



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103755802 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 30

(21) 申请号 201410019076. 9

C07K 1/107(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 01. 16

C07K 16/44(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800 号江南大学食品学院

(72) 发明人 胥传来 刘丽强 王利兵

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
(普通合伙) 32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/795(2006. 01)

C07K 14/77(2006. 01)

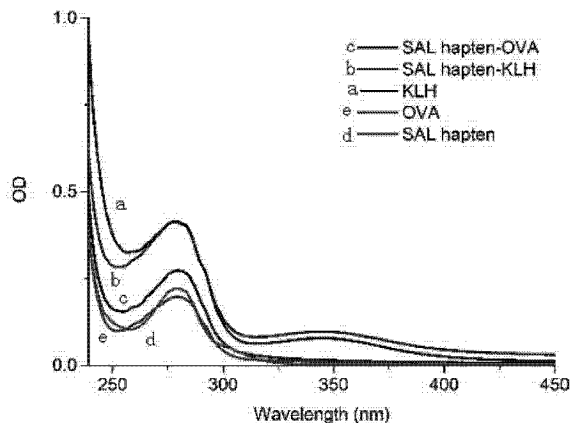
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

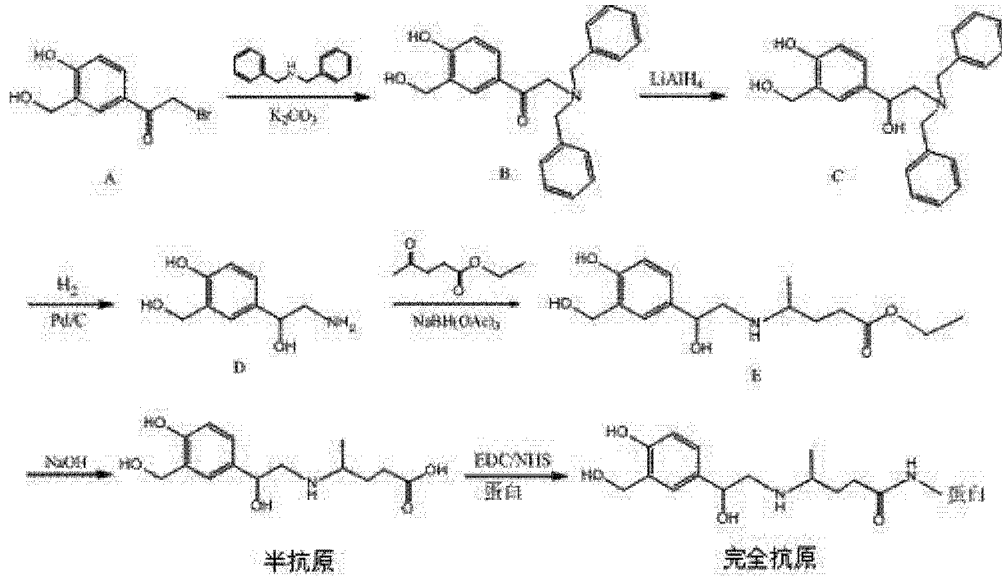
一种结构特异性沙丁胺醇完全抗原的合成方法

(57) 摘要

一种结构特异性沙丁胺醇完全抗原的合成方法,属于生物化工技术领域。本发明包括如下步骤:2-溴-1-[4-羟基-3-(羟甲基)苯基]乙-1-酮溶解于丙酮,加入碳酸钾后,与二苯基胺反应生成化合物B,在氢化铝锂催化下,生成化合物C,再在Pd/C催化下和氢气生成化合物D,再与乙酰丙酸乙酯还原胺化反应生成化合物E,在碱性条件下水解,并于酸性条件下重结晶后生成沙丁胺醇半抗原,名称为4-((2-羟基-2-(4-羟基-3-(羟甲基)苯基)乙基)氨基)戊酸。将此半抗原上的羧基与载体蛋白上的氨基进行偶联得到完全抗原。实验结果表明,用该完全抗原免疫动物得到的抗血清效价达81000,检测限为0.3ng/mL,半抑制浓度为3.2ng/mL。产生的抗体特异性高、灵敏度高;该抗原或抗体具有广阔的应用前景。



