



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105669628 A

(43) 申请公布日 2016.06.15

(21) 申请号 201610021937.6

C07K 14/765(2006.01)

(22) 申请日 2016.01.12

C07K 14/77(2006.01)

(71) 申请人 华南农业大学

C07K 16/44(2006.01)

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

G01N 33/53(2006.01)

(72) 发明人 雷红涛 陈佳虹 孙远明 李轩
李永芳 沈兴 陆宁 张雅琼
徐振林 沈玉栋 杨金易 王弘
肖治理

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 林丽明

(51) Int. Cl.

C07D 311/36(2006.01)

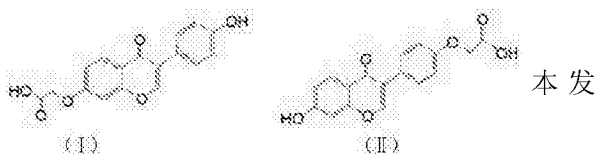
权利要求书2页 说明书8页 附图4页

(54) 发明名称

一种黄豆苷元半抗原和完全抗原及其制备方
法和应用

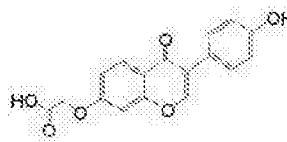
(57) 摘要

本发明公开了一种黄豆苷元半抗原和完全
抗原及其制备方法和应用。所述黄豆苷元
半抗原的分子结构如下式(I)或式(II)所示：

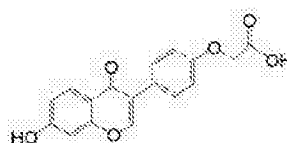


本发

明以黄豆苷元为原料,经过2步化学反应分别得
到黄豆苷元7-衍生物和4-衍生物半抗原,成功
地合成了黄豆苷元半抗原,合成方法安全有效,产
物纯度高。在此基础上进一步采用活泼酯法制备
适合于动物免疫的黄豆苷元完全抗原,以此抗原
免疫Balb/c小鼠,效价可达1:32000,抑制率可达
94.9%,为建立黄豆苷元的免疫分析方法提供了核
心原材料和有利条件,具有广阔的实际应用前景。



(I)



(II)

所述氯仿和甲醇的体积比为15~25:1;步骤S4所述目标产物酯与甲醇的比例为5~10mg/mL。

6. 根据权利要求3所述制备方法,其特征在于,在式(I)和式(II)的制备方法中,步骤S2或S4所述萃取均是用乙酸乙酯和饱和氯化钠溶液分别萃取,步骤S2或S4所述干燥过滤均是用无水硫酸钠进行干燥过滤。

7. 权利要求1所述黄豆苷元半抗原在制备黄豆苷元完全抗原或在制备黄豆苷元抗体中的应用。

8. 一种黄豆苷元完全抗原,其特征在于,是以权利要求1所述黄豆苷元半抗原合成得到黄豆苷元完全抗原。

9. 权利要求8所述黄豆苷元完全抗原的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1. 将黄豆苷元半抗原、EDC和NHS溶于200 μ L的DMF中,室温搅拌反应过夜,即得活化好的黄豆苷元衍生物;

S2. 将载体蛋白溶于0.9%的氯化钠溶液中,再边搅拌边逐滴加入上述活化好的黄豆苷元衍生物,室温下反应1~5h,反应结束后,用0.9%的氯化钠溶液透析,即得到黄豆苷元完全抗原。

10. 权利要求8所述黄豆苷元完全抗原在制备检测试剂盒中的应用。

一种黄豆苷元半抗原和完全抗原及其制备方法和应用

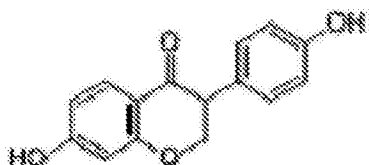
技术领域

[0001] 本发明属于生物化学技术领域。更具体地,涉及一种黄豆苷元半抗原和完全抗原及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 黄豆苷元又名大豆苷元,是大豆异黄酮的一种,由豆科植物葛根中提取得到,具有类似雌激素的生物活性;具有扩张冠状动脉、股动脉、脑动脉,增加脑血流量,加强四肢血液循环,降低血液黏度,减弱血管阻力,减少心肌耗氧量,改善心功能,增强微循环,加强末梢血流量,使血液流变学改变,降压、改善心率作用。黄豆苷元可用于高血压、症状性高血压、冠心病、眩晕症、脑血栓、心绞痛、心肌梗死、心律失常、突发性耳聋、妇女更年期综合征等的治疗。黄豆苷元分子式为 $C_{15}H_{10}O_4$,分子量:254.24,其结构式如下式所示:

[0003]



[0004] 目前,检测黄豆苷元的方法有高效液相色谱法(HPLC),高效液相色谱-串联质谱法(LC-MS-MS)和毛细管电泳法(HPCE)等仪器方法,但这些方法存在操作繁琐,耗时,费用比较贵等缺点,不能实现大量样品的快速检测,而免疫分析方法具有灵敏度高,检测速度快,特异性强的优点,具有显著优势。而得到高亲和力和高特异性的抗体是免疫检测的前提,其中,人工抗原的合成更是其中非常重要的一步。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服现有黄豆苷元检测方法的缺陷和技术不足,提供一种黄豆苷元半抗原和完全抗原的制备方法。本发明制备方法合成步骤安全有效,纯度较高,可得到满足制备完全抗原纯度要求的黄豆苷元半抗原衍生物。

