



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110938011 B

(45) 授权公告日 2021.07.20

(21) 申请号 201911090100.7

C07K 14/77 (2006.01)

(22) 申请日 2019.11.08

C07K 14/79 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C07K 14/795 (2006.01)

申请公布号 CN 110938011 A

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.03.31

(73) 专利权人 华南农业大学

(56) 对比文件

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

US 4206145 A, 1980.06.03

US 4206145 A, 1980.06.03

(72) 发明人 罗林 徐振林 罗双子 贾宝珠
何镇熹 孙远明 沈玉栋 雷红涛
王弘

向灿辉等. 荧光光谱法研究苯佐卡因与牛血清白蛋白的相互作用.《黑龙江大学自然科学学报》.2016,第33卷(第4期),527-532.

向灿辉等. 荧光光谱法研究苯佐卡因与牛血清白蛋白的相互作用.《黑龙江大学自然科学学报》.2016,第33卷(第4期),527-532.

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

李桂敏等. 地西洋单克隆抗体的制备及其酶联免疫吸附检测方法的建立.《食品安全质量检测学报》.2014,第5卷(第3期),956-963.

代理人 周建军

审查员 孙文倩

(51) Int.Cl.

C07C 229/60 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

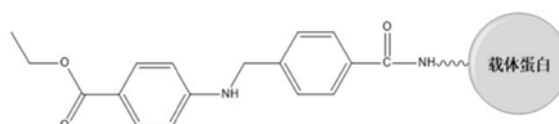
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

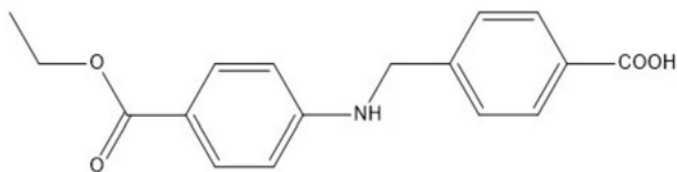
一种苯佐卡因半抗原、人工抗原、抗体及其制备与应用

(57) 摘要

本发明提供一种苯佐卡因半抗原、人工抗原、抗体及其制备与应用。苯佐卡因半抗原具有式(I)所示结构,苯佐卡因人工抗原具有式(II)或(III)所示结构。由于苯佐卡因本身的限量标准较少,有关于其半抗原及人工抗原合成也鲜有报道,与其相关免疫检测方法也较少,而现有的苯佐卡因检测技术主要以仪器法为主,而仪器法操作复杂,前处理要求高,成本高。利用本发明的人工抗原免疫动物得到的抗血清效价高,得到的抗体具有特异性高、灵敏度好、准确度高等显著优点。

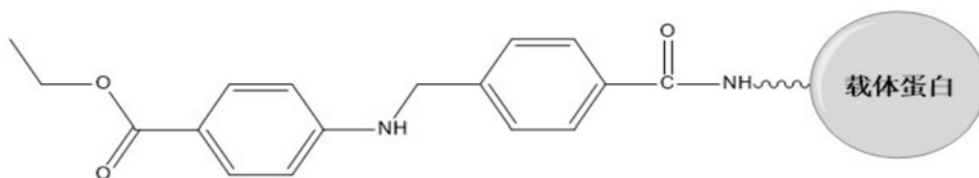


1. 结构如式 (I) 所示的苯佐卡因半抗原在制备苯佐卡因人工抗原中的应用;



(I)。

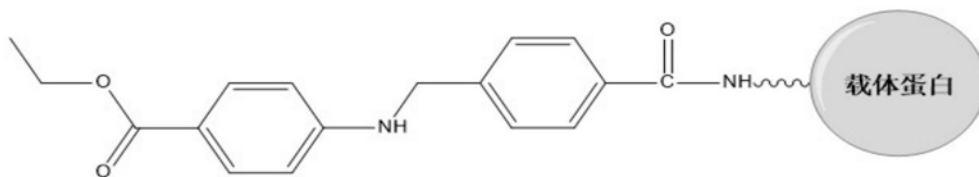
2. 一种苯佐卡因人工抗原,其特征在於,所述苯佐卡因人工抗原的结构如式 (II) 所示:



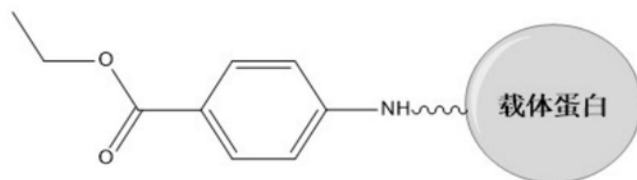
(II)。

3. 根据权利要求2所述的苯佐卡因人工抗原,其特征在於,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白、钥孔血蓝蛋白、乳铁蛋白中的任一种。

