

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 21/79 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710022543.3

[43] 公开日 2007年11月14日

[11] 公开号 CN 101071133A

[22] 申请日 2007.5.11

[21] 申请号 200710022543.3

[71] 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道1800号

[72] 发明人 胥传来 李秋生 彭池方 周亚南

陶冠军 秦 昉 徐一平

[74] 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所

代理人 时旭丹 刘品超

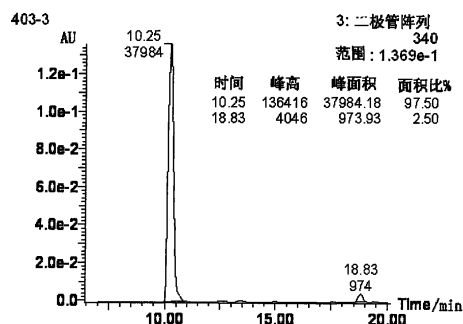
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

[54] 发明名称

一种硝西洋人工抗原的制备方法

[57] 摘要

一种硝西洋人工抗原的制备方法，属于生物化工技术领域。本发明以硝西洋为原料，利用铁粉还原法使硝西洋苯环上的硝基还原为胺基，制备人工半抗原；再利用重氮化法对半抗原上的胺基进行重氮化并使之与牛血清蛋白结合，制备硝西洋的人工抗原即硝西洋-牛血清蛋白。本发明合成了硝西洋的人工抗原，合成步骤简洁，有效，完全可用于免疫分析当中，为以后人们的研究提供了方便的途径，可以满足国内对其研究的需要。



1. 一种硝西洋人工抗原的制备方法，其特征是以硝西洋为原料，利用铁粉还原法使硝西洋苯环上的硝基还原为胺基，制备人工半抗原；再利用重氮化法对半抗原上的胺基进行重氮化并使之与牛血清蛋白结合，制备硝西洋的人工抗原即硝西洋-牛血清蛋白；步骤为：

1)人工半抗原的制备：称取 9mmol 还原铁粉于 50ml 圆底烧瓶中，加入 10ml 水、3mmol 氯化铵，水浴中加热 15min；另称取硝西洋 3mmol，用一定量的甲醇溶解后，分 3 次加入上述的反应液中，回流反应 4~6h，趁热过滤铁粉，将滤液进行减压蒸馏，得到的残留用少量热甲醇溶液溶解，低温析出沉淀，过滤，干燥得到 2mmol 半抗原 1,3-二氢-7-胺基-5-苯基-2H-1,4-苯并二氮卓-2-酮备用；

反应终点监测：采用薄层层析法进行监测，硅胶薄板下端 1cm 处作一水平线，吸取反应液 1 μ l 点于线上，点样结束后吹干，将薄板放入层析缸中，层析液为乙酸乙酯-正己烷混合溶剂，乙酸乙酯/正己烷体积比为 1:1，展开至薄板 3/4 处，取板，吹干溶剂；将薄板置于紫外分析仪中，在 254nm 波长观察，在 Rf 为 0.25 处观察到显色点作为反应终点；

2) 人工抗原的制备：

制备 A 液：称取 0.1mmol 半抗原于 20ml 烧杯中，加入 10ml 二甲基甲酰胺、1ml 水和 1ml 的 1N 盐酸，形成深红色溶液，冷却至 2 $^{\circ}$ C；然后逐步滴加 1M 亚硝酸钠溶液，用淀粉碘化钾试纸监测，直到试纸变蓝停止滴加，低温下搅拌 1h，此液为 A 液；

制备 B 液：称取 400mg 的牛血清蛋白溶于 15ml 的 pH9.0 硼酸盐缓冲液，低温保存，此液为 B 液；

在低温搅拌下，将 A 液逐滴地滴加到 B 液中，并用 1N 的氢氧化钠溶液调节 pH，使 pH 保持在 9；在 4 $^{\circ}$ C 条件下搅拌保存过夜，得人工抗原混合液；

将人工抗原混合液移入透析袋中，用 2 \times 2L 的 0.05M 的碳酸氢钠溶液和 2 \times 2L 的去离子水透析 4-6 天，使用冻干法将透析袋中的液体制成粉末，即得到人工抗原：硝西洋-牛血清蛋白。

