[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 14/77 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710170882.6

[43] 公开日 2008 年 6 月 11 日

[11] 公开号 CN 101195658A

[22] 申请日 2007.11.23

[21] 申请号 200710170882.6

[71] 申请人 东华大学

地址 201620 上海市松江区松江新城区人民北路 2999 号

[72] 发明人 庄惠生 周 纯

[74] 专利代理机构 上海泰能知识产权代理事务所

代理人 黄志达 谢文凯

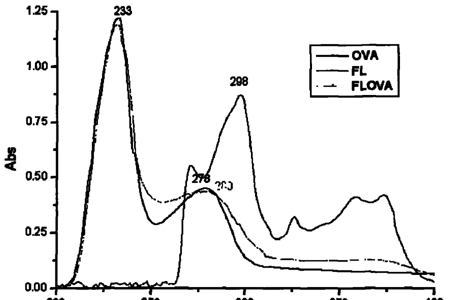
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

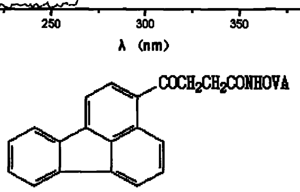
[54] 发明名称

一种荧蒽包被原 FL－OVA 及制备和用途

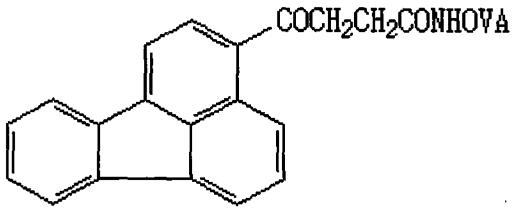
[57] 摘要

本发明涉及一种荧蒽包被原 FL－OVA 及制备和应用，其结构式如下，制备包括：(1)将丁二酸酐、荧蒽、无水三氯化铝按摩尔比 1∶1∶2.2 投料，溶解于硝基苯中，冰浴反应，加入稀盐酸终止，分离出的有机层用稀盐酸水洗后，旋转蒸发除去硝基苯，重结晶干燥。(2)取溶有荧蒽半抗原的有机溶剂，依次加入正丁胺与氯甲酸异丁酯，室温或4℃下搅拌反应2－4 小时；将上述反应液逐滴滴入用 PBS 溶解的蛋白质溶液中，4℃反应1－4 小时，透析后离心分出上清液，即得免疫原 FL－OVA 偶联物，柱提纯，加入等量甘油－20℃下冻干保存。本发明制备简便，成本低，容易工业化生产；荧蒽人工包被原，通过免疫动物制备成荧蒽特异性抗体，用于现场检测水体、土壤及大气中痕量的荧蒽。





1. 一种荧蒽包被原 FL-OVA，其结构式如下：



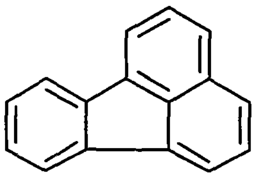
其中 OVA 是卵清蛋白。

2. 一种荧蒽包被原 FL-OVA 的制备方法，包括以下步骤：

（1）荧蒽半抗原的合成：将丁二酸酐、荧蒽、无水三氯化铝按摩尔比 1:1:2.2 投料，并溶解于硝基苯中，得到无色溶液，冰浴下搅拌反应，在 0-4℃冰浴下，7-8 小时，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，得到黄色固体粉末；在甲醇-乙醚中重结晶获得黄色晶体状的荧蒽半抗原，干燥后得纯品。

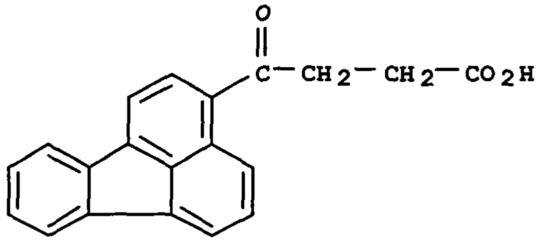
（2）荧蒽人工包被原的合成：取溶有荧蒽半抗原的有机溶剂，依次加入正丁胺与氯甲酸异丁酯，室温或 4℃下搅拌反应 2-4 小时；将上述反应液逐滴滴入用 PBS 溶解的蛋白质溶液中，4℃反应 1-4 小时，反应完毕，将溶液装入透析袋，用蒸馏水或 pH6.8-7.4 PBS 缓冲溶液或 0.9%的生理盐水透析 5d；透析后离心分出上清液，即得免疫原 FL-OVA 偶联物，经过柱提纯后，加入等量甘油-20℃下冻干保存。

