



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108129412 A

(43)申请公布日 2018.06.08

(21)申请号 201711431980.0

C07K 14/795(2006.01)

(22)申请日 2017.12.26

C07K 14/415(2006.01)

(71)申请人 华南农业大学

C12N 9/26(2006.01)

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

(72)发明人 沈玉栋 何凡 邹婷婷 徐振林
杨金易 王弘 韦晓群 孙远明
雷红涛(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 林丽明

(51)Int.Cl.

C07D 263/26(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

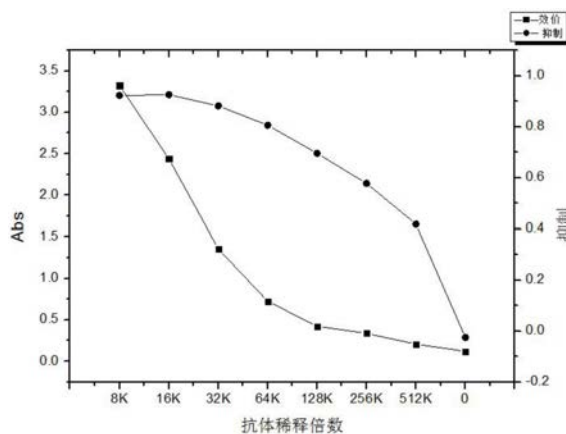
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

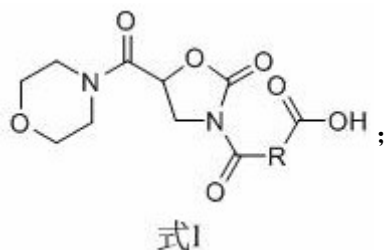
一种5-甲基吗啉-3-氨基-2-噻烷基酮抗原、
抗体及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种5-甲基吗啉-3-氨基-2-噻烷基酮抗原、抗体及其制备方法与应用。本发明首先对5-甲基吗啉-3-氨基-2-噻烷基酮分子结构进行改造,包括引入羰基结构使半抗原手臂结构自由旋转度下降,使半抗原呈现构象限定性以及增加结构复杂性等等,使得分子的特征结构更好的被免疫动物所识别,从而可大大增加制备抗体的成功几率。并以此基础制备了5-甲基吗啉-3-氨基-2-噻烷基酮人工抗原和抗体,效价高、检测效率高;克服了传统仪器法存在周期长、专业性强、成本高,不适宜现场大批量快速检测等缺点问题。本发明的抗原抗体合成过程简单、成本低,为开发出成本低廉、检测效率高、操作简便的酶联免疫快速检测工具,奠定了基础,应用前景好。



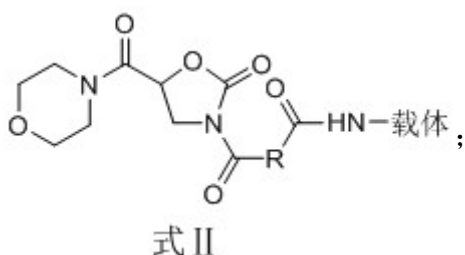
1. 一种5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原,其特征在于,具有式I所示结构:



其中,R为 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 。

2. 权利要求1所述5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原在制备5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮人工抗原或抗体方面的应用。

3. 一种5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮人工抗原,其特征在于,由权利要求1所述半抗原与大分子载体偶联得到的,具有式II所示结构:



其中,R为 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 。

4. 根据权利要求3所述的人工抗原,其特征在于,结构式中的载体为牛血清蛋白、 α -淀粉酶、藻蓝素、伴刀豆球蛋白 A或卵清蛋白。

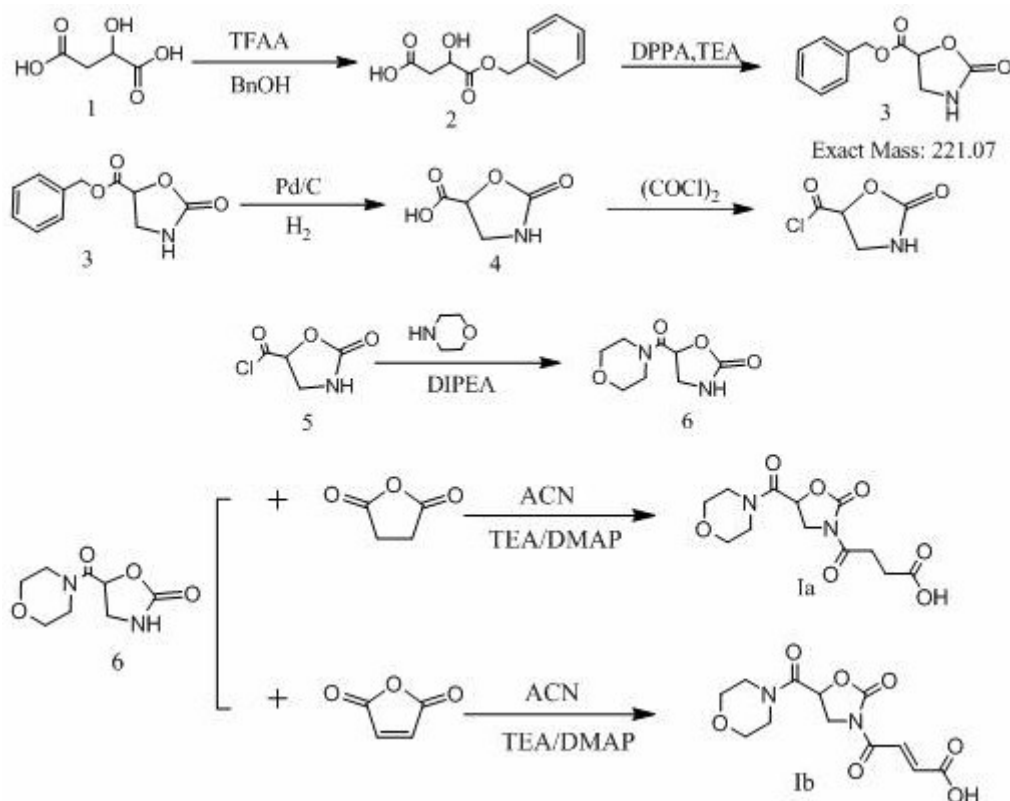
5. 权利要求3或4所述5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮人工抗原在制备抗5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮抗体方面的应用。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述抗体为多克隆抗体、单克隆抗体或者基因工程抗体。

