(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103896789 A
(43)申请公布日 2014.07.02

(21)申请号 201410104220.9
(22)申请日 2014.03.19
(71)申请人 中国农业大学
地址 100193 北京市海淀区圆明园西路 2 号
(72)发明人 沈建忠 李建成 郭燕 刘爽
(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
代理人 关畅
(51)Int.Cl.
C07C 225/20(2006.01)
C07C 221/00(2006.01)
C07K 14/765(2006.01)
C07K 14/77(2006.01)
C07K 16/44(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)

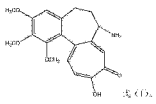
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

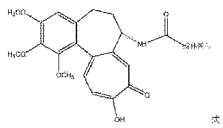
秋水仙碱半抗原、抗原及其多克隆抗体的制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种秋水仙碱半抗原、抗原及其多克隆抗体的制备方法和应用。本发明提供的秋水仙碱半抗原，即为式(I)所示化合物。本发明还保护一种抗原，即式(II)所示化合物。本发明还要求保护以式(II)所示化合物为免疫原得到的抗体。本发明还保护一种用于检测秋水仙碱的试剂盒，包括式(I)所示化合物或式(II)所示化合物。所述试剂盒还可包括所述抗体。本发明为秋水仙碱的检测提供了新的途径，具有重大的应用价值。



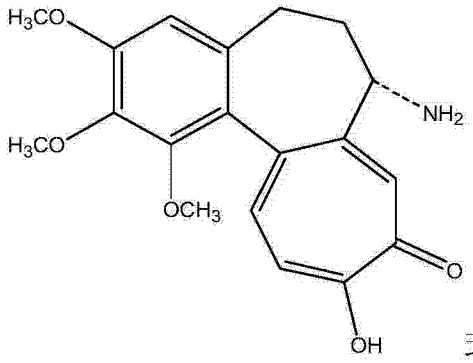
式(I)。



式(II)。

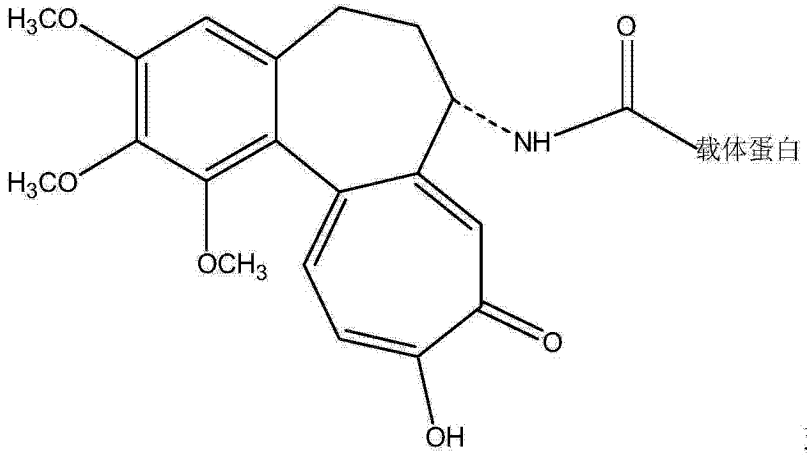
CN 103896789 A

1. 式（I）所示化合物；



式（I）。

2. 式（II）所示化合物；



式（II）。

3. 以式（II）所示化合物为免疫原得到的抗体。

4. 式（I）所示化合物或式（II）所示化合物在制备用于检测秋水仙碱的试剂盒中的应用。

5. 式（II）所示化合物在检测秋水仙碱中的应用。

6. 一种用于检测秋水仙碱的试剂盒，包括式（I）所示化合物或式（II）所示化合物。

7. 如权利要求 6 所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括权利要求 3 所述抗体。

秋水仙碱半抗原、抗原及其多克隆抗体的制备方法和应用

技术领域

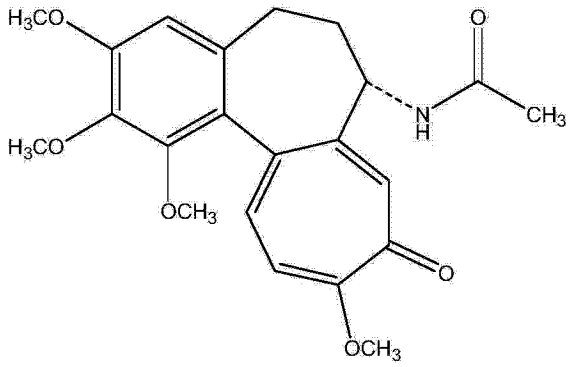
[0001] 本发明涉及一种秋水仙碱半抗原、抗原及其多克隆抗体的制备方法和应用。

