



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107556370 A

(43)申请公布日 2018.01.09

(21)申请号 201710812878.9

(22)申请日 2017.09.11

(71)申请人 杨蕾

地址 310000 浙江省杭州市西湖区文二路
207号

(72)发明人 杨蕾

(51)Int.Cl.

C07K 14/00(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

C07K 16/06(2006.01)

G01N 33/82(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

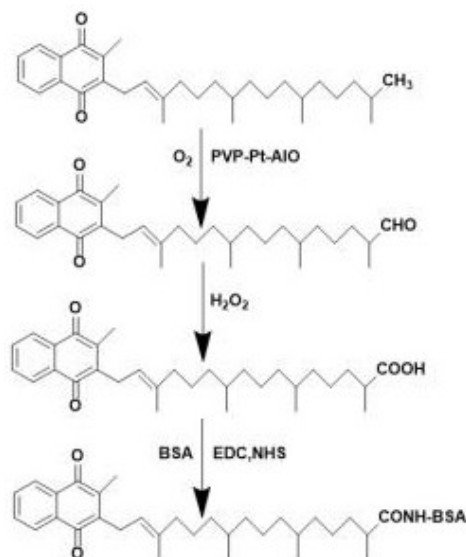
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种维生素K1人工抗原的制备方法

(57)摘要

一种维生素K1人工抗原的制备方法,属于生物化学技术领域。本发明使用铂催化剂对维生素K1进行催化氧化,可以选择性的将苯环侧链的脂肪链末端甲基氧化成醛基,然后醛基再次氧化成羧基,利用羧基基团与载体蛋白上的氨基进行偶联,这种维生素K1抗原的制备方法保留了维生素K1苯环的原始结构,充分暴露了维生素K1的抗原决定簇。通过紫外吸收光谱和SDS-PAGE证实了维生素K1与蛋白的成功偶联,并通过制备的维生素K1的抗体验证了维生素K1人工抗原合成的有效性。此方法合成步骤简单、有效性强,为维生素K1人工抗原的制备提供了重要的研究和实用价值。



1. 一种维生素K1人工抗原的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

(1) 维生素K1的脂肪链甲基氧化成醛基

称取50mg维生素K1加入圆底烧瓶中,加入5mL吡啶进行溶解,再加入20~50mg的PVP-Pt-A10催化剂,抽去真空后充入氧气,置于50~80℃的水浴磁力搅拌器上搅拌反应2~4h,反应结束后,将反应液进行离心分离出液体,将液体加入到10mL pH2.0的冰水中搅拌反应5min,再将其用乙酸乙酯进行三次萃取,在40℃的条件下用旋转蒸发仪旋干,得到脂肪链醛基化的维生素K1;

(2) 醛基氧化成羧基

将步骤(1)中旋干后的固体用5mL甲醇溶解,然后加入1mL质量比为50%的KOH溶液,将其置于60℃的水浴搅拌条件下缓慢滴加体积比为30%的双氧水溶液1~4mL,滴加完后继续搅拌反应30min,然后用1M盐酸溶液将溶液pH调整到6.5,从而得到羧基修饰的维生素K1;

(3) 完全人工抗原的合成

在步骤(2)制备的溶液中加入40mg碳二亚胺和25mg的N-羟基琥珀酰亚胺,室温下搅拌反应2h,然后在搅拌状态下缓慢滴加到10mL 10mg/mL的BSA溶液中,室温下搅拌反应4~6h后,将溶液进行在pH7.2的PBS缓冲液中透析3次,从而得到维生素K1的人工抗原;

(4) 人工抗原的鉴定

用10%的SDS-PAGE凝胶电泳和紫外吸收光谱鉴定人工抗原的偶联效果。

2. 根据权利要求1所述的一种维生素K1人工抗原的制备方法,其特征在于所述的PVP-Pt-A10催化剂的制备方法为:将10g $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、300mg聚乙烯吡咯烷酮、35g仲丁醇铝、50mL乙醇加入到150mL锥形瓶中,150℃的条件下搅拌回流3h,然后加入10mL的 H_2O 水解40min,冷却至室温后,得到灰色固体,将固体先用蒸馏水洗涤再用丙酮洗涤,50℃条件下真空干燥10h,即得到PVP-Pt-A10催化剂。