4. 一种苯佐卡因人工抗原组合物,其特征在於,包括结构如式 (II) 和式 (III) 所示的苯佐卡因人工抗原;



(II) ,



(III)。

5. 权利要求2~3任意一项所述苯佐卡因人工抗原或权利要求4所述苯佐卡因人工抗原组合物在制备苯佐卡因抗体中的应用。

6. 权利要求2~3任意一项所述苯佐卡因人工抗原或权利要求4所述苯佐卡因人工抗原组合物制备得到的苯佐卡因抗体。

7. 一种免疫分析检测苯佐卡因的方法,其特征在於,包括如下步骤:

(1) 采用权利要求2中结构如式 (II) 所示的苯佐卡因人工抗原免疫动物,制得多克隆抗体;

(2) 采用权利要求4中结构如式 (III) 所示的苯佐卡因人工抗原作为包被原,包被至微孔,将步骤 (1) 制得的所述多克隆抗体加入所述微孔中,然后加入待测样品,采用竞争ELISA法测定待测样品中苯佐卡因的含量。

一种苯佐卡因半抗原、人工抗原、抗体及其制备与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全免疫检测技术领域,特别是涉及一种苯佐卡因半抗原、人工抗原、抗体及其制备与应用。

背景技术

[0002] 在渔业生产中,常常由于远距离、高密度的运输,鱼体易挣扎受伤、感染鱼病或缺氧死亡,为增加鱼的成活率,减少经济损失,苯佐卡因也被广泛用作流通环节鱼体麻醉药。其能强制改变鱼类在运输途中的生理状态,使鱼体内代谢强度降低,使鱼行动迟缓,进入类似休眠状态,从而防止鱼在容器中剧烈运动而造成伤害。

[0003] 随着人们对食品安全的关注及诉求日益增加,食品药物的残留已经成为了一个社会热点问题。苯佐卡因作为渔用麻醉剂,具有麻醉效果好、操作方便、可迅速麻醉和复苏等优点,但其安全性存在争议。世界各国对麻醉剂在食用水产品中的应用均较为谨慎,目前仅挪威批准苯佐卡因可作为渔用麻醉剂,但规定其休药期为21天。我国尚未对该药物作为渔用麻醉剂方面制定详细的限量规定。因此,为保障水产品安全性,建立快速准确监测水产品中苯佐卡因残留水平的分析技术具有重要意义。

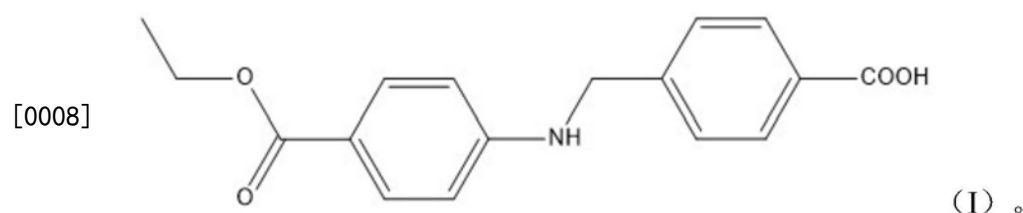
[0004] 目前,苯佐卡因的检测主要依赖仪器分析方法,如液相色谱法、液相色谱-串联质谱法、气相色谱-串联质谱法。这些方法虽然检测结果准确可靠,但是依赖昂贵仪器,不仅费时费力,且操作要求高,不适宜大批量的快速筛选,亟待解决。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服现有苯佐卡因及其检测方法的缺陷和不足,提供一种苯佐卡因半抗原、人工抗原、抗体及其制备与应用,利用本发明的人工抗原免疫动物,得到的抗体具有特异性高、灵敏度好、准确度高等显著优点。

[0006] 本发明上述目的通过以下技术方案实现:

[0007] 本发明提供一种苯佐卡因半抗原,其结构如式(I)所示:



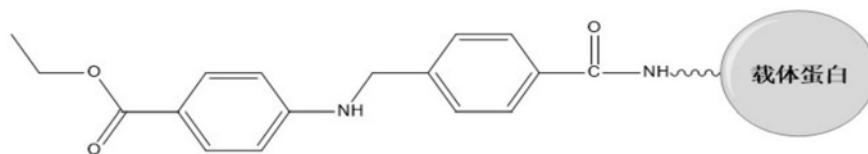
[0009] 本发明保留了苯佐卡因的空间结构,其半抗原只在原有分子的基础上衍生出一个手臂,本发明的抗原进行动物免疫后可得到优质、高效的抗体。

[0010] 本发明还提供上述苯佐卡因半抗原在制备苯佐卡因人工抗原中的应用。

[0011] 本发明还提供由上述苯佐卡因半抗原制得的苯佐卡因人工抗原。

[0012] 可选地,所述苯佐卡因人工抗原的结构如式(II)所示:

[0013]



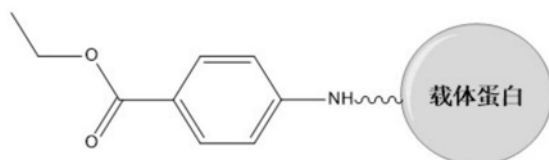
(II)。

[0014] 该人工抗原可用作免疫原。

[0015] 可选地,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白、钥孔血蓝蛋白、乳铁蛋白中的任一种。该人工抗原用作免疫原时,所述载体蛋白优选为牛血清白蛋白。

[0016] 本发明还提供一种苯佐卡因人工抗原,其结构如式(III)所示:

[0017]



(III)。

[0018] 该人工抗原可用作包被原。

[0019] 可选地,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白中的任一种。该人工抗原用作包被原时,所述载体蛋白优选为鸡卵清白蛋白。

[0020] 本发明还提供一种苯佐卡因人工抗原组合,包括上述苯佐卡因人工抗原。

[0021] 本发明还提供上述苯佐卡因人工抗原或苯佐卡因人工抗原组合在制备苯佐卡因抗体中的应用。

[0022] 本发明还提供由上述苯佐卡因人工抗原制备得到的苯佐卡因抗体。

[0023] 可选地,所述抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体、基因工程抗体。

[0024] 可选地,所述抗体是通过上述人工抗原免疫动物制得。

[0025] 可选地,所述动物包括但不限于新西兰大白兔、BALB/C小鼠、羊驼等。

[0026] 本发明还提供上述苯佐卡因半抗原的制备方法,包括:将苯佐卡因与4-甲酰苯甲酸在甲醇中发生缩合反应后,再加入硼氢化钠,还原反应,得到所述苯佐卡因半抗原。

[0027] 可选地,所述苯佐卡因与所4-苯甲酰苯甲酸的摩尔比为1:1~2。

[0028] 可选地,参与缩合反应的试剂还包括三乙胺,其用量为:7.2mmol

[0029] 可选地,缩合反应时,加热回流反应2-3h。

[0030] 可选地,硼氢化钠的用量为2~4mmol

[0031] 可选地,还原反应时,50℃冷凝回流1h。

[0032] 可选地,还原反应结束后,旋转蒸发去除溶剂,萃取,再次旋转蒸发去除萃取剂,将所得的产物过硅胶柱洗脱,再次旋转蒸发,得到产物。

[0033] 可选地,萃取时,采用的萃取剂为乙酸乙酯。

[0034] 可选地,洗脱时,按体积计,洗脱液中石油醚:乙酸乙酯=3~6:1。

[0035] 本发明还提供上述式(II)所示苯佐卡因人工抗原的制备方法,包括:将上述苯佐卡因半抗原溶于N,N-二甲基甲酰胺(即DMF)中,得到混合液,将载体蛋白加入所述混合液中,混合后,将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(简称EDC)加入所述混合液中,偶联反应后,得到式(II)所示苯佐卡因人工抗原。1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐为活化剂。

- [0036] 可选地,所述苯佐卡因半抗原与所述载体蛋白的摩尔比为(300-600):1。
- [0037] 可选地,将载体蛋白加入所述混合液时,预先将蛋白溶于缓冲液中,然后将该溶液加入所述混合液中。
- [0038] 可选地,所述N,N-二甲基甲酰胺的用量为0.2-1mL。
- [0039] 可选地,所述苯佐卡因半抗原与所述1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的摩尔比为1:(1-2)。
- [0040] 可选地,将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶解于水中,然后将该水溶液滴加至所述混合液中。
- [0041] 可选地,偶联反应结束后,用缓冲液透析,得到所述苯佐卡因人工抗原。
- [0042] 可选地,所述缓冲液为PBS缓冲液。
- [0043] 可选地,所述缓冲液pH值为7.4~8.0,优选为7.4。
- [0044] 本发明还提供上述式(III)所示苯佐卡因人工抗原的制备方法,包括:
- [0045] 将苯佐卡因溶于盐酸和 NaNO_2 中反应,结束后,向反应液中加入蛋白,在碱性条件下反应,得到式(III)所示苯佐卡因人工抗原。盐酸为溶剂, NaNO_2 为活化剂。
- [0046] 可选地,所述盐酸的浓度为0.1~1mol/L。
- [0047] 可选地,所述苯佐卡因与所述 NaNO_2 的用量为1:(1-2)
- [0048] 可选地,加入蛋白时,预先将蛋白溶于缓冲液中,然后将所得溶液加入所述反应液中。
- [0049] 可选地,在碱性条件下反应时,用含有碱的水溶液调节pH至9-10,优选为9.5。含有碱的水溶液具体可以为氢氧化钠水溶液。
- [0050] 可选地,在碱性条件下反应结束后,用缓冲液透析,得到所述苯佐卡因人工抗原。
- [0051] 可选地,所述缓冲液为PBS缓冲液。
- [0052] 可选地,所述缓冲液pH值为7.4~8.0,优选为7.4。
- [0053] 本发明还提供一种免疫分析检测苯佐卡因的方法,包括如下步骤:
- [0054] (1)采用式(II)所示苯佐卡因人工抗原免疫动物,制得多克隆抗体;
- [0055] (2)采用式(III)所示苯佐卡因人工抗原作为包被原,包被至微孔,将步骤(1)制得的所述多克隆抗体加入所述微孔中,然后加入待测样品,采用竞争ELISA法测定待测样品中苯佐卡因的含量。
- [0056] 本发明具有以下有益效果:
- [0057] 由于苯佐卡因本身的限量标准较少,有关于其半抗原及人工抗原合成也鲜有报道,与其相关免疫检测方法也较少,而现有的苯佐卡因检测技术主要以仪器法为主,而仪器法操作复杂,前处理要求高,成本高。利用本发明的人工抗原免疫动物得到的抗血清效价高,得到的抗体具有特异性高、灵敏度好、准确度高等显著优点。