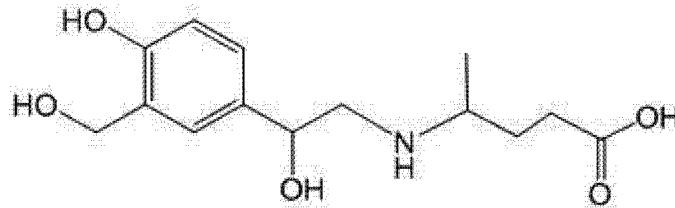
1. 一种沙丁胺醇完全抗原的合成方法,其特征在于合成路线为:



工艺步骤为:

(1) 沙丁胺醇半抗原的制备:

合成一种小分子化合物作为沙丁胺醇半抗原,名称为 4-((2-羟基-2-(4-羟基-3-(羟甲基)苯基)乙基)氨基)戊酸,其分子结构式如式 I 所示:



式 I:

制备步骤:将 2-溴-1-[4-羟基-3-(羟甲基)苯基]乙-1-酮溶解于丙酮,加入碳酸钾后,与二苯基胺反应生成化合物 B;在氢化铝锂催化下,生成化合物 C;再在 Pd/C 催化下和氢气生成化合物 D;再与乙酰丙酸乙酯还原胺化反应生成化合物 E;在碱性条件下水解,最后于酸性条件下重结晶后生成式 I 所示沙丁胺醇半抗原;

(2) 沙丁胺醇完全抗原的制备:

方案 A:将沙丁胺醇半抗原,用 DMF 溶解,与 NHS、EDC 反应,式 I 所示化合物:NHS:EDC 的摩尔比为 1: 1.5: 2,在 4°C 下、避光搅拌反应 1h,再在室温 25°C 下反应 12h;取载体蛋白,沙丁胺醇半抗原与载体蛋白的摩尔比为 80:1,用 0.1M pH9.6 碳酸盐缓冲液溶解,其中溶解后的蛋白浓度大于 3mg/mL,且碳酸盐缓冲液与 DMF 的体积比例为 5:1;将活化的半抗原溶液缓慢滴加到蛋白溶液中,室温下反应 24h,用 PBS 缓冲液透析 2 天,期间换液 4 次,即得到沙丁胺醇完全抗原;

或方案 B:将沙丁胺醇半抗原,用 DMF 溶解,与三正丁胺、氯甲酸异丁酯反应,半抗原:三正丁胺:氯甲酸异丁酯的摩尔比为 1: 1.2: 1.2,0°C 反应 1h;取载体蛋白,半抗原与载体蛋白的摩尔比为 80:1,用 0.1M pH9.6 碳酸盐缓冲液溶解,0°C 预冷 30min,其中溶解后的蛋白浓度大于 3mg/mL,且碳酸盐缓冲液与 DMF 的体积比例为 5:1;在 0°C 条件下,将活化的半抗原溶液缓慢滴加到蛋白溶液中,0°C 条件下反应 1h,然后室温下反应 24h,用 PBS 缓冲液

透析 2 天,期间换液 4 次,即得到沙丁胺醇完全抗原。

2. 根据权利要求 1 所述的沙丁胺醇完全抗原的合成方法,其特征在于所述载体蛋白为牛血清白蛋白 BSA、匙孔血蓝蛋白 KLH、血蓝蛋白 LPH、鸡卵清白蛋白 OVA、人血清白蛋白 HAS 之一种。

3. 权利要求 1 所述的沙丁胺醇完全抗原的应用,其特征在于:在制备沙丁胺醇抗体中的应用,所述抗体为多克隆抗体或单克隆抗体,所述抗体在检测沙丁胺醇中的应用。

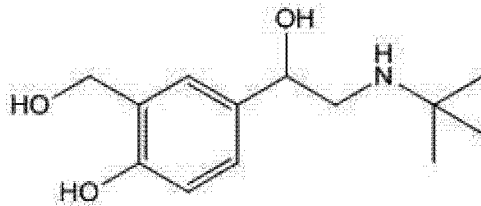
一种结构特异性沙丁胺醇完全抗原的合成方法

技术领域

[0001] 一种结构特异性的沙丁胺醇完全抗原的合成方法,属于生物化工技术领域。

背景技术

[0002] 沙丁胺醇(salbutamol),是一种短效 β 2肾上腺素能受体激动剂,用作平喘药。添加微量沙丁胺醇于牲畜饲料内,可以增加牲畜的瘦肉量及换肉率、减少脂肪,但是其毒性远高于具有相同功能的沙丁胺醇类似物。2002年9月10日起在中国境内禁止在饲料和动物饮用水中使用沙丁胺醇。