[0006] 本发明的目的是提供一种黄豆苷元半抗原。

[0007] 本发明第二个目的是提供上述黄豆苷元半抗原的制备方法。

[0008] 本发明的再一目的是提供利用上述黄豆苷元半抗原制备完全抗原的方法,以及制备得到的黄豆苷元完全抗原。

[0009] 本发明上述目的通过以下技术方案实现:

[0010] 一种黄豆苷元半抗原,其分子结构如下式(I)或式(II)所示:

- [0034] 在式(II)的制备方法中,优选地,步骤S1所述黄豆苷元与N,N-二甲基甲酰胺的比例为20~30mg/mL。
- [0035] 更优选地,步骤S1所述黄豆苷元与N,N-二甲基甲酰胺的比例为25mg/mL。
- [0036] 优选地,步骤S1所述叔丁醇钾与黄豆苷元的质量比为0.5~2:1,
- [0037] 更优选地,步骤S1所述叔丁醇钾与黄豆苷元的质量比为1.1:1。
- [0038] 优选地,步骤S1所述溴乙酸乙酯与N,N-二甲基甲酰胺的体积比为0.005~0.02:1。
- [0039] 更优选地,步骤S1所述溴乙酸乙酯与N,N-二甲基甲酰胺的体积比为0.01625:1。
- [0040] 优选地,步骤S1所述低温是指-40℃~-70℃。
- [0041] 另外,在上述式(I)和式(II)的制备方法中,优选地,步骤S3所述氯仿和甲醇的体积比为15~25:1。
- [0042] 更优选地,步骤S3所述氯仿和甲醇的体积比为20:1。
- [0043] 优选地,步骤S4所述目标产物酯与甲醇的比例为5~10mg/mL。
- [0044] 更优选地,步骤S4所述目标产物酯与甲醇的比例为6.8mg/mL。
- [0045] 优选地,步骤S2或S4所述萃取是用乙酸乙酯和饱和氯化钠溶液分别萃取。
- [0046] 优选地,步骤S2或S4所述干燥过滤是用无水硫酸钠进行干燥过滤。
- [0047] 优选地,步骤S2或S4所述盐酸溶液的浓度为1mol/L。
- [0048] 优选地,步骤S4所述氢氧化钾溶液的浓度为1mol/L。
- [0049] 优选地,步骤S2所述蒸馏水的用量是丙酮的5倍。
- [0050] 优选地,步骤S4所述蒸馏水的用量是甲醇的5倍。
- [0051] 优选地,步骤S2或S4所述萃取为分别萃取两次。
- [0052] 另外,上述黄豆苷元半抗原在制备黄豆苷元完全抗原或在制备黄豆苷元抗体中的应用,以及以上述黄豆苷元半抗原合成得到的黄豆苷元完全抗原,也在本发明的保护范围之内。
- [0053] 作为一种优选的实施方案,上述黄豆苷元完全抗原的制备方法包括以下步骤:
- [0054] S1.将黄豆苷元半抗原、EDC和NHS溶于200 μ L的DMF中,室温搅拌反应过夜,即得活化好的黄豆苷元衍生物;
- [0055] S2.将载体蛋白溶于0.9%的氯化钠溶液中,再边搅拌边逐滴加入上述活化好的黄豆苷元衍生物,室温下反应1~5h,反应结束后,用0.9%的氯化钠溶液透析,即得到黄豆苷元完全抗原,分装后冷冻保存于-20℃。
- [0056] 其中,优选地,步骤S1中的黄豆苷元半抗原、EDC和NHS的质量比为1:0.6~1.2:0.4~1。
- [0057] 优选地,步骤S1中的黄豆苷元半抗原:DMF=5mg/mL。
- [0058] 优选地,步骤S2中的载体蛋白:氯化钠溶液=6~10mg:1.8~2.5mL。
- [0059] 优选地,步骤S2所述载体蛋白是BSA或OVA。
- [0060] 本发明还提供了一种鉴定或应用上述完全抗原黄豆苷元7-BSA或黄豆苷元4'-BSA的方法,是按照50 μ g/只的剂量,分别皮下注射免疫5只雌性Balb/c小鼠。初次免疫将免疫原与完全弗氏佐剂按照1:1混合乳化。之后将免疫原与不完全弗氏佐剂按照1:1混合每间隔两周进行一次加强免疫。三免后尾部取血间接ELISA法测定效价。
- [0061] 另外,上述黄豆苷元半抗原在制备黄豆苷元完全抗原化合物,或在制备黄豆苷元

抗体中的应用,以及上述黄豆苷元半抗原在检测黄豆苷元或其结构类似物中的应用,均在本发明的保护范围之内。

[0062] 同时,所述黄豆苷元完全抗原和黄豆苷元抗体在检测黄豆苷元或其结构类似物中的应用,以及在黄豆苷元免疫检测中的应用或制备检测试剂盒的应用,也应在本发明的保护范围之内。

[0063] 由于黄豆苷元属于小分子物质,无法直接诱导动物机体产生特异性抗体,其本身没有可供偶联的活性官能团(如氨基、羧基等),因此无法与载体蛋白发生偶联反应产生特异性抗体的抗原。若对黄豆苷元分子进行修饰衍生化,接上活性官能团使其能与载体蛋白偶联则有可能形成抗原,这种经过人工修饰后的抗原称为人工抗原,而该衍生化产物则称为半抗原。因此,要实现黄豆苷元和载体蛋白的偶联,得到特异性抗体,首先要进行黄豆苷元的设计和合成。为保证半抗原和大分子载体蛋白偶联后能被识别,半抗原的设计关键之处在于尽可能保留其母环结构,在其适当的位置引入合适的连接臂和能与载体蛋白偶联的活性基团。而针对黄豆苷元化学结构,其本身在7位和4'位具有两个羟基,基于此,本发明设计了黄豆苷元半抗原合成方法,从7位和4'位分别衍生,并以此制备适合于动物免疫的完全抗原,为建立黄豆苷元的免疫分析方法提供了有利的条件,满足了国内对该研究的需要,具有广阔的实际应用前景。

