



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102675455 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 19

(21) 申请号 201210151680. 8

G01N 33/531 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 05. 16

G01N 30/02 (2006. 01)

(71) 申请人 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所

地址 730000 甘肃省兰州市七里河区小西湖硷沟沿 335 号

(72) 发明人 张景艳 李建喜 张凯 杨志强
王磊 王学智 张宏 孟嘉仁
秦哲

(74) 专利代理机构 北京中恒高博知识产权代理有限公司 11249

代理人 陆菊华

(51) Int. Cl.

C07K 14/765 (2006. 01)

C07K 14/77 (2006. 01)

C07K 14/795 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种喹乙醇残留标示物高偶联比的全抗原合成方法

(57) 摘要

本发明公开一种高偶联比的喹乙醇残留标示物全抗原合成方法。该方法采用 N, N' - 二异丙基碳二亚胺为催化剂, 3- 甲基喹啉啉 -2- 羧酸与过量的 N- 羟基琥珀酰亚胺发生酯化反应, 酯化物再与载体蛋白偶联反应即得到高偶联比的喹乙醇残留标示物全抗原。本发明使用的催化剂安全性更高, 不易造成操作人员的过敏, 且副产物少, 所得全抗原偶联比可达到 32 ~ 62 ; 所得抗原免疫小鼠后, 可得到抗体效价在 128000 以上的 MQCA 多克隆抗体, 与喹乙醇、喹啉酮、痢菌净的交叉反应性均小于 20%, 与氯霉素、盐酸克伦特罗、抗生素类等无交叉反应性。

1. 噻乙醇残留标示物高偶联比的全抗原合成方法,其特征在于:在 N,N'-二异丙基碳二亚胺存在下,3-甲基喹喔啉-2-羧酸与 N-羟基琥珀酰亚胺发生酯化反应,反应产物再与载体蛋白偶联,得到全抗原。

2. 根据权利要求 1 所述噻乙醇残留标示物高偶联比的全抗原合成方法,其特征在于:所述 3-甲基喹喔啉-2-羧酸与 N-羟基琥珀酰亚胺的摩尔用量比为 1:(1.5~2)。

3. 根据权利要求 1 所述噻乙醇残留标示物高偶联比的全抗原合成方法,其特征在于:所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清白蛋白或钥孔戚血蓝蛋白。

4. 根据权利要求 1 所述噻乙醇残留标示物高偶联比的全抗原合成方法,其特征在于,所得全抗原偶联比的检测:将含全抗原的反应液置于超滤管中,离心、洗涤,收集滤液,采用高效液相色谱法检测滤液中游离 3-甲基喹喔啉-2-羧酸的浓度,色谱条件:填充剂为十八烷基硅烷键合硅胶,流动相为体积比为 60:40 的甲醇水混合液,检测波长为 320nm,

$$\text{偶联比} = \frac{m_{\text{总}} - V_{\text{反应}} \times C_1}{M_2 \times n}$$

其中, $m_{\text{总}}$ 为 3-甲基喹喔啉-2-羧酸加入的总质量;

C_1 为游离 3-甲基喹喔啉-2-羧酸的浓度;

M_2 为 3-甲基喹喔啉-2-羧酸的摩尔质量;

n 为载体蛋白的摩尔数,偶联比为每个载体蛋白分子上结合 3-甲基喹喔啉-2-羧酸的分子个数。

5. 依权利要求 1 至 3 任一所述噻乙醇残留标示物高偶联比的全抗原合成方法制得的全抗原的应用,其特征在于:用于制备噻乙醇残留标示物 ELISA 检测试剂盒。

一种喹乙醇残留标示物高偶联比的全抗原合成方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫化学分析技术领域,具体涉及一种喹乙醇残留标示物高偶联比的全抗原合成方法。

