-DiMeIQ_x、7,8-DiMeIQ_x、4,7,8-TriMeIQ_x)以及吡啶类杂环胺(PhIP) 8种极性杂环胺总含量的免疫检测。

[0041] 杂环胺8-MeIQ_x抗体的应用，包括如下步骤：

[0042] (1) 包被：用包被液把包被抗原稀释，然后以每孔100μL包被于96孔酶标板上，4℃孵育过夜或37℃孵育3h；

[0043] (2) 洗板：加入洗涤液PBST，每孔加入250μL，于振荡器上振荡2min，弃去PBST，重复洗板3次；

[0044] (3) 封闭：每孔加入200μL封闭液，于37℃封闭1h，然后弃去封闭液，用PBST重复洗板3次；

[0045] (4) 加样：每孔先加入50μL的杂环胺8-MeIQ_x标准溶液或样品溶液，然后各加入50μL的抗体，加样完毕后，在37℃下竞争反应1h，然后用PBST重复洗板4次；

[0046] (5) 加羊抗兔HRP标记二抗：把羊抗兔HRP标记二抗用PBS稀释适当浓度，每孔100μL加样，37℃下孵育30min，用PBST重复洗板5次；

[0047] (6) 显色：每孔加入100μL混匀后的底物液，37℃下反应15-20min；

[0048] (7) 终止：每孔加入50μL的硫酸终止液，终止显色反应；

[0049] (8) 读数：在双波长方式，450nm为测定波长，650nm为参比波长，下用酶标仪测定各孔的吸光度值；抑制率的计算公式如式所示：

$$[0050] \quad \text{抑制率(\%)} = \frac{OD_{\text{对照}} - OD}{OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}}} \times 100\%$$

[0051] 式中：OD_{对照}：加PBS和抗体的微孔的吸光度值；

[0052] OD_{空白}：只加PBS的微孔的吸光度值；

[0053] OD：加了抗体和标准品或样品的微孔的吸光度值。

[0054] 本发明制备出广谱性杂环胺的通用型抗体，建立简单、快速的杂环胺酶联免疫检测方法，为食品中有害物的检测提供了一种可靠的技术支撑。

[0055] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果：

[0056] 该设计、合成的半抗原与喹啉类、喹喔啉类和吡啶类杂环胺相似程度高，对上述几种杂环胺的特征结构保留完整，充分暴露极性杂环胺的抗原决定簇，为制备广谱性良好的抗体奠定了基础；制备有结构差异的包被原，与抗体组成抗原抗体竞争反应系统，利用抗体识别差异化提高方法灵敏度。

[0057] 其抗体具有良好的灵敏度,检测限(以8-MeIQx计算)达到10.92 μ g/L;同时对极性杂环胺具有良好的广谱识别性,8种极性杂环胺的交叉反应率均高达94%以上。

[0058] 本发明合成半抗原的方法与其他方法相比较,操作简单方便,更加易于推广普及,并且提供的快速检测方法简便、快速,而且检测的精确度可达90%以上,非常适合快速定量检测的需要。因此,本发明不仅在实验室检测中表现出色,并为开发出成本低廉、检测效率高、操作简便的酶联免疫快速检测工具,奠定了基础,具有良好的应用前景,既有经济效益又有社会效益。

附图说明

[0059] 图1为杂环胺酶联免疫检测方法的标准曲线(以8-MeIQx计)

具体实施方式

[0060] 实施例中所用到的各物质都是从市场上购买的。

[0061] 实施例一

[0062] 1. 杂环胺8-MeIQx半抗原的制备

[0063] 将20mg琥珀酸酐溶于5mL无水二氯甲烷,加入溶有21mg的8-MeIQx的15mL无水二氯甲烷溶液中并在40℃下回流3h,并由薄层色谱(Thin Layer Chromatography, TLC)监测(展开剂组分及比例为二氯甲烷:无水甲醇:氨水=9:1:0.1, v/v),反应终止后,60℃减压旋蒸除去溶剂即杂环胺8-MeIQx半抗原(分子量:313.31)。