[0064] 本发明具有以下有益效果:

[0065] 本发明提供了一种新型的黄豆苷元半抗原衍生物的合成方法,为黄豆苷元完全抗原的合成及黄豆苷元抗体的制备提供可能,方法合成步骤安全有效,产物纯度较高。

[0066] 另外,采用活泼酯法分别与本发明的免疫原与牛血清白蛋白偶联,制备适合于动物免疫的黄豆苷元完全抗原,以此抗原免疫Ba1b/c小鼠,效价可达1:32000,抑制率可达94.9%,效价和抑制较高,为建立黄豆苷元的免疫分析方法提供了核心原材料和有利的条件,满足了国内对该研究的需要,具有广阔的实际应用前景。

附图说明

[0067] 图1为黄豆苷元半抗原(黄豆苷元7-衍生物和黄豆苷元4'-衍生物)的分子结构。

[0068] 图2为黄豆苷元7-衍生物酯的质谱图。

[0069] 图3为黄豆苷元7-衍生物的质谱图。

[0070] 图4为黄豆苷元4'-衍生物酯的质谱图。

[0071] 图5为黄豆苷元4'-衍生物的质谱图。

[0072] 图6为黄豆苷元7-衍生物的抗体性能鉴定图

[0073] 图7为黄豆苷元4'-衍生物的抗体性能鉴定图

具体实施方式

[0074] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0075] 除非特别说明,本发明所用试剂和材料均为市购。

[0076] 实施例1黄豆苷元半抗原(I)合成及鉴定

[0077] 1、将100mg黄豆昔元溶于4.0mL丙酮中,依次加入0.43mL 1mol/L氢氧化钾溶液,6.4mg碘化钾和65 μ L溴乙酸乙酯,室温下搅拌反应。

[0078] 再用1mol/L盐酸溶液中和后加入20mL的蒸馏水,然后用乙酸乙酯和饱和氯化钠溶液分别萃取2次,每次20mL,合并有机层,以无水硫酸钠干燥过滤,旋转蒸发除去乙酸乙酯。

[0079] 所得粗品酯用丙酮复溶,以氯仿:甲醇=20:1(v:v)作展开剂,室温下进行薄层层析,得到目标产物酯51mg,得率91%。质谱结果如下:ESI-MS m/z:339.17(M-H)-(图2),核磁结果如下:¹HNMR(400MHz,CDCl₃), δ ppm.8.24(d,1H,J=8.8Hz),7.92(s,1H),7.36-7.40(m,2H),7.04(dd,J=8.8,2.4Hz,1H),6.84-6.87(m,3H),4.73(s,1H),4.31(q,J=7.2Hz,2H),1.32(t,J=7.2,3H)。

[0080] 2、将上述步骤的目标产物酯取34mg溶于5mL甲醇中,加入1mol/L的氢氧化钾溶液反应。再用1mol/L盐酸溶液中和,再加入20mL的蒸馏水,然后用乙酸乙酯和饱和氯化钠溶液分别萃取2次,每次20mL,合并有机层,以无水硫酸钠干燥过滤,旋转蒸发除去乙酸乙酯,得到目标产物黄豆昔元7-衍生物31mg,得率100%。质谱结果如下:ESI-MS m/z:311.04(M-H)-(图3)核磁结果如下:¹HNMR(400MHz,DMSO-d₆) δ ppm.13.14(br s,1H),9.51(s,1H),8.37(s,1H),7.92(s,1H),8.04(d,J=9.2Hz,1H),7.40(d,J=6.8,2.Hz,2H),7.08-7.14(m,2H),6.81(d,J=6.8,2Hz,2H),4.88(s,2H)。

[0081] 实施例2黄豆昔元半抗原(I)合成及鉴定

[0082] 1、将80mg黄豆昔元溶于4.0mL丙酮中,依次加入0.2mL 1mol/L氢氧化钾溶液,5mg碘化钾和20 μ L溴乙酸乙酯,室温下搅拌反应。

[0083] 再用1mol/L盐酸溶液中和后加入20mL的蒸馏水,然后用乙酸乙酯和饱和氯化钠溶液分别萃取2次,每次20mL,合并有机层,以无水硫酸钠干燥过滤,旋转蒸发除去乙酸乙酯。

[0084] 所得粗品酯用丙酮复溶,以氯仿:甲醇=15:1(v:v)作展开剂,室温下进行薄层层析,得到目标产物酯,得率89%。质谱结果如下:ESI-MS m/z:339.17(M-H)-(图2),核磁结果如下:¹HNMR(400MHz,CDCl₃), δ ppm.8.24(d,1H,J=8.8Hz),7.92(s,1H),7.36-7.40(m,2H),7.04(dd,J=8.8,2.4Hz,1H),6.84-6.87(m,3H),4.73(s,1H),4.31(q,J=7.2Hz,2H),1.32(t,J=7.2,3H)。

[0085] 2、将上述步骤的目标产物酯取25mg溶于5mL甲醇中,加入1mol/L的氢氧化钾溶液反应。再用1mol/L盐酸溶液中和,再加入20mL的蒸馏水,然后用乙酸乙酯和饱和氯化钠溶液分别萃取2次,每次20mL,合并有机层,以无水硫酸钠干燥过滤,旋转蒸发除去乙酸乙酯,得到目标产物黄豆昔元7-衍生物,得率100%。质谱结果如下:ESI-MS m/z:311.04(M-H)-(图3)核磁结果如下:¹HNMR(400MHz,DMSO-d₆) δ ppm.13.14(br s,1H),9.51(s,1H),8.37(s,1H),7.92(s,1H),8.04(d,J=9.2Hz,1H),7.40(d,J=6.8,2.Hz,2H),7.08-7.14(m,2H),6.81(d,J=6.8,2Hz,2H),4.88(s,2H)。

