



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103204924 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 17

(21) 申请号 201310092348. 3

(22) 申请日 2013. 03. 22

(71) 申请人 杭州宏泰生物技术有限公司

地址 311222 浙江省杭州市萧山区河庄镇民
主村

(72) 发明人 沈海英 徐建明

(74) 专利代理机构 杭州杭诚专利事务有限公
司 33109

代理人 俞润体 沈相权

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

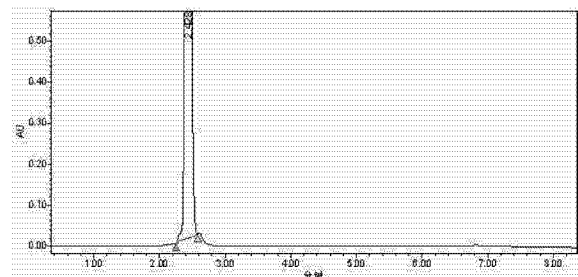
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种苯胺绿人工抗原的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种苯胺绿人工抗原,尤其涉及一种苯胺绿人工抗原的制备方法。按以下步骤进行:制备人工半抗原-半抗原 4-MGC 的合成→制备苯胺绿人工抗原-苯胺绿-BSA 的合成。一种苯胺绿人工抗原的制备方法,合成工艺先进,特异性强,得到的苯胺绿人工抗原用于免疫新西兰白兔,检测结果表明,苯胺绿人工抗原的免疫血清的效价为 1:72000,完全可用于免疫分析中,为苯胺绿的检测提供更加方便快捷准确的途径。



1. 一种苯胺绿人工抗原的制备方法,其特征在于按以下步骤进行:

(1)、制备人工半抗原 --- 半抗原 4-MGC 的合成:

(a)、将质量摩尔比为 2:1 的 N,N- 二甲基苯胺和 4- 羧基苯甲醛加入到圆底烧瓶中, N,N- 二甲基苯胺为 3g, 在温度为 100°C 下搅拌反应 6 小时, 形成反应液; 反应结束后反应液用乙醚提取, 转干, 经重结晶后得到白色固体产物 I;

(b)、在产物 I 中加入苯 30ml 以及催化量 Amberlyst 15 resin 一起放入圆底烧瓶中, 在氮气的保护下, 在温度为 130°C 下进行回流搅拌过夜, 形成溶剂; 反应结束后, 将溶剂减压后转干, 用乙醚提取得到产物 II;

(c)、将产物 II 经硅胶柱层析纯化后, 提取得到半抗原 4-MGC 的白色固体;

(2)、制备苯胺绿人工抗原 --- 苯胺绿 -BSA 的合成:

(d)、称取 0.425g 的半抗原 4-MGC 和 0.225g 的 N- 羟基琥珀酰亚胺溶于 10.0ml 的 N,N- 二甲基甲酰胺中, 存放于烧杯中, 再将溶解了 0.255g N,N- 二环己基碳二亚胺的 10.0ml N,N- 二甲基甲酰胺的溶液慢慢滴加, 边滴加边磁力搅拌, 搅拌结束后在温度为 20°C 下进行磁力搅拌过夜, 得到 A 液;

(e)、将牛血清蛋白溶于 PBS 缓冲液中, 得到浓度为 5mg/ml 的 B 液;

(f)、在常温磁力搅拌条件下, 将 A 液逐滴加入到装有 10ml 的 B 液中, 得到人工抗原混合液, 在温度为 4°C 的冰箱内进行磁力搅拌过夜;

(g)、制备钠离子浓度为 0.1mol/L 的 PBS 缓冲液, pH 为 7.2 ~ 7.4;

(h)、将人工抗原混合液于 PBS 缓冲液中进行透析, 在温度为 4°C 下进行搅拌透析, 每 4 小时换一次 PBS 缓冲液, 透析时间为 2 天, 形成透析液, 紫外扫描透析液无小分子吸收峰时, 将产物离心取上清, 在无菌条件下通过 0.2 μm 的滤膜, 即得到人工抗原: 苯胺绿 - 牛血清蛋白。

