



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101948532 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 19

(21) 申请号 201010270317. 9

(22) 申请日 2010. 09. 02

(71) 申请人 南京工业大学

地址 210009 江苏省南京市鼓楼区鼓楼区新
模范马路 5 号

(72) 发明人 李方实 谢卿 杨明明 李壹

(51) Int. Cl.

C07K 14/765 (2006. 01)

C07K 16/44 (2006. 01)

C07K 16/06 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

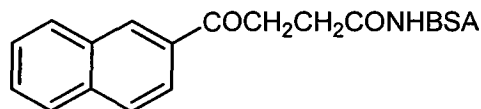
(54) 发明名称

一种萘人工免疫原 NA-BSA 及其制备方法和
用途

(57) 摘要

本发明涉及一种萘人工免疫原 NA-BSA 及其
制备方法和用途,制备 (1) 将丁二酸酐、萘、无水
三氯化铝按摩尔比 1 : 1 : 2.2 投料,溶解于硝基
苯中,冰浴搅拌,加稀盐酸终止反应,有机层用大
量稀盐酸水洗后,旋转蒸发除去硝基苯,得到棕黄
色固体粉末,重结晶,干燥;(2) 将溶有 N- 羟基琥
珀酸亚胺和 N,N'- 二环己基碳酰亚胺逐滴加入萘
半抗原溶液中,冰浴下搅拌反应 4 小时后,加入到
牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸盐缓冲液中,4℃下反
应 12 ~ 16 小时,透析后离心分出上清液,即得萘
人工免疫原 NA-BSA 偶联物,分装后 -20℃下保存。
本发明制备简便,成本低,容易工业化生产;萘人
工免疫原 NA-BSA 通过动物制备成萘特异性抗体,
用于现场检测水体、土壤及大气中痕量的萘。

1. 一种萘人工免疫原 NA-BSA, 结构式如下:



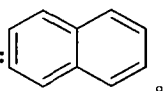
其中 BSA 为牛血清白蛋白。

2. 一种制备如权利要求 1 所述的萘人工免疫原 NA-BSA 的方法, 包含以下步骤:

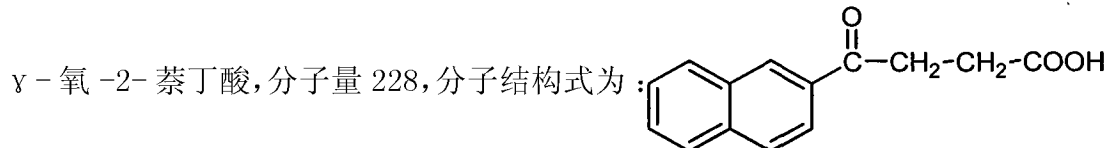
(1) 萘半抗原的合成: 将丁二酸酐、萘、无水三氯化铝按摩尔比 1 : 1 : 2.2 投料, 并溶解于硝基苯中, 得到无色液体, 冰浴下搅拌反应, 在 0 ~ 4℃ 冰浴下进行 7 ~ 8 小时后, 加入稀盐酸终止反应, 将烧瓶中的液体倒出, 加稀盐酸水解, 分离出的有机层用大量稀盐酸水洗后, 旋转蒸发除去硝基苯, 得到棕黄色固体粉末, 在甲醇 - 乙醚中重结晶获得黄色晶体状的萘半抗原 NA, 干燥后得纯品;

(2) 萘人工免疫原的合成: 将溶有 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 N, N' - 二环己基碳酰亚胺 (DCC) 的有机溶剂逐滴加入溶有萘半抗原的有机溶剂中, 冰浴下搅拌反应 3 ~ 4 小时, 离心分出上清液, 加入到溶有 BSA 的磷酸缓冲液中, 3 ~ 6℃ 反应 12 ~ 16 小时, 将溶液装入透析袋, 用 pH6 ~ 8 磷酸缓冲液透析 3 ~ 6d; 透析后离心分出上清液, 即得萘人工免疫原 NA-BSA 偶联物, 分装后 -10℃ ~ -40℃ 保存。

