



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102901811 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 13

(21) 申请号 201210401857. 5

审查员 周露露

(22) 申请日 2012. 10. 20

(73) 专利权人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800 号江南大学食品学院

(72) 发明人 匡华 陈秀金 郭金英 刘丽强
胥传来 王利兵

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
(普通合伙) 32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

G06F 17/50 (2006. 01)

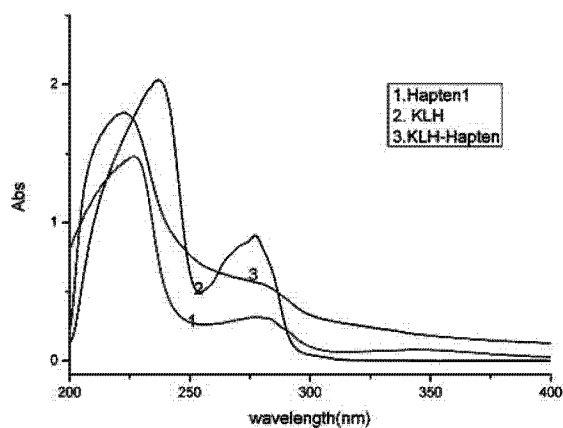
权利要求书1页 说明书5页 附图11页

(54) 发明名称

一种基于计算机分子模拟技术的拟除虫菊酯类的半抗原设计和应用

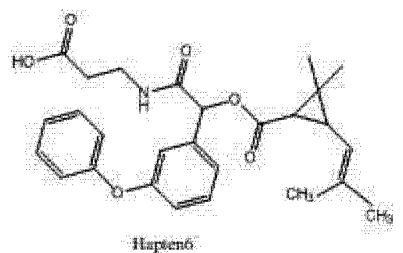
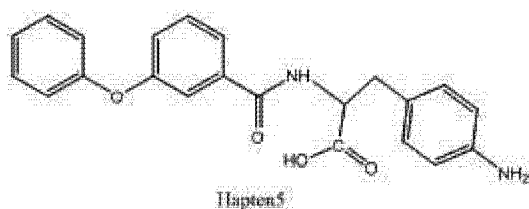
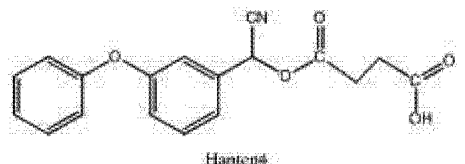
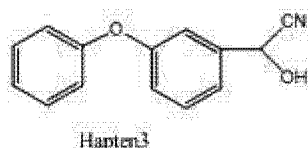
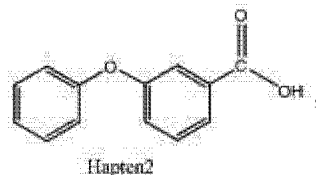
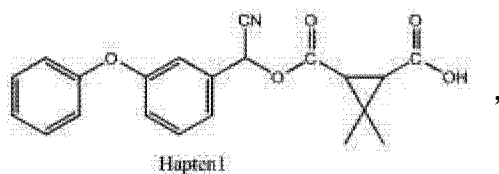
(57) 摘要

一种基于计算机分子模拟技术的拟除虫菊酯类的半抗原设计和应用,属于拟除虫菊酯类农药的检测技术领域。本发明设计了6种可能的半抗原。利用 Gaussian 软件计算半抗原和目标物的电荷分布;利用 DiscoveryStudio2.5 软件构建半抗原和目标物空间构象,通过比较,选择结构相似程度最高的半抗原为免疫半抗原(hapten1);预测该半抗原能产生良好的免疫效果。选择结构差异较大的为包被半抗原(hapten5)。本方法成功地运用计算机分子模拟软件对拟除虫菊酯类农药半抗原进行了设计,通过合成免疫原和免疫,血清筛选,融合,筛选和亚克,实现识别拟除虫菊酯类农药群选择性抗体的制备,证明该法具有节约时间和资金,很强的预测能力,为以后免疫学的分析研究提供了一种新方法。



1. 一种 II 型拟除虫菊酯农药通用半抗原的设计方法,其特征在于根据拟除虫菊酯类农药的分子结构,设计了 6 种半抗原:

半抗原结构式:



(1) 计算每个半抗原分子中原子的电荷性质及每个半抗原分子的空间结构,将半抗原分子和目标分子的总电荷性质,空间结构进行比较,选出免疫半抗原和包被半抗原;

(a) 利用 Gaussian 软件计算每个半抗原分子的电荷性质和带电量;

(b) 利用 Discovery Studio 2.5 构建各个半抗原和拟除虫菊酯类农药的三维分子,打开 Discovery Studio 2.5,从 View 菜单下,打开 Toolbars,选择 Sketching;打开一个分子显示窗口 Molecule Window, File>new>Molecule Window;然后在此窗口构建化合物的 3D 空间构象;

(c) 将半抗原和目标分子的总电荷性质,空间构象进行比较,选择与目标分子的空间构象和电荷分布最接近的半抗原,最有可能产生免疫效果的 Hapten1 为免疫半抗原;二者差异比较大的 Hapten5 被选为包被半抗原;

(2) 免疫原制备:以血蓝蛋白 KLH 为载体蛋白,采用 EDC 法合成免疫原:称取 0.05mmol 的 Hapten1,再加入 DMF 1.0mL,溶解得到 A 液;称取 0.1mmol 的 EDC 和 0.12mmol 的 NHS 加到 A 液中,室温反应 12h,得到 B 液;量取 5.0mg/mL 的血蓝蛋白 KLH 16mL,冰浴中反应 6h, 4℃透析 72h,换透析液 6-8 次,鉴定,分装, -20℃冻存,备用;

(3) 包被原制备:以牛血清白蛋白 BSA 为载体蛋白,采用重氮化法合成包被原:称取 0.02mmol 的 Hapten5,滴入几点乙醇溶解,溶于 1mol/L、0.6mL 盐酸中,得到 A' 液;在冰浴搅拌下,加入 0.2mol/L、0.15mL 的 NaNO₃ 溶液中反应 1h,称取牛血清白蛋白 BSA 27mg,溶于 pH 9.6、5mL 碳酸盐缓冲溶液中,为 B' 液;然后在冰浴搅拌下,将 A' 液逐滴加到 B' 液中,滴加完毕,反应 3h;4℃透析 72h,其间换透析液 6-8 次,鉴定,分装, -20℃冻存,备用;

(4) 单克隆抗体的制备:免疫 8 周龄 BALB/c 雌性小鼠 6 只,按常规方法制备得到单克隆抗体;

