



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112390776 A

(43)申请公布日 2021.02.23

(21)申请号 201910744641.0

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2019.08.13

G01N 33/531(2006.01)

(71)申请人 国家粮食和物资储备局科学研究院

地址 100037 北京市西城区百万庄大街11号

(72)发明人 郭超 王超 郭伟群

(74)专利代理机构 北京正理专利代理有限公司
11257

代理人 邹欢

(51)Int.Cl.

C07D 313/00(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

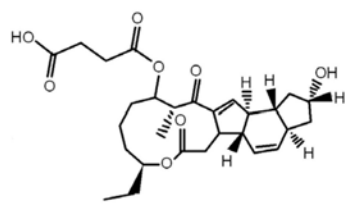
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种多杀菌素糖苷配基半抗原及其制备方法和应用

(57)摘要

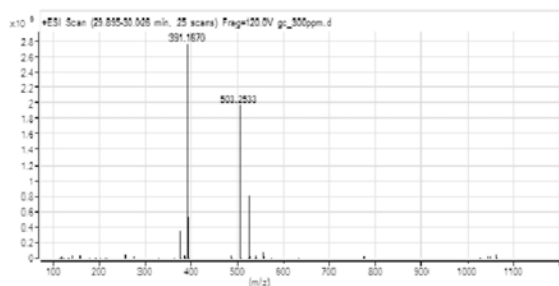
本发明公开了一种多杀菌素糖苷配基半抗原,其分子结构式如下式I所示:



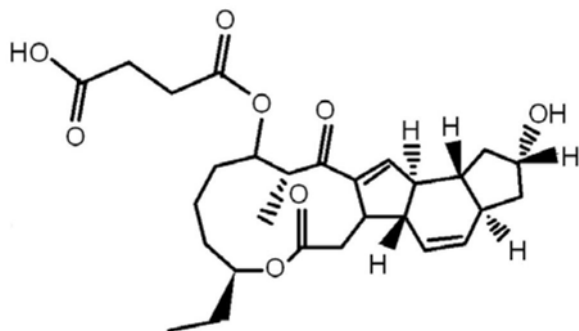
该多杀菌素糖苷

I。

配基半抗原在糖苷配基含量的检测中,检测限低、半数抑制浓度低。本发明还公开了该多杀菌素糖苷配基半抗原的制备方法及其应用。

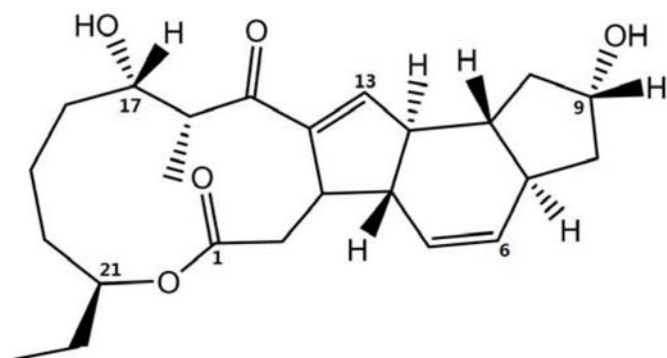


1. 一种多杀菌素糖苷配基半抗原, 其特征在于, 其分子结构式如下式I所示:



I。

2. 如权利要求1所述的多杀菌素糖苷配基半抗原的制备方法, 其特征在于, 将分子结构式如下式II所示的多杀菌素糖苷配基的C17位羟基与琥珀酸酐反应得到所述多杀菌素糖苷配基半抗原,



II;

