

[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 200910085643.X

[51] Int. Cl.

C07D 251/52 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/77 (2006.01)

C07K 1/113 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 12 月 9 日

[11] 公开号 CN 101597267A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/531 (2006.01)

[22] 申请日 2009.5.27

[21] 申请号 200910085643.X

[71] 申请人 中国农业大学

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路 2 号

[72] 发明人 沈建忠 张素霞 丁双阳 史为民

江海洋 王战辉 王亚辉

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关畅 任凤华

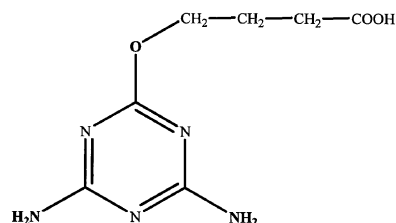
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 2 页

[54] 发明名称

三聚氰胺半抗原、抗原及其制备方法和应用

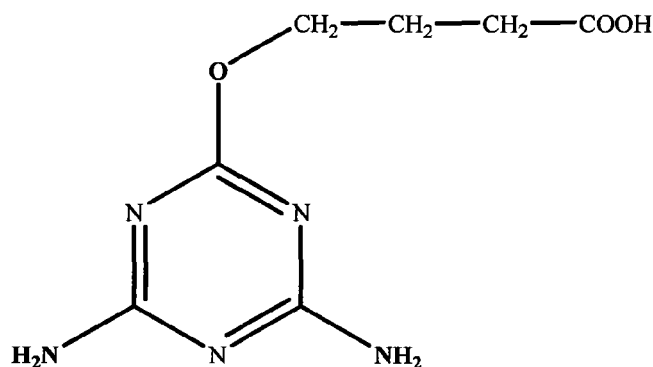
[57] 摘要

本发明公开了一种三聚氰胺半抗原、抗原及其制备方法和应用。本发明提供的三聚氰胺半抗原是式(I)所示化合物,用式(I)所示化合物与载体蛋白连接可以得到三聚氰胺抗原。所述三聚氰胺抗原可应用于制备三聚氰胺特异性抗体。本发明具有特异、灵敏、准确、快速、方便、廉价等特点。本发明制备方法简便可行、成本较低,半抗原产率较高。本发明的三聚氰胺人工抗原,通过免疫动物可产生了针对三聚氰胺的特异性抗体,用于快速检测食品中的三聚氰胺残留,具有简单、快速、处理样品量大、灵敏度高、特异性强等诸多优点。



式(I)

1、式（I）所示化合物：



式（I）。

2、式（I）所示化合物的制备方法，包括如下步骤：

（1）将 4,6-二氨基-2-羟基-1,3,5-三嗪和 4-溴丁酸乙酯 60℃-80℃回流 12 小时以上，蒸干溶剂；4,6-二氨基-2-羟基-1,3,5-三嗪和 4-溴丁酸乙酯的物质的量比为 1：（1.5-2）；

（2）将步骤（1）的产物在碱性无水环境中 80℃-100℃回流 1-2 小时，蒸干；

（3）将步骤（2）的产物置于 pH3 以下环境中进行酸化；得到式（I）所示化合物。

3、如权利要求 2 所述的方法，其特征在于：步骤（1）中，所述回流是在有机溶剂或有机溶剂溶液中进行的；步骤（2）中，所述回流是在含有氢氧化钾的甲醇溶液中进行的。

4、一种三聚氰胺抗原，是将式（I）所示化合物和载体蛋白偶联得到的偶联物。

5、权利要求 4 所述三聚氰胺抗原的制备方法，包括如下步骤：

将权利要求 1 所述化合物的溶液加入载体蛋白溶液中 pH9.0 反应 4-6 小时；得到所述三聚氰胺抗原。

6、如权利要求 5 所述的方法，其特征在于：所述权利要求 1 所述化合物的溶液的制备方法如下：将含有权利要求 1 所述化合物和三正丁胺的有机溶剂置于 3-5℃冰浴中冷却并搅拌；然后加入氯甲酸异丁酯 3-5℃搅拌 30-40 分钟。

