

[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 200710051936.7

[51] Int. Cl.
C07K 1/10 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/536 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 10 月 29 日

[11] 公开号 CN 101293912A

[22] 申请日 2007.4.23

[21] 申请号 200710051936.7

[71] 申请人 陈福生

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街 1 号

[72] 发明人 陈福生 周有祥 吴佳佳 余 伟
徐 莺

权利要求书 3 页 说明书 7 页 附图 2 页

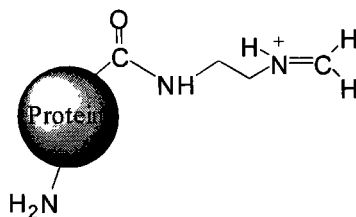
[54] 发明名称

一步法构建阳离子化载体蛋白与黄曲霉毒素 B₁ 的偶联物

[57] 摘要

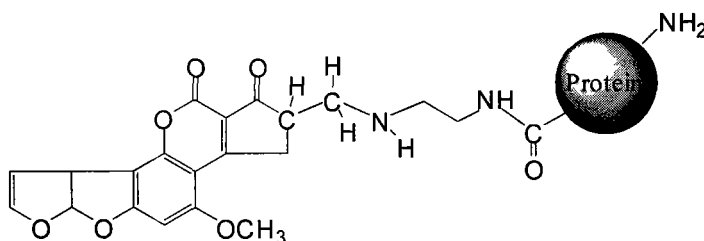
本发明根据胺甲基化反应反应原理，利用黄曲霉毒素 B₁ 结构中羰基碳的 α - 活泼氢，以甲醛为偶联剂，与阳离子蛋白中的胺乙基发生缩合反应，一步法构建黄曲霉毒素 B₁ - 阳离子载体蛋白偶联物。该法较之目前采用先将黄曲霉毒素 B₁ 衍生转化为羧基活化物后，再与载体蛋白缩合偶联的两步法，具有步骤少、操作简单、利用率高的优点。

1. 阳离子蛋白，其特征在于结构式：



其中，载体蛋白的羧基几乎全部被胺乙基取代，整个蛋白带正电，因而作为完全抗原免疫动物时，阳离子载体蛋白更易与机体内带弱负电的细胞膜表面结合，进而被抗原提呈细胞识别和刺激机体内的免疫应答。

2. AFB₁-阳离子蛋白偶联物，其特征在于它的分子结构式为：



其中，载体蛋白可以是阳离子牛血清白蛋白（Cationized bovine serum albumin, cBSA）、阳离子卵清白蛋白（Cationized ovalbumin, cOVA）、阳离子辣根过氧化物酶（Cationized horseradish peroxidase, cHRP）、阳离子血孔匙蛋白（Cationized keyhole limpet hemocyanin, cKLH）或阳离子多聚赖氨酸（Cationized poly-L-lysine, cPLL），分别与 AFB₁ 结合得到 AFB₁-cBSA、AFB₁-cOVA、AFB₁-cHRP、AFB₁-cKLH 和 AFB₁-cPLL。

3. 制备权利要求 1 所述一种阳离子载体蛋白的方法，其特征在于包括步骤：

（1）制备 cBSA，步骤如下：

将 20~100 μ L 乙二胺（ethylenediamine, EDA）加入到冰浴的 500 μ L 0.1mol/L 2-乙烷磺酸（2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid, MES）缓冲液中，并用 1mol/L HCl 将 pH 调节到 4~6，然后，将 5~100mg BSA 溶解在 50 μ L 的上述 MES 缓冲液后，与上述 EDA 溶液混匀，再在上述混合液中添加 2~50mg 的碳化亚二胺（1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide, EDC），室温搅拌 1~12h，用 4mol/L 的醋酸终止反应，用去离子水充分透析 48~72h 后，将其冻藏备用。

（2）制备 cOVA，步骤如下：

将 20~100 μ L EDA 加入到冰浴的 500 μ L 0.1mol/L MES 缓冲液中,并用 1mol/L HCl 将 pH 调节到 4~6,然后,将 5~100mg OVA 溶解在 100 μ L 的上述 MES 缓冲液后,与上述 EDA 溶液混匀,再在上述混合液中添加 2~50mg 的 EDC,室温搅拌 1~12h,用 4mol/L 的醋酸终止反应,用去离子水充分透析 48~72h 后,将其冻藏备用。

(3) 制备 cHRP, 步骤如下:

将 20~100 μ L EDA 加入到冰浴的 500 μ L 0.1mol/L MES 缓冲液中,并用 1mol/L HCl 将 pH 调节到 4~6,然后,将 5~100mg HRP 溶解在 500 μ L 的上述 MES 缓冲液后,与上述 EDA 溶液混匀,再在上述混合液中添加 2~50mg 的 EDC,室温搅拌 1~12h,用 4mol/L 的醋酸终止反应,用去离子水充分透析 48~72h 后,冻藏备用。

(4) 制备 cKLH, 步骤如下:

将 20~100 μ L EDA 加入到冰浴的 500 μ L 0.1mol/L MES 缓冲液中,并用 1mol/L HCl 将 pH 调节到 4~6,再将 5~100mg KLH 溶解于 800 μ L 的上述 MES 缓冲液后,与上述 EDA 溶液混匀,再在上述混合液中添加 2~50mg 的 EDC,室温搅拌 1~12h 后,用 4mol/L 的醋酸终止反应,用去离子水充分透析 48~72h 后,冻藏备用。

(5) 制备 cPLL, 步骤如下:

将 20~100 μ L EDA 加入到冰浴的 500 μ L 0.1mol/L MES 缓冲液中,并用 1mol/L HCl 将 pH 调节到 4~6,再将 5~100mg PLL 溶解于 1000 μ L 的上述 MES 缓冲液,然后,与上述 EDA 溶液混匀,再在上述混合液中添加 2~50mg 的 EDC,室温搅拌 1~12h 后,用 4mol/L 的醋酸终止反应,最后用去离子水充分透析 48~72h,冻藏备用。

所用 EDA 体积在 20 μ L ~100 μ L 之间,所用的载体蛋白质量在 5mg~100mg 之间,EDA 与 MES 的体积比在 1:25~1:5 之间, MES 缓冲液的 pH 调节到 4~6。

4. 如权利要求 2 所述一种 AFB₁-阳离子载体蛋白偶联物的制备方法,其特征在于 AFB₁ 上羰基的 α -活泼氢能够在甲醛的偶联作用下与阳离子蛋白的胺乙基反应,得到 AFB₁-阳离子载体蛋白的偶联物,能够制备包括免疫抗原、包被抗原和酶标记物在内的 AFB₁-阳离子蛋白偶联物,得到 AFB₁ 完全抗原。

5. 如权利要求 2 所述一种 AFB₁-阳离子载体蛋白偶联物的制备方法,其特征是偶联剂甲醛。

6. 根据权利要求 4 所述的方法,其特征在于包括步骤:

(1) AFB₁-cBSA 的制备,步骤如下:将 5~100mg cBSA 与 1~50mg AFB₁ 分别用 500~10000 μ L 去离子水和 50~1000 μ L 二甲基甲酰胺溶解,再将 AFB₁ 溶液逐滴加入到上述

蛋白质溶液中，混匀后，迅速加入 50~1000 μ L 甲醛，37 $^{\circ}$ C下轻摇 24h，充分反应后即得到 AFB₁-cBSA，用去离子水充分透析 48h 后，冻干备用。

(2) AFB₁-cOVA 的制备，步骤如下：将 5~100mg 的 cOVA 与 1~50mg AFB₁ 分别用 500~10000 μ L 去离子水和 50~1000 μ L 二甲基甲酰胺溶解，再将 AFB₁ 溶液逐滴加入到上述蛋白质溶液中，混匀后，迅速加入 50~1000 μ L 甲醛，37 $^{\circ}$ C下轻摇 24h，充分反应后即得到 AFB₁-cOVA，接着用去离子水充分透析 48h 后，冻干备用。

(3) AFB₁-cHRP 的制备，步骤如下：将 5~100mg 的 cHRP 与 1~50mg AFB₁ 分别用 500~10000 μ L 去离子水和 500 μ L 二甲基甲酰胺溶解，再将 AFB₁ 溶液逐滴加入到上述蛋白质溶液中，混匀后，迅速加入 50~1000 μ L 甲醛，37 $^{\circ}$ C下轻摇 24h，充分反应后即得到 AFB₁-cHRP，接着用去离子水充分透析 48h 后，冻干备用。

(4) AFB₁-cKLH 的制备，步骤如下：将 5~100mg 的 cKLH 与 1~50mg AFB₁ 分别用 500~10000 μ L 去离子水和 50~1000 μ L 二甲基甲酰胺溶解，再将 AFB₁ 溶液逐滴加入到上述蛋白质溶液中，混匀后，迅速加入 50~1000 μ L 甲醛，37 $^{\circ}$ C下轻摇 24h，充分反应后即得到 AFB₁-cKLH，接着用去离子水充分透析 48h 后，冻干备用。

