



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103149351 A

(43) 申请公布日 2013.06.12

(21) 申请号 201310093867.1

G01N 33/577(2006.01)

(22) 申请日 2013.03.21

G01N 33/558(2006.01)

(71) 申请人 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

(72) 发明人 匡华 陈秀金 胥传来 徐利广

马丽萍 刘丽强 王利兵 丁利
马伟 宋姗姗

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所

32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

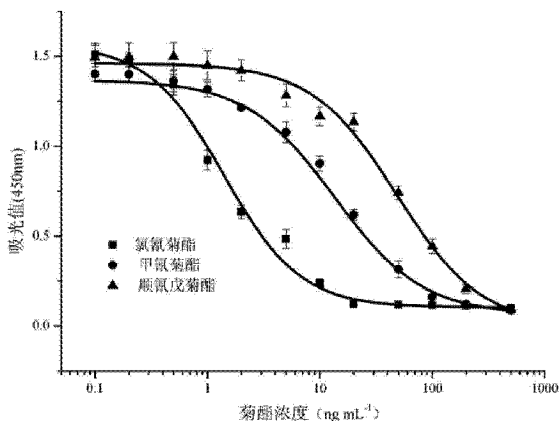
权利要求书1页 说明书6页 附图4页

(54) 发明名称

一种拟除虫菊酯类农药通用包被抗原的合成及应用

(57) 摘要

一种拟除虫菊酯类农药通用包被抗原的合成及应用,属于生物化工技术领域。本发明以 3- 苯氧苯甲酸和对硝基苯丙氨酸为原料,经过 2 步化学反应,合成拟除虫菊酯类农药的通用包被半抗原,用重氮化法将其和载体蛋白牛血清白蛋白 BSA 偶联,用紫外分光光度法进行鉴定和估算偶联物的偶联比。合成的偶联物(包被抗原)用于酶联免疫分析和胶体金免疫层析试纸条的制备。通过酶联免疫分析和胶体金免疫层析试纸条的制备,证明本发明成功地合成了拟除虫菊酯类农药通用包被抗原,为人们建立拟除虫菊酯类农药的免疫分析方法提供了基础;同时也满足了国内对拟除虫菊酯类农药的快速检测的需求。



1. 一种拟除虫菊酯类农药通用包被抗原的合成方法,其特征在于以 3- 苯氧苯甲酸和对硝基苯丙氨酸为原料,经过 2 步化学反应,合成拟除虫菊酯类农药的通用半抗原,用重氮化法将其和载体蛋白 BSA 偶联,用紫外分光光度法进行鉴定;合成步骤为:

(1) 半抗原的合成

①化合物 3 :N-(3- 苯氧基苯酰)-4- 硝基 -L- 苯丙氨酸的合成

该反应在 N_2 保护下,将 500mg 化合物 1 :3- 苯氧苯甲酸溶于 10mL 氯仿中,溶解后将其置于冰浴中,然后向其中滴加 5 μ L 的 DMF 和 0.33mL 氯化亚砷,搅拌 5min 后撤掉冰浴,然后在 65 $^{\circ}$ C 油浴中加热 1h,旋转蒸发除去氯仿及多余的氯化亚砷,得到无色透明的液体,加入 1mL 四氢呋喃将其溶解,为 a 液;接着将 480mg 化合物 2 :对硝基苯丙氨酸和 380mg 碳酸钾溶于 10mL 水中,为 b 液;然后在 10min 内将 a 液缓慢滴加到强力搅拌下的 b 液中,反应 1h 后,用每次 50mL 乙酸乙酯萃取两次,接着用每次 30mL 质量浓度 0.8%NaCl 盐水洗两次,无水硫酸钠干燥,过滤旋干得到 0.5g 黄色胶状化合物 3,直接用于下步;

②化合物 4 :N-(3- 苯氧基苯酰)-4- 氨基 -L- 苯丙氨酸的合成

将 0.5g 化合物 3 和 50mg 钯碳 Pd/C 加入到 10mL 乙酸乙酯中,在 25 $^{\circ}$ C 下氢化 2h,用薄层层析法监测反应进程,点板显示,原料完全反应时停止反应,过滤除去催化剂,旋蒸得到一灰白色固体,再加入 10mL 乙酸乙酯稀释,接着在超声波仪中超声 10min,过滤得到湿品,红外烘箱下干燥,得到 165mg 化合物 4,即拟除虫菊酯类农药通用包被半抗原;

(2) 包被抗原的制备

①制备 A 液 :称取 0.027mmol 半抗原化合物 4 于 10mL 小瓶中,先滴入几点乙醇将其溶解,然后逐滴加入 0.5mL、1mol/L 盐酸,溶液会变浑,冷却至 0-5 $^{\circ}$ C,然后逐滴加入现配好的质量浓度 30% 亚硝酸钠溶液,用淀粉碘化钾试纸监测亚硝酸钠的用量,直到试纸在 15s 内变蓝为止,停止滴加亚硝酸钠溶液,接着在 0 $^{\circ}$ C 下搅拌反应 45min,得到 A 液;

②制备 B 液 :称取 30mg 的牛血清白蛋白溶于 6mL、0.2M、pH8.8 的硼酸盐缓冲液,得到 B 液;

③在冰浴搅拌下,将 A 液逐滴地滴加到 B 液中,并用 1mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH,将 pH 保持在 8.5,冰浴下搅拌反应 3h,得到包被抗原粗品;

④将反应好的包被抗原移入透析袋中,用 0.01M、pH7.2 磷酸盐缓冲液透析 3 天,期间更换透析液 6-8 次,得到包被抗原 :即半抗原 -BSA 偶联物;