[0086] 实施例3黄豆昔元半抗原(I)合成及鉴定

[0087] 1、将120mg黄豆昔元溶于4.0mL丙酮中,依次加入0.8mL 1mol/L氢氧化钾溶液,10mg碘化钾和80 μ L溴乙酸乙酯,室温下搅拌反应。

[0088] 再用1mol/L盐酸溶液中和后加入20mL的蒸馏水,然后用乙酸乙酯和饱和氯化钠溶液分别萃取2次,每次20mL,合并有机层,以无水硫酸钠干燥过滤,旋转蒸发除去乙酸乙酯。

[0089] 所得粗品酯用丙酮复溶,以氯仿:甲醇=25:1(v:v)作展开剂,室温下进行薄层层

析,得到目标产物酯,得率90%。质谱结果如下:ESI-MS m/z :339.17(M-H)-(图2)核磁结果如下: ^1H NMR(400MHz, CDCl_3), δ ppm.8.24(d, 1H, $J=8.8\text{Hz}$), 7.92(s, 1H), 7.36-7.40(m, 2H), 7.04(dd, $J=8.8, 2.4\text{Hz}$, 1H), 6.84-6.87(m, 3H), 4.73(s, 1H), 4.31(q, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 1.32(t, $J=7.2$, 3H)。

[0090] 2、将上述步骤的目标产物酯取25~50mg溶于5mL甲醇中,加入1mol/L的氢氧化钾溶液反应。再用1mol/L盐酸溶液中和,再加入20mL的蒸馏水,然后用乙酸乙酯和饱和氯化钠溶液分别萃取2次,每次20mL,合并有机层,以无水硫酸钠干燥过滤,旋转蒸发除去乙酸乙酯,得到目标产物黄豆苷元7-衍生物,得率100%。质谱结果如下:ESI-MS m/z :311.04(M-H)-(图3),核磁结果如下: ^1H NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ ppm.13.14(br s, 1H), 9.51(s, 1H), 8.37(s, 1H), 7.92(s, 1H), 8.04(d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 7.40(d, $J=6.8, 2.4\text{Hz}$, 2H), 7.08-7.14(m, 2H), 6.81(d, $J=6.8, 2\text{Hz}$, 2H), 4.88(s, 2H)。

[0091] 实施例4黄豆苷元半抗原(II)合成及鉴定

[0092] 1、将100mg黄豆苷元溶于4.0mL N,N-二甲基甲酰胺中,依次加入110mg叔丁醇钾和65 μL 溴乙酸乙酯,-40 $^\circ\text{C}$ ~-70 $^\circ\text{C}$ 下搅拌反应。

[0093] 再用1mol/L盐酸溶液中和,再加入20mL的蒸馏水,然后用乙酸乙酯和饱和氯化钠溶液分别萃取2次,每次20mL,合并有机层,以无水硫酸钠干燥过滤,旋转蒸发除去乙酸乙酯。

[0094] 所得粗品酯用丙酮复溶,以氯仿:甲醇=20:1(v:v)作展开剂,室温下进行薄层层析,得到产物酯39.7mg,得率62.5%。质谱结果如下:ESI-MS m/z :339.17(M-H)-(图4),核磁结果如下: ^1H NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ ppm.8.35(s, 1H), 7.97(d, $J=6.4\text{Hz}$, 1H), 7.49-7.51(m, 2H), 6.97-6.99(m, 2H), 6.94(dd, $J=8.8, 2.4\text{Hz}$, 1H), 6.87(d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 4.81(s, c 2H), 4.18(q, $J=6.8\text{Hz}$, 2H), 1.23(t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H)。

[0095] 2、将所得粗品产物酯取34mg经液相色谱纯化,得到目标产物酯21.3mg,得率62.6%。

[0096] 3、将上述步骤的目标产物酯溶于5mL甲醇中,加入1mol/L的氢氧化钾溶液反应。再用1mol/L盐酸溶液中和,再加入20mL的蒸馏水,然后用乙酸乙酯和饱和氯化钠溶液分别萃取2次,每次20mL,合并有机层,以无水硫酸钠干燥过滤,旋转蒸发除去乙酸乙酯,得到目标产物黄豆苷元7-衍生物21mg,得率100%。质谱结果如下:ESI-MS m/z :311.13(M-H)-(图5),核磁结果如下: ^1H NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ ppm.12.98(br s, 1H), 10.78(br s, 1H), 8.34(s, 1H), 7.97(d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 7.48-7.51(m, 2H), 6.92-6.98(m, 3H), 6.87(d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 4.70(s, 1H)。

[0097] 实施例5黄豆苷元半抗原(II)合成及鉴定

[0098] 1、将80mg黄豆苷元溶于4.0mL N,N-二甲基甲酰胺中,依次加入50mg叔丁醇钾和20 μL 溴乙酸乙酯,-40 $^\circ\text{C}$ 下搅拌反应。

[0099] 再用1mol/L盐酸溶液中和,再加入20mL的蒸馏水,然后用乙酸乙酯和饱和氯化钠溶液分别萃取2次,每次20mL,合并有机层,以无水硫酸钠干燥过滤,旋转蒸发除去乙酸乙酯。

[0100] 所得粗品酯用丙酮复溶,以氯仿:甲醇=15:1(v:v)作展开剂,室温下进行薄层层析,得到产物酯,得率61%。质谱结果如下:ESI-MS m/z :339.17(M-H)-(图4),核磁结果如

