

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102051389 B

(45) 授权公告日 2013.04.03

(21) 申请号 201010536029.3

(22) 申请日 2010.11.09

(73) 专利权人 北京科美生物技术有限公司

地址 100094 北京市海淀区永丰基地丰贤中路7号北科技园

(72) 发明人 胡国茂 唐宝军 柴淑芳

(51) Int. Cl.

C12P 7/62(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101413955 A, 2009.04.22,

WO 2009080701 A1, 2009.07.02,

Shi-Hua Wang et al. Zearalenone (ZEN)

detection by a single chain fragment variable (scFv) antibody.《World J Microbiol Biotechnol》. 2008, 第24卷 1681-1685.

审查员 冯晓亮

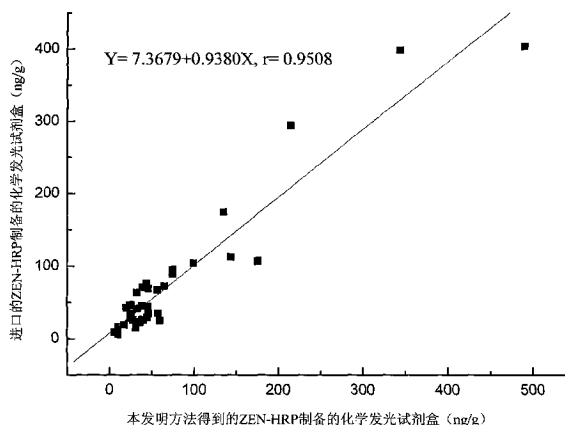
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

辣根过氧化物酶标记玉米赤霉烯酮的合成工艺

(57) 摘要

本发明公开了一种辣根过氧化物酶标记玉米赤霉烯酮的合成工艺,所述合成工艺是通过羧基化玉米赤霉烯酮得到羧基化产物后,再与辣根过氧化物酶进行缩合反应得到所述辣根过氧化物酶标记的玉米赤霉烯酮。因化学发光免疫分析领域中检测玉米赤霉烯酮试剂盒的关键组分辣根过氧化物酶标记物的制备工艺一直是一个难以攻克的难题,因此本发明提供的简单易行、成本低廉的辣根过氧化物酶标记物合成工艺有很好的市场应用前景。



1. 一种辣根过氧化物酶标记玉米赤霉烯酮的合成工艺,其特征在于,所述工艺为(1)羧基化:玉米赤霉烯酮与盐酸羧甲基羟胺在极性有机溶剂中进行反应,终止反应后分别用苯、乙酸乙酯进行萃取,得到羧基化的玉米赤霉烯酮;(2)缩合反应:羧基化的玉米赤霉烯酮与琥珀酰亚胺、碳二亚胺在二甲基甲酰胺或乙醇中进行反应,之后将其滴加到辣根过氧化物酶的碱性溶液中反应,得到辣根过氧化物酶标记的玉米赤霉烯酮。

2. 根据权利要求1所述的合成工艺,其特征在于,所述极性有机溶剂为吡啶、二甲基亚砷。

3. 根据权利要求2所述的合成工艺,其特征在于,所述盐酸羧甲基羟胺是过量的;所述极性有机溶剂的用量为每毫克玉米赤霉烯酮用0.4-0.6毫升。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的合成工艺,其特征在于,所述工艺(1)羧基化的具体过程为:将玉米赤霉烯酮和盐酸羧甲基羟胺溶于吡啶中,其中每毫克玉米赤霉烯酮用0.5毫升吡啶,室温搅拌过夜,然后加入等反应体积的蒸馏水,调pH至8-9,振荡使溶液澄清,用苯提取后,调水层pH至酸性用乙酸乙酯萃取,干燥后得到羧基化的玉米赤霉烯酮。

