



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105294862 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 03

(21) 申请号 201510823454. 3

(22) 申请日 2015. 11. 23

(71) 申请人 天津科技大学

地址 300457 天津市河西区大沽南路 1038 号

(72) 发明人 刘冰 冯久慧 王硕

(74) 专利代理机构 北京金智普华知识产权代理有限公司 11401

代理人 李明卓

(51) Int. Cl.

C07K 16/44(2006. 01)

C07K 1/34(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

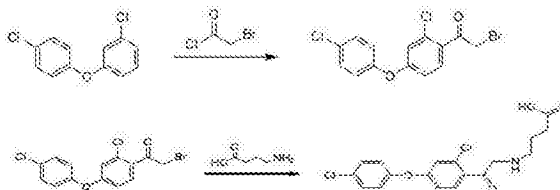
权利要求书3页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种高特异性苯醚甲环唑多克隆抗体的制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种高特异性苯醚甲环唑多克隆抗体的制备方法,属于免疫分析技术。所述多克隆抗体是由苯醚甲环唑半抗原与载体蛋白结合,免疫动物制成,所述苯醚甲环唑半抗原由3,4'-二氯二苯醚和溴代乙酰氯反应制得中间体,然后连接4-氨基丁酸制成。本发明制备的苯醚甲环唑多克隆抗体具有较高的特异性,填补了苯醚甲环唑高特异性多克隆抗体制备研究方向的空白。



1. 一种高特异性苯醚甲环唑多克隆抗体的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:

1) 苯醚甲环唑半抗原的制备:

称取 6.0 ~ 7.5g [BMIM]Cl 加入干燥的三口烧瓶中,向其中缓缓加入 12.5 ~ 13.5g 无水三氯化铁固体,在氮气保护下反应过夜,得到 [BMIM]Cl-FeCl<sub>3</sub> 离子液体;在反应好的离子液体中直接加入 8.5 ~ 12.0mL 3,4'-二氯二苯醚,5.5 ~ 8.0mL 溴代乙酰氯,装上冷凝管,在冷凝管顶部装上氯化钙吸水装置,于 50 ~ 80°C 下加热回流反应 3 ~ 6h,反应结束后将反应体系转入到烧杯中,用环己烷提取产物,将提取液于 30 ~ 60°C 旋干;以石油醚和乙酸乙酯为展开剂将上述产物通过硅胶柱进行分离纯化,得到中间体 2-溴-1-(2-氯-4-(4-氯苯氧基)苯基)乙酮;分别称取 8.5 ~ 10.0mg 4-氨基丁酸,4.5 ~ 6.0mg 碳酸氢钠,8.5 ~ 12.5mg 碘化钾,放入圆底烧瓶中,加入 0.5 ~ 1.0mL 水使其溶解,再加入 20.0 ~ 30.0mg 中间体 2-溴-1-(2-氯-4-(4-氯苯氧基)苯基)乙酮的 DMF 溶液,60 ~ 60°C 加热回流反应 3 ~ 6h;然后加入丙酮共沸,旋蒸除去 DMF,混合物用乙酸乙酯和水多次萃取后,收集有机相并旋干乙酸乙酯,得到淡黄色粘稠液体,即为苯醚甲环唑半抗原;

2) 苯醚甲环唑半抗原与载体蛋白偶联制备免疫原:

称取 10.0 ~ 20.0mg 步骤 1) 制备的半抗原溶于 200 ~ 500 μL N,N-二甲基甲酰胺中,加入 6.1 ~ 7.0mg N-羟基琥珀酰亚胺和 11.5 ~ 12.6mg N,N-二环己基碳二亚胺,室温搅拌 16 ~ 24h 后,有浑浊物产生,离心除去沉淀,取上清液 100 ~ 400 μL 缓慢加入到 1 ~ 4mL 溶有 15 ~ 30mg 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液中,在室温下反应 3 ~ 6h 后将反应液移入透析袋中,在 4°C 下,浸入磷酸盐缓冲液中透析三天,得到免疫原 1,即 Hapten-BSA;取上述上清液 20 ~ 100 μL 缓慢加入到 1 ~ 4mL 溶有 15 ~ 30mg 钥孔血蓝蛋白的磷酸盐缓冲液中,在室温下反应 3 ~ 6h 后将反应液移入透析袋中,在 4°C 下,浸入磷酸盐缓冲液中透析三天,得到免疫原 2,即 Hapten-KLH;

3) 以混合酸酐法制备包被原:

称取 8.0 ~ 10.0mg 步骤 1) 制备的半抗原,溶于 200 ~ 500 μL N,N-二甲基甲酰胺中,4°C 预冷,加入 4 ~ 6 μL 三正丁胺,反应 8 ~ 15min 后,再加入 1 ~ 4 μL 氯甲酸异丁酯,于冰水浴中搅拌反应 0.5 ~ 2.0h;称取 8.0 ~ 12.0mg 鸡卵白蛋白溶解于 2 ~ 5mL 碳酸盐缓冲液中,搅拌下缓慢加入上述反应液,4°C 反应过夜后将反应液移入透析袋中,在 4°C 下,浸入磷酸盐缓冲液中透析三天,即可得到包被原;

