



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103524362 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 22

(21) 申请号 201310352708. 9

C07K 16/06(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 08. 14

G01N 33/53(2006. 01)

(71) 申请人 深圳大学

地址 518000 广东省深圳市南山区南海大道  
3688 号金工坊 110

(72) 发明人 胡章立

(74) 专利代理机构 深圳市千纳专利代理有限公司 44218

代理人 康宇宁

(51) Int. Cl.

C07C 227/10(2006. 01)

C07C 229/52(2006. 01)

C07C 229/42(2006. 01)

C07K 14/77(2006. 01)

C07K 14/795(2006. 01)

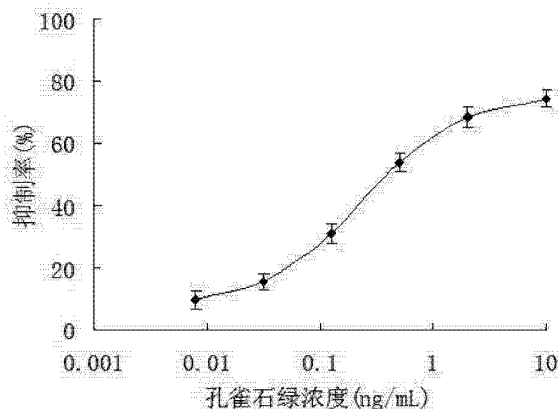
权利要求书3页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称

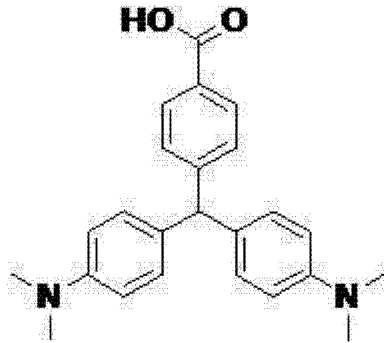
孔雀石绿人工抗原和抗体及其制备方法和应用

(57) 摘要

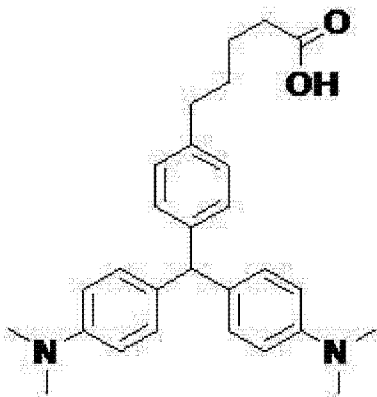
本发明申请提供孔雀石绿人工抗原和抗体的制备,涉及三苯甲烷类化学物质孔雀石绿人工半抗原、人工抗原及抗体的制备。本发明克服了传统的理化分析方法繁琐复杂、成本较高、分析速度慢的问题,提供了简便、快速、灵敏、准确的免疫分析技术。以 4-[双(4-二甲氨基)苯基]甲基苯甲酸和 5-[4-[双(4-二甲氨基)苯基]甲基}苯基戊酸为半抗原,分别与血蓝蛋白、卵清蛋白等载体蛋白连接合成人工抗原,再经动物免疫、取血、分出抗血清、纯化制得抗体。该抗体稳定、具有良好的特异性和灵敏度,可用于孔雀石绿的快速免疫检测,具有良好的应用前景。



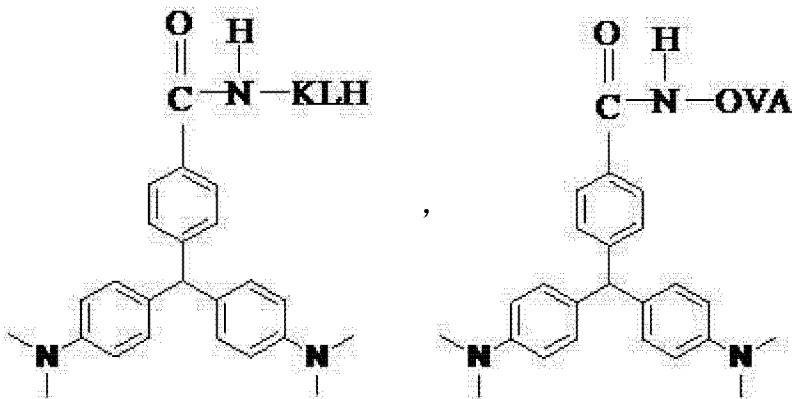
1. 一种孔雀石绿半抗原,其特征在于:所述的半抗原包括(a)4-[双(4-二甲胺基)苯基]甲基苯甲酸,和(b)5-{4-[双(4-二甲胺基)苯基]甲基}苯基戊酸,其中,(a)4-[双(4-二甲胺基)苯基]甲基苯甲酸的结构如下:

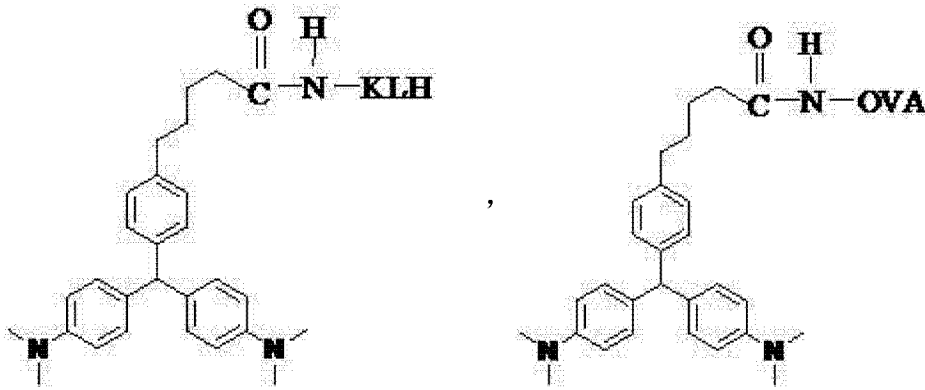


(b) 5-{4-[双(4-二甲胺基)苯基]甲基}苯基戊酸的结构如下:



2. 权利要求1所述的孔雀石绿半抗原与载体蛋白连接形成的完全抗原,其特征在于:以4-[双(4-二甲胺基)苯基]甲基苯甲酸和5-{4-[双(4-二甲胺基)苯基]甲基}苯基戊酸为半抗原,分别与卵清蛋白或血蓝蛋白偶联,其结构如下:





3. 权利要求1所述的4-[双(4-二甲氨基)苯基]甲基苯甲酸的合成方法如下,其特征在于,包括如下步骤:称取对-甲酰基苯甲酸甲酯和氯化锌于烧瓶中,然后加入N,N-二甲基苯胺,加热到120-140°C,搅拌反应4-6小时,乙酸乙酯萃取,乙酸乙酯/正己烷=1:2的硅胶柱层析纯化18-24h后,得到目标化合物4-[双(4-二甲氨基)苯基]甲基苯甲酸。