5. 根据权利要求1所述的合成工艺,其特征在于,所述羧基化的玉米赤霉烯酮与辣根过氧化物酶的反应摩尔比为1.5-3:1。

6. 根据权利要求1-3及5中任一项所述的合成工艺,其特征在于,所述工艺(2)缩合反应的具体过程为:将羧基化的玉米赤霉烯酮、琥珀酰亚胺以及碳二亚胺,溶于二甲基甲酰胺中,室温搅拌反应1h,将反应后的液体缓慢滴加到辣根过氧化物酶的NaHCO₃溶液中,其中羧基化产物与辣根过氧化物酶的反应摩尔比为2:1,室温搅拌,透析过夜,得到辣根过氧化物酶标记的玉米赤霉烯酮。

辣根过氧化物酶标记玉米赤霉烯酮的合成工艺

技术领域

[0001] 本发明涉及酶标试剂的合成工艺领域,更具体地说,涉及一种辣根过氧化物酶标记玉米赤霉烯酮的合成工艺。

背景技术

[0002] 玉米赤霉烯酮 (zearalenone, ZEN) 又称 F2 毒素,是由镰刀菌产生的一种具有类雌激素作用的真菌二次代谢产物,属于 2,4-二羟基苯甲酸内酯类化合物。化学名为 6-(10-羟基-6-氧基-十一-碳烯基) β -雷锁酸内酯,广泛存在于霉变的玉米、高粱、小麦等谷类作物和奶中。

[0003] 玉米赤霉烯酮具有很强的雌性激素作用,如果摄入被玉米赤霉烯酮污染的饲料可引起猪、大鼠、小鼠、家禽等动物的雌激素过多症和严重的生殖道症状和不孕症。同时玉米赤霉烯酮被证明还具有还具有免疫毒性、基因毒性、细胞毒性等,而且人们怀疑玉米赤霉烯酮的雌激素作用导致儿童中产生早期青春综合症的原因。因玉米赤霉烯酮具有热稳定性(在 100-125 $^{\circ}$ C 还可保持稳定)且不溶于水,玉米赤霉烯酮的食源性危害受到越来越多的关注。到 2003 年,全世界已有 19 个国家制订了食品中玉米赤霉烯酮的限量标准,而且欧盟于 2005 年制定了食品中玉米赤霉烯酮统一限量标。欧盟中规定未加工谷物,玉米加工品中玉米赤霉烯酮含量必须低于 100 μ g/kg,而婴幼儿食品中的含量不得超过 20 μ g/kg,其它食品中限量在 50-400 μ g/kg 之间。每天人体摄入玉米赤霉烯酮量不得超过 0.05 μ g/kg。我国尚未建立食品中玉米赤霉烯酮的国家标准检测方法,迄今为止也没有开展过全国性的粮食中玉米赤霉烯酮污染状况调查,对消费者健康造成威胁,因此为保护消费者健康及我国的粮食贸易,迫切需要建立测定一种灵敏的检测玉米赤霉烯酮的方法。

[0004] 现今检测玉米赤霉烯酮常用的方法有:酶联免疫吸附法(ELISA)、薄层色谱法、免疫亲和柱-HPLC 法、质谱技术、气相色谱、毛细管电泳以及其它基于抗体抗原免疫反应的方法。

[0005] 但这几种检测方法均存在一些缺陷,而近年发展迅速的化学发光免疫分析法结合了免疫反应的高特异性和化学发光反应的高灵敏性,仪器简单,成本低廉得到了越来越多的关注。但目前国内各检测中心均采用的是国外昂贵的进口试剂盒及相应检测系统,其中辣根过氧化物酶标记的玉米赤霉烯酮(ZEN-HRP)组分是该化学发光免疫分析试剂盒的关键组分。但因辣根过氧化物酶标记玉米赤霉烯酮的制备技术一直为该试剂盒厂家作为技术秘密保护,现国内外还未见有相关报道。

