



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109824645 A

(43)申请公布日 2019.05.31

(21)申请号 201910152522.6

C07K 14/435(2006.01)

(22)申请日 2019.02.28

C07K 16/44(2006.01)

(71)申请人 中国农业大学

G01N 33/53(2006.01)

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

G01N 33/535(2006.01)

(72)发明人 沈建忠 王战辉 江海洋 温凯
余文博 于雪芝 李红芳 段长飞
史为民 张素霞

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君 黄爽

(51)Int.Cl.

C07D 311/56(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

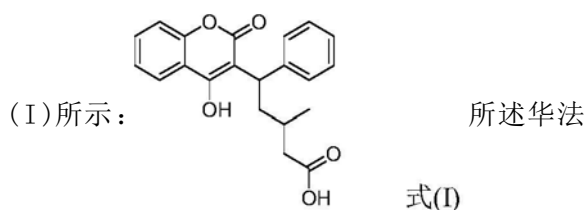
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

华法林半抗原和人工抗原及其制备方法与
应用

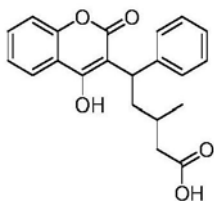
(57)摘要

本发明涉及华法林半抗原和人工抗原及其
制备方法与应用。所述华法林半抗原的结构如式



林人工抗原是由式(I)所示半抗原与载体蛋白偶
联得到。利用所述华法林人工抗原免疫动物,可
得到效价高,灵敏度高的特异性抗体。本发明提
供的华法林半抗原及其制备的抗体,为建立快
速、简便、价廉、灵敏、特异的华法林检测方法提
供了新手段。

1. 华法林半抗原, 其特征在于, 其结构如式(I)所示:

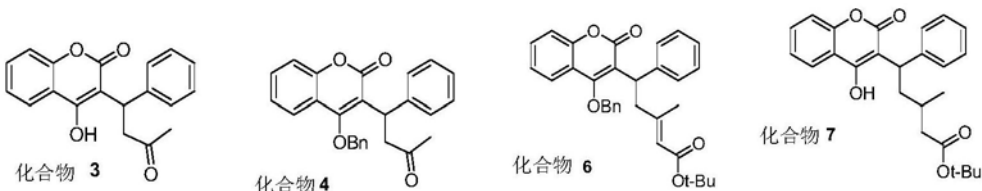


式(I)。

2. 权利要求1所述半抗原的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

- 1) 4-羟基香豆素、苯亚甲基丙酮与DL-脯氨酸反应得到化合物3;
- 2) 化合物3与苄溴反应得到化合物4;
- 3) 化合物4与2-(二乙氧磷酰)乙酸叔丁酯反应得到化合物6;
- 4) 化合物6发生氢化反应得到化合物7;
- 5) 化合物7与三氟乙酸反应得到华法林半抗原;

其中, 所述化合物3、4、6、7的结构分别如下:



3. 根据权利要求2所述的方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

1) 将1.62g 4-羟基香豆素、1.46mg苯亚甲基丙酮与含580mg DL-脯氨酸的DMSO溶液20mL混合, 于20℃搅拌16h; 向反应混合物中加水120mL; 反应混合物用乙酸乙酯提取; 合并有机相, 依次用水、饱和食盐水洗, 然后用硫酸镁干燥, 溶剂旋干后所得残留物用硅胶柱层析分离, 得到化合物3;

2) 化合物4的合成: 将616mg化合物3、376mg苄溴与含607mg碳酸钾的丙酮溶液20mL混合, 25℃回流24h; 溶剂旋干后, 向所得残留物中加入1N盐酸溶液30mL, 然后用乙酸乙酯提取; 合并有机相, 用硫酸镁干燥, 溶剂旋干后所得残留物用硅胶柱层析分离, 得到化合物4;

3) 化合物6的合成: 向含378mg 2-(二乙氧磷酰)乙酸叔丁酯的四氢呋喃溶液20mL中, 在0℃下加入含60mg氢钠的浓度为60%的矿物油, 该反应混合物在室温搅拌15min; 然后向反应体系中加入398mg化合物4, 室温搅拌16h; 再向反应体系中加入饱和氯化铵溶液50mL, 然后用乙酸乙酯提取; 合并有机相, 依次用水、饱和食盐水洗, 然后用无水硫酸钠干燥, 溶剂旋干后所得残留物用硅胶柱层析分离, 得到化合物6;

4) 化合物7的合成: 将4.70g化合物6、10%钯碳700mg和50mL乙醇的混合物在氢气氛围下, 于25℃氢化24h, 过滤去掉钯碳, 滤液浓缩得粘稠油状物, 即为化合物7的粗品;