一种硝西洋人工抗原的制备方法

技术领域

一种硝西洋人工抗原的制备方法，属于生物化工技术领域。

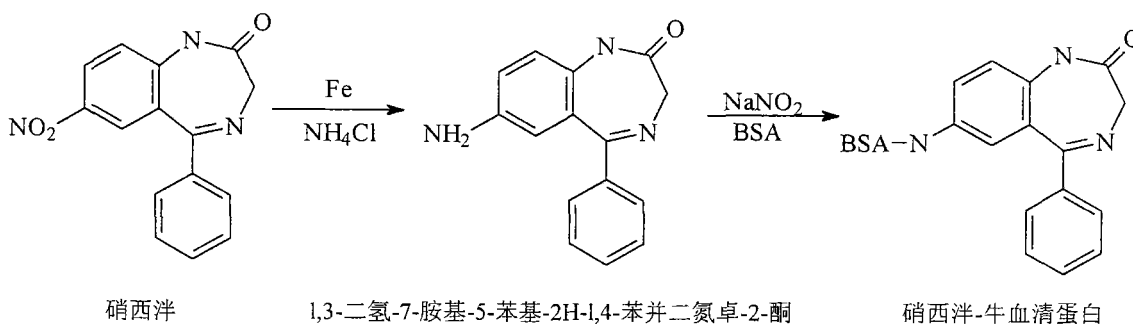
背景技术

硝西洋（Nitrazepam）为苯二氮卓类镇静安眠药，化学名称为：1,3-二氢-7-硝基-5-苯基-2H-1,4-苯并二氮卓-2-酮。曾用作动物饲料添加剂，作为生长促进剂，具有使动物嗜睡少动，生长快且有改变肉质的作用。也用在屠宰和动物检疫之前，或将动物转移屠宰之前，起镇静作用，以减轻动物紧张状态，降低动物伤害和死亡率。此类药物常见嗜睡，可见无力、头痛、晕眩、恶心、便秘，偶见皮疹、肝损害、骨髓抑制等不良反应。若随意在饲料中添加此类药物，蓄积的药物通过食物链进入人体，将造成巨大的危害。为此许多国家将此类药物列入禁用药物名单。目前，国内外有关硝西洋的检测主要有高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱法(GC)、薄层色谱法(TLC)、气-质联用法(GC-MS)、液-质联用法(LC-MS)等，但这些方法不仅需要昂贵的仪器设备，对检材的要求也比较高，需要进一步的提纯处理才能进行，这已经不能达到现代检测对快速、方便、准确的要求。近年来，国外已经开展了对苯二氮卓类免疫分析方法的研究，但国内目前在这方面还是一片空白。为了加强对国内肉制品的监督力度和保障人民的身体健康，有必要展开对苯二氮卓类免疫分析方法的研究，有必要提供一种有效的硝西洋人工抗原的制备方法。

发明内容

本发明的目的是提供一种硝西洋人工抗原的制备方法，所制备的产品可用于苯二氮卓类免疫分析方法的研究，为今后人们的研究提供了方便的途径。

本发明的技术方案：第一步为半抗原的制备及检测，以硝西洋为原料，利用铁粉还原法使硝西洋苯环上的硝基还原为胺基；第二步为人工抗原的制备及检测，利用重氮化法对半抗原上的胺基进行重氮化并使之与牛血清蛋白（BSA）结合，制备硝西洋的人工抗原。其反应方程式为：



工艺步骤为：

(1) 人工半抗原的制备：

称取 9mmol 还原铁粉于 50ml 圆底烧瓶中，加入 10ml 水、3mmol 氯化铵，水浴中加热 15min。另称取硝西洋 3mmol，用一定量的甲醇溶解后，分 3 次加入上述的反应液当中，回流反应 4-6h。趁热过滤铁粉，将滤液进行减压蒸馏，得到的残留用少量热甲醇溶液溶解，低温析出沉淀，过滤，干燥得到 2mmol 半抗原 1,3-二氢-7-氨基-5-苯基-2H-1,4-苯并二氮卓-2-酮备用。

反应终点监测：硅胶薄层板的制作：称取硅胶 12g，溶解在 40ml 0.5%质量浓度的羟甲基纤维素钠溶液中，用玻璃棒充分搅拌成糊状，超声波振荡 1 分钟，均匀涂布在玻璃板上，置于阴凉处自然干燥后，放入 105℃的烘箱中活化 1h，然后放入干燥箱中备用。

