



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105503689 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 20

(21) 申请号 201510956434. 3

G07K 16/14(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 12. 17

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(71) 申请人 西南大学

地址 400715 重庆市北碚区天生路 2 号

(72) 发明人 马良 张宇昊 吴春生 钟红

(74) 专利代理机构 北京同恒源知识产权代理有限公司 11275

代理人 赵荣之

(51) Int. Cl.

G07D 207/38(2006. 01)

G07K 14/765(2006. 01)

G07K 14/795(2006. 01)

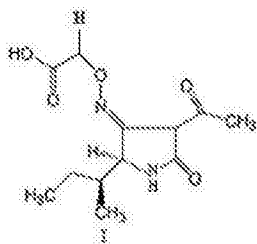
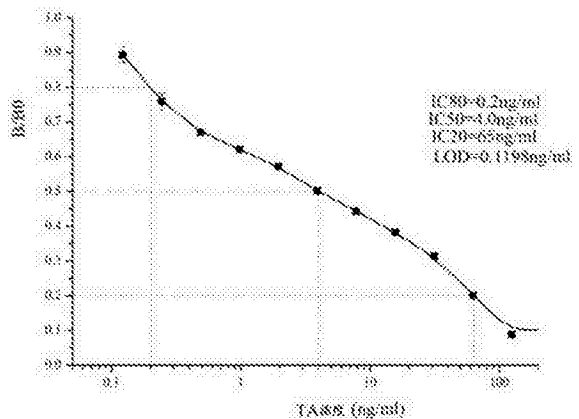
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

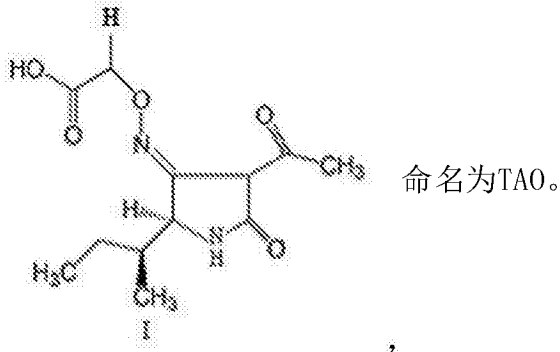
链格孢霉素细交链格孢菌酮酸人工抗原、多克隆抗体及制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种链格孢霉素细交链格孢菌酮酸人工抗原、多克隆抗体及制备方法和应用,具体公开了一种作为细交链格孢菌酮酸半抗原的化合物(式I),半抗原TAO与牛血清蛋白和血蓝蛋白等大分子蛋白偶联获得的人工抗原,由该人工抗原制备得到的多克隆抗体以及它们在检测细交链格孢菌酮酸中的应用。本研究通过建立间接竞争ELISA方法可检测TA,为TA免疫学检测方法提供理论依据并为进一步开发检测TA的免疫学速测产品奠定基础,为建立TA的免疫学检测方法、开发TA的免疫学系列产品,快速、高效地监控TA的污染情况提供了又一条新途径。



1. 作为细交链格孢菌酮酸半抗原的化合物,其特征在于,具有式I所述结构:



2. 权利要求1所述化合物的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

按质量体积比13:17(mg:mL)的比例将细交链格孢菌酮酸溶于混合溶剂A中,加入过量羧甲基羟胺半盐酸盐,混合均匀后回流加热15h,冷却,减压干燥,加入2M的盐酸溶解,二氯甲烷萃取,无水硫酸钠干燥后减压浓缩得胶状物,将胶状物用二氯甲烷/正己烷重沉淀纯化即得;所述混合溶剂A为甲醇、吡啶和水按体积比为1:4:1的比例混合而得。