发明内容

[0006] 为了弥补化学发光免疫分析领域中检测玉米赤霉烯酮试剂盒的关键组分辣根过氧化物酶标记物还未有公开制备工艺的不足,本发明提供了一种简便易行、成本低廉的辣根过氧化物酶(HRP)标记玉米赤霉烯酮的合成工艺。

[0007] 本发明提供了一种辣根过氧化物酶标记玉米赤霉烯酮的合成工艺,其中,所述工

艺是通过羧基化玉米赤霉烯酮得到羧基化产物后,再与辣根过氧化物酶进行缩合反应得到所述辣根过氧化物酶标记的玉米赤霉烯酮。

[0008] 优选地,所述羧基化玉米赤霉烯酮为玉米赤霉烯酮与盐酸羧甲基羟胺在极性有机溶剂中进行反应。

[0009] 优选地,所述极性有机溶剂为吡啶、二甲基亚砷。

[0010] 优选地,所述反应中盐酸羧甲基羟胺是过量的;所述极性有机溶剂的用量为每毫克玉米赤霉烯酮用 0.4 ~ 0.6 毫升。

[0011] 优选地,所述羧基化玉米赤霉烯酮得到羧基化产物还包括在玉米赤霉烯酮与盐酸羧甲基羟胺反应后,终止反应并分别用苯、乙酸乙酯进行萃取的步骤。

[0012] 优选地,所述羧基化玉米赤霉烯酮得到羧基化产物的具体过程为:将玉米赤霉烯酮和盐酸羧甲基羟胺溶于吡啶中,其中每毫克玉米赤霉烯酮用 0.5 毫升吡啶,室温搅拌过夜,然后加入等反应体积的蒸馏水,调 pH 至 8 ~ 9,振荡使溶液澄清,用苯提取后,调水层 pH 至酸性用乙酸乙酯萃取,干燥得到羧基化产物即羧基化的玉米赤霉烯酮。

[0013] 在得到羧基化产物即羧基化的玉米赤霉烯酮后,可用常规的薄板层析法进行纯化鉴定。

[0014] 优选地,所述缩合反应为羧基化产物与琥珀酰亚胺、碳二亚胺反应后,将其滴加到辣根过氧化物酶的碱性溶液中反应。本步反应中因使用了琥珀酰亚胺,将常规的一步缩合反应改进为两步,碳二亚胺通过琥珀酰亚胺与羧基化产物相结合后,再与辣根过氧化物酶反应,有效避免了在一步反应中酶之间的交联反应,从而有效提高了辣根过氧化物酶标记的有效性。

[0015] 优选地,所述缩合反应在二甲基甲酰胺(DMF)或乙醇中进行。该反应环境也可选择其他同时对水和有机溶剂均有亲和力的极性有机溶剂。

[0016] 优选地,所述羧基化产物与辣根过氧化物酶的反应摩尔比为 1.5 ~ 3 : 1。

[0017] 优选地,所述缩合反应的具体过程为:将羧基化产物、琥珀酰亚胺以及碳二亚胺,溶于二甲基甲酰胺中,室温搅拌反应 1h,将反应后的液体缓慢滴加到辣根过氧化物酶的 NaHCO₃ 溶液中,其中羧基化产物与辣根过氧化物酶的反应摩尔比为 2 : 1,室温搅拌,透析过夜,得产物辣根过氧化物酶标记玉米赤霉烯酮。

[0018] 本发明提供的辣根过氧化物酶标记玉米赤霉烯酮的合成工艺,具有以下有益效果:

[0019] 1、解决了化学发光免疫分析领域中检测玉米赤霉烯酮试剂盒的关键组分辣根过氧化物酶标记物现还未有公开制备工艺的问题:因玉米赤霉烯酮的化学结构中缺少如胺基或羧基等反应基,要将其连接到蛋白质上,必须通过化学方法,对其结构进行修饰,引入一个活性基团,本发明合成工艺对玉米赤霉烯酮的化学结构进行了改进,在其分子中引入了一可与蛋白质相结合的羧基,从而有效解决了该难题;

