

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710135242.1

[51] Int. Cl.

C07K 14/765 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/536 (2006.01)

C07J 5/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008年4月16日

[11] 公开号 CN 101161679A

[22] 申请日 2007.11.1

[21] 申请号 200710135242.1

[71] 申请人 江南大学

地址 214028 江苏省无锡市新区新华路94号
江南大学国家大学科技园

[72] 发明人 胥传来 袁媛 彭池方 尹丽梅
陈伟

[74] 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
代理人 时旭丹 刘品超

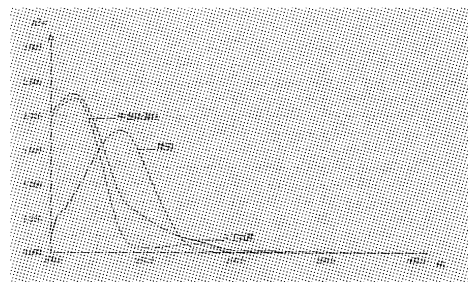
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

[54] 发明名称

一种地赛米松人工抗原的制备方法

[57] 摘要

一种地赛米松人工抗原的制备方法，属于生物化工领域。本发明以地赛米松为原料，利用丁二酸酐与地赛米松反应生成地赛米松琥珀酸半酯，得到人工半抗原；利用活性酯法使半抗原转变为活性酯中间体，然后使之与牛血清蛋白结合，制备地赛米松的人工抗原即地赛米松—牛血清蛋白。本发明合成了地赛米松的人工抗原，所制备的产品可用于糖皮质激素类免疫方法的研究，合成步骤简洁，有效，完全可用于免疫分析中，为以后人们的研究提供了方便的途径，可以满足国内对其研究的需要。



1.一种地赛米松人工抗原的制备方法,其特征是以地赛米松为原料,利用丁二酸酐与地赛米松反应生成地赛米松琥珀酸半酯,得到人工半抗原;利用活性酯法使半抗原转变为活性酯中间体,然后使之与牛血清蛋白结合,制备地赛米松的人工抗原即地赛米松-牛血清蛋白;步骤为:

(1) 人工半抗原的制备:

地赛米松和丁二酸酐配料摩尔比为 1:3,称取地赛米松 0.8mmol 和丁二酸酐 2.4mmol 于 50mL 圆底烧瓶中,加入 5mL 无水吡啶,混合物在 60℃下加热搅拌反应 6h,将反应物转入 20mL 含 10%盐酸的 4℃冰水中,有白色沉淀析出,离心除去吡啶及过量的丁二酸酐,滤饼用去离子水洗涤数次,离心,干燥箱干燥后得到地赛米松半抗原,置于 4℃保存;

硅胶薄层板的制作:称取硅胶 12g,溶解在 40mL 0.5%质量浓度的羟甲基纤维素钠溶液中,用玻璃棒充分搅拌成糊状,超声波振荡 1 分钟,均匀涂布在玻璃板上,置于阴凉处自然干燥后,放入 105℃的烘箱中活化 1h,最后放入干燥箱中备用;

薄层层析法检测:硅胶薄板下端 1cm 处作一水平线,吸取反应液 1μL 点于线上,点样结束后吹干,将薄板放入层析缸中,层析液为甲醇:氯仿:氨水体积比为 21:78:1,展开至薄板 3.5-4cm 处,取板,吹干溶剂,将薄板置于紫外分析仪中,在 254nm 波长观察,在 Rf 为 0.21 处观察到显色点作为反应终点;

(2) 人工抗原的制备:

制备 A 液:称取 0.09mmol 半抗原, 0.09mmol N-羟基琥珀酰亚胺, 0.099mmol N,N-二环己基碳二亚胺于 20mL 烧杯中,溶解于 1.8mL 的二氧六环中,室温下搅拌过夜,离心后弃沉淀,清液为活性酯中间体,为 A 液;

