



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101643453 B

(45) 授权公告日 2011.05.18

(21) 申请号 200910085644.4

G01N 33/566 (2006.01)

(22) 申请日 2009.05.27

G01N 33/531 (2006.01)

(73) 专利权人 北京维德维康生物技术有限公司
地址 100085 北京市海淀区上地十街1号院
4号楼

(56) 对比文件

CN 101413943 A, 2009.04.22, 全文.

CN 101183105 A, 2008.05.21, 全文.

(72) 发明人 吴小平 江海洋 王战辉 米铁军
阮永磊 徐飞 李娜

Mark T. Muldoon 等. Hapten Synthesis and
Immunoassay Development for the Analysis
of Chlorodiamino-s-triazine in Treated
Pesticide Waste and Rinsate. 《J. Agric. Food
Chem. 》. 1994, 第42卷(第3期), 747-755.

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限
公司 11245

审查员 徐奇

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

C07D 251/70 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/795 (2006.01)

C07K 14/77 (2006.01)

C07K 1/113 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 3 页

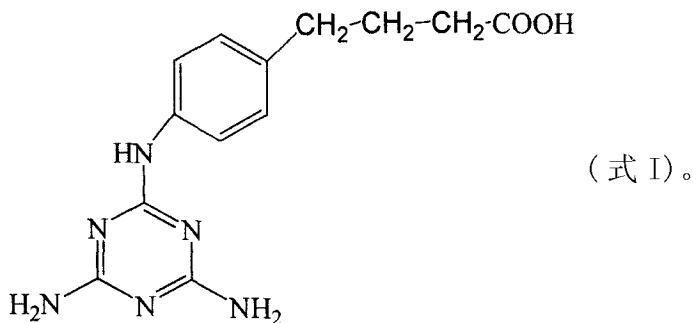
(54) 发明名称

一种三聚氰胺半抗原与抗原及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种三聚氰胺半抗原与抗原及其制备方法与应用。该制备式 I 所示的化合物的方法,包括如下步骤:将 2-氯-4,6-二氨基-1,3,5-三嗪和对氨基苯丁酸混合,在碱性、无水的环境下,在 70°C-80°C 的温度下,回流反应 24-30 小时,得到式 I 所示的化合物;2-氯-4,6-二氨基-1,3,5-三嗪与对氨基苯丁酸的投料摩尔比为 1:(1-3),优选为 1:1。实验结果表明,用本发明的抗原免疫动物得到的抗血清的效价可达 1:8×10⁴,最低检测限为 49ng/mL,半抑制浓度为 257ng/mL,产生的抗体的特异性高、灵敏度高、准确度高。因此,本发明的抗原及抗体及方法具有广阔的应用前景。

1. 一种化合物,其分子结构式如式 I 所示:



2. 一种化合物,是权利要求 1 中所述化合物与载体蛋白的偶联物。

3. 根据权利要求 2 所述的化合物,其特征在于:所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、血蓝蛋白或卵清白蛋白。

4. 一种制备权利要求 1 中式 I 所示的化合物的方法,包括如下步骤:将 2-氯-4,6-二氨基-1,3,5-三嗪和对氨基苯丁酸混合,在碱性、无水的环境下,在 70°C-80°C 的温度下,回流反应 24-30 小时,得到式 I 所示的化合物。

5. 一种制备权利要求 2 中所述化合物的方法,包括如下步骤:

1) 将式 I 所示化合物、N,N-二甲基甲酰胺、N,N'-二环己基碳化二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺混合,在 20°C-30°C 的条件下,反应 12-18 小时,得到溶液 I;

2) 向所述溶液 I 中加入载体蛋白,在 20°C-30°C 的条件下,反应 12-20 小时,得到权利要求 2 中所述偶联物。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于:步骤 1) 中,将式 I 所示化合物、N,N-二甲基甲酰胺、N,N'-二环己基碳化二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺混合,在 25°C 的条件下,反应 12 小时,得到溶液 I;步骤 2) 中,向所述溶液 I 中加入载体蛋白,在 25°C 的条件下,反应 12 小时,得到权利要求 2 中所述偶联物。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的方法,其特征在于:所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、血蓝蛋白或卵清白蛋白。

8. 权利要求 1、2 或 3 所述化合物在检测三聚氰胺中的应用。

一种三聚氰胺半抗原与抗原及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种三聚氰胺半抗原与抗原及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 三聚氰胺 (Melamine), 分子式 $C_3N_6H_6$, 简称三胺, 是一种三嗪类含氮杂环有机化合物。三聚氰胺呈弱碱性, 与盐酸、硫酸、硝酸、乙酸、草酸等都能形成三聚氰胺盐。三聚氰胺是重要的氮杂环有机化工原料, 在中性或微碱性情况下, 与甲醛缩合而成各种羟甲基三聚氰胺, 但在微酸性环境中 (pH5.5 ~ 6.5) 与羟甲基的衍生物进行缩聚反应而生成树脂产物。三聚氰胺是一种用途广泛的基本有机化工中间产品, 最主要的用途是作为生产三聚氰胺甲醛树脂的原料。该树脂硬度比脲醛树脂高, 不易燃, 耐水、耐热、耐老化、耐电弧、耐化学腐蚀, 有良好的绝缘性能、光泽度和机械强度, 广泛运用于木材、塑料、涂料、造纸、纺织、皮革、电气、医药等行业。三聚氰胺还可以作阻燃剂、减水剂、甲醛清洁剂等。