3. 根据权利要求1所述的一种维生素K1人工抗原的制备方法,其特征在于所述的PVP-Pt-A10催化剂的添加量为30mg。

4. 根据权利要求1所述的一种维生素K1人工抗原的制备方法,其特征在于所述的步骤(1)中催化反应的温度为60℃。

5. 根据权利要求1所述的一种维生素K1人工抗原的制备方法,其特征在于所述的步骤(1)中催化反应的时间为3h。

6. 根据权利要求1所述的一种维生素K1人工抗原的制备方法,其特征在于所述的步骤(2)中30%双氧水的添加量为3mL。

7. 根据权利要求1所述的一种维生素K1人工抗原的制备方法,其特征在于所述的步骤(3)中维生素K1和BSA的反应时间为5h。

8. 一种人工抗原制备维生素K1抗体的方法,其特征在于包括如下步骤:

(1) 动物免疫

取权利要求1制备的人工抗原与弗氏完全佐剂等量混合,在注射器中充分乳化后皮下注射3只BALB/C小鼠,每只小鼠的免疫剂量为50 μg ,间隔三周后对小鼠进行加强免疫,加强免疫用的是等量抗原与弗氏不完全佐剂的乳化液,每只小鼠的免疫剂量为50 μg ,四次免疫后对小鼠进行尾部采血,通过离心分离出血清;

(2) 测定抗体效价

将维生素K1包被原用0.01M pH9.6的碳酸盐缓冲液进行溶解,配成浓度为2 μ g/mL、1 μ g/mL、0.5 μ g/mL、0.25 μ g/mL的包被浓度进行包被,置于37℃烘箱中孵育2h,然后用含0.5% Tween-20的0.01M pH7.4的PBS洗液洗涤三次,再用 1% 的明胶作为封闭剂在37℃封闭2h,取出洗涤三次甩干;将抗血清稀释1000、3000、9000、27000倍,每种稀释倍数的抗体加入到四种包被浓度的酶标板孔中,每个孔加100 μ L,37℃孵育30min后洗涤干净,再加入1:3000的羊抗鼠二抗100 μ L/孔,37℃孵育30min后洗涤干净,再加入100 μ L/孔的TMB显色液显色15min,最后加入50 μ L/孔的终止液,用酶标仪测定480nm处的吸光值;

(3) 间接ELISA的测定

用1 μ g/mL、0.5 μ g/mL、0.25 μ g/mL的维生素K1包被原包被3条酶标板100 μ L/孔,37℃孵育2h,再用含0.5% Tween-20的0.01M pH7.4的PBS洗液洗涤三次,甩干后用 1% 的明胶在37℃封闭2h后,取出洗涤三次甩干;将维生素K1标准品配成100ng/mL、50ng/mL、20ng/mL、10ng/mL、5ng/mL的浓度,3条酶标板的第一行加入50 μ L/孔的PBS缓冲液,从第二行开始每行依次加入从低浓度到高浓度的维生素K1标准品50 μ L/孔,同时再加入50 μ L/孔的1:2000稀释的维生素K1抗血清,37℃孵育30min后洗涤干净,加入1:3000的羊抗鼠二抗100 μ L/孔,37℃孵育30min后洗涤,再用100 μ L/孔的TMB显色液显色15min,最后加入50 μ L/孔的终止液,用酶标仪测定480nm处的吸光值。

一种维生素K1人工抗原的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物化学技术领域,具体涉及一种维生素K1人工抗原的制备方法。