3. 根据权利要求 2 所述的一种荧蒽包被原 FL-OVA 的制备方法，其特征在于，所述步骤（1）中的荧蒽的分子结构式为：



。

4. 根据权利要求 2 所述的一种荧蒽包被原 FL-OVA 的制备方法，其特征在于，所述步骤（1）中的荧蒽半抗原的化学名称为荧蒽丁酸-γ-氧，分子量为 302，分子结构式如下：



。

5. 根据权利要求 2 所述的一种荧蒽包被原 FL-OVA 的制备方法，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）或二甲基亚砜（DMSO）。

6. 根据权利要求 2 所述的一种荧蒽包被原 FL-OVA 的制备方法，其特征在于，所述步骤（2）中所述的半抗原、正丁胺、氯甲酸异丁酯、蛋白质摩尔比 1:1-4:1-3:0.005-0.05。

7. 一种荧蒽包被原 FL-OVA 的用途，通过免疫动物制备成荧蒽特异性抗体，能与荧蒽发生特异性免疫反应的免疫球蛋白 IgG，用于现场检测水体、土壤及大气中的痕量的荧蒽。

一种荧蒽包被原FL-OVA及制备和用途

技术领域

本发明属荧蒽的多克隆抗体领域，特别是涉及一种荧蒽包被原 FL-OVA 及制备和用途。

背景技术

多环芳烃（Polycyclic Aromatic Hydrocarbons，PAHs）指两个以上苯环连在一起的化合物，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等有机污染日益严重，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，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，多环芳烃类化合物就占7种，在这些多环芳烃中检出率最高的是苯并[b]荧蒽、荧蒽和苯并[k]荧蒽，检出率分别为59%, 48% 和 46%。

荧蒽是多环芳烃中较常见的物质，存在于煤焦油的蒽油馏份中，经分馏精制而得，可用做非磁性金属表面探伤荧光剂，也可用于制造合成染料和药物等。纯品荧蒽为白色或黄绿色针状或片状结晶，能溶于乙醇、二硫化碳及苯等有机溶剂中。目前对荧蒽的检测主要采用高效液相色谱和气相色谱等分析方法，这些方法虽然准确可靠，可是由于对样品的预处理复杂、耗时且需要大量有机溶剂萃取，并且在之后的检测过程中要用到精密昂贵的检测仪器而不适于推广使用，也不利于当环境污染事故发生在野外时的现场快速检测。因而寻求一种快速、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。

20 世纪 60 年代发展起来的免疫分析（Immmunoassay ，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应用，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，满足简单、快速、灵敏地检测环境激素的要求。1985年美国Cetus公司的K.B.Mullis和R.K.Saiki等发明了一种特异

性DNA体外扩增技术，这个方法实质是体外酶促合成特异性DNA片断，又称无细胞分子克隆系统，将这一技术称为Polymerase Chain Reaction简称PCR，即聚合酶链式反应。1992年Sano等将免疫分析技术与PCR技术相结合，新研究出来的免疫PCR技术由于兼具了免疫分析技术特异性强和PCR技术灵敏度高的优点，因而将在环境微量痕量污染物的检测中会有很好的应用前景。

目前尚未见有用免疫分析方法检测荧蒽的报道，更没有见用免疫PCR技术检测荧蒽的相关报道。而合格的荧蒽抗原是免疫得到合格荧蒽抗体的前提，合格的荧蒽抗体是建立荧蒽免疫检测方法的关键，有关荧蒽抗原抗体的制备，国内外还未见报道。

