

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 14/765 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810234130.6

[43] 公开日 2009年4月8日

[11] 公开号 CN 101402683A

[22] 申请日 2008.11.3

[21] 申请号 200810234130.6

[71] 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道1800号
江南大学食品学院

[72] 发明人 胥传来 孙凤霞 刘丽强 彭池方
徐丽广 谢会玲 袁媛 尹丽梅

[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

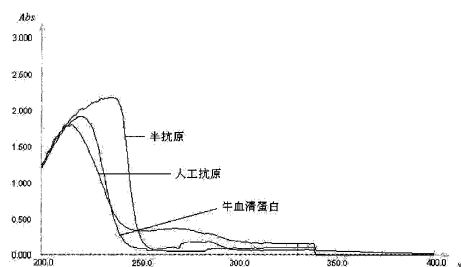
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

[54] 发明名称

一种三聚氰胺人工抗原的合成方法

[57] 摘要

一种三聚氰胺人工抗原的合成方法，属于生物化工技术领域。本发明以三聚氰胺为半抗原，利用其结构中原有的氨基，通过戊二醛使半抗原和牛血清蛋白发生结合，制备三聚氰胺的人工抗原，即三聚氰胺-牛血清蛋白；所制备的产品可用于食品中三聚氰胺含量及免疫检测上，具有检测快速、操作简便、成本低的优点，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必需的人工抗原，可以满足国内对其研究的需要。



1、一种三聚氰胺人工抗原的合成方法，其特征是以三聚氰胺为半抗原，利用其结构中原有的氨基，通过戊二醛使半抗原和牛血清蛋白发生结合，制备三聚氰胺的人工抗原，即三聚氰胺-牛血清蛋白；合成步骤为：

(1) 制备 A 液：称取 13mg 的半抗原于 25mL 烧杯中，加入含质量浓度 50% 甲醛的 pH7.2 的磷酸盐缓冲液 4mL，在室温磁力搅拌下至充分溶解后，逐滴加入质量浓度 25% 的戊二醛 12mL，在室温磁力搅拌下反应 3h，此液为 A 液；

(2) 制备 B 液：称取 10mg 的牛血清蛋白溶于 pH 9.6、0.05mmol/L 的碳酸盐缓冲液 2mL 中，低温保存，此液为 B 液；

(3) 在室温磁力搅拌下，将 B 液缓慢滴加到 A 液中，并在搅拌条件下继续反应 3h，期间分两次共加入 2mL 的磷酸盐缓冲液，即得到人工抗原混合液；

(4) 将人工抗原混合液移入透析袋中，用 0.01mol/L、pH 7.2 的磷酸盐缓冲液透析 3-4 天，每天更换 2 次磷酸盐缓冲液；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：三聚氰胺-牛血清蛋白；

