



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110563712 A

(43)申请公布日 2019.12.13

(21)申请号 201910898251.9

G01N 33/531(2006.01)

(22)申请日 2019.09.23

G01N 33/68(2006.01)

(71)申请人 中国农业大学

地址 100191 北京市海淀区圆明园西路2号

(72)发明人 温凯 沈建忠 王战辉 江海洋

于雪芝 张素霞 李红芳 史为民

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限

公司 11245

代理人 吴爱琴

(51)Int.Cl.

C07D 407/04(2006.01)

C07K 14/765(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5页 附图2页

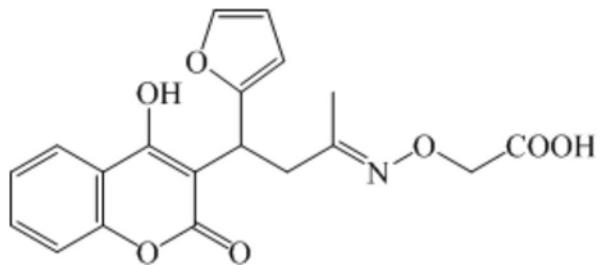
(54)发明名称

克灭鼠半抗原的合成及应用

(57)摘要

本发明提供一种克灭鼠半抗原的合成及应用。所述克灭鼠半抗原的结构式如下所示：通过将克灭鼠与羧甲基羟氨半盐酸盐发生缩合反应制备得到所述克灭鼠半抗原。本发明还提供一种克灭鼠人工抗原，由克灭鼠半抗原与载体蛋白偶联制备得到。本发明提供一种克灭鼠半抗原合成方法，其完全抗原可将克灭鼠的化学结构暴露出来作为抗原决定簇，为高灵敏度抗克灭鼠抗体的制备奠定基础。最终，筛选获得性质最优抗体CF-CMO-BSA-3#，效价最高可达 3.2×10^4 ，灵敏度为0.32ng/mL。利用本发明提供的克灭鼠半抗原制备的克灭鼠多克隆抗体具有灵敏度高，实用价值高等独特优点，在公共卫生安全检测中具有良好的应用前景。

1. 克灭鼠半抗原,其结构式如式I所示:



式I。

2. 制备权利要求1中式I所示克灭鼠半抗原的方法,包括:使得克灭鼠与羧甲基羟氨半盐酸盐发生缩合反应得到式I所示克灭鼠半抗原。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于:所述方法中,克灭鼠与羧甲基羟氨半盐酸盐的质量比为20mg:15mg;

所述缩合反应在吡啶溶液中进行;

所述缩合反应的反应温度为30~80℃,所述缩合反应的时间为5~12h。

4. 克灭鼠人工抗原,由权利要求1中式I所示克灭鼠半抗原与载体蛋白偶联制备得到;

其中,所述载体蛋白为牛血清白蛋白或鸡卵清白蛋白。

5. 制备权利要求4所述的克灭鼠人工抗原的方法,包括:采用生物偶联法-活泼酯法使权利要求1中式I所示克灭鼠半抗原与载体蛋白偶联得到克灭鼠人工抗原。

6. 由权利要求4所述的克灭鼠人工抗原制备得到的特异性抗体,包括多克隆抗体和单克隆抗体。

7. 权利要求1所述的克灭鼠半抗原或权利要求4所述的克灭鼠人工抗原的以下任一应用:

1) 在制备抗克灭鼠特异性抗体中的应用;

2) 在检测抗克灭鼠特异性抗体中的应用。

8. 抗克灭鼠多克隆抗体,由权利要求4所述的克灭鼠人工抗原免疫实验动物获得;

优选地,所述克灭鼠人工抗原由权利要求1中式I所示克灭鼠半抗原与牛血清白蛋白偶联制备得到。

9. 由权利要求6所述的特异性抗体或权利要求8所述的抗克灭鼠多克隆抗体制备的克灭鼠检测试剂或试剂盒。

10. 权利要求6所述的特异性抗体或权利要求8所述的抗克灭鼠多克隆抗体的以下任一应用:

1) 在检测克灭鼠中的应用;

2) 在制备克灭鼠的免疫层析试纸条中的应用;

3) 在制备克灭鼠的胶体金检测试纸条中的应用。

克灭鼠半抗原的合成及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及公共卫生领域,具体涉及一种克灭鼠半抗原、人工抗原的制备方法及其应用。

