

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810079538.0

[43] 公开日 2009年4月1日

[11] 公开号 CN 101397340A

[22] 申请日 2008.10.9

[21] 申请号 200810079538.0

[71] 申请人 河北大学

地址 050021 河北省保定市五四东路180号

[72] 发明人 赵志磊 李小亭 吴广臣 王庭欣

庞艳苹 刘峥颢 夏立娅

[74] 专利代理机构 石家庄汇科专利商标事务所

代理人 王琪

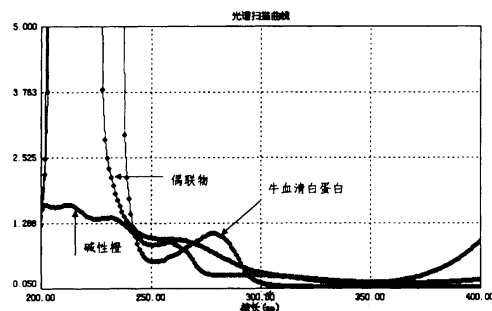
权利要求书3页 说明书8页 附图2页

[54] 发明名称

碱性橙人工抗原合成及抗体制备方法

[57] 摘要

本发明属于抗原、抗体的制备方法，专用于非食用色素碱性橙特异性识别、及研制碱性橙的速测免疫试剂盒。包括碱性橙人工抗原合成及其抗体的制备方法，主要以戊二醛为偶联剂分别与牛血清白蛋白和卵清蛋白合成免疫抗原和包被抗原，并将免疫抗原注射到新西兰大白兔体内，制备出高效价的碱性橙抗体，该抗体稳定性好，效价高，为碱性橙酶联免疫试剂盒的研制解决了技术难点，该方法实用性强，抗原抗体制备过程无需高价值设备，可操作性强，适于大规模生产。



1、碱性橙人工抗原合成方法，其特征在于包括如下工艺步骤：

A、免疫抗原合成

取 150-250 毫克牛血清白蛋白，15-20 毫克碱性橙，浓度为 50%的戊二醛溶液 1-2 毫升，分别将其溶于 4-6 毫升浓度为 0.1 摩尔/升、pH=7.4 的磷酸缓冲液、0.2-0.3 毫升甲醇及 1-2 毫升浓度为 0.1 摩尔/升、pH=7.4 的磷酸缓冲液；以戊二醛为偶联剂，将牛血清白蛋白溶液和碱性橙溶液混匀后滴加戊二醛溶液，于室温下放置 1 小时，在 4°C 下放置 15-20 小时，高速离心 12-20 分钟，上清液转入透析袋，于 0.01 摩尔/升、pH=7.4 磷酸缓冲液中在 4°C 透析 5-7 天，每天更换两次透析液，透析完毕分装成 1 毫升/管，-20°C 冻存。

2、根据权利要求 1 所述的碱性橙人工抗原合成方法，其特征在于还包括步骤 B，该步骤的工艺过程如下：

B、包被抗原合成

取 150-250 毫克卵清蛋白，15-20 毫克碱性橙，浓度为 50%的戊二醛溶液 1-2 毫升，分别将其溶于 4-6 毫升浓度为 0.1 摩尔/升、pH= 7.4 的磷酸缓冲液、0.2-0.3 毫升甲醇及 1-2 毫升浓度为 0.1 摩尔/升、pH=7.4 磷酸缓冲液；以戊二醛为偶联剂，将卵清蛋白溶液和碱性橙溶液混匀后滴加戊二醛溶液，于室温下放置 1 小时，在 4°C 下放置 15-20 小时，高速离心 12-20 分钟，上清液转入透析袋，于浓度为 0.01 摩尔/升、pH=7.4 的磷酸缓冲液中 4°C 透析 5-7 天，每天更换两次透析液，透析完毕分装，-20°C 冻存。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的碱性橙人工抗原合成方法，其特征在于所述的步骤 A、B 中的离心转速为 4000 转/分钟。

