

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/531 (2006.01)
C12N 15/33 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410096072.7

[45] 授权公告日 2006 年 12 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 1291230C

[22] 申请日 2004.11.29

[21] 申请号 200410096072.7

[73] 专利权人 清华大学

地址 100084 北京市海淀区清华园

[72] 发明人 何 苗 盛建武 施汉昌

审查员 边 昕

[74] 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事务所

代理人 廖元秋

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称

对微囊藻毒素 - LR 进行化学修饰并合成完全抗原的方法

[57] 摘要

本发明涉及对微囊藻毒素 - LR 进行化学修饰并合成完全抗原的方法, 属于免疫检测技术领域, 包括对微囊藻毒素 - LR 的化学修饰和用戊二醛 1 步法合成完全抗原两部分; 本方法选择第 7 位氨基酸 Mdha 作为连接位点, Mdha 远离致毒基团 Adda, 因而抗体能够有效的识别出微囊藻毒素和节球藻毒素; 而且远离两个可变的氨基酸, 因而能够识别出微囊藻毒素的各种异构体, 可提高微囊藻毒素 - LR 抗体的特异性。

1、一种对微囊藻毒素-LR 分子进行化学修饰并合成完全抗原的方法，包括对微囊藻毒素-LR 的化学修饰和用戊二醛 1 步法合成完全抗原两部分；

所述对微囊藻毒素-LR 的化学修饰方法的具体步骤如下：

1) 将 2-巯基乙胺和 MC-LR 按照大摩尔比(1000~5000): 1 充分混和在 pH=8.0~10.0 的碱性碳酸盐缓冲液中；混合均匀，在 40℃~60℃ 反应 1~2 小时；

2) 反应完毕，降到室温，加入与 2-巯基乙胺等摩尔的乙酸使反应停止，得到中间产物 H₂N-etMC-LR；

3) 采用固相萃取技术对该中间产物进行纯化；

所述用戊二醛 1 步法合成完全抗原方法的具体步骤如下：

4) 将所获得的纯化后的中间产物溶于缓冲溶液中，使其在溶液中的浓度为 0.1~1mg/mL；

5) 按中间产物 : 戊二醛摩尔比为 1 : (5~20) 加入适量戊二醛，剧烈振摇，充分摇匀后，按中间产物: BSA 摩尔比 10~15 : 1 加入 BSA 溶液，充分混合，反应 12 小时以上；