薄层层析法检测：硅胶薄板下端 1cm 处作一水平线，吸取反应液 1 μ l 点于线上，点样结束后吹干，将薄板放入层析缸中，层析液为乙酸乙酯-正己烷混合溶剂，乙酸乙酯:正己烷体积比为 1:1，展开至薄板 3/4 处，取板，吹干溶剂。将薄板置于紫外分析仪中，在 254nm 波长观察，在 Rf 为 0.25 处观察到显色点作为反应终点。

(2) 人工抗原的制备：

制备 A 液：称取 0.1mmol 半抗原于 20ml 烧杯中，加入 10ml 二甲基甲酰胺、1ml 水和 1ml 的 1N 盐酸，形成深红色溶液，冷却至 2℃。然后逐步滴加 1M 亚硝酸钠溶液，用淀粉碘化钾试纸监测，直到试纸变蓝停止滴加，低温下搅拌 1h，此液为 A 液。

硼酸盐缓冲液：0.2mol/L 硼酸：硼酸 12.37g 加水至 1000ml，0.05mol/L 硼砂：硼砂 19.07g 加水至 1000ml，将上述两溶液以体积比 2:8 的比例混合即为 pH9.0 的硼酸盐缓冲液。

制备 B 液：称取 400mg 的牛血清蛋白溶于 15ml 的 pH9.0 硼酸盐缓冲液，低温保存，此液为 B 液。

在低温搅拌下，将 A 液逐滴地滴加到 B 液中，并用 1N 的氢氧化钠溶液调节 pH，使 pH 始终保持在 9。在 4℃条件下搅拌保存过夜，即得到人工抗原混合液。

透析袋前处理：取 10cm 的透析袋，于沸水中煮沸 5min，再用 60℃的去离子水冲洗 3min，保存在 4℃去离子水中备用。

将人工抗原混合液移入透析袋中，用 2 \times 2L 的 0.05M 的碳酸氢钠溶液和 2 \times 2L 的去离子水透析 4-6 天。最后使用冻干法将透析袋中的液体制成粉末，即得到人工抗原：硝西洋-牛血清蛋白。

(3) 硝西洋人工抗原的鉴定

偶联比测定：估算偶联物中被偶联的两种分子的比率（偶联比率）的方法，虽然方法种类很多，但都是依据检测偶联物中被偶联的两种分子含量（或相对含量）的原理建立起来的。分光光度法是利用物质对光的吸收与其浓度呈比例关系的原理分别测定被偶联的两种分子浓度。在大分子与小分子偶联物中，两种分子均有各自不同的紫外扫描光谱，并表现出光谱图迭加的性质。

摩尔吸光系数 ϵ ：配制硝西洋浓度为 0, 10, 20, 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的 20%乙醇溶液，通过紫外扫描可知硝西洋的最大吸收波长为 242nm，在 242nm 处测吸光值，每个浓度做平行样。摩尔吸光系数计算为： $\epsilon = \text{吸光值} / \text{摩尔浓度}$ 。本发明计算得 $\epsilon = 15032.44 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$

偶联物蛋白浓度测定：配制浓度为 0, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的牛血清蛋白溶液 1.5ml，加入 5ml 考马斯亮蓝染色液，立即混匀，30℃水浴温热 5 分钟，每个浓度做平行样。在 595nm 处测吸光值，绘制蛋白浓度与吸光值的关系曲线。在 595nm 处测定抗原溶液的吸光值，从曲线上得到抗原溶液的相应的蛋白浓度。先将本发明偶联物蛋白溶解稀释后进行测定，计算得抗原溶液的蛋白浓度为 7.35 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

偶联比测定：配制 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 牛血清蛋白的 20%乙醇溶液，将偶联产物用 20%乙醇稀释到 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，在 242nm 处测吸光值，以 20%乙醇为空白，测出的吸光值分别为 A_1 , A_2 ，则偶联比率 r 为： $r = [(A_1 - A_2) / \epsilon] / (150 \times 10^{-3} / 65000)$ ，本发明计算得 $r \approx 23$ 。

其中 ϵ 为摩尔吸光系数 ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$)，65000 为牛血清蛋白的分子量， 150×10^{-3} 为牛血清蛋白浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)。

