



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110981744 A

(43)申请公布日 2020.04.10

(21)申请号 201911088322.5

C07C 233/20(2006.01)

(22)申请日 2019.11.08

C07K 14/47(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

(71)申请人 深圳市疾病预防控制中心(深圳市
卫生检验中心、深圳市预防医学研
究所)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

地址 518055 广东省深圳市南山区龙苑路8
号

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(72)发明人 柯跃斌 沈建忠 王战辉 李金峰
蒋慧 于雪芝 江海洋 赵芳

(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 许青华

(51)Int.Cl.

C07C 231/12(2006.01)

C07C 233/18(2006.01)

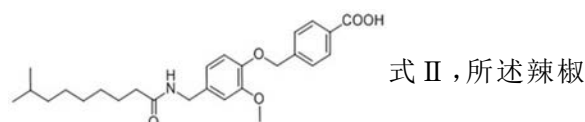
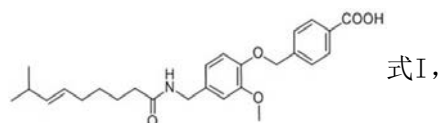
权利要求书2页 说明书8页 附图9页

(54)发明名称

用于地沟油检测的辣椒素半抗原、人工抗原
及其制备方法与应用

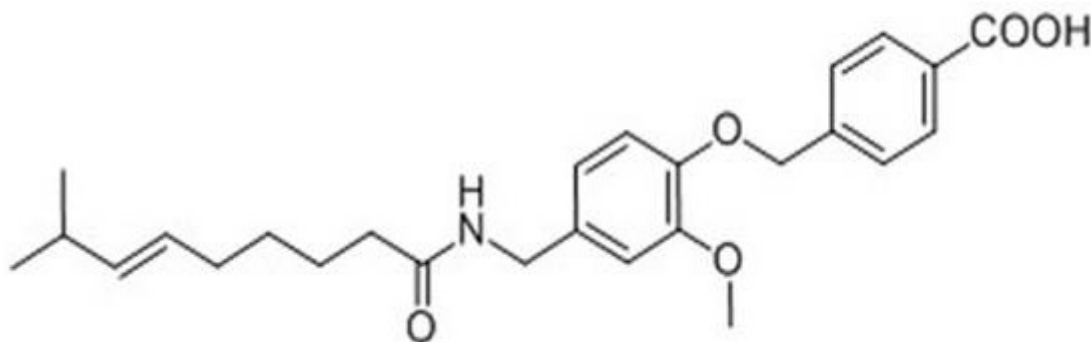
(57)摘要

本发明公开了用于地沟油检测的辣椒素半
抗原和人工抗原及其制备方法与应用。所述辣椒
素半抗原的结构如式I或式II所示：

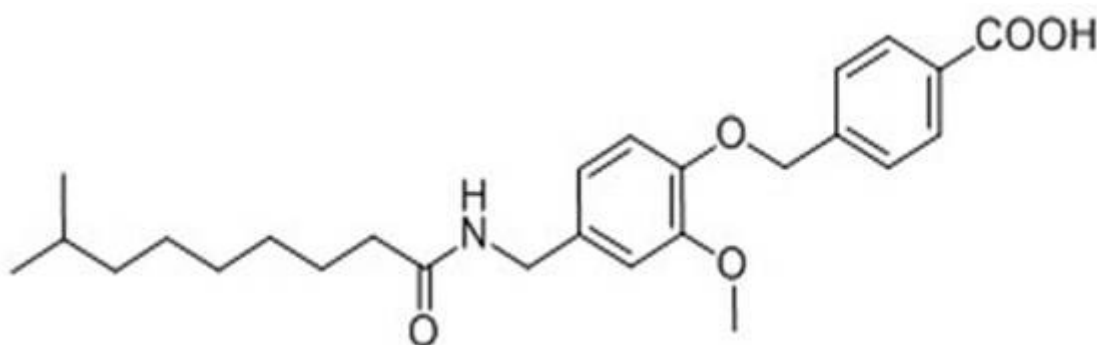


素人工抗原是由式I或式II所示半抗原与载体蛋
白偶联得到。利用所述辣椒素人工抗原免疫动
物,可得到效价高,灵敏度高的特异性抗体。本发
明提供的辣椒素半抗原及其制备的抗体,为建立
快速、简便、价廉、灵敏、特异的辣椒素检测方
法提供了新手段。

1. 用于地沟油检测的辣椒素半抗原, 其特征在于, 其结构如式 I 或式 II 所示:

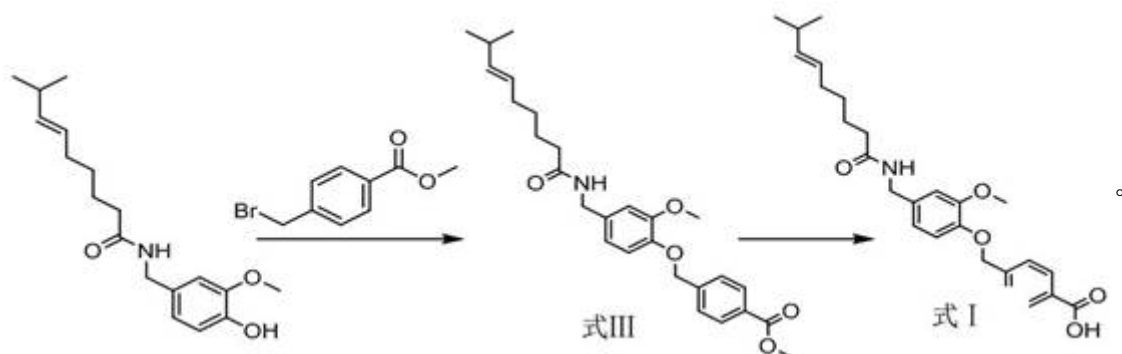


式 (I),



式 II。

2. 权利要求1所述辣椒素半抗原的制备方法, 其特征在于, 当所述辣椒素半抗原为式 I 所示化合物时, 制备方法包括如下步骤: 以天然辣椒素与4-溴甲基苯甲酸甲酯为原料进行回流反应, 得到式 III 化合物, 然后在碱性条件下加热反应, 最后加酸调至酸性, 得到辣椒素半抗原化合物, 即式 I 化合物, 合成路线如下:



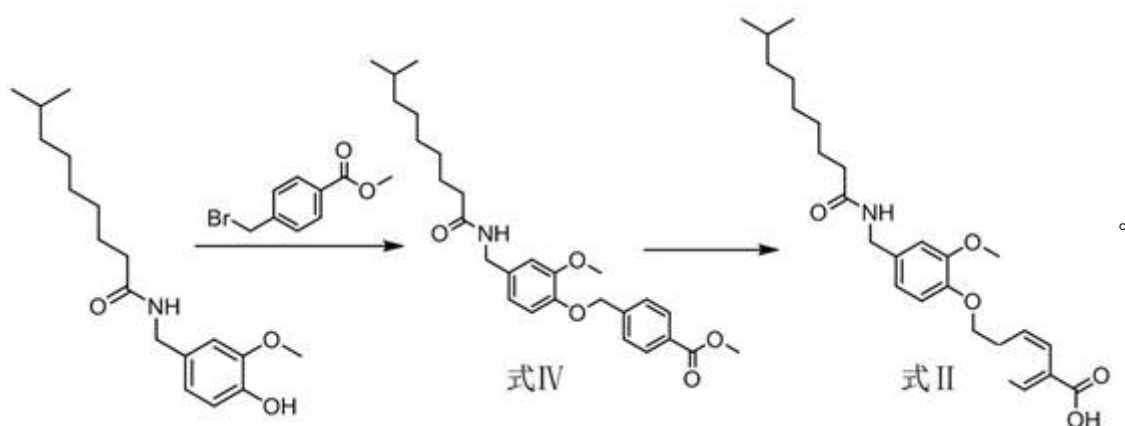
3. 根据权利要求2所述辣椒素半抗原的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

步骤A1: 将天然辣椒素和碳酸钾加入乙腈中, 搅拌均匀, 加入4-溴甲基苯甲酸甲酯, 回流反应, 后处理浓缩除去大部分乙腈, 倒入水中, 乙酸乙酯, 提取, 水洗, 干燥, 过柱纯化;

步骤A2: 将步骤A1产物溶于四氢呋喃中, 加入等量的乙醇, 再滴加氢氧化钠水溶液, 加热反应, 后处理浓缩除去大部分乙醇和四氢呋喃, 冷却至室温, 加盐酸调至酸性, 产品析出, 收集干燥, 即得辣椒素半抗原。

4. 权利要求1所述辣椒素半抗原的制备方法, 其特征在于, 当所述辣椒素半抗原为式 II 所示化合物时, 制备方法包括如下步骤: 以二氢辣椒素与4-溴甲基苯甲酸甲酯为原料进行

回流反应,得到式IV化合物,然后在碱性条件下加热反应,最后加酸调至酸性,得到辣椒素半抗原化合物,即式II化合物,合成路线如下:



5. 根据权利要求4所述辣椒素半抗原的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤B1:将二氢辣椒素和碳酸钾加入乙腈中,搅拌均匀,加入4-溴甲基苯甲酸甲酯,回流反应,后处理浓缩除去大部分乙腈,倒入水中,乙酸乙酯,提取,水洗,干燥,过柱纯化;

步骤B2:将步骤B1产物溶于四氢呋喃中,加入等量的乙醇,再滴加氢氧化钠水溶液,加热反应,后处理浓缩除去大部分乙醇和四氢呋喃,冷却至室温,加盐酸调至酸性,产品析出,收集干燥,即得辣椒素半抗原。