(5) 三聚氰胺人工抗原的鉴定：采用紫外分光光度法测定偶联比。

一种三聚氰胺人工抗原的合成方法

技术领域

一种三聚氰胺人工抗原的合成方法，属于生物化工技术领域。

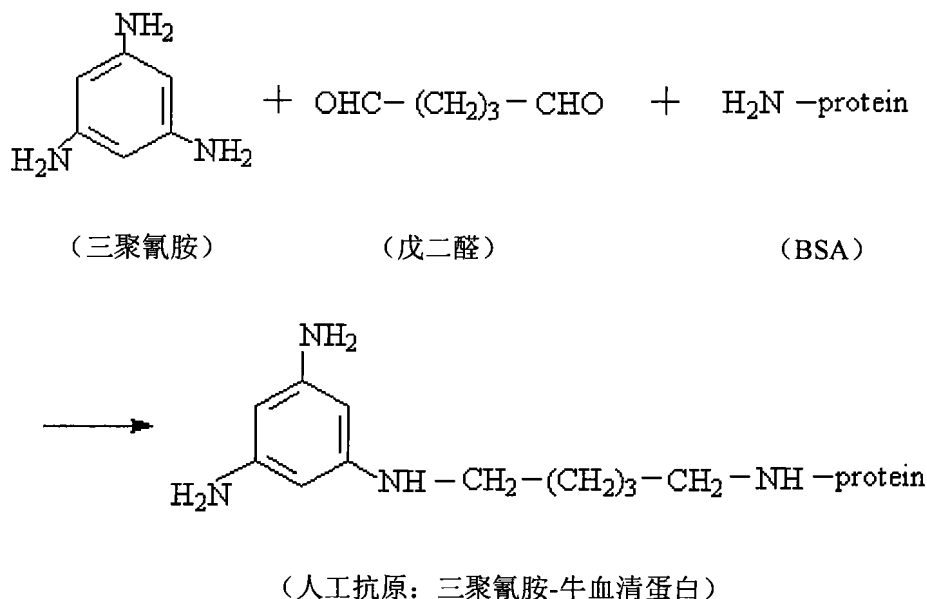
背景技术

三聚氰胺（Melamine, MM）简称三胺，学名三氨三嗪，别名蜜胺、氰尿酸胺、三聚酰胺，是一种重要的氮杂环有机化工原料，主要用于生产三聚氰胺-甲醛树脂，广泛用于塑料、涂料、皮革等行业。三聚氰胺在一般情况下较稳定，但在高温时会分解释放出氰化物，因此，采用三聚氰胺制造的器具均需标明“不可放进微波炉使用”。此外，三聚氰胺还可用作阻燃剂、粘合剂、甲醛清洁剂等。通过水解作用，三聚氰胺可以转化为三聚氰酸一酰胺、三聚氰酸三酰胺和三聚氰酸。美国 FDA 研究表明，三聚氰胺与钙在体内尿 pH 维持下形成不溶解的复合物，导致尿结石和膀胱癌，对人体造成巨大损害。由于目前在食品尤其是奶制品中测定蛋白质含量主要是通过“凯氏定氮法”测出含氮量从而估算其蛋白质含量，三聚氰胺分子含氮量高达 66%左右，在奶品中添加三聚氰胺会增加其蛋白质含量的测试值，且成本低廉，利润巨大，所以三聚氰胺常被不法商人用作食品添加剂，以提升食品检测中的蛋白质含量指标，例如我国三鹿奶粉事件，因此三聚氰胺也被人称为“蛋白精”，为此我国在 2008 年 10 月 7 日卫生部等五部门联合发布公告，确定了三聚氰胺在乳与乳制品中的检测限量值。目前我国对三聚氰胺检测有三种方法，即高效液相色谱法（HPLC）、气相色谱-质谱法（GC-MS）和液相色谱-质谱法（LC-MS），但这三种方法均需要昂贵的仪器设备和专业技术人员，对检材要求较高，样品前处理和提纯过程费时费力，已不能满足现代检测对方便、快速、准确的要求。近年来，国外已经开展了对三聚氰胺免疫分析方法的研究，但国内尚没有此方面的报道，为弥补这一空白，有必要制备三聚氰胺人工抗原。

发明内容

针对现有检测技术中存在的不足之处，本发明的目的是提供一种三聚氰胺人工抗原的制备方法，所制备的产品可用于食品中三聚氰胺含量及免疫检测上，具有检测快速、操作简便、成本低的优点，为今后的研究提供方便的途径。

本发明的技术方案：一种三聚氰胺人工抗原的制备方法，以三聚氰胺为半抗原，利用其结构中原有的氨基，通过戊二醛使半抗原和牛血清蛋白发生结合，制备三聚氰胺的人工抗原，即三聚氰胺-牛血清蛋白。其反应方程式为：



工艺步骤为:

1、人工抗原的制备

(1) 制备 A 液: 称取 13mg 的半抗原于 25mL 烧杯中, 加入含质量浓度 50% 甲醛的 pH 7.2 的磷酸盐缓冲液 4mL, 在室温磁力搅拌下至充分溶解后, 逐滴加入质量浓度 25% 的戊二醛 12mL, 在室温磁力搅拌下反应 3h, 此液为 A 液;

磷酸盐缓冲液: 磷酸氢二钠 10.9g, 磷酸二氢钠 3.2g, 氯化钠 90g 加蒸馏水至 1000mL, 调节 pH 至 7.2, 室温储存, 用时稀释 10 倍即为工作液;

