



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102875671 A

(43) 申请公布日 2013.01.16

(21) 申请号 201210363827.X

(22) 申请日 2012.09.27

(71) 申请人 南京农业大学

地址 210095 江苏省南京市卫岗1号南京农业大学科技处赵珩

(72) 发明人 王鸣华 李明 施海燕

(51) Int. Cl.

C07K 16/06 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页

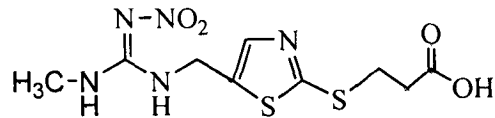
(54) 发明名称

噻虫胺抗原、抗体及其应用

(57) 摘要

本发明涉及噻虫胺抗原、抗体及其应用,属于免疫化学分析技术领域。专用于噻虫胺特异性多克隆抗体制备和酶联免疫吸附分析方法(ELISA),及其在环境和农产品中噻虫胺残留的高灵敏快速检测。通过对噻虫胺噻唑环上氯原子进行取代,合成了半抗原,化学名为3-(5-((3-甲基-2-硝基胍)-基甲基)噻唑-2-巯基)丙酸,将其分别于牛血清蛋白和卵清蛋白偶联制备免疫抗原和包被抗原。用免疫抗原免疫新西兰大白兔,获得噻虫胺的特异性多克隆抗体。建立的ELISA线性范围为1.1 μg/L-2mg/L,检测限为1.1 μg/L。本发明半抗原合成技术简便可行,抗体特异性高,适用于环境和农产品中大批量样品检测和现场监测。

1. 噻虫胺多克隆抗体,是由免疫新西兰大白兔获得的。
2. 权利要求 1 所述噻虫胺抗体的制备方法,包括:
 - 1) 人工半抗原,其特征在于它的分子结构式为:



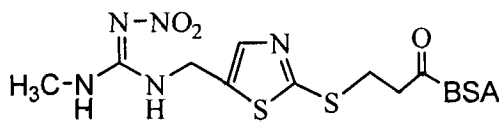
人工半抗原

- 2) 人工半抗原制备

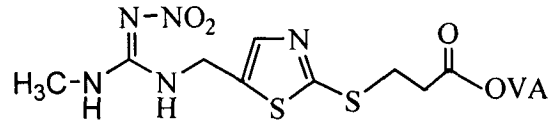
将 8mmol (0.45g) KOH 溶解于 20mL 乙醇中,加入 4mmol (0.42g) β -巯基丙酸搅拌,待完全溶解后加入 4mmol (1.02g) 噻虫胺,80°C 搅拌回流 2h。反应结束后,过滤反应液,滤液减压浓缩得淡黄色固体。加入 50mL 水,用 1mol/L 的盐酸调节 pH = 2.0。用乙酸乙酯萃取,有机相经水洗和无水硫酸钠干燥,减压浓缩得白色粉末状物质,经甲醇重结晶,得白色晶体。化学名:3-(5-((3-甲基-2-硝基胍)-基甲基)噻唑-2-巯基)丙酸,相对分子质量:319,熔程:158.5°C -160.2°C。

- 3) 人工抗原制备

人工抗原特征在于,权利要求采用碳二亚胺法将半抗原与牛血清蛋白 (BSA) 偶联制备免疫抗原,采用混合酸酐法与卵清蛋白 (OVA) 偶联制备包被抗原。其分子结构式为:



免疫抗原



包被抗原

- 4) 免疫

用权利要求 23) 所述噻虫胺免疫抗原免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体。

3. 权利要求 1 所述噻虫胺多克隆抗体酶联免疫吸附分析方法 (ELISA) 建立,及在检测环境和农产品中噻虫胺残留量中的应用。

噻虫胺抗原、抗体及其应用

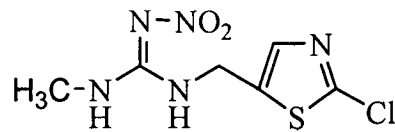
一、技术领域

[0001] 本发明涉及噻虫胺抗原、抗体及其应用,属于免疫化学分析技术领域。专用于噻虫胺多克隆抗体的制备,及其在环境和农产品中噻虫胺残留的酶联免疫吸附分析方法(ELISA)。