6. 辣椒素人工抗原,其特征在于,由权利要求1所述辣椒素半抗原与载体蛋白偶联后得到;

其中,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白的任一种。

7. 权利要求6所述的辣椒素人工抗原的制备方法,其特征在于,采用活化酯法将载体蛋白偶联于权利要求1所述辣椒素半抗原的羧基碳上。

8. 辣椒素特异性抗体,其特征在于,它是由权利要求6所述辣椒素人工抗原制备的特异性抗体。

9. 由权利要求8所述辣椒素特异性抗体制备的辣椒素检测试剂或试剂盒。

10. 权利要求8所述辣椒素特异性抗体的以下任一应用:

- (1) 在检测辣椒素中的应用;
- (2) 在制备辣椒素的免疫层析试纸条中的应用;
- (3) 在制备辣椒素的胶体金检测试纸条中的应用。

用于地沟油检测的辣椒素半抗原、人工抗原及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物化工技术领域,具体地说,涉及了用于地沟油检测的辣椒素半抗原和人工抗原及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 地沟油,又称泔水油、垃圾油,一般只作为工业用油。因地沟油从原料来源、加工工艺及灌装运输过程等均不符合有关卫生安全规定,生产出的油脂质量无法保证,对人体健康有严重危害,长期摄入将会导致肝、心、肺损害,甚至引发癌症。

[0003] 据文献统计,通过监测辣椒素类物质判别地沟油的准确率可以达到80%以上。而在组成辣椒素类物质的多种辣椒碱类化合物中,最主要的是辣椒素(capsaicin,CPC),在天然辣椒素中占比高达69%。因此,食用油中辣椒素的检测对鉴别地沟油具有重要意义。

[0004] 辣椒素检测方法中目前应用较多的是仪器方法,包括高效液相色谱法以及色谱-质谱联用技术,仪器方法灵敏度及准确度相对较高,且检测结果可靠,但是需要专业的操作人员以及大型仪器,样品处理过程复杂,分析成本高,无法满足现场快速检测的要求。而免疫分析方法既具有仪器检测技术灵敏度高、特异性好的优点,且操作简便、能够满足现场检测需求,已经被广泛应用到食品污染物的检测中。

[0005] 如中国发明专利(公告号CN103951577A,公告日2015-07-22,发明名称一种辣椒素人工半抗原、人工抗原及其制备方法)公开了一种辣椒素人工半抗原化合物的合成方法,是以N-(4-羟基-3-甲氧基苄基)壬酰胺与4-溴代丁酸乙酯为原料经成醚反应,得到式Ⅲ化合物,然后将其中的酯基团水解制得辣椒素人工半抗原化合物I,具体包括以下步骤:(1)将摩尔比为1:(1.2~1.5)的N-(4-羟基-3-甲氧基苄基)壬酰胺和4-溴丁酸乙酯分别溶解于N,N-二甲基甲酰胺中,得到相应的N-(4-羟基-3-甲氧基苄基)壬酰胺溶液和4-溴丁酸乙酯溶液,然后将4-溴丁酸乙酯溶液置于恒压漏斗,缓慢滴加至N-(4-羟基-3-甲氧基苄基)壬酰胺溶液中,待滴加完毕,在105~110℃条件下反应5~7h,后处理得到中间产物Ⅲ;(2)将中间产物Ⅲ在碱性条件下水解,后处理得到辣椒素人工抗原。实验结果表明,用该辣椒素人工半抗原化合物抗原免疫动物得到的抗血清效价可达128000,但对辣椒素的半抑制浓度IC₅₀值为3.34μg/mL,IC₅₀偏高,灵敏度有待提高。

[0006] 又如中国发明专利(公开号CN104447383A,公开日2015-3-25,一种二氢辣椒素人工半抗原、人工抗原及其制备方法)公开了一种二氢辣椒素人工半抗原的制备方法,具体包括以下步骤:称取N-(4-羟基-3-甲氧基苄基)壬酰胺5.86g、顺丁烯二酸酐2.36g和N,N'-二环己基碳二亚胺0.49g,25mL二氯甲烷于反应瓶中室温反应0.5h,然后将上述反应液置于冰浴中使其温度控制在0~5℃范围内,取4-二甲氨基吡啶0.30g和4mL二氯甲烷置于恒压滴液漏斗中充分混匀,缓慢向反应瓶中滴加,0.5h滴加完毕,待滴加完毕,保持室温25℃条件继续搅拌6小时,将反应液过滤,减压蒸馏除去溶剂得淡黄色的油状物粗产品,然后将该粗产品通过硅胶柱层析,柱层析试剂:石油醚和乙酸乙酯体积比为1:1的混合溶液,脱色得到二

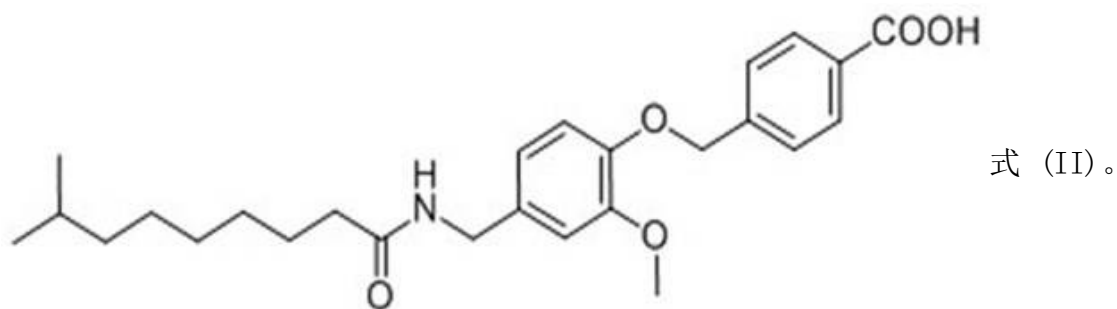
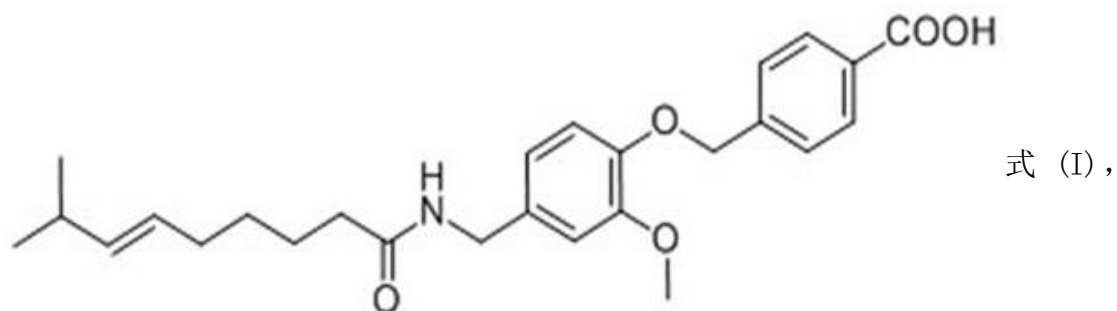
氢辣椒素半抗原(E)-4-[2-甲氧基-4-(壬酰胺甲基)苯氧基]-4-氧-2-丁烯酸,分子式为C₂₁N₀H₂₉。实验结果表明,用该二氢辣椒素人工半抗原免疫动物得到的抗血清效价可达4000,但是对二氢辣椒素的半抑制浓度IC₅₀值为3.06μg/mL,IC₅₀偏高,灵敏度有待提高。

[0007] 因此有必要再设计免疫半抗原分子,制备出一种辣椒素检测抗体对于地沟油的快速检测且具有高灵敏度特性尤为重要。

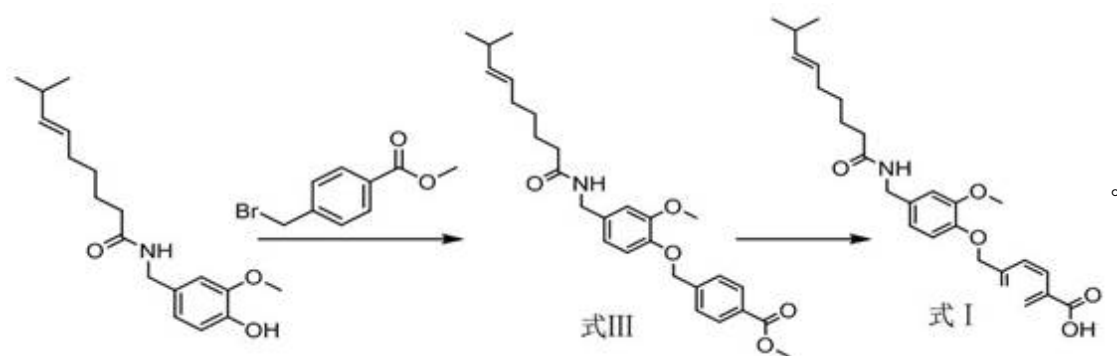
发明内容

[0008] 本发明的目的是提供用于地沟油检测的辣椒素半抗原和人工抗原及其制备方法与应用。

[0009] 为了实现本发明目的,第一方面,本发明提供用于地沟油检测的辣椒素半抗原,其结构如式I或式II所示:



[0010] 第二方面,本发明提供所述辣椒素半抗原的制备方法,当所述辣椒素半抗原为式I所示化合物时,制备方法包括如下步骤:以天然辣椒素与4-溴甲基苯甲酸甲酯为原料进行回流反应,得到式III化合物,然后在碱性条件下加热反应,最后加酸调至酸性,得到辣椒素半抗原化合物,即式I化合物,合成路线如下:



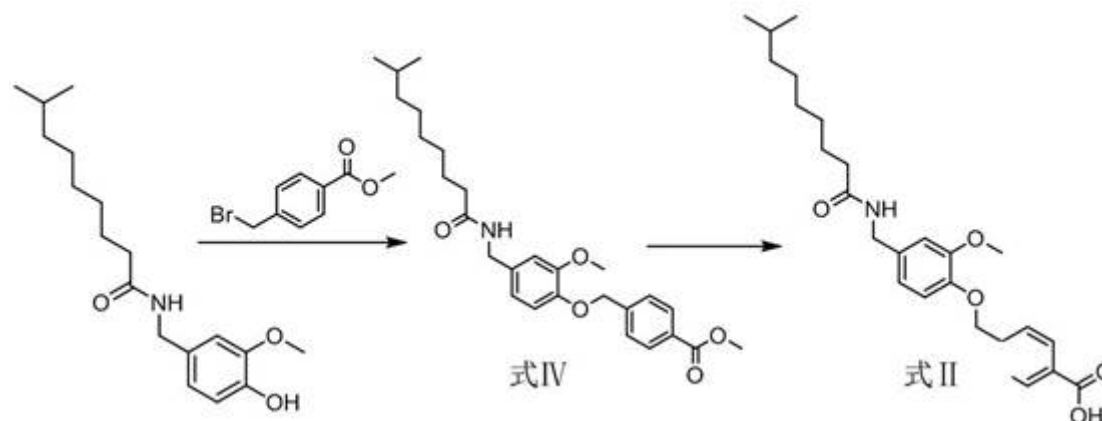
[0011] 当所述辣椒素半抗原为式I所示化合物时,制备方法具体包括如下步骤:

步骤A1:将1 eq天然辣椒素和2 eq碳酸钾加入乙腈中,搅拌均匀,加入1.2 eq 4-溴甲

基苯甲酸甲酯,回流反应24 h,后处理浓缩除去大部分乙腈,倒入水中,乙酸乙酯,提取,水洗,干燥,过柱纯化,收率约70%。

[0012] 步骤A2:将步骤A1产物溶于四氢呋喃中,加入等量的乙醇,再滴加2 eq氢氧化钠水溶液,加热至50度反应1 h,后处理浓缩除去大部分乙醇和四氢呋喃,冷却至室温,加盐酸调至酸性,产品析出,收集干燥,收率90%,即得辣椒素半抗原。

[0013] 当所述辣椒素半抗原为式II所示化合物时,制备方法包括如下步骤:以二氢辣椒素与4-溴甲基苯甲酸甲酯为原料进行回流反应,得到式IV化合物,然后在碱性条件下加热反应,最后加酸调至酸性,得到辣椒素半抗原化合物,即式II化合物,合成路线如下:



[0014] 当所述辣椒素半抗原为式II所示化合物时,制备方法具体包括如下步骤:

步骤B1:1 eq二氢辣椒素和2 eq碳酸钾加入乙腈中,搅拌均匀,加入1.2 eq 4-溴甲基苯甲酸甲酯,回流反应24 h,后处理浓缩除去大部分乙腈,倒入水中,乙酸乙酯,提取,水洗,干燥,过柱纯化,收率约70%。

[0015] 步骤B2:将步骤B1产物溶于四氢呋喃中,加入等量的乙醇,再滴加2 eq氢氧化钠水溶液,加热至50℃反应1 h,后处理浓缩除去大部分乙醇和四氢呋喃,冷却至室温,加盐酸调至酸性,产品析出,收集干燥,收率90%,即得辣椒素半抗原。

[0016] 第三方面,本发明提供辣椒素人工抗原,其由上述辣椒素半抗原与载体蛋白偶联后得到;其中,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白的一种。优选牛血清白蛋白BSA、钥孔血蓝蛋白KLH。

[0017] 第四方面,本发明提供所述辣椒素人工抗原的制备方法,采用活化酯法将载体蛋白偶联于权利要求1所述半抗原的羧基碳上。

[0018] 优选地,式I所示化合物与载体蛋白的偶联时摩尔比为8.4:1;式II所示化合物与载体蛋白的偶联时摩尔比为5.8:1。

[0019] 第五方面,本发明提供由所述辣椒素人工抗原制备的特异性抗体,其为多克隆抗体或单克隆抗体,优选多克隆抗体。所述多克隆抗体可通过辣椒素人工抗原免疫实验动物(如新西兰大白兔),收集血清纯化获得。

[0020] 第六方面,本发明提供所述辣椒素半抗原或所述辣椒素人工抗原的以下任一应用:

- ①制备抗辣椒素特异性抗体中的应用;
- ②检测抗辣椒素特异性抗体中的应用。

[0021] 第七方面,本发明提供由所述特异性抗体制备的辣椒素检测试剂或试剂盒。

[0022] 第八方面,本发明提供所述特异性抗体的以下任一应用:

- (1) 在检测辣椒素中的应用;
- (2) 在制备辣椒素的免疫层析试纸条中的应用;
- (3) 在制备辣椒素的胶体金检测试纸条中的应用。

[0023] 借由上述技术方案,本发明至少具有下列优点及有益效果:

本发明首次公开了两种新的辣椒素半抗原、人工抗原及其制备方法,用所述辣椒素人工抗原免疫动物,可得到效价高,灵敏度高的特异性抗体。本发明提供的辣椒素半抗原及其制备的抗体,为建立快速、简便、价廉、灵敏、特异的辣椒素检测方法提供了新手段。

[0024] 半抗原的结构在高灵敏度小分子抗体制备过程中是关键因素,本发明人设计合成的2种新型半抗原通过更大程度的保留辣椒素的特征结构、适当增加间隔臂长度、引入刚性间隔臂苯甲酸,三者协同作用,可以更好的将辣椒素化学结构暴露于免疫系统,提高了免疫半抗原的刺激原性,因此获得了IC₅₀低、灵敏度高的抗体,其IC₅₀可达1.02 ng/mL,灵敏度相比现有技术中的抗体提高了约3000倍,这也是本次研发过程中意料不到的技术效果。

[0025] 利用本发明提供的半抗原与载体蛋白的偶联物制备辣椒素抗体(多抗),制备过程简单、经济,抗体对辣椒素的检测灵敏度可达1.02 ng/mL、实用价值高。本发明在地沟油检测中具有良好的应用前景。

附图说明

[0026] 图1为本发明实施例1中式I所示辣椒素半抗原制备的流程图。

[0027] 图2为本发明实施例1中式II所示辣椒素半抗原制备的流程图。

[0028] 图3为本发明实施例1中式I所示辣椒素半抗原的质谱图。

[0029] 图4为本发明实施例1中式II所示辣椒素半抗原的质谱图。

[0030] 图5为本发明实施例1中式I所示辣椒素半抗原的¹H-NMR图。

[0031] 图6为本发明实施例1中式II所示辣椒素半抗原的¹H-NMR图。

[0032] 图7为本发明实施例2中BSA的MALDI-TOF-MS图。

[0033] 图8为本发明实施例2中CPC①-BSA的MALDI-TOF-MS图。

[0034] 图9为本发明实施例2中CPC②-BSA的MALDI-TOF-MS图。

[0035] 图10为本发明实施例4中利用多克隆抗体检测辣椒素的标准曲线图。

具体实施方式

[0036] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用原料均为市售商品。

[0037] 以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。实施例中所用的PBS缓冲液均为pH7.4、0.01 M的PBS缓冲液。实施例中所用的碳酸盐缓冲液均为pH9.6、0.05 mol/L的碳酸钠缓冲液。

[0038] NHS为N-羟基琥珀酰亚胺的缩写。EDC为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的缩写。DMF为N,N-二甲基甲酰胺的缩写。NHS、EDC、牛血清白蛋白(Albumin from bovine serum, BSA)、钥孔血蓝蛋白(Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH)以及弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂均购自Sigma公司。柱层析所用固定相均为200-300目的硅胶。

[0039] 实施例1 辣椒素半抗原的制备和表征

一、辣椒素半抗原的制备

1、式I所示辣椒素半抗原的制备,是以天然辣椒素与4-溴甲基苯甲酸甲酯为原料进行回流反应,得到式III化合物,然后在碱性条件下加热反应,最后加酸调至酸性,得到辣椒素半抗原化合物,即式I化合物,合成路线图如图1所示,具体合成步骤如下:

步骤A1:称取3.05 g天然辣椒素和2.76 g碳酸钾加入乙腈中,搅拌均匀,加入2.75 g 4-溴甲基苯甲酸甲酯,回流反应24 h,后处理浓缩除去大部分乙腈,倒入水中,乙酸乙酯,提取,水洗,干燥,过柱纯化,收率约70%。

[0040] 步骤A2:将步骤A1产物溶于四氢呋喃中,加入等量的乙醇,再滴加0.02 mol氢氧化钠水溶液,加热至50度反应1h,后处理浓缩除去大部分乙醇和四氢呋喃,冷却至室温,加盐酸调至酸性(PH值为4-6),产品析出,得到辣椒素半抗原4-(2-甲氧基-4-((8-甲基-6-壬烯酰胺)甲基)苯氧基)苯甲酸,分子式为 $C_{26}H_{33}NO_5$,收集干燥,收率90%。

[0041] 2、式II所示辣椒素半抗原的制备,是以二氢辣椒素与4-溴甲基苯甲酸甲酯为原料进行回流反应,得到式IV化合物,然后在碱性条件下加热反应,最后加酸调至酸性,得到辣椒素半抗原化合物,即式II化合物,合成路线图如图2所示,具体合成步骤如下:

步骤B1:称取3.07 g 二氢辣椒素和2.76 g碳酸钾加入乙腈中,搅拌均匀,加入2.75 g 4-溴甲基苯甲酸甲酯,回流反应24 h,后处理浓缩除去大部分乙腈,倒入水中,乙酸乙酯,提取,水洗,干燥,过柱纯化,收率约70%。

[0042] 步骤B2:将步骤B1产物溶于四氢呋喃中,加入等量的乙醇,再滴加0.02 mol氢氧化钠水溶液,加热至50℃反应1 h,后处理浓缩除去大部分乙醇和四氢呋喃,冷却至室温,加盐酸调至酸性,产品析出,得到辣椒素半抗原4-(2-甲氧基-4-((8-甲基壬酰胺)甲基)苯氧基)苯甲酸,分子式为 $C_{26}H_{35}NO_5$,收集干燥,收率90%。

[0043] 二、辣椒素半抗原的表征

1、质谱鉴定

步骤一制备的式I所示辣椒素半抗原的质谱鉴定结果:MS m/z $[M+H]^+$ 理论值:439.55;实测值:439.9,与目标产物的分子量相吻合,质谱见图3。

[0044] 步骤一制备的式II所示辣椒素半抗原的质谱鉴定结果:MS m/z $[M+H]^+$ 理论值:441.57;实测值:441.9,与目标产物的分子量相吻合,质谱见图4。

[0045] 2、核磁共振鉴定

步骤一制备的式I所示辣椒素半抗原的核磁鉴定结果: 1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 12.99 (br, s, 1H, COOH), 8.29 (t, 1H, NH), 7.97-7.94 (d, 2H, CHar), 7.65-7.62 (d, 2H, CHar), 6.94 (s, 1H, Char), 6.92-6.71 (dd, 2H, Char), 5.35-5.32 (m, 2H, CH=CH), 5.14 (s, 2H, CH₂), 4.19-4.17 (d, 2H, CH₂), 3.78 (s, 3H, CH₃), 2.28-2.22 (m, 1H, CH), 2.14-2.09 (t, 2H, CH₂), 1.94-1.93 (q, 2H, CH₂), 1.54-1.49 (m, 2H, CH₂), 1.31-1.29 (m, 2H, CH₂), 0.93-0.83 (dd, 6H, CH₃, CH₃)。核磁数据表明上述方法合成的化合物即为目标产物,磁共振鉴定结果见图5。

[0046] 步骤一制备的式II所示辣椒素半抗原的核磁鉴定结果: 1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 12.99 (br, s, 1H, COOH), 8.29 (t, 1H, NH), 7.97-7.94 (d, 2H, CHar), 7.56-7.52 (d, 2H, CHar), 6.94 (s, 1H, Char), 6.92-6.71 (dd, 2H, Char), 5.14 (s, 2H, CH₂), 4.19-4.17 (d, 2H, CH₂), 3.78 (s, 3H, CH₃), 2.13-2.08 (t, 2H, CH₂), 1.53-1.49 (m, 3H, CH₂, CH), 1.1.23-1.11 (m,

8H, CH₂, CH₂, CH₂, CH₂) , 0.85-0.83 (dd, 6H, CH₃, CH₃)。核磁数据表明上述方法合成的化合物即为目标产物,磁共振鉴定结果见图6。

[0047] 实施例2 辣椒素人工抗原的制备和表征

所述免疫原与包被原的制备方法中,其区别在于载体蛋白的使用类型,所述免疫原载体蛋白主要采用KLH,所述包被原载体蛋白主要采用BSA,所用偶联方法为活泼酯法。

[0048] 一、辣椒素包被原的合成和鉴定

1、辣椒素包被原的制备

(1) 将43.3 mg实施例1 制备得到的I所示化合物溶于500 μ L DMF中,加入15 mg NHS和30 mg EDC,室温下搅拌过夜,得到溶液I。

[0049] (2) 将60 mg BSA加入10 mL PBS 缓冲液中,充分溶解,即为溶液II。

[0050] (3) 将溶液I缓慢滴加至溶液II中至溶液出现浑浊,共加入溶液I约50 μ L,4℃下缓慢搅拌24 h 后装入透析袋,在生理盐水中4℃透析48 h (中间换水3次),得到辣椒素包被原溶液,-20℃保存。式I所示化合物合成的辣椒素包被原简称CPC①-BSA。

[0051] (4) 取44.0 mg实施例1 制备得到的式II所示化合物,使用上述三步同样的方法制备式II所示化合物合成的辣椒素包被原,简称CPC②-BSA。

[0052] 2、辣椒素包被原的鉴定

用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS)法分别测定CPC①-BSA溶液和CPC②-BSA溶液中BSA与半抗原的结合比。结果见图7、图8、图9。

[0053] 结合比= $\{M(\text{偶联物}) - M(\text{蛋白质})\} / M(\text{半抗原})$,M为分子量;

式I半抗原的分子量为439.6,由质谱最高峰值分析BSA的分子量为64671.3,偶联物的分子量为68378.7,经计算得出BSA与半抗原的结合比为8.4,即CPC①-BSA中一个BSA分子上平均偶联8.4个半抗原。

[0054] 式II半抗原的分子量为441.6,由质谱最高峰值分析偶联物的分子量为67240.6,经计算得出BSA与半抗原的结合比为5.8,即CPC②-BSA中一个BSA分子上平均偶联5.8个半抗原。

[0055] 二、辣椒素免疫原的合成

1、辣椒素免疫原的制备

用KLH代替BSA,其它同实施例2的步骤一的步骤1(即1、辣椒素包被原的制备)。

[0056] 式I所示化合物合成辣椒素免疫原简称CPC①-KLH。

[0057] 式II所示化合物合成辣椒素免疫原简称CPC②-KLH。

[0058] 实施例3 辣椒素抗血清的制备

将实施例2制备的CPC①-KLH,CPC②-KLH溶液分别免疫2组3-4月龄,体重1.5-2.0 kg的雌性新西兰大白兔,每组2只。将各免疫原用生理盐水稀释至1 mg/mL,与等量弗氏佐剂乳化。首免采用弗氏完全佐剂,颈背部皮内多点注射,免疫剂量为1 mg/只。4周后进行加强免疫,每隔4周加免1次,共加免3次,佐剂改为弗氏不完全佐剂,免疫剂量不变,改为颈背部皮下多点注射。第4次免疫1周后,用心脏采血的方法大量采血。取血后,将血液37℃静置2 h,然后4℃静置过夜,然后3000 rpm离心20 min,收集上清液,即为抗血清,-20℃分装保存。

[0059] 实施例4 辣椒素抗血清的测定

一、采用间接ELISA方法检测抗血清效价,具体操作步骤如下:

1) 包被:将实施例2中的抗原用0.05 M、pH9.6碳酸盐缓冲液从10 $\mu\text{g/mL}$ 开始进行倍比稀释,100 $\mu\text{L/孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应2 h。

[0060] 2) 洗涤:将板内溶液倾去,甩干,并用洗涤液洗涤3次,每次3 min。

[0061] 3) 封闭:拍干后,加入200 $\mu\text{L/孔}$ 封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应2 h。洗涤后烘干备用。

[0062] 4) 加样:将抗血清从1:1000开始进行倍比稀释,并加入到各种稀释度的包被孔中,100 $\mu\text{L/孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应1 h;充分洗涤后,加入1:3000稀释的HRP-羊抗兔IgG,100 $\mu\text{L/孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应1 h。

[0063] 5) 显色:将酶标板取出,充分洗涤后,每孔加入100 μL 的TMB显色液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应15 min。

[0064] 6) 终止和测定:每孔加入100 μL 终止液以终止反应,然后用酶标仪测定各孔的OD₄₅₀值。

[0065] 7) 结果判读:以OD₄₅₀值 $\geq$ 阴性对照孔的2.1倍(即P/N $\geq$ 2.1)所对应的血清最高稀释倍数即为血清的ELISA效价。

[0066] 二、最低检测限、半数抑制以及特异性的检测

具体操作步骤如下:

1) 用上述的间接ELISA方法确定以CPC②-BSA作为包被原,以CPC①-KLH免疫兔子获得的血清作为抗体,以OD₄₅₀值在1.5左右时所对应的抗原和抗体浓度为最适工作浓度。

[0067] 2) 包被:将包被原用包被缓冲液稀释5000倍,100 $\mu\text{L/孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应2 h。

[0068] 3) 洗涤和封闭:方法操作同上述间接ELISA法。

[0069] 4) 配辣椒素CPC标准溶液:将CPC标准品溶于DMF中配制成5 mg/mL的母液,然后在加样前,再用0.01 mol/L, pH7.4的PBS溶液倍比稀释成需要浓度(CPC的浓度分别为0.1 ng/mL、0.3 ng/mL、0.9 ng/mL、2.7 ng/mL、8.1 ng/mL、24.3 ng/mL)。

[0070] 5) 加样:每孔加入50 μL 倍比稀释的CPC各浓度标准品,然后再加入50 $\mu\text{L/孔}$ 最适稀释倍数的抗血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应1 h。充分洗涤后,加入1:5000稀释的HRP-羊抗兔IgG,100 $\mu\text{L/孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应1 h。

[0071] 6) 显色反应:将酶标板取出,充分洗涤后,每孔加入100 μL 的TMB显色液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应15 min。

