



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105111307 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 02

(21) 申请号 201510483528. 3

(22) 申请日 2015. 08. 07

(71) 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

(72) 发明人 庄惠生 孙瑞艳 卜聃

(74) 专利代理机构 上海汉声知识产权代理有限公司 31236

代理人 郭国中 陈少凌

(51) Int. Cl.

C07K 14/77(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书2页 说明书10页 附图3页

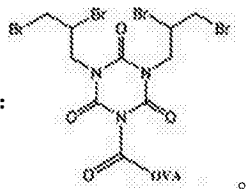
(54) 发明名称

三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的制备和用途

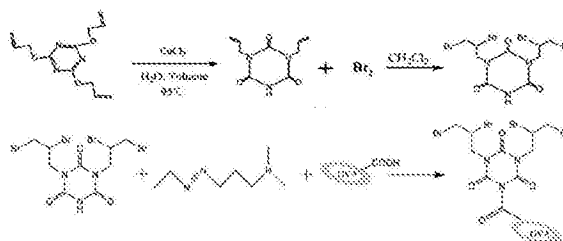
(57) 摘要

本发明公开了一种三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的制备和用途;所述包被原结构式

如下:

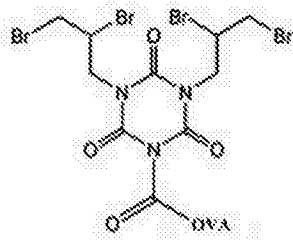


制备时,2,4,6-三(烯



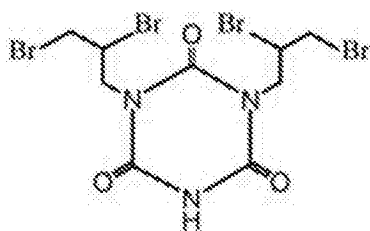
丙氧基)-1,3,5-三嗪与 CuCl_2 回流反应得二烯丙基异氰脲酸酯;二烯丙基异氰脲酸酯和液溴回流反应得三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原;采用水溶性碳二亚胺法,将所述半抗原与卵清白蛋白偶联反应,即得包被原 TBC-OVA。本发明的包被原可以与被分析物三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯形成直接竞争关系,都能特异性识别抗三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯的多克隆抗体,为建立免疫检测方法奠定基础。此外,包被原的制备方法简单,稳定性好,成本低,易于工业化生产。

1. 一种三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原,其结构式如下:



2. 一种如权利要求1所述的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的制备方法,其特征在于,所述方法包括:

采用水溶性碳二亚胺法,将三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原



与卵清白蛋白偶联反应,即得所述三(2,3-二溴丙基)异氰脲

酸酯包被原。

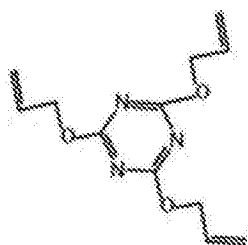
3. 根据权利要求2所述的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的制备方法,其特征在于,所述偶联反应是在0~4℃冰浴遮光条件下进行的,反应时间为25~30h。

4. 根据权利要求2所述的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的制备方法,其特征在于,所述方法还包括离心分离,透析上清液,再次离心分离得到所述三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的步骤。

5. 根据权利要求2所述的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的制备方法,其特征在于,所述水溶性碳二亚胺法选用1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐,所述三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐和卵清白蛋白的摩尔比为1:1~1.5:0.005~0.05。

6. 根据权利要求2所述的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的制备方法,其特征在于,所述三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原是通过包括如下步骤的方法制备而得的:

S1、在非质子性有机溶剂存在的条件下,2,4,6-三(烯丙氧基)-1,3,5-三嗪



与CuCl₂回流反应,生成二烯丙基异氰脲酸酯;

S2、在非质子性有机溶剂存在的条件下,所述二烯丙基异氰脲酸酯和液溴回流反应,生成三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原。

7. 根据权利要求6所述的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的制备方法,其特征在于,步骤S1中,所述2,4,6-三(烯丙氧基)-1,3,5-三嗪、水、氯化亚铜的摩尔比为

1 : 1 : 45 ~ 50 ;所述回流反应的温度为 95 ~ 100℃,反应时间为 5 ~ 6 小时 ;所述非质子性有机溶剂选自甲苯、二氯甲烷或丙酮。

8. 根据权利要求 6 所述的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的制备方法,其特征在于,步骤 S2 中,所述二烯丙基异氰脲酸酯和液溴的摩尔比为 1 : 4 ~ 5 ;所述回流反应的温度为 50 ~ 60℃,反应时间为 1 ~ 2 小时 ;所述非质子性有机溶剂选自甲苯、二氯甲烷或丙酮。

9. 一种如权利要求 1 所述的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原在用于痕量溴代阻燃剂三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯检测中的用途。

10. 根据权利要求 9 所述的用途,其特征在于,所述检测为免疫检测方法,检测时所述三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原与被分析物三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯直接竞争具特异性免疫反应的抗三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯特异性抗体。

三 (2,3- 二溴丙基) 异氰脲酸酯包被原的制备和用途

技术领域

[0001] 本发明属于小分子有机污染物的免疫化学及生物分析技术领域,涉及有机合成、免疫化学、分子生物学、理化检测等技术,具体涉及一种三 (2,3- 二溴丙基) 异氰脲酸酯包被原的制备方法及用途。

背景技术

[0002] 溴代阻燃剂 (Brominated Flame Retardant, BFRs),指能使聚合物不容易着火或者着火后使其燃烧变慢的一种助剂,是目前世界上产量和用量最大的有机阻燃剂之一。随着多种溴代阻燃剂逐渐在多数国家和地区被禁止生产使用,新的溴代阻燃剂产品被逐渐开发生产出以填补市场空白,三 (2,3- 二溴丙基) 异氰脲酸酯 (Tris(2,3-dibromopropyl) isocyanurate, TBC) 就是新溴代阻燃剂的一个代表。TBC 是溴代阻燃剂中的一种,分子结构中含有六个溴原子,也属于三嗪系列阻燃剂。作为阻燃剂的新品种,TBC 具有优异的阻燃性能、热稳定性、不易光解、低发烟性等优点,被广泛用于纤维增强塑料、农用聚氨酯薄膜、聚烯烃、聚氯乙烯 (PVC)、聚苯烯、ABS 树脂不饱和聚脂、合成橡胶和合成纤维等制品中。在上述材料或产品中,TBC 阻燃剂的含量一般在 5-10% w/w。我国从二十世纪八十年代中期开始生产、使用 TBC 产品,生产厂家集中在东南沿海和长江流域。

