



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108409749 B

(45)授权公告日 2019.09.06

(21)申请号 201810089277.4 *C07K 14/765(2006.01)*
(22)申请日 2018.01.30 *C07K 14/77(2006.01)*
(65)同一申请的已公布的文献号 *C07K 14/795(2006.01)*
申请公布号 CN 108409749 A *C07K 1/107(2006.01)*
(43)申请公布日 2018.08.17 *G01N 33/531(2006.01)*
(73)专利权人 中国农业科学院蜜蜂研究所 *G01N 33/558(2006.01)*
地址 100093 北京市海淀区香山北沟1号 *G01N 33/577(2006.01)*
(72)发明人 杨术鹏 李熠 张金振 周金慧
张静 关利娟 金玥 袁媛 王鹏
赵文
(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司
公司 11002
代理人 王文君 黄爽
(51)Int.Cl.
C07D 491/22(2006.01)

审查员 李军勇

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

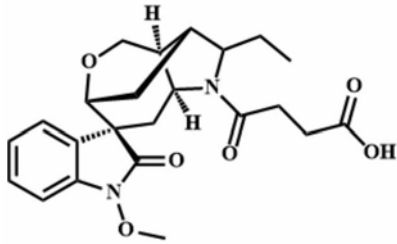
(54)发明名称

钩吻素己半抗原和全抗原及其制备方法与
应用

(57)摘要

本发明涉及钩吻素己半抗原和全抗原及其制备方法与应用。本发明首先将钩吻素己中不饱和和胺基加氢还原,暴露其活性的氨基,然后与酸酐反应,得到含有羧基基团的化合物,即为钩吻素己半抗原;再将半抗原与载体蛋白偶联获得其全抗原。利用本发明的全抗原免疫动物可以产生针对钩吻素己的特异性抗体,可用于建立钩吻素己的酶联免疫吸附分析方法和胶体金试纸条快速检测法,从而用于快速检测钩吻素己导致的食物中毒,应用前景广阔。

1. 钩吻素己半抗原,其特征在於,其结构如式(I)所示:



式 (I) 。

2. 钩吻素己全抗原,其特征在於,由权利要求1所述钩吻素己半抗原与载体蛋白偶联后得到的;其中,所述载体蛋白选自BSA、VOA、KLH。

3. 由权利要求2所述钩吻素己全抗原制备的特异性抗体。

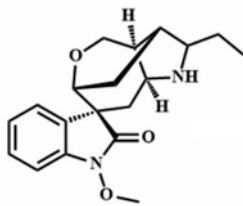
4. 由权利要求1所述钩吻素己半抗原,或权利要求2所述钩吻素己全抗原,或权利要求3所述特异性抗体制备的钩吻素己检测试剂或试剂盒。

5. 权利要求1所述钩吻素己半抗原,或权利要求2所述钩吻素己全抗原,或权利要求3所述特异性抗体,或权利要求4所述检测试剂或试剂盒在钩吻素己的ELISA免疫分析检测中的应用。

6. 权利要求1所述钩吻素己半抗原,或权利要求2所述钩吻素己全抗原,或权利要求3所述特异性抗体,或权利要求4所述检测试剂在制备钩吻素己的胶体金检测试纸条中的应用。

7. 权利要求1所述钩吻素己半抗原的制备方法,其特征在於,将50mg钩吻素己溶于3mL无水THF,加入3.0eq硼氢化钠,每隔3h加入5μL无水甲醇,共加入15μL,加毕,室温搅拌12h;加入20μL冰乙酸淬灭反应,将反应体系倒入分液漏斗,加入10mL水,60mL二氯甲烷,分3次萃取;合并有机相,浓缩干燥后进行柱色谱分离,得式(II)化合物;然后,将20mg式(II)化合物溶于0.4mL DMF,加入2.0eq琥珀酸酐,室温搅拌过夜,反应体系加水淬灭后,用乙酸乙酯萃取,然后用稀盐酸洗涤,有机相干燥浓缩后,柱色谱分离即得目标化合物;

其中,式(II)化合物的结构如下:



式 (II) 。

8. 权利要求2所述钩吻素己全抗原的制备方法,其特征在於,采用活泼酯法合成钩吻素己全抗原,具体如下:

用N,N二甲基甲酰胺溶解钩吻素己半抗原,将钩吻素己半抗原与N-羟基琥珀酰亚胺,1-己基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺按摩尔比1:2:4混合,室温避光反应5h,得到活化的钩吻素己半抗原溶液;将载体蛋白溶解于磷酸盐缓冲液中,制成浓度5mg/mL的载体蛋白溶液;将活化的钩吻素己半抗原溶液逐滴加到载体蛋白溶液中,边滴加边搅拌,使活化的钩吻素己半抗原与载体蛋白的摩尔比达4:1,4℃搅拌反应过夜,用磷酸盐缓冲液透析3天,离心取上清,即得钩吻素己全抗原。

钩吻素己半抗原和全抗原及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物化工技术领域,具体地说,涉及钩吻素己半抗原和全抗原及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 钩吻是马钱科的一种开花植物,广泛分布于岭南地区(广东、广西和福建南部),因其全株有毒且毒性强烈,也称之为断肠草,大茶药等。钩吻的花朵呈黄色且鲜艳,人们易于将其误认为金银花而食用,从而导致钩吻中毒事件频发。此外,钩吻还是我国重要的有毒蜜源植物,当其它蜜源匮乏,钩吻成为当地优势蜜源植物时,蜜蜂便会采集其花蜜酿制有毒蜂蜜,人一旦误食此蜂蜜便会发生中毒反应,严重者甚至致人死亡。钩吻中毒患者主要表现为视力障碍和呼吸中枢神经系统的麻痹,中毒的潜伏期短,严重者多因呼吸麻痹而死亡。可见,在岭南地区由钩吻引发的中毒问题突出,急需开发出高灵敏度、高特异性、简单、快速的分析方法,辅助食物中毒的诊断和鉴别。

[0003] 钩吻的高毒性主要是由吲哚类生物碱导致的,目前已经分离鉴定了120余种钩吻生物碱,其中钩吻素子和钩吻素甲含量较高,而钩吻素己(化学结构见图2)的毒性最强,其在小鼠中的LD₅₀约为0.2mg/kgB.W.,属于剧毒性物质。鉴于钩吻素己的高毒性及其在植物体根茎叶花中广泛分布,通常将其归咎为钩吻中毒的关键性物质。此外,研究者从钩吻有毒蜂蜜中发现了高含量的钩吻素己,并将其作为钩吻有毒蜂蜜的生物标志物之一。因此,可以通过检测食物、蜂蜜中的钩吻素己来识别和鉴定是否为毒性食物。对于小分子化合物,常见的检测方法主要可分为基于化合物理化性质的液相色谱、液质联用、气质联用等仪器分析法;以及基于抗原抗体特异性识别的免疫分析法,如酶联免疫吸附法和胶体金侧流层析法等。尽管仪器分析法属于确证性方法,但是其样本制备繁琐、仪器操作复杂、对检测人员素质要求较高、分析成本昂贵且耗时间长等弊端,无法满足快速检测以及现场检测需要。ELISA和胶体金试纸条等免疫分析具有高灵敏高特异性、操作简单快速,非常适合大量的检测和现场快速检测。

[0004] 在免疫分析方法中,抗体是其核心试剂,一旦获得优良的抗体,便可以设计出多种多样的免疫分析方法。而获得高灵敏度、高特异性的抗体的关键便是半抗原的设计与合成。钩吻素己的化学结构中并不存在可供直接的活性基团,这便需要以钩吻素己的化学结构为基础,做一定修饰,暴露出可供链接的氨基、羧基、羟基等活性基团。目前,未见钩吻素己半抗原设计与合成的相关报道。为获得优良的钩吻素己抗体,建立相关的免疫分析方法。

发明内容

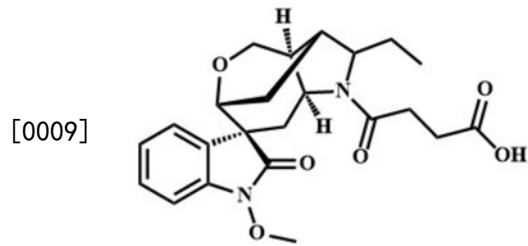
[0005] 本发明针对目前钩吻素己抗原合成技术及免疫分析技术的空白,提供一种新型的钩吻素己半抗原及全抗原合成方法,为高特异性、高灵敏度钩吻素己单克隆抗体制备及免疫分析方法的建立奠定基础。

[0006] 本发明首先将钩吻素己中不饱和胺基加氢还原,暴露其活性的氨基,然后与酸酐

反应得到含有羧基基团的化合物,即为钩吻素己半抗原;再与载体蛋白偶联获得其全抗原。

[0007] 本发明提供的钩吻素己半抗原,将钩吻素己中不饱和胺基加氢还原,暴露其活性的氨基,然后与酸酐反应,得到含有羧基基团的化合物,即为钩吻素己半抗原。

[0008] 优选地,本发明钩吻素己半抗原的结构如式(I)所示:



式(I)

[0010] 本发明提供的钩吻素己全抗原,其是由所述钩吻素己半抗原与载体蛋白偶联后得到的。

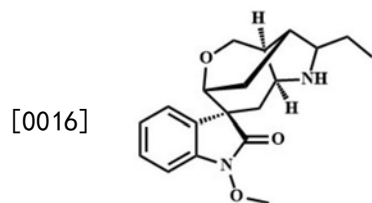
[0011] 本发明所述载体蛋白选自BSA、VOA、KLH等。

[0012] 本发明还提供由所述钩吻素己全抗原制备的特异性抗体,所述抗体为多克隆抗体或单克隆抗体。

[0013] 本发明还提供由所述钩吻素己半抗原,或所述钩吻素己全抗原,或所述特异性抗体制备的钩吻素己检测试剂或试剂盒。

[0014] 本发明还提供由所述钩吻素己半抗原,或所述钩吻素己全抗原,或所述特异性抗体,或所述检测试剂在制备钩吻素己的胶体金检测试纸条中的应用。

[0015] 本发明式(I)结构的钩吻素己半抗原,可按如下方法制备:钩吻素己化合物中的不饱和胺基经加氢还原后,得到式(II)化合物,式(II)化合物再与琥珀酸酐反应,即得钩吻素己半抗原。



式(II)

[0017] 具体制备方法如下:

[0018] 将50mg钩吻素己溶于3mL无水THF,加入3.0eq硼氢化钠,每隔3h加入5μL无水甲醇,共加入15μL,加毕,室温搅拌12h;加入20μL冰乙酸淬灭反应,将反应体系倒入分液漏斗,加入10mL水,60mL二氯甲烷,分3次萃取;合并有机相,浓缩干燥后进行柱色谱分离(以乙酸乙酯/石油醚作为展开剂,乙酸乙酯和石油醚的体积比为1:1,得式(II)化合物;然后,将20mg式(II)化合物溶于0.4mL DMF,加入2.0eq琥珀酸酐,室温搅拌过夜,反应体系加水淬灭后,用乙酸乙酯萃取,然后用稀盐酸(0.01N)洗涤,有机相干燥浓缩后,柱色谱分离即得目标化合物。

[0019] 与钩吻素己相比,目标化合物分子中增加了一个含四个碳原子的间隔臂,完整地保留了钩吻素己的结构,可以作为钩吻素己半抗原。

[0020] 本发明的钩吻素己全抗原,可按如下方法制备:

[0021] 采用活泼酯法合成钩吻素己全抗原:用N,N二甲基甲酰胺溶解钩吻素己半抗原,将

钩吻素己半抗原与N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 1-己基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺 (EDC) 按摩尔比1:2:4混合, 室温避光反应5h, 得到活化的钩吻素己半抗原溶液; 将载体蛋白溶解于磷酸盐缓冲液中, 制成浓度5mg/mL的载体蛋白溶液; 将活化的钩吻素己半抗原溶液逐滴加到载体蛋白溶液中, 边滴加边搅拌, 使活化的钩吻素己半抗原与载体蛋白的摩尔比达20:1, 4℃搅拌反应过夜, 用磷酸盐缓冲液透析3天, 离心取上清, 即得钩吻素己全抗原。

[0022] 本发明的制备方法各合成步骤中所述的固定值仅是优化后数值, 但是本发明的保护范围不限于此, 只要能够合成相应的钩吻素己半抗原和全抗原化合物, 应均属于本发明的保护范围。

[0023] 本发明钩吻素己全抗原的合成路线见图1。

[0024] 前述方法中, 所述载体蛋白为牛血清白蛋白 (BSA), 鸡卵清白蛋白 (OVA) 或匙孔血蓝蛋白 (KLH)。

[0025] 优选地, 所述钩吻素己半抗原及活化中间产物纯度均大于95%。

[0026] 优选地, 所述磷酸盐缓冲液的浓度为0.1M。

[0027] 优选地, 所述搅拌反应时间为9h。

[0028] 上述钩吻素己半抗原或全抗原化合物或抗体在检测钩吻素己中的应用, 以及用免疫分析方法检测实际样品中钩吻素己残留也属于本发明保护的范畴。

[0029] 利用本发明提供的半抗原与载体蛋白BSA的偶联物免疫小鼠后, 检测小鼠抗血清效价可达50000, 半数抑制浓度为2.1ng/mL。实验结果表明, 用本发明合成的钩吻素己半抗原、完全抗原可以产生高灵敏度、高特异性抗体。本发明的抗原和抗体可用于建立酶联免疫吸附分析方法等免疫分析方法, 为检测食品中的钩吻素己残留奠定了基础。