5) 华法林半抗原的合成: 0℃下, 向含3.50g化合物7粗品的二氯甲烷溶液20mL中加入6mL三氟乙酸, 反应混合物在室温下搅拌24h; 然后向反应体系中加入二氯甲烷80mL和水80mL, 溶液分层; 有机相依次用水、饱和食盐水洗, 然后用无水硫酸钠干燥, 溶剂旋干后即得华法林半抗原;

优选地, 步骤1) 和2) 硅胶柱层析所用流动相为石油醚和乙酸乙酯体积比4:1的混合物; 步骤3) 硅胶柱层析所用流动相为石油醚和乙酸乙酯体积比15:1的混合物。

4. 华法林人工抗原, 其特征在于, 由权利要求1所述华法林半抗原与载体蛋白偶联后得

到；

其中,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白;优选牛血清白蛋白、钥孔血蓝蛋白。

5. 权利要求4所述人工抗原的制备方法,其特征在于,采用活泼酯法使所述华法林半抗原与载体蛋白偶联制得人工抗原。

6. 由权利要求4所述人工抗原制备的特异性抗体,包括多克隆抗体和单克隆抗体。

7. 权利要求1所述半抗原或权利要求4所述人工抗原的以下任一应用:

①在制备抗华法林特异性抗体中的应用;

②在检测抗华法林特异性抗体中的应用。

8. 抗华法林多克隆抗体,其特征在于,由权利要求4所述人工抗原免疫实验动物获得;优选地,所述人工抗原由所述华法林半抗原与钥孔血蓝蛋白偶联得到。

9. 由权利要求6所述特异性抗体或权利要求8所述多克隆抗体制备的华法林检测试剂或试剂盒。

10. 权利要求6所述特异性抗体或权利要求8所述多克隆抗体的以下任一应用:

(1) 在检测华法林中的应用;

(2) 在制备华法林的免疫层析试纸条中的应用;

(3) 在制备华法林的胶体金检测试纸条中的应用。

华法林半抗原和人工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,涉及华法林半抗原和人工抗原及其制备方法与应用。

背景技术

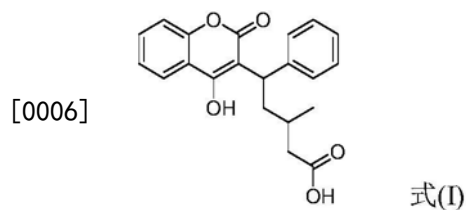
[0002] 华法林(warfarin,WAR)是一种香豆素类抗凝血剂,是应用最早、最畅销且使用最广泛的灭鼠药。因其结构与维生素K相似,可以抑制维生素K参与的凝血因子II、VII、IX、X的在肝脏的合成。当鼠食用大量药物后会出现内脏出血至死的现象,从而达到高效灭鼠的效果。而人体摄入过量华法林后会发生皮肤淤血和胃出血、肠道出血等内出血的现象,后果较为严重。由于华法林便宜易获得,应用广泛,经常会发生一些误食,恶意投毒,二次中毒等中毒事件,严重影响威胁了公共卫生安全。因此,在发生中毒事件后有必要对生物样本中华法林的进行检测,为病因的确证和临床治疗奠定基础。

[0003] 目前,生物样品中华法林的检测方法主要有高效液相色谱法,液质联用等仪器分析方法。尽管仪器分析方法是确证方法,但存在检测成本高,需要专门人员进行操作,样品处理复杂等缺点,无法满足大批量样本快速筛查。免疫分析技术,具有较高的灵敏度和特异性,已成为大量样本的现场快速检测的通用方法。免疫分析方法的关键在于抗原的设计和抗体的制备。利用化学合成法,合成有一定的复杂性或刚性,结构基本满足抗体制备的前提下具有活性基团的半抗原。根据半抗原的活性基团,选择相应的生物偶联方法,将半抗原与载体蛋白偶联,制备完全抗原,免疫模式动物,获得抗体,为免疫分析方法的建立奠定基础。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供华法林半抗原和人工抗原及其制备方法与应用。

[0005] 为了实现本发明目的,第一方面,本发明提供华法林半抗原,其结构如式(I)所示:



[0007] 第二方面,本发明提供所述半抗原的制备方法,包括如下步骤:

[0008] 1) 4-羟基香豆素、苯亚甲基丙酮与DL-脯氨酸反应得到化合物3;

