



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102120767 B

(45) 授权公告日 2013.05.15

(21) 申请号 201010604420.2

(22) 申请日 2010.12.24

(73) 专利权人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800 号江南大学食品学院

专利权人 湖南出入境检验检疫局检验检疫
技术中心

(72) 发明人 王利兵 胥传来 李灼坤 邢常瑞
宋珊珊 刘丽强

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

C07K 14/765 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2005116080 A1, 2005.12.08,

Goda Y, Kobayashi A, Fujimoto S,
et.al., .Development of enzyme-linked
immunosorbent assay for detection of
alkylphenol polyethoxylates and their

biodegradation products. 《Water Res》. 2004,
第 38 卷 (第 20 期),

杜志辉等. 壬基酚人工抗原及多克隆抗体的
制备. 《解放军预防医学杂志》. 2006, 第 24 卷 (第
06 期),

Mart'ianov AA, Dzantiev BB, Zherdev AV,
et.al., .Immunoenzyme assay of nonylphenol:
study of selectivity and detection of
alkylphenolic non-ionic surfactants in
water samples. 《Talanta》. 2005, 第 65 卷 (第
2 期),

审查员 汪波莉

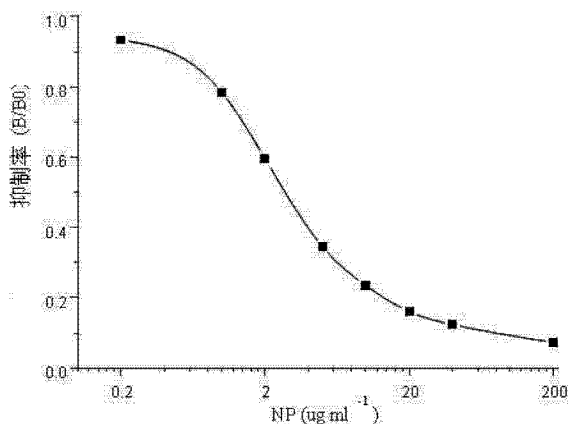
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称

一种烷基酚类药物通用人工抗原的合成方法

(57) 摘要

一种烷基酚类药物的通用人工抗原的合成方法,属于生物化工技术领域。本发明以壬基酚 NP 为半抗原,用活性酯法将其与载体蛋白牛血清白蛋白 BSA 偶联,制得壬基酚-牛血清白蛋白偶联物,即为烷基酚类药物通用人工抗原;用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定偶联物的偶联比。本发明成功合成了烷基酚类药物的通用人工抗原,合成步骤简洁,有效,完全可用于免疫分析当中,为以后人们的研究提供了必需的人工抗原,可以满足国内对其研究的需要。



1. 一种烷基酚类药物通用人工抗原的合成方法,其特征在于以壬基酚为半抗原,用活性酯法将其与载体蛋白牛血清白蛋白偶联,用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定偶联物的偶联比;步骤为:

(1)人工抗原的合成:壬基酚、N-羟基琥珀酰亚胺、碳二亚胺、牛血清白蛋白以摩尔比为 80 : 120 : 136 : 1 的比例反应,壬基酚溶液溶于含二甲基吡啶的戊二酸酐的无水乙醇和吡啶混合溶液中,65℃搅拌反应 24h 后用真空旋转蒸发提纯,再加 N,N-二甲基甲酰胺溶剂溶解后,加入 N-羟基琥珀酰亚胺和碳二亚胺搅拌反应 6h,为 A 液;牛血清白蛋白溶于磷酸盐缓冲液中,为 B 液;将 A 液逐滴加入 B 液中,室温下搅拌反应 3h,离心取上清液得壬基酚-牛血清白蛋白混合液,即为烷基酚类药物通用人工抗原混合液;

透析袋前处理:取 10cm 的透析袋,于沸水中煮沸 5min,再用 60℃的去离子水冲洗 3min,保存在 4℃去离子水中备用;