(3) 包被抗原用紫外分光光度法进行鉴定。

2. 用权利要求 1 所述方法合成的拟除虫菊酯类农药通用包被抗原的应用,其特征在于用于酶联免疫分析和胶体金免疫层析试纸条的制备。

一种拟除虫菊酯类农药通用包被抗原的合成及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种拟除虫菊酯类农药通用包被抗原的合成及应用,合成的抗原用紫外分光光度法进行鉴定,并将其用于酶联免疫分析和胶体金免疫层析试纸条的制备,属于生物化工技术领域。

背景技术

[0002] 拟除虫菊酯类农药,英文名称 Pyrethroid insecticides,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,具有灭虫速度快、残效时间短、对高等动物及鸟类毒性低,使用安全等优点,被广泛用于茶园、果园、牧业和家庭的害虫防治,因此,拟除虫菊酯类农药已成为现代杀虫剂的主要支柱产品之一。但长期大量地施用该农药,造成了严重的环境污染和食品安全隐患。同时研究表明,拟除虫菊酯类农药对于鱼、虾、蟹等水生生物的毒性比较大。因此,建立拟除虫菊酯类农药残留的快速检测技术,具有十分重要的环境意义。

[0003] 目前,用于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都需要经过繁琐的样品制备过程,而这些前处理过程不仅耗时费钱,而且可能会造成痕量拟除虫菊酯类农药丢失;而酶联免疫检测技术和免疫层析试纸条方法相结合,正好可以弥补这些方法的不足。

[0004] 近年来,检测拟除虫菊酯类农药多残留的酶联免疫分析法已经建立,但是酶联免疫分析试剂盒的测定时间长,需要酶标仪读数,不适合现场的快速检测。而胶体金免疫层析试纸条用于检测样品时,结果可以用肉眼直接观察,成本低、时间短,特别适合于现场粗测。而在制备拟除虫菊酯类农药金标试纸条过程中,若包被抗原对相应单克隆抗体的亲和力过高,导致抗体的灵敏度下降;反之,若包被抗原对相应单克隆抗体的亲和力太低,导致检测线不显色。因此,只有在包被抗原对相应抗体的亲和力合适时,才能进行胶体金免疫层析试纸条的制备。

[0005] 本发明设计并合成了一种新型的拟除虫菊酯类农药的通用包被半抗原,利用重氮化法偶联载体蛋白 BSA,合成包被原,将其用于免疫分析和制备胶体金免疫层析试纸条,取得了很好的效果。目前,尚没有报道关于该包被原的制备以及将其用于拟除虫菊酯类农药的胶体金免疫层析试纸条的制备。

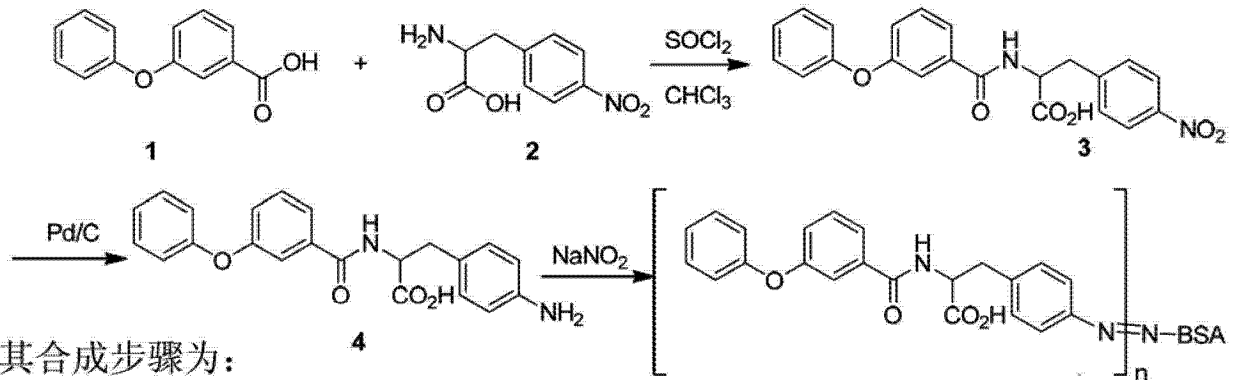
发明内容

[0006] 本发明目的提供了一种拟除虫菊酯类农药通用包被抗原的合成及应用。合成的抗原采用紫外分光光度法进行鉴定,将该包被抗原用于拟除虫菊酯类农药的免疫分析和胶体金免疫层析试纸条的制备,为今后快速检测拟除虫菊酯类农药提供了有利条件。

[0007] 本发明的技术方案:一种拟除虫菊酯类农药通用包被抗原的合成方法,以 3-苯氧苯甲酸和对硝基苯丙氨酸为原料,经过 2 步化学反应,得到拟除虫菊酯类农药的通用半抗

原,用重氮化法将其与载体蛋白 BSA 偶联,用紫外分光光度法来鉴定和估算偶联物的偶联比。其反应方程式为

[0008]



[0009] (1) 半抗原的合成。

[0010] ①化合物 3 :N-(3- 苯氧基苯酰)-4- 硝基 -L- 苯丙氨酸的合成 :

[0011] 该反应在 N_2 保护下,将 500mg 化合物 1 :3- 苯氧基苯甲酸溶于 10mL 氯仿中,溶解后将其置于冰浴中,然后向其中滴加 $5\mu L$ 的 DMF 和 0.33mL 氯化亚砷,搅拌 5min 后撤掉冰浴,然后在 $65^\circ C$ 油浴中加热 1h,旋转蒸发除去氯仿及多余的氯化亚砷,得到无色透明的液体,加入 1mL 四氢呋喃将其溶解,为 a 液 ;接着将 480mg 化合物 2 :对硝基苯丙氨酸和 380mg 碳酸钾溶于 10mL 水中,为 b 液 ;然后在 10min 内将 a 液缓慢滴加到强力搅拌下的 b 液中,反应 1h 后,用每次 50mL 乙酸乙酯萃取两次,接着用每次 30mL 质量浓度 0.8% NaCl 盐水洗两次,无水硫酸钠干燥,过滤旋干得到 0.5g 黄色胶状化合物 3,直接用于下步,该产物的结构通过液质联用技术得到证实 :LCMS (ESI) $m/z=407.35$ ($[M-H]^-$) ;