3. 根据权利要求 2 所述的一种萘人工免疫原 NA-BSA 的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 (1) 中的萘的分子结构式为:



4. 根据权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤 (1) 中的萘半抗原的化学名称为



5. 根据权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤 (2) 中的有机溶剂是 N, N- 二甲基甲酰胺 (DMF)。

6. 根据权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤 (2) 中的半抗原、NHS、DCC 摩尔比为 1 : 1.5 : 1.5, 半抗原、蛋白质摩尔比分别为 200 : 1。

7. 一种萘人工免疫原 NA-BSA 的应用, 通过免疫动物制备成萘特异性抗体, 能与萘发生特异性免疫反应的免疫球蛋白 IgG, 用于现场检测水体、土壤及大气中痕量的萘。

一种萘人工免疫原 NA-BSA 及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明属萘的多克隆抗体领域,特别是涉及一种萘人工免疫原 NA-BSA 的制备及用途。

背景技术

[0002] 多环芳烃 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) 是含有两个或两个以上苯环的碳氢化合物的统称,如萘、蒽、菲、荧蒽、苯并芘等。近年来,海上石油开采,轮船运输、海损溢油,工业、生活燃烧废气排放等使得多环芳烃污染日益严重,大量调查研究表明,空气、土壤、水体及生物体等都受到了多环芳烃的污染。多环芳烃是最早发现且数量最多的致癌物,目前已经发现的致癌性多环芳烃及其衍生物已超过 400 种,占已被发现致癌物质总数的 1/3 以上。每年排放到大气中的多环芳烃约几十万吨,因其毒性、生物蓄积性和半挥发性以及在环境中的持久存在,已经受到国际科学界的广泛关注。1976 年美国环保局提出 129 种“优先控制污染物”中,多环芳烃类化合物就有 16 种;欧盟最新有害物质禁令中也列入了 16 种多环芳烃;1990 年我国提出的水中优先控制的 68 种污染物中,其中多环芳烃类化合物就占 7 种。

[0003] 萘是多环芳烃中较常见的物质,是工业上最重要的稠环芳烃,它从炼油的副产品煤焦油中大量生产,是制造某些染料、燃料、润滑剂、苯酐、农药及其它有机化合物的主要原料。作为防蛀剂,还广泛应用于毛织品、皮货、木材等的保存。1958 年以来,代替滴滴涕等氯化产品的甲萘威投产以后,用作杀虫剂原料的比例大大增加。人暴露于萘的机会主要在萘的生产和使用过程,另外吸烟和被动吸烟也是一种暴露机会,据报道香烟中含有一定量的萘、甲基萘等,因此美国环保局 (EPA) 将萘及其衍生物视为普遍存在的环境污染物而受到重视,我国也已规定禁止使用萘作为防蛀剂。因此寻求一种快速、简便、灵敏且经济实用的分析方法成为当前研究的主要方向。

[0004] 20 世纪 60 年代发展起来的免疫分析 (Immunoassay, IA) 是基于抗原与抗体的特异性、可逆性结合反应的分析技术。免疫反应涉及抗原与抗体分子间的立体化学、电荷、氢键和偶极间的综合作用,具有常规理化分析技术无可比拟的选择性和高灵敏度,非常适宜于复杂基质中痕量组分的分析。因此,免疫分析具有特异性强、灵敏度高、方便快捷、分析容量大、检测成本低、安全可靠等优点,可以满足简单、快速、灵敏地检测环境激素的要求。

[0005] 目前关于免疫分析方法检测萘的报道很少。合格的萘抗原是免疫得到合格的萘抗体的重要前提,合格的萘抗体是建立萘免疫检测方法的关键所在。有关萘抗体的制备,国内外报道甚少。

发明内容

[0006] 要解决的技术问题

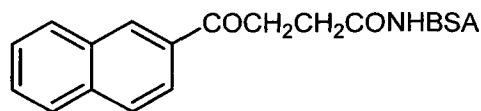
[0007] 本发明要解决的技术问题是提供一种萘人工免疫原 NA-BSA 的制备及用途,以克服现有检测技术中对萘样品预处理复杂、耗时、且需要大量有机溶剂萃取,以及在检测过程