7. 一种抗5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮抗体,其特征在于,是以权利要求3或4所述人工抗原为免疫原和包被原制备得到。

8. 权利要求7所述抗体在免疫法检测5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮中的应用。

9. 权利要求1所述5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:先使DL-苹果酸和三氟乙酸酐反应,然后除去溶剂得到油状物,在油状物中加入适量的苯醇,室温搅拌反应以制备中间体2;将中间体2与三乙胺和DPPA发生反应制备中间体3,再加入10%的钨碳反应得到中间体4;再将中间体4与草酰氯反应制备中间体5;在三乙胺存在的条件下,吗啡啉和中间体5反应以制备中间体6;以乙腈为溶剂,依次加入中间体6、三乙胺和DMAP,再向混合物中加入丁二酸酐或马来酸酐,搅拌反应,即可制备半抗原Ia或Ib,其反应式为:



10. 权利要求3或4所述5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮人工抗原的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:将5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原、DCC和NHS溶于适量的DMF中,4℃搅拌反应过夜,离心取上清即得活化好的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原衍生物;将活化好的半抗原衍生物逐滴加入到含有5mg/mL大分子载体的PBS缓冲溶液中,4℃搅拌反应12h,4℃用PBS透析3天,每天更换透析液3次,得到5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮人工抗原,分装,并低温保存备用;所述的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原与载体蛋白的的摩尔比为40~100:1。

一种5-甲基吗啉-3-氨基-2-噻烷基酮抗原、抗体及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于药物检测技术领域。更具体地,涉及一种5-甲基吗啉-3-氨基-2-噻烷基酮抗原、抗体及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 呋喃它酮(furaltadone),属于硝基呋喃类药物,是一类人工合成的广谱抗菌药物,在动物体内的代谢物是5-甲基吗啉-3-氨基-2-噻烷基酮(AMOZ)。因为呋喃它酮能够干扰细菌体内的氧化还原酶系统,破坏细菌的糖代谢,使整个代谢系统紊乱,从而很好的起到杀菌作用。其作为一种药效显著的广谱抗菌药物,曾广泛应用于畜禽及水产养殖业,以治疗由大肠杆菌或沙门氏菌所引起的肠炎、疥疮、赤鳍病、溃疡病等或者作为促进水产动物生长的添加剂。呋喃它酮原药经动物服用后,在体内的代谢速度很快,一般数个小时就能转化成代谢物AMOZ,AMOZ能与动物体内蛋白质结合成稳定的残留物,在体内的代谢时间很长,当动物体内的这类药物残留量达到一定量时,会出现一系列的毒性症状,主要表现出腹泻、胃肠出血、周围神经炎、瘫痪、惊厥等反应,严重的造成动物死亡。另外,这类残留在动物体内的呋喃它酮代谢物通过我们普通的食物加工过程较难消除,如长时间的蒸煮、微波加热、烧烤等方式,都无法使其降解。当我们食用含有这类药物残留的食物后,残留物在人体酸性的胃液环境中释放,被人体吸收,进一步对人体的健康产生危害,如果长时间的蓄积则会诱导产生致畸、致癌和致突变等病变。最后,呋喃它酮原药本身也是一种致癌性较强的药物,能引起人体DNA一定程度的损伤以及真核细胞的诱变。

[0003] 由于呋喃它酮及其代谢物的残留给人体及环境造成的危害之大,全球许多国家对它的使用做了限制。欧盟于1995年规定在动物性食品中禁止使用此类药物,并不得检出,在2007年将这类药物列为违禁药物。2010年,我国发布了《食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂名单(第四批)》的通知,明确将硝基呋喃类药物呋喃唑酮、呋喃它酮、呋喃妥因及呋喃西林列入可能违法添加的非食用物质名单。但是由于硝基呋喃类药物价格便宜且药效好,目前在畜牧、禽和水产养殖业中还在大范围的使用。同时也出现了相应的食品安全事件,如2015年,山东食品药品监督管理局在抽检的肉及肉制品中检出呋喃它酮代谢物。2017年,国家食药监局11月9日通报,该局抽检了鲜活水产品607批次,检出不合格样品66批次,其中硝基呋喃代谢物不合格样品16批次。针对以上情况,对于加强水产品等肉制品中的呋喃它酮类物质的检测亟不可待。因呋喃它酮在动物体内代谢快,若对其残留量进行检测,结果必定不够准确,而其代谢物因能和动物体内的蛋白形成稳定的结合物,所以检测其代谢物比检测原药更有意义。

[0004] 目前常见的代谢物的检测方法有高效液相色谱技术及其联用技术、分光光度法、液相色谱—紫外法、原子吸收法、薄层色谱法等。然而,高昂的仪器设备,复杂繁琐的样品前处理,高额的检测成本以及需要专业人员操作使得上述方法越来越难以满足当前愈发高强度的食品安全监管的需求。因此建立快速、便捷的呋喃它酮类残留检测方法显得十分必要。

基于抗原-抗体特异性识别的酶联免疫分析方法 (ELISA) 具有快速、灵敏、准确等优点, 特别适用于现场进行高通量检测。另外, ELISA 因其能弥补仪器法的上述不足, 已在食品安全检测中发挥了重要作用。大多数农兽药、毒素、环境污染物分子量较小 (<1000Da), 属于有反应原性而无免疫原性的小分子, 但如果将小分子连接到具有免疫原性的大分子上, 做成人工抗原, 就可能使机体产生免疫应答, 产生针对小分子结构的抗体。因为不是任何小分子与大分子载体连接都能产生特异性抗体, 所以小分子半抗原结构的设计非常重要。对于半抗原结构的选择, 如果小分子待测物本身含有 $-NH_2$, $-COOH$, $-OH$, $-SH$ 等功能基团, 可直接活化后偶联载体蛋白, 便可合成人工完全抗原。虽然 5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮含有 $-NH_2$ 活性基团, 但基于其结构为柔性线性结构, 较为简单, 不利于特异性抗体的产生。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服上述现有技术的缺陷和不足, 提供一种 5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮 (AM0Z) 结构限定性半抗原, 同时提供由所述半抗原偶联载体蛋白制备的人工抗原, 以及免疫实验动物后使机体产生特异的针对 5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮的抗体。

