



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101962343 B

(45) 授权公告日 2013.12.25

(21) 申请号 201010256944.7

(22) 申请日 2010.08.17

(73) 专利权人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

(72) 发明人 雷红涛 孙远明 宋利军 刘肆
王强

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 林丽明

(51) Int. Cl.

C07C 245/08(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101397340 A, 2009.04.01, 说明书第7-8
页实施例.

CN 101585878 A, 2009.11.25, 说明书第2-3
页具体实施方式.

Eliot Steinberg et al. The Synthesis of
azo compounds for urogenital analgesia.
《Journal of the American Pharmaceutical
Association》. 1953, 第 XLII 卷 (第 3 期), 第
129-131 页.

Dolores Torres Pérez et al. Espectros
electrónicos de colorantes derivados de la
m-fenilendiamina. 《Revista CENIC Ciencias
Químicas》. 1999, 第 30 卷 (第 2 期), 第 60-63
页.

Dolores Torres Pérez et al. Espectros
electrónicos de colorantes derivados de la
m-fenilendiamina. 《Revista CENIC Ciencias
Químicas》. 1999, 第 30 卷 (第 2 期), 第 60-63
页.

审查员 赵永江

权利要求书2页 说明书5页

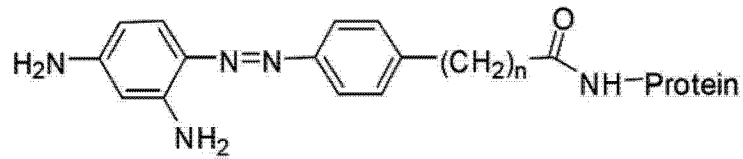
(54) 发明名称

碱性橙半抗原、人工抗原和抗体及其制备方
法和应用

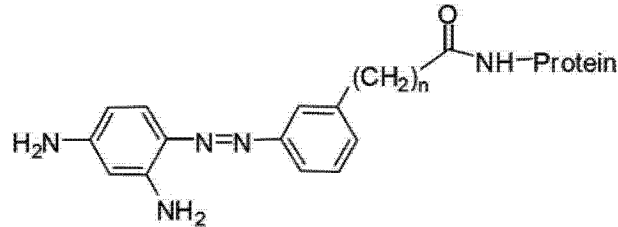
(57) 摘要

本发明公开了一种碱性橙半抗原、人工抗原、
抗体及其制备方法和应用。本发明以间苯二胺与
对氨基苯酸或间氨基苯酸通过重氮化反应生成含
羧基的半抗原；通过活泼酯法或者混合酸酐法将
所述半抗原与蛋白质偶联制备人工抗原；以所述
人工抗原制备得到碱性橙特异性抗体。所述抗体
可用于碱性橙免疫检测，对实现碱性橙的安全监
控具有重要实际应用意义。

1. 一种碱性橙人工抗原,其特征在于具有式(III)或式(IV)所示结构:



(III)



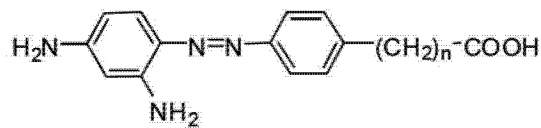
(IV)

其中,式(III)或式(IV)中 $n=0 \sim 3$ 。

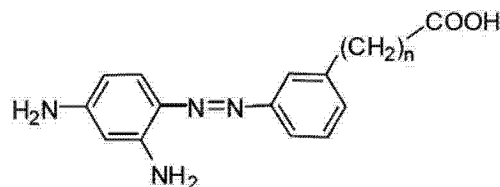
2. 一种权利要求1所述抗原的制备方法,其特征在于用活泼脂法制备,步骤如下:

(1) 将式(I)或式(II)所示的半抗原 $5 \sim 10\text{mg}$ 溶解于 $1 \sim 3\text{ml}$ 二氧六环或二甲基甲酰胺中,加入 $5 \sim 10\text{mg}$ 二环己基碳二亚胺和 $5 \sim 10\text{mg}$ N-羟基琥珀酰亚胺,反应 $3.5 \sim 5\text{h}$,离心除去沉淀得上清;

