

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510035243.X

[51] Int. Cl.

G01N 33/536 (2006.01)

G01N 33/544 (2006.01)

C07K 14/76 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 2 月 1 日

[11] 公开号 CN 1727897A

[22] 申请日 2005.6.20

[21] 申请号 200510035243.X

[71] 申请人 华南农业大学

地址 510640 广东省广州市天河区五山

[72] 发明人 黄晓钰 雷红涛 孙远明 吴青
王弘 湛国莲 高秀杰 陈家贵
肖治理

[74] 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司
代理人 伍宏达

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称

3-氯-1,2-丙二醇人工抗原制备方法

[57] 摘要

本发明涉及 3-氯-1,2-丙二醇人工抗原制备方法。利用 3-氯乳酸为半抗原，以水溶性碳二亚胺盐酸盐为偶联剂，将半抗原 3-氯乳酸与阳离子化载体偶联，制备出 3-氯-1,2-丙二醇的人工抗原。该人工抗原可用于制备 3-氯-1,2-丙二醇的抗体，也可进一步用于建立 3-氯-1,2-丙二醇免疫检测方法。

1、3-氯-1, 2-丙二醇人工抗原制备方法, 采用偶联剂将半抗原偶联于载体, 其特征在于用 3-氯乳酸作为半抗原, 将 3-氯乳酸与阳离子化载体在偶联剂作用下偶联, 制备出 3-氯-1, 2-丙二醇的人工抗原。

2、根据权利要求 1 所述的人工抗原制备方法, 其特征在于偶联所用载体为阳离子化的载体, 该阳离子化载体为阳离子化试剂处理过的蛋白质或其片段或合成多肽或半合成多肽。

3、根据权利要求 1 所述的人工抗原制备方法, 其特征在于载体阳离子化处理所用试剂为乙二胺。

4、根据权利要求 1 所述的人工抗原制备方法, 其特征在于半抗原与阳离子化载体偶联所用偶联剂为水溶性碳二亚胺盐酸盐。

3-氯-1, 2-丙二醇人工抗原制备方法

技术领域

本发明涉及一种人工抗原的制备,尤其是3-氯-1, 2-丙二醇的人工抗原制备。

背景技术

3-氯-1, 2-丙二醇,英文缩写为3-MCPD,通常被称为三氯丙醇,是丙三醇被氯原子取代1个羟基形成的产物,是近年来备受关注的氯丙醇类有机污染物的一种。3-氯-1, 2-丙二醇主要来源于酸水解植物蛋白质(HVP),HVP水解液常作为风味剂被添加在酱油中,另外某些风味快餐、固体汤料、焙烤粮食、黑麦和黑麦提取物、发酵类香肠、袋泡茶包装袋、净化饮用水的含氯凝聚剂、以3-氯-1, 2-环氧丙烷加工的变性淀粉等也经常出现3-氯-1, 2-丙二醇,家庭烹调和有些食品的加工贮藏过程中有时也有氯丙醇出现。许多研究表明,3-氯-1, 2-丙二醇会引起癌症、影响肾脏及生育,引起贫血、白细胞减少、血小板减少,降低男性生育力,使雄性的肾脏及睾丸、乳腺、包皮腺癌变几率增加。因此,很有必要加强3-氯-1, 2-丙二醇的检测。

3-氯-1, 2-丙二醇检测一直以来主要是色质联用法,目前国际上最先进的检测方法是稳定性同位素稀释质谱技术,尽管这种方法准确灵敏,检测限低,但其前处理繁琐,操作复杂,检测时间长,设备昂贵,检测费用高,只能实验室操作,有一定的局限性,因此,人们迫切希望有一种简单、快速、灵敏、廉价的检测技术能对3-氯-1, 2-丙二醇进行大量样品快速检测。免疫分析恰好具备这样的优点,其特异性强、灵敏度高、对仪器设备要求不高、操作简单、检测容量大、成本低、易普及推广,世界粮农组织已向多个国家推荐此项技术,美国化学学会将免疫分析技术、色谱分析技术共同列为化学污染物的主要分析技术。

要建立免疫分析方法,抗原、抗体是最关键两种试剂。对于小分子半抗原物质,因为分子量太小,结构太简单,不具有免疫原性,必须将其与大分子物质偶联制备成人工完全抗原,才能用于免疫动物制备抗体。因此,精心设计