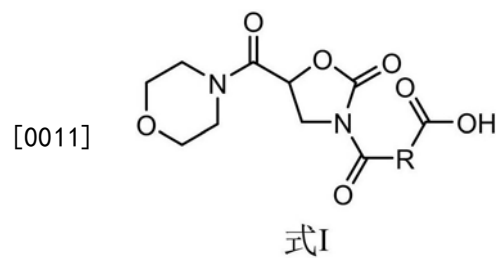
[0006] 本发明的目的是提供一种 5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原。

[0007] 本发明另一目的是提供一种 5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮人工抗原。

[0008] 本发明的再一目的是提供所述 5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原、人工抗原及其制备的抗体在免疫检测 5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮含量中的应用。

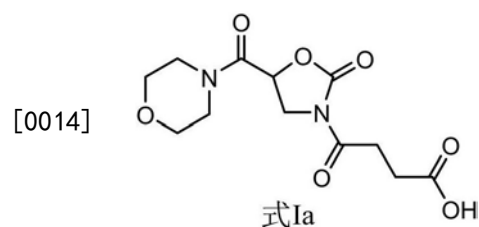
[0009] 本发明上述目的通过以下技术方案实现:

[0010] 一种 5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原, 具有式 I 所示结构:

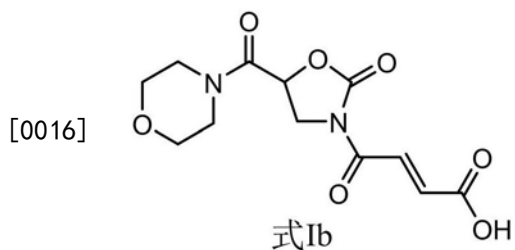


[0012] 其中, R 为 $-CH_2-CH_2-$ 和 $-CH=CH-$ 。

[0013] 当 R 为 $-CH_2-CH_2-$ 时, 所述的 5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原的结构如式 Ia 所示:

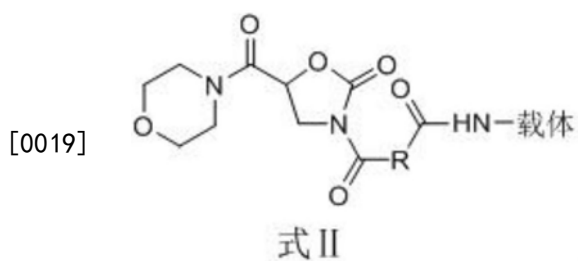


[0015] 当 R 为 $-CH=CH-$ 时, 所述的 5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原的结构如式 Ib 所示:



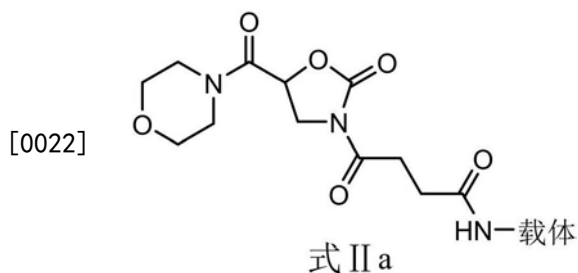
[0017] 所述5-甲基吗啉-3-氨基-2-噻烷基酮半抗原在制备5-甲基吗啉-3-氨基-2-噻烷基酮人工抗原或抗体方面的应用,也在本发明的保护范围之内。

[0018] 一种5-甲基吗啉-3-氨基-2-噻烷基酮人工抗原,由上述半抗原与大分子载体偶联得到的,具有式II所示结构:

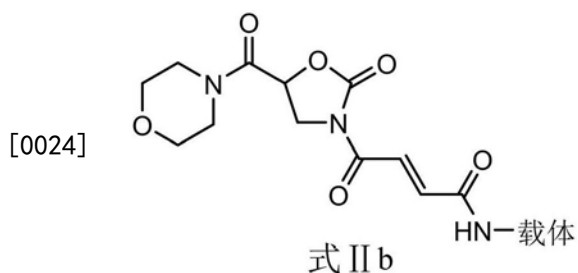


[0020] 其中,R为 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 。

[0021] 当R为 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 时,所述5-甲基吗啉-3-氨基-2-噻烷基酮人工抗原的结构如式IIa所示:



[0023] 当R为 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 时,所述5-甲基吗啉-3-氨基-2-噻烷基酮人工抗原的结构如式IIb所示:



[0025] 优选地,结构式中的载体为牛血清蛋白(BSA)、 α -淀粉酶、藻蓝素、伴刀豆球蛋白A(ConA)或卵清蛋白(OVA)。其中,BSA、 α -淀粉酶、藻蓝素和ConA用于制备免疫原,OVA用于制备包被原。

