

[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 200810162182.7

[51] Int. Cl.
C07D 241/42 (2006.01)
G01N 33/536 (2006.01)

[43] 公开日 2009年5月13日

[11] 公开号 CN 101429167A

[22] 申请日 2008.11.18

[21] 申请号 200810162182.7

[71] 申请人 浙江林学院

地址 311300 浙江省临安市锦城街道环城北路88号

[72] 发明人 郭明 庞钰权 孔新刚

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司
代理人 周烽

权利要求书2页 说明书14页

[54] 发明名称

新的镉离子人工抗原螯合剂制备方法

[57] 摘要

一种新的镉离子人工抗原螯合剂制备方法，以4-硝基邻苯二胺为原料经过缩合、溴化、消除等一系列反应化学合成了6-溴乙酰氨基-2,3-(N,N,N',N'-四乙酸)二甲胺基喹啉，简称BAT-DQ，以该新螯合剂先与镉离子螯合形成Cd-BAT-DQ，再与载体蛋白质偶联成人工抗原Cd-BAT-DQ-BSA，通过免疫BALB/c小鼠，然后通过杂交瘤制备技术获得针对重金属镉螯合物的单克隆抗体，用于检测环境、食品、水体中重金属镉的残留。本发明具有快速、灵敏、成本低、特别适合大批量样品现场快速检测的特点，尤其是本新螯合剂的成功合成，为镉离子人工抗原的合成提供了全新的、低成本的、稳定而灵敏的核心原料，应用推广前景广阔。

1、一种新的镉离子人工抗原整合剂制备方法，其特征在于包括下列步骤：

1) 6-硝基-2, 3-二甲基喹啉的合成：

将 2 g 4-硝基邻苯二胺和 1.13 g 丁二酮放入 250 mL 单口烧瓶中，以 50 mL 无水乙醇为溶剂，加热回流 2 h，冷却至室温后抽滤，加 30 mL 无水乙醇结晶提纯，所得产物即为 6-硝基-2, 3-二甲基喹啉；

2) 6-硝基-2, 3-二溴甲基喹啉的合成：

取 0.5 g 第一步产物 6-硝基-2, 3-二甲基喹啉、0.202 g 偶氮二异丁腈与 1.14 g N-溴代琥珀酰亚胺置于干燥的 250 mL 单口圆底烧瓶中，再取 40 mL CCl_4 加入烧瓶中，装上回流冷凝管，抽真空并用氩气保护，将烧瓶置于事先加热到 80℃ 的油浴中，强力搅拌，并用火焰枪辅助加热使之快速回流，待反应完毕后，将混合物冷却至室温再过滤，取滤液放入水浴锅中蒸馏、冷却，得 6-硝基-2, 3-二溴甲基喹啉；

3) 6-硝基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹啉的合成：

在装有机械搅拌、回流冷凝管和恒压漏斗的三口烧瓶中，加入 1.99 mL 亚氨基二乙酸二乙酯、10 mL 干燥的乙腈和 2.63 g 无水碳酸钾粉末，搅拌下向反应混合液中滴加溶有 1.805 g 6-硝基-2, 3-二溴甲基喹啉的 10 mL 干燥的乙腈，回流 8-10 h，冷却，滤去碳酸钾，滤液减压下旋转蒸发回收溶剂，得淡黄色油状液体，往上述油状液中加入含 3.48 g $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ 的饱和溶液，室温下充分搅拌至油状液均转化为白色沉淀，抽滤钡盐并用蒸馏水充分浸泡、洗涤。然后将此钡盐转移到 15 mL 水中，将混合物加热煮沸，加入硫酸至清液中不再出现混浊，过滤除去硫酸钡，再用沸水煮洗硫酸钡残渣 3 次，将滤液

和洗涤液合并，冰箱中冷却 8-10 h 得到 6-硝基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉；

4) 6-氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉的合成：

将 100 mL 乙醇和 2.025 g 6-硝基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉加入到 250 mL 装有温度计、机械搅拌器的三口瓶中，搅拌加入 1.2 g 钨碳催化剂和 5.29 g 水合肼在 80-85℃ 条件下反应 4 h 后，趁热过滤，滤液经减压蒸去乙醇，冷却后所得固体用 50 mL 苯重结晶，得到 6-氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉；

