



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103833845 A

(43) 申请公布日 2014. 06. 04

(21) 申请号 201310644040. 5

(22) 申请日 2013. 12. 05

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800 号江南大学食品学院

(72) 发明人 匡华 胥传来 严会娟 刘丽强
徐丽广 马伟 宋珊珊

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
(普通合伙) 32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

C07K 14/77(2006. 01)

C07K 14/765(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

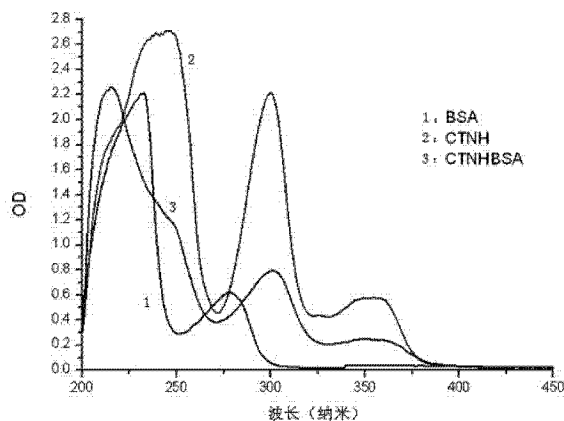
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种百菌清人工抗原的合成方法

(57) 摘要

一种百菌清人工抗原的合成方法,属于生物化工技术领域。本发明以百菌清原药与6-氨基己酸反应得到具有羧基产物为半抗原 CTNH,再用碳二亚胺法将CTNH与载体蛋白牛血清白蛋白BSA 偶联得偶联物CTNH-BSA 用作免疫抗原,将CTNH与载体蛋白鸡卵清白蛋白OVA 偶联得偶联物CTNH-OVA 用作包被抗原,用紫外法测定偶联物的偶联比。本发明成功合成了百菌清人工抗原,合成步骤简洁,有效,完全可用于免疫分析中,为以后人们的研究提供了必需的人工抗原。



1. 一种百菌清人工抗原的合成方法,其特征在于:百菌清原药与6-氨基己酸反应得到具有羧基的半抗原CTNH,再用碳二亚胺法将CTNH与载体蛋白牛血清白蛋白BSA偶联得偶联物CTNH-BSA用作免疫抗原,将CTNH与载体蛋白鸡卵清白蛋白OVA偶联得偶联物CTNH-OVA用作包被抗原,用紫外法测定偶联物的偶联比;步骤为:

(1)半抗原的合成:称取百菌清原药1.9mmol,KOH 1.9mmol,6-氨基己酸2mmol,将这三种药物溶于20mL乙醇,60℃反应12h,再在90℃反应12h,将反应物旋转蒸发,再用20mL水溶解,用盐酸调pH至4-5,产生沉淀,将沉淀烘干即为半抗原CTNH,用液质连用技术进行鉴定与分析;

(2)免疫抗原CTNH-BSA的制备

制备A液:称取35.8mg CTNH,1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺EDC 56.9mg,N-羟基丁二酰亚胺NHS 35.6mg,用1mL无水二甲基甲酰胺DMF溶解,室温搅拌反应8h,得A液;

制备B液:称取牛血清白蛋白BSA 112mg溶于20mL pH7.2的0.01mol/L PBS中,得B液;

在室温条件下,逐滴将A液加入到B液中,室温反应过夜,即得偶联物CTNH-BSA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;

将偶联物CTNH-BSA混合液放入透析袋于0.01mol/L的PBS中透析3天,每天三次换液;CTNH-BSA用作免疫抗原;

(3)包被抗原CTNH-OVA的制备

制备C液:称取40mg CTNH,溶于1mL无水DMF,依次滴加32μL三正丁胺和17.5μL的氯甲酸异丁酯,4℃搅拌反应1h,得C液;

制备D液:称取鸡卵清白蛋白OVA 166mg溶于30mL的PBS中,得D液;在4℃下,逐滴将C液加入到D液中,4℃反应5h,即得偶联物CTNH-OVA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;

将偶联物CTNH-OVA混合液放入透析袋于0.01mol/L的PBS中透析3天,每天三次换液,CTNH-OVA用作包被抗原;

(4)百菌清人工抗原的鉴定

①采用液质连用技术鉴定半抗原;