磷酸盐缓冲液:将 0.2mol/L 的磷酸氢二钠溶液 94.7mL 与 0.2mol/L 的磷酸二氢钠溶液 5.3mL 混合即为 pH 8.0 的磷酸盐缓冲液;

制备 B 液:称取 120.6mg 的牛血清蛋白溶解于 9mL 的 pH 8.0 的磷酸盐缓冲液中,4℃低温搅拌半小时,此液为 B 液;

在 4℃低温搅拌下,将 A 液逐滴地滴加到 B 液中,全部滴完后,混合液搅拌 1 小时恢复至室温,即得到人工抗原混合液;

透析袋前处理:取 10cm 的透析袋,于沸水中煮沸 10min,再用 60℃的去离子水冲洗 3min,保存在 4℃去离子水中备用;

将人工抗原混合液移入透析袋中,用 2×2L 的超纯水透析 3 天,最后使用冻干法将透析袋中的液体制成粉末,即得到人工抗原:地赛米松-牛血清蛋白。

一种地赛米松人工抗原的制备方法

技术领域

一种地赛米松人工抗原的制备方法，属于生物化工领域。

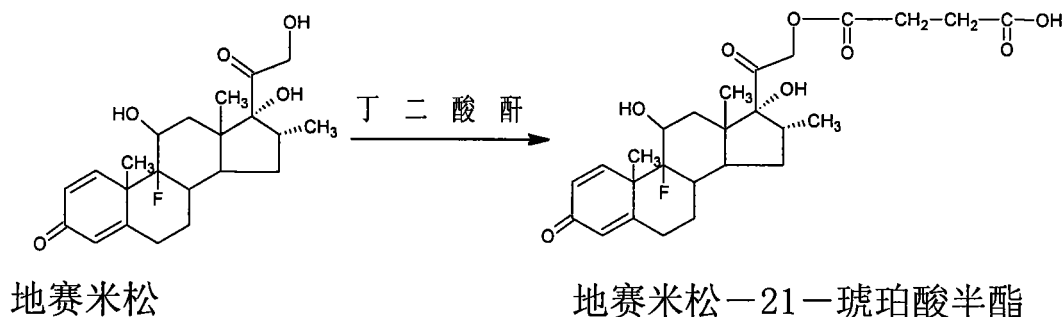
背景技术

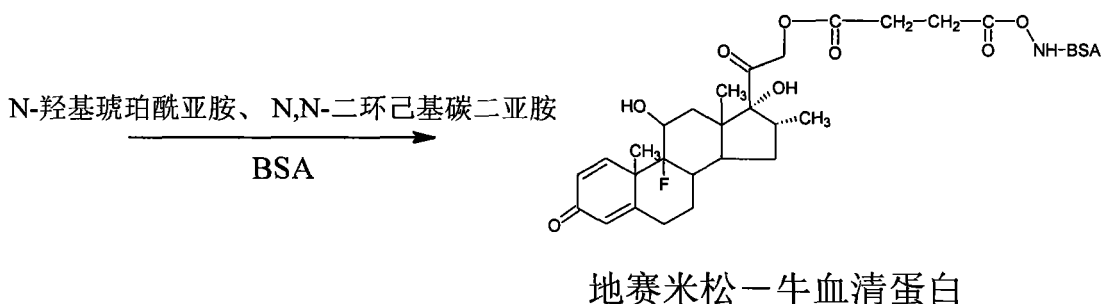
地赛米松（Dexamethasone）属人工合成类糖皮质激素，化学名称为16 α -甲基-11 β ，17 α ，21-三羟基-9 α -氟孕甾-1，4-二烯-3，20-二酮。具有抗过敏、抗炎和影响糖代谢的作用，常被用于治疗家畜的炎症反应、免疫性疾病、牛的酮病和羊妊娠毒血症等。地赛米松还常被用作生长促进剂，增加家畜的饲料摄入量从而使其达到增重的目的。然而，经毒理学试验证明，该药物具有至突变性、蓄积毒性，ADI值为0.000015mg/kgbw/day。若随意在饲料中添加该药物，蓄积的药物通过食物链进入人体，将造成巨大的危害。为此许多国家将此类药物列入禁用药物名单。当今国际上常用的地赛米松残留的检测方法有：薄层色谱（TLC）、液相色谱(LC)、气相色谱(GC)、气-质联用法(GC-MS)、液-质联用法(LC-MS)等，但这些仪器分析方法不仅需要昂贵的仪器设备，对检材的要求也比较高，需要经过复杂的样品前处理才能进行。国外早已经开展了对地赛米松免疫分析方法的研究，但国内目前在这方面还是一片空白。为了加强对国内肉制品的监督力度和保障人民的身体健康，有必要展开对地赛米松免疫分析方法的研究，有必要提供一种有效的地赛米松人工抗原的制备方法。

