



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108794428 A

(43)申请公布日 2018.11.13

(21)申请号 201810632217.2

(22)申请日 2018.06.19

(71)申请人 广东工业大学

地址 510006 广东省广州市越秀区东风东路729号

(72)发明人 黄玄贺 卢宇靖 蔡森源 李莹
龙威 张焜 黄宝华

(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 295/185(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

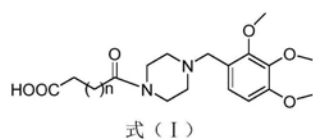
权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

一种曲美他嗪半抗原、人工抗原及其制备方法和应用

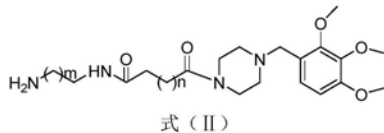
(57)摘要

本发明涉及一种曲美他嗪半抗原、人工抗原及其制备方法和应用。所述半抗原,具有如式(I)或式(II)所示的结构:



式(I)

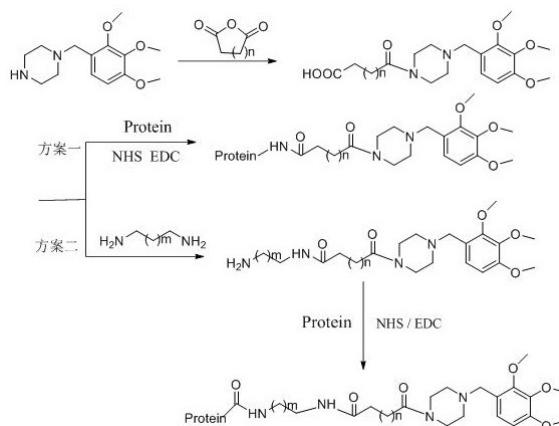
其中n为1~3,m



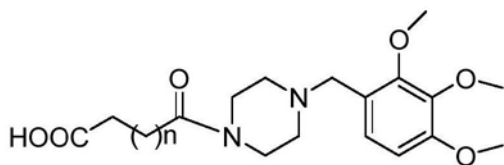
式(II)

为1~3;本发明提供的半抗原在保留曲美他嗪基本结构的基础上引入连接臂结构和用于偶联大分子的活性基团,这样既有利于其与大分子偶联,又可以在偶联后充分暴露本身分子结构和分子量较小的曲美他嗪基本结构,避免了其被大分子掩蔽而影响动物机体的识别。本发明通过活性酯化法将半抗原与蛋白质偶联制备人工抗原,偶

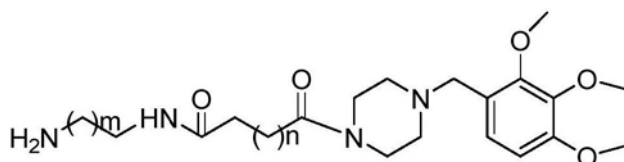
联比可达14.2,可用于曲美他嗪的免疫检测。



1. 一种曲美他嗪半抗原, 其特征在于, 具有如式 (I) 或式 (II) 所示的结构:



式 (I)



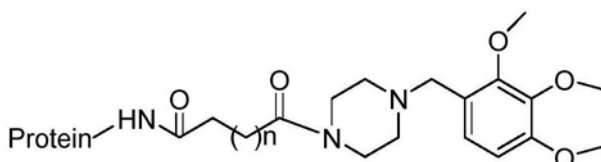
式 (II)

其中n为1~3, m为1~3。

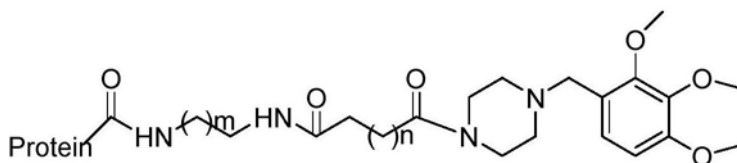
2. 根据权利要求1所述半抗原, 其特征在于, 式 (I) 所示结构中, n为2。

3. 根据权利要求2所述半抗原, 其特征在于, 式 (II) 所示结构中n为1, m为1。

4. 基于权利要求1~3任一所述曲美他嗪半抗原的人工抗原, 其特征在于, 具有如式 (III) 或式 (IV) 所示的结构:



式 (III)

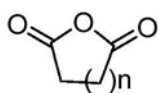


式 (IV)。

5. 根据权利要求4所述人工抗原, 其特征在于, 所述Protein为牛血清蛋白或卵清蛋白OVA。

6. 权利要求1~3任一所述半抗原的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

S1: 将曲美他嗪与式 (V) 所示环状酸酐混合, 溶解, 然后加入三乙胺, 搅拌, 萃取, 干燥, 浓缩后得固体, 重结晶后得式 (I) 所示半抗原; 所述曲美他嗪与环状酸酐的质量比为1:5~13;