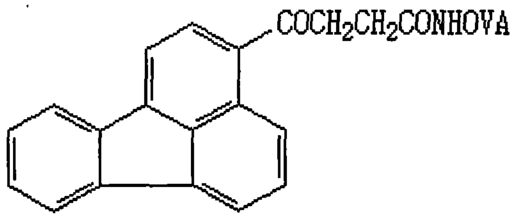
发明内容

要解决的技术问题

本发明要解决的技术问题是提供一种荧蒽包被原FL-OVA及制备和用途，以克服现有检测技术中对荧蒽样品预处理复杂、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于推广使用和不利于当环境污染事故发生在野外时的现场快速检测等缺点。

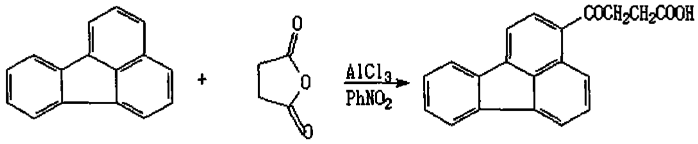
技术方案

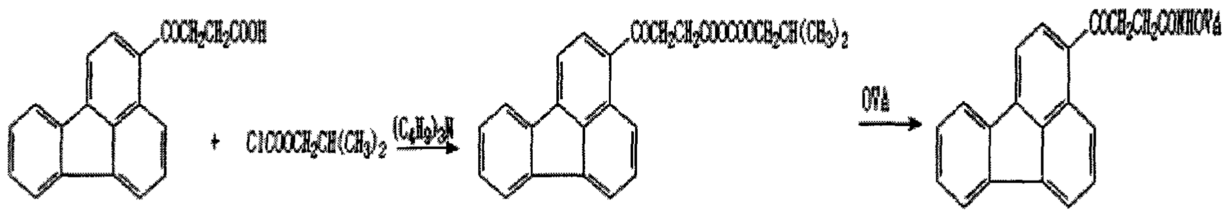
本发明的一种荧蒽包被原FL-OVA，其结构式如下：



其中OVA是卵清蛋白。

本发明的一种荧蒽包被原FL-OVA的制备，采用混合酸酐法合成荧蒽人工包被原，其反应方程式如下：

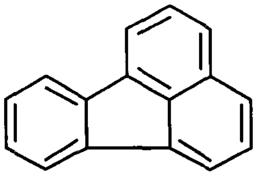




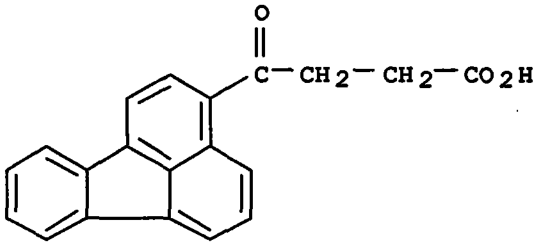
本发明的一种荧蒽包被原 FL-OVA 的制备方法，包括以下步骤：

（1）荧蒽半抗原的合成：将丁二酸酐、荧蒽、无水三氯化铝三者按摩尔比 1:1:2.2 投料，并溶解于硝基苯中，得到无色溶液，冰浴下搅拌反应，整个反应在 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，得到黄色固体粉末；在甲醇-乙醚中重结晶获得黄色晶体状的荧蒽半抗原，干燥后得纯品。

（2）荧蒽人工包被原的合成：取一定量溶有荧蒽半抗原的有机溶剂，依次加入正丁胺与氯甲酸异丁酯，室温或 4℃下搅拌反应 2-4 小时；将上述反应液逐滴滴入用 PBS 溶解的蛋白质溶液中，4℃反应 1-4 小时，其中所述的半抗原、正丁胺、氯甲酸异丁酯、蛋白质四者摩尔比为 1:1-4:1-3:0.005-0.05；反应完毕，将溶液装入透析袋，用蒸馏水或 pH6.8-7.4 PBS 缓冲溶液或 0.9％的生理盐水透析 5d；透析后离心分出上清液，即得免疫原 FL-OVA 偶联物，经过柱提纯后，加入等量甘油-20℃下冻干保存。