7、权利要求 4 所述三聚氰胺抗原在制备三聚氰胺特异性抗体中的应用。

8、应用权利要求 4 所述三聚氰胺抗原制备得到的抗体。

9、权利要求 1 所述化合物、权利要求 4 所述三聚氰胺抗原、权利要求 8 所述抗体在检测三聚氰胺中的应用。

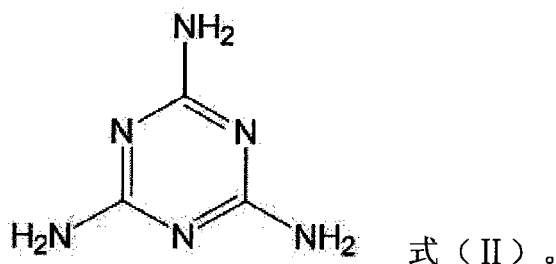
三聚氰胺半抗原、抗原及其制备方法和应用

技术领域

本发明涉及一种三聚氰胺半抗原、抗原及其制备方法和应用。

背景技术

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，结构如式 (II) 所示：



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。三聚氰胺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。

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。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，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。

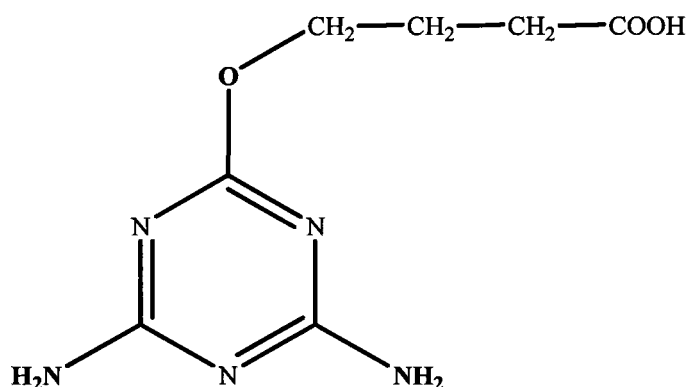
蛋白质主要由氨基酸组成，其含氮量一般不超过 30%，而三聚氰胺分子中含氮量为 66% 左右。常用的蛋白质测试方法“凯氏定氮法”是通过测出含氮量乘以 6.25 来估算蛋白质含量，因此，添加三聚氰胺会使得食品的蛋白质测试含量虚高，从而使劣质食品和饲料在检验机构只做粗蛋白质简易测试时蒙混过关。食品和饲料工业蛋白质含量测试方法的缺陷，加之三聚氰胺作为一种白色结晶粉末，没有什么气味

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”。

发明内容

本发明的目的是提供一种三聚氰胺半抗原、抗原及其制备方法和应用。

本发明提供的三聚氰胺半抗原，是式（I）所示化合物：



式（I）。

本发明还保护式（I）所示化合物的制备方法，包括如下步骤：

（1）将 4,6-二氨基-2-羟基-1,3,5-三嗪和 4-溴丁酸乙酯 60℃-80℃回流 12 小时以上，蒸干溶剂；4,6-二氨基-2-羟基-1,3,5-三嗪和 4-溴丁酸乙酯的物质的量的比值为 1：（1.5-2）；

（2）将步骤（1）的产物在碱性无水环境中 80℃-100℃回流 1-2 小时，蒸干；

（3）将步骤（2）的产物置于 pH3 以下环境中进行酸化；得到式（I）所示化合物。

步骤（1）中，所述回流时，常规有机溶剂均可采用，如丙酮。为了保持无水环境，还可在有机溶剂中加入无水碳酸钠。步骤（1）中，所述回流的温度具体可为 70℃、时间具体可为 16 小时。