6) 反应完毕，混合物在 PBS 中透析 24 小时以上，得到微囊藻毒素-LR 的完全抗原。

2、如权利要求 1 所述方法，其特征在于，所述采用固相萃取技术的纯化方法，采用 C₁₈ 固相萃取柱，具体步骤如下：

活化：用甲醇活化 C₁₈ 柱，并用高纯水调整，分为 2~3 次使用；

上样：将水样以 5~10mL/min 的流速流过固相萃取柱进行富集浓缩，重力过滤；

淋洗：装样完毕后，用 1~10% 甲醇水溶液淋洗以净化样品，分为 2~4 次使用；

洗脱：待固相萃取柱吹干后，用甲醇将微囊藻毒素洗脱并收集。

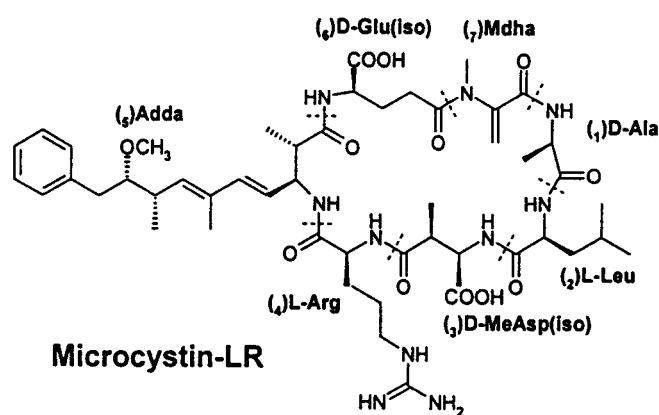
对微囊藻毒素-LR 进行化学修饰并合成完全抗原的方法

技术领域

本发明属于免疫检测技术领域，特别涉及对微囊藻毒素-LR 分子合成完全抗原的方法。

背景技术

微囊藻毒素-LR (Microcystin-LR, 简称 MC-LR) 是目前已知急性毒性最强、危害最大的一种淡水蓝藻毒素。微囊藻毒素是一组环状七肽，其中微囊藻毒素-LR 的分子结构式如下：



目前已经发现微囊藻毒素各种异构体有 60 多种，其变化主要在于第 2 位和第 4 位上 2 个 L-氨基酸的不同，如 MC-LR 这 2 个位置上的氨基酸分别为亮氨酸和精氨酸（见上式中的序号 2 和 4）。研究发现，第 5 位氨基酸 Adda 对微囊藻毒素的毒性是必需的，其共轭立体结构会影响其毒性，结构改变则毒性改变。

免疫检测技术的关键在于获得特异性和亲和力良好的抗体，而抗体的这 2 个主要特性很大程度上取决于抗原的性质；微囊藻毒素-LR 分子量为 1000 左右，本身不具备免疫原性，属于半抗原，只有与大分子物质连接合成完全抗原才能促使机体产生免疫反应，从而获得抗体。合成并纯化免疫性能良好的 MC-LR 完全抗原是非常关键的技术环节。

一般来说，连接位点应选择对免疫来说最不重要的区域，而将抗原决定簇基团（致毒基团）暴露在外面，因为抗体对远离连接位点的基团的识别能力远远大于邻近连接位点的基团的识别能力。

目前大多数研究(制备微囊藻毒素-LR 的抗体)的连接位点都是选择 MC-LR 第 3 位的 D-MeAsp 或第 6 位的 D-Glu。利用其羧基只与载体蛋白相连，不通过化学修饰。这样带来的后果是：由此产生的抗体只能识别带有 Adda 氨基酸的藻毒素，而不能将

各种微囊藻毒素区别开来，从而不能很好的应用于免疫检测。

发明内容

本发明的目的是为克服已有技术的不足之处，提出一种对微囊藻毒素-LR 分子进行化学修饰并合成完全抗原的方法，本方法选择第 7 位氨基酸 Mdha 作为连接位点，Mdha 远离致毒基团 Adda，因而抗体能够有效的识别出微囊藻毒素和节球藻毒素；而且远离两个可变的氨基酸，因而能够识别出微囊藻毒素的各种异构体，可提高微囊藻毒素-LR 抗体的特异性。

本发明提出的一种对微囊藻毒素-LR 分子进行化学修饰并合成完全抗原的方法，包括对微囊藻毒素-LR 的化学修饰和用戊二醛 1 步法合成完全抗原两部分，

所述对微囊藻毒素-LR 的化学修饰方法的具体步骤如下：

1) 将 2-巯基乙胺和 MC-LR 按照大摩尔比(1000~5000):1 充分混和在 pH=8.0~10.0 的碱性碳酸盐缓冲液中；混合均匀，在 40℃~60℃ 反应 1~2 小时；

2) 反应完毕，降到室温(20℃~30℃)，加入与 2-巯基乙胺等摩尔的乙酸使反应停止，得到中间产物 H₂N-etMC-LR；

3) 采用固相萃取技术对该中间产物进行纯化；

所述用戊二醛 1 步法合成完全抗原方法的具体步骤如下：

4) 将所获得的纯化后的中间产物溶于缓冲溶液中，使其在溶液中的浓度为 0.1~1mg/mL；

5) 按中间产物：戊二醛摩尔比为 1:(5~20) 加入适量戊二醛，剧烈振摇，充分摇匀后，按中间产物：BSA 摩尔比 10~15:1 加入 BSA 溶液，充分混合，反应 12 小时以上；