所述步骤（1）中的荧蒽的分子结构式为：。

所述步骤（1）中的荧蒽半抗原的化学名称为荧蒽丁酸-γ-氧，分子量是 302，分子结构式如下：



。

所述步骤（2）中的有机溶剂是 N’N-二甲基甲酰胺（DMF）或二甲基亚砜（DMSO）。

本发明的一种的荧蒽包被原 FL-OVA 的用途，利用上述方法合成的荧蒽人工包被原，

通过免疫动物制备成荧蒽特异性抗体，它是能与荧蒽发生特异性免疫反应的免疫球蛋白IgG，可用于检测水体、土壤及大气中的痕量的荧蒽，便于进行现场监测。

由于荧蒽是小分子物质，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分子直接结合的氨基，羟基，羧基等基团，故本发明先通过Friedel-Crafts酰基化反应使荧蒽分子带上一个四个碳链长的羧基，然后用活化酯法和混合酸酐法将这个含羧基的半抗原分子与蛋白质分子偶联制备出荧蒽的人工抗原，再利用此抗原对新西兰大白兔进行免疫，获得对应的高效价、高特异性的的荧蒽多克隆抗体，此抗体将应用于建立免疫PCR分析方法以检测环境中荧蒽。

有益效果

本发明所制备的荧蒽特异性抗体具有如下优点：

（1） 实用性强：荧蒽的多克隆抗体制备技术具有重要的使用价值和实际意义，制备的抗体特异性好、效价高，以抗原抗体免疫学反应为基础可用于样品测定；此抗体及其制备方法为免疫PCR法测定环境中痕量的荧蒽提供保障，也为多环芳烃荧蒽快速检测试剂盒的研制解决了一大技术难点。

（2） 稳定性好：本发明制备的荧蒽抗体具有较好的稳定性。

（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

图1是荧蒽人工包被原的紫外光谱图：

其中OVA为卵清蛋白，FL为荧蒽半抗原，FL-OVA为荧蒽人工包被原。

具体实施方式

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。

实施例1

（1） 荧蒽半抗原的合成

称取1.0 g（10 mmol）丁二酸酐溶于30 mL的硝基苯中，得到无色溶液，另称取3 g（22 mmol）无水三氯化铝和2.02 g（10 mmol）的荧蒽置于装有20 mL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，30 min 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黄色固体粉末；在甲醇-乙醚中重结晶获得黄色晶体状的荧蒽半抗原，熔点为196-200℃。

（2）荧蒽半抗原的鉴定

取上述合成的荧蒽半抗原少许，用溴化钾压片后红外光谱扫描，结果如下[υ (cm^{-1})]：2660（w O-H），1710(s C=O)，1610，1490， 1430(s C=C),812(s Ar-H)。与文献报导的荧蒽的红外光谱比较，半抗原的红外光谱图中有明显的羰基（-COOH）吸收峰，说明荧蒽分子上已经引入了羧基，它可以与蛋白质分子偶联。

将荧蒽半抗原用二甲亚砜（DMSO）溶解，测定样品的核磁共振氢谱（^{1}HNMR），结果如下(δ,DMSO):2.66(t，2H，CH_2-H)，3.40(t，2H，CH_2-H)，7.44-8.72(m，9H，Ar-H)，12.18(s，1H，COOH-H)，氢谱鉴定的结果表示：在荧蒽分子结构中成功引入了羧基，可与蛋白质偶联合成人工抗原。

荧蒽半抗原的质谱峰（MS，70ev）m/z 出现在302（59 M^+）229（100），201（44），100（25）处，也与目的产物半抗原结构相符合。

（3）荧蒽包被原的合成

称取步骤（1）中所合成的荧蒽半抗原 60.4 mg（0.2 mmol）置于洁净干燥的小锥形瓶中，加入200 μL DMF 溶解，依次加入等摩尔 20 μL（0.2 mmol）正丁胺与 25 μL（0.2 mmol）氯甲酸异丁酯，4℃磁力搅拌反应 2 h；称取 60 mg OVA 溶于 5 mL CBS，将上述反应液200 μL 慢慢滴入小锥形瓶中，4 ℃反应 4 h；反应完毕，用蒸馏水透析 2 d，生理盐水透析 3 d，离心分出上清液，即得到荧蒽人工全抗原 FL-OVA；加入等量的甘油-20℃下保存，或-20℃冻干保存。