背景技术

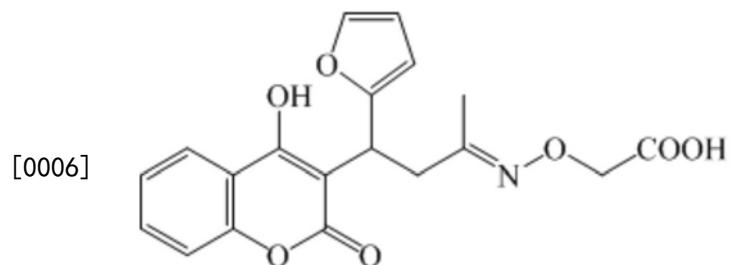
[0002] 克灭鼠 (Coumafuryl, CF) 是一种第一代香豆素类抗凝血剂,其毒性大,灭鼠效果较好,是一种应用颇为广泛的杀鼠剂。因其结构与维生素K相似,可以抑制维生素K参与的凝血因子Ⅱ、VII、IX、X的在肝脏的合成。当鼠食用大量药物后会出现内脏出血至死的现象,从而达到高效灭鼠的效果。而人体摄入过量克灭鼠后会发生皮肤淤血和胃出血、肠道出血等内出血的现象,后果较为严重。由于克灭鼠的灭鼠效果较好,应用广泛,经常会发生一些误食,恶意投毒,二次中毒等中毒事件,严重影响威胁了公共卫生安全。因此,在发生中毒事件后有必要对生物样本中克灭鼠进行检测,为病因的确证和临床治疗奠定基础。

[0003] 目前,生物样品中克灭鼠的检测方法主要有高效液相色谱法,液质联用等仪器分析方法。尽管仪器分析方法是确证方法,但存在检测成本高,需要专门人员进行操作,样品处理复杂等缺点,无法满足快速筛查的要求。免疫分析技术,具有检测速度快、灵敏度高和特异性好的优点,应用较为广泛。免疫分析方法的关键在于抗原的设计和抗体的制备。利用化学合成法,在尽可能保证靶标分子结构不变的情况下对待测物结构进行改造,获得具有活性基团的半抗原。根据半抗原的活性基团,选择相应的生物偶联方法,将半抗原与载体蛋白偶联,制备完全抗原,免疫实验动物,获得抗体,为检测样本中克灭鼠含量的免疫分析方法的建立奠定基础。

发明内容

[0004] 本发明的目的之一是提供一种克灭鼠半抗原及其制备。

[0005] 本发明所提供的克灭鼠半抗原 (CF-CMO),其结构式如式I所示:



式I,

[0007] 上述式I所示克灭鼠半抗原通过包括如下步骤的方法制备得到:

[0008] 使得克灭鼠与羧甲基羟氨半盐酸盐 (CMO) 发生缩合反应得到式I所示克灭鼠半抗原。

[0009] 上述方法中,克灭鼠与羧甲基羟氨半盐酸盐的质量比具体可为20mg:15mg;

[0010] 所述缩合反应在吡啶溶液中进行;

[0011] 所述缩合反应的反应温度可为30-80℃,具体可为60℃;所述缩合反应的时间可为5-12h,具体可为8h。

[0012] 具体地,所述克灭鼠半抗原通过包括如下步骤的方法制备得到:将克灭鼠20mg,CMO 15mg,溶于3mL吡啶溶液中,随后转移到带有冷凝装置的圆底烧瓶中,60℃磁力搅拌反应8h,反应液在水浴氮气仪下吹干(60℃);加入3mL 0.1M的NaHCO₃溶液,涡旋使残渣溶解;并使用5mL乙酸乙酯进行萃取3次;之后水相使用0.1M HCl调pH=3,5mL乙酸乙酯进行萃取3次;有机相使用水浴氮气仪下吹干(30℃),即获得半抗原CF-CMO (23mg)。

