



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109307761 A

(43)申请公布日 2019.02.05

(21)申请号 201811173795.0

(22)申请日 2018.10.09

(71)申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

(72)发明人 肖治理 刘谦 徐振林 杨曦
江梦霞 张浩仪 赵颖娴 胡山行

(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 任重

(51)Int.Cl.

G01N 33/549(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

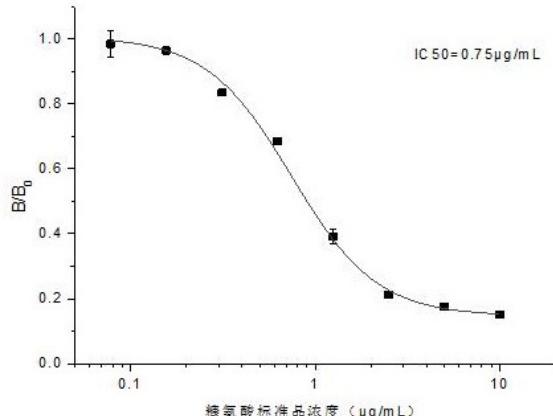
权利要求书1页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

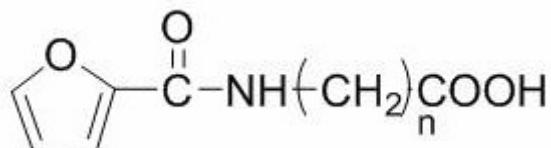
一种检测糠氨酸的间接竞争ELISA方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测糠氨酸的间接竞争ELISA方法。本发明利用糠酸和氯化亚砜合成糠氨酸半抗原，然后将该半抗原与载体蛋白进行偶联，得到糠氨酸人工完全抗原，进而制备其糠氨酸多克隆抗体，并基于抗原抗体特异性识别建立了检测糠氨酸的间接竞争ELISA方法，该方法是利用糠氨酸多克隆抗体作为结合抗体，糠酸人工完全抗原作为包被原建立的。该方法具有快速、灵敏、准确等优点，特别适用于现场大量样品的快速检测，为乳品中糠氨酸的快速检测开辟了一种新路径，提供了一种新的检测手段。



1. 一种糠氨酸半抗原，其特征在于，糠氨酸半抗原具有式(I)所示分子结构：



式(I)，其中n为2到7的自然数。

2. 权利要求1所述的糠氨酸半抗原的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：

S11. 将糠酸与氯化亚砜混合并溶解反应，得到中间产物A；

S12. 用四氢呋喃溶解中间产物A，得到溶液A；

S13. 用水溶解氢氧化钠和C₃～C₈直链氨基酸中的一种，得到溶液B；

S14. 在冰浴及碱性条件下，将溶液B滴加到溶液A中反应，调pH至4～5，蒸干溶剂得到粗产物；

S15. 用有机溶剂溶解粗产物，硅胶柱层析纯化，即得所述糠氨酸半抗原；

所述C₃～C₈直链氨基酸包括氨基丙酸、氨基丁酸、氨基戊酸、氨基己酸、氨基庚酸或氨基辛酸。

3. 一种糠氨酸人工完全抗原，其特征在于，由权利要求1所述糠氨酸半抗原与载体蛋白偶联得到。

4. 根据权利要求3所述糠氨酸人工完全抗原，其特征在于，所述载体蛋白为牛血清白蛋白。

5. 一种糠酸人工完全抗原，其特征在于，由糠酸与载体蛋白偶联得到。

6. 根据权利要求5所述糠酸人工完全抗原，其特征在于，所述载体蛋白为卵清蛋白。

7. 一种糠氨酸抗体，其特征在于，利用权利要求3所述糠氨酸人工完全抗原制备得到。

8. 权利要求1所述糠氨酸半抗原、权利要求3所述糠氨酸人工完全抗原、权利要求5所述糠酸人工完全抗原和/或权利要求7所述糠氨酸抗体在建立糠氨酸分析检测方法，和/或在制备糠氨酸分析检测试剂盒中的应用。

9. 一种检测糠氨酸的间接竞争酶联免疫方法，其特征在于，将权利要求4所述糠酸人工完全抗原作为包被抗原，将权利要求7所述糠氨酸抗体作为结合抗体。

10. 权利要求9所述间接竞争酶联免疫方法在糠氨酸分析检测中的应用。

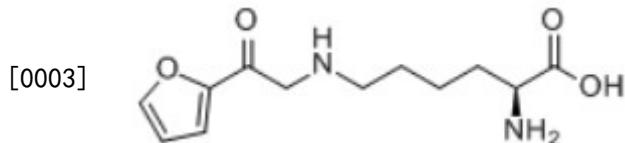
一种检测糠氨酸的间接竞争ELISA方法

技术领域

[0001] 本发明属于食品分析领域。更具体地，涉及一种检测糠氨酸的间接竞争ELISA方法。

背景技术

[0002] 糠氨酸(Furosine,Furoylmethylysine,FML)，又称“呋喃素”，学名为“ ϵ -N-2-呋喃甲基-L-赖氨酸”，其结构如下式所示。糠氨酸是美拉德反应的产物，是食品中的蛋白质(或氨基酸)与还原糖在高温加工或长期储存时发生Maillard反应产生的系列糖基化终产物之一。由蛋白质暴露的赖氨酸与游离乳糖发生反应，经过酸水解最终形成游离的糠氨酸，常作为判断蜂蜜和牛奶等产品新鲜度或营养损伤程度的一个重要指标。亦有大量研究表明，人体内糖基化终产物是老年性疾病的介导因素，糠氨酸是导致糖尿病慢性并发症及衰老的危险物质，摄入过量对人体健康有害。