式 (V)

S2: 将式 (I) 所示半抗原与如式 (VI) 所示的脂肪类二胺混合, 于120~140℃下搅拌反应12~14h, 减压浓缩得油状粗产物; 分散洗涤, 抽滤即得式 (II) 所述半抗原; 所述曲美他嗪衍生物与脂肪类二胺的质量比为1:4~10;



式 (VI)。

7. 权利要求4~5任一所述人工抗原的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

S3:将式 (I) 或式 (II) 所示半抗原、活化剂混合,溶解,搅拌得一号反应液;

S4:将一号反应液加入载体蛋白溶液中,避光搅拌,离心,透析并取分子量为20000~30000的反应产物,干燥即得式 (III) 或式 (VI) 所示人工抗原;所述载体蛋白与式 (I) 或式 (II) 所示半抗原的质量比为1:15~25。

8. 根据权利要求7所述制备方法,其特征在于,S3中所述活化剂为N-羟基琥珀酰亚胺 NHS和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺EDC。

9. 根据权利要求7所述制备方法,其特征在于,所述载体蛋白溶液由载体蛋白与磷酸缓冲液混合得到,所述载体蛋白与磷酸缓冲液的质量比为1:1.1~1.2。

10. 权利要求1~3任一所述半抗原或权利要求4~5任一所述人工抗原在曲美他嗪免疫检测中的应用。

一种曲美他嗪半抗原、人工抗原及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种曲美他嗪半抗原、人工抗原及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 曲美他嗪(trimetazidine),又叫1-[(2,3,4-三甲氧基苯基)甲基]哌嗪,分子式为C₁₄H₂₂N₂O₃,分子量为266.34,CAS号为5011-34-7。曲美他嗪为作用较强的抗心绞痛药,其起效较硝酸甘油慢,但作用持续时间较长。具有对抗肾上腺素、去甲肾上腺素及加压素的作用,能降低血管阻力,增加冠脉血流量及周围循环血流量,促进心肌代谢及心肌能量的产生。同时能减低心脏工作负荷,降低心肌耗氧量及心肌能量的消耗,从而改善心肌氧的供需平衡,还能增加对强心苷的耐受性,对伴有严重心功能不全者可与洋地黄并用。

[0003] 曲美他嗪最常见的副作用是:头晕、食欲不振、皮疹等。对本药过敏者、新近心肌梗死者禁用。妊娠期间避免给药。禁用于帕金森病、帕金森综合征、震颤、不宁腿综合征以及其他相关的运动障碍,严重肾功能损害患者。近年来,中成药及保健品非法添加化学物质越来越引起人们的关注,不法药商为了谋取非法利益,通过非法加入曲美他嗪,使疗效缓和的中成药或保健品具有了暂时的速效、高效或特效,增加销量,获取非法高额利润。但作为患者,在长期不知情的情况下服用含有曲美他嗪的中成药或保健品会引起严重的副作用。目前,检测中成药或保健品中是否含有曲美他嗪成分,采用的仍是传统的检验方法,须将提取的样品带回实验室进行分析,或是使用大型的试验车,这样都很不方便,而且反应时间长,实验耗资较大。

[0004] 免疫分析是一种基于抗原抗体特异性识别和结合反应的分析方法,具有灵敏、对仪器要求不高、操作简单、成本低等优点。曲美他嗪属于分子量小于1000的小分子化合物,本身不具备反应性和免疫原性,为了实现曲美他嗪的免疫检测,不仅需要合成具备高效价的曲美他嗪抗原,而且还需要筛选特异性强、敏感度高的曲美他嗪单克隆抗体。但是目前尚没有有关曲美他嗪单克隆抗体的相关报道。对于技术人员来说高效价的曲美他嗪抗原的设计仍是难点。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服现有技术中曲美他嗪免疫检测实现困难的缺点,提供一种曲美他嗪半抗原。本发明提供的半抗原在保留曲美他嗪基本结构的基础上引入连接臂结构和用于偶联大分子的活性基团,这样既有利于其与大分子偶联,又可以在偶联后充分暴露本身分子结构和分子量较小的曲美他嗪基本结构,避免了其被大分子掩蔽而影响动物机体的识别。本发明通过活性酯化法将半抗原与蛋白质偶联制备人工抗原,偶联比可达14.2,可用于曲美他嗪的免疫检测。