3. 细交链格孢菌酮酸人工抗原,其特征在于,将半抗原TAO与牛血清蛋白偶联获得人工抗原TAO-BSA,或与血蓝蛋白偶联获得人工抗原TAO-KLH。

4. 权利要求3所述细交链格孢菌酮酸人工抗原的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

按摩尔比为1:1.5~5:5~10的比例称取TAO、N-羟基琥珀酰亚胺和二环己基碳二亚胺,分别溶解于二甲基甲酰胺后再缓慢滴加混合,室温下避光搅拌16h,4℃冷却2h以上,10000r/min离心5min,得到上清液,将上清液与牛血清蛋白按摩尔比60~80:1,或与血蓝蛋白按摩尔比250~350:1的比例进行偶联,4℃搅拌反应2h后PBS 4℃透析纯化。

5. 细交链格孢菌酮酸抗体,其特征在于,由权利要求1所述作为细交链格孢菌酮酸半抗原的化合物或由权利要求3所述细交链格孢菌酮酸人工抗原制备得到。

6. 根据权利要求5所述的细交链格孢菌酮酸抗体,其特征在于,所述抗体为多克隆抗体、单克隆抗体或基因工程抗体。

7. 权利要求1所述作为细交链格孢菌酮酸半抗原的化合物、权利要求3所述细交链格孢菌酮酸人工抗原、权利要求5或6所述细交链格孢菌酮酸抗体在检测细交链格孢菌酮酸中的应用。

链格孢霉毒素细交链格孢菌酮酸人工抗原、多克隆抗体及制备方法及应用

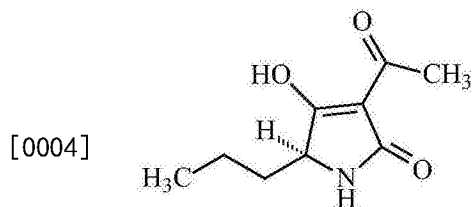
技术领域

[0001] 本发明属于分析检测技术领域,具体涉及一种链格孢霉毒素细交链格孢菌酮酸人工抗原、多克隆抗体及制备方法和应用。

背景技术

[0002] 细交链格孢菌酮酸(Tenuazonic acid,TA)是链格孢霉、稻瘟病菌等霉菌在特定条件下产生的有毒代谢产物之一,在美国、加拿大、巴西、中国等国家均有发现。TA可广泛污染食品及饲料,导致水果、谷物以及蔬菜的采后腐烂,并可寄生、腐生植物体内导致茎点霉病以及水稻稻瘟病等。在目前已知的70多种具有明显毒性的链格孢霉毒素中,TA毒性最强且污染水平居各种链格孢霉毒素之首。TA具有多种生物特性,如通过抑制核糖体的释放抑制蛋白质的合成,抗病毒、抗肿瘤、抑菌性、细胞毒性和植物毒性,并且对哺乳动物(小鼠、大鼠等)也具有急性毒性。但是目前关于TA对人类及动物相关危害的数据相对比较缺乏,包括欧美等发达国家和地区也尚未颁布关于TA毒素的限量标准。

[0003] TA的污染水平一般为 $\mu\text{g}/\text{kg}$,需要较高水平的检测灵敏度,利用免疫学检测霉菌毒素与仪器方法互补获得较高的检测灵敏度是目前霉菌毒素检测领域研究和应用的热点方法。TA分子结构式为 $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{O}_3\text{N}$,分子量较小($M=197$),本身无法产生免疫原性,通常要对TA进行半抗原修饰和人工抗原的合成研究,才能制备得到免疫抗体继而进一步开发免疫产品与方法,而目前市场上尚无商品化的TA免疫产品出现。



细交链格孢菌酮酸结构式

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的之一在于提供一种链格孢霉毒素细交链格孢菌酮酸人工抗原,目的之二在于提供该人工抗原的多克隆抗体,目的之三在于提供该人工抗原的制备方法和应用。

[0006] 本发明采取的技术方案如下:

[0007] 1、作为细交链格孢菌酮酸半抗原的化合物,具有式I所述结构:

附图说明

[0019] 为了使本发明的目的、技术方案和有益效果更加清楚,本发明提供如下附图:

[0020] 图1半抗原TAO质谱图;

[0021] 图2 TAO-BSA紫外吸收谱图;

[0022] 图3 TAO-KLH紫外吸收谱图;

[0023] 图4 TA、BSA、KLH、TAO-BSA、TAO-KLH红外光谱图;

[0024] 图5抗体竞争抑制率曲线。

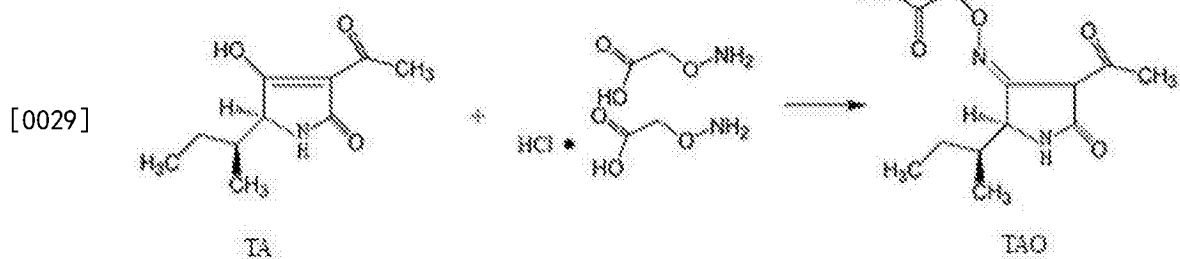
具体实施方式

[0025] 下面对本发明的优选实施例进行详细的描述。实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。

[0026] 试剂:TA铜盐(纯度>99%,成都杰锐科技有限公司);牛血清蛋白(Bovine serum albumin,BSA)、血蓝蛋白(Keyhole Limpet Hemocyanin,KLH)(sigma公司);弗氏完全佐剂与不完全佐剂(Sigma公司);N,N-二甲基甲酰胺(DMF);N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),N,N-二环己基碳二亚胺(DCC),羧甲基羟胺半盐酸盐($(\text{H}_2\text{NOCH}_2\text{CO}_2\text{H})_2\text{-HCl}$)(成都科龙化工试剂公司);酶标羊抗鼠IgG抗体(武汉博士德生物工程有限公司)。

[0027] 实施例1半抗原TAO的合成

[0028] 取 $1.3\text{mg}(6.6 \times 10^{-3}\text{mmol})$ TA溶于混合溶剂(甲醇:吡啶:水=1:4:1)1.70mL中,加入羧甲基羟胺半盐酸盐($(\text{H}_2\text{NOCH}_2\text{CO}_2\text{H})_2\text{-HCl}$) 3.3mg,混合均匀后,加入至旋转蒸发仪中回流加热15h,冷却至室温后过夜。将混合物减压干燥,加入0.30mL 2M的HCl,尽量用二氯甲烷萃取水相中的合成物,合并有机相,通过加入无水硫酸钠干燥后减压浓缩得胶状物。通过二氯甲烷/正己烷重沉淀纯化,得到浅棕色粉末,-20℃储存,HPLC/MS检测。