背景技术

[0002] 秋水仙碱是从欧洲百合科植物秋水仙(Colchicum autumnale L.)的球茎中分离出的一种卓酚酮类生物碱,许多百合科秋水仙属植物中都含有秋水仙碱。

[0003] 秋水仙碱的化学名为氮-(5,6,7,9-四氢-1,2,3,10-四甲氧基-9-氧代苯并[a]庚间三烯-7基)-乙酰胺,分子式为$C_{22}H_{25}NO_6$,分子量399.44,结构式如下:

[0004]



。

[0005] 秋水仙碱临床上作为痛风性关节炎急性发作和某些癌症治疗的首选药。近几年的实验室及临床中的研究中已证明,秋水仙素作为微管解囊药,具有抗炎、抗纤维化和免疫调节等作用。但秋水仙碱毒性较大,且其治疗量和中毒量比较接近,因此临床应用上受到了严格的限制,发展准确可靠的检测原料和制剂中秋水仙碱含量的技术就显得尤为重要。

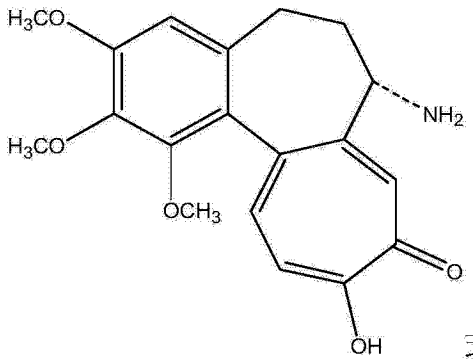
[0006] 秋水仙碱的测定方法中,使用比较广泛的方法有电化学、分光光度法、薄层色谱法、HPLC法和HPLC-MS联用等。其中分光光度方法通用性强,但检测要求低。薄层色谱法操作复杂,适用面较窄。HPLC技术所需设备要求较高,仪器价格昂贵,对操作人员的要求较高,难于推广。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种秋水仙碱半抗原、抗原及其多克隆抗体的制备方法和应用。

[0008] 本发明提供的秋水仙碱半抗原,即为式(I)所示化合物;

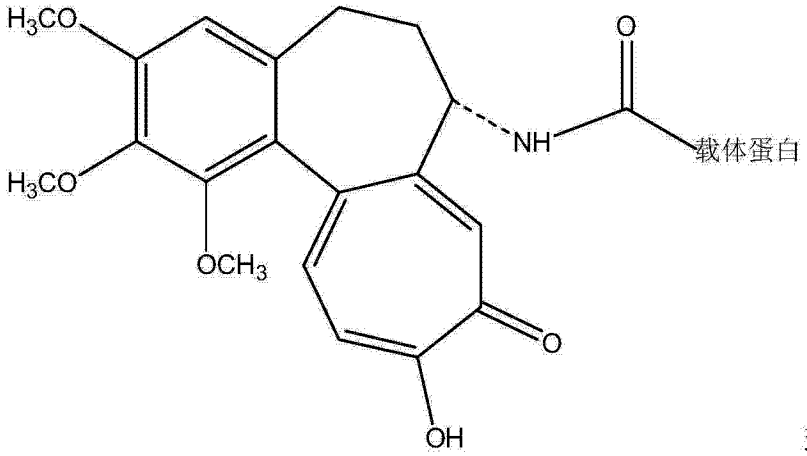
[0009]



式（I）。

[0010] 本发明还保护一种抗原，即式（II）所示化合物；

[0011]



式（II）。

[0012] 所述载体蛋白具体可为牛血清白蛋白（BSA）或卵清白蛋白（OVA）。

[0013] 本发明还要求保护以式（II）所示化合物为免疫原得到的抗体。

[0014] 本发明还保护式（I）所示化合物或式（II）所示化合物在制备用于检测秋水仙碱的试剂盒中的应用。

[0015] 本发明还保护式（II）所示化合物在检测秋水仙碱中的应用。式（II）所示化合物可以作为免疫原和／或包被原。

[0016] 本发明还保护一种用于检测秋水仙碱的试剂盒，包括式（I）所示化合物或式（II）所示化合物。所述试剂盒还可包括所述抗体。

[0017] 免疫分析检测技术是近年来在环境、食品安全监测领域逐渐广泛应用的一种快速、高通量、低成本的检测技术，已逐渐成为世界各国有毒有害残留物快速筛选监测的主要方法之一。本发明为秋水仙碱的检测提供了新的途径，具有重大的应用价值。