背景技术

[0002] 维生素K又称抗出血维生素,是具有叶绿醌生物活性的 α ,甲基-1,4-萘醌衍生物的总称。维生素K1(VK1)属于维生素K的一种,别名植物甲萘醌,是一种植物源性维生素,在自然界中主要以叶绿醌形式存在,绿色植物中维生素K1含量丰富,是肝脏凝血酶原合成的必需物质,与肝脏其他凝血因子的合成有关,具有促进凝血的功能,可以用于治疗因各种维生素K缺乏引起的出血性疾病治疗,也可以促进身体对钙、糖的吸收,成人只要注重日常的饮食就可以满足正常的维生素K1的含量,而婴幼儿对维生素K1的摄取主要是通过牛奶中维生素K1的添加来得到实现。此外,维生素K1还参与骨代谢和细胞生长,并具有阵痛和缓解支气管痉挛的作用。然而较大剂量或超量使用可导致新生儿、早产儿肝损伤、溶血性贫血、高胆红素血症及黄疸,还有可能出现脸红、发红疹、肠胃不适、皮肤搔痒等过敏症状。因此对奶粉、食品和药品中的维生素K1检测具有重要的作用。

[0003] 目前,维生素K1检测最常用的方法是紫外检测法,还包括液相色谱法、液相色谱-串联质谱法、液相色谱-电化学检测法等,虽然这些方法可以满足维生素K1的检测需求,然而昂贵的仪器和专业复杂的样品处理过程使得此类方法只局限于检测实验室使用,并且检测时间长,不能实现大量样本的快速检测。酶联免疫吸附实验(ELISA)是一种快速、灵敏、高通量的检测方法,操作简单方便,可以适用于大量样本的现场快速检测。建立高效的免疫学检测方法,需要得到高灵敏高特异性的抗体,因此高效抗原的制备是获得高灵敏抗体的前提。

发明内容

[0004] 要解决的技术问题:现有的基于仪器检测维生素K1的方法需要昂贵的仪器,并且需要专业的操作人员进行操作,样品前处理复杂,检测周期长,并且不能实现样本的高通量现场快速检测。

[0005] 技术方案:本发明公开了一种维生素K1人工抗原的制备方法,包括如下步骤:

(1) 维生素K1的脂肪链甲基氧化成醛基

称取50mg维生素K1加入圆底烧瓶中,加入5mL吡啶进行溶解,再加入20~50mg的PVP-Pt-A10催化剂,抽去真空后充入氧气,置于50~80℃的水浴磁力搅拌器上搅拌反应2~4h,反应结束后,将反应液进行离心分离出液体,将液体加入到10mL pH2.0的冰水中搅拌反应5min,再将其用乙酸乙酯进行三次萃取,在40℃的条件下用旋转蒸发仪旋干,得到脂肪链醛基化的维生素K1。

[0006] (2) 醛基氧化成羧基

将步骤(1)中旋干后的固体用5mL甲醇溶解,然后加入1mL质量比为50%的KOH溶液,将其置于60℃的水浴搅拌条件下缓慢滴加体积比为30%的双氧水溶液1~4mL,滴加完后继续搅拌

反应30min,然后用1M盐酸溶液将溶液pH调整到6.5,从而得到羧基修饰的维生素K1。

[0007] (3) 完全人工抗原的合成

在步骤(2)制备的溶液中加入40mg碳二亚胺和25mg的N-羟基琥珀酰亚胺,室温下搅拌反应2h,然后在搅拌状态下缓慢滴加到10mL 10mg/mL的BSA溶液中,室温下搅拌反应4~6h后,将溶液进行在pH7.2的PBS缓冲液中透析3次,从而得到维生素K1的人工抗原。

[0008] (4) 人工抗原的鉴定

用10%的SDS-PAGE凝胶电泳和紫外吸收光谱鉴定人工抗原的偶联效果。

[0009] (5) 一种人工抗原制备维生素K1抗体的方法,包括如下步骤:

(a) 动物免疫

取步骤(3)制备的人工抗原与弗氏完全佐剂等量混合,在注射器中充分乳化后皮下注射3只BALB/C小鼠,每只小鼠的免疫剂量为50 μ g,间隔三周后对小鼠进行加强免疫,加强免疫用的是等量抗原与弗氏不完全佐剂的乳化液,每只小鼠的免疫剂量为50 μ g,四次免疫后对小鼠进行尾部采血,通过离心分离出血清。