4. 权利要求1所述的5-{4-[双(4-二甲氨基)苯基]甲基}苯基戊酸的合成方法如下,其特征在于,包括如下步骤:

称取对-羟基苯甲酸溶于二氯甲烷中,0°C加入溴化苄及三乙胺,室温搅拌反应1-2天,0°C加入饱和氯化铵淬灭反应,二氯甲烷萃取,浓缩,硅胶柱纯化(乙酸乙酯/正己烷=1:3)得到化合物4-羟甲基苯甲酸苯甲酯;

将该产物溶于二氯甲烷中,0°C加入三氯异氰尿酸、NaHCO<sub>3</sub>及2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物,反应5-8分钟,硅胶柱纯化(乙酸乙酯/正己烷=1:2),洗脱液浓缩得到化合物4-甲酰基苯甲酸苯甲酯;

称取wittig试剂溶于四氢呋喃中,慢慢加入六甲基二硅基胺基锂,在-80--75°C搅拌0.5-2.0小时,加入4-甲酰基苯甲酸苯甲酯,两小时内温度由-80--75°C升到-25°C,TLC监测,浓缩,硅胶柱纯化(乙酸乙酯/正己烷=1:4)得到中间产物;将中间产物溶于无水甲醇,加入钯碳,氢气保护,常温搅拌反应4-6小时,TLC监测,加入少量乙酸乙酯,硅胶柱纯化(甲醇),浓缩得化合物4-丁酸乙酯基苯甲酸;

将上述产物溶于无水四氢呋喃,0-4°C加入氯甲酸异丁酯及三乙胺,搅拌反应1-2小时,加入硼氢化钠,继续搅拌反应3-5小时,0-4°C加入HCl淬灭反应,浓缩,乙酸乙酯萃取,浓缩,硅胶柱纯化(乙酸乙酯/正己烷=1:5)得到化合物5-(4-羟甲基-苯基)-戊酸乙酯;

将该化合物溶于二氯甲烷中,0-4°C加入三氯异氰尿酸、NaHCO<sub>3</sub>及2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物,反应5-8分钟后迅速过硅胶短柱(乙酸乙酯/正己烷=1:4),得到化合物5-(4-羟基-苯基)-戊酸乙酯;

称取氯化锌和化合物5-(4-羟基-苯基)-戊酸乙酯于烧杯中,加入N,N-二甲基苯胺,加热到110-130°C,搅拌反应1-2天,TLC监测,乙酸乙酯萃取,硅胶柱纯化(甲醇/二氯甲烷=1:10),得目标化合物5-{4-[双(4-二甲氨基)苯基]甲基}苯基戊酸,产率25%。

5. 权利要求2所述的完全抗原的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

取权利要求1所述半抗原以及N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)于烧瓶内加入无水四氢呋喃,在N<sub>2</sub>保护下,逐滴加入溶有N,N-二环己基碳二亚胺DCC的无水四氢呋喃溶液,边滴边搅拌,室温(18-25°C)下搅拌反应4-6h,硅胶柱纯化得到半抗原活化酯;

取权利要求 1 所述半抗原的活化酯溶于 DMF 配成溶液 A, 载体蛋白溶于磷酸缓冲溶液中配成溶液 B, 然后在冰浴下将溶液 A 缓慢加入溶液 B 中, 经搅拌后在 4℃ 下反应过夜, 最后将反应液置入透析袋中, 在 4℃, pH=7.4 的 PBS 溶液中透析三天, 精确量取蛋白质偶联物溶液的体积, 测定浓度和结合比, 分装, -20℃ 下贮藏。

6. 使用权利要求 2 所述完全抗原制备抗体的方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

(1) 免疫: 免疫动物采用雄性新西兰大耳白兔, 免疫方法采用皮下和肌肉注射法, 共进行 6 次免疫, 加强免疫分别在初次免疫后第 2 周, 第 4 周和第 6 周进行三次, 以后两次为一个月进行一次, 从第 3 次免疫后开始采血测效价, 采血时间为免疫后第 10 天;

初次免疫: 取 1mg 上述人工抗原溶于 0.9% 的 NaCl 和弗式完全佐剂等体积配制的溶液中, 进行动物免疫;

加强免疫: 取 0.5mg 上述人工抗原溶于 0.9% 的 NaCl 和弗式不完全佐剂等体积配制的溶液中, 进行动物免疫;

(2) 抗体纯化: 定时检测动物抗体效价, 当抗体对一定的包被抗原达到适宜效价时, 采集血液, 并离心获得抗血清, 使用 Protein A-Sepharose 4B 蛋白亲和层析柱对抗血清进行纯化, 制备 IgG 抗体。

7. 权利要求 6 所述方法制备得到的本发明申请还提供上述方法得到的特异性抗体用于间接竞争 ELISA 方法的建立, 为在食品中检测微量孔雀石绿残留中的应用奠定基础。

## 孔雀石绿人工抗原和抗体及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明申请涉及具有三苯甲烷类结构的孔雀石绿人工半抗原、特异性抗原的合成及特异性抗体的制备,属于小分子化合物免疫化学和残留分析技术领域。

### 背景技术

[0002] 随着国民经济的快速发展,城乡居民生活水平不断提高,人们的饮食结构正发生深刻的变化。水产品以其低脂肪、低胆固醇、高蛋白、营养丰富、味道鲜美等优点,正成为广大消费者所青睐的食品之一。

[0003] 与其它肉类产品相比,微生物更易于在水产品体内繁殖,在水产品的肠道、皮肤、肌肉中我们很容易发现各种致病菌、病毒和寄生虫,养殖户为了预防和防治水产动物患病或受微生物污染,在养殖过程中会使用杀虫剂、杀菌剂等,这些药物的违规使用或不合理使用又会引发药物残留等质量问题。因此,加快水产品安全快速检测技术研究,提高水产品质量,建立健全水产品质量监督体系,对提高我国水产品在全球市场的竞争力,具有重要的现实意义和深远的战略意义。