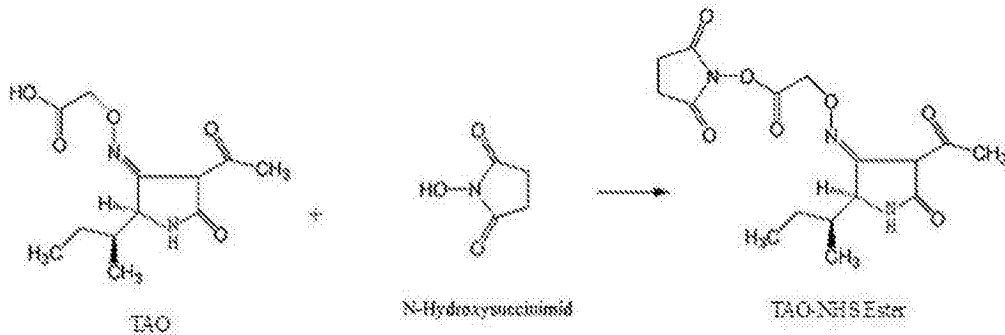


[0030] 利用TA在C4位上的羟基,与羧甲基羟胺半盐酸盐反应后得到半抗原,并用质谱定性检测半抗原结构,结果如图1所示。TA的分子量为197,图1中在m/z 195.2处出现峰值,说明样品中含有未反应完全的TA,根据TAO分子量,推断在m/z为269.0处即为 $[\text{TAO}]^-$,另外,m/z在284和291处分别为 $[\text{TAO} \cdot \text{NH}_3]^-$ 、 $[\text{TAO} \cdot \text{Na}]^+$,说明TA通过脲化反应成功得到了TAO。

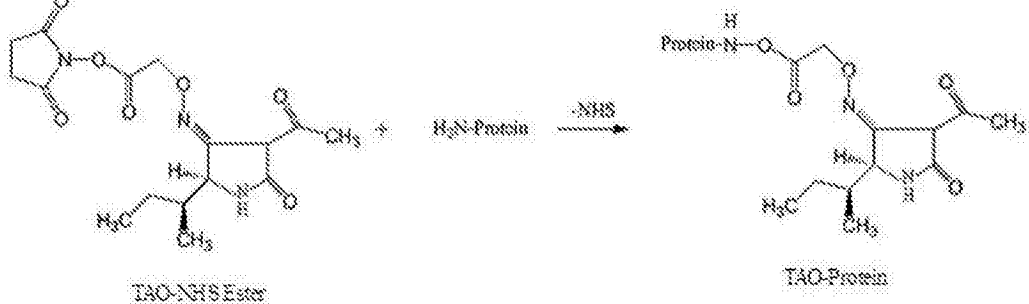
[0031] 实施例2人工抗原的制备

[0032] 按TAO:N-羟基琥珀酰亚胺(NHS):二环己基碳二亚胺(DCC)摩尔比为1:5:10进行反应。取TAO溶于400μL二甲基甲酰胺(DMF)中,加入NHS(溶于300μL DMF),取DCC(溶于300μL DMF)缓慢滴加至离心管中,用磁力搅拌计室温下避光搅拌过夜(约16h)。将反应后的混合液置于4℃冷却2h以上(若发现沉淀),可在10000r/min离心5min,得到上清液(活泼酯液)。将活泼酯液与BSA和KLH分别以投料比(60:1、300:1)进行偶联获得TAO-BSA和TAO-KLH,经PBS

在4℃透析纯化后,分装保存。



[0033]



合成路线

[0034] 最后一次透析外液作为空白对照,与TA标准品、载体蛋白溶液、半抗原溶液和所制备的人工抗原溶液吸入比色皿中进行紫外扫描鉴定,检测人工抗原是否得到较好的纯化,采用考马斯亮蓝法(Bradford法)测定人工抗原浓度(以载体蛋白无损进行粗算人工抗原的浓度)。半抗原与载体蛋白偶联比计算按以下公式计算:结合比=(ϵ 偶联物- ϵ 载体蛋白)/ ϵ 半抗原。

[0035] 结果见图2和图3。根据考马斯亮蓝法测TAO-BSA和TAO-KLH人工抗原的浓度分别为1.27mg/mL和2.37mg/mL。TA标准品在197nm、285nm处有特征吸收峰;BSA、KLH的特征吸收峰在279nm处。半抗原TAO在300nm处出现特征吸收峰,较TA的特征吸收峰发生了明显的红移,说明TA标准品结构发生了改变。而人工抗原TAO-BSA、TAO-KLH相较偶联载体蛋白BSA、KLH在279nm处特征吸收峰显著增强,同时与半抗原TAO相比在300nm处的特征吸收峰也有明显的蓝移。由此,可以初步判断,TAO与载体蛋白发生了偶联。根据上述公式计算偶联比分别为18.3:1、38.7:1,皆大于10:1,可判断偶联效果较好。

