



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102120774 B

(45) 授权公告日 2013. 04. 03

(21) 申请号 201010600940. 6

宋娟. 半抗原的设计、修饰及人工抗原的制备. 《分析化学》. 2010,

(22) 申请日 2010. 12. 23

审查员 唐慧

(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

(72) 发明人 匡华 胥传来 李灼坤 邢常瑞
宋珊珊 刘丽强 王利兵

(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 19/00 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

(56) 对比文件

刘程. 食品添加剂食用大全. 《食品添加剂食用大全》. 2004,

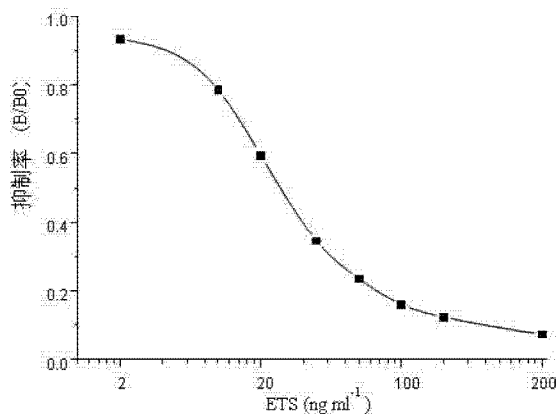
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种适用于赤藓红色素的人工抗原的合成方法

(57) 摘要

一种适用于赤藓红色素的人工抗原的合成方法,属于生物化工技术领域。本发明以荧光素 FLS 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,即得赤藓红的人工抗原荧光素 FLS-牛血清白蛋白偶联物;用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定偶联物的偶联比。本发明成功合成了荧光素 FLS-牛血清白蛋白偶联物,即是适用于赤藓红色素的人工抗原。本发明合成步骤简洁,有效,完全可用于免疫分析中,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. 一种适用于赤藓红色素的人工抗原的合成方法,其特征是以荧光素 FLS 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,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:投料配比为荧光素 FLS : N- 羟基琥珀酰亚胺: 碳二亚胺: 牛血清白蛋白的摩尔比控制为 60 : 68 : 90 : 1 ;荧光素 FLS 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,75℃搅拌 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 8h, 为 A 液 ;牛血清白蛋白溶于 0.01M、pH7.4 的 PBS 缓冲液中,为 B 液 ;将 A 液逐滴加入到 B 液中,室温下搅拌反应 6h,离心取上清液,获得荧光素 FLS-BSA 偶联物混合液,即为适用于赤藓红的人工抗原混合液 ;

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 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液透析,透析 2 次,再用每次 2L 的去离子水透析,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,获得荧光素 FLS-BSA 偶联物,即为适用于赤藓红的人工抗原 ;

(2)人工抗原的鉴定:荧光素 FLS-BSA 偶联物采用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定其偶联比。