二、背景技术

[0002] 噻虫胺(clothianidin),化学名1-(2-氯-1,3-噻唑-5-基甲基)-3-甲基-2-硝基胍,由日本住化武田/拜耳联合开发,于2001年12月在日本获得登记,化学结构见下图,分子式: $C_6H_8ClN_5O_2S$,相对分子质量:249.68,熔点:176.8℃。噻虫胺是含噻唑环的新型烟碱类杀虫剂,主要作用于昆虫神经系统突触后膜的烟碱型乙酰胆碱受体。噻虫胺以其新颖的作用机制、广谱高效的杀虫活性、灵活的使用方法,被广泛应用于防治危害水稻、蔬菜、果园、茶叶等作物的半翅目、鞘翅目、双翅目和某些鳞翅目害虫。人们长期食用被噻虫胺污染的农产品会造成内分泌系统的紊乱甚至导致癌症的发生。此外,噻虫胺对蜜蜂和家蚕高毒。因而,需要一种灵敏、快速、选择性的残留检测方法。

[0003]



噻虫胺

[0004] 美国发布部分蔬菜和水果的噻虫胺最大允许残留量为0.05mg/kg。目前噻虫胺残留检测方法采用仪器分析方法,如液相色谱分析法、气相色谱分析法、液相-质谱连用分析法等。这些仪器分析方法灵敏准确,但检测仪器昂贵、样品前处理较繁琐、检测费时费力、难以满足大量样品快速简便检测的需要。

[0005] 免疫检测方法具有快速、廉价、简便、灵敏、特异的优点,在大量样品快速筛选和现场监测中显示出独特优势。ELISA是一种将酶催化反应和免疫反应相结合的免疫标记测定技术,有酶催化反应的高灵敏度和抗原抗体反应的高特异性,在灵敏度方面有很大的优势。ELISA作为一种快速灵敏的检测方法,在许多小分子免疫分析中已得到较成熟的应用。通过化学合成噻虫胺半抗原和人工抗原,制备针对噻虫胺的特异性抗体,建立噻虫胺免疫学检测方法。该发明方法的完成,将解决噻虫胺半抗原合成,抗体制备等关键技术,建立噻虫胺的ELISA快速检测技术。该发明不仅为食品安全检测,而且为我国农产品等的出入境检测、环境监测部门的水域监测提供有效的技术手段和检测方法。对我国农产品的可持续发展和食品安全问题具有重要的现实意义和重要的社会、经济价值。目前国内外尚未见有关噻虫胺的免疫学研究报道。

三、发明内容

[0006] 技术问题

[0007] 本发明的目的在于提供一种噻虫胺的酶联免疫吸附分析方法,对环境和农产品中噻虫胺的残留进行准确、灵敏、快速、简单的检测。

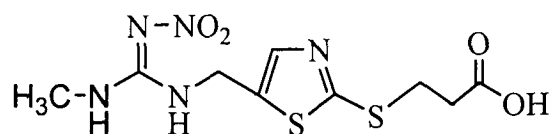
[0008] 技术方案

[0009] 本发明噻虫胺残留 ELISA 检测方法,包括:

[0010] 1 人工半抗原制备

[0011] 将 8mmol (0.45g) KOH 溶解于 20mL 乙醇中,加入 4mmol (0.42g) β -巯基丙酸搅拌,待完全溶解后加入 4mmol (1.02g) 噻虫胺,80°C 搅拌回流 2h。反应结束后,过滤反应液,滤液减压浓缩得淡黄色固体。加入 50mL 水,用 1mol/L 的盐酸调节 pH = 2.0。用乙酸乙酯萃取,有机相经水洗和无水硫酸钠干燥,减压浓缩得白色粉末状物质,经甲醇重结晶,得白色晶体。噻虫胺人工半抗原化学名为 3-(5-((3-甲基-2-硝基胍)-基甲基)噻唑-2-巯基)丙酸,分子结构如下:

[0012]

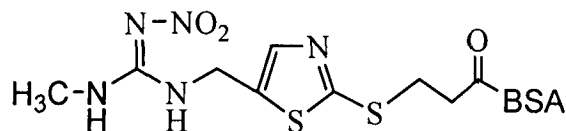


人工半抗原

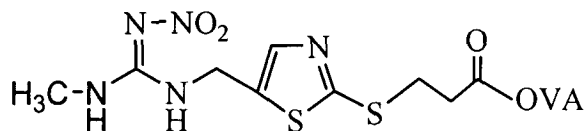
[0013] 2 人工抗原制备

[0014] 采用碳二亚胺法将半抗原与牛血清蛋白 (BSA) 偶联制备免疫抗原,采用混合酸酐法将半抗原与卵清蛋白 (OVA) 偶联制备包被抗原。其分子结构如下:

[0015]



免疫抗原



包被抗原

[0016] 3 抗体制备

[0017] 将制备好的免疫抗原免疫新西兰大白兔,免疫剂量为 1.0-1.5mg/kg (按 BSA 量计),共免疫五次。首次免疫由等体积的免疫抗原和弗氏完全佐剂乳化,背部皮下注射,以后用等体积免疫抗原和弗氏不完全佐剂乳化。从第三次免疫开始,每次免疫后耳缘静脉采血,测定效价。待免疫血清效价稳定后,心脏采血。采用辛酸-硫酸铵盐析法纯化血清,冷冻干燥得到抗体冻干粉。

[0018] 4 免疫分析方法建立及应用

[0019] 对制备的噻虫胺抗体进行效价、特异性及灵敏度的分析,建立噻虫胺的 ELISA。将建立的酶免疫分析方法应用于环境样品和农产品中噻虫胺的残留量检测。

[0020] 有益效果

[0021] 本发明优点和积极效果表现在:

[0022] 1 新颖实用:噻虫胺抗原合成与抗体制备技术具有重要的实用价值和实际意义。首次设计合成噻虫胺人工抗原,经免疫动物产生特异性多克隆抗体,为噻虫胺残留的高效快速分析提供了一种新的方法。传统的农药仪器分析前处理过程繁琐,成本高,耗时长,大

量使用有机溶剂易造成环境污染,且对操作人员素质要求较高,难以满足农产品安全分析对快速、简便、准确、大量检测的需求。而本发明提供的噻虫胺免疫分析方法具有操作简单快速(只需要2-3小时)、分析成本低、分析容量大、安全可靠、容易普及推广,特别适用于大批量样品检测和现场监测,可以与传统仪器分析方法互为补充。

[0023] 2 准确度高:噻虫胺抗体经纯化制成冻干粉后的效价为 4×10^6 。抗体特异性识别噻虫胺,除与呋虫胺有一定的交叉反应外,与其他烟碱类杀虫剂没有明显的交叉反应。从而可知,所制备的抗体特异性强,可快速准确地分析检测噻虫胺在样本中的残留量。应用该免疫方法噻虫胺在实际样品中的回收率为 80.36-116.35%,变异系数低于 10%,符合残留分析标准。

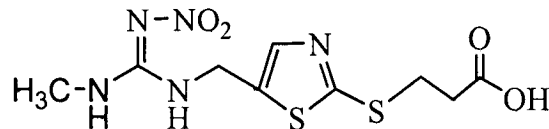
[0024] 3 灵敏度高:建立的 ELISA 的抑制中浓度 (IC_{50}) 为 0.046mg/L,检测限 (IC_{10} , LOD) 为 $1.1 \mu\text{g/L}$,线性范围为 $1.1 \mu\text{g/L}$ -2mg/L。

四、具体实施方式

[0025] 1 人工半抗原的合成

[0026] 对噻虫胺分子噻唑环上氯原子进行取代,合成具有四个原子连接臂的半抗原,既最大限度的保留了噻虫胺特征基团,又形成了羧基末端基团,能较好的跟蛋白偶联。产物纯化后通过质谱 (ESI) 和核磁共振氢谱 ($^1\text{H-NMR}$) 鉴定。噻虫胺人工半抗原化学名为 3-(5-((3-甲基-2-硝基胍)-基甲基)噻唑-2-巯基)丙酸,分子结构如下:

[0027]



人工半抗原

[0028] 1.1 人工半抗原的合成

[0029] 将 8mmol (0.45g) KOH 溶解于 20mL 乙醇中,加入 4mmol (0.42g) β -巯基丙酸搅拌,待完全溶解后加入 4mmol (1.02g) 噻虫胺,80°C 搅拌回流 2h。反应结束后,过滤反应液,滤液减压浓缩得淡黄色固体。加入 50mL 水,用 1mol/L 的盐酸调节 $\text{pH} = 2.0$ 。用乙酸乙酯萃取,有机相经水洗和无水硫酸钠干燥,减压浓缩得白色粉末状物质,经甲醇重结晶,得白色晶体。