（4）荧蒽包被原的鉴定

常用的鉴定人工包被原结合比的方法是紫外光谱法，按常规来说，只要人工包被原的紫外光谱图与原蛋白载体和半抗原的紫外图谱相比发生了变化，即可间接说明人工包被原成功合成。

由紫外光谱图可知，半抗原荧蒽 FL 在 298 nm 处有特征吸收峰，蛋白质 OVA 在 278 nm 处有最大吸收峰，而所合成的荧蒽包被原 FL-OVA 的特征吸收峰在 280 nm 处，与蛋白质 OVA 和半抗原 FL 比较都发生了移动，具备有半抗原和蛋白质的吸收特征。

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，根据吸收峰可确定偶联是否成功。

结合比计算公式如下：

$$结合比=\frac{\varepsilon_{\text{conjugate}}-\varepsilon_{\text{protein}}}{\varepsilon_{\text{hapten}}}=\frac{(OD_{conjugate}-OD_{protein})\times C_{hapten}\times M_{protein}}{OD_{hapten}\times M_{hapten}\times C_{protein}}$$

计算合成的荧蒽包被原的结合比分别为 12.8，该结合比值在文献所建议的范围之内，证明合成的荧蒽包被原比较理想。

实施例 2

（1）荧蒽抗血清的制备

制备成年的雄性新西兰白每组三只（编号 I 、II和III），体重约 2-2.5Kg，饲养于标准实验动物房（由上海松江农林职业技术学校动物房饲养），每只兔子单笼饲养，观察一周后免疫。

将实施例 1 中所合成的荧蒽包被原慢慢解冻，用 0.9%生理盐水或 PBS 稀释至 1mg/mL，按免疫剂量吸入 5mL 消毒注射器中，首次免疫加入等量弗氏完全佐剂（CFA），用聚氯乙烯塑胶管连接另一支 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。

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。首次注射免疫后，间隔四周，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、颈下多点及腿部肌肉注射加强免疫，免疫剂量为每公斤兔体重 2mg。从第三次开始，每次免疫后 7 天，于兔耳缘静脉采 1mL 血，分离血清，测定抗体效价；当达到一定效价后，采全血。本试验采用兔颈动脉采血法，每只兔子可采血约 60mL 左右，采血后，收集在 100mL 的三角烧瓶中，待血液凝固后，用针头将三角烧瓶边缘的血块与三角烧瓶分离，置于 37℃培养箱中 30min；再放于 4℃冰箱中 3-4 小时，等血块收缩后，用吸管将血清吸入离心管中，以 4000rpm 离心 15min，分离出血清，于-20℃保存； I 号兔得血清 23mL， II 号兔得血清 23mL，III号兔得血清 23mL。

（2）荧蒽抗体效价的测定

将免疫原按制定的免疫方案免疫 3 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 1mL 血，血清经适当稀释后，用试管凝集法、琼脂双向扩散法和荧光免疫法测定抗体效价；待第五次免疫，有兔子获得了较高的效价，试管凝集实验测得的效价分别为：1:320，1:640，1:640；琼脂双向扩散法测得的效价分别为 1:32，1:64，1:64；荧光免疫法测得效价分别是：1:25600，1:51200，1:51200。