[0012] ②化合物 4 :N-(3- 苯氧基苯酰)-4- 氨基 -L- 苯丙氨酸的合成 :

[0013] 将 0.5g 化合物 3 和 50mg 钯碳 Pd/C 加入到 10mL 乙酸乙酯中,在 $25^\circ C$ 下氢化 2h,用薄层层析法监测反应进程,点板显示,原料完全反应时停止反应,过滤除去催化剂,旋蒸得到一灰白色固体,再加入 10mL 乙酸乙酯稀释,接着在超声波仪中超声 10min,过滤得到湿品,红外烘箱下干燥,得到 165mg 化合物 4,即拟除虫菊酯类农药通用包被半抗原,反应得率 33%, 1H NMR (400MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.68 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, NH), 7.59 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, ArH), 7.49 ~ 7.41 (m, 4H, ArH), 7.19 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, ArH), 7.04 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, ArH), 6.91 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 6.42 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 4.45 (m, 1H, CH), 2.94 (m, 1H, CH_2), 2.86 (m, 1H, CH_2) ;

[0014] (2) 包被抗原的制备

[0015] ①制备 A 液 :称取 0.027mmol 半抗原化合物 4 于 10mL 小瓶中,先滴入几点乙醇将其溶解,然后逐滴加入 0.5mL、1mol/L 盐酸,溶液变浑浊,冷却至 $0-5^\circ C$ 。然后逐滴加入现配好的质量浓度 30% 亚硝酸钠溶液,用淀粉碘化钾试纸监测亚硝酸钠的用量,直到试纸在 15s 内变蓝为止,停止滴加亚硝酸钠溶液,接着在 $0^\circ C$ 下搅拌反应 45min,得到 A 液。

[0016] ②制备 B 液 :称取 30mg 的牛血清白蛋白溶于 6mL 的硼酸盐缓冲液 (0.2M, pH8.8), 得到 B 液。

[0017] ③在冰浴搅拌下,将 A 液逐滴地滴加到 B 液中,并用 1mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH,将 pH 保持在 8.5,冰浴下搅拌反应 3h,得到包被抗原粗品 ;

[0018] ④将反应好的包被抗原移入透析袋中,用 0.01M、pH7.2 磷酸盐缓冲液透析 3 天,期间更换透析液 6-8 次,得到包被抗原:即半抗原-BSA 偶联物;

[0019] (3) 人工包被抗原的鉴定

[0020] ①鉴定:采用重氮化法合成的抗原时,由于蛋白质和小分子之间形成了氮氮三键,会使反应溶液呈现橘黄色,用紫外分光光度仪扫描时会在 340nm 形成一个新的吸收峰。因此,包被抗原紫外扫描图若在 340nm 处有新峰产生,说明偶联成功;否则说明偶联失败。

[0021] ②偶联比测定:采用分光光度法估算偶联物中两种分子的偶联比率。

[0022] 摩尔吸光系数 ϵ :配制半抗原(N-(3-苯氧基苯酰)-4-氨基-L-苯丙氨酸)浓度为 0, 10, 30, 50 $\mu\text{g/mL}$ 的水溶液,由紫外扫描的结果可知,半抗原的最大吸收波长为 285nm,每个浓度做 3 个平行样,摩尔吸光系数 ϵ 计算公式:

[0023] $\epsilon = \text{吸光值} / \text{摩尔浓度}$ 。本实验计算得 $\epsilon = 15069.36\text{L/mol}$ 。

[0024] 偶联物蛋白浓度测定:因为在包被抗原的制备过程中,蛋白溶液澄清。所以蛋白浓度的计算公式: $C=M/V$,其中, M 为牛血清白蛋白的质量 mg; V 为包被抗原透析后的体积 mL; C 为包被抗原的蛋白浓度。通过计算可得,包被抗原的蛋白浓度为 3.65mg/mL。

[0025] 偶联比测定:配制 200 $\mu\text{g/mL}$ 牛血清白蛋白的水溶液;将包被抗原用水溶液稀释到 200 $\mu\text{g/mL}$,分别测定在 285nm 处测吸光值,测出的 200 $\mu\text{g/mL}$ 牛血清白蛋白水溶液的吸光值为 A1, 200 $\mu\text{g/mL}$ 包被抗原水溶液的吸光值为 A2,则偶联比 r 为:

[0026] $r = ((A2 - A1) / \epsilon) / (200 \times 10^{-3} / 66200)$

[0027] 其中 ϵ 为摩尔吸光系数(L/mol), 66200 为牛血清白蛋白的分子量。本实验计算得: $r \approx 19$ 。

[0028] 用所述方法合成的拟除虫菊酯类农药通用包被抗原,用于酶联免疫分析和胶体金免疫层析试纸条的制备。

[0029] 本发明的有益效果:本发明合成了拟除虫菊酯类农药的通用包被抗原,可用于免疫分析和胶体金免疫层析试纸条的制备,为以后的研究提供了方便,可满足国内市场对其研究的需要。