[0004] 孔雀石绿是人工合成的有机化合物,其是由 1 摩尔分子的苯甲醛(Benzaldehyde)和 2 摩尔分子的二甲苯胺在浓盐酸混和下,加热缩合成隐色素碱(Leuco base),在酸性条件下加过氧化铅使其氧化,并在碱性液中沉淀出色素碱,它属于三苯甲烷型的绿色染料。孔雀石绿以往仅在制陶业、纺织业、皮革业、食品着色剂等方面有所使用。自 1933 年起孔雀石绿开始作为驱虫剂、杀菌剂、防腐剂在水产养殖中出现,而后因为其具有价格低廉、效果显著等优点,被广泛应用于预防与治疗各类水产动物的水霉病和对原虫的控制。但随着研究的深入,发现孔雀石绿进入生物机体后可影响其生长和繁殖能力,造成肝、脾、肾和心脏的病变,对皮肤、眼睛及肺部都有一定的损伤,还具有致癌、致畸和致突变等副作用。鉴于孔雀石绿的危害性,国内外对其残留量制定了严格标准,包括美国、加拿大和欧盟在内的许多国家都规定,不能在水产品中使使用孔雀石绿。欧盟确定孔雀石绿和隐色孔雀石绿的最低执法限量为 2 $\mu$ g/kg; 加拿大水产品养殖全程禁止使用孔雀石绿,并规定了鱼产品中孔雀石绿和无色孔雀石绿含量须在 1ppb 以下,2002 年 12 月农业部对农牧发[1999]17 号文《动物性食品中兽药残留限量》进行了重新修订(235 号公告)中规定孔雀石绿为不得检出。日本于 2006 年实施的《肯定列表制度》,其中规定孔雀石绿不得检出。但由于孔雀石绿的抗菌效果较好,价格便宜,不少水产养殖户仍偷偷使用,因此对孔雀石绿的残留监控工作依然是一项艰巨而重大的任务。

[0005] 目前孔雀石绿及隐孔雀石绿残留检测主要是气相色谱法和高效液相色谱法,仪器检测法虽然准确率较高,但因其设备昂贵,操作繁琐,不适用于现场快速检测。因而迫切需要开发一种简便、快速、灵敏的检测孔雀石绿残留的方法。

[0006] 酶联免疫吸附分析,即 ELISA 法,利用了抗原抗体复合物的免疫反应与酶的催化放大作用,即保持了抗原抗体的特异性,又保持了酶催化反应的敏感性,因而极大的提高了反应灵敏度。同时它又属于一种非均相免疫分析,即在反应中的每一步都通过洗涤除去了

未反应物质和干扰物质。利用 ELISA 方法不仅可以定性而且可以定量检测样品中的微量残留物,这种分析方法对仪器设备要求不高,具有简便快速,灵敏度高,特异性强,易于标准化、自动化和适于大容量样本分析等优点。20 世纪 80 年代后,免疫分析技术已成为优先研究、开发和利用的兽药残留快速检测技术,美国化学学会已经将免疫分析方法与 GC、HPLC 方法一起列为化学兽药残留分析的三大支柱技术,这也为食品中微量孔雀石绿残留检测提供了新的技术。

[0007] 半抗原是指能与对应抗体结合可以发生抗原-抗体反应、又不能单独激发人或动物体产生抗体的抗原,即它只有反应原性,不具有免疫原性,故又称作不完全抗原。通常,具有免疫原性的物质分子量应大于 10000,而一般兽药的分子量均小于 1000,不能刺激机体产生针对兽药抗原决定簇的特异性抗体,因此小分子物质必须与大分子载体偶联后才具有免疫原性,这也是小分子免疫分析的基本模式。半抗原的结构直接影响了抗体的选择性,半抗原分子的设计与合成是小分子免疫分析技术的关键所在。半抗原分子的设计应以兽药亲体以及有毒理学意义的代谢产物的分子结构为目标化合物,设计中应相应地突出特定兽药的分子结构,制备相应的单一特异性抗体或族特异性抗体。一般理想的半抗原分子应尽量具备与待测物类似的立体化学特征,以减少免疫交叉反应性,提高抗体的特异性;同时,要保证半抗原与载体大分子偶联后,半抗原的特征结构能最大限度地被免疫活性细胞所识别,以制备出具有预期选择性和高亲和力的抗体。

[0008] 人工抗原是半抗原与大分子载体蛋白偶联得到的完全抗原。使用载体不仅仅是简单地增加半抗原的分子量,更重要的是利用其较强的免疫原性诱导机体产生免疫应答,从而使机体产生针对半抗原及人工抗原的特异性抗体。因此,免疫分析技术的关键是半抗原的分子设计、合成、人工抗原及抗体的制备。

## 发明内容

[0009] 本发明申请的目的是通过设计合成具有三苯甲烷结构的兽药孔雀石绿的半抗原和人工抗原,突出了这类兽药分子特异性抗原决定簇,然后免疫动物产生亲和性很高的特异性抗体,并以此为基础建立了快速免疫方法,准确检测兽药孔雀石绿。

[0010] 本发明申请的设计思路是,先合成小分子目标分析物半抗原,并与载体蛋白质偶联,制备有效的人工抗原,免疫动物制备针对特定小分子分析物的特异性抗体,利用抗原抗体的特异性免疫学反应和易被检测识别的标记物的放大作用,从而定性和定量的检测样本中超微量小分子目标物。其选择性在于免疫学反应的测定性,其灵敏度取决于抗体的亲和性和标记物的可检性,因此可以快速准确的检测兽药孔雀石绿在样本中的残用量。其关键在于半抗原的分子设计,合成和全抗原及抗体的制备。

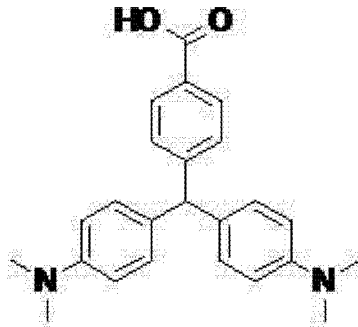
[0011] 孔雀石绿的结构如图 2 所示所示。

从免疫学角度分析,电子云密度较高的二甲氨基取代的两个苯环系统可能是产生特异性抗体的决定性特征结构区。因此,半抗原设计中必须要保留这部分特征结构,而在远离该药物特征结构区的非取代苯环的对位上衍生化与载体蛋白偶联的间隔臂。本发明申请在设计合成孔雀石绿半抗原时,在非取代苯环的对位引入吸电子性质的羧基,同时分别设计了长短不一的间隔臂。

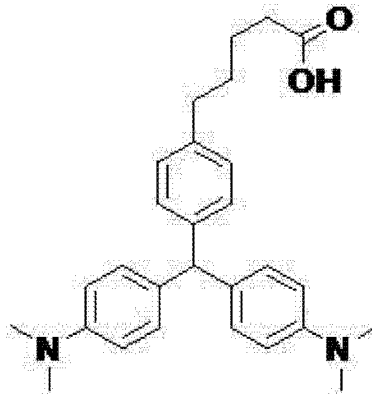
[0012] 本发明申请的的目的之一是提供孔雀石绿半抗原。

[0013] 本发明的半抗原包括:(a)4-[双(4-二甲胺基)苯基]甲基苯甲酸,和(b)5-{4-[双(4-二甲胺基)苯基]甲基}苯基戊酸,其中,

(a)4-[双(4-二甲胺基)苯基]甲基苯甲酸的结构如下:

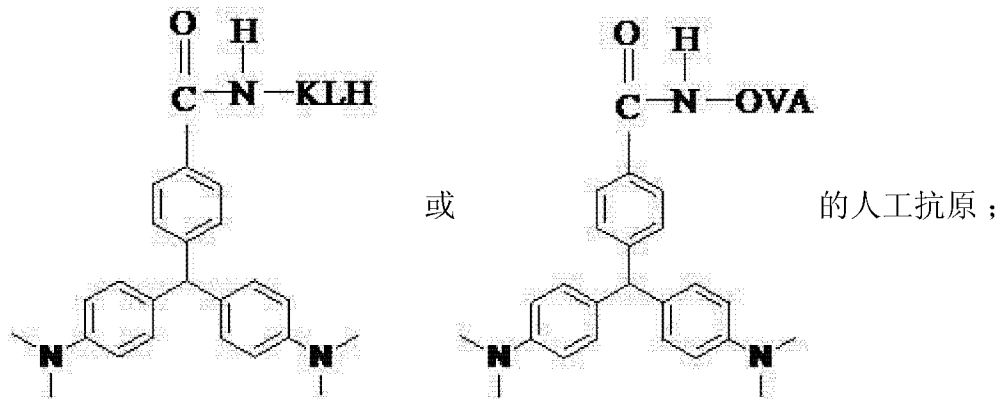


(b) 5-{4-[双(4-二甲胺基)苯基]甲基}苯基戊酸的结构如下:

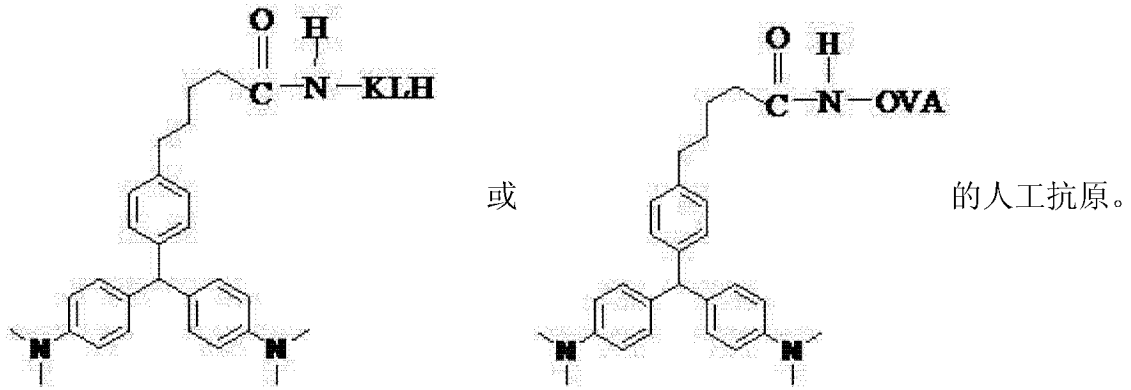


本发明申请的另一个目的是提供由上述半抗原与载体蛋白连接形成的完全抗原。

[0014] 1、以4-[双(4-二甲胺基)苯基]甲基苯甲酸为半抗原,与载体蛋白偶联合成分子式为:

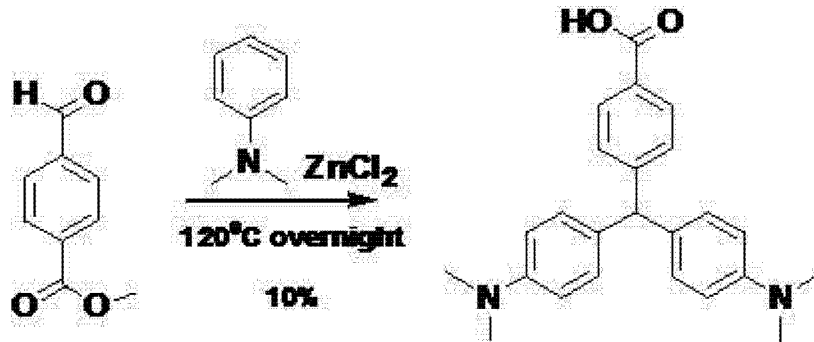


2、以5-{4-[双(4-二甲胺基)苯基]甲基}苯基戊酸为半抗原,与载体蛋白偶联合成分子式为:



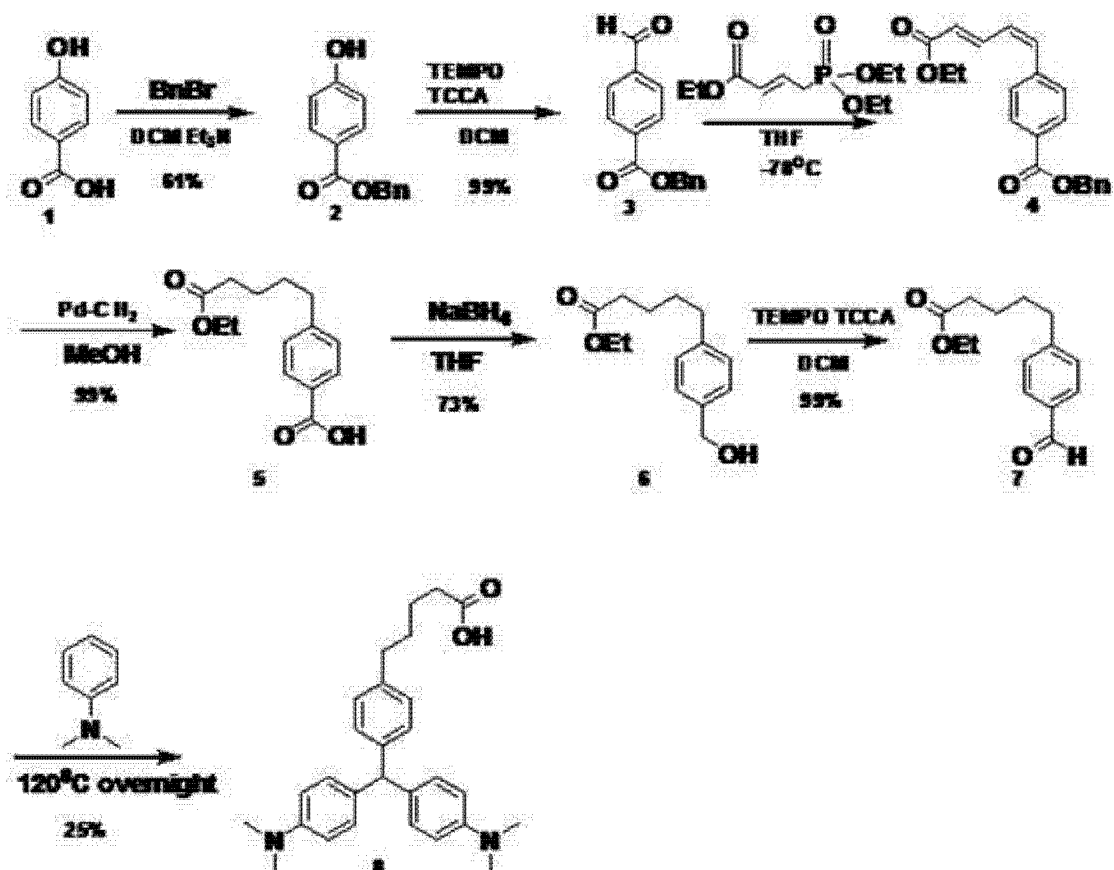
[0015] 本发明申请提供上述孔雀石绿半抗原的合成方法,包括如下的步骤:

(a) 4-[双(4-二甲氨基)苯基]甲基苯甲酸的合成方法如下所述:



准确称取对-甲酰基苯甲酸甲酯和氯化锌于烧瓶中,然后加入N,N-二甲基苯胺,加热到120-140°C,搅拌反应4-6小时,乙酸乙酯萃取,硅胶柱层析纯化(乙酸乙酯/正己烷=1:2)过夜(18-24h)后,得到目标化合物4-[双(4-二甲氨基)苯基]甲基苯甲酸,产率10%。

[0016] (b) 5-[4-[双(4-二甲氨基)苯基]甲基]苯基戊酸的合成方法如下所述:



1、称取对-羟基苯甲酸溶于二氯甲烷中，0℃加入溴化苄及三乙胺，室温搅拌反应1-2天，0℃加入饱和氯化铵淬灭反应，二氯甲烷萃取，浓缩，硅胶柱纯化(乙酸乙酯/正己烷=1:3)得到化合物4-羟甲基苯甲酸苯甲酯；

2、将该产物溶于二氯甲烷中，0℃加入三氯异氰尿酸、NaHCO<sub>3</sub>及2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物，反应5-8分钟，硅胶柱纯化(乙酸乙酯/正己烷=1:2)，洗脱液浓缩得到化合物4-甲酰基苯甲酸苯甲酯；

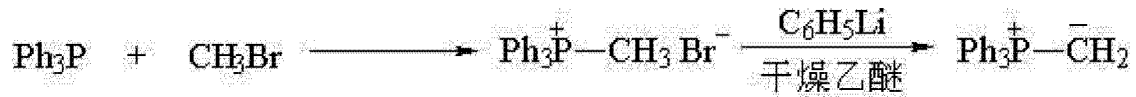
3、称取 Wittig 试剂溶于四氢呋喃中，慢慢加入六甲基二硅基胺基锂，在-80--75℃搅拌0.5-2.0小时，加入4-甲酰基苯甲酸苯甲酯，两小时内温度由-80--75℃升到-25℃，TLC监测，浓缩，硅胶柱纯化(乙酸乙酯/正己烷=1:4)得到中间产物；将中间产物溶于无水甲醇，加入钯碳，氢气保护，常温搅拌反应4-6小时，TLC监测，加入少量乙酸乙酯，硅胶柱纯化(甲醇)，浓缩得化合物4-丁酸乙酯基苯甲酸；

4、将上述产物溶于无水四氢呋喃，0-4℃加入氯甲酸异丁酯及三乙胺，搅拌反应1-2小时，加入硼氢化钠，继续搅拌反应3-5小时，0-4℃加入HCl淬灭反应，浓缩，乙酸乙酯萃取，浓缩，硅胶柱纯化(乙酸乙酯/正己烷=1:5)得到化合物5-(4-羟甲基-苯基)-戊酸乙酯；

5、将该化合物溶于二氯甲烷中，0-4℃加入三氯异氰尿酸、NaHCO<sub>3</sub>及2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物，反应5-8分钟后迅速过硅胶短柱(乙酸乙酯/正己烷=1:4)，得到化合物5-(4-羟基-苯基)-戊酸乙酯；

6、称取氯化锌和化合物5-(4-羟基-苯基)-戊酸乙酯于烧杯中，加入N,N-二甲基苯胺，加热到110-130℃，搅拌反应1-2天，TLC监测，乙酸乙酯萃取，硅胶柱纯化(甲醇/二氯甲烷=1:10)，得目标化合物5-{4-[双(4-二甲胺基)苯基]甲基}苯基戊酸，产率25%。

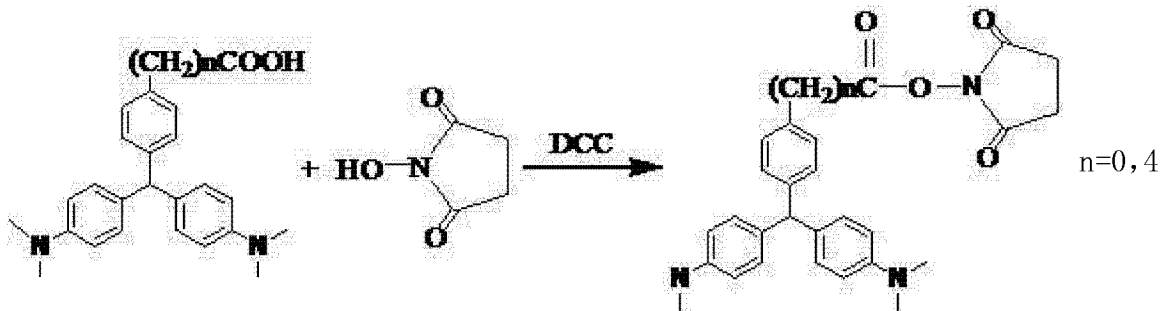
[0017] 周期表的第三周期元素，特别是硫和磷，当它们与碳结合时，碳带负电荷，硫或磷带正电荷彼此相邻，并同时保持着完整的电子隅（碳是8隅，硫、磷可超过8），这种结构的化合物称为 Ylide（叶立德），由磷形成的 Ylide 称为磷 Ylide，又称为 Wittig 试剂。Wittig 试剂的制备一般是用卤代烃与三苯基磷反应生成季磷盐，然后在强碱作用下失去一分子卤化氢形成稳定的磷 Ylide：



薄层色谱 (Thin Layer Chromatography) 常用 TLC 表示，又称薄层层析，属于固-液吸附色谱。是近年来发展起来的一种微量、快速而简单的色谱法，它兼备了柱色谱和纸色谱的优点。一方面适用于小量样品（几到几十微克，甚至  $0.01 \mu\text{g}$ ）的分离；另一方面若在制作薄层板时，把吸附层加厚，将样品点成一条线，则可分离多达 500mg 的样品，因此又可用于精制样品。故此法特别适用于挥发性较小或在较高温度易发生变化而不能用气相色谱分析的物质。此外，在进行化学反应时，常利用薄层色谱观察原料斑点的逐步消失来判断反应是否完成。

[0018] 本发明申请还提供上述半抗原制备抗原的方法，包括如下步骤：

上述的半抗原通过活化酯法分别与卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 或血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 偶联，具体做法是：