发明内容：

本发明的目的是提供一种地赛米松人工抗原的制备方法，所制备的产品可用于糖皮质激素类免疫方法的研究，为今后人们的研究提供了方便的途径。

本发明的技术方案：一种地赛米松人工抗原的制备方法，以地赛米松为原料，利用丁二酸酐与地赛米松反应生成地赛米松琥珀酸半酯，得到人工半抗原；利用活性酯法使半抗原转变为活性酯中间体，然后使之与牛血清蛋白结合，制备地赛米松的人工抗原即地赛米松-牛血清蛋白；其反应方程式为：





工艺步骤为：

(1) 人工半抗原的制备：

地赛米松和丁二酸酐配料摩尔比为 1 : 3，称取地赛米松 0.8mmol 和丁二酸酐 2.4mmol 于 50mL 圆底烧瓶中，加入 5mL 无水吡啶，混合物在 60℃ 下加热搅拌反应 6h，将反应物转入 20mL 含 10% 盐酸的 4℃ 冰水中，有白色沉淀析出，离心除去吡啶及过量的丁二酸酐，滤饼用去离子水洗涤数次，离心，干燥箱干燥后得到地赛米松半抗原，置于 4℃ 保存；

硅胶薄层板的制作：称取硅胶 12g，溶解在 40mL 0.5% 质量浓度的羟甲基纤维素钠溶液中，用玻璃棒充分搅拌成糊状，超声波振荡 1 分钟，均匀涂布在玻璃板上，置于阴凉处自然干燥后，放入 105℃ 的烘箱中活化 1h，最后放入干燥箱中备用；

薄层层析法检测：硅胶薄板下端 1cm 处作一水平线，吸取反应液 1μL 点于线上，点样结束后吹干，将薄板放入层析缸中，层析液为甲醇：氯仿：氨水体积比为 21 : 78 : 1，展开至薄板 3.5-4cm 处，取板，吹干溶剂，将薄板置于紫外分析仪中，在 254nm 波长观察，在 Rf 为 0.21 处观察到显色点作为反应终点；

(2) 人工抗原的制备：

制备 A 液：称取 0.09mmol 半抗原，0.09mmol N-羟基琥珀酰亚胺，0.099mmol N,N-二环己基碳二亚胺于 20mL 烧杯中，溶解于 1.8mL 的二氧六环中，室温下搅拌过夜，离心后弃沉淀，清液为活性酯中间体，为 A 液；

磷酸盐缓冲液：将 0.2mol/L 的磷酸氢二钠溶液 94.7mL 与 0.2mol/L 的磷酸二氢钠溶液 5.3mL 混合即为 pH 8.0 的磷酸盐缓冲液；

制备 B 液：称取 120.6mg 的牛血清蛋白溶解于 9mL 的 pH 8.0 的磷酸盐缓冲液中，4℃ 低温搅拌半小时，此液为 B 液；

在 4℃ 低温搅拌下，将 A 液逐滴地滴加到 B 液中，全部滴完后，混合液搅拌 1 小时恢复至室温，即得到人工抗原混合液；

透析袋前处理：取 10cm 的透析袋，于沸水中煮沸 10min，再用 60℃ 的去离子水冲洗 3min，保存在 4℃ 去离子水中备用；

将人工抗原混合液移入透析袋中，用 2×2L 的超纯水透析 3 天，最后使用冻干法将透析袋中的液体制成粉末，即得到人工抗原：地赛米松-牛血清蛋白。

(3) 地赛米松人工抗原的鉴定

估算偶联物中被偶联的两种分子的比率（偶联比率）的方法，虽然种类很多，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。