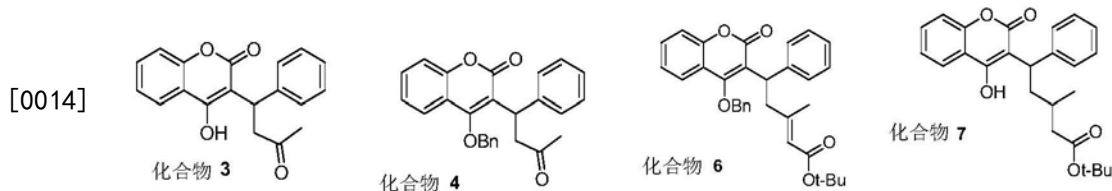
[0009] 2) 化合物3与苯溴反应得到化合物4;

[0010] 3) 化合物4与2-(二乙氧磷酰)乙酸叔丁酯反应得到化合物6;

[0011] 4) 化合物6发生氢化反应得到化合物7;

[0012] 5) 化合物7与三氟乙酸反应得到华法林半抗原;

[0013] 其中,所述化合物3、4、6、7的结构分别如下:



[0015] 进一步地,前述制备方法包括如下步骤:

[0016] 1) 化合物3的合成:将1.62g 4-羟基香豆素、1.46mg苯亚甲基丙酮与含580mg DL-脯氨酸的DMSO溶液20mL混合,于20℃搅拌16h;向反应混合物中加水120mL;反应混合物用乙酸乙酯(100mL)提取(优选提取3次);合并有机相,依次用水(100mL)、饱和食盐水(100mL)洗,然后用硫酸镁干燥,溶剂旋干后所得残留物用硅胶柱层析(优选流动相为石油醚和乙酸乙酯体积比4:1的混合物)分离,得到化合物3;

[0017] 2) 化合物4的合成:将616mg化合物3、376mg苄溴与含607mg碳酸钾的丙酮溶液20mL混合,25℃回流24h;溶剂旋干后,向所得残留物中加入1N盐酸溶液30mL,然后用乙酸乙酯(50mL)提取(优选提取2次);合并有机相,用硫酸镁干燥,溶剂旋干后所得残留物用硅胶柱层析(优选流动相为石油醚和乙酸乙酯体积比4:1的混合物)分离,得到化合物4;

[0018] 3) 化合物6的合成:向含378mg 2-(二乙氧磷酰)乙酸叔丁酯的四氢呋喃溶液20mL中,在0℃下加入含60mg氢钠的浓度为60%的矿物油,该反应混合物在室温搅拌15min;然后向反应体系中加入398mg化合物4,室温搅拌16h;再向反应体系中加入饱和氯化铵溶液50mL,然后用乙酸乙酯(50mL)提取;合并有机相,依次用水(50mL)、饱和食盐水(50mL)洗,然后用无水硫酸钠干燥,溶剂旋干后所得残留物用硅胶柱层析(优选流动相为石油醚和乙酸乙酯体积比15:1的混合物)分离,得到化合物6;

[0019] 4) 化合物7的合成:将4.70g化合物6、10%钨碳700mg和50mL乙醇的混合物在氢气氛围下,于25℃氢化24h,过滤去掉钨碳,滤液浓缩得粘稠油状物,即为化合物7的粗品;

[0020] 5) 华法林半抗原的合成:0℃下,向含3.50g化合物7粗品的二氯甲烷溶液20mL中加入6mL三氟乙酸,反应混合物在室温下搅拌24h;然后向反应体系中加入二氯甲烷80mL和水80mL,溶液分层;有机相依次用水(80mL)、饱和食盐水(80mL)洗,然后用无水硫酸钠干燥,溶剂旋干后即得华法林半抗原。

[0021] 本发明华法林半抗原合成路线见图1。

[0022] 第三方面,本发明提供华法林人工抗原,是由所述华法林半抗原与载体蛋白偶联后得到。所述华法林人工抗原可以作为免疫原也可以作为包被原。

[0023] 其中,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白;优选牛血清白蛋白、钥孔血蓝蛋白。

[0024] 第四方面,本发明提供所述人工抗原的制备方法,采用活化酯法(Active ester method,NHS)将载体蛋白偶联于所述华法林半抗原的羧基碳上。

[0025] 可选地,式(I)所示化合物与载体蛋白的偶联摩尔比为8:1。

[0026] 第五方面,本发明提供由所述华法林人工抗原制备的特异性抗体,包括多克隆抗体和单克隆抗体,优选多克隆抗体。所述多克隆抗体可通过华法林人工抗原免疫实验动物(如小鼠),收集血清纯化获得。

[0027] 第六方面,本发明提供所述华法林半抗原或所述华法林人工抗原的以下任一应用:

- [0028] ①在制备抗华法林特异性抗体中的应用；
- [0029] ②在检测抗华法林特异性抗体中的应用。
- [0030] 第七方面,本发明提供由所述特异性抗体制备的华法林检测试剂或试剂盒。
- [0031] 第八方面,本发明提供所述特异性抗体的以下任一应用:
- [0032] (1) 在检测华法林中的应用;
- [0033] (2) 在制备华法林的免疫层析试纸条中的应用;
- [0034] (3) 在制备华法林的胶体金检测试纸条中的应用。
- [0035] 本发明所述人工抗原分为免疫原和包被原,免疫原可以是WAR-KLH,包被原可以是WAR-BSA。
- [0036] 在本发明的一个具体实施方式中,免疫Balb/c小鼠的方法为:免疫原用等体积的弗氏完全佐剂乳化后首次免疫6周龄Balb/c小鼠,再用相同剂量的免疫原与等体积的弗氏不完全佐剂乳化后对首次免疫的Balb/c小鼠进行加强免疫。
- [0037] 其中,所述首次免疫的所述免疫原的剂量为0.1mg/只,乳化后每只Balb/c小鼠的免疫剂量为0.2ml/只。
- [0038] 上述加强免疫次数为2次。
- [0039] 上述加强免疫具体为在每次免疫后3周各进行一次加强免疫。
- [0040] 所述小鼠抗血清即为鼠源多克隆抗体,在第二次加强免疫一周后,眼球静脉采血分离获得血清。
- [0041] 所述分析测定方法为酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)。
- [0042] 所述ELISA检测方法,包括:间接ELISA法,检测华法林抗体血清效价;间接竞争ELISA法,测定抗体的半数抑制浓度(IC₅₀)和特异性。
- [0043] 借由上述技术方案,本发明至少具有下列优点及有益效果:
- [0044] (一)本发明首次公开了一种新型的华法林半抗原、人工抗原及其制备方法,用所述华法林人工抗原免疫动物,可得到效价高,灵敏度高的特异性抗体。本发明提供的华法林半抗原及其制备的抗体,为建立快速、简便、价廉、灵敏、特异的华法林检测方法提供了新手段。
- [0045] (二)本发明提供的华法林半抗原是利用从头合成的多步化学合成法,在尽可能保持华法林结构不变的情况下,得到活泼基团为羧基的半抗原。将所获得的纯化后的半抗原偶联载体蛋白用于制备抗体或包被原,继而建立免疫分析方法,具有较好的应用前景。
- [0046] (三)本发明提供的华法林半抗原合成方法,其完全抗原可将华法林的化学结构暴露出来作为抗原决定簇,为高灵敏度抗华法林抗体制备奠定基础。
- [0047] (四)利用本发明提供的半抗原与载体蛋白的偶联物制备华法林抗体(多克隆抗体),制备过程简单、经济,抗体效价最高可达 6.4×10^4 ,检测灵敏度(IC₅₀)为0.09ng/mL,实用价值高,在公共卫生安全检测中具有良好的应用前景。

附图说明

- [0048] 图1为本发明实施例1中式(I)所示华法林半抗原制备的流程图。
- [0049] 图2为本发明实施例1中华法林半抗原氢谱图。

[0050] 图3为本发明实施例3中利用抗血清WAR-3#检测华法林的标准曲线图。

具体实施方式

[0051] 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。

[0052] 以下实施例中使用的华法林、鼠得克、氯华法林、克灭鼠、杀鼠醚、溴敌隆、大隆、氟鼠灵、噻鼠灵、敌鼠、氯敌鼠和氯鼠酮等标准品均购自百灵威科技公司。

[0053] 化学试剂二甲基亚砜、4-羟基香豆素、苯亚甲基丙酮、乙酸乙酯、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、碳酸钾、硫酸镁、乙醇等购自国药集团。

[0054] 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、Proclin 300生物防腐剂,偶联剂N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)等均购自Sigma公司。

[0055] 钥孔血蓝蛋白(Keyhole Limpet Hemocyanin,KLH),牛血清白蛋白(Albumin from bovine serum,BSA),胎牛血清均购自Sigma公司。

[0056] 羊抗鼠IgG酶标抗体购自Jackson Immunoresearch。

[0057] 96孔酶标板购自Costar公司。

[0058] Balb/c小鼠购自北京维通利华。

[0059] 柱层析所用固定相均为200-300目的硅胶。

[0060] 实施例1华法林半抗原的制备和鉴定

[0061] 一、华法林半抗原的制备

[0062] 1、化合物3的合成

[0063] 4-羟基香豆素(化合物1,1.62g,10mmol),苯亚甲基丙酮(化合物2,1.46g10mmol)和含DL-脯氨酸(580mg,5mmol)的DMSO(20mL)溶液于20℃搅拌16h。向反应混合物中加水120mL。反应混合物用乙酸乙酯(100mL)提取3次。合并的有机相用100mL水洗,饱和食盐水洗(100mL),硫酸镁干燥。旋转蒸发仪回收溶剂后得一白色残留物(3.3g)。该残留物用硅胶柱层析分离(石油醚:乙酸乙酯=4:1,v/v)得白色粉末(2.60g,84%)为化合物3。