②人工抗原采用紫外法鉴定其偶联结果,根据偶联物中小分子与蛋白的浓度,计算其偶联比。

一种百菌清人工抗原的合成方法

技术领域

[0001] 一种百菌清人工抗原的合成方法,属于生物化工技术领域。

背景技术

[0002] 百菌清是一种广谱有机氯杀菌剂,对各种农作物及各种绿化草坪等的真菌病害具有预防作用。百菌清没有内吸传导作用,但一旦喷到植物体上之后,就能在其体表具有良好的黏着性,不易被雨水冲刷掉,因此药效期较长,再加上其广泛使用,因此,百菌清及其代谢产物在植物与土壤都有较大的残留,甚至在北极地区都有检测到。目前检测百菌清的方法主要是气相色谱法(GC)和液相色谱法(HPLC)等仪器方法,但是这些方法存在操作繁琐,耗时,费用比较贵等缺点,不能实现大量样品的快速检测,因此建立一种快速简便的百菌清检测方法具有重要意义。酶联免疫法(ELISA)是一种极为高效、敏感、快速的检测方法,然而得到高亲和力和高特异性的单克隆抗体是免疫学检测的前提,其中人工抗原的合成是其中重要的一步。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种百菌清人工抗原的合成方法。所制备的产品用于百菌清免疫分析方法研究,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:一种百菌清人工抗原的合成方法,百菌清原药与6-氨基己酸反应得到具有羧基的半抗原CTNH,再用碳二亚胺法将CTNH与载体蛋白牛血清白蛋白BSA偶联得偶联物CTNH-BSA用作免疫抗原,将CTNH与载体蛋白鸡卵清白蛋白OVA偶联得偶联物CTNH-OVA用作包被抗原,用紫外法测定偶联物的偶联比;步骤为:

(1)半抗原的合成:称取百菌清原药500mg(1.9mmol),KOH 106.6mg(1.9mmol),6-氨基己酸262mg(2mmol),将这三种药物溶于20mL乙醇,60℃反应12h,再在90℃反应12h,将反应物旋转蒸发,再用20mL水溶解,用盐酸调pH至4-5,产生沉淀,将沉淀烘干即为半抗原CTNH,用液质连用技术进行鉴定与分析;

(2)免疫抗原CTNH-BSA的制备

制备A液:称取35.8mg CTNH,1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)56.9mg,N-羟基丁二酰亚胺(NHS)35.6mg,用1mL无水二甲基甲酰胺(DMF)溶解,室温搅拌反应8h,得A液;

制备B液:称取牛血清白蛋白(BSA)112mg溶于20mL pH7.2的0.01mol/L PBS中,得B液;

在室温条件下,逐滴将A液加入到B液中,室温反应过夜,即得偶联物CTNH-BSA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;

将偶联物CTNH-BSA混合液放入透析袋于0.01mol/L的PBS中透析3天,每天三次换液;

CTNH-BSA 用作免疫抗原；

(3) 包被抗原 CTNH-OVA 的制备

制备 C 液：称取 40mg CTNH，溶于 1mL 无水 DMF，依次滴加 32 μ L 三正丁胺和 17.5 μ L 的氯甲酸异丁酯，4 $^{\circ}$ C 搅拌反应 1h，得 C 液；

制备 D 液：称取鸡卵清白蛋白(OVA)166mg 溶于 30mL 的 PBS 中，得 D 液；在 4 $^{\circ}$ C 下，逐滴将 C 液加入到 D 液中，4 $^{\circ}$ C 反应 5h，即得偶联物 CTNH-OVA 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 $^{\circ}$ C 的去离子水冲洗 3min，保存在 4 $^{\circ}$ C 去离子水中备用；

将偶联物 CTNH-OVA 混合液放入透析袋于 0.01mol/L 的 PBS 中透析 3 天，每天三次换液，CTNH-OVA 用作包被抗原；

(4) 百菌清人工抗原的鉴定

① 采用液质连用技术鉴定半抗原；

② 人工抗原采用紫外法鉴定其偶联结果，根据偶联物中小分子与蛋白的浓度，计算其偶联比。

[0005] 百菌清人工抗原的鉴定

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。紫外法是依据合成的人工抗原中的小分子浓度与蛋白浓度的比确定偶联比的。