[0030] 本发明首次对钩吻素己结构进行了改造, 得到半抗原, 制备了钩吻素己全抗原, 填补了国内外空白。利用本发明的全抗原免疫动物可以产生针对钩吻素己的特异性抗体, 可用于建立钩吻素己的酶联免疫吸附分析方法和胶体金试纸条快速检测法, 从而用于快速检测钩吻素己导致的食物中毒, 应用前景广阔。

附图说明

[0031] 图1为本发明钩吻素己完全抗原的合成路线。

[0032] 图2为本发明实施例1中式 (II) 化合物 (A) 及钩吻素己半抗原 (B) 的质谱分析结果。

[0033] 图3为本发明实施例1中钩吻素己全抗原基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱图。

[0034] 图4为本发明实施例4中小鼠血清多抗与钩吻素己的结合稀释曲线。

具体实施方式

[0035] 以下实施例用于说明本发明, 但不用来限制本发明的范围。若未特别指明, 实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段, 所用原料均为市售商品。

[0036] 实施例1钩吻素己半抗原的合成和鉴定

[0037] 1、钩吻素己半抗原的合成

[0038] 将50mg钩吻素己溶于3mL无水THF, 加入3.0eq硼氢化钠, 每隔3小时加入5μL无水甲醇, 共加入15μL, 加毕, 室温搅拌12小时。加入20μL冰乙酸淬灭反应, 反应体系倒入分液漏斗, 加入10mL水, 60mL二氯甲烷, 分三次萃取。合并有机相浓缩干燥后柱色谱分离 (乙酸乙

酯/石油醚体系作为展开剂,体积比为1:1,得式(II)目标化合物约20mg。随后,将20mg钩吻素己的还原产物溶于0.4mL DMF,加入2.0eq琥珀酸酐,室温搅拌过夜,反应体系加水淬灭后乙酸乙酯萃取,少量稀盐酸洗涤(0.01N),有机相干燥浓缩后柱色谱分离得目标化合物约5mg。

[0039] 2、钩吻素己半抗原的鉴定

[0040] 将步骤1所得还原产物采用高分辨质谱对其进行了质谱鉴定。鉴定结果见图2A。可以明显看到 m/z 328.17814 ($[M+H]^+$, $C_{19}H_{20}N_2O_3^+$),与钩吻素己的 m/z 326.16249 ($[M+H]^+$, $C_{19}H_{22}N_2O_3^+$)相比,质量数增加了2Da,表明第一步反应成功。图2B展示了第二步反应的产物,其精确质量数 m/z 428.19419 ($[M+H]^+$, $C_{23}H_{28}N_2O_6^+$),与钩吻素己的还原产物相比,质量数增加了100Da,表明目标物合成成功,与预期结果相符。

[0041] 实施例2钩吻素己全抗原的制备

[0042] 将半抗原与BSA的偶联物I,作为免疫原。将半抗原与OVA的偶联物II,作为包被原。

[0043] 1、钩吻素己免疫原的制备

[0044] 称取20mg半抗原,溶解于1mL DMF中,得到半抗原溶液;将制备的半抗原溶液,加入20mg EDC和20mg NHS,置于磁力搅拌器上,400rpm室温反应2h,得到反应中产物;取50mg BSA,溶于10mL含10% (体积百分含量) DMF的PBS缓冲液中,得到浓度约为5mg/mL的蛋白溶液。

[0045] 将反应中产物液相逐滴加入到制备的蛋白溶液中4℃搅拌,过夜反应,然后转移到截留分子量为7KDa的透析袋中,然后将透析袋置于PBS缓冲液中4℃透析3天。透析完成后,取出透析袋中的液相,3000rpm离心5min,收集上清液,即为偶联物I溶液。

[0046] 用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS)法测定偶联物I溶液中BSA与半抗原的结合比。结果见图3。

[0047] 结合比 = $(M_{\text{偶联物}} - M_{\text{载体蛋白}}) / M_{\text{半抗原}}$

[0048] 其中, M为相对分子质量。

[0049] BSA的分子量为64806Da,半抗原的分子量为428。由质谱最高峰分析偶联物的分子量为66449,经计算得出BSA与半抗原的结合比为3.82,即单个BSA分子上平均偶联3.82个半抗原。