一种苯胺绿人工抗原的制备方法

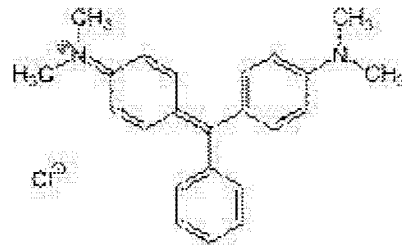
[0001]

技术领域

[0002] 本发明涉及一种苯胺绿人工抗原,尤其涉及一种苯胺绿人工抗原的制备方法。

背景技术

[0003] 苯胺绿在中文名又称孔雀石绿;中国绿;碱性孔雀石绿;品绿;盐基块绿;英文名称:Malachite Green oxalate, 苯胺绿是绿色有金属光泽的晶体,易溶于水,溶于乙醇、甲醇和戊醇,水溶液呈蓝绿色, pH0.0 以下呈黄色;最大吸收波长 616.9nm。是有毒的三苯甲烷类化学物,既是染料,也是杀菌剂,可致癌。其结构式为:



苯胺绿中的化学功能团三苯甲烷可致癌,很多国家已经禁用,但仍有渔民在防治鱼类感染真菌时使用。也有运输商用作消毒,以延长鱼类在长途贩运中的存活时间。虽然于 2002 年 5 月中国农业部已将孔雀石绿列入《食品动物禁用的兽药及其化合物清单》,但于 2005 年 8 月,福建、江西及安徽等地出口的鳗鱼产品,被验出含有孔雀石绿,国家质检总局首次下令全面回收,数日后香港更发现多种淡水鱼含有孔雀石绿,中国因此禁止所有淡水鱼出口到香港。同年 9 月 1 日香港更于来自台湾的青斑海鱼样本中验出孔雀石绿。台湾渔业署对事件表示“讶异”,并表示会作出针对性检验。

[0004] 目前,对苯胺绿的检测主要依靠高效液相色谱法(HPLC),气相色谱(GC),薄层色谱(TLC),质谱(MS)等,但是存在仪器昂贵,检测费时,并且需要专业技术人员进行操作,不能达到现代检测对快速,准确的要求。而免疫分析法可以弥补以上所有缺点,免疫分析法是一种利用抗原抗体特异性结合反应检测各种物质(药物、激素、蛋白质、微生物等)的分析方法,该方法的前提就是需要提供特异性的抗原和抗体。

发明内容

[0005] 本发明主要是解决现有技术中存在的不足,提供一种苯胺绿人工抗原的制备方法,所制备的苯胺绿人工抗原可进行动物免疫,取得相应的苯胺绿抗体,可用于各种苯胺绿类免疫分析的研究,为苯胺绿的检测提供更加方便快捷准确的途径。

[0006] 本发明的上述技术问题主要是通过下述技术方案得以解决的:

一种苯胺绿人工抗原的制备方法,按以下步骤进行:

(1)、制备人工半抗原 --- 半抗原 4-MGC 的合成:

(a)、将质量摩尔比为 2:1 的 N,N- 二甲基苯胺和 4- 羧基苯甲醛加入到圆底烧瓶中,

N,N- 二甲基苯胺为 3g, 在温度为 100℃ 下搅拌反应 6 小时, 形成反应液; 反应结束后反应液用乙醚提取, 转干, 经重结晶后得到白色固体产物 I;

(b)、在产物 I 中加入苯 30ml 以及催化量 Amberlyst 15 resin 一起放入圆底烧瓶中, 在氮气的保护下, 在温度为 130℃ 下进行回流搅拌过夜, 形成溶剂; 反应结束后, 将溶剂减压后转干, 用乙醚提取得到产物 II;

(c)、将产物 II 经硅胶柱层析纯化后, 提取得到半抗原 4-MGC 的白色固体;

半抗原 4-MGC 为半抗原 4-(双(4-二甲胺基)苯基)甲基)苯甲酸(4-MGC)。

[0007] (2)、制备苯胺绿人工抗原 --- 苯胺绿 -BSA 的合成:

(d)、称取 0.425g 的半抗原 4-MGC 和 0.225g 的 N- 羟基琥珀酰亚胺溶于

10.0ml 的 N,N- 二甲基甲酰胺中, 存放于烧杯中, 再将溶解了 0.255g N,N- 二环己基碳二亚胺的 10.0ml N,N- 二甲基甲酰胺的溶液慢慢滴加, 边滴加边磁力搅拌, 搅拌结束后在温度为 20℃ 下进行磁力搅拌过夜, 得到 A 液;

(e)、将牛血清蛋白溶于 PBS 缓冲液中, 得到浓度为 5mg/ml 的 B 液;

(f)、在常温磁力搅拌条件下, 将 A 液逐滴加入到装有 10ml 的 B 液中, 得到人工抗原混合液, 在温度为 4℃ 的冰箱内进行磁力搅拌过夜;

(g)、制备钠离子浓度为 0.1mol/L 的 PBS 缓冲液, pH 为 7.2 ~ 7.4;

(h)、将人工抗原混合液于 PBS 缓冲液中进行透析, 在温度为 4℃ 下进行搅拌透析, 每 4 小时换一次 PBS 缓冲液, 透析时间为 2 天, 形成透析液, 紫外扫描透析液无小分子吸收峰时, 将产物离心取上清, 在无菌条件下通过 0.2 μm 的滤膜, 即得到人工抗原: 苯胺绿 - 牛血清蛋白。

[0008] 由于苯胺绿的分子量较小, 单独作用时不具有免疫原性或免疫原性较弱, 因此必须将其与大分子载体比如牛血清蛋白连接形成苯胺绿抗原后, 才能刺激机体产生相应的苯胺绿抗体。本发明在制备苯胺绿人工抗原过程中, 所选的位点和交联方法都没有明显改变其结构, 保留了抗原决定簇。在苯胺绿半抗原和牛血清蛋白之间引入桥结构, 暴露抗原决定簇, 所获得的苯胺绿人工抗原保持了苯胺绿的结构特异性, 有利于相应苯胺绿抗体的产生。

[0009] 本发明的技术方案分为两步, 第一步为半抗原的制备及检测: 以 N,N- 二甲基苯胺、苯甲醛衍生物为原料, Amberlyst 15 树脂为催化剂, 在一定条件下合成苯胺绿半抗原; 第二步为人工抗原的制备与检测: 采用活泼酯和重氮化法分别将获得的半抗原与牛血清白蛋白 (BSA) 偶联, 制备苯胺绿的人工抗原即苯胺绿 - 牛血清蛋白形成相应全抗原。

[0010] 本发明制备得到的苯胺绿人工抗原可通过以下方法进行鉴定:

偶联比测定: 估算偶联物中被偶联的两种分子的比率(偶联比率)的方法虽然很多, 但都是依据检测偶联物中被偶联的两种分子含量(或相对含量)的原理建立起来的。分光光度法是利用物质对光的吸收与其浓度呈比例关系的原理分别测定被偶联的两种分子浓度。在大分子与小分子偶联物中, 两种分子均有各自不同的紫外扫描光谱, 并表现出光谱图迭加的性质。

[0011] 摩尔吸收系数 ϵ : 配制苯胺绿半抗原浓度为 0, 5, 10, 20, 30, 40ug/ml 的 PBS 溶液, 通过紫外扫描图可知苯胺绿半抗原的最大吸收波长为 288nm, 在 288nm 处测吸光值, 每个浓度做平行样。摩尔吸光系数计算为 $\epsilon = \text{吸光值} / \text{摩尔浓度}$ 。本发明计算得 $\epsilon = 5014.35\text{L/mol}$

偶联物蛋白浓度的测定:配制浓度为 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120ug/ml 的牛血清蛋白 PBS 溶液 1ml, 加入 3ml 考马斯亮蓝染色液, 立即混匀, 30℃ 水浴温热 5 分钟, 每个浓度做平行样, 在 655nm 处测吸光值, 绘制蛋白浓度与吸光值的关系曲线。将抗原溶液按一定比例吸收, 在 655 处测得抗原的吸光值, 从曲线上得到抗原溶液的相应蛋白浓度值。本发明计算得苯胺绿抗原的蛋白浓度为 3.183mg/ml。

