



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108051581 A

(43)申请公布日 2018.05.18

(21)申请号 201711365472.7

(22)申请日 2017.12.18

(71)申请人 河北中医学院

地址 050200 河北省石家庄市鹿泉经济开发
区杏苑路3号

(72)发明人 李丽华 刘文泰 李爱英

(74)专利代理机构 北京思海天达知识产权代理
有限公司 11203

代理人 张立改

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/545(2006.01)

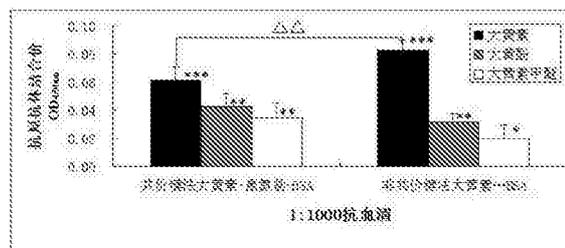
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

非共价键连接法半抗原—载体免疫原的制备

(57)摘要

非共价键连接法半抗原—载体免疫原的制备,属于免疫学检测技术领域。通过范德华力或分子间氢键连接制备非共价键连接法半抗原—载体液相免疫原和非共价键连接法半抗原—载体固相免疫原。具体方法是:①半抗原溶液与载体溶液混合或者将半抗原粉剂直接加到载体溶液或动物血清稀释液中,经搅拌、超声震荡、透析,制备非共价键连接法半抗原—载体液相免疫原,采用皮下注射免疫法免疫动物;②先用载体蛋白溶液包被膜片,再行半抗原溶液包被,或者用上述半抗原—载体液相免疫原包被膜片,制备非共价键连接法半抗原—载体包被膜片固相免疫原,采用皮下包埋膜片免疫法免疫动物。



注: 非共价键组与共价键组比较: $\Delta\Delta$, $p < 0.05$
阳性组与阴性组比较: *, $p > 0.05$, **, $p < 0.05$, ***, $p < 0.01$

1. 一种通过范德华力或分子间氢键连接的非共价键连接法半抗原---载体免疫原。
2. 按照权利要求1所述的一种通过范德华力或分子间氢键连接的非共价键连接法半抗原---载体免疫原,其特征在于,包括:通过范德华力或分子间氢键连接的非共价键连接法半抗原---载体液相免疫原和非共价键连接法半抗原---载体固相免疫原。
3. 制备权利要求2所述的一种通过范德华力或分子间氢键连接的非共价键连接法半抗原---载体免疫原,其特征在于,非共价键连接法半抗原-载体液相免疫原的制备方法,包括以下步骤:将半抗原粉剂直接加到载体溶液中,或将半抗原溶液与载体溶液混合,经超声震荡或搅拌,透析即得。
4. 制备权利要求2所述的一种通过范德华力或分子间氢键连接的非共价键连接法半抗原---载体免疫原,其特征在于,非共价键连接法半抗原---载体固相免疫原的制备方法,包括以下步骤:先用载体溶液包被膜片,再直接加入半抗原溶液行半抗原溶液包被。
5. 制备权利要求2所述的一种通过范德华力或分子间氢键连接的非共价键连接法半抗原---载体免疫原,其特征在于,非共价键连接法半抗原-载体固相免疫原的制备方法,包括以下步骤:用权利要求3中制备的非共价键连接的半抗原---载体液相免疫原直接包被膜片,即得。

非共价键连接法半抗原—载体免疫原的制备

技术领域

[0001] 本发明是对迄今通用的共价键偶联法半抗原-载体免疫原制备方法的改良,属于免疫学检测技术领域。

背景技术

[0002] 半抗原的免疫分析法检测,应用领域十分广泛。如中药成分、农药残留、饲料激素或抗生素、血药浓度、过敏原、运动员兴奋剂等领域内的检测。然而,半抗原须与大分子载体连接成半抗原-载体复合物,才具免疫原性,才能诱生抗半抗原抗体。迄今制备半抗原-载体免疫原的通用方法,是采用化学偶联法制备共价键连接的半抗原-载体免疫原。这种共价键连接的半抗原-载体免疫原:①必然占用半抗原的活性基团,致使本来分子量较小、结构简单的半抗原结构发生改变,导致半抗原表位以半抗原残基而非半抗原固有结构的形式表达。②共价键连接的半抗原残基-偶联剂残基-载体残基,属于连接紧密的分子型复合物,它诱生的抗半抗原抗体,识别的多是半抗原残基-偶联剂残基-载体残基复合表位或半抗原残基表位,而非半抗原固有表位。这可能是导致抗半抗原抗体亲和力较弱、特异性较差、易发生交叉反应的重要原因之一。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于改革了迄今通用的共价键偶联法制备半抗原-载体免疫原,易导致抗半抗原抗体特异性较差、亲和力较低的弊端。建立非共价键连接法制备半抗原—载体免疫原的方法,可显著增强诱生抗半抗原抗体的亲和力和特异性,从而提高检测敏感性。