[0050] 2、钩吻素己包被原的制备

[0051] 同步骤1的制备方法,用OVA代替BSA,得到偶联物II溶液。

[0052] 实施例3钩吻素己抗血清的制备

[0053] 将实施案例2制得的钩吻素己免疫原与佐剂乳化,用颈背部皮下多点注射免疫法免疫6-8周龄雌性Ba1b/c小鼠5只,每间隔4周加强免疫一次。

[0054] 首免制剂的制备方法如下:取实施例2制备的免疫原溶液,用PBS缓冲液稀释至1mg/mL,然后与等体积的弗氏完全佐剂混合并乳化。

[0055] 加强免制剂的制备方法如下:取实施例2制备的免疫原溶液,用PBS缓冲液稀释至1mg/mL,然后与等体积的弗氏不完全佐剂混合并乳化完全。

[0056] 实施例4钩吻素己抗血清的测定

[0057] 对小鼠两次加强免疫后一周,眼眶采血,通过离心获得血清后进行检测。

- [0058] (一) 采用间接方法(方阵滴定法)检测血清效价
- [0059] 1、包被
- [0060] 采用Costar 96孔透明板,每孔加入100 μ L包被液,37 $^{\circ}$ C孵育2h,然后用PBST溶液洗板3次。
- [0061] 包被液:用pH 9.6、0.05M的碳酸盐缓冲液稀释实施例2制备的偶联物II溶液,使偶联物II溶液从5 μ g/mL开始倍比稀释(以总蛋白浓度计)。
- [0062] 2、封闭
- [0063] 每孔加入150 μ L封闭液,37 $^{\circ}$ C孵育1h,然后用PBST溶液洗涤3次,拍干。
- [0064] 封闭液:2%脱脂牛奶水溶液。
- [0065] 3、加待测抗体
- [0066] 试验孔:每孔加入50 μ L PBS缓冲液和50 μ L小鼠抗血清稀释液;
- [0067] 对照孔:每孔加入50 μ L PBS缓冲液和50 μ L第一次免疫前的血清;
- [0068] 37 $^{\circ}$ C孵育30min,然后用PBST溶液洗涤3次,拍干。
- [0069] 稀释液:从1:2000稀释度开始,采用倍比稀释法(2倍稀释),共8个稀释度;采用PBS缓冲液作为溶剂。
- [0070] 4、加酶标二抗
- [0071] 每孔加入100 μ L酶标二抗稀释液,37 $^{\circ}$ C孵育30min,然后用PBST溶液洗涤3次,拍干。
- [0072] 酶标二抗稀释液:羊抗鼠IgG酶标抗体稀释至5000倍体积。
- [0073] 5、显色
- [0074] 每孔加入100 μ L显色液,37 $^{\circ}$ C孵育15min。
- [0075] 显色液:将2%3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液(TMB)和30%过氧化氢等体积混合。
- [0076] 6、终止反应
- [0077] 每孔加入50 μ L 2M浓硫酸。
- [0078] 7、读数
- [0079] 以OD_{450nm}波长测定各孔OD值。以阴性OD值不大于0.15,以最大OD值在1.5-1.8之间对应的抗体稀释度为抗体效价。
- [0080] (二) 采用间接竞争方法检测血清灵敏度及特异性
- [0081] 1、用上述的间接方阵滴定法确定包被原和抗体的工作浓度,OD值在1.7左右时所对应的抗原和抗体浓度为最适工作浓度。
- [0082] 2、包被
- [0083] 每孔加入100 μ L适宜浓度的包被液,37 $^{\circ}$ C孵育2h,然后用PBST溶液洗板3次。
- [0084] 3、封闭
- [0085] 每孔加入150 μ L封闭液,37 $^{\circ}$ C孵育1h,然后用PBST溶液洗涤3次,拍干。
- [0086] 4、加标准品和抗体
- [0087] 每孔加入50 μ L钩吻素己及其结构类似物钩吻素甲溶液和50 μ L适宜浓度的抗血清,37 $^{\circ}$ C孵育30min,然后用PBST溶液洗涤3次,拍干。
- [0088] 标准品溶液的溶剂为PBS缓冲液,钩吻素己及钩吻素甲标准品浓度分别为0、0.1、0.3、0.9、2.7、8.1、24.3和72.9ng/mL的溶液,每个浓度三个平行。
- [0089] 5、加酶标二抗