[0030] 1.2 噻虫胺人工半抗原的鉴定

[0031] 将纯化后的半抗原经 ESI-MS、 $^1\text{H-NMR}$ 测定,以鉴定其分子结构。质谱和核磁共振谱信息如下:ESI-MS, m/z , 320 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 和 342 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, d_6 -DMSO), δ : 2.68-2.71 (t, 2H, CH_2COO), 2.79-2.80 (s, 3H, CH_3), 3.13-3.34 (t, 2H, SCH_2), 4.50-4.51 (d, 2H, NHCH_2), 7.60 (s, 1H, thiazol-4-H), 7.92 (s, 1H, NH), 9.13 (s, 1H, NH), 12.44 (s, 1H, COOH)。

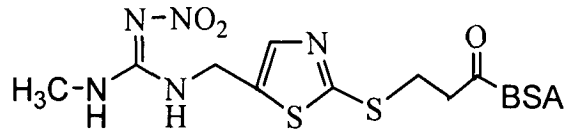
[0032] 纯化后的人工半抗原熔程: 158.5°C -160.2°C。

[0033] 从以上信息综合分析可知,所合成的产物为目标人工半抗原。

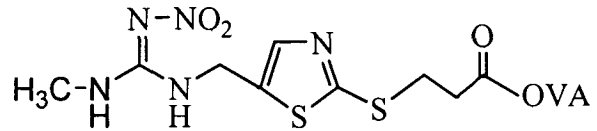
[0034] 2 人工抗原的合成

[0035] 噻虫胺人工抗原的分子结构式如下:

[0036]



免疫抗原



包被抗原

[0037] 2.1 免疫抗原的合成

[0038] 免疫抗原的合成采用碳二亚胺法。将 63.8mg (0.2mmol) 噻虫胺半抗原溶解在 1mL 的 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中,然后在溶液中加入 69.0mg (0.6mmol) 的 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS),室温下搅拌反应 15min,再加入 62.7mg (0.3mmol) 的二环己基碳二亚胺 (DCC),室温下搅拌反应过夜。离心,取上清液 0.5mL,将上清液缓慢加入到 10mg/mL 牛血清蛋白 (BSA) 的碳酸盐缓冲溶液 (CBS, 0.1mol/L, pH9.6) 中,磁力搅拌下反应 4h。将反应完成后的溶液装入预处理好的透析袋,4℃下先用蒸馏水透析 3 次 (间隔 2-3h),然后用磷酸盐缓冲溶液 (PBS, 0.01mol/L, pH7.4) 透析 72h,每天换液 3-5 次,即得免疫抗原,分装,保存于 -20℃ 的冰箱中。

[0039] 2.2 包被抗原的合成

[0040] 包被抗原的合成采用混合酸酐法。将 79.8mg (0.25mmol) 半抗原,溶解在 1mL 的 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中,然后边搅拌边在溶液中加入 60 μL 三正丁胺和 30 μL 氯甲酸异丁酯,室温下反应 1h,再缓慢加入到 15mL 的 10mg/mL 卵清蛋白 (OVA) 的 CBS (0.1mol/L, pH9.6) 中,磁力搅拌下反应 2h,待反应完成后,装入透析袋,4℃下先用蒸馏水透析 3 次 (间隔 2-3h),然后用 PBS (0.01mol/L, pH7.4) 透析 72h,每天换液 3-5 次,即得包被抗原,分装,保存于 -20℃ 的冰箱中备用。

[0041] 2.3 人工抗原的鉴定

[0042] 对半抗原、载体蛋白及偶联物进行紫外 (200nm ~ 400nm) 扫描。从紫外谱图看到偶联物紫外吸收光谱较载体蛋白和半抗原的吸收光谱发生了明显的变化,具有载体蛋白和半抗原的紫外吸收特征,说明半抗原和载体蛋白偶联成功。根据它们在 280nm 波长下的摩尔吸光系数估算得到免疫抗原和包被抗原的结合比分别为 15 : 1 和 8 : 1。

[0043] 3 抗体制备

[0044] 3.1 免疫新西兰大白兔制备抗血清

[0045] 背部皮下注射免疫新西兰大白兔,初次免疫用等量弗氏完全佐剂 (FCA) 乳化免疫原,免疫剂量为 1.0mg/kg (按 BSA 量计),3 周后用弗氏不完全佐剂 (FIA) 乳化加强免疫,免疫剂量为 1.5mg/kg,以后每间隔 2 周加免一次,共加免 4 次。具体免疫方案见下表。