(2) 将上清滴入 2ml pH 值为 $7.4 \sim 9.6$ 、 1mol/L 含有 10mg/mL 载体蛋白的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中,反应 $8 \sim 12\text{h}$,用 0.85% 的生理盐水透析 4 天得所述抗原;



(I);或



(II)

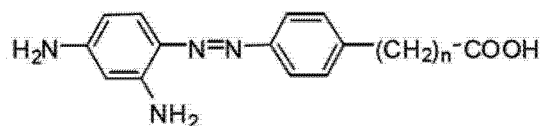
其中,式(I)或式(II)中 $n=0 \sim 3$ 。

3. 一种权利要求1所述抗原的制备方法,其特征在于按照混合酸酐法制备,步骤如下:

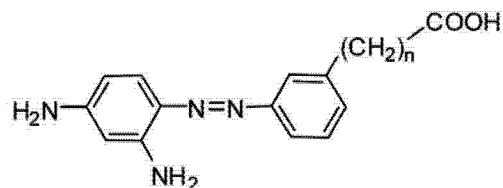
(1) 将式(I)或式(II)所示的半抗原 $5 \sim 10\text{mg}$ 溶解于 $1 \sim 3\text{ml}$ 二氧六环或二甲基甲酰胺中,加入 $5 \sim 10\text{mg}$ 加入氯甲酸异丁酯,搅拌反应 $0.5 \sim 2\text{h}$,得甲液;

(2) 将载体蛋白 $10 \sim 20\text{mg}$ 溶于 $1 \sim 2\text{ml}$ 1mol/L 、pH 9.6 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中,得乙液;

(3) 将甲液缓慢滴加到乙液中,搅拌反应过夜,反应液用 0.85% 的生理盐水透析 4 天得抗原;



(I);或



(II)

其中,式(I)或式(II)中 $n=0 \sim 3$ 。

4. 根据权利要求2或3所述的制备方法,其特征在于所述的载体蛋白为牛血清白蛋白、匙孔血蓝蛋白或卵清白蛋白。

5. 一种权利要求1所述碱性橙抗原的应用,其特征在于是应用于制备碱性橙多克隆抗体或单克隆抗体。

6. 一种权利要求1所述碱性橙抗原的应用,其特征在于应用于食品样品中的碱性橙残留检测方面。

7. 根据权利要求5所述应用,其特征在于所述碱性橙多克隆抗体或单克隆抗体应用于食品样品中的碱性橙残留检测方面。

碱性橙半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全技术领域。具体涉及碱性橙半抗原、人工抗原和抗体的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 碱性橙,化学名为 2,4-二氨基偶氮苯,俗名“王金黄”,是一种偶氮类碱性工业染料,用于腈纶、蚕丝、羊毛、二醋纤单宁媒纤维的染色,也可以用于皮革麻的染色和竹、木、纸张、蚊香的着色及制造色淀、溶剂染料、阳离子染料。

[0003] 碱性橙在体内代谢成胺类,有强致癌性。根据美国卫生研究所(NIH)化学品健康与安全数据库资料表明:摄取、吸入以及皮肤接触该物质均会造成急性和慢性的中毒伤害。根据《中华人民共和国食品添加剂使用卫生标准》(GB 2760)及《中华人民共和国食品卫生法》的相关规定,该物质为禁止用作食品添加剂的化学制品。

[0004] 由于在中性及偏碱性条件下,碱性橙与蛋白质吸附较牢固,不易褪色,因此有些不法商人就将其用于豆制品的染色,使腐竹、豆皮的色泽光亮,欺骗消费者,使消费者的身体健康受到严重影响。对碱性橙残留的检测具有重要的意义。

[0005] 对碱性橙残留的检测目前主要有薄层层析(TLC)、高效液相色谱/紫外检测器(HPLC/UV)、高效液相色谱/光电二极管阵列(HPLC/PDA)、液相色谱-质谱联用(LC-MS)、气相色谱-质谱联用(GC-MS)等方法。这些仪器检测方法操作复杂、需受过专门训练的专业人员才能操作,而且存在着适用范围窄、设备昂贵、成本高等问题。目前我国相应的碱性橙检测技术不完备,很有必要研制更加简单快捷方便的检测方法和产品。