1、取上述半抗原以及 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 于烧瓶内加入无水四氢呋喃，在  $\text{N}_2$  保护下，逐滴加入溶有 N,N'-二环己基碳二亚胺 DCC 的无水四氢呋喃溶液，边滴边搅拌，室温 ( $18-25^\circ\text{C}$ ) 下搅拌反应 4 h，硅胶柱纯化得到半抗原活化酯；

2、取上述半抗原的活化酯溶于 DMF 配成溶液 A，载体蛋白溶于磷酸缓冲溶液中配成溶液 B，然后在冰浴下将溶液 A 缓慢加入溶液 B 中，经搅拌后在  $4^\circ\text{C}$  下反应过夜，最后将反应液置入透析袋中，在  $4^\circ\text{C}$ ， $\text{pH}=7.4$  的 PBS 溶液中透析三天，精确量取蛋白质偶联物溶液的体积，测定浓度和结合比，分装， $-20^\circ\text{C}$  下贮藏。

[0019] 本发明申请的再一个目的是提供利用上述抗原制备抗体的方法，上述人工抗原再经动物免疫，取血，分出抗全血清，纯化制得特异性抗体，包括如下步骤：

免疫和特异性抗体的制备：

(1) 免疫：免疫动物采用雄性新西兰大耳白兔，免疫方法采用皮下和肌肉注射法，共进行 6 次免疫，加强免疫分别在初次免疫后第 2 周，第 4 周和第 6 周进行三次，以后两次为一个月进行一次，从第 3 次免疫后开始采血测效价，采血时间为免疫后第 10 天；

初次免疫：取 1mg 上述人工抗原溶于 0.9% 的 NaCl 和弗式完全佐剂等体积配制的溶液

中,进行动物免疫;

加强免疫:取 0.5mg 上述人工抗原溶于 0.9% 的 NaCl 和弗式不完全佐剂等体积配制的溶液中,进行动物免疫;

(2) 抗体纯化:定时检测动物抗体效价,当抗体对一定的包被抗原达到适宜效价时,采集血液,并离心获得抗血清,使用 Protein A-Sepharose 4B 蛋白亲和层析柱对抗血清进行纯化,制备 IgG 抗体。

[0020] 本发明申请还提供上述方法得到的特异性抗体用于间接竞争 ELISA 方法的建立,为在食品中检测微量孔雀石绿残留中的应用奠定基础。

#### 附图说明

[0021] 图 1 为实施例 6 中,间接竞争 ELISA 法的标准曲线;

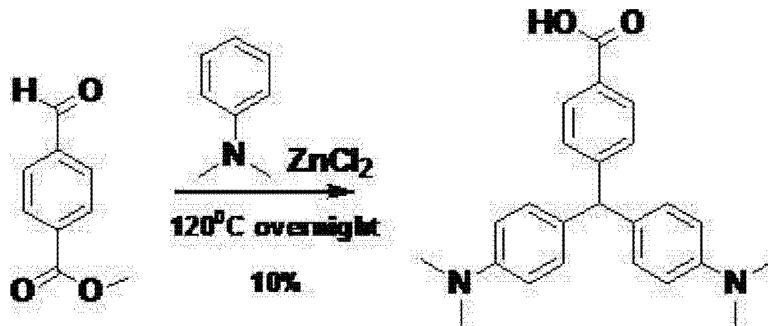
图 2 为孔雀石绿的化学结构式。

具体实施方式

[0022] 以下结合具体的结构和方法,对本发明所述的技术方案进行非限制性的描述,以便公众理解。

[0023] 实施例 1 孔雀石绿半抗原 4-[双(4-二甲氨基)苯基]甲基苯甲酸的合成

(a) 4-[双(4-二甲氨基)苯基]甲基苯甲酸

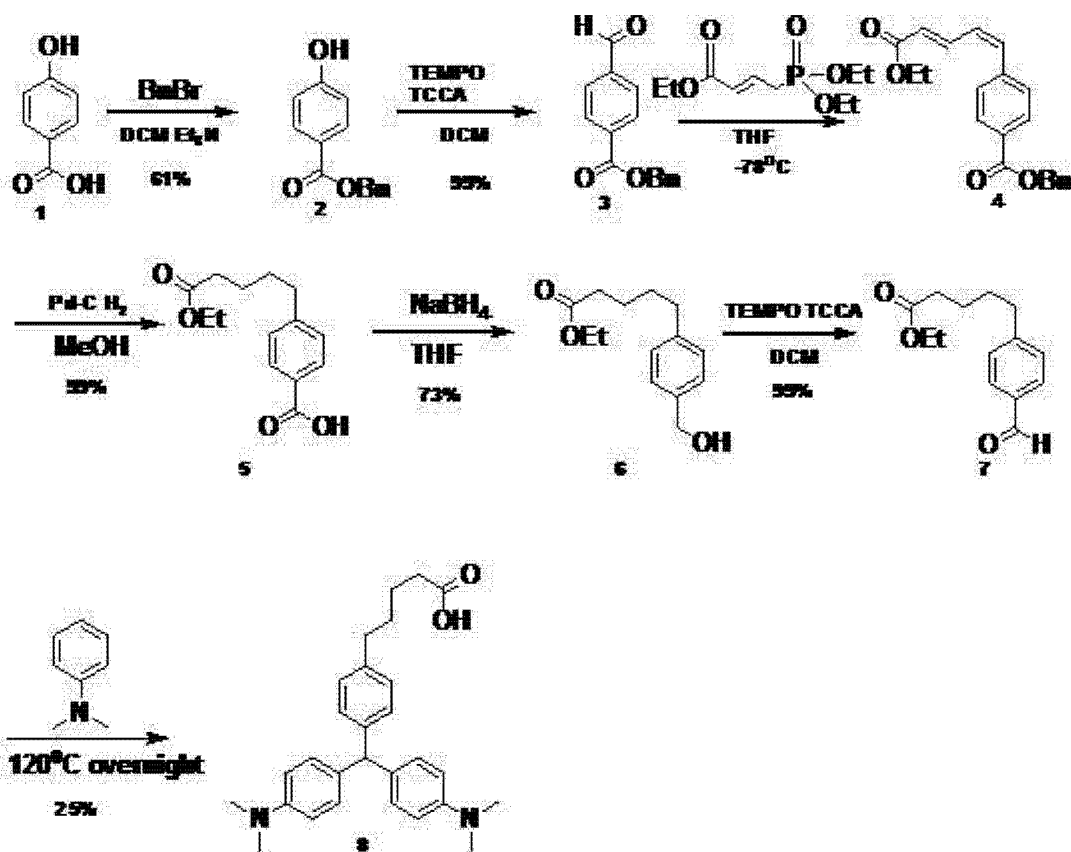


半抗原(a)的合成路线:

准确称取 1.8 g 对-甲酰基苯甲酸甲酯和 3.7 g 氯化锌于 50 mL 烧瓶中,然后加入 5.3 g N,N-二甲基苯胺,加热到 120°C,搅拌反应 4 小时,乙酸乙酯萃取,硅胶柱层析纯化(乙酸乙酯/正己烷 = 1:2)得到目标化合物 4-[双(4-二甲氨基)苯基]甲基苯甲酸,产率 10%。

[0024] 实施例 2 孔雀石绿半抗原 5-{4-[双(4-二甲氨基)苯基]甲基}苯基戊酸的合成

(b) 5-{4-[双(4-二甲氨基)苯基]甲基}苯基戊酸



1、准确称取 10 g 对-羟基苯甲酸溶于二氯甲烷中,0℃加入 7.8 ml 溴化苄及 9.3 ml 三乙胺,室温搅拌反应 1-2 天,0℃加入饱和氯化铵淬灭反应,二氯甲烷萃取,浓缩,硅胶柱纯化(乙酸乙酯 / 正己烷 = 1:3)得到化合物 4-羟甲基苯甲酸苯甲酯;

2、将 4.1g 该产物溶于二氯甲烷中,0℃加入 7.9g 三氯异氰尿酸、2.86 g  $NaHCO_3$  及 2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物,反应 5 分钟,硅胶短柱纯化(乙酸乙酯 / 正己烷 = 1:2),洗脱液浓缩得到化合物 4-甲酰基苯甲酸苯甲酯;

3、称取 2.87g wittig 试剂溶于四氢呋喃中,慢慢加入 23.25ml 六甲基二硅基胺基锂,在  $-78^\circ C$  搅拌 0.5 小时,加入 3.57g 4-甲酰基苯甲酸苯甲酯,两小时内温度由  $-78^\circ C$  升到  $-25^\circ C$ ,TLC 监测,浓缩,硅胶柱纯化(乙酸乙酯 / 正己烷 = 1:4)得到中间产物;将中间产物 5.27g 溶于无水甲醇,加入钯碳,氢气保护,常温搅拌反应 4 小时,TLC 监测,加入少量乙酸乙酯,硅胶柱纯化,浓缩得化合物 4-丁酸乙酯基苯甲酸;

4、将 3.8g 上述产物溶于无水四氢呋喃,0℃加入 3.37ml 氯甲酸异丁酯及 4.8ml 三乙胺,搅拌反应 1 小时,加入 3.25g 硼氢化钠,继续搅拌反应 3 小时,0℃加入 0.1M HCl 淬灭反应,浓缩,乙酸乙酯萃取,浓缩,硅胶柱纯化(乙酸乙酯 / 正己烷 = 1:5)得到化合物 5-(4-羟甲基-苯基)-戊酸乙酯;

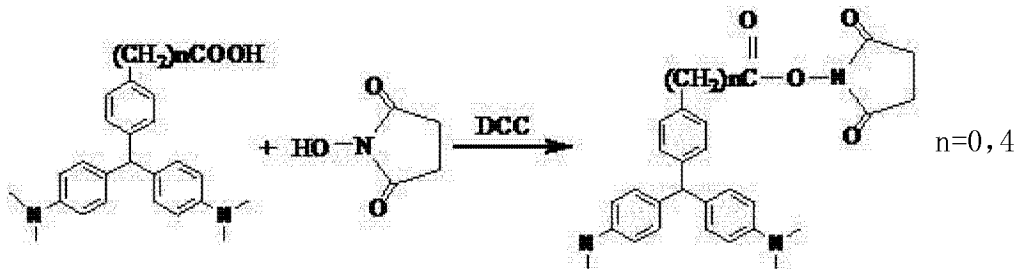
5、将 1.4g 该化合物溶于二氯甲烷中,0℃加入 3.1g 三氯异氰尿酸、1.1 g  $NaHCO_3$  及 2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物,反应 5 分钟后迅速过硅胶短柱(乙酸乙酯 / 正己烷 = 1:4),得到化合物 5-(4-羟基-苯基)-戊酸乙酯;

6、称取 1.22 g 氯化锌和 0.6g 化合物 5-(4-羟基-苯基)-戊酸乙酯于 50 ml 烧杯中,加入 3 ml  $N,N$ -二甲基苯胺,加热到  $120^\circ C$ ,搅拌反应 1 天,TLC 监测,乙酸乙酯萃取,硅胶柱纯化(甲醇 / 二氯甲烷 = 1:10)得目标化合物 5-{4-[双(4-二甲胺基)苯基]甲基}苯基

戊酸,产率 25%。

#### [0025] 实施例 3 孔雀石绿完全抗原的合成

半抗原通过活化酯法分别与卵清蛋白(ovalbumin, OVA)或血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH) 偶联,具体做法是:



取上述半抗原 0.5 mmol, 0.625 mmol N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)于 25 ml 圆底烧瓶并加入 3 ml 无水四氢呋喃,在  $N_2$  保护下,逐滴加入溶有 0.625 mmol N,N-二环己基碳二亚胺 DCC 的 4 ml 无水四氢呋喃溶液,边滴边搅拌,室温下搅拌反应 4 h,硅胶柱纯化得到半抗原活化酯。

[0026] 取上述半抗原的活化酯溶于 DMF 配成溶液 A,载体蛋白溶于磷酸缓冲溶液中配成溶液 B。然后在冰浴下将溶液 A 缓慢的加入溶液 B 中。经搅拌后在  $4^\circ C$  下反应过夜,最后将反应液置入透析袋中,在  $4^\circ C$ , pH=7.4 的 PBS 溶液中透析三天。精确量取蛋白质偶联物溶液的体积,测定浓度和结合比,分装,  $-20^\circ C$  下贮藏。

#### [0027] 实施例 4 抗体的制备

将制备好的偶联 KLH 的抗原用来免疫 2kg 以上的新西兰大耳白兔。首次免疫采用由等体积的弗氏完全佐剂乳化的免疫原,于腋下多点注射;前三次免疫间隔 2 周、以后每隔 4 周用由等体积的弗氏不完全佐剂乳化的免疫原,于腋下注射。从第三次开始,每次免疫后一周,兔耳缘静脉采血测效价(间接 ELISA 法)。待效价达到一定程度后,兔心脏采血至其死亡。以此方法制备得高效价的孔雀石绿抗体。

#### [0028] 实施例 5 抗体效价的纯化

以 Protein A-Sepharose 4B 作为亲和层析介质,采用免疫亲和层析法对抗血清进行纯化:用磷酸缓冲液平衡柱子,流速为 1 mL/min;用磷酸缓冲液稀释抗血清后上柱,流速为 0.5 mL/min。280 nm 条件下,用磷酸缓冲液冲洗柱子,IgG 被 Protein A-Sepharose 4B 吸附,其他杂蛋白随缓冲液流出,当基线再次平衡后用 pH 2.7 的 glycine-HCl 缓冲液洗脱 IgG,流速 0.5 mL/min。收集洗脱液,迅速用 1 mol/L Tris (pH 9.1)中和抗体,将抗体装入透析袋,  $4^\circ C$  条件下 PBS 溶液透析三天,测定其浓度,加入 0.1% 叠氮钠,  $4^\circ C$  保存。