[0064] 2、化合物4的合成

[0065] 化合物3(616mg,2mmol),苄溴(376mg,2mmol)和含碳酸钾(607mg,4mmol)的丙酮(20mL)混合,25℃回流24h。丙酮用旋转蒸发仪回收得残留物。向该残留物中加1N盐酸溶液(30mL),然后用乙酸乙酯(50mL)提取两次。合并有机相(乙酸乙酯),用硫酸镁干燥,溶剂旋干后得残留物。该残留物用硅胶柱层析分离(石油醚:乙酸乙酯=4:1,v/v)得白色粉末(300mg,38%)为化合物4。

[0066] 3、化合物6的合成

[0067] 向含2-(二乙氧磷酰)乙酸叔丁酯(化合物5,378mg,1.5mmol)的四氢呋喃(20mL)溶液中,在0℃下加入氢钠(60mg,溶于60%的矿物油中)。该反应混合物在室温搅拌15min。往反应体系中加入化合物4(398mg,1mmol)。该反应混合物在室温搅拌16h。向反应体系中加入饱和的氯化铵溶液(50mL)。乙酸乙酯提取(50mL),合并的有机相用水洗(50mL),饱和食盐水洗(50mL),无水硫酸钠干燥。溶剂旋干后得残留物(1.0g)。该残留物用硅胶柱层析分离(石油醚:乙酸乙酯=15:1,v/v)得白色粉末(100mg,25%)为化合物6。

[0068] 4、化合物7的合成

[0069] 化合物6 (4.70g, 9.46mmol), 钯碳(10%, 700mg) 和乙醇(50mL) 的混合物在氢气氛围下氢化24h, 过滤去掉钯碳。滤液浓缩得粘稠油状物(3.50g), 即为化合物7的粗品。

[0070] 5、化合物target-2的合成

[0071] 0℃下, 向含粗品化合物7 (3.50g) 的二氯甲烷(20mL) 溶液中加入三氟乙酸(6mL)。反应混合物在室温下搅拌24h。向反应体系中加入二氯甲烷(80mL), 水(80mL), 分层。有机相用水洗(80mL), 饱和食盐水洗(80mL), 硫酸钠干燥。旋干溶剂后得白色固体为目标产物target-2 (2.0g, 68%)。(合成路径图见图1)

[0072] 二、华法林半抗原的鉴定

[0073] 用核磁对纯化后的半抗原进行鉴定, 结果见图2。¹H NMR (500MHz, CDCl₃): δ 1.07-1.14 (m, 3H), 1.98-2.11 (m, 2H), 2.27-2.31 (m, 2H), 2.35-2.61 (m, 1H), 4.67-4.71 (m, 1H), 7.21-7.42 (m, 6H), 7.47-7.53 (m, 3H), 7.69-7.75 (m, 1H)。氢谱数据表明半抗原合成成功, 可以用于抗体的制备。

[0074] 实施例2华法林人工抗原的制备

[0075] 称取实施例1制备的华法林半抗原20mg, 溶解于400μL DMF中, 得到半抗原溶液。再向制备的半抗原溶液中加入10mg EDC和180mg NHS, 置于磁力搅拌器上, 300rpm室温反应5h。将反应后的溶液离心(4000rpm), 取上清(350μL)。取80mg BSA和20mg KLH, 分别溶于15mL含10% (体积百分含量) DMF的PBS缓冲液和10mL含5% (体积百分含量) DMF的PBS缓冲液中, 得到两种蛋白溶液。分别向两种蛋白溶液中滴加100μL和70μL上述上清液, 置于磁力搅拌器反应5h, 即可获得半抗原与载体蛋白的偶联物(人工抗原)。将上述所制备的蛋白偶联物转移到截留分子量为10KDa的透析袋中, 然后将透析袋置于PBS缓冲液中4℃透析3天。取出透析后的人工抗原3000rpm离心5min, 收集上清液。其中, KLH与半抗原的偶联物命名为WAR-KLH, BSA与半抗原的偶联物命名为WAR-BSA。

