

[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 200710135244.0

[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 101161681A

[22] 申请日 2007.11.1

[21] 申请号 200710135244.0

[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 李秋生
谢会玲

[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

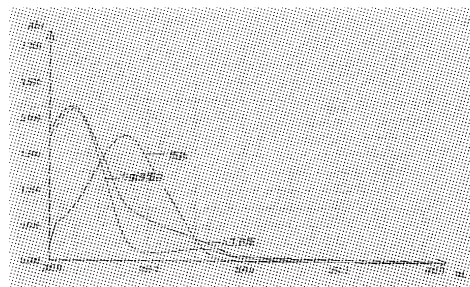
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

[54] 发明名称

一种双氟米松人工抗原的制备方法

[57] 摘要

一种双氟米松人工抗原的制备方法，属于生物化工领域。本发明是以双氟米松为原料，利用丁二酸酐与双氟米松反应生成双氟米松琥珀酸半酯，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，制备双氟米松的人工抗原即双氟米松-牛血清蛋白。本发明合成了双氟米松的人工抗原，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当中，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。



1.一种双氟米松人工抗原的制备方法,其特征是以双氟米松为原料,利用丁二酸酐与双氟米松反应生成双氟米松琥珀酸半酯,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,制备双氟米松的人工抗原即双氟米松-牛血清蛋白;步骤为:

(1)人工半抗原的制备:

双氟米松和丁二酸酐配料摩尔比为1:3,称取双氟米松0.4mmol和丁二酸酐1.2mmol置于50mL圆底烧瓶中,加入2.5mL无水吡啶,在60℃下加热搅拌6h,将反应物转入10mL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,干燥箱干燥后得到双氟米松半抗原,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pH8.0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pH8.0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:双氟米松-牛血清蛋白。

一种双氟米松人工抗原的制备方法

技术领域

一种双氟米松人工抗原的制备方法，属于生物化工领域。

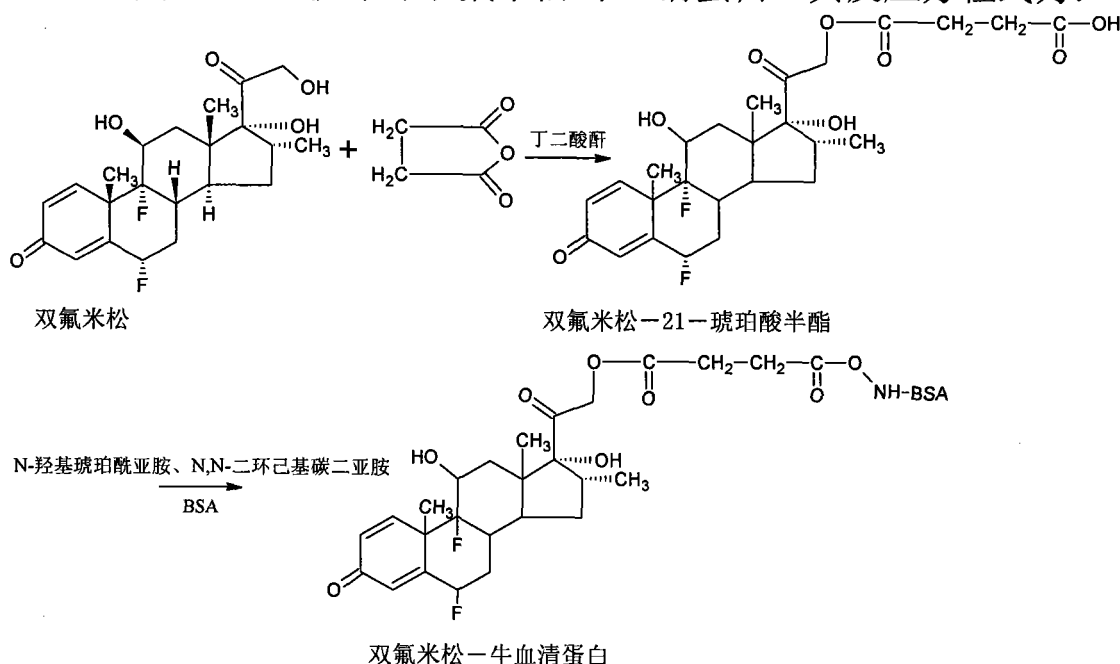
背景技术

双氟米松(Flumethasone,FLM)属人工合成类糖皮质激素，化学名称为6 α ,9 α -双氟孕甾-16 α -甲基-11 β , 17 α , 21-三羟基-1, 4-二烯-3, 20二酮。具有抗过敏、抗炎的作用，其具有蓄积毒性，许多国家将此药物列入禁用药物名单，尤其是牛肉制品及牛奶中不得检出。当今国际上常用的双氟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双氟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，有必要展开对双氟米松免疫分析方法的研究，有必要提供一种有效的双氟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双氟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：一种双氟米松人工抗原的制备方法，以双氟米松为原料，利用丁二酸酐与双氟米松反应生成双氟米松琥珀酸半酯，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，制备双氟米松的人工抗原即双氟米松-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：