[0004] 本发明的技术方案是:通过范德华力或分子间氢键制备非共价键连接的半抗原—载体免疫原。

[0005] 一种通过范德华力或分子间氢键连接的非共价键连接法半抗原—载体免疫原。包括:通过范德华力或分子间氢键连接的非共价键连接法半抗原—载体液相免疫原和非共价键连接法半抗原—载体固相免疫原。

[0006] 具体制备方法是:

[0007] 非共价键连接法半抗原—载体液相免疫原的制备方法,包括以下步骤:将半抗原粉剂直接加到载体溶液中,或将半抗原溶液与载体溶液混合,经超声震荡或搅拌,透析即得。

[0008] 非共价键连接法半抗原—载体固相免疫原的制备方法,包括以下步骤:先用载体溶液包被膜片,再直接加入半抗原溶液行半抗原溶液包被。或用上述本发明制备的非共价键连接的半抗原—载体液相免疫原直接包被膜片,即得。

[0009] 本发明的半抗原为常规的半抗原,载体为常规的载体。本发明通过物质间范德华力或分子间氢键得到的非共价键连接半抗原—载体免疫原:①不改变相连物质的分子结构,可保留半抗原的固有构型;②非共价键的键长远长于共价键,在半抗原与载体间保留了较长空间距离,可使半抗原表位能够相对独立表达。因此,采用非共价键连接法半抗

原---载体免疫原,是提高抗半抗原抗体特异性、增强亲和力、增加半抗原检测敏感性的重要措施之一。

[0010] 实验证实:非共价键连接法大黄素---BSA、共价键偶联法大黄素-BSA(重氮化偶联法大黄素-重氮盐-BSA)包被PVDF膜片免疫原,通过膜片皮下包埋免疫法免疫大鼠,诱生抗大黄素抗血清。本发明非共价键连接法抗血清与大黄素反应的抗原抗体结合价显著高于共价键偶联法。在特异性方面,本发明非共价键连接法抗血清与大黄素呈高价结合,与大黄酚呈低价结合,不与大黄素甲醚结合;而重氮化偶联法抗血清除与大黄素呈较高价结合外,也均与大黄酚和大黄素甲醚结合。即非共价键连接法半抗原---载体免疫原诱生抗体,对半抗原具有高度特异性和亲和力。

[0011] 本发明的优点是:非共价键连接半抗原---载体免疫原,诱生抗半抗原抗体的特异性高、亲和力强、检测敏感性高,且操作简便、省材、省时,具有广阔的应用前景。

[0012] 说明书附图

[0013] 图1为本发明非共价键连接法得到的非共价键连接大黄素---BSA包被PVDF膜片免疫抗血清和重氮化偶联法共价键连接大黄素-BSA包被PVDF膜片免疫抗血清的特异性比较图。

具体实施方式

[0014] 下面结合实施例,进一步阐述本发明的技术内容,但本发明并不限于以下实施例。

[0015] 实施例1.非共价键连接法制备大黄素---BSA包被PVDF膜片固相免疫原1

[0016] 将PVDF膜制成 $3 \times 8\text{mm}$ 、 $3 \times 4\text{mm}$ 膜片放于试管内,用甲醇处理5秒,立即用纯净水洗2次。加BSA溶液(40mg溶于 0.01mol/L pH7.4PBS 2ml),胶塞封口,置水平摇床振摇60min。用 0.01mol/L pH7.2PBS漂洗2次。将包被膜片置纱网上,置 50°C 温箱干燥, 4°C 保存备用。将BSA包被膜片放入试管,加 0.75mg/ml 大黄素-2%碳酸钠溶液2ml,胶塞封口,置水平摇床振摇60min。用 0.01mol/L pH6.47PBS漂洗2次。即制得非共价键连接的大黄素---BSA包被膜片固相免疫原。