(5) AFB₁-cPLL 的制备，步骤如下：将 5~100mg 的 cPLL 与 1~50mg AFB₁ 分别用 500~10000 μ L 去离子水和 50~1000 μ L 二甲基甲酰胺溶解，再将上述 AFB₁ 溶液逐滴加入到上述蛋白质溶液中，混匀后，迅速加入 50~1000 μ L 甲醛，37 $^{\circ}$ C下轻摇 24h，充分反应后即得到 AFB₁-cPLL，接着用去离子水充分透析 48h 后，冻干备用。

其中，阳离子载体蛋白与 AFB₁ 的质量比例在 1:1~5:1 之间，二甲基甲酰胺和甲醛的体积比在 1:1~5:1 之间。

一步法构建阳离子化载体蛋白与黄曲霉毒素 B₁ 的偶联物

技术领域

本发明涉及阳离子载体蛋白的制备及黄曲霉毒素 B₁-阳离子蛋白偶联物的一步法构建。将构建的偶联物作为免疫原免疫动物，可提高机体的免疫应答水平，制备高质量的抗黄曲霉毒素 B₁ 抗体。

背景技术

黄曲霉毒素 (Aflatoxin, AFT) 是一类主要由寄生曲霉 (*Aspergillus parasiticus*) 和产毒的黄曲霉 (*A. flavus*) 所产生的有毒次生代谢产物，其中以黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁) 的危害最大，是目前已知的毒性最大的致癌物之一。国际癌症研究机构已将其列为 I 级致癌物。由于 AFB₁ 污染食品的途径很多，因此要完全杜绝 AFB₁ 的污染是不可能的，完善监督措施和采用科学检测方法可以在最大程度上减少 AFB₁ 对人类健康的危害。目前 AFB₁ 的检测方法主要有基于理化和免疫的分析方法，前者包括薄层层析法、高效液相色谱、质谱和毛细管电泳等，薄层层析法作为我国目前检测 AFB₁ 国标方法，虽然操作简便，成本低廉，但由于是半定量方法，灵敏度低，已经难以满足低检测限的需要；而其他仪器分析方法虽然灵敏度高、重现性好，但同时存在着耗时、检测仪器昂贵、操作复杂等缺点，不能满足现场快速检测的需求；而酶联免疫吸附反应、免疫微柱以及免疫芯片等免疫学检测方法由于节省时间、成本低、操作简便，适合批量检测和现场检测，正逐步受到我国各质检相关部门的重视。

AFB₁ 作为半抗原，需将其与载体蛋白偶联后，才能具备刺激动物产生抗体的免疫原性。但由于完全抗原制备过程复杂，AFB₁ 利用率低，因此常常需要使用较大量的 AFB₁ 才能制备得到相应的抗体；然而，“9.11”事件后，AFB₁ 作为一种剧毒的生物试剂被美国等发达国家严格控制。市场上该毒素标准品不仅价格高而且难以买到，这给研究 AFB₁ 的免疫学检测方法带来很大困难，也在一定程度上阻碍了免疫学方法的应用和推广。

早期研究认为 AFB₁ 本身性质不活泼，不具备与载体蛋白连接的活性基团，需将其衍生后，再与载体蛋白偶联，即先将 AFB₁ 转化为 AFB₁-羧基活化物 (AFB₁-Oxime, AFB₁-O)，然后，在碳化二亚胺 (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide, EDC) 等偶联剂的催化下，与载体蛋白发生缩合反应，形成稳定的 AFB₁-O-载体蛋白偶联物。其中，第一步 AFB₁ 的转化率为 70%~80%，AFB₁-O 的纯化得率为 80%~90%，而第二步，仅有 30%~40% 的 AFB₁-O 偶联到载体蛋白上。因此，AFB₁ 的总利用率在 20% 左右，利用率较低。

综合上述原因, 研究提高 AFB₁ 利用率的偶联物制备方法是非常必要的。

本发明利用了阳离子载体蛋白胺甲基化原理构建了 AFB₁-阳离子载体蛋白的偶联物。在 AFB₁ 的结构中, 由于其羰基的 α -活泼氢在弱酸条件下, 以烯醇式存在, 可通过甲醛的偶联作用, 与载体蛋白的胺乙基发生胺甲基化偶联。由于阳离子载体蛋白的羧基几乎全部被胺乙基取代, 因而整个蛋白带正电, 作为完全抗原免疫动物时, 较之普通蛋白的偶联物, 阳离子载体蛋白更易与机体内带弱负电的细胞膜表面结合, 进而被抗原提呈细胞识别和刺激机体内的免疫应答, 同时, 也提高了机体对共价偶联在阳离子载体蛋白半抗原 (AFB₁) 的识别和应答水平, 即可刺激抗原提呈细胞对半抗原决定簇的提呈、促进 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的增殖。