[0036] 经压片处理后,在红外光谱4000~500 cm^{-1} 波长范围内扫描鉴定,结果见图4。由图4可知TA在3434.31 cm^{-1} 含有一个吸收峰,表明TA含有一个-OH;在1602.48 cm^{-1} 有一个C=C骨架振动;在1126.58 cm^{-1} 处含有一个吸收峰,表明TA含有N-H键。BSA蛋白在3308.78 cm^{-1} 处有-NH₂伸缩振动,2959.96 cm^{-1} 处有-CH₃的伸缩振动、1657.12 cm^{-1} 、1544.15 cm^{-1} 处有两条酰胺带吸收峰(酰胺I、II带)。KLH蛋白在3440.28 cm^{-1} 、1652.76 cm^{-1} 、1066.69 cm^{-1} 、538.35 cm^{-1} 处的四个特征吸收峰。TAO-BSA在红外光谱图上基本显示出BSA的红外特征吸收谱带(1655.11 cm^{-1} 、1649.79 cm^{-1} 处的酰胺I带),在1126.83 cm^{-1} 、1088.33 cm^{-1} 附近显示出了毒素特征吸收峰,且较毒素而言吸收峰明显增高,说明结合了多个半抗原;在1544.15 cm^{-1} 处的酰胺吸收峰有明显降低,推测可能是半抗原与BSA的-NH₂结合使得酰胺键减少,结合紫外吸收光谱分析,人

工抗原TAO-BSA合成成功。TAO-KLH在红外光谱图上基本显示出KLH的红外特征吸收谱带(1638.28 cm^{-1} 、1645.83 cm^{-1} 处的酰胺I带以及在533.94 cm^{-1} 、540.30 cm^{-1} 处的特征峰),在1125.65 cm^{-1} 、1124.40 cm^{-1} 附近显示出了毒素特征吸收峰,且较毒素而言吸收峰明显增高,结合紫外吸收光谱分析,人工抗原TAO-KLH合成成功。

[0037] 实施例3抗TA多克隆抗体的制备

[0038] 用制备得到的免疫原TAO-BSA免疫B1ab/c小鼠2只,免疫剂量分别为50 μg 、100 μg ,共免疫5次:首次免疫3周后进行二次免疫,以后每隔一周免疫1次。自二免开始,每次免疫7天后断尾取血,用间接非竞争ELISA检测抗血清效价,取免疫效果较好的血清抗体作间接竞争ELISA。最后一次免疫后眼球取血。每次取血后,血液放于37 $^{\circ}\text{C}$ 温室2h,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,8000r/min离心,将等体积甘油加入至吸取的上清液并混合均匀,置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存备用。

[0039] 以20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TAO-KLH为包被原检测抗血清效价,测得结果为 1.6×10^4 ,说明动物体内对TAO-BSA产生了免疫应答。采用棋盘法确定间接竞争ELISA的工作条件,可选择包被20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗原,抗体稀释16000倍或者包被10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗原,抗体稀释8000进行间接竞争ELISA。

[0040] 实施例4TA的间接竞争ELISA检测

[0041] ELISA检测方法如下:

[0042] (1)包被:将包被抗原稀释适当浓度,每孔100 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,弃去包被液,PBST洗涤三次,扣干。

[0043] (2)封闭:称取1g脱脂奶粉加入至20mL PBST缓冲液中,每孔200 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h,弃去封闭液,洗涤三次,扣干。

[0044] (3)竞争反应:将标准品TA按3.13mg/mL往下倍比稀释(稀释液为5%乙腈/PBS),每孔50 μL ;按最佳抗血清稀释倍数稀释血清,每孔50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h,弃去反应液,洗涤三次,扣干。