目前，国内外对于糠氨酸的测定方法主要依靠常规仪器分析方法，如高效液相色谱法(HPLC)、高效液相色谱串联质谱法(HPLC-MS)、氨基酸分析仪法、荧光光谱法以及毛细管色谱串联质谱(CE-MS)法等。这些方法存在前处理复杂、设备昂贵、操作繁琐、专业性强等缺点，难以满足现场或大批量样品快速检测的需要。

[0004] 糠氨酸属于小分子化合物(MW≤1000)，这类化合物不具有免疫原性，不能直接免疫动物制备特异性抗体，需要首先将其偶联到具有免疫原性的大分子载体(通常为蛋白质)上。如果小分子待测物本身含有-NH₂，-COOH，-OH，-SH等功能基团，可直接活化后偶联载体蛋白。虽然糠氨酸本身含有-NH₂和-COOH活性基团，但其在人工抗原制备时极易发生自身缩合，不利于完全抗原的制备及特异性抗体的产生。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服上述现有技术的缺陷和不足，提供一种检测糠氨酸的间接竞争ELISA方法。所述基于抗原抗体特异性识别的免疫分析方法具有快速、灵敏、准确等优点，特别适用于现场大量样品的快速检测。

- [0006] 本发明的第一个目的是提供一种糠氨酸半抗原。
- [0007] 本发明的第二个目的是提供所述糠氨酸半抗原的制备方法。
- [0008] 本发明的第三个目的是提供一种糠氨酸人工完全抗原。
- [0009] 本发明的第四个目的是提供一种糠酸人工完全抗原。
- [0010] 本发明的第五个目的是提供一种糠氨酸抗体。
- [0011] 本发明的第六个目的是提供所述糠氨酸半抗原、所述糠氨酸人工完全抗原、所述糠酸人工完全抗原和/或所述糠氨酸抗体在建立糠氨酸分析检测方法，和/或糠氨酸分析检

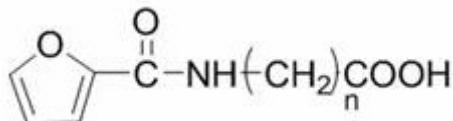
测试剂盒中的应用。

[0012] 本发明的第七个目的是提供一种检测糠氨酸的间接竞争酶联免疫方法。

[0013] 本发明的第八个目的是提供所述间接竞争酶联免疫方法在糠氨酸分析检测中的应用。

[0014] 本发明上述目的通过以下技术方案实现：

一种糠氨酸半抗原，所述糠氨酸半抗原具有式(I)所示分子结构：



式(I)，其中n为2到7的自然数。

[0015] 上述糠氨酸半抗原的制备方法，具体包括如下步骤：

S11. 将糠酸与氯化亚砜混合并溶解反应，得到中间产物A；

S12. 用四氢呋喃溶解中间产物A，得到溶液A；

S13. 用水溶解氢氧化钠和C₃～C₈直链氨基酸中的一种，得到溶液B；

S14. 在冰浴及碱性条件下，将溶液B滴加到溶液A中反应，调pH至4～5，蒸干溶剂得到粗产物；

S15. 用有机溶剂溶解粗产物，硅胶柱层析纯化，即得所述糠氨酸半抗原；

所述C₃～C₈直链氨基酸包括氨基丙酸、氨基丁酸、氨基戊酸、氨基己酸、氨基庚酸或氨基辛酸。

[0016] 优选地，步骤S11中，糠酸与氯化亚砜溶解于有机溶剂，反应之后蒸干有机溶剂，并除去氯化亚砜。

[0017] 更优选地，步骤S11中，所述有机溶剂为二氯甲烷。

[0018] 优选地，步骤S11中，所述有机溶剂与氯化亚砜的体积比为2～5:1。

[0019] 更优选地，步骤S11中，所述有机溶剂与氯化亚砜的体积比为3:1。

[0020] 优选地，步骤S11中，所述反应的条件为55～85℃下回流反应4～12 h。

[0021] 更优选地，步骤S11中，所述反应的条件为75℃下回流反应6 h。

[0022] 优选地，步骤S11中，糠酸与氯化亚砜的质量体积比为1:2～6(g/mL)。

[0023] 更优选地，步骤S11中，糠酸与氯化亚砜的质量体积比为2:5(g/mL)。

[0024] 优选地，步骤S11中，反应完成后用旋转蒸发仪蒸干有机溶剂。

[0025] 优选地，步骤S11中，蒸干溶剂后再加入有机溶剂，再次蒸干有机溶剂除去未蒸出的氯化亚砜。

[0026] 优选地，步骤S12中，四氢呋喃与步骤S11中的中间产物A的体积-质量比为2～30:1(mL/g)。

[0027] 更优选地，步骤S12中，四氢呋喃与步骤S11中的中间产物A的体积-质量比为14:1(mL/g)。

[0028] 优选地，步骤S13中，NaOH的终浓度为0.1～0.6 g/mL。

[0029] 更优选地，步骤S13中，NaOH的终浓度为0.28 g/mL。

[0030] 优选地，步骤S13中，所述C₃～C₈直链氨基酸的终浓度为0.05～4 mmol/mL。

[0031] 更优选地，步骤S13中，所述C₃～C₈直链氨基酸的终浓度为2.73 mmol/mL。

[0032] 当所述直链氨基酸为氨基丙酸时,式(I)中n为2;当所述直链氨基酸为氨基丁酸时,式(I)中n为3;当所述直链氨基酸为氨基戊酸时,式(I)中n为4;当所述直链氨基酸为氨基己酸时,式(I)中n为5;当所述直链氨基酸为氨基庚酸时,式(I)中n为6;当所述直链氨基酸为氨基辛酸时,式(I)中n为7。