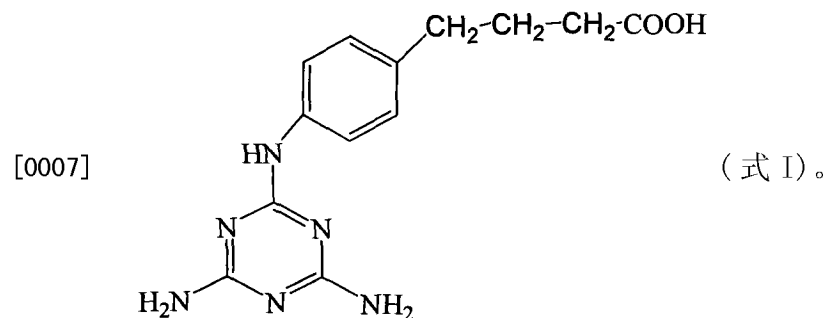
[0003] 三聚氰胺目前被认为毒性轻微, 大鼠口服的半数致死量大于 3g/kg 体重。动物长期摄入三聚氰胺会造成生殖、泌尿系统的损害, 膀胱、肾部结石, 并可进一步诱发膀胱癌。

[0004] 蛋白质主要由氨基酸组成, 其含氮量一般不超过 30%, 而三聚氰胺分子中含氮量为 66% 左右。常用的蛋白质测试方法“凯氏定氮法”是通过测出含氮量乘以 6.25 来估算蛋白质含量, 因此, 添加三聚氰胺会使得食品的蛋白质测试含量虚高, 从而使劣质食品和饲料在检验机构只做粗蛋白质简易测试时蒙混过关。食品和饲料工业蛋白质含量测试方法的缺陷, 加之三聚氰胺作为一种白色结晶粉末, 没有什么气味和味道, 食品与饲料中掺杂了三聚氰胺后也不易被发现, 为此三聚氰胺也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, 因此三聚氰胺也被人们称为“蛋白精”。因此, 需要灵敏、准确、快速的检测方法。

发明内容

[0005] 本发明的一个目的是提供一种可用作三聚氰胺半抗原和三聚氰胺抗原的化合物及其制备方法。

[0006] 本发明所提供的可用作三聚氰胺半抗原的化合物, 具有式 I 所示分子结构。



[0008] 本发明所提供的可用作三聚氰胺抗原的化合物, 是式 I 所示化合物与载体蛋白的偶联物。

[0009] 所述载体蛋白可为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、兰素蛋白或卵清白蛋白,最优选为牛血清白蛋白。

[0010] 本发明所提供的制备式 I 所示化合物的方法,包括如下步骤:将 2-氯-4,6-二氨基-1,3,5-三嗪和对氨基苯丁酸混合,在碱性、无水的环境下,在 70℃-80℃ 的温度下,回流反应 24-30 小时,得到式 I 所示的化合物;

[0011] 2-氯-4,6-二氨基-1,3,5-三嗪与对氨基苯丁酸的投料摩尔比为 1 : (1-3),优选为 1 : 1。

[0012] 本发明所提供的制备上述三聚氰胺抗原化合物的方法,包括如下步骤:

[0013] 1) 将式 I 所示化合物、N,N-二甲基甲酰胺、N,N'-二环己基碳化二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺混合,在 20℃-30℃ 的条件下,反应 12-18 小时,得到溶液 I;温度优选为 25℃,时间优选为 12 小时;

[0014] 2) 向溶液 I 中加入载体蛋白,在 20℃-30℃ 的条件下,反应 12-20 小时,得到上述偶联物(即三聚氰胺抗原化合物);温度优选为 25℃,时间优选为 12 小时;

[0015] 所述步骤 1) 中,所述式 I 所示化合物、N,N-二甲基甲酰胺、N,N'-二环己基碳化二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺的投料摩尔数比为 1 : 1 : 1 : 1。

[0016] 所述式 I 所示化合物与载体蛋白的投料摩尔数比为 (6-8) : 1,优选为 7 : 1。

[0017] 含羧基半抗原先与碳二亚胺类物质反应生成不稳定的类酸酐中间体,然后再与蛋白质的氨基反应生成酰胺和脲衍生物。

[0018] 其中,载体蛋白可为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、兰素蛋白或卵清白蛋白,最优选为牛血清白蛋白。

[0019] 上述三聚氰胺半抗原或三聚氰胺抗原化合物在制备三聚氰胺抗体中的应用也属于本发明的保护范围。

[0020] 由上述任一所述化合物免疫动物得到的抗体也属于本发明的保护范围。所述抗体具体为单克隆抗体。

[0021] 上述任一所述化合物和 / 或抗体在检测三聚氰胺中的应用也属于本发明的保护范围。

[0022] 鉴于食品和饲料工业蛋白质含量测试方法的缺陷,本发明依靠免疫学、免疫化学基本原理和残留分析技术手段,设计、合成小分子目标分析物半抗原,并与载体蛋白偶联,制备有效人工抗原,免疫动物制备针对小分子分析物特异性抗体。利用抗原抗体的特异性免疫学反应和易被检测识别的标记物的放大作用,定量的检测样本中微量小分子目标分析物,具有特异、灵敏、准确、快速、方便、廉价等特点。