4) 免疫动物,制得苯醚甲环唑多克隆抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的一种高特异性苯醚甲环唑多克隆抗体的制备方法,其特征在于:步骤 1) 中,称取 6.66g [BMIM]Cl 加入干燥的 100mL 三口烧瓶中,向其中缓缓加入 12.675g 无水三氯化铁固体,在氮气保护下反应过夜,得到 [BMIM]Cl-FeCl<sub>3</sub> 离子液体;在反应好的离子液体中直接加入 10mL 3,4'-二氯二苯醚,7mL 溴代乙酰氯,装上冷凝管,在冷凝管顶部装上氯化钙吸水装置,于 60°C 下加热回流反应 5h,反应结束后将反应体系转入到烧杯中,用环己烷提取产物,将提取液于 45°C 旋干;以石油醚和乙酸乙酯为展开剂将上述产物通过硅胶柱进行分离纯化,得到中间体 2-溴-1-(2-氯-4-(4-氯苯氧基)苯基)乙酮;分别称取 6.73mg 4-氨基丁酸,5mg 碳酸氢钠,10mg 碘化钾,放入 50mL 圆底烧瓶中,加入 800 μL 水使其溶解,加入 22.62mg 中间体 2-溴-1-(2-氯-4-(4-氯苯氧基)苯基)乙酮的 4mL DMF 溶液,70°C 加热回流反应 5h,然后加入丙酮共沸,旋蒸除去 DMF,混合物用乙酸乙酯

和水多次萃取后,收集有机相并旋干乙酸乙酯,得到淡黄色粘稠液体,即为苯醚甲环唑半抗原。

3. 根据权利要求 1 所述的一种高特异性苯醚甲环唑多克隆抗体的制备方法,其特征在于:步骤 2) 中,称取 15mg 步骤 1) 制备的半抗原溶于 300  $\mu$ L N,N-二甲基甲酰胺中,加入 6.78mg N-羟基琥珀酰亚胺和 12.16mg N,N-二环己基碳二亚胺,室温搅拌 18h 后,有浑浊物产生,5000rpm 离心 10min 除去沉淀,取上清液 200  $\mu$ L 缓慢加入到 2mL 溶有 20mg 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液中,在室温下反应 4h 后将反应液移入透析袋中,在 4 $^{\circ}$ C 下,浸入磷酸盐缓冲液中透析三天,得到免疫原 1,即 Hapten-BSA;取上述上清液 40  $\mu$ L 缓慢加入到 2mL 溶有 20mg 钥孔血蓝蛋白的磷酸盐缓冲液中,在室温下反应 4h 后将反应液移入透析袋中,在 4 $^{\circ}$ C 下,浸入磷酸盐缓冲液中透析三天,得到免疫原 2,即 Hapten-KLH。

4. 根据权利要求 1 所述的一种高特异性苯醚甲环唑多克隆抗体的制备方法,其特征在于:步骤 3) 中,称取 8.5mg 步骤 1) 制备的半抗原,溶于 300  $\mu$ L N,N-二甲基甲酰胺中,4 $^{\circ}$ C 预冷,加入 5.26  $\mu$ L 三正丁胺,反应 10min 后,再加入 2.6  $\mu$ L 氯甲酸异丁酯,于冰水浴中搅拌反应 1h。称取 10mg 鸡卵白蛋白溶解于 3ml 碳酸盐缓冲液中,搅拌下缓慢加入上述反应液,4 $^{\circ}$ C 反应过夜后将反应液移入透析袋中,在 4 $^{\circ}$ C 下,浸入磷酸盐缓冲液中透析三天,即可得到包被原。

5. 根据权利要求 1 所述的一种高特异性苯醚甲环唑多克隆抗体的制备方法,其特征在于:步骤 4) 中,免疫过程包括如下步骤;

实验采用 4 只新西兰大白兔,雄性,月龄 3 个月,体重 1.5 公斤左右,按免疫原种类进行编号,两种免疫原 Hapten-BSA 和 Hapten-KLH 各免疫两只动物作为平行对照,饲养于标准实验动物房,连续观察一周,确定其状态良好后,开始进行免疫,实验采用多点皮下注射法进行免疫;

两种免疫原 Hapten-BSA 和 Hapten-KLH 各取 1mg 分别溶于 1mL 新鲜配置的生理盐水中,与相同体积的弗氏完全佐剂乳化后进行初次免疫;两种免疫原 Hapten-BSA 和 Hapten-KLH 各取 1mg 分别溶于 1mL 新鲜配置的生理盐水中,再与等体积弗氏不完全佐剂乳化后用于加强免疫;首次免疫两周后进行第一次加强免疫,此后每两周再进行一次加强免疫;分别于第三、四次免疫后 8-10 天后,由兔子的耳静脉采血,利用间接竞争 ELISA 进行抗血清效价和特异性的测定;第五次免疫后的 8-10 天股动脉采全血,前一天实验动物需禁食,但要保证饮水供应充足,采得的全血经 4 $^{\circ}$ C,10000r/min 离心处理后收集全部血清,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

6. 一种使用权利要求 1~5 任一权利要求所述的一种高特异性苯醚甲环唑多克隆抗体的制备方法制备的抗体用于苯醚甲环唑多克隆抗体效价及亲和性的测定方法,其特征在于:包括如下步骤,