偶联物蛋白浓度测定：配制浓度为 0, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的牛血清蛋白溶液 1.5mL，加入 5mL 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 595nm 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稀释，在 595nm 处测定抗原溶液的吸光值，从曲线上得到抗原溶液的相应的蛋白浓度。本实验计算得抗原溶液的蛋白浓度为 5.12 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

偶联比测定：配制地赛米松浓度为 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 20%乙醇溶液，通过紫外扫描可知地赛米松的最大吸收波长为 240nm。

配制 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 牛血清蛋白的水溶液，将偶联产物用去离子水稀释到约 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，在 240nm 处测吸光值，以去离子水为空白，测出吸光值。将 DEX, DEX-BSA, BAS 的质量浓度根据其相对分子质量转换为摩尔浓度，然后根据公式(1)算出各自的摩尔消光系数：

$$\text{摩尔消光系数 } \varepsilon = \frac{A}{C} \quad (1)$$

其中, A 为吸光度, C 为摩尔浓度。

再根据公式(2)估算交联率：

$$M_{\text{DEX}}: M_{\text{BAS}} = (\varepsilon_{\text{DEX-BSA}} - \varepsilon_{\text{BAS}}) / \varepsilon_{\text{DEX}} \quad (2)$$

本发明计算得交联率约为 11。

本发明的有益效果：本发明合成了地赛米松的人工抗原，所制备的产品可用于糖皮质激素类免疫方法的研究，合成步骤简洁，有效，完全可用于免疫分析中，为以后人们的研究提供了方便的途径，可以满足国内对其研究的需要。

附图说明

图1 地赛米松人工半抗原的液相色谱图。

图2 地赛米松人工半抗原的质谱图。

图3 地赛米松人工半抗原的紫外图。

图4 地赛米松人工抗原制备前后的紫外扫描图。

具体实施方式

(1) 人工半抗原的制备：

称取 0.32g 地赛米松和 0.24g 丁二酸酐于 50mL 圆底烧瓶中，加入 5mL 无

水吡啶，混合物在 60℃ 下加热搅拌反应 6h，将反应物转入含 10% 盐酸(v/v)的冰水(4℃)中，有白色沉淀析出，离心出去吡啶及过量的丁二酸酐，去离子水洗涤数次，离心，干燥箱干燥后保存。

反应终点监测：硅胶薄层板的制作，称取硅胶 12g，溶解在 40mL 0.5% 质量浓度的羟甲基纤维素钠溶液中，用玻璃棒充分搅拌成糊状，超声波振荡 1 分钟，均匀涂布在玻璃板上，置于阴凉处自然干燥后，放入 105℃ 的烘箱中活化 1h，最后放入干燥箱中备用。

薄层层析法检测：硅胶薄板下端 1cm 处作一水平线，吸取反应液 1 μ L 点于线上，点样结束后吹干，将薄板放入层析缸中，层析液为甲醇：氯仿：氨水，体积比为 21：78：1，展开至薄板 3.5-4cm 处，取板，吹干溶剂。将薄板置于紫外分析仪中，在 254nm 波长观察，在 Rf 为 0.21 处观察到显色点作为反应终点。

(2) 人工抗原的制备：

制备 A 液：称取 44.31mg (0.09mmol) 半抗原，10.35mg (0.09mmol) N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)，20.4mg (0.099mmol) N,N-二环己基碳二亚胺 (DCC) 于 20mL 烧杯中，溶解于 1.8mL 的二氧六环中，室温下搅拌过夜，离心后弃沉淀，清液为活性酯中间体，为 A 液；