[0045] (4)二抗反应:将二抗稀释至合适浓度,每孔100 μL ,孵育1h,弃去反应液,洗涤三次,扣干。

[0046] (5)显色反应:配制显色液,每孔100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15~20min。

[0047] (6)终止:用2mol/L H_2SO_4 终止反应,每孔50 μL ,5min后酶标仪以空白对照调零,450nm波长下测吸光值。

[0048] (7)计算竞争抑制率,竞争抑制率=(有竞争的抗原孔的OD值/阳性对照孔的OD值) $\times 100\%$ 。

[0049] 以20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TAO-KLH为包被原,建立TA的icELISA标准曲线(如图5),半抑制浓度 IC_{50} 为4.0ng/mL,以20个阴性对照组的平均值加减三倍标准偏差得到检出限(LOD)为0.1198ng/mL,定量线性检测范围(IC_{20} - IC_{80})为0.2-65ng/mL。

[0050] 实施例5抗体交叉反应率的测定

[0051] 采用间接竞争ELISA对抗血清的交叉反应率进行分析,只是将反应中的标准品由各种毒素来代替,本实验采用的是在自然环境中,容易同时污染的其他重点霉菌毒素:黄曲霉毒素B1(aflatoxins,AFB1)、脱氧雪腐镰刀烯醇(deoxynivalenol,DON)、玉米赤霉烯酮(zearalenone,ZEN)。

[0052] 交叉反应率为抗血清对TA的灵敏度与AFB1、DON和ZEN的比值。

[0053] 交叉反应=(TA灵敏度/其他毒素灵敏度) $\times 100\%$ 。

[0054] 由于TA与同类链格孢霉毒素的结构差别较大,发生交叉反应率的可能较低,且其他链格孢霉菌毒素的毒害作用相对较低,因此实验针对常见几种与TA易发生同时污染的重点霉菌毒素(AFB1、ZEN和DON)进行了交叉反应率的测定。按实施例4中所得最佳包被抗原浓度和最佳抗血清稀释倍数,以TA、AFB1、ZEN和DON为竞争抗原,进行间接竞争ELISA实验,检测抗血清的特异性。结果表明,抗TA的抗体与农产品中几种常见的重点毒素几乎没有交叉反应(IC₅₀均大于5000μg/mL,交叉反应率均小于1%),说明该抗体在实际应用中对TA的特异性较好。可以进一步优化实验条件以得到灵敏度更好的多克隆抗体,并尝试进行单克隆抗体的制备研究。

[0055] 最后说明的是,以上优选实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管通过上述优选实施例已经对本发明进行了详细的描述,但本领域技术人员应当理解,可以在形式上和细节上对其作出各种各样的改变,而不偏离本发明权利要求书所限定的范围。