中要用到精密昂贵的检测仪器而不适宜推广使用和不利于当环境污染事件发生在野外时的现场快速检测等缺点。

[0008] 技术方案

[0009] 本发明的一种萘人工免疫原 NA-BSA, 结构式如下:

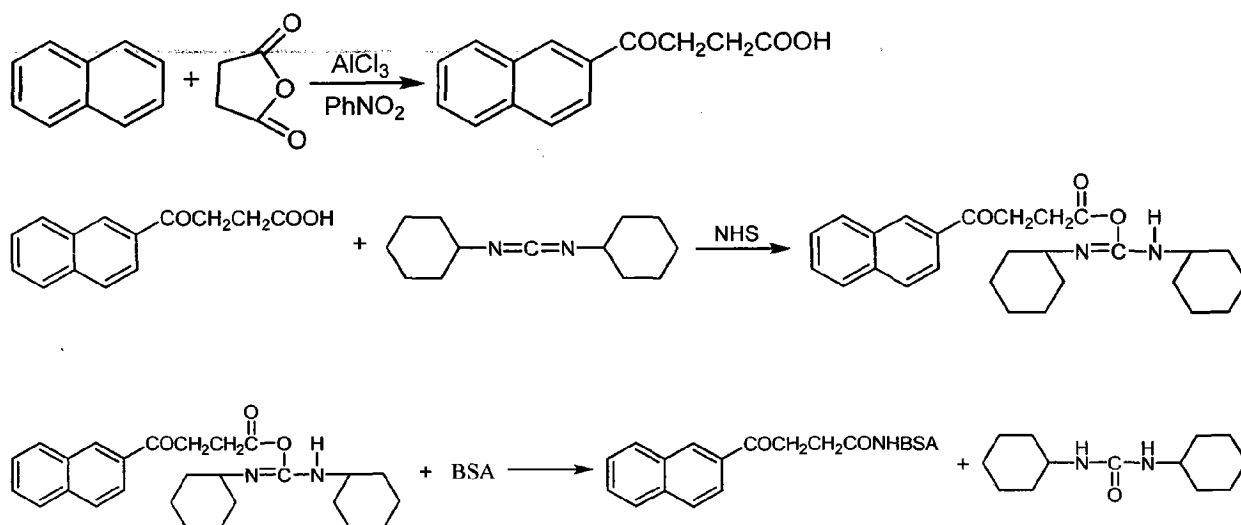
[0010]



[0011] 其中 BSA 是牛血清白蛋白。

[0012] 本发明采用活化酯法合成萘人工免疫原, 其反应方程式如下:

[0013]



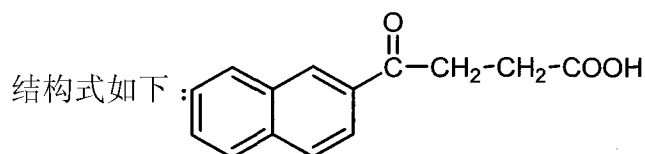
[0014] 本发明的一种萘人工免疫原 NA-BSA 的制备方法, 包括以下步骤:

[0015] (1) 萘半抗原的合成: 将丁二酸酐、萘、无水三氯化铝按摩尔比 1 : 1 : 2.2 投料, 并溶解于硝基苯中, 得到无色液体, 冰浴下搅拌反应, 在 0 ~ 4℃ 冰浴下进行 7 ~ 8 小时后, 加入稀盐酸终止反应, 将烧瓶中的液体倒出, 加稀盐酸水解, 分离出的有机层用大量稀盐酸水洗后, 旋转蒸发除去硝基苯, 得到棕黄色固体粉末, 在甲醇 - 乙醚中重结晶获得黄色晶体状的萘半抗原 NA, 干燥后得纯品;