双氟米松和丁二酸酐配料摩尔比为 1 : 3，称取双氟米松 0.4mmol 和丁二酸酐 1.2mmol 置于 50mL 圆底烧瓶中，加入 2.5mL 无水吡啶，在 60℃ 下加热搅拌 6h，将反应物转入 10mL 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，干燥箱干燥后得到双氟米松半抗原，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 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 0.09mmol 半抗原，0.09mmol N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)，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；

磷酸盐缓冲液 (PBS)：配制 0.2mol/L 磷酸氢二钠溶液：磷酸氢二钠 71.64g 加水至 1000mL。配制 0.2mol/L 的磷酸二氢钠溶液：磷酸二氢钠 35.61g 加水至 1000mL。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 pH8.0 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 \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：双氟米松-牛血清蛋白。

(3) 双氟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 3.20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

偶联比测定：配制双氟米松浓度为 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 20%乙醇溶液，通过紫外扫描可知双氟米松的最大吸收波长为 241nm。

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 241nm 处测吸光值，以去离子水为空白，测出吸光值。将 FLM,FLM-BAS, 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：

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

本发明计算得交联率约为 17。

本发明的有益效果：本发明合成了双氟米松的人工抗原，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当中，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 双氟米松人工半抗原的液相色谱图。

图2 双氟米松人工半抗原的质谱图。

图3 双氟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 0.16g 双氟米松和 0.12g 丁二酸酐于 50mL 圆底烧瓶中，加入 2.5mL 无水吡啶，混合物在 60℃下加热搅拌 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 3/4 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 45.93mg (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。

磷酸盐缓冲液: 0.2mol/L 磷酸氢二钠液: 磷酸氢二钠 71.64g 加水至 1000mL。配 0.2mol/L 的磷酸二氢钠液: 磷酸二氢钠 35.61g 加水至 1000mL。将 94.7mL 的磷酸氢二钠液与 5.3mL 的磷酸二氢钠液混合即为 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，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，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：双氟米松-牛血清蛋白。

(3) 双氟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。本实验计算得抗原溶液的蛋白浓度为 3.20mg \cdot mL⁻¹。

偶联比测定：配制双氟米松浓度为 50 μ g \cdot mL⁻¹ 的 20% 乙醇溶液，通过紫外扫

描可知双氟米松的最大吸收波长为 241nm。

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 241nm 处测吸光值，以去离子水为空白，测出吸光值。将 FLM,FLM-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：

