



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101962368 A

(43) 申请公布日 2011.02.02

(21) 申请号 201010256925.4

(22) 申请日 2010.08.17

(71) 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483 号

(72) 发明人 孙远明 雷红涛 沈玉栋

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 林丽明

(51) Int. Cl.

C07D 251/32 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/77 (2006.01)

C07K 14/795 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 5 页

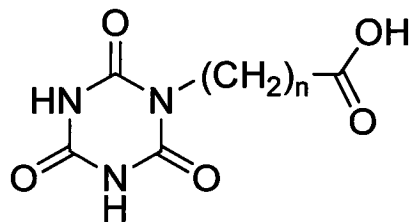
(54) 发明名称

氰脲酸半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种氰脲酸半抗原、人工抗原、抗体及其制备方法和应用。本发明以 1,3,5-三嗪-2,4,6-(1H,3H,5H)-三酮与溴代羧酸苯酯反应生成含羧基的半抗原;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,获得氰脲酸特异性抗体。本发明所述抗体可用于氰脲酸免疫检测,实现氰脲酸现场快速检测,保障食品安全。

1. 一种氰脲酸人工半抗原,其特征在于是将 1,3,5-三嗪-2,4,6-(1H,3H,5H)-三酮与溴代羧酸苄酯反应制备得到,具有式(I)所示分子结构:



(I)

其中, n 为 $-CH_2$ 基团数目, $n = 1 \sim 8$ 。

2. 一种权利要求 1 所述氰脲酸人工半抗原的制备方法,其特征包括以下步骤:

(1) 将氰脲酸和溴代羧酸苄酯装入圆底烧瓶中,加入少量 N,N -二甲基甲酰胺溶解反应物;

(2) 往步骤(1)溶解好的体系中加入与氰脲酸等物质量的催化剂,反应后减压蒸除 N,N -二甲基甲酰胺,用四氢呋喃溶解残渣 A,过滤,滤液浓缩至干,得残渣 B;

(3) 残渣 B 用二氯甲烷 + 甲醇 (95+5) 为展开剂柱层析,获得中间产物,用过量氢氧化钾溶液充分水解中间产物,再用浓盐酸酸化,蒸干溶剂得白色固体,白色固体用冷水洗涤后得目标半抗原。

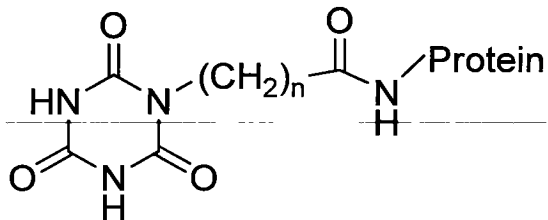
3. 根据权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于步骤(1)所述氰脲酸和溴代羧酸苄酯的投料摩尔比为 $6 : 1 \sim 1 : 1$;步骤(1)所述溴代羧酸苄酯为 $n = 1 \sim 8$ 的溴代羧酸苄酯。

4. 根据权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于步骤(2)所述催化剂为碳酸钾、三乙胺或 4-二甲氨基吡啶。

5. 根据权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于步骤(2)所述反应的反应温度为 $40 \sim 80^\circ\text{C}$,反应时间为 $5 \sim 24\text{h}$ 。

6. 根据权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于步骤(3)所述浓盐酸酸化是将中间产物酸化至 pH 值为 $3 \sim 6$ 。

7. 一种氰脲酸人工抗原,其特征在于是将权利要求 1 所述的氰脲酸半抗原与蛋白质偶联制备得到,具有式(II)所示分子结构:



(II)

其中, n 为 $-CH_2$ 基团数目, $n = 1 \sim 8$ 。

8. 一种权利要求 7 所述氰脲酸人工抗原的制备方法,其特征在于采用活泼脂法或者混合酸酐法将权利要求 1 所述的氰脲酸半抗原与蛋白质偶联。

9. 根据权利要求 8 所述的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 将所述半抗原溶解于溶剂中,所述溶剂优选二氧六环或二甲基甲酰胺;

(2) 往步骤(1)溶解好的体系中加入二环己基碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺,室温反应后离心除去沉淀,得上清液;二环己基碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺加入量优选按照摩尔比 1:1 的比例确定;

(3) 将上清液滴入 pH 值为 7.4~9.55 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中,缓冲液中含有 10mg/mL 的载体蛋白,反应 2~4h 后,将反应液装入透析袋,用 0.85% 的生理盐水透析 3~4 天,得人工抗原;

或者包括以下步骤:

(1) 将权利要求 2 或 3 制备得到的半抗原溶解于溶剂中;所述溶剂优选二氧六环或二甲基甲酰胺;

(2) 往步骤(1)体系中加入氯甲酸异丁酯,4°C 反应得甲液;

将载体蛋白溶于 1mol/L pH 值为 9.6 的碳酸氢钠缓冲液中,得乙液;载体蛋白优选 BSA 或 KLH 或 CONA 或 THY 或 OVA;

(3) 将甲液缓慢滴加到乙液中,4°C 搅拌反应过夜,将反应液装入透析袋,用 0.85% 的生理盐水透析 3d,得人工抗原。

10. 一种权利要求 7 所述抗原的应用,其特征在于应用于制备特异性抗体或氰脲酸免疫检测方面。

氰脲酸半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用

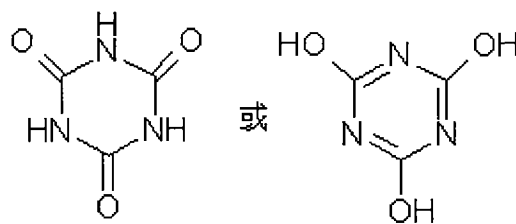
技术领域

[0001] 本发明属于食品安全技术领域。具体涉及氰脲酸半抗原、人工抗原和抗体的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 氰脲酸又名 1,3,5-三嗪-2,4,6-(1H,3H,5H)-三酮, S-三嗪-2,4,6-三醇, 异氰脲酸, 2,4,6-三(2-羟基-4-正丁氧基苯基)-1,3,5-三嗪, 对称三羟基三氮杂苯, 2,4,6-三羟基-1,3,5-三嗪, 均三嗪三醇, 2,4,6-三羟基-1,3,5-三嗪, CAS 号:108-80-5, 结构式为:

[0003]



[0004] 氰脲酸可以作为三聚氰胺的一种杂质出现; 氰脲酸也是美国食品和药品管理局认可的可以用作反刍动物饲料添加剂的缩二脲的一种成分; 它还被用作二氯异氰脲酸消毒剂的分解物, 可在游泳池水中发现。消费者接触这一化学品的可能途径是: 食用被非法添加三聚氰胺或者氰脲酸的食品、喝了游泳池的水、饮用由地表水处理后的饮水, 以及食用体内积存此化学品的鱼类。对饮水消毒时, 二氯异氰脲酸钠迅速脱氯, 形成氰脲酸(有关文献命名为氰尿酸)。

[0005] 氰脲酸对哺乳动物具有低急性毒性, 大鼠的经口半数致死量为每公斤体重 7700 毫克。几项亚慢性经口毒性研究项目显示, 氰脲酸造成肾组织损伤, 其中包括肾小管扩张, 肾小管上皮坏死或增生, 嗜碱性肾小管增加, 中性粒细胞浸润, 以及矿化和纤维化。

[0006] 对氰脲酸残留的检测目前主要采用高效液相色谱法 (HPLC)。然而应用 HPLC 时样品前处理非常繁琐, 测定方法相当复杂, 需受过专门训练的人员才能操作, 检测通量很小, 而且监测成本昂贵。因此, 目前我国相应的氰脲酸检测技术并不很完备, 很有必要研制更加简单快捷方便的检测产品。

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

[0008] 但任何半抗原物质免疫检测方法的建立, 都必须首先制备出氰脲酸半抗原、抗原及抗体, 然后才能利用这些试剂建立免疫检测方法。因此, 半抗原合成、人工抗原及其抗体制备, 是氰脲酸免疫分析方法建立的难点。半抗原物质的抗体生产涉及分析化学、有机化学、免疫学、生物学等知识背景, 任何一个环节失败, 皆不能成功。抗原设计的合理性确定了合成的难度, 同时决定了抗体的特异性, 目前尚没有成熟的理论完全预测。因此, 尽管氰脲酸的快速检测有很大的需求, 但由于半抗原物质抗体制备技术的复杂性合成的难度, 国内外目前尚未见氰脲酸免疫分析的任何报导。

发明内容

[0009] 本发明的一个目的是填补氰脲酸现有检测技术的不足,提供一种可应用于氰脲酸免疫检测方面的氰脲酸人工半抗原、人工抗原和特异性抗体。

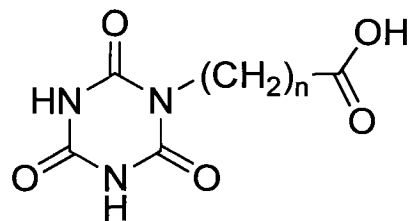
[0010] 本发明的另一个目的是提供所述氰脲酸人工半抗原、人工抗原和特异性抗体的制备方法。