本发明中 AFB₁ 的总利用率在 50%左右。实验证明, 通过该法制备的偶联物具有较好的免疫原性, 能够刺激机体产生高质量的 AFB₁ 抗体。因此, 本发明相对于传统合成方法, 有操作步骤少、毒素利用率高、抗体效价高等优点。

本专利发明者针对两步法存在的诸多问题, 发明了用阳离子载体蛋白一步构建黄曲霉毒素 B₁-载体蛋白偶联物的方法。相关研究国内外尚未见报道。

主要参考文献

- [1] Apple, R.J., Domen, P.L., Muckerheide, A. and Michael, J.G. (1988) Cationization of protein antigens. IV. Increased antigen uptake by antigen-presenting cells. *J Immunol* 140, 3290-5.
- [2] Barbiroli, A., Bonomi, F., Benedetti, S., Mannino, S., Monti, L., Cattaneo, T. and Iametti, S. (2007) Binding of aflatoxin M1 to different protein fractions in ovine and caprine milk. *J Dairy Sci* 90, 532-40.
- [3] Chu, F.S., Lau, H.P., Fan, T.S. and Zhang, G.S. (1982) Ethylenediamine modified bovine serum albumin as protein carrier in the production of antibody against mycotoxins. *J Immunol Methods* 55, 73-8.
- [4] Domen, P.L., Muckerheide, A. and Michael, J.G. (1987) Cationization of protein antigens. III. Abrogation of oral tolerance. *J Immunol* 139, 3195-8.
- [5] Fusheng, C., Xinchang Luo, Qi Zhou. (1999) Immunological detection of aflatoxin B1 I : preparation of aflatoxin B1 antigen. *Mycosystema* 18, 316~320. (in Chinese)
- [6] Gathumbi, J.K., Usleber, E., Ngatia, T.A., Kangethe, E.K. and Martlbauer, E. (2003) Application of immunoaffinity chromatography and enzyme immunoassay in rapid detection of aflatoxin B1 in chicken liver tissues. *Poult Sci* 82, 585-90.
- [7] Jaimez, J., Fente, C.A., Vazquez, B.I., Franco, C.M., Cepeda, A., Mahuzier, G. and Prognon, P. (2000) Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. *Journal of Chromatography A* 882, 1-10.
- [8] Muckerheide, A., Apple, R.J., Pesce, A.J. and Michael, J.G. (1987a) Cationization of protein antigens. I. Alteration of immunogenic properties. *J Immunol* 138, 833-7.
- [9] Muckerheide, A., Domen, P.L. and Michael, J.G. (1987b) Cationization of protein antigens. II. Alteration of regulatory properties. *J Immunol* 138, 2800-4.

- [10] Ramos Catharino, R., de Azevedo Marques, L., Silva Santos, L., Baptista, A.S., Gloria, E.M., Calori-Domingues, M.A., Facco, E.M. and Eberlin, M.N. (2005) Aflatoxin screening by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* 77, 8155-7.
- [11] Saha, D., Acharya, D., Roy, D., Shrestha, D. and Dhar, T.K. (2007) Simultaneous enzyme immunoassay for the screening of aflatoxin B1 and ochratoxin A in chili samples. *Anal Chim Acta* 584, 343-9.
- [12] Sapsford, K.E., Taitt, C.R., Fertig, S., Moore, M.H., Lassman, M.E., Maragos, C.M. and Shriver-Lake, L.C. (2006) Indirect competitive immunoassay for detection of aflatoxin B1 in corn and nut products using the array biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 21, 2298-2305.

发明内容

(一) 要解决的技术问题

本发明的目的是提供一种一步构建 AFB₁-载体蛋白偶联物的方法。

(二) 技术方案

为达到上述目的，本发明采用的技术方案是：

烯醇或者含 α -活泼氢的羰基化合物，在偶联剂甲醛的作用下，能与伯胺或仲胺进行偶联。

根据该原理，AFB₁上羰基的 α -活泼氢就能够在甲醛的偶联作用下与含有胺乙基的阳离子蛋白反应，得到 AFB₁-阳离子蛋白的偶联物。阳离子化蛋白相对于简单蛋白而言，具有较多的胺乙基，因而整个蛋白带正电，作为完全抗原免疫动物时，较之普通蛋白的偶联物，阳离子载体蛋白更易与机体内带弱负电的细胞膜表面结合，进而被抗原提呈细胞识别和刺激机体内的免疫应答。