1) 包被,先用碳酸盐缓冲液稀释待包被的包被原,把稀释好的包被原稀释液加入到酶标板的微孔中,每孔添加 50~150  $\mu$ L 稀释液,加完后把酶标板置于 20~40 $^{\circ}$ C 条件下反应 2~5h 后,弃去孔中液体,向酶标板中加入 200~300  $\mu$ L 洗涤液 PBST 缓冲液,在震荡器上震荡 1~3min,弃去洗涤液,即为洗板 1 次,重复洗板 2~5 次;优选的,把稀释好的包被原稀释液加入酶标板的微孔中,每微孔添加 100  $\mu$ L;加完后把酶标板置于 37 $^{\circ}$ C 条件下反应 3h,弃去孔中液体,向酶标板中加入 250  $\mu$ L 的洗涤液 PBST 缓冲液,在震荡器上震荡 1~3min;弃去洗涤液,即为洗板 1 次,重复洗板 2~5 次,优选的,重复洗板 3 次;

2) 封闭:向酶标板的每个微孔中加入 150 ~ 250  $\mu\text{L}$  封闭液,加完后把酶标板置于 20 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$  条件下,0.5 ~ 1.5h 后取出酶标板弃去封闭液,重复洗板 2 ~ 5 次;优选的,向酶标板的每个微孔中加入 200  $\mu\text{L}$  封闭液,加完后把酶标板置于 37 $^{\circ}\text{C}$  条件下,1h 后取出酶标板弃去封闭液,重复洗板 3 次;所述封闭液为含有质量浓度为 0.5% 脱脂乳粉的磷酸盐缓冲溶液;

3) 竞争反应:向酶标板的每个微孔先加入 50 ~ 150  $\mu\text{L}$  的磷酸盐缓冲液或 1000  $\mu\text{g/L}$  的标准品稀释液,然后再向其中加入 50 ~ 150  $\mu\text{L}$  梯度稀释的抗血清溶液,抗血清是用磷酸盐缓冲溶液进行稀释的,酶标板被置于 20 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$  条件下孵育 0.5 ~ 1.5h 之后,重复洗板 2 ~ 5 次;优选的,向酶标板的每个微孔先加入 50  $\mu\text{L}$  的磷酸盐缓冲液或 1000  $\mu\text{g/L}$  的标准品稀释液,然后再向其中加入 50  $\mu\text{L}$  梯度稀释的抗血清溶液;酶标板被置于 37 $^{\circ}\text{C}$  条件下孵育 1h 之后,重复洗板 4 次;

4) 加入酶标二抗,向酶标板的每个微孔中加入 50 ~ 150  $\mu\text{L}$  酶标二抗稀释液,酶标二抗用磷酸盐缓冲溶液进行稀释,其稀释倍数为 15000 ~ 25000 倍,加完后把酶标板置于 20 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$  条件下,0.5 ~ 1.5h 后取出酶标板弃去孔中液体,重复洗板 2 ~ 5 次;优选的,向酶标板的每个微孔中加入 100  $\mu\text{L}$  酶标二抗,其稀释倍数为 20000 倍,加完后把酶标板置于 37 $^{\circ}\text{C}$  条件下,0.5h 后取出酶标板弃去孔中液体,重复洗板 5 次;所述酶标二抗为 HRP- 标记羊抗兔二抗;

5) 显色,向酶标板的每个微孔中加入 50 ~ 150  $\mu\text{L}$  显色液,加完后把酶标板置于 20 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$  条件下,0.5 ~ 1.5h 后取出;优选的,向酶标板的每个微孔中加入 100  $\mu\text{L}$  显色液,加完后把酶标板置于 37 $^{\circ}\text{C}$  条件下,0.5h 后取出;

6) 终止并读数,向酶标板的每个微孔中加入 50 ~ 150  $\mu\text{L}$  终止液,在双波长方式下用酶标仪读取酶标板中每个微孔的吸光度值;优选的,向酶标板的每个微孔中加入 50  $\mu\text{L}$  终止液,在双波长方式 450 ~ 650nm 下用酶标仪读取酶标板中每个微孔的吸光度值,选取吸光度值在 0.8 ~ 1.2 范围内的抗血清稀释度,即为抗血清效价;对于抗血清特异性的测定,确定抗血清效价后,测定标准品浓度为 1000  $\mu\text{g/L}$  的抑制率,按以下公式计算其抑制率,

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{OD_{\text{阴性对照}} - OD_{\text{阳性对照}}}{OD_{\text{阴性对照}} - OD_{\text{空白}}} \times 100\%$$

其中:OD 阴性对照是不加标准品的吸光度值;OD 空白是不加标准品和抗血清的吸光度值;OD 阳性对照加标准品的吸光度值。

## 一种高特异性苯醚甲环唑多克隆抗体的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于小分子化合物免疫分析技术领域,涉及一种三唑类杀菌剂的高特异性多克隆抗体的制备方法。

### 背景技术

[0002] 苯醚甲环唑,又名恶醚唑,是一种广谱高效的三唑类内吸性杀菌剂,能够强烈地抑制致病菌细胞膜重要组成部分—麦角甾醇的生物合成,从而破坏细胞膜的结构与功能,对作物有持久保护和治疗作用。