5) 6-溴乙酰氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉的合成：

取 5.05 g 溴乙酰溴溶于 30 mL 三氯化碳中，2.105 g 碳酸氢钠溶于 100 mL 水中，冰浴中将碳酸氢钠溶液缓慢滴入到溴乙酰溴溶液中，取 18.722 g 6-氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉装入三口烧瓶中，温度保持在 50-60℃，快速搅拌的同时把溴乙酰溴和碳酸氢钠混合液缓慢地滴入 6-氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉中，并用氢氧化钠溶液控制反应体系的 pH 为 12.0，滴加完毕，升温到 90℃，搅拌，将溶剂全部蒸出，加入 50 mL 浓盐酸，过滤分离出 NaCl，然后往盐酸提取液中加入 150 mL 无水乙醇，产生白色沉淀，4℃ 存放 8-10 h，用 50% 的乙醇水溶液重结晶，得 6-溴乙酰氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉，简称 BATDQ，即为本发明的新螯合剂。

新的镉离子人工抗原整合剂制备方法

技术领域

本发明涉及一种新的双功能整合剂，尤其是镉离子人工抗原的新整合剂的制备方法。

背景技术

在重金属免疫分析技术中需进行人工抗原的合成，合成重金属人工抗原是利用双功能整合剂先与重金属形成稳定的螯合物(半抗原分子)，再与载体蛋白质偶联形成重金属-整合剂-载体蛋白质人工抗原，相对于重金属镉而言，目前已有的化合物中很难找到合适的双功能整合剂，有的结构不太适合，有的价格过于昂贵，不易大量应用，阻碍了重金属镉人工抗原的有效合成。如CN10106337“重金属镉单克隆抗体的制备方法”中采用日本进口的1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸作为镉离子的双功能整合剂，售价高达300元/mg，推广与应用受到限制，故寻找具有自主知识产权的用于镉人工抗原合成的双功能整合剂，并进而制备相应的单克隆抗体，进行重金属镉残留污染的快速检测具有十分重要的现实意义。

发明内容

本发明的目的是提供一种针对重金属镉的双功能整合剂 6-

溴乙酰氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹啉的制备方法, 并公开基于此双功能螯合剂的人工抗原合成和单克隆抗体的制备方法和检测结果, 以进一步验证本螯合剂在人工抗原合成中的应用效果。

本发明的目的通过如下措施实现:

新螯合剂 BATDQ 的制备方法包括如下步骤:

1) 6-硝基-2, 3-二甲基喹啉的合成:

将 2 g 4-硝基邻苯二胺和 1.13 g 丁二酮放入 250 mL 单口烧瓶中, 以 50 mL 无水乙醇为溶剂, 加热回流 2 h, 冷却至室温后抽滤, 加 30 mL 无水乙醇结晶提纯, 所得产物即为 6-硝基-2, 3-二甲基喹啉;

2) 6-硝基-2, 3-二溴甲基喹啉的合成:

取 0.5 g 第一步产物 6-硝基-2, 3-二甲基喹啉、0.202 g 偶氮二异丁腈与 1.14 g N-溴代琥珀酰亚胺置于干燥的 250 mL 单口圆底烧瓶中, 再取 40 mL CCl_4 加入烧瓶中, 装上回流冷凝管, 抽真空并用氩气保护, 将烧瓶置于事先加热到 80℃ 的油浴中, 强力搅拌, 并用火焰枪辅助加热使之快速回流, 待反应完毕后, 将混合物冷却至室温再过滤, 取滤液放入水浴锅中蒸馏、冷却, 得 6-硝基-2, 3-二溴甲基喹啉;

3) 6-硝基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹啉的合成:

在装有机械搅拌、回流冷凝管和恒压漏斗的三口烧瓶中, 加

入 1.99 mL 亚氨基二乙酸二乙酯、10 mL 干燥的乙腈和 2.63 g 无水碳酸钾粉末，搅拌下向反应混合物中滴加溶有 1.805 g 6-硝基-2, 3-二溴甲基喹啉的 10 mL 干燥的乙腈，回流 8-10 h，冷却，滤去碳酸钾，滤液减压下旋转蒸发回收溶剂，得淡黄色油状液体，往上述油状液中加入含 3.48g $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 的饱和溶液，室温下充分搅拌至油状液均转化为白色沉淀，抽滤钡盐并用蒸馏水充分浸泡、洗涤。然后将此钡盐转移到 15mL 水中，将混合物加热煮沸，加入硫酸至清液中不再出现混浊，过滤除去硫酸钡，再用沸水煮洗硫酸钡残渣 3 次，将滤液和洗涤液合并，冰箱中冷却 8-10 h 得到 6-硝基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹啉；

4) 6-氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹啉的合成：

将 100 mL 乙醇和 2.025g 6-硝基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹啉加入到 250 mL 装有温度计、机械搅拌器的三口瓶中，搅拌加入 1.2 g 钨碳催化剂和 5.29 g 水合肼在 80-85℃ 条件下反应 4 h 后，趁热过滤，滤液经减压蒸去乙醇，冷却后所得固体用 50 mL 苯重结晶，得到 6-氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹啉；

5) 6-溴乙酰氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹啉的合成：

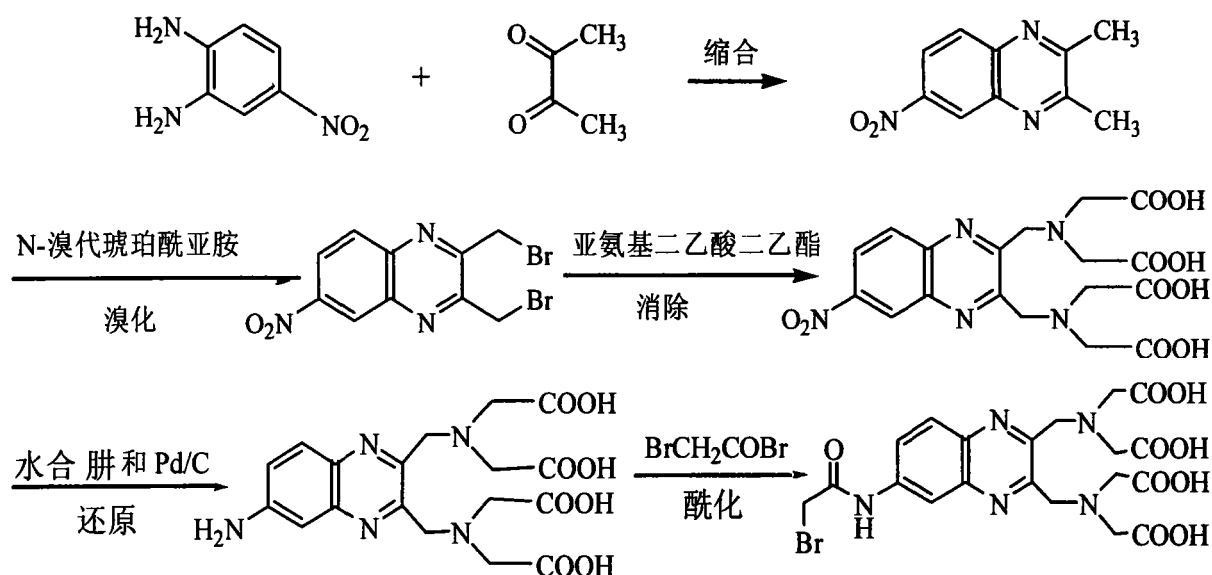
取 5.05 g 溴乙酰溴溶于 30 mL 三氯化碳中，2.105 g 碳酸氢钠溶于 100 mL 水中，冰浴中将碳酸氢钠溶液缓慢滴入到溴乙酰

