



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102241764 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 16

(21) 申请号 201110115016. 3

(22) 申请日 2011. 05. 05

(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 陈洪岩

(51) Int. Cl.

C07K 14/765 (2006. 01)

C07K 1/113 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

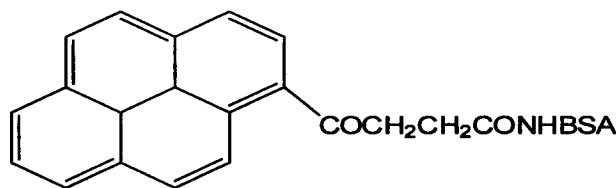
(54) 发明名称

一种芘人工免疫原 PY-BSA 的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及一种芘人工免疫原 PY-BSA 及其制备方法和用途,制备 (1) 以丁二酸酐、芘、无水三氯化铝为原料,冰浴反应半小时,然后于 25℃ 反应 24h。加盐酸终止反应,再加 NaOH 回流,过滤,滤液中加入盐酸,重结晶,活性炭脱色,干燥,得淡黄色芘半抗原;(2) 以芘半抗原、N- 羟基琥珀酸亚胺和 N, N' - 二环己基碳酰亚胺为原料, DMF 为溶剂,冰浴下搅拌反应 4 小时。然后将所得活化酯加入到牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸盐缓冲液中, 4℃ 下反应 20 小时,透析后离心分出上清液,制得到芘人工免疫原 PY-BSA。本发明制备简便,成本低;芘人工免疫原 PY-BSA 通过动物制备成芘特异性抗体,从而用于环境中痕量芘的检测与监控。

1. 一种芘人工免疫原 PY-BSA, 其特征在于该芘人工免疫原具有如下结构:



其中 BSA 为牛血清白蛋白。

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

(1) 芘半抗原的合成: 在干燥烧瓶中, 加入摩尔比为 1 : 1 芘和丁二酸酐, 待固体全部溶解用冰 - 盐浴冷却反应体系至 -5°C , 分三次加入摩尔比 2.2 倍于芘的无水三氯化铝。恒温反应半小时, 然后再于 25°C 反应 24h。反应完毕, 反应物用盐酸调至 pH 值至酸性, 然后加 NaOH 调 pH 值至碱性, 回流 3h。过滤, 滤液用盐酸调回至酸性。所得的粗产物用冰乙酸重结晶, 活性炭脱色, 干燥后得到淡黄色固体粉末。

(2) 芘人工免疫原的合成: 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芘半抗原的有机溶剂中, 冰浴下搅拌反应 4 小时, 离心分出的上清液, 加入到溶有 BSA 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 4°C 反应 20 个小时, 将溶液装入透析袋, 用 pH6 ~ 8 磷酸盐缓冲液透析 3 ~ 6d; 透析后离心分出上清液, 即得芘人工免疫原 PY-BSA 偶联物, 分装后 -20°C 保存。

3. 根据权利要求 2 所述的一种芘人工免疫原 PY-BSA 的制备方法, 其特征在于, 所述步

骤 (1) 中的芘的分子结构式为:

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

γ -氧代-1-芘丁酸, 分子量 302, 分子结构式为:

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 100 : 1。

7. 一种芘人工免疫原 PY-BSA 的应用, 通过免疫动物制备成芘特异性抗体, 能与芘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芘。