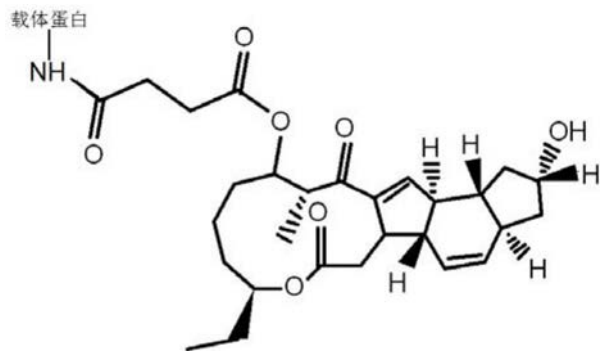
优选地, 所述制备方法包括如下步骤:

将多杀菌素糖苷配基用乙腈溶解, 加入三乙胺和琥珀酸酐, 于55℃加热反应完全, 纯化, 得所述多杀菌素糖苷配基半抗原;

其中, 所述多杀菌素糖苷配基、三乙胺和琥珀酸酐的用量比为0.4g:0.2-1.2mL:0.12-0.36g。

3. 如权利要求1所述的多杀菌素糖苷配基半抗原在制备多杀菌素糖苷配基人工抗原中的应用。

4. 一种多杀菌素糖苷配基人工抗原, 其特征在于, 由如权利要求1所述的多杀菌素糖苷配基半抗原与载体蛋白偶联得到, 其分子结构式如下式III所示:



III。

5. 根据权利要求4所述的多杀菌素糖苷配基人工抗原, 其特征在于, 所述载体蛋白选自牛血清蛋白、卵清蛋白、匙孔血蓝蛋白中的一种或几种。

6. 如权利要求4-5任一项所述的多杀菌素糖苷配基人工抗原的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 向所述多杀菌素糖苷配基半抗原的溶液中加入a) 三乙胺和氯甲酸异丁酯,或,b) N-羟基琥珀酰亚胺和碳二亚胺,搅拌反应;

2) 将步骤1) 反应液离心,取上清液滴加至载体蛋白的磷酸缓冲液中,室温搅拌反应;

3) 将步骤2) 反应液室温下透析纯化,得所述多杀菌素糖苷配基人工抗原。

7. 一种多杀菌素糖苷配基抗体,其特征在于,由权利要求4-5任一项所述的多杀菌素糖苷配基人工抗原为免疫原制备得到。

8. 如权利要求1所述的多杀菌素糖苷配基半抗原或4-5任一项所述的多杀菌素糖苷配基人工抗原在制备多杀菌素糖苷配基抗体中的应用。

9. 一种酶联免疫检测多杀菌素糖苷配基的免疫原和包被原组合,其特征在于,免疫原为权利要求1所述多杀菌素糖苷配基半抗原与牛血清蛋白的偶联物,包被原为权利要求1所述半抗原与卵清蛋白的偶联物。

10. 如权利要求9所述免疫原和包被原组合在检测多杀菌素糖苷配基含量、构建多杀菌素糖苷配基酶联免疫检测以及多杀菌素糖苷配基类似物结构筛选方法中的应用。

一种多杀菌素糖苷配基半抗原及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及多杀菌素糖苷配基半抗原、抗原技术领域。更具体地，涉及一种多杀菌素糖苷配基半抗原及其制备方法和应用。

背景技术

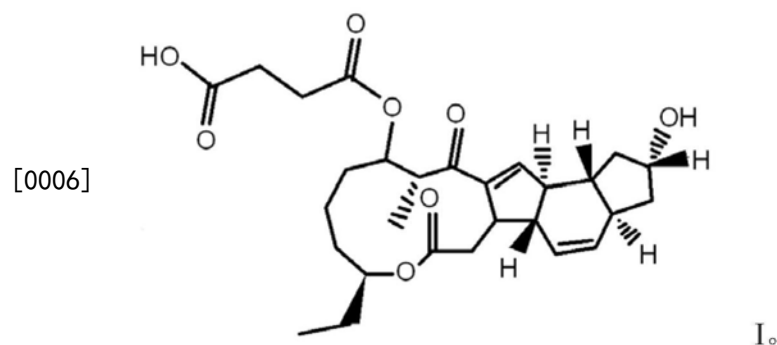
[0002] 多杀菌素的合成途径为：起始单位丙酸上按照A-A-P-A-A-A-A-A-A-A (A-乙酰，P-丙酰)的顺序添加10个酰基缩合形成聚酮链，后在酶的催化作用下环化为大环内酯，接着在聚酮环内C3-C14、C4-C12及C7-C11之间形成交联桥，即为多杀菌素糖苷配基，最后于C9、C17位连接鼠李糖和福乐糖胺。糖苷配基作为多杀菌素合成过程中的中间体，其发酵过程中浓度的变化直接影响多杀菌素的产量，因此需要建立一种高灵敏度的检测方法。