[0033] 优选地,步骤S14中,所述碱性条件为pH为10~11。

[0034] 优选地,步骤S14中,所述反应的时间为6~18 h。

[0035] 更优选地,步骤S14中,所述反应的时间为12 h。

[0036] 优选地,步骤S14中,蒸干溶剂的条件为55°C减压浓缩。

[0037] 优选地,步骤S15中,所述有机溶剂为甲醇。

[0038] 优选地,步骤S15中,用有机溶剂溶解粗产物,加入硅胶粉,拌样,蒸干溶剂,上柱,洗脱。

[0039] 更优选地,步骤S15中,硅胶粉的规格为200~300目。

[0040] 优选地,步骤S15中,所述硅胶柱层析洗脱剂为体积比为1:4~8的甲醇和二氯甲烷。

[0041] 更优选地,步骤S15中,甲醇和二氯甲烷的体积比为1:5。

[0042] 一种糠氨酸人工完全抗原,由上述糠氨酸半抗原与载体蛋白偶联得到。

[0043] 所述载体蛋白包括牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、钥孔血蓝蛋白(KLH)或人血清白蛋白(HSA)。

[0044] 优选地,所述载体蛋白为牛血清白蛋白。

[0045] 所述糠氨酸人工完全抗原的制备方法,糠氨酸人工完全抗原是由糠氨酸半抗原通过活泼酯法或混合酸酐法偶联载体蛋白得到。

[0046] 优选地,所述活泼酯法步骤如下:

S21. 取糠氨酸半抗原、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)和N,N'-二环己基碳化二亚胺(DCC)溶于无水N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,室温下搅拌反应,离心,取上清,得到活化液;

S22. 在载体蛋白的碳酸盐缓冲液溶液中,加入步骤S21中的活化液,室温下搅拌反应;

S23. 将步骤S22反应后的液体透析,离心,取上清液,保存。

[0047] 优选地,步骤S21中,所述糠氨酸半抗原、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)和N,N'-二环己基碳化二亚胺(DCC)的摩尔比为1~1.1:1~1.3:1~1.5。

[0048] 更优选地,步骤S21中,所述糠氨酸半抗原、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)和N,N'-二环己基碳化二亚胺(DCC)的摩尔比为1:1:1。

[0049] 优选地,步骤S21中,糠氨酸半抗原的浓度为0.03~0.125 mmol/mL。

[0050] 更优选地,步骤S21中,糠氨酸半抗原的浓度为0.05 mmol/mL。

[0051] 优选地,步骤S21中,所述反应的时间为6~18 h。

[0052] 更优选地,步骤S21中,所述反应的时间为12 h。

[0053] 优选地,步骤S22中,碳酸盐缓冲液浓度为0.01~0.2 mol/L,pH为7.4~9.6。

[0054] 更优选地,步骤S22中,碳酸盐缓冲液浓度为0.05 mol/L,pH为9.6。

[0055] 优选地,步骤S22中,在载体蛋白的碳酸盐缓冲液溶液中,载体蛋白的浓度为4.25~28.3 mg/mL。

[0056] 更优选地,步骤S22中,在载体蛋白的碳酸盐缓冲液溶液中,载体蛋白的浓度为8.5

mg/mL。

- [0057] 优选地，步骤S22中，载体蛋白的碳酸盐缓冲液溶液与活化液的体积比为5~20:1。
- [0058] 更优选地，步骤S22中，载体蛋白的碳酸盐缓冲液溶液与活化液的体积比为10:1。
- [0059] 优选地，步骤S22中，所述反应的时间为2~6 h。
- [0060] 更优选地，步骤S22中，所述反应的时间为3 h。
- [0061] 优选地，步骤S23中，用pH为7.4~8.4，浓度为0.01~0.02 mol/L的PBS作为透析液。
- [0062] 更优选地，步骤S23中，用pH为7.4，浓度为0.01 mol/L的PBS作为透析液。
- [0063] 优选地，步骤S23中，每2~6 h换一次透析液。
- [0064] 更优选地，步骤S23中，每4 h换一次透析液。
- [0065] 优选地，步骤S23中，所述离心的条件为2000~8000 r/min的转速，时间为5~15 min。
- [0066] 更优选地，步骤S23中，所述离心的条件为6000 r/min的转速，时间为10 min。
- [0067] 优选地，所述混合酸酐法步骤如下：

