



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103342683 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 15

(21) 申请号 201310325822. 2

C07K 16/44(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 07. 30

C07K 16/06(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(73) 专利权人 中国农业大学

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路 2 号

审查员 李小宏

(72) 发明人 沈建忠 程林丽 王战辉 张素霞
高海祥

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

C07D 241/52(2006. 01)

C07K 14/765(2006. 01)

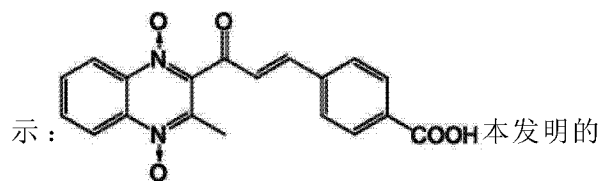
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种喹烯酮半抗原及其制备方法和其应用

(57) 摘要

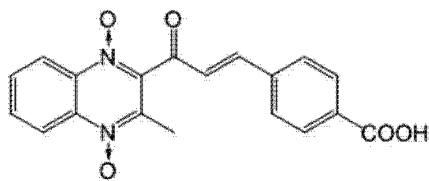
本发明公开了一种喹烯酮半抗原及其制备方法和其应用。该喹烯酮半抗原的结构式如式 I 所



式 (I)

喹烯酮半抗原在偶联蛋白后免疫动物,可获得针对喹烯酮或喹烯酮代谢产物的特异性抗体,该抗体可用于快速检测动物性产品中喹烯酮及其主要代谢产物脱二氧喹烯酮的残留。本发明提供的喹烯酮半抗原为建立快速、简便、价廉、灵敏、特异的喹烯酮及其主要代谢产物脱二氧喹烯酮的筛选方法提供了新的物质基础。

1. 一种喹烯酮半抗原, 具有式 I 所示的化学结构:



式 (I)

2. 权利要求 1 所述半抗原的制备方法, 包括下述步骤: 将乙酰甲喹和对甲酰苯甲酸在碱催化剂作用下, 于 40℃ 反应 12 小时, 再室温反应过夜, 即得喹烯酮半抗原; 所述乙酰甲喹和对甲酰苯甲酸的摩尔比为 1:1.2。

3. 根据权利要求 2 所述的方法, 其特征在于: 所述碱催化剂为氢氧化钠。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的方法, 其特征在于: 所述反应在溶剂中进行, 所述溶剂为无水乙醇。

5. 根据权利要求 2 或 3 所述的方法, 其特征在于: 所述反应完毕后还包括纯化过程。

6. 权利要求 1 所述喹烯酮半抗原或由权利要求 2-5 任意所述方法直接得到的喹烯酮半抗原作为半抗原的用途。

7. 权利要求 1 所述喹烯酮半抗原或由权利要求 2-5 任意所述方法直接得到的喹烯酮半抗原在检测喹烯酮或喹烯酮代谢产物中的用途。

8. 权利要求 1 所述喹烯酮半抗原或由权利要求 2-5 任意所述方法直接得到的喹烯酮半抗原在制备检测喹烯酮或喹烯酮代谢产物产品中的用途。

9. 一种多克隆抗体, 所述多克隆抗体是将权利要求 1 所述喹烯酮半抗原或由权利要求 2-5 任意所述方法直接得到的喹烯酮半抗原与牛血清蛋白的偶联物作为抗原免疫动物后获得的。

10. 一种特异性检测喹烯酮或喹烯酮代谢产物的试剂盒, 所述试剂盒包括下述 1)-9):

1) 碳酸盐缓冲液:

Na_2CO_3 1.59g/L

NaHCO_3 2.93g/L

溶剂为蒸馏水;

2) 将权利要求 1 所述喹烯酮半抗原或由权利要求 2-5 任意所述方法直接得到的喹烯酮半抗原与卵清蛋白的偶联物作为包被抗原;

3) 封闭液:

小牛血清 50 ml/L

蔗糖 50g/L

酪蛋白 2.5g/L

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.8g/L

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.593g/L

Proclin 300 300 μL /L

溶剂为蒸馏水；

4) 磷酸盐缓冲液：

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.12g/L

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.76g/L

溶剂为蒸馏水；

5) HRP-羊抗兔 IgG；

6) 底物缓冲液：

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 36.8g/L

柠檬酸 9.33g/L

溶剂为蒸馏水；

7) 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺溶液：

TMB 96.15 mg/L

乙二醇 38.46 mL/L

质量分数为 30% 的过氧化氢 961 μL /L

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 35.4 g/L

柠檬酸 8.97 g/L

溶剂为蒸馏水；

8) H_2SO_4 溶液：

质量分数为 98% 的浓硫酸 2mol/L

溶剂为蒸馏水；

9) 将权利要求 1 所述喹烯酮半抗原或由权利要求 2-5 任意所述方法直接得到的喹烯酮半抗原与牛血清蛋白的偶联物作为抗原免疫动物后获得的多克隆抗体。

一种喹烯酮半抗原及其制备方法和其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物化工技术领域,具体涉及一种喹烯酮半抗原及其制备方法和其应用。

背景技术

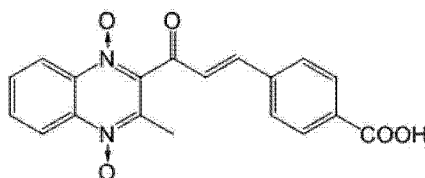
[0002] 喹烯酮 (Quinocetone) 分子式 $C_{18}H_{14}N_2O_3$, 属喹噁啉类药物, 是中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所研制的畜禽抗菌、止泻、促生长新药, 是我国在国际上首创的一类新兽药。该类药物对多种肠道致病菌 (特别是革兰氏阴性菌) 有抑制作用, 可明显降低畜禽腹泻发生率, 促进生长并提高饲料转化率。目前包括我国在内的许多国家和地区都广泛用作动物饲料添加剂。喹烯酮在畜牧业上广泛使用的同时, 由于畜牧业生产者不熟悉药物的理化性质和药理毒理特点, 存在一定的滥用情况, 导致畜产品中喹烯酮及其主要代谢产物脱二氧喹烯酮残留超标, 对人们的身体健康造成严重的潜在威胁。同时由于动物性产品具有不易储存、易变质等特点, 为了保障消费者的身体健康, 迫切需要建立一种快速、简便、价廉、灵敏、特异的喹烯酮及其主要代谢产物脱二氧喹烯酮的筛选方法。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种喹烯酮半抗原及其制备方法和其应用。

[0004] 本发明提供的喹烯酮半抗原具有式 I 所示的化学结构:

[0005]



式 (I)

[0006] 本发明提供的喹烯酮半抗原的制备方法, 包括下述步骤: 将乙酰甲喹和对甲酰苯甲酸在碱催化剂作用下, 于 40°C 反应 12 小时, 再室温反应过夜, 即得喹烯酮半抗原; 所述乙酰甲喹和对甲酰苯甲酸的摩尔比为 1:1.2。

[0007] 所述方法中, 所述室温具体为 $25-27^{\circ}\text{C}$; 所述反应过夜具体为反应 12-14 小时。

[0008] 所述方法中, 所述碱催化剂为氢氧化钠。

[0009] 所述方法中, 所述反应在溶剂中进行, 所述溶剂为无水乙醇。

[0010] 所述方法中, 所述反应完毕后还包括纯化过程。

[0011] 所述纯化过程具体为过滤、产物依次用 35°C 无水乙醇和 35°C 丙酮清洗、干燥后即得。

[0012] 所述清洗具体为清洗 3 次; 所述干燥具体为用无水硫酸钠干燥。

[0013] 本发明提供的喹烯酮半抗原或由所述方法直接得到的喹烯酮半抗原作为半抗原

的用途。

[0014] 所述作为半抗原的用途具体指用所述半抗原偶联蛋白后免疫动物,可获得针对喹烯酮或喹烯酮代谢产物的特异性抗体;所述喹烯酮代谢产物具体指脱二氧喹烯酮。

[0015] 本发明提供的喹烯酮半抗原或由所述方法直接得到的喹烯酮半抗原在检测喹烯酮或喹烯酮代谢产物中的用途。

[0016] 所述用途中,所述喹烯酮代谢产物具体指脱二氧喹烯酮。

[0017] 本发明提供的喹烯酮半抗原或由所述方法直接得到的喹烯酮半抗原在制备检测喹烯酮或喹烯酮代谢产物产品中的用途。

[0018] 所述喹烯酮代谢产物具体指脱二氧喹烯酮。

[0019] 本发明的另一个目的是提供一种抗原,为所述喹烯酮半抗原或由所述方法直接得到的喹烯酮半抗原与牛血清白蛋白的偶联物。

[0020] 本发明的还一个目的是提供一种多克隆抗体,所述多克隆抗体是所述喹烯酮半抗原或由所述方法直接得到的喹烯酮半抗原与牛血清蛋白的偶联物作为抗原免疫动物后获得的。