[0016] (2) 萘人工免疫原的合成: 将溶有 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 N,N'-二环己基碳酰亚胺 (DCC) 的有机溶剂逐滴加入溶有萘半抗原的有机溶剂中, 冰浴下搅拌反应 3 ~ 4 小时, 离心分出上清液, 加入到溶有 BSA 的磷酸缓冲液中, 3 ~ 6℃ 下反应 12 ~ 16 小时, 将溶液装入透析袋, 用 pH6 ~ 8 磷酸缓冲液透析 3 ~ 6d; 透析后离心分出上清液, 即得萘人工免疫原 NA-BSA 偶联物, 分装后 -10 ~ -40℃ 保存。

[0017] 所述步骤 (1) 中的萘的分子结构式为:

[0018] 所述步骤 (1) 中的萘半抗原的化学名称为 γ-氧-2-萘丁酸, 分子量为 228, 分子



[0019] 所述步骤(2)中的有机溶剂是N,N-二甲基甲酰胺(DMF)。

[0020] 本发明的一种萘人工免疫原NA-BSA的用途,通过免疫动物制备成萘特异性抗体,能与萘发生特异性免疫反应的免疫球蛋白IgG,用于检测水体、土壤及大气中痕量的萘,便于进行现场监测。

[0021] 由于萘是小分子物质,只具有免疫反应性而不具有免疫原性,而且该分子上没有能与蛋白质直接结合的氨基、羟基、羧基等基团,故本发明先通过Friedel-Crafts酰基化反应使萘分子带上一个四个碳链长的羧基,然后用活化酯法将这个含羧基的半抗原分子与蛋白质分子偶联制备出萘人工免疫原,再利用此免疫原对新西兰大白兔进行免疫,获得对应的高效价、高特异性的萘多克隆抗体,此抗体将应用于建立免疫分析方法以检测环境中的萘。

[0022] 有益效果

[0023] 本发明所制备的萘特异性抗体具有以下优点:

[0024] (1) 实用性强:萘的多克隆抗体制备技术具有主要的使用价值和实际意义,制备的抗体特异性好、效价高,以抗原抗体免疫反应为基础可用于样品测定;此抗体及其制备方法为酶联免疫分析法测定环境中痕量的萘提供保障,也为多环芳烃萘快速检测试剂盒的研制解决了一大技术难点。

[0025] (2) 稳定性好:本发明制备的萘抗体具有较好的稳定性。

[0026] (3) 抗体制备技术简便可行:抗体整个制备过程无需特殊仪器设备,成本低廉,容易工业化规模生产。

附图说明

[0027] 图1是萘人工免疫原NA-BSA的紫外光谱图,

[0028] 其中BSA为牛血清白蛋白,NA为萘半抗原,NA-BSA为萘人工免疫原。

[0029] 具体实施方式

[0030] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的阐述,应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明讲授的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0031] 实施例1

[0032] (1) 萘半抗原的合成

[0033] 称取1.0g(10mmol)丁二酸酐溶于30mL硝基苯中,得到无色溶液,另称取3g(22mmol)无水三氯化铝和2.02g(10mmol)的萘置于装有20mL硝基苯的三口烧瓶中,冰浴下搅拌溶解,得到血红色的络合物溶液,将丁二酸酐溶液用滴液漏斗慢慢滴加入上述络合物溶液中,30min内加入完毕;反应液颜色逐渐变成棕褐色,整个反应在0~4℃冰浴下进行8小时后,加入稀盐酸终止反应,将烧瓶中的液体倒出;加稀盐酸水解,分离出的有机层用大量稀盐酸水洗后,旋转蒸发除去硝基苯得到棕黄色固体粉末;在甲醇-乙醚中重结晶获得黄色晶体状的萘半抗原,熔点为158~160℃。

[0034] (2) 萘半抗原的鉴定

[0035] 取上述合成的萘半抗原少许,用溴化钾压片后红外光谱扫描,结果如下 $[\nu(\text{cm}^{-1})]$:

1713, 1679(s C = O), 1624, 1490, 1432(s C = C), 812(s Ar-H)。与文献报道的萘的红外光谱比较, 半抗原的红外谱图中有明显的羰基(C = O)吸收峰, 说明萘分子上已经引入了羧基, 它可以与蛋白质分子偶联。