本发明的有益效果：本发明合成了硝西洋的人工抗原，合成步骤简洁，有效，完全可用于免疫分析当中，为以后人们的研究提供了方便的途径，可以满足国内对其研究的需要。

附图说明

图1 硝西洋人工半抗原的液相色谱图。

图2 硝西洋人工半抗原的质谱图。

图3 硝西洋人工半抗原的紫外图。

图4 硝西洋人工抗原制备前后的紫外扫描图。

具体实施方式

(1) 人工半抗原的制备：

称取 9mmol 还原铁粉于 50ml 圆底烧瓶中，加入 10ml 水、3mmol 氯化铵，水浴中加热 15min。另称取硝西洋 3mmol，用一定量的甲醇溶解后，分 3 次加入上述的反应液当中，回流反应 4-6h。趁热过滤铁粉，将滤液进行减压蒸馏，得到的残留用少量热甲醇溶液溶解，低温析出沉淀，过滤，干燥得到 2mmol 半抗

原 1,3-二氢-7-氨基-5-苯基-2H-1,4-苯并二氮卓-2-酮备用。

反应终点监测：硅胶薄层板的制作，称取硅胶 12g，溶解在 40ml 0.5%质量浓度的羟甲基纤维素钠溶液中，用玻璃棒充分搅拌成糊状，超声波振荡 1 分钟，均匀涂布在玻璃板上，置于阴凉处自然干燥后，放入 105℃ 的烘箱中活化 1h，最后放入干燥箱中备用。

薄层层析法检测：硅胶薄板下端 1cm 处作一水平线，吸取反应液 1 μ l 点于线上，点样结束后吹干，将薄板放入层析缸中，层析液为乙酸乙酯-正己烷混合溶剂，乙酸乙酯:正己烷体积比为 1:1，展开至薄板 3/4 处，取板，吹干溶剂。将薄板置于紫外分析仪中，在 254nm 波长观察，在 Rf 为 0.25 处观察到显色点作为反应终点。

(2) 人工抗原的制备：

制备 A 液：称取 0.1mmol 半抗原于 20ml 烧杯中，加入 10ml 二甲基甲酰胺、1ml 水和 1ml 的 1N 盐酸，形成深红色溶液，冷却至 2℃。然后逐步滴加 1M 亚硝酸钠溶液，用淀粉碘化钾试纸监测，直到试纸变蓝停止滴加，低温下搅拌 1h，此液为 A 液。

硼酸盐缓冲液：0.2mol/L 硼酸：硼酸 12.37g 加水至 1000ml，0.05mol/L 硼砂：硼砂 19.07g 加水至 1000ml，将上述两溶液以体积比 2:8 的比例混合即为 pH9.0 的硼酸盐缓冲液。

制备 B 液：称取 400mg 的牛血清蛋白溶于 15ml 的 pH9.0 硼酸盐缓冲液，低温保存，此液为 B 液。

在低温搅拌下，将 A 液逐滴地滴加到 B 液，并用 1N 的氢氧化钠溶液调节 pH，使 pH 保持在 9。在 4℃ 条件下搅拌保存过夜，即得到人工抗原混合液。

透析袋前处理：取 10cm 的透析袋，于沸水中煮沸 5min，再用 60℃ 的去离子水冲洗 3min，保存在 4℃ 去离子水中备用。

将人工抗原混合液移入透析袋中，用 2 \times 2L 的 0.05M 的碳酸氢钠溶液和 2 \times 2L 的去离子水透析 4-6 天。最后使用冻干法将透析袋中的液体制成粉末，即得到人工抗原：硝西洋-牛血清蛋白。