具体步骤：

1. 阳离子蛋白的制备

载体蛋白包括：牛血清白蛋白（Bovine serum albumin, BSA）、卵清白蛋白（Ovalbumin, OVA）、辣根过氧化物酶（Horseradish peroxidase, HRP）、血孔匙蛋白（Keyhole limpet hemocyanin, KLH）和多聚赖氨酸（Ploy-l-lysine, PLL）。

制备步骤：

(1) 将乙二胺（ethylenediamine, EDA）加入到冰浴中的 2-乙烷磺酸基（2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid, MES）缓冲液中，并用 HCl 调节 pH 至弱酸性；

(2) 将载体蛋白溶于 MES 后，与上述 EDA 溶液混匀；

(3) 滴加偶联剂 EDC 于 (2) 所述溶液中，室温反应后，用醋酸终止反应；

(4) 将上述反应物用去离子水充分透析；

(5) 将其冻干后，冻干备用。

所用 EDA 体积在 20 μ L~100 μ L 之间,所用的载体蛋白质量在 5mg~100mg 之间,EDA 与 MES 的体积比在 1:25~1:5 之间, MES 缓冲液的 pH 调节到 4~6。

制备得到阳离子牛血清白蛋白 (Cationized bovine serum albumin, cBSA)、阳离子卵清白蛋白 (Cationized ovalbumin, cOVA)、阳离子辣根过氧化物酶 (Cationized horseradish peroxidase, cHRP)、阳离子血孔匙蛋白 (Cationized keyhole limpet hemocyanin, cKLH) 或阳离子多聚赖氨酸 (Cationized ploy-l-lysine, cPLL)。

2. AFB₁-阳离子载体蛋白偶联物的制备

AFB₁-阳离子载体蛋白偶联物包括 AFB₁-cBSA、AFB₁-cOVA、AFB₁-cHRP、AFB₁-cKLH 和 AFB₁-cPLL。

制备步骤:

(1) 将阳离子载体蛋白和 AFB₁ 分别用去离子水和二甲基甲酰胺溶解后,将 AFB₁ 溶液逐滴加入到载体蛋白液中混匀;

(2) 在上述反应液中加入偶联剂甲醛,反应后即得到 AFB₁-阳离子载体蛋白偶联物;

(3) 用去离子水充分透析后,冻干备用。

其中,阳离子载体蛋白与 AFB₁ 的质量比例在 1:1~5:1 之间,二甲基甲酰胺和甲醛的体积比在 1:1~5:1 之间。

(三) 有益效果

本发明以 AFB₁ 为半抗原,利用阳离子蛋白一步法合成 AFB₁-载体蛋白偶联物,该法具有步骤简单、AFB₁ 利用率高等优点,避免了目前所用两步法步骤多、利用率低等缺点。

附图说明

下面结合附图和实施例对本发明专利进一步说明。

图 1 AFB₁ 的结构

图 2 载体蛋白的阳离子化

图 3 AFB₁ 与阳离子载体蛋白的偶联机理

① AFB₁ 在弱酸性缓冲液中的烯醇化;

② 阳离子载体蛋白中亚胺离子的形成;

③ 阳离子载体蛋白中的亚胺离子在甲醛作用下,与烯醇化 AFB₁ 偶联

具体实施方式

实施例1 AFB₁-cBSA 偶联物的制备

1.1 cBSA 的制备:

将 50~100 μ L EDA 加入到 500 μ L 冰浴 MES 缓冲液中,并用 HCl 将 pH 调节到 5.5 左右,再将 5~100mg BSA 溶解于 50 μ L 的 MES 缓冲液,然后,与上述 EDA 溶液混匀,再在上述混合液中添加 2~50mg 的 EDC,室温搅拌 1~12h 后,用醋酸终止反应,最后用去离子水充分透析 48~72h,冻干备用。

1.2 AFB₁-cBSA 偶联物的制备:

将 5~100mg 的 cBSA 与 2mg AFB₁ 分别用 500~10000 μ L 去离子水和 50~1000 μ L 二甲基甲酰胺溶解后,再将上述 AFB₁ 溶液逐滴加入到上述蛋白质溶液中混匀,然后迅速加入 50~1000 μ L 甲醛,37 $^{\circ}$ C 下轻摇 24h,用去离子水充分透析 48h 后,冻干备用。

实施例2 AFB₁-cOVA 偶联物的的制备

2.1 cOVA 的制备:

将 50~100 μ L EDA 加入到 500 μ L 冰浴 MES 缓冲液中,并用 HCl 将 pH 调节到 5.5 左右,再将 5~100mg OVA 溶解于 100 μ L 的上述缓冲液,然后,与上述 EDA 溶液混匀,再在上述混合液中添加 2~50mg 的 EDC,室温搅拌 1~12h 后,用醋酸终止反应,最后用去离子水充分透析 48~72h,冻干备用。

2.2 AFB₁-cOVA 偶联物的制备:

将 5~100mg 的 cOVA 与 1~50mg AFB₁ 分别用 500~10000 μ L 去离子水和 50~1000 μ L 二甲基甲酰胺溶解后,再将上述 AFB₁ 溶液逐滴加入到上述蛋白质溶液中混匀,然后迅速加入 50~1000 μ L 甲醛,37 $^{\circ}$ C 下轻摇 24h,用去离子水充分透析 48h 后,冻干备用。

实施例3 AFB₁-cHRP 偶联物的制备

3.1 cHRP 的制备:

将 50~100 μ L EDA 加入到冰浴的 500 μ L MES 缓冲液中,并用 HCl 将 pH 调节到 5.5 左右,再将 5~100mg HRP 溶解于 500 μ L 的上述 MES 缓冲液,然后,与上述 EDA 溶液混匀,再在上述混合液中添加 2~50mg 的 EDC,室温搅拌 1~12h 后,用醋酸终止反应,最后用去离子水充分透析 48~72h,冻干备用。

3.2 AFB₁-cHRP 偶联物的制备:

将 5~100mg 的 cHRP 与 1~50mg AFB₁ 分别用 500~10000 μ L 去离子水和 50~1000 μ L 二甲基甲酰胺溶解后, 再将上述 AFB₁ 溶液逐滴加入到上述蛋白质溶液中混匀后, 迅速加入 50~1000 μ L 甲醛, 37 $^{\circ}$ C 下轻摇 24h, 用去离子水充分透析 48h 后, 冻干备用。

实施例 4 AFB₁-cKLH 偶联物的制备

4.1 cKLH 的制备:

将 50~100 μ L EDA 加入到冰浴的 500 μ L MES 缓冲液中, 并用 HCl 将 pH 调节到 5.5 左右, 再将 5~100mg KLH 溶解于 800 μ L 的上述 MES 缓冲液, 然后, 与上述 EDA 溶液混匀, 再在上述混合液中添加 2~50mg 的 EDC, 室温搅拌 1~12h 后, 用醋酸终止反应, 最后用去离子水充分透析 48~72h, 冻干备用。

4.2 AFB₁-cKLH 偶联物的制备:

将 5~100mg 的 cKLH 与 1~50mg AFB₁ 分别用 500~10000 μ L 去离子水和 50~1000 μ L 二甲基甲酰胺溶解后, 再将上述 AFB₁ 溶液逐滴加入到上述蛋白质溶液中混匀, 然后迅速加入 50~1000 μ L 甲醛, 37 $^{\circ}$ C 下轻摇 24h, 用去离子水充分透析 48h 后, 冻干备用。

实施例 5 AFB₁-cPLL 偶联物的制备

5.1 cPLL 的制备:

将 50~100 μ L EDA 加入到冰浴的 500 μ L MES 缓冲液中, 并用 HCl 将 pH 调节到 5.5 左右, 再将 5~100mg PLL 溶解于 1000 μ L 的上述 MES 缓冲液, 然后, 与上述 EDA 溶液混匀, 再在上述混合液中添加 2~50mg 的 EDC, 室温搅拌 1~12h 后, 用醋酸终止反应, 最后用去离子水充分透析 48~72h, 冻干备用。

5.2 AFB₁-cPLL 偶联物的制备:

将 5~100mg 的 cPLL 与 1~50mg AFB₁ 分别用 500~10000 μ L 去离子水和 50~1000 μ L 二甲基甲酰胺溶解后, 再将上述 AFB₁ 溶液逐滴加入到上述蛋白质溶液中混匀, 然后迅速加入 50~1000 μ L 甲醛, 37 $^{\circ}$ C 下轻摇 24h, 用去离子水充分透析 48h 后, 冻干备用。

上述所用 MES 缓冲液浓度均为 0.1mol/L, HCl 均为 1mol/L, 醋酸均为 4mol/L。

AFB₁-阳离子蛋白偶联物的鉴定:

采用紫外分光光度计对阳离子载体蛋白、AFB₁ 标品及偶联物进行扫描, 根据其特征吸收峰来确定偶联是否成功。

结果显示, AFB₁-阳离子载体蛋白偶联物在 270nm 和 366nm 有两个主要的吸收峰, 前一个吸收峰是载体蛋白 (280nm) 和 AFB₁ (266nm) 的叠加峰, 而后者是 AFB₁ 的另一特征吸收峰 (363nm)。根据偶联比公式, 结合紫外图谱上吸收峰波长及吸光度, 可以计算出 AFB₁ 与阳离子蛋白的偶联比。

$$\text{公式: } \frac{M_{AFB_1}}{M_{\text{载体蛋白}}} = \frac{A_{\text{偶联物} \cdot 366nm} / \epsilon_{AFB_1 \cdot 366nm}}{(A_{\text{偶联物} \cdot 278nm} - A_{\text{偶联物} \cdot 366nm} \times \epsilon_{AFB_1 \cdot 278nm} / \epsilon_{AFB_1 \cdot 366nm}) / \epsilon_{\text{载体蛋白} \cdot 278nm}}$$

其中: M_{AFB_1} : 偶联物中 AFB₁ 的摩尔质量;

$M_{\text{载体蛋白}}$: 偶联物中载体蛋白的摩尔质量;

$A_{\text{偶联物} \cdot 278nm}$: 偶联物在 278nm 处的吸光度;

$A_{\text{偶联物} \cdot 366nm}$: 偶联物在 366nm 处的吸光度;

$\epsilon_{AFB_1 \cdot 278nm}$: AFB₁ 在 278nm 处的摩尔吸光系数;

$\epsilon_{AFB_1 \cdot 366nm}$: AFB₁ 在 366nm 处的摩尔吸光系数;

$\epsilon_{\text{载体蛋白} \cdot 278nm}$: 载体蛋白在 278nm 处的摩尔吸光系数

经过计算, AFB₁ 与阳离子蛋白的偶联比在 6.1 左右, 证明了成功制备 AFB₁-阳离子蛋白偶联物。

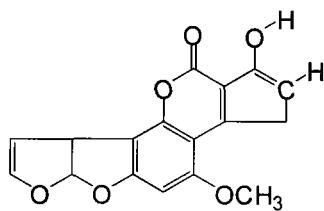


图 1

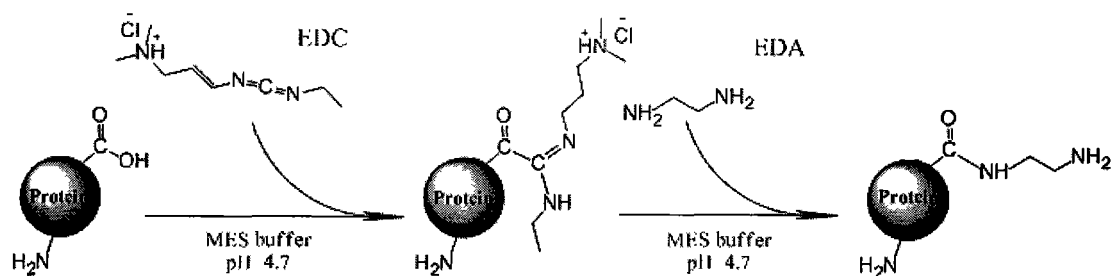
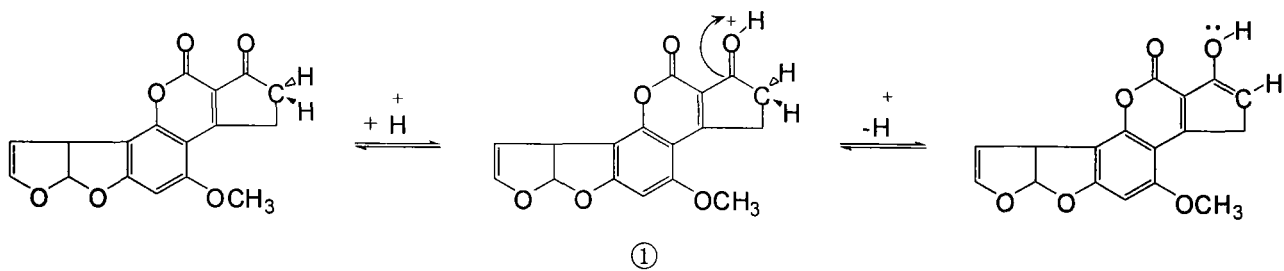
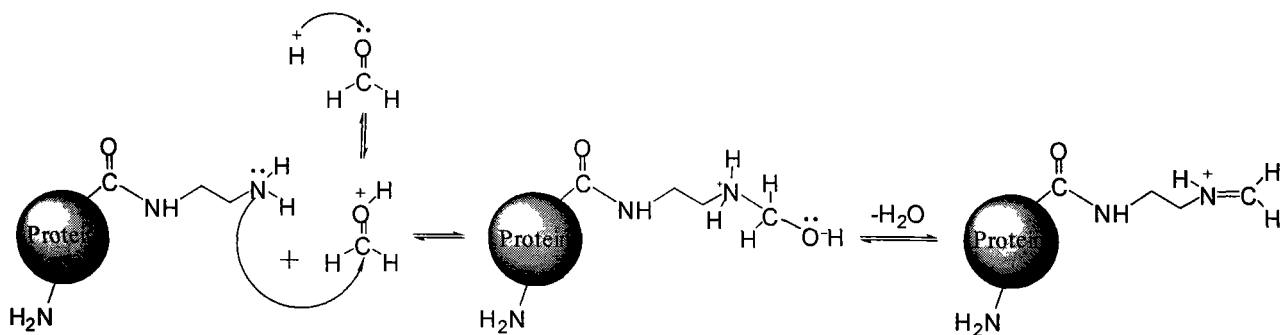