[0003] 多杀菌素糖苷配基及其结构类似物的检测方法主要为高效液相色谱法，该方法虽然精确度高，但大批量检测过于缓慢，并且不能同时检测多个目标物。

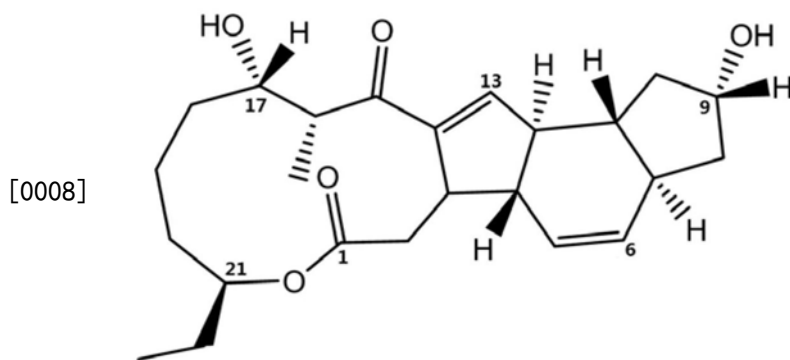
发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种多杀菌素糖苷配基半抗原及其制备方法和应用。本发明中，该多杀菌素糖苷配基半抗原用于制备多杀菌素糖苷配基抗体时，采用所述抗原抗体优化建立额多杀菌素糖苷配基酶联免疫吸附检测方法，检测限达到3.26ng/mL，半数抑制浓度为115.9ng/mL。

[0005] 本发明的第一方面提供一种多杀菌素糖苷配基半抗原，其分子结构式如下式I所示：



[0007] 本发明的第二方面提供如上第一方面所述的多杀菌素糖苷配基半抗原的制备方法，包括：将分子结构式如下式II所示的多杀菌素糖苷配基的C17位羟基与琥珀酸酐反应得到所述多杀菌素糖苷配基半抗原，



[0009] 其中,上述式II所示的多杀菌素糖苷配基可以通过将多杀菌素A在酸性条件下水解得到。具体可参考“Journal of Antibiotics,1998,51 (8) :795-799”。

[0010] 可选地,所述制备方法具体包括如下步骤:

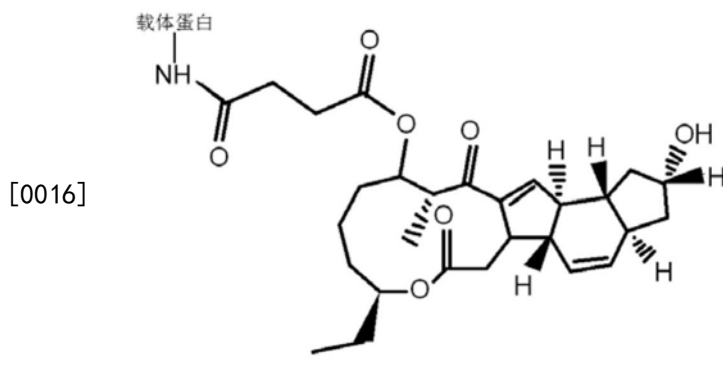
[0011] 将多杀菌素糖苷配基用乙腈溶解,加入三乙胺和琥珀酸酐,于55℃加热反应完全,纯化,得所述多杀菌素糖苷配基半抗原;

