



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102120766 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 13

(21) 申请号 201010602291. 3

(22) 申请日 2010. 12. 23

(71) 申请人 江苏省农业科学院

地址 210014 江苏省南京市玄武区钟灵街
50 号

(72) 发明人 张旭 邢锦城 马鸿翔 余桂红
孙晓波

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207
代理人 胡锡瑜

(51) Int. Cl.

C07K 14/76 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种脱氧雪腐镰刀菌烯醇人工抗原的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明属于免疫检测及生物技术领域, 具体涉及一种脱氧雪腐镰刀菌烯醇人工抗原的制备方法及应用。利用丁基硼酸封闭脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON) 的 7, 15- 羟基, 戊二酸酐酰化 3- 羟基合成 3-HG-DON, 通过二环己基碳二亚胺活泼酯法将 3-HG-DON 偶联到载体蛋白 BSA, 得到人工抗原 DON-HG-BSA。本发明提供的制备方法尽量避免反应副产物的生成, 降低或避免蛋白对半抗原的掩蔽效应, 制备过程温度条件比较温和, 在 10~37℃ 之间, 避免高温条件下 DON 氧化而产生副产物, 操作简易可行。

1. 一种脱氧雪腐镰刀菌烯醇人工抗原 DON-HG-BSA 的制备方法,其特征是由以下步骤构成:

(1) (A) 采用丁基硼酸(BBA)封闭脱氧雪腐镰刀菌烯醇 C7 和 C15 上的羟基,形成环状内酯 DON-BBA;(B) 用戊二酸酐同 C3 上的羟基发生酰化反应,形成 BBA-DON-HG,并用甲醇解封闭,形成 3-HG-DON;(C) 用 DCC 方法将 3-HG-DON 与 BSA 载体蛋白偶联,得到人工抗原 DON-HG-BSA;

(2) 步骤(A)中将脱氧雪腐镰刀菌烯醇溶解于无水四氢呋喃后与丁基硼酸(BBA)混合,脱氧雪腐镰刀菌烯醇与丁基硼酸的物质的量比为:1:8~10;脱氧雪腐镰刀菌烯醇与无水四氢呋喃的体积比为:0.01~0.02(g/mL);室温振荡反应 12-16 小时,以薄层色谱(TLC)检测监控反应程度,直至 DON 封闭完全,形成 DON-BBA;

(3) 步骤(B)中将 DON-BBA 与 4-二甲氨基吡啶(DMAP)(溶于无水四氢呋喃)和戊二酸酐(HG)(溶于无水四氢呋喃)混合,DON-BBA 与 DMAP 和 HG 的物质的量比为:1:2~4:6~9,4-二甲氨基吡啶与无水四氢呋喃的体积比为 1:0.1~0.2(g/mL),戊二酸酐与无水四氢呋喃的体积比为 1:0.1~0.2(g/mL);37℃振荡反应 2 小时后加入蒸馏水 400~500 μ l 终止反应,抽真空除去四氢呋喃;氯仿萃取 3~4 次,合并氯仿相,抽真空去除氯仿,将残留物溶于 700~800 μ l 甲醇,室温振荡反应(解封闭)12~16 小时;薄层层析纯化 3-HG-DON(展层剂为氯仿:丙酮:异丙醇=8:1:1),紫外光下刮取 Rf 值小于 DON 的条带,甲醇洗脱收集,真空干燥得 3-HG-DON;

(4) 步骤(C)中 3-HG-DON 与 N-羟基琥珀酰亚胺 NHS 及二环己基碳二亚胺 DCC 混合,溶于无水四氢呋喃中,3-HG-DON 与 NHS 及 DCC 的物质的量比为:1:0.001~0.003:0.002-0.004;10-14℃振荡反应 8~10 小时,以薄层色谱 TLC 检测监控反应程度;真空抽干四氢呋喃,加入 200~300 μ l DMSO 溶解,缓慢加入至 1200~1300 μ l 牛血清白蛋白溶液,15℃低速(100~120r/min)振荡反应 8~10 小时,用 0.01mol/L pH7.4 PBS 缓冲液透析 3 天,冷冻真空干燥,得到人工抗原 DON-HG-BSA,分装 4℃保存;