[0010] (b) 测定抗体效价

将维生素K1包被原用0.01M pH9.6的碳酸盐缓冲液进行溶解,配成浓度为2 μ g/mL、1 μ g/mL、0.5 μ g/mL、0.25 μ g/mL的包被浓度进行包被,置于37 $^{\circ}$ C烘箱中孵育2h,然后用含0.5% Tween-20的0.01M pH7.4的PBS洗液洗涤三次,再用 1% 的明胶作为封闭剂在37 $^{\circ}$ C封闭2h,取出洗涤三次甩干;将抗血清稀释1000、3000、9000、27000倍,每种稀释倍数的抗体加入到四种包被浓度的酶标板孔中,每个孔加100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育30min后洗涤干净,再加入1:3000的羊抗鼠二抗100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育30min后洗涤干净,再加入100 μ L/孔的TMB显色液显色15min,最后加入50 μ L/孔的终止液,用酶标仪测定480nm处的吸光值。

[0011] (c) 间接ELISA的测定

用1 μ g/mL、0.5 μ g/mL、0.25 μ g/mL的维生素K1包被原包被3条酶标板100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育2h,再用含0.5%Tween-20的0.01M pH7.4的PBS洗液洗涤三次,甩干后用 1% 的明胶在37 $^{\circ}$ C封闭2h后,取出洗涤三次甩干;将维生素K1标准品配成100ng/mL、50ng/mL、20ng/mL、10ng/mL、5ng/mL的浓度,3条酶标板的第一行加入50 μ L/孔的PBS缓冲液,从第二行开始每行依次加入从低浓度到高浓度的维生素K1标准品50 μ L/孔,同时再加入50 μ L/孔的1:2000稀释的维生素K1抗血清,37 $^{\circ}$ C孵育30min后洗涤干净,加入1:3000的羊抗鼠二抗100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育30min后洗涤,再用100 μ L/孔的TMB显色液显色15min,最后加入50 μ L/孔的终止液,用酶标仪测定480nm处的吸光值。

[0012] 本发明所述的维生素K1人工抗原的制备方法中PVP-Pt-A10催化剂的制备方法为:将10g $H_2PtCl_6 \cdot 6H_2O$ 、300mg聚乙烯吡咯烷酮、35g仲丁醇铝、50mL乙醇加入到150mL锥形瓶中,150 $^{\circ}$ C的条件下搅拌回流3h,然后加入10mL的 H_2O 水解40min,冷却至室温后,得到灰色固体,将固体先用蒸馏水洗涤再用丙酮洗涤,50 $^{\circ}$ C条件下真空干燥10h,即得到PVP-Pt-A10催化剂。

[0013] 本发明所述的维生素K1人工抗原的制备方法中PVP-Pt-A10催化剂的添加量为30mg。

[0014] 本发明所述的维生素K1人工抗原的制备方法的步骤(1)中催化反应的温度为60 $^{\circ}$ C。

- [0015] 本发明所述的维生素K1人工抗原的制备方法的步骤(1)中催化反应的时间为3h。
- [0016] 本发明所述的维生素K1人工抗原的制备方法的步骤(2)中30%双氧水的添加量为3mL。
- [0017] 本发明所述的维生素K1人工抗原的制备方法的步骤(3)中维生素K1和BSA的反应时间为5h。
- [0018] 有益效果：本发明使用铂催化剂对维生素K1进行催化氧化，可以选择性的将苯环侧链的脂肪链末端甲基氧化成醛基，然后醛基再次氧化成羧基，利用羧基基团将载体蛋白进行偶联，这种维生素K1抗原的制备方法保留了维生素K1苯环的原始结构，充分暴露了维生素K1的抗原决定簇，制备的抗体可以更好的识别维生素K1的标准品。

附图说明

- [0019] 图1 维生素K1人工抗原的合成流程图。
- [0020] 图2 维生素K1-BSA、BSA的SDS-PAGE图。

具体实施方式

[0021] 实施例1

一种维生素K1人工抗原的制备方法，包括如下步骤：

(1) PVP-Pt-A10催化剂的制备

将10g $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、300mg聚乙烯吡咯烷酮、35g仲丁醇铝、50mL乙醇加入到150mL锥形瓶中，150℃的条件下搅拌回流3h，然后加入10mL的 H_2O 水解40min，冷却至室温后，得到灰色固体，将固体先用蒸馏水洗涤再用丙酮洗涤，50℃条件下真空干燥10h，即得到PVP-Pt-A10催化剂。