一种芘人工免疫原 PY-BSA 的制备方法及其用途

技术领域

[0001] 本发明属芘的多克隆抗体领域,特别是涉及一种芘人工免疫原 PY-BSA 的制备及用途。

背景技术

[0002] 多环芳烃是指含有两个或两个以上苯环的有机化合物,一般可分为非稠环型和稠环型两类。常见的多环芳烃有萘、蒽、菲、芘、苯并芘、荧蒽等。多环芳烃种类繁多,目前已知的有 400 多种。这类化合物性质比较稳定。它的来源包括自然来源和人为来源。自然来源主要是生物体内的合成、森林及草原自然起火等。人为来源主要是来自化石燃料的燃烧、汽车尾气、秸秆焚烧以及石油提炼。多环芳烃在自然环境(水、土壤、大气等)中普遍存在且能够长距离迁移。多环芳烃容易在生物体内蓄积且具有“三致”的特点,即致癌性、致畸性、致突变性。因此,世界各国都十分重视对多环芳烃的监控,对其在环境中的含量有严格的限制。美国 EPA 已将萘、蒽、芘等 16 种 PAHs 确定为环境优先控制污染物,且总量要小于 $0.2 \mu\text{g/L}$ 。中国将 7 种多环芳烃列为优先控制污染物,规定饮用水中苯并[a]芘的质量浓度应小于 $0.01 \mu\text{g/L}$ 。

[0003] 目前,检测环境中芘等 PAHs 常用的方法有气相色谱法和高效液相色谱法。这些方法对样品检测的精密度和准确度都较高,但是前处理过程繁琐、耗时,不适于大批量快速检测和现场检测。因此,研究和开发一种简便、快速、灵敏的分析方法成为当务之急。

[0004] 免疫分析法是基于抗原与抗体的特异性结合反应而建立起来的分析方法。酶联免疫吸附试验法(ELISA)是免疫分析中的一项新技术,现在不仅应用于多种疾病的免疫诊断,还应用于大分子抗原和小分子抗原的定量测定。ELISA 法具有灵敏、特异、简单、快速、稳定及易于自动化操作等特点。

[0005] 目前有关运用 ELISA 来检测芘的报道甚少。合成合格的芘人工抗原是获得芘抗体的前提,而获得芘抗体也是建立芘的 ELISA 分析方法的重要环节。

发明内容

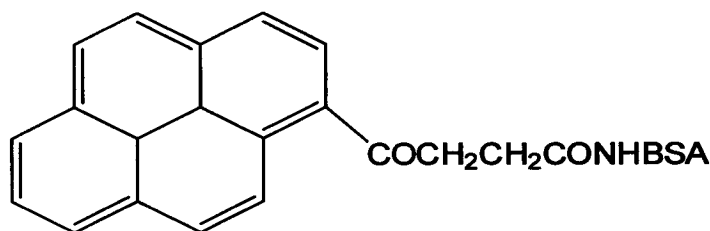
[0006] 要解决的技术问题

[0007] 本发明要解决的技术问题是提供一种芘的人工免疫原 PY-BSA 的制备及用途,以克服现有检测技术中对芘样品预处理复杂、耗时、且需要大量有机溶剂萃取,以及在检测过程中要运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] 本发明的一种芘人工免疫原 PY-BSA,结构式如下:

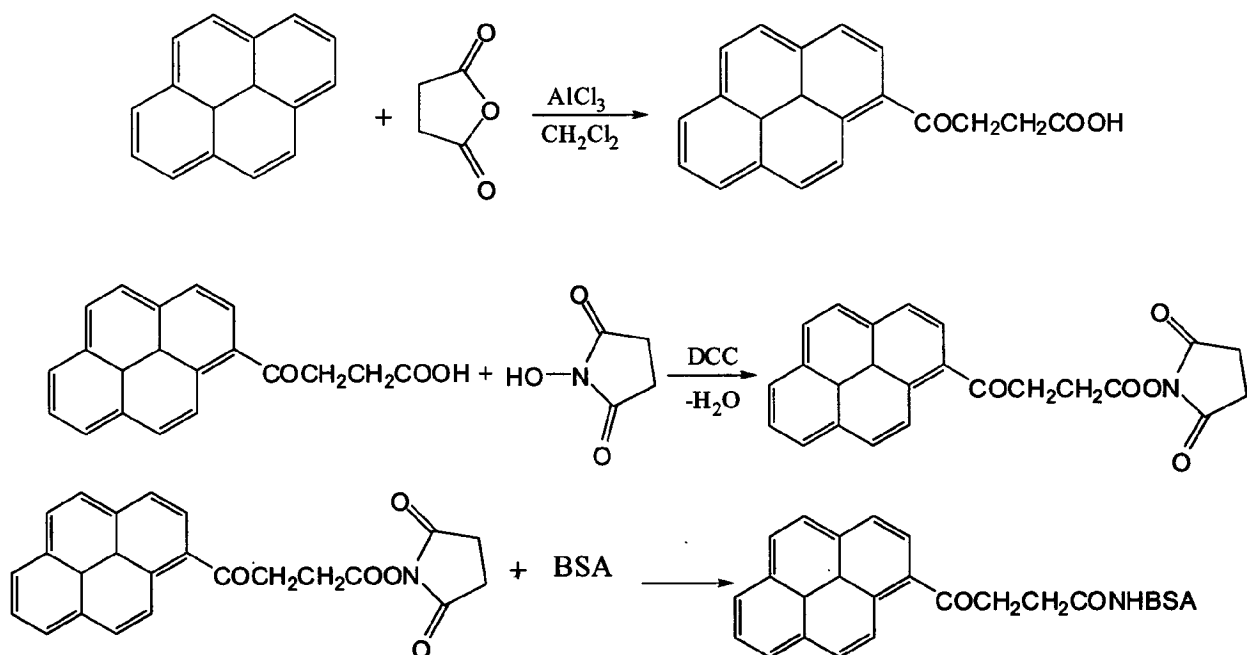
[0010]



[0011] 其中 BSA 是牛血清白蛋白。

[0012] 本发明采用活化酯法合成芫人工免疫原,其反应方程式如下:

[0013]

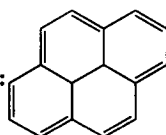


[0014] 本发明为一种茈人工免疫原 PY-BSA 的制备方法,包括以下步骤:

[0015] (1) 茈萜抗原的合成:在干燥烧瓶中,加入摩尔比为 1 : 1 茈和丁二酸酐,待固体全部溶解用冰-盐浴冷却反应体系至 -5°C ,分三次加入摩尔比 2.2 倍于茈的无水三氯化铝。恒温反应半小时,然后再于 25°C 反应 24h。反应完毕,反应物用盐酸调至 pH 值至酸性,然后加 NaOH 调 pH 值至碱性,回流 3h。过滤,滤液用盐酸调回至酸性。所得的粗产物用冰乙酸重结晶,活性炭脱色,干燥后得到淡黄色固体粉末。

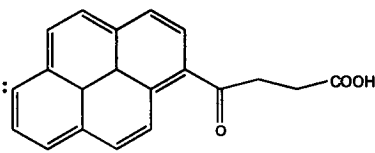
[0016] (2) 芑人工免疫原的合成:将溶有 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 N,N'- 二环己基碳酰亚胺 (DCC) 的有机溶剂逐滴加入溶有芑半抗原的有机溶剂中,冰浴下搅拌反应 4 小时,离心分出的上清液,加入到溶有 BSA 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中,4℃ 反应 20 个小时,将溶液装入透析袋,用 pH6 ~ 8 磷酸缓冲液透析 3 ~ 6d ;透析后离心分出上清液,即得芑人工免疫原 PY-BSA 偶联物,分装后 -20℃ 保存。

[0017] 所述步骤(1)中的茚的分子结构式为：



[0018] 所述步骤(1)中的茈半抗原的化学名称为 γ -氧代-1-茈丁酸, 分子量为 302, 分

子结构式如下：



[0019] 所述步骤(2)中的有机溶剂是N,N-二甲基甲酰胺(DMF)。

[0020] 本发明的一种芘人工免疫原PY-BSA的用途,通过免疫动物制备成芘特异性抗体,能与芘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芘,便于进行现场监测。