(5) 抗体灵敏度的测定:采用间接竞争酶联免疫吸附法进行测定。

一种基于计算机分子模拟技术的拟除虫菊酯类的半抗原设计 和应用

技术领域

[0001] 一种基于计算机分子模拟技术的拟除虫菊酯类的半抗原设计 and 应用, 借助计算机技术对半抗原的电荷分布和空间构象进行计算和模拟, 是一种设计 II 类拟除虫菊酯农药的半抗原结构的新方法, 涉及拟除虫菊酯类农药的检测技术领域。

背景技术

[0002] 拟除虫菊酯类(Pyrethroids)农药是一类在天然除虫菊酯化学结构研究基础上发展而来的仿生杀虫剂。其具有性质稳定、不易光解、使用浓度低、触杀作用强、灭虫速度快、残效时间短、对高等动物及鸟类低毒性, 无特殊臭味及安全系数高、对环境污染小等特点, 被广泛用于农业、牧业和家庭的害虫防治, 尤其是随着高毒有机磷农药的禁用, 拟除虫菊酯杀虫剂得到了更加广泛地应用, 现已成为农用及卫生杀虫剂的主要支柱产品之一。但长期大量地施用农药, 不仅造成了严重的环境污染和食品安全的隐患, 危害到生态系统的结构和危害到人类的健康, 进而影响到我国农业的可持续发展; 同时, 还严重地影响了农产品在国际市场的竞争力。我国加入世贸组织以后, 农产品经常遇到因农药残留量超标而遭受输入国拒收, 并蒙受索赔而造成巨大的经济损失。近年来研究表明, 拟除虫菊酯类农药对于一些非目标生物如蜜蜂、家蚕及天敌昆虫和鱼、虾、鳖等水生生物的毒性比较大。因此, 建立拟除虫菊酯农药残留快速、简便和灵敏的检测技术, 具有十分重要的环境意义。

[0003] 目前, 检测拟除虫菊酯类农药的方法有气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC), 色谱和质谱的联用技术、毛细管电泳法等, 但是这些仪器分析方法需要经过繁琐的样品提取, 净化和衍生化等处理, 复杂的样品前处理不仅耗时费钱, 而且会造成痕量拟除虫菊酯类农药丢失; 此外, 这些传统的农残分析方法很难实现快速、低成本、高通量和现场检测的要求, 而酶联免疫检测技术正好可以弥补这些不足, 所以近年来得到了迅猛发展, 并显示出了巨大的市场潜力。

[0004] 酶联免疫检测技术的关键是制备出特异性好和灵敏度高的抗体, 而能否制备出好抗体的关键在于半抗原的设计。一直以来, 由于对抗原抗体作用机理以及半抗原空间结构的了解不足, 导致半抗原的设计仅根据目标物化学结构进行设计, 没能考虑到空间结构和电荷分布的影响, 具有很大的盲目性。为此, 往往需要进行反复多次的免疫尝试, 耗费了大量的时间和资金。而且对于食品专业的人员来说, 对半抗原进行有机修饰或从头合成, 往往非常困难。

[0005] 分子模拟软件已经成功地应用于生命科学的许多研究领域: 药物设计, 生物信息学, 免疫学, 病毒学, 遗传与发育生物学和医学等。利用分子模拟软件(Discovery Studio 2.5 软件)可以对半抗原的空间结构进行模拟, 然后将半抗原分子的结构信息和目标物质进行比较, 通常选择和目标物电荷性质一样, 空间结构模拟程度最高的半抗原作为免疫半抗原, 并且通过实验取得了良好的效果。

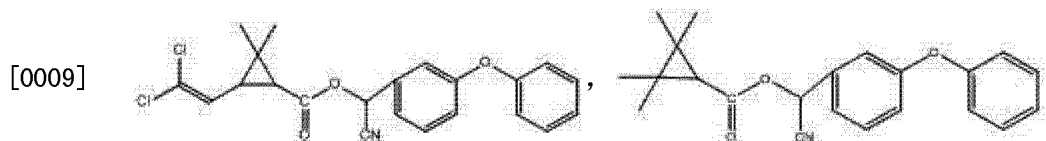
[0006] Discovery Studio (简称 DS), 基于 Windows/Linux 系统和个人电脑、面向生命科

学领域的新一代分子建模和模拟环境。与 Pipeline Pilot Server 结合在一起,提供化学/生物学数据显示、模拟/分析、构建三维分子、展示动态变化、三维作图及许多其它功能。目前,国内利用计算机软件技术 Discovery Studio 2.5 进行拟除虫菊酯类农药通用性半抗原的设计尚无报道。

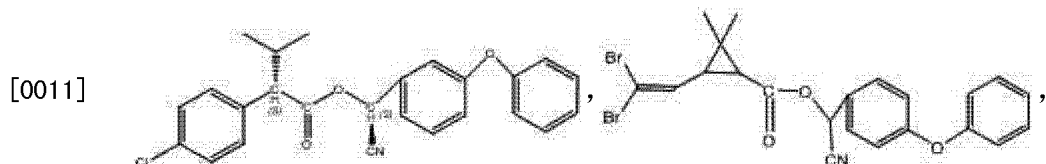
发明内容

[0007] 本发明提供一种 II 型拟除虫菊酯农药通用半抗原的设计方法,为今后小分子半抗原的设计提供了一种新技术和新方法。

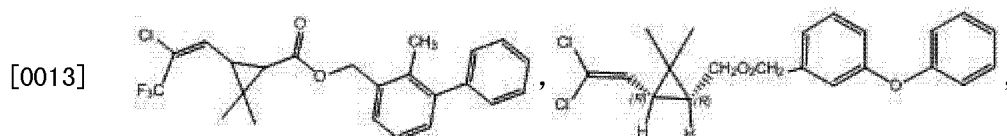
[0008] 本发明的技术方案:一种 II 型拟除虫菊酯农药通用半抗原的设计方法,根据拟除虫菊酯类农药的分子结构,设计了 6 种半抗原,拟除虫菊酯农药结构式:



[0010] 氯氰菊酯 甲氰菊酯

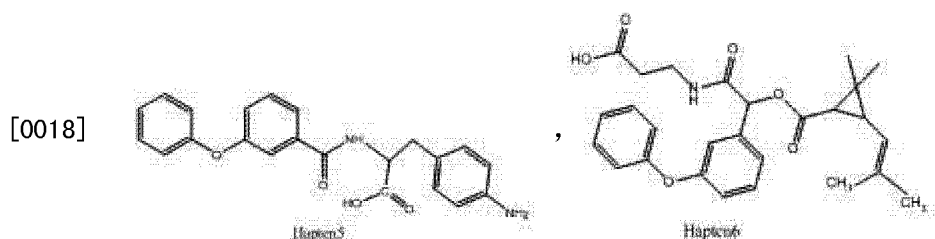
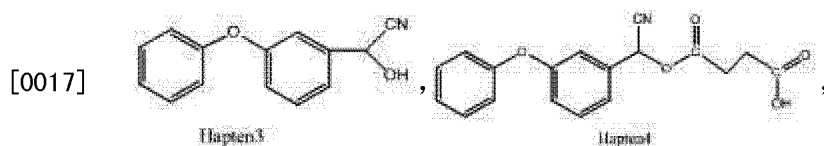
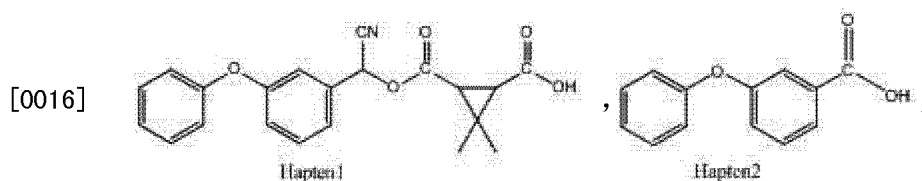


