



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106916221 A

(43)申请公布日 2017.07.04

(21)申请号 201710260543.0

(22)申请日 2017.04.20

(71)申请人 山西大学

地址 030006 山西省太原市小店区坞城路
92号

(72)发明人 杜会枝

(74)专利代理机构 山西五维专利事务所(有限
公司) 14105

代理人 张福增

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图2页

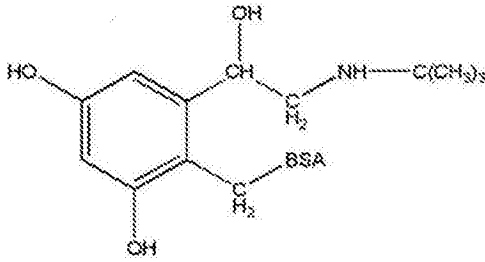
(54)发明名称

一种合成特布他林与牛血清白蛋白偶联物的方法

(57)摘要

本发明提供一种合成特布他林与牛血清白蛋白偶联物的方法,步骤包括:1)将牛血清白蛋白(BSA)溶于磷酸缓冲液(PBS,pH=6.0)中,再加入特布他林,搅拌溶解,然后滴加甲醛溶液,室温条件下搅拌反应24小时,得反应液;2)将反应液转移到透析袋中,将透析袋放入盛有蒸馏水的烧杯中,室温搅拌条件下透析3天;3)将透析产物经高速冷冻离心机离心,收集上清液,真空冷冻干燥,至干燥粉末即可。本发明一步合成特布他林与牛血清白蛋白偶联物,对食品中瘦肉精添加剂的免疫检测开发和应用有重要意义。

1. 一种特布他林与牛血清白蛋白偶联物,其特征在于,结构式为:



2. 如权利要求1所述的特布他林与牛血清白蛋白偶联物的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:将BSA溶于pH=6.0的PBS缓冲液中,再加入特布他林,搅拌溶解,然后滴加甲醛溶液,室温条件下搅拌反应20-25小时,得反应液;将反应液转移到透析袋中,将透析袋放入盛有蒸馏水的容器中,室温搅拌条件下透析3天;将透析产物经高速冷冻离心机离心,收集上清液,真空冷冻干燥,即得到特布他林与牛血清白蛋白偶联物白色粉末。

3. 如权利要求2所述的特布他林与牛血清白蛋白偶联物的制备方法,其特征在于,所述特布他林、甲醛与BSA的摩尔比10-30:10-30:1。

4. 如权利要求3所述的特布他林与牛血清白蛋白偶联物的制备方法,其特征在于,所述特布他林、甲醛和BSA的摩尔比为30:30:1。

5. 如权利要求3所述的特布他林与牛血清白蛋白偶联物的制备方法,其特征在于,所述室温条件下搅拌反应24小时。

6. 如权利要求3所述的特布他林与牛血清白蛋白偶联物在检测特布他林瘦肉精中的应用。

一种合成特布他林与牛血清白蛋白偶联物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白偶联物,具体属于一种合成特布他林与牛血清白蛋白偶联物的方法。

背景技术

[0002] 瘦肉精属于饲料添加剂,可提高饲料的转化率,增加动物的瘦肉率,用量大、代谢慢,有稳定的化学性质,150℃以上才会分解。人食用后,会渐渐中毒,产生异常生理反应,严重影响健康。特布他林属于儿茶酚型瘦肉精化合物。目前,采用4-氨基苯甲为联结物,用1,4-丁二醇缩水甘油醚和对氨基苯甲酸将特布他林与BSA偶联,制备特布他林与牛血清白蛋白偶联物。此过程需要至少两步合成,还需要4-氨基苯甲等多种反应试剂,所以开发一种经济、低能耗、制备时间短、快捷方便的新方法是很有必要的。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种合成特布他林与牛血清白蛋白偶联物的方法,该方法应低能耗、制备简单、时间短、方便快捷。

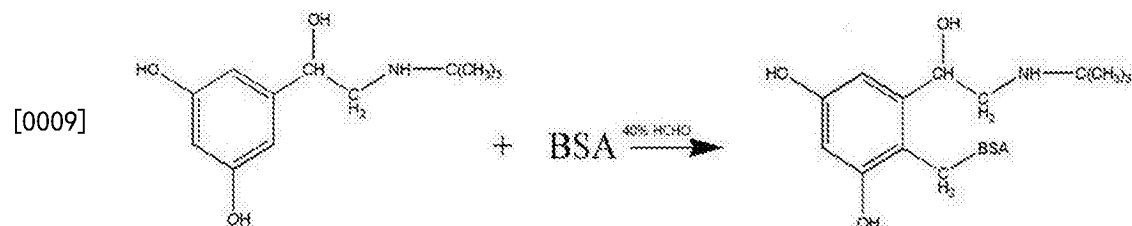
[0004] 本发明以特布他林与BSA偶联,制备特布他林与牛血清白蛋白偶联物,有效地解决其繁琐且高昂的合成过程。

