



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104744586 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 01

(21) 申请号 201310726618. 1

(22) 申请日 2013. 12. 25

(71) 申请人 深圳先进技术研究院

地址 518055 广东省深圳市南山区西丽大学  
城学苑大道 1068 号

(72) 发明人 万晓春 邹军辉 唐超 王蒲

(74) 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司  
44202

代理人 郝传鑫 熊永强

(51) Int. Cl.

*C07K 14/765*(2006. 01)

*C07K 14/77*(2006. 01)

*C07K 16/44*(2006. 01)

*G01N 33/53*(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种锌完全抗原及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明实施例提供了一种锌完全抗原及其制备方法和应用。该锌完全抗原通过具有硫氰基的双功能螯合剂将锌与载体蛋白连接形成, 双功能螯合剂的一端与锌离子通过化学键连接, 双功能螯合剂的另一端的硫氰基与载体蛋白的氨基偶联。该锌完全抗原兼具免疫反应性和免疫原性, 可用于免疫动物制得特异性识别锌离子的单克隆抗体, 从而建立经济、快速检测金属锌的免疫学检测方法奠定基础。

1. 一种锌完全抗原,其特征在于,所述锌完全抗原由具有硫氰基的双功能整合剂将锌离子与载体蛋白连接形成,所述双功能整合剂的一端与所述锌离子通过化学键连接,所述双功能整合剂的另一端的硫氰基与所述载体蛋白的氨基偶联。

2. 如权利要求1所述的一种锌完全抗原,其特征在于,所述具有硫氰基的双功能整合剂为1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸或p-SCN-Bn-DTPA,所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

3. 如权利要求2所述的一种锌完全抗原,其特征在于,所述牛血清白蛋白与所述锌离子的偶联比为1:44~50,所述卵清蛋白与所述锌离子的偶联比为1:17~20。

4. 一种锌完全抗原的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 制备双功能整合剂1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸溶液;

(2) 将含有锌离子的溶液逐滴加入到所述1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸溶液中,室温下反应,制得锌离子-双功能整合剂复合物;

(3) 将所述锌离子-双功能整合剂复合物逐滴加入到含有载体蛋白的缓冲体系中制得反应混合液,室温下反应,反应结束后离心超滤或透析除去未反应的锌离子和双功能整合剂,制得锌完全抗原,所述锌完全抗原由具有硫氰基的双功能整合剂将锌离子与载体蛋白连接形成,所述双功能整合剂的一端与所述锌离子通过化学键连接,所述双功能整合剂的另一端的硫氰基与所述载体蛋白的氨基偶联。

5. 如权利要求4所述的一种锌完全抗原的制备方法,其特征在于,所述锌离子与所述1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸的摩尔比为1:1。

6. 如权利要求4所述的一种锌完全抗原的制备方法,其特征在于,所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白,所述牛血清白蛋白与所述锌离子的偶联比为1:44~50,所述卵清蛋白与所述锌离子的偶联比为1:17~20。

7. 一种锌完全抗原的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将双功能整合剂p-SCN-Bn-DTPA和载体蛋白在缓冲体系中反应,反应后超滤除去未反应的p-SCN-Bn-DTPA,洗取截留物制得双功能整合剂-载体蛋白复合物;

(3) 在所述双功能整合剂-载体蛋白复合物中逐滴加入含有锌离子的溶液反应,超滤去除未整合的锌离子,制得锌完全抗原,所述锌完全抗原由具有硫氰基的双功能整合剂将锌离子与载体蛋白连接形成,所述双功能整合剂的一端与所述锌离子通过化学键连接,所述双功能整合剂的另一端的硫氰基与所述载体蛋白的氨基偶联。

8. 如权利要求7所述的一种锌完全抗原的制备方法,其特征在于,所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白,所述牛血清白蛋白与所述锌离子的摩尔比为1:44~50,所述卵清蛋白与所述锌离子的摩尔比为1:17~20。

9. 如权利要求7所述的一种锌完全抗原的制备方法,其特征在于,所述双功能整合剂p-SCN-Bn-DTPA和牛血清白蛋白的质量比为1:2,所述双功能整合剂p-SCN-Bn-DTPA和卵清蛋白的质量比为1:3~4。

10. 一种锌完全抗原在制备多克隆抗体、单克隆抗体及锌免疫检测试剂盒中的应用,其特征在于,所述锌完全抗原由具有硫氰基的双功能整合剂将锌离子与载体蛋白连接形成,所述双功能整合剂的一端与所述锌离子通过化学键连接,所述双功能整合剂的另一端的硫氰基与所述载体蛋白的氨基偶联。