背景技术

[0002] 喹乙醇又称喹酰胺醇,商品名为倍育诺、快育灵,有中度至明显的蓄积毒性,对大多数动物有明显的致畸作用,对人也有潜在的三致性,即致畸形,致突变,致癌,由于其在饲料及饲料添加剂中滥用所引起的食品安全问题备受关注,对喹乙醇及其残留标示物 3-甲基喹啉啉-2-羧酸(MQCA)残留快速检测试剂盒和胶体金试纸条的研究成为近年来国内热点。3-甲基喹啉啉-2-羧酸为小分子物质,不能刺激动物机体产生免疫应答获得抗体,需与大分子物质如牛血清白蛋白、卵清白蛋白、钥孔戚血蓝蛋白等联接作为免疫全抗原。研究发现半抗原能否刺激机体产生高特异性的抗血清不仅决定于它与蛋白质的结合位点,而且取决于蛋白质上连接的半抗原数目。已有的 3-甲基喹啉啉-2-羧酸全抗原合成方法都选用 N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)作为催化剂,但该催化剂的缺点是合成过程中容易产生的副产物 N,N'-二环己基脲且不易除净,该副产物对皮肤、眼睛有刺激性,引起发炎,所得全抗原的偶联比一般只有 10:1 左右。目前国内尚未建立合理、可靠的喹乙醇残留标示物全抗原偶联比检测方法,其偶联比的测定方法主要为紫外分光光度法,该方法的专属性不强,准确度不高。

发明内容

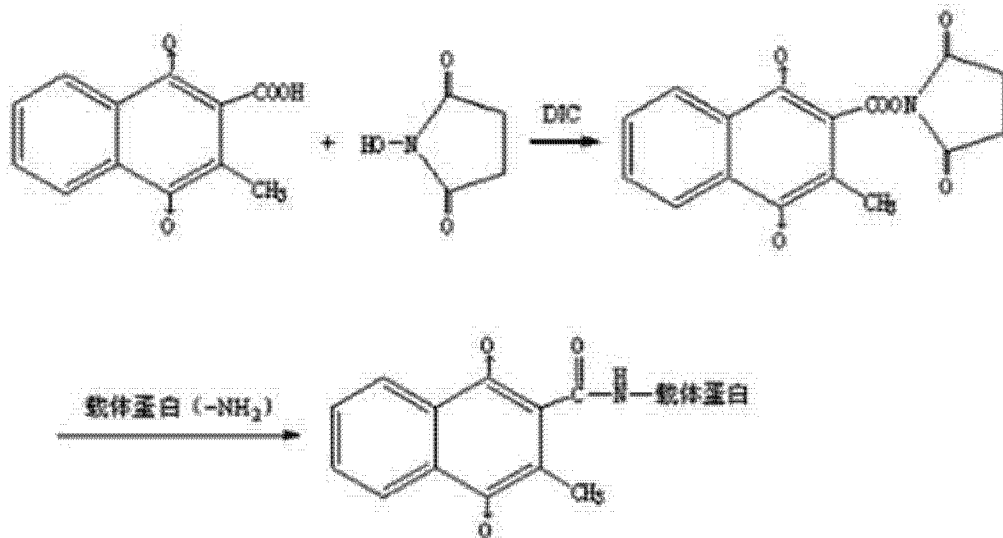
[0003] 本发明的目的是提供一种安全性好、效率高、高偶联比的 3-甲基喹啉啉-2-羧酸全抗原的合成方法。

[0004] 本发明获得 3-甲基喹啉啉-2-羧酸全抗原的合成方法如下:

在 N,N'-二异丙基碳二亚胺存在下,3-甲基喹啉啉-2-羧酸与 N-羟基琥珀酰亚胺发生酯化反应,反应产物再与载体蛋白偶联,得到全抗原。

[0005] 所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清白蛋白或钥孔戚血蓝蛋白。

[0006] 合成路线为:



具体的合成过程为：将 3-甲基喹啉-2-羧酸溶于二甲基甲酰胺中，再加入催化剂 N,N'-二异丙基碳二亚胺，催化剂与 3-甲基喹啉-2-羧酸的摩尔用量相等，然后加入过量的 N-羟基琥珀酰亚胺，与其发生酯化反应得到酯化物。反应后，离心除去沉淀物，再向反应液中滴加溶有载体蛋白的 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液，酯化物与载体蛋白分子上的氨基发生偶联反应得到全抗原。反应液置于超滤管中，离心、洗涤，除去未反应完全的小分子物质，采用 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液洗涤。