附图说明

- [0058] 图1显示为本发明实施例的苯佐卡因半抗原化学结构示意图。
- [0059] 图2显示为本发明实施例1的苯佐卡因半抗原质谱鉴定图。
- [0060] 图3显示为本发明实施例2的苯佐卡因人工免疫原结构示意图。
- [0061] 图4显示为本发明实施例2的苯佐卡因人工包被原结构示意图。

[0062] 图5显示为本发明实施例2的苯佐卡因半抗原及其免疫抗原、载体蛋白紫外扫描图。

[0063] 图6显示为本发明实施例2的苯佐卡因半抗原及其免疫抗原、载体蛋白紫外扫描图。

[0064] 图7显示为本发明实施例4的半抗原所制备的抗体对苯佐卡因的抑制曲线图。

具体实施方式

[0065] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0066] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0067] 基于现有技术所存在的缺陷,需发明一种针对苯佐卡因麻醉剂的快速、简便的检测方法。基于抗原-抗体特异性结合的免疫分析法具有样品前处理简便、操作简单、快速、灵敏、检测成本低等特点,被誉为是21世纪最具竞争和挑战的快速检测技术,在食品安全领域具有广阔的应用前景。目前尚未见有关苯佐卡因免疫检测研究报道。

[0068] 以下实施例中,

[0069] 实施例1半抗原的制备方法

[0070] 在25mL圆底烧瓶中将825mg (5mmol) 苯佐卡因溶于25mL无水甲醇(溶剂)中,待溶解后加入1mL三乙胺(催化剂),磁力搅拌下缓慢滴加入670mg的苯醛酸,80℃下冷凝回流反应3h后,加入0.12g硼氢化钠还原,50℃下冷凝回流反应1h,将甲醇40℃下旋干,用水溶解,乙酸乙酯萃取3次后,将乙酸乙酯50℃下旋干,所得反应混合物过硅胶柱纯化,用石油醚:乙酸乙酯=3:1(体积比)洗脱后,50℃下旋干得到产物,即为目标半抗原(即苯佐卡因半抗原),目标半抗原的化学结构如图1所示,图2为苯佐卡因半抗原质谱鉴定图。

[0071] ESI-MS analysis m/z 298 $[M-H]^-$; 1H NMR (600MHz, DMSO) δ 10.05 (s, 1H), 8.07 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.89 (dd, $J=12.2, 8.2$ Hz, 4H), 7.65 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 7.41 (d, $J=7.3$ Hz, 2H), 7.18 (t, $J=6.1$ Hz, 1H), 6.59 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 4.41 (d, $J=6.0$ Hz, 2H), 4.18 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.24 (t, $J=7.1$ Hz, 3H)。

[0072] 实施例2免疫原/包被原的制备方法

[0073] 免疫原与包被原的制备方法中,其区别在于半抗原的结构式、载体蛋白的使用类型以及偶联的方法,免疫原载体蛋白主要采用牛血清白蛋白(BSA),包被原载体蛋白主要采用鸡卵清白蛋白(OVA),所用偶联方法为活泼酯法或重氮化法。牛血清蛋白购自北京博奥拓达科技有限公司,鸡卵清白蛋白购自sigma公司。