4、根据权利要求 1 所述的碱性橙人工抗原的抗体制备方法，其特征在于选健康雄兔，用免疫抗原免疫实验动物，免疫前观察一周，并分别采血制备阴性血清。

5、根据权利要求 4 所述的碱性橙人工抗原的抗体制备方法，其特征在于免疫实验动物是将分装好的免疫抗原用生理盐水稀释成 1-2 毫克/毫升的浓度，取 1-2 毫克免疫抗原加 1 毫升生理盐水，再加等量弗氏完全佐剂混匀为乳化剂，于兔子的背部皮下多点注射进行首免；2 周后，取同样量免疫抗原加弗氏不完全佐剂乳化后进行背部皮下多点注射，为加强免疫；采用同样的操作方法重复免疫 4 次，每次隔 2 周；在免疫后采血制备抗血清。

6、根据权利要求 4 所述的碱性橙人工抗原的抗体制备方法，其特征在于所述的采血前 24 小时使兔子禁食，在第四次加强免疫后第 7-10 天，兔耳缘静脉采血 30-50 毫升，分装于 5 支 10 毫升试管中，于 25℃ 下静置 4 小时，使血球凝固，用针剥离血球于试管壁，再置 4℃ 冰箱中过夜收凝，以 4000 转/分钟离心 10-15 分钟，分离后的抗血清置于 4℃ 冰箱待纯化。

7、根据权利要求 6 所述的碱性橙人工抗原的抗体制备方法，其特征在于所述的血清纯化采用 50%饱和硫酸铵沉淀法。

8、根据权利要求 7 所述的碱性橙人工抗原的抗体制备方法，其特征在于所述的 50%饱和硫酸铵沉淀法是用生理盐水将抗血清稀释一倍，然后在搅拌条件下缓慢加入等量饱和硫酸铵，溶液中出现白色沉淀，于 4℃ 冰箱中放置过夜，高速离心沉淀 30 分钟，上清液为清蛋白部分，弃去不要，沉淀物中加入原抗血清量 2 倍的生理盐水，待充分溶解后，再加入 33%饱和度的饱和硫酸铵，进行第二次沉淀，如此再重复二次，使沉淀物达到完全白色为止；沉淀物以原

抗血清量 1/5-1/10 的生理盐水溶解，置透析袋中去盐，浓缩后分装，冻存。

9、根据权利要求 4 或 5 所述的碱性橙人工抗原的抗体制备方法，其特征在于所述的兔子为 4-6 月龄、体重 2-3 公斤的健康雄性新西兰大白兔。

10、根据权利要求 2 所述的碱性橙人工抗原合成方法，其特征在于抗体效价的测定包括：

(a) 包被：采用 0.85 摩尔/升、pH=9.6 的碳酸盐缓冲液将包被抗原稀释到 5 微克/毫升，在酶标板上用移液枪每孔加入 150 微升，然后 4°C 过夜；

(b) 洗涤：用含 0.05%吐温 80 的 0.01 摩尔/升、pH=7.4 磷酸缓冲液为洗涤液，洗酶标板 3 遍，200 微升 1/孔，每次间隔 3 分钟，在吸水纸上拍干；