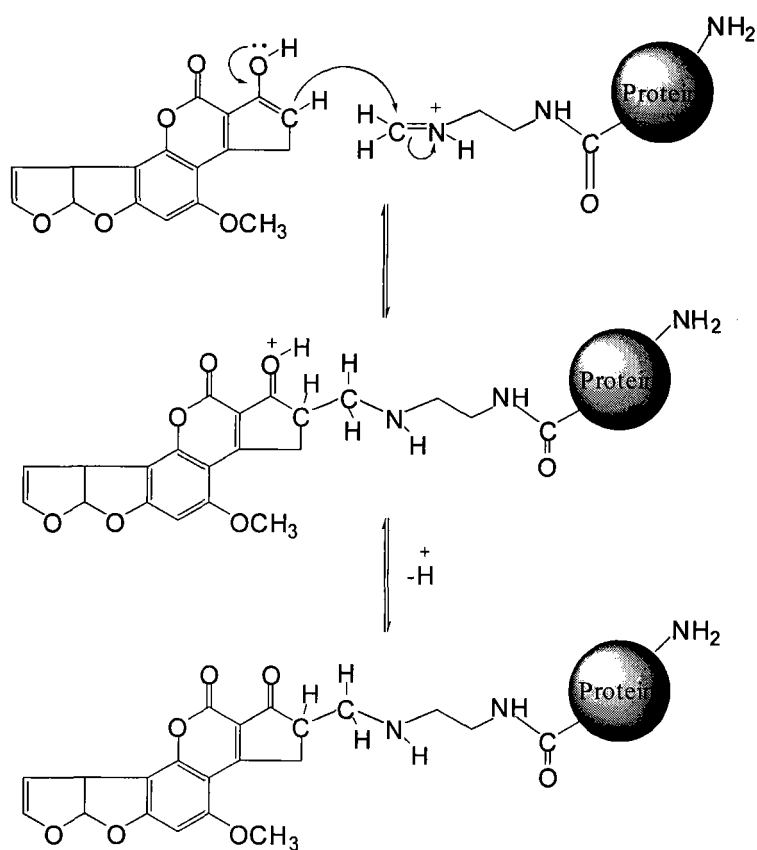
图 2



①



②



③
图 3

专利名称(译)	一步法构建阳离子化载体蛋白与黄曲霉毒素B1的偶联物		
公开(公告)号	CN101293912A	公开(公告)日	2008-10-29
申请号	CN200710051936.7	申请日	2007-04-23
[标]申请(专利权)人(译)	陈福生		
申请(专利权)人(译)	陈福生		
当前申请(专利权)人(译)	陈福生		
[标]发明人	陈福生 周有祥 吴佳佳 余伟 徐莺		
发明人	陈福生 周有祥 吴佳佳 余伟 徐莺		
IPC分类号	C07K1/10 C07K16/18 G01N33/536		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明根据胺甲基化反应反应原理，利用黄曲霉毒素B1结构中羰基碳的 α -活泼氢，以甲醛为偶联剂，与阳离子蛋白中的胺乙基发生缩合反应，一步法构建黄曲霉毒素B1-阳离子载体蛋白偶联物。该法较之目前采用先将黄曲霉毒素B1衍生转化为羧基活化物后，再与载体蛋白缩合偶联的两步法，具有步骤少、操作简单、利用率高的优点。