半抗原结构, 选择合适的方法将半抗原偶联于大分子载体, 获取良好的人工抗原, 就成为建立半抗原免疫检测的前提和关键。只有制备出高质量的人工抗原, 才可能进一步制备检测所需抗体。目前, 国内外有关化学污染物免疫分析的研究已涉及到农药、兽药、生物毒素等对象, 但针对 3-氯-1, 2-丙二醇的免疫检测研究尚未见任何报道。

发 明 内 容

本发明用 3-氯乳酸作为半抗原, 将 3-氯乳酸与阳离子化载体在偶联剂作用下偶联, 制备出 3-氯-1, 2-丙二醇的人工抗原。其中偶联所用载体为阳离子化的载体, 该阳离子化载体可为阳离子化试剂处理过的蛋白质或其片段或合成多肽或半合成多肽, 优选的是阳离子化试剂处理过的牛血清白蛋白; 载体阳离子化处理所用试剂为乙二胺; 半抗原与阳离子化载体偶联所用偶联剂为水溶性碳二亚胺盐酸盐。

具体实施方式:

- (1) 配置乙二胺溶液: 配置 10% (v/v) 的乙二胺溶液 1mL, 用 6mol/L 的盐酸调整 pH 至 6.0。
- (2) 乙二胺活化载体: 给乙二胺溶液中加入 3mL 6.1mg/mL 蛋白或多肽或合成多肽或半合成多肽水溶液, 如牛血清白蛋白、L-多聚赖氨酸水溶液等, 再加入 0.8mg 水溶性碳二亚胺盐酸盐, 室温反应 15min。
- (3) 脱盐: 用 0.15mol/L NaCl 溶液平衡 Sephadex G-25 柱后, 将乙二胺活化的载体蛋白溶液上柱, 紫外监测 280nm 吸收情况, 收集第一峰组分。
- (4) 浓缩: 将收集液用透析袋浓缩至 2mL, 将浓缩液转移至一小烧杯。
- (5) 偶联: 给浓缩液中加入 3mmol 3-氯乳酸半抗原, 立即加入 100 μ L 0.1mol/L, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS), 再加入 0.8mg 水溶性碳二亚胺盐酸盐, 室温搅拌反应 2 小时。
- (6) 透析: 反应液用 PBS (0.1mol/L, pH 7.8) 透析 48 小时, 分装。
- (7) 紫外扫描鉴定: 可见偶联物在 240-280nm 间的吸收曲线为一肩峰吸收带, 明显不同于阳离子化牛血清白蛋白吸收特征, 表明偶联成功。

用这种方法制备的人工抗原免疫 Balb/c 小鼠,经过间接竞争 ELISA 鉴定,表明针对 3-氯-1, 2-丙二醇的抗体产生,进一步表明人工抗原制备成功。

本方法使用 3-氯乳酸作为半抗原,最大程度保留了 3-氯-1, 2-丙二醇的结构,有利于提高抗体的特异性;采用乙二胺活化载体蛋白,使得载体蛋白表面带大量正电荷,有利于半抗原 3-氯乳酸的羧基与蛋白表面大量带正电荷的氨基偶联;另外,乙二胺可以充当手臂,使得半抗原离蛋白较远,避免了蛋白对半抗原的掩蔽效应。因此,制备出的 3-氯-1, 2-丙二醇人工抗原免疫原性较好,可用于制备抗体,用于建立免疫检测方法。这对于保障食品安全,提高食品残留物分析水平都具有非常重要的意义。

实 施 例

3-氯-1, 2-丙二醇人工抗原制备:

- (1) 为了达到上述目的,本发明采取下列措施:配置乙二胺溶液:配置 10% (v/v) 的乙二胺溶液 1mL,用 6mol/L 的盐酸调整 pH 至 6.0。
- (2) 乙二胺活化载体:给乙二胺溶液中加入 3mL 6.1mg/mL 牛血清白蛋白或多肽或合成多肽或半合成多肽水溶液,再加入 0.8mg 水溶性碳二亚胺盐酸盐,室温反应 15min。
- (3) 脱盐:用 0.15mol/L NaCl 溶液平衡 Sephadex G-25 柱后,将乙二胺活化的载体蛋白溶液上柱,紫外监测 280nm 吸收情况,收集第一峰组分。
- (4) 浓缩:将收集液用透析袋浓缩至 2mL,将浓缩液转移至一小烧杯。
- (5) 偶联:给浓缩液中加入 3mmol 3-氯乳酸半抗原,立即加入 100 μ L 0.1mol/L, pH 7.4 的 PBS,再加入 0.8mg 水溶性碳二亚胺盐酸盐,室温搅拌反应 2 小时。
- (6) 透析:反应液用 PBS (0.1mol/L, pH 7.8) 透析 48 小时,分装。