[0072] 7) 终止和测定:每孔加入100 μL 终止液以终止反应,然后用酶标仪测定各孔的OD₄₅₀值。

[0073] 8) 数据处理:以CPC各浓度的对数为横坐标,以CPC各浓度对应的OD值为纵坐标,使用Origin 8.5软件,按照四参数对数拟合绘制标准曲线,如图10所示,通过计算IC₅₀值(半数抑制浓度)判定抗血清对CPC是否具有高亲和力。

[0074] 结果显示,四免后,兔子抗血清效价可达3000,检测限为0.05 ng/mL, IC₅₀值为1.02 ng/mL,线性检测范围为0.16-6.63 ng/mL。

[0075] 需要说明的是,效价的高低与IC₅₀高低没有直接关联。效价与IC₅₀不是呈正相关的关系,对于小分子抗体而言抗体效价的差异对小分子的检测无影响,灵敏度才是最重要的性质参数。

[0076] 经常规交叉反应测定,该抗体与氰戊菊酯、溴氰菊酯等化学残留污染物及黄曲霉

毒素等生物毒素污染物均无交叉反应,表明抗体可以特异性与辣椒素反应。

[0077] 综上,上述辣椒素半抗原、人工抗原是可以制备出亲和力高,灵敏度更高(IC₅₀值低至1.02 ng/mL)的辣椒素特异性抗体。而且,与现有技术中公开的辣椒素半抗原、抗原及其制备方法相比,本发明获得的抗体的灵敏度提供了约3000倍,这是本发明未曾预料到的技术效果。获得此技术效果,可能存在的原因如下:

(1)现有技术中的半抗原合成是以N-(4-羟基-3-甲氧基苄基)壬酰胺为原料,此原料在保留辣椒素的特征结构上有所不足;再者,间隔臂只有4个碳的长度,与载体蛋白偶联时无法充分暴露目标识别位点。除此之外,其间隔臂为线性的丁酸,线性的间隔臂具有一定的柔性,在作为抗原决定簇刺激机体产生抗体时效果不一定好。

[0078] (2)本发明是直接采用辣椒素和二氢辣椒素为原料,可更大程度的保留了辣椒素的特征结构;本发明的间隔臂稍长一些,与载体蛋白偶联时能更充分暴露目标识别位点;本发明人在半抗原合成的过程中首次尝试使用苯甲酸,其具有刚性结构,在免疫刺激的过程中可能会取得较好的免疫效果。最终通过实验结果表明,本发明人设计合成的免疫半抗原可以刺激动物机体产生更强烈的免疫反应,获得更灵敏的抗体。

[0079] (3)半抗原的结构在高灵敏度小分子抗体制备过程中是关键因素,本发明半抗原的合成原料、合成方法、合成路径均与现有技术不同,制备获得的半抗原结构也是不同,为更高灵敏度抗体的制备奠定基础。半抗原的合理设计是制备小分子抗体的关键,本发明以天然辣椒素和二氢辣椒素为起始原料,设计合成了2种不同结构但具有相同间隔臂的半抗原,通过更大程度的保留辣椒素的特征结构、适当增加间隔臂长度、引入刚性间隔臂苯甲酸,三者协同作用可以更好的将辣椒素化学结构暴露于免疫系统,提高了免疫半抗原的刺激原性,因此获得了IC₅₀低、灵敏度高的抗体。

[0080] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之做一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