(5) 溶解载体蛋白的缓冲液为碳酸氢钠水溶液,缓冲液的浓度为 0.1~0.2 mol/L,载体蛋白的质量与缓冲溶液的体积比为 5~8 $\times 10^{-3}$ (g/mL)。

2. 权利要求 1 方法制备的一种脱氧雪腐镰刀菌烯醇人工抗原在食品、农业等领域免疫检测中的应用。

一种脱氧雪腐镰刀菌烯醇人工抗原的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测及生物技术领域,具体涉及一种脱氧雪腐镰刀菌烯醇人工抗原的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 由禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*, Schw)引起的小麦赤霉病是一个世界范围内的病害,不仅造成严重的产量损失,而且病麦粒残留的真菌毒素严重威胁人畜的健康。脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON),是一种单端孢霉烯族毒素,是禾谷镰刀菌产生的最重要的有毒代谢产物,主要污染小麦、玉米等谷物及其制品,不仅具有致动物呕吐等急性毒性、生殖毒性、免疫毒性,而且也是我国恶性肿瘤高发区居民粮食优势污染霉菌毒素之一。因此,及时对食品及其原料中的真菌毒素进行检测,防止真菌毒素(如DON)污染的食品进入食物链,是预防真菌毒素对人和动物带来危害的重要手段。

[0003] 薄层层析法(TLC)、高效液相法(HPLC)、气相色谱法(GC)曾广泛应用于脱氧雪腐镰刀菌烯醇的定量检测,但这些方法在检测过程中需要使用大量的有机溶剂、贵重的设备和繁杂的样品净化,比较昂贵和耗时,不适用于数量较多样品的检测。免疫学检测法,其原理是在成功制备DON免疫抗体的基础上,利用间接酶联免疫检测法(ELISA)来测样品中DON的含量,该方法具有高选择性、灵敏、快速、一次可检测多个样品、对样品的纯度要求不高、操作简单等特点,是目前DON检测的较好方法。DON是小分子半抗原,其分子量为296.3,结构简单,必须首先将其同大分子蛋白相偶联,合成DON人工抗原,才能保证DON抗原的有效包被。

[0004] 关于DON人工抗原合成的策略已有多种报道。1986年Zhang等首次建立了DON的免疫检测方法,通过将DON乙酰化,合成了含三个乙酰基的DON(Tri-Ac-DON),但测定过程比较烦琐,且准确性差。1988年Casale等在制备复合抗原的过程中,先将C7和C15上的羟基用丁基硼酸进行封闭,形成环状内酯,然后经高温反应将C3位上的羟基转变成羧基,再与载体蛋白进行共价结合,最后去除环状内酯物质。1990年Mills等人又采用一种新的半抗原衍生法,即用戊二酸酐与3-Ac-DON反应得到3-Ac-DON-Hemiglutarate。然后,利用乙酰酯酶(Acetyl esterase)水解掉C3上的乙酰基,生成DON-Hemiglutarate,再与BSA偶联,得到所需抗原DON-HG-BSA。该方法的不足之处是3-Ac-DON和乙酰酯酶非常昂贵。

发明内容

[0005] 本发明需要解决的问题是:提供有效而容易获得的方法制备脱氧雪腐镰刀菌烯醇的人工抗原,使之可以用于人工抗原的免疫学分析。

[0006] 本发明的技术方案为:1. 采用丁基硼酸封闭脱氧雪腐镰刀菌烯醇C7和C15上的羟基,形成环状内酯DON-BBA。2. 用戊二酸酐同C3上的羟基发生酰化反应,形成BBA-DON-HG,并用甲醇解封闭,形成3-HG-DON。3. 用DCC方法将3-HG-DON与BSA载体蛋白偶联,得到人工抗原DON-HG-BSA。

