



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105061343 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201510483197. 3

C07K 14/765(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 08. 07

C07K 14/77(2006. 01)

(71) 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

(72) 发明人 庄惠生 孙瑞艳 卜聃

(74) 专利代理机构 上海汉声知识产权代理有限公司 31236

代理人 郭国中 陈少凌

(51) Int. Cl.

C07D 251/34(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

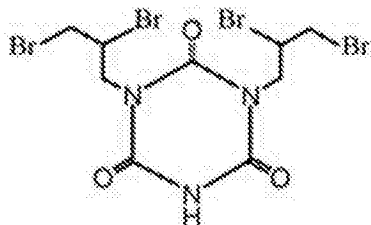
权利要求书2页 说明书9页 附图3页

(54) 发明名称

三(2,3-二溴丙基)异氰尿酸酯半抗原及制备、用途

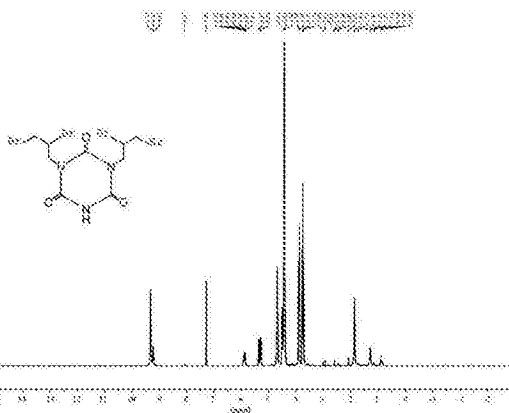
(57) 摘要

本发明公开了一种三(2,3-二溴丙基)异氰尿酸酯半抗原及制备、用途;所述三(2,3-二溴丙基)异氰尿酸酯半抗原的结构式为:

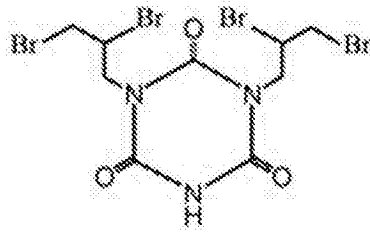


其制备方法为以

2,4,6-三(烯丙氧基)-1,3,5-三嗪为原料,经两步反应制备带有仲氨基活性基团的TBC半抗原。所述三(2,3-二溴丙基)异氰尿酸酯半抗原制备方法简便,稳定性好,成本低,容易工业化生产;三(2,3-二溴丙基)异氰尿酸酯半抗原通过戊二醛法或碳二亚胺法或重氮化法与载体蛋白偶联制备三(2,3-二溴丙基)异氰尿酸酯人工全抗原,为制备特异性好、效价高的抗体和建立亲和素-生物素化酶联免疫吸附分析法提供了保障。



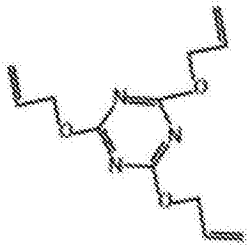
1. 一种三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原,其特征在于,其结构式如式(I)所示:



(I)。

2. 一种如权利要求1所述的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原的制备方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

S1、在非质子性有机溶剂存在的条件下,2,4,6-三(烯丙氧基)-1,3,5-三嗪



与氯化铜回流反应,生成二烯丙基异氰脲酸酯;

S2、在非质子性有机溶剂存在的条件下,二烯丙基异氰脲酸酯和液溴回流反应,生成所述三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原。

3. 根据权利要求2所述的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原的制备方法,其特征在于,所述2,4,6-三(烯丙氧基)-1,3,5-三嗪、水、氯化铜的摩尔比为1:1:45~50;所述二烯丙基异氰脲酸酯和液溴的摩尔比为1:4~5。

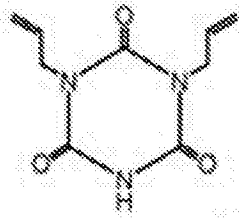
4. 根据权利要求2所述的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原的制备方法,其特征在于,步骤S1中,所述回流反应的温度为95~100℃,反应时间为5~6小时;步骤S2中,所述回流反应的温度为50~60℃,反应时间为1~2小时。

5. 根据权利要求2所述的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原的制备方法,其特征在于,步骤S1、步骤S2中的非质子性有机溶剂独立的选自甲苯、二氯甲烷或丙酮。

6. 根据权利要求2所述的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原的制备方法,其特征在于,步骤S1还包括回流反应结束后用体积比为2:1的二氯甲烷和石油醚重结晶,洗涤,得到纯化后的二烯丙基异氰脲酸酯的步骤。

7. 根据权利要求2所述的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原的制备方法,其特征在于,步骤S2还包括回流反应结束后用饱和Na₂S₂O₃溶液以终止反应,向反应液中加入二氯甲烷,分离并干燥有机相,将干燥后的有机相去溶剂,层析柱分离纯化,得到纯化后的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原的步骤。

8. 一种三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原中间体,其特征在于,其结构式如式(II)所示:



(II)。

9. 一种三(2,3-二溴丙基)异氰尿酸酯人工全抗原,其特征在于,所述人工全抗原是由如权利要求1所述的三(2,3-二溴丙基)异氰尿酸酯半抗原通过戊二醛法或碳二亚胺法或重氮化法与蛋白质分子偶联制备而得。

10. 一种如权利要求1所述的三(2,3-二溴丙基)异氰尿酸酯半抗原在用于痕量溴代阻燃剂三(2,3-二溴丙基)异氰尿酸酯检测中的用途。

三 (2,3- 二溴丙基) 异氰脲酸酯半抗原及制备、用途

技术领域

[0001] 本发明涉及半抗原及其制备方法,具体涉及一种三 (2,3- 二溴丙基) 异氰脲酸酯半抗原及其制备、用途。

背景技术

[0002] 溴系阻燃剂是目前世界上产量最大的有机阻燃剂之一,其中主要是多溴联苯醚 (PBDEs) 和多溴联苯 (PBBs) 类物质,此外还有其中三嗪类。其中,三 (2,3- 二溴丙基) 异氰脲酸酯 (Tris (2,3-dibromopropyl) isocyanurate, TBC), 分子结构中含有六个溴原子,是我国目前有机溴系阻燃剂的主要产品,属于三嗪系列阻燃剂。作为阻燃剂的新品种,TBC 具有优异的阻燃性能、热稳定性、不易光解、低发烟性等优点,被广泛用于纤维增强塑料、农用聚氨酯薄膜、聚烯烃、聚氯乙烯 (PVC)、聚苯烯、ABS 树脂不饱和聚脂、合成橡胶和合成纤维等制品中和材料领域,并随着这些产品的使用,慢慢逸散到环境中。