[0023] 本发明以 4,6-二氨基-2-氯-1,3,5-三嗪(CAAT)为起始物质,应用对氨基苯丁酸上的氨基上的氢原子取代 CAAT 分子上的氯原子,从而获得能与载体蛋白直接偶联的活性基团,获得三聚氰胺半抗原氨基苯丁酸代二胺-s-三嗪,简称 p-ABTAAT,然后以活性酯法与载体蛋白(牛血清蛋白 BSA)偶联制备人工抗原。将人工抗原免疫动物后产生了针对三聚氰胺的高亲和力的特异性抗体。本发明制备方法简便可行、成本较低,半抗原产率较高,为快速检测食品中的三聚氰胺残留提供了必备的基础。

[0024] 实验结果表明,用本发明的抗原免疫动物得到的抗血清的效价可达 1 : 8×10^4 ,最低检测限为 49ng/L,半抑制浓度为 257ng/L,产生的抗体的特异性高、灵敏度高、准确度高。

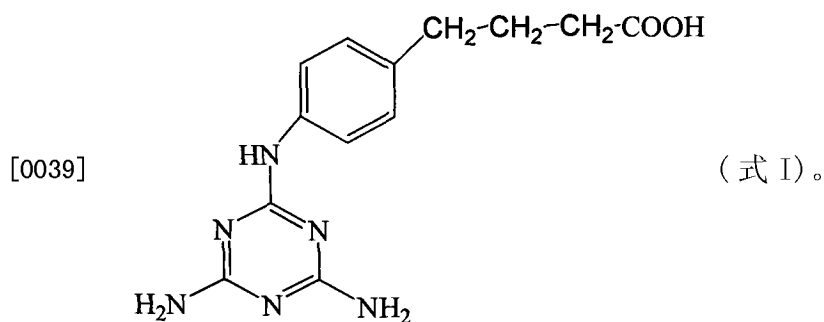
本发明的抗原和 / 或抗体,可用于建立竞争酶联免疫吸附分析技术,从而用于快速检测食品中的三聚氰胺残留,较现有的色谱法比,具有成本低廉、操作简单、样品前处理简便、方便快捷的特点,还减少由于采用 HPLC、GC 检测而使用的甲醇、乙腈等有机溶剂对环境的污染,适合于大规模检测,克服了现有检测技术中对三聚氰胺样品预处理复杂、耗时、且需要大量有机溶剂萃取,以及在检测过程中要用到精密昂贵的检测仪器而不适于推广使用等缺点。本发明的制备方法的产率高。因此,本发明的抗原及抗体及方法具有广阔的应用前景。

附图说明

- [0025] 图 1 为三聚氰胺抗原的合成图。
[0026] 图 2 为三聚氰胺半抗原质谱图。
[0027] 图 3 为三聚氰胺抗原的紫外光谱图。
[0028] 图 4 为三聚氰胺抗原的分子结构示意图。

具体实施方式

- [0029] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。
[0030] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。
[0031] 实施例 1、三聚氰胺半抗原与三聚氰胺抗原的制备与鉴定
[0032] 三聚氰胺半抗原及抗原的合成如图 1 所示。
[0033] 一、三聚氰胺半抗原的合成与鉴定
[0034] 1、三聚氰胺半抗原的合成
[0035] 称取 2- 氯 -4,6- 二氨基 -1,3,5- 三嗪 (CAAT) 0.430g (3mmol) 悬浮于经 Na_2SO_4 处理的 10mL 无水乙醇中,加入 0.5g (3mmol) 的对氨基苯丁酸 (2- 氯 -4,6- 二氨基 -1,3,5- 三嗪与对氨基苯丁酸的投料摩尔比为 1 : 1),加入 KOH,使 KOH 的终浓度为 85%。温度为 75℃ 条件下水浴回流 24 小时,分别在 16 小时和 19 小时的时候,加入 0.37g 对氨基苯丁酸 (2.0mmol) 和 85% KOH (180mg, 2.7mmol)。产物过滤,减压蒸馏,获得油状物质。产物溶解于 30mL 5% 的碳酸钠溶液,10mL 二氯甲烷洗涤两次,水相用浓盐酸调 pH 至 1,收集沉淀,干燥获得产品。实验设 3 次重复,结果取平均数。获得目的产物 (半抗原) 195mg,产率为 68%,命名为 p-ABTAAT。产率的计算公式为:产率 = 实际得到的产物的量 / 理论上得到的产物的量 $\times 100\%$ 。
[0036] 2、三聚氰胺半抗原的鉴定
[0037] 取上述产物经 ESI 质谱测定其结构,发现其分子离子峰为 289 (M+1) (见图 2)。
[0038] 半抗原化合物的元素分析结果 (%) :C, 54.16 ;H, 5.59 ;N, 29.15 ;O, 11.10。由上可知,化合物的分子量为 288,分子中含有 2 个 O, 13 个 C。说明三聚氰胺半抗原合成成功。三聚氰胺半抗原的分子结构式如式 I 所示:



[0040] 二、三聚氰胺抗原的合成与鉴定

[0041] 1、三聚氰胺抗原的合成

[0042] p-ABTAAT 溶解于 N, N- 二甲基甲酰胺 (DMF), 分别加入 N, N' - 二环己基碳二亚胺 (DCC) 和 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) (p-ABTAAT、DMF、DCC 和 NHS 的投料物质的量比为 1 : 1 : 1 : 1), 25℃ 下搅拌反应 12 小时, 离心, 除去沉淀, 得到溶液 I; 向溶液 I 中加入溶有 100mg 牛血清蛋白 (BSA) 的水溶液 5mL (p-ABTAAT 与牛血清蛋白的投料物质的量比为 7 : 1), 25℃ 下搅拌反应 12 小时。将溶液装入透析袋, 用蒸馏水透析 5 天, 离心分离出上清液, 即得到三聚氰胺免疫原 p-ABTAAT-BSA。三聚氰胺半抗原的化学名称为氨基苯丁酸代二胺-s-三嗪, 分子量为 288。计算产率。产率的计算公式为: 产率 = 实际得到的产物的量 / 理论得到的产物的量 × 100%。实验设 3 次重复, 结果取平均数。结果目的产物的产率为 57.2%。

[0043] 2、三聚氰胺抗原的鉴定

[0044] 按合成三聚氰胺抗原反应所用的半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例, 分别进行紫外 (200nm-400nm) 扫描鉴定, 并通过比较三者在同一波长下的吸光值计算其结合比。

[0045] 由图 3 紫外光谱图可知, 产物的紫外光谱图与牛血清蛋白 (BSA) 相比发生了明显变化, 说明半抗原已经与 BSA 成功偶联制得三聚氰胺人工抗原。经计算, 三聚氰胺半抗原与 BSA 的结合比为 17 : 1。三聚氰胺抗原的分子结构式示意图如图 4 所示。

[0046] 实施例 2、三聚氰胺半抗原与三聚氰胺抗原的制备与鉴定

[0047] 一、三聚氰胺半抗原的合成与鉴定

[0048] 1、三聚氰胺半抗原的合成

[0049] 称取 2- 氯 -4,6- 二氨基 -1,3,5- 三嗪 (CAAT) 悬浮于经 Na₂SO₄ 处理的 10mL 无水乙醇提中, 加入对氨基苯丁酸 (2- 氯 -4,6- 二氨基 -1,3,5- 三嗪与对氨基苯丁酸的投料摩尔比为 1 : 2), 加入 KOH, 使 KOH 的终浓度为 85%。温度为 70℃ 条件下水浴回流 26 小时, 分别在 16 小时和 19 小时的时候, 加入 0.37g 对氨基苯丁酸 (2.0mmol) 和 85% KOH (180mg, 2.7mmol)。产物过滤, 减压蒸馏, 获得油状物质。产物溶解于 30mL 5% 的碳酸钠溶液, 10mL 二氯甲烷洗涤两次, 水相用浓盐酸调 pH 至 1, 收集沉淀, 干燥获得产品。实验设 3 次重复, 结果取平均数。获得目的产物 (半抗原) 产率为 67%, 命名为 p-ABTAAT-1。产率的计算公式为: 产率 = 实际得到的产物的量 / 理论上得到的产物的量 × 100%。

[0050] 2、三聚氰胺半抗原的鉴定

[0051] 取上述产物经 ESI 质谱测定其结构, 发现其分子离子峰为 289 (M+1)。半抗原化合物的元素分析结果 (%): C, 54.16; H, 5.59; N, 29.15; O, 11.10。由上可知, 化合物的分子量为 288, 分子中含有 2 个 O, 13 个 C。初步说明三聚氰胺半抗原合成成功。三聚氰胺半抗原

的分子结构式如式 I 所示。

[0052] 二、三聚氰胺抗原的合成与鉴定

[0053] 1、三聚氰胺抗原的合成

[0054] p-ABTAAT-1 溶解于 N, N'-二甲基甲酰胺 (DMF), 分别加入 N, N'-二环己基碳二亚胺 (DCC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) (p-ABTAAT-1、DMF、DCC 和 NHS 的投料物质的量比为 1 : 1 : 1 : 1), 20℃ 下搅拌反应 14 小时, 离心, 除去沉淀, 得到溶液 I; 向溶液 I 中加入溶有 100mg 牛血清蛋白 (BSA) 的水溶液 5mL (p-ABTAAT-1 与牛血清蛋白的投料物质的量比为 6 : 1), 20℃ 下搅拌反应 14 小时。将溶液装入透析袋, 用蒸馏水透析 5 天, 离心分离出上清液, 即得到三聚氰胺免疫原。计算产率。产率的计算公式为: 产率 = 实际得到的产物的量 / 理论得到的产物的量 × 100%。实验设 3 次重复, 结果取平均数。结果目的产物的产率为 57%。