[0005] 本发明的技术方案:

[0006] 一种合成特布他林与牛血清白蛋白偶联物的方法,特征在于,包括如下步骤:

[0007] 将BSA溶于PBS (pH=6.0) 缓冲液中,再加入特布他林,搅拌溶解,然后滴加甲醛溶液,室温条件下搅拌反应20-25小时,得反应液;将反应液转移到透析袋中,将透析袋放入盛有蒸馏水的容器中,室温搅拌条件下透析3天;将透析产物经高速冷冻离心机离心,收集上清液,真空冷冻干燥12小时,即得到特布他林与牛血清白蛋白偶联物白色粉末。其中,特布他林、甲醛和BSA的摩尔比为10-30:10-30:1。

[0008] 其反应式如下:



[0010] 上述步骤中的合成条件进一步优选为:

[0011] 特布他林、甲醛和BSA的摩尔比为30:30:1。

[0012] 室温条件下搅拌反应24小时。

[0013] 本发明具有如下优点和效果:

[0014] 本发明的有益效果:本申请利用Mannich反应制备特布他林与牛血清白蛋白偶联物,通过亚甲基直接将特布他林小分子与载体蛋白BSA相偶联,有效避开了繁琐的设计和合

成过程,简化了合成步骤,合成过程简单、时间短、成本低。同时本发明充分保留了特布他林的特征官能团叔丁基,通过紫外光谱和红外光谱等表征方法,证明特布他林与载体蛋白BSA偶联成功,因此,所述偶联物可用于食品中瘦肉精添加剂的免疫检测。

附图说明

- [0015] 图1 特布他林、BSA和偶联物的紫外扫描图谱
- [0016] 图2 特布他林、BSA和偶联物的红外光谱图
- [0017] 图3 BSA、特布他林、偶联物、特布他林与BSA混合液的荧光效果对比图
- [0018] 图4 偶联物的细胞毒性检测

具体实施方式

[0019] 为更好地理解本发明,下面结合实施例对本发明作进一步地说明,本发明要求保护的并不局限于实施例表述的范围。

[0020] 实施例1

[0021] 将BSA (66.43mg, 1 μ mol) 溶于PBS (pH=6.0) 缓冲液中,再加入特布他林 (8.23mg, 30 μ mol), 搅拌溶解,然后滴加40% 甲醛溶液 (30 μ l), 室温条件下搅拌反应24小时,得反应液;将反应液转移到透析袋中,将透析袋放入盛有蒸馏水的烧杯中,室温搅拌条件下透析3天;将透析产物经高速冷冻离心机离心,收集上清液,真空冷冻干燥12小时,即得到偶联物白色粉末 (26.3mg, 产率:39.42%)。

[0022] 将BSA、特布他林和偶联物用PBS (pH=6.0) 分别配制成0.5mg/ml 溶液备用。先用PBS缓冲溶液 (pH=6.0) 在波长220~400nm范围内基线平衡,然后分别扫描已配好的3份溶液,记录在各波段波长扫描的吸光度值。BSA的特征吸收峰在290nm处,最大吸光度值约为0.290;特布他林在波长277nm处有最大吸收峰,最大吸光度值为2.550;而偶联物在波长285nm处有最大吸收峰,最大吸光度值约为0.678,与特布他林和BSA的特征吸收峰有明显区别,同时又处于两者的吸收峰之间。根据紫外扫描图谱,可初步推测特布他林与BSA偶联成功。见图1。