[0003] 国内外广大环境学者对各种环境介质和生物样品中 TBC 的浓度和毒性效应做了大量研究。研究表明,TBC 可以在各种水体、底泥、土壤、大气等各种环境介质中存在,TBC 发生裂解时会释放出有毒气体溴化氢,溴化氢易吸收空气中的水分形成氢溴酸,具有很强的腐蚀性,存在二次危害。其辛醇 - 水分配系数 (Log Kow, 25℃) 为 7.35,生物富集系数 (Log BCF) 为 4.30,表明 TBC 易于在生物体内富集;TBC 在不同营养级生物体内含量变化表现出明显的生物富集性,并对生物体有毒性和内分泌干扰性。此外,生物富集性和大气自由基氧化半衰期结果显示 TBC 具有与 POPs 相类似的持久性、长距离传输性和可生物富集性等理化特性,并可通过血脑屏障富集于脑组织中。目前 TBC 的长距离迁移特性未知,但从它较低的饱和蒸汽压 (1.57×10^{-13} Pa) 和较高的辛醇 - 空气分配系数 (Log Koa = 23.7) 分析,TBC 可吸附在颗粒物的表面并随气流迁移扩散。虽然现阶段 TBC 的生产使用未被施加任何限制,但它已被“加拿大环境威胁生态物质 (Lower Ecological Concern) 筛选名录”纳入,作为一种高优先级化学品识别。

[0004] 目前对三 (2,3- 二溴丙基) 异氰脲酸酯的检测手段主要为气相色谱和高效液相色谱等仪器检测方法,这些方法虽然准确可靠,但对样品的预处理方法和操作人员的专业性有很高的要求。正因为这些方法的处理复杂、耗时、仪器价格昂贵而不适合推广使用,也不利于在环境污染事故现场快速检测。为克服这些缺点,寻求一种快速、简便、灵敏且经济实用的分析方法就成为环境监测领域的主要研究方向。

[0005] 20 世纪 60 年代发展起来的免疫分析 (Immunoassay, IA) 是基于抗原和抗体的特异性、可逆性结合反应的分析技术。免疫分析具有常规理化分析技术无可比拟的选择性和高灵敏性,非常适合复杂介质中痕量组分的分析。因此免疫分析具有的特异性强、灵敏度高、方法快捷简单、分析通量大、检测成本低等优点,使得该类方法可以满足简单、快速、灵敏地检测持久性有机污染物的要求。1971 年 Engvail, Van Weerman 等报道了检测体液中微量物质的固相免疫分析技术,即酶联免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。目前,ELISA 方法已经成为免疫分析方法中重要的组成部分。ELISA 方法是将抗

原-抗体之间的免疫反应与酶的高效催化特性有机结合而发展起来的一种免疫分析方法。其中,以亲和素-生物素信号放大系统为基础的亲和素-生物素化酶联免疫吸附分析法,以生物素标记抗体(抗原),并以酶标亲和素代替ELISA方法中酶标抗体。亲和素是卵白蛋白中的一种碱性糖蛋白,分子量约为68kDa。一个亲和素分子由4个亚单位组成,每个亚单位都可以与一个生物素分子(分子量为244)特异性结合。生物素与亲和素结合特异性强,其亲和力比抗原抗体反应大得多,亲和常数高达 $10^{15}M^{-1}$ 。由于一个亲和素能与4个生物素分子结合,因此在检测中可提高被固相结合酶的数量,进而提高检测方法的灵敏度

[0006] 目前尚没有亲和素-生物素化酶联免疫吸附分析法检测三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯的相关报道。

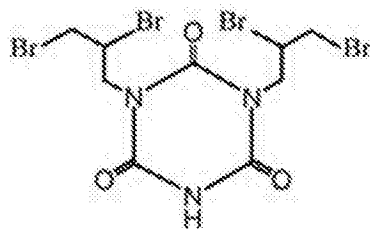
发明内容

[0007] 针对现有技术中的缺陷,本发明的目的在于首次提供一种步骤简单,速度快,产率高的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原及其制备、用途。

[0008] 本发明的研究机理在于:对于三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯免疫监测方法的建立,高纯度合适的半抗原是制备具有高灵敏度和特异性免疫原和高效价抗体的根本,更是建立三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯免疫检测方法的关键。因此,本发明的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原的制备是采用免疫方法测定三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯的基础,对于建立多溴联苯单体的监测方法,具有重要的应用价值和理论研究意义。

[0009] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

[0010] 第一方面,本发明涉及一种三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原,其结构式如式(I)所示:



[0011]

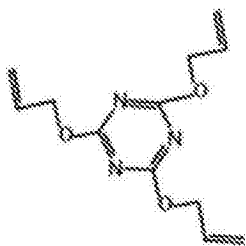
所述式I化合物(三(2,3-二溴丙基)异

(I)。

氰脲酸酯半抗原)为淡黄色针状结晶体,分子式: $C_9H_{10}Br_4N_3O_3$,分子量527.78;熔点:128~131℃。

[0012] 第二方面,本发明涉及一种三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原的制备方法,所述方法包括如下步骤:

[0013] S1、在非质子性有机溶剂存在的条件下,2,4,6-三(烯丙氧基)-1,3,5-三嗪



与氯化铜回流反应,生成二烯丙基异氰脲酸酯;

[0014] S2、在二氯甲烷存在的条件下,二烯丙基异氰脲酸酯和液溴回流反应,生成带有仲氨基活性基团的二(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯,即所述三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯

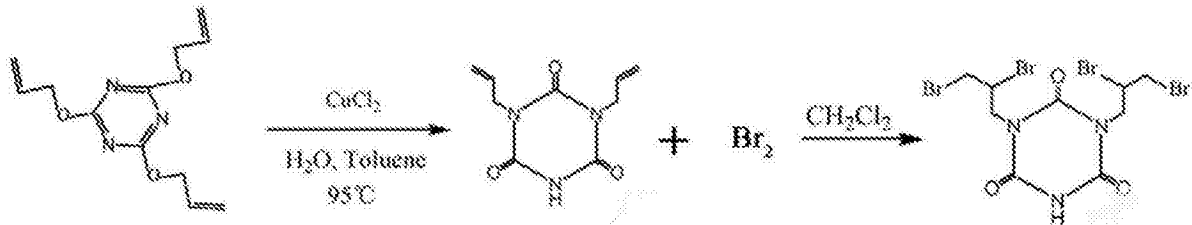
半抗原；该引入的氨基基团可与载体蛋白偶联。

[0015] 优选的，步骤 S1 具体为：将三（2,3-二溴丙基）异氰脲酸酯和氯化铜溶解在非质子性有机溶剂中，得溶液 A，逐渐升温，随后保持恒温回流反应，直至原料点消失为止。

[0016] 优选的，步骤 S2 具体为：二烯丙基异氰脲酸酯溶于非质子性有机溶剂环境中，然后逐滴加入液溴逐渐升温，随后保持恒温回流反应，直至原料点消失为止。

[0017] 其化学反应方程式如下：

[0018]



[0019] 优选的，所述 2,4,6-三（烯丙氧基）-1,3,5-三嗪、水、氯化铜的摩尔比为 1 : 1 : 45 ~ 50；所述二烯丙基异氰脲酸酯和液溴的摩尔比为 1 : 4 ~ 5。

[0020] 理想状态下三（2,3-二溴丙基）异氰脲酸酯、水、氯化铜的摩尔比是 1 : 1 : 45，但为了反应顺利进行，一般氯化铜可以过量一些，但不能超过理想量的 1.5 倍；理想状态下 2,4,6-三（烯丙氧基）-1,3,5-三嗪与氯化铜反应生成的半抗原中间体与液溴的摩尔比是 1 : 4，为确保反应顺利向右进行，液溴要过量，但不能超过理想摩尔量的 1.25 倍即半抗原中间体摩尔量的 5 倍。

[0021] 优选的，步骤 S1 中，所述回流反应的温度为 $95 \sim 100^\circ\text{C}$ ，反应时间为 5 ~ 6 小时；步骤 S2 中，所述回流反应的温度为 $50 \sim 60^\circ\text{C}$ ，反应时间为 1 ~ 2 小时。该温度更有利于反应的进行。

[0022] 优选的，步骤 S1、步骤 S2 中的非质子性有机溶剂独立的选自甲苯、二氯甲烷或丙酮。

[0023] 优选的，步骤 S1 还包括回流反应结束后用体积比为 2 : 1 的二氯甲烷和石油醚重结晶，洗涤，得到纯化后的二烯丙基异氰脲酸酯的步骤。

[0024] 优选的，步骤 S2 还包括回流反应结束后用饱和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液以终止反应，向反应液中加入二氯甲烷，分离并干燥有机相，将干燥后的有机相去溶剂，层析柱分离纯化，得到纯化后的三（2,3-二溴丙基）异氰脲酸酯半抗原的步骤。

[0025] 具体而言，包括以下步骤：

[0026] B、反应结束后用饱和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液以终止反应；

[0027] C、向反应液中加入二氯甲烷，分离并先后用水洗、饱和 NaCl 溶液多次洗涤，再用无水 Na_2SO_4 干燥有机相以除去多余的水分；

[0028] D、将干燥后的有机相去溶剂，过层析柱分离纯化，最终得到纯化后的淡黄色针状结晶三（2,3-二溴丙基）异氰脲酸酯半抗原二（2,3-二溴丙基）异氰脲酸酯，即式 I 化合物。

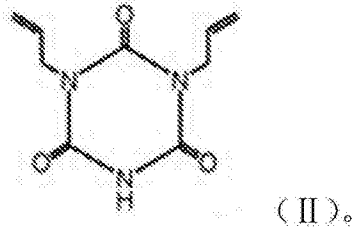
[0029] 优选的，步骤 B 中，所述饱和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液终止反应的现象为反应体系液红色消失；这样有利于终止反应，也防止逆反应的发生。

[0030] 优选的，所述层析柱分离纯化的薄层层析展开剂采用体积比为 1 : 1 的乙酸乙酯

和正己烷组成的混合溶液。本发明的半抗原是有机相物质，本发明意外发现采用该展开剂更利于半抗原的纯化，使获得的半抗原纯度更高。

[0031] 第三方面，本发明涉及一种三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原中间体，其结构式如式(II)所示：

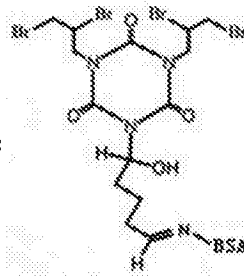
[0032]



[0033] 第四方面，本发明涉及一种三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯人工全抗原，所述人工全抗原是由如权利要求1所述的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原通过戊二醛法或碳二亚胺法或重氮化法与蛋白质分子偶联制备而得。

[0034] 优选的，所述人工全抗原包括三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯人工免疫原，是由所述的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原通过戊二醛法或碳二亚胺法或重氮化法与牛血清蛋白偶联制备而得。

[0035] 该人工免疫原 TBC-BSA 的结构式为：

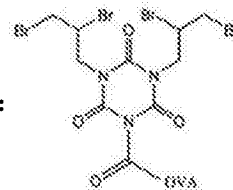


(戊二醛法)。该人工免疫

原免疫新西兰大白兔，可通过生物体内的免疫应答进而制备得到抗三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯的特异性抗体

[0036] 优选的，所述人工全抗原包括三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯人工包被原，是由所述的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原通过戊二醛法或碳二亚胺法或重氮化法与卵清白蛋白偶联制备而得。

[0037] 该人工包被原 TBC-OVA 的结构式为：



(碳二亚胺法)。该人工包

被原和三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯都能与抗三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯特异性抗体免疫球蛋白 IgG 发生特异性识别的反应。

[0038] 第五方面，本发明涉及一种三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原用于痕量溴代阻燃剂三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯检测中的用途。