[0007] 进一步，所述 3-甲基喹啉-2-羧酸与 N-羟基琥珀酰亚胺的摩尔用量比为 1 : (1.5 ~ 2)，优选 1 : 1.6。

[0008] 酯化反应时的反应温度为 30 ~ 45℃，优选 37℃。

[0009] 偶联反应时的反应温度为 30 ~ 45℃，优选 37℃。

[0010] 采用上述合成方法制得的 3-甲基喹啉-2-羧酸全抗原的偶联比的检测方法：将上述含全抗原的反应液置于超滤管中，离心、洗涤，收集滤液，采用高效液相色谱法检测滤液中游离 3-甲基喹啉-2-羧酸的浓度，色谱条件：填充剂为十八烷基硅烷键合硅胶，流动相为体积比为 60:40 的甲醇水混合液，检测波长为 320nm。

[0011] 采用上述合成方法制得的 3-甲基喹啉-2-羧酸全抗原用于制备喹乙醇残留标示物 ELISA 检测试剂盒。

[0012] 本发明有益效果：

(1) 本发明在合成 3-甲基喹啉-2-羧酸全抗原所用的催化剂为 N,N'-二异丙基碳二亚胺 (DIC)，反应时较易形成均相反应，与催化剂 N,N'-二环己基碳二亚胺 (DCC) 相比，其副产物少，安全性更高，不易造成操作人员的过敏，且最终所得的全抗原偶联比可由 10 左右提高到 32 ~ 68；

(2) 在以往实验中都采用透析法除去反应中的有害物质和杂质，通常需要在 4℃，透析 2 ~ 4 天、PBS 缓冲液 4 ~ 8L。本发明应用分子截留量为 30 000dal 的超滤管离心纯化 MQCA 全抗原，所需时间短，且耗费 PBS 缓冲液仅需 4 ~ 8mL，为准确测定全抗原偶联比提供了可行性。

[0013] (3) 本发明选用高效液相色谱法检测全抗原的偶联比，该检测方法的精密度符合要求，RSD=0.23%；重现性良好，RSD=1.14%。

[0014] (4) 本发明制得的全抗原可用于喹乙醇残留标示物—3-甲基喹啉啉-2-羧酸 ELISA 快速检测试剂盒中关键试剂——包被抗原,能减少包被抗原的用量;该抗原免疫小鼠后,可得到抗体效价在 128000 以上的 MQCA 多克隆抗体,与喹乙醇、喹啉酮、痢菌净的交叉反应性均小于 20%,与氯霉素、盐酸克伦特罗、抗生素类等无交叉反应性,可用于喹乙醇残留 ELISA 快速检测试剂盒中关键试剂——抗工作液,该抗原还能用于制备高特异性的 3-甲基喹啉啉-2-羧酸单克隆抗体。

[0015] 附图说明

- 图 1 为 MQCA 标准品的高效液相色谱图;
- 图 2 为全抗原 MQCA-BSA 合成中游离 MQCA 的高效液相色谱图;
- 图 3 为全抗原 MQCA-OVA 合成中游离 MQCA 的高效液相色谱图;
- 图 4 为全抗原 MQCA-KLH 合成中游离 MQCA 的高效液相色谱图
- 图 5 为峰面积与 MQCA 溶液的标准曲线;
- 图 6 为 MQCA 多克隆抗体的效价。

具体实施方式

[0016] 以下结合实施例和附图对本发明做进一步说明。

[0017] 实施例 1

全抗原 (MQCA-BSA) 的合成:将 25mmol 的 3-甲基喹啉啉-2-羧酸 (MQCA) 溶于 0.5mL 的二甲基甲酰胺中,再加入 25mmol 的 N,N'-二异丙基碳二亚胺 (DIC),搅拌 30min,然后加入 40mmol 的 N-羟基琥珀酰亚胺,37℃ 避光搅拌反应 16h,离心除去沉淀物,离心得到的清液为反应液 A;将 3.0×10^{-4} mmol 牛血清白蛋白 (BSA, 分子量为 68000) 溶于 1.5mL 0.02 mol/L 的磷酸缓冲溶液 (pH=7.4) 中,得溶液 B;将溶液 B 逐滴加至反应液 A 中,37℃ 下搅拌过夜,反应液置于超滤管 (分子截留量为 30 KD) 中,离心 10min 后,加入 0.2mol/L pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液 1mL,再离心,重复操作 3~4 次,充分洗去未反应完全的小分子物质,收集滤液,取 1mL 滤液过 0.22 μ m 的滤膜,采用高效液相色谱法检测滤液中游离 MQCA 的浓度;经超滤管截留下的全抗原经冷冻干燥后分装,保存。