[0012] S-氰戊菊酯 溴氰菊酯



[0014] 联苯菊酯 顺式氯菊酯

[0015] 半抗原(Hapten)结构式:



[0019] 步骤为:

[0020] (1) 计算每个半抗原分子中原子的电荷性质、每个半抗原分子的空间结构,将半抗

原分子和目标分子的总电荷性质,空间结构进行比较,选出免疫半抗原和包被半抗原;

[0021] (a) 利用 Gaussian 软件计算每个半抗原分子的电荷性质和带电量;

[0022] (b) 利用 Discovery Studio 2.5 构建各个半抗原和拟除虫菊酯类农药的三维分子,打开 Discovery Studio 2.5,从 View 菜单下,打开 Toolbars,选择 Sketching;打开一个分子显示窗口 Molecule Window,File>new>Molecule Window;然后在此窗口构建化合物的 3D 空间构象;

[0023] (c) 将半抗原和目标分子的总电荷性质,空间构象进行比较,选择半抗原的空间构象和电荷分布最接近的目标物,为最有可能产生免疫效果的半抗原 Hapten1 即为免疫半抗原;二者差异比较大的 Hapten5 被选为包被半抗原;

[0024] (2) 免疫原制备:以血蓝蛋白(KLH)为载体蛋白,采用 EDC 法(碳二亚胺法)合成免疫原:称取 0.05mmol 的 Hapten1,再加入 DMF 1.0mL,溶解得到 A 液;称取 0.1mmol 的 EDC 和 0.12mmol 的 NHS 加到 A 液中,室温反应 12h,得到 B 液;量取 5.0mg/mL 的血蓝蛋白 KLH 16mL,冰浴中反应 6h,4℃透析 72h,换透析液 6-8 次,鉴定,分装,-20℃冻存,备用;

[0025] (3) 包被原制备:以牛血清白蛋白(BSA)为载体蛋白,采用重氮化法合成包被原:称取 0.02mmol 的半抗原 5,滴入几点乙醇溶解,溶于 1mol/L、0.6mL 盐酸中,得到 A' 液;在冰浴搅拌下,加入 0.2mol/L、0.15mL 的 NaNO_3 溶液中反应 1h,称取 BSA 27mg,溶于 pH 9.6、5mL 碳酸盐缓冲溶液中,为 B' 液;然后在冰浴搅拌下,将 A' 液逐滴加到 B' 液中,滴加完毕,反应 3h;4℃透析 72h,其间换透析液 6-8 次,鉴定,分装,-20℃冻存,备用;

[0026] (4) 单克隆抗体的制备:免疫 8 周龄左右 BALB/c 雌性小鼠 6 只,按常规方法制备得到单克隆抗体:免疫 8 周龄左右 BALB/c 雌性小鼠 6 只,首免时将免疫原和氟氏完全佐剂按照 1:1 比例混合,100g/只剂量免疫;间隔 4 周,加强免时用氟氏不完全佐剂代替完全佐剂,间隔 3 周;四免后采血筛选,按常规杂交瘤融合技术融合,采用稀释法进行亚克,采用间接竞争酶联免疫吸附法进行筛选,最终得到纯的细胞株;

[0027] (5) 抗体灵敏度的测定:采用间接竞争酶联免疫吸附法进行测定。

[0028] 本发明的有益效果:本发明是基于计算机分子模拟软件对拟除虫菊酯半抗原的电荷性质和空间构象进行构建,预测能产生好的免疫效果的半抗原,通过免疫原的合成和免疫过程,实现识别拟除虫菊酯类农药筛选性抗体的制备,具有节约时间和资金,很好预测能力的优点。

附图说明

[0029] 图 1 各种半抗原和目标物质的电荷性质计算图,包括拟除虫菊酯类农药电荷分布图及各种半抗原电荷分布图。1-1-1 氯氰菊酯,1-1-2 甲氰菊酯,1-1-3 S-氰戊菊酯,1-1-4 联苯菊酯,1-1-5 溴氰菊酯,1-1-6 顺氯菊酯;1-2-1 半抗原 1,1-2-2 半抗原 2,1-2-3 半抗原 3,1-2-4 半抗原 4,1-2-5 半抗原 5,1-2-6 半抗原 6。

[0030] 图 2 各种半抗原和目标物质的空间构象图。2-1-1 氯氰菊酯,2-1-2 甲氰菊酯,2-1-3 S-氰戊菊酯,2-1-4 联苯菊酯,2-1-5 溴氰菊酯,2-1-6 顺氯菊酯;2-2-1 半抗原 1,2-2-2 半抗原 2,2-2-3 半抗原 3,2-2-4 半抗原 4,2-2-5 半抗原 5,2-2-6

[0031] 半抗原 6。

[0032] 图 3 免疫原紫外鉴定图。

[0033] 图 4 包被原紫外鉴定图。

具体实施方式

[0034] (1) 确定免疫原半抗原及包被半抗原

[0035] (a) 利用 Gaussian 软件计算每个拟除虫菊酯农药和半抗原的电荷性质。

[0036] 表 1 各种半抗原和目标物质的电荷分布总结表

[0037]

拟除虫菊酯农药	原子电荷总数
氯氰菊酯	负
甲氰菊酯	负
S- 氰戊菊酯	负
溴氰菊酯	负
联苯菊酯	负
顺式-氯菊酯	负
半抗原	
Hapten1	负
Hapten2	负
Hapten3	负
Hapten4	正
Hapten5	正
Hapten6	正

[0038] (b) 利用 Discovery Studio 2.5 构建各个半抗原和拟除虫菊酯类农药的三维分子, 打开 Discovery Studio 2.5, 从 View 菜单下, 打开 Toolbars, 选择 Sketching; 打开一个分子显示窗口(Molecule Window), File>new>Molecule Window; 然后在此窗口构建化合物的 3D 空间构象。如图 2 所示。

[0039] (c) 将半抗原和目标分子的总电荷性质, 空间构象进行比较, 选择半抗原的空间构象和电荷分布最接近目标物, 为最有可能产生免疫效果的半抗原(Hapten1); 二者差异比较大的被选为包被半抗原(Hapten5)。