[0013] 本发明的克灭鼠半抗原合成路线见图1。

[0014] 本发明的另一目的是提供克灭鼠人工抗原及其制备。

[0015] 本发明所提供的克灭鼠人工抗原,由上述克灭鼠半抗原与载体蛋白偶联制备得到。所述克灭鼠人工抗原可以作为免疫原也可以作为包被原。

[0016] 其中,所述半抗原与载体蛋白偶联的方法为生物偶联法-活泼酯法(active ester method)。

[0017] 所述载体蛋白为牛血清白蛋白(Albumin from bovine serum, BSA)或鸡卵清白蛋白(Ovalbumin, OVA)。

[0018] 所述CF-CMO与载体蛋白的偶联摩尔比可为:0.5:1-30:1,具体可为1.8:1。

[0019] 本发明所述人工抗原分为免疫原和包被原,免疫原可以是CF-CMO-BSA,包被原可以是CF-CMO-OVA。

[0020] 本发明的再一目的是提供由所述克灭鼠人工抗原制备的特异性抗体,包括多克隆抗体和单克隆抗体,优选多克隆抗体。

[0021] 所述多克隆抗体可通过克灭鼠人工抗原免疫实验动物(如小鼠),收集血清纯化获得。

[0022] 本发明的又一目的是提供所述克灭鼠半抗原或所述克灭鼠人工抗原的以下任一应用:

[0023] 1) 在制备抗克灭鼠特异性抗体中的应用;

[0024] 2) 在检测抗克灭鼠特异性抗体中的应用。

[0025] 本发明还提供由所述特异性抗体制备的克灭鼠检测试剂或试剂盒。

[0026] 本发明进一步提供所述特异性抗体的以下任一应用:

[0027] 1) 在检测克灭鼠中的应用;

[0028] 2) 在制备克灭鼠的免疫层析试纸条中的应用;

[0029] 3) 在制备克灭鼠的胶体金检测试纸条中的应用。

[0030] 在本发明的一个具体实施方式中,免疫BALB/c小鼠的方法为:将免疫原用等体积的弗氏完全佐剂乳化后,首次免疫6-8周龄BALB/c小鼠,再用相同剂量的免疫原与等体积的弗氏不完全佐剂乳化后对首次免疫后的BALB/c小鼠进行加强免疫;

[0031] 其中,首次免疫的所述免疫原的剂量为0.1mg/只,乳化好后每只BALB/c小鼠的免疫剂量为0.2mL/只;

[0032] 上述加强免疫次数为2次;

[0033] 上述加强免疫具体为在每次免疫后3周各进行一次加强免疫。

[0034] 所述小鼠抗血清即为鼠源多克隆抗体,在第二次加强免疫一周后,眼球静脉采血,

并离心获得血清。

[0035] 所述分析测定方法为酶联免疫吸附测定法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)；

[0036] 所述ELISA检测方法,包括:间接ELISA法,检测克灭鼠抗体血清效价;间接竞争ELISA法,测定抗体的灵敏度。

[0037] 本发明具有如下有益效果:本发明提供一种克灭鼠半抗原合成方法,其完全抗原可将克灭鼠的化学结构暴露出来作为抗原决定簇,为高灵敏度抗克灭鼠抗体的制备奠定基础。最终,筛选获得性质最优抗体CF-CMO-BSA-3#,效价最高可达 3.2×10^4 ,灵敏度为0.32ng/mL。

[0038] 利用本发明提供的克灭鼠半抗原制备的克灭鼠多克隆抗体具有灵敏度高,实用价值高等独特优点,在公共卫生安全检测中具有良好的应用前景。

附图说明

[0039] 图1为本发明中克灭鼠半抗原CF-CMO合成路线图。

[0040] 图2为本发明实施例制备得到的克灭鼠半抗原CF-CMO的质谱图。

[0041] 图3为载体蛋白BSA和免疫原CF-CMO-BSA的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱图 (MALDI-TOF-MS)。

[0042] 图4为利用抗血清CF-CMO-BSA-3#检测克灭鼠的标准曲线图。

具体实施方式

[0043] 下面通过具体实施例对本发明进行说明,但本发明并不局限于此。

[0044] 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;下述实施例中所用的试剂、生物材料等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0045] 下述实施例中所采用的克灭鼠标准品为德国Dr.Ehrenstorfer公司的产品。

[0046] 化学试剂吡啶,乙酸乙酯,碳酸氢钠,浓盐酸,浓硫酸,N,N-二甲基甲酰胺(DMF)等均为国药集团的产品。

[0047] 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、Proclin 300生物防腐剂,羧甲基羟氨半盐酸盐,偶联剂N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)等均为sigma公司的产品。