[0003] TBC 阻燃剂也有溴代阻燃剂的不足,并存在一定的环境问题:如裂解时会释放出有毒气体溴化氢,溴化氢易吸收空气中的水分形成氢溴酸,具有很强的腐蚀性,存在二次危害。生物富集性和大气自由基氧化半衰期结果显示 TBC 具有与持久性有机污染物相类似的持久性、长距离传输性和可生物富集性等理化特性,并可通过血脑屏障富集于脑组织中。虽然现阶段 TBC 的生产使用并未被施加任何限制,但它已被纳入加拿大环境威胁生态物质 (Lower Ecological Concern) 筛选名录中,作为一种高优先级化学品识别。

[0004] 目前,关于 TBC 的研究主要集中在水体、沉积物、大气等环境领域和生物体的毒性方面,但样品的检测方法方面研究较少。目前对三 (2,3- 二溴丙基) 异氰脲酸酯的检测手段主要为气相色谱和高效液相色谱等仪器检测方法,这些方法虽然准确可靠,但对样品的预处理方法和操作人员的专业性有很高的要求。正因为这些方法的处理复杂、耗时、仪器价格昂贵而不适合推广使用,也不利于在环境污染事故现场快速检测。为克服这些缺点,寻求一种快速、简便、灵敏且经济实用的分析方法就成为环境监测领域的主要研究方向。因此,开展研究并建立有效、可靠的含溴阻燃剂的检测方法及标准,并通过相关的法规予以保障,成为一项极为重要和迫切的工作。

[0005] 20 世纪 60 年代发展起来的免疫分析是基于抗原和抗体的特异性、可逆性结合反应的分析技术。免疫分析具有常规理化分析技术无可比拟的选择性和高灵敏性,非常适合复杂介质中痕量组分的分析。因此免疫分析具有的特异性强、灵敏度高、方法快捷简单、分析通量大、检测成本低等优点,使得该类方法可以满足简单、快速、灵敏地检测持久性有机污染物的要求。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,即聚合酶链式反应,简称 PCR。1992 年 Sano 等将免疫分析技术与 PCR 技

术结合,发展出免疫 PCR 技术。免疫 PCR 技术兼具了免疫分析的特异性强和 PCR 技术的灵敏度高(检测限高达 $10^{-11} \sim 10^{-12}$ g/L) 的特点,可用于检测环境中痕量污染物。2003 年,美国西北大学 Mirkin 等人提出“纳米粒子-DNA 生物条形码”概念,通过抗原-抗体的特异结合以及磁场作用来实现对目标分析物的识别和分离;而修饰在 GNPs 表面的 DNA 片段则被用作检测信号以实现定性或定量检测。虽然常规生物条形码方法可大大提高生物条形码方法的灵敏度和自动化程度,但方法应用中仍需使用磁性微珠来实现磁分离。磁分离步骤不仅使检测方法复杂,难以实现对样品的高通量检测,而且会增加因分离造成的人为误差。与传统免疫 PCR 方法相比,免疫 PCR 技术与生物条形码相结合发展的免疫 PCR 生物条形码方法最显著的特点就是利用纳米探针巨大的比表面积提高了抗体与 DNA 的结合比例,比值从 1 : 1 增加到 N : 1。此外,纳米探针在反应前已经制备成功,这使得分析时间更短,同时也避免了反应中诸多试剂加入引起的非特异性吸附,进而提高了检测灵敏度。

[0006] 目前,尚无用免疫 PCR 生物条形码方法检测三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯的相关报道。而制备合格的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原是建立三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯生物免疫分析检测方法的关键,这将具有重要的应用价值和理论研究意义。

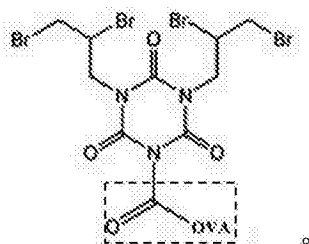
发明内容

[0007] 本发明的目的在于克服上述现有技术存在的缺陷,提供一种步骤简单,速度快,产率高的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原(TBC-OVA)的制备和用途;本发明制备的溴代阻燃剂三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原(TBC-OVA)为利用包被原、高特异性的多克隆抗体建立新型生物免疫分析检测方法奠定基础。该新型生物免疫分析检测方法克服了现有检测方法的缺点:样品预处理复杂费时,检测仪器昂贵,操作人员操作要求高,方法不易于推广,不能用于环境污染事故的现场检测等。

[0008] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现:

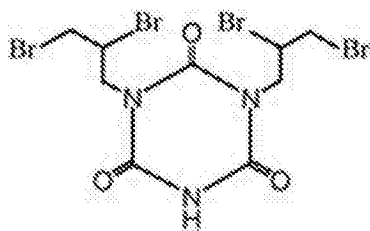
[0009] 第一方面,本发明涉及一种三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原,其结构式如下:

[0010]



[0011] 第二方面,本发明涉及一种三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的制备方法,所述方法包括:

[0012] 采用水溶性碳二亚胺(EDC)法,将三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原



与卵清白蛋白 (OVA) 偶联反应,即得所述三 (2,3-二溴丙基) 异

氰脲酸酯包被原 (TBC-OVA)。

[0013] 优选的,所述偶联反应是在 $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ 冰浴遮光条件下进行的,反应时间为 $25 \sim 30\text{h}$ 。

[0014] 更优选的,所述偶联反应中水溶性碳二亚胺是分批加入的。所述水溶性碳二亚胺选用 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐溶液;所述偶联反应具体为:先加入大部分的 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐溶液,冰浴遮光搅拌 $5 \sim 6$ 小时,再向混合液中加入另外少量的 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐溶液,继续冰浴遮光搅拌 $20 \sim 24$ 小时。该偶联反应可实现偶联比高,进而满足实际生产需要。