(c) 封闭：加入 1%的卵清蛋白封闭液 150 微升 1/孔，37°C 孵育 2 小时后拍干；

(d) 加样：加入事先系列稀释好的抗体，100 微升/孔，37°C 孵育 2 小时；

(e) 洗涤：用洗液洗 3 遍，200 微升/孔，每次间隔 3 分钟，在吸水纸上拍干；

(f) 加酶标二抗：加入羊抗兔酶标抗体(1000 倍稀释)100 微升/孔，37°C 孵育 1 小时；洗板 5 次；

(g) 显色：加入 100 微升邻苯二胺显色液，37°C 显色 10 分钟；

(h) 终止：加入 2 摩尔/升的硫酸 50 微升/孔，酶标仪读取各孔吸光值；
判定标准：阳性血清与阴性血清的比值 2 :1 的血清稀释倍数为血清效价。

碱性橙人工抗原合成及抗体制备方法

技术领域

本发明属于抗原、抗体的制备方法，专用于非食用色素碱性橙特异性识别、及研制碱性橙的速测免疫试剂盒。

背景技术

碱性橙是一种偶氮类碱性染料，俗名“王金黄”，化学名为 2, 4 二胺基偶氮苯，分子式为 $C_{12}H_{12}N_4 \cdot HCl$ 。主要用于纺织品、皮革制品及木制品的染色。根据美国卫生研究所(NIH)化学品健康与安全数据库资料表明：摄取、吸入以及皮肤接触该物质均会造成急性和慢性的中毒伤害，有确凿的动物实验数据表明，该物质为致癌物。根据《中华人民共和国食品添加剂使用卫生标准》(GB2760)及《中华人民共和国食品卫生法》的相关规定，为禁止用作食品添加剂的化学制品。由于碱性橙比其它水溶性染料如柠檬黄、日落黄等更易于在鲜海鱼和豆制品上染色且不易褪色，因此一些不法商贩用碱性橙对食品进行染色，以次充好，以假乱真，极大危害了消费者的身心健康。

目前已有的检测方法主要是高效液相色谱法，但是该方法虽然检出限低，但需要消耗大量有机试剂，污染环境，样品前处理程序复杂，且不能满足大批量食品的快速检测。

酶联免疫技术是二十世纪六十年代发展起来的新技术，现在已广泛应用于快速、微量检测农药残留。该方法可定性定量检测食品中微量残留有害物质，且对仪器要求不高，操作快速简单，无需对样品进行复杂的前处理，灵敏度高，特异性强，适用于大量样本快速检测，但尚未见应用于非食用色素的检测报道，实现酶联免疫检测的关键是合成碱性橙人工抗原和抗体。碱性

橙的分子量较小，是只有反应原性而无免疫原性的半抗原，不能直接刺激动物产生抗体，只有和载体蛋白连接后才能转化为既有反应原性又有免疫原性的完全抗原，刺激动物产生抗体，碱性橙本身含有氨基，因此可以以此基团为基础将碱性橙分子和蛋白分子链接起来。

发明内容

本发明的目的在于以戊二醛为偶联剂，合成了碱性橙人工抗原，并以此为基础制备了碱性橙抗体。

本发明的整体技术方案是：碱性橙人工抗原合成方法，包括如下工艺步骤：

A、免疫抗原合成

取 150-250 毫克牛血清白蛋白，15-20 毫克碱性橙，浓度为 50%的戊二醛溶液 1-2 毫升，分别将其溶于 4-6 毫升浓度为 0.1 摩尔/升、pH=7.4 的磷酸缓冲液、0.2-0.3 毫升甲醇及 1-2 毫升浓度为 0.1 摩尔/升、pH=7.4 的磷酸缓冲液；以戊二醛为偶联剂，将牛血清白蛋白溶液和碱性橙溶液混匀后滴加戊二醛溶液，于室温下放置 1 小时，在 4°C 下放置 15-20 小时，高速离心 12-20 分钟，上清液转入透析袋，于 0.01 摩尔/升、pH=7.4 磷酸缓冲液中在 4°C 透析 5-7 天，每天更换两次透析液，透析完毕分装成 1 毫升/管，-20°C 冻存保存；