[0026] 所述5-甲基吗啉-3-氨基-2-噻烷基酮人工抗原在制备抗5-甲基吗啉-3-氨基-2-噻烷基酮抗体方面的应用,也应在本发明的保护范围之内。

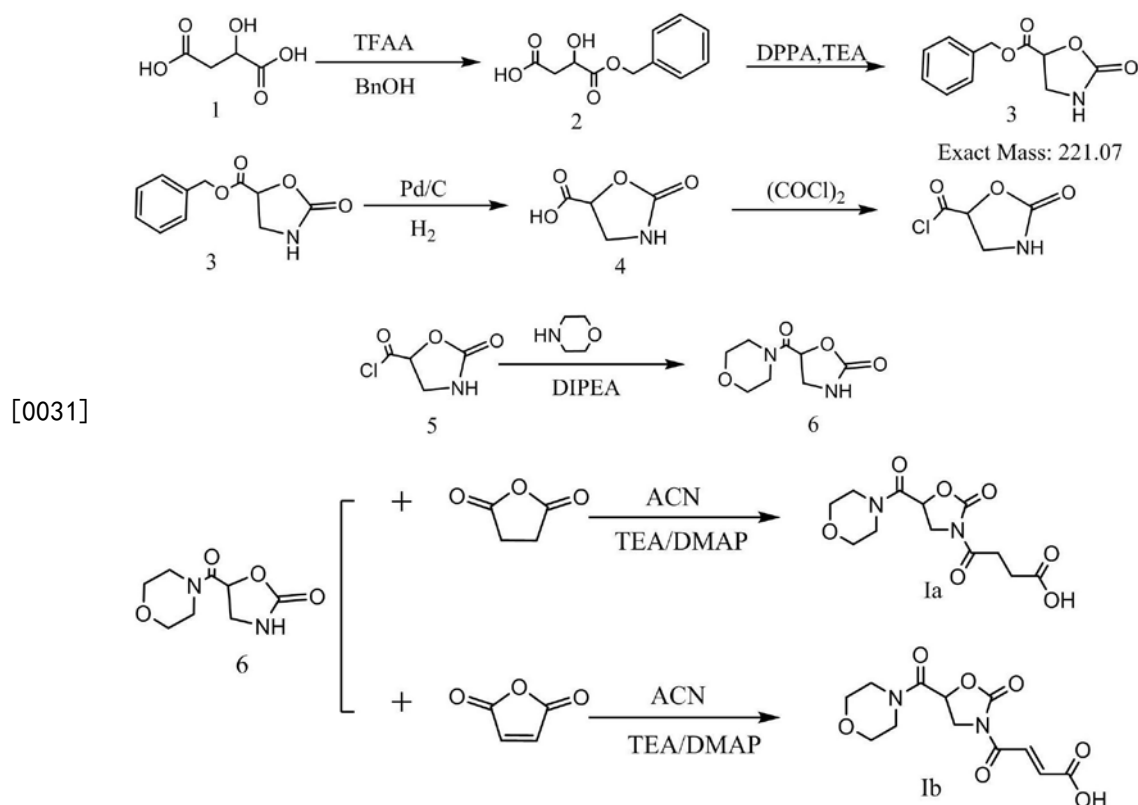
[0027] 所述抗体为多克隆抗体、单克隆抗体或者基因工程抗体。

[0028] 一种以上述人工抗原为免疫原和包被原制备得到的抗5-甲基吗啉-3-氨基-2-噻

烷基酮抗体,也在本发明的保护范围之内。

[0029] 以及所述抗体在免疫法检测5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮中的应用,也在本发明的保护范围之内。

[0030] 另外,本发明上述提供的所述5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原的制备方法,包括如下步骤:先使DL-苹果酸和三氟乙酸酐反应,然后除去溶剂得到油状物,在油状物中加入适量的苄醇,室温搅拌反应以制备中间体2;将中间体2与三乙胺和DPPA发生反应制备中间体3,再加入10%的钯碳反应得到中间体4;再将中间体4与草酰氯反应制备中间体5;在三乙胺存在的条件下,吗啡啉和中间体5反应以制备中间体6;以乙腈为溶剂,依次加入中间体6、三乙胺和DMAP,再向混合物中加入丁二酸酐或者马来酸酐,搅拌反应,即可制备半抗原Ia或Ib,其反应式为:



[0032] 在所述5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原的制备方法中,5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原Ia的制备方法中的关键因素如下:

[0033] (1) DL-苹果酸、三氟乙酸酐和苄醇的摩尔比为1:2~3:2,DL-苹果酸和三氟乙酸酐先在0℃下搅拌反应1小时,室温搅拌反应3小时。然后蒸干三氟乙酸酐,油泵抽真空去除过量的溶剂;再加入苄醇,室温搅拌反应3h,反应完成后,将混合物倒入乙酸乙酯中,用饱和碳酸氢钠溶液进行提取,合并水相。水相用乙酸乙酯洗涤,然后调节PH到2,用乙酸乙酯萃取,合并有机相,干燥,蒸干溶剂得到油状产品即中间体2,不经纯化进行下一步反应;

[0034] (2) 中间体2、三乙胺和DPPA的摩尔比为1:1~1.5:1~1.5,溶剂甲苯,混合物在氮气保护下加热到80℃,反应4小时。蒸干溶剂,残留物溶于乙酸乙酯,用碳酸氢钠饱和溶液洗涤,用无水硫酸钠干燥,蒸干溶剂后,用石油醚/乙酸乙酯过柱得到中间体3;

[0035] (3) 中间体3和钯碳的摩尔比为:5~6:1,溶剂甲醇,氢气氛围下搅拌反应过夜,过滤,旋干得到中间体4;

[0036] (4) 中间体4和草酰氯的摩尔比为:1:2,溶剂二氯甲烷,催化剂DMF,室温搅拌反应2小时。旋干溶剂,并用二氯甲烷带干残留的溶剂得到浅棕色固体酰氯即中间体5,将中间体5溶于二氯甲烷待用;

[0037] (5) 吗啡啉、三乙胺摩尔比为:1:3,先将吗啡啉和三乙胺溶于二氯甲烷中,再加入上述准备好的酰氯溶液,搅拌反应3小时。蒸干溶剂,然后用反相Flash制备,冻干后得到淡黄色液体即中间体6;

[0038] (6) 中间体6、三乙胺和丁二酸酐的摩尔比为:1:4:2,混合物室温搅拌反应两小时,用制备高效液相色谱纯化,冻干后得到白色固体,即半抗原Ia。

[0039] 在所述5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原的制备方法中,5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原Ib的制备方法中的关键因素:中间体6、三乙胺和马来酸酐的摩尔比为:1:4:1,混合物室温搅拌反应两小时,用制备高效液相色谱纯化,冻干后得到白色固体,即半抗原Ib。

[0040] 另外,所述5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮人工抗原的制备方法,包括如下步骤:

[0041] 将5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原、DCC和NHS溶于适量的DMF中,4℃搅拌反应过夜,离心取上清即得活化好的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原衍生物;将活化好的半抗原衍生物逐滴加入到含有5mg/mL大分子载体的PBS缓冲溶液中,4℃搅拌反应12h,4℃用PBS透析3天,每天更换透析液3次,得到5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮人工抗原,分装,并低温保存备用;所述的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原与载体蛋白的摩尔比为40~100:1。

[0042] 另外,一种直接检测5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮的快速免疫分析方法,包括如下步骤:

[0043] (1) 将所述的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮免疫原免疫动物制备抗5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮多克隆抗体;

[0044] (2) 将所述的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮包被原包被在微孔板上,将上步制备得到的抗5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮多克隆抗体加入微孔板中;

[0045] (3) 采用间接竞争ELISA方法检测抗血清效价。

[0046] 本发明具有以下有益效果:

[0047] 本发明提供了一种5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮结构限定性半抗原。本发明首先在5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮分子结构的基础上引入羰基结构使半抗原手臂结构自由旋转度下降,使半抗原呈现构象限定性以及增加结构复杂性,然后又通过与酸酐反应延长手臂,使5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮分子的特征结构更好的被免疫动物所识别,从而可大大增加制备抗体的成功几率。

[0048] 同时,本发明提供了由所述半抗原偶联载体蛋白制备的人工抗原,以及免疫实验动物后使机体产生特异的针对5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮的抗体,效价高、检测效率高。克服了传统检测5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮的仪器法存在周期长、专业性强、成本高,不适宜现场大批量快速检测等缺点,无法实现5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮的快速检测的问题。

[0049] 本发明的抗原抗体合成过程简单、成本较低,并为开发出成本低廉,检测效率高、操作简便的酶联免疫快速检测工具,奠定了基础,具有良好的应用前景。

附图说明

[0050] 图1为5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原Ia的质谱图。

[0051] 图2为5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原Ib的质谱图。

[0052] 图3为5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原Ia的抗体性能鉴定图。

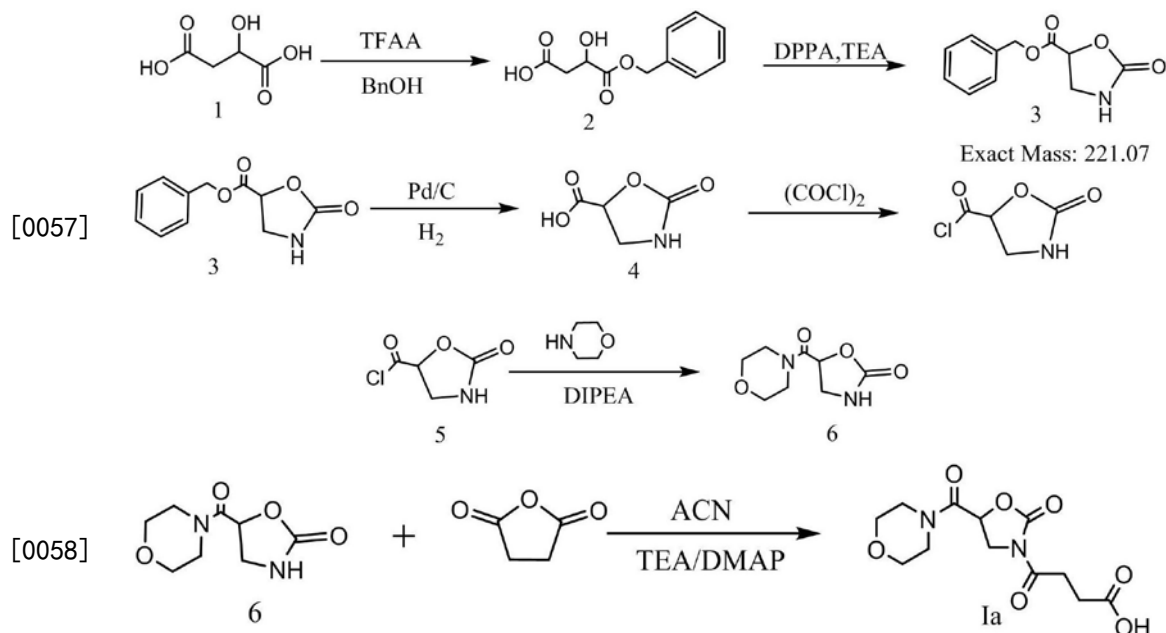
[0053] 图4为5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原Ib的抗体性能鉴定图。

具体实施方式

[0054] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0055] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0056] 实施例1:5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原Ia的合成



[0059] 0℃条件下,将化合物1 (19.4g,0.1mol) 和33ml (2.4equiv) 三氟乙酸酐置于100mL 单口圆底烧瓶中,混合物在0℃下搅拌反应1小时,室温搅拌反应3小时。然后蒸干三氟乙酸酐,油泵抽真空去除过量的溶剂。向残留的油状物中加21ml (2.0equiv) 的苄醇,混合物室温搅拌反应3小时。将混合物倒入500ml乙酸乙酯中,用饱和碳酸氢钠溶液 (100ml*4) 提取,合并水相;水相用乙酸乙酯 (100ml) 洗涤一次,然后调节PH到2,用乙酸乙酯 (100ml*3) 萃取。合并有机相,干燥,蒸干溶剂得到油状产品19.3g (86%yield) 不经纯化,直接进入下一步反应。

[0060] 将上一步得到的中间体2 (19g,0.085mol) 溶于甲苯,向其中加入三乙胺 (14.3ml, 0.1mol) 和DPPA (21ml,0.097mol),混合物在氮气保护下加热到80℃,反应4小时。蒸干溶剂,残留物溶于乙酸乙酯 (300ml),用碳酸氢钠饱和溶液 (100ml*3) 洗涤。用无水硫酸钠干燥。蒸干溶剂后用石油醚/乙酸乙酯1:1过柱得到白色固体3.6g (19%yield),即中间体3;