[0074] 免疫原(活泼酯法):取苯佐卡因半抗原(BZKY-299) 140mg溶于0.6mL DMF中,将50mg BSA溶解于10mL pH为7.4的PBS(磷酸盐缓冲液)中后,加入半抗原溶解液,磁力搅拌10min,混合均匀后,得到蛋白-半抗原混合液,取90mg的EDC溶解在200 μ L水中,在搅拌下滴加入蛋白-半抗原混合液中,室温偶联过夜;偶联混合物于4℃下PBS透析3天,得到苯佐卡因免疫原;免疫原具有如图3所示结构,该结构式中,载体蛋白为牛血清白蛋白。

[0075] 包被原(重氮化法):取100mg的OVA溶解在5mL的碳酸盐缓冲液(pH9.0)中;称取50mg苯佐卡因,加入1mL盐酸(1mol/L)和0.75mL $NaNO_2$,充分溶解后磁力搅拌反应30min,反

应完后加入溶解的蛋白中,调pH至9.5左右,磁力搅拌反应1h,PBS透析3d后得到苯佐卡因包被原;包被原具有图4所示结构,该结构式中,载体蛋白为鸡卵清白蛋白。

[0076] 将免疫原、包被原分别稀释至1mg/mL,分装于离心管中,于-20℃保存,以供使用。

[0077] 如图5所示,对载体蛋白BSA、半抗原BZKY-299及其相应的免疫原进行紫外扫描测定(200~400nm),发现免疫原的特征吸收峰有向半抗原特征吸收峰位偏移,说明免疫原偶联成功。

[0078] 如图6所示,对载体蛋白OVA、BZKY及其相应的包被原进行紫外扫描测定(200~400nm),发现免疫原的特征吸收峰有向半抗原特征吸收峰位偏移,说明免疫原偶联成功。

[0079] 实施例3抗体制备及鉴定

[0080] 将实施例2制备好的免疫原与等量的免疫佐剂(第一次免疫用完全弗氏佐剂,以后加强免疫均用不完全弗氏佐剂)乳化均匀,免疫动物。将2.5~3kg的新西兰大白兔分别采用背部皮下、各部位皮下、腿部肌肉和耳缘静脉多种注射方式免疫,4周后第二次免疫,以后每间隔3周加强免疫一次。第三次加强免疫后1周耳缘静脉取血,并利用间接竞争ELISA测定血清效价,酶标板购自美国赛默飞公司。当效价不再上升时,采用耳缘静脉加强免疫。一周后心脏采血,水浴0.5~1h,4℃、10000离心15min,取上清即为抗血清。采用硫酸铵沉淀法纯化抗血清,得到多克隆抗体,于-20℃冻存备用。

[0081] 间接竞争ELISA测定抗体阳性滴度,以2.1倍于阴性血的测定值为准,结果表明半抗原BZKY-299对应的抗血清(BZKY-299-BSA)效价为1:4000,说明该免疫原具有较好的免疫效果。

[0082] 实施例4抗体的特异性及灵敏度

[0083] 1、依据如上效果,使用抗血清(BZKY-299-BSA)绘制酶联免疫分析(ELISA)标准曲线;使用碳酸盐缓冲液(CBS,pH=9.0)作为包被原稀释液,磷酸盐缓冲液(PBS,0.01mol/L,pH=7.4)作为一抗的稀释液,磷酸吐温缓冲液(PBST,0.01mol/L)作为二抗的稀释液,使用BZKY-OVA作为包被原:将50μL系列浓度的药物标准品和50μL适当稀释倍数的苯佐卡因多特异性抗体加入96孔酶标板中,竞争反应后通过酶联免疫检测仪测定吸光值(OD),酶联免疫检测仪购自美国赛默飞公司。以OD值为纵坐标,相应的标准品浓度对数值为横坐标,应用origin8.5软件四参数对函数进行曲线拟合: $y = (A-D) / [1 + (X/C)^B] + D$,其中,A和D分别代表药物浓度最小和最大的吸光值(OD),C为中点浓度,当标准品浓度等于C时的OD值为(A+D)/2,正处于曲线的拐点处,半数抑制量浓度为IC₅₀,B表示曲线的陡峭程度,称斜率因子;以IC₁₀为检测限,以IC₂₀~IC₈₀为检测范围。以苯佐卡因为标准品建立ELISA的标准曲线,结果如图7,相关标准曲线参数见表1。结合图7及表1可知,以苯佐卡因为标准品建立的标准曲线具备典型的S型曲线,检测灵敏度好。由于该特异性抗体能直接识别苯佐卡因,因此,该方法可以直接检测食品中的苯佐卡因的含量。

[0084] 表1抗血清(BZKY-299-BSA)对苯佐卡因的检测参数

[0085]	免疫原	IC ₅₀ (ng/mL)	线性范围 (ng/mL)	最低检测限 (ng/mL)	相关系数
	BZKY-299-BSA	22.88	5.45-96.03	2.36	0.99971