[0023] 实施例2

[0024] 将BSA、特布他林和偶联物分别用KBr压片后,进行红外光谱扫描,偶联物的红外吸收曲线虽与BSA的很相似,但部分吸收峰相对BSA来说有了一定移动或加强,推测是由于BSA偶联了特布他林造成的。从特布他林的红外谱图上可以看出1,3,5-三取代芳烃的吸收:695 cm^{-1} 处的1,3,5-三取代化合物强吸收峰,苯环的骨架振动在1610 cm^{-1} 、1522 cm^{-1} 和1486 cm^{-1} 这三个吸收峰,也可以看到-C(CH₃)₃结构的甲基有两个强度不等的吸收峰,即约1382 cm^{-1} 、1344 cm^{-1} ,图中3334 cm^{-1} 的宽峰是羟基的伸缩振动,偶联物的红外谱图中都有相似的吸收峰。此外,偶联物的红外谱图中还可以看到蛋白质类物质共有的吸收,如3303 cm^{-1} 处的氨基N-H吸收峰,1655 cm^{-1} 、1538 cm^{-1} 的酰胺谱带,说明偶联物中含有BSA的结构。同时,沉淀在1655 cm^{-1} 和3303 cm^{-1} 附近的吸收峰相对BSA来说有所增强,而特布他林在这两处都有强吸收,可能是连接特布他林分子后分别受其苯环骨架振动和酚羟基的影响。故此推测特布他林与BSA偶联成功。见图2。

[0025] 实施例3

[0026] 图3显示了BSA、特布他林、偶联物和特布他林与BSA等摩尔混合溶液在365nm紫外灯下的荧光效果图。前三组溶液中物质均为0.1mM。混合溶液中BSA与特布他林的总和为0.1mM。可明显看出,仅偶联物有荧光,也可以推测特布他林与BSA偶联成功。见图3,图中:(a) BSA的荧光效果图、(b) 特布他林的荧光效果图、(c) 偶联物的荧光效果图、(d) 特布他林和BSA混合液的荧光效果图。

[0027] 实施例4

[0028] 在DMEM培养基中加入100单位/ml的青霉素/链霉素和10%的胎牛血清,制备成培养液,在5%CO₂和37℃的培养箱中,分别培养人肝肿瘤细胞HepG2和小鼠海马神经元细胞株HT22细胞。用培养液分别重悬混匀细胞,铺在96孔板中,每孔200μl,培养箱中培养过夜。向细胞中分别加入不同浓度的偶联物48h后,加入20μl MTT(终浓度为0.5mg/ml),37℃下放置4小时,倒掉MTT,分别加入150μl DMSO。用酶标仪测定490nm处的吸收值,空白对照组中DMSO的含量为0.1%。结果显示,在1~100μM浓度范围内,偶联物对HepG2和HT22两种细胞均无毒性(n=6)。见图4,图中:a图为偶联物对HepG2细胞的毒性检测图,b图为偶联物对HT22细胞的毒性检测图。