步骤（2）中，所述回流可在含有氢氧化钾的甲醇溶液中进行。步骤（1）中，所述回流的温度具体可为 80℃、时间具体可为 1 小时。

本发明提供的三聚氰胺抗原，是将式（I）所示化合物和载体蛋白偶联得到的偶联物。

所述三聚氰胺抗原的结构示意图见图 3。

本发明还保护所述三聚氰胺抗原的制备方法，包括如下步骤：

将式(I)所示化合物的溶液加入载体蛋白溶液中 pH9.0 反应 4-6 小时;得到所述三聚氰胺抗原。

所述式(I)所示化合物的溶液的制备方法如下:将含有式(I)所示化合物和三正丁胺的有机溶剂置于 3-5℃冰浴中冷却并搅拌;然后加入氯甲酸异丁酯 3-5℃搅拌 30-40 分钟。

所述有机溶剂具体可为二噁烷。

常用载体蛋白均可采用,如牛血清白蛋白(BSA),卵清蛋白(OVA)等。

所述三聚氰胺抗原可以作为免疫原制备三聚氰胺特异性抗体。

应用三聚氰胺抗原制备得到的抗体也属于本发明的保护范围。

所述抗体具体可为单克隆抗体。

式(I)所示化合物、所述三聚氰胺抗原、所述抗体均可应用于检测三聚氰胺。

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的特异性抗体。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。本发明制备方法简便可行、成本较低,半抗原产率较高。本发明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。本发明的三聚氰胺人工抗原,通过免疫动物可产生了针对三聚氰胺的特异性抗体,用于快速检测食品中的三聚氰胺残留,具有简单、快速、处理样品量大、灵敏度高、特异性强等诸多优点。

附图说明

图 1 为三聚氰胺半抗原的正负离子质谱图。

图 2 为三聚氰胺人工抗原的紫外光谱图。

图 3 为三聚氰胺抗原的结构示意图。

具体实施方式

以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

产率=实际得到的产物的质量/理论上得到产物的质量×100%。

实施例 1、三聚氰胺半抗原的制备和鉴定

一、三聚氰胺半抗原的制备

1、称取 120mg 4,6-二氨基-2-羟基-1,3,5-三嗪（购自 Acros Organics 公司，CAS 号：3397-62-4），100 μ L 4-溴丁酸乙酯，100mg 无水碳酸钠置于 50mL 烧瓶中，再加入 20mL 丙酮，70℃回流 16 小时，减压蒸干溶剂。

2、残留物溶于 15mL 甲醇-氢氧化钾混合液（15%，88mg 氢氧化钾溶于 5mL 甲醇）中，80℃回流 1 小时，减压蒸干溶剂。

3、向残留物中加 8mL 蒸馏水（全部溶解），2M 的 HCl 酸化至 pH 为 3（出现白色沉淀）。

4、离心收集沉淀，50℃烘干。得到反应产物（三聚氰胺半抗原）143 mg，产率为 68%。

二、三聚氰胺半抗原的鉴定

将步骤一制备得到的三聚氰胺半抗原进行 ESI 质谱鉴定和元素分析。

质谱图见图 1。三聚氰胺半抗原具有分子离子峰 212 ($M-1$)。

元素分析结果 (%)：C, 39.44; H, 5.20; N, 32.85; O, 22.51。

分析结果表明：三聚氰胺半抗原分子中含有 3 个 O, 7 个 C, 结构如式 (I) 所示，分子量为 213。

实施例 2、三聚氰胺人工抗原的制备和鉴定

一、三聚氰胺人工抗原的合成

1、将 10mg 三聚氰胺半抗原，溶于 1mL 二噁烷中，搅拌使其完全溶解；然后加入 50 μ L 无水三正丁胺，将此混合物置于 4℃冰浴中冷却，并搅拌 15 分钟。加入 25 μ L 重蒸的氯甲酸异丁酯，4℃左右搅拌 30 分钟。

2、称取 50mg 牛血清蛋白 (BSA) 溶于水中，搅拌使其溶解，用 0.1mol/L 的 NaOH 调 pH 至 9.0；将步骤 1 得到的半抗原溶液逐滴加入到溶解的蛋白中，并于 4℃轻微搅拌 4 小时，整个过程维持 pH 在 9.0。