[0064] 2. 杂环胺8-MeIQx免疫原的制备:

[0065] 称取杂环胺8-MeIQx半抗原0.97mg于4mL棕色瓶中,用400 μ L DMF溶解;称取1.07mg NHS、0.9mg EDC加入到棕色瓶中,室温搅拌18h,进行活化;称取20mg KLH蛋白溶解在4mL的pH8.0的磷酸缓冲液中;将制得的活化液缓慢滴加到蛋白质溶液中,5 μ L/2min,加完后,4℃反应12h;再将所得反应溶液在4℃用pH7.4的0.01M的磷酸缓冲液中透析3d,每天换四次透析液,最后将透析液取出,得到杂环胺8-MeIQx免疫原。

[0066] 3. 杂环胺8-MeIQx包被原的制备方法

[0067] 称取13.8mg杂环胺8-MeIQx半抗原于4mL棕色瓶中,用400 μ L DMF溶解;称取15.2mg NHS、12.6mg EDC加入到棕色瓶中,室温搅拌18h,进行活化;称取20mg OVA蛋白溶解在4mL的pH8.0的磷酸缓冲液中;将制得的活化液缓慢滴加到蛋白质溶液中,5 μ L/2min,加完后,4℃反应12h;再将所得反应溶液在4℃用pH7.4的0.01M的磷酸缓冲液中透析3d,每天换四次透析液,最后将透析液取出,得到杂环胺8-MeIQx包被原。

[0068] 4. 杂环胺8-MeIQx抗体的制备

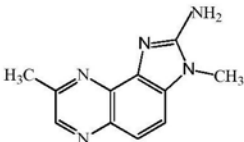
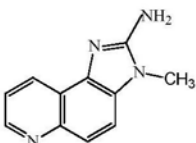
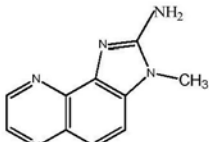
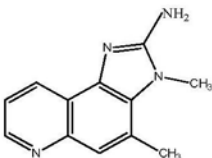
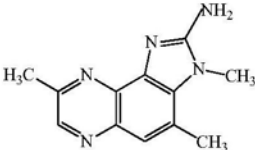
[0069] 免疫动物选用雌性大白兔,首次免疫采用背部多点皮下注射和腿部肌肉注射免疫,加强免疫采用背部多点皮下注射免疫;初免后进行四次加强免疫,具体做法分别是:初次免疫:取1mg上述免疫原溶于0.9%的NaCl溶液和弗氏完全佐剂等体积所配制的溶液中,进行动物免疫;加强免疫:用1mg上述免疫原溶于0.9%的NaCl溶液和弗氏不完全佐剂等体积所配制的溶液,进行动物免疫;加强免疫分别于初次免疫后2、4和6周后免疫三次,此后加强免疫间隔为一个月;从第二次加强免疫开始,免疫后第9天时由兔子的耳缘静脉取血,进行效价检测;抗体对杂环胺8-MeIQx包被原效价达到较高水平时,采集血液,并离心获得抗

血清,使用ProteinA-Sepharose 4B蛋白亲和层析柱对抗血清进行纯化,制备得到权利要求4所述的多克隆抗体。

[0070] 利用方阵实验分别确定包被原的包被量为每孔0.05 μ g,抗体稀释倍数为1:2000,酶标二抗稀释倍数为1:20000,在此条件下测定抗体特异性。以抗体与结构类似化合物的交叉反应程度,以抑制抗体最大结合率的50%所需目标分析物的IC₅₀值与所需各种结构类似化合物的IC₅₀值之比的百分数表示,即交叉反应率CR(%)。交叉反应率结果见表1,喹啉类杂环胺(IQ、MeIQ)、喹喔啉类杂环胺(IQ_x、8-MeIQ_x、4,8-DiMeIQ_x、7,8-DiMeIQ_x、4,7,8-TriMeIQ_x)以及吡啶类杂环胺(PhIP) 8种极性杂环胺的交叉反应率均高达94%以上,说明此抗体可以同时识别这8种杂环胺,且对每一种杂环胺的识别能力非常接近,因此方法可以实现8种极性杂环胺总含量的免疫检测。