[0006] 本发明的另一目的在于提供一种曲美他嗪人工抗原。

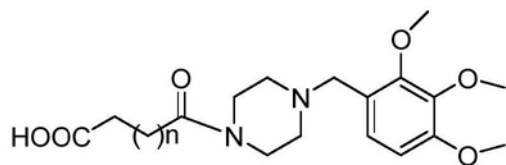
[0007] 本发明的另一目的在于提供上述曲美他嗪半抗原的制备方法。

[0008] 本发明的另一目的在于提供上述曲美他嗪人工抗原的制备方法。

[0009] 本发明的另一目的在于提供上述曲美他嗪半抗原或人工抗原在曲美他嗪免疫检测中的应用。

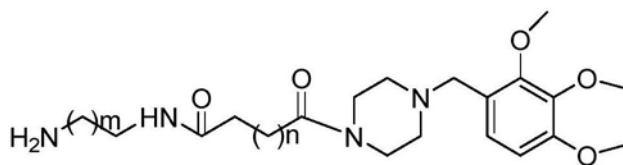
[0010] 为实现上述发明目的,本发明采用如下技术方案:

[0011] 一种曲美他嗪半抗原,具有如式(I)或式(II)所示的结构:



式(I)

[0012]



式(II)

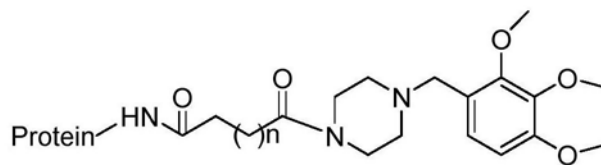
[0013] 其中n为1~3,m为1~3。

[0014] 本发明提供的半抗原在保留曲美他嗪基本结构的基础上引入连接臂结构和用于偶联大分子的活性基团,这样既有利于其与大分子偶联,又可以在偶联后充分暴露本身分子结构和分子量较小的曲美他嗪基本结构,避免了其被大分子掩蔽而影响动物机体的识别。

[0015] 优选地,式(I)所示结构中,n为2。

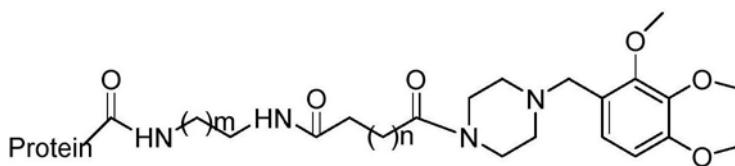
[0016] 优选地,式(II)所示结构中n为1,m为1。

[0017] 基于上述曲美他嗪半抗原的人工抗原,具有如式(III)或式(IV)所示的结构:



式(III)

[0018]



式(IV)。

[0019] 本发明通过活性酯化法将半抗原与蛋白质偶联制备人工抗原,偶联比可达14.2,可用于曲美他嗪的免疫检测。

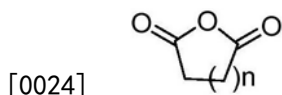
[0020] 优选地,所述Protein为牛血清蛋白或卵清蛋白OVA。

[0021] 更为优选地,所述Protein为牛血清蛋白。

[0022] 上述半抗原的制备方法,包括如下步骤:

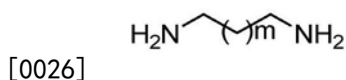
[0023] S1:将曲美他嗪与式(V)所示环状酸酐混合,溶解,然后加入三乙胺,搅拌,萃取,干燥,浓缩后得固体,重结晶后得式(I)所示半抗原;所述曲美他嗪与环状酸酐的质量比为

1:5~13;



式 (V)

[0025] S2:将式(I)所示半抗原与如式(VI)所示的脂肪类二胺混合,于XX~XX℃下搅拌反应XX~XXh,减压浓缩得油状粗产物;分散洗涤,抽滤即得式(II)所述半抗原;所述曲美他嗪衍生物与脂肪类二胺的质量比为1:4~10;



式 (VI)。

[0027] 优选地,S1中溶解的溶剂为1,4-二氧六环。

[0028] 优选地,所述三乙胺以滴状加入后,于40~50℃密闭条件下搅拌10~12h;所述三乙胺与曲美他嗪的质量比为30:1,所述三乙胺的pH为7.0。

[0029] 优选地,S1中利用乙酸乙酯进行萃取3次,并合并萃取液;利用无水Na₂SO₄进行干燥;利用75%乙醇进行重结晶。

[0030] 优选地,S2中于130℃搅拌反应12h。

[0031] 上述人工抗原的制备方法,包括如下步骤:

[0032] S3:将式(I)或式(II)所示半抗原、活化剂混合,溶解,搅拌得一号反应液;

[0033] S4:将一号反应液加入载体蛋白溶液中,避光搅拌,离心,透析并取分子量为20000~30000的反应产物,干燥即得式(III)或式(VI)所示人工抗原;所述载体蛋白与式(I)或式(II)所示半抗原的质量比为1:15~25。

[0034] 优选地,S3中所述活化剂为N-羟基琥珀酰亚胺NHS和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺EDC。

[0035] 更为优选地,S3中式(I)或式(II)所示半抗原、NHS和EDC的质量比为1:5~8:10~13。

[0036] 更为优选地,S3中于N,N-二甲基甲酰胺DMF中溶解。

[0037] 优选地,所述载体蛋白溶液由载体蛋白与磷酸缓冲液混合得到,所述载体蛋白与磷酸缓冲液的质量比为1:1.1~1.2。

[0038] 优选地,S4中于7.0~7.5的磷酸盐缓冲液中透析,所述透析的温度为3~5℃,透析的时间为46~50h,并每隔6~8h换一次磷酸盐缓冲液。

[0039] 上述半抗原或人工抗原在曲美他嗪免疫检测中的应用也在本发明的保护范围内。

[0040] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0041] 本发明提供的半抗原在保留曲美他嗪基本结构的基础上引入连接臂结构和用于偶联大分子的活性基团,这样既有利于其与大分子偶联,又可以在偶联后充分暴露本身分子结构和分子量较小的曲美他嗪基本结构,避免了其被大分子掩蔽而影响动物机体的识别。本发明通过活性酯化法将半抗原与蛋白质偶联制备人工抗原,偶联比可达14.2,可用于曲美他嗪的免疫检测。

附图说明

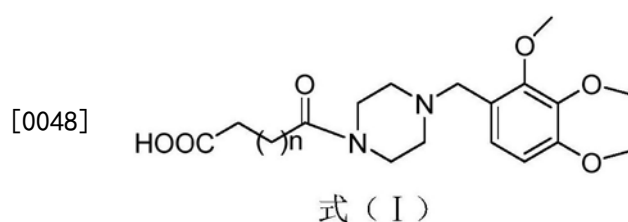
- [0042] 图1为曲美他嗪的结构式；
 [0043] 图2为各实施例制备流程图；
 [0044] 图3为偶联物TR-BSA的紫外全波谱扫描图。

具体实施方式

[0045] 下面结合实施例进一步阐述本发明。这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下例实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照本领域常规条件或按照制造厂商建议的条件；所使用的原料、试剂等，如无特殊说明，均为可从常规市场等商业途径得到的原料和试剂。本领域的技术人员在本发明的基础上所做的任何非实质性的变化及替换均属于本发明所要求保护的范围。

[0046] 实施例1

[0047] 本实施例提供一种曲美他嗪半抗原，结构式如式(I)， $n=1$ ：



[0049] 制备方法如下(如图2)：

[0050] 将1份曲美他嗪(结构式如图1)与10份丁二酸酐混合后，溶解于30份的1,4-二氧六环中，然后逐滴加入5滴三乙胺，40℃密闭搅拌反应12h。反应结束后，将反应液倾入水中，用100份乙酸乙酯萃取3次，合并萃取液，以无水Na2SO4进行干燥，浓缩后得到固体，75%乙醇重结晶得到固体产物为曲美他嗪半抗原。

[0051] 所得产物的结构表征为：¹H NMR (400MHz, DMSO) δ6.93 (d, J=7.6Hz, 1H), 6.50 (d, J=7.3Hz, 1H), 3.98 (s, J=4.1Hz, 3H), 3.80 (s, J=4.2Hz, 3H), 3.69 (s, J=4.1Hz, 2H), 3.62 (s, J=4.4Hz, 3H), 3.43 (t, J=3.1Hz, 4H), 2.60 (t, J=3.6Hz, 2H), 2.50 (t, J=3.3Hz, 4H), 2.49 (t, J=3.5Hz, 2H)。

[0052] 利用该半抗原可制备得到相对应的人工抗原。

[0053] 制备方法如下(如图2)：

[0054] 1、将本实施例制得的半抗原、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)平衡至室温；

[0055] 2、将1份上述的半抗原、8份EDC和13份NHS混合于圆底烧瓶，加入DMF，待所有物质溶解后，室温避光下搅拌12h，生成溶液记为一号反应液；

[0056] 3、将载体蛋白与磷酸缓冲溶液按照1:1.2的比例溶解，此溶液记为二号反应液；在本实施例中载体蛋白为牛血清蛋白。应当理解的是，还可以选用卵清蛋白OVA。