[0018] 实施例 2

全抗原 (MQCA-OVA) 的合成:将 25mmol 的 MQCA 溶于 0.5mL 的二甲基甲酰胺中,再加入 25mmol 的 DIC,搅拌 30min,然后加入 40mmol 的 N-羟基琥珀酰亚胺,37℃ 避光搅拌反应 16h,离心除去沉淀物,离心得到的清液为反应液 A;将 4.4×10^{-4} mmol 卵清白蛋白 (OVA, 分子量为 45000) 溶于 1.5mL 0.02 mol/L 的磷酸缓冲溶液 (pH=7.4) 中,得溶液 B;将溶液 B 逐滴加至反应液 A 中,37℃ 下搅拌过夜,反应液置于超滤管 (分子截留量为 30 KD) 中,离心 10min 后,加入 0.2mol/L pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液 1mL,再离心,重复操作 3~4 次,充分洗去未反应完全的小分子物质,收集滤液,取 1mL 滤液过 0.22 μ m 的滤膜,采用高效液相色谱法检测滤液中游离 MQCA 的浓度;经超滤管截留下的全抗原经冷冻干燥后分装,保存。

[0019] 实施例 3

全抗原 (MQCA-KLH) 的合成:将 25mmol 的 MQCA 溶于 0.5mL 的二甲基甲酰胺中,再加入 25mmol 的 DIC,搅拌 30min,然后加入 40mmol 的 N-羟基琥珀酰亚胺,37℃ 避光搅拌反应 16h,离心除去沉淀物,离心得到的清液为反应液 A;将 2.5×10^{-6} mmol 的钥孔戚血蓝蛋白 (KLH, 分

子量为 8000000)溶于 1.5mL 0.02 mol/L 的磷酸缓冲溶液 (pH=7.4)中,得溶液 B;将溶液 B 逐滴加至反应液 A 中,37℃下搅拌过夜,反应液置于超滤管(分子截留量为 30 KD)中,离心 10min 后,加入 0.2mol/L pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液 1mL,再离心,重复操作 3~4 次,充分洗去未反应完全的小分子物质,收集滤液,取 1mL 滤液过 0.22 μm 的滤膜,采用高效液相色谱法检测滤液中游离 MQCA 的浓度;经超滤管截留下的全抗原经冷冻干燥后分装,保存。

[0020] 实施例 4

全抗原产物偶联比的检测:采用高效液相色谱法,所用填充剂为十八烷基硅烷键合硅胶,流动相为体积比为 60:40 的甲醇水混合液,流速 1.0ml/min,柱温 30℃,紫外检测器:检测波长为 320nm,进样量 10 μL,同时以 MQCA 标准品绘制标准曲线。

$$\text{偶联比} = \frac{m_B - V_{\text{反应}} \times C_1}{M_2 \times n}$$

[0021] 其中, $m_{\text{总}}$ 为 3-甲基喹啉啉-2-羧酸加入的总质量;

C_1 为游离 3-甲基喹啉啉-2-羧酸的浓度;

M_2 为 3-甲基喹啉啉-2-羧酸的摩尔质量;

n 为载体蛋白的摩尔数,偶联比为每个载体蛋白分子上结合 MQCA 的分子个数。

[0022] 所得全抗原 MQCA-BSA、MQCA-OVA、MQCA-KLH 的偶联比分别为 38.73、32.44、62.56,采用上述高效液相色谱法检测的精密度符合要求 (RSD=0.23%),重现性良好 (RSD=1.14%)。