[0003] 苯醚甲环唑属于低毒类杀菌剂,对人的每日容许摄入量为 0.01mg/kg 体重。通过对苯醚甲环唑的急性毒性的研究表明,该种药物的大鼠急性经口半数致死量(LD50)为 1453mg/kg,兔子的急性经皮 LD50 为大于 2010mg/kg。对兔子皮肤和眼睛有刺激作用,对豚鼠无皮肤过敏反应。大鼠急性吸入致死中浓度(LC50)(4 小时)为大于 0.045mg/L 空气,野鸭急性经口 LD50 为大于 2150mg/kg。(鱼工)鳟 LC50(96 小时)为 0.8mg/L,对蜜蜂无毒。对于苯醚甲环唑的亚慢性经口毒性的研究资料,目前我国出现的还比较少,但最近一些研究表明雌性、雄性大鼠苯醚甲环唑的亚慢性经口毒性的无明显损害作用剂量(NOEL)均在低剂量组(300mg/kg)。虽然毒性蓄积性不强,但如果残留量高于残留限量标准,也会对人体带来严重的伤害。

[0004] 目前常用的苯醚甲环唑检测方法有气相色谱法(GC)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)和高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS),传统仪器方法存在前处理复杂,仪器和相应配套费用昂贵,无法大规模进行平行样同时检测等缺点。酶联免疫分析法具有方法简单,方便迅速,特异性强等优点,在苯醚甲环唑残留检测中还没有广泛应用,有良好的发展前景。

[0005] 在酶联免疫分析法中,半抗原及人工抗原的合成通常是制备抗体的关键步骤,所以本发明的关键技术是半抗原的结构设计。苯醚甲环唑作为一种小分子物质不具有免疫原性,不能直接免疫动物产生特异性抗体、必须合成突出分子立体结构特异性部位的半抗原,并与大分子载体连接构成接合物,才能免疫动物产生针对性的特异性抗体。这种半抗原与大分子载体的结合物称为人工抗原。人工抗原的制备不是任意的,包括结合位点、结合方式、载体种类、以及半抗原与目标分析物任何结构上的差异如大小、形状、成份、构型、构象、极性、电子云密度等等在内的诸因素,都可能极大地影响着相应抗体的性质,因此人工抗原的制备是决定产生其特异性抗体的关键。

### 发明内容

[0006] 本发明旨在通过人工抗原的制备,建立一种高特异性苯醚甲环唑多克隆抗体的制备方法,为后续的研究夯实基础,以实现苯醚甲环唑的定量检测。

[0007] 为达到上述目的,本发明的技术方案是这样实现的:

[0008] 苯醚甲环唑多克隆抗体的制备包括人工抗原的制备和动物免疫过程,包括如下

步骤：

[0009] 1) 苯醚甲环唑半抗原的制备：

[0010] 称取 6.0 ~ 7.5g [BMIM]Cl 加入干燥的三口烧瓶中，向其中缓缓加入 12.5 ~ 13.5g 无水三氯化铁固体，在氮气保护下反应过夜，得到 [BMIM]Cl-FeCl<sub>3</sub> 离子液体；在反应好的离子液体中直接加入 8.5 ~ 12.0mL 3,4'-二氯二苯醚，5.5 ~ 8.0mL 溴代乙酰氯，装上冷凝管，在冷凝管顶部装上氯化钙吸水装置，于 50 ~ 80℃ 下加热回流反应 3 ~ 6h，反应结束后将反应体系转入到烧杯中，用环己烷提取产物，将提取液于 30 ~ 60℃ 旋干；以石油醚和乙酸乙酯为展开剂将上述产物通过硅胶柱进行分离纯化，得到中间体 2-溴-1-(2-氯-4-(4-氯苯氧基)苯基)乙酮；分别称取 8.5 ~ 10.0mg 4-氨基丁酸，4.5 ~ 6.0mg 碳酸氢钠，8.5 ~ 12.5mg 碘化钾，放入圆底烧瓶中，加入 0.5 ~ 1.0mL 水使其溶解，再加入 20.0 ~ 30.0mg 中间体 2-溴-1-(2-氯-4-(4-氯苯氧基)苯基)乙酮的 DMF 溶液，60 ~ 90℃ 加热回流反应 3 ~ 6h；然后加入丙酮共沸，旋蒸除去 DMF，混合物用乙酸乙酯和水多次萃取后，收集有机相并旋干乙酸乙酯，得到淡黄色粘稠液体，即为苯醚甲环唑半抗原；

[0011] 2) 苯醚甲环唑半抗原与载体蛋白偶联制备免疫原：

[0012] 称取 10.0 ~ 20.0mg 步骤 1) 制备的半抗原溶于 200 ~ 500 μL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中，加入 6.1 ~ 7.0mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 11.5 ~ 12.9mg N,N-二环己基碳二亚胺 (DCC)，室温搅拌 16 ~ 24h 后，有浑浊物产生，离心除去沉淀，取上清液 100 ~ 400 μL 缓慢加入到 1 ~ 4mL 溶有 15 ~ 30mg 牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸盐缓冲液中，在室温下反应 3 ~ 6h 后将反应液移入透析袋中，在 4℃ 下，浸入磷酸盐缓冲液中透析三天，得到免疫原 1，即 Hapten-BSA；取上述上清液 20 ~ 100 μL 缓慢加入到 1 ~ 4mL 溶有 15 ~ 30mg 钥孔血蓝蛋白 (KLH) 的磷酸盐缓冲液中，在室温下反应 3 ~ 6h 后将反应液移入透析袋中，在 4℃ 下，浸入磷酸盐缓冲液中透析三天，得到免疫原 2，即 Hapten-KLH；