[0086] 表2抗血清BZKY-299-BSA对半抗原苯佐卡因及其结构类似物的交叉反应率

[0087]	竞争药物	IC ₅₀ (ng/mL)	交叉反应率
	苯佐卡因	22.88	100%
	邻氨基苯甲酸乙酯	1266.26	1.80%
	苯甲酸	>5000	<0.1%
	丁香酚	>5000	<0.1%

[0088] 2、鸡卵清白蛋白包被原：

[0089] S1. 包被原1如图2所示 (BZKY-299-OVA)，其中载体蛋白为鸡卵清白蛋白；

[0090] S2. 包被原2如图3所示 (BZKY-OVA)，其中载体蛋白为鸡卵清白蛋白。

[0091] 表3ELISA检测结果

[0092]	包被原	效价	抑制	IC ₅₀ (ng/mL)
	BZKY-299-OVA	1:64000	17.29%	669.29
	BZKY-OVA	1:4000	73.25%	22.88

[0093] 由上表3可知：包被原BZKY-299-OVA检测抗血清，效价虽然较高，但是抑制率较低，检测灵敏度低。这可能是BZKY-OVA包被原未添加手臂，排除了针对手臂的特异性，使得抑制率有了明显的升高。

[0094] 综上所述，利用本发明的人工抗原免疫动物得到的抗血清的效价可达1:4000，最低检测限为2.36ng/mL，半抑制浓度为22.88ng/mL，该抗体具有特异性高、灵敏度好、准确度高、检测速度快等显著优点，因此，本发明提供的抗原和抗体可用于建立苯佐卡因的酶联免疫吸附分析技术，从而用于快速检测食品中残留的苯佐卡因，具有广阔的应用前景。

[0095] 上述实施例为本发明较佳的实施方式，但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制，其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化，均应为等效的置换方式，都包含在本发明的保护范围之内。