附图说明

[0018] 图 1 为秋水仙碱半抗原的质谱图。

[0019] 图 2 为秋水仙碱人工抗原的紫外光谱扫描。

具体实施方式

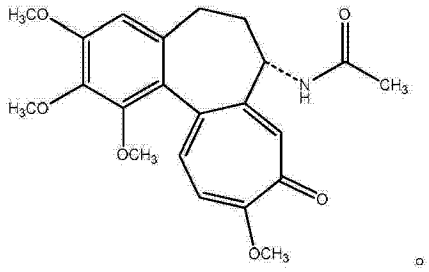
[0020] 以下的实施例便于更好地理解本发明，但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料，如无特殊说明，均为自

常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验，均设置三次重复实验，结果取平均值。

[0021] 秋水仙碱(COL)：购自百灵威科技有限公司，CAS 号：64-86-8。非布索坦：购自上海凯试科技有限公司，CAS 号：144060-53-7。别嘌呤醇：购自百灵威科技有限公司，CAS 号：315-30-0。N,N- 二甲基甲酰胺(DMF)：购自国药集团化学试剂有限公司，CAS 号：68-12-2。鸡卵清白蛋白(OVA)：购自 Sigma 公司，CAS 号：9006-50-2。1- 乙基 -3-（3- 二甲氨丙基）- 碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCL)：购自 Alfa Aesar 公司，CAS 号：25952-53-8。牛血清白蛋白(BSA)：购自北京经科宏达生物公司，CAS 号：9048-46-8。

[0022] 秋水仙碱的结构式如下：

[0023]



[0024] 实施例 1、秋水仙碱半抗原的制备和鉴定

[0025] 一、秋水仙碱半抗原的制备

[0026] 1、取 4.5ml 硫酸水溶液(含 0.017mol 硫酸)，加入 0.00038mol 秋水仙碱，充分溶解，然后 100℃油浴回流 5h。秋水仙碱与硫酸的摩尔比约为 0.022:1。

[0027] 2、取步骤 1 的产物，加入水和 Na_2CO_3，调 pH 至 8，然后进行抽滤，并用冷水冲洗，收集滤液。

[0028] 3、取步骤 2 得到的滤液，用 CH_2Cl_2 萃取三次(每次加入 10ml CH_2Cl_2 并室温静置 10min)，合并有机相，用纯水洗两次，然后用无水 Na_2SO_4 干燥，然后旋转蒸发，得到 102mg 干物质(秋水仙碱半抗原)，产率为 74%。

[0029] 二、秋水仙碱半抗原的鉴定

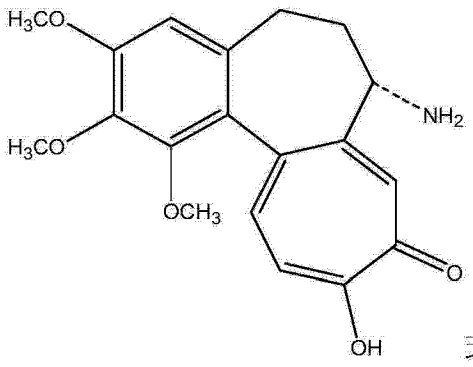
[0030] 将步骤一制备得到的秋水仙碱半抗原进行质谱鉴定和元素分析。

[0031] 质谱图见图 1。秋水仙碱半抗原具有分子离子峰 344.2。

[0032] 秋水仙碱半抗原的元素分析结果(%)：C,66.40；H,6.20；N,4.10；0,23.30。

[0033] 分析结果表明：秋水仙碱半抗原的结构式如下(分子量为 343.37)：

[0034]



式 (I)。

[0035] 实施例 2、秋水仙碱人工抗原的制备和鉴定

[0036] 一、秋水仙碱人工抗原的制备(戊二醛法)