[0006] 免疫检测方法应用于碱性橙的检测相对简单快捷。免疫检测方法包括胶体金免疫层析法、ELISA法,是目前食品安全快速检测的两种重要方法,已经在食品安全检测中发挥着越来越明显的作用。免疫检测方法都必须首先制备出碱性橙半抗原、抗原及抗体,然后才能利用这些试剂建立免疫检测方法。

[0007] 胥传来等公开了一种专利《一种碱性橙 II 完全抗原的合成方法》(申请号:200910031728.X),以碱性橙 II 为半抗原,用重氮化法将其与载体蛋白 BSA 偶联制备抗体;赵志磊等公开了一种专利《碱性橙人工抗原合成及抗体制备方法》(申请号:200810079538.0),以戊二醛为偶联剂分别与牛血清白蛋白。

[0008] 但是,碱性橙与很多偶氮类染料很类似,其苯环上的氨基数目及位置是区别于其他染料的特征结构,在半抗原设计时若不保留特征结构,抗体的特异性将受到很大影响。

[0009] 因此,需要寻找新的方法,在半抗原设计时能保留碱性橙的特征结构,保证抗体的特异性才能获得理想的检测效果。

发明内容

[0010] 本发明的一个目的是填补碱性橙现有检测技术的不足,提供一种碱性橙人工半抗原、人工抗原和特异性抗体。

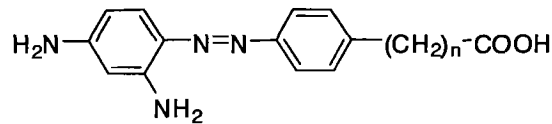
[0011] 本发明的另一个目的是提供所述碱性橙人工半抗原、人工抗原和特异性抗体的制备方法。

[0012] 本发明还有一个目的是提供所述碱性橙人工半抗原、人工抗原和特异性抗体的应用。

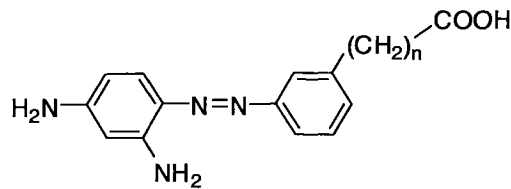
[0013] 本发明的目的通过以下技术方案予以实现：

[0014] 提供一种碱性橙人工半抗原、人工抗原和特异性抗体，所述碱性橙人工半抗原具有式 (I) 或式 (II) 所示结构：

[0015]



(I)

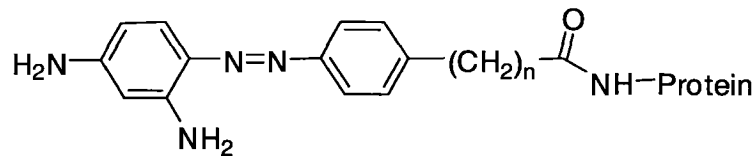


(II)

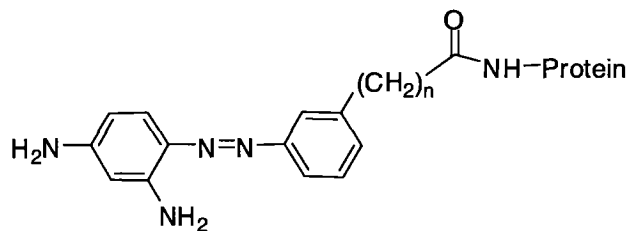
[0016] 其中，式 (I) 或式 (II) 中 $n = 0 \sim 3$ 。

[0017] 所述碱性橙人工抗原，具有式 (III) 或式 (IV) 所示结构：

[0018]



(III)



(IV)

[0019] 本发明提供了所述碱性橙半抗原的制备方法，以间苯二胺为原料，与对氨基苯酸或间氨基苯酸通过重氮化反应生成含羧基的半抗原。包括以下步骤：

[0020] (1) 将对氨基苯酸或间氨基苯酸 $1 \sim 3\text{mmol}$ 溶于 20ml 水中，加入 10ml 0.1mol/l 的盐酸，加入含 $114 \sim 228\text{mg}$ ($1.15 \sim 3.3\text{mmol}$) 的亚硝酸钠水溶液 1mL ，反应 2h ，反应液为重氮液；