#### [0029] 实施例 6 孔雀石绿兽药竞争性与孔雀石绿抗体结合

采用间接竞争 ELISA 方法,对检测曲线进行初步探索。方法如下:

1、包被:将制备好的偶联 OVA 的抗原溶于 50 mmol, PH 9 的碳酸缓冲液中,配制成  $10 \mu g/ml$  的包被液,每孔加  $100 \mu L$  包被液  $4^\circ C$  静置 12-16 小时,再将包被好的每孔用 PBST 即磷酸盐缓冲溶液 0.05% (v/v),吐温 20 洗液洗涤 3 次;

2、封闭:每孔加入  $200 \mu L$ , 1% 的牛血清蛋白(BSA)-PBS 封闭液,封闭 1 小时,再将封闭好的每孔用 PBST 即磷酸盐缓冲溶液 0.05% (v/v),吐温 20 洗液洗涤 3 次;

3、竞争反应:每孔加入  $100 \mu L$  孔雀石绿标准品和孔雀石绿纯化抗体,竞争反应 1 小时,

再将竞争结束的每孔用 PBST 即磷酸盐缓冲溶液 0.05% (v/v), 吐温 20 洗液洗涤 4 次;

4、加入酶标物: 加入用 PBS 稀释的酶标二抗 (100  $\mu$  L/well), 室温下反应 30 min, 然后用 PBST 洗液洗板 5 次;

5、显色: 显色底物使用四甲基联苯胺 (TMB), 每孔加 150  $\mu$  L 四甲基联苯胺 (TMB) - 双氧水溶液 (5mg 四甲基联苯胺 (TMB) 溶于 1mL 底物缓冲液), 显色 20 分钟后每孔加 50  $\mu$  L 的 15mol/L 的硫酸中止, 反应液在自动酶标仪上读数, 计算抑制率。

$$[0030] \quad \text{抑制率} = \left[ 1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \right] \times 100$$

式中 A 是吸光值。

[0031] 如图 1 所示, X 轴为待测物浓度, y 轴为抑制率, 以待测物浓度对数值及相应抑制率绘制标准曲线。IC<sub>50</sub> = 0.5 ng/mL, IC<sub>15</sub> = 0.03 ng/mL。

[0032] 应该理解的是, 上述内容不应理解为对所述技术方案的任何限制, 事实上, 凡以相同或近似的原理对所述技术方案进行的改进, 包括反应条件的改变, 以及相应试剂的等同替换, 以实现基本相同功能和效果为目的, 则都在本发明申请所要求保护的技术方案。

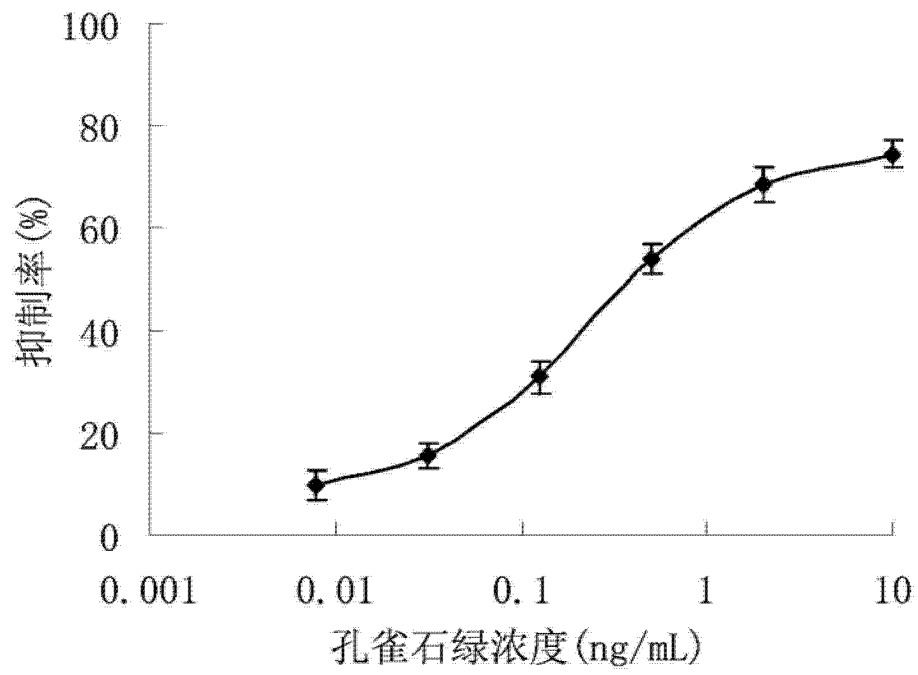


图 1

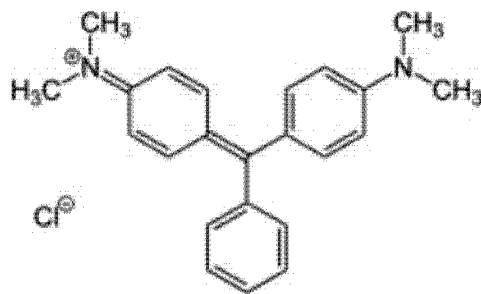


图 2

专利名称(译)	孔雀石绿人工抗原和抗体及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN103524362A</a>	公开(公告)日	2014-01-22
申请号	CN201310352708.9	申请日	2013-08-14
[标]申请(专利权)人(译)	深圳大学		
申请(专利权)人(译)	深圳大学		
当前申请(专利权)人(译)	深圳大学		
[标]发明人	胡章立		
发明人	胡章立		
IPC分类号	C07C227/10 C07C229/52 C07C229/42 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/06 G01N33/53		
其他公开文献	CN103524362B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明申请提供孔雀石绿人工抗原和抗体的制备，涉及三苯甲烷类化学物质孔雀石绿人工半抗原、人工抗原及抗体的制备。本发明克服了传统的理化分析方法繁琐复杂、成本较高、分析速度慢的问题，提供了简便、快速、灵敏、准确的免疫分析技术。以4-[双(4-二甲氨基)苯基]甲基苯甲酸和5-[4-[双(4-二甲氨基)苯基]甲基]苯基戊酸为半抗原，分别与血蓝蛋白、卵清蛋白等载体蛋白连接合成人工抗原，再经动物免疫、取血、分出抗血清、纯化制得抗体。该抗体稳定、具有良好的特异性和灵敏度，可用于孔雀石绿的快速免疫检测，具有良好的应用前景。