将人工抗原混合液移入透析袋中,用每次 2L 的 0.01M 的磷酸盐缓冲液透析 2 次,再用每次 2L 的去离子水透析 2 次,共透析 3 天;最后使用冻干法将透析袋中的液体制成粉末,得壬基酚-牛血清白蛋白偶联物,即是烷基酚类药物通用人工抗原;

(2)人工抗原的鉴定:壬基酚-牛血清白蛋白偶联物采用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定其偶联比。

一种烷基酚类药物通用人工抗原的合成方法

技术领域

[0001] 一种烷基酚类药物通用人工抗原的合成方法,属于生物化工技术领域。

背景技术

[0002] 烷基酚类化合物(Alkyl Phenol, APs),属于内分泌干扰物质中重要的一种,具有明显的环境雌激素效应。该类化合物多为脂溶性有机化合物,化学稳定性较强,一旦摄入就不易降解排出,有生物累积性,危害性较大,即使微量也可对生物产生影响。同时其在环境中分布也十分广泛,并且含量较低。烷基酚类化合物 APs 是重要的精细化工原料,在表面活性剂、润滑油添加剂、油溶性酚醛树脂及绝缘材料、纺织印染、造纸助剂、农药乳化剂、工业用洗涤剂、橡胶塑料的防老抗氧剂、油田及炼油厂化学品等领域具有广泛用途。APs 中最重要的是壬基酚(Nonyl Phenol, NP)和辛基酚(Octylphenol, OP),二者只在长碳链相差一个甲基,它们同属于联合国 UNEP 制订的持久性有毒化学污染物。NP 和 OP 等 APs 内分泌干扰物主要为烷基酚聚环氧乙烷醚(Alkylphenolethoxylater, APEO)在环境降解过程中的中间产物。一般随着 APEO 的排放进入环境,并且在环境中分布比较广泛。APs 类化合物可以对生物体形成外因性雌性激素作用,其中又以 OP 为最强, NP 次之,而其它 APs 类化合物则依照亲水端链从短到长,作用程度依次削减。APs 类化合物是促乳房癌细胞活性化与增殖现象的环境内分泌干扰物。同时烷基酚类化合物对细胞的 DNA 有明显的损伤作用,并且 DNA 的损伤程度与化学结构有一定的关系,苯酚环中增加其他基团,可使致突变活性增强,并且随着苯酚环中氯原子数的增加,致突变活性也增强;随着苯酚对位碳原子数增多,其致突变活性也增高等。因此,APs 类物质也逐步被列入强制性禁用范围,一些国家纷纷制定法规限制 APs 的生产和使用。欧盟第 2003 / 53 / EC 号指令规定纺织品中 NP 和 NPEO 含量均不能高于 0.1%。这些措施成为我国纺织品出口欧盟面临的又一大技术贸易壁垒,因此对 APs 检测方法的研究提上日程。现今烷基酚主要的分析方法有:高效液相色谱法、气相色谱法、LC-MS、LC-MS/MS、GC/MS 等。现有的仪器检测法虽然有灵敏度高、适用范围广等优点,但是样品前处理复杂,所需的仪器昂贵,成本高,检测时间长,因此有必要研究特异性强,灵敏度高同时价格低廉,能快速简便的免疫检测技术。这就需要合成能产生簇特异性抗体的免疫原。目前为止,国内外尚没有针对烷基酚结构多残留的免疫检测方法的报道,为此设计合成了以烷基酚的降解产物壬基酚 NP 为半抗原的用于烷基酚类结构检测的完全抗原。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种烷基酚类药物通用人工抗原的合成方法。所制备的产品用于烷基酚类结构的免疫分析方法研究。为今后人们的研究提供了更好的必需的人工抗原。

[0004] 本发明的技术方案:一种烷基酚类药物通用人工抗原的合成方法,以壬基酚为半抗原,用活性酯法将其与载体蛋白 BSA 偶联,用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定偶联物的偶联比。步骤为:

[0005] (1) 人工抗原的合成：壬基酚、N-羟基琥珀酰亚胺、碳二亚胺、牛血清白蛋白控制摩尔比为 80 : 120 : 136 : 1 的比例反应，壬基酚溶液溶于含二甲基吡啶的戊二酸酐的无水乙醇和吡啶混合溶液中，65℃ 搅拌反应 24h 后用真空旋转蒸发提纯，再加 N,N-二甲基甲酰胺 DMF 溶剂溶解后，加入 N-羟基琥珀酰亚胺和碳二亚胺搅拌反应 6h，为 A 液；牛血清白蛋白溶于磷酸盐缓冲液中，为 B 液；将 A 液逐滴加入 B 液中，室温下搅拌反应 3h，离心取上清液得壬基酚-BSA 混合液，即为烷基酚类药物通用人工抗原混合液；

[0006] 透析袋前处理：取 10cm 的透析袋，于沸水中煮沸 5min，再用 60℃ 的去离子水冲洗 3min，保存在 4℃ 去离子水中备用；

[0007] 将人工抗原混合液移入透析袋中，用每次 2L 的 0.01M 的 PBS 溶液透析 2 次，再用每次 2L 的去离子水透析 2 次，共透析 3 天；最后使用冻干法将透析袋中的液体制成粉末，得壬基酚-BSA 偶联物，即是烷基酚类药物通用人工抗原；

[0008] (2) 人工抗原的鉴定：壬基酚-BSA 偶联物采用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定其偶联比。

[0009] 偶联比测定：是估算偶联物中被偶联的两种分子的比率(偶联比率)的方法，虽然测定方法种类很多，但都是依据检测偶联物中被偶联的两种分子含量(或相对含量)的原理建立起来的。凝胶电泳法是依据合成的人工抗原的分子量来鉴定合成的人工抗原。SDS-聚丙烯酰胺电泳利用迁移率只与分子量有关，而与所带电荷、分子形状无关，可以利用 SDS-聚丙烯酰胺电泳来确定人工抗原的分子量从而确定偶联比。本发明采用 10% 的分离胶，5% 的压缩胶，对牛血清白蛋白 BSA、偶联物 NP-BSA 进行电泳鉴定。利用 FR980 生物电泳凝胶成像系统软件得出偶联比 $r \approx 23$ 。即人工抗原的形式完全符合免疫要求。

[0010] 偶联物蛋白浓度测定：配制浓度为 0, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的牛血清白蛋白溶液 1.5mL，加入 5mL 考马斯亮蓝染色液，立即混匀，30℃ 水浴温热 5min，每个浓度做平行样。在 595nm 处测吸光值，绘制牛血清白蛋白浓度与吸光值的关系曲线。将抗原溶液按一定比例稀释，在 595nm 处测定壬基酚-牛血清白蛋白抗原溶液的吸光值，从曲线上得到抗原溶液的相应的蛋白浓度。本发明计算得抗原溶液的蛋白浓度为 10.96mg $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0011] 本发明的有益效果：本发明成功合成了烷基酚类药物通用人工抗原壬基酚-BSA 偶联物，合成步骤简洁，有效，完全可用于免疫分析当中，为以后人们的研究提供了方便的途径，可以满足国内对其研究的需要。

附图说明

[0012] 图 1 壬基酚 NP-BSA 等的电泳图。

[0013] 图 2 利用间接 ELISA 方法测得的壬基酚-BSA 偶联物的抑制曲线。

具体实施方式

[0014] 实施例 1

[0015] (1) 人工抗原的制备

[0016] 取 220.35mg (1mmol) 壬基酚 NP 和 1.140g (10mmol) 戊二酸酐，以及 22.4mg (0.2mmol) 二甲基吡啶 DMAP 到圆底烧瓶里，然后再加入 9mL 无水乙醇和 1mL 无水吡啶，最后放入 65℃ 水浴反应 24h。产物溶液用真空旋转蒸发提纯，再加入 DMF 溶液溶解以备下一步反