[0006] 偶联物蛋白浓度测定：将反应前蛋白的质量除以透析后偶联物的体积即可得到偶联物中蛋白的含量。

[0007] 偶联物中小分子浓度的测定：浓度为 10 μ g/mL 的小分子在特征峰 355nm 处的吸光值 $A_1=0.57826$ ，偶联物在 355nm 处的吸光值 $A_2=0.35219$ ，小分子的分子量为 360.61g/mol，所以，偶联物中小分子的浓度 $= (0.35219 \times 10 \mu\text{g/mL}) / 0.57826$

$= 6.09 \mu\text{g/mL}$ ；偶联比 $= [(6.09 \mu\text{g/mL} / 360.61) / (3.33\text{mg/mL} / 68000)] \times 12$ (稀释倍数) $= 4$ 。

[0008] 本发明的有益效果：本发明成功合成了百菌清人工抗原，合成步骤简洁，有效，完全可用于免疫分析中，为以后人们的研究提供了方便的途径。

附图说明

[0009] 图 1 合成半抗原的液质连用(LC/MS)鉴定图。

[0010] 1-a：在总离子图中可以看到在时间为 4.16 分钟的时候，有一个较强的出峰。

[0011] 1-b：CTNH 的分子量 359，在质谱负离子扫描模式下，分子离子峰为 358(M-1)。

[0012] 图 2 合成免疫抗原 CTNH-BSA 的紫外鉴定图。

[0013] 图 3 合成包被抗原 CTNH-OVA 的紫外鉴定图。

具体实施方式

[0014] 实施例 1

(1) 半抗原的合成：称取百菌清原药 500mg (1.9mmol)，KOH 106.6mg (1.9mmol)，6-氨基己酸 262mg (2mmol)，将这三种药物溶于 20mL 乙醇，60 $^{\circ}$ C 反应 12h，再在 90 $^{\circ}$ C 反应 12h。将

反应物旋转蒸发,再用 20mL 水溶解,用盐酸调 pH 至 4-5,产生沉淀,将沉淀烘干即为半抗原 CTNH。用液质连用技术进行鉴定与分析。

[0015] (2) 偶联物 CTNH-BSA 的制备

称取 35.8mg CTNH,1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺 (EDC) 56.9mg, N-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 35.6mg,用 1mL 无水二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解(称为 A 液),室温搅拌反应 8h。称取牛血清白蛋白 (BSA) 112mg 溶于 20mL pH7.2 的 0.01mol/L PBS 中(称为 B 液),在室温条件,逐滴将 A 液加入到 B 液中,室温反应过夜,即得偶联物 CTNH-BSA 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;

将偶联物 CTNH-BSA 混合液放入透析袋于 0.01mol/L 的 PBS 中透析 3 天,每天三次换液。CTNH-BSA 用作免疫抗原;

(3) 偶联物 CTNH-OVA 的制备

称取 40mg CTNH,溶于 1mL 无水 DMF,依次滴加 32 μ L 三正丁胺和 17.5 μ L 的氯甲酸异丁酯(称为 C 液),4℃ 搅拌反应 1h。称取鸡卵清白蛋白 (OVA) 166mg 溶于 30mL 的 PBS 中(称为 D 液)。在 4℃ 下,逐滴将 C 液加入到 D 液中,4℃ 反应 5h,即得偶联物 CTNH-OVA 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;

将偶联物 CTNH-OVA 混合液放入透析袋于 0.01mol/L 的 PBS 中透析 3 天,每天三次换液。CTNH-OVA 用作包被抗原;