[0003] 目前我国对沙丁胺醇的检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、液质联用法(LC/MS)、酶联免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、胶体金试纸条法等。仪器分析方法存在样品须经多步稀释、过滤、提取,制备复杂、繁琐的缺点。尽管仪器方法是沙丁胺醇检测的确证方法,但是由于其操作繁琐,以及长时间的样本前处理过程,导致检测成本高,周期长,无法满足大批量样本快速筛查,以及现场快速检测的要求。ELISA和胶体金试纸条法属于免疫分析技术,具有较高的灵敏度和特异性,检测时对样本的纯度要求不高而且操作简便,适用于大量样本的现场快速检测。

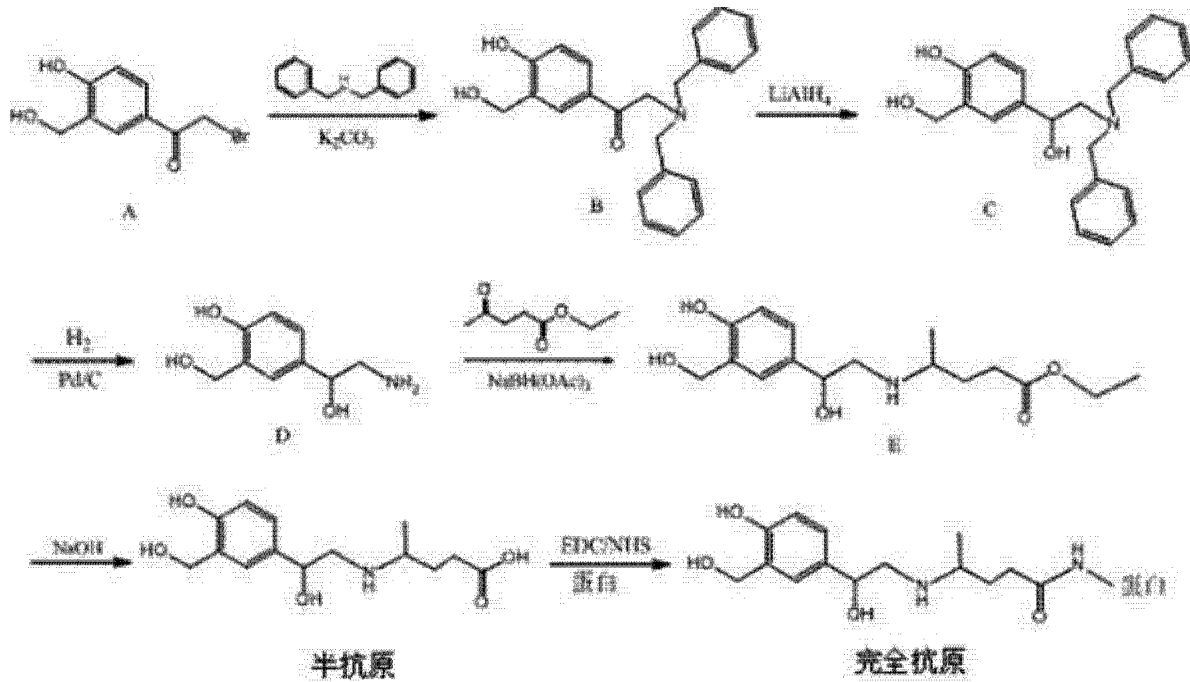
[0004] 影响免疫分析方法的关键因素在于特异性的抗原和抗体。传统的沙丁胺醇人工抗原一般通过琥珀酸酐与沙丁胺醇分子上的羟基偶联,衍生出羧基再与蛋白偶联。由于沙丁胺醇上有三个羟基,都能参与反应,因此使用琥珀酸酐法得到的羧基衍生物是一个混合物,最终通过免疫动物得到的抗体是针对这种混合物的,抗体的特异性和灵敏度会受到很大影响。同时,由于 β 2激动剂的其它药物,如克伦特罗,溴布特罗,特步他林,马步特罗,班布特罗等结构都有与沙丁胺醇一样的叔丁基侧链,因此通过羟基偶联的抗原,暴露出的位点是这几种 β 2激动剂的共有基团,相应免疫出的抗体不可避免的会与这些 β 2激动剂有交叉反应。