[0057] 4、将一号反应液按每5秒1滴的速度滴入二号反应液中，滴加完后，需控制载体蛋白与半抗原化合物比例为1:20，然后室温避光搅拌30min，接着4℃下避光搅拌直到反应完全(48小时)，将生成的溶液记为三号反应液；

[0058] 5、反应结束后，将三号反应液进行离心处理，并将上清液置于分子截留为30000的透析袋中，于pH值为7.4的磷酸盐缓冲液中，在4℃的条件下进行透析48小时，每隔6~8小时

换一次磷酸盐缓冲液；

[0059] 6、透析后透析袋中所得溶液，经冷冻干燥得白色固体，即为人工合成抗原。

[0060] 实施例2

[0061] 本实施例提供一种曲美他嗪半抗原，结构式如式(I)，n为2。

[0062] 制备方法如下：

[0063] 将1份曲美他嗪与10份戊二酸酐混合后，后续步骤与实施例1相同。

[0064] 所得产物的结构表征为：¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 6.96 (d, J=7.8Hz, 1H), 6.45 (d, J=8.1Hz, 1H), 3.94 (s, J=4.4Hz, 3H), 3.85 (s, J=4.3Hz, 3H), 3.76 (s, J=4.1Hz, 2H), 3.65 (s, J=4.4Hz, 3H), 3.40 (t, J=3.0Hz, 4H), 2.42 (t, J=2.8Hz, 4H), 2.37 (t, J=3.5Hz, 2H), 2.30 (t, J=3.6Hz, 2H), 2.02 (m, J=4.7Hz, 2H)。

[0065] 利用该半抗原可制备得到相对应的人工抗原，制备方法与实施例1一致。

[0066] 实施例3

[0067] 本实施例提供一种曲美他嗪半抗原，结构式如式(I)，n为3。

[0068] 制备方法如下：

[0069] 将1份曲美他嗪与10份己二酸酐混合后，后续步骤与实施例1相同。

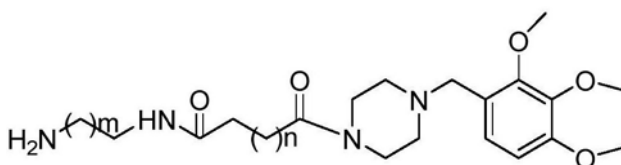
[0070] 所得产物的结构表征为：¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 6.90 (d, J=8.6Hz, 1H), 6.52 (d, J=7.8Hz, 1H), 3.87 (s, J=5.0Hz, 3H), 3.76 (s, J=4.2Hz, 3H), 3.69 (s, J=4.1Hz, 2H), 3.64 (s, J=4.4Hz, 3H), 3.43 (t, J=3.1Hz, 4H), 2.50 (t, J=3.3Hz, 4H), 2.31 (t, J=3.5Hz, 2H), 2.18 (t, J=3.4Hz, 2H), 1.54 (m, 2.7Hz, 2H), 1.52 (m, J=4.9Hz, 2H)。

[0071] 利用该半抗原可制备得到相对应的人工抗原，制备方法与实施例1一致。

[0072] 实施例4

[0073] 本实施例提供一种曲美他嗪半抗原，结构式如式(II)，n=1, m=1。

[0074]



[0075] 式(II)

[0076] 制备方法如下(如图2)：

[0077] 1、将1份曲美他嗪与10份丁二酸酐混合后，后续步骤与实施例1相同。

[0078] 2、将1份曲美他嗪衍生物与8份丙二胺混合，130℃搅拌反应12h，产物减压浓缩至近干，得油状粗产物；加入50份纯净水，超声分散洗涤后，抽滤收集固体，干燥得到曲美他嗪半抗原。

[0079] 所得产物的结构表征为：¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 8.03 (s, J=4.8Hz, 1H), 6.93 (d, J=7.6Hz, 1H), 6.50 (d, J=7.3Hz, 1H), 3.78 (s, J=4.1Hz, 3H), 3.70 (s, J=4.2Hz, 3H), 3.65 (s, J=4.1Hz, 2H), 3.62 (t, J=4.6Hz, 2H), 3.52 (s, J=4.4Hz, 3H), 3.43 (t, J=3.1Hz, 4H), 2.77 (t, J=4.5Hz, 2H), 2.63 (t, J=3.6Hz, 2H), 2.50 (t, J=3.3Hz, 4H), 2.44 (t, J=3.5Hz, 4H), 2.33 (t, J=3.5Hz, 2H), 1.50 (s, J=4.2Hz, 2H)。