[0039] 优选的，所述检测包括将所述三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原通过戊二醛法或碳二亚胺法或重氮化法与载体蛋白偶联制备三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯人工全抗原。

[0040] 本发明涉及三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原及其制备方法、用途;由于三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯是小分子物质,只具有反应原性而没有免疫原性,而且该分子上没有能与蛋白质分子直接结合的氨基、羧基等官能团,因此需要对三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯分子衍生化使其分子上带上一个氨基。为了免疫分析方法的实现,用戊二醛法或碳二亚胺法或重氮化法将这个含羧基的半抗原与蛋白质分子偶联制备人工全抗原(包括人工免疫原和人工包被原),其中人工免疫原免疫新西兰大白兔,通过生物体内的免疫应答进而制备得到抗三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯的特异性抗体,而人工包被原和三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯都能与抗三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯特异性抗体免疫球蛋白 IgG 发生特异性识别的反应,即人工包被原和三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯是直接竞争的关系,从而建立免疫分析方法用于水体、土壤、大气等环境样品和电子产品、纺织印染品、建筑装饰等产品中痕量溴代阻燃剂三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯的检测。

[0041] 与现有技术相比,本发明具有如下的有益效果:

[0042] 1) 半抗原实用性强:三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原制备和抗体制备具有重要的实用价值和现实意义。该半抗原保留了三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯的结构,再利用戊二醛法或碳二亚胺法或重氮化法偶联蛋白质使其具有针对三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯的抗原决定簇,可成功制备三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯人工免疫原 TBC-BSA 或三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯人工包被原 TBC-OVA,为制备特异性好、效价高的抗体和建立免疫 PCR 生物条形码方法提供了保障。

[0043] 2) 半抗原稳定性好:本发明首次制备获得了三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原,且此法合成的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原结构具有较好的稳定性,在室温状态下可保存多年,几乎不会失效。

[0044] 3) 半抗原制备技术简便可行:半抗原的整个制备过程无需特别的仪器设备,成本低廉,且制备速度快,产率高,容易工业化规模生产。

附图说明

[0045] 通过阅读参照以下附图对非限制性实施例所作的详细描述,本发明的其它特征、目的和优点将会变得更明显:

[0046] 图 1 为三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原中间体的核磁共振谱图;

[0047] 图 2 为三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原的核磁共振谱图;

[0048] 图 3 为三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原的红外光谱图;

[0049] 图 4 为三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原 TBC-hapten、载体蛋白 BSA 和人工全抗原 TBC-BSA 的紫外光谱图;

[0050] 图 5 为三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原 TBC-hapten、载体蛋白 OVA 和人工全抗原 TBC-OVA 的紫外光谱图;

[0051] 图 6 为间接竞争法检测三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯免疫 PCR 生物条形码方法的扩增曲线;

[0052] 图 7 为间接竞争免疫 PCR 生物条形码方法检测三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯的标准工作曲线。

具体实施方式

[0053] 下面结合具体实施例对本发明进行详细说明。以下实施例将有助于本领域的技术人员进一步理解本发明,但不以任何形式限制本发明。应当指出的是,对本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进。这些都属于本发明的保护范围。

[0054] 实施例 1、三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原中间体的制备和表征

[0055] (1)TBC 半抗原中间体的制备

[0056] 称取 12.46g(0.05mol)2,4,6-三(烯丙氧基)-1,3,5-三嗪和 0.9g(0.05mol)水和 0.38g(2.25mmol) $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,溶于甲苯后加入到圆底烧瓶中,逐渐升温至 95℃回流加热 6 小时,直至薄板层析法(TLC)检测原料点消失为止($R_f = 0.2$;展开剂,正己烷:乙酸乙酯 = 5:1);反应结束后冷却至室温,将反应液转移至旋转蒸发仪中减压蒸馏除去溶剂,再用二氯甲烷和石油醚(V:V = 2:1)重结晶,抽滤得浅绿色粉末状固体。随后用稀盐酸重复洗涤绿色固体直至颜色变为白色,再用蒸馏水洗涤至近中性,得二烯丙基异氰脲酸酯即 TBC 半抗原中间体。二烯丙基异氰脲酸酯分子式: $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3$;分子量:209.2;产率:63.6%;熔点:146-148℃,纯度 97%。

[0057] (2)TBC 半抗原中间体的表征

[0058] 获得的 TBC 半抗原中间体,其结构通过核磁共振等检测手段分析鉴定,TBC 半抗原中间体的核磁共振氢谱图如图 1 所示,其特征如下: $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm):8.44(1H ArH 非苯环),5.89(1H-C = C-H 共轭),5.23-5.34(2H-C = CH_2),4.45、4.47(2H Ar- CH_2 -R)。核磁表征结果表明,实验成功制备了 TBC 半抗原中间体。

[0059] 实施例 2、三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原中间体的制备和表征

[0060] (1)TBC 半抗原中间体的制备

[0061] 称取 12.46g(0.05mol)2,4,6-三(烯丙氧基)-1,3,5-三嗪和 0.9g(0.05mol)水和 0.42g(2.5mmol) $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,溶于甲苯后加入到圆底烧瓶中,逐渐升温至 95℃回流加热 5 小时,直至薄板层析法(TLC)检测原料点消失为止($R_f = 0.2$;展开剂,正己烷:乙酸乙酯 = 5:1);反应结束后冷却至室温,将反应液转移至旋转蒸发仪中减压蒸馏除去溶剂,再用二氯甲烷和石油醚(V:V = 2:1)重结晶,抽滤得浅绿色粉末状固体。随后用稀盐酸重复洗涤绿色固体直至颜色变为白色,再用蒸馏水洗涤至近中性,得二烯丙基异氰脲酸酯即 TBC 半抗原中间体。二烯丙基异氰脲酸酯分子式:分子式: $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3$;分子量:209.2;产率:63.6%;熔点:146-148℃,纯度 97%。

[0062] (2)TBC 半抗原中间体的表征

[0063] 获得的 TBC 半抗原中间体,其结构通过核磁共振等检测手段分析鉴定,TBC 半抗原中间体的核磁共振氢谱图特征如下: $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm):8.44(1H ArH 非苯环),5.89(1H-C = C-H 共轭),5.23-5.34(2H-C = CH_2),4.45、4.47(2H Ar- CH_2 -R)。核磁表征结果表明,实验成功制备了 TBC 半抗原中间体。