下： $^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6). δ ppm. 8.35(s, 1H), 7.97(d, $J=6.4\text{Hz}$, 1H), 7.49-7.51(m, 2H), 6.97-6.99(m, 2H), 6.94(dd, $J=8.8, 2.4\text{Hz}$, 1H), 6.87(d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 4.81(s, c 2H), 4.18(q, $J=6.8\text{Hz}$, 2H), 1.23(t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H)。

[0101] 2、将所得粗品产物酯取25mg经液相色谱纯化,得到目标产物酯,得率61.2%。

[0102] 3、将上述步骤的目标产物酯溶于5mL甲醇中,加入1mol/L的氢氧化钾溶液反应。再用1mol/L盐酸溶液中和,再加入20mL的蒸馏水,然后用乙酸乙酯和饱和氯化钠溶液分别萃取2次,每次20mL,合并有机层,以无水硫酸钠干燥过滤,旋转蒸发除去乙酸乙酯,得到目标产物黄豆昔元7-衍生物,得率100%。质谱结果如下:ESI-MS m/z :311.13(M-H)-(图5),核磁结果如下: $^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6). δ ppm. 12.98(br s, 1H), 10.78(br s, 1H), 8.34(s, 1H), 7.97(d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 7.48-7.51(m, 2H), 6.92-6.98(m, 3H), 6.87(d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 4.70(s, 1H)。

[0103] 实施例6黄豆昔元半抗原(II)合成及鉴定

[0104] 1、将120mg黄豆昔元溶于4.0mL N,N-二甲基甲酰胺中,依次加入200mg叔丁醇钾和80 μL 溴乙酸乙酯,-70 $^\circ\text{C}$ 下搅拌反应。

[0105] 再用1mol/L盐酸溶液中和,再加入20mL的蒸馏水,然后用乙酸乙酯和饱和氯化钠溶液分别萃取2次,每次20mL,合并有机层,以无水硫酸钠干燥过滤,旋转蒸发除去乙酸乙酯。

[0106] 所得粗品酯用丙酮复溶,以氯仿:甲醇=25:1(v:v)作展开剂,室温下进行薄层层析,得到产物酯,得率62%。质谱结果如下:ESI-MS m/z :339.17(M-H)-(图4),核磁结果如下: $^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6). δ ppm. 8.35(s, 1H), 7.97(d, $J=6.4\text{Hz}$, 1H), 7.49-7.51(m, 2H), 6.97-6.99(m, 2H), 6.94(dd, $J=8.8, 2.4\text{Hz}$, 1H), 6.87(d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 4.81(s, c 2H), 4.18(q, $J=6.8\text{Hz}$, 2H), 1.23(t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H)。

[0107] 2、将所得粗品产物酯取50mg经液相色谱纯化,得到目标产物酯,得率62.2%。

[0108] 3、将上述步骤的目标产物酯溶于5mL甲醇中,加入1mol/L的氢氧化钾溶液反应。再用1mol/L盐酸溶液中和,再加入20mL的蒸馏水,然后用乙酸乙酯和饱和氯化钠溶液分别萃取2次,每次20mL,合并有机层,以无水硫酸钠干燥过滤,旋转蒸发除去乙酸乙酯,得到目标产物黄豆昔元7-衍生物,得率100%。质谱结果如下:ESI-MS m/z :311.13(M-H)-(图5),核磁结果如下: $^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6). δ ppm. 12.98(br s, 1H), 10.78(br s, 1H), 8.34(s, 1H), 7.97(d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 7.48-7.51(m, 2H), 6.92-6.98(m, 3H), 6.87(d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 4.70(s, 1H)。

[0109] 实施例7黄豆昔元完全抗原的合成

[0110] 以上述实施例1和4制备的黄豆昔元半抗原(I)或(II)为例,分别合成黄豆昔元完全抗原的方法如下:

[0111] (1)按照每1mg黄豆昔元半抗原(I)或(II),与0.8mg的EDC和0.6mg的NHS溶于200 μL 的DMF中的比例操作,室温搅拌反应过夜,即得活化好的黄豆昔元衍生物;

[0112] (2)将10mg的载体蛋白溶于1.8~2.5mL的0.9%的氯化钠溶液中,将上一步活化好的黄豆昔元衍生物边搅拌边逐滴加入载体蛋白溶液中,室温下反应1-5h,反应结束后,用0.9%的氯化钠溶液透析,即得到黄豆昔元完全抗原。

[0113] 实施例8黄豆昔元多克隆抗体的制备及鉴定

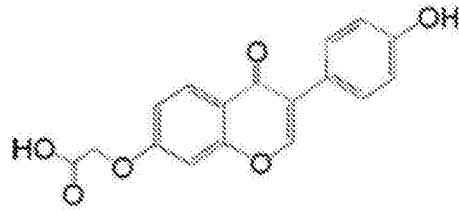
[0114] 1、黄豆苷元多克隆抗体的制备

[0115] 按照50 μ g/只的剂量,分别皮下注射免疫5只雌性Ba1b/c小鼠。初次免疫将免疫原与完全弗氏佐剂按照1:1混合乳化。之后将免疫原与不完全弗氏佐剂按照1:1混合每间隔两周进行一次加强免疫。