[0017] 采用大黄素-BSA包被膜片皮下包埋免疫法免疫大鼠:初次免疫:将 $3 \times 8\text{mm}$ 大黄素-BSA包被膜片,光面向内纵向折叠放于套管针内,分别在两个后大腿内侧进针,将膜片推至皮下(2片/只);加强免疫:间隔14天在左侧后大腿外侧,同法包埋(1片/只);追加免疫:间隔14天在右侧后大腿外侧,同法包埋 $3 \times 4\text{mm}$ 膜片(1片/只)。末次免疫后第10天,腹股沟动脉放血制血清。

[0018] 实施例2.非共价键连接法制备大黄素---动物血清蛋白包被PVDF膜片固相免疫原2

[0019] 将实施例1的BSA溶液改为动物血清(用 0.01mol/L pH7.4PBS稀释成1:2动物血清),其他操作方法同实例1。

[0020] 实施例3.非共价键连接法制备大黄素---载体蛋白包被PVDF膜片固相免疫原3

[0021] 将实施例1或2的 0.75mg/ml 大黄素-2%碳酸钠溶液,改为 0.75mg/ml 大黄素有机溶液(如用乙醇、乙醚或苯等溶解大黄素),其他方法同实例1。

[0022] 实施例4.非共价键连接法制备大黄素---载体蛋白包被PVDF膜片固相免疫原4

[0023] 取大黄素 1.5mg 加到BSA溶液(BSA 40mg溶于 0.01mol/L pH7.4PBS 2ml)或1:2动物

血清2ml中,经漩涡震荡、超声震荡混匀,制备大黄素---载体悬液。用甲醇处理PVDF膜片5秒,立即用纯净水洗2次。将膜片加到大黄素-载体悬液中,胶塞封口,置水平摇床振摇60min。用0.01mol/L pH6.5PBS漂洗2次。即得非共价键连接的大黄素---载体包被膜片固相免疫原。免疫方法同实施例1。

[0024] 实施例5.非共价键连接法制备大黄素---BSA液相免疫原1

[0025] 取大黄素16.5mg溶于2%碳酸钠溶液2ml,加BSA溶液(BSA 400mg溶于0.01mol/L pH7.4PBS 20ml溶液),搅拌1-10h。将该溶液置透析袋中,4℃用0.01mol/L pH6.5PBS透析两天,期间多次换液,即得非共价键连接的大黄素---BSA液相免疫原。采用皮下注射免疫法免疫大鼠:初次免疫:取抗原0.3ml与等量不完全弗氏佐剂混合乳化后,多点皮下注射0.1ml/只。两周后同上法加强免疫一次,免疫剂量为0.08ml/只。再间隔两周,用不加佐剂的抗原皮下注射0.05ml/只。末次免疫后第10天,腹股沟动脉放血制血清。

[0026] 实施例6.非共价键连接法制备大黄素---BSA液相免疫原2

[0027] 取大黄素15mg加到BSA溶液(BSA 400mg溶于0.01mol/L pH7.4PBS 20ml溶液)中,经漩涡震荡、超声震荡混匀,搅拌1-10h。透析与免疫方法同实施例5。

[0028] 实施例7.非共价键法大黄素---BSA与重氮化偶联法大黄素-重氮盐-BSA包被PVDF膜片固相免疫原的免疫原性及抗血清特异性比较

[0029] 1.实验材料:BSA溶液:BSA 40mg溶于0.01mol/L pH7.4PBS 2ml;大黄素-2%碳酸钠溶液:大黄素1.5mg溶于2%碳酸钠溶液2ml。大黄素-重氮盐溶液:取对氨基苯甲酸16mg,亚硝酸钠8mg溶于三蒸水2ml中,置冰浴中震荡20min,加少量尿素即得重氮盐溶液;取大黄素3mg溶于2%碳酸钠溶液2ml,在不断搅拌下逐滴加入到重氮盐溶液中,室温震荡25min。