[0007] 1. 采用丁基硼酸封闭脱氧雪腐镰刀菌烯醇 C7 和 C15 上的羟基, 形成环状内酯 DON-BBA;

a) 将脱氧雪腐镰刀菌烯醇溶解于无水四氢呋喃后与丁基硼酸混合, 脱氧雪腐镰刀菌烯醇与丁基硼酸的物质的量比为 $1:8 \sim 10$, 脱氧雪腐镰刀菌烯醇与无水四氢呋喃的体积比为 $0.01 \sim 0.02$ (g/mL);

b) 室温振荡反应 12-16 小时, 以薄层色谱 TLC 检测监控反应程度, 直至 DON 封闭完全, 形成 DON-BBA。

[0008] 2. 用戊二酸酐同 C3 上的羟基发生酰化反应, 形成 BBA-DON-HG, 并用甲醇解封闭, 形成 3-HG-DON;

a) 将 DON-BBA 与 4-二甲氨基吡啶 (溶于无水四氢呋喃) 和戊二酸酐 (溶于无水四氢呋喃) 混合, DON-BBA 与 DMAP 和 HG 的物质的量比为 $1:2 \sim 4:6 \sim 9$, 4-二甲氨基吡啶与无水四氢呋喃的体积比为 $1:0.1 \sim 0.2$ (g/mL), 戊二酸酐与无水四氢呋喃的体积比为 $1:0.1 \sim 0.2$ (g/mL);

b) 37°C 振荡反应 2 小时后加入蒸馏水 $400 \sim 500 \mu\text{l}$ 终止反应, 抽真空除去四氢呋喃;

c) 氯仿萃取 $3 \sim 4$ 次, 合并氯仿相, 抽真空去除氯仿;

d) 将残留物溶于 $700 \sim 800 \mu\text{l}$ 甲醇, 室温振荡反应 (解封闭) 12~16 小时;

e) 薄层层析纯化 3-HG-DON (展层剂为氯仿:丙酮:异丙醇 = $8:1:1$), 紫外光下割取 R_f 值小于 DON 的条带, 甲醇洗脱收集, 真空干燥得 3-HG-DON。

[0009] 3. 用 DCC 活泼酯法将 3-HG-DON 与 BSA 载体蛋白偶联, 得到人工抗原 DON-HG-BSA;

a) 3-HG-DON 与 N-羟基琥珀酰亚胺 NHS 及二环己基碳二亚胺 DCC 混合, 溶于无水四氢呋喃中, 3-HG-DON 与 NHS 及 DCC 的物质的量比为 $1:0.001 \sim 0.003:0.002 \sim 0.004$;

b) $10 \sim 14^{\circ}\text{C}$ 振荡反应 $8 \sim 12$ 小时, 以薄层色谱 TLC 检测监控反应程度;

c) 真空抽干四氢呋喃, 加入 $200 \sim 300 \mu\text{l}$ DMSO 溶解, 缓慢加入至 $1200 \mu\text{l}$ 牛血清白蛋白溶液, 溶解载体蛋白的缓冲液为碳酸氢钠水溶液, 缓冲液的浓度为 $0.1 \sim 0.2$ mol/L, 载体蛋白的质量与缓冲溶液的体积比为 $5 \sim 8 \times 10^{-3}$ (g/mL);

d) 15°C 低速 ($100 \sim 120 \text{r/min}$) 振荡反应 $8 \sim 10$ 小时, 用 0.01mol/L pH7.4 PBS 缓冲液透析 3 天, 冷冻真空干燥, 得到人工抗原 DON-HG-BSA, 分装 4°C 保存。