[0020] 2、本发明辣根过氧化物酶标记玉米赤霉烯酮的合成工艺合成的酶标记物效率较高:在该合成工艺进行酶标记反应步骤(即缩合反应)时,因使用了琥珀酰亚胺,将常规的一步缩合反应改进为两步,碳二亚胺通过琥珀酰亚胺与羧基化产物相结合后,再与辣根过氧化物酶反应,有效避免了在一步反应中酶自身间的交联反应,酶活性增高,从而有效提高了辣根过氧化物酶标记的有效性。

附图说明

[0021] 图 1 是实施例 3 合成的辣根过氧化物酶标记的玉米赤霉烯酮与 Beacom 公司购买的辣根过氧化物酶标记的玉米赤霉烯酮分别应用于玉米赤霉烯酮化学发光免疫分析试剂盒中的检测结果比较图。

具体实施方式

[0022] 以下所举实施例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的保护范围。

[0023] 下述为本发明涉及到的试剂及其来源:

[0024] 玉米赤霉烯酮 (ZEN)、辣根过氧化物酶 (HRP)、N, N- 二甲基甲酰胺 (DMF) 均购自 Sigma-Aldrich 公司 (圣路易斯,美国);

[0025] 盐酸羧甲基羟胺 (CMO) 购自 Aldrich 公司 (密尔沃基,威斯康星州,美国)。

[0026] N- 琥珀酰亚胺 (NHS) 及碳二亚胺 (EDC) 则购自 pierce 公司 (罗克福德,美国)。

[0027] 实施例 1 辣根过氧化物酶标记玉米赤霉烯酮的制备

[0028] 称取 0.5mg ZEN 和 4.0mg 盐酸羧甲基羟胺,溶于 0.2ml 吡啶,室温下搅拌 24h。反应溶液中加入 0.2ml 蒸馏水,用 0.2M NaOH 调节 pH 至 8.5,振荡使溶液澄清。用苯 (0.2ml) 提取 3 次,水层用 2M HCl 调节 pH 至 3,用乙酸乙酯 (0.5ml) 萃取 3 次,真空抽干,得到的羧基化产物为羧基化的玉米赤霉烯酮。

[0029] 称取 0.2mg 羧基化的玉米赤霉烯酮,0.4mg 琥珀酰亚胺以及 1mg 碳二亚胺,溶于 0.7ml DMF,室温下搅拌反应 1h。将此反应液缓慢滴加到含 13.6mg HRP 的 0.1M NaHCO₃ 溶液中,室温下搅拌 2h。用 0.02M PBS 透析过夜,所得产物 (ZEN-HRP) 用等体积甘油保护,-20℃ 以下保存。

[0030] 实施例 2 辣根过氧化物酶标记玉米赤霉烯酮的制备

[0031] 称取 0.5mg ZEN 和 4.3mg 盐酸羧甲基羟胺,溶于 0.3ml 二甲基亚砜,室温下搅拌 24h。反应溶液中加入 0.3ml 蒸馏水,用 0.2M NaOH 调节 pH 至 9,振荡使溶液澄清。用苯 (0.3ml) 提取 3 次,水层用 2M HCl 调节 pH 至 4,用乙酸乙酯 (0.6ml) 萃取 3 次,真空抽干,得到的羧基化产物为羧基化的玉米赤霉烯酮。

[0032] 称取 0.2mg 羧基化的玉米赤霉烯酮,0.4mg 琥珀酰亚胺以及 1mg 碳二亚胺,溶于 0.7ml 乙醇,室温下搅拌反应 1h。将此反应液缓慢滴加到含 6.8mg HRP 的 0.1M NaHCO₃ 溶液中,室温下搅拌 2h。用 0.02M PBS 透析过夜,所得产物 (ZEN-HRP) 用等体积甘油保护,-20℃ 以下保存。