碱性橙人工抗原的抗体的制备方法是：选健康雄兔，用免疫抗原免疫实验动物，免疫前观察一周，并分别采血制备阴性血清。

本发明碱性橙人工抗原合成方法，还包括包被抗原的合成步骤 B，该步骤的工艺流程如下：

取 150-250 毫克卵清蛋白, 15-20 毫克碱性橙, 浓度为 50%的戊二醛溶液 1-2 毫升, 分别将其溶于 4-6 毫升浓度为 0.1 摩尔/升、pH= 7.4 的磷酸缓冲液、0.2-0.3 毫升甲醇及 1-2 毫升浓度为 0.1 摩尔/升、pH=7.4 磷酸缓冲液; 以戊二醛为偶联剂, 将卵清蛋白溶液和碱性橙溶液混匀后滴加戊二醛溶液, 于室温下放置 1 小时, 在 4°C下放置 15-20 小时, 高速离心 12-20 分钟, 上清液转入透析袋, 于浓度为 0.01 摩尔/升、pH=7.4 的磷酸缓冲液中 4°C透析 5-7 天, 每天更换两次透析液, 透析完毕分装, -20°C冻存保存。

优选的技术方案是所述的步骤 A、B 中的离心转速为 4000 转/分钟。

所述碱性橙人工抗原的抗体制备具体方法是: 免疫实验动物是将分装好的免疫抗原用生理盐水稀释成 1-2 毫克/毫升的浓度, 取 1-2 毫克免疫抗原加 1 毫升生理盐水, 再加等量弗氏完全佐剂混匀为乳化剂, 于兔子的背部皮下多点注射进行首免; 2 周后, 取同样量免疫抗原加弗氏不完全佐剂乳化后进行背部皮下多点注射, 为加强免疫; 采用同样的操作方法重复免疫 4 次, 每次隔 2 周; 在免疫后采血制备抗血清。

优选的技术方案是, 为防止血脂过高, 采血前 24 小时使兔子禁食, 在第四次加强免疫后第 7-10 天, 兔耳缘静脉采血 30-50 毫升, 分装于 5 支 10 毫升试管中, 于 25°C下静置 4 小时, 使血球凝固, 用针剥离血球于试管壁, 再置 4°C冰箱中过夜收凝, 以 4000 转/分钟离心 10-15 分钟, 分离后的抗血清置于 4°C冰箱待纯化。

上述血清纯化采用 50%饱和硫酸铵沉淀法。

50%饱和硫酸铵沉淀法是用生理盐水将抗血清稀释一倍, 然后在搅拌条件下缓慢加入等量饱和硫酸铵, 溶液中出现白色沉淀, 于 4°C冰箱中放置过夜,

高速离心沉淀 30 分钟，上清液为清蛋白部分，弃去不要，沉淀物中加入原抗血清量 2 倍的生理盐水，待充分溶解后，再加入（半量）33%饱和度的饱和硫酸铵，进行第二次沉淀，如此再重复二次，使沉淀物达到完全白色为止；沉淀物以原抗血清量 1/5-1/10 的生理盐水溶解，置透析袋中去盐，浓缩后分装，冻存。

优选的实验动物（健康雄兔）采用 4-6 月龄、体重 2-3 公斤的健康雄性新西兰大白兔。

人工抗原的鉴定：

用 0.1 摩尔/升 pH 7.4 磷酸缓冲液将牛血清白蛋白、卵清蛋白及其偶联物适当稀释溶解，以磷酸缓冲液为空白；碱性橙用甲醇溶解，以甲醇为空白在 200-400 纳米下进行紫外扫描，绘制紫外吸收光谱曲线。

根据公式 $K=A/CL$ 计算偶联物、牛血清白蛋白、卵清蛋白的摩尔消光系数，在载体蛋白和碱性橙的最大吸收波长处检测偶联物的光吸收值。按公式 1 计算偶联物中的摩尔比，

$$\text{公式 1 } C_a/C_b = (A_{\text{偶}259} \times K_{\text{BSA}278} - A_{\text{偶}278} \times K_{\text{BSA}259}) / (A_{\text{偶}278} \times K_{\text{碱性橙}259} - A_{\text{偶}278} \times K_{\text{碱性橙}278})$$