溴溶液中，取 18.722 g 6-氨基-2,3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉装入三口烧瓶中，温度保持在 50-60℃，快速搅拌的同时把溴乙酰溴和碳酸氢钠混合液缓慢地滴入 6-氨基-2,3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉中，并用氢氧化钠溶液控制反应体系的 pH 为 12.0，滴加完毕，升温到 90℃，搅拌，将溶剂全部蒸出，加入 50 mL 浓盐酸，过滤分离出 NaCl，然后往盐酸提取液中加入 150 mL 无水乙醇，产生白色沉淀，4℃ 存放 8-10 h，用 50% 的乙醇水溶液重结晶，得 6-溴乙酰氨基-2,3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉 (6-bromine acetamido-2,3-(N, N, N', N'-tetraacetyl) dimethylamino-quinoxaline, 简称 BATDQ)，即为本发明的新螯合剂。

本发明的有益效果是应用本双功能螯合剂偶联率通过原子吸收分光光度法检测达到 11-15: 1，符合要求，原料和人工等成本价格为 30 元/mg，成本低；合成人工抗原免疫原性强，稳定性好，所制备的抗血清效价达到 3×10^5 ；获得的单克隆抗体检出限低为 1pbb、特异性强，制备过程简单。

具体实施方式

本发明下面用结构式表示各原料合成新螯合剂的反应路线：



本螯合剂的合成以 4-硝基邻苯二胺为核心原料，经过缩合、溴化、消除、还原、酰化一系列反应化学合成了 6-溴乙酰氨基-2,3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉化合物，一方面它具有的四乙酸结构能与镉离子形成稳定的螯合物，另一方面溴乙酰氨基团上的溴在弱碱性条件下极易与蛋白分子上的氨基发生缩合反应，形成了镉离子-螯合剂-载体蛋白质复合物，从而实现了重金属镉离子人工抗原的合成。

这种新型螯合剂的成功合成为重金属镉人工抗原合成提供了较为简便的手段，为重金属镉的酶免疫分析技术奠定了基础。同时，将新合成的人工抗原通过小鼠免疫、细胞融合等生物学技术最后获得高效价、高灵敏度的单克隆抗体，进而建立起一套针对重金属镉的可靠免疫学速测技术。

本申请是对传统的重金属镉离子检测技术的有益补充，为重金属镉污染残留的在线速测方法提供了新途径，以快速、灵敏、成本低、便于对多个样品进行在线操作等优点决定了能更好的适应重金属镉分析任务重、要求高的特点，其技术特点适合重金属镉快速检测的发展方向。经文献检索和市场调查，6-溴乙酰氨基-2,3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉的合成及基于此

螯合剂的重金属镉单克隆抗体在国内外尚未见报道和应用。

因合成镉单克隆抗体所需 BATDQ 螯合剂的量不多，所以均以实验室设备制备，反应中涉及的用量以克、毫克、毫升计量，如需大批量推广，再折算成千克、升计量，并用工业化手段采用反应釜等相应设备生产，这是同行技术人员易于掌握的。又因权利要求书中的各原料、加入量、反应条件都给出了单个数值，不是区间值，属最佳方案，所以下面只给出一个最佳实施例。

最佳实施例：

本新螯合剂的合成方法包括下列步骤：

1) 6-硝基-2, 3-二甲基喹啉的合成：

将 2 g 4-硝基邻苯二胺和 1.13 g 丁二酮放入 250 mL 单口烧瓶中，以 50 mL 无水乙醇为溶剂，加热回流 2 h，冷却至室温后抽滤，加 30 mL 无水乙醇结晶提纯，所得产物即为 6-硝基-2, 3-二甲基喹啉；

2) 6-硝基-2, 3-二溴甲基喹啉的合成：

取 0.5 g 第一步产物 6-硝基-2, 3-二甲基喹啉、0.202 g 偶氮二异丁腈与 1.14 g N-溴代琥珀酰亚胺置于干燥的 250 mL 单口圆底烧瓶中，再取 40 mL CCl_4 加入烧瓶中，装上回流冷凝管，抽真空并用氩气保护，将烧瓶置于事先加热到 80℃ 的油浴中，强力搅拌，并用火焰枪辅助加热使之快速回流，待反应完毕后，将混合物冷却至室温再过滤，取滤液放入水浴锅中蒸馏、冷却，得 6-硝基-2, 3-二溴甲基喹啉；