[0005] 本发明的半抗原是在沙丁胺醇分子的叔丁基侧链一端接出活性羧基,得到单一特异性结构的沙丁胺醇羧基衍生物,该衍生物为沙丁胺醇半抗原,将半抗原与载体蛋白偶联最后形成完全抗原。

发明内容

[0006] 本发明的目的:针对现有沙丁胺醇抗原合成技术以及相应抗体的不足和缺陷,提供一种新型的结构特异性沙丁胺醇半抗原和完全抗原合成方法,使得制备高特异性的沙丁胺醇单克隆抗体成为可能。

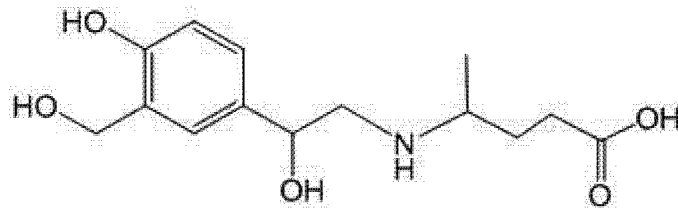
[0007] 本发明的技术方案：一种沙丁胺醇完全抗原的合成方法，其合成路线为：



工艺步骤为：

(1) 沙丁胺醇半抗原的制备：

合成一种小分子化合物作为沙丁胺醇半抗原，名称为 4-((2-羟基-2-(4-羟基-3-(羟甲基)苯基)乙基)氨基)戊酸，其分子结构式如式 I 所示：



式 I；

制备步骤：将 2-溴-1-[4-羟基-3-(羟甲基)苯基]乙-1-酮溶解于丙酮，加入碳酸钾后，与二苯基胺反应生成化合物 B，在氢化铝锂催化下，生成化合物 C，再在 Pd/C 催化下和氢气生成化合物 D，再与乙酰丙酸乙酯还原胺化反应生成化合物 E，在碱性条件下水解，最后于酸性条件下重结晶后生成式 I 所示沙丁胺醇半抗原；

(2) 沙丁胺醇完全抗原的制备：

方案 A：将沙丁胺醇半抗原，用 DMF 溶解，与 NHS、EDC 反应，式 I 所示化合物：NHS:EDC 的摩尔比为 1: 1.5: 2，在 4℃ 下、避光搅拌反应 1h，再在室温下反应 12h；取载体蛋白，沙丁胺醇半抗原与载体蛋白的摩尔比为 80:1，用 0.1M pH9.6 碳酸盐缓冲液溶解，其中溶解后的蛋白浓度大于 3mg/mL，且碳酸盐缓冲液与 DMF 的体积比例为 5:1；将活化的半抗原溶液慢速滴加到蛋白溶液中，室温下反应 24h，用 PBS 缓冲液透析 2 天，期间换液 4 次，即得到沙丁胺醇完全抗原；

或方案 B：将沙丁胺醇半抗原，用 DMF 溶解，与三正丁胺、氯甲酸异丁酯反应，半抗原：三正丁胺：氯甲酸异丁酯的摩尔比为 1: 1.2: 1.2，0℃ 反应 1h；取载体蛋白，半抗原与载

体蛋白的摩尔比为80:1,用 0.1M pH9.6 碳酸盐缓冲液溶解,0℃预冷 30min,其中溶解后的蛋白浓度大于 3mg/mL,且碳酸盐缓冲液与 DMF 的体积比例为 5:1;在 0℃条件下,将活化的半抗原溶液慢速滴加到蛋白溶液中,0℃条件下反应 1h,然后室温下反应 24h,用 PBS 缓冲液透析 2 天,期间换液 4 次,即得到沙丁胺醇完全抗原。