[0023] 实施例 5

将制备好的免疫抗原 MQCA-BSA 用生理盐水稀释到适量浓度,加等量弗氏完全佐剂制成油包水的乳化剂;按 100 μg/只共免疫 6 周龄雌性 Balb/C 小鼠 5 次(首剂量加倍);每隔 2W 免疫 1 次;在腹腔、背部、皮下、颈部多点免疫;第 2、3、4 次免疫时,抗原与等体积弗氏不完全佐剂制成油包水的乳化剂,以同样剂量加强免疫;第 5 次免疫时,抗原不加佐剂经腹腔注射进行冲刺免疫。未免一周后眼眶采血,分离得到血清。该抗原免疫 6 只小鼠后,均可得到抗体效价 ($OD_{\text{阳性}}/OD_{\text{阴性}} \geq 2.0$ 时的最大稀释倍数) 在 128000 以上的 MQCA 多克隆抗体。

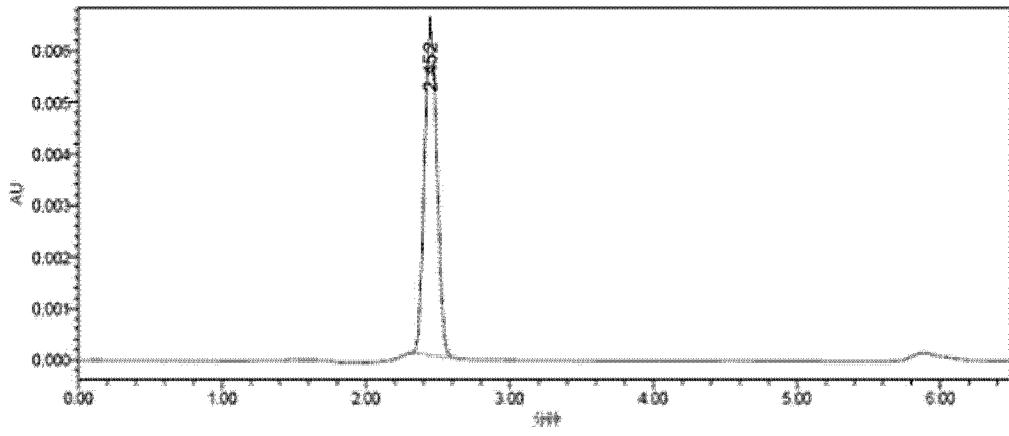


图 1

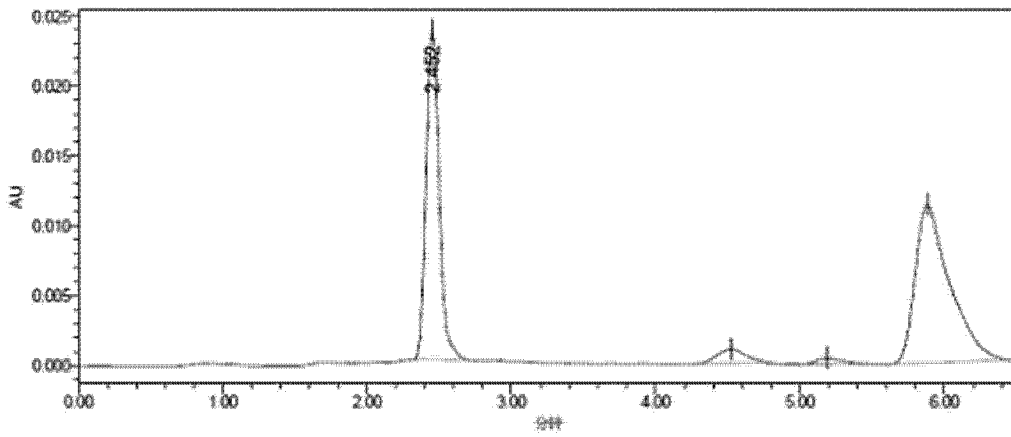