3) 6-硝基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹啉的合成：

在装有机械搅拌、回流冷凝管和恒压漏斗的三口烧瓶中，加入 1.99 mL 亚氨基二乙酸二乙酯、10 mL 干燥的乙腈和 2.63 g 无

水碳酸钾粉末，搅拌下向反应混合液中滴加溶有 1.805 g 6-硝基-2, 3-二溴甲基喹喔啉的 10 mL 干燥的乙腈，回流 8-10 h，冷却，滤去碳酸钾，滤液减压下旋转蒸发回收溶剂，得淡黄色油状液体，往上述油状液中加入含 3.48 g $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 的饱和溶液，室温下充分搅拌至油状液均转化为白色沉淀，抽滤钡盐并用蒸馏水充分浸泡、洗涤。然后将此钡盐转移到 15 mL 水中，将混合物加热煮沸，加入硫酸至清液中不再出现混浊，过滤除去硫酸钡，再用沸水煮沸洗硫酸钡残渣 3 次，将滤液和洗涤液合并，冰箱中冷却 8-10 h 得到 6-硝基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉；

4) 6-氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉的合成：

将 100 mL 乙醇和 2.025 g 6-硝基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉加入到 250 mL 装有温度计、机械搅拌器的三口瓶中，搅拌加入 1.2 g 钨碳催化剂和 5.29 g 水合肼在 80-85 °C 条件下反应 4 h 后，趁热过滤，滤液经减压蒸去乙醇，冷却后所得固体用 50 mL 苯重结晶，得到 6-氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉；

5) 6-溴乙酰氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉的合成：

取 5.05 g 溴乙酰溴溶于 30 mL 三氯化碳中，2.105 g 碳酸氢钠溶于 100 mL 水中，冰浴中将碳酸氢钠溶液缓慢滴入到溴乙酰溴溶液中，取 18.722 g 6-氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉装入三口烧瓶中，温度保持在 50-60 °C，快速搅拌的同时把溴乙酰溴和碳酸氢钠混合液缓慢地滴入 6-氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉中，并用氢氧化钠溶液控制反应体系的 pH 为 12.0。滴加完毕，升温到 90 °C，搅拌，将溶剂

全部蒸出，加入 50 mL 浓盐酸，过滤分离出 NaCl，然后往盐酸提取液中加入 150 mL 无水乙醇，产生白色沉淀，4℃ 存放 8-10 h，用 50% 的乙醇水溶液重结晶，得 6-溴乙酰氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹啉，简称为 BATDQ。

用本新螯合剂合成重金属镉人工抗原的方法按如下步骤进行：

1) 人工抗原的合成：

取 BATDQ 0.8 mg，用 pH 为 7.5， $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液定容至 2 mL，加入 0.4 mg 的 CdCl_2 ，搅拌使其混合均匀，反应 30 min，将 5 mg 牛血清白蛋白 (BSA) 用磷酸盐缓冲液定容至 2 mL，室温下，将其缓慢加入 BATDQ 和 CdCl_2 的混合溶液中，并用 KOH 调节 pH 到 9.5，室温下搅拌反应 20 min，存放于 4℃ 冰箱反应 8-10 h。

将充分反应的混合液在使用前用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EDTA 和去离子水冲洗过的截留分子量为 30KD 的超滤管，在 3000 rpm/min 的条件下离心 10 min，用 pH 为 7.4， $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 不断冲洗，直至保留液中不再含游离的小分子物质为止，用 Tris-HCl 稀释至 5 mL，-20℃ 冰箱保存，待用；

2) 包被原的合成：

用新合成的双功能螯合剂 BATDQ 先与重金属镉离子螯合形成 Cd-BATDQ·螯合物，再以人血清白蛋白 (HSA) 为载体，合成 Cd-BATDQ-HSA 包被抗原；

3) 原子吸收法对偶联结果的鉴定：

分别配制镉标液 (0.1 、 0.3 、 0.5 、 0.7 、 $0.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)，做标准曲线，将偶联产物取 1 mL 稀释 20 倍用原子吸收法检测镉的含量。经原子吸收分光光度法检测人工抗原 Cd-BATDQ-BSA、

Cd-BATDQ-HSA 中镉离子的含量分别为 $20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $26.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，经计算两种人工抗原的偶联率分别为 11-12:1、14-15:1，偶联比率符合制备抗体要求。