一种适用于赤藓红色素的人工抗原的合成方法

技术领域

[0001] 一种适用于赤藓红色素的人工抗原的合成方法,属于生物化工技术领域。

背景技术

[0002] 赤藓红,英文名称为:Erythrosine, ETS,其化学名称为:2-(2,4,5,7-四碘-6-羟基-3-氧咕吨-9-基)苯甲酸二钠盐,也叫四碘荧光素B, CAS号568-63-8,分子式是 $C_{20}H_6I_4Na_2O_5$ 。赤藓红是人工合成色素中的一种,色泽鲜艳,常用于食品加工制品和饮料中,以提高其感官性。食品着色剂可分为天然色素和人工合成色素两大类,因人工合成色素具有成本低廉、色调多样、色泽亮艳和着色力强等特点,故在食品加工业中被广泛采用。由于合成色素以苯、甲苯、萘等化工产品为原料,经过磺化、硝化、卤化、偶氮化等一系列有机反应制成合成色素。因此,食用合成色素多为含有R-N=N-Rc键、苯环或氧杂蒽结构化合物,它们对人体存在一定的不安全性或者产生有害作用,过多食用会危害人体健康。毒理学研究发现,某些合成色素有慢性毒性或致癌性,故近年各国都严格控制其使用范围和使用量。因此食品添加剂已成为食品安全问题的一个关注焦点。2008年4月,英国食品标准局拟议禁止在食品内添加6种人工合成色素:日落黄、柠檬黄、胭脂红、诱惑红、喹啉黄、偶氮玉红,因其能够引起多种儿童多动症的症状,比如过度活跃、注意力不集中等。欧盟食品安全局也对此高度重视,并开展相关物质的风险评估研究。目前赤藓红的毒理学研究表明赤藓红对小鼠的生殖和神经行为有轻微影响,并且赤藓红能对雄甾酮和对硝基苯酚的葡萄糖苷酸化和糖脂化起到抑制作用,此外还会降低肝细胞中的葡萄糖异生作用和尿素生成作用。合成色素有严格的控制使用范围和最大使用量。并鉴于其潜在严重危害性,因此食品中合成色素的准确测定具有重要意义。现今赤藓红主要的分析方法有:高效液相色谱法、毛细管电泳法、LC-MS、LC-MS/MS、GC/MS、阴离子交换色谱法、示波极谱法及薄层色谱法等。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,国内外尚没有针对赤藓红结构残留的免疫检测方法的报道,为此设计合成了以赤藓红的中间体荧光素为半抗原的用于赤藓红人工合成色素检测的完全抗原。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种适用于人工合成食品色素赤藓红的免疫原合成方法。所制备的产品用于赤藓红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:一种赤藓红的中间体荧光素FLS人工抗原的合成方法,以衍生化后的赤藓红中间体荧光素FLS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,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:投料配比为荧光素FLS:N-羟基琥珀酰亚胺:碳二亚

胺：牛血清白蛋白的摩尔比控制为 60 : 68 : 90 : 1 ; 荧光素 FLS 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, 75℃ 搅拌 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 8h, 为 A 液 ; 牛血清白蛋白溶于 0. 01M、pH7. 4 的磷酸盐缓冲溶液中, 为 B 液 ; 将 A 液逐滴加入到 B 液中, 室温下搅拌反应 6h, 离心取上清液, 获得荧光素 FLS-BSA 偶联物混合液, 即为适用于赤藓红的人工抗原混合液 ;

[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 pH 7. 4 的磷酸盐缓冲溶液透析, 透析 2 次, 再用每次 2L 的去离子水透析, 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, 获得荧光素 FLS-BSA 偶联物, 即为适用于赤藓红的人工抗原。

[0008] (2) 人工抗原的鉴定 : 荧光素 FLS-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 FLS-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 $r \approx 19$ 。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 处测定荧光素 - 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。本实验计算得抗原溶液的蛋白浓度为 19. 60mg $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0011] 本发明的有益效果 : 本发明成功合成了荧光素 FLS-BSA 偶联物, 即为适用于赤藓红的人工抗原。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方便的途径, 此方法产生的多克隆抗体可以满足国内对其研究的需要。

附图说明

[0012] 图 1 荧光素 FLS-BSA 的电泳图。

[0013] 图 2 利用间接 ELISA 方法测得的赤藓红 ETS 标准抑制曲线。

具体实施方式

[0014] 实施例 1

[0015] (1) 人工抗原的制备

[0016] 取 200mg (0. 60187mmol) 荧光素 FLS 和 1. 140g (10mmol) 戊二酸酐, 以及 112mg (1 mmol) 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 75℃ 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

来做反应。取 0.5mL 含有 20mg(0.06019 mmol) 荧光素 FLS 衍生物的 N,N-二甲基甲酰胺 DMF 溶液到棕色小瓶中,再加入 15.52mg(0.06807 mmol) N-羟基琥珀酰亚胺 SulF-NHS 和 17.32mg(0.09033 mmol) 碳化二亚胺 EDC,室温反应 8h,为 A 液。将 65mg(0.001mmol) 牛血清白蛋白 BSA 溶解到 0.01M、pH7.4 的磷酸盐缓冲液 PBS 中,为 B 液。然后将 A 液缓慢滴加到 B 液中,室温反应 6h,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℃的去离子水冲洗 3min,保存在 4℃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 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,获得荧光素 FLS-BSA 偶联物,即为适用于赤鲟红的人工抗原。