(2) 制备 B 液: 称取 10mg 的牛血清蛋白溶于 pH 9.6、0.05mmol/L 的碳酸盐缓冲液 2mL 中, 低温保存, 此液为 B 液;

碳酸盐缓冲液: 称取碳酸钠 1.08g, 碳酸氢钠 2.95g 加蒸馏水至 1000mL, 调节 pH 至 9.6, 室温保存;

(3) 在室温磁力搅拌下, 将 B 液缓慢滴加到 A 液中, 并在搅拌条件下继续反应 3h, 期间分两次共加入 2mL 的磷酸盐缓冲液, 即得到人工抗原混合液;

(4) 将人工抗原混合液移入透析袋中, 用 0.01mol/L、pH 7.2 的磷酸盐缓冲液透析 3-4 天, 每天更换 2 次磷酸盐缓冲液; 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: 三聚氰胺-牛血清蛋白。

透析袋的预处理: 取 10cm 的透析袋, 于沸水中煮沸 10min, 然后将其放入去离子水中分别煮两次, 每次 10 分钟, 再用 60℃ 的去离子水冲洗 3min, 保存在 4℃ 去离子水中备用。

2、三聚氰胺人工抗原的鉴定: 采用紫外分光光度法测定偶联比。

本发明的有益效果: 所制备的产品可用于食品中三聚氰胺含量及免疫检测上, 具有检测快速、操作简便、成本低的优点, 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必需的人工抗原, 可以满足国内对

其研究的需要。

附图说明

图1 三聚氰胺人工抗原制备前后的紫外扫描图。

具体实施方式

1. 人工抗原的制备

(1) 制备 A 液：称取 13mg 的半抗原于 25mL 烧杯中，加入含质量浓度 50% 甲醛的 pH7.2 的磷酸盐缓冲液 4mL，在室温磁力搅拌下至充分溶解后，逐滴加入质量浓度 25% 的戊二醛 12mL，在室温磁力搅拌下反应 3h，此液为 A 液。

磷酸盐缓冲液：磷酸氢二钠 10.9g，磷酸二氢钠 3.2g，氯化钠 90g 加蒸馏水至 1000mL，调节 pH 至 7.2，室温储存，用时稀释 10 倍即为工作液。

(2) 制备 B 液：称取 10mg 的牛血清蛋白溶于 pH 9.6，0.05mmol/L 的碳酸盐缓冲液 2mL 中，低温保存。此液为 B 液。

碳酸盐缓冲液：称取碳酸钠 1.08g，碳酸氢钠 2.95g 加蒸馏水至 1000mL，调节 pH 至 9.6，室温保存。

(3) 在室温磁力搅拌下，将 B 液缓慢滴加到 A 液中，并在搅拌条件下继续反应 3h，期间分两次共加入 2mL 的磷酸盐缓冲液，即得到人工抗原混合液。

(4) 将人工抗原混合液移入透析袋中，用 0.01mol/L，pH 7.2 的磷酸盐缓冲液透析 3-4 天，每天更换 2 次磷酸盐缓冲液。使用冻干法将透析袋中的液体制成粉末，即得到人工抗原：三聚氰胺-牛血清蛋白。

透析袋的预处理：取 10cm 的透析袋，于沸水中煮沸 10min，然后将其放入去离子水中分别煮两次，每次 10 分钟，再用 60℃ 的去离子水冲洗 3min，保存在 4℃ 去离子水中备用。

2、三聚氰胺人工抗原的鉴定：采用紫外分光光度法测定偶联比。

偶联比测定：采用紫外分光光度法。如果半抗原结构中含有发色团，并且与蛋白质连接后不影响发色团的结构，则可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，根据吸收度加合性原理判断半抗原是否和蛋白质偶联并计算偶联比。

摩尔吸收系数 ϵ ：配制三聚氰胺浓度为 0, 10, 20, 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的甲醇溶液，通过紫外扫描可知三聚氰胺的最大吸收波长为 234nm，在 234nm 处测吸光值，每个浓度做平行样。摩尔吸光系数计算为： $\epsilon = \text{吸光值}/\text{摩尔浓度}$ 。本实验计算得 $\epsilon=1015.61 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。