4) SDS-PAGE 法对偶联结果的鉴定:

采用 SDS-PAGE 不连续电泳，以 Tris-HCl 作为缓冲体系，10% 分离胶，5% 浓缩胶。样品在浓缩胶上电泳时以恒定电流 (20 mA) 电泳，待其转入分离胶后恒定电流 (30 mA)，电泳至溴酚蓝距分离胶底边 1 cm 左右停止。卸开电泳槽，取出胶板，固定液固定 40 min，敏化 30 min，水洗 4 次，银染，最后显色呈像。电泳结果显示，人工抗原 Cd-BATDQ-BSA、Cd-BATDQ-HSA 在电泳中的泳动速度明显落后于其相应的载体蛋白，且偶联后的人工抗原与原载体蛋白相比增加的分子量在 6000 D 左右。

用人工抗原制备重金属镉单克隆抗体的方法包括如下步骤:

1) 小鼠免疫及抗血清制备:

选用 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠 8 只，将人工抗原与佐剂 (完全或不完全) 按 1:1 比例混合，注射器双推法使其混合均匀，初次免疫将人工抗原与完全佐剂乳化，腹腔、皮下、颈部每只小鼠注射 0.2 mL，一免 3 周后进行二免，剂量和途径同第一次，从二免开始佐剂换用不完全佐剂，每隔两周分别进行三免、四免，四免后采血清，检测效价，取效价高的继续加强免疫，加强免疫时抗原不加任何佐剂;

加强免疫 3 天后，摘眼球取小鼠血液于灭菌的康氏管内，室温放置 1h，在超净工作台用无菌管把血块和管壁剥离， 37°C 恒温 2 h 后， 4°C 冰箱中反应 8-10 h，使血清充分析出，收集血清，将血清 1000 rpm/min 离心 10 min，收集上清，将血清分装， -20°C 保存;

2) 抗血清效价检测:

用 pH 为 9.6, $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸盐包被缓冲液将包被抗原 Cd-BATDQ-HSA 稀释为 $2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $100 \text{ } \mu\text{L}/\text{孔}$, 包被到酶标板上, 4°C 反应 8-10 h;

倾去板孔液, 用 pH 为 7.4, $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸盐洗涤液洗涤 3 次, 3 min/次, 拍干;

加入 10% 小牛血清作为封闭液, $200 \text{ } \mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 孵育 3 h, 同前洗涤;

加入用抗血清稀释液按 400、800、1600、3200、6400、12800、25600、51200 倍稀释的抗血清, 设置空白对照, 并用正常小鼠血清作为阴性对照, 37°C 孵育 1 h, 洗涤;

加入 1:5000 稀释的羊抗小鼠酶标 IgG-HRP, $100 \text{ } \mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 孵育 1 h, 同前洗涤;

加入邻苯二胺底物显色, $100 \text{ } \mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 显色 15 min;

加入 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ 终止显色反应, $50 \text{ } \mu\text{L}/\text{孔}$, 终止反应 5 min;

于 492 nm 波段处测吸光值, 以样品孔的 OD 值大于阴性孔的 OD 值的 2 倍为阳性, 经间接 ELISA 法检测抗血清的效价达到 1×10^5 。

3) 细胞融合:

(1) 在无菌条件下, 制备饲养细胞, 取效价高的 BALB/c 小鼠, 最后加强免疫三天后, 制备免疫脾细胞, 并准备对数生长期的 Sp2/0 瘤细胞;

(2) 取 1.0×10^8 个脾细胞, $2.0-5.0 \times 10^7$ 个 Sp2/0 细胞按 1:1-10 的比列加入到 50mL 融合管中, 轻轻摇匀;

(3) $1000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 10 min, 弃上清液;

(4) 将融合管置于掌心轻轻摩擦，以防止细胞沉淀，使细胞松散均匀成糊状；

(5) 将融合管置于 37℃ 水浴中，吸取 1 mL 37℃ 预热的聚乙二醇 4000，缓慢加入融合管中，边加边轻轻摇匀，60 S 内加完；

(6) 在 90 S 内缓慢滴加无血清的 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media) 培养基 30-40 mL，终止融合；