[0019] (2) 荧光素人工抗原的鉴定

[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,对牛血清蛋白 BSA、FLS-BSA 偶联物进行电泳鉴定。利用 FR980 生物电泳凝胶成像系统软件得出偶联比 $r \approx 19$ 。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 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 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 处测定荧光素-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。本实验计算得抗原溶液的蛋白浓度为 $19.60\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0022] 试验结果表明我们制得的荧光素 FLS-BSA 偶联物产生了针对赤鲟红是非常好的抗体,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	200000	1:6000	1:16000
1 号	2 号兔子抗血清	250000	1:8000	1:18000

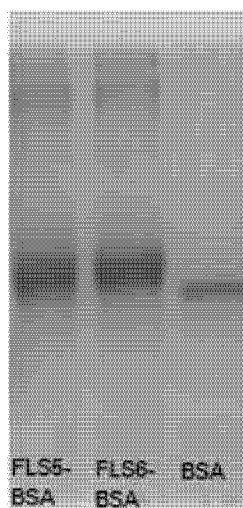


图 1

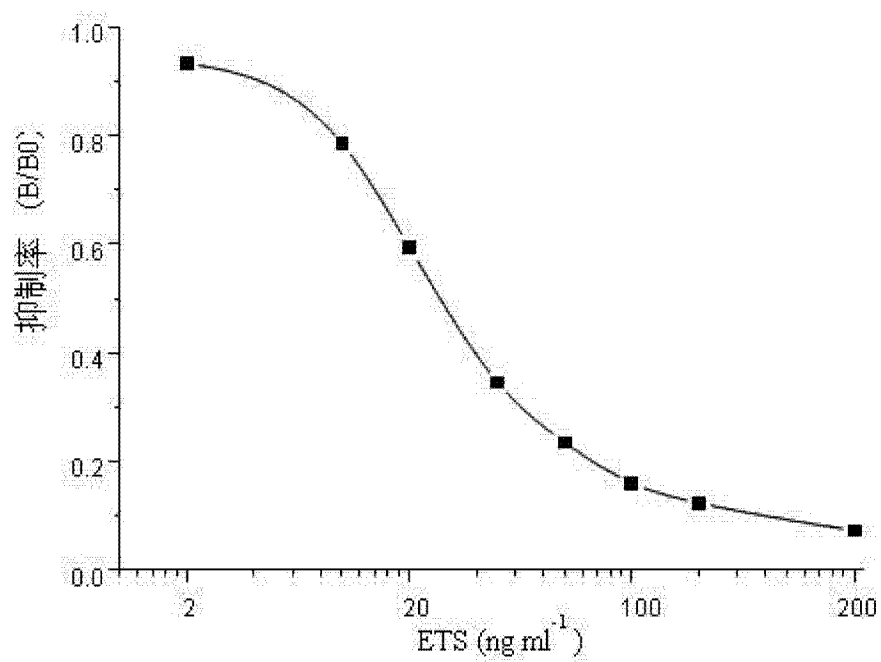


图 2

专利名称(译)	一种适用于赤藓红色素的人工抗原的合成方法		
公开(公告)号	CN102120774B	公开(公告)日	2013-04-03
申请号	CN201010600940.6	申请日	2010-12-23
[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		
[标]发明人	匡华 胥传来 李灼坤 邢常瑞 宋珊珊 刘丽强 王利兵		
发明人	匡华 胥传来 李灼坤 邢常瑞 宋珊珊 刘丽强 王利兵		
IPC分类号	C07K19/00 G01N33/533		
审查员(译)	唐慧		
其他公开文献	CN102120774A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种适用于赤藓红色素的人工抗原的合成方法，属于生物化工技术领域。本发明以荧光素FLS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，即得赤藓红的人工抗原荧光素FLS-牛血清白蛋白偶联物；用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定偶联物的偶联比。本发明成功合成了荧光素FLS-牛血清白蛋白偶联物，即是适用于赤藓红色素的人工抗原。本发明合成步骤简洁，有效，完全可用于免疫分析中，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。

