

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 1/107

G01N 33/531



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410096071.2

[43] 公开日 2005 年 7 月 6 日

[11] 公开号 CN 1634975A

[22] 申请日 2004. 11. 29

[21] 申请号 200410096071.2

[71] 申请人 清华大学

地址 100084 北京市海淀区清华园

[72] 发明人 刘 举 施汉昌 何 苗 余若祯

[74] 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事务所
代理人 廖元秋

权利要求书 1 页 说明书 3 页

[54] 发明名称 一种增加间隔臂的 2, 4 - 滴合成抗原的制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种增加间隔臂的 2, 4 - 滴合成抗原的制备方法, 属于小分子环境污染物免疫检测领域, 包括两种方法: 其一, 先合成 2, 4 - 滴和具有 C3 链或者 C6 链的分子(如 L - 赖氨酸)的缩合物, 然后再和载体蛋白交联; 其二, 在载体蛋白表面连接具有 C3 链或者 C6 链的分子(如 β - 丙氨酸、 ϵ - 氨基己酸或者 L - 赖氨酸), 然后将 2, 4 - 滴的羧基与充当间隔臂分子的氨基缩合。本发明能使 2, 4 - 滴分子充分暴露在载体蛋白分子表面, 以便获得特异性强、亲和力好的 2, 4 - 滴抗体。这种方法可以刺激动物的免疫系统地产生 2, 4 - 滴的特异性抗体含量更高的多克隆抗体。所产生的多克隆抗体能应用于水体或者饮用水中的 2, 4 - 滴的常规检测。

1、一种增加间隔臂的 2,4-滴合成抗原的制备方法,其特征在于,先合成 2,4-滴和具有 C3 链或者 C6 链的分子的缩合物,然后再和载体蛋白交联;包括以下步骤:

1)按质量比(0.5~1.2):1 将叔丁氧羰基-赖氨酸与 2,4-滴混合溶于缓冲溶液 PBS 中,调节 pH 为 5.5~6.5;

2)缓慢加入与 2,4-滴质量比为(0.5~1)的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺,于室温 20°C~30°C 条件下反应 1~3 小时;

3)制备 HCl/乙酸乙酯溶液:在吸滤瓶中放入固体 NH_4Cl ,缓慢加入 98%浓 H_2SO_4 ,产生的 HCl 气体经硫酸洗瓶和 CaCl_2 干燥塔干燥后通入冰冷却的乙酸乙酯中,将获得的溶液密封保存于 4°C 冰箱中;

4)将 2,4-滴与叔丁氧羰基-赖氨酸的缩合产物在 50°C~70°C 下用旋转蒸发器干燥,产物溶于乙酸乙酯中,于 0°C 下与第 3)步制备的 HCl/乙酸乙酯溶液混合,脱除赖氨酸的氨基保护叔丁氧羰基,0°C~4°C 反应 2~3 小时后收集沉淀,并用预冷的乙酸乙酯反复洗涤;

5)采用强酸性阳离子交换树脂去除自身环化的赖氨酸单体,获得纯化的 2,4-滴和赖氨酸 ϵ -氨基的交联物;

6)按照载体蛋白:2,4-滴为(0.35~0.7):1 将载体蛋白和纯化后的缩合物混合溶解在 PBS 溶液中,调节 pH 为 5.5~6.5;

7)再次缓慢加入与 2,4-滴质量比为 0.5~1 的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺,并且轻轻搅拌均匀后于 0°C~4°C 静置 12 小时以上,反应产物溶液经 0.1M 的 NaHCO_3 水溶液透析,然后再用 pH 7.2 的 PBS 透析,将获得的产物溶液分装冻存。

2、一种增加间隔臂的 2,4-滴合成抗原的制备方法,其特征在于,在载体蛋白表面连接具有 C3 链或者 C6 链的分子(如 β -丙氨酸、 ϵ -氨基己酸或者 L-赖氨酸),然后将 2,4-滴的羧基与充当间隔臂分子的氨基缩合;包括以下步骤:

1)封闭载体蛋白的羧基:将 Tris 和载体蛋白溶于 PBS 中,调节 pH 为 5.5~6.5,加入与载体蛋白质量比为 0.5~1.5 的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺,并缓慢搅拌均匀,于室温 20°C~30°C 条件下反应 1~3 小时;