[0012] 其中,所述多杀菌素糖苷配基、三乙胺和琥珀酸酐的用量比为0.4g:0.2-1.2mL:0.12-0.36g。

[0013] 可选地,所述多杀菌素糖苷配基、三乙胺和琥珀酸酐的用量比为:0.4g:0.2-1.2mL:0.12-0.36g,更优选的用量比为:0.4g:0.4mL:0.24g。

[0014] 本发明的第三方面提供如上第一方面所述的多杀菌素糖苷配基半抗原在制备多杀菌素糖苷配基人工抗原中的应用。

[0015] 本发明的第四方面提供一种多杀菌素糖苷配基人工抗原,由第一方面所述的多杀菌素糖苷配基半抗原与载体蛋白偶联得到,其分子结构式如下式III所示:



[0017] 可选地,所述载体蛋白选自牛血清蛋白、卵清蛋白、匙孔血蓝蛋白中的一种或几种。

[0018] 本发明的第五方面提供如上第四个方面所述的多杀菌素糖苷配基人工抗原的制备方法,该方法包括如下步骤:

[0019] 1) 向所述多杀菌素糖苷配基半抗原的溶液中加入a) 三乙胺和氯甲酸异丁酯,或, b) N-羟基琥珀酰亚胺和碳二亚胺,搅拌反应;

[0020] 2) 将步骤1) 反应液离心,取上清液滴加至载体蛋白的磷酸缓冲液中,室温搅拌反应;

[0021] 3) 将步骤2) 反应液室温下透析纯化,得所述多杀菌素糖苷配基人工抗原。

[0022] 可选地,步骤1) 中,所述杀菌素糖苷配基半抗原的溶液中的溶剂选自二甲基亚砜

或二甲基甲酰胺。当所述溶剂为二甲基亚砒时,步骤1)中,向该溶液中加入a)三乙胺和氯甲酸异丁酯;当所述溶剂为二甲基甲酰胺时,步骤1)中,向该溶液中加入b)N-羟基琥珀酰亚胺和碳二亚胺。

[0023] 当所述溶剂为二甲基亚砒时:

[0024] 可选地,步骤1)中,所述多杀菌素糖苷配基半抗原和氯甲酸异丁酯的用量摩尔比为:1:3-4,优选的为1:3.5。

[0025] 可选地,载体蛋白与多杀菌素糖苷配基半抗原的摩尔比为15-60:1。

[0026] 可选地,所述二甲基亚砒和磷酸盐缓冲液的体积比为3:7。

[0027] 可选地,步骤1)中反应时间为1-3h。

[0028] 可选地,步骤2)中反应时间为8-12h。

[0029] 当所述溶剂为二甲基甲酰胺时:

[0030] 可选地,步骤1)中,所述多杀菌素糖苷配基半抗原、N-羟基琥珀酰亚胺和碳二亚胺(EDC)的用量摩尔比为:1:1-1.5:1-1.5,更优选的为1:1.2:1.2。

[0031] 可选地,载体蛋白与多杀菌素糖苷配基半抗原的摩尔比为:15-60:1。

[0032] 可选地,所述二甲基亚砒和磷酸盐缓冲液的体积比为:3:7。

[0033] 可选地,步骤1)中反应时间为1-3h。

[0034] 可选地,步骤2)中反应时间为8-12h。

[0035] 本发明的第六方面提供一种多杀菌素糖苷配基抗体,由如上第四个方面所述的多杀菌素糖苷配基人工抗原为免疫原制备得到。

[0036] 本发明的第七方面提供如第一方面所述的多杀菌素糖苷配基半抗原或如上第四个方面所述的多杀菌素糖苷配基人工抗原在制备多杀菌素糖苷配基抗体中的应用。

[0037] 本发明的第八方面提供一种酶联免疫检测多杀菌素糖苷配基的免疫原和包被原组合,其中,免疫原为第一方面所述的多杀菌素糖苷配基半抗原与牛血清蛋白的偶联物,包被原为第一方面所述的多杀菌素糖苷配基半抗原与卵清蛋白的偶联物。