[0048] 钮孔血蓝蛋白,牛血清白蛋白,胎牛血清均为sigma公司的产品。

[0049] 羊抗鼠IgG酶标抗体为Jackson Immunoresearch的产品。

[0050] 96孔酶标板购自costar公司。

[0051] BALB/c小鼠购自北京维通利华。

[0052] 实施例1、克灭鼠半抗原CF-CMO的制备和鉴定

[0053] 称取克灭鼠20mg,羧甲基羟氨半盐酸盐(CMO)15mg,溶于3mL吡啶溶液中,随后转移到带有冷凝装置的圆底烧瓶中,60℃磁力搅拌反应8h,反应液在水浴氮气仪下吹干(60℃)。加入3mL 0.1M的NaHCO₃溶液,涡旋使残渣溶解。并使用5mL乙酸乙酯进行萃取3次。之后水相使用0.1M HCl调pH=3,5mL乙酸乙酯进行萃取3次。有机相使用水浴氮气仪下吹干(30℃),即获得半抗原CF-CMO(23mg)。(合成路径图见图1)

[0054] 用质谱对纯化后的半抗原进行鉴定(见图2),CF-CMO:MS m/z 393.8[M-Na]⁺,质谱数据与CF-CMO分子量(MW=371.1)相符,结果表明半抗原CF-CMO合成成功,可以用于抗体的制备。

[0055] 实施例2、克灭鼠人工抗原的制备

[0056] 称取克灭鼠半抗原(CF-CMO)10mg,溶解于300μL DMF中,得到半抗原溶液。再向制备的半抗原溶液中加入5mg EDC和3mg NHS(流程图见图1),置于磁力搅拌器上,300rpm室温反应5h。将反应后的溶液离心(5000rmp),取上清(280μL)。后取40mg BSA和50mg OVA,分别溶于7mL含5%(体积百分含量)DMF的PBS缓冲液和9mL含5%(体积百分含量)DMF的PBS缓冲液中,得到两种蛋白溶液。分别向两种蛋白溶液中滴加200μL和180μL上述上清液,置于磁力搅拌器反应5h,即可获得半抗原与载体蛋白的偶联物(人工抗原)。将上述所制备的蛋白偶联物转移到截留分子量为10KD的透析袋中,然后将透析袋置于PBS缓冲液(0.01mol/L PBS, pH=7.4)中4℃透析3天。取出透析后的人工抗原3000rpm离心10min,收集上清液。CF-CMO-BSA经MALDI-TOF-MS鉴定,可得载体蛋白BSA与半抗原CF-CMO的偶联比为1:1.8,结果证明免疫原合成成功,可用于小鼠免疫,制备单克隆抗体。

[0057] 实施例3、克灭鼠多克隆抗体的制备和鉴定

[0058] 一、克灭鼠多克隆抗体的制备

[0059] 将上述所准备的CF-CMO-BSA作为免疫原免疫小鼠共6只,将CF-CMO-OVA作为包被原作为抗血清检测的包被原。用Bradford法测定完全抗原的浓度,经测定可得CF-CMO-BSA和CF-CMO-OVA的浓度均为5mg/mL。

[0060] 首次免疫时将免疫原稀释至1mg/mL(用0.01mol/L PBS稀释),取稀释后的免疫原与弗氏完全佐剂等体积混合,并充分乳化,颈背部皮下多点接种6-8周龄BALB/c小鼠(6只),接种免疫原剂量为100μg/只,注射剂量为0.2mL/只。之后,每隔3周加强免疫一次,加强免疫时将免疫原与等体积的弗氏不完全佐剂乳化。免疫原的免疫剂量与首次免疫剂量相同,加强免疫次数为2次。

[0061] 二、小鼠多克隆抗体的检测

[0062] 在第2次加强免疫完成一周后对小鼠眼球采血,4000rpm离心共获得6种抗血清(即多克隆抗体),抗血清分别命名按照CF-CMO-BSA-1#,CF-CMO-BSA-2#的规律进行命名。用经典棋盘法测抗血清效价以及用间接竞争ELISA法测抗血清灵敏度。

[0063] 1、抗血清效价的测定

[0064] 用间接ELISA法对抗体效价进行检测。间接ELISA法步骤如下:

[0065] (1)包被:用0.05M的碳酸盐缓冲液(pH 9.6)将包被原CF-CMO-OVA稀释成0.5μg/mL,并加入96孔透明酶标板中(100μL/孔),4℃过夜孵育10h,用PBST缓冲液洗板3次。