S31. 称取糠氨酸半抗原溶于无水DMF中，之后加入三正丁胺、氯甲酸异丁酯，室温下反应，得到反应液；

S32. 向载体蛋白的PBS溶液滴加反应液，室温下搅拌反应；

S33. 将步骤S32反应后的液体透析，离心，取上清液，保存。

- [0068] 优选地，步骤S31中，糠氨酸半抗原、三正丁胺、氯甲酸异丁酯的摩尔比为1~1.1:1~1.2:1~1.5。
- [0069] 更优选地，步骤S31中，糠氨酸半抗原、三正丁胺、氯甲酸异丁酯的摩尔比为1:1:1。
- [0070] 优选地，步骤S31中，糠氨酸半抗原的浓度为0.005~0.018 mmol/mL。
- [0071] 更优选地，步骤S31中，糠氨酸半抗原的浓度为0.018 mmol/mL。
- [0072] 优选地，步骤S31中，所述反应的时间为0.5 h~3 h。
- [0073] 更优选地，步骤S31中，所述反应的时间为1 h。
- [0074] 优选地，步骤S32中，在载体蛋白的PBS溶液中，载体蛋白的浓度为4.25~28.3 mg/mL。
- [0075] 更优选地，步骤S32中，在载体蛋白的PBS溶液中，载体蛋白的终浓度为15 mg/mL。
- [0076] 优选地，步骤S32中，载体蛋白的PBS溶液与反应液的体积比为5~20:1。
- [0077] 更优选地，步骤S32中，载体蛋白的PBS溶液与反应液的体积比为20:1。
- [0078] 优选地，步骤S32中，PBS的浓度为0.01~0.02 mol/L，pH为7.4~8.4。
- [0079] 优选地，步骤S32中，PBS的浓度为0.1 mol/L，pH为7.4。
- [0080] 优选地，步骤S32中，所述反应的时间为2~6 h。
- [0081] 更优选地，步骤S32中，所述反应的时间为3 h。
- [0082] 优选地，步骤S33中，用pH为7.4~8.4，浓度为0.01~0.02 mol/L的PBS作为透析液。
- [0083] 更优选地，步骤S33中，用pH为7.4，浓度为0.01 mol/L的PBS作为透析液。
- [0084] 优选地，步骤S33中，每2~6 h换一次透析液。
- [0085] 更优选地，步骤S33中，每4 h换一次透析液。

[0086] 优选地,步骤S33中,所述离心的条件为2000~8000 r/min的转速,时间为5~15 min。

[0087] 更优选地,步骤S33中,所述离心的条件为6000 r/min的转速,时间为10 min。

[0088] 上述糠氨酸人工完全抗原用作免疫动物用的免疫抗原和ELISA检测用的包被抗原,也在本发明的保护范围之内。

[0089] 一种糠酸人工完全抗原,由糠酸与载体蛋白偶联得到。

[0090] 所述载体蛋白包括牛血清白蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白或人血清白蛋白。

[0091] 优选地,所述载体蛋白为卵清蛋白。

[0092] 所述糠酸人工完全抗原的制备方法,糠酸人工完全抗原是由糠酸通过活泼酯法偶联卵清蛋白得到。

[0093] 具体的,所述活泼酯法具体步骤如下:

S41. 糠酸溶于DMF中,搅拌加入DCC和NHS,反应,离心后取上清液;

S42. 向载体蛋白的PBS溶液滴加上清液,室温下搅拌反应;

S43. 将步骤S42反应后的液体透析,离心,取上清液,保存。

[0094] 优选地,步骤S41中,糠酸、DCC和NHS的摩尔比为1~3:3~9:3~9。更优选地,步骤S41中,糠酸、DCC和NHS的摩尔比为2:3:3。

[0095] 优选地,步骤S41中,糠酸的浓度为0.001~1 mmol/mL。

[0096] 更优选地,步骤S41中,糠酸的浓度为0.01 mmol/mL。

[0097] 优选地,步骤S41中所述反应为4℃下磁力搅拌反应过夜。

[0098] 优选地,步骤S42中,PBS的浓度为0.01~0.02 mol/L,pH为7.4~8.4。

[0099] 更优选地,步骤S42中,PBS的浓度为0.01 mol/L,pH为7.4。

[0100] 优选地,步骤S42中,载体蛋白的PBS溶液中,载体蛋白的浓度为3.75~28.3 mg/mL。

[0101] 更优选地,步骤S42中,载体蛋白的PBS溶液中,载体蛋白的浓度为3.75 mg/mL。

[0102] 优选地,步骤S43中,用PBS透析2~6天,每天更换2~6次透析液。

[0103] 更优选地,步骤S43中,用PBS透析3天,每天更换4次透析液。

[0104] 所述糠酸人工完全抗原用作进行ELISA检测用的包被抗原,也在本发明的保护范围之内。

[0105] 一种糠氨酸抗体,由上述的糠氨酸人工完全抗原制备得到。

[0106] 优选地,上述糠氨酸抗体为:单克隆抗体、多克隆抗体或基因工程抗体。

[0107] 具体的,所述糠氨酸抗体的制备过程如下:

S51. 选取小鼠作为实验动物,将糠氨酸人工完全抗原用PBS稀释,与弗氏佐剂混合乳化,在背部、皮下、颈部注射,进行初次免疫;

S52. 第二次免疫,糠氨酸人工完全抗原用与弗氏不完全佐剂乳化,操作方法与步骤S41相同;

S53. 第三次加强免疫,操作方法与步骤S52相同;