3-氯-1, 2-丙二醇人工抗原紫外光谱鉴定:

对透析后的偶联产物采用紫外扫描鉴定,可见偶联物在 240-280nm 间的吸收曲线为一强吸收带,明显不同于阳离子化牛血清白蛋白吸收特征,表明 3-氯乳酸与牛血清白蛋白发生反应,表明偶联成功。

3-氯-1, 2-丙二醇人工抗原动物免疫效果鉴定:

取健康 5 周龄雌性二级 Balb/c 小鼠 2 只进行免疫。第一次基础免疫将 0.3 mL 2mg/mL 的 3-氯-1, 2-丙二醇人工抗原与等量完全弗氏佐剂用搅拌器充分混匀乳化, 进行腹腔注射, 注射量 0.2 mL/只。3 周后进行加强免疫, 佐剂换为不完全弗氏佐剂, 每隔两周加强免疫一次。第三次加强免疫后, 尾静脉采血, 分离血清。以卵清白蛋白与 3-氯乳酸的偶联物为包被抗原, 包被抗原制备方法同于牛血清白蛋白与 3-氯乳酸的偶联方法, 倍比稀释血清, 一行每孔都加入 50uL 300mg/mL 的 3-氯-1, 2-丙二醇, 另一行每孔都加入 50uL 空白稀释液 PBST, 采用间接竞争 ELISA 鉴定血清特异性, 结果如下, 每个 OD 为三次重复测定平均值:

孔 号	1	2	3	4	5	6	7
血清稀释倍数 ($\times 10^3$)	2	4	8	16	32	64	阴性对照 OD
含 3-氯-1, 2-丙二醇孔 OD	1.647	0.558	0.168	0.000	0.000	0.000	0.016
不含 3-氯-1, 2-丙二醇孔 OD	2.582	1.964	1.266	0.547	0.165	0.089	

从以上表格数据可以看出, 相同反应条件下, 含有 3-氯-1, 2-丙二醇的孔的 OD 明显低于不含 3-氯-1, 2-丙二醇的孔的 OD, 表明 3-氯-1, 2-丙二醇可以与血清反应, 即说明抗 3-氯-1, 2-丙二醇的抗体产生, 进一步证明 3-氯-1, 2-丙二醇人工抗原合成成功。

专利名称(译)	3 - 氯 - 1 , 2 - 丙二醇人工抗原制备方法		
公开(公告)号	CN1727897A	公开(公告)日	2006-02-01
申请号	CN200510035243.X	申请日	2005-06-20
[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	黄晓钰 雷红涛 孙远明 吴青 王弘 谌国莲 高秀杰 陈家贵 肖治理		
发明人	黄晓钰 雷红涛 孙远明 吴青 王弘 谌国莲 高秀杰 陈家贵 肖治理		
IPC分类号	G01N33/536 G01N33/544 C07K14/76		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及3 - 氯 - 1 , 2 - 丙二醇人工抗原制备方法。利用3 - 氯乳酸为半抗原, 以水溶性碳二亚胺盐酸盐为偶联剂, 将半抗原3 - 氯乳酸与阳离子化载体偶联, 制备出3 - 氯 - 1 , 2 - 丙二醇的人工抗原。该人工抗原可用于制备3 - 氯 - 1 , 2 - 丙二醇的抗体, 也可进一步用于建立3 - 氯 - 1 , 2 - 丙二醇免疫检测方法。

孔 号	1	2	3	4	5	6	7
血清稀释倍数 ($\times 10^3$)	2	4	8	16	32	64	阴性对照 OD
含 3-氯-1, 2-丙二醇孔 OD	1.647	0.558	0.168	0.000	0.000	0.000	0.016
不含 3-氯-1, 2-丙二醇孔 OD	2.582	1.964	1.266	0.547	0.165	0.089	