[0021] (2) 将 $1 \sim 3$ 倍于对 (间) 氨基苯酸物质的量的间苯二胺溶于 5mL 水中，用 1mol/L 盐酸调节 pH 值至 $6 \sim 7$ ，然后逐滴加入步骤 (1) 制备得到的重氮液，静置过夜，离心所得

沉淀即为半抗原。

[0022] 本发明所述人工抗原的制备可采用活泼脂法或者混合酸酐法与蛋白质偶联制备人工抗原,也可以根据本发明设计思想,采用本领域其他常规方法将本发明所述半抗原与蛋白质偶联制备人工抗原。

[0023] 本发明所述抗原的制备方法包括以下步骤(活泼酯法):

[0024] (1) 将权利要求1所述半抗原5~10mg溶解于1~3ml 二氧六环或二甲基甲酰胺中,加入5~10mg 二环己基碳二亚胺和5~10mgN-羟基琥珀酰亚胺,反应3.5~5h,离心除去沉淀得上清;

[0025] (2) 将上清滴入2mL pH 7.4~9.6、1mol/L含有10mg/mL载体蛋白的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中,反应8~12h,用0.85%的生理盐水透析4天得所述抗原。

[0026] 或者,本发明所述抗原的制备方法包括以下步骤(混合酸酐法):

[0027] (1) 将权利要求1所述半抗原5~10mg溶解于1~3ml 二氧六环或二甲基甲酰胺中,加入5~10mg 加入氯甲酸异丁酯,搅拌反应0.5~2h,得甲液;

[0028] (2) 将载体蛋白10~20mg溶于1~2mL 1mol/L、pH值为9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中,得乙液;

[0029] (3) 将甲液缓慢滴加到乙液中,搅拌反应过夜,反应液用0.85%的生理盐水透析4天得抗原。

[0030] 根据权利要求5或6所述的制备方法,其特征在于所述的载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA)、匙孔血蓝蛋白(KLH)、卵清白蛋白(OVA)等蛋白类物质。

[0031] 可用本发明制得的抗原免疫Balb/c小鼠或新西兰兔,免疫剂量为1mg/Kg,背部皮下注射,每隔15d加强免疫一次,第4次后耳缘静脉采血测定效价和特异性,待效价和特异性合格后,采集血清获得多克隆抗体;或用小鼠脾细胞进行细胞融合,获得杂交瘤细胞,细胞分泌获得单克隆抗体。

[0032] 所述多克隆抗体可应用于食品或环境样品中的碱性橙残留检测方面。

[0033] 本发明的有益效果是:

[0034] 通过设计合理的合成路线,在半抗原设计时能保留碱性橙的特征结构,从而保证获得的抗体的特异性,所述抗体可用于简单快捷方便的碱性橙免疫检测,包括胶体金免疫层析、ELISA等食品安全快速检测方法,实现碱性橙安全监控,获得理想的检测效果。

具体实施方式

[0035] 下面结合具体实施例进一步详细说明本发明。实施例中碱性橙等试剂除非特别说明,都是常规市购实验室用试剂。

[0036] 本发明的总体技术方案如下

[0037] 实施例1半抗原1(hapten1)合成

[0038] 以对氨基苯甲酸作为对氨基苯酸类的代表,但不局限于对氨基苯甲酸,其余对氨基苯酸类物质为原料时,方法同下:

[0039] (1) 对氨基苯甲酸411mg(3mmol)溶于20ml水中,加入10ml 0.1mol/l的盐酸,加入含114~228mg(1.15~3.3mmol)的亚硝酸钠水溶液1mL,反应2h,反应液为重氮液;

[0040] (2) 间苯二胺356mg(3.3mmol)溶于5mL水中,用1mol/L盐酸调节pH至6~7,然后

逐滴加入步骤(1)制备得到的重氮液,静置过夜,离心所得沉淀即为半抗原 1(hapten 1)。

[0041] 半抗原 1 鉴定结果:

[0042] TLC $R_f = 0.5$ ($\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 15 : 1$);MS(APCI positive)m/z :257[M-H]⁺.¹H NMR(DMSO-d₆,600MHz) δ :8.79(s,1H),8.58(s,1H),7.95(d,2H),7.82(d,4H),6.5(d,4H),3.59(d,2H)