2)将 ϵ -氨基己酸或者 β -丙氨酸的羧基和载体蛋白的氨基交联:将 1)的溶液加入与载体蛋白质量比为 0.8~1.0 的 ϵ -氨基己酸(或者 β -丙氨酸),接着加入与 1)步中等量的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺,并缓慢搅拌均匀,4°C 条件下静置 12 小时以上,反应产物溶液经 pH 7.2 的 PBS 透析;

3)按照载体蛋白:2,4-滴为(0.35~0.7):1 在透析后的载体蛋白中加入 2,4-滴,调节 pH 为 5.5~6.5;

4)缓慢加入与 1)步中等量的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺,并缓慢搅拌均匀,4°C 条件下静置 12 小时以上,反应产物溶液经 0.1M 的 NaHCO_3 水溶液透析,然后再用 pH 7.2 的 PBS 透析,将获得的产物溶液分装冻存。

一种增加间隔臂的 2,4-滴合成抗原的制备方法

技术领域

本发明属于小分子环境污染物免疫检测领域，特别涉及水体和饮用水中除草剂 2,4-滴免疫检测的合成抗原的制备方法。

背景技术

水体中含有大量有害小分子环境污染物是饮用水危害人类健康的主要原因之一。大量使用各种合成农药（包括 2,4-滴），导致地表水中小分子有机污染物不断增加，使水体丧失饮用功能。现有 2,4-滴检测技术主要利用固-液萃取（Liquid-Solid Extraction）和气相色谱-质谱技术（GC-MS）。2,4-滴传统检测方法的样品制备（萃取、还原、衍生化和纯化）过程繁复、耗时长，检测结果的一致性较差，这样就限制了常规检测的次数和精度。而免疫检测技术因具有特异性强、灵敏性高、检测迅速、样品通量大等优势近年来在环境污染物检测领域引起了广泛的关注，并对此展开了广泛的研究和一定的应用。目前已有的技术采用各种交联剂，使 2,4-滴分子的羧基和载体蛋白分子的氨基直接缩合，分子间通过酰胺键而连接，但是合成抗原上的部分 2,4-滴分子被蛋白表面的一些长链基团所掩蔽，免疫动物所产生的 2,4-滴特异性抗体的含量较低、并且特异性和亲和力相对较弱。

发明内容

本发明的目的是为克服已有技术的不足之处，提出一种增加间隔臂的 2,4-滴合成抗原的制备方法，本方法在载体蛋白和 2,4-滴分子增加了一个间隔臂，可合成一种免疫性能好的半抗原，使 2,4-滴分子充分暴露在载体蛋白分子表面，以便获得特异性强、亲和力好的 2,4-滴抗体。这种增加了间隔臂分子的 2,4-滴免疫原，可以刺激动物的免疫系统地产生 2,4-滴的特异性抗体含量更高的多克隆抗体。所产生的多克隆抗体能应用于水体或者饮用水中的 2,4-滴的常规检测。

本发明提出一种增加间隔臂的 2,4-滴合成抗原的制备方法，先合成 2,4-滴和具有 C3 链或者 C6 链的分子（如 L-赖氨酸）的缩合物，然后再和载体蛋白交联；包括以下步骤：

1) 按质量比(0.5~1.2): 1 将叔丁氧羰基-赖氨酸与 2,4-滴混合溶于缓冲溶液 PBS 中，调节 pH 为 5.5~6.5；

2) 缓慢加入与 2,4-滴质量比为(0.5~1)的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺，于室温 20°C~30°C 条件下反应 1~3 小时；

3) 制备 HCl/乙酸乙酯溶液：在吸滤瓶中放入固体 NH_4Cl ，缓慢加入 98% 浓 H_2SO_4 ，产生的 HCl 气体经硫酸洗瓶和 CaCl_2 干燥塔干燥后通入冰冷却的乙酸乙酯中，将获得的溶液密封保存于 0°C~4°C 冰箱中；

4) 将 2,4-滴与叔丁氧羰基-赖氨酸的缩合产物在 50℃~70℃ 下用旋转蒸发器干燥, 产物溶于乙酸乙酯中, 于 0℃ 下与第 3) 步制备的 HCl/乙酸乙酯溶液混合, 脱除赖氨酸的氨基保护叔丁氧羰基, 0℃~4℃ 反应 2~3 小时后收集沉淀, 并用预冷的乙酸乙酯反复洗涤;

5) 采用强酸性阳离子交换树脂去除自身环化的赖氨酸单体, 获得纯化的 2,4-滴和赖氨酸 ϵ -氨基的交联物;