附图说明

[0030] 图 1 N-(3-苯氧基苯酰)-4-氨基-L-苯丙氨酸的核磁谱图。 ^1H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 8.68 (d, J=8.4Hz, 1H, NH), 7.59 (d, J=7.6Hz, 1H, ArH), 7.49 ~ 7.41 (m, 4H, ArH), 7.19 (t, J=7.2Hz, 2H, ArH), 7.04 (d, J=8.8Hz, 2H, ArH), 6.91 (d, J=8.4Hz, 2H, ArH), 6.42 (d, J=8.0Hz, 2H, ArH), 4.45 (m, 1H, CH), 2.94 (m, 1H, CH₂), 2.86 (m, 1H, CH₂)。

[0031] 图 2 包被抗原的紫外鉴定图。图中 1、BSA 代表牛血清白蛋白; 2、H-BSA 代表拟除虫菊酯类农药通用包被抗原; 3、H 代表菊酯的半抗原 Hapten。

[0032] 图 3 氯氰菊酯, 甲氰菊酯和顺氰戊菊酯的抑制曲线。浓度单位: ppb。

[0033] 图 4 氯氰菊酯的胶体金试纸条的测定结果实例图, 浓度单位: ppb。

[0034] 图 5 甲氰菊酯的胶体金试纸条的测定结果实例图, 浓度单位: ppb。

[0035] 图 6 顺式氰戊菊酯的胶体金试纸条的测定结果实例图, 浓度单位: ppb。

具体实施方式

[0036] 本发明合成的拟除虫菊酯类农药的通用半抗原,采用重氮化法和牛血清白蛋白偶联形成包被抗原,通过紫外分光光度法,酶联免疫分析和胶体金免疫层析试纸条的制备,证明拟除虫菊酯类农药的通用包被抗原合成成功。下面将结合实例做进一步的描述,实施例中如无特殊说明均为常规方法。

[0037] 实施例 1:一种拟除虫菊酯类农药通用包被抗原的制备

[0038] (1) 半抗原的合成

[0039] ①化合物 3:N-(3-苯氧基苯酰)-4-硝基-L-苯丙氨酸的合成:

[0040] 该反应在 N_2 保护下,将 500mg 化合物 1:3-苯氧基苯甲酸溶于 10mL 氯仿中,溶解后将其置于冰浴中,然后向其中滴加 5 μ L 的 DMF 和 0.33mL 氯化亚砷,搅拌 5min 后撤掉冰浴,然后在 65 $^{\circ}$ C 油浴中加热 1h,旋转蒸发除去氯仿及多余的氯化亚砷,得到无色透明的液体,加入 1mL 四氢呋喃将其溶解,为 a 液;接着将 480mg 化合物 2:对硝基苯丙氨酸和 380mg 碳酸钾溶于 10mL 水中,为 b 液;然后在 10min 内将 a 液缓慢滴加到强力搅拌下的 b 液中,反应 1h 后,用每次 50mL 乙酸乙酯萃取两次,接着用每次 30mL 质量浓度 0.8% NaCl 盐水洗两次,无水硫酸钠干燥,过滤旋干得到 0.5g 黄色胶状化合物 3,直接用于下步,该产物的结构通过液质联用技术得到证实:LCMS (ESI) $m/z=407.35$ ($[M-H]^-$);

[0041] ②化合物 4:N-(3-苯氧基苯酰)-4-氨基-L-苯丙氨酸的合成

[0042] 将 0.5g 化合物 3 和 50mg 钯碳 Pd/C 加入到 10mL 乙酸乙酯中,在 25 $^{\circ}$ C 下氢化 2h,用薄层层析法监测反应进程,点板显示,原料完全反应时停止反应,过滤除去催化剂,旋蒸得到一灰白色固体,再加入 10mL 乙酸乙酯稀释,接着在超声波仪中超声 10min,过滤得到湿品,红外烘箱下干燥,得到 165mg 化合物 4,即拟除虫菊酯类农药通用包被半抗原,反应得率 33%, 1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 8.68 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, NH), 7.59 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, ArH), 7.49 ~ 7.41 (m, 4H, ArH), 7.19 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, ArH), 7.04 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, ArH), 6.91 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 6.42 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 4.45 (m, 1H, CH), 2.94 (m, 1H, CH_2), 2.86 (m, 1H, CH_2);

[0043] (2) 包被抗原的制备

[0044] ①制备 A 液:称取 0.027mmol 半抗原化合物 4 于 10mL 小瓶中,先滴入几点乙醇将其溶解,然后逐滴加入 0.5mL、1mol/L 盐酸,溶液变浑浊,冷却至 0-5 $^{\circ}$ C。然后逐滴加入现配好的质量浓度 30% 亚硝酸钠溶液,用淀粉碘化钾试纸监测亚硝酸钠的用量,直到试纸在 15s 内变蓝为止,停止滴加亚硝酸钠溶液,接着在 0 $^{\circ}$ C 下搅拌 45min,得到 A 液。

[0045] ②制备 B 液:称取 30mg 的牛血清白蛋白溶于 6mL 的硼酸盐缓冲液(0.2M, pH8.8),得到 B 液。

[0046] ③在冰浴搅拌下,将 A 液逐滴地滴加到 B 液中,并用 1mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH,将 pH 保持在 8.5,冰浴下,搅拌反应 3h,得到包被抗原粗品;

[0047] ④将反应好的包被抗原移入透析袋中,用 0.01M、pH7.2 磷酸盐缓冲液透析 3 天,期间更换透析液 6-8 次,得到包被抗原:即半抗原-BSA 偶联物;

[0048] (3) 人工包被抗原的鉴定

[0049] ①鉴定:采用重氮化法合成的抗原时,由于蛋白质和小分子之间形成了氮氮三键,会使反应溶液呈现橘黄色,用紫外分光光度仪扫描时会在 340nm 形成一个新的吸收峰。因此,包被抗原紫外扫描图若在 340nm 处有新峰产生,说明偶联成功;否则说明偶联失败。