[0076] 实施例3华法林多克隆抗体的制备和鉴定

[0077] 一、华法林多克隆抗体的制备

[0078] 将实施例2制备的WAR-KLH作为免疫原免疫小鼠, 将WAR-BSA作为抗血清检测的包被原。用bradford法测定WAR-KLH和WAR-BSA的浓度, 经测定可得WAR-KLH和WAR-BSA的浓度分别为5mg/mL和1.5mg/mL。

[0079] 首次免疫时将WAR-KLH免疫原稀释至1mg/mL (用0.01mol/L PBS稀释), 取稀释后的免疫原与弗氏完全佐剂等体积混合, 并充分乳化, 颈背部皮下多点接种6周龄Ba1b/c小鼠(6只), 接种免疫原剂量为100μg/只, 注射剂量为0.2ml/只。之后, 每隔3周加强免疫一次, 加强免疫时将免疫原与等体积的弗氏不完全佐剂乳化。免疫原的免疫剂量与首次免疫剂量相同, 加强免疫次数为2次。

[0080] 二、小鼠多克隆抗体的检测

[0081] 在第2次加强免疫完成一周后对小鼠眼球采血, 3000rpm离心共获得5种抗血清(即多克隆抗体), 抗血清分别命名按照1#小鼠的抗血清为WAR-1#, 2#小鼠的抗血清为WAR-2#的规律进行命名。用经典棋盘法测抗血清效价以及用间接竞争ELISA法测抗血清灵敏度。

[0082] 1、抗血清效价的测定

[0083] 用间接ELISA法对抗体效价进行检测。间接ELISA法步骤如下:

[0084] (1) 包被: 用0.05M的碳酸盐缓冲液(pH 9.6) 将包被原WAR-BSA稀释成0.5μg/mL, 并

加入96孔透明酶标板中(100 μ L/孔),37 $^{\circ}$ C温箱孵育2h,用PBST缓冲液洗板3次。

[0085] (2) 封闭:加入封闭液(2%脱脂牛奶)150 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C温箱孵育1h,弃封闭液,用PBST缓冲液洗涤1次,拍干。

[0086] (3) 加待测抗体:各列孔加入50 μ L 0.01M PBS(pH7.4),再加入50 μ L稀释后的华法林多克隆抗体,抗体从1:2000开始,以2倍为梯度用0.01M PBS开始稀释,共稀释8个梯度。加样量为每孔50 μ L,37 $^{\circ}$ C温箱反应30min,PBST缓冲液洗涤3次,拍干。

[0087] 同时设置未经免疫的小鼠抗血清作为阴性对照。

[0088] (4) 加酶标二抗:加入用酶标二抗稀释液按照体积比1:5000稀释的HRP标记羊抗鼠IgG抗体,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C温箱反应30min,PBST缓冲液洗涤3次,拍干。

[0089] (5) 显色:将辣根过氧化物酶底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液和质量分数为30%的过氧化氢按照1:1的体积比混合,加入微孔板中(100 μ L/孔),37 $^{\circ}$ C温箱显色15min。

[0090] (6) 终止:每孔加入50 μ L 2mol/L的浓硫酸。

[0091] (7) 读数:以OD₄₅₀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。抗血清的最佳稀释度见表1,由表1数据可以看出,所有抗血清的稀释度均在 0.8×10^4 以上,说明用合成的半抗原偶联载体蛋白去免疫小鼠,可以获得较好的免疫效果。其中抗血清WAR-3#的效价最高,为 6.4×10^4 。

[0092] 2、多克隆抗体IC₅₀的测定

[0093] (1) 包被、封闭过程同上。

[0094] (2) 加标准品和抗体:每孔加入50 μ L华法林标准品溶液和50 μ L抗体稀释液(按照表1中的抗体效价进行稀释),37 $^{\circ}$ C孵育30min,然后用PBST溶液洗涤3次,拍干。标准品溶液的溶剂为PBS缓冲液,标准品浓度分别为0、0.0033、0.01、0.03、0.09、0.27、0.81和2.43ng/mL的溶液,每个浓度三个平行。

[0095] 表1抗血清性质表征

[0096]

抗血清编号	包被原浓度	抗体稀释度(10^4)	IC ₅₀ (ng/mL)
WAR-1#	0.5 μ g/mL	0.8	2.17
WAR-2#		3.2	1.2

[0097]