(7) 37℃ 静置 10 min 后，1000 r/min，离心 10 min，弃上清液；

(8) 将融合管置于手掌，摩擦使之松散，加入 60-80 mL HAT 培养基使细胞悬浮，混匀，分装于带有饲养细胞的 96 孔细胞培养板里，100 μ L/孔，37℃、5% CO₂ 培养。

4) 阳性孔的筛选及克隆：

细胞融合后 12-16 d 筛选，采用有限稀释法：

(1) 制备待克隆的杂交瘤细胞悬液，细胞计数，用含 12% 血清的 HT 培养基稀释至每毫升含 5、10 和 15 个细胞 3 种不同的稀释度；

(2) 每种杂交瘤细胞分装于培养有饲养细胞的 96 孔细胞培养板中，每个稀释度分装 32 孔，每孔量为 0.1 mL，每孔的杂交瘤细胞数分别为 0.5、1 和 1.5；

(3) 37℃、5% CO₂ 湿润培养 7-10 天，出现肉眼可见的克隆即用间接 ELISA 法检测抗体效价；

(4) 取抗体检测阳性孔的细胞继续扩大培养并冻存。

5) 腹水型单抗的制备：

(1) 腹腔注射液体石蜡，每只小鼠 0.3-0.5 mL；

(2) 7-10 天用无血清培养基稀释的杂交瘤细胞腹腔接种，每只小鼠注射 5×10^5 个细胞；

(3) 间隔 5 天后, 观察小鼠腹水产生情况, 如腹部明显膨大, 以手触摸时, 皮肤有紧张感, 即用 16 号针头采集腹水, 连续采 2-3 次, 每只小鼠采 5-10 mL 腹水;

(4) 将腹水在 2000 rpm/min 条件下离心 5 min, 除去细胞成分和其他的沉淀物, 收集上清, 测定抗体效价, 分装, -80°C 冻存, 或冻干保存。

6) 腹水型单抗的纯化:

(1) 用微孔滤膜过滤腹水, 除去较大的凝块及脂肪滴, 在 4°C , 10000rpm/min 的条件下离心 15 min, 除去细胞残渣及小颗粒物质;

(2) 饱和硫酸铵法进行粗提;

(3) DEAE 离子交换层析法对单抗进行纯化

至此, 本发明对新螯合剂的制备方法、基于本螯合剂的人工抗原的合成及对应镉螯合物单克隆抗体的制备, 都作了完整而清楚的介绍, 穿插介绍了人工抗原偶联结果的两种鉴定方法, 抗血清效价的检测方法, 进行验证。

为更进一步说明本发明, 下面再介绍抗体效价的检测, 镉标准曲线的建立、抑制率的计算, 并以水果中重金属镉离子的含量为例介绍快速检测法, 便于公众全面了解本发明。

为检测抗体效价的需要, 介绍包被抗原的合成方法:

取 BATDQ 0.8 mg, 用 pH 为 7.5, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液定容至 2 mL, 加入 0.4 mg 的 CdCl_2 , 搅拌使其混合均匀, 反应 30 min, 将 5 mg 人血清白蛋白用磷酸盐缓冲液定容至 2 mL, 室温下, 将其缓慢加入 BATDQ 和 CdCl_2 的混合溶液中, 并用 KOH 调节 pH 到 9.5, 室温下搅拌反应 20 min, 存放于 4°C 冰箱反应 8-10 h。

将充分反应的混合液用使用前用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EDTA 和去离子水冲洗过的截留分子量为 30KD 的超滤管在 3000 rpm/min 的条件下离心 10 min, 用 pH 为 7.4, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 不断冲洗, 直至保留液中不再含游离的小分子物质为止, 用 Tris-HCl 稀释至 5 mL, -20°C 冰箱保存, 待用。

为检测抗体的检测限, 下面介绍重金属镉标准曲线的建立:

1、包被 以最佳包被抗原浓度 ($2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 包被酶标板, $100 \mu\text{L}$ /孔, 4°C 冰箱过夜, 洗涤液洗板 5 次;