[0043] 实施例 2 半抗原 2(hapten2) 的合成

[0044] 以间氨基苯乙酸作为间氨基苯酸类的代表,但不局限于胺氨基苯乙酸,其余间氨基苯酸类物质为原料时,方法同下:

[0045] (1) 将 433mg 间氨基苯乙酸溶于 20ml 水中,加入 10ml0.1mol/l 的盐酸,加入含 114 ~ 228mg(1.15 ~ 3.3mmol) 的亚硝酸钠水溶液 1mL,反应 2h,反应液为重氮液;

[0046] (2) 间苯二胺 356mg(3.3mol) 溶于 5mL 水中,用 1mol/L 盐酸调节 pH 至 6 ~ 7,然后逐滴加入步骤(1)制备得到的重氮液,静置过夜,离心所得沉淀即为半抗原 2(hapten 2)。

[0047] 半抗原 2 鉴定结果:

[0048] TLC $R_f = 0.5$ ($\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 15 : 1$).MS(APCI positive)m/z :271[M-H]⁺.¹H NMR(DMSO-d₆,600MHz) δ :7.61(d,2H),7.29-7.36(d,4H),5.86-6.00(d,2H)。

[0049] 实施例 3 免疫抗原制备

[0050] 以半抗原 1 为例讲述免疫原制备,其他半抗原制备时方法相同,不再赘述。

[0051] (1) 将 5 ~ 10mg 实施例 1 所制备的半抗原 1 溶解于 1ml 二氧六环中,加入 10mg 二环己基碳二亚胺和 10mg N-羟基琥珀酰亚胺,反应 5h,离心除去沉淀得上清;

[0052] (2) 将上清滴入 2mL pH 值为 9.6、1mol/L 含有 10mg/mL 牛血清白蛋白的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中,反应 12h,用 0.85% 的生理盐水透析 4 天得抗原 hapten1-BSA。

[0053] 实施例 4 包被抗原制备

[0054] 以半抗原 2 为例讲述包被抗原制备,其他半抗原制备时方法相同,不再赘述。

[0055] (1) 将 10mg 实施例 2 的半抗原 2 溶解于 1 二氧六环或二甲基甲酰胺中,加入 10mg 加入氯甲酸异丁酯,搅拌反应 2h,得甲液;

[0056] (2) 将卵清白蛋白(OVA)20mg 溶于 2mL 1mol/L、pH 值为 9.6 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中,得乙液;

[0057] (3) 将甲液缓慢滴加到乙液中,搅拌反应过夜,反应液用 0.85% 的生理盐水透析 4 天得包被抗原 OVA-hapten 2。

[0058] 实施例 5 抗血清的制备

[0059] 取实验室常规使用的 1.5 ~ 2kg 新西兰白兔 3 只,将免疫原 hapten1-BSA,用生理盐水稀释,加等体积弗氏完全佐剂充分乳化,给 2 只新西兰兔进行背部皮下皮下多点注射,免疫剂量为 0.5mg/只,两周后加强免疫,免疫剂量同基础免疫,改用弗氏不完全佐剂,每两周加强免疫一次剂量为 0.3mg/只。从第三次加强免疫开始,免疫后第 7d 耳部动脉取血,定期监测并鉴定抗体。

[0060] 待抗体达到一定水平后,心脏采血,室温静置,待血液凝固后,转入 37°C 温箱中放置 30min,再转入 4°C 冰箱内过夜,分离得到抗血清 serum1。

[0061] 实施例 6 抗体纯化

[0062] 采用辛酸-硫酸铵法或者 Protein G/A 进行。辛酸-硫酸铵法是常规方法,每毫

升兔血清中加入 75 μ L 辛酸,每毫升小鼠腹水中加入 33 μ L ;Protein G/A 按照商品说明书进行即可。

[0063] 实施例 7 标准曲线的建立

[0064] (1) 包被

[0065] 将包被抗原用 pH 值 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释至 0.8 μ g/mL、0.6 μ g/mL,包被酶标板,100 μ L/孔,置于 4 $^{\circ}$ C 过夜。