6) 按照载体蛋白: 2,4-滴为(0.35~0.7): 1 将载体蛋白(牛血清白蛋白、兔血清白蛋白、鸡卵清蛋白或血蓝蛋白)和纯化后的缩合物混合溶解在 PBS 溶液中, 调节 pH 为 5.5~6.5;

7) 再次缓慢加入与 2,4-滴质量比为 0.5~1 的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺, 并且轻轻搅拌均匀。4℃ 条件下静置 12 小时以上。反应产物溶液经 0.1M 的 NaHCO_3 水溶液透析, 然后再用 pH 7.2 的 PBS 透析, 将获得的产物溶液分装冻存。

本发明提出另一种增加间隔臂的 2,4-滴合成抗原的制备方法, 在载体蛋白表面连接具有 C3 链或者 C6 链的分子(如 β -丙氨酸、 ϵ -氨基己酸或者 L-赖氨酸), 然后将 2,4-滴的羧基与充当间隔臂分子的氨基缩合。包括以下步骤:

1) 封闭载体蛋白的羧基: 将 Tris 和载体蛋白(牛血清白蛋白、兔血清白蛋白、鸡卵清蛋白或血蓝蛋白)溶于 PBS 中, 调节 pH 为 5.5~6.5, 加入与载体蛋白质量比为 0.5~1.5 的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺, 并缓慢搅拌均匀, 于室温 20℃~30℃ 条件下反应 1~3 小时;

2) 将 ϵ -氨基己酸或者 β -丙氨酸的羧基和载体蛋白的氨基交联: 将 1) 的溶液加入与载体蛋白质量比为 0.8~1.0 的 ϵ -氨基己酸(或者 β -丙氨酸), 接着加入与 1) 步中等量的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺, 并缓慢搅拌均匀, 4℃ 条件下静置 12 小时以上, 反应产物溶液经 pH 7.2 的 PBS 透析;

3) 按照载体蛋白: 2,4-滴为(0.35~0.7): 1 在透析后的载体蛋白中加入 2,4-滴, 调节 pH 为 5.5~6.5;

4) 缓慢加入与 1) 步中等量的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺, 并缓慢搅拌均匀, 4℃ 条件下静置 12 小时以上, 反应产物溶液经 0.1M 的 NaHCO_3 水溶液透析, 然后再用 pH 7.2 的 PBS 透析, 将获得的产物溶液分装冻存。

如上所说的添加间隔臂技术是利用 β -丙氨酸、 ϵ -氨基己酸、L-赖氨酸的碳链长度将 2,4-滴分子在载体蛋白表面充分暴露, 更好地刺激免疫动物产生特异性抗体的技术。

本发明的特点及技术效果:

本发明将载体蛋白和 2,4-滴分子之间通过一个具有 C3 链或者 C6 链的分子连接在一起, 也就是在载体蛋白和 2,4-滴分子增加了一个间隔臂, 使 2,4-滴分子充分暴露在载体蛋白分子表面, 这种方法可以刺激动物的免疫系统最大限度地产生 2,4-滴的特异性抗体。

本发明通过大量实验研究, 从多种 2,4-滴合成免疫原免疫动物所产生的抗血清对水中 2,4-滴的检测中比较, 并以此为基础开发出了能够产生特异性强、亲和力好的抗体的增加间隔臂技术。

本发明首先明确了 2,4-滴合成抗原能够刺激实验动物免疫系统产生特异性抗体的基础上, 为了提高抗体的特异性而设计并合成的带有间隔臂的 2,4-滴的合成抗原。符合免疫学基本原理, 可以产生特异性更强的 2,4-滴抗体, 减少其对 2,4-滴的相似物(2,4,5-涕、2,4-二氯苯氧丁酸)的交叉反应。

具体实施方式

实施例 1 为采用合成 2,4-滴和具有 C3 链或者 C6 链的分子(如 L-赖氨酸)的缩合物, 然后再和载体蛋白交联的增加间隔臂的方法。具体实施步骤如下:

246.3mg 叔丁氧羰基-赖氨酸、221mg 2,4-滴溶于 10ml PBS 中, 调节 pH 为 6.0, 缓慢加入 200 mg 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺, 于 25°C 条件下反应 2 小时。

制备 HCl/乙酸乙酯溶液在 2L 吸滤瓶中放入 200 g 固体 NH_4Cl , 缓慢加入 98% 的浓 H_2SO_4 , 产生的 HCl 气体经硫酸洗瓶和 CaCl_2 干燥塔干燥后通入冰冷却的 500ml 乙酸乙酯中, 将获得的溶液密封保存于 4°C 冰箱中。