[0064] 实施例 3、三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原的制备和表征

[0065] (1)TBC 半抗原的制备

[0066] 称取 0.5g(0.9448mmol)TBC 半抗原中间体(二烯丙基异氰脲酸酯)溶于 20mL CH_2Cl_2 中;在加热 50℃状态下,向上述液体中逐滴加入 120 μL (3.78mmol)液溴,保持回流反

应 2 小时,薄板层析法 (TLC) 监测反应直至反应完全;反应液冷却至室温后,向反应体系中加入饱和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液,直至反应体系液红色消失;用 100mL 水和 150mL (50mL \times 3 次) CH_2Cl_2 重复萃取反应液,随后,分离并保留有机相,并用饱和 NaCl 溶液多次洗涤,再用无水 Na_2SO_4 干燥有机相以除去多余的水分,得二 (2,3-二溴丙基) 异氰脲酸酯粗品。粗品用乙酸乙酯和正己烷的混合液 (V/V = 1 : 1) 重结晶,得二 (2,3-二溴丙基) 异氰脲酸酯即 TBC 半抗原。三 (2,3-二溴丙基) 异氰脲酸酯半抗原分子式: $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{N}_3\text{O}_3$;分子量 527.78;产率 47.1%;熔点: 128 ~ 131 $^\circ\text{C}$,纯度 98%。

[0067] (2) TBC 半抗原的表征

[0068] 获得的 TBC 半抗原,其结构通过核磁共振、红外光谱、紫外光谱等检测手段分析鉴定, TBC 半抗原中间体的核磁共振氢谱图如图 2 所示,其特征如下: ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 9.22 (1H N-H), 4.42 (1H R-CH-Br), 3.77、3.88 (2H- CH_2 -Br), 1.44、1.28 (2H- CH_2 -)。核磁表征中有明显的 -NH 基团特征峰,结果表明:实验成功制备了 TBC 半抗原。

[0069] TBC 半抗原的红外光谱特征如下: IR (KBr) ν/cm^{-1} : 1671.98 (C = O 伸缩), 1430.92 (O-H 面内弯曲); 3320.82 (仲氨 N-H 伸缩), 1295.93、1315.21 (C-N 芳香伸缩); 2989.12 (C-H 伸缩), 1648.84 ~ 1432.85 (C = C 苯环骨架振动), 910 ~ 665 (C-H 面外弯曲), 621.08 (C-Br 伸缩)。从图 3 的红外图谱结果分析看出, TBC 半抗原分子的红外光谱中有明显的 -COOH、-NH、苯环、C-Br 等基团特征吸收峰,证明制备的 TBC 半抗原分子中含有氨基官能团。

[0070] 实施例 4、三 (2,3-二溴丙基) 异氰脲酸酯半抗原的制备和表征

[0071] (1) TBC 半抗原的制备

[0072] 称取 0.5g (0.9448mmol) TBC 半抗原中间体 (二烯丙基异氰脲酸酯) 溶于 20mL CH_2Cl_2 中;在加热 60 $^\circ\text{C}$ 状态下,向上述液体中逐滴加入 132 μL (4.16mmol) 液溴,保持回流反应 1 小时,薄板层析法 (TLC) 监测反应直至反应完全;反应液冷却至室温后,向反应体系中加入饱和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液,直至反应体系液红色消失;用 100mL 水和 150mL (50mL \times 3 次) CH_2Cl_2 重复萃取反应液,随后,分离并保留有机相,并用饱和 NaCl 溶液多次洗涤,再用无水 Na_2SO_4 干燥有机相以除去多余的水分,得二 (2,3-二溴丙基) 异氰脲酸酯粗品。粗品用乙酸乙酯和正己烷的混合液 (V/V = 1 : 1) 重结晶,得二 (2,3-二溴丙基) 异氰脲酸酯即 TBC 半抗原。三 (2,3-二溴丙基) 异氰脲酸酯半抗原分子式: $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{N}_3\text{O}_3$;分子量 527.78;产率 47.1%;熔点: 128 ~ 131 $^\circ\text{C}$,纯度 98%。

[0073] (2) TBC 半抗原的表征

[0074] 获得的 TBC 半抗原,其结构通过核磁共振、红外光谱、紫外光谱等检测手段分析鉴定, TBC 半抗原中间体的核磁共振氢谱特征如下: ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 9.22 (1H N-H), 4.42 (1H R-CH-Br), 3.77、3.88 (2H- CH_2 -Br), 1.44、1.28 (2H- CH_2 -)。核磁表征中有明显的 -NH 基团特征峰,结果表明:实验成功制备了 TBC 半抗原。

[0075] TBC 半抗原的红外光谱特征如下: IR (KBr) ν/cm^{-1} : 1671.98 (C = O 伸缩), 1430.92 (O-H 面内弯曲); 3320.82 (仲氨 N-H 伸缩), 1295.93、1315.21 (C-N 芳香伸缩); 2989.12 (C-H 伸缩), 1648.84 ~ 1432.85 (C = C 苯环骨架振动), 910 ~ 665 (C-H 面外弯曲), 621.08 (C-Br 伸缩)。从红外图谱数据结果分析看出, TBC 半抗原分子的红外光谱中有明显的 -COOH、-NH、苯环、C-Br 等基团特征吸收峰,证明制备的 TBC 半抗原分子中含有氨基

官能团。

[0076] 实施例 5、三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯人工全抗原的制备

[0077] 本发明制备的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原,主要应用在环境中三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯的免疫检测中。它的主要用途之一,就是可以用来直接和蛋白质大分子偶联,制备出用来免疫动物的免疫原,进而制备出相应的单克隆或多克隆抗体。在此基础上建立三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯的免疫测定方法。下面就三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原的使用做以下应用举例:

[0078] 采用戊二醛法制备 TBC-BSA 免疫原,具体合成步骤:称取 0.1434g(0.5mmol)TBC 半抗原,溶于 1mL DMF 中;称取 120mg BSA 溶于 10mL 0.01M pH 7.40PBS 缓冲液中;4℃磁力搅拌下,逐滴将 TBC 半抗原溶液滴入 BSA 溶液中,滴加结束后向反应体系中加入 200 μL 25% 戊二醛,4℃低温磁力搅拌 24h;反应结束后,低温离心分离上清液,将上清液装入透析袋中,用 0.01M pH7.40 的 PBS 透析 3d,每天换水 3 次,离心分离沉淀后得 TBC 免疫原 TBC-BSA。免疫原经紫外-可见分光光度计鉴定后,小量分装,-20℃冷冻保存。

[0079] 通过碳二亚胺法制备 TBC-OVA 包被原,具体合成步骤:称取 0.2645g(0.5mmol)TBC 半抗原溶于 1mL DMF 中;称取 0.09585g(0.5mmol)1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC)和 0.1125g OVA 分别溶于 0.01M pH5.0 的 NaAc-HAc 缓冲液中;向 OVA 溶液中缓慢滴加 TBC 半抗原和 EDC 溶液,4℃冰浴遮光搅拌 6h,再向混合液中加入另外 10mg EDC 溶液,继续 4℃冰浴遮光搅拌 24h。反应结束后,3000rpm 离心 10-15min 分离上清液,上清液用 0.01M pH7.4PBS 缓冲液透析 3d,每天换水 3 次。透析后,离心分离沉淀,得 TBC 包被原 TBC-OVA。包被原经紫外-可见分光光度计鉴定后,小量分装,-20℃冷冻保存。

[0080] 偶联物经紫外可见分光光度计扫描鉴定后,从图 4 和图 5 的 TBC 半抗原、载体蛋白和人工全抗原紫外光谱图中可以看出,TBC 半抗原的特征吸收峰位于 281nm;载体蛋白 BSA 的特征吸收峰位于 227nm 和 273nm 处;载体蛋白 OVA 的特征吸收峰出现在 219nm、224nm、268nm 处。偶联物 TBC-BSA 和 TBC-OVA 的紫外光谱中不仅分别包含 BSA 和 OVA 的特征峰,还在 256 和 253nm 处出现了新的吸收峰。TBC-BSA 和 TBC-OVA 半抗原特征吸收峰发生了蓝移,这可能是受到载体蛋白在 270nm 左右吸收峰的影响所致。吸收峰蓝移现象的出现,说明以上信息表明 TBC-BSA 和 TBC-OVA 偶联成功。

[0081] 这些全抗原既可以用于免疫动物,通过动物产生的免疫反应得到可以用来做免疫分析的单克隆或多克隆抗体,又可以作为免疫竞争对象而使用。

[0082] 实施例 6、间接竞争免疫 PCR 生物条形码方法检测三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯

[0083] 为了增强 PCR 管的吸附性,用 0.8% 的戊二醛对 PCR 管进行预处理,每孔加入 20 μL 戊二醛溶液,37℃下温育 5 小时,然后用超纯水洗涤 3 次,甩干备用;用包被缓冲液(0.05M pH 9.60 碳酸盐缓冲液)将包被原 TBC-OVA 稀释至适当浓度,加入到经过戊二醛处理的 PCR 管中进行包被,每孔 20 μL,0~4℃下包被过夜;倒掉包被原,每孔加入 200 μL 洗涤液(0.01M pH 7.40PBST)进行洗涤,振荡 3 分钟后甩干,洗三遍后加入 200 μL 封闭液(含 1% OVA 的磷酸盐缓冲溶液),37℃下温育 1 小时;洗板三次,将抗 TBC 多克隆抗体稀释至适当浓度,每孔加入 10 μL 抗体及 10 μL TBC 小分子,空白对照孔中加入 20 μL PBS,37℃下温育 1 小时;洗板三次并甩干,用 0.01M pH7.40PBS 将金纳米颗粒生物探针稀释至适当倍数,每孔加入 20 μL,37℃下温育 1 小时;倒掉溶液后用洗脱液重复洗涤五次,再用超纯水重复洗

涤五次；最后加入扩增引物和荧光物质，采用 20 μ L 的扩增体系，每孔加入 10 μ L PCR 试剂盒 mixture，上下游引物各加入 0.25 μ L，超纯水 9.5 μ L；在加入 PCR 扩增试剂时，在荧光 PCR 反应仪中进行扩增（PCR 扩增程序：95 $^{\circ}$ C 预变性 5min；95 $^{\circ}$ C 20s，57 $^{\circ}$ C 20s，72 $^{\circ}$ C 20s，以此进行 35 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 3min）。测定的 Ct 值与待测抗原的量成反比。根据加入已知浓度的抗原和相应的 Ct 值作标准曲线，从而可以得到相应待测样品中 TBC 的浓度。其测定的扩增曲线与建立的标准曲线如图 6 和图 7 所示。

[0084] 本实验中所用条形码 DNA 取自 PUC19 质粒 DNA 中的一段。根据引物设计原理，使用 primer premier 5.0 软件设计合适的引物，上游引物 5'-GAG GCG GTT TGC GTA TTG-3' 和下游引物 5'-AGC GAG GAA GCG GAA GAG-3'，委托生工生物工程（上海）股份有限公司制备合成。

[0085] 当 TBC 浓度在 0.1pg/L-100pg/L 时线性相关性较好，线性方程为 $Ct = 1.0711\lg C + 14.3$ ($R^2 = 0.974$, $n = 5$)， $LOD = 0.97\text{pg/L}$ 。

[0086] 以上对本发明的具体实施例进行了描述。需要理解的是，本发明并不局限于上述特定实施方式，本领域技术人员可以在权利要求的范围内做出各种变形或修改，这并不影响本发明的实质内容。