应。取 0.5mL 含有 10mg (0.04538 mmol) 壬基酚 NP 衍生物的 N,N-二甲基甲酰胺 DMF 溶液到棕色小瓶中,再加入 14.77mg (0.06807 mmol) N-羟基琥珀酰亚胺 SulF-NHS 和 14.78mg (0.07715 mmol) 碳化二亚胺 EDC,室温反应 6h,为 A 液。将 37.55mg (0.56725 μ mol) 牛血清白蛋白 BSA 溶解到 0.01M、pH7.4 的磷酸盐 PBS 缓冲液中,为 B 液。然后将 A 液缓慢滴加到 B 液中,室温反应 3h,离心去掉沉淀,取上清液即得人工抗原混合液。

[0017] 透析袋前处理:取 10cm 的透析袋,于沸水中煮沸 5min,再用 60°C 的去离子水冲洗 3min,保存在 4°C 去离子水中备用。

[0018] 将人工抗原混合液移入透析袋中,用 2×2L 的 0.01M 的磷酸盐 PBS 溶液和 2×2L 的去离子水透析 3 天。最后使用冻干法将透析袋中的液体制成粉末,即得到人工抗原:壬基酚 NP-牛血清蛋白。

[0019] (2) 壬基酚人工抗原的鉴定

[0020] 偶联比测定:是估算偶联物中被偶联的两种分子的比率(偶联比率)的方法,虽然测定方法种类很多,但都是依据检测偶联物中被偶联的两种分子含量(或相对含量)的原理建立起来的。凝胶电泳法是依据合成的人工抗原的分子量来鉴定合成的人工抗原。SDS-聚丙烯酰胺电泳利用迁移率只与分子量有关,而与所带电荷、分子形状无关,可以利用 SDS-聚丙烯酰胺电泳来确定人工抗原的分子量从而确定偶联比。本实验采用 10% 的分离胶,5% 的压缩胶,对牛血清白蛋白 BSA、偶联物 NP-BSA 进行电泳鉴定。利用 FR980 生物电泳凝胶成像系统软件得出偶联比 $r \approx 23$ 。即人工抗原的形式完全符合免疫要求。

[0021] 偶联物蛋白浓度测定:配制浓度为 0,40,60,80,100,120,160,200 μ g·mL⁻¹ 的牛血清白蛋白溶液 1.5mL,加入 5mL 考马斯亮蓝染色液,立即混匀,30°C 水浴温热 5min,每个浓度做平行样。在 595nm 处测吸光值,绘制牛血清蛋白浓度与吸光值的关系曲线。将抗原溶液按一定比例稀释,在 595nm 处测定壬基酚-牛血清蛋白抗原溶液的吸光值,从曲线上得到抗原溶液的相应的蛋白浓度。本实验计算得抗原溶液的蛋白浓度为 10.96mg·mL⁻¹。

[0022] 试验结果表明我们制得的壬基酚-牛血清白蛋白偶联物产生了针对烷基酚类药物是非常好的抗体,相关实验结果数据见表 1 和图 2。

[0023] 表 1 不同兔子血清的抗体效价

[0024]

免疫原	血清编码	效价	工作浓度	
			包被原浓度	抗血清稀释浓度
1 号	1 号兔子抗血清	18000	1:3000	1:8000
1 号	2 号兔子抗血清	22000	1:4000	1:8000

