



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107619440 A

(43)申请公布日 2018.01.23

(21)申请号 201710678469.4

(22)申请日 2017.08.10

(71)申请人 南昌大学

地址 330031 江西省南昌市红谷滩新区学
府大道999号

(72)发明人 郭岚 万益群 肖石妹 鄢爱平
柳英霞

(74)专利代理机构 南昌恒桥知识产权代理事务
所(普通合伙) 36125

代理人 杨志宇

(51)Int.Cl.

C07K 14/765(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

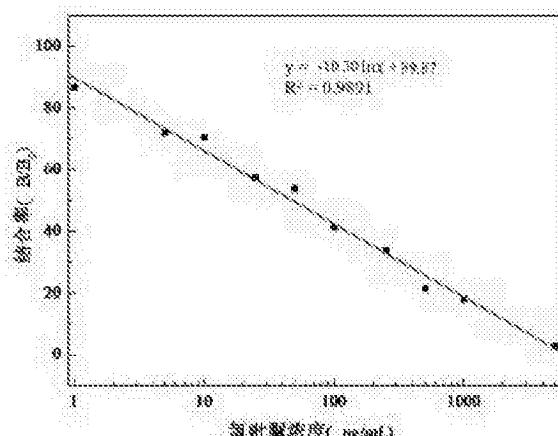
权利要求书2页 说明书7页 附图5页

(54)发明名称

一种氯吡脲人工抗原和多克隆抗体的制备
方法与应用

(57)摘要

本发明公开了氯吡脲人工抗原和多克隆抗体的制备方法及其应用。本发明克服了传统的理化分析方法繁琐复杂、成本较高、分析速度慢等问题，提供了简便、快速、灵敏的免疫分析技术。该制备方法包括以下几个主要步骤：第一步采用傅克反应合成人工氯吡脲半抗原。第二步以氯吡脲半抗原为原料，采用碳二亚酰法与牛血清蛋白进行偶联得到氯吡脲人工抗原。第三步用合成的人工抗原对新西兰大白兔进行免疫，取血，离心得到抗血清，即为抗氯吡脲多克隆抗体，该抗体具有良好的特异性和灵敏度，且合成方法简便，可用于氯吡脲的快速免疫检测，具有良好的应用价值。



1. 一种氯吡脲人工抗原和多克隆抗体的制备方法与应用, 其特征在于: 制备方法在于以下具体步骤:

(1) 氯吡脲半抗原的合成: 在无水三氯化铝的催化作用下, 氯吡脲与丁二酸酐发生傅克反应, 在氯吡脲的苯环上引入活性基团羧基和连接臂, 得到半抗原, 即氯吡脲半抗原;

(2) 氯吡脲全抗原的合成: 采用碳二亚酰法将氯吡脲半抗原与牛血清蛋白进行偶联, 得到免疫全抗原;

(3) 多克隆抗体的制备: 用合成的全抗原免疫动物, 取血, 离心得到抗血清, 即为氯吡脲多克隆抗体。

2. 如权利要求1所述的一种氯吡脲人工抗原和多克隆抗体的制备方法与应用, 其特征在于: 所述的动物优选为新西兰大白兔。

3. 如权利要求1所述的一种氯吡脲人工抗原和多克隆抗体的制备方法与应用一种氯吡脲人工抗原和多克隆抗体的制备方法与应用, 其特征在于: 具体的步骤如下:

(1) 氯吡脲半抗原的合成

采用无水二甲基甲酰胺(DMF)做溶剂, 氯吡脲(2.48 g)、丁二酸酐(1 g)、无水三氯化铝(6.68 g)按1:1:5的摩尔比进行投料, 将DMF(2 mL)逐滴加入到装有无水三氯化铝的烧瓶中, 不断搅拌使其充分溶解, 待瓶口不再有白雾冒出时放入油浴(200℃)中, 把氯吡脲和丁二酸酐的混合物加入到烧瓶中, 反应2 h后, 把反应液慢慢倒入90 mL冰水中, 加6 mL浓度为12 mol/L的浓盐酸, 冷却静置后过滤水洗, 得到粗品, 再用DMF/甲醇对粗品进行重结晶纯化, 得到淡粉色固体物质, 即为氯吡脲半抗原(CPPU-COOH);

(2) 氯吡脲免疫抗原的合成

准确称取CPPU-COOH 3.48 mg溶于200 μL DMF中, 加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 1.38 mg(另溶于200 μL DMF), 再加入2.88 mg溶解好的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)(另溶于300 μL DMF), 室温下振荡反应12 h, 得到溶液1; 称取6.8 mg BSA溶于2 mL 1×PBS中, 得到溶液2, 再将溶液1逐滴加入溶液2中, 边加边振荡, 冰浴振荡反应12 h, 反应混合物移入处理好的透析袋中, 用超纯水透析3 d, 每天换3次透析液, 即得到氯吡脲免疫抗原(CPPU-BSA), -20℃保存备用;

(3) 氯吡脲检测抗原的制备称取CPPU-COOH 3.48 mg溶于200 μL DMF中, 加入NHS 3.45 mg(溶于200 μL DMF), 再直接加入2.88 mg EDC(另溶于300 μL DMF), 室温振荡反应12 h, 得到溶液3; 称取4.5 mg 卵清蛋白(OVA)溶于1.8 mL 1×PBS中, 得到溶液4, 将溶液3与溶液4混匀后, 冰浴振荡反应12 h反应混合物移入处理好的透析袋中, 用超纯水透析3 d, 每天换3次透析液, 即得到氯吡脲检测抗原(CPPU-OVA), -20℃保存备用;