[0037] 1、取 30mg 鸡卵清白蛋白,溶于 3ml pH7.4、0.01M 的磷酸盐缓冲液。

[0038] 2、取实施例 1 制备的秋水仙碱半抗原 9.15mg,溶解于 750μl N,N-二甲基甲酰胺,逐滴滴加到步骤 1 得到的鸡卵清白蛋白溶液,然后在磁力搅拌器上室温搅拌 2h。

[0039] 3、将 8.42μl 戊二醛缓慢滴加到步骤 2 得到的溶液中,然后室温搅拌 24h。

[0040] 4、完成步骤 3 后,将溶液装入透析袋,在 pH7.4、0.1M 的磷酸盐缓冲液中透析 72h(每天换水 2-3 次),得到包被原溶液,分装并 -20℃保存。

[0041] 二、秋水仙碱人工抗原的制备(碳二亚胺法)

[0042] 1、取 30mg 牛血清白蛋白,溶于 3ml pH7.4、0.01M 的磷酸盐缓冲液。

[0043] 2、取实施例 1 制备的秋水仙碱半抗原 7.55mg 和 12.65mg1- 乙基 -3-(3- 二甲氨丙基)- 碳二亚胺盐酸盐,溶于 750μl N,N- 二甲基甲酰胺,然后室温搅拌 4h。

[0044] 3、将步骤 2 得到的溶液缓慢滴加至步骤 1 得到的牛血清白蛋白溶液,然后室温搅拌 24h。

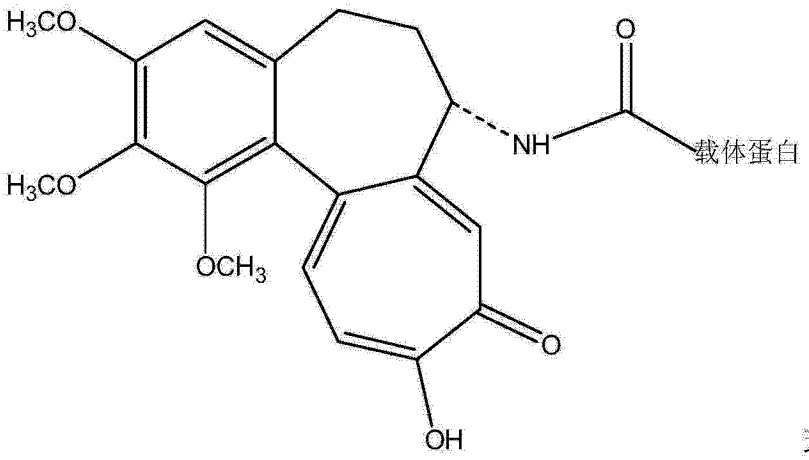
[0045] 4、完成步骤 3 后,将溶液装入透析袋,在 pH7.4、0.1M 的磷酸盐缓冲液中透析 72h(每天换水 2-3 次),得到免疫原溶液,分装并 -20℃保存。

[0046] 三、秋水仙碱人工抗原的鉴定

[0047] 分别将步骤一和步骤二制备的溶液用 pH7.4、0.1M 的磷酸盐缓冲液稀释,然后进行紫外光谱扫描。见图 2。产物的紫外图谱与 BSA、OVA 相比发生了明显变化,说明秋水仙碱半抗原与载体蛋白成功偶联。

[0048] 秋水仙碱人工抗原的结构式如下 :

[0049]



式(Ⅱ)。

[0050] 载体蛋白为 BSA 时,作为免疫原。载体蛋白为 OVA 时作为包被原。

[0051] 实施例 3、抗血清的制备和特异性测定

[0052] 一、免疫动物制备抗血清

[0053] 采用新西兰大白兔为免疫动物,免疫程序如下 :

[0054] 初次免疫 :取实施例 2 制备的免疫原溶液,用生理盐水稀释至 0.5ml,然后与等体积的弗氏完全佐剂混合并充分乳化,然后采用颈背部皮下多点注射的方式免疫新西兰大白兔,免疫剂量为 1mg/ 只(以蛋白量计),免疫体积为 1ml。

[0055] 初次免疫后，每隔两周进行一次加强免疫(共进行5次加强免疫)，每次加强免疫的方式：取实施例2制备的免疫原溶液，用生理盐水稀释至0.5ml，然后与等体积的弗氏不完全佐剂混合并充分乳化，然后采用颈背部皮下多点注射的方式免疫新西兰大白兔，免疫剂量为1mg/只(以蛋白量计)，免疫体积为1ml。