WAR-3#	6.4	0.09
WAR-4#	3.2	1.36
WAR-5#	1.6	3.65
WAR-6#	1.6	4.81

[0098] 注:IC₅₀测定时的检测标准物为华法林。

[0099] (3) 加酶标二抗,显色,终止及读数过程同上。

[0100] 将所测得的数据以 $-\log_{10}$ (竞争物)值为横坐标,以OD₄₅₀值为纵坐标,利用Origin8.0的四参数方程进行拟合,建立标准曲线获得IC₅₀值。5种多克隆抗体的IC₅₀值见表1,由表1数据可以看出,抗体的IC₅₀均低于5ng/mL,其中多克隆抗体WAR-3#的IC₅₀值最低,为0.09ng/mL。结果表明,本发明中所设计的半抗原结构作为抗原决定簇,可以很好地刺激小鼠产生高灵敏度抗体。

[0101] 3、多克隆抗体特异性的检测

[0102] 选取抗血清IC₅₀最低的WAR-3#,进行特异性的测定。检测方法同上。华法林结构类似物(鼠得克、氯华法林、克灭鼠、杀鼠醚、溴敌隆、大隆、氟鼠灵、噻鼠灵、敌鼠、氯敌鼠和氯鼠酮)的浓度调整为0,1,3,9,27,81,243,729ng/mL,设定3个平行,测定抗体的特异性。抗体的特异性用交叉反应率(CR)来表示,具体计算公式为:CR(%) = IC₅₀(华法林) / IC₅₀(结构类似物) × 100%。由表2数据可以看出,WAR-3#可以特异性识别华法林,对其他抗凝血鼠药的交叉反应率小于50%。

[0103] 表2抗血清WAR-3#的交叉反应率表

抗凝血鼠药	IC ₅₀ (ng/mL)	CR (%)
华法林	0.09	100.0
杀鼠醚	0.2	45.0
溴敌隆	0.4	22.5
氯华法林	1.28	7.0
敌鼠	2.4	3.8
[0104] 氯敌鼠	1.9	4.7
鼠得克	4.1	2.2
大隆	19	0.5
克灭鼠	18.8	0.5
氟鼠灵	24	0.4
噻鼠灵	243	0.04
氯鼠酮	>500	<0.02

[0105] 利用抗血清WAR-3#检测华法林的标准曲线见图3。WAR-3#对华法林的线性检测范围(IC₂₀-IC₈₀)为0.027-0.38ng/mL。IC₅₀=0.09ng/mL。