[0061] 将上一步得到的3.5g中间体3溶于100ml甲醇,加入10%的钨碳300mg,氢气氛围下

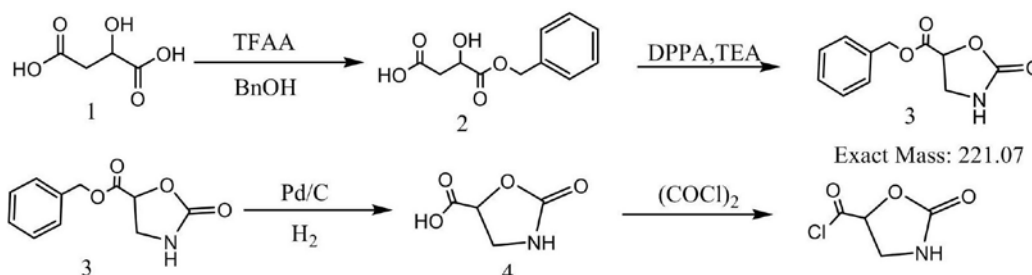
搅拌反应过夜,过滤,旋干得到产品1.9g (95%yield),为白色固体,即中间体4。

[0062] 将中间体4 (1.3g, 0.01mol) 溶于100ml二氯甲烷,加入催化量的DMF,向其中加入草酰氯 (1.7ml, 0.02mol), 室温搅拌反应2小时,旋干溶剂,并用二氯甲烷带干残留的溶剂得到浅棕色固体酰氯即为中间体5,将该酰氯溶解于50ml二氯甲烷待用。

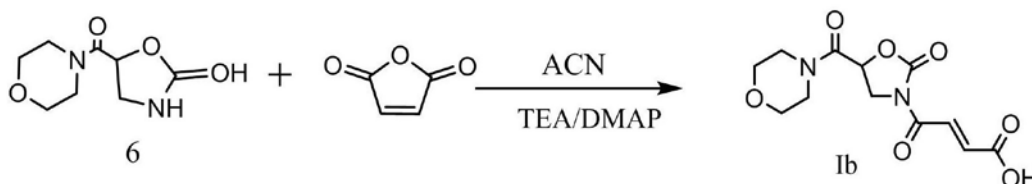
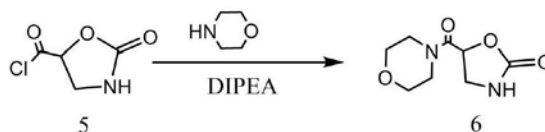
[0063] 将吗啡啉 (870mg, 0.01mol) 和三乙胺 (4.2ml, 0.03mol) 溶解在50ml二氯甲烷中,向其中加入上面得到的酰氯溶液 (一次性加入), 搅拌反应3小时。蒸干溶剂,然后用反相Flash制备,冻干后得到淡黄色液体360mg (17.9%yield), 即得到中间体6。

[0064] 将中间体6 (200mg, 0.001mol) 加入10ml乙腈中,搅拌下向其中加入三乙胺 (0.56ml, 0.004mol) 和催化量的DMAP,向混合物中加入丁二酸酐 (200mg, 0.002mol)。室温搅拌反应两小时,用制备高效液相色谱纯化,冻干后得到白色固体30mg (10%yield), 终产物经质谱 (如图1) 鉴定结构正确,从而制得纯化的半抗原Ia。

[0065] 实施例2: 5-甲基吗啡啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原Ib的合成



[0066]



[0067] 将实施例1中制备得到的中间体6 (200mg, 0.001mol) 溶解在10ml乙腈中,搅拌下向其中加入三乙胺 (0.56ml, 0.004mol) 和催化量的DMAP,向混合物中加入马来酸酐 (196mg, 0.001mol)。室温搅拌反应两小时,用制备高效液相色谱纯化,冻干后得到白色固体15mg (5%yield), 终产物经质谱 (如图2) 鉴定结构正确,从而制得纯化的半抗原Ib。

[0068] 实施例3: 人工抗原的合成

[0069] 本发明提供5-甲基吗啡啉-3-氨基-2-唑烷基酮人工抗原的制备方法,主要包括免疫原和包被原的合成。免疫原与包被原的制备不同之处在于载体种类,所述的免疫原采用的载体为牛血清蛋白 (BSA)、 α -淀粉酶、藻蓝素、伴刀豆球蛋白A (ConA); 所述的包被原采用的载体蛋白为卵清蛋白 (OVA)。免疫原的制备方法。本发明采用的合成免疫原/包被原的方法为活泼酯法。

[0070] (1) 免疫原的合成

[0071] 将实施例1中所述的5-甲基吗啡啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原Ia 15.0mg (0.05mmol)

溶于1.5mLDMF中,搅拌加入24.8mgDCC和13.8mgNHS,4℃下磁力搅拌反应过夜,离心后取上清为A液。称取载体蛋白20mg溶于4mLPBS缓冲溶液(0.01M,pH7.4)中,搅拌溶解制备B液。磁力搅拌下,吸取A液逐滴加入到B液中,4℃下磁力搅拌反应12h。离心后,取上清液,4℃下PBS透析3天,每天更换3次透析液。得到免疫原Ia-BSA,Ia- α -淀粉酶,Ia-藻蓝素,Ia-ConA,用PBS调整浓度为1mg/mL,每管500 μ L分装于0.5mL离心管中。冻存于-20℃冰箱中,备用。

[0072] 将上一步中的半抗原换成实施例2所述的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原Ib14.9mg(0.05mmol),其它合成步骤相同,可得5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮免疫原Ib-BSA,Ib- α -淀粉酶,Ib-藻蓝素,Ib-ConA,用PBS调整浓度为1mg/mL,每管500 μ L分装于0.5mL离心管中。冻存于-20℃冰箱中,备用。

[0073] (2) 包被原的合成

[0074] 对于实施例1和2中所述的半抗原对应的包被原的合成方法,其合成步骤与免疫原的合成步骤一致,唯一不同的是将所用的载体蛋白换成OVA,由此可得包被原Ia-OVA、Ib-OVA。用PBS调整浓度为1mg/mL,每管500 μ L分装于0.5mL离心管中。冻存于-20℃冰箱中,备用。