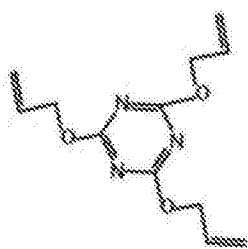
[0015] 优选的,所述方法还包括离心分离,透析上清液,再次离心分离得到所述三 (2,3-二溴丙基) 异氰脲酸酯包被原的步骤。

[0016] 优选的,所述水溶性碳二亚胺法采用的溶剂为 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐溶液,所述三 (2,3-二溴丙基) 异氰脲酸酯半抗原、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐和卵清白蛋白的摩尔比为 $1 : 1 \sim 1.5 : 0.005 \sim 0.05$ 。更优选的摩尔比为 $1 : 1.1 \sim 1.5 : 0.005 \sim 0.05$ 。

[0017] 优选的,所述方法包括将所述三 (2,3-二溴丙基) 异氰脲酸酯半抗原溶解于非质子性有机溶剂中形成半抗原溶液的步骤;所述非质子性有机溶剂选自 N,N-二甲基甲酰胺或二甲亚砜。

[0018] 优选的,所述三 (2,3-二溴丙基) 异氰脲酸酯半抗原是通过包括如下步骤的方法制备而得的:

[0019] S1、在非质子性有机溶剂存在的条件下,2,4,6-三(烯丙氧基)-1,3,5-三嗪



与 CuCl_2 回流反应,生成二烯丙基异氰脲酸酯;

[0020] S2、在非质子性有机溶剂存在的条件下,所述二烯丙基异氰脲酸酯和液溴回流反应,生成三 (2,3-二溴丙基) 异氰脲酸酯半抗原,即 TBC 半抗原,化学名称为二 (2,3-二溴丙基) 异氰脲酸酯,分子量 527.78。

[0021] 优选的,步骤 S1 中,所述 2,4,6-三(烯丙氧基)-1,3,5-三嗪、水、氯化亚铜的摩尔比为 $1 : 1 : 45 \sim 50$;所述回流反应的温度为 $95 \sim 100^{\circ}\text{C}$,反应时间为 $5 \sim 6$ 小时;所述非质子性有机溶剂选自甲苯、二氯甲烷或丙酮。

[0022] 优选的,步骤 S2 中,所述二烯丙基异氰脲酸酯和液溴的摩尔比为 $1 : 4 \sim 5$;所述回流反应的温度为 $50 \sim 60^{\circ}\text{C}$,反应时间为 $1 \sim 2$ 小时;所述非质子性有机溶剂选自甲苯、

二氯甲烷或丙酮。

[0023] 优选的,步骤 S1 还包括回流反应结束后用体积比为 2 : 1 的二氯甲烷和石油醚重结晶,洗涤,得到纯化后的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯的步骤。

[0024] 优选的,步骤 S2 还包括回流反应结束后用饱和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液以终止反应,二氯甲烷萃取反应液,分离并干燥有机相,用体积比为 1 : 1 的乙酸乙酯与正己烷的混合液重结晶,洗涤,得到纯化后的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原的步骤。

[0025] 第三方面,本发明涉及一种三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原在用于痕量溴代阻燃剂三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯检测中的用途。

[0026] 优选的,所述检测采用免疫检测方法,检测时所述三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原与被分析物三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯直接竞争具特异性免疫反应的抗三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯特异性抗体。

[0027] 由于三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原(TBC-OVA)可以与被分析物三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯形成直接竞争关系,它们都能特异性识别抗三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯的多克隆抗体,进而建立专一、高效的生物免疫方法用于水体、土壤、大气等环境样品和电子产品、纺织印染品、建筑装潢等产品中痕量溴代阻燃剂三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯的检测。

[0028] 本发明的机理在于:由于三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯是小分子物质,只具有反应原性而没有包被原性,而且该分子上没有能与蛋白质分子直接结合的氨基、羧基等官能团,故本发明选择 2,4,6-三(烯丙氧基)-1,3,5-三嗪为原料,通过两步反应制备带有仲氨基活性基团的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原,然后用水溶性碳二亚胺(EDC)法将这个含仲氨基的半抗原与卵清白偶联制备包被原,将其用于建立针对三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯的免疫分析方法。

[0029] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0030] 1) 包被原实用性强:三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的制备具有重要的实用价值和现实意义。利用本专利中介绍的方法,成功制备了三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原(TBC-OVA)。该包被原保留了三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯的结构,具有针对三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯的抗原决定簇,为建立免疫 PCR 生物条形码方法提供了保障。

[0031] 2) 包被原稳定性好:此法合成的三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原具有较好的稳定性,在 0 ~ 4℃ 环境下可保存 12 个月不变性, -20℃ 环境下可保存 3 ~ 5 年。

[0032] 3) 包被原制备技术简便可行:抗原的整个制备过程无需特别的仪器设备,成本低廉,容易工业化规模生产。

附图说明

[0033] 通过阅读参照以下附图对非限制性实施例所作的详细描述,本发明的其它特征、目的和优点将会变得更加明显:

[0034] 图 1 为三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的制备流程示意图;

[0035] 图 2 为三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原红外光谱;

[0036] 图 3 为三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原核磁共振光谱;

[0037] 图 4 为三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原、蛋白质和包被原的紫外吸收光谱

图；

[0038] 图 5 为间接竞争法检测三 (2,3- 二溴丙基) 异氰脲酸酯免疫 PCR 生物条形码方法的扩增曲线；

[0039] 图 6 为间接竞争免疫 PCR 生物条形码方法检测三 (2,3- 二溴丙基) 异氰脲酸酯的标准工作曲线。

具体实施方式

[0040] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的阐述,这些实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,在阅读本发明讲授的内容后,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。

[0041] 本发明的三 (2,3- 二溴丙基) 异氰脲酸酯包被原的制备流程示意图如图 1 所示,制备时,2,4,6- 三 (烯丙氧基)-1,3,5- 三嗪与 CuCl_2 回流反应得二烯丙基异氰脲酸酯;二烯丙基异氰脲酸酯和液溴回流反应得三 (2,3- 二溴丙基) 异氰脲酸酯半抗原;采用水溶性碳二亚胺法,将所述半抗原与卵清白蛋白偶联反应,即得包被原 TBC-OVA。水溶性碳二亚胺法反应中,三 (2,3- 二溴丙基) 异氰脲酸酯半抗原的仲氨基是与 OVA 的羧基发生偶联反应,生成包被原 TBC-OVA。具体制备及应用见以下各实施例:

[0042] 实施例 1、三 (2,3- 二溴丙基) 异氰脲酸酯半抗原的制备与鉴定

[0043] (1) 三 (2,3- 二溴丙基) 异氰脲酸酯半抗原的制备

[0044] 原料 2,4,6- 三 (烯丙氧基)-1,3,5- 三嗪、水、二水合氯化铜的摩尔比为 1 : 1 : 45,溶于甲苯后加入到圆底烧瓶中,95℃ 加热回流,薄板层析法 (展开剂,正己烷: 乙酸乙酯 = 5 : 1 (v : v)) 检测到原料点消失为止,自然冷却至室温后将反应液转移至旋转蒸发仪中减压蒸馏除去溶剂;随后用二氯甲烷和石油醚的混合液 (v : v = 2 : 1) 重结晶,抽滤后得到浅绿色粉末状固体;固体用稀盐酸重复洗涤绿色固体直至颜色变为白色,再用蒸馏水洗涤至近中性,加压烘干后取 0.5g 溶于 20mL 二氯甲烷中,加热状态下逐滴加入 120 μL 液溴,保持回流反应,薄板层析法 (展开剂,正己烷: 乙酸乙酯 = 5 : 1 (v : v)) 监测反应直至反应完全;冷却至室温后向反应体系中加入饱和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液直至反应体系液红色消失,用 100mL 水和 150mL (50mL $\times$ 3 次) 二氯甲烷重复萃取反应液,分离并保留有机相,并用饱和氯化钠溶液多次洗涤以去除杂质,再用无水硫酸钠干燥有机相以除去多余的水分,粗品用乙酸乙酯与正己烷的混合液 (v : v = 1 : 1) 重结晶得针状晶体即三 (2,3- 二溴丙基) 异氰脲酸酯半抗原二 (2,3- 二溴丙基) 异氰脲酸酯,产率 47.1%;熔点: 128-131℃。

[0045] (2) 三 (2,3- 二溴丙基) 异氰脲酸酯半抗原的鉴定

[0046] 将制得的半抗原经红外光谱 (图 2)、核磁共振光谱 (图 3) 鉴定,结果为: IR (KBr) ν/cm^{-1} : 1671.98 (C=O 伸缩), 1430.92 (O-H 面内弯曲); 3320.82 (胺 N-H 伸缩), 1295.93、1315.21 (C-N 芳香伸缩); 2989.12 (C-H 伸缩), 1648.84 ~ 1432.85 (C=C 苯环骨架振动), 910 ~ 665 (C-H 面外弯曲), 621.08 (C-Br 伸缩); ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 9.22 (1HN-H), 4.42 (1H R-CH-Br), 3.77、3.88 (2H-CH₂-Br), 1.44、1.28 (2H-CH₂-)。红外、核磁表征结果表明, TBC 半抗原红外光谱有明显的 -COOH、-NH、苯环、C-Br 等基团特征吸收峰,证明制备的 TBC 半抗原分子中含有氨基官能团,最终实验中成功制备了 TBC 半抗原。

[0047] 从以上分析可知,所合成的产物为目标物。

[0048] 实施例 2、三 (2,3-二溴丙基) 异氰脲酸酯包被原的合成与鉴定

[0049] (1) 三 (2,3-二溴丙基) 异氰脲酸酯包被原的合成

[0050] 称取 0.5mmol 三 (2,3-二溴丙基) 异氰脲酸酯半抗原于小锥形瓶中,加入 1mL N, N-二甲基甲酰胺使之溶解,形成三 (2,3-二溴丙基) 异氰脲酸酯半抗原溶液;再分别称取 96mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐 (0.5mmol) 和 0.1125g OVA (0.0025mmol) 分别溶于 2mL 0.01M pH5.0 的醋酸钠-醋酸缓冲液 (NaAc-HAc) 中,形成 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐溶液和 OVA 溶液;向 OVA 溶液中缓慢滴加三 (2,3-二溴丙基) 异氰脲酸酯半抗原溶液和上述配好的 2mL 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐溶液,0℃冰浴遮光搅拌 5 小时,再向混合液中加入另外 0.05mmol 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐溶液 (10mg 溶于 0.2mL NaAc-HAc 中),继续 4℃冰浴遮光搅拌 24 小时;反应结束后,3000rpm 离心 10min 分离上清液,将上清液装入透析袋,用 0.01M pH7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 透析 3 天,每 8 小时换透析液 1 次,低温离心得到的上清液,即得到三 (2,3-二溴丙基) 异氰脲酸酯包被原 (TBC-OVA)。包被原经紫外-可见分光光度计鉴定好,小量分装,-20℃冷冻保存。

[0051] (2) 三 (2,3-二溴丙基) 异氰脲酸酯包被原的鉴定

[0052] 可进行包被原鉴定的方法有色谱法、红外光谱法、紫外光谱法、SDS-PAGE 凝胶电泳等。其中最常用的方法是紫外可见光谱法。一般来说,只要包被原的紫外-可见光谱与载蛋白和半抗原的紫外光谱不同,即可间接说明半抗原成功与蛋白质偶联,包被原合成成功。因为根据朗伯-比尔定律,当波长一定时,混合物的紫外吸收具有加合性。

[0053] 包被原的紫外光谱表征具体为:将制备的包被原适当稀释,使其吸光度在 0.1~2.0 之间,以 PBS 为空白对照,用紫外分光光度计在 200~500nm 分别测定三 (2,3-二溴丙基) 异氰脲酸酯半抗原和包被原 TBC-OVA 的吸光值,绘制紫外吸收光谱图,并根据以下公式计算偶联比:

[0054]