## 一种锌完全抗原及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种锌完全抗原及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 重金属锌是人体必需的微量元素,含量少但功用非常重要。锌可通过吸入和食入途径进入人体,摄入量过多可致中毒,如吸入会引起口渴、胸部紧束感、干咳、高热、头晕头痛等;食入锌过多可引起急性锌中毒,有呕吐、腹泻等胃肠道症状;慢性锌中毒可有贫血等症状;动物实验可致肝、肾功能及免疫力受损。有些儿童玩具的涂料含锌,小儿喜把玩具放口内,常食入锌过多可致中毒。

[0003] 在食品安全检测和环境监测中,重金属锌的检测大都采用仪器法(如原子吸收光谱法、电感耦合等离子体质谱分析法等)和化学显色法。仪器法检测结果精确,但是普遍存在仪器昂贵、对检测样品要求高、需专业技术人员操作和在大量样品检测时耗时间长等问题,难以实现现场快速检测的需要。化学显色法灵敏度不够高、较易受样品中其他物质的干扰、在大量样品检测时,所需的耗材较多且耗时较长等。

[0004] 免疫学检测方法是一种简便、快速且高通量的生物化学检测方法,通过抗原和抗体之间的特异性结合反应进行定性和定量检测。建立锌免疫学检测方法的关键在于合成兼具免疫反应性和免疫原性的锌抗原和制备特异性识别锌离子的抗体。而重金属锌分子量很小,仅具有免疫反应性,不具有免疫原性,属于半抗原,无法直接用于免疫动物产生针对锌的特异性抗体,因此无法难以落实针对锌的免疫学检测。

### 发明内容

[0005] 为解决上述问题,本发明实施例提供了一种锌完全抗原及其制备方法和应用。该锌完全抗原通过具有硫氰基的双功能螯合剂将锌与载体蛋白连接形成,兼具免疫反应性和免疫原性,可用于免疫动物制得特异性识别锌离子的单克隆抗体,从而建立经济、快速检测金属锌的免疫学检测方法奠定基础。

[0006] 本发明实施例第一方面提供了一种锌完全抗原,所述锌完全抗原由具有硫氰基的双功能螯合剂将锌离子与载体蛋白连接形成,所述双功能螯合剂的一端与所述锌离子通过化学键连接,所述双功能螯合剂的另一端的硫氰基与所述载体蛋白的氨基偶联。

[0007] 优选地,所述具有硫氰基的双功能螯合剂为 1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸(iEDTA)或 p-SCN-Bn-DTPA。所述 p-SCN-Bn-DTPA 为二乙基三胺五乙酸的衍生物,末端具有活性基团硫氰基。

[0008] 优选地,所述载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA)或卵清蛋白(OVA)。

[0009] 优选地,所述牛血清白蛋白与所述锌离子的偶联比为 1:44 ~ 50。

[0010] 优选地,所述卵清蛋白与所述锌离子的偶联比为 1:17 ~ 20。

[0011] 本发明实施例第二方面提供了一种锌完全抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0012] (1)制备双功能螯合剂 1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸(iEDTA)

溶液；

[0013] (2) 将含有锌离子的溶液逐滴加入到所述 1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸(iEDTA)溶液中,室温下反应,制得锌离子-双功能螯合剂复合物；

[0014] (3) 将所述锌离子-双功能螯合剂复合物逐滴加入到含有载体蛋白的缓冲体系中制得反应混合液,室温下反应,反应结束后离心超滤或透析除去未反应的锌离子和双功能螯合剂,制得锌完全抗原,所述锌完全抗原由具有硫氰基的双功能螯合剂将锌离子与载体蛋白连接形成,所述双功能螯合剂的一端与所述锌离子通过化学键连接,所述双功能螯合剂的另一端的硫氰基与所述载体蛋白的氨基偶联。

[0015] 优选地,步骤(1)中所述锌离子与所述 1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸(iEDTA)的摩尔比为 1:1。

[0016] 优选地,步骤(1)中所述 1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸溶液为将 1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸溶解在二甲基亚砷中制得。

[0017] 优选地,步骤(2)中所述室温下反应为 25℃、125rpm 下反应 3h。

[0018] 优选地,步骤(3)中所述含有载体蛋白的缓冲体系为载体蛋白溶解于 pH 值为 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液中制得,所述 Tris-HCl 缓冲液的摩尔浓度为 0.1mol/L,制得反应混合液后调节所述反应混合液的 pH 值为 9.0 ~ 9.5。

[0019] 优选地,步骤(3)中通过加入三乙胺溶液调节所述反应混合液的 pH 值。

[0020] 优选地,步骤(3)中所述室温下反应为 25℃、125rpm 下反应 24h。

[0021] 优选地,步骤(3)中所述载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA)或卵清蛋白(OVA)。