（3）荧蒽抗体的纯化和鉴定

荧蒽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相吸附纯化血清，纯化荧蒽抗体冻干后于-20℃保存。

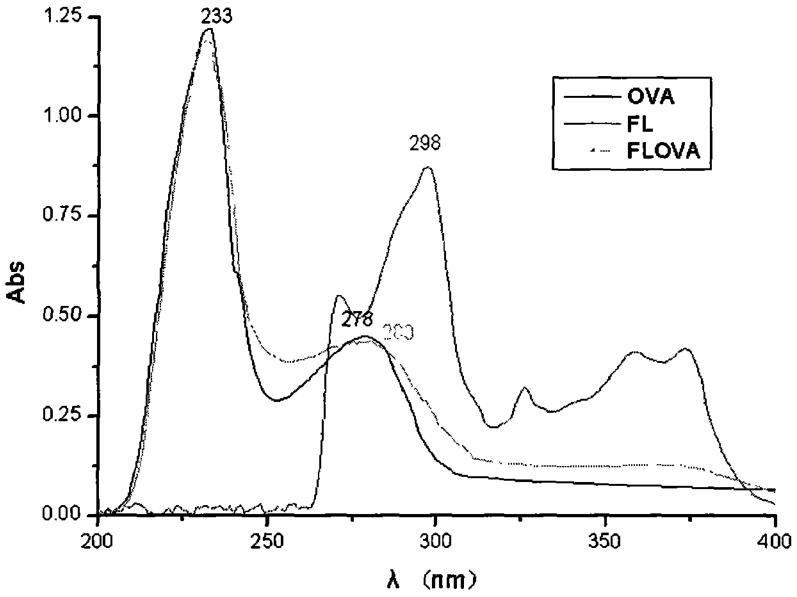
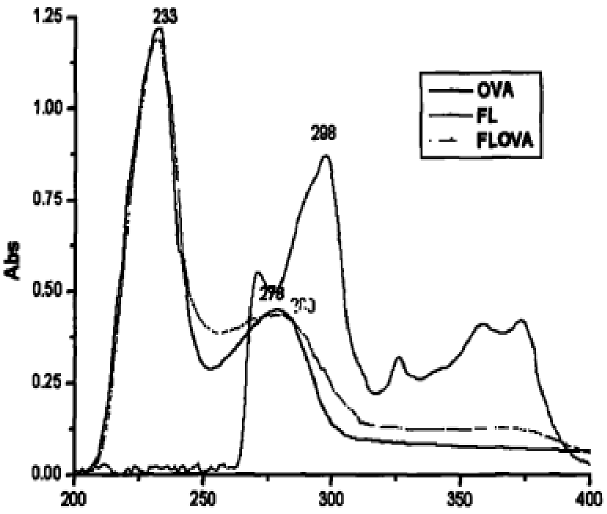

1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
Abs
200
250
300
350
400
λ (nm)
233
298
278
OVA
FL
FLOVA

图 1

patsnap

专利名称(译)	一种荧蒽包被原FL - OVA及制备和用途		
公开(公告)号	CN101195658A	公开(公告)日	2008-06-11
申请号	CN200710170882.6	申请日	2007-11-23
[标]申请(专利权)人(译)	东华大学		
申请(专利权)人(译)	东华大学		
当前申请(专利权)人(译)	东华大学		
[标]发明人	庄惠生 周纯		
发明人	庄惠生 周纯		
IPC分类号	C07K14/77 G01N33/531 G01N33/53		
代理人(译)	黄志达 谢文凯		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种荧蒽包被原FL - OVA及制备和应用，其结构式如下，制备包括：(1)将丁二酸酐、荧蒽、无水三氯化铝按摩尔比1:1:2.2投料，溶解于硝基苯中，冰浴反应，加入稀盐酸终止，分离出的有机层用稀盐酸水洗后，旋转蒸发除去硝基苯，重结晶干燥。(2)取溶有荧蒽半抗原的有机溶剂，依次加入正丁胺与氯甲酸异丁酯，室温或4℃下搅拌反应2 - 4小时；将上述反应液逐滴滴入用PBS溶解的蛋白质溶液中，4℃反应1 - 4小时，透析后离心分出上清液，即得免疫原FL - OVA偶联物，柱提纯，加入等量甘油 - 20℃下冻干保存。本发明制备简便，成本低，容易工业化生产；荧蒽人工包被原，通过免疫动物制备成荧蒽特异性抗体，用于现场检测水体、土壤及大气中痕量的荧蒽。