S54. 在第三次免疫7 d后,采集小鼠血液,检测血清效价。

[0108] 优选地,步骤S51中,选用5周龄的Balb/c小鼠作为实验动物,实验前暂养一周。

[0109] 优选地,步骤S51中,所述糠氨酸人工完全抗原用PBS稀释至0.5~2.5 mg/mL。

- [0110] 更优选地，步骤S51中所述糠氨酸人工完全抗原用PBS稀释至1 mg/mL。
- [0111] 优选地，步骤S51中，糠氨酸人工完全抗原与弗氏佐剂混合的体积比为1:1~1.5。
- [0112] 更优选地，步骤S51中，糠氨酸人工完全抗原与弗氏佐剂混合的体积比为1:1。
- [0113] 更优选的，步骤S51中，初次免疫的剂量为100~300 μL/只
更优选的，步骤S51中，初次免疫的剂量为200 μL/只。
- [0114] 优选地，步骤S52中，糠氨酸人工完全抗原与弗氏不完全佐剂混合的体积比为1:1~1.5。
- [0115] 更优选地，步骤S52中，糠氨酸人工完全抗原与弗氏不完全佐剂混合的体积比为1:1。
- [0116] 一种检测糠氨酸的间接竞争酶联免疫方法，所述方法是将上述糠酸人工完全抗原作为包被抗原，将糠氨酸多克隆抗体作为结合抗体。
- [0117] 优选地，所述间接竞争酶联免疫方法，包括如下步骤：
S61. 包被：将上述糠酸人工完全抗原用缓冲液稀释，并做空白对照组，加入孔中进行反应包被，洗板；
S62. 封闭：每孔加封闭液进行封闭，洗板；
S63. 与一抗竞争结合：将PBS和糠氨酸、样品分别加入到孔中，然后将含有糠氨酸多克隆抗体的血清加入到孔内，进行孵育，洗涤；
S64. 与二抗结合：每孔加入PBS稀释的酶标二抗IgG-HRP，进行孵育，洗涤；
S65. 显色：每孔加入显色液显色；
S66. 终止：每孔加入浓硫酸终止反应；
S67. 读数：在450 nm波长下测吸光度值。
- [0118] 优选地，步骤S61中所述包被原糠酸人工完全抗原的浓度为0.1~10 μg/mL。
- [0119] 更优选地，步骤S61中所述包被原糠酸人工完全抗原的浓度为1 μg/mL。
- [0120] 优选地，步骤S63中所述含有糠氨酸多克隆抗体的血清的稀释度为1:1000~128000。
- [0121] 更优选地，步骤S63中所述含有糠氨酸多克隆抗体的血清的稀释度为1:32000。
- [0122] 优选地，步骤S64中所述酶标二抗IgG-HRP的稀释度为1:4000~6000。
- [0123] 更优选地，步骤S64中所述酶标二抗IgG-HRP的稀释度为1:5000。
- [0124] 上述糠氨酸半抗原、糠氨酸人工完全抗原、糠酸人工完全抗原和/或糠氨酸抗体在建立糠氨酸分析检测方法，和/或糠氨酸分析检测试剂盒中的应用也在本发明保护范围之内。上述检测糠氨酸的间接竞争酶联免疫的方法在糠氨酸分析检测中的应用也在本发明保护范围之内。
- [0125] 本发明具有以下有益效果：
本发明对糠氨酸半抗原结构进行分析，设计合成一种新的糠氨酸半抗原，然后将该半抗原与载体蛋白进行偶联，得到糠氨酸人工完全抗原，进而制备其多克隆抗体，并基于抗原抗体特异性识别建立了检测糠氨酸的间接竞争ELISA方法，该方法具有快速、灵敏、准确等优点，特别适用于现场大量样品的快速检测，为乳品中糠氨酸的快速检测开辟了一种新路径，提供了一种新的检测手段。

附图说明

- [0126] 图1为糠氨酸半抗原的质谱鉴定图。
- [0127] 图2为含多克隆抗体的抗血清检测效果图。
- [0128] 图3为间接竞争ELISA法检测糠氨酸的标准曲线图。

具体实施方式

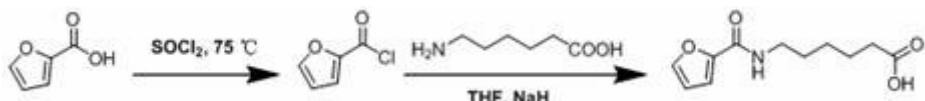
[0129] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明，但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明，本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0130] 除非特别说明，以下实施例所用试剂和材料均为市购。

实施例1 糠氨酸半抗原合成

1、实验步骤

一种糠氨酸半抗原的合成方法，反应式如下，包括以下步骤：



1.1 称取2 g 糠酸，取5 mL 氯化亚砜，15 mL的二氯甲烷加入到50 mL圆底烧瓶中，置于75℃下回流反应6 h，反应完成后用旋转蒸发仪蒸干溶剂，再加入二氯甲烷10 mL，除去未蒸出的氯化亚砜，得到浅黄色油状物；

1.2 将上述浅黄色油状物用30 mL四氢呋喃溶解，得到四氢呋喃-糠酸混合溶液；

1.3 称取NaOH 4.3 g，氨基己酸5.4 g，加水15 mL溶解，得氨基己酸混合溶液；

1.4 在冰浴条件下，将氨基己酸混合溶液滴加到四氢呋喃-糠酸混合溶液中，PH为10~11，反应12 h，用浓HCl调至PH 4~5，将反应后溶剂在55℃减压浓缩蒸干，得粗产物；

1.5 用甲醇溶解粗产物，加入200~300目硅胶粉，拌样，蒸干溶剂，粗产物经柱层析(甲醇：二氯甲烷=1:5)纯化，得糠氨酸半抗原，记为FML-1。

2、实验结果

糠氨酸半抗原的质谱鉴定结果如图1所示。由图可知，制备得到的糠氨酸半抗原。

实施例2 糠氨酸人工完全抗原合成

糠氨酸人工完全抗原是由糠氨酸半抗原通过活泼酯法、混合酸酐法偶联牛血清白蛋白BSA得到，其方法步骤如下：

1、活泼酯法偶联：

1.1 称取糠氨酸半抗原FML-1 11.25 mg (0.05 mmol)、N-羟基丁二酰亚胺(NHS) 5.75 mg (0.05 mmol) 和N,N'-二环己基碳化二亚胺(DCC) 10.32 mg (0.05 mmol) 溶于1 mL无水N,N-二甲基甲酰胺(DMF) 中，室温下搅拌反应12 h，反应液6000 r/min离心10 min，分取上清活化液；