[0106] 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。

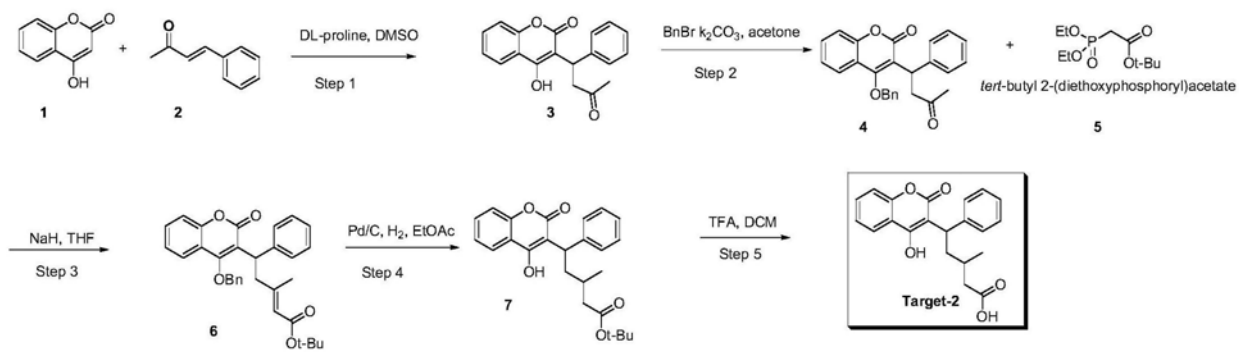


图1

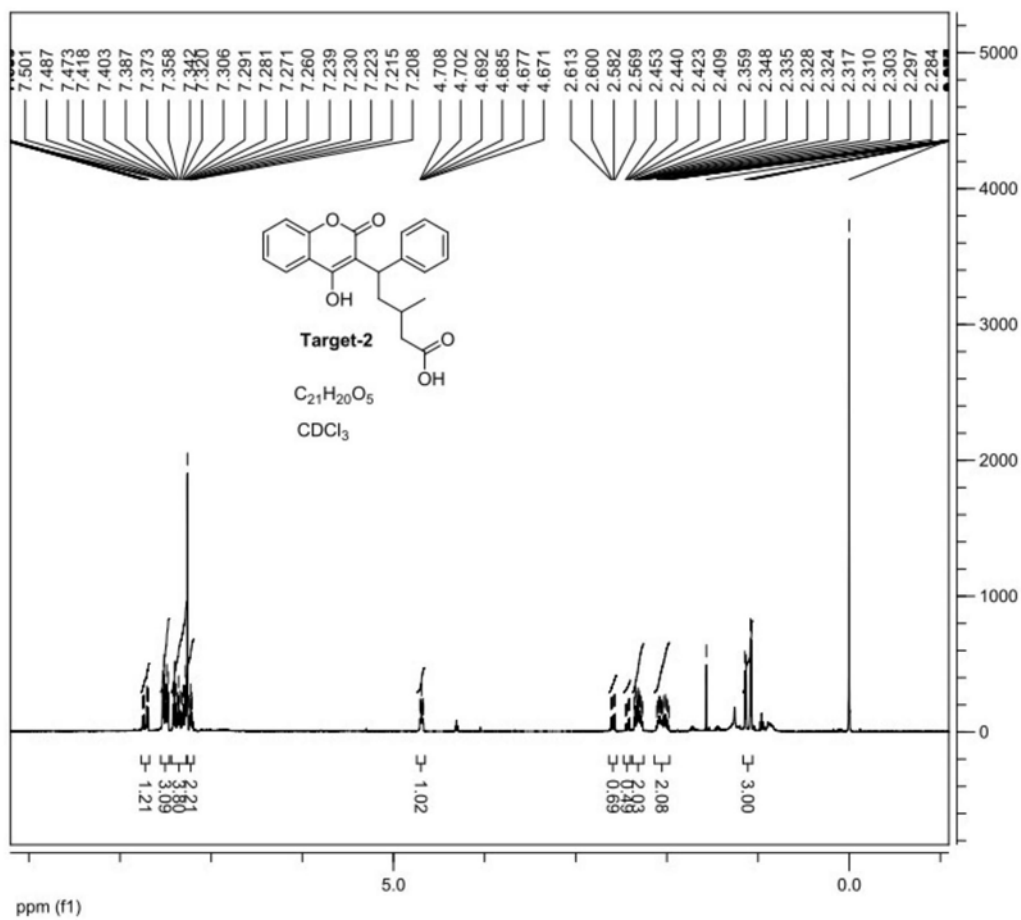


图2

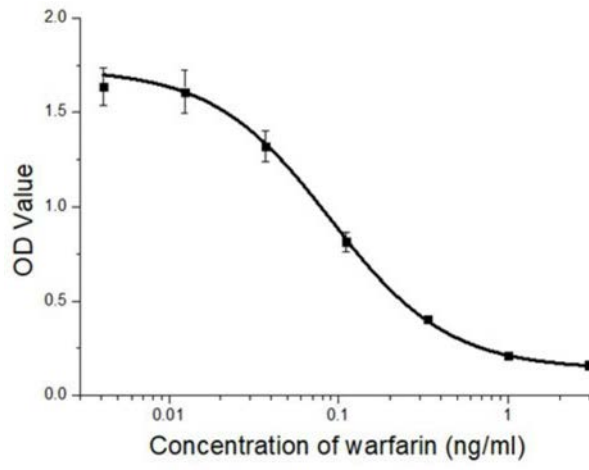
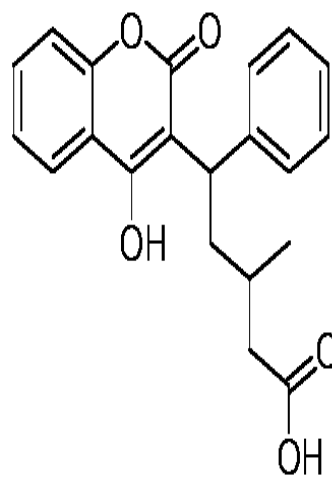


图3

专利名称(译)	华法林半抗原和人工抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN109824645A	公开(公告)日	2019-05-31
申请号	CN201910152522.6	申请日	2019-02-28
[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 王战辉 江海洋 温凯 余文博 于雪芝 李红芳 史为民 张素霞		
发明人	沈建忠 王战辉 江海洋 温凯 余文博 于雪芝 李红芳 段长飞 史为民 张素霞		
IPC分类号	C07D311/56 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K14/435 C07K16/44 G01N33/53 G01N33/535		
代理人(译)	王文君 黄爽		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及华法林半抗原和人工抗原及其制备方法与应用。所述华法林半抗原的结构如式(I)所示：所述华法林人工抗原是由式(I)所示半抗原与载体蛋白偶联得到。利用所述华法林人工抗原免疫动物，可得到效价高，灵敏度高的特异性抗体。本发明提供的华法林半抗原及其制备的抗体，为建立快速、简便、价廉、灵敏、特异的华法林检测方法提供了新手段。



式(I)。