[0008] 所述的沙丁胺醇完全抗原的合成方法,所述载体蛋白为牛血清白蛋白 BSA、匙孔血蓝蛋白 KLH、血蓝蛋白 LPH、鸡卵清白蛋白 OVA、人血清白蛋白 HAS 之一。

[0009] 所述的沙丁胺醇完全抗原的应用,在制备沙丁胺醇抗体中的应用,所述抗体为多克隆抗体或单克隆抗体,所述抗体在检测沙丁胺醇中的应用。

[0010] 将完全抗原透析,然后进行紫外鉴定(图 1)。

[0011] 所述的 2-溴-1-[4-羟基-3-(羟甲基)苯基]乙-1-酮,6-氨基己酸纯度均大于 95%。

[0012] 上述沙丁胺醇半抗原或完全抗原化合物在制备沙丁胺醇抗体中的应用也属于本发明的保护范围。

[0013] 上述沙丁胺醇完全抗原化合物免疫动物得到的抗体也属于本发明的保护范围,所述抗体为多克隆抗体和单克隆抗体。

[0014] 上述沙丁胺醇半抗原或完全抗原化合物或抗体在检测沙丁胺醇中的应用也属于本发明保护的范畴。

[0015] 本发明的有益效果:本发明是新型的沙丁胺醇完全抗原合成方法,完全抗原呈现出的特异性的沙丁胺醇抗原决定簇,使得筛选出高特异性的沙丁胺醇单克隆抗体成为可能。

[0016] 实验结果表明,用本发明的完全抗原免疫动物得到的抗血清效价可达 81000,检测限为 0.3ng/mL,半抑制浓度为 3.2ng/mL。产生的抗体特异性高、灵敏度高。本发明的抗原或抗体可用于建立酶联免疫吸附分析方法和胶体金试纸快速检测法,从而用于快速检测食品中的沙丁胺醇残留。

附图说明

[0017] 图 1、沙丁胺醇完全抗原紫外光谱图。

具体实施方式

[0018] 下述实施例中所使用的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0019] 下述实施例中所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0020] 实施例 1 沙丁胺醇半抗原的制备

2-溴-1-[4-羟基-3-(羟甲基)苯基]乙-1-酮 500mg,溶解于 20mL 丙酮,加入 560mg 碳酸钾,混匀,再加入 430 μL 二苄基胺 60℃回流反应 12h,生成化合物 B;-20℃下,加入 230mg 氢化铝锂反应 12h,生成化合物 C;在 Pd/C 催化下,通氢气反应生成化合物 D;加入 0.3mL 乙酰丙酸乙酯,0.6mL 三乙胺,430mg 乙酰氧基硼氢化钠反应 12h,生成化合物 E;加入 6mL 1mol/L 的 NaOH 溶液水解 4h,旋蒸,加入 10mL 水溶解,调节反应液 pH 至 3.0,4℃下,静置重结晶,得到白色沉淀,离心烘干即为沙丁胺醇半抗原。

[0021] 实施例 2、沙丁胺醇完全抗原的制备

取 25mg 沙丁胺醇半抗原,加入 2mL DMF 溶解,再分别加入 NHS,EDC(半抗原 : NHS : EDC 的摩尔比为 1 : 1.5 : 2),4℃下,避光混匀,搅拌反应 60min,再在室温 25℃下反应 12h。取 75mg 牛血清蛋白(半抗原与牛血清蛋白的摩尔比为 80:1),加入 10mL 0.1M pH9.6 碳酸盐缓冲液。将活化的半抗原溶液慢速滴加到蛋白溶液中,室温下反应 24h。用 PBS 缓冲液透析 2 天,期间换液 4 次,即得到沙丁胺醇完全抗原。

[0022] 实施例 3、沙丁胺醇完全抗原的制备

取 25mg 沙丁胺醇半抗原,加入 2mL DMF 溶解,0℃预冷 30min。0℃下,分别加入三正丁胺、氯甲酸异丁酯(半抗原 : 三正丁胺 : 氯甲酸异丁酯的摩尔比为 1 : 1.2 : 1.2),0℃反应 1h。取 75mg 牛血清蛋白(半抗原与牛血清蛋白的摩尔比为 80:1),加入 10mL 0.1M pH9.6 碳酸盐缓冲液,0℃预冷 30 min。在 0℃条件下,将活化的半抗原溶液慢速滴加到蛋白溶液中,0℃条件下反应 1h,然后室温下反应 24h。用 PBS 缓冲液透析 2 天,期间换液 4 次,即得到沙丁胺醇完全抗原。