[0090] 每孔加入100 μ L酶标二抗稀释液,37 $^{\circ}$ C孵育30min,然后用PBST溶液洗涤3次,拍干。

[0091] 6、显色

[0092] 每孔加入100 μ L显色液,37 $^{\circ}$ C孵育15min。

[0093] 7、终止反应

[0094] 每孔加入50 μ L 2M浓硫酸。

[0095] 8、读数

[0096] 以OD_{450nm}波长测定各孔OD值。

[0097] 9、数据处理

[0098] 以 \log_{10} (钩吻素己浓度)值为横坐标,以OD值(测定OD_{450nm})为纵坐标,利用Origin 8.0的四参数方程进行拟合,建立标准曲线获得IC₅₀值。图4展示了小鼠血清多抗与钩吻素己的结合稀释曲线,其IC₅₀值为1.02ng/mL,表明此血清多抗具有良好的灵敏度。

[0099] 钩吻素己抗体的特异性以交叉反应率来计算,计算方式为:

[0100] 交叉反应率 = IC₅₀(钩吻素己) / IC₅₀(结构类似物)

[0101] 结果显示,二次加强免疫后,小鼠抗血清效价可达50000,半数抑制浓度为2.1ng/mL,与结构类似物钩吻素甲、钩吻素子等钩吻生物碱的交叉反应率小于0.1%,表明或者的小鼠多抗具有良好的特异性。

[0102] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之做一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