[0021] 由于芘是小分子物质,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酰基化反应使芘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,从而制备出芘人工免疫原。

附图说明

[0022] 图1是芘人工免疫原PY-BSA的紫外光谱图,

[0023] 其中BSA为牛血清白蛋白,PY为芘半抗原,PY-BSA为芘人工免疫原。

[0024] 具体实施方法

[0025] 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。

[0026] 实施例1

[0027] (1) 芘半抗原的合成

[0028] 干燥烧瓶中加入26ml二氯甲烷、0.95g(9.5mmol)丁二酸酐($M_r = 100.07\text{g/mol}$)、2g(9.8mmol)芘($M_r = 202.26\text{g/mol}$),待固体全部溶解后用冰-盐浴冷却反应体系至 -5°C 。分三次将2.8g无水 AlCl_3 ($M_r = 133.34\text{g/mol}$)加入反应瓶中,恒温反应0.5h,再于 25°C 反应24h。反应完毕,反应物用盐酸调pH值至2,然后加NaOH调pH值至10,回流3h。过滤,滤液用盐酸调pH值至2。所得粗产物经冰乙酸重结晶,活性炭脱色,干燥得到淡黄色粉末状芘半抗原,熔点为 $183 \sim 185^\circ\text{C}$ 。

[0029] (2) 芘半抗原的鉴定

[0030] 取少许上述合成的芘半抗原,用溴化钾压片后红外光谱扫描,结果如下 $[\nu(\text{cm}^{-1})]$: 3040, 2923, 1695, 1666, 1507, 1405, 1213, 844。与文献报道的芘的红外光谱比较,半抗原的红外谱图中有明显的羰基($\text{C}=\text{O}$)吸收峰,即 1695cm^{-1} 的吸收峰为羧酸的羰基峰, 1666cm^{-1} 的吸收峰为靠近芘环的羰基峰,说明芘分子上已经引入了羧基,可以与蛋白质分子偶联。

[0031] 将芘半抗原用氘代DMSO溶解,测定样品的核磁共振氢谱($^1\text{H NMR}$),结果如下(δ , DMSO): 2.7736(2H, t, $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 3.5(2H, t, $-\text{COCH}_2-$), 8.1262 ~ 8.7758(m, 9H, Ar-H), 12.2512(s, 1H, $-\text{COOH}$), 氢谱鉴定的结果表示:在芘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。

[0032] (3) 芘免疫原的合成

[0033] 在10mL茄形瓶中加入60.4mg(0.2mmol)步骤(1)中半抗原,再加入无水

DMF600 μ L, 冰浴, 磁搅拌, 有机酸迅速溶解。10min 内缓慢滴加 N, N' - 二环己基碳酰亚胺 (DCC) 61.8mg (0.3mmol) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 34.5mg (0.3mmol) 的无水 DMF600 μ L 溶液。塞紧瓶塞, 冰浴, 磁搅拌 4h, 得活化脂。在 25mL 烧杯中加入 134mg (0.002mmol) BSA, 加入 5mLPBS (pH7.4) 将其溶解, 在强烈搅拌下 10min 内缓慢滴加活化酯, 滴加完毕后, 4℃磁力搅拌反应 20h。4000 转离心 30min, 取上层清液放入透析袋, 用 PBS (pH 7.4) 透析。每透析 24 小时换一次 PBS, 并测定其紫外吸收, 待已基本无紫外吸收, 可以确认已透析完全。将透析袋内的液体倒入离心管, 8000 转离心 30min, 取上层澄清液体, 即得到芑人工抗原 PY-BSA; 分装后 -20℃保存。

[0034] (4) 芑免疫原的鉴定

[0035] 常用的鉴定人工免疫原结合比的方法是紫外光谱法。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。