1.2 称取34 mg BSA溶于4 mL碳酸盐缓冲溶液(0.05 mol/L, PH9.6) 中，以0.25滴/秒的速度缓慢滴加400 μL活化液，然后室温下搅拌反应3 h；

1.3 再将步骤S22反应后的液体装入透析袋，用PBS(磷酸盐缓冲液0.01 mol/L), PH 7.4透析，每4 h换液一次透析液，透析后6000 r/min离心10 min，取上清液，-20℃保存。

2、混合酸酐法偶联：

2.1 称取糠氨酸半抗原FML-1 4.05 mg (0.018 mmol) 溶于1 mL无水DMF中,之后加入4.28 μ L (0.018 mmol) 三正丁胺,再添加2.34 μ L (0.018 mmol) 氯甲酸异丁酯,室温下反应1 h;

2.2 称取30 mg BSA溶于2 mL浓度为0.1 mol/L的PBS (pH=7.4) 中,边搅拌边缓慢滴加100 μ L上一步反应液,室温下搅拌反应3 h,再将反应液装入透析袋,用PBS(磷酸盐缓冲液0.01 mol/L),PH 7.4透析,每4 h换液一次透析液,透析后离心,6000 r/min离心10 min,取上清液分装,-20℃保存。

[0135] 实施例3 糠酸人工完全抗原合成

由于免疫原是采用BSA载体蛋白,通常选用异源包被的方式进行icELISA实验,故选择OVA作为包被原以减少非特异性的吸附。糠酸人工完全抗原是由糠酸通过活泼酯法偶联卵清蛋白得到,其方法步骤如下:

活泼酯法偶联:

1. 称取1.12 mg 糠酸 (0.01 mmol) 溶于1 mL DMF中,搅拌加入3.095 mg (0.015 mmol) DCC和1.726 mg (0.015 mmol) NHS,4℃下磁力搅拌反应过夜,离心后取上清液;

2. 称取7.5 mg 卵清蛋白溶于2 mL浓度为0.01 mol/L的PBS (pH=7.4) 中,搅拌溶解制备载体蛋白溶液;

3. 磁力搅拌下,步骤1中上清液逐渐滴入步骤2中载体蛋白溶液中,4℃下反应12 h,离心后,取上清液,4℃下用PBS透析3 d,每天更换4次透析液,得到的人工抗原以1 mg/mL的浓度分装于1 mL离心管中,-20℃保存。

[0136] 实施例4 糠氨酸多克隆抗体的制备

糠氨酸多克隆抗体的制备,其步骤和结果如下:

1、实验步骤

1.1 糠氨酸多克隆抗体的制备

- (1)选取5周龄的Balb/c小鼠作为实验动物,实验前暂养一周。将糠氨酸人工完全抗原用PBS稀释至1 mg/mL,与等量弗氏佐剂混合乳化,初次免疫设定每次免疫剂量为200 μ L/只,在背部、皮下、颈部多点免疫;

- (2)三周后进行第二次免疫,免疫抗原用弗氏不完全佐剂乳化,注射部位和剂量与初次免疫相同;

- (3)两周后进行第三次加强免疫,操作步骤与第二次相同;

- (4)在第三次免疫7 d后,断尾采集小鼠血液,用ELISA检测血清效价。

[0137] 1.2 糠氨酸多克隆抗体的效价测定

抗血清效价的ELISA测定步骤如下:

- (1)将包被原糠氨酸人工完全抗原用碳酸盐缓冲液稀释,100 μ L每孔加入酶标板中,37℃过夜。次日取出酶标版,将板内液体倒掉,洗板2次,每孔加入洗涤液300 μ L,以下洗涤方法相同;

- (2)加封闭液120 μ L/孔,37℃孵育3 h,洗涤5次,置于37℃烘箱干燥1 h;

- (3)将PBS和糠氨酸分别加入到两列酶标孔,50 μ L/孔,然后将稀释好的含有糠氨酸多克隆抗体的血清加入到孔内,50 μ L/孔,37℃孵育40 min后洗涤5次;

- (4)每孔加入100 μ L 1:5000酶标二抗IgG-HRP,37℃孵育30 min后洗涤5次;

(5) 加入100 μL TMB显色液(A液:B液=1:1), 37℃温育10 min, 再加入50 μL 10%浓硫酸终止反应, 用酶标仪在450 nm波长下测吸光OD值, 从而确定抗体效价。

[0138] 2、实验结果

含多克隆抗体的抗血清检测如图2所示。由图可知, 本发明制备的抗体效价在32000~64000之间, 满足实验要求。

[0139] 实施例5 间接竞争ELISA检测样液中糠氨酸

1、实验步骤

利用棋盘滴定法对包被抗原和抗体稀释倍数进行筛选, 选择以糠酸人工完全抗原为包被抗原, 包被原浓度为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 抗血清稀释度为1:32000, 酶标二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG-HRP)稀释度为1:5000。

[0140] 1.1 包被: 以0.01M PH 9.6的碳酸盐缓冲液稀释糠酸人工完全抗原至1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 将稀释后的包被原加入到酶标板中, 每孔100 μL , 置于37℃水浴箱孵育过夜;

1.2 封闭: 洗板2次, 拍干, 加入120 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的封闭液, 置于37℃恒温水浴锅孵育3 h, 拍干, 于37℃干燥箱干燥1 h;