[0012] 偶联比测定:配制 100ug/ml 的牛血清蛋白 PBS 溶液, 将偶联物用 PBS 稀释到 100ug/ml, 在 276 处测得吸光值, 以 PBS 为空白, 测得吸光值 A_1 , A_2 , 则偶联比率 γ 为:
$$\gamma = [(A_1 - A_2) / \epsilon] / (100 \times 10^{-3} / 65000)$$
, 本发明计算得 $\gamma \approx 17$ 。

[0013] 其中 ϵ 为摩尔吸光系数(L/mol), 65000 为牛血清蛋白的分子量, 100×10^{-3} 为牛血清蛋白浓度(ug/ml)。

[0014] 因此, 本发明的一种苯胺绿人工抗原的制备方法, 合成工艺先进, 特异性强, 得到的苯胺绿人工抗原用于免疫新西兰白兔, 检测结果表明, 苯胺绿人工抗原的免疫血清的效价为 1:72000, 完全可用于免疫分析中, 为苯胺绿的检测提供更加方便快捷准确的途径。

附图说明

[0015] 图 1 是苯胺绿人工半抗原的液相色谱图;

图 2 是苯胺绿人工半抗原的质谱图;

图 3 是苯胺绿人工抗原制备前后的紫外扫描图。

具体实施方式

[0016] 下面通过实施例, 结合附图对本发明的技术方案作进一步具体的说明。

[0017] 实施例 1: 一种苯胺绿人工抗原的制备方法, 按以下步骤进行:

(1)、制备人工半抗原 —— 半抗原 4-MGC 的合成:

(a)、将质量摩尔比为 2:1 的 N,N- 二甲基苯胺和 4- 羧基苯甲醛加入到圆底烧瓶中, N,N- 二甲基苯胺为 3g, 在温度为 100℃ 下搅拌反应 6 小时, 形成反应液; 反应结束后反应液用乙醚提取, 转干, 经重结晶后得到白色固体产物 I;

(b)、在产物 I 中加入苯 30ml 以及催化量 Amberlyst 15 resin 一起放入圆底烧瓶中, 在氮气的保护下, 在温度为 130℃ 下进行回流搅拌过夜, 形成溶剂; 反应结束后, 将溶剂减压后转干, 用乙醚提取得到产物 II;

(c)、将产物 II 经硅胶柱层析纯化后, 提取得到半抗原 4-MGC 的白色固体;

(2)、制备苯胺绿人工抗原 —— 苯胺绿 -BSA 的合成:

(d)、称取 0.425g 的半抗原 4-MGC 和 0.225g 的 N- 羟基琥珀酰亚胺溶于 10.0ml 的 N,N- 二甲基甲酰胺中, 存放于烧杯中, 再将溶解了 0.255g N,N- 二环己基碳二亚胺的 10.0ml N,N- 二甲基甲酰胺的溶液慢慢滴加, 边滴加边磁力搅拌, 搅拌结束后在温度为 20℃ 下进行磁力搅拌过夜, 得到 A 液;

(e)、将牛血清蛋白溶于 PBS 缓冲液中, 得到浓度为 5mg/ml 的 B 液;

(f)、在常温磁力搅拌条件下, 将 A 液逐滴加入到装有 10ml 的 B 液中, 得到人工抗原混合液, 在温度为 4℃ 的冰箱内进行磁力搅拌过夜;

(g)、制备钠离子浓度为 0.1mol/L 的 PBS 缓冲液, pH 为 7.2;

(h)、将人工抗原混合液于 PBS 缓冲液中进行透析,在温度为 4℃ 下进行搅拌透析,每 4 小时换一次 PBS 缓冲液,透析时间为 2 天,形成透析液,紫外扫描透析液无小分子吸收峰时,将产物离心取上清,在无菌条件下通过 0.2 μm 的滤膜,即得到人工抗原:苯胺绿-牛血清蛋白。