[0050] ②偶联比测定:采用分光光度法估算偶联物中两种分子的偶联比率。

[0051] 摩尔吸光系数 ϵ :配制半抗原(N-(3-苯氧基苯酰)-4-氨基-L-苯丙氨酸)浓度为 0, 10, 30, 50 $\mu\text{g/mL}$ 的水溶液,由紫外扫描的结果可知,半抗原的最大吸收波长为 285nm,每个浓度做 3 个平行样,摩尔吸光系数 ϵ 计算公式:

[0052] $\epsilon = \text{吸光值} / \text{摩尔浓度}$ 。本实验计算得 $\epsilon = 15069.36\text{L/mol}$ 。

[0053] 偶联物蛋白浓度测定:因为在包被抗原的制备过程中,蛋白溶液澄清。所以蛋白浓度的计算公式: $C=M/V$,其中,M为牛血清白蛋白的质量 mg;V为包被抗原透析后的体积 mL;C为包被抗原的蛋白浓度。通过计算可得,包被抗原的蛋白浓度为 3.65mg/mL。

[0054] 偶联比测定:配制 200 $\mu\text{g/mL}$ 牛血清白蛋白的水溶液;将包被抗原用水溶液稀释到 200 $\mu\text{g/mL}$,分别测定在 285nm 处测吸光值,测出的 200 $\mu\text{g/mL}$ 牛血清白蛋白的水溶液的吸光值为 A1,200 $\mu\text{g/mL}$ 包被抗原水溶液的吸光值为 A2,则偶联比率 r 为:

[0055] $r = ((A2 - A1) / \epsilon) / (200 \times 10^{-3} / 66200)$

[0056] 其中 ϵ 为摩尔吸光系数(L/mol),66200 为牛血清白蛋白的分子量。本实验计算得: $r \approx 19$ 。根据文献[杨利国,胡少旭等.酶免疫测定技术,南京大学出版社(第一版),1998:251.]报道,蛋白质和小分子的偶联比通常在 8-25 之间。

[0057] 实施例 2:

[0058] 1、包被板的制备

[0059] 采用 pH9.6、0.05M 碳酸盐缓冲液来稀释拟除虫菊酯类农药通用包被抗原,倍比稀释 6 个梯度,包被液按照每孔 100 μL 加入 96 孔酶标板中,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,用洗液(含 0.02%Tween20 的 0.01M PBS)洗涤,每次在吸水纸上拍干,重复四次。然后加入封闭液(含 0.2% 明胶的 pH9.6、0.05M 碳酸盐缓冲溶液)200 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱放置 2h,取出,用上述洗液洗四次后,37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱放置 15min,烘干后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

[0060] 2、拟除虫菊酯类农药标准品溶液的配制

[0061] 用正己烷配制 1mg/mL 的菊酯标准品溶液,置于棕色的玻璃瓶中,保存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。使用前,用正己烷将标准品稀释 10 倍,为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。量取 20 μL 置于玻璃瓶中,用氮气吹干,然后加入 0.5mL 的甲醇,震荡,将其溶解。接着加入 1.5mL 的 0.01M PBS,混匀,得到 1 $\mu\text{g/mL}$ 的菊酯标准品溶液,然后用 20% 甲醇-PBS 溶液倍比稀释 7 个梯度浓度。

[0062] 3、抗体溶液配制:用抗体稀释液(含 0.1% 明胶和 0.025%Tween20 的 0.01MPBS, pH7.2) 对抗体进行稀释,从 1000 倍开始,倍比稀释 8 个水平。

[0063] 4、用间接竞争酶联免疫法验证包被抗原

[0064] 4.1 按照棋盘法,在包好的酶标板中每孔加入 50 μL 20% 甲醇-PBS 溶液(或者标准品溶液),然后加入 50 μL 抗体溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 下,反应 30min,取出,用洗液洗 4 次,拍干。

[0065] 4.2 将 HRP 标记的羊抗鼠抗体用抗体稀释液稀释 3000 倍,按照每孔 100 μL 加入酶标板内。37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 30min,取出,用洗液洗 6 次,拍干。

[0066] 4.3 显色:底物 i 为含有双氧水的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液;底物 ii 为含有 3, 3', 5, 5'-四甲基对二氨基联苯(TMB)的乙二醇溶液。将底物 i 和底物 ii 按照质量比 5:1 比例混合,然后按照每孔 100 μL 加入,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱,显色 10-15min。

[0067] 4.4 终止:用 2mol/L 的 H_2SO_4 溶液按照每孔 50 μL 量加入,板内溶液颜色由蓝变黄。

[0068] 4.5 读数:用酶标仪在 450nm 波长下测定各孔吸光值(Abs 值)。然后以吸光值为纵

坐标,以菊酯标准品浓度的 Log 对数为横坐标绘制标准曲线。结果如图 3 所示,结果表明该通用包被抗原对抗体具有很好的亲和力,同时对氯氰菊酯,甲氰菊酯和顺氰戊菊酯的半数抑制浓度分别为 1.66ng/mL ;14.03ng/mL ;45.76ng/mL。

[0069] 实施例 3 :