(4) 抗氯吡脲多克隆抗体的制备

用得到的氯吡脲免疫抗原对体重为1.5~2.5 kg的新西兰大白兔进行免疫, 每次免疫剂量均为200~300 μg/只, 第一次免疫采用弗氏完全佐剂与等体积的免疫抗原混合后乳化, 皮下注射8~10个部位, 之后每间隔3周加强免疫一次, 加强免疫采用弗氏不完全佐剂与等体积抗原乳化后背部皮下免疫5个点外, 增加注射两个肌肉位点, 从第3次加强免疫开始, 在免疫后的第七天耳缘静脉取血, 检测抗血清的效价和特异性, 当抗体的效价和特异性达到要求后, 颈动脉采血, 离心后获得抗血清, -20℃保存。

4. 一种氯吡脲人工抗原和多克隆抗体的应用, 其特征在于: 氯吡脲多克隆抗体在检测

水果中氯吡脲的应用。

5. 如权利要求4所述的一种氯吡脲人工抗原和多克隆抗体的应用,其特征在于:应用抗氯吡脲多克隆抗体检测脐橙中氯吡脲残留量的间接竞争酶联免疫方法具体如下:

1、样品前处理

称取10 g已匀浆好的脐橙样品于50 mL离心管中,再加入1 g氯化钠固体,20mL乙腈,涡旋震荡两分钟,将离心管置于冷水浴中冷却,缓慢加入6 g无水硫酸镁,用玻璃棒充分混匀搅拌,涡旋震荡,于4000 r/min离心5min;移取2 mL上清液于15 mL离心管中,再加入100 mgN-丙基乙二胺(PSA),100 mg C18,30 mg活性炭和100 mg无水硫酸镁,涡旋震荡2分钟,于4000 r/min离心5 min,准确移取1 mL上清液于10 mL离心管中,氮气吹干,用含10%甲醇1×PBS(pH=6)缓冲溶液定容至1 mL,即可进行酶联免疫测定;

2、间接竞争酶联免疫法

采用方正滴定法优化了检测抗原的最佳包被浓度,同时对ELISA条件中的氯吡脲标准溶液中有机溶剂浓度、抗血清稀释液的离子强度和pH值进行了优化,确定了最佳工作条件,具体如下:

(1) 抗原包被:用1×PBS稀释检测抗原到浓度为2 ug/mL,按照 100 μL/孔加入到 96孔酶标板孔中,做好标记,4 °C 湿盒过夜;

(2) 封闭:倾去反应液,PBST 洗涤液洗涤三次,取封闭液(1×PBS 含 5%脱脂奶粉)以150 μL/孔加入酶标板孔, 37 °C 湿盒孵育1.5小时;

(3) 一抗反应:倾去封闭液,用PBST 洗涤液洗涤三次,在每孔中先加入50 μL 1×PBS缓冲液,再加入50 μL氯吡脲标准溶液或样品溶液,然后加入50 μL 1:80000稀释的抗氯吡脲多克隆抗体工作液,稀释液为10×PBS缓冲液,pH=6.0,同时设置空白对照为PBS,37 °C保湿温育45 min;

(4) 二抗反应:倾去反应液,PBST 洗涤液洗涤三次,每孔加入 200μL的1:10000的HRP-羊抗兔 1gG 二抗,37°C 湿盒孵育1小时;

(5) 底物显色反应:倾去反应液,PBST 洗涤液洗涤三次,每孔加入TMB底物显色液 150 μL,室温反应20分钟;

(6) 终止反应:往酶标板孔中加入终止液(2N H₂SO₄),50 μL/孔;

(7) 测定:把酶标板正确放置在酶标仪上,检测每孔在 450nm处吸光值OD_{450nm}值。

一种氯吡脲人工抗原和多克隆抗体的制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种氯吡脲人工抗原和多克隆抗体的制备方法与应用，属于植物生长调节剂小分子化合物免疫化学和食品安全分析领域。

背景技术

[0002] 氯吡脲是一种高活性的植物生长调节剂，具有加速细胞有丝分裂、促进细胞的增大和分化、防止落花落果、促进果实膨大等作用，常用于脐橙、柑桔、猕猴桃、葡萄、西瓜、黄瓜等果蔬的农业生产中。残留于果蔬中的氯吡脲可能会对人类及其他生物造成潜在的威胁，美国环保署在《农药毒性确认和管理》中指出，长期接触氯吡脲会引起体内蛋白质代谢的紊乱，造成肺气肿和体型消瘦。各国制定对食品中氯吡脲的最大残留限量不同，范围为0.01~0.1 mg/kg，如澳大利亚规定猕猴桃中氯吡脲的最大残留限量为0.01 mg/kg，美国为0.04 mg/kg，欧盟为0.05 mg/kg，日本为0.1 mg/kg。我国食品安全国家标准GB2763-2014(食品中农药最大残留限量)规定食品中氯吡脲最大残留限量为黄瓜、西瓜、甜瓜≤0.1 mg/kg，猕猴桃、葡萄、橙、枇杷≤0.05 mg/kg。

[0003] 氯吡脲残留检测目前主要采用液相色谱法、气相色谱法或质谱分析方法等技术，存在检测成本高、周期长及操作繁琐复杂等问题，不适合大规模现场筛查，因此迫切要求发展简便、灵敏、特异性强、成本低廉的快速检测技术。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种氯吡脲人工抗原和多克隆抗体的制备方法，及提供抗氯吡脲多克隆抗体在检测氯吡脲中的应用。