将偶联物适当稀释后，测定 280 纳米和 260 纳米的吸光度值，按公式 2 计算蛋白的浓度即偶联物的浓度：

$$\text{公式 2 : 蛋白质 (摩尔/升 g/摩尔/升 l)} = 1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260}$$

戊二醛对偶联效果的影响结果如图 1、2 所示：

表 1 半抗原，载体蛋白及偶联物的紫外光谱扫描结果分析

	259 纳米	吸光系数	278 纳米	吸光系数
碱性橙	0.412	10115.8	0.17	4174
牛血清白蛋白	0.577	22601.4	1.017	39836.4
卵清蛋白	0.72	17564	1.126	27463.4
牛血清白蛋白偶联物	0.441		0.332	
卵清蛋白偶联物	0.256		0.179	

碱性橙、牛血清白蛋白、卵清蛋白的浓度分别为 10.13 微克/毫升、1.736 微克/毫升、1.763 微克/毫升，用紫外分光光度计扫描后半抗原与载体蛋白偶联后所形成的完全抗原具备两者的紫外吸收特征，由图 1、2 可知从而定性的确定由戊二醛为偶联剂的半抗原和载体蛋白成功偶联，碱性橙和载体蛋白的吸收峰分别为 259 纳米，278 纳米，免疫抗原和包被抗原的偶联比分别为 6.6 和 5.2。

抗体效价的测定：

(a) 包被：采用 0.85 摩尔/升、pH=9.6 的碳酸盐缓冲液将包被抗原稀释到 5 微克/毫升，在酶标板上用移液枪每孔加入 150 微升，然后 4℃过夜；

(b) 洗涤：用含 0.05%吐温 80 的 0.01 摩尔/升、pH=7.4 磷酸缓冲液为洗涤液，洗酶标板 3 遍，200 微升 1/孔，每次间隔 3 分钟，在吸水纸上拍干；

(c) 封闭：加入 1%的卵清蛋白封闭液 150 微升 1/孔，37℃孵育 2 小时后拍干；

(d) 加样：加入事先系列稀释好的抗体，100 微升/孔，37℃孵育 2 小时；

(e) 洗涤：用洗液洗 3 遍，200 微升/孔，每次间隔 3 分钟，在吸水纸上

拍干；

(f) 加酶标二抗：加入羊抗兔酶标抗体(1000 倍稀释)100 微升/孔，37℃孵育 1 小时；洗板 5 次；

(g) 显色：加入 100 微升邻苯二胺显色液，37℃显色 10 分钟；

(h) 终止：加入 2 摩尔/升的硫酸 50 微升/孔，酶标仪读取各孔吸光值。

判定标准：阳性血清与阴性血清的比值 2 :1 的血清稀释倍数为血清效价。

结果显示碱性橙抗体效价为 12000。

本发明所取得的实质性特点和显著的技术进步在于：

1、碱性橙人工抗原及其抗体的实用性强。碱性橙抗原及抗体的合成具有重要使用价值和实用意义，为碱性橙酶联免疫试剂盒的研制解决了一个技术难点，为实现碱性橙的快速检测开辟了道路。