3、将混合物于 4℃在 0.1mol/L, pH 7.4 的 PBS 中透析 72 小时，每隔 6 小时换透析液 1 次。冷冻干燥后于 -20℃保存。

二、三聚氰胺人工抗原的鉴定

按合成三聚氰胺免疫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。产物的紫外光谱图与牛血清蛋白（BSA）相比发生了变化，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，三聚氰胺半抗原分子与 BSA 分子的结合比为 21: 1。

实施例 3、抗血清的制备和特异性鉴定

一、三聚氰胺抗血清的制备

采用 8 只 7 周龄、体重 2-3 公斤、健康的新西兰大白兔为免疫动物；以实施例 2 制备的三聚氰胺人工抗原为免疫原；免疫剂量：基础免疫为 1.0 mg/kg，加强免疫剂量为 1.5 mg/kg。免疫的具体步骤如下：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。

从加强免疫第三次开始，在每次免疫后第 7 天于兔子耳缘静脉采血，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。血清经适当稀释后用间接 ELISA 测定效价。第 6 次免疫后，兔子获得了高效价的抗体，抗血清的滴度为 $1: 128 \times 10^4$ 。

二、三聚氰胺抗血清效价的测定

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

用方阵滴定法确定三聚氰胺包被抗原（把载体蛋白换成卵清蛋白，制备方法同三聚氰胺人工抗原）和步骤一制备的抗血清的工作浓度，三聚氰胺包被抗原的工作浓度为 1.5 μg/mL，抗血清的工作浓度为 1/40000。

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：0 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL、500 ng/mL、1 μg/mL、2 μg/mL。采用 8 组平行试验 (n=8)。

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 0.5 h，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 0.5 h，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 10-15 min，用酶标

仪在波长450nm处测定OD值。以OD值为纵坐标，以三聚氰胺实验溶液浓度的log10值为横坐标，绘制半对数标准曲线图。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。

根据标准曲线得出10%抑制量和半数抑制量（IC₅₀），比较检测灵敏度。

抑制率用以下式计算：

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

式中：OD_{max}为不加标准品时的吸光值，OD_x为标准品 x 时的吸光值，OD_{min}为空白对照孔的吸光值。

由上述公式计算得三聚氰胺抗体在缓冲液中的 LOD 值为 56 ng/mL，半数抑制量（IC₅₀）为 267 ng/mL。

三、三聚氰胺抗体特异性测定

抗血清的特异性就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。常用交叉反应率作为评价的重要标准。交叉反应越小，抗血清的特异性越好。

检测三聚氰胺人工抗原与如下几种物质的交叉反应率：

三聚氰胺、三聚氰酸、其他三嗪类类似物、四环素、三聚氰酸-酰胺、庆大霉素、三聚氰酸二酰胺、氨苄青霉素。

用样品稀释液将以上几种物质分别稀释成如下浓度：0ng/mL、25ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、250ng/mL、500ng/mL、1 μg/mL。

按照步骤二中所述方法，各自建立标准曲线，测定抑制中浓度IC₅₀。

交叉反应率（%）=（引起50%抑制的三聚氰胺人工抗原的浓度/引起50%抑制的抗原类似物的浓度）×100%。

实验设 3 次重复，结果取平均数。

各类似物的交叉反应率（%）：三聚氰胺 100.0，三聚氰酸<3.0，其他三嗪类类似物<0.1，四环素<0.1，三聚氰酸一酰胺<0.1，庆大霉素<0.1，三聚氰酸二酰胺<0.1，氨苄青霉素<0.1。

实施例 4、三聚氰胺半抗原的制备和鉴定

一、三聚氰胺半抗原的制备

4,6-二氨基-2-羟基-1,3,5-三嗪：4-溴丁酸乙酯=1：1.5（摩尔比）。

1、4,6-二氨基-2-羟基-1,3,5-三嗪（购自 Acros Organics 公司，CAS 号：3397-62-4），4-溴丁酸乙酯，100mg 无水碳酸钠置于 50mL 烧瓶中，再加入 20mL 丙酮，80℃回流 12 小时，减压蒸干溶剂。