1.3 与一抗竞争结合: 标准孔加入系列浓度的糠氨酸标准溶液50 μL 和按最优稀释倍数稀释的糠氨酸多克隆抗体50 μL , 样品孔加入样品溶液50 μL 和糠氨酸多克隆抗体50 μL , 轰荡混匀, 按最优竞争反应时间在37℃水浴箱中孵育, 倾去孔内液体, 洗板5次, 拍干;

1.4 与二抗结合: 将酶标二抗IgG-HRP用PBS 1:5000稀释, 每孔加入100 μL , 37℃结合30 min, 以洗涤缓冲液PBST洗涤, 拍干;

1.5 显色: 每孔加入100 μL 显色液, 37℃恒温水浴锅水浴10 min;

1.6 终止: 将10%硫酸溶液加入到酶标板中终止反应, 每孔50 μL ;

1.7 读数: 用酶标仪在450 nm波长下测吸光OD值;

1.8 计算: 以标准品浓度对数值为横坐标, 以B/B₀(B₀: 糠氨酸标准溶液浓度为0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 所对应的吸光度值; B: 其它标准浓度所对应的吸光度值)为纵坐标, 绘制标准曲线, 应用Origin软件中的四参数拟合竞争标准曲线, 并计算样液中糠氨酸的含量。

[0141] 2、实验结果

间接竞争ELISA法检测糠氨酸的标准曲线如图3所示。线性可靠, 可作为标准曲线。

[0142] 对比例不同人工抗原对糠氨酸抑制剂的抑制率测定

1、实验步骤

用糠氨酸偶联不同载体蛋白(BSA、KLH或OVA)得到三种不同人工抗原, 即糠氨酸BSA、糠氨酸KLH、糠氨酸OVA 免疫小鼠后, 对其抗血清进行icELISA实验, 对糠氨酸抑制剂的抑制率测定, 实验方法如实施例4。

[0143] 2、实验结果

实验结果表明, 糠氨酸BSA、糠氨酸KLH、糠氨酸OVA三种抗血清对10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 糠氨酸抑制剂的抑制率分别为68.6%、51%、32%, 故选择糠氨酸-BSA作为最佳抗体进行下一步实验。

[0144] 本发明的关键在于糠氨酸半抗原的设计合成以及其ELISA方法的建立。

[0145] 本发明首次制备出糠氨酸多克隆抗体, 并建立了检测糠氨酸的间接竞争ELISA方法, 为实现糠氨酸的快速检测开辟了一种新路径, 提供了一种新思路和一项新技术。

[0146] 上述实施例为本发明较佳的实施方式, 但本发明的实施方式并不受上述实施例的

限制，其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化，均应为等效的置换方式，都包含在本发明的保护范围之内。

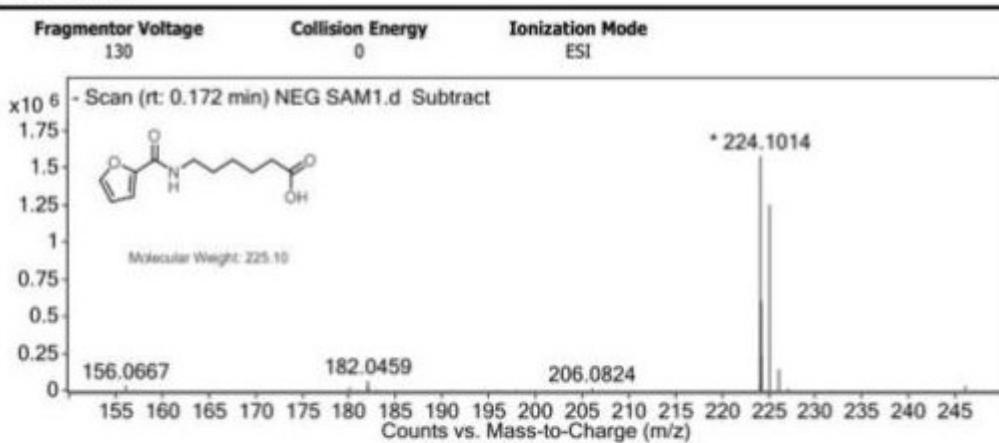
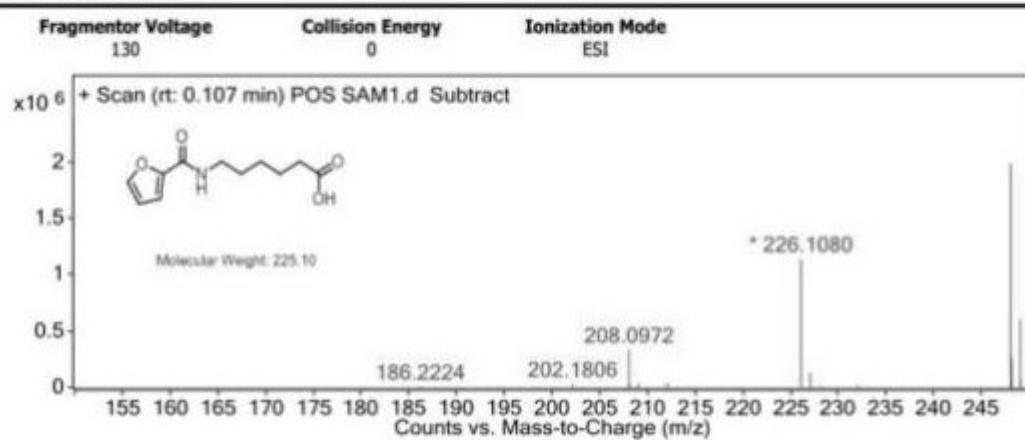
User Spectra**User Spectra**