[0013] 3) 以混合酸酐法制备包被原：

[0014] 称取 8.0 ~ 10.0mg 步骤 1) 制备的半抗原，溶于 200 ~ 500 μL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中，4℃ 预冷，加入 4 ~ 6 μL 三正丁胺，反应 8 ~ 15min 后，再加入 1 ~ 4 μL 氯甲酸异丁酯，于冰水浴中搅拌反应 0.5 ~ 2.0h；称取 8.0 ~ 12.0mg 鸡卵白蛋白 (OVA) 溶解于 2 ~ 5mL 碳酸盐缓冲液中，搅拌下缓慢加入上述反应液，4℃ 反应过夜后将反应液移入透析袋中，在 4℃ 下，浸入磷酸盐缓冲液中透析三天，即可得到包被原；

[0015] 4) 免疫动物，制得苯醚甲环唑多克隆抗体。

[0016] 进一步，步骤 1) 中，称取 6.99g [BMIM]Cl 加入干燥的 100mL 三口烧瓶中，向其中缓缓加入 12.975g 无水三氯化铁固体，在氮气保护下反应过夜，得到 [BMIM]Cl-FeCl<sub>3</sub> 离子液体；在反应好的离子液体中直接加入 10mL 3,4'-二氯二苯醚，7mL 溴代乙酰氯，装上冷凝管，在冷凝管顶部装上氯化钙吸水装置，于 60℃ 下加热回流反应 5h，反应结束后将反应体系转入到烧杯中，用环己烷提取产物，将提取液于 45℃ 旋干；以石油醚和乙酸乙酯为展开剂将上述产物通过硅胶柱进行分离纯化，得到中间体 2-溴-1-(2-氯-4-(4-氯苯氧基)苯基)乙酮；分别称取 9.73mg 4-氨基丁酸，5mg 碳酸氢钠，10mg 碘化钾，放入 50mL 圆底烧瓶中，加入 800 μL 水使其溶解，加入 22.62mg 中间体 2-溴-1-(2-氯-4-(4-氯苯氧基)苯基)乙酮的 4mL DMF 溶液，70℃ 加热回流反应 5h，然后加入丙酮共沸，旋蒸除去 DMF，混合物用乙酸乙酯和水多次萃取后，收集有机相并旋干乙酸乙酯，得到淡黄色粘稠液体，即为苯醚

甲环唑半抗原。

[0017] 进一步,步骤 2) 中,称取 15mg 步骤 1) 制备的半抗原溶于 300  $\mu$ L N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中,加入 6.78mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 12.16mg N,N-二环己基碳二亚胺 (DCC),室温搅拌 18h 后,有浑浊物产生,5000rpm 离心 10min 除去沉淀,取上清液 200  $\mu$ L 缓慢加入到 2mL 溶有 20mg 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液中,在室温下反应 4h 后将反应液移入透析袋中,在 4 $^{\circ}$ C 下,浸入磷酸盐缓冲液中透析三天,得到免疫原 1,即 Hapten-BSA;取上述上清液 40  $\mu$ L 缓慢加入到 2mL 溶有 20mg 钥孔血蓝蛋白的磷酸盐缓冲液中,在室温下反应 4h 后将反应液移入透析袋中,在 4 $^{\circ}$ C 下,浸入磷酸盐缓冲液中透析三天,得到免疫原 2,即 Hapten-KLH。

[0018] 进一步,步骤 3) 中,称取 8.5mg 步骤 1) 制备的半抗原,溶于 300  $\mu$ L N,N-二甲基甲酰胺中,4 $^{\circ}$ C 预冷,加入 5.29  $\mu$ L 三正丁胺,反应 10min 后,再加入 2.9  $\mu$ L 氯甲酸异丁酯,于冰水浴中搅拌反应 1h。称取 10mg 鸡卵白蛋白溶解于 3ml 碳酸盐缓冲液中,搅拌下缓慢加入上述反应液,4 $^{\circ}$ C 反应过夜后将反应液移入透析袋中,在 4 $^{\circ}$ C 下,浸入磷酸盐缓冲液中透析三天,即可得到包被原。

[0019] 进一步,步骤 4) 中,免疫过程包括如下步骤;

[0020] 实验采用 4 只新西兰大白兔,雄性,月龄 3 个月,体重 1.5 公斤左右,按免疫原种类进行编号,两种免疫原 Hapten-BSA 和 Hapten-KLH 各免疫两只动物作为平行对照,饲养于标准实验动物房,连续观察一周,确定其状态良好后,开始进行免疫,实验采用多点皮下注射法进行免疫;

[0021] 两种免疫原 Hapten-BSA 和 Hapten-KLH 各取 1mg 分别溶于 1mL 新鲜配置的生理盐水中,与相同体积的弗氏完全佐剂乳化后进行初次免疫;两种免疫原 Hapten-BSA 和 Hapten-KLH 各取 1mg 分别溶于 1mL 新鲜配置的生理盐水中,再与等体积弗氏不完全佐剂乳化后用于加强免疫;首次免疫两周后进行第一次加强免疫,此后每两周再进行一次加强免疫;分别于第三、四次免疫后 8-10 天后,由兔子的耳静脉采血,利用间接竞争 ELISA 进行抗血清效价和特异性的测定;第五次免疫后的 8-10 天股动脉采全血,前一天实验动物需禁食,但要保证饮水供应充足,采得的全血经 4 $^{\circ}$ C,10000r/min 离心处理后收集全部血清,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0022] 本发明还公开了所述的一种高特异性苯醚甲环唑多克隆抗体的制备方法制备的抗体用于苯醚甲环唑多克隆抗体效价及亲和性的测定方法,其特征在于:包括如下步骤,