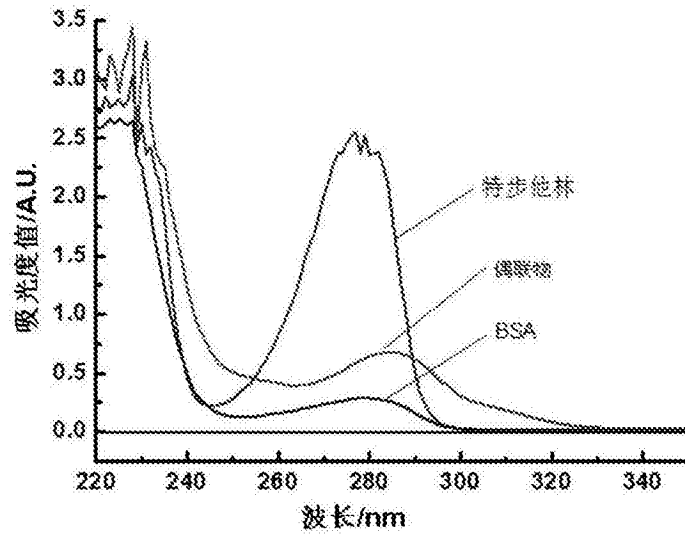


图1

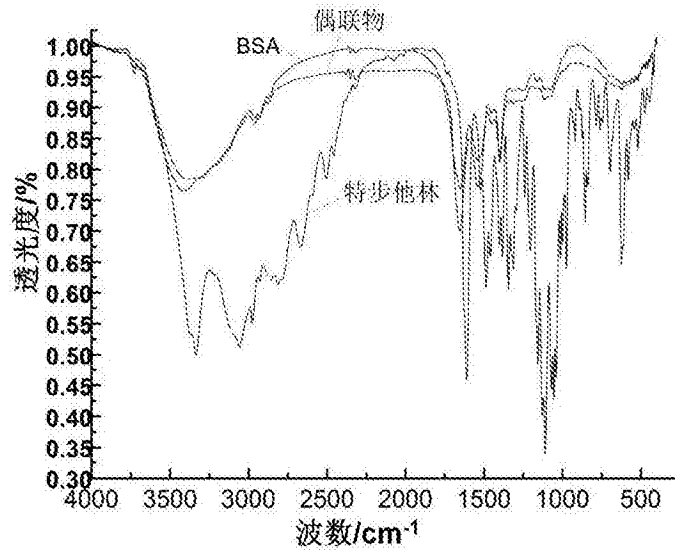


图2

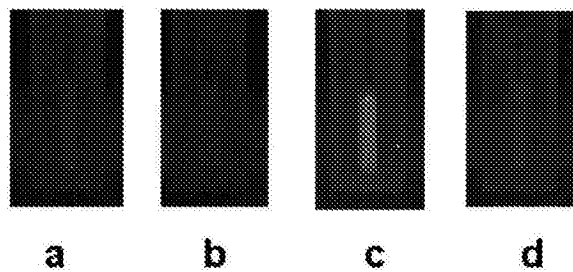


图3

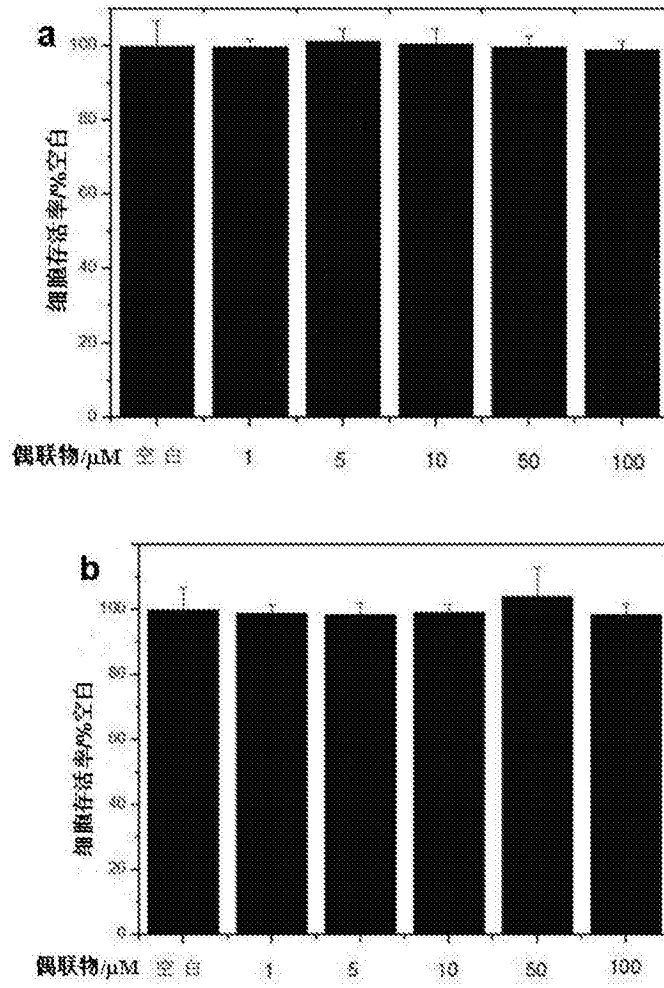


图4

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种合成特布他林与牛血清白蛋白偶联物的方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN106916221A | 公开(公告)日 | 2017-07-04 |
| 申请号 | CN201710260543.0 | 申请日 | 2017-04-20 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 山西大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 山西大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 山西大学 | | |
| [标]发明人 | 社会枝 | | |
| 发明人 | 社会枝 | | |
| IPC分类号 | C07K14/765 G01N33/531 | | |
| CPC分类号 | C07K19/00 C07K14/765 G01N33/5308 G01N33/531 | | |
| 代理人(译) | 张福增 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明提供一种合成特布他林与牛血清白蛋白偶联物的方法，步骤包括：1)将牛血清白蛋白(BSA)溶于磷酸缓冲液(PBS，pH=6.0)中，再加入特布他林，搅拌溶解，然后滴加甲醛溶液，室温条件下搅拌反应24小时，得反应液；2)将反应液转移到透析袋中，将透析袋放入盛有蒸馏水的烧杯中，室温搅拌条件下透析3天；3)将透析产物经高速冷冻离心机离心，收集上清液，真空冷冻干燥，至干燥粉末即可。本发明一步合成特布他林与牛血清白蛋白偶联物，对食品中瘦肉精添加剂的免疫检测开发和应用有重要意义。