磷酸盐 (PBS) 缓冲液：0.2mol/L 磷酸氢二钠：磷酸氢二钠 71.64g 加水至 1000mL。0.2mol/L 的磷酸二氢钠：磷酸二氢钠 35.61g 加水至 1000mL。将 94.7mL 的磷酸氢二钠与 5.3mL 的磷酸二氢钠混合即为 pH 8.0 的磷酸盐缓冲液。

制备 B 液：称取 120.6mg 的 BSA 溶解于 9mL 的 pH 8.0 的磷酸盐缓冲液中，4℃ 低温搅拌半小时，此液为 B 液。

在低温 (4℃) 搅拌下，将 A 液逐滴地滴加到 B 液中，全部滴完后，混合液搅拌 1 小时恢复至室温，即得到人工抗原混合液。

透析袋前处理：取 10cm 的透析袋，于沸水中煮沸 10min，再用 60℃ 的去离子水冲洗 3min，保存在 4℃ 去离子水中备用。

将人工抗原混合液移入透析袋中，用 2 \times 2L 的超纯水透析 3 天。最后使用冻干法将透析袋中的液体制成粉末，即得到人工抗原：地赛米松-牛血清蛋白。

(3) 地赛米松人工抗原的鉴定

估算偶联物中被偶联的两种分子的比率 (偶联比率) 的方法，虽然种类很多，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。

偶联物蛋白浓度测定：配制浓度为 0, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 200 μ g \cdot mL⁻¹ 的牛血清蛋白溶液 1.5mL，加入 5mL 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 595nm 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稀释，在 595nm 处测定抗原溶液的吸光值，从曲线上得到抗原溶液的相应的蛋白浓度。本发明计算得抗原溶液的蛋白浓度为 $5.12\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

偶联比测定：配制地塞米松浓度为 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 20%乙醇溶液，通过紫外扫描可知地塞米松的最大吸收波长为 240nm。

配制 $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 牛血清蛋白的水溶液，将偶联产物用去离子水稀释到约 $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，在 240nm 处测吸光值，以去离子水为空白，测出吸光值。将 DEX, DEX-BSA, BAS 的质量浓度根据其相对分子质量转换为摩尔浓度，然后根据公式(1)算出各自的摩尔消光系数：

$$\text{摩尔消光系数 } \varepsilon = \frac{A}{C} \quad (1)$$

其中，A 为吸光度，C 为摩尔浓度。

再根据公式(2)估算交联率：

$$M_{\text{DEX}}: M_{\text{BAS}} = (\varepsilon_{\text{DEX-BSA}} - \varepsilon_{\text{BAS}}) / \varepsilon_{\text{DEX}} \quad (2)$$