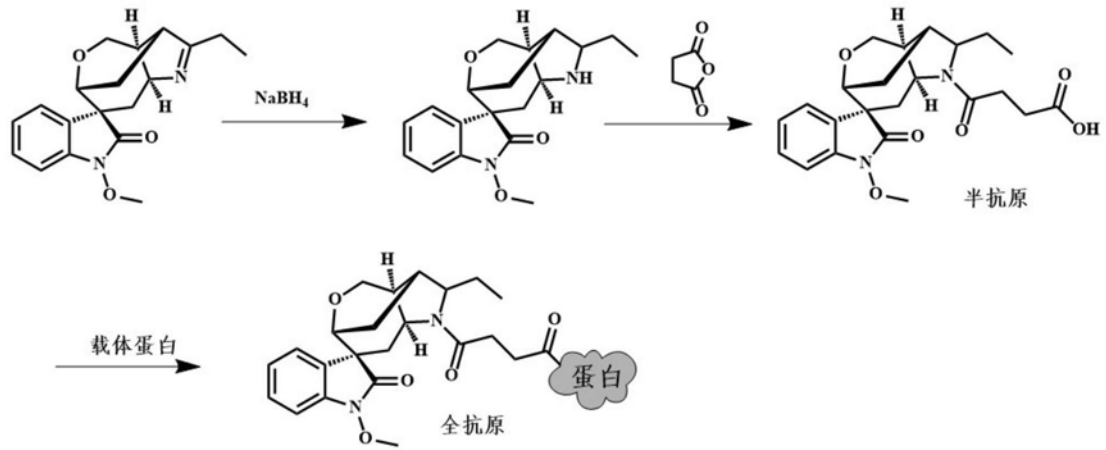


图1

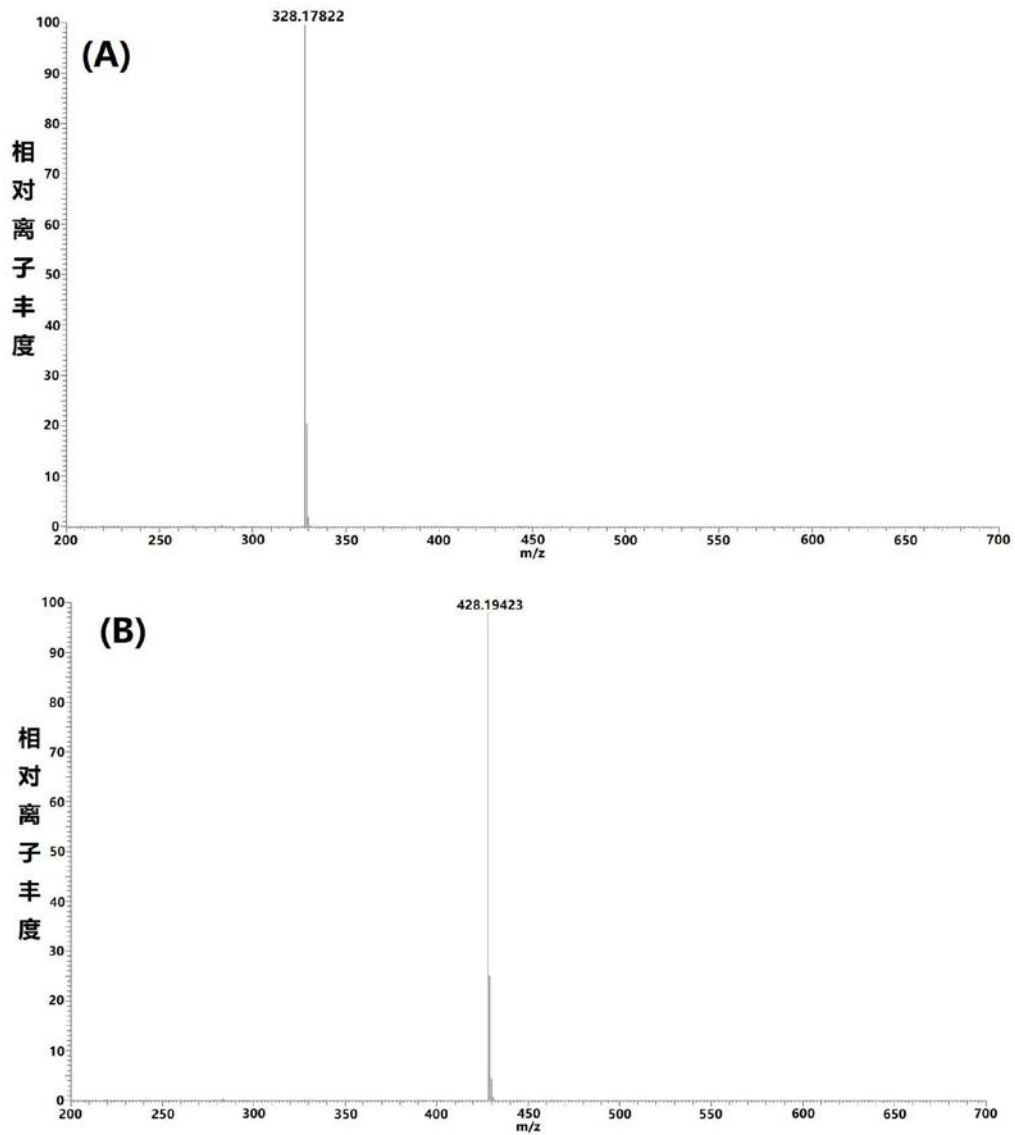


图2

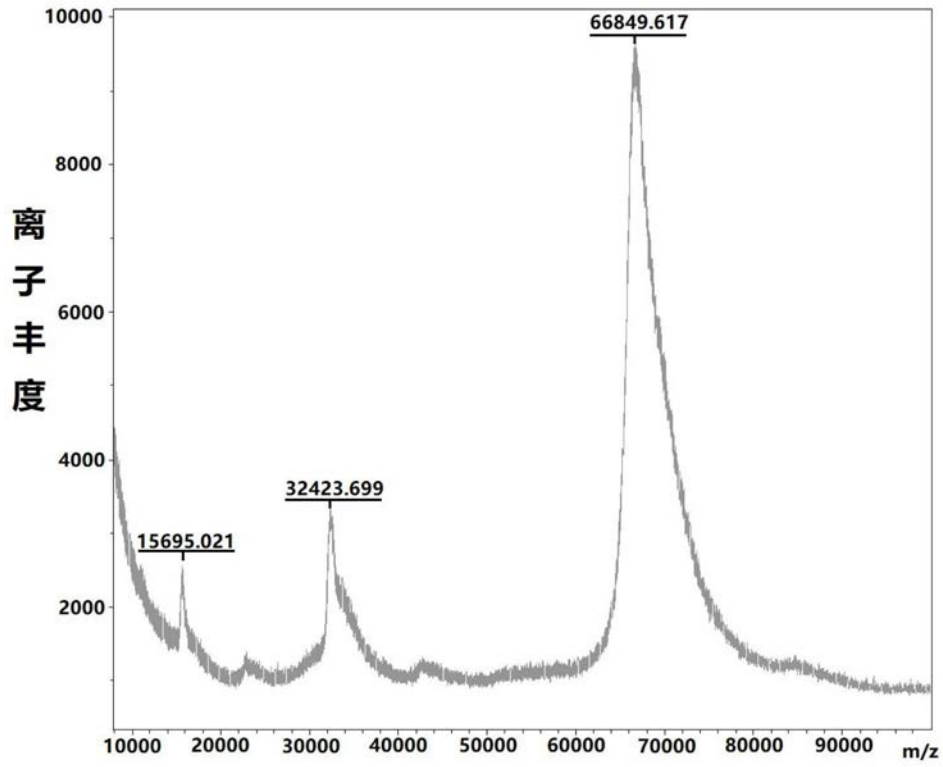


图3

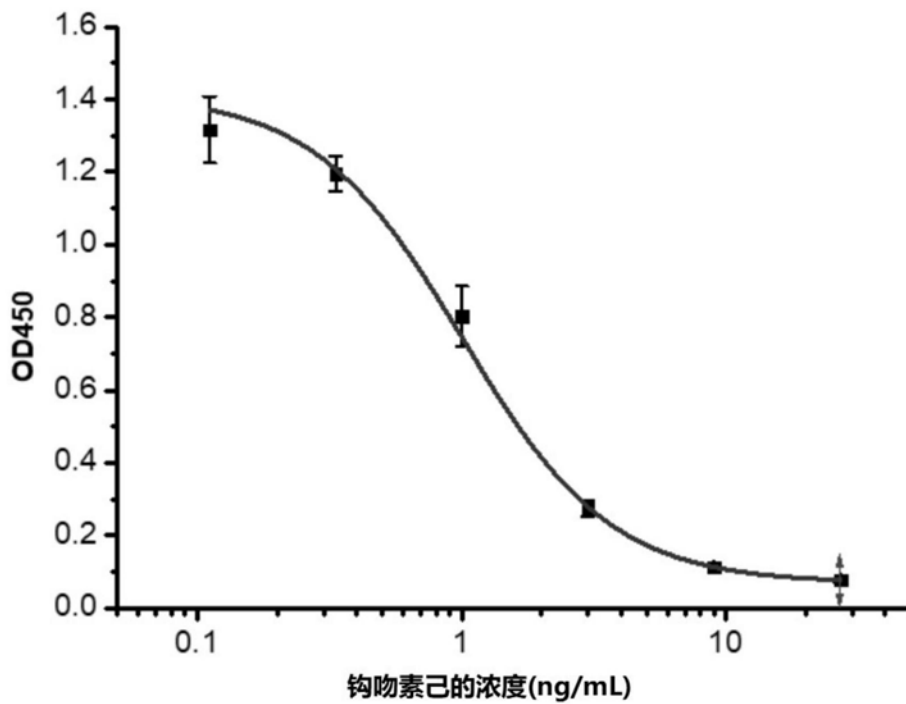
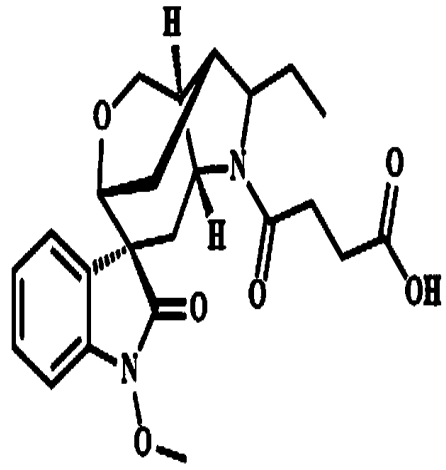


图4

专利名称(译)	钩吻素己半抗原和全抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN108409749B	公开(公告)日	2019-09-06
申请号	CN201810089277.4	申请日	2018-01-30
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院蜜蜂研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院蜜蜂研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院蜜蜂研究所		
[标]发明人	杨术鹏 李熠 张金振 周金慧 张静 关利娟 金玥 袁媛 王鹏 赵文		
发明人	杨术鹏 李熠 张金振 周金慧 张静 关利娟 金玥 袁媛 王鹏 赵文		
IPC分类号	C07D491/22 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K1/107 G01N33/531 G01N33/558 G01N33/577		
代理人(译)	王文君 黄爽		
审查员(译)	李军勇		
其他公开文献	CN108409749A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及钩吻素己半抗原和全抗原及其制备方法与应用。本发明首先将钩吻素己中不饱和胺基加氢还原，暴露其活性的氨基，然后与酸酐反应，得到含有羧基基团的化合物，即为钩吻素己半抗原；再将半抗原与载体蛋白偶联获得其全抗原。利用本发明的全抗原免疫动物可以产生针对钩吻素己的特异性抗体，可用于建立钩吻素己的酶联免疫吸附分析方法和胶体金试纸条快速检测法，从而用于快速检测钩吻素己导致的食物中毒，应用前景广阔。



式 (I)