[0010] 本发明的效果是本发明利用丁基硼酸封闭 DON 的 7, 15-羟基, 戊二酸酐酰化 3-羟基合成 3-HG-DON, 通过二环己基碳二亚胺活泼酯法将 3-HG-DON 偶联到载体蛋白 BSA, 提供了一种避免极端温度反应、操作简易的 DON 人工抗原的合成方法。与现有的 DON 人工抗原合成方法相比, 本发明的有益效果在于: 1. 采用丁基硼酸封闭 C7 和 C15 上的羟基, 尽量避免反应副产物的生成; 2. 用具有稍长碳链的戊二酸酐同 C3 上的羟基发生酯化反应, 进而同 BSA 偶联, 可以降低或避免蛋白对半抗原的掩蔽效应; 3. 整个制备过程温度条件比较温和, 在 $10 \sim 37^{\circ}\text{C}$ 之间, 避免高温条件下 DON 氧化而产生副产物。本发明制备的脱氧雪腐镰刀菌烯醇人工抗原可在食品、农业等领域免疫检测中应用。

附图说明

[0011] 附图 1: 薄层色谱检测 DON 封闭反应

1. DON-BBA 2. DON。

[0012] 附图 2 :薄层色谱检测 DON 解封闭反应

1. 3-HG-DON 2. DON。

具体实施方式

[0013] 1. 将 4mg 脱氧雪腐镰刀菌烯醇溶解于 400 μ l 无水四氢呋喃后与 34.4mg 丁基硼酸混合,室温振荡反应 12 小时,薄层色谱检测 DON 封闭完全,形成 DON-BBA。

[0014] 2. 将 DON-BBA 与 12.8mg 4-二甲氨基吡啶 (溶于 128 μ l 无水四氢呋喃) 和 29.6mg 戊二酸酐 (溶于 300 μ l 无水四氢呋喃) 混合,37 $^{\circ}$ C 振荡反应 2 小时后加入蒸馏水 400 μ l 终止反应,抽真空除去四氢呋喃,氯仿萃取 4 次,合并氯仿相,抽真空去除氯仿,将残留物溶于 800 μ l 甲醇,室温振荡反应 (解封闭) 12 小时,薄层层析纯化 3-HG-DON (展层剂为氯仿:丙酮:异丙醇=8:1:1),紫外光下剖取 Rf 值小于 DON 的条带,甲醇洗脱收集,真空干燥得 3-HG-DON。

[0015] 3. 1 mg 3-HG-DON 与 0.001 mg N-羟基琥珀酰亚胺 NHS 及 0.0027mg 二环己基碳二亚胺 DCC 混合,溶于 200 μ l 无水四氢呋喃中,14 $^{\circ}$ C 振荡反应 12 小时,薄层色谱 TLC 检测,真空抽干四氢呋喃,加入 200 DMSO 溶解,缓慢加入至 6mg 牛血清白蛋白 (溶于 1200 μ l 0.13mol/L NaHCO₃ 水溶液),15 $^{\circ}$ C 低速 (100~120r/min) 振荡反应 8~10 小时,用 0.01mol/L pH7.4 PBS 缓冲液透析 3 天,冷冻真空干燥,得到人工抗原 DON-HG-BSA,分装 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0016] 4. 5mg 纯化的人工抗原 DON-HG-BSA 溶于 0.01mol/L pH7.4 PBS 中,37 $^{\circ}$ C 包被经紫外照射处理 96 孔酶标板 6 小时, PBST 洗板 3 次,加满 1% 明胶,4 $^{\circ}$ C 封阻过夜;PBST 洗板 3 次,加入目标抗体,37 $^{\circ}$ C 作用 1-2 小时;PBST 洗板 6 次,加入兔抗抗体,37 $^{\circ}$ C 作用 1 小时;PBST 洗板 4 次,PBS 稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗兔酶标二抗 3000 倍,加 100 μ l OPD 底物溶液,37 $^{\circ}$ C 避光显色 8-10min;加 50 μ l 12mol/l H₂SO₄ 终止反应,测定 OD₄₉₂ 光吸收值为 1.353,BSA 在同一处理下吸收值为 0.277。