[0075] 实施例4:5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮半抗原单克隆抗体、基因工程抗体和多克隆抗体的制备

[0076] 1、单克隆抗体的制备

[0077] 动物免疫:将实施例3制备的Ia和Ib的四种免疫原分别与等量的佐剂(第一次用完全弗氏佐剂,之后均用不完全弗氏佐剂)混合乳化,对Balb/c小鼠进行间隔免疫,间接免疫分析检测并得到血液中含有5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮特异性抗体的小鼠脾脏。

[0078] 细胞融合与克隆:取产生特异性抗体的Balb/c小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞SP20融合,采用间接竞争酶联免疫分析方法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法或显微克隆法对阳性孔进行克隆化,得到并建立产单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0079] 细胞冻存与复苏:取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0080] 单克隆抗体的制备与纯化:采用体内诱生法,将Balb/c小鼠(8周龄)腹腔注入灭菌石蜡油,7~14天后腹腔注射杂交瘤细胞,7~10天后采集腹水。经辛酸-饱和硫酸胺法或亲和层析法进行腹水纯化,纯度经SDS-PAGE电泳鉴定,小瓶分装,-20℃保存。

[0081] 2、基因工程抗体的制备

[0082] 提取5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮单克隆细胞或经5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮免疫原免疫后的小鼠脾脏细胞的RNA,反转录为cDNA,设计抗体轻重链扩增引物,利用PCR技术扩增出抗体的轻重链基因,插入表达质粒TGI菌株,在大肠杆菌中表达,利用免疫亲和方法进行纯化得到基因工程抗体,纯度由SDS-PAGE电泳鉴定,小瓶分装,-20℃保存。

[0083] 3、多克隆抗体的制备

[0084] 将实施例3制备的免疫原Ia-BSA,Ia- α -淀粉酶,Ia-藻蓝素,Ia-ConA和免疫原Ib-BSA,Ib- α -淀粉酶,Ib-藻蓝素,Ib-ConA分别与等量的佐剂(第一次用完全弗氏佐剂,之后均用不完全弗氏佐剂)混合乳化,采用背部皮下、各部位皮下、腿部肌肉和耳缘静脉多种注射方式免疫体重为2.5~3kg的健康新西兰大白兔,每种免疫原对应注射两只。第一次免疫间

隔四周后每三周加强免疫一次。第三次加强免疫后1周耳缘静脉取血,并利用间接ELISA测定血清效价,当效价不在上升时,采用耳缘静脉加强免疫。两天后心脏采血,室温静置0.5~1h,于4℃,12000r/min下离心10min,取上清分装于离心管中,于-20℃下保存备用。

[0085] 间接竞争ELISA测定抗体效价以吸光值在1.0~1.5之间为准,结果表明,如图3所示,式Ia所对应的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮免疫原Ia-ConA对应的多克隆抗血清的效价是1:32000,抑制率77%;如图4所示,式Ib所对应的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮免疫原Ib-ConA对应的多克隆抗血清的效价是1:32000,抑制率88%。