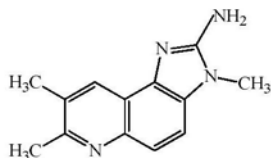
[0071] 表1 8-MeIQ_x杂环胺抗体对几种杂环胺的交叉反应率

[0072]

化合物名称	结构式	IC ₅₀ (μ g/L)	交叉反应率(%)
8-MeIQ _x		99.08	100.00
IQ		102.42	96.74
IQ _x		98.98	100.10
MeIQ		104.86	94.49
4,8-DiMeIQ _x		102.88	96.31

[0073]

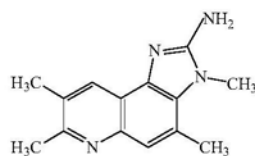
7,8-DiMeIQx



98.37

100.72

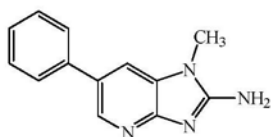
4,7,8-TriMeIQx



91.73

108.01

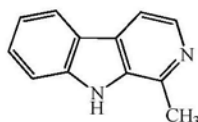
PhIP



104.51

94.80

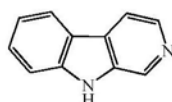
Harman



>2000

< 0.01

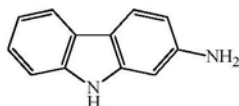
Norharman



>2000

< 0.01

AαC



>2000

< 0.01

[0074] 实施例二

[0075] 使用实施例1得到的杂环胺抗体进行免疫检测,以8-MeIQx为标准目标物建立标准曲线,方法检测结果作为食品中喹啉类杂环胺(IQ、MeIQ)、喹啉类杂环胺(IQx、8-MeIQx、4,8-DiMeIQx、7,8-DiMeIQx、4,7,8-TriMeIQx)以及吡啶类杂环胺(PhIP)8种极性杂环胺的总含量。

[0076] (1) 包被:用包被液把包被抗原适当稀释,然后以每孔100μL包被于96孔酶标板上,4℃孵育过夜或37℃孵育3h。

[0077] (2) 洗板:加入洗涤液PBST,每孔加入250μL,于振荡器上振荡2min,弃去PBST,重复洗板3次;

[0078] (3) 封闭:每孔加入200μL封闭液,于37℃封闭1h,然后弃去封闭液,用PBST重复洗板3次;

[0079] (4) 加样:每孔先加入50μL的杂环胺8-MeIQx标准溶液或样品溶液,然后各加入50μL的抗体,加样完毕后,在37℃下竞争反应1h,然后用PBST重复洗板4次;

[0080] (5) 加羊抗兔HRP标记二抗:把羊抗兔HRP标记二抗用PBS稀释适当浓度,每孔100μL加样,37℃下孵育30min,用PBST重复洗板5次。

[0081] (6) 显色: 每孔加入100μL混匀后的底物液, 37℃下反应15min;

[0082] (7) 终止: 每孔加入50μL的硫酸终止液, 终止显色反应。

[0083] (8) 读数: 在双波长方式 (450nm为测定波长, 650nm为参比波长) 下用酶标仪测定各孔的吸光度值。目标分析物浓度对抗体的抑制率 $I = [(A_{\max} - A_{\min}) - (A_i - A_{\min}) / (A_{\max} - A_{\min})] \times 100$, 抗体与抗原的结合率 $B/B_0 = (A_i - A_{\min}) / (A_{\max} - A_{\min}) \times 100$, 式中: A_{\max} 空白孔平均吸光值; A_{\min} 免疫前免血清对照孔平均吸光值。 A_i 加样孔平均吸光值。以抑制率或结合率 B/B_0 为纵坐标、分析物浓度为横坐标绘制标准曲线, 如图1, 检测限为 $10.92 \pm 1.02 \mu\text{g/L}$ (以8-MeIQ_x计)。