2、残留物溶于 15mL 甲醇-氢氧化钾混合液（15%，88mg 氢氧化钾溶于 5mL 甲醇）中，80℃回流 1 小时，减压蒸干溶剂。

3、向残留物中加 8mL 蒸馏水（全部溶解），2M 的 HCl 酸化至 pH 为 2.5（出现白色沉淀）。

4、离心收集沉淀，50℃烘干。得到反应产物（三聚氰胺半抗原），产率为 69%。

二、三聚氰胺半抗原的鉴定

将步骤一制备得到的三聚氰胺半抗原进行 ESI 质谱鉴定和元素分析。

结果表明，同样得到了式（I）所示化合物。

实施例 5、三聚氰胺半抗原的制备和鉴定

一、三聚氰胺半抗原的制备

4,6-二氨基-2-羟基-1,3,5-三嗪：4-溴丁酸乙酯=1：2（摩尔比）。

1、4,6-二氨基-2-羟基-1,3,5-三嗪（购自 Acros Organics 公司，CAS 号：3397-62-4），4-溴丁酸乙酯，100mg 无水碳酸钠置于 50mL 烧瓶中，再加入 20mL 丙酮，60℃回流 20 小时，减压蒸干溶剂。

2、残留物溶于 15mL 甲醇-氢氧化钾混合液（15%，88mg 氢氧化钾溶于 5mL 甲醇）中，100℃回流 2 小时，减压蒸干溶剂。

3、向残留物中加 8mL 蒸馏水（全部溶解），2M 的 HCl 酸化至 pH 为 3（出现白色沉淀）。

4、离心收集沉淀，50℃烘干。得到反应产物（三聚氰胺半抗原），产率为 71%。

二、三聚氰胺半抗原的鉴定

将步骤一制备得到的三聚氰胺半抗原进行 ESI 质谱鉴定和元素分析。

结果表明，同样得到了式（I）所示化合物。

NL: 2.05E5
090513-01#760-791 RT:
1.58-1.64 AV: 32 SB: 63
0.16-0.22, 1.70-1.75 T:
[TMS-cESI Fullms]
50.00-1000.00]

NL: 1.04E4
090513-01#582-606 RT:
1.21-1.26 AV: 25 SB: 61
0.46-0.52, 1.40-1.46 T:
[TMS-cESI Fullms]
50.00-1000.00]