[0021] 本发明的再一个目的是提供一种特异性检测喹烯酮或喹烯酮代谢产物的试剂盒,所述试剂盒包括下述 1)-9):

[0022] 1) 碳酸盐缓冲液:

[0023] Na_2CO_3 1.59g/L

[0024] NaHCO_3 2.93g/L

[0025] 溶剂为蒸馏水;

[0026] 2) 将权利要求 1 所述喹烯酮半抗原或由权利要求 2-5 任意所述方法直接得到的喹烯酮半抗原与卵清蛋白的偶联物作为包被抗原;

[0027] 3) 封闭液:

[0028]

小牛血清	50 ml/L
蔗糖	50g/L
酪蛋白	2.5g/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	5.8g/L
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.593g/L
Proclin 300	300 μ l/L

[0029] 溶剂为蒸馏水;

[0030] 4) 磷酸盐缓冲液:

[0031] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.12g/L

[0032] $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.76g/L

[0033] 溶剂为蒸馏水;

[0034] 5) HRP-羊抗兔 IgG;

[0035] 6) 底物缓冲液:

[0036] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 36.8g/L

[0037] 柠檬酸 9.33g/L

[0038] 溶剂为蒸馏水；

[0039] 7) 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺溶液；

[0040]

TMB	96.15 mg/L
乙二醇	38.46 mL/L
质量分数为 30% 的过氧化氢	961 μ L/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	35.4 g/L
柠檬酸	8.97 g/L

[0041] 溶剂为蒸馏水；

[0042] 8) H_2SO_4 溶液；

[0043] 质量分数为 98% 的浓硫酸 2mol/L

[0044] 溶剂为蒸馏水；

[0045] 9) 将权利要求 1 所述喹烯酮半抗原或由权利要求 2-5 任意所述方法直接得到的喹烯酮半抗原与牛血清蛋白的偶联物作为抗原免疫动物后获得的多克隆抗体。

[0046] 所述试剂盒中, 所述喹烯酮代谢产物具体指脱二氧喹烯酮。

[0047] 本发明的喹烯酮半抗原合成方法简单, 纯度和产率高, 可以直接与蛋白偶联后免疫动物产生针对喹烯酮及其主要代谢产物的特异性抗体, 该抗体可用于快速检测动物性产品中喹烯酮及其主要代谢产物的残留。

附图说明

[0048] 图 1 为喹烯酮半抗原的化学结构图。

[0049] 图 2 为喹烯酮半抗原及其 C^{13} 同位素的质谱图。

[0050] 图 3 为喹烯酮半抗原的质谱图。

[0051] 图 4 为喹烯酮半抗原的核磁谱图。

具体实施方式

[0052] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明, 均为常规方法。

[0053] 下述实施例中所用的材料、试剂等, 如无特殊说明, 均可从商业途径得到。

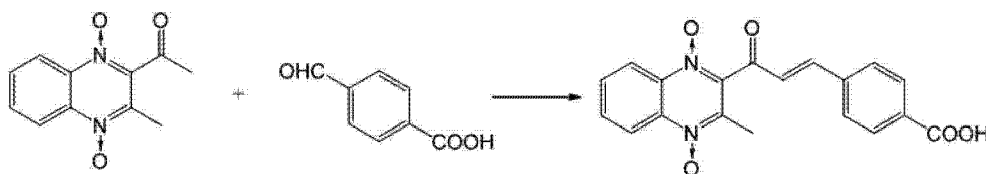
[0054] 下述实施例中所用的溶剂均为分析纯级别的试剂。

[0055] 实施例 1、喹烯酮半抗原的合成

[0056] 喹烯酮半抗原的化学结构式见图 1, 化学名称为 2-(3-(4-羧苯基)丙烯酰)-3-甲基喹噁啉-1, 4-二氧化物, 其合成过程如下所述。

[0057] (一) 喹烯酮半抗原的合成反应式如下所示：

[0058]