[0022] 优选地,步骤(3)中加入的所述牛血清白蛋白与所述锌离子的摩尔比为 1:44 ~ 50。

[0023] 优选地,步骤(3)中加入的所述卵清蛋白与所述锌离子的摩尔比为 1:17 ~ 20。

[0024] 本发明实施例第三方面提供了一种锌完全抗原的制备方法,包括以下步骤：

[0025] (1) 将双功能螯合剂 p-SCN-Bn-DTPA 和载体蛋白在缓冲体系中反应,反应后超滤除去未反应的 p-SCN-Bn-DTPA,洗取截留物制得双功能螯合剂-载体蛋白复合物；

[0026] (3) 在所述双功能螯合剂-载体蛋白复合物中逐滴加入含有锌离子的溶液反应,超滤去除未整合的锌离子,制得锌完全抗原,所述锌完全抗原由具有硫氰基的双功能螯合剂将锌离子与载体蛋白连接形成,所述双功能螯合剂的一端与所述锌离子通过化学键连接,所述双功能螯合剂的另一端的硫氰基与所述载体蛋白的氨基偶联。

[0027] 优选地,步骤(1)中所述缓冲体系为 pH 值为 9.4 的 HEPES 缓冲液。

[0028] 优选地,步骤(1)中所述在缓冲体系中反应为反应 24h。

[0029] 优选地,步骤(1)中所述超滤条件为 4℃且 6000r/min。

[0030] 优选地,步骤(1)中所述洗取截留物为用 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液洗取截留物。

[0031] 优选地,步骤(2)中逐滴加入含有锌离子的溶液反应 1h。

[0032] 优选地,步骤(1)中所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

[0033] 优选地,所述牛血清白蛋白与所述锌离子的摩尔比为 1:44 ~ 50。

[0034] 优选地,所述卵清蛋白与所述锌离子的摩尔比为 1:17 ~ 20。

[0035] 优选地,所述双功能螯合剂 p-SCN-Bn-DTPA 和牛血清白蛋白的质量比为 1:2。

[0036] 优选地,所述双功能螯合剂 p-SCN-Bn-DTPA 和卵清蛋白的质量比为 1:3 ~ 4。

[0037] 本发明实施例第四方面提供了一种锌完全抗原在制备多克隆抗体、单克隆抗体及锌免疫检测试剂盒中的应用,所述锌完全抗原由具有硫氰基的双功能螯合剂将锌离子与载体蛋白连接形成,所述双功能螯合剂的一端与所述锌离子通过化学键连接,所述双功能螯合剂的另一端的硫氰基与所述载体蛋白的氨基偶联。

[0038] 本发明实施例提供了一种锌完全抗原及其制备方法和应用。该锌完全抗原通过具有硫氰基的双功能螯合剂将锌与载体蛋白连接形成,兼具免疫反应性和免疫原性,可用于免疫动物制得特异性识别锌离子的单克隆抗体,从而建立经济、快速检测金属锌的免疫学检测方法奠定基础。

### 具体实施方式

[0039] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0040] 本发明实施例提供了一种锌完全抗原及其制备方法和应用。该锌完全抗原通过具有硫氰基的双功能螯合剂将锌与载体蛋白连接形成,兼具免疫反应性和免疫原性,可用于免疫动物制得特异性识别锌离子的单克隆抗体,从而建立经济、快速检测金属锌的免疫学检测方法奠定基础。

[0041] 实施例一

[0042] 一种锌完全抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0043] 称取 0.5mg iEDTA,用 100  $\mu$  L DMSO 溶解,制得 iEDTA 溶液;随后将 100  $\mu$  L 含有 1.0  $\mu$  mol  $Zn^{2+}$  的溶液逐滴加入到 iEDTA 溶液中,25 $^{\circ}C$ 、125rpm 反应 3h,制得  $Zn^{2+}$ -iEDTA 复合物。将 1.5mg BSA 溶解于 800  $\mu$  L,0.1M, pH 值为 7.4 Tris-HCl 缓冲液中制得含有 BSA 的缓冲体系。然后将  $Zn^{2+}$ -iEDTA 复合物逐滴加入到含有 BSA 的缓冲体系中制得反应混合液。加入三乙胺溶液调节反应混合液的 pH 值为 9.0,25 $^{\circ}C$ 、125rpm 反应 24h。反应结束后,用反应混合液加入到已经用 0.1M EDTA  $\cdot$  2Na 预处理的超滤管中,5000g 离心超滤 5 次,每次 10min,除去未偶联上的  $Zn^{2+}$  和 iEDTA。收集离心超滤的截留物即为锌完全抗原。最后可用 PBS 缓冲液重悬截留物,得到总体积为 1mL 的锌完全抗原溶液。所述锌完全抗原溶液可经鉴定后分装,置于 -20 $^{\circ}C$  保存备用。