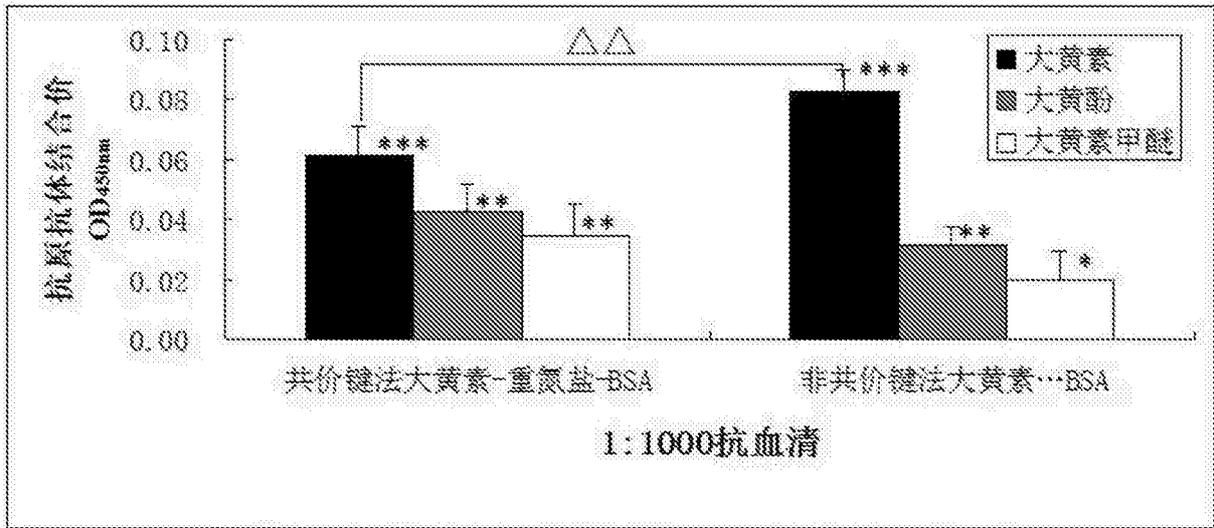
[0030] 2.大黄素-BSA包被PVDF膜片固相免疫原制备:①BSA包被PVDF膜片:将PVDF(孔径0.45um)制成3×8mm和3×4mm膜片,放于试管内,用甲醇预处理5秒,立即用纯净水洗2次,加BSA溶液2ml,胶塞封口,置水平摇床振摇60min,用0.01mol/L pH7.2PBS漂洗2次。将包被膜片置纱网上,置50℃温箱干燥,4℃保存备用。②将BSA包被膜片加到大黄素-2%碳酸钠溶液2ml中,胶塞封口,置水平摇床避光振摇20小时,用0.01mol/L pH6.5PBS洗2次。即得非共价键连接的大黄素---BSA包被PVDF膜片固相免疫原,冷冻保存备用。③将BSA包被膜片加到大黄素-重氮盐溶液2ml中,加EDC1 4mg,胶塞封口,置水平摇床避光振摇20小时,用0.01mol/L pH6.5PBS洗2次,即得大黄素-重氮盐-BSA包被PVDF膜片固相免疫原,冷冻保存备用。

[0031] 3.免疫大鼠制备抗血清:雌性wistar大鼠,6周龄,体重180~200g,清洁级,购于河北医科大学实验动物中心,合格证号1304157,自行饲养。随机分成2组,每组3只。初次免疫:将3×8mm包被膜片纵向折叠(光面向内)放于套管针内,分别在左右后大腿内侧进针,将膜片置于皮下(2片/鼠);加强免疫:间隔14天在左侧大腿外侧,同法包埋(1片/鼠);追加免疫:间隔14天在右侧大腿外侧,同法包埋3×4mm(1片/鼠)。末次免疫10天后,腹股沟动脉放血,制血清,-20℃冷冻保存。

[0032] 4.ELISA法检测免疫原性与特异性:预先用10%山羊血清-pH9.5碳酸缓冲液200μl/孔包被ELISA孔板60min,用pH6.47PBS-0.05%Tween20洗4次。再分别用0.2mmol大黄素-0.15M NaOH、0.2mmol大黄酚-0.15M NaOH、0.2mmol大黄素甲醚-0.15M NaOH和0.15M NaOH(阴性对照组)各100μl/孔包被60min,用pH6.47PBS-0.05%Tween20洗4次。每组设3个同水平孔。加1:1000抗血清-pH6.5PBS 100μl/孔反应60min,用pH6.47PBS-0.05%Tween20洗4