[0059] (二) 喹烯酮半抗原的合成具体过程为：

[0060] 在一个 500mL 的圆底烧瓶中加入乙酰甲喹 10.9g、对甲酰基苯甲酸 9.0g 和氢氧化钠 1.0g,于 100ml 无水乙醇中搅拌、加热升温到 40℃,反应 12h,然后室温(25-27℃)反应过夜(12h)。

[0061] 将反应液抽滤后,将抽滤漏斗中的混合物依次用 35℃无水乙醇和 35℃丙酮各清洗 3 遍,每遍使用的溶剂量为 50ml,移除上层洗涤液;将在抽滤漏斗中清洗后的混合物转移至圆底烧瓶中,置于干燥器内再经无水硫酸钠(干燥时无水硫酸钠不与产物混合或直接接触)干燥 6 小时后,移开无水硫酸钠,将圆底烧瓶中的液固混合物转入抽滤漏斗中抽滤,抽滤漏斗中所得黄色块状产物即喹烯酮半抗原,收率 67%(计算公式如下)。所得喹烯酮半抗原可直接与蛋白偶联后免疫动物产生针对喹烯酮和其主要代谢产物脱二氧喹烯酮均具有特异性的抗体。

[0062] 产率计算公式:

[0063] (1) 产率 = 半抗原的实际质量 / 半抗原的理论质量 $\times 100\%$

[0064] (2) 半抗原的理论质量 = 反应物乙酰甲喹的质量 $\times 351/219$

[0065] 说明:351 为半抗原的摩尔质量;219 为乙酰甲喹的摩尔质量。

[0066] (三) 喹烯酮半抗原的鉴定

[0067] 1、质谱鉴定

[0068] 质谱鉴定结果见图 2 和图 3。图 2 中 m/z 351 峰为合成产物的准分子离子峰 $[M+H]^+$; m/z 352 峰为合成产物的 C^{13} 同位素的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 。对 m/z 351 峰所对应的化合物进一步进行离子扫描,结果见图 3。图 3 中 m/z 317 峰为合成产物失去两个 $-O$ 和两个 $-H$ 形成的碎片离子的准分子离子峰 $[M+H]^+$; m/z 143 和 m/z 175 为合成产物侧链断裂产生的碎片离子峰。图 2 和图 3 的质谱数据结果表明上述方法合成的化合物即为图 1 所示的 2-(3-(4-羧苯基)丙烯酰)-3-甲基喹噁啉-1,4-二氧化物。

[0069] 2、核磁共振鉴定

[0070] 磁共振鉴定结果见图 4。由图 4 得喹烯酮半抗原的核磁数据为: 1H NMR: d_6 -DMSO δ : 2.50 (3H, d), 7.35 (1H, d), 7.86 (1H, d), 7.89 (3H, m), 8.00 (4H, q), 8.45 (1H, d), 8.55 (1H, d), 12.50 (1H, s)。核磁数据表明上述方法合成的化合物即为图 1 所示的 2-(3-(4-羧苯基)丙烯酰)-3-甲基喹噁啉-1,4-二氧化物。

[0071] 实施例 2、喹烯酮多克隆抗体的制备

[0072] (一) 喹烯酮抗原的制备

[0073] 以 N-羧基琥珀酰亚胺法合成喹烯酮半抗原与牛血清蛋白的偶联物作为抗原。其原理为:上述半抗原上的活性羧基与 N-羧基琥珀酰亚胺反应生成酸酐中间体,活化羧基,与蛋白质分子中的氨基反应生成酰胺键而合成免疫原。

[0074] 具体步骤为:称取喹烯酮半抗原 15mg,用 N,N-二甲基甲酰胺 3mL 溶解,接着依次加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 50mg 和 N-羧基琥珀酰亚胺 50mg,室温下磁力搅拌 1 小时。称取 10mg 牛血清蛋白溶于 1mL 水中。将牛血清蛋白溶液缓缓加入喹烯酮半抗原反应混合液中,磁力搅拌 6 小时。将混合物装入透析袋中,在磷酸盐缓冲液(0.01mol/L, pH7.4)中透析 6 天,每天早晚换透析液。将透析后的产物在 25-27℃下 3500r/min 离心 5min。取上清,采用紫外分光光度计法测得其蛋白浓度为 27mg/mL,分装,置于 -20℃保存。