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

本发明计算得交联率约为 17。

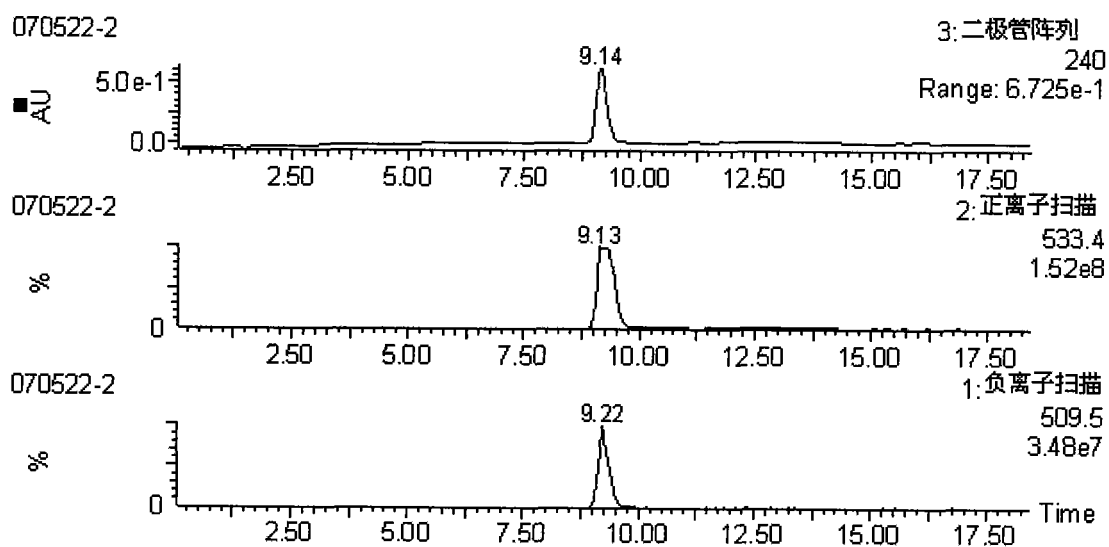


图 1

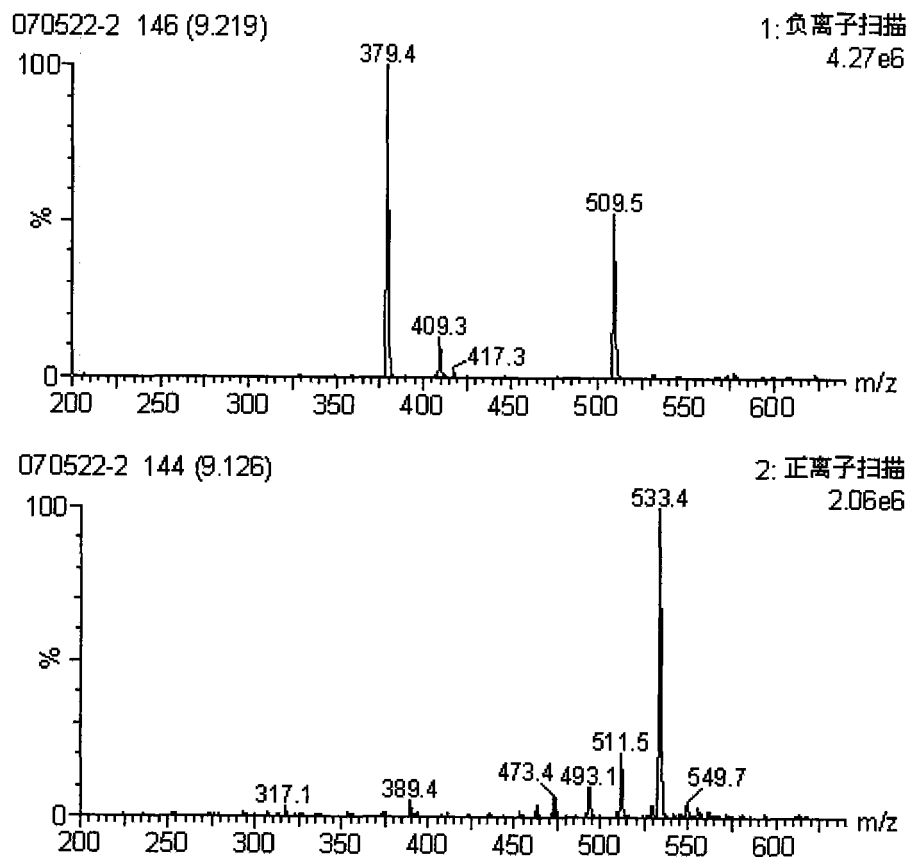


图 2

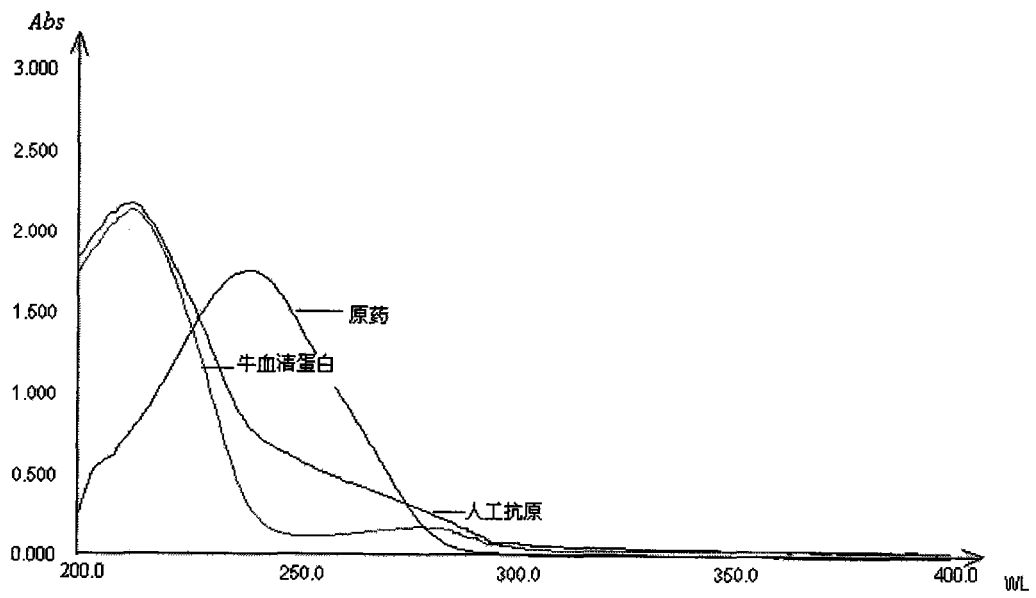


图 3

专利名称(译)	一种双氟米松人工抗原的制备方法		
公开(公告)号	CN101161681A	公开(公告)日	2008-04-16
申请号	CN200710135244.0	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 李秋生 谢会玲		
发明人	胥传来 袁媛 彭池方 李秋生 谢会玲		
IPC分类号	C07K14/765 G01N33/531 G01N33/536 C07J5/00		
其他公开文献	CN101161681B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种双氟米松人工抗原的制备方法，属于生物化工领域。本发明是以双氟米松为原料，利用丁二酸酐与双氟米松反应生成双氟米松琥珀酸半酯，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，制备双氟米松的人工抗原即双氟米松-牛血清蛋白。本发明合成了双氟米松的人工抗原，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当中，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。