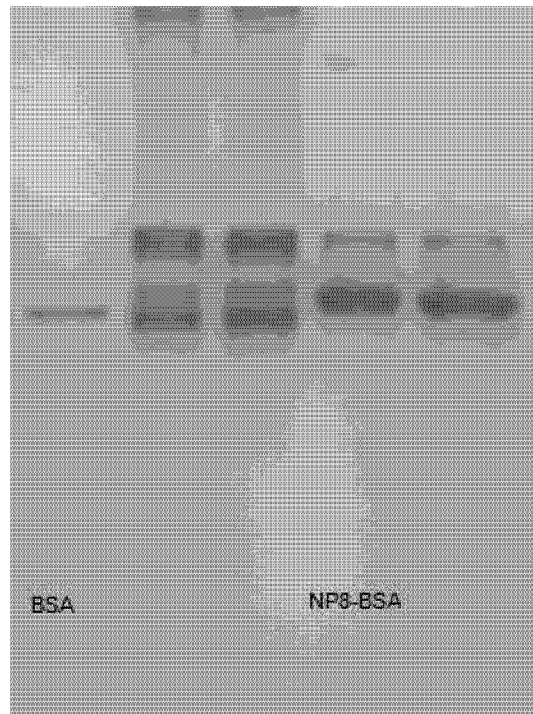


图 1

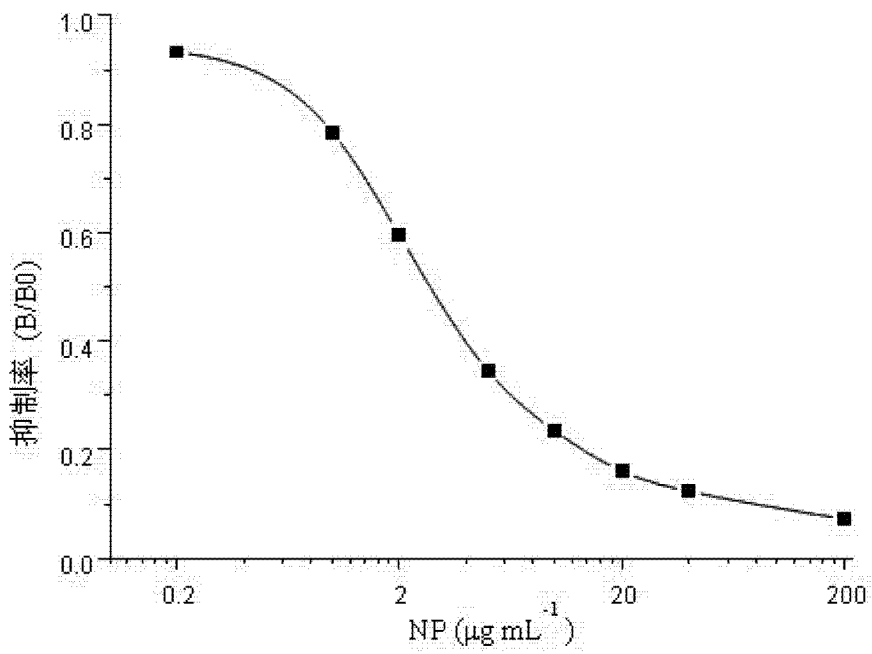


图 2

专利名称(译)	一种烷基酚类药物通用人工抗原的合成方法		
公开(公告)号	CN102120767B	公开(公告)日	2013-05-15
申请号	CN201010604420.2	申请日	2010-12-24
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学 湖南出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
[标]发明人	王利兵 胥传来 李灼坤 邢常瑞 宋珊珊 刘丽强		
发明人	王利兵 胥传来 李灼坤 邢常瑞 宋珊珊 刘丽强		
IPC分类号	C07K14/765 G01N33/53		
其他公开文献	CN102120767A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种烷基酚类药物的通用人工抗原的合成方法，属于生物化工技术领域。本发明以壬基酚NP为半抗原，用活性酯法将其与载体蛋白牛血清白蛋白BSA偶联，制得壬基酚-牛血清白蛋白偶联物，即为烷基酚类药物通用人工抗原；用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定偶联物的偶联比。本发明成功合成了烷基酚类药物的通用人工抗原，合成步骤简洁，有效，完全可用于免疫分析当中，为以后人们的研究提供了必需的人工抗原，可以满足国内对其研究的需要。