[0066] (2) 洗涤、封闭

[0067] 倾去孔内液体,每孔加洗涤液 200 μ L,洗涤 2 次,然后甩净洗涤液;封闭:每孔加入 120 μ L 封闭液,37 $^{\circ}$ C 封闭 3h,然后甩净洗涤液,37 $^{\circ}$ C 烘 30min。

[0068] (3) 加样

[0069] 第一孔加 50 μ L PBST,后面 11 孔依次加入三聚氰胺标准溶液,然后每孔加入 50 μ L 稀释好的抗血清。

[0070] (4) 加酶标二抗

[0071] 每孔加入 100 μ L HRP-羊抗鼠 IgG(15000 稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。洗涤同 2。

[0072] (5) 显色

[0073] 每孔加入显色液 100 μ L,置于 37 $^{\circ}$ C 显色 15min,然后每孔加入 50 μ L 的终止液(10% H_2SO_4)以终止反应。

[0074] 12.7 测定

[0075] 用酶联免疫检测仪测定各孔 A_{450nm} 的吸收值。结果发现:

[0076] $IC_{50} = 0.31ng/ml$,最低检测限为 0.087ng/ml;

[0077] 实施例 8 抗体的特异性

[0078] 常用交叉反应活性作为评价的重要指标,交叉反应越小,抗体的特异性越强,以下列公式计算交叉反应性 CR%:

[0079]

$$CR = \frac{IC_{50}(\text{碱性橙})}{IC_{50}(\text{交叉药物})} \times 100\%$$

[0080] 发现所得抗体 serum1 和 serum2 与日落黄、酒石黄、酸性橙、玫瑰红、碱性嫩黄、酸性金黄、对位红、苏丹红均无明显交叉反应,特异性非常良好。

[0081] 实施例 9 豆干样品检测

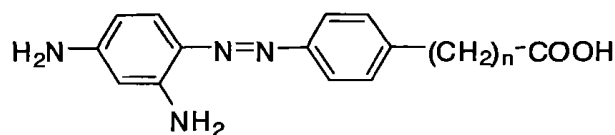
[0082] 将豆干剪碎后研磨,分别称取 5.00g 豆干样本和 5.00g 无水硫酸钠置于 50mL 的离心管,加无水乙醇 15ml,在恒温磁力搅拌器上搅拌提取 15min,静置澄清,转移上清液于干燥的 50ml 的离心管中,再次以同样的方法用 10ml 无水乙醇提取,合并提取液用滤纸过滤,减压浓缩至干,用 0.05mol/L, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液定容到 25ml,将实施例 7 中的标准品换成提取液,进行检测。对市面 20 份样品随机检测,与 HPLC 方法的相关系数达到 86.6%。

[0083] 若采用添加样,添加量为 40ng/mL、400ng/mL、2 μ g/mL 时,回收率可达到 83 ~ 92%。

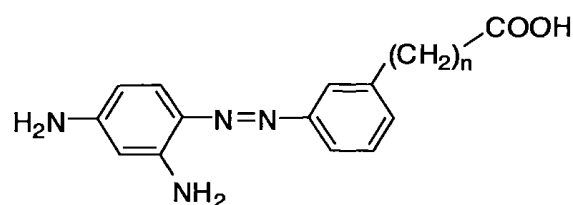
专利名称(译)	碱性橙半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN101962343B	公开(公告)日	2013-12-25
申请号	CN201010256944.7	申请日	2010-08-17
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	雷红涛 孙远明 宋利军 刘肆 王强		
发明人	雷红涛 孙远明 宋利军 刘肆 王强		
IPC分类号	C07C245/08 C07K14/765 C07K14/795 C07K14/77 C07K16/44 G01N33/558 G01N33/535		
代理人(译)	林丽明		
审查员(译)	赵永江		
其他公开文献	CN101962343A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种碱性橙半抗原、人工抗原、抗体及其制备方法和应用。本发明以间苯二胺与对氨基苯酸或间氨基苯酸通过重氮化反应生成含羧基的半抗原；通过活泼酯法或者混合酸酐法将所述半抗原与蛋白质偶联制备人工抗原；以所述人工抗原制备得到碱性橙特异性抗体。所述抗体可用于碱性橙免疫检测，对实现碱性橙的安全监控具有重要实际应用意义。



(I)



(II)