[0070] 1 金纳米粒子和菊酯单克隆抗体的偶联:本发明使用的金纳米粒子(粒径:22-27nm)由本实验室合成。偶联拟除虫菊酯的群选性抗体到金纳米粒子表面的具体方法是:量取一定量的金纳米粒子溶液至小试管中,离心(8000rpm,10min),目的除去金纳米粒子溶液中柠檬酸三钠,用同样体积的超纯水重悬,随后将拟除虫菊酯类群选性抗体缓慢滴加入金纳米粒悬液中,室温震荡 2h,再滴加 1%BSA,使 BSA 的终浓度为 0.1%,室温震荡 2h,以封闭金纳米粒上未结合的位点,避免非特异性吸附。离心(7000rpm,8min),除去多余的抗体和 BSA,超纯水重悬,重复洗 2 次,最后将抗体标记好的金纳米粒,存放 4℃冰箱备用。使用时,则用定量加样装置将已经标记有拟除虫菊酯类抗体的金纳米粒加到结合垫上,每垫 10 ~ 15 μ L,再放入 37℃烘箱干燥 1h 备用,以组成试纸条。

[0071] 2 包被抗原和羊抗鼠二抗至硝酸纤维素膜(NC 膜):用喷膜仪将一定浓度的包被抗原和羊抗鼠喷载于硝酸纤维素膜(NC 膜)的检测线(T 线)和控制线(C 线)上,在 37℃烘箱中干燥 30min,备用。

[0072] 3 检测测试板的制作:分别将标记拟除虫菊酯类农药单克隆抗体的金纳米粒的结合垫、包被抗原和二抗的硝酸纤维素膜(NC 膜)、样品垫、吸水垫、组成检测试纸条。

[0073] 4 样品检测:将检测试纸条样品垫分别插入空白及添加标准样品的溶液(氯氰菊酯:0ng/mL,5ng/mL,10ng/mL,20ng/mL,40ng/mL,60ng/mL,80ng/mL;甲氰菊酯 0ng/mL,25ng/mL,50ng/mL,100ng/mL,200ng/mL,400ng/mL,600ng/mL;顺氰戊菊酯:0ng/mL,100ng/mL,200ng/mL,400ng/mL,600ng/mL,800ng/mL);样品溶液将通过层析作用从试纸条上流过,10min 后,测定空白溶液的试纸条出现两条红色的线,结果如图 4,5 和 6 所示,胶体金免疫层析试纸条检测氯氰菊酯的灵敏度达到了 50ng/mL,检测甲氰菊酯的灵敏度达到了 200ng/mL,检测顺氰戊菊酯的灵敏度达到了 400ng/mL。同时结果表明,采用合成的包被原制备的试纸条对多种菊酯农药均有识别力,完全可用于菊酯农药多残留的粗测。

[0074] 表 1 拟除虫菊酯类农药单克隆抗体对本发明的包被抗原效价的测定结果

[0075]

细胞编号	吸光值	工作浓度

[0076]