[0075] 透析所用磷酸盐缓冲液(pH7.4)的组成成分及含量为：

[0076]

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.59g
NaCl	8.5g
KCl	0.2g
蒸馏水	1000 mL

[0077] (二) 喹烯酮多克隆抗体的制备

[0078] 选取 6 只 7 周龄的新西兰大白兔为试验对象。用 0.15mol/L 的氯化钠溶液将上述制备的抗原稀释成 1mg/mL (以载体蛋白计)。取稀释后的抗原 1mL, 加入等量弗氏完全佐剂制成乳化剂, 在家兔的背部皮内多点注射进行首免。2 周后, 取同样浓度和体积的抗原加弗氏不完全佐剂乳化后进行背部皮下多点注射, 每 2 周加强免疫一次 (方法同二免), 共免疫 5 次。最后一次免疫, 为耳缘静脉注射。

[0079] (三) 喹烯酮多克隆抗体的采集及其效价检测

[0080] 用卵清蛋白代替牛血清蛋白, 采用与抗原制备相同的方法制备包被抗原。第五次免疫后用耳后静脉采血的方式采集大白兔血液, 离心取血清进行效价检测。用方阵滴定法确定包被抗原和多克隆抗体的最适工作浓度, 选择 OD 值为 1.5 左右时的抗原和抗体稀释度为工作浓度。

[0081] 建立的间接 ELISA 法的步骤如下：

[0082] 1. 包被：用碳酸盐缓冲液(pH9.6)将包被抗原稀释为系列浓度, 每一浓度包被一行, 100 μL /孔, 4℃过夜；

[0083] 所用碳酸盐缓冲液(pH9.6)的组成成分及含量为：

[0084]	Na_2CO_3	1.59g
[0085]	NaHCO_3	2.93g
[0086]	蒸馏水	1000mL

[0087] 2. 洗涤与封闭：倾去孔内液体, 用磷酸盐缓冲液(pH7.2)洗涤 3 次。每孔加入 150 μL 封闭液, 37℃恒温封闭 1 小时, 然后洗涤 2 次；

[0088] 洗涤所用磷酸盐缓冲液(pH7.2)的组成成分及含量为：

[0089]	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3.12g
[0090]	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.76g
[0091]	蒸馏水	1000mL

[0092] 封闭液的组成成分及含量为：

[0093]

小牛血清	50 ml
蔗糖	50 g
酪蛋白	2.5 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	5.8 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.593 g
Proclin 300	300 μl
蒸馏水	1000 mL

[0094] 3. 加样 : 各列孔加入从 1:1000 开始的倍比稀释的待检血清, 每孔 100 μL , 37℃ 反应 1 小时 ; 洗涤同 2。每孔加入 100 μL HRP- 羊抗兔 IgG, 37℃ 反应 1 小时。洗涤同 2 ;

[0095] 稀释待测血清的底物缓冲液 (pH5.0) 的组成成分及含量为 :

[0096] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.68g

[0097] 柠檬酸 0.933g

[0098] 加蒸馏水至 100mL

[0099] 4. 显色测定 : 每孔加入 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 溶液 100 μL , 37℃ 显色 20min, 然后每孔加入的 H_2SO_4 溶液 (2mol/L) 50 μL 以终止反应, 最后用酶标仪测定各孔在 450nm 处的 OD 值 ;

[0100] 所用 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 溶液的组成成分及含量为 :

[0101]

TMB	2.5 mg
乙二醇	1 mL
底物缓冲液	25 mL
质量分数为 30% 的过氧化氢	25 μL

[0102] 底物缓冲液为步骤 3 所述的稀释待测血清的缓冲液 (pH5.0)。

[0103] 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 溶液临用时新鲜配制。

[0104] H_2SO_4 溶液 (2mol/L) 的组成成分及含量为 :

[0105] 质量分数为 98% 的浓硫酸 (18.4mol/L) 21.74mL

[0106] 蒸馏水 178.26mL

[0107] 5. 判定结果 : 以 OD450nm 大于 2 倍阴性对照孔的血清最高稀释倍数为血清的 ELISA 效价。

[0108] 获得的检测结果如下 : 包被抗原的最适工作浓度均为 1:1000 ; 来自 6 只大白兔的第五次免疫后抗血清中某抗血清获得最佳效价, 即 1:5000, 该抗血清即为获得的喹烯酮多克隆抗体。