2、封闭 10%的小牛血清, $200 \mu\text{L}$ /孔, 37°C 反应 3h, 洗涤液洗板 5 次;

3、加样 取系列浓度 (0、10、50、100、250、500、1 000 和 $5000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的金属镉标液加入适宜浓度的 EDTA 中, 按 1:1 的体积比加入最佳稀释浓度的抗血清, 室温下反应 30 min, $100 \mu\text{L}$ /孔, 37°C 反应 1h, 洗涤液洗板 5 次;

4、加酶标二抗 要求稀释 HRP 标记的羊抗鼠抗体 IgG-HRP, 将稀释后的 IgG-HRP 按 $100 \mu\text{L}$ /孔加入酶标板, 37°C 反应 1 h, 洗涤液洗板 5 次;

5、显色 配好的 OPD 显色液显色 10 min, $100 \mu\text{L}$ /孔;

6、终止 加 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸, $50 \mu\text{L}$ /孔;

7、读数 在酶标仪上测 420 nm 处的吸光度, 并计算抑制率;

8、抑制率的计算

$$\text{抑制率(I\%)} = \frac{\text{零标准吸光度值} - \text{样品或标准液吸光度值}}{\text{零标准吸光度值} - \text{空白对照吸光度值}} \times 100\%$$

然后以 I% 为纵坐标, 以标样的自然对数浓度值为横坐标, 做标准曲线。

下面以水体中重金属镉含量的快速检测为例加以说明：

水体样品的前处理：取水样 1000 μL ，用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤出去杂质，加入 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的镉标液 5 μL ，配置成 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的液体样品。

1、包被 以最佳包被抗原浓度（4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）包被酶标板，100 μL /孔，4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱反应 8-10 h，洗涤液洗板 5 次；

2、封闭 10%的小牛血清，200 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 3 h，洗涤液洗板 5 次；

3、加样 将样品和最佳稀释浓度的抗血清按 1:1 的体积，充分混合，室温下反应 30 min，100 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h，洗涤液洗板 5 次；

4、加酶标二抗 将按要求稀释后的 HRP 标记的羊抗鼠抗体，100 μL /孔加入酶标板，37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h，洗涤液洗板 5 次；

5、显色 加入配好的 OPD 显色液（使用前配制）显色 10 min，100 μL /孔；

6、终止 加 2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸，50 μL /孔，终止 5 min；

7、读数 在酶标仪上测 420 nm 处的吸光度；

8、数据处理 根据每个样品的 I%值就可根据标准曲线求出相对应样品的浓度。

本发明中使用的许多化学原料如 DMEM、HAT、HT、Tris-HCl、EDTA 等都可以从市售获得，相应的使用方法在该产品的说明书中有明示，不细述。

专利名称(译)	新的镉离子人工抗原整合剂制备方法		
公开(公告)号	CN101429167A	公开(公告)日	2009-05-13
申请号	CN200810162182.7	申请日	2008-11-18
[标]申请(专利权)人(译)	浙江农林大学		
申请(专利权)人(译)	浙江林学院		
当前申请(专利权)人(译)	浙江林学院		
[标]发明人	郭明 庞钰权 孔新刚		
发明人	郭明 庞钰权 孔新刚		
IPC分类号	C07D241/42 G01N33/536		
代理人(译)	周烽		
其他公开文献	CN101429167B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种新的镉离子人工抗原整合剂制备方法，以4-硝基邻苯二胺为原料经过缩合、溴化、消除等一系列反应化学合成了6-溴乙酰氨基-2,3-(N,N,N',N'-四乙酸)二甲胺基喹啉，简称BATDQ，以该新整合剂先与镉离子螯合形成Cd-BATDQ，再与载体蛋白质偶联成人工抗原Cd-BATDQ-BSA，通过免疫BALB/c小鼠，然后通过杂交瘤制备技术获得针对重金属镉螯合物的单克隆抗体，用于检测环境、食品、水体中重金属镉的残留。本发明具有快速、灵敏、成本低、特别适合大批量样品现场快速检测的特点，尤其是本新整合剂的成功合成，为镉离子人工抗原的合成提供了全新的、低成本的、稳定而灵敏的核心原料，应用推广前景广阔。