本发明计算得交联率约为 11。

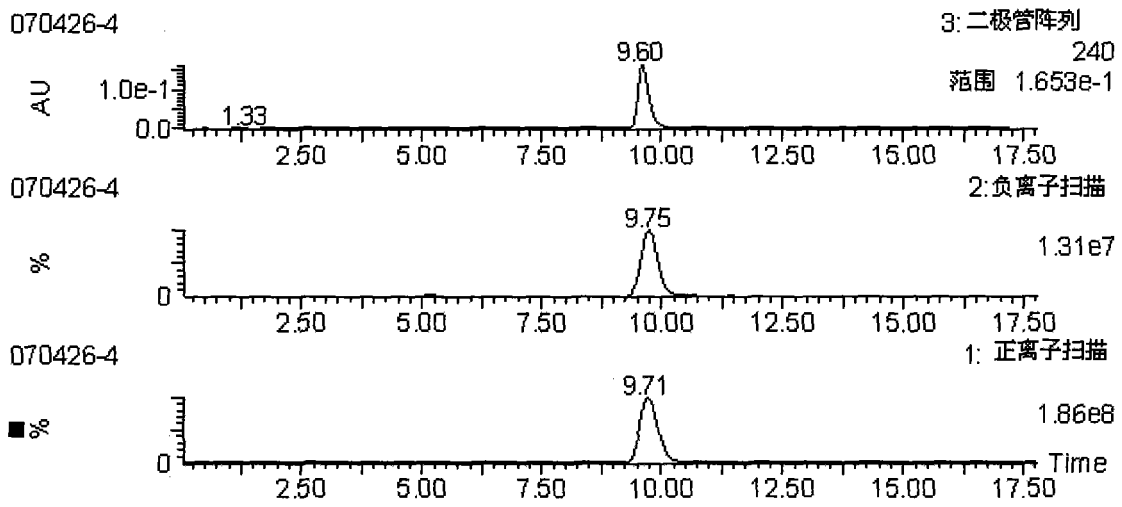


图 1

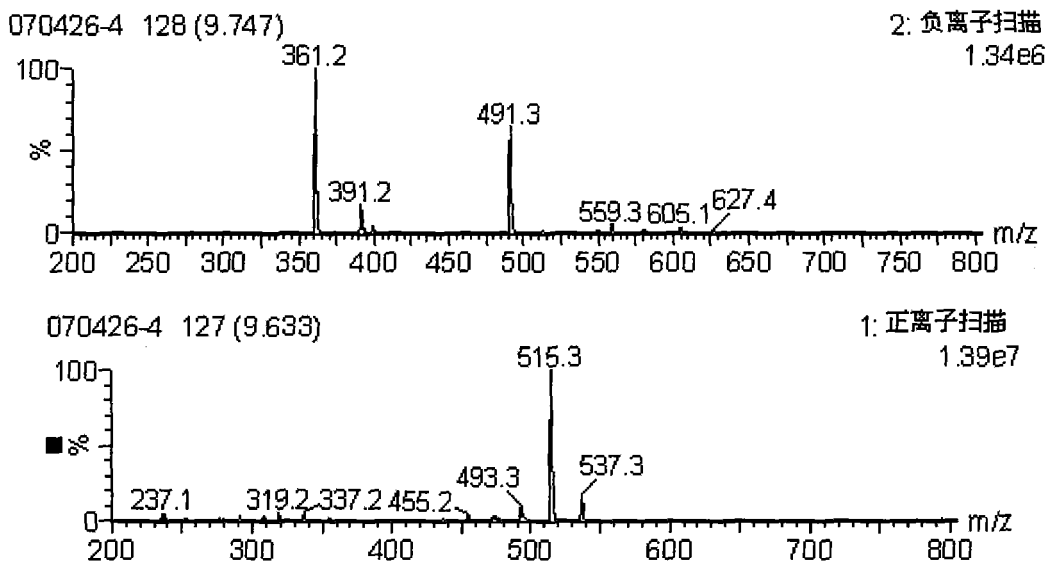


图 2

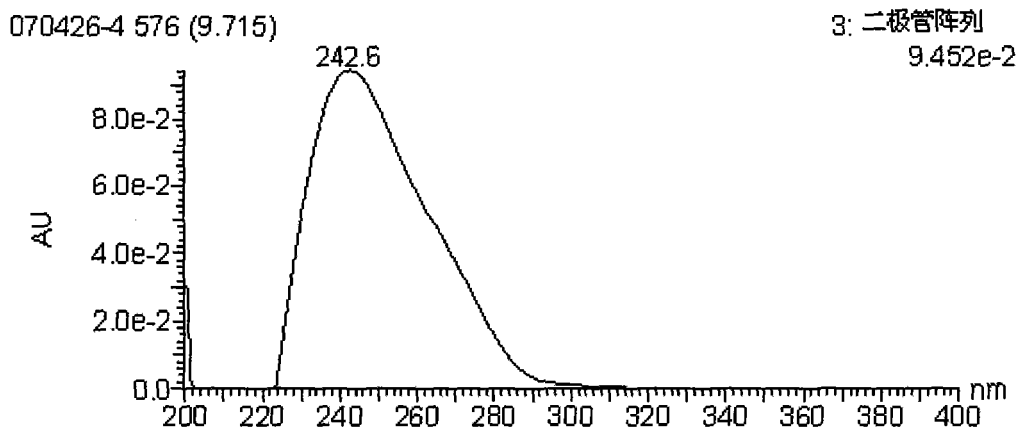


图 3

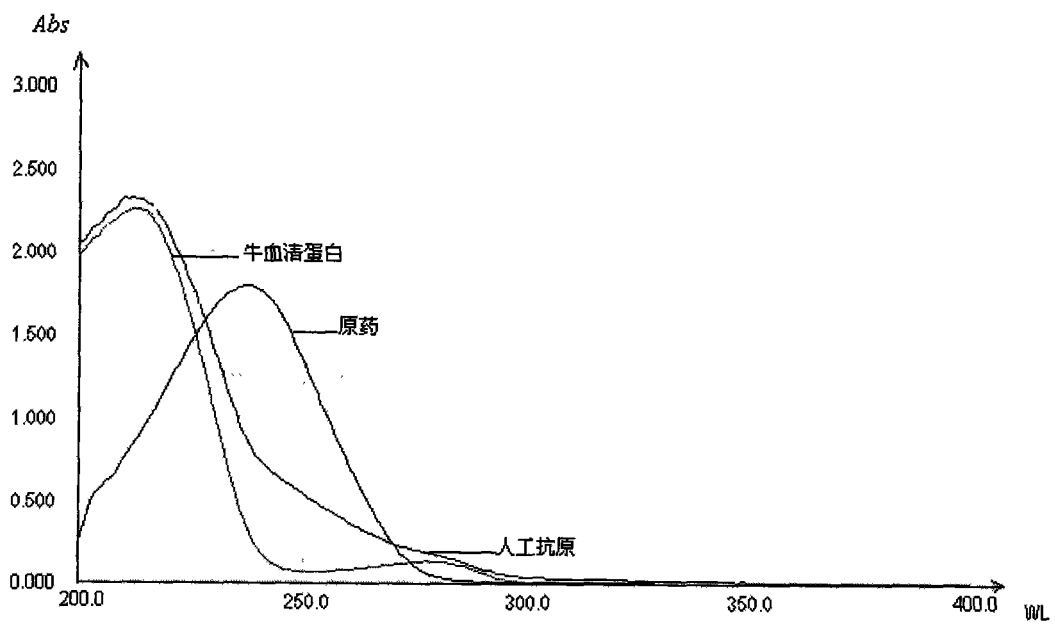


图 4

专利名称(译)	一种地赛米松人工抗原的制备方法		
公开(公告)号	CN101161679A	公开(公告)日	2008-04-16
申请号	CN200710135242.1	申请日	2007-11-01
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	胥传来 袁媛 彭池方 尹丽梅 陈伟		
发明人	胥传来 袁媛 彭池方 尹丽梅 陈伟		
IPC分类号	C07K14/765 G01N33/531 G01N33/536 C07J5/00		
其他公开文献	CN101161679B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种地赛米松人工抗原的制备方法，属于生物化工领域。本发明以地赛米松为原料，利用丁二酸酐与地赛米松反应生成地赛米松琥珀酸半酯，得到人工半抗原；利用活性酯法使半抗原转变为活性酯中间体，然后使之与牛血清蛋白结合，制备地赛米松的人工抗原即地赛米松-牛血清蛋白。本发明合成了地赛米松的人工抗原，所制备的产品可用于糖皮质激素类免疫方法的研究，合成步骤简洁，有效，完全可用于免疫分析中，为以后人们的研究提供了方便的途径，可以满足国内对其研究的需要。