[0084] 标准曲线中, X轴为杂环胺8-MeIQ_x浓度, Y轴为杂环胺8-MeIQ_x标准品在各浓度下对抗体的抑制率, 是典型的S型曲线。

[0085] 如图1所示, 计算杂环胺间接竞争ELISA方法的灵敏度 (IC_{50} 值, 以8-MeIQ_x计算) 与检出限 (IC_{15} 值, 以8-MeIQ_x计算) 分别为: $99.08 \pm 3.05 \mu\text{g/L}$ 和 $10.92 \pm 1.02 \mu\text{g/L}$

[0086] 以上所述仅为本发明创造的较佳实施例而已, 并不用以限制本发明创造, 凡在本发明创造的精神和原则之内, 所作的任何修改、等同替换、改进等, 均应包含在本发明创造的保护范围之内。

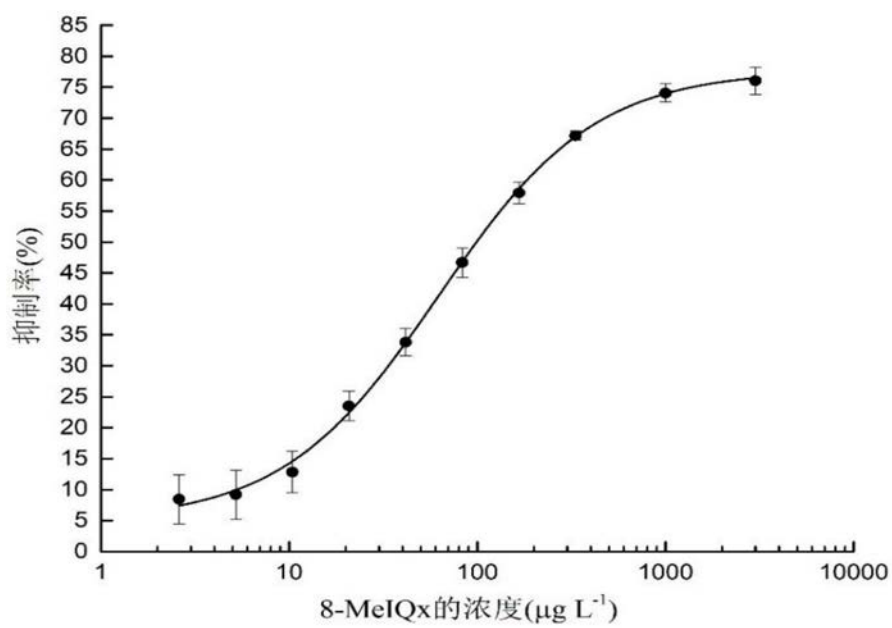


图1

专利名称(译)	一种杂环胺8-MeIQx半抗原、抗体及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN110117286A	公开(公告)日	2019-08-13
申请号	CN201910445688.7	申请日	2019-05-27
[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	生威 王硕 赵秋霞 张燕		
发明人	生威 王硕 赵秋霞 张燕		
IPC分类号	C07D487/04 C07K14/795 C07K14/77 C07K11/107 C07K16/44 C07K16/06 G01N33/53 G01N33/536 G01N33/543 G01N33/574		
CPC分类号	C07D487/04 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/06 C07K16/065 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/53 G01N33/536 G01N33/543 G01N33/574		
代理人(译)	郭乐		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种杂环胺8-MeIQx半抗原、抗体及其制备方法和应用，涉及杂环胺半抗原合成、人工完全抗原和抗体的制备及其酶联免疫分析方法的建立。本发明针对杂环胺检测的高通量和快速样品制备的要求，克服了已有理化分析方法繁琐复杂、成本较高、分析速度慢的问题，建立了灵敏、高效、快速、准确的免疫分析技术。使用该抗体建立的检测食品中杂环胺的方法具有良好的灵敏度并可以同时识别包括8-MeIQx在内的8种极性杂环胺，具有良好的广谱性，检测限(以8-MeIQx计算)为10.92 $\mu\text{g/L}$ ，并且检测方法成本低廉，操作简便，适合于食品中极性杂环胺总量的快速检测。