[0011] 本发明还有一个目的是提供所述氰脲酸人工半抗原、人工抗原和特异性抗体的应用。

[0012] 本发明的目的通过以下技术方案予以实现:

[0013] 提供一种氰脲酸人工半抗原、人工抗原和特异性单克隆抗体,所述氰脲酸人工半抗原具有式(I)所示分子结构:

[0014]

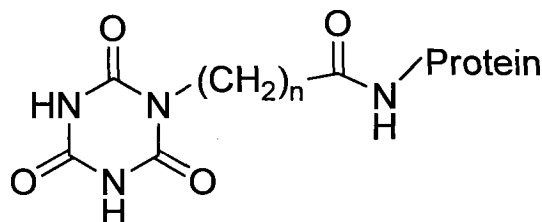


(I)

[0015] 其中, n 为 $-\text{CH}_2$ 基团数目, $n = 1 \sim 8$ 。

[0016] 所述氰脲酸人工抗原,具有式(II)所示分子结构:

[0017]



(II)

[0018] 其中, n 为 $-\text{CH}_2$ 基团数目, $n = 1 \sim 8$ 。

[0019] 本发明提供了所述氰脲酸半抗原的制备方法,是将 1,3,5-三嗪-2,4,6-(1H,3H,5H)-三酮与溴代羧酸苄酯反应生成含羧基的半抗原;

[0020] 氰脲酸半抗原合成路线如下:

[0021]



[0022] 本发明所述氰脲酸半抗原的制备包括以下步骤:

[0023] (1) 将氰脲酸和溴代羧酸苄酯装入圆底烧瓶中,加入少量 N,N- 二甲基甲酰胺 (又名二甲基甲酰胺, DMF) 溶解反应物;

[0024] (2) 往步骤 (1) 溶解好的反应物中加入与氰脲酸等物质量的催化剂,反应后减压蒸除溶剂 DMF,用四氢呋喃溶解残渣 A,过滤,滤液浓缩至干,得残渣 B;

[0025] (3) 残渣 B 用二氯甲烷 + 甲醇 (95+5) 为展开剂柱层析,获得中间产物,用过量氢氧化钾溶液充分水解中间产物,再用浓盐酸酸化至 pH 值为 3 ~ 6,蒸干溶剂得白色固体,白色固体用冷水洗涤后得目标半抗原。

[0026] 上述步骤 (1) 所述氰脲酸和溴代羧酸苄酯的投料摩尔比为 6 : 1 ~ 1 : 1。

[0027] 步骤 (1) 所述溴代羧酸苄酯优选 $n = 1 \sim 8$ 的溴代羧酸苄酯。

[0028] 步骤 (2) 所述催化剂为碳酸钾、三乙胺或其他碱性催化剂如 DMAP (4- 二甲氨基吡啶)。

[0029] 步骤 (2) 所述反应的反应温度为 40 ~ 80°C,反应时间为 5 ~ 24h。

[0030] 步骤 (3) 所述冷水洗涤次数为 3 ~ 5 次。

[0031] 本发明所述人工抗原的制备可采用活泼脂法或者混合酸酐法,也可以根据本发明设计思想,采用本领域其他常规方法将本发明所述半抗原与蛋白质偶联制备人工抗原。

[0032] 采用活泼脂法制备本发明所述抗原的具体步骤如下:

[0033] (1) 将本发明半抗原溶解于适宜量的溶剂中,所述溶剂优选二氧六环或二甲基甲酰胺;

[0034] (2) 往步骤 (1) 溶解好的体系中加入二环己基碳二亚胺和 N- 羟基琥珀酰亚胺,室温反应后离心除去沉淀,得上清液;二环己基碳二亚胺和 N- 羟基琥珀酰亚胺加入量按照摩尔比 1 : 1 的比例确定;

[0035] (3) 将上清液滴入 pH 值为 7.4 ~ 9.55 的碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液中,缓冲液中含有 10mg/mL 的载体蛋白,反应 2 ~ 4h 后,将反应液装入透析袋,用 0.85% 的生理盐水透析 3 ~ 4 天,得人工抗原。

[0036] 步骤 (3 所述) 载体蛋白可选 BSA、KLH、CONA、THY 或 OVA。

[0037] 采用混合酸酐法制备本发明所述抗原的具体步骤如下:

[0038] (1) 将本发明半抗原溶解于适宜量的溶剂中,所述溶剂优选二氧六环或二甲基甲酰胺;

[0039] (2) 往步骤 (1) 体系中加入氯甲酸异丁酯,4°C 反应得甲液;

[0040] 将载体蛋白溶于 1mol/L pH 值为 9.6 的碳酸氢钠缓冲液中,得乙液;载体蛋白可为 BSA 或 KLH 或 CONA 或 THY 或 OVA;

[0041] (3) 将甲液缓慢滴加到乙液中,4°C 搅拌反应过夜,将反应液装入透析袋,用 0.85% 的生理盐水透析 3d,得人工抗原。

[0042] 本发明所述氰脲酸特异性抗体制备,其具体步骤如下:

[0043] 用所得人工抗原免疫 Balb/c 小鼠或新西兰兔,免疫剂量为 1mg/Kg,背部皮下注射,每隔 15d 加强免疫一次,第 4 次后耳缘静脉采血测定效价和特异性,待效价和特异性合格后,采集血清获得多克隆抗体;或用小鼠脾细胞进行细胞融合,获得杂交瘤细胞,细胞分泌获得单克隆抗体。

[0044] 抗体用辛酸 - 硫酸铵法或 Protein G/A 亲和纯化。

[0045] 本发明同时提供了所述抗体的应用,可应用于食品、水、包装材料和环境中氰脲酸残留量检测方面,尤其是现场快速免疫检测氰脲酸方面。

[0046] 本发明的有益效果是:

[0047] 氰脲酸免疫分析方法,目前尚未见任何研究报道,本发明设计合理合成方法和线路,制备得到特异性优良的半抗原、抗原和抗体,并首次提供了一种实现氰脲酸免疫分析的方法,使得快速检测氰脲酸得以实现,避免了实验室繁荣复杂的仪器分析步骤,操作简便,无需专业技术人员;检测成本远远低于常规使用的仪器检测方法。

具体实施方式

[0048] 下面结合具体实施例进一步详细说明本发明。实施例中氰脲酸等药剂除非特别说明,都是常规市购实验室用试剂。

[0049] 实施例 1 半抗原合成

[0050] 本实施例以 $n = 1$ 时的溴乙酸苄酯为例。

[0051] 将 5mmol 氰脲酸和 5mmol 溴代酸苄酯装入圆底烧瓶中,加入 8mLDMF,再加入 5mmol DMAP, $40 \sim 80^{\circ}\text{C}$ 反应 10h,减压蒸除溶剂,用四氢呋喃溶解残渣,过滤,滤液浓缩至干,用二氯甲烷+甲醇(95+5)为展开剂,柱层析,收集 $R_f = 0.3$ 的组分,蒸干溶剂,白色固体用过量氢氧化钾水解过夜,再用浓盐酸酸化至 pH 值为 3,蒸干溶剂,出现白色固体,用冷水洗涤 3~5 次,得目标半抗原。

[0052] 当 $n = 3 \sim 8$ 时,方法基本同上,仅将溴代酸苄酯中的碳链长短更换,即采用相应的溴代酸苄酯反应,摩尔比例同溴乙酸苄酯,不再赘述。

[0053] 实施例 2 人工抗原制备

[0054] 本实施例以 $n = 1$ 时的溴乙酸苄酯法所得半抗原为原料制备人工抗原为例描述如下。

[0055] 活泼酯法:将 0.20mmol 的半抗原溶解于 1.0mL 的二氧六环(或二甲基甲酰胺)中,加入 0.22mmol 的二环己基碳二亚胺和 0.22mmol N-羟基琥珀酰亚胺,室温反应 3.5h,离心除去沉淀,将上清滴入 5mLpH 为 7.4~9.55 碳酸缓冲液中,缓冲液中含有 10mg/mL 的载体蛋白,载体蛋白为 BSA;反应 2~4h 后,将反应液装入透析袋,用 0.85% 的生理盐水透析 3d,得人工抗原(命名为:M-a-3-BSA)。

[0056] 载体蛋白替换为 KLH 或 CONA 或 THY 或 OVA 的制备过程,本领域技术人员可参照了解,不再赘述。

[0057] 实施例 3 人工抗原制备

[0058] 混合酸酐法:将 0.1mmol 半抗原溶于 1.5mL 二氧六环中,加入 0.15mmol 氯甲酸异丁酯, 4°C 搅拌反应 0.5h,此为甲液。将 50mg 载体蛋白溶于 4mL1mol/L pH 9.6 的碳酸氢钠缓冲液中,此为乙液。载体蛋白为 OVA。将甲液缓慢滴加到乙液中, 4°C 搅拌反应过夜,将反应液装入透析袋,用 0.85% 的生理盐水透析 3d,得人工抗原。