(3) 硝西洋人工抗原的鉴定，同上述。

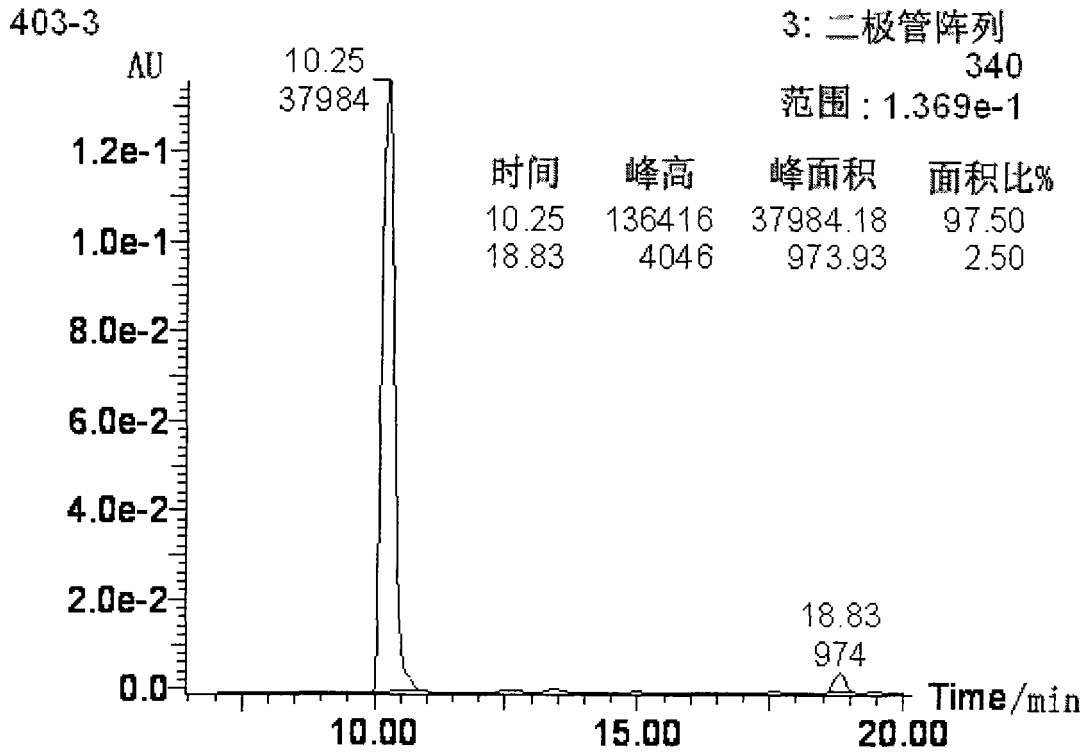


图1

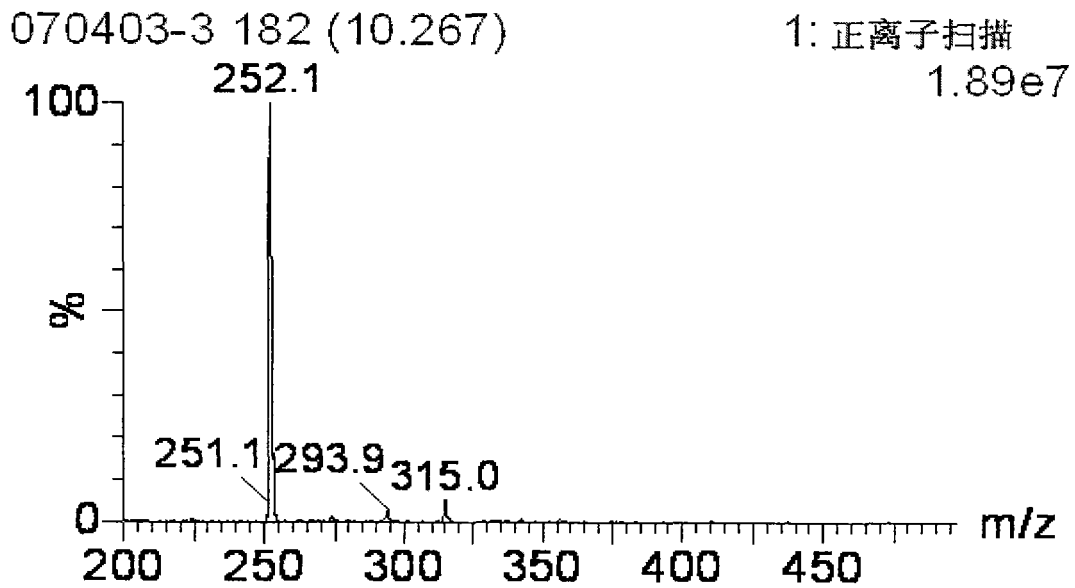


图2

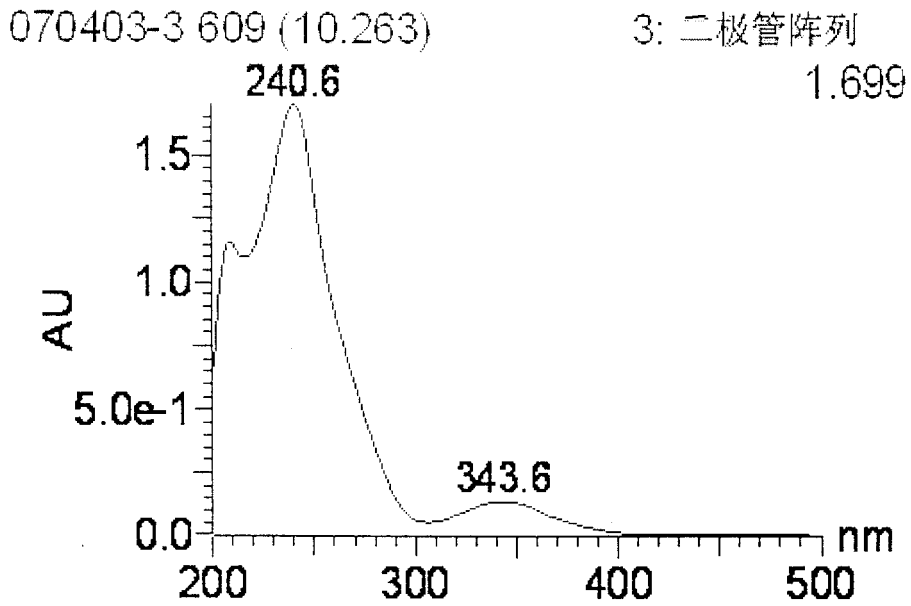


图3

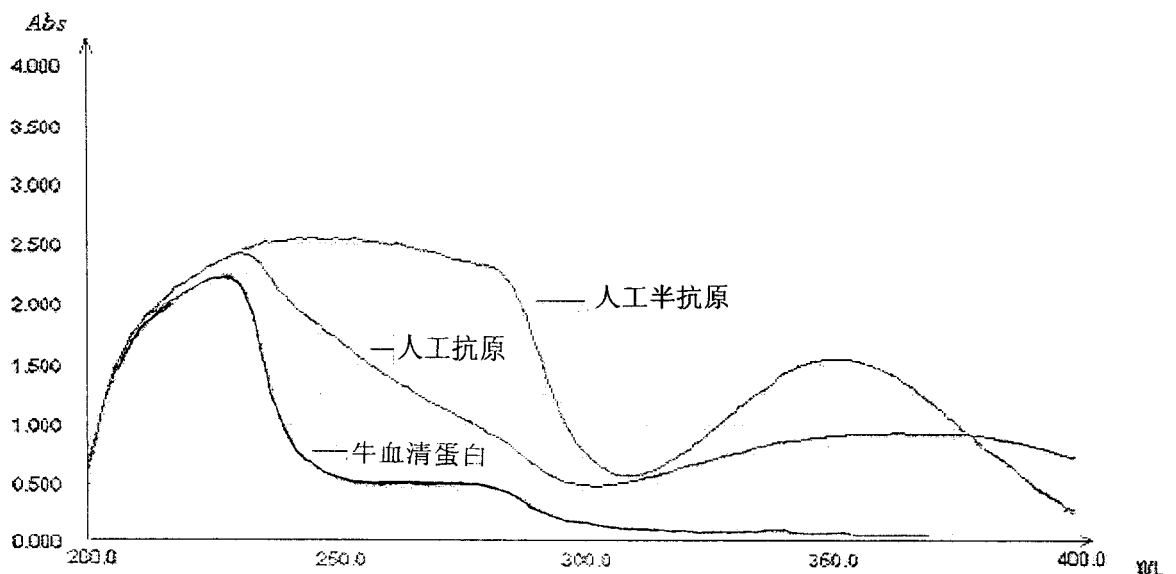


图4

专利名称(译)	一种硝西洋人工抗原的制备方法		
公开(公告)号	CN101071133A	公开(公告)日	2007-11-14
申请号	CN200710022543.3	申请日	2007-05-11
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	胥传来 李秋生 彭池方 周亚南 陶冠军 秦昉 徐一平		
发明人	胥传来 李秋生 彭池方 周亚南 陶冠军 秦昉 徐一平		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53 G01N33/558 G01N21/79		
其他公开文献	CN101071133B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)
 一种硝西洋人工抗原的制备方法，属于生物化工技术领域。本发明以硝西洋为原料，利用铁粉还原法使硝西洋苯环上的硝基还原为胺基，制备人工半抗原；再利用重氮化法对半抗原上的胺基进行重氮化并使之与牛血清蛋白结合，制备硝西洋的人工抗原即硝西洋-牛血清蛋白。本发明合成了硝西洋的人工抗原，合成步骤简洁，有效，完全可用于免疫分析当中，为以后人们的研究提供了方便的途径，可以满足国内对其研究的需要。