次。加1:50000辣根酶标记山羊抗大鼠IgG 100 μ l/孔反应30min,用pH6.47PBS-0.05% Tween20洗4次。加TMB显色液100 μ l/孔显色15min,加2M硫酸50 μ l/孔终止显色,酶标仪检测OD_{450nm}值。最后将每组3个孔的检测值按数据大小排序,同序计算抗原抗体结合价=阳性实验组OD_{450nm}值-阴性对照组OD_{450nm}值。用SPSS16.0统计软件,取阳性实验组OD值与阴性对照组OD值进行t检验,以 $p < 0.05$ 判定为有效结合价检测值;取非共价键法大黄素---BSA与重氮化偶联法大黄素-重氮盐-BSA两组的抗原抗体结合价值,进行t检验,比较两组的差异性。

[0033] 两组抗血清的特异性结果见图1。非共价键连接法大黄素---BSA抗血清与大黄素反应的抗原抗体结合价为有效结合价 ($p < 0.01$),与大黄酚反应呈低价结合 ($p < 0.05$),与大黄素甲醚反应为无效结合价 ($p > 0.05$);重氮化偶联法大黄素-重氮盐-BSA抗血清与大黄素反应的抗原抗体结合价为有效结合价 ($p < 0.01$),与大黄酚、大黄素甲醚反应的抗原抗体结合价也均为有效结合价 ($p < 0.05$)。非共价键法大黄素---BSA组显著高于重氮化偶联法大黄素-重氮盐-BSA组与大黄素反应的结合价 ($p < 0.05$)。结论:非共价键法大黄素---BSA组抗血清对大黄素具有高度特异性和敏感性;重氮化偶联法大黄素-重氮盐-BSA组抗血清的特异性较差、敏感性较低。



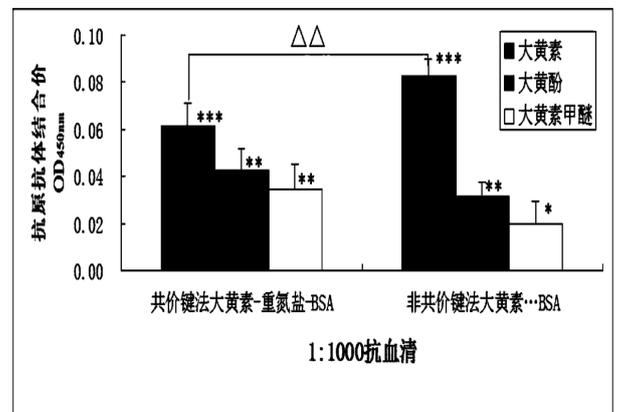
注：非共价键组与共价键组比较：△△：p<0.05
阳性组与阴性组比较：*：p>0.05，**：p<0.05，***：p<0.01

图1

专利名称(译)	非共价键连接法半抗原---载体免疫原的制备		
公开(公告)号	CN108051581A	公开(公告)日	2018-05-18
申请号	CN2017111365472.7	申请日	2017-12-18
[标]申请(专利权)人(译)	河北中医学院		
申请(专利权)人(译)	河北中医学院		
当前申请(专利权)人(译)	河北中医学院		
[标]发明人	李丽华 刘文泰 李爱英		
发明人	李丽华 刘文泰 李爱英		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/545		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/545		
代理人(译)	张立改		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

非共价键连接法半抗原---载体免疫原的制备，属于免疫学检测技术领域。通过范德华力或分子间氢键连接制备非共价键连接法半抗原---载体液相免疫原和非共价键连接法半抗原---载体固相免疫原。具体方法是：①半抗原溶液与载体溶液混合或者将半抗原粉剂直接加到载体溶液或动物血清稀释液中，经搅拌、超声震荡、透析，制备非共价键连接半抗原---载体液相免疫原，采用皮下注射免疫法免疫动物；②先用载体蛋白溶液包被膜片，再行半抗原溶液包被，或者用上述半抗原---载体液相免疫原包被膜片，制备非共价键连接半抗原---载体包被膜片固相免疫原，采用皮下包埋膜片免疫法免疫动物。



注：非共价键组与共价键组比较：△△：p<0.05
阳性组与阴性组比较：*：p>0.05，**：p<0.05，***：p<0.01