[0040] (2) 免疫原制备: 称取 Hapten1 (0.05mmol, 18.25mg), 再加入 DMF 1.0mL, 溶解得到 A 液。称取 EDC (0.1mmol, 19.1mg) 和 NHS (0.12mmol, 13.8mg) 加到 A 液中, 室温反应 12h, 得到 B 液。量取血蓝蛋白(KLH) 16mL (5.0mg/mL), 冰浴中反应 6h, 透析(4℃, 72h, 换透析液 6-8 次), 鉴定, 分装, -20℃冻存, 备用。

[0041] (3) 包被原制备: 称取半抗原 5 (0.02mmol, 7.5mg), 滴入几点乙醇溶解, 溶于盐酸(1mol/L, 0.6mL), 得到 A' 液。在冰浴搅拌下, 加入 NaNO₃ (0.2mol/L, 0.15mL), 反应 1h。称取 BSA 27.0mg, 溶于碳酸盐缓冲溶液 5mL (简称 CB, pH 9.6) 为 B' 液; 然后在冰浴搅拌下, 将 A' 液逐滴加到 B' 液中, 滴加完毕, 反应 3h。透析(4℃, 72h, 换透析液 6-8 次), 鉴定, 分装, -20℃冻存, 备用。

[0042] (3) 单克隆抗体的制备: 免疫 8 周龄左右 BALB/c 雌性小鼠 6 只, 首免时将免疫原和氟氏完全佐剂按照 1:1 比例混合, 100 μg/只剂量免疫。间隔 4 周, 加强免时用氟氏代替完全佐剂代替氟氏完全佐剂, 间隔 3 周。四免后采血筛选, 按常规杂交瘤融合技术融合, 采用有限稀释法进行亚克, 采用间接竞争酶联免疫吸附法进行筛选, 最终得到纯的细胞株。利用体内诱生法产生腹水, 采用辛酸-硫酸铵法进行纯化, 得到纯化腹水用于单克隆抗体的

制备

[0043] (4) 抗体灵敏度的测定 采用间接竞争酶联免疫法进行测定。

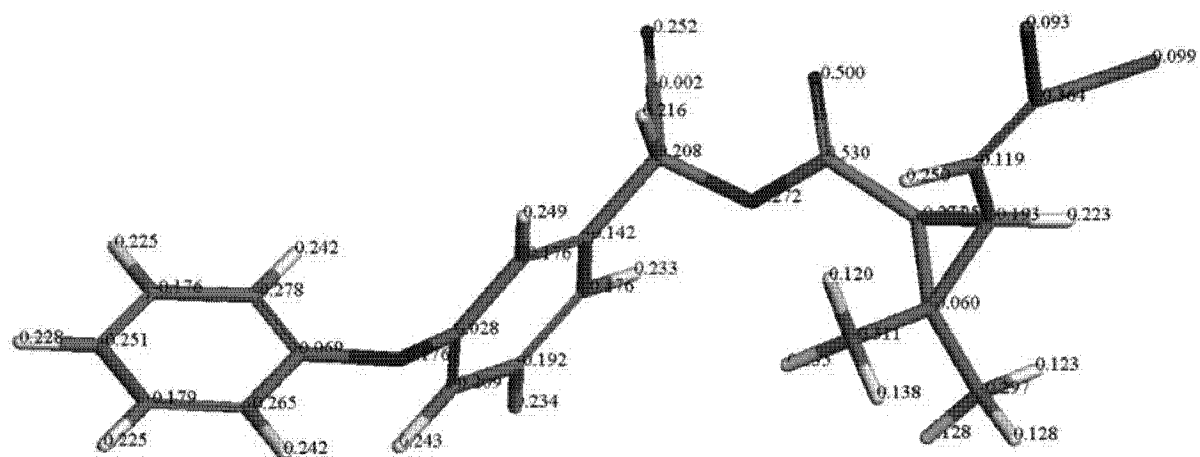
[0044] 包被浓度 :0.25 μ g/mL; 抗体浓度为 4mg/mL, 稀释倍数 :24000 ;

[0045] 标准品 :先将标准品配成 1mg/mL 的甲醇标准溶液, 然后用 15% 的甲醇 -0.01MPBS 混合液直接稀释到 1ppm, 然后倍比稀释即可。

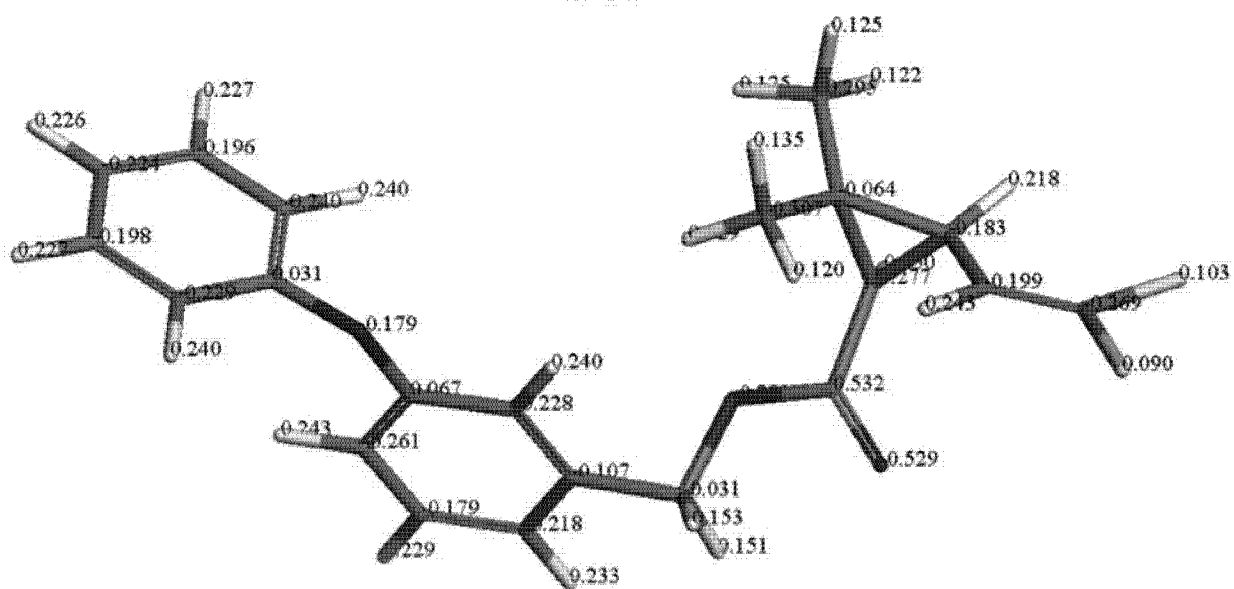
[0046] 表 2、抗体灵敏度表

[0047]