2、合成的抗原抗体的稳定性好，在 4℃下贮藏 3 个月或在-18℃贮藏 1 年仍保持活性。

3、抗原及抗体的制备技术简单易行，制备过程中无需特殊高价值设备，易实现工厂化生产。

附图说明

图 1 是半抗原，偶联物和牛血清白蛋白的紫外吸收光谱曲线谱

图 2 是半抗原，偶联物和卵清蛋白的紫外吸收光谱曲线谱

具体实施方式

以下结合本发明的实施例作进一步描述，但不作为对本发明的限定。

本实施例的整体技术构思如下：

1、碱性橙人工抗原合成方法，包括如下工艺步骤：

A、免疫抗原合成

取 150 毫克牛血清白蛋白，15 毫克碱性橙，浓度为 50%的戊二醛溶液 1-2 毫升，分别将其溶于 4-6 毫升浓度为 0.1 摩尔/升、pH=7.4 的磷酸缓冲液、0.2-0.3 毫升甲醇及 1-2 毫升浓度为 0.1 摩尔/升、pH=7.4 的磷酸缓冲液；以戊二醛为偶联剂，将牛血清白蛋白溶液和碱性橙溶液混匀后滴加戊二醛溶液，于室温下放置 1 小时，在 4℃下放置 15-20 小时，高速离心 12-20 分钟，上清液转入透析袋，于 0.01 摩尔/升、pH =7.4 磷酸缓冲液中在 4℃透析 5-7 天，每天更换两次透析液，透析完毕分装成 1 毫升/管，-20℃冻存；

B、包被抗原合成

取 150-250 毫克卵清蛋白，15-20 毫克碱性橙，浓度为 50%的戊二醛溶液 1-2 毫升，分别将其溶于 4-6 毫升浓度为 0.1 摩尔/升、pH= 7.4 的磷酸缓冲液、0.2-0.3 毫升甲醇及 1-2 毫升浓度为 0.1 摩尔/升、pH=7.4 磷酸缓冲液；以戊二醛为偶联剂，将卵清蛋白溶液和碱性橙溶液混匀后滴加戊二醛溶液，于室温下放置 1 小时，在 4℃下放置 15-20 小时，高速离心 12-20 分钟，上清液转入透析袋，于浓度为 0.01 摩尔/升、pH=7.4 的磷酸缓冲液中 4℃透析 5-7 天，每天更换两次透析液，透析完毕分装-20℃冻存。

步骤 A、B 中的离心转速为 4000 转/分钟。

碱性橙人工抗原的抗体制备方法是：选健康雄兔，用免疫抗原免疫实验动物，免疫前观察一周，并分别采血制备阴性血清。

免疫实验动物是将分装好的免疫抗原用生理盐水稀释成 1-2 毫克/毫升的浓度，取 1-2 毫克免疫抗原加 1 毫升生理盐水，再加等量弗氏完全佐剂混匀为乳化剂，于兔子的背部皮内多点注射进行首免；2 周后，取同样量免疫抗原

加弗氏不完全佐剂乳化后进行背部皮下多点注射，为加强免疫；采用同样的操作方法重复免疫4次，每次隔2周；在免疫后采血制备抗血清。

采血前24小时使兔子禁食，在第四次加强免疫后第7-10天，兔耳缘静脉采血30-50毫升，分装于5支10毫升试管中，于25℃下静置4小时，使血球凝固，用针剥离血球于试管壁，再置4℃冰箱中过夜收凝，以4000转/分钟离心10-15分钟，分离后的抗血清置于4℃冰箱待纯化。

血清纯化采用50%饱和硫酸铵沉淀法。50%饱和硫酸铵沉淀法是用生理盐水将抗血清稀释一倍，然后在搅拌条件下缓慢加入等量饱和硫酸铵，溶液中出现白色沉淀，于4℃冰箱中放置过夜，高速离心沉淀30分钟，上清液为清蛋白部分，弃去不要，沉淀物中加入原抗血清量2倍的生理盐水，待充分溶解后，再加入33%饱和度的饱和硫酸铵，进行第二次沉淀，如此再重复二次，使沉淀物达到完全白色为止。沉淀物以原抗血清量1/5-1/10的生理盐水溶解，置透析袋中去盐，浓缩后分装，冻存。