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

[0055] 式中: $OD_{\text{conjugate}}$ ——偶联物吸光度; OD_{protein} ——蛋白质吸光值; OD_{hapten} ——半抗原吸光值; C_{hapten} ——半抗原浓度; C_{protein} ——蛋白质浓度; M_{hapten} ——半抗原分子量; M_{protein} ——蛋白质分子量。

[0056] 本发明采用全波长紫外分光光度计对半抗原、载体蛋白和包被原进行扫描,根据特征吸收峰的位置确定偶联是否成功。元素分析结果进一步证明了产物的结构和所设计的路线一致。

[0057] 由紫外光谱 (图 4) 可知, TBC 半抗原在 281nm 处有特征吸收峰, 载体蛋白 OVA 在 219nm、224nm、268nm 处有特征吸收峰, 包被原 TBC-OVA 的紫外光谱中不仅分别包含 OVA 的特征峰, 还在 253nm 处出现了新的吸收峰, 说明偶联成功。计算 TBC-OVA 中 TBC 与 OVA 的结合比分别为 12 : 1。

[0058] (3) 三 (2,3-二溴丙基) 异氰脲酸酯包被原蛋白质浓度的测定

[0059] 根据考马斯亮蓝 G250 法测定包被原蛋白质浓度。考马斯亮蓝 G250 在游离时为红

色,与蛋白质结合后为青蓝色,前者最大吸收值在 465nm,后者在 595nm 处。以 OVA 为标准物质配置不同浓度标准溶液,与一定量考马斯亮蓝 G250 反应后,分别在 595nm 处测定溶液吸光度值。标准溶液在 0-150 μ g/mL 范围内线性关系良好。在稀释一定倍数的包被原溶液中加入考马斯亮蓝染色,在相同波长处测量吸光度值,后与标准曲线比较,得制备的包被原蛋白质浓度为 3.01mg/mL。

[0060] 这些包被原可以作为免疫竞争对象而使用。

[0061] 实施例 3、三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的合成与鉴定

[0062] (1) 三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的合成

[0063] 称取 0.5mmol 三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原于小锥形瓶中,加入 1mL N,N-二甲基甲酰胺使之溶解,再分别称取 115mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(0.6mmol)和 1.125g OVA(0.025mmol)分别溶于 2mL 0.01M pH5.0 的醋酸钠-醋酸缓冲液(NaAc-HAc)中;向 OVA 溶液中缓慢滴加三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原溶液和上述配好的 2mL 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐溶液,1℃冰浴遮光搅拌 6 小时,再向混合液中加入另外 0.06mmol 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐溶液(11mg 溶于 0.2mL NaAc-HAc 中),继续 3℃冰浴遮光搅拌 22 小时;反应结束后,3000rpm 离心 12min 分离上清液,将上清液装入透析袋,用 0.01M pH7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)透析 3 天,每 8 小时换透析液 1 次,低温离心得到的上清液,即得到三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原(TBC-OVA)。包被原经紫外-可见分光光度计鉴定好,小量分装,-20℃冷冻保存。

[0064] (2) 三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的鉴定

[0065] 可进行包被原鉴定的方法有色谱法、红外光谱法、紫外光谱法、SDS-PAGE 凝胶电泳等。其中最常用的方法是紫外可见光谱法。一般来说,只要包被原的紫外-可见光谱与载体蛋白和半抗原的紫外光谱不同,即可间接说明半抗原成功与蛋白质偶联,包被原合成成功。因为根据朗伯-比尔定律,当波长一定时,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、载体蛋白和包被原进行扫描,根据特征吸收峰的位置确定偶联是否成功。元素分析结果进一步证明了产物的结构和所设计的路线一致。

[0066] 由紫外光谱可知,TBC 半抗原在 281nm 处有特征吸收峰,载体蛋白 OVA 在 219nm、224nm、268nm 处有特征吸收峰,包被原 TBC-OVA 的紫外光谱中不仅分别包含 OVA 的特征峰,还在 253nm 处出现了新的吸收峰,说明偶联成功。计算 TBC-OVA 中 TBC 与 OVA 的结合比分别为 12 : 1。

[0067] (3) 三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原蛋白质浓度的测定

[0068] 根据考马斯亮蓝 G250 法测定包被原蛋白质浓度。考马斯亮蓝 G250 在游离时为红色,与蛋白质结合后为青蓝色,前者最大吸收值在 465nm,后者在 595nm 处。以 OVA 为标准物质配置不同浓度标准溶液,与一定量考马斯亮蓝 G250 反应后,分别在 595nm 处测定溶液吸光度值。标准溶液在 0-150 μ g/mL 范围内线性关系良好。在稀释一定倍数的包被原溶液中加入考马斯亮蓝染色,在相同波长处测量吸光度值,后与标准曲线比较,得制备的包被原蛋白质浓度为 3.01mg/mL。

[0069] 这些包被原可以作为免疫竞争对象而使用。

[0070] 实施例 4、三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的合成与鉴定

[0071] (1) 三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的合成

[0072] 称取 0.5mmol 三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原于小锥形瓶中,加入 1mL N,N-二甲基甲酰胺使之溶解,再分别称取 124mg 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(0.65mmol)和 0.225g OVA(0.005mmol)分别溶于 2mL 0.01M pH5.0 的醋酸钠-醋酸缓冲液(NaAc-HAc)中;向 OVA 溶液中缓慢滴加三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原溶液和上述配好的 2mL 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐溶液,3℃冰浴遮光搅拌 6 小时,再向混合液中加入另外 0.05mmol 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐溶液(12mg 溶于 0.2mL NaAc-HAc 中),继续 2℃冰浴遮光搅拌 22 小时;反应结束后,3000rpm 离心 12min 分离上清液,将上清液装入透析袋,用 0.01M pH7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)透析 3 天,每 8 小时换透析液 1 次,低温离心得到的上清液,即得到三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原(TBC-OVA)。包被原经紫外-可见分光光度计鉴定好,小量分装,-20℃冷冻保存。

[0073] (2) 三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的鉴定

[0074] 可进行包被原鉴定的方法有色谱法、红外光谱法、紫外光谱法、SDS-PAGE 凝胶电泳等。其中最常用的方法是紫外可见光谱法。一般来说,只要包被原的紫外-可见光谱与载蛋白和半抗原的紫外光谱不同,即可间接说明半抗原成功与蛋白质偶联,包被原合成成功。因为根据朗伯-比尔定律,当波长一定时,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、载体蛋白和包被原进行扫描,根据特征吸收峰的位置确定偶联是否成功。元素分析结果进一步证明了产物的结构和所设计的路线一致。