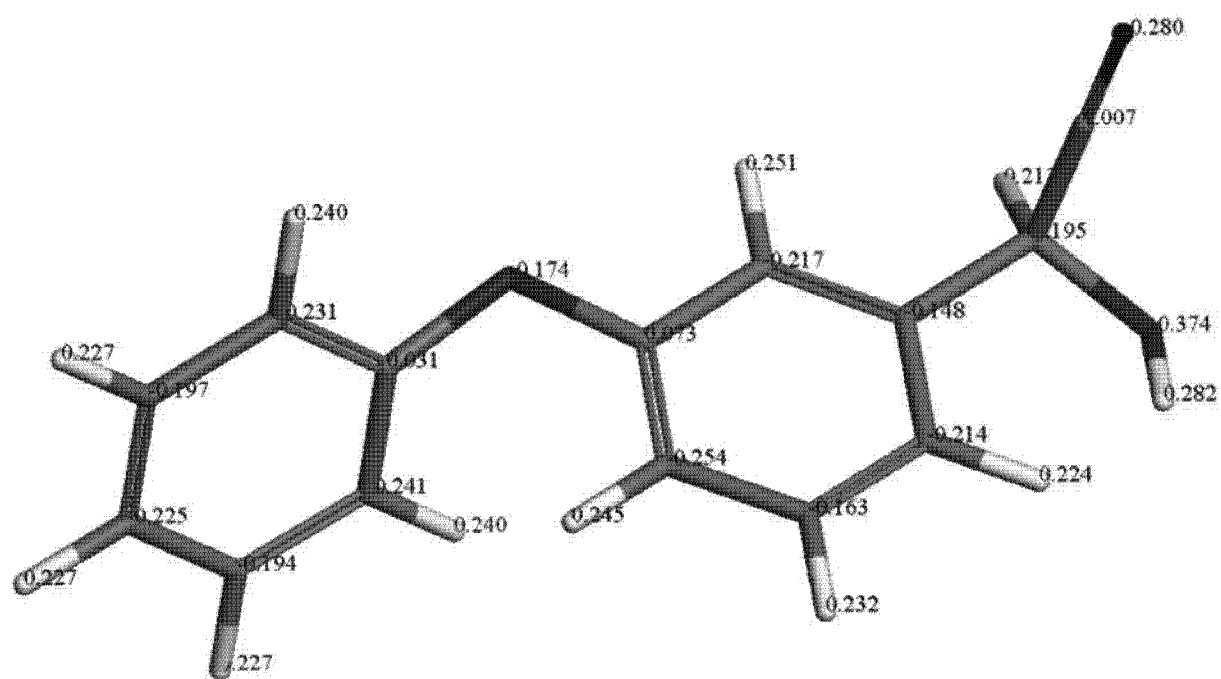
标准品	haptens-BSA IC ₅₀ (ng/mL)
氯氰菊酯	1.7
甲氰菊酯	16.4
haptens	69.1
S 氰戊菊酯	45
haptens 1	156.1
联苯菊酯	146.9
溴氰菊酯	199.6
顺式氯菊酯	820.1