[0022] (2) 维生素K1的脂肪链甲基氧化成醛基

称取50mg维生素K1加入圆底烧瓶中，加入5mL吡啶进行溶解，再加入30mg的PVP-Pt-A10催化剂，抽去真空后充入氧气，置于60℃的水浴磁力搅拌器上搅拌反应3h，反应结束后，将反应液进行离心分离出液体，将液体加入到10mL pH2.0的冰水中搅拌反应5min，再将其用乙酸乙酯进行三次萃取，在40℃的条件下用旋转蒸发仪旋干，得到脂肪链醛基化的维生素K1。

[0023] (3) 醛基氧化成羧基

将步骤(2)中旋干后的固体用5mL甲醇溶解，然后加入1mL质量比为50%的KOH溶液，将其置于60℃的水浴搅拌条件下缓慢滴加体积比为30%的双氧水溶液3mL，滴加完后继续搅拌反应30min，然后用1M盐酸溶液将溶液pH调整到6.5，从而得到羧基修饰的维生素K1。

[0024] (4) 完全人工抗原的合成

在步骤(3)制备的溶液中加入40mg碳二亚胺和25mg的N-羟基琥珀酰亚胺，室温下搅拌反应2h，然后在搅拌状态下缓慢滴加到10mL 10mg/mL的BSA溶液中，室温下搅拌反应5h后，将溶液进行在pH7.2的PBS缓冲液中透析3次，从而得到维生素K1的人工抗原。

[0025] (5) 人工抗原的鉴定

用10%的SDS-PAGE凝胶电泳和紫外吸收光谱鉴定人工抗原的偶联效果。从SDS-PAGE图得出，维生素K1-BSA偶联物的电泳条件位置滞后于BSA的电泳条带，并且维生素K1-BSA偶联

物的紫外吸收峰与维生素K1和BSA相比都有所便宜,因此维生素K1已成功与BSA偶联。

[0026] (6)一种人工抗原制备维生素K1抗体的方法,包括如下步骤:

(a) 动物免疫

取步骤(3)制备的人工抗原与弗氏完全佐剂等量混合,在注射器中充分乳化后皮下注射3只BALB/C小鼠,每只小鼠的免疫剂量为50 μ g,间隔三周后对小鼠进行加强免疫,加强免疫用的是等量抗原与弗氏不完全佐剂的乳化液,每只小鼠的免疫剂量为50 μ g,四次免疫后对小鼠进行尾部采血,通过离心分离出血清。

[0027] (b) 测定抗体效价

将维生素K1包被原用0.01M pH9.6的碳酸盐缓冲液进行溶解,配成浓度为2 μ g/mL、1 μ g/mL、0.5 μ g/mL、0.25 μ g/mL的包被浓度进行包被,置于37 $^{\circ}$ C烘箱中孵育2h,然后用含0.5% Tween-20的0.01M pH7.4的PBS洗液洗涤三次,再用 1% 的明胶作为封闭剂在37 $^{\circ}$ C封闭2h,取出洗涤三次甩干;将抗血清稀释1000、3000、9000、27000倍,每种稀释倍数的抗体加入到四种包被浓度的酶标板孔中,每个孔加100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育30min后洗涤干净,再加入1:3000的羊抗鼠二抗100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育30min后洗涤干净,再加入100 μ L/孔的TMB显色液显色15min,最后加入50 μ L/孔的终止液,用酶标仪测定480nm处的吸光值如下表所示。从下表得出,随着抗血清的稀释,仍显现出较高的OD值,因此免疫出的抗体效价较高。

包被浓度 (μ g/mL) \ 血清稀释倍数	2	1	0.5	0.25
1000	2.331	2.125	2.108	1.864
3000	1.983	1.879	1.741	1.372
9000	1.523	1.403	1.252	0.965
27000	0.947	0.857	0.749	0.545