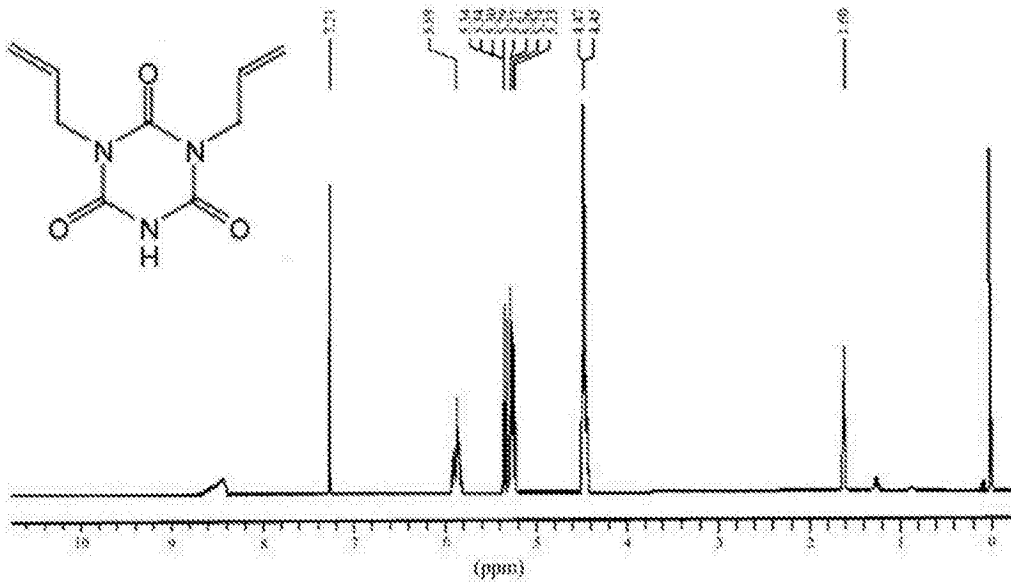


图 1

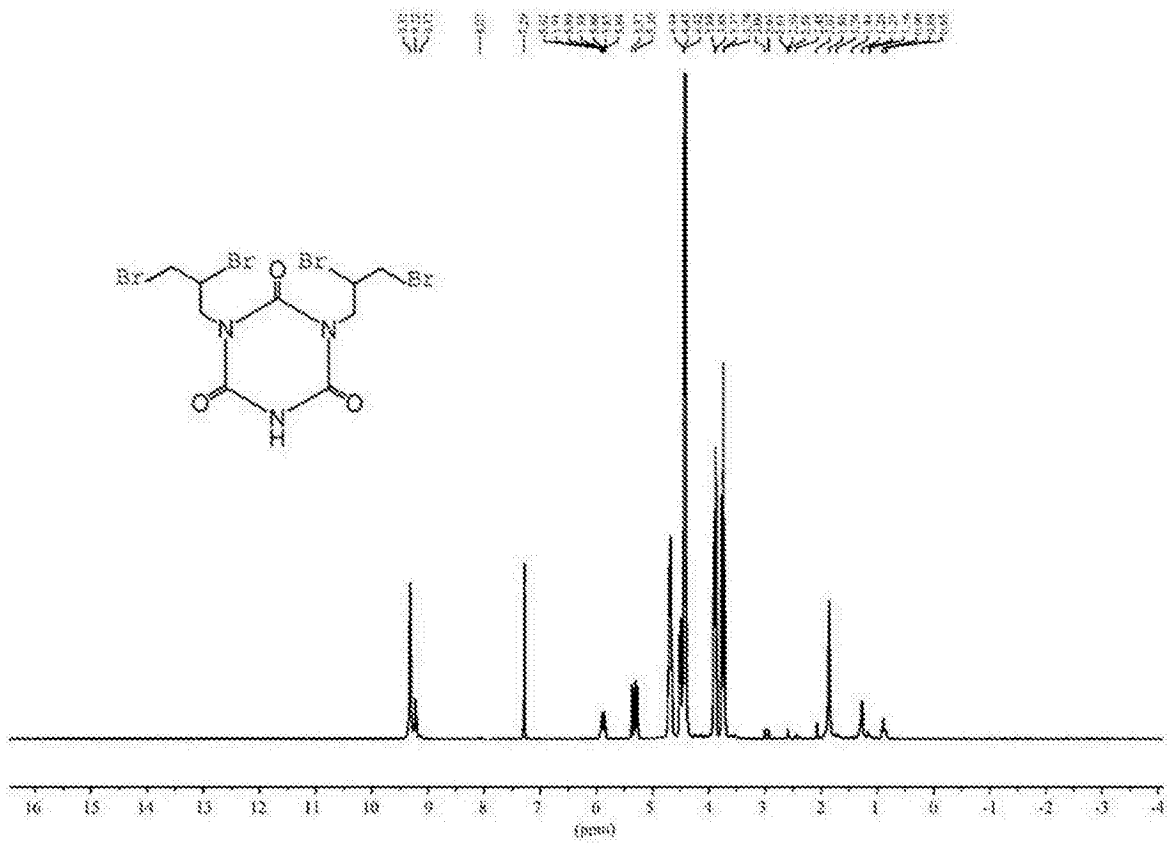


图 2

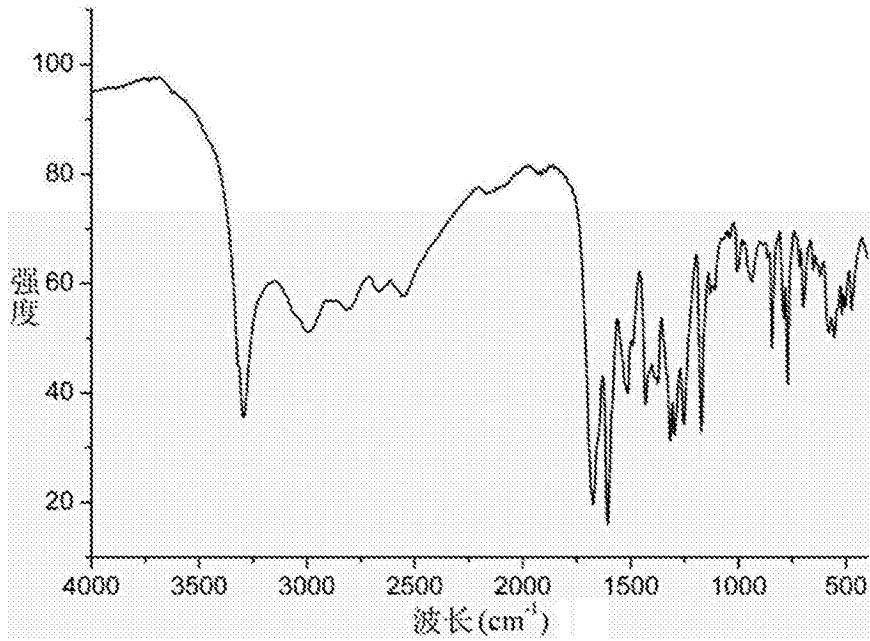


图 3

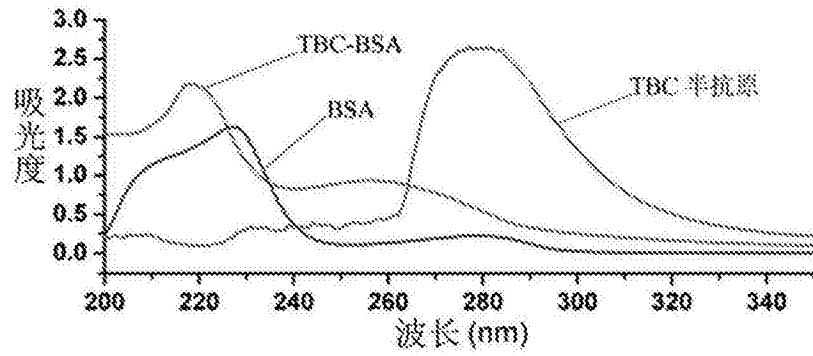


图 4

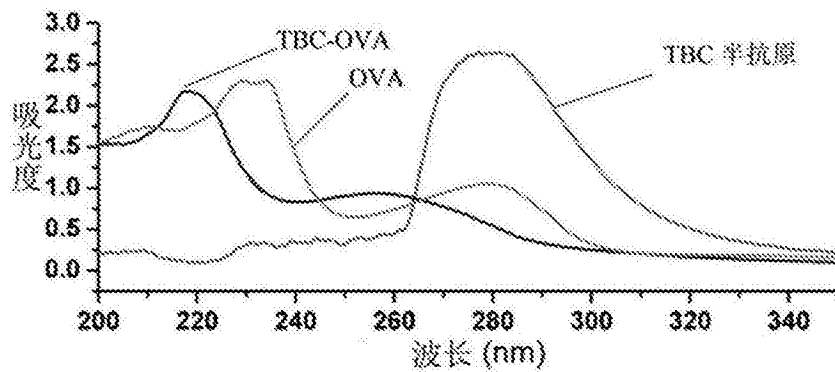


图 5

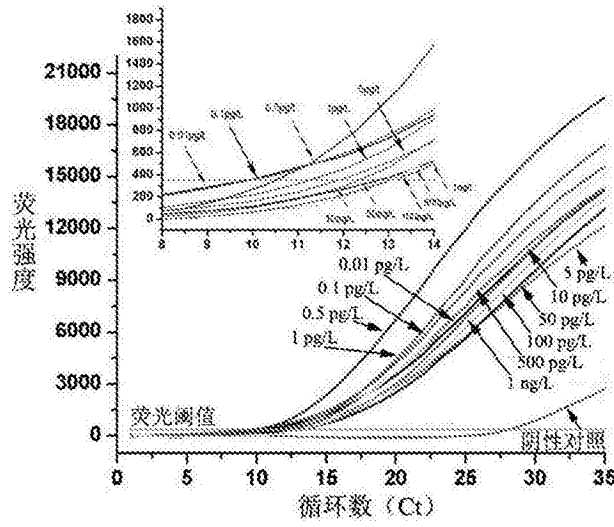


图 6

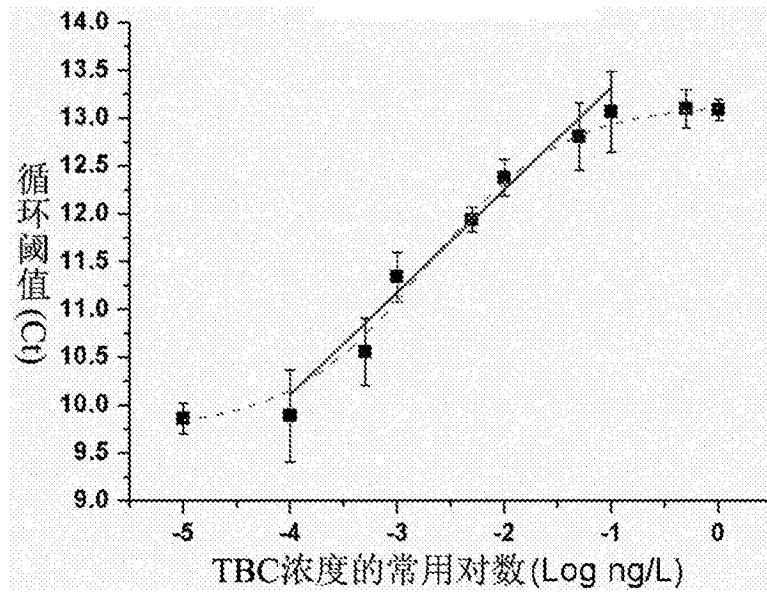


图 7

专利名称(译)	三(2,3-二溴丙基)异氰尿酸酯半抗原及制备、用途		
公开(公告)号	CN105061343A	公开(公告)日	2015-11-18
申请号	CN201510483197.3	申请日	2015-08-07
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	庄惠生 孙瑞艳 卜聃		
发明人	庄惠生 孙瑞艳 卜聃		
IPC分类号	C07D251/34 G01N33/53 C07K14/765 C07K14/77		
CPC分类号	C07D251/34 C07K14/765 C07K14/77 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种三(2,3-二溴丙基)异氰尿酸酯半抗原及制备、用途；所述三(2,3-二溴丙基)异氰尿酸酯半抗原的结构式为：其制备方法为以2,4,6-三(烯丙氧基)-1,3,5-三嗪为原料，经两步反应制备带有仲氨基活性基团的TBC半抗原。所述三(2,3-二溴丙基)异氰尿酸酯半抗原制备方法简便，稳定性好，成本低，容易工业化生产；三(2,3-二溴丙基)异氰尿酸酯半抗原通过戊二醛法或碳二亚胺法或重氮化法与载体蛋白偶联制备三(2,3-二溴丙基)异氰尿酸酯人工全抗原，为制备特异性好、效价高的抗体和建立亲和素-生物素化酶联免疫吸附分析法提供了保障。