[0023] 实施例 4、沙丁胺醇抗血清的制备

以实施例 2 制得的抗原为免疫原,选用 6-8 周龄,雌性 BALB/C 小鼠为免疫动物,采用弗氏佐剂进行免疫,免疫小鼠 5 只。弗氏佐剂免疫方法为 :首免取适量免疫原与等体积弗氏完全佐剂混合,乳化好后经颈背部皮下多点注射免疫,每间隔 3 周加强免疫一次。

[0024] 实施例 5、沙丁胺醇抗血清的测定

一、采用间接 ELISA 方法检测血清效价,具体操作步骤如下 :

1) 包被 :将实施例 3 中的抗原用 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液从 10μg/mL 开始倍比稀释,100μL/孔,37℃反应 2h ;

2) 洗涤 :将板内溶液倾去,甩干,并用洗涤液洗涤 3 次,每次 3min ;

3) 封闭 :拍干后,加入 200μL /孔封闭液,37℃反应 2h。洗涤后烘干备用 ;

4) 加样 :将抗血清从 1:1000 开始倍比稀释,并加入到各稀释度的包被孔中,100μL/孔,37℃反应 1h ;充分洗涤后,加入 1:3000 稀释的 HRP-羊抗鼠 IgG,100μL /孔,37℃反应 1h ;

5) 显色 :将酶标板取出,充分洗涤后,每孔加入 100μL 的 TMB 显色液,37℃避光反应 15min ;

6) 终止和测定 :每孔加入 100μL 终止液以终止反应,然后用酶标仪测定各孔的 OD₄₅₀ 值 ;

7) 结果判读 :以 OD₄₅₀ 值大于或等于阴性对照孔的 2.1 倍(即 P/N ≥ 2.1)所对应的血清最高稀释倍数即为血清的 ELISA 效价。

[0025] 二、最低检测限、半数抑制以及特异性的检测

具体操作步骤如下 :

1) 用上述的间接 ELISA 方阵滴定法确定包被原和抗体的工作浓度,以 OD₄₅₀ 值在 1.5 左右时所对应的抗原和抗体浓度为最适工作浓度 ;

2) 包被 :将包被原用包被缓冲液稀释至最适工作浓度,100μL/孔,37℃反应 2h ;

3) 洗涤和封闭 :方法操作同上述间接 ELISA 法 ;

4) 配制沙丁胺醇标准溶液 :将沙丁胺醇标准品用 0.01mol/L, pH7.4 的 PBS 溶液配制成 1mg/mL 的母液,然后,在加样前,再用 0.01mol/L, pH7.4 的 PBS 溶液倍比稀释成需要浓度 ;

5) 加样 :每孔加入 50μL 倍比稀释的沙丁胺醇各浓度标准品,然后再加入 50μL/孔最适

稀释倍数的抗血清,37℃反应 1h。充分洗涤后,加入 1:3000 稀释的 HRP-羊抗鼠 IgG,100μL /孔,37℃反应 1h;

6) 显色反应:将酶标板取出,充分洗涤后,每孔加入 100μL 的 TMB 显色液,37℃避光反应 15min;

7) 终止和测定:每孔加入 100μL 终止液以终止反应,然后用酶标仪测定各孔的 OD₄₅₀ 值;

8) 数据处理:以沙丁胺醇各浓度的对数为横坐标,以沙丁胺醇各浓度对应的 OD 值为纵坐标,绘制标准曲线,计算半数抑制浓度(IC₅₀,即 OD₄₅₀ 值从零标准溶液对应的 A₀ 下降到 50% 时所对应的标准品浓度),从而判定抗血清对沙丁胺醇是否具有特异性;

9) 将沙丁胺醇的标准品换成莱克多巴胺、马步特罗、克伦特罗按上述方法测定 IC₅₀ 值,并计算交叉反应率:

$$\text{交叉反应率(\%)} = \text{IC}_{50}(\text{沙丁胺醇}) / \text{IC}_{50}(\text{类似物})$$

实验设 3 次重复,结果取平均值;结果显示,四免后,小鼠抗血清效价可达 81000,检测限为 0.3ng/mL,沙丁胺醇 IC₅₀ 为 3.2ng/mL,各类似物的交叉反应率均小于 0.1。