[0033] 实施例 3 辣根过氧化物酶标记玉米赤霉烯酮的制备

[0034] 称取 0.4mg ZEN 和 3.2mg 盐酸羧甲基羟胺,溶于 0.2ml 吡啶,室温下搅拌 24h。反应溶液中加入 0.2ml 蒸馏水,用 0.2M NaOH 调节 pH 至 8,振荡使溶液澄清。用苯 (0.2ml) 提取 3 次,水层用 2M HCl 调节 pH 至 3,用乙酸乙酯 (0.5ml) 萃取 3 次,真空抽干,得到的羧基化产物为羧基化的玉米赤霉烯酮。

[0035] 称取 0.2mg 羧基化的玉米赤霉烯酮,0.4mg 琥珀酰亚胺以及 1mg 碳二亚胺,溶于 0.7ml DMF,室温下搅拌反应 1h。将此反应液缓慢滴加到含 10.2mg HRP 的 0.1M NaHCO₃ 溶液中,室温下搅拌 2h。用 0.02M PBS 透析过夜,所得产物 (ZEN-HRP) 用等体积甘油保护,-20℃

以下保存。

[0036] 实施例 4 辣根过氧化物酶标记的玉米赤霉烯酮的应用实验 -

[0037] 将实施例 3 制备得到的辣根过氧化物酶标记的玉米赤霉烯酮 (ZEN-HRP) 与从 Beacom 公司购买的 ZEN-HRP 应用于检测 ZEN 的化学发光免疫分析试剂盒进行对比实验, 结果如下:

[0038] 1、对所制备的两种试剂盒进行了方法学鉴定, 结果如下:

[0039] 表 1 试剂盒的技术指标检测对比结果

[0040]

检验项目	检验标准	进口产品试剂盒 检验结果	本发明检验结果
准确性	平均回收率在 90.0~ 110.0%	109.45%	105.15%
精密性 CV (%)	≤15%(n=10)	13.5%	5.0%
灵敏度	≤0.5ng/mL	0.32 ng/mL	0.08ng/mL
稳定性	各试剂组分置 37℃ 至少 7 天	符合检验标准	符合检验标准

[0041] 2、用所制备的两种试剂盒分别检测不同样品中 ZEN 的含量, 结果如下:

[0042] 共检测谷物样品数 40 例, 其中玉米面 15 例, 绿豆面 7 例, 黄豆面 9 例, 小米面 4 例, 面粉 5 例, 检测结果如下:

[0043]

试剂盒类型 样品序号	使用本发明方法得到的 ZEN-HRP 制备的化学发光试剂 盒 (ng/g)	进口的 ZEN-HRP 制备的化学发 光试剂盒 (ng/g)
1	6.25	9.25
2	10.0	6.25
3	10.3	16.5
4	24.3	29.3
5	36.0	22.3
6	17.3	19.4
7	24.5	34.3
8	45.3	44.5
9	38.5	45.3
10	27.5	26.3
11	25.8	46.5
12	25.0	30.8
13	31.3	41.5
14	25.6	33.0
15	39.5	26.3
16	20.0	42.8
17	32.5	63.5
18	31.3	15.5
19	45.5	34.5
20	44.3	29.3
21	45.5	69.5
22	64.3	72.5
23	36.0	23.3
24	38.0	25.5
25	59.3	25.5
26	39.4	71.0
27	57.3	35.3
28	35.3	22.0
29	24.3	46.5
30	56.3	67.5
31	74.5	95.5
32	43.5	76.5
33	74.3	89.0
34	99.3	104.3
35	143.3	112.5
36	134.8	174.3
37	175.8	107.3
38	214.5	294.5
39	343.5	398.5
40	489.5	403.8

[0044] 以两种方法的测值做线性比对,具体比较结果见附图 1。附图 1 以使用本发明方法得到的 ZEN-HRP 制备的化学发光试剂盒测值为横坐标,进口的 ZEN-HRP 制备的化学发光试剂盒测值为纵坐标,得到线性方程为: $Y = 0.9380X + 7.3679$, $r = 0.9508$,表明相关性良好。