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 5min，每个浓度做平行样。在 595 nm 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。本实验计算得偶联物蛋白浓度为 $1.38\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

偶联比测定：配制 $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 牛血清蛋白的甲醇溶液，将偶联后产物用甲醇稀释到 $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，在 234 nm 处测吸光值，以甲醇溶液为空白，测出的吸光值分别为 A_1 、 A_2 ，则偶联比率 γ 为： $\gamma = [(A_1 - A_2)/\varepsilon]/(200 \times 10^{-3}/66210)$ ，本实验计算得 $\gamma \approx 27.9$ 。

其中 ε 为摩尔吸光系数 ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$)，66210 为牛血清蛋白的分子量， 200×10^{-3} 为牛血清蛋白浓度 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

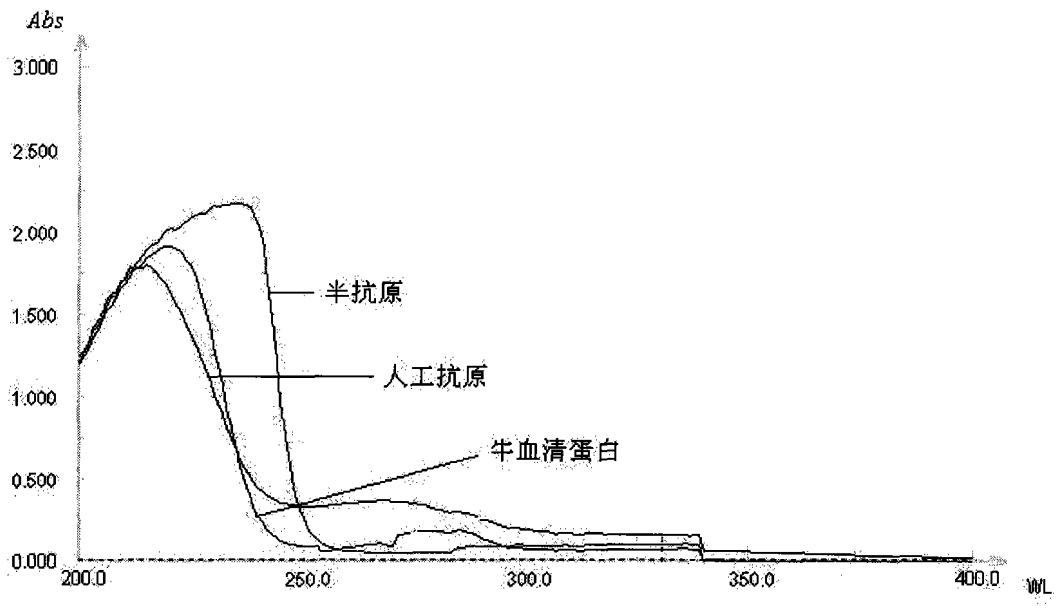


图 1

专利名称(译)	一种三聚氰胺人工抗原的合成方法		
公开(公告)号	CN101402683A	公开(公告)日	2009-04-08
申请号	CN200810234130.6	申请日	2008-11-03
[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 孙凤霞 刘丽强 彭池方 徐丽广 谢会玲 袁媛 尹丽梅		
发明人	胥传来 孙凤霞 刘丽强 彭池方 徐丽广 谢会玲 袁媛 尹丽梅		
IPC分类号	C07K14/765 G01N33/53		
其他公开文献	CN101402683B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种三聚氰胺人工抗原的合成方法，属于生物化工技术领域。本发明以三聚氰胺为半抗原，利用其结构中原有的氨基，通过戊二醛使半抗原和牛血清蛋白发生结合，制备三聚氰胺的人工抗原，即三聚氰胺-牛血清蛋白；所制备的产品可用于食品中三聚氰胺含量及免疫检测上，具有检测快速、操作简便、成本低的优点，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必需的人工抗原，可以满足国内对其研究的需要。