[0080] 利用该半抗原可制备得到相对应的人工抗原，制备方法与实施例1一致。

[0081] 实施例5

[0082] 本实施例提供一种曲美他嗪半抗原,结构式如式(II), $n=3,m=1$ 。

[0083] 制备方法如下:

[0084] 1、将1份曲美他嗪与10份己二酸酐混合后,后续步骤与实施例1相同。

[0085] 2、将1份曲美他嗪衍生物与8份丙二胺混合,后续步骤与实施例4的步骤2相同。

[0086] 所得产物的结构表征为: $^1\text{H NMR}$ (400MHz,DMSO) δ 8.00 (s, $J=5.7\text{Hz}$,1H),6.87 (d, $J=7.9\text{Hz}$,1H),6.53 (d, $J=7.6\text{Hz}$,1H),3.84 (s, $J=4.2\text{Hz}$,3H),3.75 (s, $J=4.2\text{Hz}$,3H),3.69 (s, $J=4.1\text{Hz}$,2H),3.66 (t, $J=4.6\text{Hz}$,2H),3.60 (s, $J=4.4\text{Hz}$,3H),3.43 (t, $J=3.1\text{Hz}$,4H),2.70 (t, $J=4.5\text{Hz}$,2H),2.55 (t, $J=3.3\text{Hz}$,4H),2.27 (t, $J=3.5\text{Hz}$,2H),2.15 (m, $J=3.4\text{Hz}$,2H),1.57 (m, $J=4.8\text{Hz}$,4H),1.44 (s, $J=4.1\text{Hz}$,2H)。

[0087] 利用该半抗原可制备得到相对应的人工抗原,制备方法与实施例1一致。

[0088] 实施例6

[0089] 本实施例提供一种曲美他嗪半抗原,结构式如式(II), $n=3,m=2$ 。

[0090] 制备方法如下:

[0091] 1、将1份曲美他嗪与10份己二酸酐混合后,后续步骤与实施例1相同。

[0092] 2、将1份曲美他嗪衍生物与8份丁二胺混合,后续步骤与实施例4的步骤2相同。

[0093] 所得产物的结构表征为: $^1\text{H NMR}$ (400MHz,DMSO) δ 7.82 (s, $J=5.2\text{Hz}$,1H),6.96 (d, $J=7.6\text{Hz}$,1H),6.61 (d, $J=7.2\text{Hz}$,1H),3.83 (s, $J=4.1\text{Hz}$,3H),3.75 (s, $J=4.2\text{Hz}$,3H),3.68 (s, $J=4.1\text{Hz}$,2H),3.61 (s, $J=4.4\text{Hz}$,3H),3.43 (t, $J=3.1\text{Hz}$,4H),3.38 (t, $J=4.6\text{Hz}$,2H),2.69 (t, $J=4.5\text{Hz}$,2H),2.50 (t, $J=3.3\text{Hz}$,4H),2.27 (t, $J=3.5\text{Hz}$,2H),2.15 (m, $J=3.4\text{Hz}$,2H),1.88 (m, $J=4.2\text{Hz}$,2H),1.57 (m, $J=4.8\text{Hz}$,4H),1.43 (s, $J=5.4\text{Hz}$,2H)。

[0094] 实施例7

[0095] 本实施例提供一种曲美他嗪半抗原,结构式如式(II), $n=2,m=3$ 。

[0096] 制备方法如下:

[0097] 1、将1份曲美他嗪与10份戊二酸酐混合后,后续步骤与实施例1相同。

[0098] 2、将1份曲美他嗪衍生物与8份戊二胺混合,后续步骤与实施例4的步骤2相同。

[0099] 所得产物的结构表征为: $^1\text{H NMR}$ (400MHz,DMSO) δ 7.72 (s, $J=4.8\text{Hz}$,1H),6.88 (d, $J=7.6\text{Hz}$,1H),6.50 (d, $J=7.3\text{Hz}$,1H),3.79 (s, $J=2.8\text{Hz}$,3H),3.72 (s, $J=6.0\text{Hz}$,3H),3.64 (s, $J=3.5\text{Hz}$,2H),3.58 (s, $J=4.4\text{Hz}$,3H),3.43 (t, $J=3.1\text{Hz}$,4H),3.05 (t, $J=4.9\text{Hz}$,2H),2.69 (t, $J=4.5\text{Hz}$,2H),2.50 (t, $J=3.3\text{Hz}$,4H),2.35 (t, $J=3.5\text{Hz}$,4H),2.27 (t, $J=3.5\text{Hz}$,2H),2.03 (m, $J=4.7\text{Hz}$,2H),1.55 (m, $J=4.8\text{Hz}$,4H),1.42 (s, $J=2.1\text{Hz}$,2H)。