图1

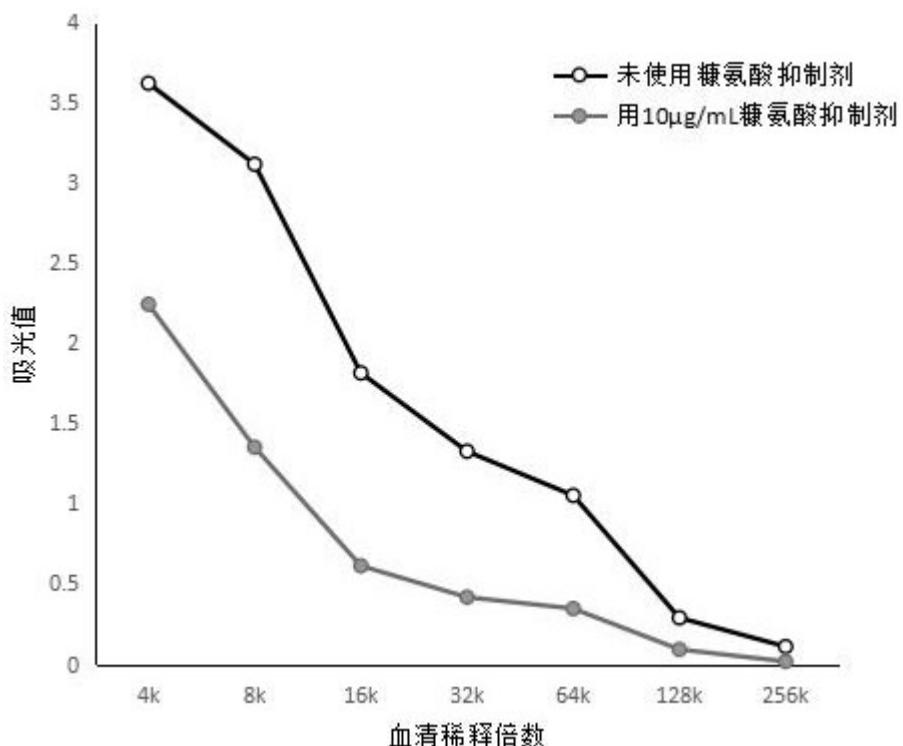


图2

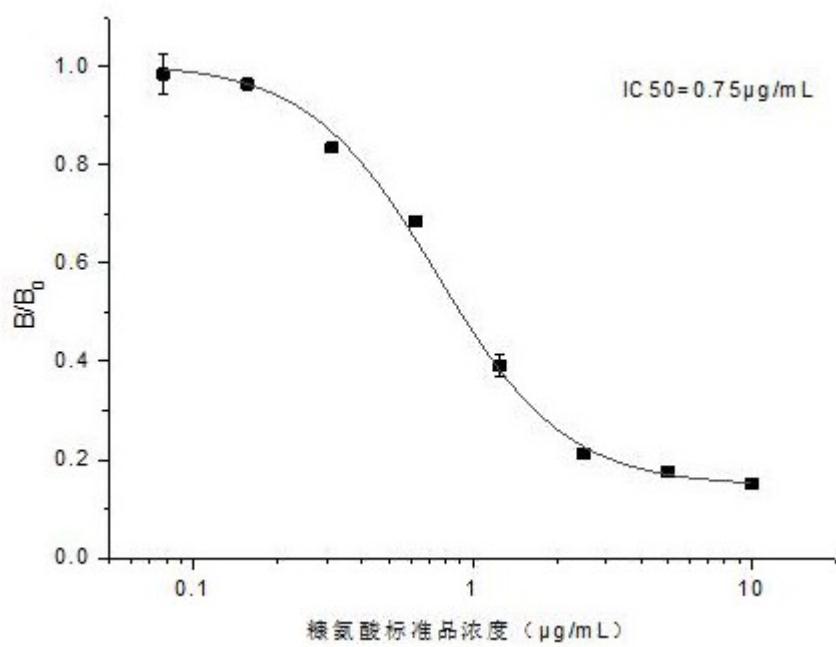


图3

专利名称(译)	一种检测糠氨酸的间接竞争ELISA方法		
公开(公告)号	CN109307761A	公开(公告)日	2019-02-05
申请号	CN201811173795.0	申请日	2018-10-09
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	肖治理 刘谦 徐振林 杨曦 江梦霞 张浩仪 赵颖娴 胡山行		
发明人	肖治理 刘谦 徐振林 杨曦 江梦霞 张浩仪 赵颖娴 胡山行		
IPC分类号	G01N33/549 G01N33/535 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/544 G01N33/535 G01N33/6854		
代理人(译)	任重		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种检测糠氨酸的间接竞争ELISA方法。本发明利用糠酸和氯化亚砜合成糠氨酸半抗原，然后将该半抗原与载体蛋白进行偶联，得到糠氨酸人工完全抗原，进而制备其糠氨酸多克隆抗体，并基于抗原抗体特异性识别建立了检测糠氨酸的间接竞争ELISA方法，该方法是利用糠氨酸多克隆抗体作为结合抗体，糠酸人工完全抗原作为包被原建立的。该方法具有快速、灵敏、准确等优点，特别适用于现场大量样品的快速检测，为乳品中糠氨酸的快速检测开辟了一种新路径，提供了一种新的检测手段。