[0056] 最后一次加强免疫两周后，进行末次免疫，方式：取实施例2制备的免疫原溶液，用生理盐水稀释至0.5ml，然后采用颈背部皮下多点注射的方式免疫新西兰大白兔，免疫剂量为1mg/只(以蛋白量计)，免疫体积为1ml。

[0057] 末次免疫10天后，心脏采血并分离血清。

[0058] 二、间接ELISA法测定血清的效价

[0059] 采用实施例1制备的包被原溶液进行包被，包被浓度为0.33μg/mL(以蛋白量计)。采用pH7.4、0.01M的PBS缓冲液梯度稀释步骤一制备的血清。采用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG抗体作为酶标二抗。采用未进行任何免疫的新西兰大白兔的血清作为阴性对照。在酶标仪上于450nm测定各孔OD值，P/N值≥2.1的最大稀释倍数即为血清的效价(P表示试验孔的吸光度值；N表示阴性对照孔的吸光度值)。步骤一制备的血清的效价为1:10000。

[0060] 三、间接竞争性ELISA法测定血清的最低检测限(LOD值)和半数抑制量(IC_{50})

[0061] 1、取实施例1制备的包被原溶液，用pH9.6、0.05M的碳酸盐缓冲液稀释，得到蛋白浓度为0.33μg/mL的包被液，将包被液加至酶标板，100μL/孔，37℃孵育2h，然后弃上清，用PBST溶液洗涤一遍，拍干。

[0062] 2、加入封闭液(含0.25%酪蛋白、5%小牛血清的PBS缓冲液)，150μL/孔，37℃孵育1h，弃上清，拍干。

[0063] 3、试验孔加入50μL标准品溶液(用pH7.4、0.01M PBS缓冲液和秋水仙碱制备标准品溶液，秋水仙碱的浓度分别为0.3ng/ml、1ng/ml、3ng/ml、9ng/ml、27ng/ml、81ng/ml或243ng/ml)和50μL血清稀释液(用pH7.4、0.01M的PBS缓冲液将步骤一得到的血清稀释至10000倍体积)；设置用50μL pH7.4、0.01M的PBS缓冲液代替50μL标准品溶液的阴性对照孔；设置用50μL pH7.4、0.01M的PBS缓冲液代替50μL血清稀释液的空白对照孔；4℃孵育1h，弃上清，用PBST溶液洗涤4次，拍干。

[0064] 4、加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG抗体(1:3000稀释)，100μL/孔，37℃孵育30min，弃上清，用PBST溶液洗涤4次，拍干。

[0065] 5、加DAB显色液(100μL/孔)，37℃孵育15min，然后加2M硫酸溶液(50μL/孔)，然后在酶标仪上于450nm测定各孔OD值。

[0066] 以吸光度值A为纵坐标，以秋水仙碱标准品溶液浓度的$\log_{10}$值为横坐标，绘制半对数标准曲线图。标准曲线具有完整的反S形状，并具有上平台和下平台，标准曲线的平行测定次数8次，实验重复性良好，相对标准偏差(变异系数)均在15%以内。

[0067] 根据标准曲线得出10%抑制量和半数抑制量(IC_{50})，比较检测灵敏度。

[0068] 抑制率用以下公式计算：

[0069]

$$\text{抑制率}(\%)=\frac{(OD_{max}-OD_{min})-(OD_{x}-OD_{min})}{(OD_{max}-OD_{min})}\times 100\%$$

[0070] 式中：OD_{max} 为阴性对照孔的吸光值(即阴性对照)，OD_x 为试验孔的吸光值，OD_{min} 为空白对照孔的吸光值。

[0071] 由ELISA方法的标准曲线可见，半数抑制量(IC_{50})为0.54ng/mL，最低检测限(LOD)为0.04ng/mL，在0.04-8.19ng/mL范围内，抑制率与药物浓度的对数值呈显著的线性关系，相关系数为r=0.9989。

[0072] 四、血清的特异性

[0073] 用秋水仙碱的结构类似物代替秋水仙碱，其它同步骤三。

[0074] 交叉反应率(%)=IC_{50}(秋水仙碱)/IC_{50}(结构类似物)×100%。

[0075] 交叉反应率结果见表1，血清的特异性良好。

[0076] 表1结构类似物的交叉反应率

[0077]