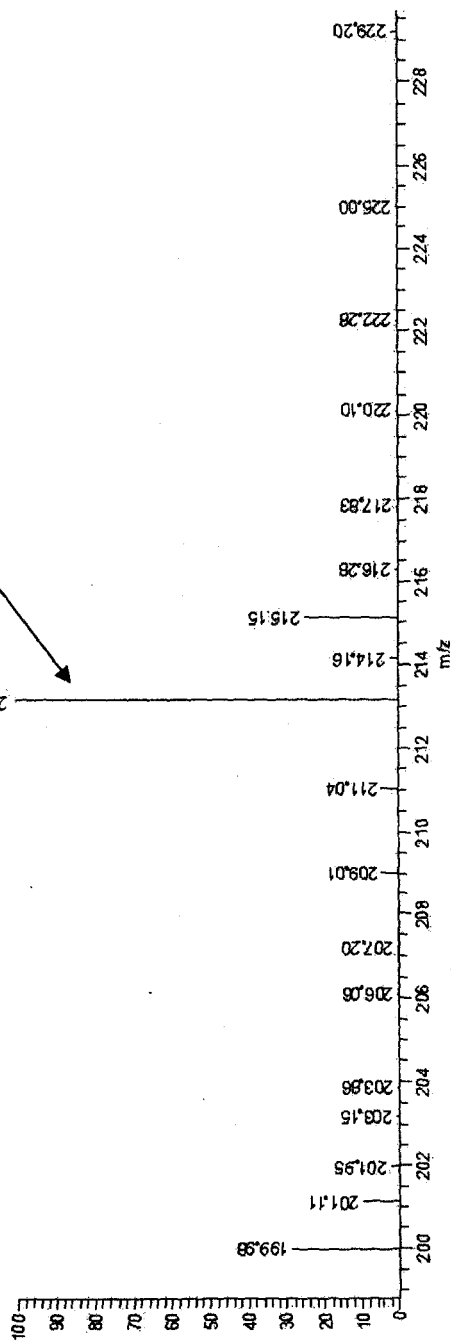
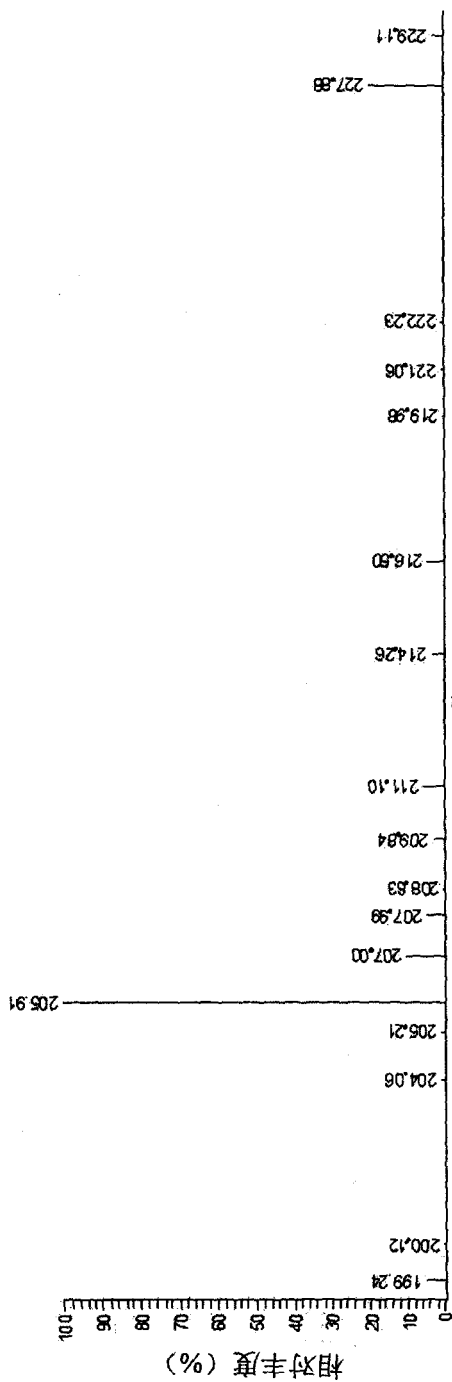