[0109] (四) 抗体 IgG 的特异性检测

[0110] 采用方阵法确定包被原和抗体的最适工作浓度, 采用间接竞争 ELISA 法检测所得抗体 IgG 对其它喹噁啉类药物及代谢产物 (喹乙醇、乙酰甲喹、卡巴氧、3- 甲基喹噁啉 -2- 羧酸和喹噁啉 -2- 羧酸) 的特异性, 具体操作步骤同 (三), 结果表明, 该抗体仅对喹烯酮及其主要代谢产物脱二氧喹烯酮特异性结合, 与其它喹噁啉类药物及代谢物交叉反应不明显。

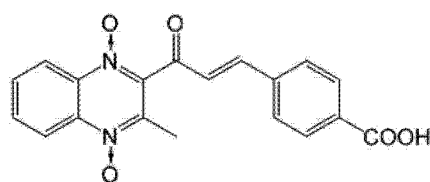


图 1

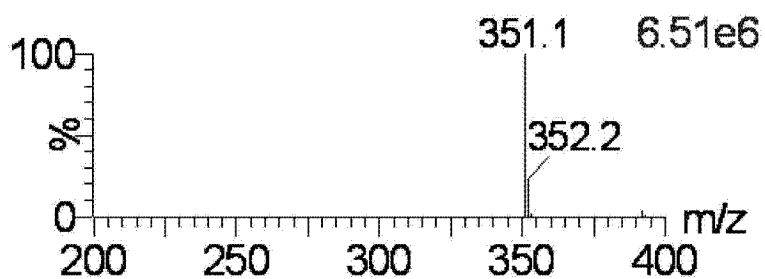


图 2

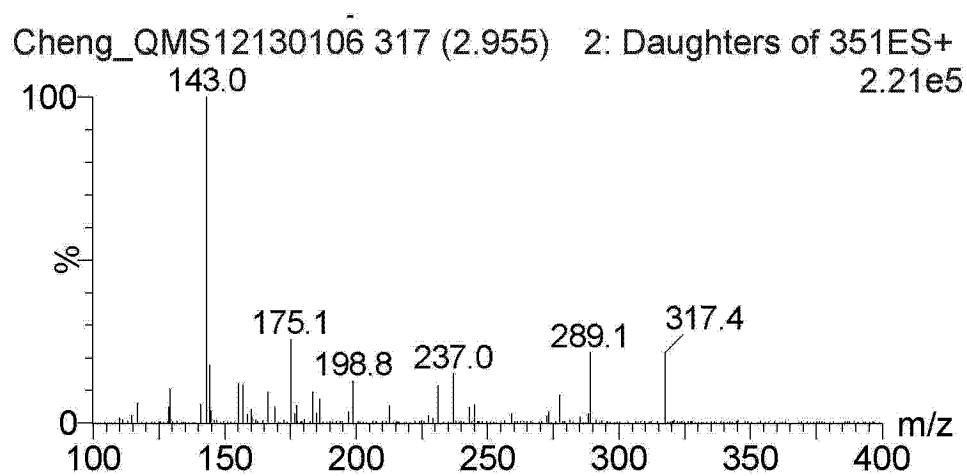


图 3

专利名称(译)	一种喹烯酮半抗原及其制备方法和其应用		
公开(公告)号	CN103342683B	公开(公告)日	2015-07-15
申请号	CN201310325822.2	申请日	2013-07-30
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	沈建忠 程林丽 王战辉 张素霞 高海祥		
发明人	沈建忠 程林丽 王战辉 张素霞 高海祥		
IPC分类号	C07D241/52 C07K14/765 C07K16/44 C07K16/06 G01N33/53		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN103342683A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种喹烯酮半抗原及其制备方法和其应用。该喹烯酮半抗原的结构式如式I所示：本发明的喹烯酮半抗原在偶联蛋白后免疫动物，可获得针对喹烯酮或喹烯酮代谢产物的特异性抗体，该抗体可用于快速检测动物性产品中喹烯酮及其主要代谢产物脱二氧喹烯酮的残留。本发明提供的喹烯酮半抗原为建立快速、简便、价廉、灵敏、特异的喹烯酮及其主要代谢产物脱二氧喹烯酮的筛选方法提供了新的物质基础。