6) 反应完毕，混合物在 PBS 中透析 24 小时以上，得到微囊藻毒素-LR 的完全抗原。

上述采用固相萃取技术的纯化方法，采用 C₁₈ 固相萃取柱，具体步骤如下：

活化：用甲醇活化 C₁₈ 柱，并用高纯水调整，分为 2~3 次使用；

上样：将水样以 5~10mL/min 的流速流过固相萃取柱进行富集浓缩。重力过滤；

淋洗：装样完毕后，用 1~10% 甲醇水溶液淋洗以净化样品，分为 2~4 次使用；

洗脱：待固相萃取柱吹干后，用甲醇(分为多次)将微囊藻毒素洗脱并收集。

本发明的特点及技术效果：

本方法选择第 7 位氨基酸 Mdha 作为连接位点，Mdha 远离致毒基团 Adda，因而抗体能够有效的识别出微囊藻毒素和节球藻毒素；而且远离两个可变的氨基酸，因而能够识别出微囊藻毒素的各种异构体，可提高微囊藻毒素-LR 抗体的特异性。

本发明利用 2-巯基乙胺在上述第 7 位氨基酸的双键处引入 1 个氨基，通过它与载体蛋白连接；并通过 SPE 固相萃取技术来纯化中间产物；通过 MS 测定产物的分子量从而鉴定修饰是否成功。

本发明偶联剂的选择：在上述对 MC-LR 进行氨基修饰后(修饰产物)，用戊二醛作为偶联剂，采用戊二醛一步法将 MC-LR。戊二醛是一种双功能偶联试剂，能通过它两端的醛基将 2 个自由氨基合成到一块。通过戊二醛合成还可为多肽和载体蛋白之间提供一段非常灵活的长链，使它们之间有较大的空间，从而将半抗原充分暴露在外部，形成有利的免疫表位，进而达到良好的免疫效果。

具体实施方式

实施例 1

首先进行微囊藻毒素-LR 的氨基修饰，具体步骤如下：

将 0.5mg MC-LR 溶于 2ml 0.1M pH=9 的碳酸盐缓冲液中；

称取 60.4mg 2-巯基乙胺加入上述溶液中。混合物充分摇匀，在 40℃ 反应 2 小时；

反应完毕，降到室温 20℃，加入与 2-巯基乙胺等摩尔的乙酸使反应停止，得到中间产物 $H_2N-etMC-LR$ ；

采用固相萃取技术纯化中间产物，材料为 500mg 6mL C_{18} BondElut cartridge；

再用戊二醛 1 步法合成完全抗原，具体步骤如下：

将所获得的中间产物(含 MC-LR 约 0.5mg)溶于 3mL 0.01mol/L pH7.4 的 PBS 中(预先加入 3% v/v 的甲醇 methanol，即加入 100 μ L 甲醇)；