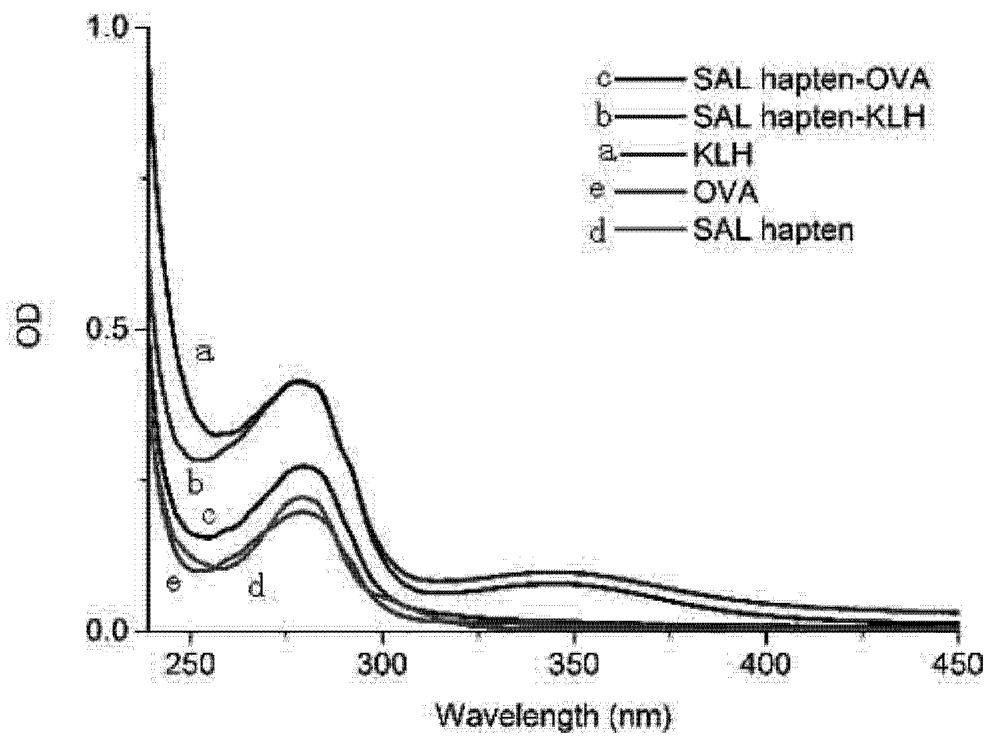


图 1

专利名称(译)	一种结构特异性沙丁胺醇完全抗原的合成方法		
公开(公告)号	CN103755802A	公开(公告)日	2014-04-30
申请号	CN201410019076.9	申请日	2014-01-16
[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 刘丽强 王利兵		
发明人	胥传来 刘丽强 王利兵		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/795 C07K14/77 C07K11/107 C07K16/44 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 C07K19/00		
其他公开文献	CN103755802B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种结构特异性沙丁胺醇完全抗原的合成方法，属于生物化工技术领域。本发明包括如下步骤：2-溴-1-[4-羟基-3-(羟甲基)苯基]乙-1-酮溶解于丙酮，加入碳酸钾后，与二苄基胺反应生成化合物B，在氢化铝锂催化下，生成化合物C，再在Pd/C催化下和氢气生成化合物D，再与乙酰丙酸乙酯还原胺化反应生成化合物E，在碱性条件下水解，并于酸性条件下重结晶后生成沙丁胺醇半抗原，名称为4-((2-羟基-2-(4-羟基-3-(羟甲基)苯基)乙基)氨基)戊酸。将此半抗原上的羧基与载体蛋白上的氨基进行偶联得到完全抗原。实验结果表明，用该完全抗原免疫动物得到的抗血清效价达81000，检测限为0.3ng/mL，半抑制浓度为3.2ng/mL。产生的抗体特异性高、灵敏度高；该抗原或抗体具有广阔的应用前景。