[0075] 由紫外光谱可知,TBC 半抗原在 281nm 处有特征吸收峰,载体蛋白 OVA 在 219nm、224nm、268nm 处有特征吸收峰,包被原 TBC-OVA 的紫外光谱中不仅分别包含 OVA 的特征峰,还在 253nm 处出现了新的吸收峰,说明偶联成功。计算 TBC-OVA 中 TBC 与 OVA 的结合比分别为 12 : 1。

[0076] (3) 三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原蛋白质浓度的测定

[0077] 根据考马斯亮蓝 G250 法测定包被原蛋白质浓度。考马斯亮蓝 G250 在游离时为红色,与蛋白质结合后为青蓝色,前者最大吸收值在 465nm,后者在 595nm 处。以 OVA 为标准物质配置不同浓度标准溶液,与一定量考马斯亮蓝 G250 反应后,分别在 595nm 处测定溶液吸光度值。标准溶液在 0-150 μ g/mL 范围内线性关系良好。在稀释一定倍数的包被原溶液中加入考马斯亮蓝染色,在相同波长处测量吸光度值,后与标准曲线比较,得制备的包被原蛋白质浓度为 3.01mg/mL。

[0078] 这些包被原可以作为免疫竞争对象而使用。

[0079] 实施例 5、三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的合成与鉴定

[0080] (1) 三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的合成

[0081] 称取 0.5mmol 三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原于小锥形瓶中,加入 1mL N,N-二甲基甲酰胺使之溶解,再分别称取 130mg 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(0.68mmol)和 0.225g OVA(0.005mmol)分别溶于 2mL 0.01M pH5.0 的醋酸钠-醋酸缓冲液(NaAc-HAc)中;向 OVA 溶液中缓慢滴加三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原溶液和上述配好的 2mL 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐溶液,4℃冰浴遮光搅拌 6 小时,再向混合液中加入另外 0.07mmol 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺

盐酸盐溶液 (13mg 溶于 0.2mL NaAc-HAc 中), 继续 4℃冰浴遮光搅拌 24 小时; 反应结束后, 3000rpm 离心 15min 分离上清液, 将上清液装入透析袋, 用 0.01M pH7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 透析 3 天, 每 8 小时换透析液 1 次, 低温离心得到的上清液, 即得到三 (2,3- 二溴丙基) 异氰脲酸酯包被原 (TBC-OVA)。包被原经紫外 - 可见分光光度计鉴定好, 小量分装, -20℃冷冻保存。

[0082] (2) 三 (2,3- 二溴丙基) 异氰脲酸酯包被原的鉴定

[0083] 可进行包被原鉴定的方法有色谱法、红外光谱法、紫外光谱法、SDS-PAGE 凝胶电泳等。其中最常用的方法是紫外可见光谱法。一般来说, 只要包被原的紫外 - 可见光谱与载体蛋白和半抗原的紫外光谱不同, 即可间接说明半抗原成功与蛋白质偶联, 包被原合成成功。因为根据朗伯 - 比尔定律, 当波长一定时, 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、载体蛋白和包被原进行扫描, 根据特征吸收峰的位置确定偶联是否成功。元素分析结果进一步证明了产物的结构和所设计的路线一致。

[0084] 由紫外光谱可知, TBC 半抗原在 281nm 处有特征吸收峰, 载体蛋白 OVA 在 219nm、224nm、268nm 处有特征吸收峰, 包被原 TBC-OVA 的紫外光谱中不仅分别包含 OVA 的特征峰, 还在 253nm 处出现了新的吸收峰, 说明偶联成功。计算 TBC-OVA 中 TBC 与 OVA 的结合比分别为 12 : 1。

[0085] (3) 三 (2,3- 二溴丙基) 异氰脲酸酯包被原蛋白质浓度的测定

[0086] 根据考马斯亮蓝 G250 法测定包被原蛋白质浓度。考马斯亮蓝 G250 在游离时为红色, 与蛋白质结合后为青蓝色, 前者最大吸收值在 465nm, 后者在 595nm 处。以 OVA 为标准物质配置不同浓度标准溶液, 与一定量考马斯亮蓝 G250 反应后, 分别在 595nm 处测定溶液吸光度值。标准溶液在 0-150 μ g/mL 范围内线性关系良好。在稀释一定倍数的包被原溶液中加入考马斯亮蓝染色, 在相同波长处测量吸光度值, 后与标准曲线比较, 得制备的包被原蛋白质浓度为 3.01mg/mL。

[0087] 这些包被原可以作为免疫竞争对象而使用。

[0088] 实施例 6、间接竞争免疫 PCR 生物条形码方法检测三 (2,3- 二溴丙基) 异氰脲酸酯

[0089] 为了增强 PCR 管的吸附性, 用 0.8% 的戊二醛对 PCR 管进行预处理, 每孔加入 20 μ L 戊二醛溶液, 37℃下温育 5 小时, 然后用超纯水洗涤 3 次, 甩干备用; 用包被缓冲液 (0.05M pH 9.60 碳酸盐缓冲液) 将包被原 TBC-OVA 稀释至适当浓度, 加入到经过戊二醛处理的 PCR 管中进行包被, 每孔 20 μ L, 0 ~ 4℃下包被过夜; 倒掉包被原, 每孔加入 200 μ L 洗涤液 (0.01M pH 7.40PBST) 进行洗涤, 振荡 3 分钟后甩干, 洗三遍后加入 200 μ L 封闭液 (含 1% OVA 的磷酸盐缓冲溶液), 37℃下温育 1 小时; 洗板三次, 将抗 TBC 多克隆抗体稀释至适当浓度, 每孔加入 10 μ L 抗体及 10 μ L TBC 小分子, 空白对照孔中加入 20 μ L PBS, 37℃下温育 1 小时; 洗板三次并甩干, 用 0.01M pH 7.40PBS 将金纳米颗粒生物探针稀释至适当倍数, 每孔加入 20 μ L, 37℃下温育 1 小时; 倒掉溶液后用洗脱液重复洗涤五次, 再用超纯水重复洗涤五次; 最后加入扩增引物和荧光物质, 采用 20 μ L 的扩增体系, 每孔加入 10 μ L PCR 试剂盒 mixture, 上下游引物各加入 0.25 μ L, 超纯水 9.5 μ L; 在加入 PCR 扩增试剂时, 在荧光 PCR 反应仪中进行扩增 (PCR 扩增程序: 95℃预变性 5min; 95℃ 20s, 57℃ 20s, 72℃ 20s, 以此进行 35 个循环; 72℃延伸 3min)。测定的 Ct 值与待测抗原的量成反比。根据加入已知浓度的抗原和相应的 Ct 值作标准曲线, 从而可以得到相应待测样品中 TBC 的浓度。其测定