将 2,4-D 与叔丁氧羰基-赖氨酸的偶联产物在 60°C 下用旋转蒸发器干燥, 产物溶于 10ml 乙酸乙酯, 于 0°C 下同之前制备的 10 ml HCl/乙酸乙酯溶液混合, 脱除赖氨酸的氨基保护叔丁氧羰基, 4°C 反应 2.5h 后收集沉淀, 并用 30ml 预冷的乙酸乙酯反复洗涤。

采用三菱化学的 pK208 大孔强酸性阳离子交换树脂去除自身环化的赖氨酸单体, 获得纯化的 2,4-滴和赖氨酸 ϵ -氨基的交联物。将纯化后的缩合物和 150 mg 载体蛋白(牛血清白蛋白、兔血清白蛋白、鸡卵清蛋白或血蓝蛋白)溶解在 10ml PBS 溶液中, 调节 pH 为 6.0。缓慢加入 200 mg 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺, 并且轻轻搅拌。4°C 条件下静置 18 小时。反应产物溶液经 0.1M 的 NaHCO_3 水溶液透析 1 天(期间 4 次更换透析液 2L), 然后再用 pH 7.2 的 PBS 透析 1 天(期间 4 次更换透析液 2L)。将获得的产物溶液分装冻存。

实施例 2 为采用在载体蛋白表面连接具有 C3 链或者 C6 链的分子(如 β -丙氨酸、 ϵ -氨基己酸或者 L-赖氨酸), 然后将 2,4-滴的羧基与充当间隔臂分子的氨基残基交联增加间隔臂的方法。具体实施步骤如下:

121mg Tris 和 150 mg 载体蛋白(牛血清白蛋白、兔血清白蛋白、鸡卵清蛋白或血蓝蛋白)溶于 10 ml PBS 中, 调节 pH 为 6.0, 缓慢加入 100mg—200 mg 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺, 并搅拌均匀。于 25°C 条件下反应 2 小时。封闭载体蛋白的羧基。

上述反应溶液中加入 132mg ϵ -氨基己酸(或者 90 mg β -丙氨酸), 100mg—200mg 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺。将 ϵ -氨基己酸或者 β -丙氨酸的羧基和载体蛋白的氨基交联。反应产物溶液经 pH 7.2 的 PBS 透析 1 天(期间 4 次更换透析液 2L)。

透析后的反应溶液中加入 221 mg 2,4-滴, 调节 pH 为 6.0。缓慢加入 200 mg 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺, 并且轻轻搅拌均匀。4°C 条件下静置 18 小时。反应产物溶液经 0.1M 的 NaHCO_3 水溶液透析 1 天(期间 4 次更换透析液 2L), 然后再用 pH 7.2 的 PBS 透析 1 天(期间 4 次更换透析液 2L)。将获得的产物溶液分装冻存。

专利名称(译)	一种增加间隔臂的2，4 - 滴合成抗原的制备方法		
公开(公告)号	CN1634975A	公开(公告)日	2005-07-06
申请号	CN200410096071.2	申请日	2004-11-29
[标]申请(专利权)人(译)	清华大学		
申请(专利权)人(译)	清华大学		
当前申请(专利权)人(译)	清华大学		
[标]发明人	刘举 施汉昌 何苗 余若祯		
发明人	刘举 施汉昌 何苗 余若祯		
IPC分类号	C07K1/107 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种增加间隔臂的2，4 - 滴合成抗原的制备方法，属于小分子环境污染免疫检测领域，包括两种方法：其一，先合成2，4 - 滴和具有C3链或者C6链的分子(如L - 赖氨酸)的缩合物，然后再和载体蛋白交联；其二，在载体蛋白表面连接具有C3链或者C6链的分子(如β - 丙氨酸、ε - 氨基己酸或者L - 赖氨酸)，然后将2，4 - 滴的羧基与充当间隔臂分子的氨基缩合。本发明能使2，4 - 滴分子充分暴露在载体蛋白分子表面，以便获得特异性强、亲和力好的2，4 - 滴抗体。这种方法可以刺激动物的免疫系统地产生2，4 - 滴的特异性抗体含量更高的多克隆抗体。所产生的多克隆抗体能应用于水体或者饮用水中的2，4 - 滴的常规检测。