百菌清人工抗原的鉴定

采用液质连用技术鉴定半抗原;人工抗原采用紫外法鉴定其偶联结果,根据偶联物中小分子与蛋白的浓度,计算其偶联比。

[0016] 表 1 免疫小鼠的效价与抑制

| | | 包被抗原浓度 (不加百菌清标准品) | | | | | | | | |
|------------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|--|
| | | 1号小鼠 | | 2号小鼠 | | 3号小鼠 | | 4号小鼠 | | |
| 血清 稀 释 倍 数 | | 0.25 $\mu\text{g/mL}$ | 0.125 $\mu\text{g/mL}$ | 0.25 $\mu\text{g/mL}$ | 0.125 $\mu\text{g/mL}$ | 0.25 $\mu\text{g/mL}$ | 0.125 $\mu\text{g/mL}$ | 0.25 $\mu\text{g/mL}$ | 0.125 $\mu\text{g/mL}$ | |
| | 1:1000 | 1.988 | 1.582 | 2.891 | 2.767 | 2.335 | 1.78 | 2.62 | 2.327 | |
| | 1:3000 | 1.098 | 0.782 | 2.411 | 2.125 | 1.409 | 1.016 | 1.773 | 1.474 | |
| | 1:9000 | 0.444 | 0.356 | 1.392 | 1.15 | 0.658 | 0.444 | 0.915 | 0.781 | |
| | 1:27000 | 0.224 | 0.191 | 0.639 | 0.49 | 0.307 | 0.221 | 0.412 | 0.364 | |
| | 加百菌清标准品浓度 20ng/mL | | | | | | | | | |
| | | 0.25 $\mu\text{g/mL}$ | 0.125 $\mu\text{g/mL}$ | 0.25 $\mu\text{g/mL}$ | 0.125 $\mu\text{g/mL}$ | 0.25 $\mu\text{g/mL}$ | 0.125 $\mu\text{g/mL}$ | 0.25 $\mu\text{g/mL}$ | 0.125 $\mu\text{g/mL}$ | |
| | 1:1000 | 1.19 | 0.875 | 2.436 | 1.792 | 1.392 | 0.9 | 1.76 | 1.162 | |
| | 1:3000 | 0.508 | 0.369 | 1.414 | 0.873 | 0.61 | 0.374 | 0.845 | 0.541 | |
| | 1:9000 | 0.225 | 0.184 | 0.57 | 0.371 | 0.254 | 0.168 | 0.336 | 0.269 | |
| 1:27000 | 0.141 | 0.108 | 0.247 | 0.193 | 0.51 | 0.105 | 0.205 | 0.159 | | |