[0044] 实施例二

[0045] 一种锌完全抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0046] 称取 0.5mg iEDTA,用 100  $\mu$  L DMSO 溶解,制得 iEDTA 溶液;随后将 100  $\mu$  L 含有 1.0  $\mu$  mol  $Zn^{2+}$  的溶液逐滴加入到 iEDTA 溶液中,25 $^{\circ}C$ 、125rpm 反应 3h,制得  $Zn^{2+}$ -iEDTA 复合物。将 2.5mg OVA 溶解于 800  $\mu$  L,0.1M, pH 值为 7.4 Tris-HCl 缓冲液中制得含有 BSA 的缓冲体系。然后将  $Zn^{2+}$ -iEDTA 复合物逐滴加入到含有 OVA 的缓冲体系中制得反应混合液。加入三乙胺溶液调节反应混合液的 pH 值为 9.0,25 $^{\circ}C$ 、125rpm 反应 24h。反应结束后,用反应液加入到已经用 0.1M EDTA  $\cdot$  2Na 预处理的超滤管中,5000g 离心超滤 5 次,每次 10min,除去未偶联上的  $Zn^{2+}$  和 iEDTA。收集离心超滤的截留物即为锌完全抗原。最后可用 PBS 缓冲液重悬截留物,得到总体积为 1mL 的锌完全抗原溶液。所述锌完全抗原溶液可经鉴定后

分装,置于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

[0047] 实施例三

[0048] 一种锌完全抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0049] 先将 2mg 的 p-SCN-Bn-DTPA 和 4.0mg 的 BSA 蛋白在 pH 值为 9.4 的 HEPES 缓冲液中反应 24h 后,在  $4^{\circ}\text{C}$ 、6000r/min 的条件下,超滤 5min 去除未偶联上的 p-SCN-Bn-DTPA,再用 pH 值为 7.4 的 HEPES 缓冲液洗取截留物,然后逐滴加入 100  $\mu\text{L}$  含有 3.0  $\mu\text{mol}$   $\text{Zn}^{2+}$  的溶液,室温反应 1h 后,超滤去除未整合的  $\text{Zn}^{2+}$ 。收集超滤的截留物即为锌完全抗原。可再用反应缓冲液稀释截留物,最终得到 2mL 的溶液。使用前,用 100mmol/L DTPA 和 0.1mol/L, pH7.4 的 HEPES 缓冲液对超滤离心管预处理。

[0050] 实施例四

[0051] 一种锌完全抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0052] 先将 2mg 的 p-SCN-Bn-DTPA 和 6.5mg 的 OVA 蛋白在 pH 值为 9.4 的 HEPES 缓冲液中反应 24h 后,在  $4^{\circ}\text{C}$ 、6000r/min 的条件下,超滤 5min 去除未偶联上的 p-SCN-Bn-DTPA,再用 pH 值为 7.4 的 HEPES 缓冲液洗取截留物,然后逐滴加入 100  $\mu\text{L}$  含有 3.0  $\mu\text{mol}$   $\text{Zn}^{2+}$  的溶液,室温反应 1h 后,超滤去除未整合的  $\text{Zn}^{2+}$ 。收集超滤的截留物即为锌完全抗原。可再用反应缓冲液稀释截留物,最终得到 2mL 的溶液。使用前,用 100mmol/L DTPA 和 0.1mol/L, pH7.4 的 HEPES 缓冲液对超滤离心管预处理。

专利名称(译)	一种锌完全抗原及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN104744586A</a>	公开(公告)日	2015-07-01
申请号	CN201310726618.1	申请日	2013-12-25
[标]申请(专利权)人(译)	深圳先进技术研究院		
申请(专利权)人(译)	深圳先进技术研究院		
当前申请(专利权)人(译)	深圳先进技术研究院		
[标]发明人	万晓春 邹军辉 唐超 王蒲		
发明人	万晓春 邹军辉 唐超 王蒲		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 G01N33/53		
CPC分类号	C07K19/00 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 G01N33/53 G01N33/577		
代理人(译)	熊永强		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明实施例提供了一种锌完全抗原及其制备方法和应用。该锌完全抗原通过具有硫氰基的双功能螯合剂将锌与载体蛋白连接形成，双功能螯合剂的一端与锌离子通过化学键连接，双功能螯合剂的另一端的硫氰基与载体蛋白的氨基偶联。该锌完全抗原兼具免疫反应性和免疫原性，可用于免疫动物制得特异性识别锌离子的单克隆抗体，从而建立经济、快速检测金属锌的免疫学检测方法奠定基础。