名称	IC_{50}	交叉反应率
别嘌呤醇	大于1μg	小于1%
非布索坦	大于1μg	小于1%

[0078] 实施例4、

[0079] 1、取30mg鸡卵清白蛋白，溶于3ml pH7.4、0.01M的磷酸盐缓冲液。

[0080] 2、取实施例1制备的秋水仙碱半抗原11.24mg和18.79mg1-乙基-3-(3-二甲氨丙基)-碳二亚胺盐酸盐，溶于750μl N,N-二甲基甲酰胺，然后室温搅拌4h。

[0081] 3、将步骤2得到的溶液缓慢滴加至步骤1得到的牛血清白蛋白溶液，然后室温搅拌24h。

[0082] 4、完成步骤3后，将溶液装入透析袋，在pH7.4、0.1M的磷酸盐缓冲液中透析72h(每天换水2-3次)，分装并-20℃保存。

[0083] 5、间接竞争性ELISA法测定血清的半数抑制量(IC_{50})

[0084] (1)取步骤4得到的溶液，用pH9.6、0.05M的碳酸盐缓冲液稀释，得到蛋白浓度为0.45μg/mL的包被液，将包被液加至酶标板，100μL/孔，37℃孵育2h，然后弃上清，用PBST溶液洗涤一遍，拍干。

[0085] (2)加入封闭液(含0.25%酪蛋白、5%小牛血清的PBS缓冲液)，150μL/孔，37℃孵育1h，弃上清，拍干。

[0086] (3)试验孔加入50μL标准品溶液(用pH7.4、0.01M PBS缓冲液和秋水仙碱制备标准品溶液，秋水仙碱的浓度分别为0.3ng/ml、1ng/ml、3ng/ml、9ng/ml、27ng/ml、81ng/ml或243ng/ml)和50μL血清稀释液(用pH7.4、0.01M的PBS缓冲液将实施例3的步骤一得到的血清稀释至10000倍体积)；设置用50μL pH7.4、0.01M的PBS缓冲液代替50μL标准品溶液的阴性对照孔；设置用50μL pH7.4、0.01M的PBS缓冲液代替50μL血清稀释液的空白对照孔；4℃孵育1h，弃上清，用PBST溶液洗涤4次，拍干。

[0087] (4)加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG抗体(1:3000稀释)，100μL/孔，37℃孵育30min，弃上清，用PBST溶液洗涤4次，拍干。