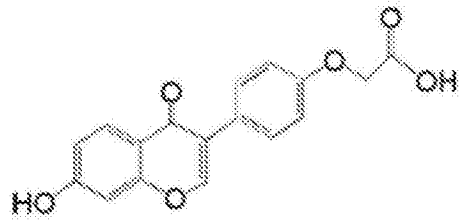
[0116] 2、黄豆苷元多克隆抗体鉴定

[0117] 从第3次加强免疫开始,每次第8天采血,经放置、离心后得到血清,血清适当稀释后用间接竞争ELISA法测定效价。四免后,小鼠可获得高效价的抗体。黄豆苷元免疫原1(由黄豆苷元半抗原(I)制备)所获得的抗体效价最高为1:8000,抑制率为94.2%(如附图6所示)。黄豆苷元免疫原2(由黄豆苷元半抗原(II)制备)所获得的抗体效价最高为1:32000,抑制率为94.9%(如附图7所示)。

[0118] 综上所述,本发明成功合成黄豆苷元半抗原(I)和(II),利用该半抗原分别制备黄豆苷元完全抗原,利用该抗原可生产黄豆苷元抗体,为黄豆苷元免疫分析方法的建立和发展奠定了基础。



(I)



(II)

图1

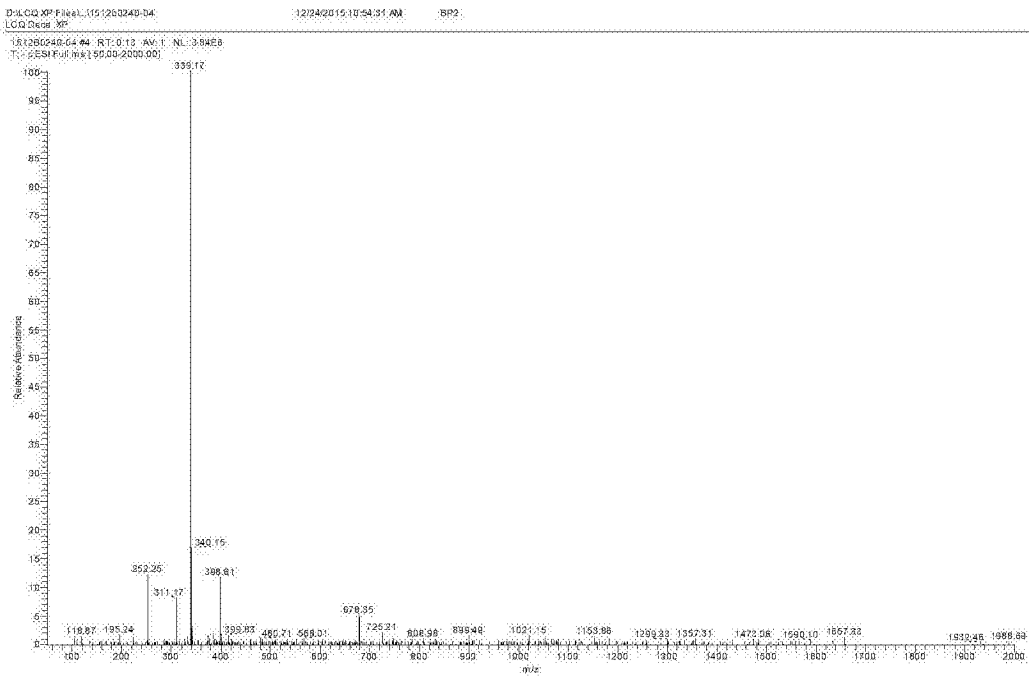


图2

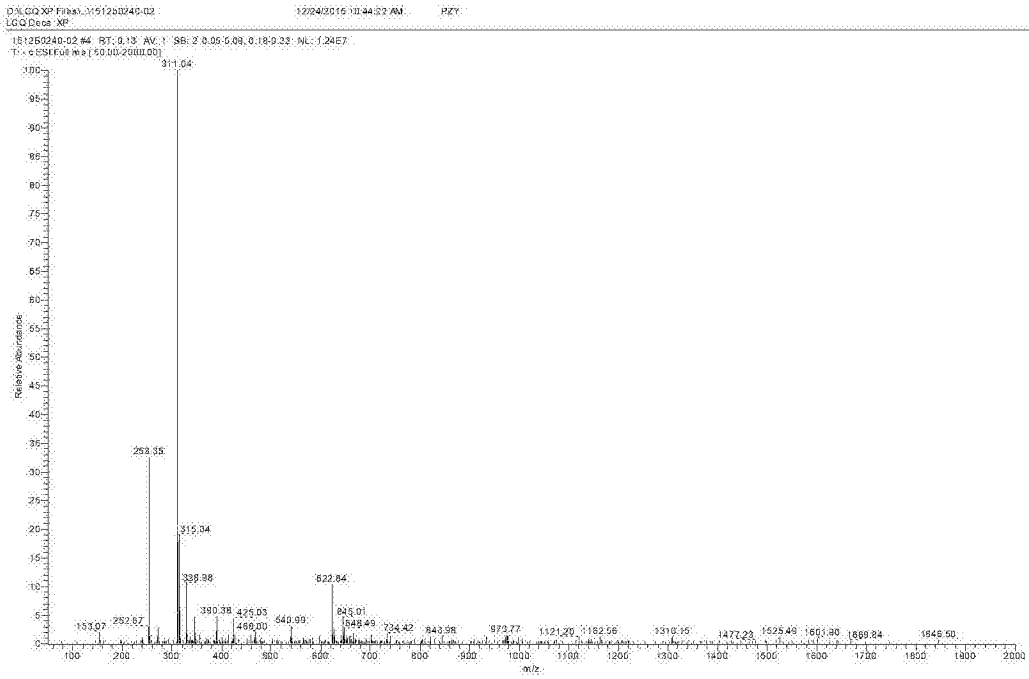


图3

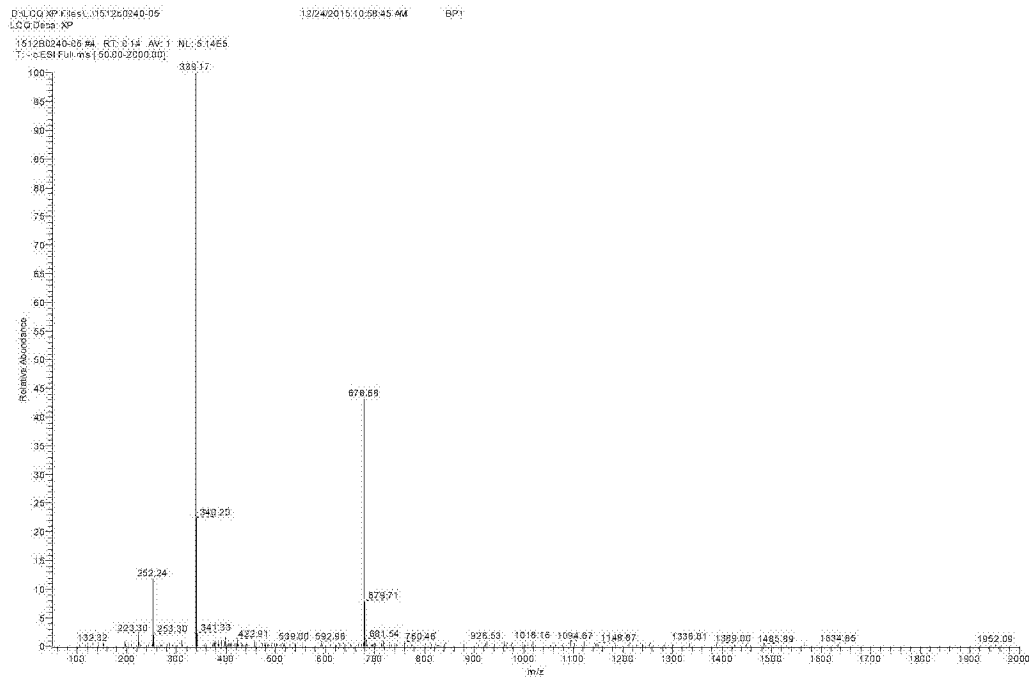