按 MC-LR : 戊二醛摩尔比为 5 : 1 加入适量 0.1% 的戊二醛，剧烈振摇，

按 MC-LR: BSA 摩尔比 10 : 1 加入 1mg/mL 的 BSA 溶液 5mL，充分混合，4℃ 振荡 16 小时；

反应完毕，混合物在 PBS 中透析 24 小时，4℃，(8 小时换一次，共 3 次；每次用 PBS 2L)；

上述采用固相萃取技术的纯化方法，具体步骤如下：

活化：用 4mL 甲醇活化，并用 6mL 高纯水调整，分为 2~3 次使用；

上样：将水样以 5~10mL/min 的流速流过固相萃取柱进行富集浓缩。重力过滤；

淋洗：装样完毕后，用 5% 甲醇水溶液 6mL 淋洗以净化样品，分为 3 次使用；

洗脱：待固相萃取柱吹干后，以 4mL 甲醇(分为 2 次)将微囊藻毒素洗脱并收集。

中间产物的鉴定采用 MS 仪测定主要产物的分子量。

MC-LR 的修饰及纯化结果：对于修饰后的 MC-LR，为了证实引进游离的巯基乙胺是否成功，本研究利用质谱仪 MS 测定目标产物(中间产物)的分子量。将 2-巯基乙胺与 MC-LR 按照摩尔比 3000: 1 反应，固相萃取纯化后，用甲醇洗脱，MS 测定值为 1072.7；主要产物的理论分子量为 MC-LR 与 $H_2N-CH_2CH_2-SH$ 的分子量之和，即 1072.2，二者基本一致。结果表明，氨基修饰是成功的。对于合成抗原的鉴定，本实施例采用了紫外扫描技术。

对于合成抗原的鉴定，本实施例采用了紫外扫描技术。

合成完全抗原的定性分析：对 BSA, MC-LR 及完全抗原的紫外扫描曲线显示：完全抗原和 BSA 同样在 280nm 处有吸收峰；而 238nm 是 MC-LR 的吸收峰，完全抗原紫外扫描结果在 238nm 附近发生明显的红移，从而可以判断，合成是有效的。

实施例 2

首先进行微囊藻毒素-LR 的氨基修饰，具体步骤如下：

将 1.0 mg MC-LR 溶于 2ml 0.1M pH=9 的碳酸盐缓冲液中；

称取 500 mg 2-巯基乙胺加入上述溶液中。混合物充分摇匀，在 60℃ 反应 1 小时；

反应完毕，降到室温 25℃，加入与 2-巯基乙胺等摩尔的乙酸使反应停止；

用 500mg 6ml C₁₈ BondElut cartridge 纯化中间产物；

再来用戊二醛 1 步法合成完全抗原，具体步骤如下：

将所获得的中间产物(含 MC-LR 约 1.0 mg)溶于 3mL 0.01mol/L pH7.4 的 PBS 中(预先加入 3% v/v 的甲醇 methanol, 即加入 100uL 甲醇)；

按 MC-LR : 戊二醛摩尔比为 15 : 1 加入适量 0.1% 的戊二醛，剧烈振摇；

按 MC-LR: BSA 摩尔比 20 : 1 加入 1mg/mL 的 BSA 溶液 5mL，充分混合，4℃ 振荡 20 小时；

反应完毕，混合物在 PBS 中透析 24 小时，4℃。

对于合成抗原的鉴定采用多电荷生物质谱技术：

将所获得的完全抗原纯化、脱盐后，利用 API3000 液相色谱质谱联用仪测定的质谱图显示：BSA 分子量为 66463.0，每连接上 1 个中间产物分子，分子量增加 1000 左右。从完全抗原的质谱图可以发现，分子量分布从 66000 一直到 73000，合成比在 3~8 之间的完全抗原是存在的，未参与合成的 BSA 信号较小。

专利名称(译)	对微囊藻毒素 - LR进行化学修饰并合成完全抗原的方法		
公开(公告)号	CN1291230C	公开(公告)日	2006-12-20
申请号	CN200410096072.7	申请日	2004-11-29
[标]申请(专利权)人(译)	清华大学		
申请(专利权)人(译)	清华大学		
当前申请(专利权)人(译)	清华大学		
[标]发明人	何苗 盛建武 施汉昌		
发明人	何苗 盛建武 施汉昌		
IPC分类号	G01N33/531 C12N15/33		
其他公开文献	CN1603827A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及对微囊藻毒素-LR进行化学修饰并合成完全抗原的方法，属于免疫检测技术领域，包括对微囊藻毒素-LR的化学修饰和用戊二醛1步法合成完全抗原两部分；本方法选择第7位氨基酸Mdha作为连接位点，Mdha远离致毒基团Adda，因而抗体能够有效的识别出微囊藻毒素和节球藻毒素；而且远离两个可变的氨基酸，因而能够识别出微囊藻毒素的各种异构体，可提高微囊藻毒素-LR抗体的特异性。