免疫时间 (周)	免疫抗原	免疫剂量 (mg/kg, 体重)	免疫方法
初免 (间隔三周)	+等体积 FCA	1.0	背部皮下多点注射
二免 (间隔两周)	+等体积 FIA	1.5	背部皮下多点注射
三免 (间隔两周)	+等体积 FIA	1.5	背部皮下多点注射
四免 (间隔两周)	+等体积 FIA	1.5	背部皮下多点注射
未免	免疫抗原	1.5	大腿肌肉注射

[0046]

[0047] 基础免疫前 1 周,兔耳缘静脉采集阴性血,并制备血清作为阴性对照。从第三次免疫开始,每次免疫后耳缘静脉采血,用间接非竞争酶联免疫吸附分析法测定抗血清的效价(血清的稀释倍数即为效价)。

[0048] 待效价合格后,心脏采血。血液装于离心管中,于 37℃水浴静置 30min,待血液凝固后,用针将血球剥离离心管壁,置于 4℃冰箱过夜,离心 10min(4000r/min),分离出血清。

[0049] 3.2 抗体的纯化

[0050] 采用辛酸-硫酸铵法纯化抗体。取抗血清,用 0.06mol/L 醋酸盐缓冲液按 1:4(V/V) 稀释,调节 pH 至 4.5;室温下边搅拌边滴加辛酸(75 μL/mL 血清量),继续搅拌 30min,静置 2h(4℃),离心 30min(4℃,10000r/min),弃去沉淀。用 PBS(0.1mol/L, pH7.4) 以 1:10 稀释上清液,调整 pH 至 7.4,预冷 15min(4℃),缓慢加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.277g/mL,继续搅拌反应 30min,静置 2-3h(4℃);离心 30min(4℃,12000r/min),弃上清液,沉淀物用少量 PBS(0.01mol/L, pH7.4) 溶解,用含 EDTA(74.4mg/L) 的 PBS 于 4℃透析 3 天,每天换液 3-5 次。最后经分装并冷冻干燥,得冻干粉,-20℃保存待用。

[0051] 3.3 抗体效价

[0052] 经纯化制成的抗体冻干粉后的效价为 4×10^6 。

[0053] 4 噻虫胺 ELISA 的建立

[0054] 4.1 方法原理

[0055] 采用间接竞争免疫分析方法。将农药分子与大分子载体(如蛋白质)偶联制得的复合物作为包被抗原吸附于固相载体(96 孔酶标板)上,制备成固相抗原,然后加入待测农药和相应抗体。固相抗原,待测农药,与抗体进行竞争结合反应,待测农药含量多,被结合在固相抗原上的抗体就少,反之结合在固相抗原的抗体多,反应后加入酶标二抗(只能与结合在固相抗原上的抗体相结合),最后用底物进行显色加以测定,当抗体量一定时,加入的待测农药量越多,与固相抗原结合的抗体就越少,显色就减弱,结合率降低,反之,则显色增强,结合率升高,因而可根据已知量农药的标准曲线和待检样品的结合率,推算出待测农药的浓度。

[0056] 4.2 抗原抗体工作浓度

[0057] ELISA 抗原抗体工作浓度的确定用方阵滴定法,选择 OD 值为 1.0 时的抗原抗体稀释浓度。经实验,包被抗原浓度 0.25 μg/mL,抗体浓度 0.3 μg/mL 作为最适工作浓度

[0058] 4.3 间接竞争免疫反应程序

[0059] 4.3.1 包被

[0060] 用 CBS 缓冲液(0.05mol/L, pH9.6) 将包被抗原稀释至最适浓度,100 μL/孔加入 96 孔酶标板(Maxisorp™ 透明聚乙烯板),4℃包被过夜;

[0061] 4.3.2 封闭

[0062] 取出包被好的酶标板,弃去包被液,用 0.5%吐温-20 的磷酸盐缓冲溶液(PBST) 洗涤后,加入用 PBS 缓冲溶液稀释的 5.0%的脱脂牛奶封闭液 200 μL/孔,于 37℃温箱中温育 30min。

[0063] 4.3.3 加样

[0064] 取经封闭和洗涤后的酶标板,加入系列浓度的噻虫胺标准液或待测样品提取液 50 μL/孔,再加入抗体稀释液 50 μL/孔,同时设置空白对照和阴性对照,37℃温育 1h。

[0065] 4.3.4 加酶标二抗

[0066] 弃去孔内液体,用 PBST 溶液洗涤。加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 3000 倍稀释液 100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 温育 1h,弃去孔内液体,用 PBST 溶液洗涤。