[0028] (c) 间接ELISA的测定

用1 μ g/mL、0.5 μ g/mL、0.25 μ g/mL的维生素K1包被原包被3条酶标板100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育2h,再用含0.5% Tween-20的0.01M pH7.4的PBS洗液洗涤三次,甩干后用 1% 的明胶在37 $^{\circ}$ C封闭2h后,取出洗涤三次甩干;将维生素K1标准品配成100ng/mL、50ng/mL、20ng/mL、10ng/mL、5ng/mL的浓度,3条酶标板的第一行加入50 μ L/孔的PBS缓冲液,从第二行开始每行依次加入从低浓度到高浓度的维生素K1标准品50 μ L/孔,同时再加入50 μ L/孔的1:2000稀释的维生素K1抗血清,37 $^{\circ}$ C孵育30min后洗涤干净,加入1:3000的羊抗鼠二抗100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育30min后洗涤,再用100 μ L/孔的TMB显色液显色15min,最后加入50 μ L/孔的终止液,用酶标仪测定480nm处的吸光值如下表所示。从表中得出,加入维生素K1标准品后,OD值随之下降,因此所制备的抗体对维生素K1具有明显的抑制效果。

[0029]

包被浓度($5\mu\text{g/mL}$) VK1 添加量(ng/mL)	1	0.5	0.25
0	2.018	1.834	1.682
5	1.691	1.536	1.221
10	1.284	1.021	0.841
20	0.743	0.654	0.565
50	0.458	0.478	0.302
100	0.324	0.285	0.291

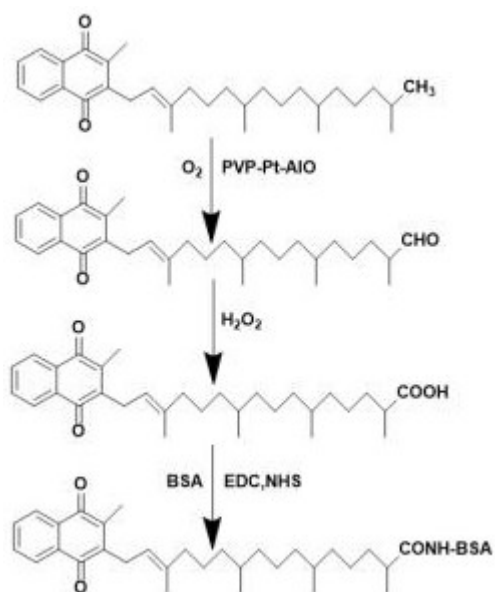


图1

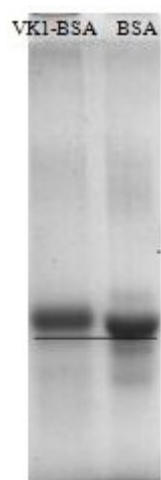


图2

专利名称(译)	一种维生素K1人工抗原的制备方法		
公开(公告)号	CN107556370A	公开(公告)日	2018-01-09
申请号	CN2017110812878.9	申请日	2017-09-11
[标]申请(专利权)人(译)	杨蕾		
申请(专利权)人(译)	杨蕾		
当前申请(专利权)人(译)	杨蕾		
[标]发明人	杨蕾		
发明人	杨蕾		
IPC分类号	C07K14/00 C07K16/44 C07K16/06 G01N33/82 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种维生素K1人工抗原的制备方法，属于生物化学技术领域。本发明使用铂催化剂对维生素K1进行催化氧化，可以选择性的将苯环侧链的脂肪链末端甲基氧化成醛基，然后醛基再次氧化成羧基，利用羧基基团与载体蛋白上的氨基进行偶联，这种维生素K1抗原的制备方法保留了维生素K1苯环的原始结构，充分暴露了维生素K1的抗原决定簇。通过紫外吸收光谱和SDS-PAGE证实了维生素K1与蛋白的成功偶联，并通过制备的维生素K1的抗体验证了维生素K1人工抗原合成的有效性。此方法合成步骤简单、有效性强，为维生素K1人工抗原的制备提供了重要的研究和实用价值。