[0100] 利用该半抗原可制备得到相对应的人工抗原,制备方法与实施例1一致。

[0101] 应用例1人工合成抗原的性能测定

[0102] 1、牛血清蛋白BSA的摩尔吸光系数测定

[0103] 配制一系列浓度牛血清蛋白BSA的PBS溶液(磷酸缓冲溶液,pH为7.4),通过紫外扫描BSA溶液,可知其最大吸收波长为278nm,选取278nm处测定吸光值,每个浓度做平行样。根据摩尔吸光系数计算公式可求出平均摩尔吸光系数:

[0104] $\epsilon=A/CL$

[0105] 其中A为吸光度,C为溶液浓度,L为液层厚度。

[0106] 以下为一系列浓度BSA的PBS溶液及其所测出的吸光值:

[0107]

$C (\mu\text{g}/\text{ml})$	10	20	30	40	50
A (278nm)	0.070	0.016	0.025	0.034	0.045

[0108] 其中液层厚度L为1cm,结合以上公式计算,求出平均摩尔吸光系数为53083.33L/(mol·cm)。

[0109] 2、抗原浓度的测定(实施例4制得的人工抗原,其中n=1,m=1)

[0110] (1) 标准曲线的绘制

[0111] 配制系列已知浓度梯度BSA的PBS溶液,与考马斯染料以体积比为1:50的比例混合,并在595nm处测量吸光度,如下为系列浓度的BSA溶液及其所测出的吸光值:

[0112]

浓度mg/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
A (595nm)	0.062	0.296	0.512	0.721	1.051	1.205

[0113] 根据测量值可绘制出吸光度与抗原浓度的线性关系,得出: $y=1.1699x+0.0562$, $R^2=0.9943$

[0114] (2) 抗原浓度的测定

[0115] 把各实施例所合成的抗原化合物稀释100倍后,和上进行同样的处理测出吸光度并进一步算出其浓度为1.983mg/mL。

[0116] 3、偶联比的测定(实施例8制得的人工抗原,其中n=1,m=1)

[0117] 把BSA和上述已测出浓度的抗原化合物均配制成200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的PBS溶液,在278nm处测量出吸光值,吸光值A₁、A₂分别为0.809和3.128,根据公式可以算出化合物的偶联比。

[0118] 偶联比的计算公式:
$$r = \frac{(A_2 - A_1)/\varepsilon}{(200 \times 10^{-3})/65000}$$

[0119] 其中: ε 为平均摩尔吸光系数L/(mol·cm),65000为BSA的摩尔质量g/mol,200 $\times 10^{-3}$ 为BSA的质量浓度g/L。

[0120] 根据以上公式,并把数据代进去,算得偶联比为14.2。BSA、曲美他嗪TR、偶联物TR-BSA的紫外全波谱扫描图见图1。

[0121] 偶联比的检测结果见表1:

[0122] 表1人工抗原的偶联比检测结果

	人工合成抗原	偶联比
[0123]	实施例 1 合成的人工抗原	11.4
	实施例 2 合成的人工抗原	13.2

[0124]

实施例 3 合成的人工抗原	9.8
实施例 4 合成的人工抗原	14.2
实施例 5 合成的人工抗原	7.5
实施例 6 合成的人工抗原	11.8
实施例 7 合成的人工抗原	12.9