[0005] 一种氯吡脲人工抗原和多克隆抗体的制备方法，是通过以下技术实现的：

(1) 氯吡脲半抗原的合成：在无水三氯化铝的催化作用下，氯吡脲与丁二酸酐发生傅克反应，在氯吡脲的苯环上引入活性基团羧基和连接臂，得到半抗原，即氯吡脲半抗原；

(2) 氯吡脲全抗原的合成：采用碳二亚酰法将氯吡脲半抗原与牛血清蛋白进行偶联，得到免疫全抗原；

(3) 多克隆抗体的制备：用合成的全抗原免疫动物，取血，离心得到抗血清，即为氯吡脲多克隆抗体。

[0006] 所述的动物优选为新西兰大白兔，利用上述方法制备的兔多克隆抗体

一种氯吡脲人工抗原和多克隆抗体的制备方法，具体的步骤如下：

1、氯吡脲半抗原的合成

采用无水二甲基甲酰胺(DMF)做溶剂，氯吡脲(2.48 g)、丁二酸酐(1 g)、无水三氯化铝(6.68 g)按1:1:5的摩尔比进行投料。将DMF(2 mL)逐滴加入到装有无水三氯化铝的烧瓶中，不断搅拌使其充分溶解，待瓶口不再有白雾冒出时放入油浴(200℃)中。把氯吡脲和丁二酸酐的混合物加入到烧瓶中，反应2 h后，把反应液慢慢倒入90 mL冰水中，加6 mL浓度为12 mol/L的浓盐酸，冷却静置后过滤水洗，得到粗品，再用DMF/甲醇对粗品进行重结晶纯

化,得到淡粉色固体物质,即为氯吡脲半抗原(CPPU-COOH) ;

2、氯吡脲免疫抗原的合成

准确称取CPPU-COOH 3.48 mg溶于200 μL DMF中,加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 1.38 mg(另溶于200 μL DMF),再加入2.88 mg溶解好的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)(另溶于300 μL DMF),室温下振荡反应12 h,得到溶液1;称取6.8 mg BSA溶于2 mL 1×PBS中,得到溶液2。再将溶液1逐滴加入溶液2中,边加边振荡,冰浴振荡反应12 h。反应混合物移入处理好的透析袋中,用超纯水透析3 d,每天换3次透析液,即得到氯吡脲免疫抗原(CPPU-BSA),-20℃保存备用;

3、氯吡脲检测抗原的制备

称取CPPU-COOH 3.48 mg溶于200 μL DMF中,加入NHS 3.45 mg(溶于200 μL DMF),再直接加入2.88 mg EDC(另溶于300 μL DMF),室温振荡反应12 h,得到溶液3;称取4.5 mg卵清蛋白(OVA)溶于1.8 mL 1×PBS中,得到溶液4。将溶液3与溶液4混匀后,冰浴振荡反应12 h。反应混合物移入处理好的透析袋中,用超纯水透析3 d,每天换3次透析液,即得到氯吡脲检测抗原(CPPU-OVA),-20℃保存备用;

4、抗氯吡脲多克隆抗体的制备

用得到的氯吡脲免疫抗原对体重为1.5~2.5 kg的新西兰大白兔进行免疫,每次免疫剂量均为200~300 μg/只,第一次免疫采用弗氏完全佐剂与等体积的免疫抗原混合后乳化,皮下注射8~10个部位,之后每间隔3周加强免疫一次,加强免疫采用弗氏不完全佐剂与等体积抗原乳化后背部皮下免疫5个点外,增加注射两个肌肉位点,从第3次加强免疫开始,在免疫后的第七天耳缘静脉取血,检测抗血清的效价和特异性,当抗体的效价和特异性达到要求后,颈动脉采血,离心后获得抗血清,-20℃保存。

[0007] 本发明所述的抗氯吡脲多克隆抗体在检测氯吡脲中的应用,其使用方法为间接竞争酶联免疫法,它所使用的试剂包括酶联免疫的常规试剂、酶标板和氯吡脲多克隆抗体。所述的酶标板是将氯吡脲半抗原与卵清蛋白通过碳二亚酰法偶联,将此偶联物作为包被原吸附于固相载体中而形成的。然后在酶标板上加入氯吡脲样品溶液和抗氯吡脲多克隆抗体工作液,样品中的氯吡脲就会与固相载体中的包被原竞争吸附有限的抗体。通过洗涤,将结合了样品中游离的氯吡脲的抗氯吡脲多克隆抗体洗去,再使用酶标二抗标记已经与包被原结合的抗体,显色后,测定吸光光度值,该值与样品中氯吡脲的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出氯吡脲的含量,应用本方法可以快速、灵敏、简便地检测样品中的氯吡脲残留,适用于大量样品的快速筛查。因此本发明的间接竞争酶联免疫方法具有使用方便和成本低廉的优点。

[0008] 应用抗氯吡脲多克隆抗体检测脐橙中氯吡脲残留量的间接竞争酶联免疫方法具体如下:

1、样品前处理

称取10 g已匀浆好的脐橙样品于50 mL离心管中,再加入1 g氯化钠固体,20mL乙腈,涡旋震荡两分钟,将离心管置于冷水浴中冷却,缓慢加入6 g无水硫酸镁,用玻璃棒充分混匀搅拌,涡旋震荡,于4000 r/min离心5min。移取2 mL上清液于15 mL离心管中,再加入100 mg N-丙基乙二胺(PSA),100 mg C18,30 mg活性炭和100 mg无水硫酸镁,涡旋震荡2分钟,于4000 r/min离心5 min,准确移取1 mL上清液于10 mL离心管中,氮气吹干。用含10%甲醇1×

PBS (pH=6) 缓冲溶液定容至1 mL, 即可进行酶联免疫测定;

2、间接竞争酶联免疫法

采用方正滴定法优化了检测抗原的最佳包被浓度, 同时对ELISA条件中的氯吡脲标准溶液中有机溶剂浓度、抗血清稀释液的离子强度和pH值进行了优化, 确定了最佳工作条件, 具体如下:

(1) 抗原包被: 用1×PBS稀释检测抗原到浓度为2 ug/mL, 按照 100 μL/孔加入到 96孔酶标板孔中, 做好标记, 4 °C 湿盒过夜, (2) 封闭: 倾去反应液, PBST 洗涤液洗涤三次, 取封闭液(1×PBS 含 5% 脱脂奶粉)以 150 μL/孔加入酶标板孔, 37 °C 湿盒孵育1.5小时, (3) 一抗反应: 倾去封闭液, 用PBST 洗涤液洗涤三次, 在每孔中先加入50 μL 1×PBS缓冲液, 再加入50 μL氯吡脲标准溶液或样品溶液, 然后加入50 μL 1:80000稀释的抗氯吡脲多克隆抗体工作液, 稀释液为10×PBS缓冲液, pH=6.0, 同时设置空白对照为PBS, 37 °C保湿温育45 min;

(4) 二抗反应: 倾去反应液, PBST 洗涤液洗涤三次, 每孔加入 200μL的1:10000的HRP-羊抗兔 IgG 二抗, 37°C 湿盒孵育1小时, (5) 底物显色反应: 倾去反应液, PBST 洗涤液洗涤三次, 每孔加入TMB底物显色液 150 μL, 室温反应20分钟。 (6) 终止反应: 往酶标板孔中加入终止液(2N H₂SO₄), 50 μL/孔, (7) 测定: 把酶标板正确放置在酶标仪上, 检测每孔在450nm处吸光值OD_{450nm}值。

[0009] 本发明的有益效果是:

利用本发明的间接竞争酶联免疫方法检测脐橙中的氯吡脲残留, 具有灵敏度高、特异性强、操作简单、对仪器设备要求低、成本低、无放射性同位素污染等优点, 有效填补水果中氯吡脲残留的快速检测方法的空白, 在日常食品安全快速检测领域里能够发挥重要作用。

附图说明

[0010] 图1: 氯吡脲半抗原的一级和二级质谱图a. ES1⁺; b. ES1⁻; c. ES1⁺-MS²; d. ES1⁻-MS²。

[0011] 图2: 氯吡脲的核磁共振图谱。

[0012] 图3: 氯吡脲半抗原的核磁共振图谱。

[0013] 图4: 人工免疫抗原紫外扫描光谱图a. CPPU-BSA; b. CPPU-COOH; c. BSA。

[0014] 图5: 人工包被抗原紫外扫描光谱图a. CPPU-OVA; b. CPPU-COOH; c. OVA。

[0015] 图6: 载体蛋白和人工抗原的质谱图a.BSA; b. OVA; c. CPPU-BSA; d. CPPU-OVA。

[0016] 图7: 氯吡脲的间接竞争ELISA标准抑制曲线。

具体实施方式

[0017] 实施例: 一种氯吡脲人工抗原和多克隆抗体的制备方法, 具体的步骤如下:

(一) 氯吡脲半抗原的合成

采用无水二甲基甲酰胺(DMF)做溶剂, 氯吡脲(2.48 g)、丁二酸酐(1 g)、无水三氯化铝(6.68 g)按1:1:5的摩尔比进行投料。将DMF(2 mL)逐滴加入到装有无水三氯化铝的烧瓶中, 不断搅拌使其充分溶解, 待瓶口不再有白雾冒出时放入油浴(200 °C)中。把氯吡脲和丁二酸酐的混合物加入到烧瓶中, 反应2 h后, 把反应液慢慢倒入90 mL冰水中, 加6 mL浓度为

12 mol/L的浓盐酸,冷却静置后过滤水洗,得到粗品,再用DMF/甲醇对粗品进行重结晶纯化,得到淡粉色固体物质,即为氯吡脲半抗原(CPPU-COOH);

2、氯吡脲免疫抗原的合成

准确称取CPPU-COOH 3.48 mg溶于200 μL DMF中,加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 1.38 mg(另溶于200 μL DMF),再加入2.88 mg溶解好的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)(另溶于300 μL DMF),室温下振荡反应12 h,得到溶液1;称取6.8 mg BSA溶于2 mL 1×PBS中,得到溶液2。再将溶液1逐滴加入溶液2中,边加边振荡,冰浴振荡反应12 h。反应混合物移入处理好的透析袋中,用超纯水透析3 d,每天换3次透析液,即得到氯吡脲免疫抗原(CPPU-BSA),-20℃保存备用;