[0023] 1) 包被,先用碳酸盐缓冲液稀释待包被的包被原,把稀释好的包被原稀释液加入到酶标板的微孔中,每孔添加 50 ~ 150  $\mu$ L 稀释液,加完后把酶标板置于 20 ~ 40 $^{\circ}$ C 条件下反应 2 ~ 5h 后,弃去孔中液体,向酶标板中加入 200 ~ 300  $\mu$ L 洗涤液 PBST 缓冲液,在震荡器上震荡 1 ~ 3min,弃去洗涤液,即为洗板 1 次,重复洗板 2 ~ 5 次;优选的,把稀释好的包被原稀释液加入酶标板的微孔中,每微孔添加 100  $\mu$ L;加完后把酶标板置于 37 $^{\circ}$ C 条件下反应 3h,弃去孔中液体,向酶标板中加入 250  $\mu$ L 的洗涤液 PBST 缓冲液,在震荡器上震荡 1 ~ 3min;弃去洗涤液,即为洗板 1 次,重复洗板 2 ~ 5 次,优选的,重复洗板 3 次;

[0024] 2) 封闭:向酶标板的每个微孔中加入 150 ~ 250  $\mu$ L 封闭液,加完后把酶标板置于 20 ~ 40 $^{\circ}$ C 条件下,0.5 ~ 1.5h 后取出酶标板弃去封闭液,重复洗板 2 ~ 5 次;优选的,向酶标板的每个微孔中加入 200  $\mu$ L 封闭液,加完后把酶标板置于 37 $^{\circ}$ C 条件下,1h 后取出酶标板

弃去封闭液,重复洗板 3 次;所述封闭液为含有质量浓度为 0.5%脱脂乳粉的磷酸盐缓冲溶液;

[0025] 3) 竞争反应:向酶标板的每个微孔先加入 50 ~ 150  $\mu\text{L}$  的磷酸盐缓冲液或 1000  $\mu\text{g/L}$  的标准品稀释液,然后再向其中加入 50 ~ 150  $\mu\text{L}$  梯度稀释的抗血清溶液,抗血清是用磷酸盐缓冲溶液进行稀释的,酶标板被置于 20 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$  条件下孵育 0.5 ~ 1.5h 之后,重复洗板 2 ~ 5 次;优选的,向酶标板的每个微孔先加入 50  $\mu\text{L}$  的磷酸盐缓冲液或 1000  $\mu\text{g/L}$  的标准品稀释液,然后再向其中加入 50  $\mu\text{L}$  梯度稀释的抗血清溶液;酶标板被置于 37 $^{\circ}\text{C}$  条件下孵育 1h 之后,重复洗板 4 次;

[0026] 4) 加入酶标二抗,向酶标板的每个微孔中加入 50 ~ 150  $\mu\text{L}$  酶标二抗稀释液,酶标二抗用磷酸盐缓冲溶液进行稀释,其稀释倍数为 15000 ~ 25000 倍,加完后把酶标板置于 20 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$  条件下,0.5 ~ 1.5h 后取出酶标板弃去孔中液体,重复洗板 2 ~ 5 次;优选的,向酶标板的每个微孔中加入 100  $\mu\text{L}$  酶标二抗,其稀释倍数为 20000 倍,加完后把酶标板置于 37 $^{\circ}\text{C}$  条件下,0.5h 后取出酶标板弃去孔中液体,重复洗板 5 次;所述酶标二抗为 HRP- 标记羊抗兔二抗;

[0027] 5) 显色,向酶标板的每个微孔中加入 50 ~ 150  $\mu\text{L}$  显色液,加完后把酶标板置于 20 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$  条件下,0.5 ~ 1.5h 后取出;优选的,向酶标板的每个微孔中加入 100  $\mu\text{L}$  显色液,加完后把酶标板置于 37 $^{\circ}\text{C}$  条件下,0.5h 后取出;

[0028] 6) 终止并读数,向酶标板的每个微孔中加入 50 ~ 150  $\mu\text{L}$  终止液,在双波长方式下用酶标仪读取酶标板中每个微孔的吸光度值;优选的,向酶标板的每个微孔中加入 50  $\mu\text{L}$  终止液,在双波长方式 450 ~ 650nm 下用酶标仪读取酶标板中每个微孔的吸光度值,选取吸光度值在 0.8 ~ 1.2 范围内的抗血清稀释度,即为抗血清效价;对于抗血清特异性的测定,确定抗血清效价后,测定标准品浓度为 1000  $\mu\text{g/L}$  的抑制率,按以下公式计算其抑制率,

[0029]

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{OD_{\text{阴性对照}} - OD_{\text{阳性对照}}}{OD_{\text{阴性对照}} - OD_{\text{空白}}} \times 100\%$$

[0030] 其中:OD 阴性对照是不加标准品的吸光度值;OD 空白是不加标准品和抗血清的吸光度值;OD 阳性对照加标准品的吸光度值。

[0031] 本发明填补了苯醚甲环唑高特异性多克隆抗体制备研究方向的空白,为后续的免疫分析方法的建立夯实了基础。进而能够廉价、快速、可靠、灵敏地检测苯醚甲环唑在作物中的残留量,为人们的健康生活提供有力保障。

[0032] 相对于现有技术,本发明所述的一种高特异性苯醚甲环唑多克隆的制备方法,具有以下优势:

[0033] (1) 本发明所述的抗体制备方法针对苯醚甲环唑标准品具有较高的特异性,能够准确识别其分子结构。

[0034] (2) 本发明所述的半抗原合成方法相对简单,且所用原料价格较为低廉、容易获得,在一般化学试剂公司皆可购买。由于合成效率高、反应步骤少,从而提高了反应的可控性,且具有良好的发展前景。

附图说明

[0035] 构成本发明的一部分的附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0036] 图 1 为本发明实施例一所述的苯醚甲环唑半抗原的合成路线;

[0037] 图 2 为本发明实施例一所述的苯醚甲环唑抗血清的效价及抑制率测定结果。

### 具体实施方式

[0038] 需要说明的是,在不冲突的情况下,本发明中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。

[0039] 下面将参考附图并结合实施例来详细说明本发明创造。

[0040] 实施例一

[0041] 苯醚甲环唑半抗原的合成

[0042] 称取 6.99g [BMIM]Cl 加入干燥的 100mL 三口烧瓶中,向其中缓缓加入 12.975g 无水三氯化铁固体,在氮气保护下反应过夜,得到 [BMIM]Cl-FeCl<sub>3</sub> 离子液体;在反应好的离子液体中直接加入 10mL 3,4'-二氯二苯醚,7mL 溴代乙酰氯,装上冷凝管,在冷凝管顶部装上氯化钙吸水装置,于 60℃ 下加热回流反应 5h,反应结束后将反应体系转入到烧杯中,用环己烷提取产物,将提取液于 45℃ 旋干;以石油醚和乙酸乙酯为展开剂将上述产物通过硅胶柱进行分离纯化,得到中间体 2-溴-1-(2-氯-4-(4-氯苯氧基)苯基)乙酮;分别称取 9.73mg 4-氨基丁酸,5mg 碳酸氢钠,10mg 碘化钾,放入 50mL 圆底烧瓶中,加入 800 μL 水使其溶解,加入 22.62mg 中间体 2-溴-1-(2-氯-4-(4-氯苯氧基)苯基)乙酮的 4mL DMF 溶液,70℃ 加热回流反应 5h,然后加入丙酮共沸,旋蒸除去 DMF,混合物用乙酸乙酯和水多次萃取后,收集有机相并旋干乙酸乙酯,得到淡黄色粘稠液体,即为苯醚甲环唑半抗原。

[0043] 免疫原的制备

[0044] 称取 15mg 苯醚甲环唑半抗原溶于 300 μL N,N-二甲基甲酰胺中,加入 6.78mg N-羟基琥珀酰亚胺和 12.16mg N,N-二环己基碳二亚胺,室温搅拌 18h 后,有浑浊物产生,5000rpm 离心 10min 除去沉淀,取上清液 200 μL 缓慢加入到 2mL 溶有 20mg 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液中,在室温下反应 4h 后将反应液移入透析袋中,在 4℃ 下,浸入磷酸盐缓冲液中透析三天,得到免疫原 1,即 Hapten-BSA;取上述上清液 40 μL 缓慢加入到 2mL 溶有 20mg 钥孔血蓝蛋白的磷酸盐缓冲液中,在室温下反应 4h 后将反应液移入透析袋中,在 4℃ 下,浸入磷酸盐缓冲液中透析三天,得到免疫原 2,即 Hapten-KLH。

[0045] 包被原的制备

[0046] 称取 8.5mg 苯醚甲环唑半抗原,溶于 300 μL N,N-二甲基甲酰胺中,4℃ 预冷,加入 5.29 μL 三正丁胺,反应 10min 后,再加入 2.9 μL 氯甲酸异丁酯,于冰水浴中搅拌反应 1h。称取 10mg 鸡卵白蛋白溶解于 3ml 碳酸盐缓冲液中,搅拌下缓慢加入上述反应液,4℃ 反应过夜后将反应液移入透析袋中,在 4℃ 下,浸入磷酸盐缓冲液中透析三天,即可得到包被原。

[0047] 免疫动物得到苯醚甲环唑多克隆抗体,具体步骤如下,

[0048] 实验采用 4 只新西兰大白兔,雄性,月龄 3 个月,体重 1.5 公斤左右,按免疫原种类进行编号,两种免疫原 Hapten-BSA 和 Hapten-KLH 各免疫两只动物作为平行对照,饲养于标准实验动物房,连续观察一周,确定其状态良好后,开始进行免疫,实验采用多点皮下注射法进行免疫;

[0049] 两种免疫原 Hapten-BSA 和 Hapten-KLH 各取 1mg 分别溶于 1mL 新鲜配置的生理盐水中,与相同体积的弗氏完全佐剂乳化后进行初次免疫;两种免疫原 Hapten-BSA 和 Hapten-KLH 各取 1mg 分别溶于 1mL 新鲜配置的生理盐水中,再与等体积弗氏不完全佐剂乳化后用于加强免疫;首次免疫两周后进行第一次加强免疫,此后每两周再进行一次加强免疫;分别于第三、四次免疫后 8-10 天后,由兔子的耳静脉采血,利用间接竞争 ELISA 进行抗血清效价和特异性的测定;第五次免疫后的 8-10 天股动脉采全血,前一天实验动物需禁食,但要保证饮水供应充足,采得的全血经 4℃,10000r/min 离心处理后收集全部血清,-20℃保存备用。