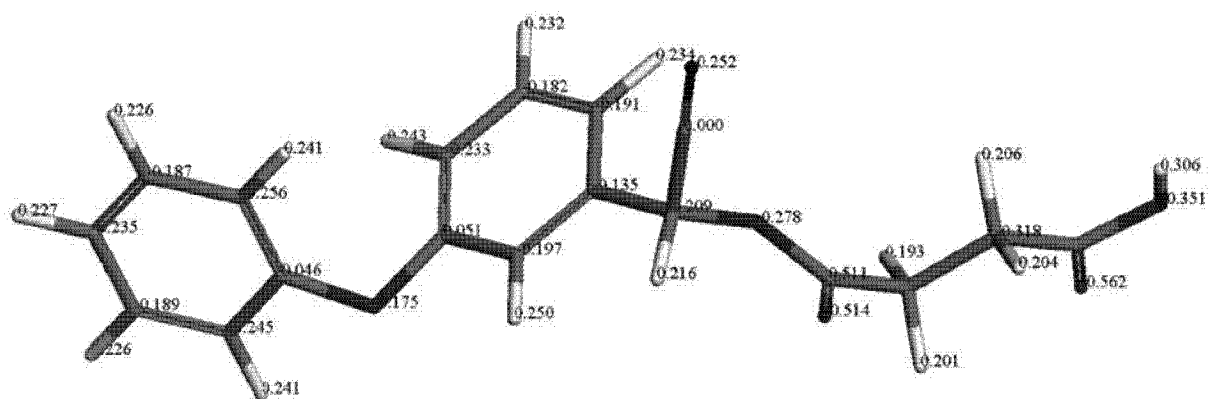
1-1-5



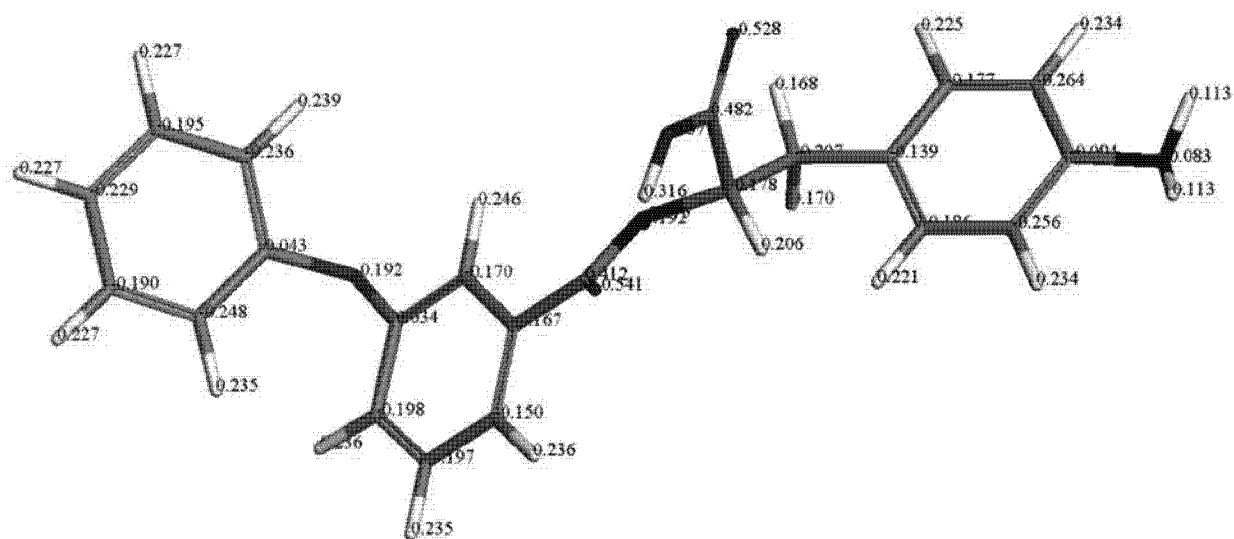
1-1-6



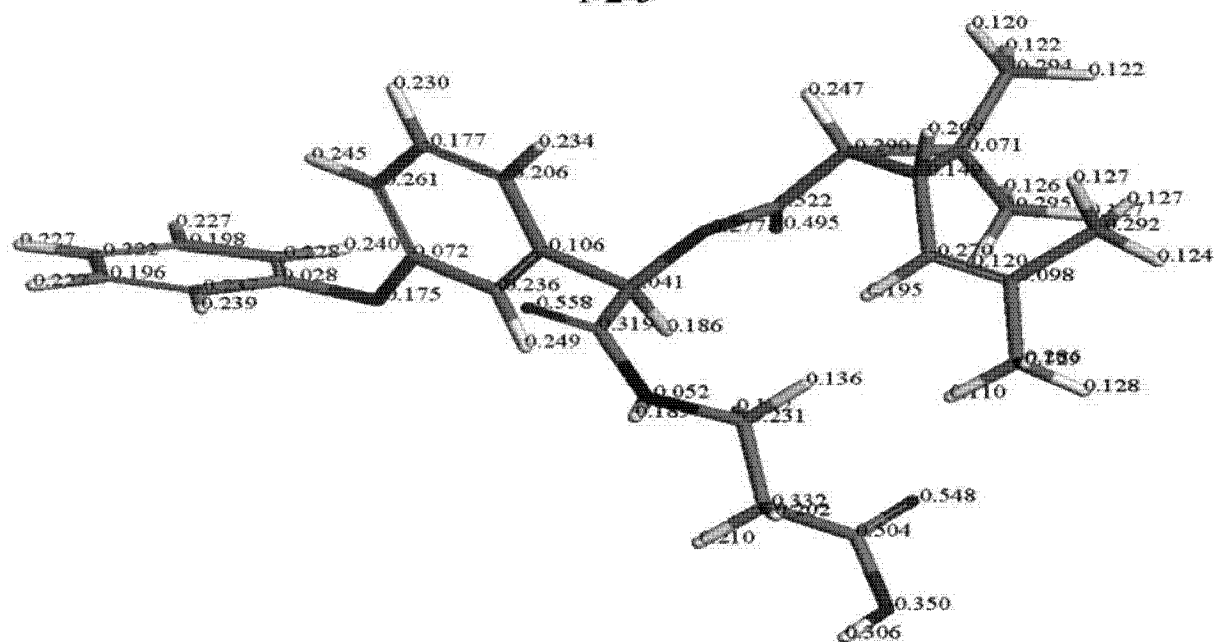
1-2-3



1-2-4

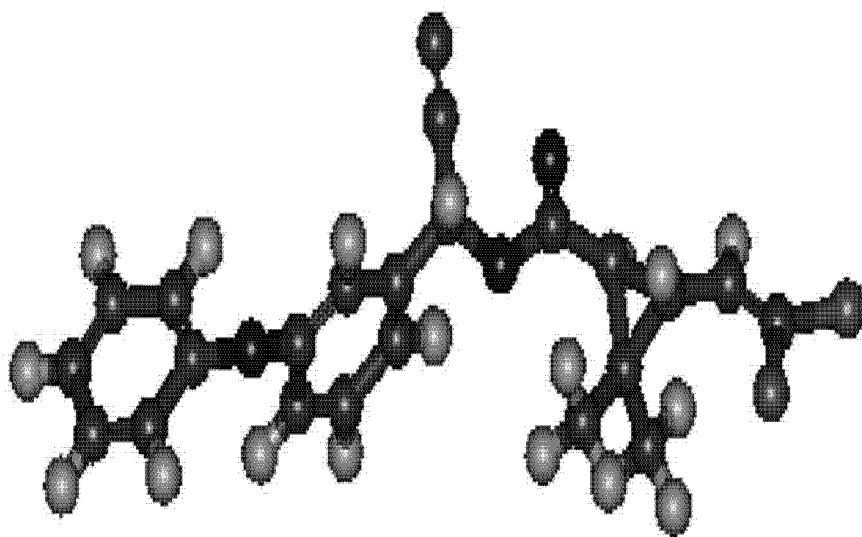


1-2-5

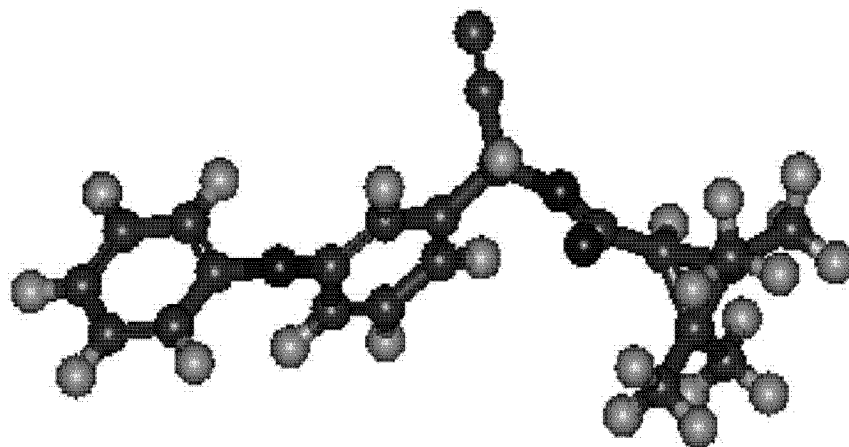


1-2-6

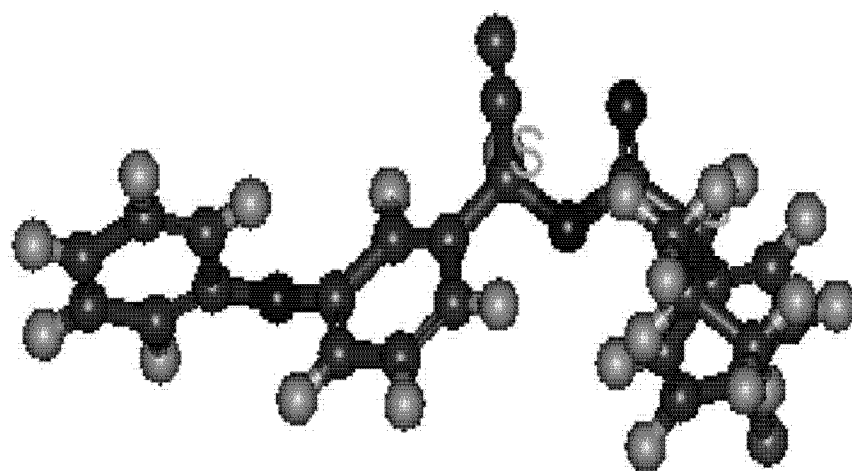
图 1



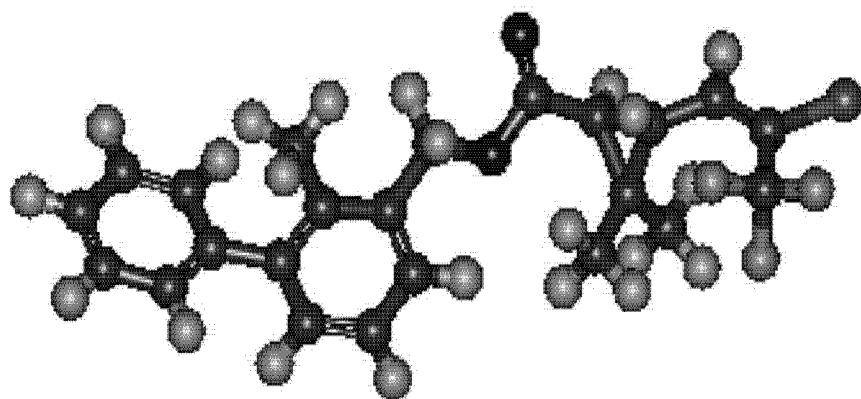
2-1-1



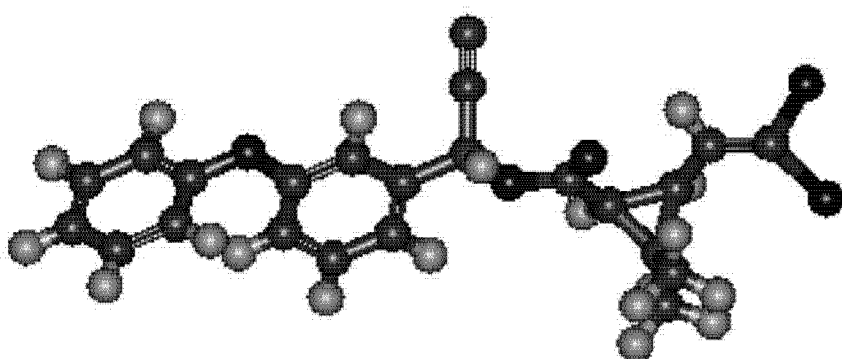
2-1-2



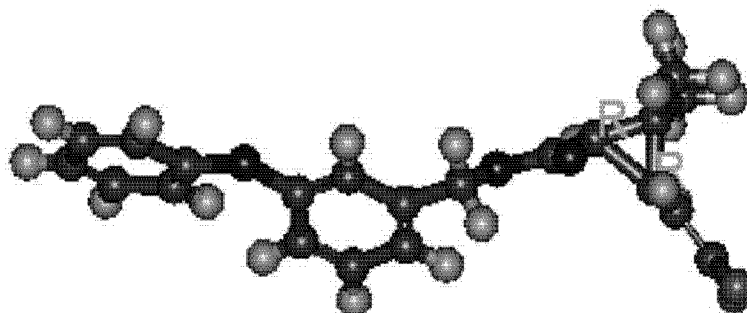
2-1-3



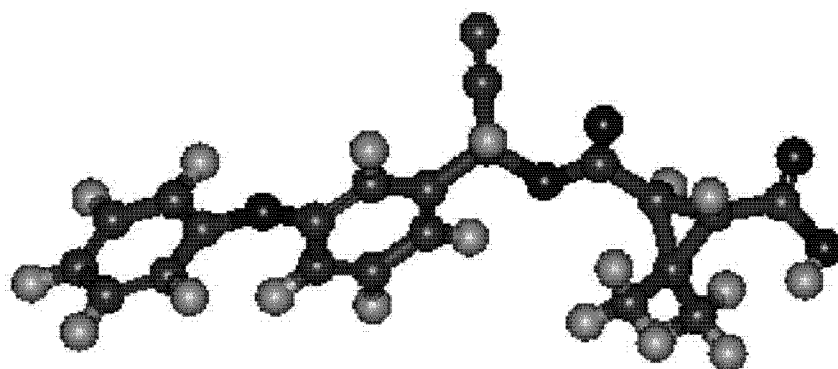
2-1-4