3、氯吡脲检测抗原的制备

称取CPPU-COOH 3.48 mg溶于200 μL DMF中,加入NHS 3.45 mg(溶于200 μL DMF),再直接加入2.88 mg EDC(另溶于300 μL DMF),室温振荡反应12 h,得到溶液3;称取4.5 mg卵清蛋白(OVA)溶于1.8 mL 1×PBS中,得到溶液4。将溶液3与溶液4混匀后,冰浴振荡反应12 h。反应混合物移入处理好的透析袋中,用超纯水透析3 d,每天换3次透析液,即得到氯吡脲检测抗原(CPPU-OVA),-20℃保存备用;

4、抗氯吡脲多克隆抗体的制备

用得到的氯吡脲免疫抗原对体重为2.0 kg的新西兰大白兔进行免疫,每次免疫剂量均为250 μg/只,第一次免疫采用弗氏完全佐剂与等体积的免疫抗原混合后乳化,皮下注射9个部位,之后每间隔3周加强免疫一次,加强免疫采用弗氏不完全佐剂与等体积抗原乳化后背部皮下免疫5个点外,增加注射两个肌肉位点,从第3次加强免疫开始,在免疫后的第七天耳缘静脉取血,检测抗血清的效价和特异性,当抗体的效价和特异性达到要求后,颈动脉采血,离心后获得抗血清,-20℃保存。

[0018] (二)应用抗氯吡脲多克隆抗体检测脐橙中氯吡脲残留量的间接竞争酶联免疫方法具体步骤如下: 1、样品前处理:

称取10g已匀浆好的脐橙样品于50mL离心管中,再加入1g氯化钠固体,20mL乙腈,涡旋震荡两分钟,将离心管置于冷水浴中冷却,缓慢加入6g无水硫酸镁,用玻璃棒充分混匀搅拌,涡旋震荡,于4000r/min离心5min。移取2mL上清液于15mL离心管中,再加入100mg N-丙基乙二胺(PSA),100mg C18,30mg 活性炭和100mg 无水硫酸镁,涡旋震荡2分钟,于4000r/min离心5min,准确移取1mL上清液于10mL离心管中。氮气吹干。用含10%甲醇1×PBS(pH=6)缓冲液定容至1mL,进行酶联免疫测定;

2、间接竞争酶联免疫法:

采用方正滴定法测定了检测抗原的最佳包被浓度(见表1),同时对ELISA条件中的氯吡脲标准溶液中有机溶剂用量、抗血清稀释液的离子强度和pH值进行了实验(见表2),确定工作条件,具体如下:

(1) 取96孔酶标板,每孔加入2.0 μg/mL检测抗原CPPU-OVA(PBS 稀释)100 μL,4℃湿盒过夜;

(2) 倾去包被液,PBST 洗板三次,取封闭液(1×PBS 含 5% 脱脂奶粉)以 150μL/孔加入酶标板孔,37℃ 湿盒孵育1.5 小时;

(3) 倾去封闭液,PBST 洗涤液洗涤三次,在每孔中首先加入 50 μL PBS 缓冲液,再加

入50 μL 1:80000稀释的抗氯吡脲多克隆抗体工作液,稀释液为10×PBS缓冲液,pH=6.0,设置空白对照(PBS),37 $^{\circ}\text{C}$ 保湿封闭45 min;

(4)倾去反应液,PBST洗板三次,每孔加入100 μL 1:1000稀释的羊抗兔 IgG-HRP,37 $^{\circ}\text{C}$ 保湿30 min。(5)倾去反应液,PBST洗涤液洗涤三次,每孔加入150 μL 新鲜配制的TMB底物显色液,室温反应20分钟。(6)每孔加入50 μL 终止液(2mol/L H₂SO₄)终止反应,轻轻摇匀,用酶标仪检测每孔在波长450nm处OD_{450nm}值。

[0019] 其中:氯吡脲标准溶液(溶解在含10%甲醇的1×PBS缓冲溶液中)

10×PBS(0.1 M ,pH 7.4):NaCl 80 g,KH₂PO₄ 2 g,Na₂HPO₄•12H₂O 29 g,KCl 2 g,蒸馏水定容至1000 mL。

[0020] 1×PBS(10×PBS稀释十倍配制)。

[0021] PBST:1×PBS 1L,Tween-20 0.5 mL,混匀后使用(现配现用)。

[0022] 终止液(2 mol/L H₂SO₄):取20mL浓硫酸(质量分数为98 %),加入160 mL蒸馏水中。

[0023] 表1 方正滴定法确定检测抗原(CPPU-OVA)最佳工作浓度。

抗体稀释度	CPPU-OVA 浓度浓度 ($\mu\text{g/mL}$)				
	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
1:2500	5.412	5.623	5.471	5.702	5.925
1:5000	4.381	4.772	4.630	4.714	4.845
1:10000	3.547	3.869	3.967	4.023	4.216
1:20000	2.743	2.995	2.984	3.001	3.004
1:40000	1.987	2.036	2.048	2.126	2.264
1:80000	1.597	1.638	1.750	1.802	1.852
1:160000	0.812	0.972	1.041	1.207	1.334
1:320000	0.358	0.439	0.781	0.823	0.912
空白	0.032	0.055	0.047	0.062	0.059

[0024] 表2 有机溶剂用量,离子强度和pH对ELISA灵敏度的影响。

影响因素	IC ₅₀ (ng/mL)	线性相关系数(R ²)
甲醇含量(%)		
5	38	0.872
10	53	0.958
20	65	0.969
30	85	0.955
离子强度(以1×PBS的浓度倍数计)		
1	81	0.987
3	76	0.979