[0050] 苯醚甲环唑多克隆抗体效价及亲和性的测定

[0051] (1) 包被

[0052] 在包被时,需要先用碳酸盐缓冲溶液稀释待包被的包被原,把稀释液加入到酶标板中的 96 微孔中 (100 μL/well),加完后把酶标板置于 4℃条件下过夜,次日,弃去孔中液体,向酶标板中加入 250 μL 的洗涤液 PBST 缓冲液,在震荡器上震荡 2min,弃去洗涤液,即为洗板一次,重复洗板 3 次。

[0053] (2) 封闭

[0054] 紧接上一步,封闭酶标板,向酶标板的每个微孔中加入 200 μL 封闭液,加完后把酶标板置于 37℃条件下,1h 后取出酶标板弃去封闭液,重复洗板 3 次。

[0055] (3) 竞争反应

[0056] 在步骤 (2) 之后,向酶标板上的每个微孔先加入 50 μL 的磷酸盐缓冲液或 1000 μg/L 的标准品稀释液,然后再向其中加入 50 μL 梯度稀释的抗血清溶液;酶标板被置于 37℃条件下孵育 1h 之后,重复洗板 4 次;

[0057] (4) 加入酶标二抗

[0058] 向酶标板的每个微孔中加入 100 μL 酶标二抗,其稀释倍数为 20000 倍,加完后把酶标板置于 37℃条件下,0.5h 后取出酶标板弃去孔中液体,重复洗板 5 次;

[0059] (5) 显色

[0060] 向酶标板的每个微孔中加入 100 μL 显色液,加完后把酶标板置于 37℃条件下,0.5h 后取出;

[0061] (6) 终止并读数

[0062] 向酶标板的每个微孔中加入 50 μL 终止液,在双波长方式 450 ~ 650nm 下用酶标仪读取酶标板中每个微孔的吸光度值,选取吸光度值在 0.8 ~ 1.2 范围内的抗血清稀释度,即为抗血清效价;对于抗血清特异性的测定,确定抗血清效价后,测定标准品浓度为 1000 μg/L 的抑制率,按以下公式计算其抑制率,

[0063]

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{OD_{\text{阴性对照}} - OD_{\text{阳性对照}}}{OD_{\text{阴性对照}} - OD_{\text{空白}}} \times 100\%$$

[0064] 其中:OD 阴性对照是不加标准品的吸光度值;OD 空白是不加标准品和抗血清的吸光度值;OD 阳性对照加标准品的吸光度值。

[0065] 苯醚甲环唑抗血清效价及亲和性的测定结果如图 2 所示,使用实施例一中对应的分析方法,当抗血清效价为 64000:1 时,其对 1000 μg/L 苯醚甲环唑标准品的抑制率高达

89%。

[0066] 以上所述仅为本发明创造的较佳实施例而已,并不用以限制本发明创造,凡在本发明创造的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明创造的保护范围之内。

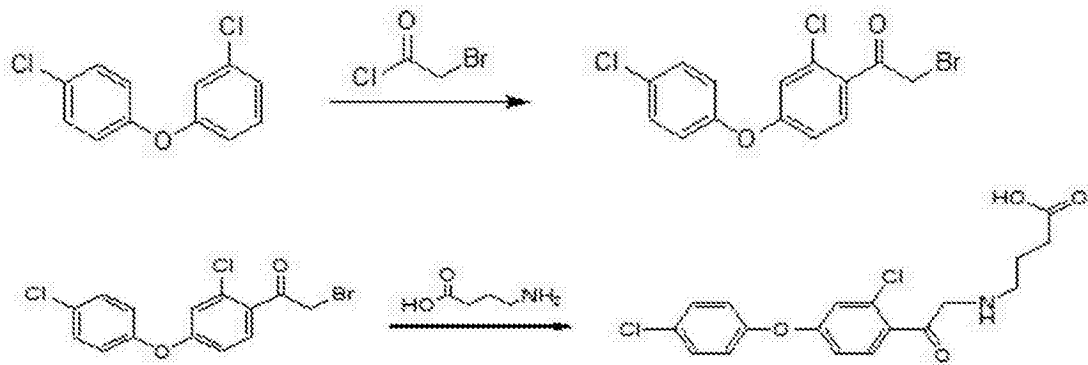


图 1

兔子编号	抗血清效价	抑制率% (1000μg/L)
Hapten-BSA-1	1: 32000	63
Hapten-BSA-2	1: 16000	43
Hapten-KLH-1	1: 64000	89
Hapten-KLH-2	1: 32000	86

图 2

专利名称(译)	一种高特异性苯醚甲环唑多克隆抗体的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN105294862A</a>	公开(公告)日	2016-02-03
申请号	CN201510823454.3	申请日	2015-11-23
[标]申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
[标]发明人	刘冰 冯久慧 王硕		
发明人	刘冰 冯久慧 王硕		
IPC分类号	C07K16/44 C07K1/34 G01N33/53		
其他公开文献	CN105294862B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种高特异性苯醚甲环唑多克隆抗体的制备方法，属于免疫分析技术。所述多克隆抗体是由苯醚甲环唑半抗原与载体蛋白结合，免疫动物制成，所述苯醚甲环唑半抗原由3, 4'-二氯二苯醚和溴代乙酰氯反应制得中间体，然后连接4-氨基丁酸制成。本发明制备的苯醚甲环唑多克隆抗体具有较高的特异性，填补了苯醚甲环唑高特异性多克隆抗体制备研究方向的空白。