[0036] 将萘半抗原用氘代氯仿溶解, 测定样品的核磁共振氢谱(^1H NMR), 结果如下(δ , CDCl_3): 7.26(s, H, CH-H), 2.88(t, 2H, CH_2 -H), 3.47(t, 2H, CH_2 -H), 7.25 ~ 8.51(m, 7H, Ar-H), 12.18(s, 1H, COOH-H), 氢谱鉴定的结果表示: 在萘分子结构中成功引入了羧基, 可与蛋白质偶联合成人工免疫原。

[0037] (3) 萘免疫原的合成

[0038] 称取步骤(1)中所合成的萘半抗原 91.2mg (0.4mmol) 置于洁净干燥的小锥形瓶中, 加入 600 μL 无水 DMF 使之溶解; 称取 123.6mg (0.6mmol) DCC 和 69.0mg (0.6mmol) NHS 溶于 600 μL 无水 DMF 中, 在冰浴磁力搅拌下, 逐滴加入小锥形瓶中, 冰浴搅拌反应 4h; 分离出上清液; 称取 100mg (0.002mmol) BSA 溶于 5mL 磷酸盐缓冲液中, 将上述上清液逐滴加入, 于 4 $^\circ\text{C}$ 反应 14h; 反应完毕, 将溶液装入透析袋, 用磷酸盐缓冲液透析 4d, 离心分出上清液, 即得到萘人工全抗原 NA-BSA; 分装后 -20 $^\circ\text{C}$ 保存。

[0039] (4) 萘免疫原的鉴定

[0040] 常用的鉴定人工免疫原结合比的方法是紫外光谱法, 按常规来说, 只要人工免疫原的紫外光谱图与原载体蛋白和半抗原的紫外图谱相比发生了变化, 即可间接说明人工免疫原成功合成。

[0041] 由紫外光谱图(图1), 可知, 半抗原 γ -氧-2-萘丁酸在 246nm 处有特征吸收峰, 蛋白质 BSA 在 278nm 处有特征吸收峰, 而萘人工免疫原 NA-BSA 偶联物的特征吸收峰在 250nm 处, 与蛋白质和半抗原 γ -氧-2-萘丁酸比较都发生了移动, 偶联物具备有半抗原和蛋白质的吸收特征, 说明已经成功合成萘免疫原。

[0042] 根据朗伯-比尔定律, 波长一定时混合物的紫外吸收具有加合性。采用全波长紫外分光光度计对半抗原、载体蛋白及偶联物进行扫描, 根据吸收峰可以确定偶联是否成功。结合比计算公式如下:

[0043]

$$\text{结合比} = \frac{\varepsilon_{\text{偶联物}} \cdot \varepsilon_{\text{载体蛋白}}}{\varepsilon_{\text{半抗原}}} = \frac{\frac{OD_{\text{偶联物}}}{C_{\text{偶联物}}} - \frac{OD_{\text{载体蛋白}}}{C_{\text{载体蛋白}}}}{\frac{OD_{\text{半抗原}}}{C_{\text{半抗原}}}}$$

[0044] 按上述公式计算, 萘免疫原的结合比为 20.4, 该结合比在文献所建议的范围内, 证明合成的萘免疫原比较理想。

[0045] 实施例 2

[0046] (1) 萘多克隆抗体的制备

[0047] 准备成年的雄性新西兰大白兔两只(编号 I 和 II), 体重约 2 ~ 2.5kg, 饲养于标准实验动物房, 每只兔子单笼饲养, 观察一周后免疫。

[0048] 将实施例 1 中所合成的萘免疫原慢慢解冻, 用磷酸盐缓冲液稀释至 1mg/mL, 按免疫剂量吸入至 5mL 消毒注射器中, 首次免疫加入等量弗氏完全佐剂(FCA), 用聚氟乙烯塑料管连接另一支 5mL 注射器, 对推至充分乳化, 形成油包水(W/O)状态, 按免疫方案注射免疫。