图4

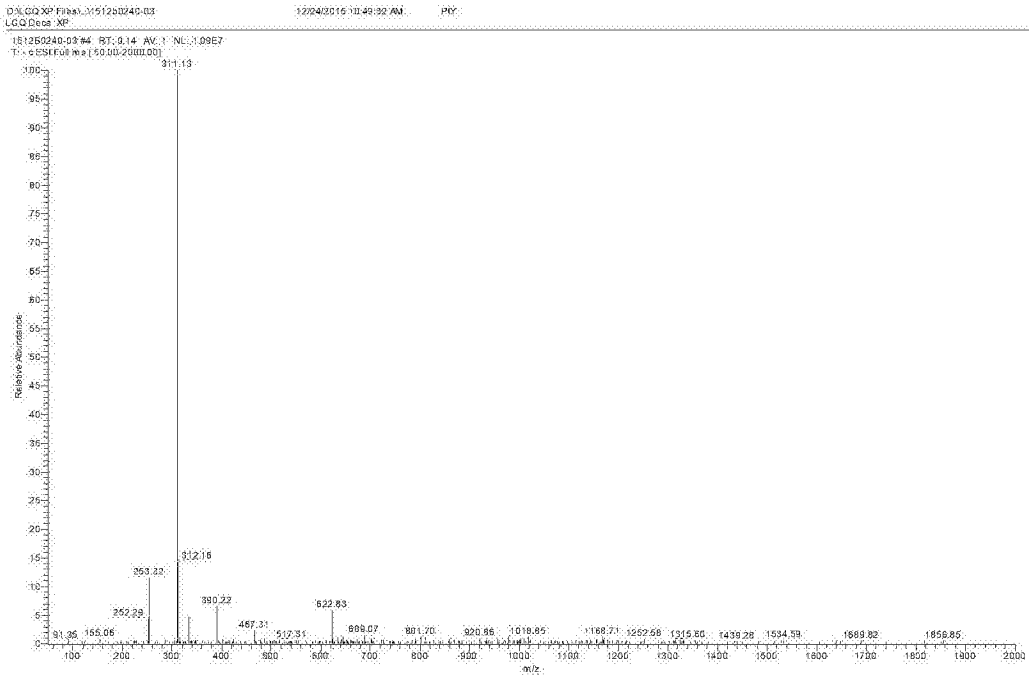


图5

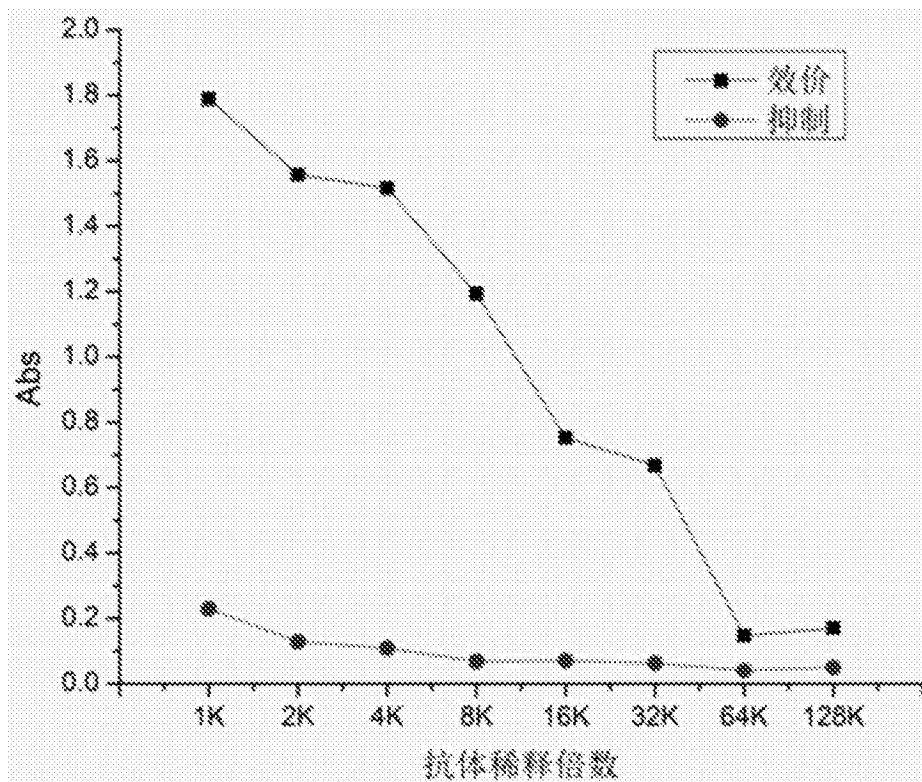


图6

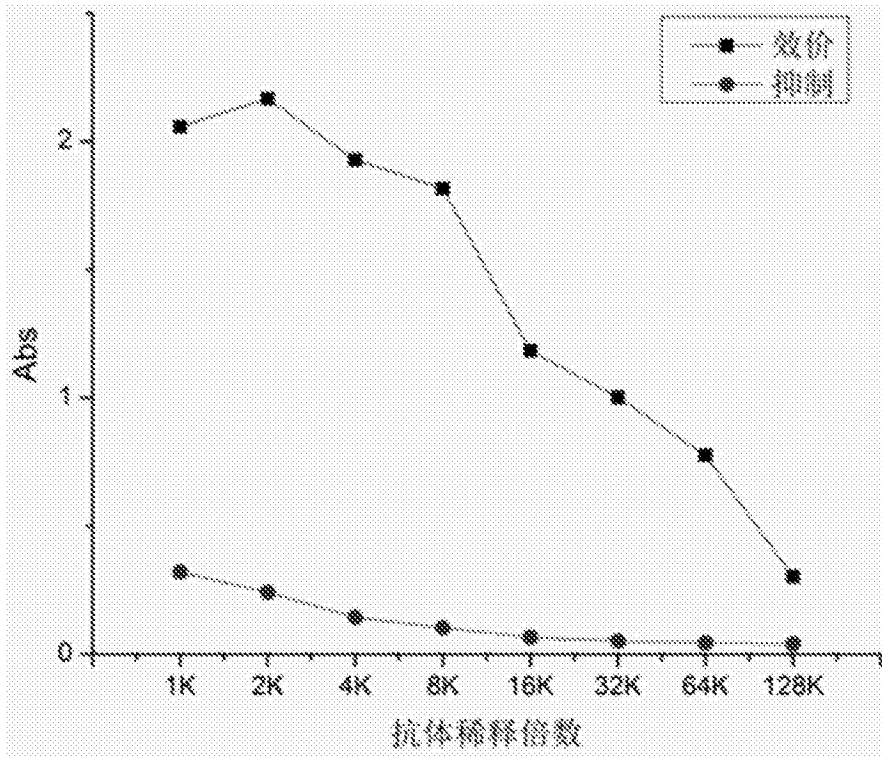
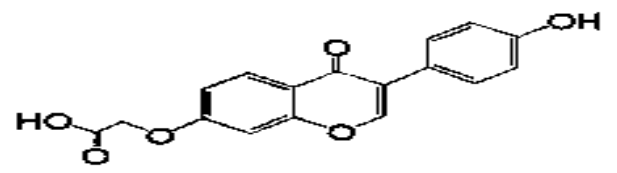


图7

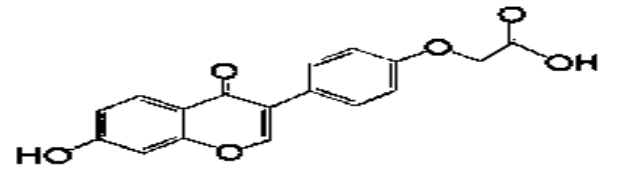
专利名称(译)	一种黄豆苷元半抗原和完全抗原及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN105669628A	公开(公告)日	2016-06-15
申请号	CN201610021937.6	申请日	2016-01-12
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	雷红涛 陈佳虹 孙远明 李轩 李永芳 沈兴 陆宁 张雅琼 徐振林 沈玉栋 杨金易 王弘 肖治理		
发明人	雷红涛 陈佳虹 孙远明 李轩 李永芳 沈兴 陆宁 张雅琼 徐振林 沈玉栋 杨金易 王弘 肖治理		
IPC分类号	C07D311/36 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 G01N33/53		
CPC分类号	C07D311/36 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/5308 G01N2400/00		
代理人(译)	林丽明		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种黄豆苷元半抗原和完全抗原及其制备方法和应用。所述黄豆苷元半抗原的分子结构如下式(I)或式(II)所示：本发明以黄豆苷元为原料，经过2步化学反应分别得到黄豆苷元7-衍生物和4'-衍生物半抗原，成功地合成了黄豆苷元半抗原，合成方法安全有效，产物纯度高。在此基础上进一步采用活泼酯法制备适合于动物免疫的黄豆苷元完全抗原，以此抗原免疫Balb/c小鼠，效价可达1：32000，抑制率可达94.9%，为建立黄豆苷元的免疫分析方法提供了核心原材料和有利条件，具有广阔的实际应用前景。



(I)



(II)