表中数值为在 450nm 处的吸光值。

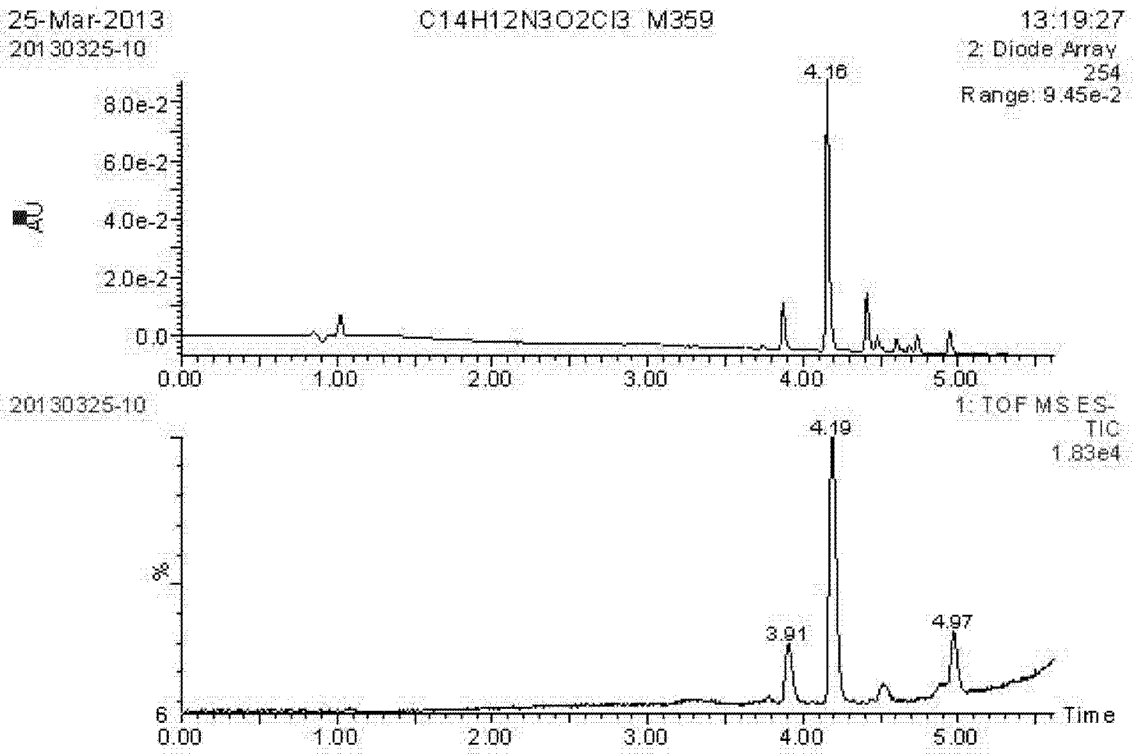


图 1-a

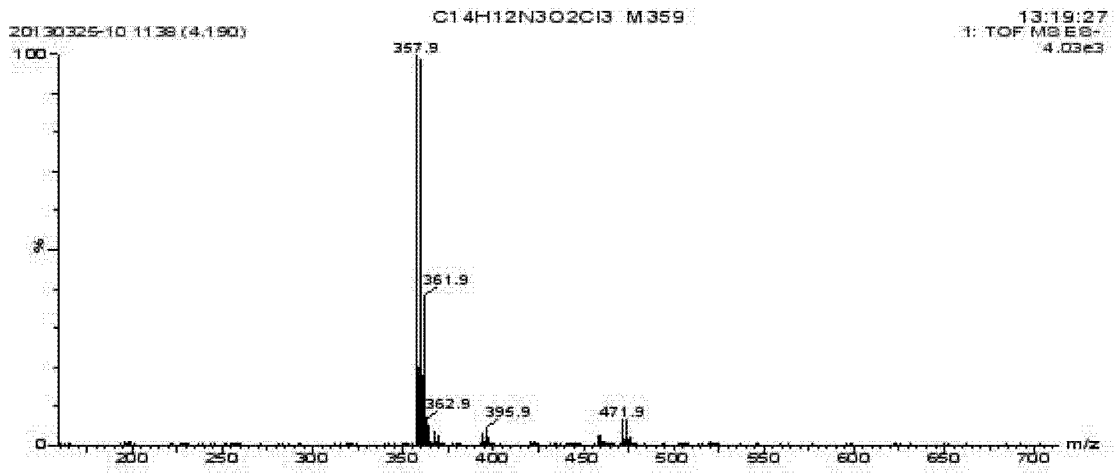


图 1-b

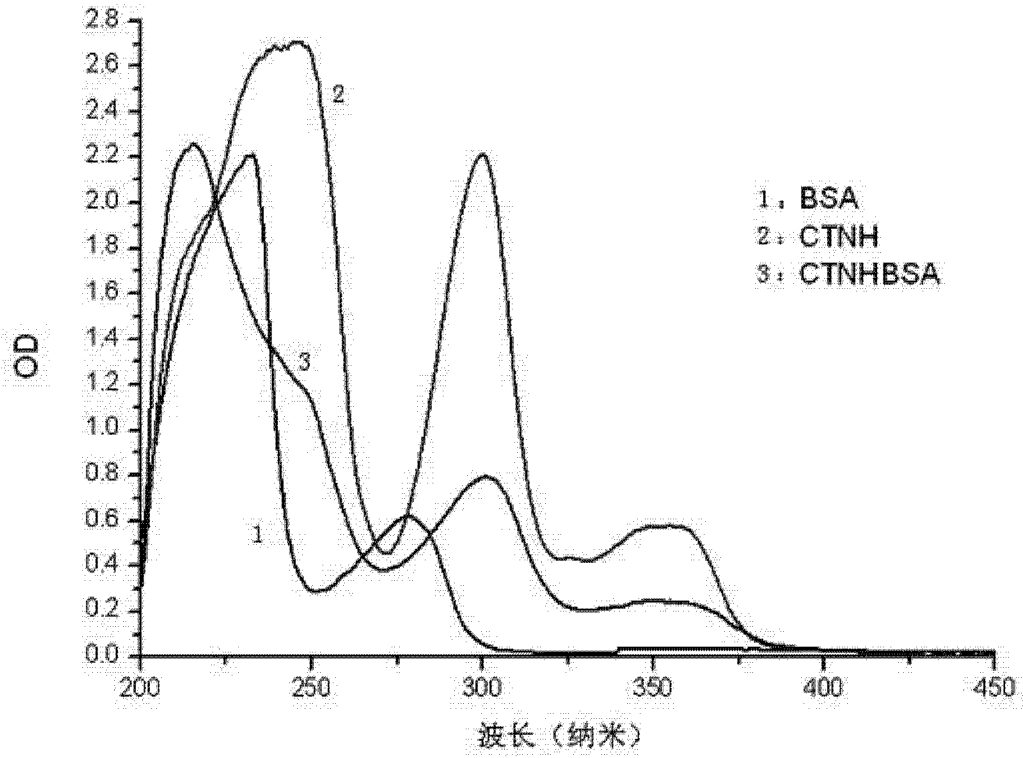


图 2

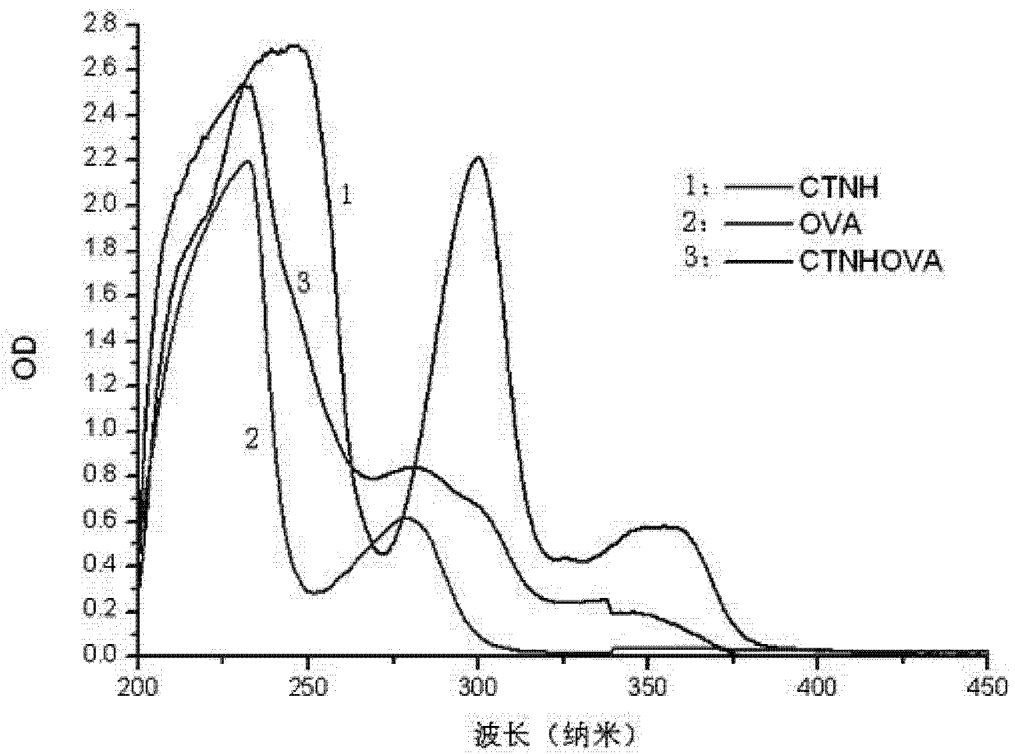


图 3

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种百菌清人工抗原的合成方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN103833845A | 公开(公告)日 | 2014-06-04 |
| 申请号 | CN201310644040.5 | 申请日 | 2013-12-05 |
| [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) | 江南大学 | | |
| [标]发明人 | 匡华 胥传来 严会娟 刘丽强 徐丽广 马伟 宋珊珊 | | |
| 发明人 | 匡华 胥传来 严会娟 刘丽强 徐丽广 马伟 宋珊珊 | | |
| IPC分类号 | C07K14/77 C07K14/765 G01N33/68 G01N33/53 | | |
| CPC分类号 | C07K14/765 C07K14/77 C07K19/00 G01N33/68 G01N2430/00 | | |
| 其他公开文献 | CN103833845B | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

一种百菌清人工抗原的合成方法，属于生物化工技术领域。本发明以百菌清原药与6-氨基己酸反应得到具有羧基产物为半抗原CTNH，再用碳二亚胺法将CTNH与载体蛋白牛血清白蛋白BSA偶联得偶联物CTNH-BSA用作免疫抗原，将CTNH与载体蛋白鸡卵清白蛋白OVA偶联得偶联物CTNH-OVA用作包被抗原，用紫外法测定偶联物的偶联比。本发明成功合成了百菌清人工抗原，合成步骤简洁，有效，完全可用于免疫分析中，为以后人们的研究提供了必需的人工抗原。