[0018]

实施例 2:一种苯胺绿人工抗原的制备方法,按以下步骤进行:

(1)、制备人工半抗原 --- 半抗原 4-MGC 的合成:

(a)、将质量摩尔比为 2:1 的 N,N- 二甲基苯胺和 4- 羧基苯甲醛加入到圆底烧瓶中, N,N- 二甲基苯胺为 3g,在温度为 100℃ 下搅拌反应 6 小时,形成反应液;反应结束后反应液用乙醚提取,转干,经重结晶后得到白色固体产物 I;

(b)、在产物 I 中加入苯 30ml 以及催化量 Amberlyst 15 resin 一起放入圆底烧瓶中,在氮气的保护下,在温度为 130℃ 下进行回流搅拌过夜,形成溶剂;反应结束后,将溶剂减压后转干,用乙醚提取得到产物 II;

(c)、将产物 II 经硅胶柱层析纯化后,提取得到半抗原 4-MGC 的白色固体;

(2)、制备苯胺绿人工抗原 --- 苯胺绿-BSA 的合成:

(d)、称取 0.425g 的半抗原 4-MGC 和 0.225g 的 N- 羟基琥珀酰亚胺溶于 10.0ml 的 N,N- 二甲基甲酰胺中,存放于烧杯中,再将溶解了 0.255g N,N- 二环己基碳二亚胺的 10.0ml N,N- 二甲基甲酰胺的溶液慢慢滴加,边滴加边磁力搅拌,搅拌结束后在温度为 20℃ 下进行磁力搅拌过夜,得到 A 液;

(e)、将牛血清蛋白溶于 PBS 缓冲液中,得到浓度为 5mg/ml 的 B 液;

(f)、在常温磁力搅拌条件下,将 A 液逐滴加入到装有 10ml 的 B 液中,得到人工抗原混合液,在温度为 4℃ 的冰箱内进行磁力搅拌过夜;

(g)、制备钠离子浓度为 0.1mol/L 的 PBS 缓冲液, pH 为 7.3;

(h)、将人工抗原混合液于 PBS 缓冲液中进行透析,在温度为 4℃ 下进行搅拌透析,每 4 小时换一次 PBS 缓冲液,透析时间为 2 天,形成透析液,紫外扫描透析液无小分子吸收峰时,将产物离心取上清,在无菌条件下通过 0.2 μm 的滤膜,即得到人工抗原:苯胺绿-牛血清蛋白。

[0019]

实施例 3:一种苯胺绿人工抗原的制备方法,按以下步骤进行:

(1)、制备人工半抗原 --- 半抗原 4-MGC 的合成:

(a)、将质量摩尔比为 2:1 的 N,N- 二甲基苯胺和 4- 羧基苯甲醛加入到圆底烧瓶中, N,N- 二甲基苯胺为 3g,在温度为 100℃ 下搅拌反应 6 小时,形成反应液;反应结束后反应液用乙醚提取,转干,经重结晶后得到白色固体产物 I;

(b)、在产物 I 中加入苯 30ml 以及催化量 Amberlyst 15 resin 一起放入圆底烧瓶中,在氮气的保护下,在温度为 130℃ 下进行回流搅拌过夜,形成溶剂;反应结束后,将溶剂减压后转干,用乙醚提取得到产物 II;

(c)、将产物 II 经硅胶柱层析纯化后,提取得到半抗原 4-MGC 的白色固体;

(2)、制备苯胺绿人工抗原 --- 苯胺绿-BSA 的合成:

(d)、称取 0.425g 的半抗原 4-MGC 和 0.225g 的 N- 羟基琥珀酰亚胺溶于

10.0ml 的 N,N- 二甲基甲酰胺中, 存放于烧杯中, 再将溶解了 0.255g N,N- 二环己基碳二亚胺的 10.0ml N,N- 二甲基甲酰胺的溶液慢慢滴加, 边滴加边磁力搅拌, 搅拌结束后在温度为 20℃ 下进行磁力搅拌过夜, 得到 A 液;