	(450nm)	包被原稀释倍数	腹水稀释倍数
3E9	1.35	1:4000	1:32000

[0077] 备注:拟除虫菊酯类农药的单克隆抗体由半抗原[氰基-3-(苯氧基苯酰-2,2,3,3-四甲基环丙烷)-羧酸偶联血蓝蛋白免疫小鼠产生的。

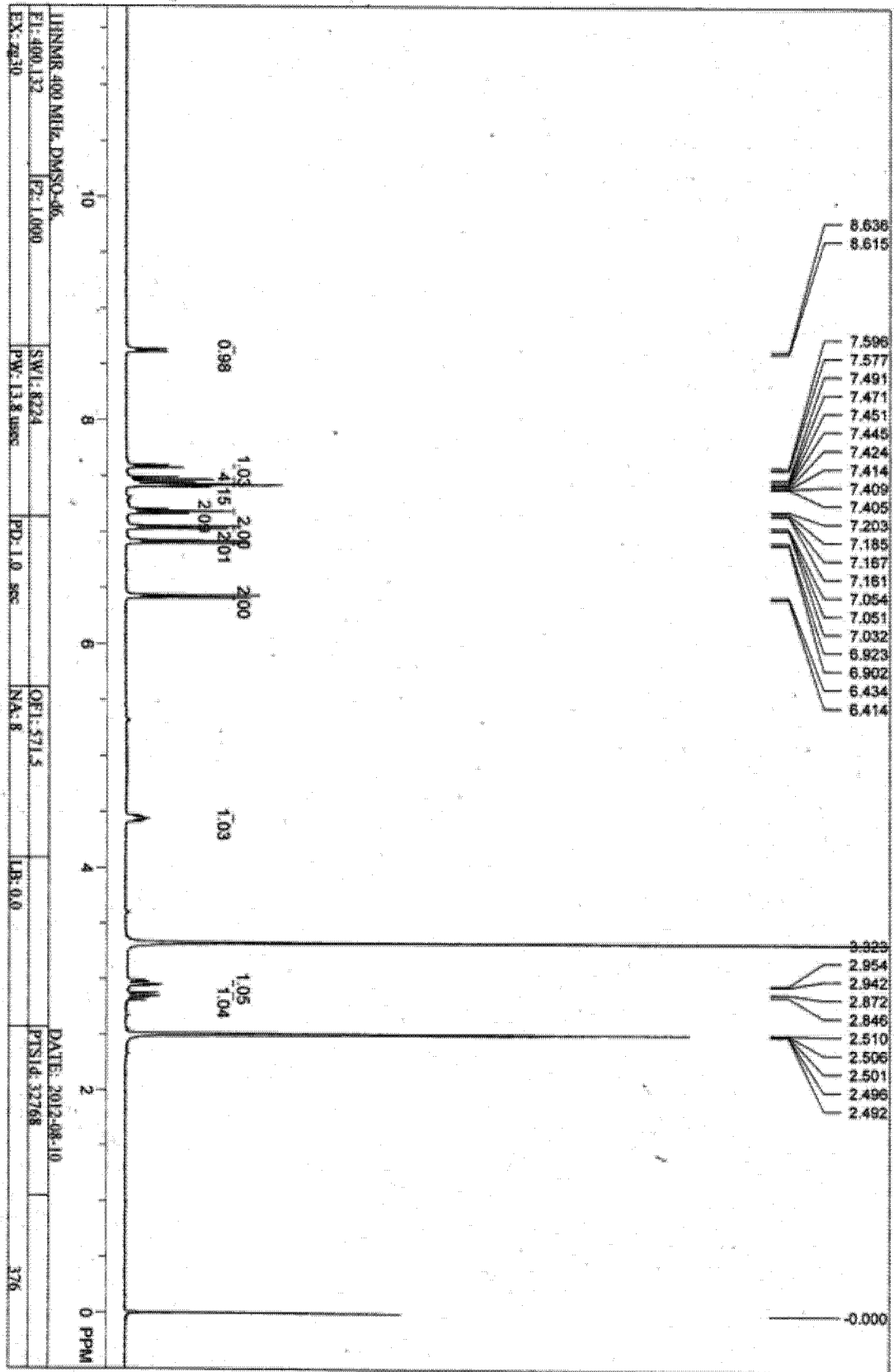


图 1

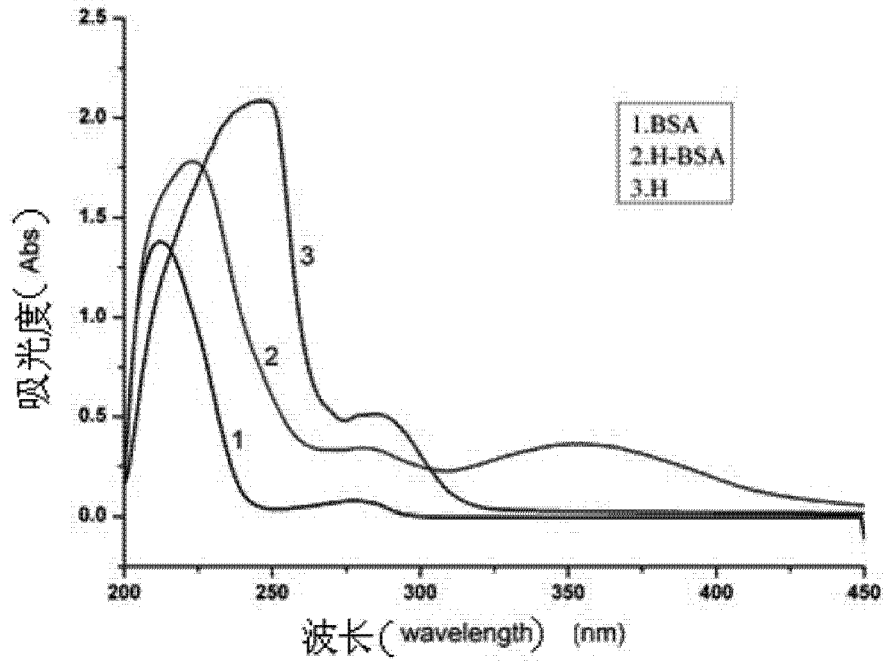


图 2

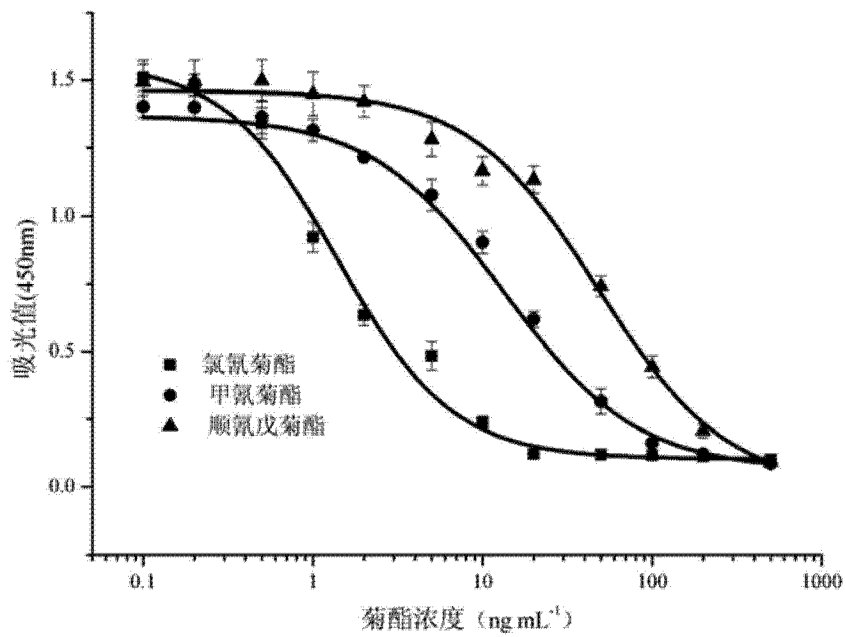


图 3

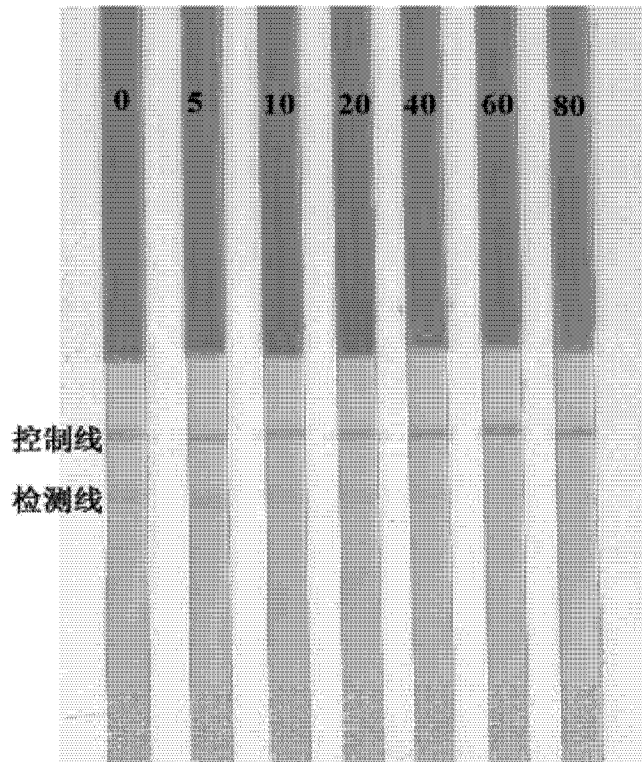


图 4

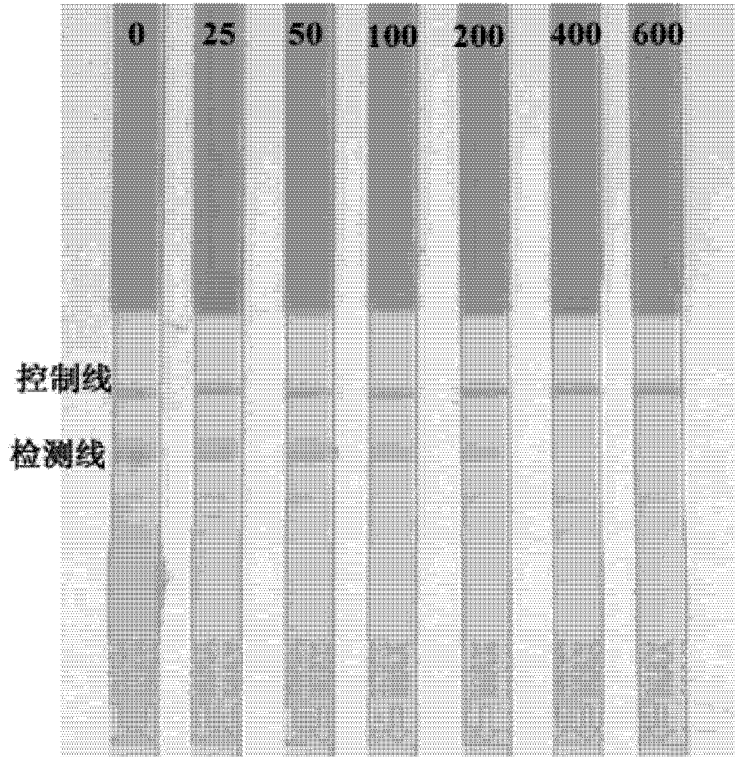


图 5

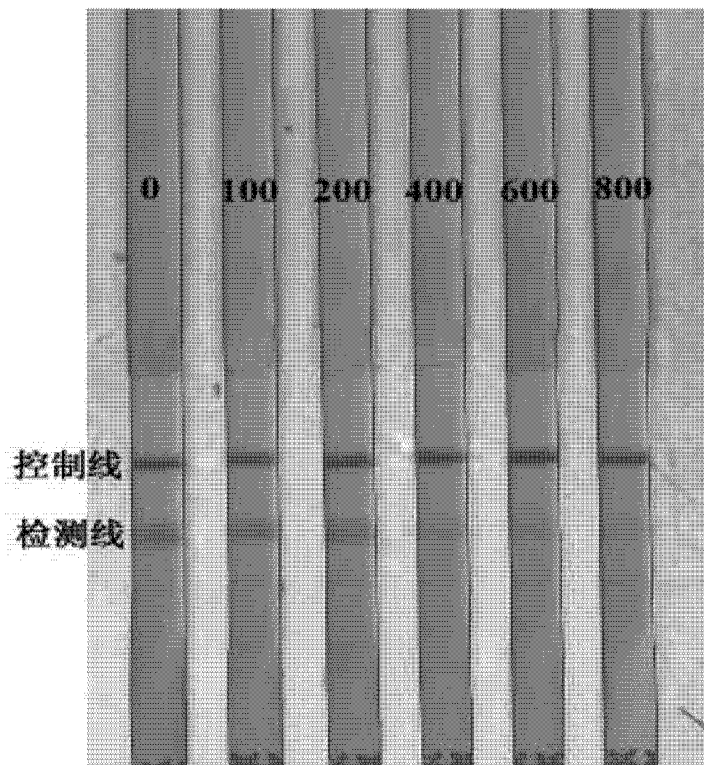


图 6

专利名称(译)	一种拟除虫菊酯类农药通用包被抗原的合成及应用		
公开(公告)号	CN103149351A	公开(公告)日	2013-06-12
申请号	CN201310093867.1	申请日	2013-03-21
[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 胥传来 徐利广 马丽萍 刘丽强 王利兵 丁利 马伟 宋姗姗		
发明人	匡华 陈秀金 胥传来 徐利广 马丽萍 刘丽强 王利兵 丁利 马伟 宋姗姗		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种拟除虫菊酯类农药通用包被抗原的合成及应用，属于生物化工技术领域。本发明以3-苯氧苯甲酸和对硝基苯丙氨酸为原料，经过2步化学反应，合成拟除虫菊酯类农药的通用包被半抗原，用重氮化法将其和载体蛋白牛血清白蛋白BSA偶联，用紫外分光光度法进行鉴定和估算偶联物的偶联比。合成的偶联物（包被抗原）用于酶联免疫分析和胶体金免疫层析试纸条的制备。通过酶联免疫分析和胶体金免疫层析试纸条的制备，证明本发明成功地合成了拟除虫菊酯类农药通用包被抗原，为人们建立拟除虫菊酯类农药的免疫分析方法提供了基础；同时也满足了国内对拟除虫菊酯类农药的快速检测的需求。