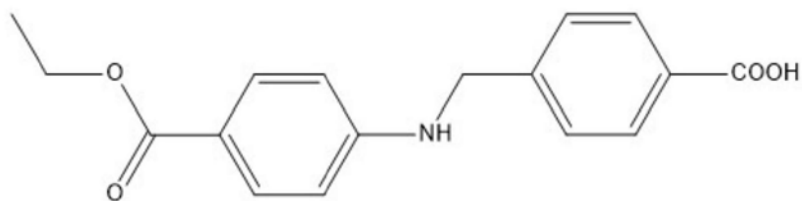


图1

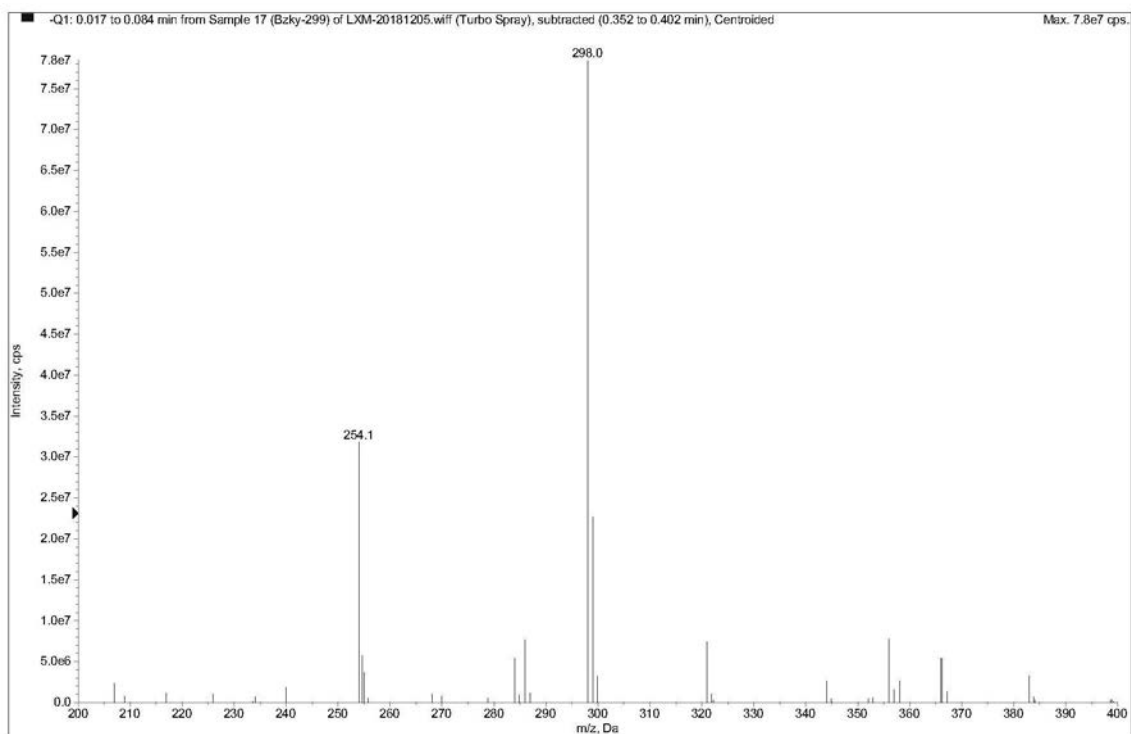


图2

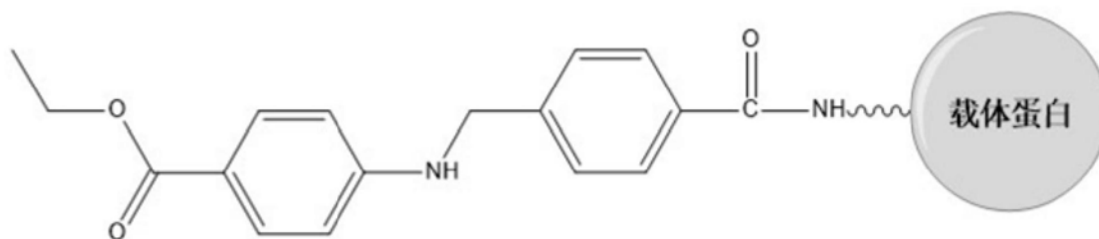


图3

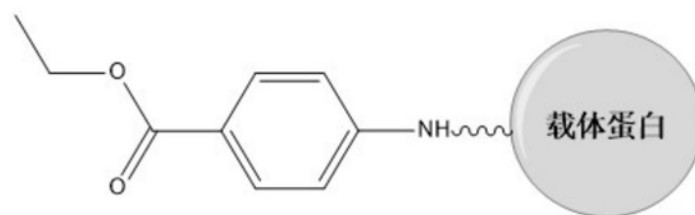