[0049] 首次注射免疫采用由等量弗氏完全佐剂乳化的免疫原,于兔颈部皮下多点注射免疫。首次免疫后,间隔三周,以后每隔两周用由弗氏不完全佐剂乳化的免疫原,于兔背部及颈下多点注射加强免疫,免疫剂量为每公斤兔体重 1mg。从第三次开始,每次免疫后 7 天,于兔耳缘静脉采血 1mL,分离血清,测定抗体效价;当达到一定效价后,心脏采全血。每只兔子采血约 60mL 左右,采血后,收集在离心管中,待血液凝固后,放于 4℃冰箱中过夜,等血块收缩后,用吸管将血清吸入离心管中,分离出血清,于 -20℃保存。

[0050] (2) 萘抗体效价的测定

[0051] 将免疫原按制定的免疫方案免疫 2 只兔子,从加强免疫第三次开始,在每次免疫后第七天于兔耳缘静脉采血 1mL,血清经适当稀释后,用酶联免疫法测得抗体效价分别为 1 : 160000, 1 : 320000。

[0052] (3) 萘抗体的纯化和鉴定

[0053] 萘抗体的纯化采用辛酸-饱和硫酸铵二步盐析法(辛酸在偏酸性的条件下能将血清中除免疫球蛋白 IgG 外的蛋白质都沉淀下来,上清液中只有 IgG),经葡聚糖凝胶柱除盐和二乙基氨基乙基纤维素柱反向吸附纯化血清,纯化萘抗体冻干后于 -20℃保存。

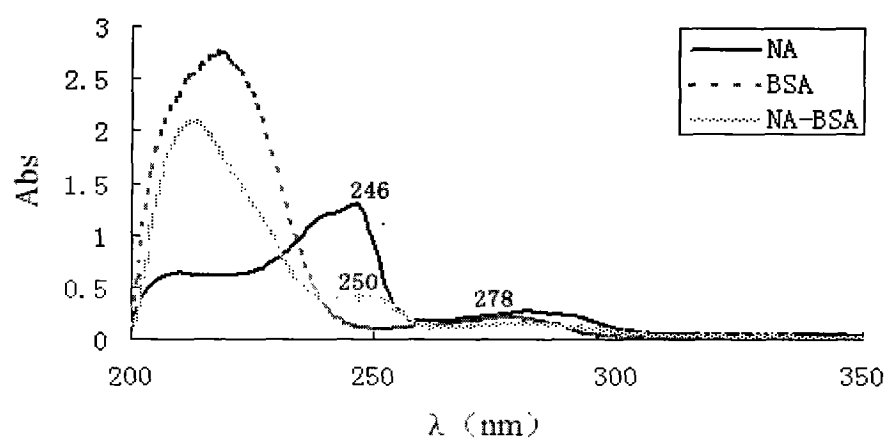


图 1

专利名称(译)	一种萘人工免疫原NA-BSA及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN101948532A	公开(公告)日	2011-01-19
申请号	CN201010270317.9	申请日	2010-09-02
[标]申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
[标]发明人	李方实 谢卿 杨明明 李壹		
发明人	李方实 谢卿 杨明明 李壹		
IPC分类号	C07K14/765 C07K16/44 C07K16/06 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种萘人工免疫原NA-BSA及其制备方法和用途，制备(1)将丁二酸酐、萘、无水三氯化铝按摩尔比1:1:2.2投料，溶解于硝基苯中，冰浴搅拌，加稀盐酸终止反应，有机层用大量稀盐酸水洗后，旋转蒸发除去硝基苯，得到棕黄色固体粉末，重结晶，干燥；(2)将溶有N-羟基琥珀酸亚胺和N，N'-二环己基碳酰亚胺逐滴加入萘半抗原溶液中，冰浴下搅拌反应4小时后，加入到牛血清白蛋白(BSA)的磷酸盐缓冲液中，4℃下反应12~16小时，透析后离心分出上清液，即得萘人工免疫原NA-BSA偶联物，分装后-20℃下保存。本发明制备简便，成本低，容易工业化生产；萘人工免疫原NA-BSA通过动物制备成萘特异性抗体，用于现场检测水体、土壤及大气中痕量的萘。