健康雄兔选用4-6月龄、体重2-3公斤的健康雄性新西兰大白兔。

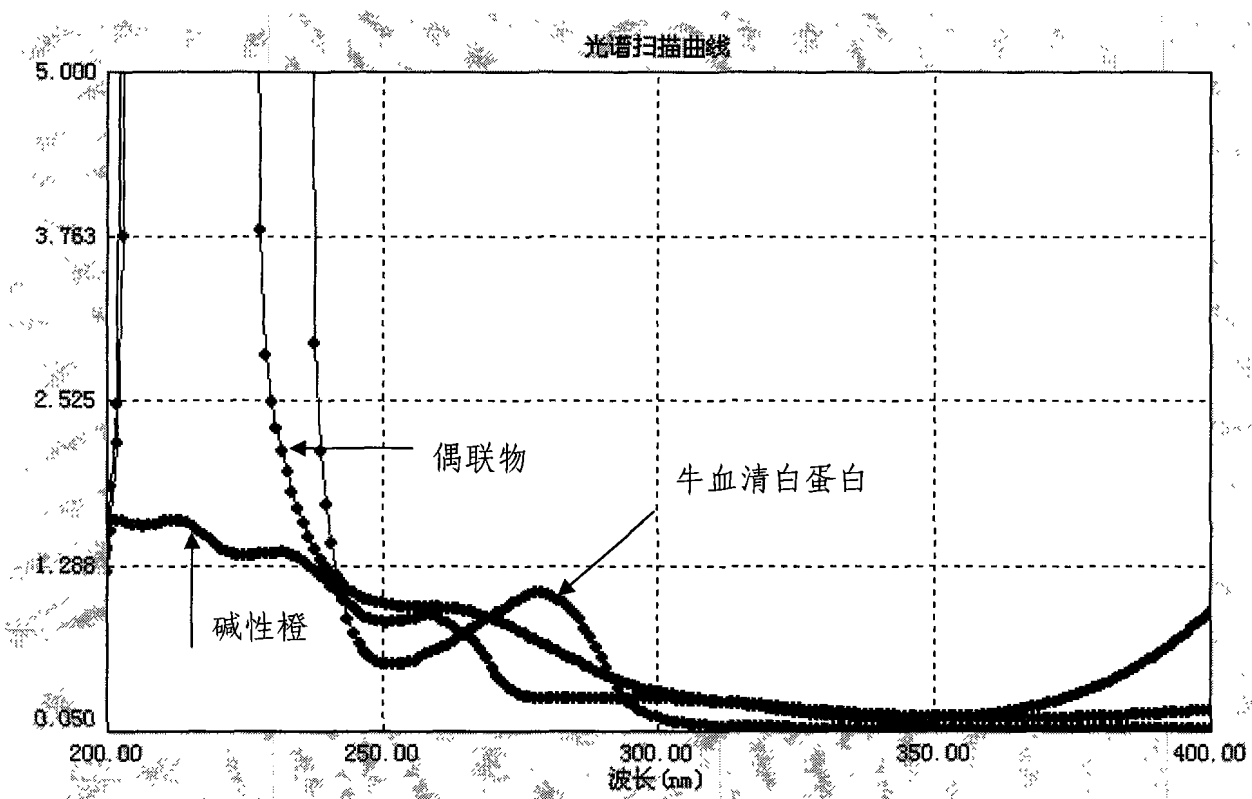


图 1

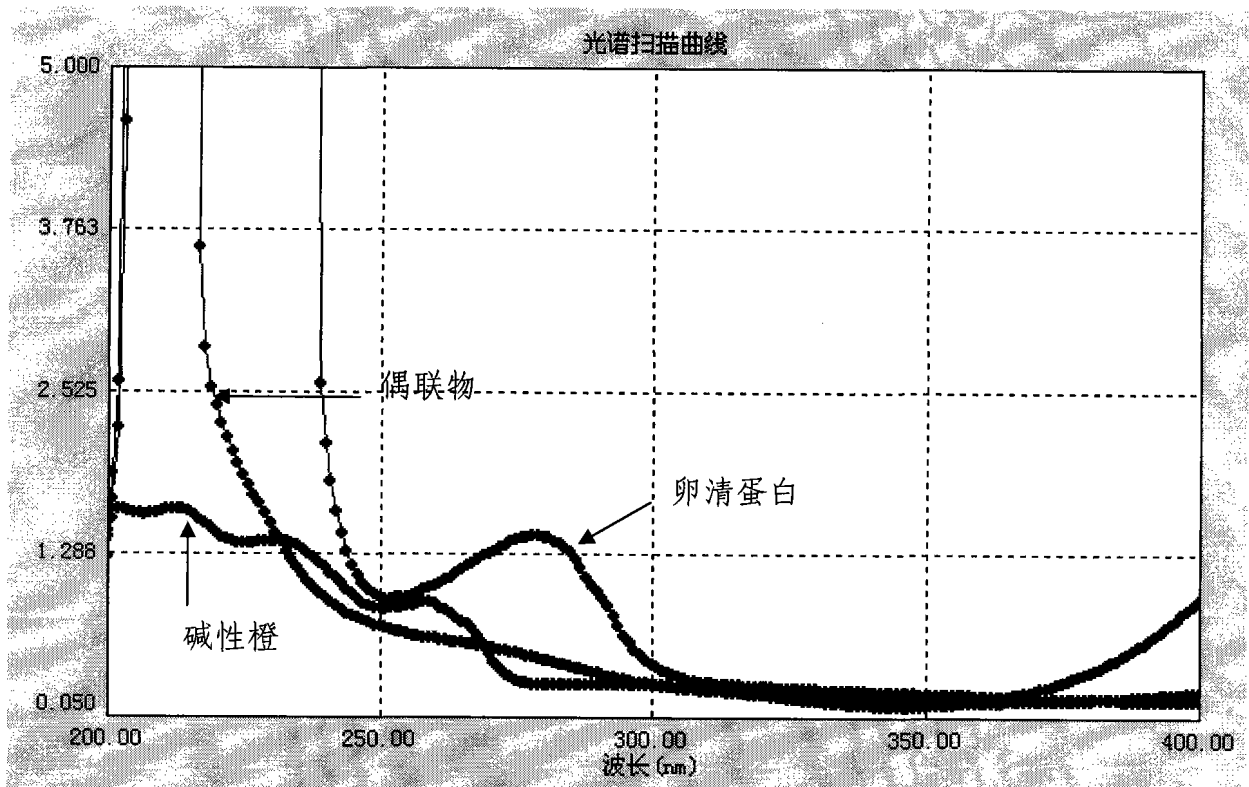


图 2

专利名称(译)	碱性橙人工抗原合成及抗体制备方法		
公开(公告)号	CN101397340A	公开(公告)日	2009-04-01
申请号	CN200810079538.0	申请日	2008-10-09
[标]申请(专利权)人(译)	河北大学		
申请(专利权)人(译)	河北大学		
当前申请(专利权)人(译)	河北大学		
[标]发明人	赵志磊 李小亭 吴广臣 王庭欣 庞艳萃 刘峥颖 夏立娅		
发明人	赵志磊 李小亭 吴广臣 王庭欣 庞艳萃 刘峥颖 夏立娅		
IPC分类号	C07K14/765 C07K16/44 G01N33/53		
代理人(译)	王琪		
其他公开文献	CN101397340B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于抗原、抗体的制备方法，专用于非食用色素碱性橙特异性识别、及研制碱性橙的速测免疫试剂盒。包括碱性橙人工抗原合成及其抗体的制备方法，主要以戊二醛为偶联剂分别与牛血清白蛋白和卵清蛋白合成免疫抗原和包被抗原，并将免疫抗原注射到新西兰大白兔体内，制备出高效价的碱性橙抗体，该抗体稳定性好，效价高，为碱性橙酶联免疫试剂盒的研制解决了技术难点，该方法实用性强，抗原抗体制备过程无需高价值设备，可操作性强，适于大规模生产。