[0038] 本发明的第九方面提供如第八方面提供的免疫原和包被原组合在检测多杀菌素糖苷配基含量、构建多杀菌素糖苷配基酶联免疫检测以及多杀菌素糖苷配基类似物结构筛选方法中的应用。

[0039] 本发明的有益效果如下:

[0040] 本发明提供的多杀菌素糖苷配基半抗原分支结构少,由其制备得到的抗体降低了特异性,不仅可以用于多杀菌素糖苷配基含量的酶联免疫检测,其对多杀菌素、丁烯基多杀菌素等多杀菌素糖苷配基结构类似物具有交叉反应,因此还可应用于多杀菌素糖苷配基结构类似物的筛选。此外,将其用于本发明提供的多杀菌素糖苷配基酶联免疫吸附检测方法中,检测限达到3.26ng/mL,半数抑制浓度为115.9ng/mL,且操作方法简便,该方法适于多杀菌素糖苷配基含量的检测。

附图说明

[0041] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步详细的说明。

[0042] 图1示出实施例1制备得到的多杀菌素糖苷配基半抗原的质谱图。

[0043] 图2示出实施例6中多杀菌素糖苷配基标准曲线。

具体实施方式

[0044] 为了更清楚地说明本发明,下面结合优选实施例和附图对本发明做进一步的说明。附图中相似的部件以相同的附图标记进行表示。本领域技术人员应当理解,下面所具体描述的内容是说明性的而非限制性的,不应以此限制本发明的保护范围。

[0045] 实施例1

[0046] 多杀菌素糖苷配基半抗原的制备:

[0047] 0.4g的多杀菌素糖苷配基用10mL的乙腈溶解,加入三乙胺400 μ l,加入琥珀酸酐0.24g,于55℃加热反应8h,TLC板监测反应进程。反应完成后直接将反应液蒸干,加水50ml,0.1M盐酸5mL,分三次加入乙酸乙酯300mL,萃取3次,合并有机相,旋蒸蒸干,上样200-300目硅胶柱,石油醚/乙酸乙酯(v/v,5/1)洗脱分离,得到多杀菌素糖苷配基半抗原。

[0048] 多杀菌素糖苷配基半抗原的质谱图如图1所示,出现了m/z为503.2的离子峰,说明该产物去质子后的分子量为502.2与目标产物的理论分子量502一致。证明其具有式I所示的结构。

[0049] 实施例2

[0050] 多杀菌素糖苷配基免疫抗原的制备:

[0051] 取多杀菌素糖苷配基半抗原35mg,加二甲基亚砷3mL溶解,加三乙胺0.17mL,氯甲酸异丁酯30 μ L,搅拌反应2h,得到A液;取100mg牛血清白蛋白,加0.1mol/L磷酸盐缓冲液7mL溶解,得到B液,将A液缓慢滴加到B液中,室温搅拌12h。0.02mol/L PB缓冲液透析纯化三天,每天换液3次,得到多杀菌素糖苷配基免疫抗原。

[0052] 实施例3

[0053] 多杀菌素糖苷配基免疫抗原的制备:

[0054] 取多杀菌素糖苷配基半抗原37mg,加二甲基甲酰胺3mL溶解,加N-羟基琥珀酰亚胺12mg,碳二亚胺17mg,搅拌反应2h,得到A液;取100mg牛血清白蛋白,加0.1mol/L磷酸盐缓冲液7mL溶解,得到B液,将A液缓慢滴加到B液中,室温搅拌12h。0.02mol/L PB缓冲液透析纯化三天,每天换液3次,得到多杀菌素糖苷配基免疫抗原。