图 1

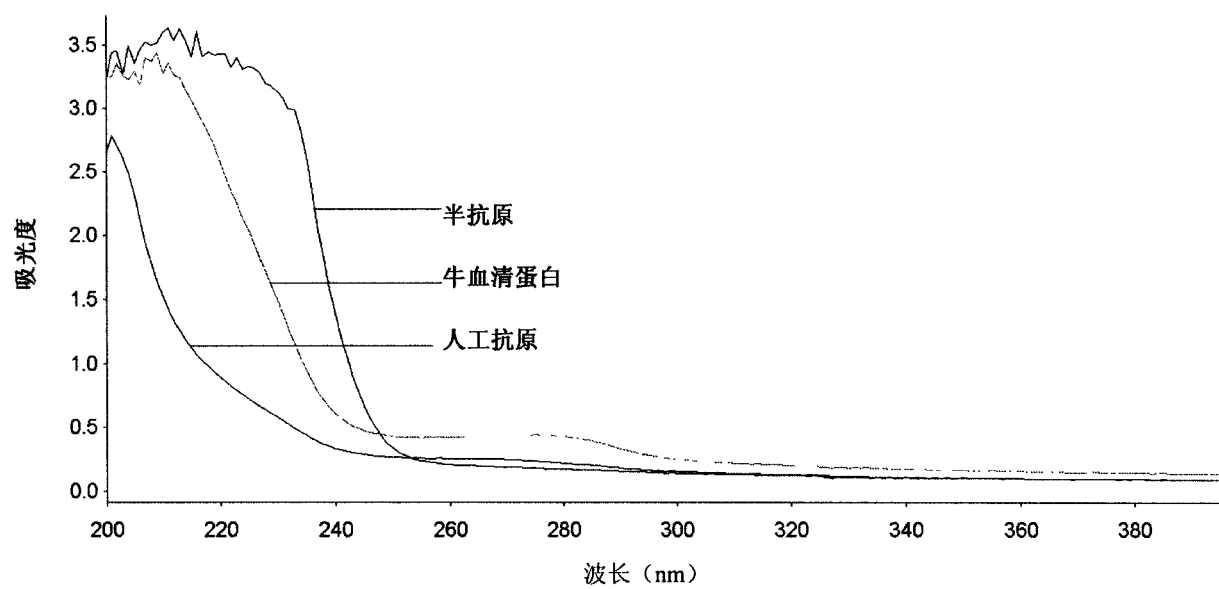


图 2

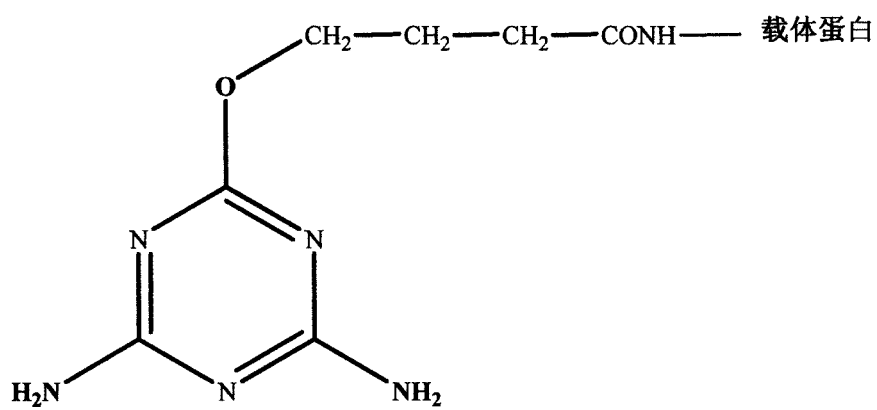
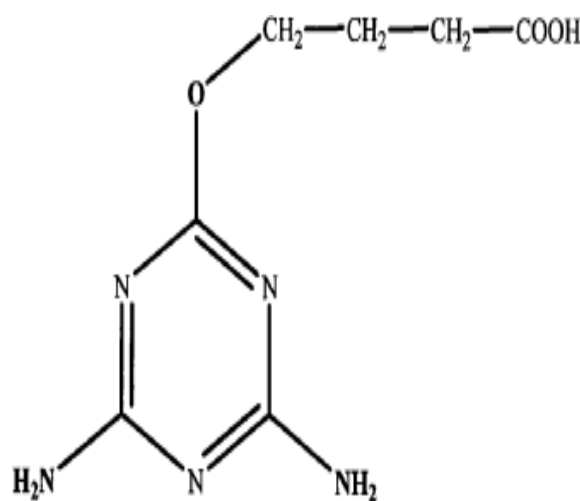


图 3

专利名称(译)	三聚氰胺半抗原、抗原及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN101597267A	公开(公告)日	2009-12-09
申请号	CN200910085643.X	申请日	2009-05-27
[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	沈建忠 张素霞 丁双阳 史为民 江海洋 王战辉 王亚辉		
发明人	沈建忠 张素霞 丁双阳 史为民 江海洋 王战辉 王亚辉		
IPC分类号	C07D251/52 C07K14/765 C07K14/77 C07K11/113 C07K16/44 G01N33/566 G01N33/531		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN101597267B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种三聚氰胺半抗原、抗原及其制备方法和应用。本发明提供的三聚氰胺半抗原是式(I)所示化合物，用式(I)所示化合物与载体蛋白连接可以得到三聚氰胺抗原。所述三聚氰胺抗原可应用于制备三聚氰胺特异性抗体。本发明具有特异、灵敏、准确、快速、方便、廉价等特点。本发明制备方法简便可行、成本较低，半抗原产率较高。本发明的三聚氰胺人工抗原，通过免疫动物可产生了针对三聚氰胺的特异性抗体，用于快速检测食品中的三聚氰胺残留，具有简单、快速、处理样品量大、灵敏度高、特异性强等诸多优点。



式