[0055] 2、三聚氰胺抗原的鉴定

[0056] 按合成三聚氰胺抗原反应所用的半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例, 分别进行紫外 (200nm-400nm) 扫描鉴定, 并通过比较三者在同一波长下的吸光值计算其结合比。实验设 3 次重复。结果表明, 产物的紫外光谱图与牛血清蛋白 (BSA) 相比发生了明显变化, 说明半抗原已经与 BSA 成功偶联制得三聚氰胺人工抗原。经计算, 三聚氰胺半抗原与 BSA 的结合比为 17 : 1。

[0057] 实施例 3、三聚氰胺半抗原与三聚氰胺抗原的制备与鉴定

[0058] 一、三聚氰胺半抗原的合成与鉴定

[0059] 1、三聚氰胺半抗原的合成

[0060] 称取 2-氯-4,6-二氨基-1,3,5-三嗪 (CAAT) 悬浮于经 Na₂SO₄ 处理的 10mL 无水乙醇提中, 加入对氨基苯丁酸 (2-氯-4,6-二氨基-1,3,5-三嗪与对氨基苯丁酸的投料摩尔比为 1 : 3), 加入 KOH, 使 KOH 的终浓度为 85%。温度为 80℃ 条件下水浴回流 30 小时, 分别在 16 小时和 19 小时的时候, 加入 0.37g 对氨基苯丁酸 (2.0mmol) 和 85% KOH (180mg, 2.7mmol)。产物过滤, 减压蒸馏, 获得油状物质。产物溶解于 30mL 5% 的碳酸钠溶液, 10mL 二氯甲烷洗涤两次, 水相用浓盐酸调 pH 至 1, 收集沉淀, 干燥获得产品。实验设 3 次重复, 结果取平均数。获得目的产物 (半抗原) 产率为 66%, 命名为 p-ABTAAT-2。产率的计算公式为: 产率 = 实际得到的产物的量 / 理论上得到的产物的量 × 100%。

[0061] 2、三聚氰胺半抗原的鉴定

[0062] 取上述产物经 ESI 质谱测定其结构, 发现其分子离子峰为 289 (M+1)。半抗原化合物的元素分析结果 (%): C, 54.16; H, 5.59; N, 29.15; O, 11.10。由上可知, 化合物的分子量为 288, 分子中含有 2 个 O, 13 个 C。说明三聚氰胺半抗原合成成功。三聚氰胺半抗原的分子结构式如式 I 所示。

[0063] 二、三聚氰胺抗原的合成与鉴定

[0064] 1、三聚氰胺抗原的合成

[0065] p-ABTAAT-2 溶解于 N, N'-二甲基甲酰胺 (DMF), 分别加入 N, N'-二环己基碳二亚胺 (DCC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) (p-ABTAAT-2、DMF、DCC 和 NHS 的投料物质的量比为 1 : 1 : 1 : 1), 30℃ 下搅拌反应 18 小时, 离心, 除去沉淀, 得到溶液 I; 向溶液 I 中加入溶有 100mg 牛血清蛋白 (BSA) 的水溶液 5mL (p-ABTAAT-2 与牛血清蛋白的投料物质的量比为

8 : 1), 20℃下搅拌反应 20 小时。将溶液装入透析袋,用蒸馏水透析 5 天,离心分离出上清液,即得到三聚氰胺免疫原。计算产率。产率的计算公式为:产率=实际得到的产物的量 / ;理论得到的产物的量 ×100%。实验设 3 次重复,结果取平均数。结果目的产物的产率为 56%。

[0066] 2、三聚氰胺抗原的鉴定

[0067] 按合成三聚氰胺抗原反应所用的半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例,分别进行紫外 (200nm-400nm) 扫描鉴定,并通过比较三者在同一波长下的吸光值计算其结合比。实验设 3 次重复。结果表明,产物的紫外光谱图与牛血清蛋白 (BSA) 相比发生了明显变化,说明半抗原已经与 BSA 成功偶联制得三聚氰胺人工抗原。经计算,三聚氰胺半抗原与 BSA 的结合比为 17 : 1。

[0068] 实施例 4、通过三聚氰胺抗体检测本发明抗原的效果

[0069] 一、三聚氰胺抗血清的制备

[0070] 以实施例 1 制得的抗原为免疫原。实验选用体 2kg 左右,健康的新西兰大白兔。实验免疫剂量基础免疫 0.5 ~ 1.0mg/kg,加强免疫剂量 1.0 ~ 1.5mg/kg,用稀释液稀释适量免疫原,加入等体积弗氏完全佐剂,充分乳化,在兔背部皮内多点注射进行首免。2 周后,取同样量抗原加弗氏不完全佐剂乳化后进行背部皮下多点注射,每 2 周加强免疫一次。从第三次加强免疫开始,每次免疫后第 8 天于兔子耳缘静脉采血,测定效价。