[0055] 实施例4

[0056] 多杀菌素糖苷配基包被抗原的制备:

[0057] 取多杀菌素糖苷配基半抗原37mg,加二甲基甲酰胺3mL溶解,加N-羟基琥珀酰亚胺12mg,碳二亚胺17mg,搅拌反应2h,得到A液;取100mg卵清蛋白,加0.1mol/L磷酸盐缓冲液7mL溶解,得到B液,将A液缓慢滴加到B液中,室温搅拌12h。0.02mol/L PB缓冲液透析纯化三天,每天换液3次,得到多杀菌素糖苷配基包被抗原。

[0058] 实施例5

[0059] 多杀菌素糖苷配基抗体的制备:

[0060] 本实施例所述抗体制备方法参照本领域常规方法。

[0061] 将实施例2或3得到的多杀菌素糖苷配基免疫抗原与等剂量免疫佐剂混合(首次免疫用弗氏完全佐剂,以后免疫使用弗氏不完全佐剂),搅拌乳化,背部多点皮下免疫健康新西兰大白兔,以后每间隔2周加强免疫一次,最后一次为腹腔加强免疫,免疫1周后采血,离心保留血清,纯化后得到抗体。

[0062] 实施例6

[0063] 多杀菌素糖苷配基酶联免疫检测方法的建立

[0064] 通过棋盘法确定包被抗原和抗体的工作浓度,包被原工作浓度为1.25ug/mL,抗体稀释倍数为9万倍。

[0065] 用不同浓度的多杀菌素糖苷配基标准品溶液做实验溶液,2倍梯度稀释。

[0066] 间接竞争酶联免疫吸附检测方法:用0.1M pH 9.6的碳酸盐缓冲液稀释液稀释抗原,混匀并加入酶标板,每孔100uL,37℃孵育2h,用洗液(含0.05%吐温20的磷酸盐缓冲液)洗板一次,拍干;加入封闭液(含5%脱脂奶粉的洗液)进行封闭,每孔150uL,37℃孵育2h,弃液,拍干;每孔加入50uL多杀菌素糖苷配基梯度稀释液,加入稀释后的抗体,每孔50uL,37℃孵育30min,洗板3次后拍干;加入稀释好的酶标二抗溶液,每孔100uL,37℃孵育30min,洗板3次后拍干;加入显色液,100uL每孔,37℃孵育15min后加入终止液,每孔50uL,用酶标仪检测波长450nm处的吸光度值。以吸光度值为纵坐标,以多杀菌素糖苷配基标准品溶液的log10值作为横坐标,绘制标准曲线(图2)。

[0067] 结果表明:曲线的半数抑制量(IC50)为115.9ng/mL,最低检测限为3.26ng/mL。

[0068] 用同样的方法绘制标准曲线,计算其它结构或功能类似物的半数抑制量,并计算交叉反应率。从表1结果可以说明本方法准确度和灵敏度较好,可应用于多杀菌素糖苷配基的检测,同时多杀菌素、丁烯基多杀菌素等多杀菌素糖苷配基结构类似物均能与抗原发生竞争反应,可应用于多杀菌素糖苷配基类似物的结构筛选。

[0069] 表1本发明抗原、抗体检测多杀菌素糖苷配基类似物的半抑制浓度和交叉率

[0070]

化合物	半数抑制浓度(IC50,ng/mL)	交叉反应率%
多杀菌素糖苷配基	115.9	100
多杀菌素	4.88	2375
丁烯基多杀菌素	9.77	1186

[0071] 显然,本发明的上述实施例仅仅是为清楚地说明本发明所作的举例,而并非是对本发明的实施方式的限定,对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动,这里无法对所有的实施方式予以穷举,凡是属于本发明的技术方案所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明的保护范围之列。