(e)、将牛血清蛋白溶于 PBS 缓冲液中, 得到浓度为 5mg/ml 的 B 液;

(f)、在常温磁力搅拌条件下, 将 A 液逐滴加入到装有 10ml 的 B 液中, 得到人工抗原混合液, 在温度为 4℃ 的冰箱内进行磁力搅拌过夜;

(g)、制备钠离子浓度为 0.1mol/L 的 PBS 缓冲液, pH 为 7.4;

(h)、将人工抗原混合液于 PBS 缓冲液中进行透析, 在温度为 4℃ 下进行搅拌透析, 每 4 小时换一次 PBS 缓冲液, 透析时间为 2 天, 形成透析液, 紫外扫描透析液无小分子吸收峰时, 将产物离心取上清, 在无菌条件下通过 0.2 μm 的滤膜, 即得到人工抗原: 苯胺绿 - 牛血清蛋白。

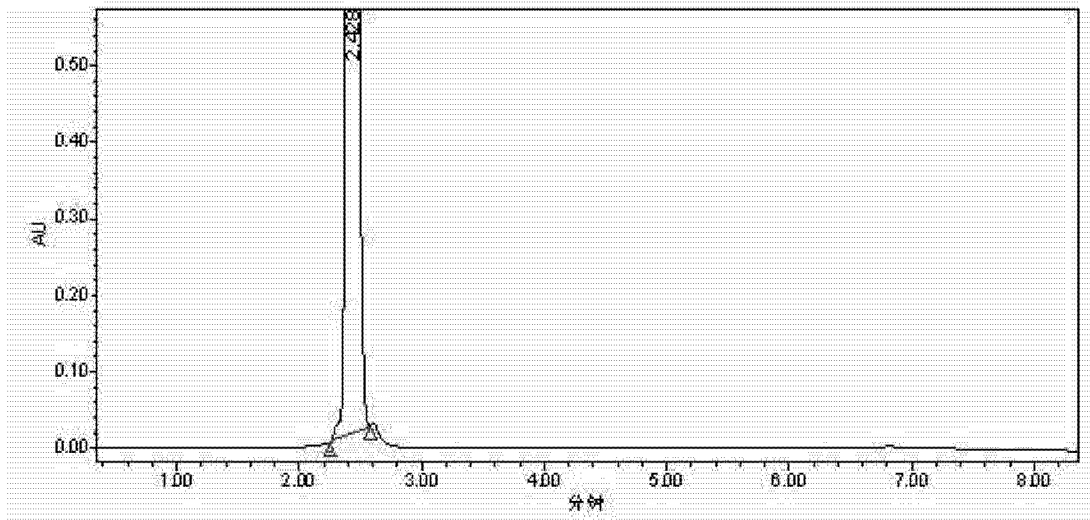


图 1

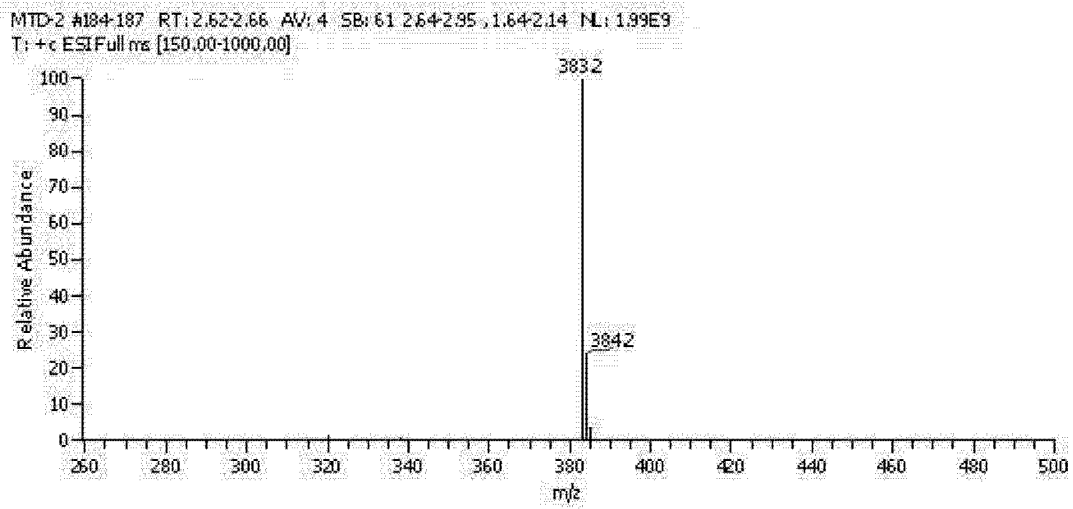
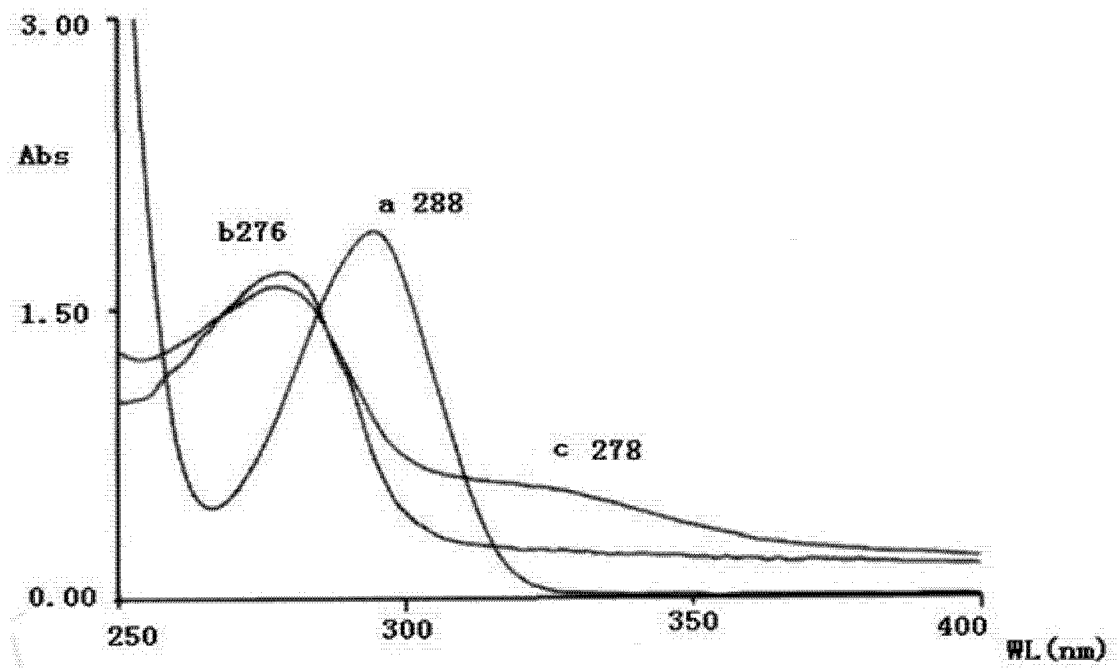


图 2



a 苯胺绿半抗原, b 苯胺绿人工抗原, c 牛血清蛋白

图 3

专利名称(译)	一种苯胺绿人工抗原的制备方法		
公开(公告)号	CN103204924A	公开(公告)日	2013-07-17
申请号	CN201310092348.3	申请日	2013-03-22
[标]发明人	沈海英 徐建明		
发明人	沈海英 徐建明		
IPC分类号	C07K14/765 G01N33/53		
代理人(译)	沉相权		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种苯胺绿人工抗原，尤其涉及一种苯胺绿人工抗原的制备方法。按以下步骤进行：制备人工半抗原-半抗原4-MGC的合成→制备苯胺绿人工抗原-苯胺绿-BSA的合成。一种苯胺绿人工抗原的制备方法，合成工艺先进，特异性强，得到的苯胺绿人工抗原用于免疫新西兰白兔，检测结果表明，苯胺绿人工抗原的免疫血清的效价为1：72000，完全可用于免疫分析中，为苯胺绿的检测提供更加方便快捷准确的途径。