[0066] (2)封闭:加入封闭液(2%脱脂牛奶)150μL/孔,37℃温箱孵育1.5h,弃封闭液,用PBST缓冲液洗涤1次,拍干。

[0067] (3)加待测抗体:各列孔加入50μL 0.01M PBS(pH 7.4),再加入50μL稀释后的克灭鼠多克隆抗体,抗体从1:1000开始,以2为梯度用0.01M PBS开始稀释,一共稀释8个浓度。加样量为每孔50μL,37℃温箱反应30min,PBST缓冲液洗涤3次,拍干。同时设置未经免疫的小鼠抗血清作为阴性对照。

[0068] (4)加酶标二抗:加入用酶标二抗稀释液按照体积比1:5000稀释的HRP标记羊抗鼠

IgG抗体,100μL/孔,37℃温箱反应30min,PBST缓冲液洗涤3次,拍干。

[0069] (5) 显色:将辣根过氧化物酶底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液和质量分数为30%的过氧化氢按照1:1的体积比混合,加入微孔板中(100μL/孔),37℃温箱显色15min。

[0070] (6) 终止:每孔加入50μL 2mol/L的浓硫酸。

[0071] (7) 读数:以OD_{450nm}波长测定各孔OD值。以阴性OD值不大于0.15,以最大OD值在1.5-1.8之间对应的抗体稀释度为抗体效价。抗血清的最佳稀释度见表1,由表中数据可得,所有抗血清的稀释度均在0.8×10⁴以上,说明用合成的半抗原偶联载体蛋白去免疫小鼠,可以获得较好的免疫效果。其中抗血清CF-CMO-BSA-3#和CF-CMO-BSA-5#的效价最高,均为3.2×10⁴。

[0072] 2、多克隆抗体IC₅₀的测定

[0073] (1) 包被、封闭过程同上述“1、抗体效价的测定”中包被与封闭过程”。

[0074] (2) 加标准品和抗体:每孔加入50μL克灭鼠标准品溶液和50μL抗体稀释液(按照表1中的抗体效价进行稀释),37℃孵育30min,然后用PBST溶液洗涤3次,拍干。标准品溶液的溶剂为PBS缓冲液,标准品浓度分别为0、0.01、0.03、0.09、0.27、0.81、2.43、7.29、21.87和65.61ng/mL的溶液,每个浓度三个平行。

[0075] (3) 加酶标二抗,显色,终止及读数过程同上述“1、抗体效价的测定”。

[0076] 将所测得的数据以- \log_{10} (竞争物)值为横坐标,以OD₄₅₀值为纵坐标,利用Origin 8.0的四参数方程进行拟合,建立标准曲线获得IC₅₀值。6种多克隆抗体的IC₅₀值见表1,由表中数据可得,CF-CMO-BSA-3#的IC₅₀最低,为0.32ng/mL(见图4)。结果表明,文中所设计的半抗原结构CF-CMO作为抗原决定簇,可以很好的刺激小鼠产生高灵敏度抗体。

[0077] 表1.抗血清性质表征表

抗血清编号	包被原浓度	抗体稀释度(10 ⁴)	IC ₅₀ (ng/mL)
[0078]	CF-CMO-BSA-1#	1.6	8.21
	CF-CMO-BSA-2#	0.8	6.75
	CF-CMO-BSA-3#	0.5 μg/mL	0.32
	CF-CMO-BSA-4#	CF-CMO-OVA	1.6
	CF-CMO-BSA-5#		3.2
	CF-CMO-BSA-6#		1.6

[0079] 注:此表格中IC₅₀测定时的检测标准物为克灭鼠。

[0080] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之做一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