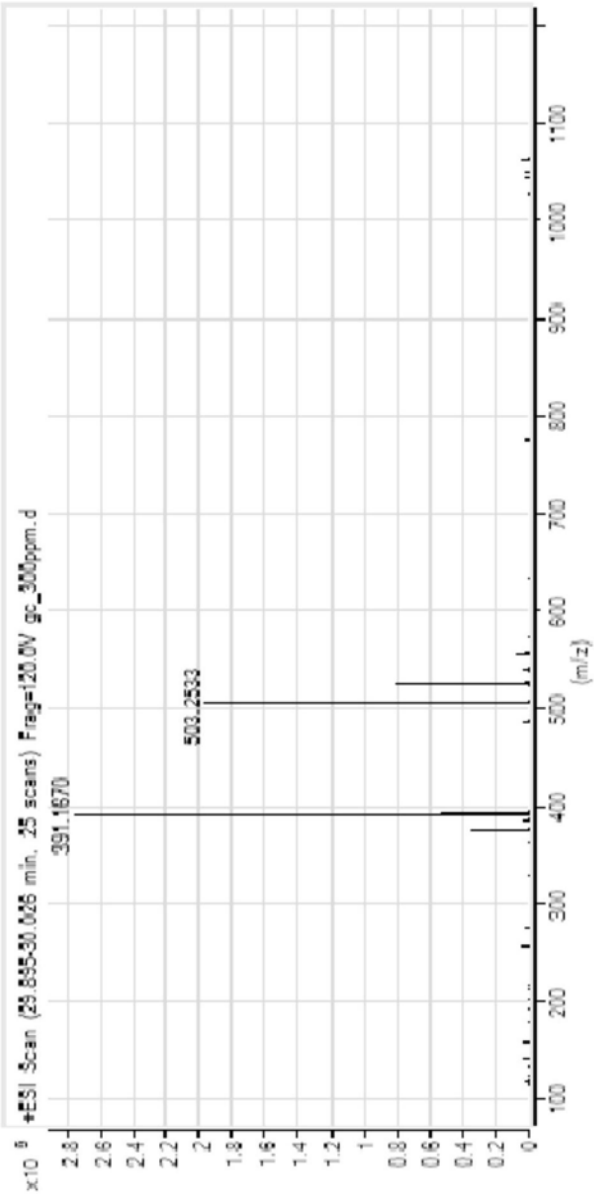


图1

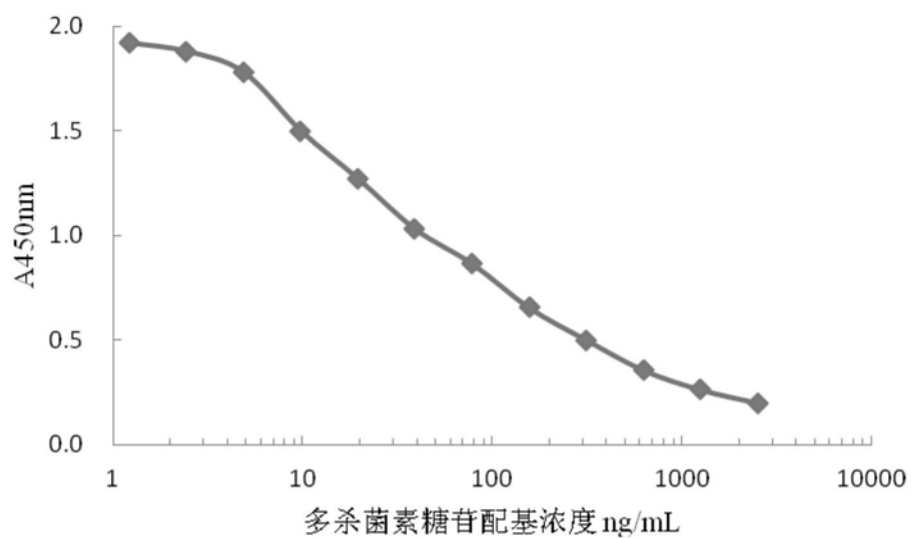


图2