[0086] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

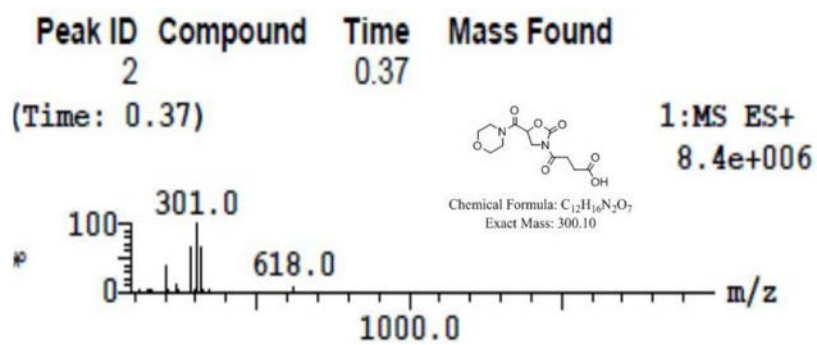


图1

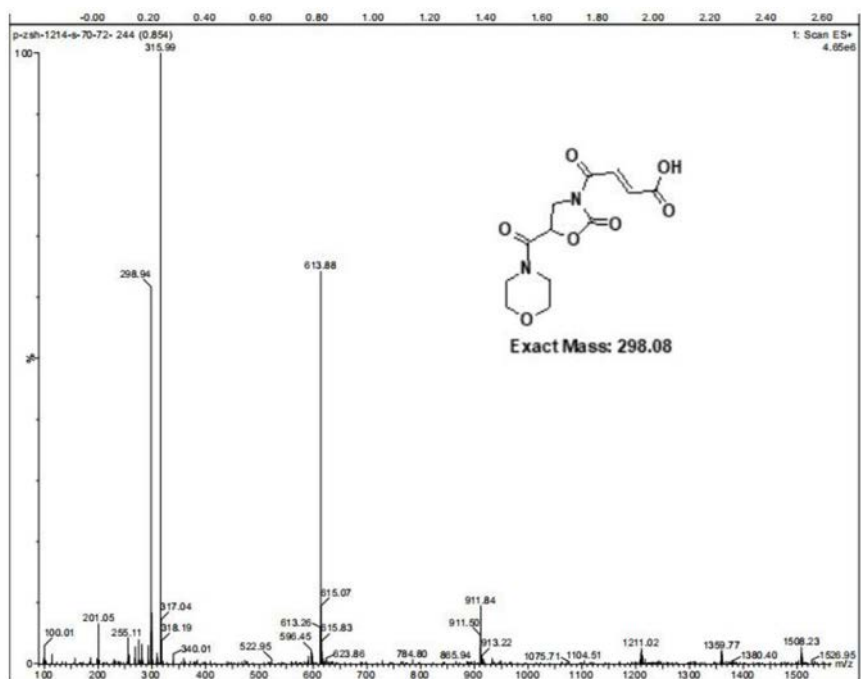


图2

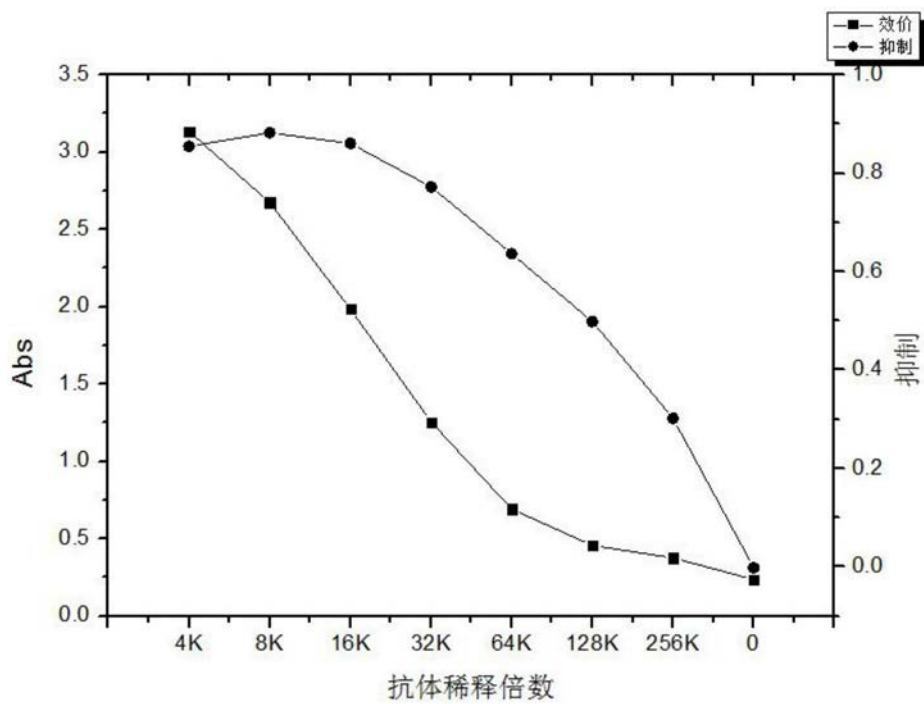


图3

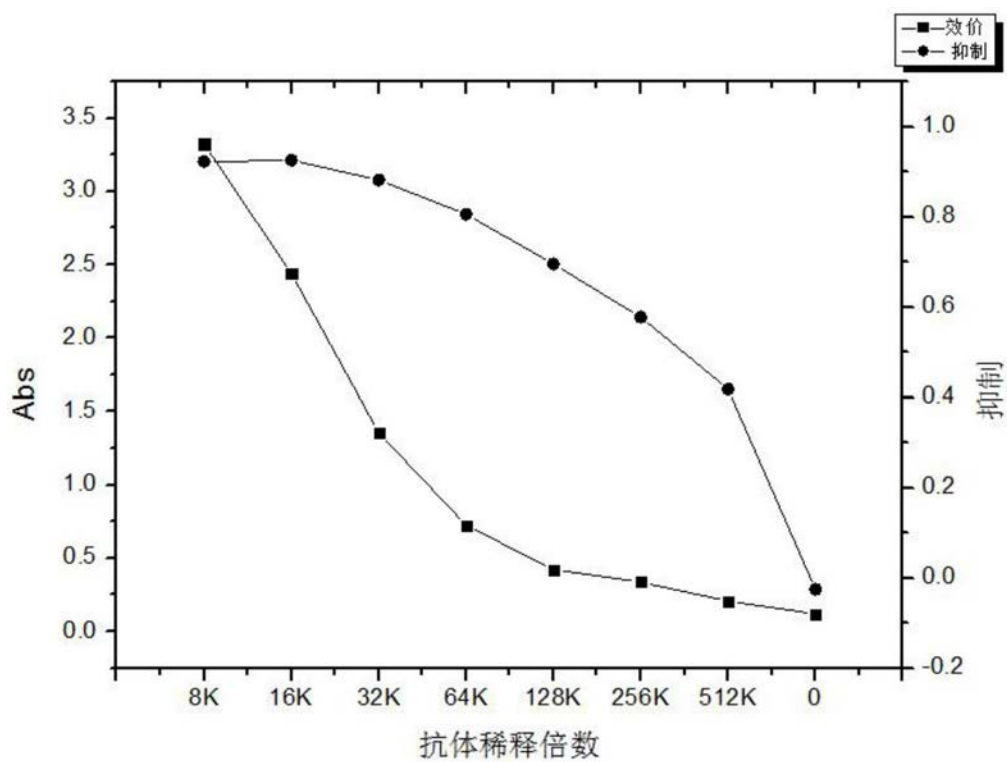


图4

专利名称(译)	一种5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮抗原、抗体及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN108129412A	公开(公告)日	2018-06-08
申请号	CN2017111431980.0	申请日	2017-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	沈玉栋 何凡 邹婷婷 徐振林 杨金易 王弘 韦晓群 孙远明 雷红涛		
发明人	沈玉栋 何凡 邹婷婷 徐振林 杨金易 王弘 韦晓群 孙远明 雷红涛		
IPC分类号	C07D263/26 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K14/415 C12N9/26 C07K16/44 G01N33/535		
CPC分类号	C07D263/26 C07K14/415 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 C07K19/00 C12N9/2414 C12Y302/01001 G01N33/535		
代理人(译)	林丽明		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮抗原、抗体及其制备方法与应用。本发明首先对5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮分子结构进行改造，包括引入羰基结构使半抗原手臂结构自由旋转度下降，使半抗原呈现构象限定性以及增加结构复杂性等等，使得分子的特征结构更好的被免疫动物所识别，从而可大大增加制备抗体的成功几率。并以此基础制备了5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮人工抗原和抗体，效价高、检测效率高；克服了传统仪器法存在周期长、专业性强、成本高，不适宜现场大批量快速检测等缺点问题。本发明的抗原抗体合成过程简单、成本低，为开发出成本低廉、检测效率高、操作简便的酶联免疫快速检测工具，奠定了基础，应用前景好。