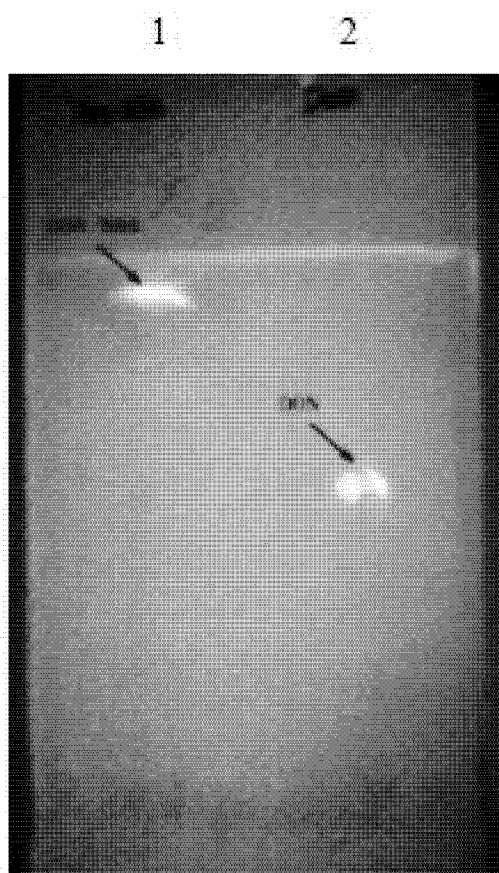


图 1

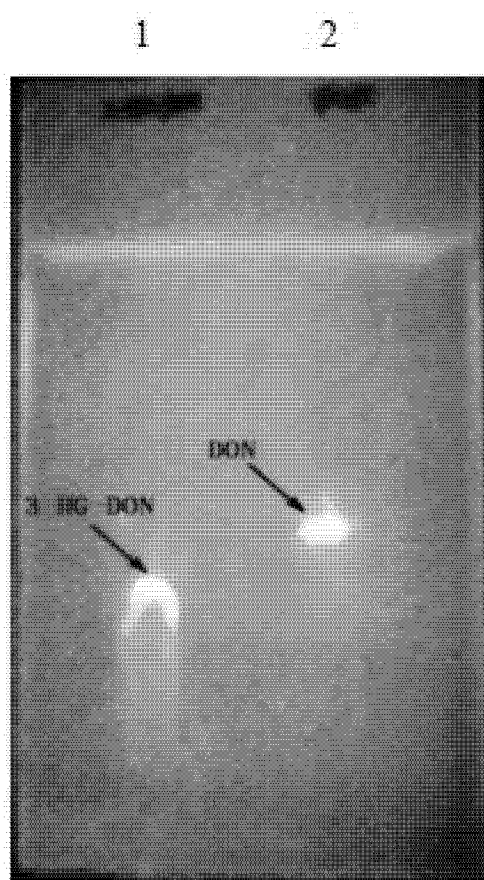


图 2

专利名称(译)	一种脱氧雪腐镰刀菌烯醇人工抗原的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN102120766A	公开(公告)日	2011-07-13
申请号	CN201010602291.3	申请日	2010-12-23
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
[标]发明人	张旭 邢锦城 马鸿翔 余桂红 孙晓波		
发明人	张旭 邢锦城 马鸿翔 余桂红 孙晓波		
IPC分类号	C07K14/76 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫检测及生物技术领域，具体涉及一种脱氧雪腐镰刀菌烯醇人工抗原的制备方法及应用。利用丁基硼酸封闭脱氧雪腐镰刀菌烯醇（DON）的7,15-羟基，戊二酸酐酰化3-羟基合成3-HG-DON，通过二环己基碳二亚胺活泼酯法将3-HG-DON偶联到载体蛋白BSA，得到人工抗原DON-HG-BSA。本发明提供的制备方法尽量避免反应副产物的生成，降低或避免蛋白对半抗原的掩蔽效应，制备过程温度条件比较温和，在10~37°C之间，避免高温条件下DON氧化而产生副产物，操作简易可行。