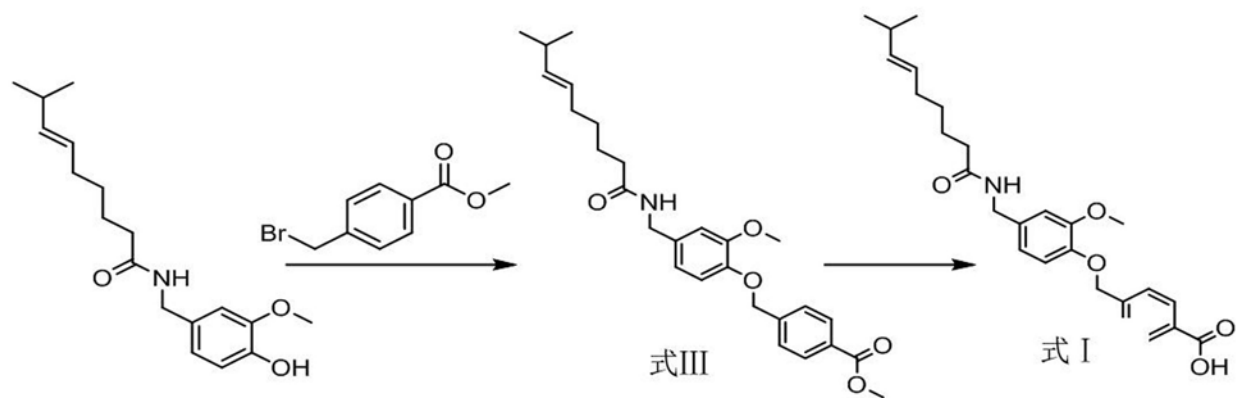


图1

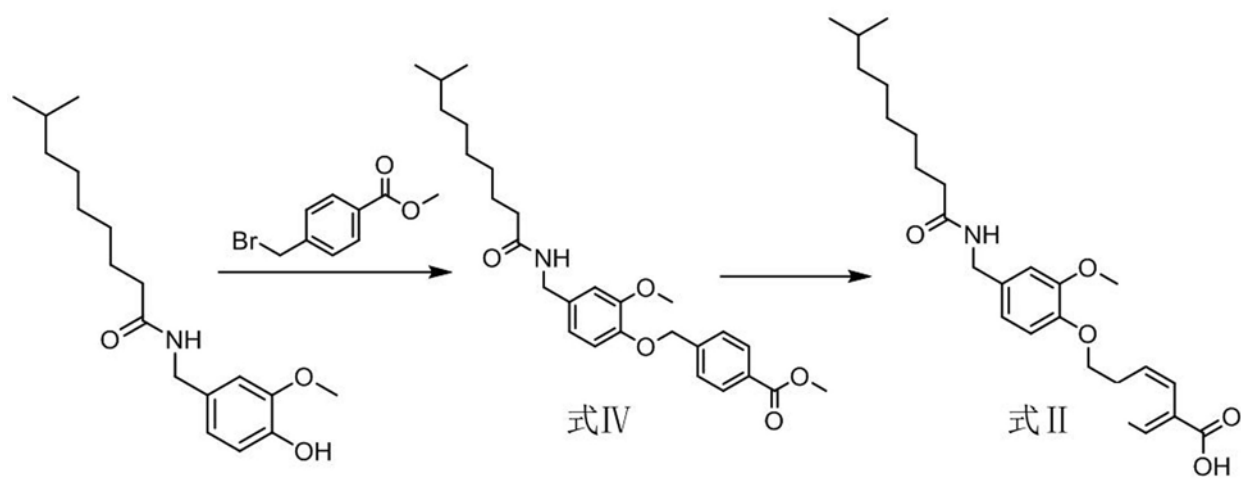


图2

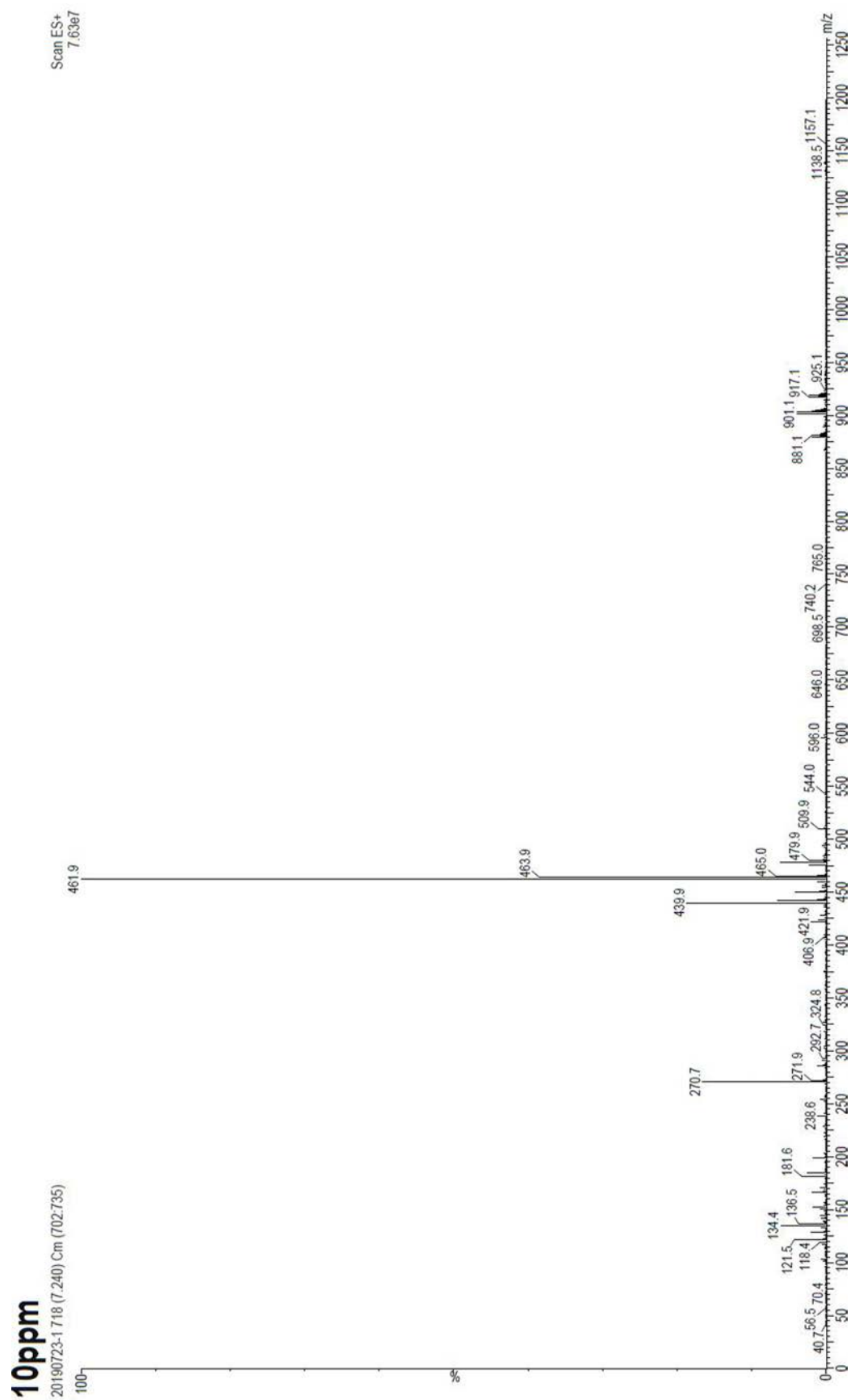


图3

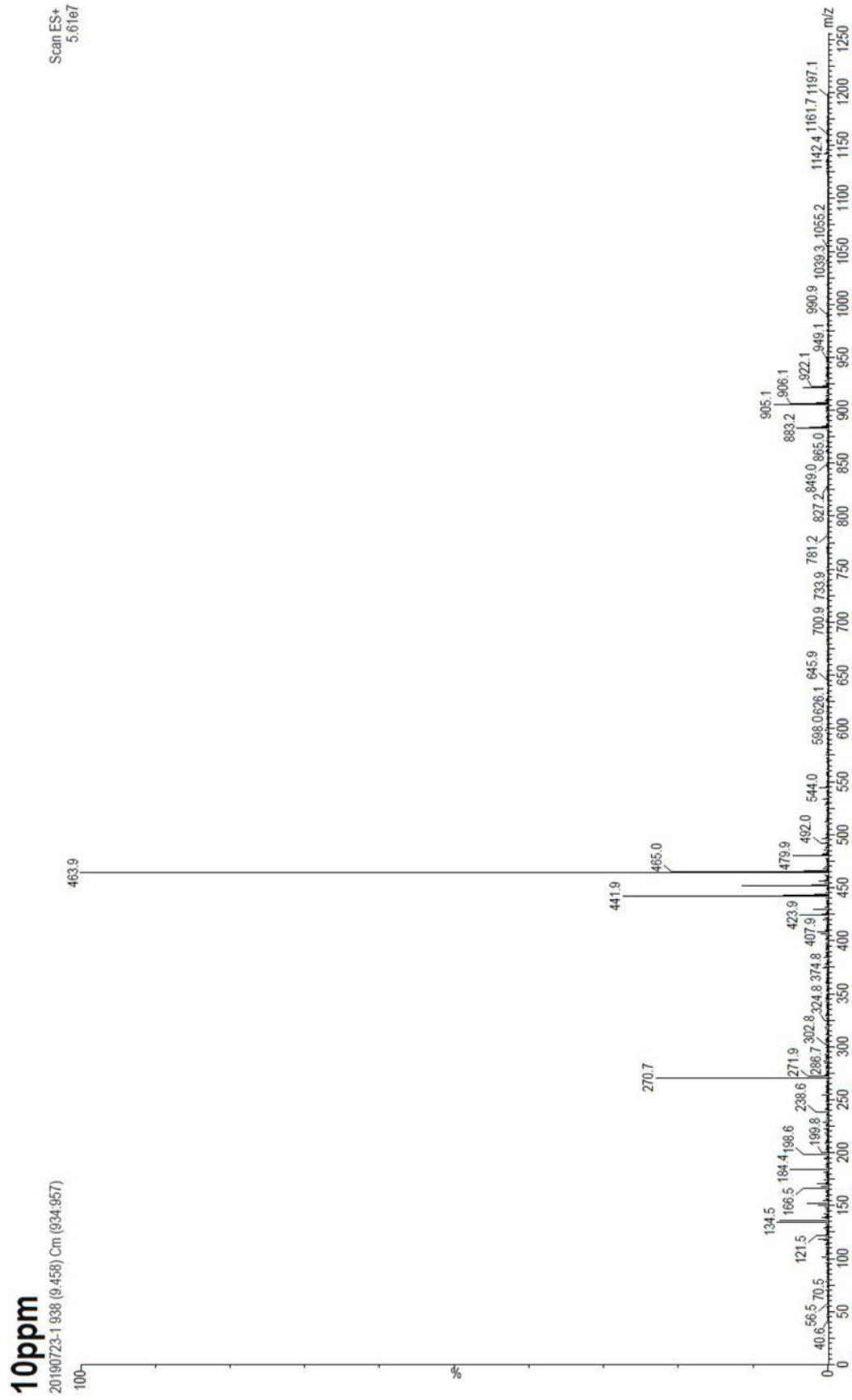


图4

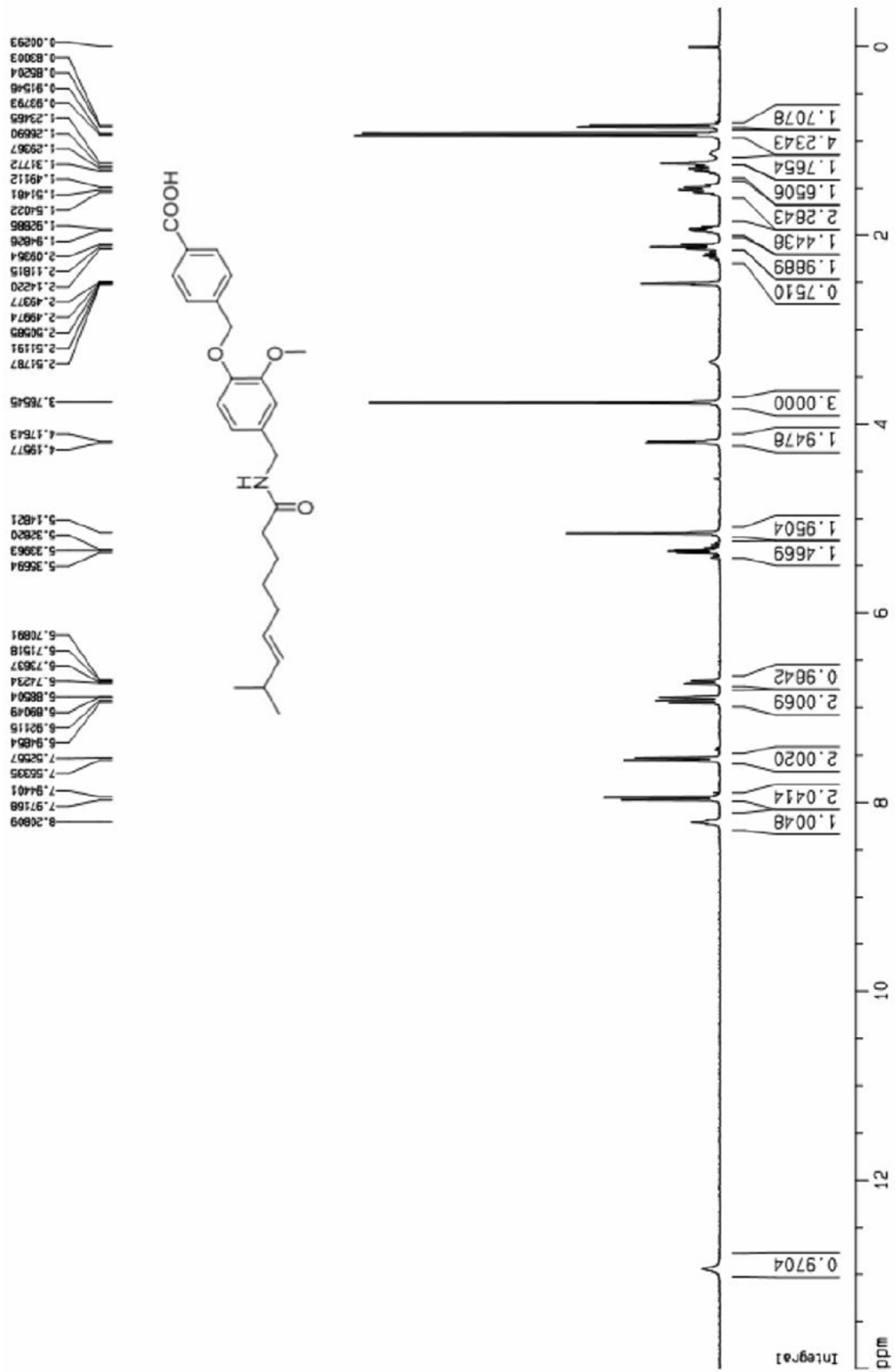


图5

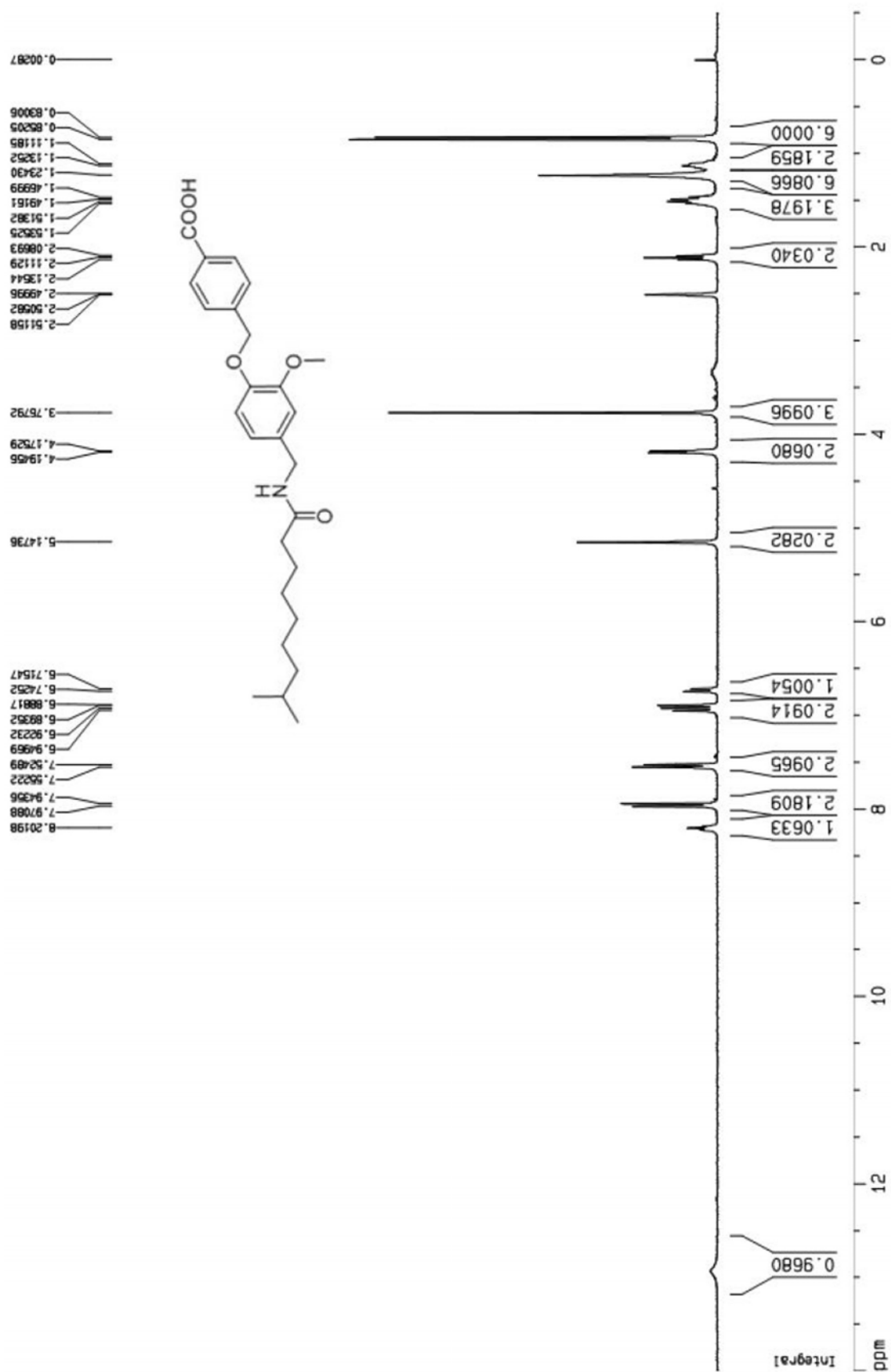


图6

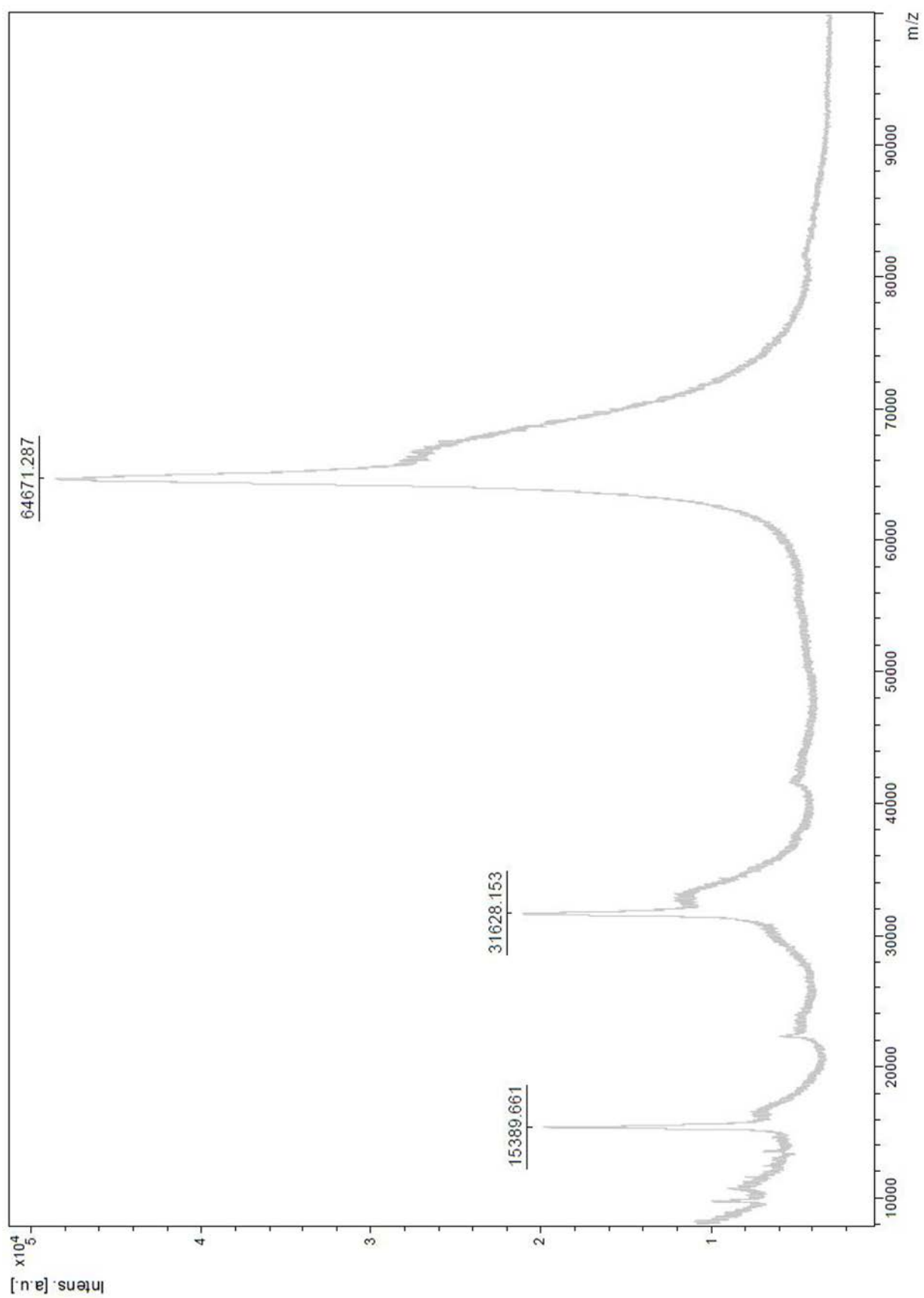


图7

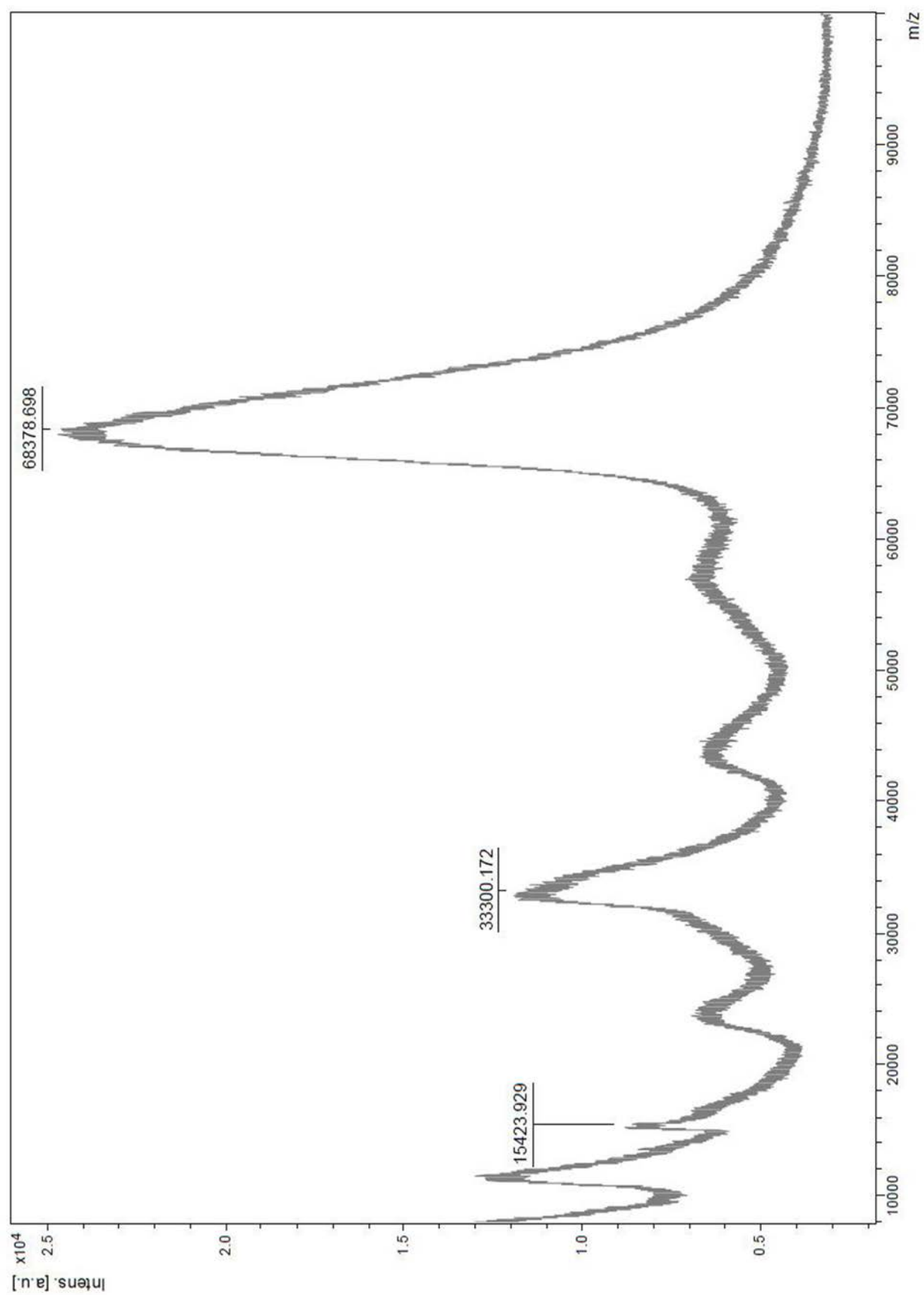


图8