[0088] (5)加DAB显色液(100μL/孔)，37℃孵育15min，然后加2M硫酸溶液(50μL/孔)，

然后在酶标仪上于 450nm 测定各孔 OD 值。

[0089] 半数抑制量（IC_{50}）为 0.54ng/mL，最低检测限（LOD）为 0.54ng/mL。

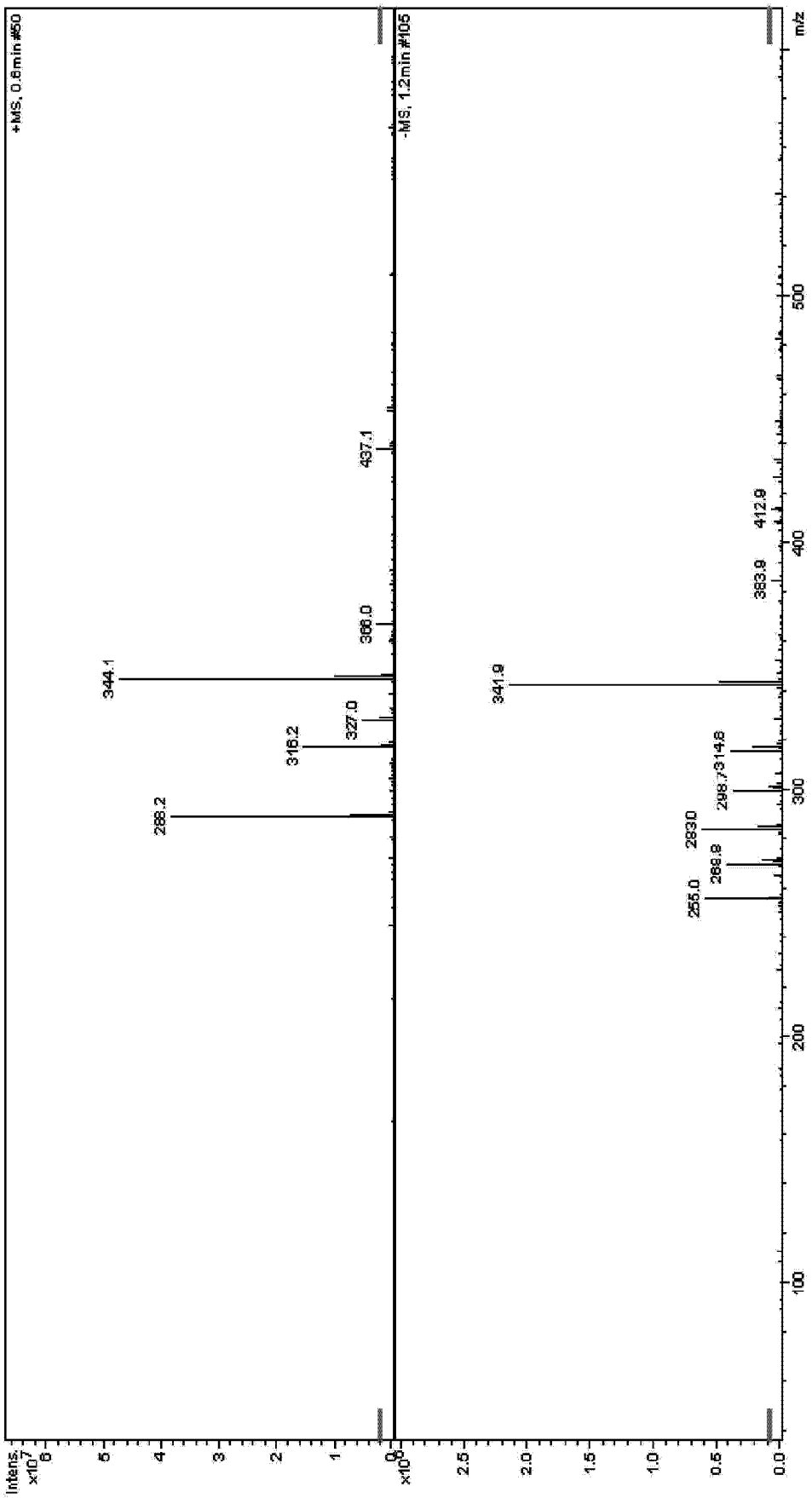

+MS, 0.6min #50
-MS, 1.2min #105
m/z
Intens.
x10^7
x10^6
344.1
437.1
366.0
327.0
316.2
288.2
341.9
383.9
412.9
314.8
298.7
293.0
266.8
255.0
100
200
300
400
500
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
1
2
3
4
5
6
7