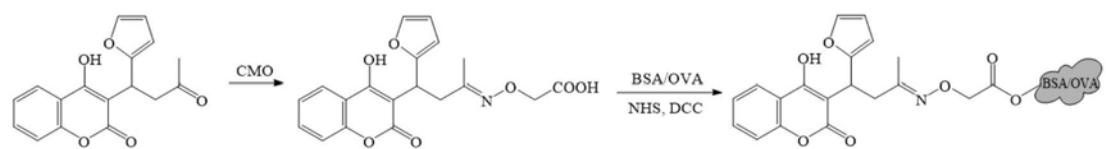


图1

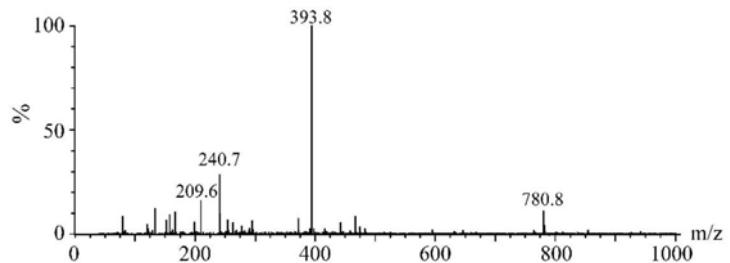


图2

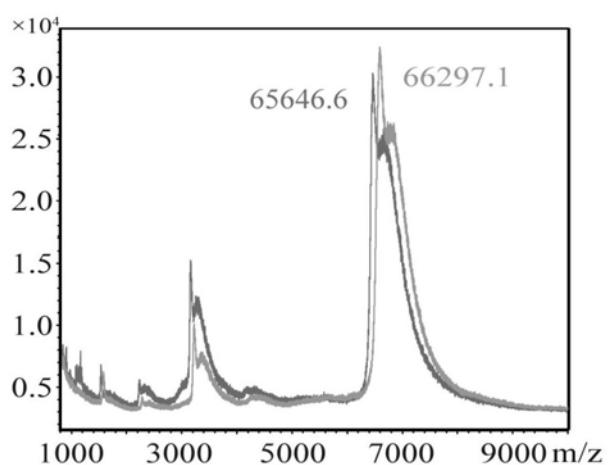


图3

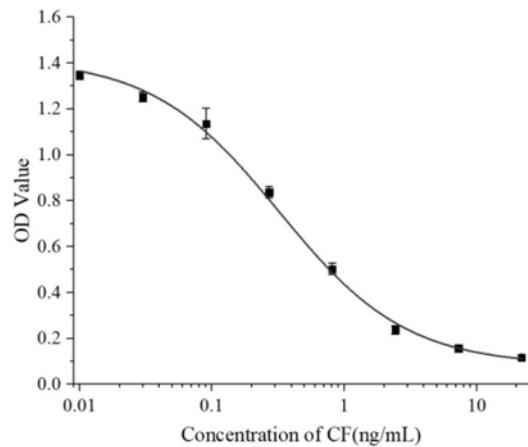
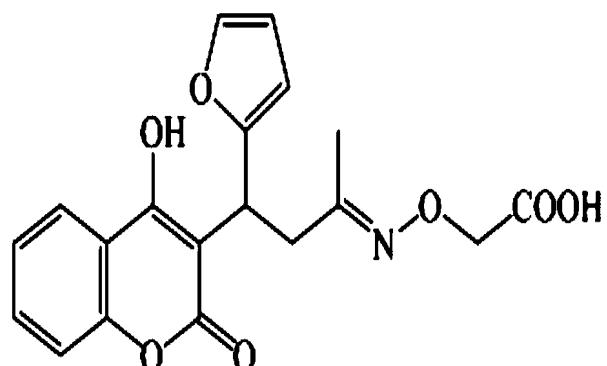


图4

专利名称(译)	克灭鼠半抗原的合成及应用		
公开(公告)号	CN110563712A	公开(公告)日	2019-12-13
申请号	CN201910898251.9	申请日	2019-09-23
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	温凯 沈建忠 王战辉 江海洋 于雪芝 张素霞 李红芳 史为民		
发明人	温凯 沈建忠 王战辉 江海洋 于雪芝 张素霞 李红芳 史为民		
IPC分类号	C07D407/04 C07K14/765 C07K14/77 C07K1/113 C07K16/44 G01N33/531 G01N33/68		
CPC分类号	C07D407/04 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 G01N33/531 G01N33/6854 G01N2430/00		
代理人(译)	吴爱琴		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明提供一种克灭鼠半抗原的合成及应用。所述克灭鼠半抗原的结构式如下所示：通过将克灭鼠与羧甲基羟氨半盐酸盐发生缩合反应制备得到所述克灭鼠半抗原。本发明还提供一种克灭鼠人工抗原，由克灭鼠半抗原与载体蛋白偶联制备得到。本发明提供一种克灭鼠半抗原合成方法，其完全抗原可将克灭鼠的化学结构暴露出来作为抗原决定簇，为高灵敏度抗克灭鼠抗体的制备奠定基础。最终，筛选获得性质最优抗体CF-CMO-BSA-3#，效价最高可达 3.2×10^4 ，灵敏度为0.32ng/mL。利用本发明提供的克灭鼠半抗原制备的克灭鼠多克隆抗体具有灵敏度高，实用价值高等独特优点，在公共卫生安全检测中具有良好的应用前景。



式I。