。

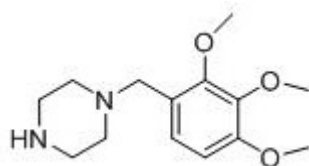


图1

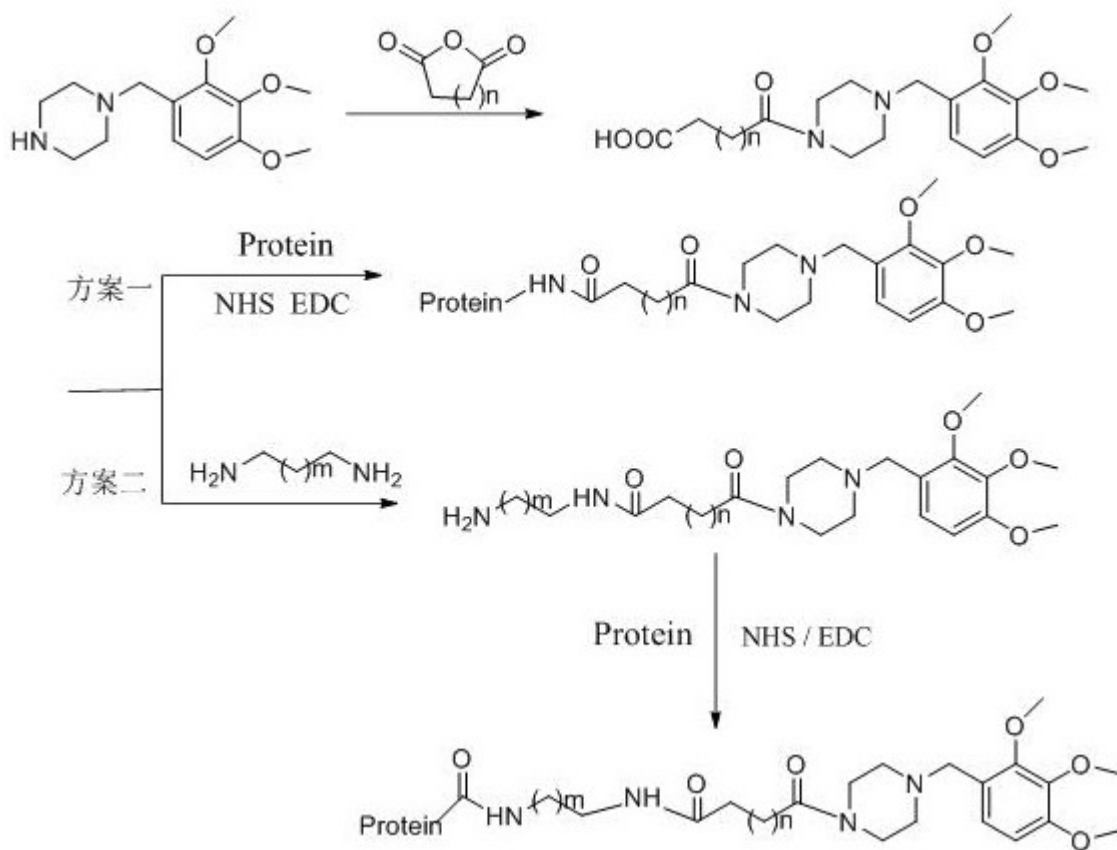


图2

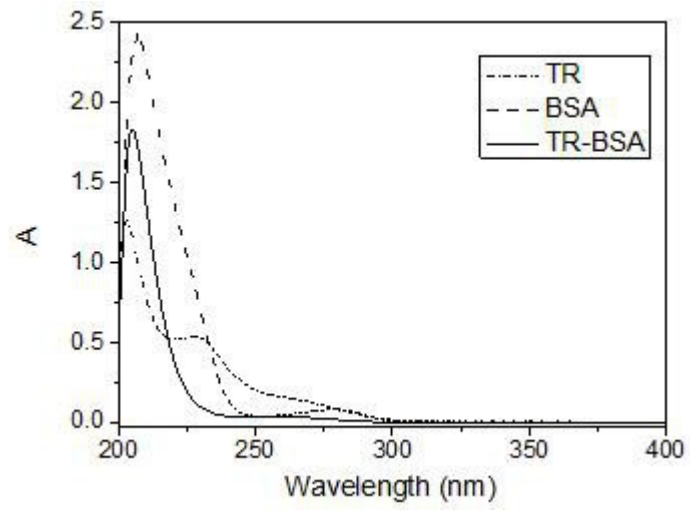


图3

专利名称(译)	一种曲美他嗪半抗原、人工抗原及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN108794428A	公开(公告)日	2018-11-13
申请号	CN201810632217.2	申请日	2018-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
[标]发明人	黄玄贺 卢宇靖 蔡森源 李莹 龙威 张焜 黄宝华		
发明人	黄玄贺 卢宇靖 蔡森源 李莹 龙威 张焜 黄宝华		
IPC分类号	C07D295/185 C07K14/765 C07K14/77 G01N33/53		
CPC分类号	C07D295/185 C07K14/765 C07K14/77 G01N33/53		
代理人(译)	林丽明		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种曲美他嗪半抗原、人工抗原及其制备方法和应用。所述半抗原，具有如式(I)或式(II)所示的结构：其中n为1~3，m为1~3；本发明提供的半抗原在保留曲美他嗪基本结构的基础上引入连接臂结构和用于偶联大分子的活性基团，这样既有利于其与大分子偶联，又可以在偶联后充分暴露本身分子结构和分子量较小的曲美他嗪基本结构，避免了其被大分子掩蔽而影响动物机体的识别。本发明通过活性酯化法将半抗原与蛋白质偶联制备人工抗原，偶联比可达14.2，可用于曲美他嗪的免疫检测。