图 1

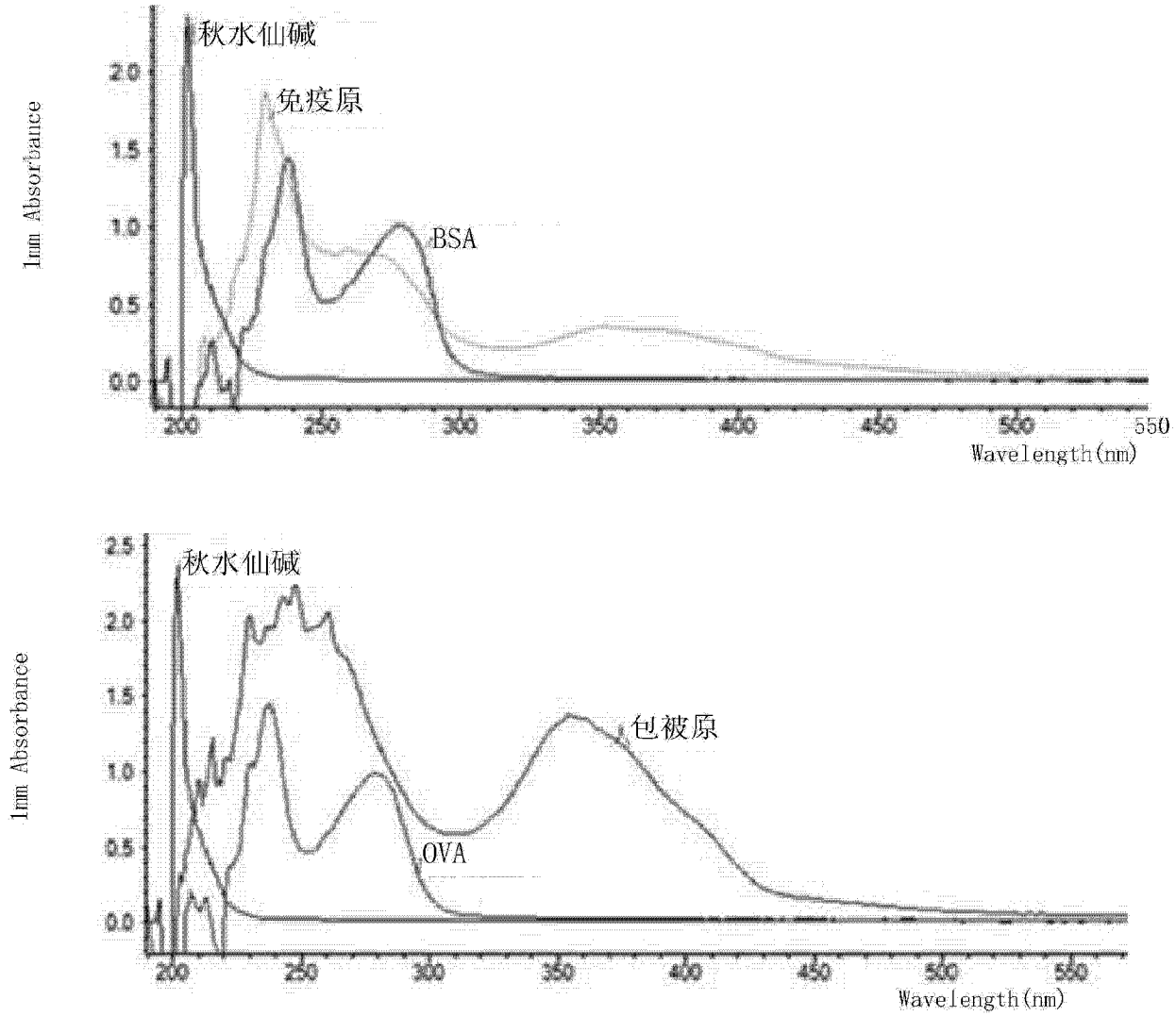
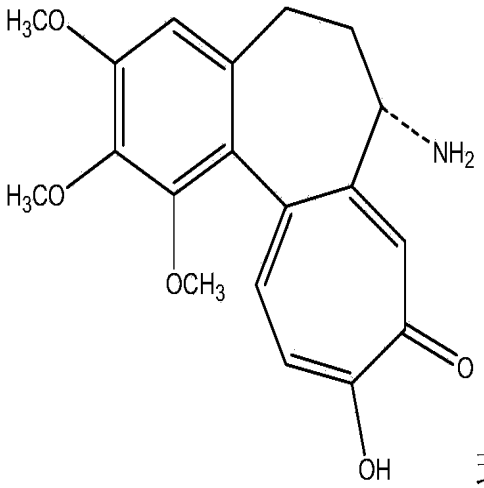

1mm Absorbance
秋水仙碱
免疫原
BSA
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
200
250
300
350
400
450
500
550
Wavelength(nm)
1mm Absorbance
秋水仙碱
包被原
OVA
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
200
250
300
350
400
450
500
550
Wavelength(nm)

图 2

专利名称(译)	秋水仙碱半抗原、抗原及其多克隆抗体的制备方法和应用		
公开(公告)号	CN103896789A	公开(公告)日	2014-07-02
申请号	CN201410104220.9	申请日	2014-03-19
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	沈建忠 李建成 郭燕 刘爽		
发明人	沈建忠 李建成 郭燕 刘爽		
IPC分类号	C07C225/20 C07C221/00 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 G01N33/53		
代理人(译)	关畅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种秋水仙碱半抗原、抗原及其多克隆抗体的制备方法和应用。本发明提供的秋水仙碱半抗原，即为式（Ⅰ）所示化合物。本发明还保护一种抗原，即式（Ⅱ）所示化合物。本发明还要求保护以式（Ⅱ）所示化合物为免疫原得到的抗体。本发明还保护一种用于检测秋水仙碱的试剂盒，包括式（Ⅰ）所示化合物或式（Ⅱ）所示化合物。所述试剂盒还可包括所述抗体。本发明为秋水仙碱的检测提供了新的途径，具有重大的应用价值。



式（Ⅰ）。