[0036] 由紫外光谱图 (图 1), 可知, 偶联物的紫外曲线具备了 BSA 和半抗原的特征峰。而偶联物曲线较 BSA 和半抗原特征峰又有略微的偏移。偶联物图谱中位于 214nm 处的吸收峰介于 BSA 的 208nm 处吸收峰和半抗原的 224nm 处吸收峰之间。偶联物在 356nm 处的吸收峰较半抗原有 3nm 的红移。这说明偶联物紫外谱图较 BSA 和半抗原的谱图确实发生了变化。因此, 可以判断偶联物中蛋白质偶联上了半抗原。

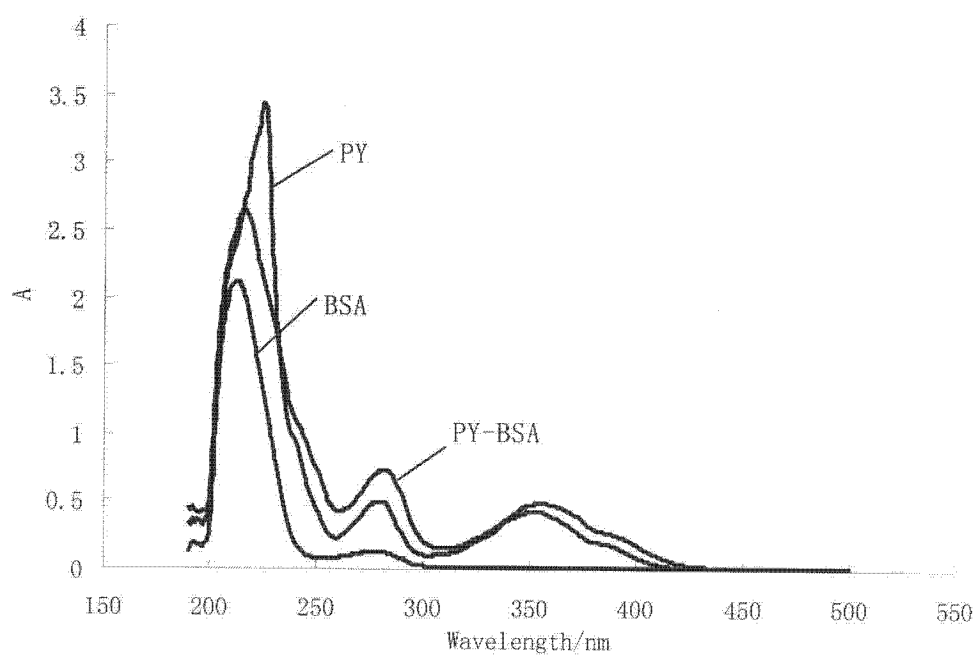


图 1

专利名称(译)	一种芘人工免疫原PY-BSA的制备方法及其用途		
公开(公告)号	CN102241764A	公开(公告)日	2011-11-16
申请号	CN201110115016.3	申请日	2011-05-05
[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 陈洪岩		
发明人	李方实 陈洪岩		
IPC分类号	C07K14/765 C07K1/113 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种芘人工免疫原PY-BSA及其制备方法和用途，制备(1)以丁二酸酐、芘、无水三氯化铝为原料，冰浴反应半小时，然后于25°C反应24h。加盐酸终止反应，再加NaOH回流，过滤，滤液中加入盐酸，重结晶，活性炭脱色，干燥，得淡黄色芘半抗原；(2)以芘半抗原、N-羧基琥珀酸亚胺和N，N'-二环己基碳酰亚胺为原料，DMF为溶剂，冰浴下搅拌反应4小时。然后将所得活化酯加入到牛血清白蛋白(BSA)的磷酸盐缓冲液中，4°C下反应20小时，透析后离心分出上清液，制得到芘人工免疫原PY-BSA。本发明制备简便，成本低；芘人工免疫原PY-BSA通过动物制备成芘特异性抗体，从而用于环境中痕量芘的检测与监控。