的扩增曲线与建立的标准曲线如图 5 和图 6 所示。

[0090] 本实验中所用条形码 DNA 取自 PUC19 质粒 DNA 中的一段。根据引物设计原理,使用 primer premier 5.0 软件设计合适的引物',上游引物 5'-GAG GCG GTT TGC GTA TTG-3' 和下游引物 5'-AGC GAG GAA GCG GAA GAG-3',委托生工生物工程(上海)股份有限公司制备合成。

[0091] 当 TBC 浓度在 0.1pg/L-100pg/L 时线性相关性较好,线性方程为 $Ct = 1.0711lgC + 14.3$ ($R^2 = 0.974$, $n = 5$), $LOD = 0.97pg/L$ 。

[0092] 以上对本发明的具体实施例进行了描述。需要理解的是,本发明并不局限于上述特定实施方式,本领域技术人员可以在权利要求的范围内做出各种变形或修改,这并不影响本发明的实质内容。

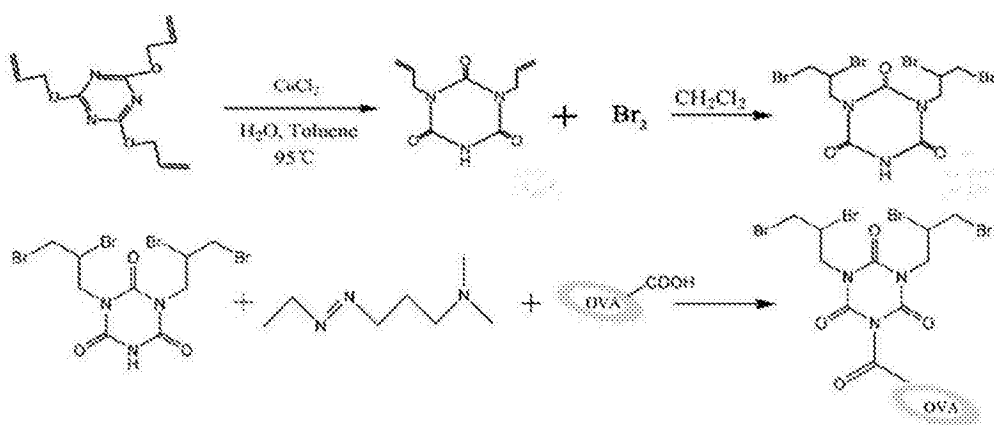


图 1

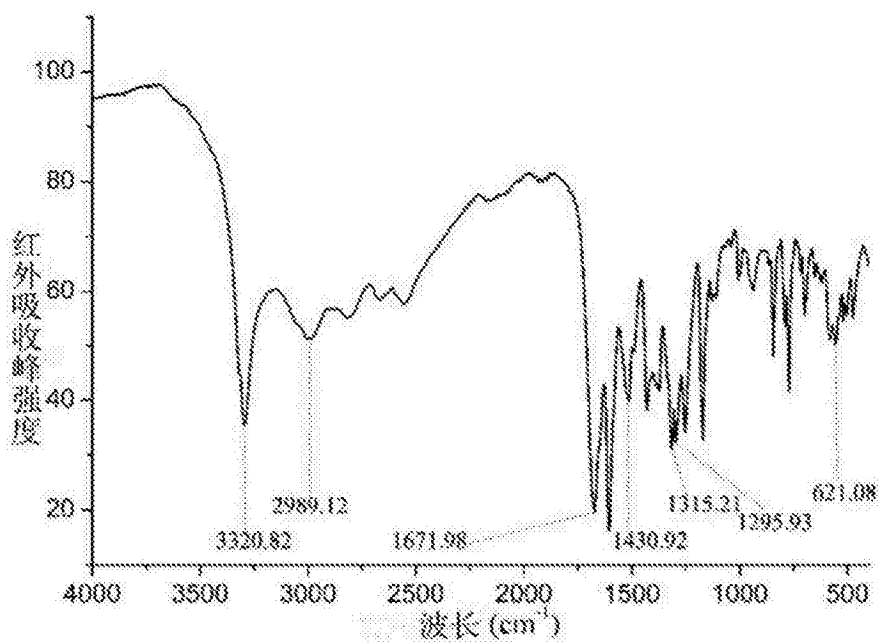


图 2

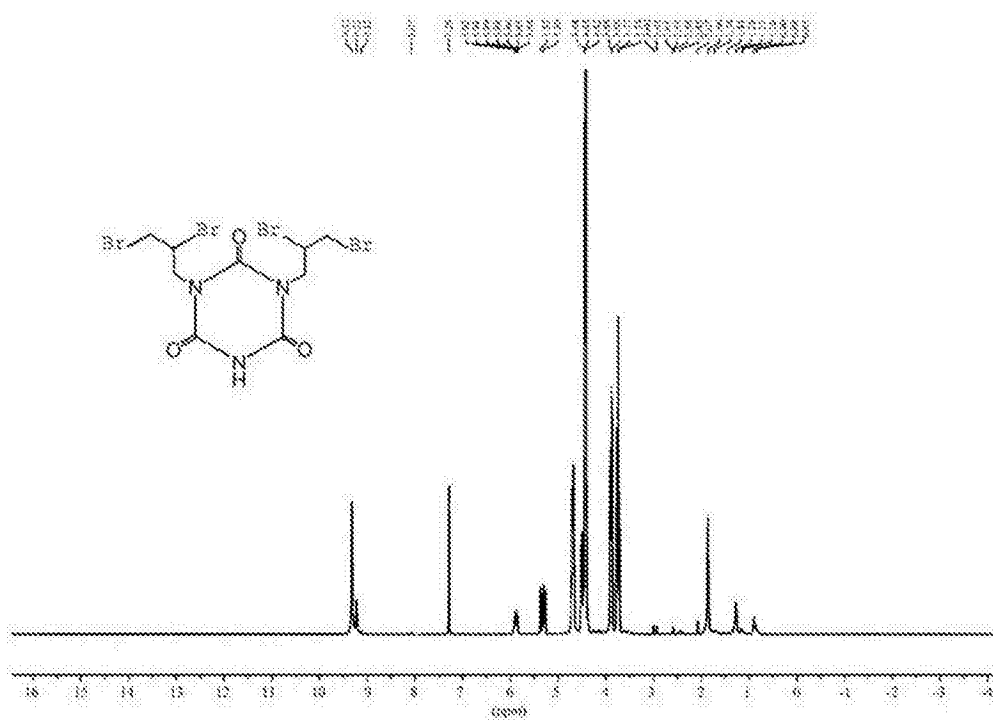


图 3

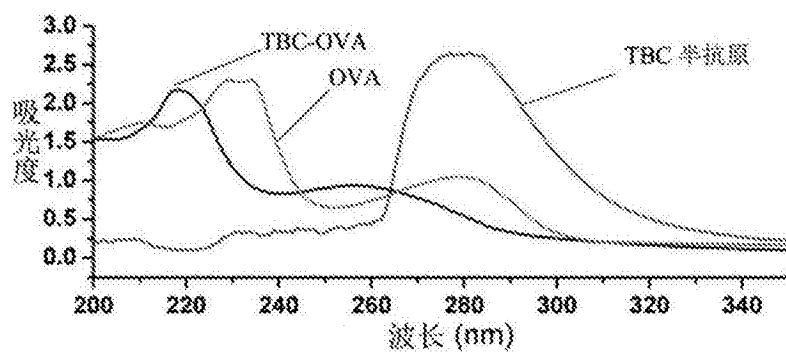


图 4

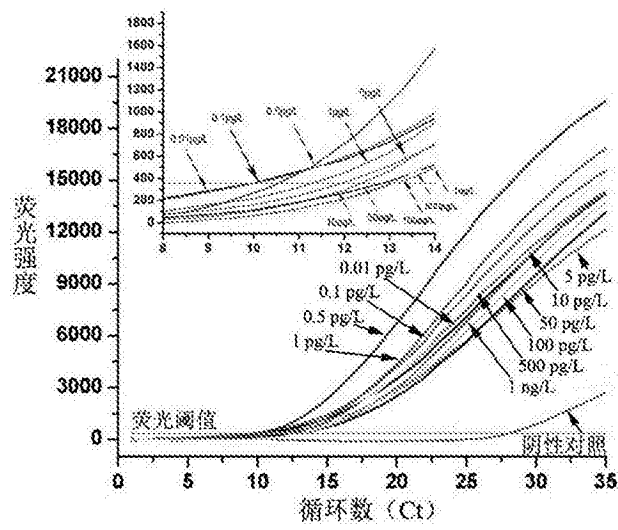


图 5

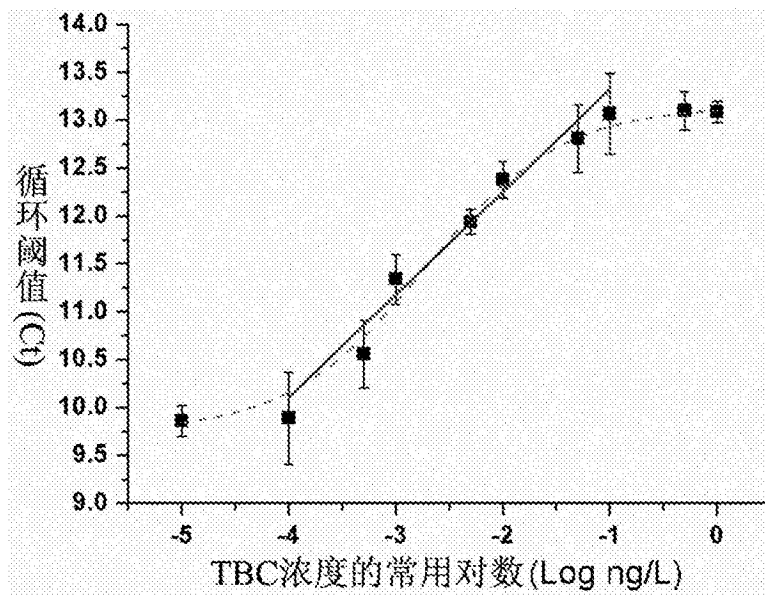


图 6

专利名称(译)	三(2, 3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的制备和用途		
公开(公告)号	CN105111307A	公开(公告)日	2015-12-02
申请号	CN201510483528.3	申请日	2015-08-07
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	庄惠生 孙瑞艳 卜聃		
发明人	庄惠生 孙瑞艳 卜聃		
IPC分类号	C07K14/77 G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	C07K19/00 C07K14/77 G01N33/53 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种三(2, 3-二溴丙基)异氰脲酸酯包被原的制备和用途；所述包被原结构式如下：制备时，2,4,6-三(烯丙氧基)-1,3,5-三嗪与CuCl₂回流反应得二烯丙基异氰脲酸酯；二烯丙基异氰脲酸酯和液溴回流反应得三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯半抗原；采用水溶性碳二亚胺法，将所述半抗原与卵清白蛋白偶联反应，即得包被原TBC-OVA。本发明的包被原可以与被分析物三(2, 3-二溴丙基)异氰脲酸酯形成直接竞争关系，都能特异性识别抗三(2, 3-二溴丙基)异氰脲酸酯的多克隆抗体，为建立免疫检测方法奠定基础。此外，包被原的制备方法简单，稳定性好，成本低，易于工业化生产。