[0045] 由上可知,本发明方法得到的 ZEN-HRP 与进口的 ZEN-HRP 分别应用于检测 ZEN 的化学发光免疫分析试剂盒中,所制备的试剂盒在技术指标与样品检测结果都十分接近,都达到了良好的效果。

[0046] 本发明辣根过氧化物酶标记 ZEN 的合成工艺简便易行,成本低廉,且制备得到的

ZEN-HRP 达到了与进口产品相近的效果,故本发明的合成工艺有很好的市场应用前景。

[0047] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

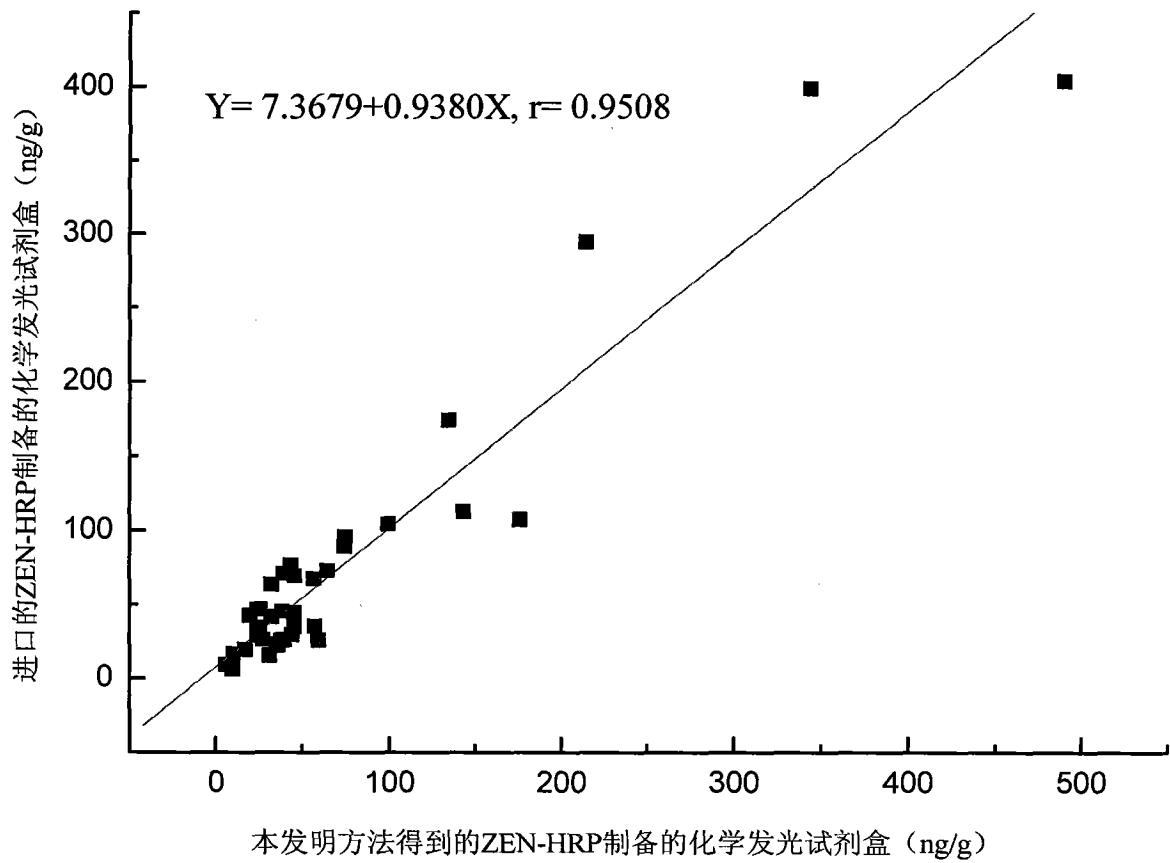


图 1