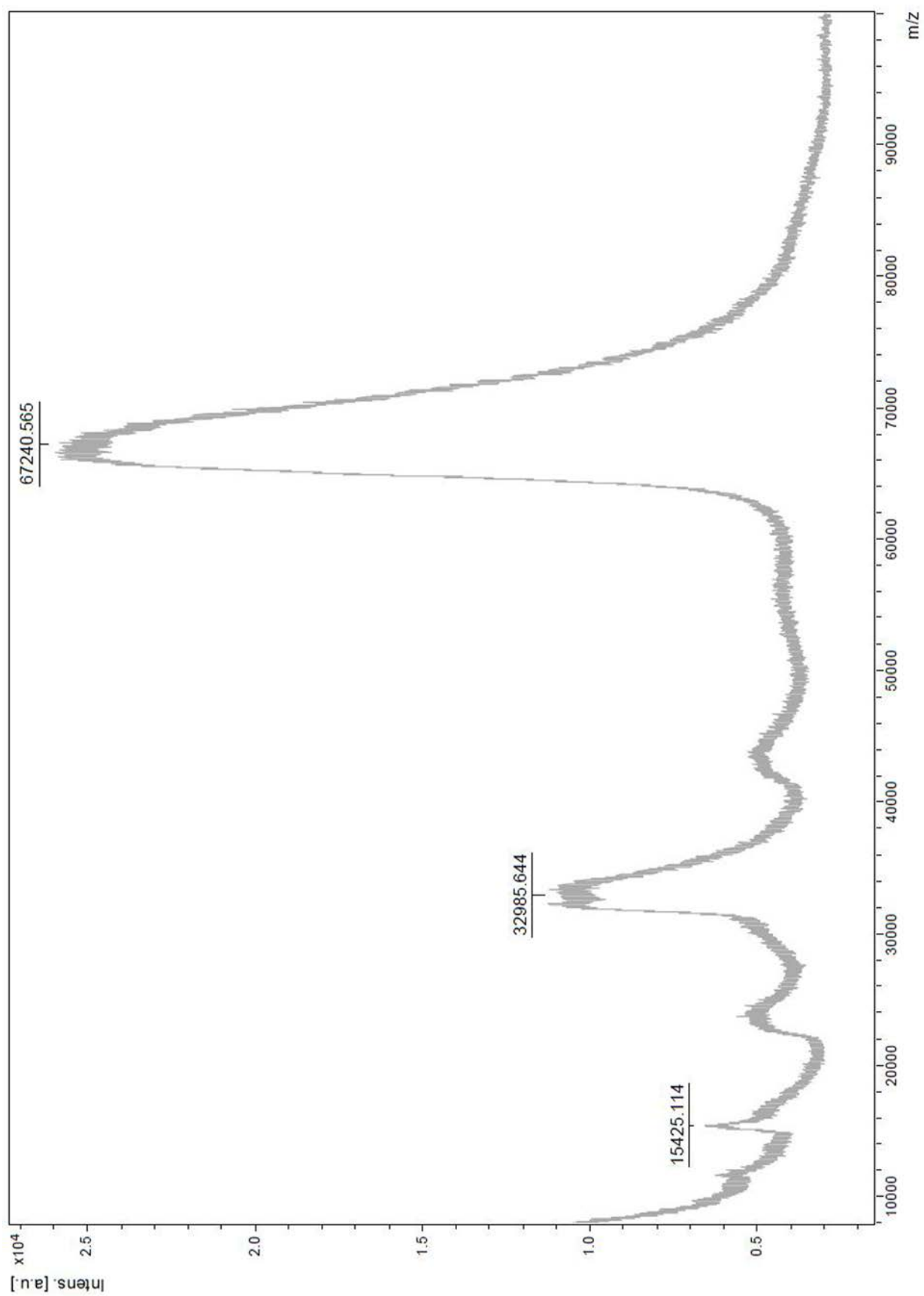


图9

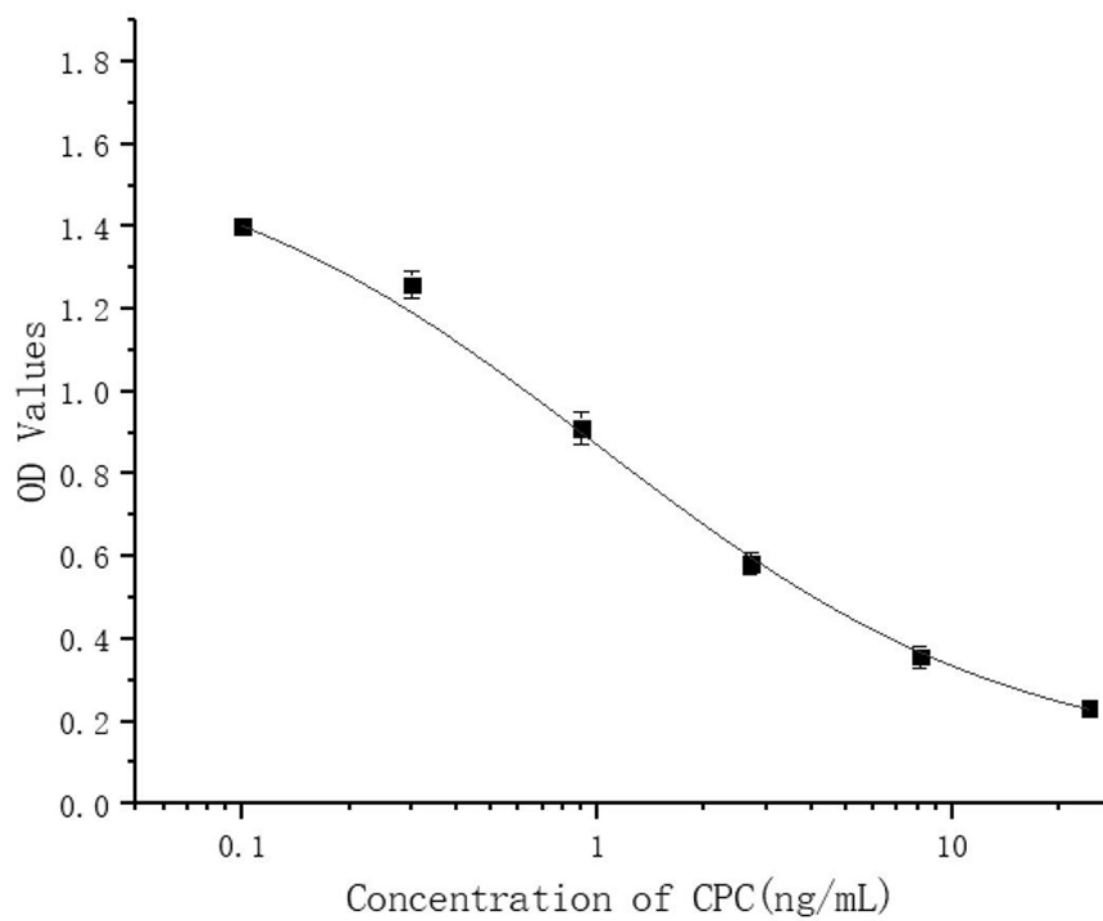


图10

专利名称(译)	用于地沟油检测的辣椒素半抗原、人工抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN110981744A	公开(公告)日	2020-04-10
申请号	CN201911088322.5	申请日	2019-11-08
[标]发明人	柯跃斌 沈建忠 王战辉 李金峰 蒋慧 于雪芝 江海洋 赵芳		
发明人	柯跃斌 沈建忠 王战辉 李金峰 蒋慧 于雪芝 江海洋 赵芳		
IPC分类号	C07C231/12 C07C233/18 C07C233/20 C07K14/47 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/53		
CPC分类号	C07C231/12 C07C233/18 C07C233/20 C07K14/47 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/53		
代理人(译)	许青华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了用于地沟油检测的辣椒素半抗原和人工抗原及其制备方法与应用。所述辣椒素半抗原的结构如式I或式II所示：式I，式II，所述辣椒素人工抗原是由式I或式II所示半抗原与载体蛋白偶联得到。利用所述辣椒素人工抗原免疫动物，可得到效价高，灵敏度高的特异性抗体。本发明提供的辣椒素半抗原及其制备的抗体，为建立快速、简便、价廉、灵敏、特异的辣椒素检测方法提供了新手段。