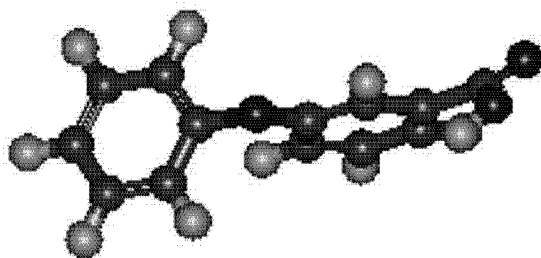
2-1-5



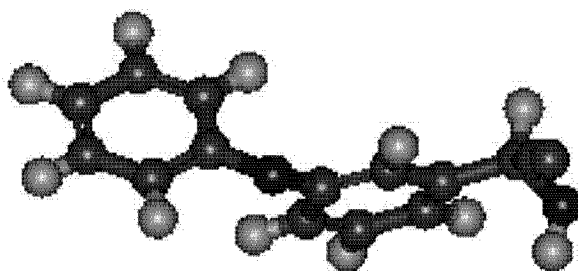
2-1-6



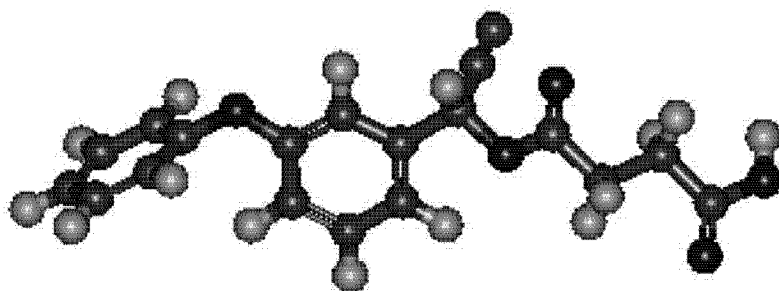
2-2-1



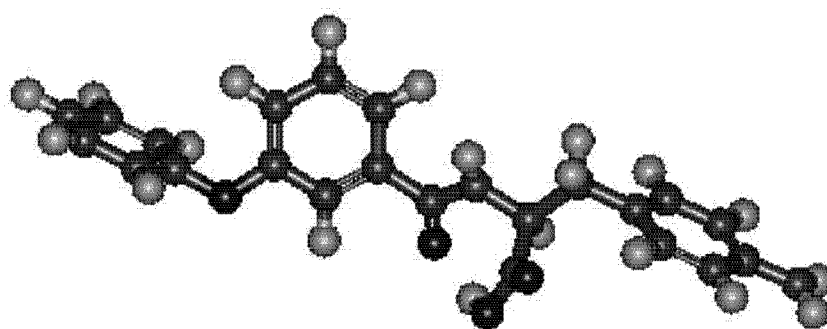
2-2-2



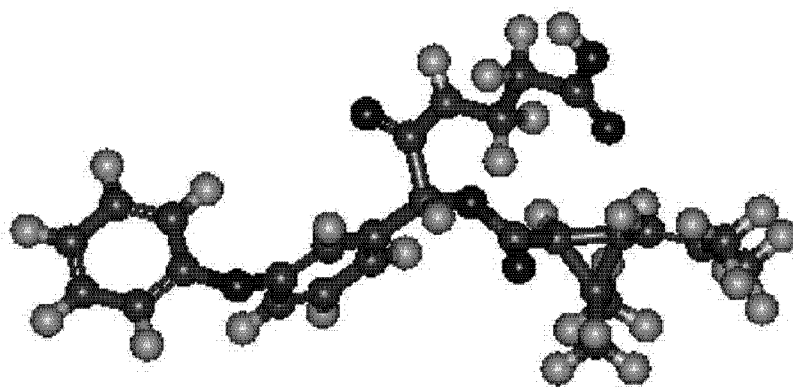
2-2-3



2-2-4



2-2-5



2-2-6

图 2

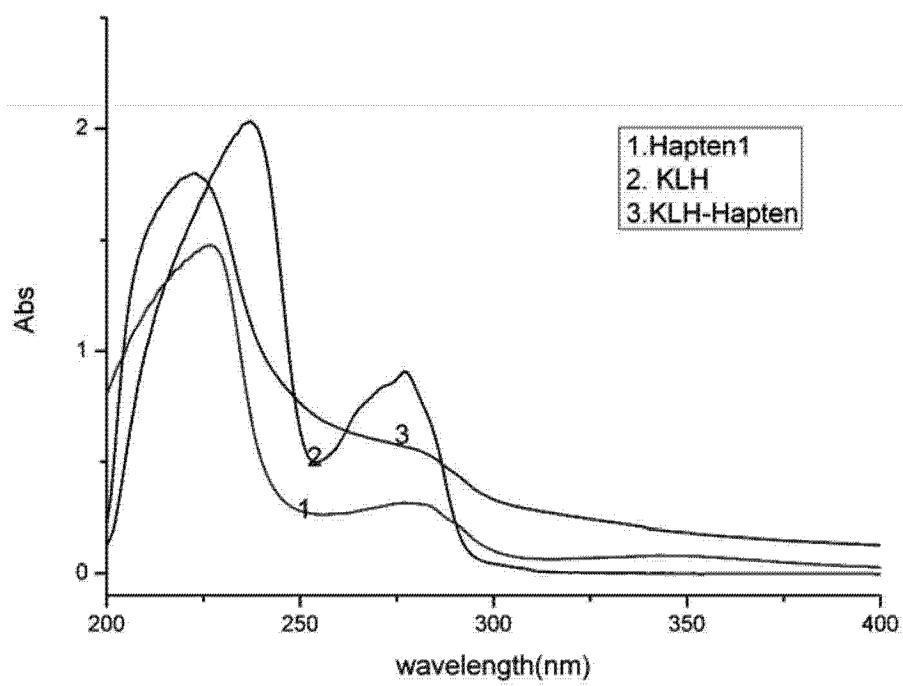


图 3

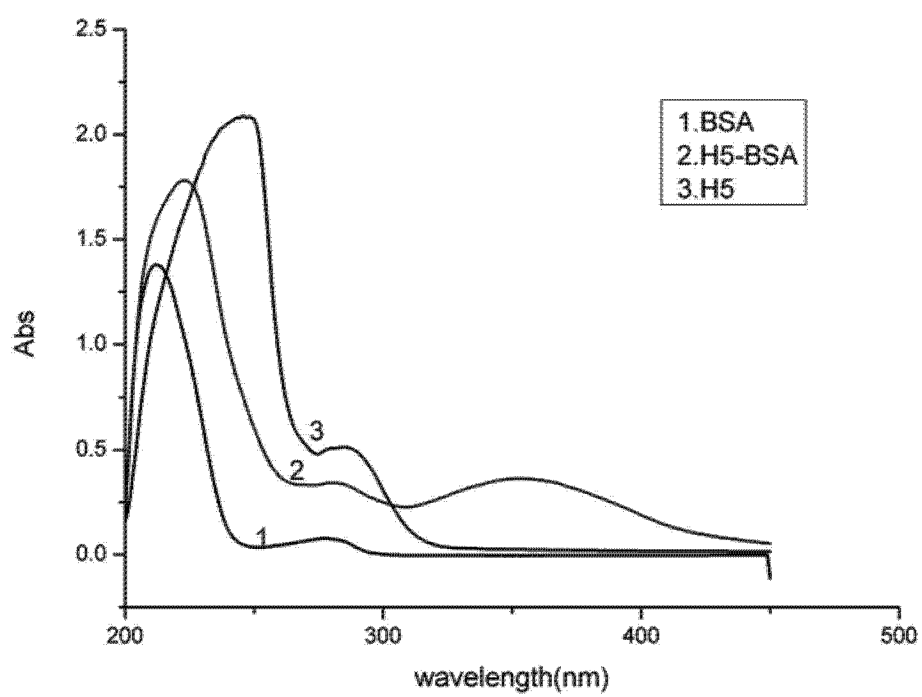


图 4

专利名称(译)	一种基于计算机分子模拟技术的拟除虫菊酯类的半抗原设计和应用		
公开(公告)号	CN102901811B	公开(公告)日	2014-08-13
申请号	CN201210401857.5	申请日	2012-10-20
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	匡华 陈秀金 郭金英 刘丽强 胥传来 王利兵		
发明人	匡华 陈秀金 郭金英 刘丽强 胥传来 王利兵		
IPC分类号	G01N33/531 G06F17/50		
审查员(译)	周露露		
其他公开文献	CN102901811A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种基于计算机分子模拟技术的拟除虫菊酯类的半抗原设计和应用，属于拟除虫菊酯类农药的检测技术领域。本发明设计了6种可能的半抗原。利用Gaussian软件计算半抗原和目标物的电荷分布；利用DiscoveryStudio2.5软件构建半抗原和目标物空间构象，通过比较，选择结构相似程度最高的半抗原为免疫半抗原（hapten1）；预测该半抗原能产生良好的免疫效果。选择结构差异较大的为包被半抗原(hapten5)。本方法成功地运用计算机分子模拟软件对拟除虫菊酯类农药半抗原进行了设计，通过合成免疫原和免疫，血清筛选，融合，筛选和亚克，实现识别拟除虫菊酯类农药群选择性抗体的制备，证明该法具有节约时间和资金，很强的预测能力，为以后免疫学的分析研究提供了一种新方法。