6	72	0.978
8	67	0.981
10	56	0.989
pH值		
4	113	0.868
5	92	0.914
6	48	0.9891
7	58	0.951
8	123	0.927

[0025] 试验例1:抗氯吡脲间接竞争ELISA标准曲线实验:

氯吡脲标准溶液的配置:将氯吡脲标准品溶于含10 %甲醇的1×PBS缓冲溶液中,配成浓度分别为5000、1000、500、250、100、50、25、10、5、1、0 ng/mL的氯吡脲标准溶液,

在含有包被原的酶标板的小孔中分别加入上述氯吡脲标准溶液50 μ L,再分别加入抗氯吡脲多克隆抗体工作液50 μ L,37 °C湿盒孵育45 min,用洗涤液洗板,再用吸水纸吸干。在酶标板的小孔中加入酶标二抗溶液100 μ L,37 °C保湿30 min,用洗涤液洗涤,拍干。加入TMB底物显色液150 μ L于酶标板的小孔中,室温反应20 min,加入终止液50 μ L,轻轻震荡摇匀,然后用酶标仪检测每孔在波长450 nm下的吸光值(OD_{450 nm}),每个浓度重复测定3次。

[0026] 检测结果分析过程为:用所获得的每个浓度的标准溶液的吸光平均值(B)除以不含氯吡脲的溶液(0标准)的吸光度值(B₀)再乘以100%,即抗体与抗原的结合率,计算公式为:抗原与抗体的结合率(%)=(B/B₀) × 100%式中B为氯吡脲标准溶液的平均吸光度值, B₀为氯吡脲浓度为0 ng/mL标准溶液的平均吸光度值。以氯吡脲标准品溶液的浓度值为X轴,结合率为Y轴,作标准曲线,如图7所示,其回归方程为y= -10.301n(C)+89.87 ($R^2=0.9891$),1C₅₀为48 ng/mL,检测范围(1C₂₀ -1C₈₀)为2.6-880 ng/mL,最低检出限(1C₁₀)为1 ng/mL用同样的方法测得样品溶液的结合率,从回归方程中计算出样品中氯吡脲的含量。

[0027] 试验例2:准确度和精密度实验

取不同浓度的氯吡脲标准溶液添加到脐橙样品中,对样品进行加标回收实验,每个浓度做6个平行,计算平均回收率和相对标准偏差,结果见表3。

[0028] 表3 样本中加标回收率(n=6)

样品	加标量 (μ g/kg)	回收量 (μ g/kg)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
脐橙	250	252.11	100.8	3.6
	100	100.26	100.3	4.9
	50	48.84	97.7	4.1
	10	11.09	110.9	0.9

由表可见,脐橙样品中的平均回收率在97.7%~110.9 %,相对标准偏差均低于5 %,说

明本方法具有良好的准确度和精密度。

[0029] 实验例3:抗体特异性实验

选择与氯吡脲结构相似的敌草隆、利谷隆、绿麦隆、毒莠定、二氯吡啶酸,配制成不同浓度的标准溶液系列,替代氯吡脲标准溶液,测定其标准曲线,并计算 IC_{50} 抑制浓度,得出交叉反应率(CR(%)),结果见表4。

$$[0030] CR(\%) = (IC_{50} \text{时氯吡脲的浓度} / IC_{50} \text{时类似物的浓度}) \times 100\%$$

表4 氯吡脲及其类似物的交叉反应

化合物	化学结构	IC_{50} (ng/mL)	CR (%)
氯吡脲		48	100
敌草隆		>5000	<0.96
利谷隆		>5000	<0.96
绿麦隆		>5000	<0.96
毒莠定		>5000	<0.96
二氯吡啶酸		>5000	<0.96

结果表明,抗氯吡脲多克隆抗体与其他类似物几乎不会结合,交叉反应率均很小。说明该抗体对氯吡脲具有很高的特异性。

[0031] 利用本发明的间接竞争酶联免疫方法检测脐橙中的氯吡脲残留,具有灵敏度高、特异性强、操作简单、对仪器设备要求低、成本低、无放射性同位素污染等优点,有效填补水果中氯吡脲残留的快速检测方法的空白,在日常食品安全快速检测领域里能够发挥重要作用。