[0071] 待免疫血清效价上去之后,就可采血。采血后将血液先置室温一段时间待其凝固,再放 4℃冰箱中 3 ~ 4 小时,待血块收缩后,离心,分离出血清。

[0072] 二、三聚氰胺抗体效价的测定

[0073] 免疫复合物按常规方法免疫兔子。从第三次加强免疫开始,每次免疫后第 7 天于兔子耳缘静脉采血。血清经适当稀释后用间接竞争性 ELISA 测定效价。

[0074] 六免后,兔子获得了高效价的抗体,抗血清的效价为 1 : 8×10^4 。

[0075] 三、抗血清最低检测限 (LOD 值) 和半数抑制量 (IC_{50}) 的检测

[0076] 三聚氰胺标准品购自 Sigma Aldrich 公司 ;CAS 号 :108-78-1。

[0077] 用方阵滴定法确定抗原 (载体蛋白为卵清蛋白,制备方法同实施例 1 所示) 和三聚氰胺抗体的工作浓度,抗原的工作浓度为 2 μ g/mL,三聚氰胺抗体的工作浓度为 1/80000 (ug/ml)。

[0078] 用不同浓度的三聚氰胺标准品溶液做实验溶液,其浓度如下 :0ng/mL、32ng/mL、64ng/mL、128ng/mL、256ng/mL、512ng/mL、1 μ g/mL、2 μ g/mL。采用 8 组平行试验 (n = 8)。

[0079] 间接竞争性 ELISA 方法 :用上述工作浓度的抗原包被酶标板,将实验溶液与抗体溶液同时加入酶标板小孔中,同时设置空白孔 (将添加的抗体溶液换成高纯水,其它一致) 和阴性对照孔 (将添加的实验溶液用 PBS 溶液代替,其它一致),37℃温育 0.5h,倒出孔内液体,用洗涤液 (10×PBST) 洗涤 3-5 次,将酶标板倒置在吸水纸上拍打 ;加入酶标二抗溶液于酶标板小孔中,37℃温育 0.5h,用洗涤液重复洗 3-5 次,吸干 ;加入底物显色溶液到酶标板小孔中,室温下反应 10-15min,用酶标仪在波长 450nm 处测定吸光度值 A。以吸光度值 A 为纵坐标,以三聚氰胺实验溶液浓度的 \log_{10} 值为横坐标,绘制半对数标准曲线图。结果表明标准曲线具有完整的反 S 形状,并具有上平台和下平台,标准曲线的平行测定次数 8 次,实验重复性良好,相对标准偏差 (变异系数) 均在 15% 以内。

[0080] 根据标准曲线得出得出 10%抑制量和半数抑制量 (IC_{50}), 比较检测灵敏度。抑制率以下式计算:

[0081]

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min}) - (\text{OD}_x - \text{OD}_{\min})}{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min})} \times 100\%$$

[0082] 式中: OD_{\max} 为不加标准品时的吸光值 (即阴性对照), OD_x 为标准品 x 时的吸光值, OD_{\min} 为空白对照孔的吸光值。

[0083] 由上述公式计算得三聚氰胺抗体在缓冲液中的 LOD 值为 49ng/mL, 半数抑制量 (IC_{50}) 为 257ng/mL。

[0084] 四、三聚氰胺抗体特异性测定

[0085] 抗体特异性是指它同特异性抗原结合的能力与同该抗原类似物结合能力的比较。常用交叉反应活性作为评价的重要标准。交叉反应越小, 抗体的特异性则越好。

[0086] 将特异性抗原及其类似物做系列稀释, 分别与同一种三聚氰胺抗体和三聚氰胺标准品建立间接竞争性 ELISA 方法, 并制作标准曲线。在标准曲线上找出抑制率 50% 的剂量和类似物抑制率 50% 的剂量, 再计算出各类似物的交叉反应率。

[0087] 本实验选择的三聚氰胺同系物为三聚氰酸、4,6-二氨基-2-羟基-1,3,5-三嗪、三聚氰酸一酰胺、三聚氰酸二酰胺、四环素、庆大霉素、氨苄青霉素。

[0088] 用样品稀释液将各同系物分别稀释成如下浓度: 0ng/mL、32ng/mL、64ng/mL、128ng/mL、256ng/mL、512ng/mL、1 μ g/mL。

[0089] 按照实验三中所述方法, 各自建立标准曲线, 测定抑制中浓度 IC_{50} 。

[0090] 交叉反应率 (%) = (引起 50% 抑制三聚氰胺的浓度 / 引起 50% 抑制类似物浓度) \times 100%。

[0091] 实验设 3 次重复, 结果取平均数。结果, 各类似物的交叉反应率 (%): 三聚氰胺 100.0, 三聚氰酸 < 10.0, 4,6-二氨基-2-羟基-1,3,5-三嗪 < 0.1, 三聚氰酸一酰胺 < 0.1, 三聚氰酸二酰胺 < 0.1, 庆大霉素 < 0.1, 四环素 < 0.1, 氨苄青霉素 < 0.1。