[0059] $n = 2 \sim 8$ 时,人工抗原制备方法同 $n = 1$,实施时仅将仅将溴代酸苄酯中的碳链长短更换,即采用相应的溴代酸苄酯反应所得半抗原,摩尔比例同溴乙酸苄酯法所得半抗原,不再赘述。

[0060] 实施例 4 抗体制备

[0061] 采用本领域常规方法利用本发明人工抗原 M-a-3-BSA 免疫实验室常规实验使用的 Balb/c 小鼠,免疫剂量为 1mg/Kg,背部皮下注射,每隔 15d 加强免疫一次,第 4 次后耳缘静脉采血测定效价和特异性,待效价和特异性合格后,进行细胞融合,获得杂交瘤细胞,细胞分泌获得单克隆抗体。

[0062] 采用本领域常规方法利用本发明人工抗原 M-a-3-BSA 免疫兔子,免疫剂量为 1mg/Kg,背部皮下注射,每隔 15d 加强免疫一次,第 4 次后直接采集血清即可得多克隆抗体。

[0063] 实施例 5 抗体纯化

[0064] 采用辛酸硫酸铵法或者 Protein G/A 进行。辛酸硫酸铵法是本领域常规方法,每毫升兔血清中加入 75 μ L 辛酸,每毫升小鼠腹水中加入 33 μ L;Protein G/A 按照商品说明书进行即可。

[0065] 实施例 8ELISA 检测应用实验

[0066] 样品处理方法:

[0067] 取鲜奶样品 2.0mL,加入 400 μ L 0.6mol/L 的三氯乙酸溶液,振荡 1min,加入 2mL PBS,6000r/min 离心 10min,取上清,加入 100 μ L 1mol/L 的 NaOH 溶液,调节 pH 为 7.4 左右。用正己烷脱脂 3 次,取下层液体,用 PBST 定容至 10mL,用于检测。

[0068] ELISA 检测:

[0069] 在酶标板上,按照 1 μ g/mL 的浓度包被人工抗原,人工抗原使用时,免疫原载体蛋白和检测抗原载体蛋白不能相同;例如人工抗原 M-a-3-BSA 免疫动物,则检测时包被抗原载体换用 OVA;包被条件采用 pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液,37 $^{\circ}$ C 孵育 3h,洗涤;然后用 5% 的脱脂奶粉封闭 1h,洗涤;加入待检样品和合适浓度的抗体,反应 1h,洗涤;然后加入合适浓度的酶标二抗,反应 1h,洗涤;加入显色底物,读数,其吸光值大小与浓度成反比。同时用氰脲酸标准品作标准曲线,即可定量检测样品中的氰脲酸。

[0070] 添加回收实验:

[0071] 对空白牛奶中分别添加 0、20、100、600 μ L,得到样品氰脲酸含量为 0、1、5、30ng/mL,按照如上样品处理方法和检测方法,回收率在 82.5 ~ 103.2%,满足一般筛选检测要求。

[0072] 同时用多种结构类似物替代氰脲酸标准品,交叉反应率均小于 1%,表明该方法特异性良好。本发明首次实现了氰脲酸的免疫快速检测,对于实现大量样品的快速检测,具有重要意义。

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 氰脲酸半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用 | | |
| 公开(公告)号 | CN101962368A | 公开(公告)日 | 2011-02-02 |
| 申请号 | CN201010256925.4 | 申请日 | 2010-08-17 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 华南农业大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 华南农业大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 华南农业大学 | | |
| [标]发明人 | 孙远明 雷红涛 沈玉栋 | | |
| 发明人 | 孙远明 雷红涛 沈玉栋 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 C07K14/77 C07K14/765 C07K16/44 C07D251/32 C07K14/795 | | |
| 代理人(译) | 林丽明 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明提供了一种氰脲酸半抗原、人工抗原、抗体及其制备方法和应用。本发明以1, 3, 5-三嗪-2, 4, 6-(1H, 3H, 5H)-三酮与溴代羧酸苯酯反应生成含羧基的半抗原；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，获得氰脲酸特异性抗体。本发明所述抗体可用于氰脲酸免疫检测，实现氰脲酸现场快速检测，保障食品安全。