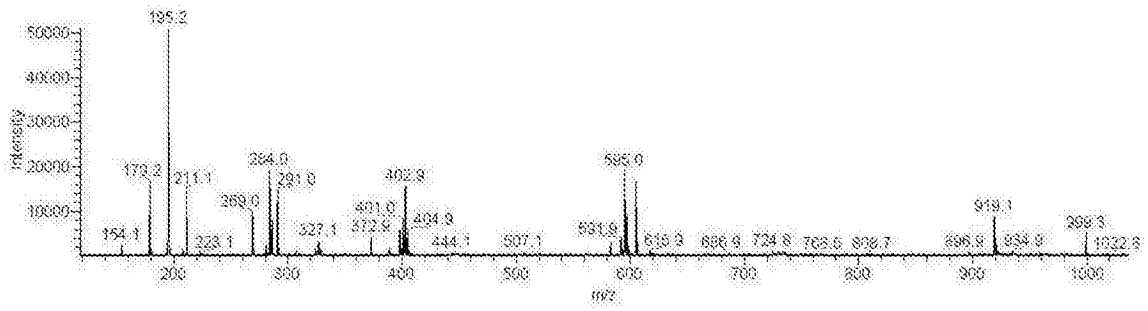


图1

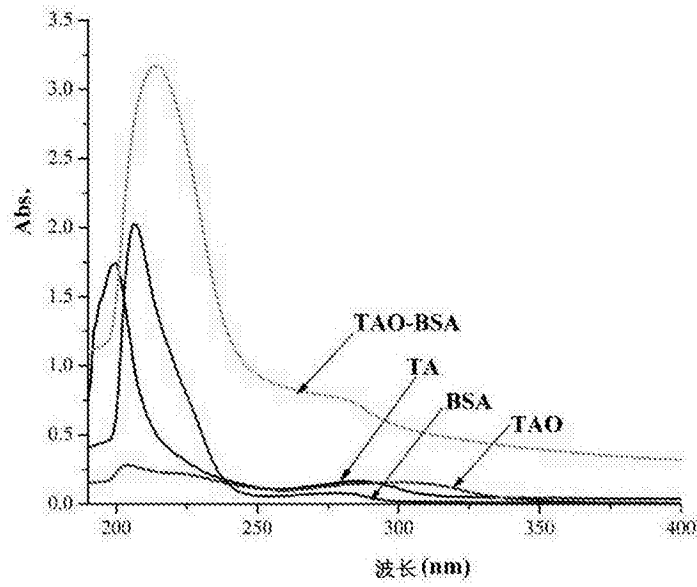


图2

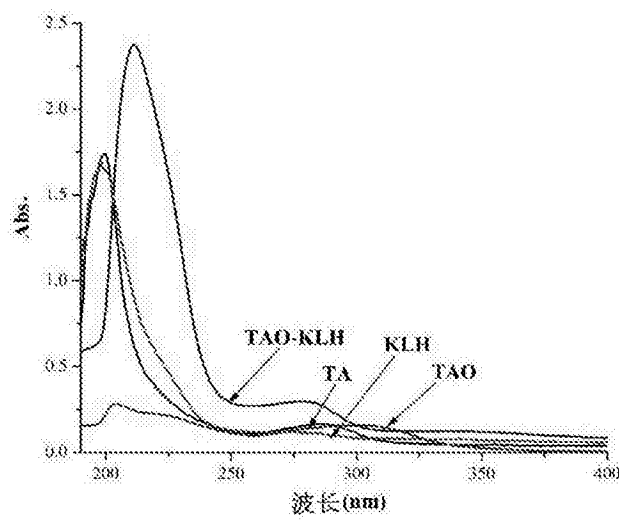


图3

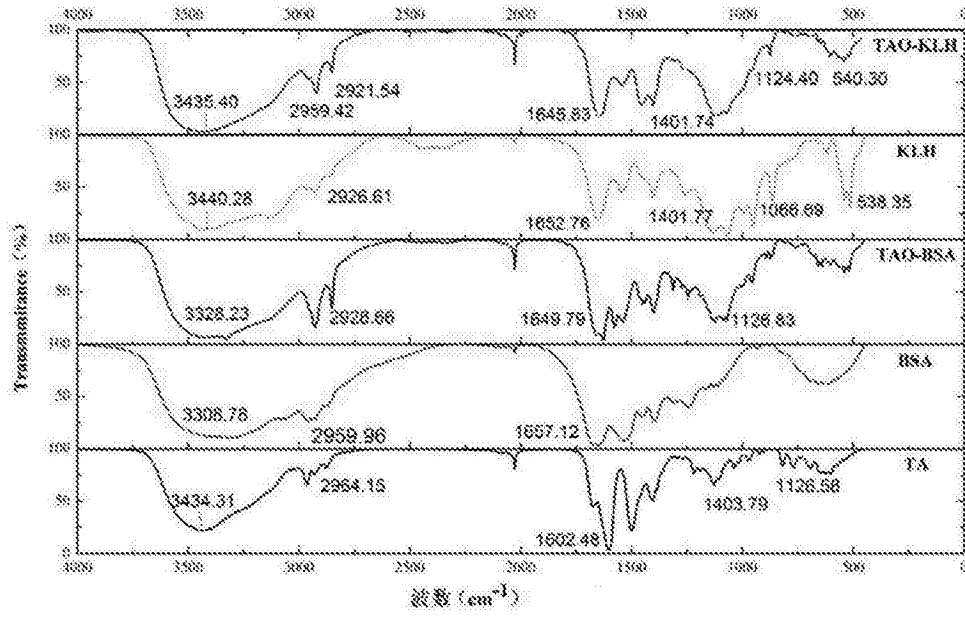


图4

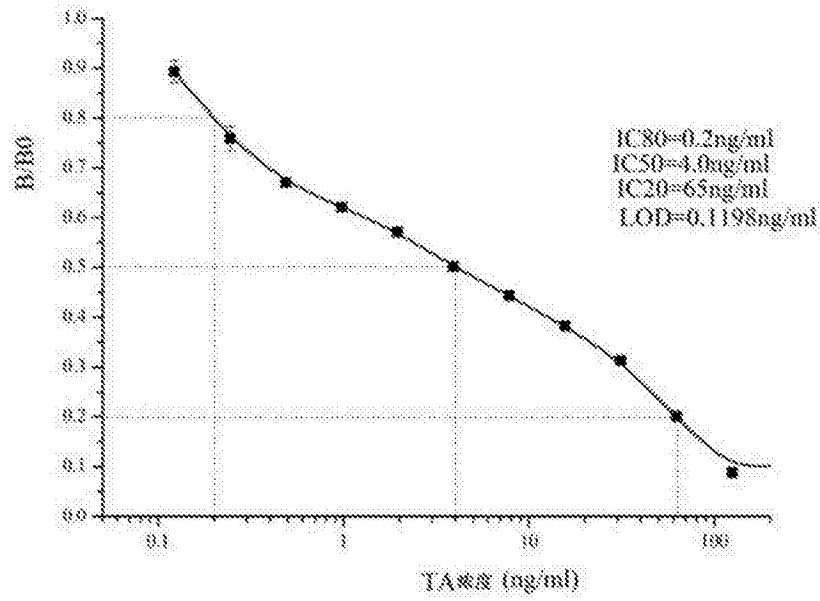


图5

专利名称(译)	链格孢霉素细交链格孢菌酮酸人工抗原、多克隆抗体及制备方法和应用		
公开(公告)号	CN105503689A	公开(公告)日	2016-04-20
申请号	CN201510956434.3	申请日	2015-12-17
[标]申请(专利权)人(译)	西南大学		
申请(专利权)人(译)	西南大学		
当前申请(专利权)人(译)	西南大学		
[标]发明人	马良 张宇昊 吴春生 钟红		
发明人	马良 张宇昊 吴春生 钟红		
IPC分类号	C07D207/38 C07K14/765 C07K14/795 C07K16/14 G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	C07D207/38 C07K14/765 C07K14/795 C07K16/14 C07K19/00 G01N33/53 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种链格孢霉素细交链格孢菌酮酸人工抗原、多克隆抗体及制备方法和应用，具体公开了一种作为细交链格孢菌酮酸半抗原的化合物(式I)，半抗原TAO与牛血清蛋白和血蓝蛋白等大分子蛋白偶联获得的人工抗原，由该人工抗原制备得到的多克隆抗体以及它们在检测细交链格孢菌酮酸中的应用。本研究通过建立间接竞争ELISA方法可检测TA，为TA免疫学检测方法提供理论依据并为进一步开发检测TA的免疫学速测产品奠定基础，为建立TA的免疫学检测方法、开发TA的免疫学系列产品，快速、高效地监控TA的污染情况提供了又一条新途径。