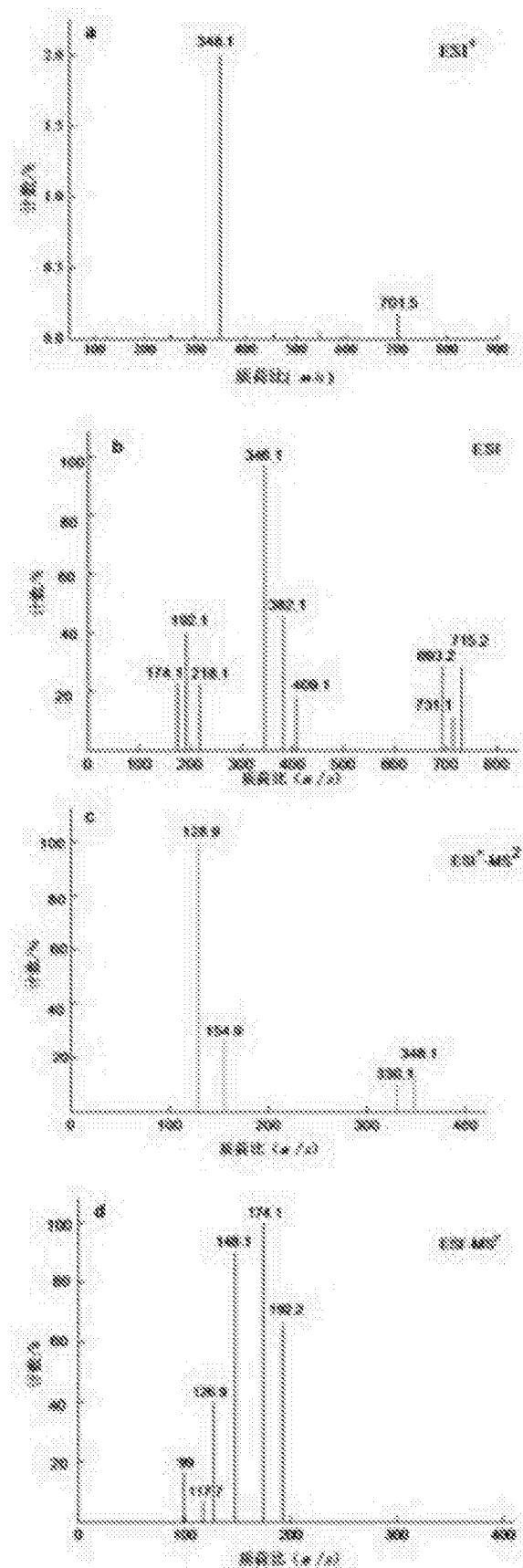


图1

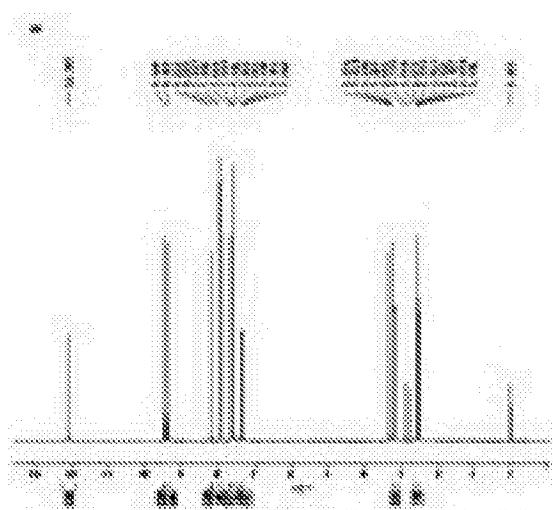


图2

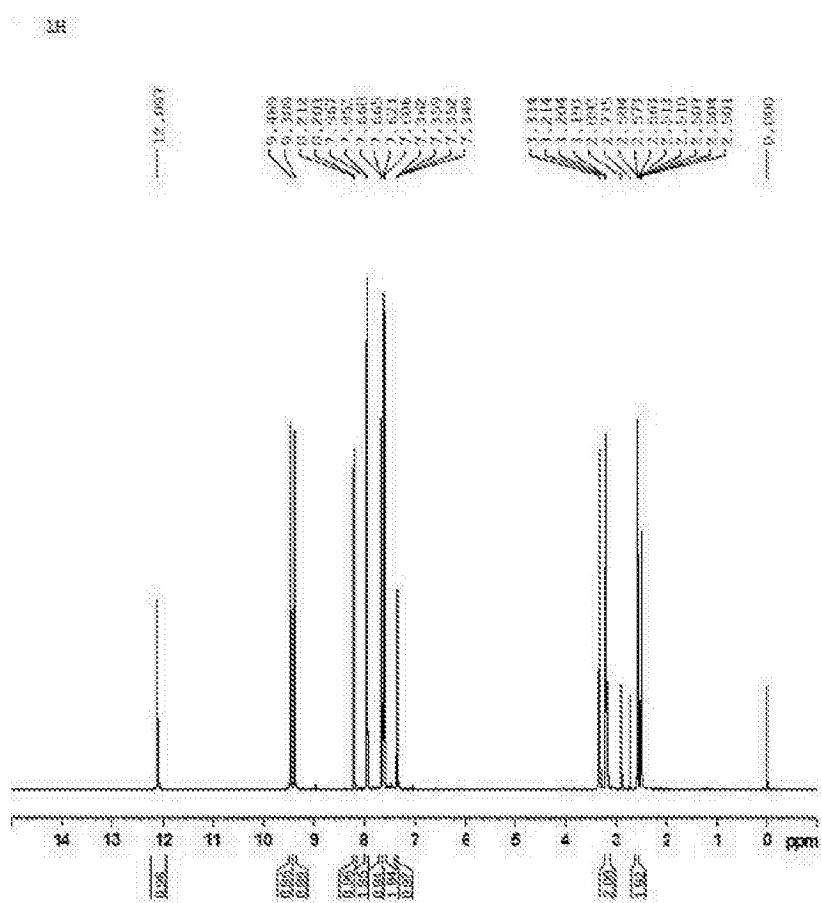


图3

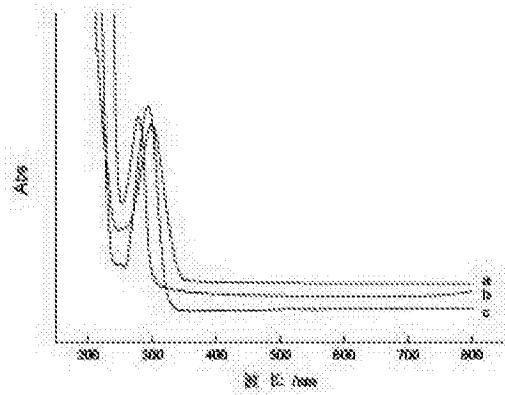


图4

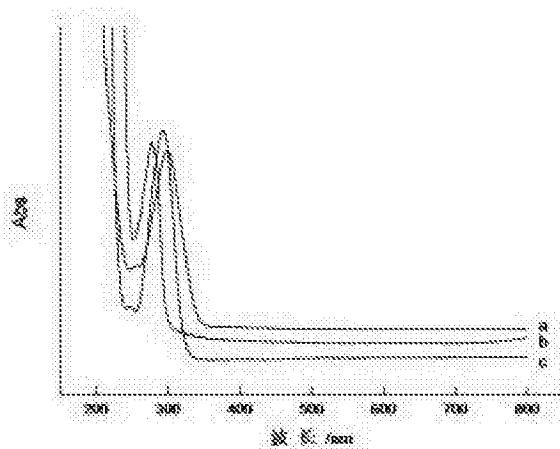


图5

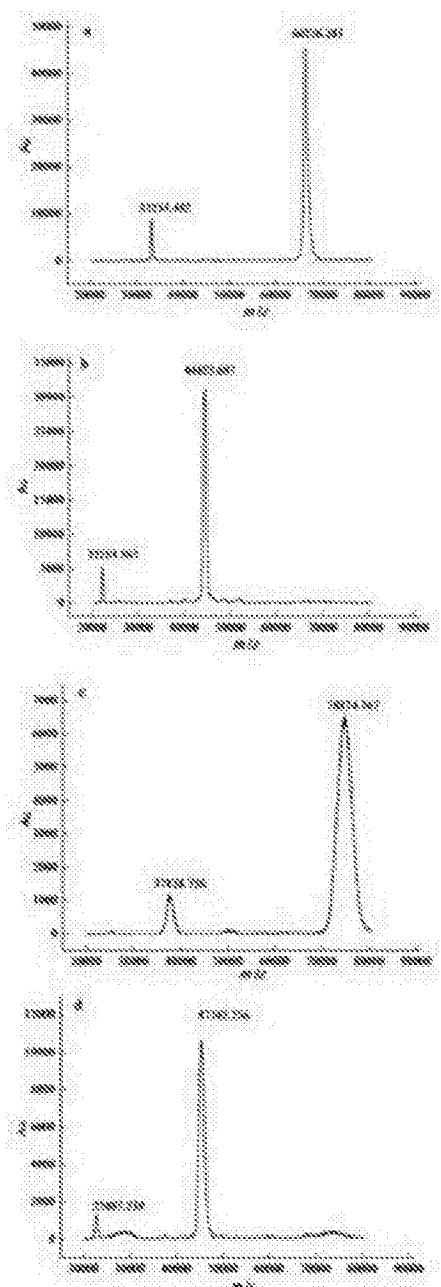


图6

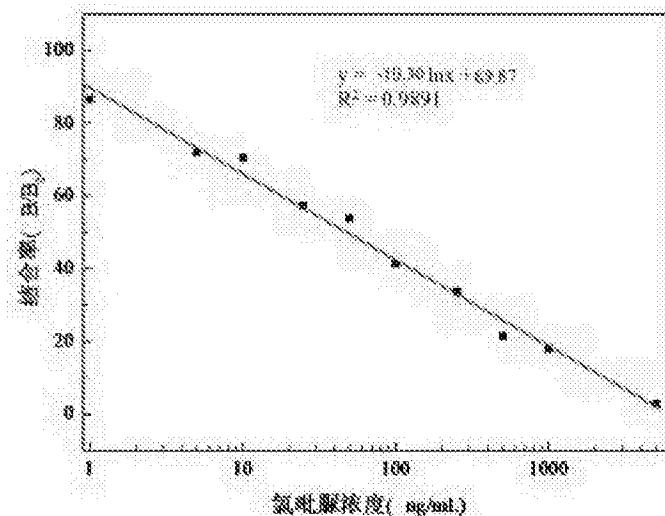


图7

专利名称(译)	一种氯吡脲人工抗原和多克隆抗体的制备方法与应用		
公开(公告)号	CN107619440A	公开(公告)日	2018-01-23
申请号	CN201710678469.4	申请日	2017-08-10
[标]申请(专利权)人(译)	南昌大学		
申请(专利权)人(译)	南昌大学		
当前申请(专利权)人(译)	南昌大学		
[标]发明人	郭岚 万益群 肖石妹 鄢爱平 柳英霞		
发明人	郭岚 万益群 肖石妹 鄢爱平 柳英霞		
IPC分类号	C07K14/765 C07K16/44 G01N33/535 G01N33/543		
代理人(译)	杨志宇		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了氯吡脲人工抗原和多克隆抗体的制备方法及其应用。本发明克服了传统的理化分析方法繁琐复杂、成本较高、分析速度慢等问题，提供了简便、快速、灵敏的免疫分析技术。该制备方法包括以下几个主要步骤：第一步采用傅克反应合成人工氯吡脲半抗原。第二步以氯吡脲半抗原为原料，采用碳二亚酰法与牛血清蛋白进行偶联得到氯吡脲人工抗原。第三步用合成的人工抗原对新西兰大白兔进行免疫，取血，离心得到抗血清，即为抗氯吡脲多克隆抗体，该抗体具有良好的特异性和灵敏度，且合成方法简便，可用于氯吡脲的快速免疫检测，具有良好的应用价值。