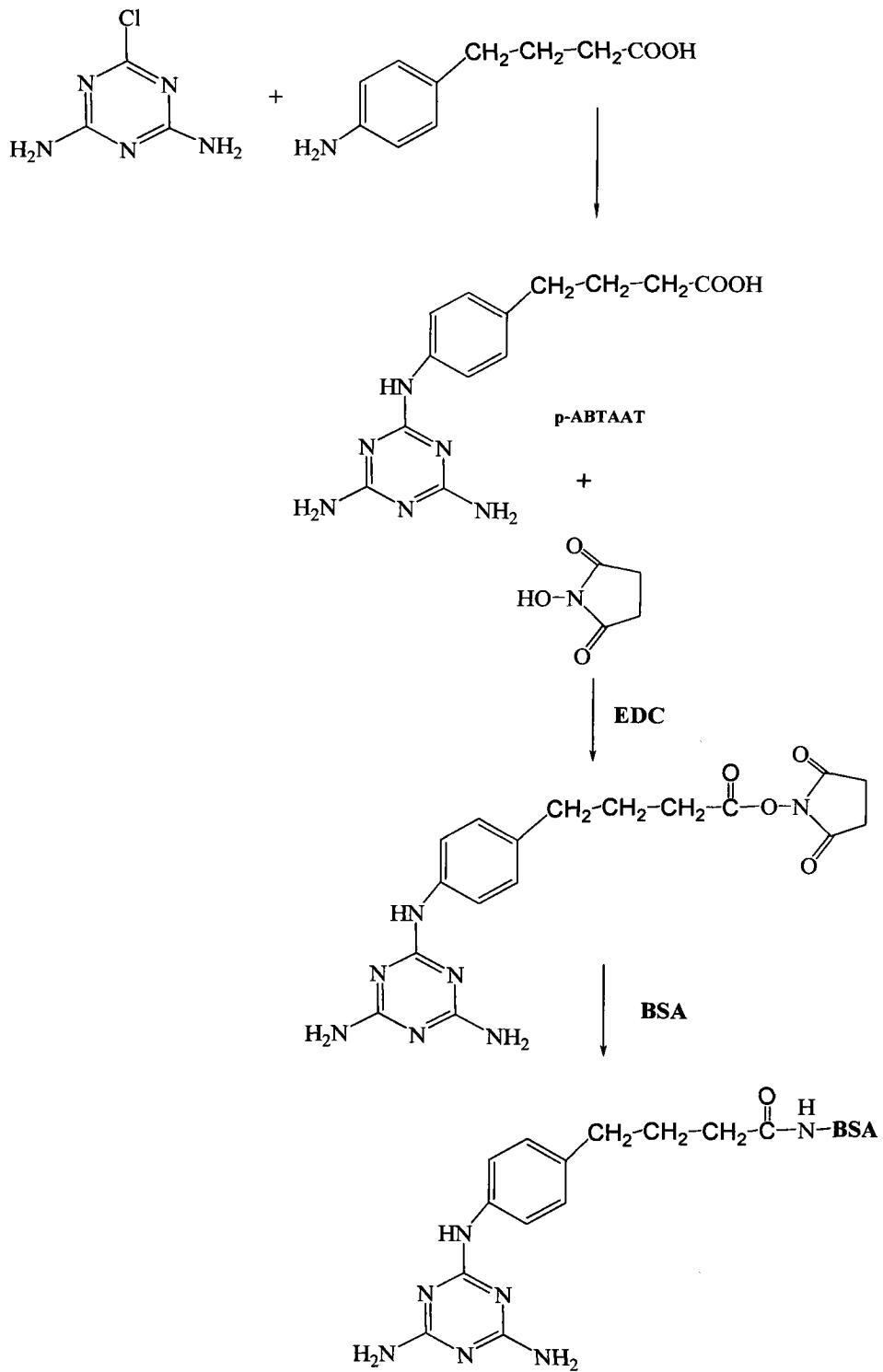


图 1

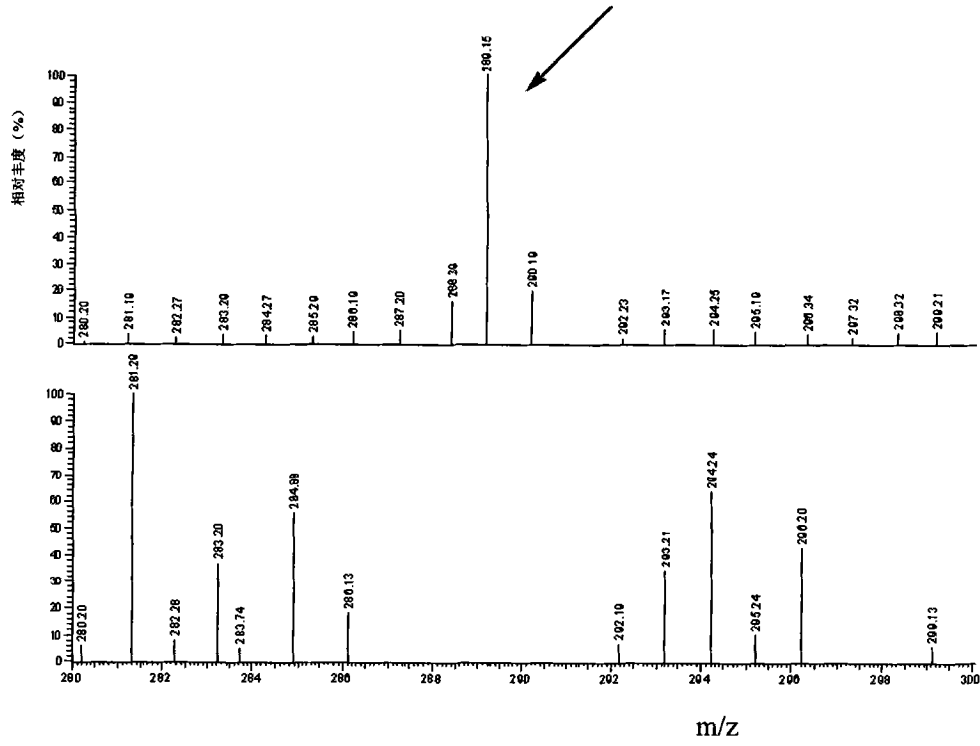


图 2

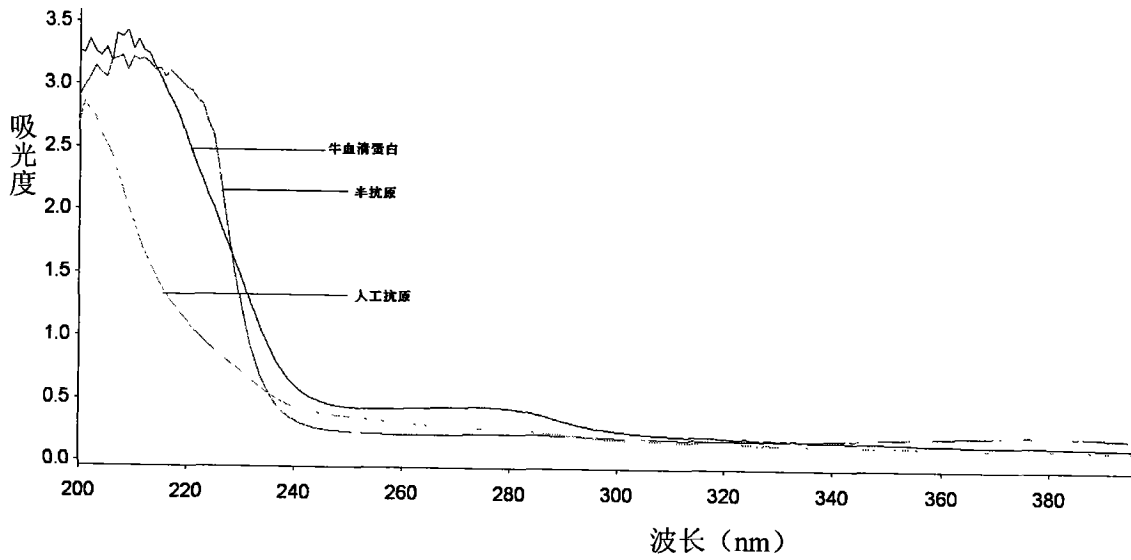


图 3

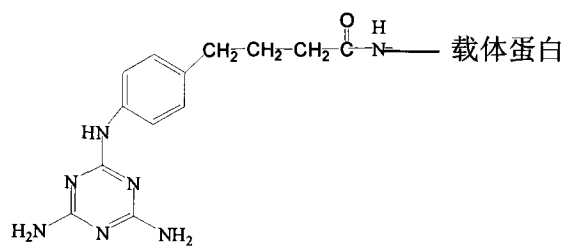


图 4

专利名称(译)	一种三聚氰胺半抗原与抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN101643453B	公开(公告)日	2011-05-18
申请号	CN200910085644.4	申请日	2009-05-27
[标]申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
[标]发明人	吴小平 江海洋 王战辉 米铁军 阮永磊 徐飞 李娜		
发明人	吴小平 江海洋 王战辉 米铁军 阮永磊 徐飞 李娜		
IPC分类号	C07D251/70 G01N33/566 C07K14/795 C07K14/765 C07K14/77 G01N33/531 C07K16/44 C07K1/113		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	徐奇		
其他公开文献	CN101643453A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种三聚氰胺半抗原与抗原及其制备方法与应用。该制备式I所示的化合物的方法，包括如下步骤：将2-氯-4，6-二氨基-1，3，5-三嗪和对氨基苯丁酸混合，在碱性、无水的环境下，在70°C-80°C的温度下，回流反应24-30小时，得到式I所示的化合物；2-氯-4，6-二氨基-1，3，5-三嗪与对氨基苯丁酸的投料摩尔比为1:(1-3)，优选为1:1。实验结果表明，用本发明的抗原免疫动物得到的抗血清的效价可达1:8×10⁴，最低检测限为49ng/mL，半抑制浓度为257ng/mL，产生的抗体的特异性高、灵敏度高、准确度高。因此，本发明的抗原及抗体及方法具有广阔的应用前景。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(\text{OD}_{\text{max}} - \text{OD}_{\text{min}}) - (\text{OD}_x - \text{OD}_{\text{min}})}{(\text{OD}_{\text{max}} - \text{OD}_{\text{min}})} \times 100\%$$