图4

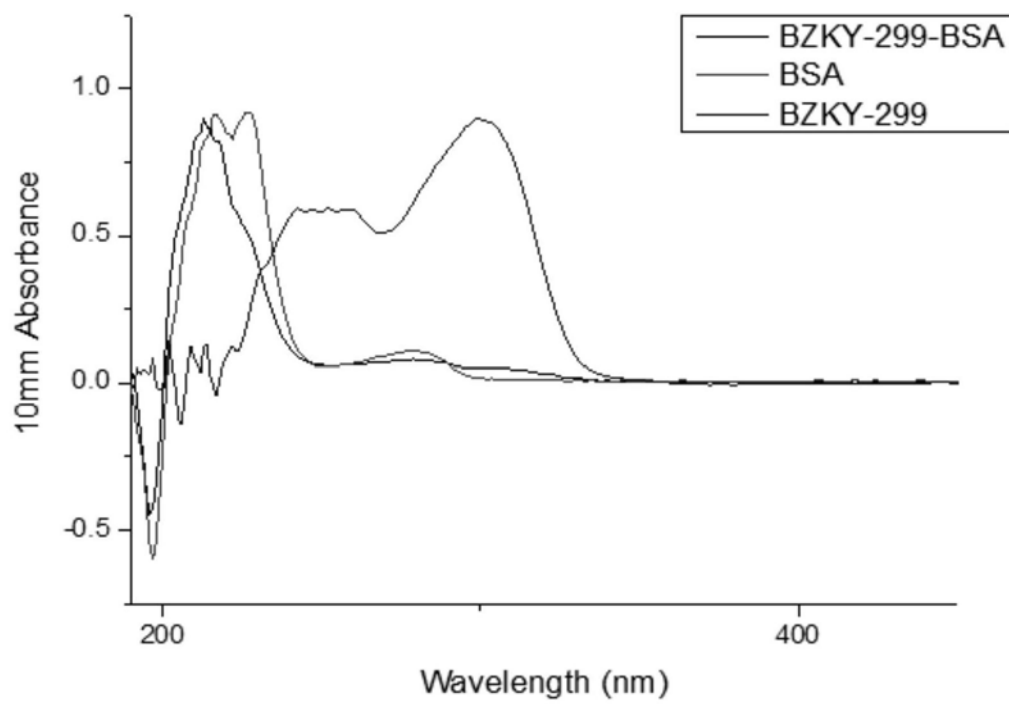


图5

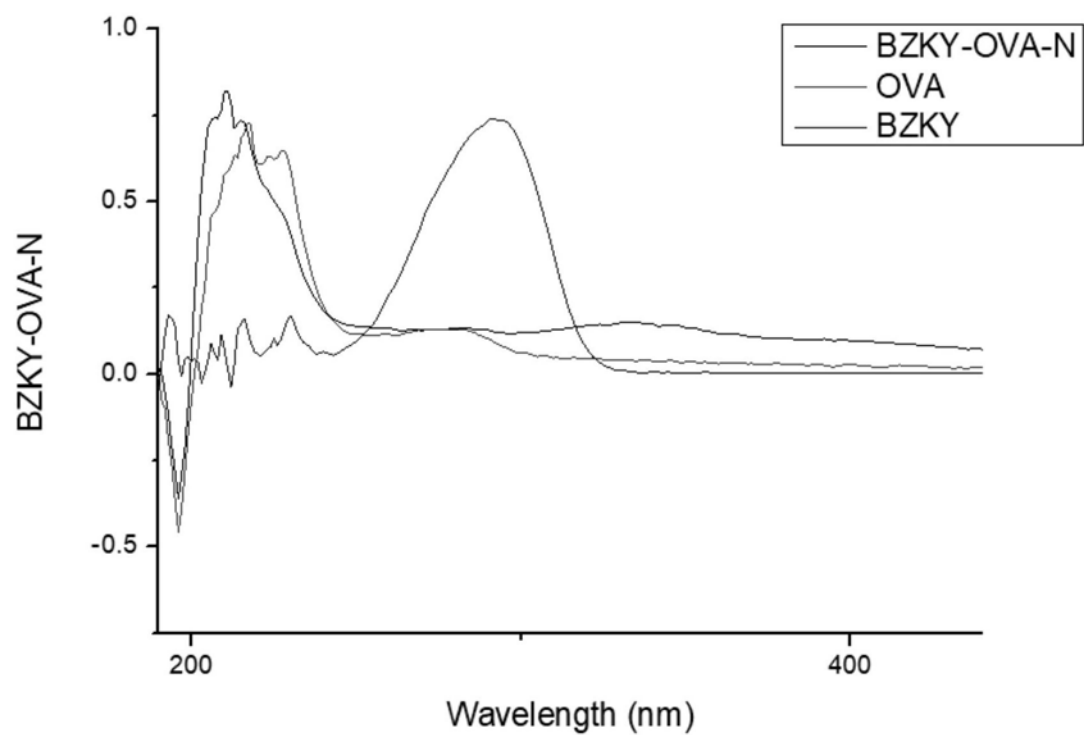


图6

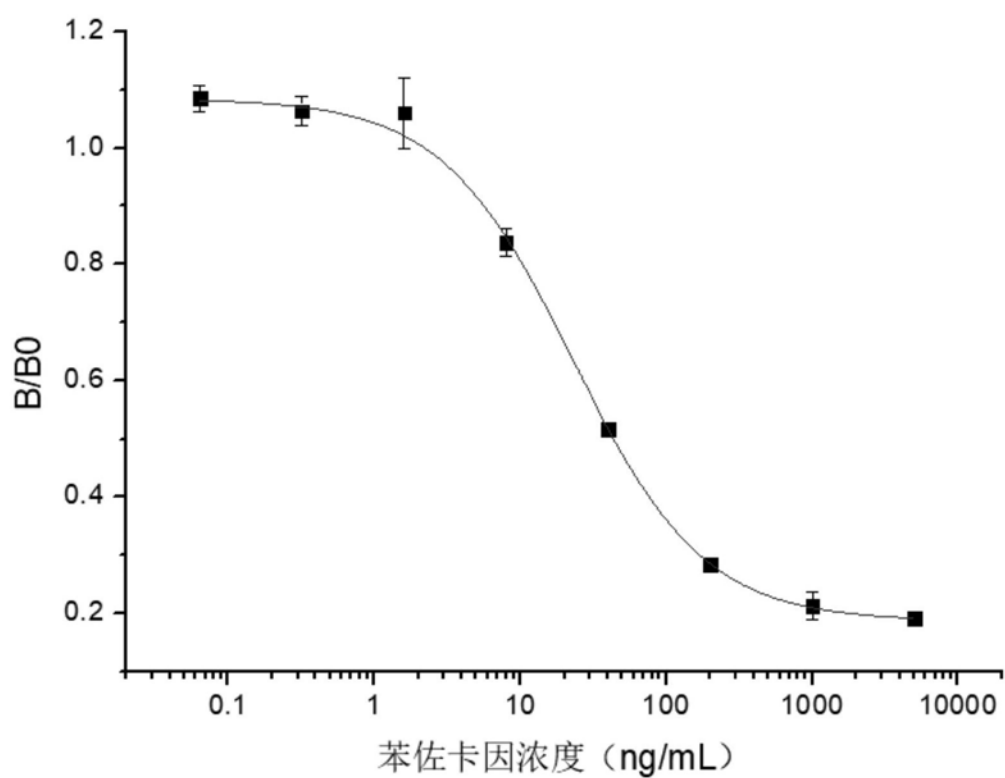


图7