图 2

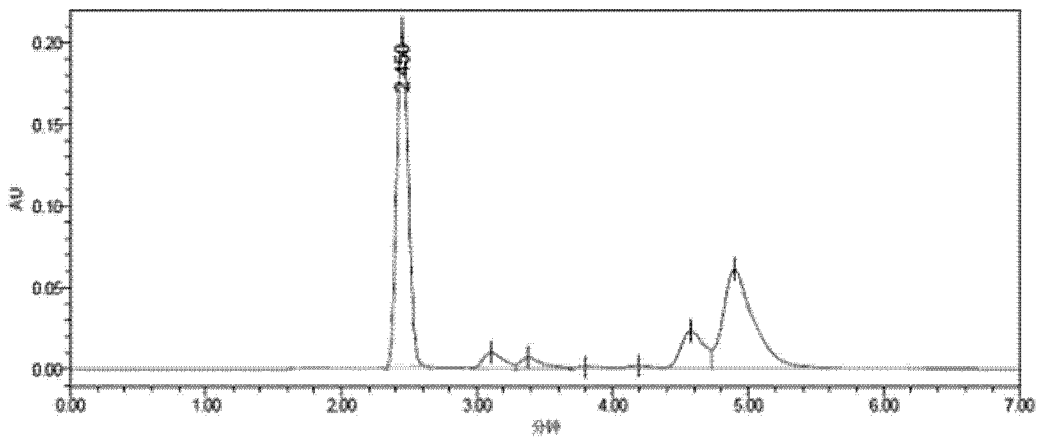


图 3

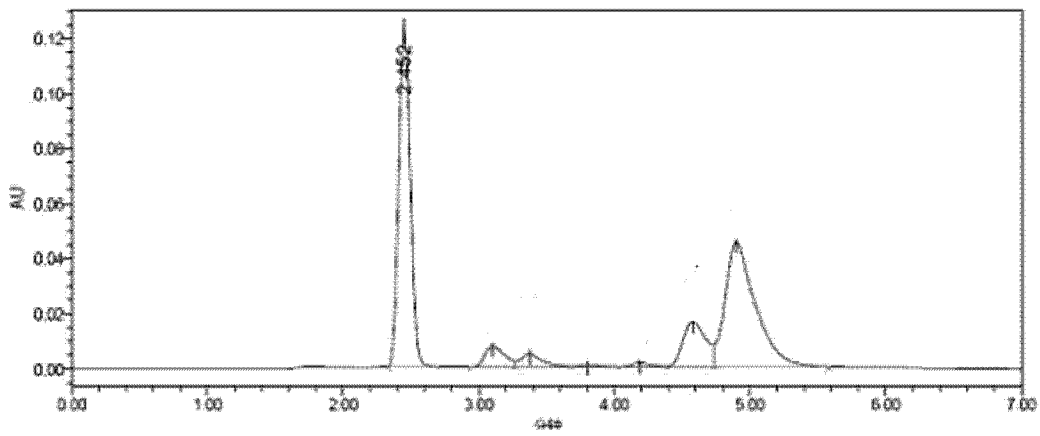


图 4

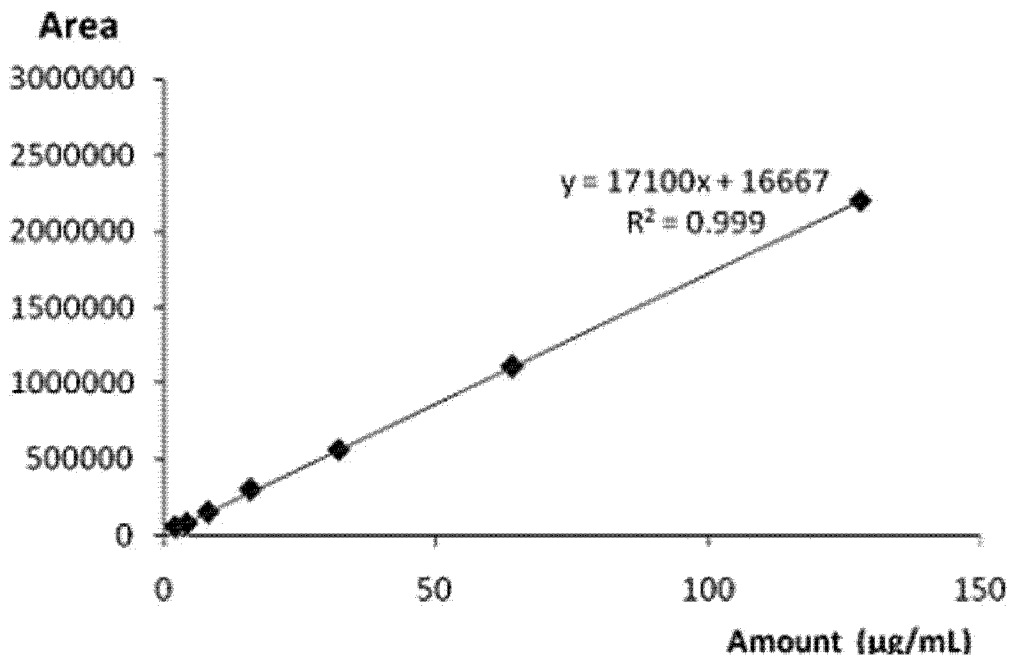


图 5

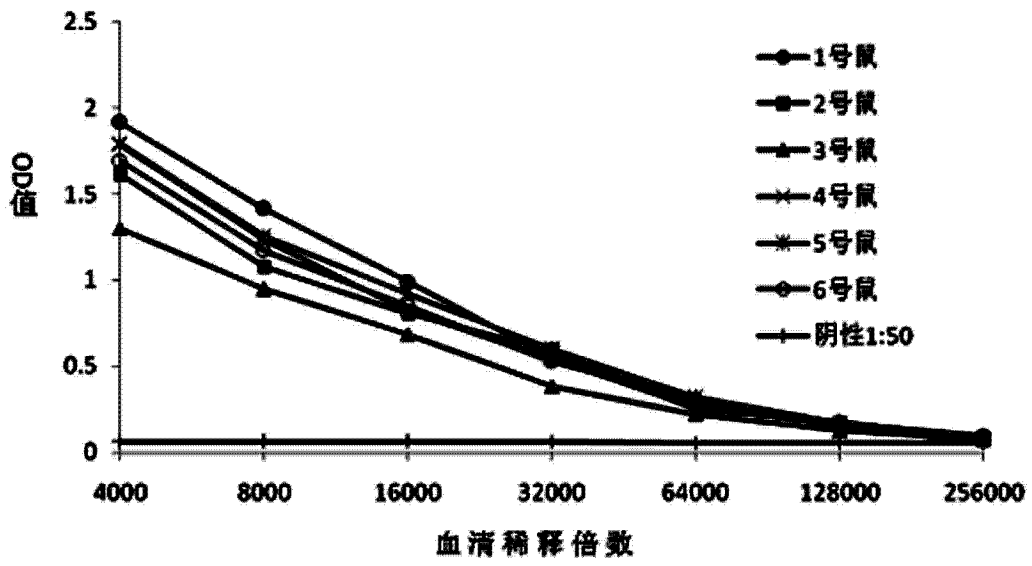


图 6

专利名称(译)	一种喹乙醇残留标示物高偶联比的全抗原合成方法		
公开(公告)号	CN102675455A	公开(公告)日	2012-09-19
申请号	CN201210151680.8	申请日	2012-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所		
[标]发明人	张景艳 李建喜 张凯 杨志强 王磊 王学智 张宏 孟嘉仁 秦哲		
发明人	张景艳 李建喜 张凯 杨志强 王磊 王学智 张宏 孟嘉仁 秦哲		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 G01N33/531 G01N30/02		
其他公开文献	CN102675455B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种高偶联比的喹乙醇残留标示物全抗原合成方法。该方法采用N,N'-二异丙基碳二亚胺为催化剂，3-甲基喹啉-2-羧酸与过量的N-羧基琥珀酰亚胺发生酯化反应，酯化物再与载体蛋白偶联反应即得到高偶联比的喹乙醇残留标示物全抗原。本发明使用的催化剂安全性更高，不易造成操作人员的过敏，且副产物少，所得全抗原偶联比可达到32~62；所得抗原免疫小鼠后，可得到抗体效价在128000以上的MQCA多克隆抗体，与喹乙醇、喹啉酮、痢菌净的交叉反应性均小于20%，与氯霉素、盐酸克伦特罗、抗生素类等无交叉反应性。