[0067] 4.3.5 显色反应

[0068] 加入四甲基联苯胺 (TMB)-H₂O₂ 底物溶液 100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 温箱中温育 15min,用 50 μ L/孔 2mol/L H₂SO₄ 终止反应。在 iMark™ 酶标仪上测定 490nm 波长下的吸光值 (A)。

[0069] 4.4 标准曲线和灵敏度

[0070] 根据结合率与噻虫胺浓度的对数作图即得到标准曲线,计算抑制中浓度 (IC₅₀) 及最低检测限 (IC₁₀, LOD)。结合率 (B/Bo, %) 以下式计算:

[0071] $B/Bo(\%) = [(Ax - Amin) / (Amax - Amin)] \times 100$

[0072] 式中:Ax 为不加药时的吸光值, Amax 为阴性对照的吸光值, Amin 为空白对照的吸光值。

[0073] 标准曲线的线性方程为: $B/Bo(\%) = -24.549 \log C + 17.168$

[0074] 噻虫胺浓度在 1.1 μ g/L-2mg/L 范围内,呈线性关系,相关系数为 $R^2 = 0.9975$, IC₅₀ 为 0.046mg/L, LOD 为 1.1 μ g/L。

[0075] 4.5 抗体的特异性

[0076] 抗体的特异性是指它同特异性抗原结合的能力与同该抗原类似物结合能力的比较。常用交叉反应作为评价的重要标准。交叉反应越小,抗体的特异性越好。

[0077] 制备的抗体除与呋虫胺有一定的交叉反应外 (CR% = 11.8%),与其他烟碱类杀虫剂没有明显的交叉反应 (CR% < 0.77%)。从而可知,所制备的抗体特异性强,可以用于噻虫胺的分析。

[0078] 5 样品添加分析

[0079] 5.1 提取方法

[0080] 5.1.1 水样

[0081] 水样 (或经过滤) 添加噻虫胺制成三个不同浓度水平 (0.01, 0.05, 0.5mg/kg) 的样品,重复 3 次,设置对照。混匀,放置过夜后,可直接检测

[0082] 5.1.2 土壤或农产品样品 (甘蓝, 大米, 玉米, 番茄)

[0083] 称取粉碎后的样品 10g, 装入三角瓶中。噻虫胺添加的方式与水样相同。混匀, 放置过夜, 在样品中加入 10mL 水和 50mL 乙腈振荡提取 1 小时。振荡完毕后, 提取液用布氏漏斗抽滤, 将滤液倒入盛有 5g 氯化钠的具塞量筒中, 剧烈振荡, 使乙腈与水分层, 静置 10min, 取 25mL 至平底烧瓶。用旋转蒸发器浓缩近干, 用含 20% 甲醇的 PBS 定容。

[0084] 5.2 样品的 ELISA 分析

[0085] 样品分析步骤参考 4.3。经分析可知, 该 ELISA 的噻虫胺回收率为 85.1-112.2%, 平均变异系数为 1.1-8.4%。

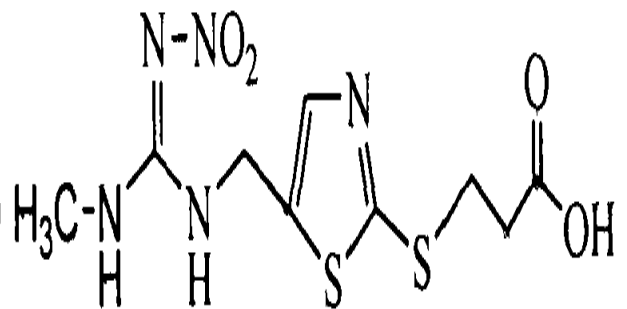
[0086] 实际样品中噻虫胺残留量检测参照 5.1 和 5.2 方法进行。

[0087] 本发明建立的噻虫胺残留的免疫分析方法符合噻虫胺残留分析标准。该方法可用于环境和农产品中噻虫胺的残留检测, 且前处理方法较仪器分析方法简单, 适合大批量检测和现场监测。

专利名称(译)	噻虫胺抗原、抗体及其应用		
公开(公告)号	CN102875671A	公开(公告)日	2013-01-16
申请号	CN201210363827.X	申请日	2012-09-27
[标]申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
[标]发明人	王鸣华 李明 施海燕		
发明人	王鸣华 李明 施海燕		
IPC分类号	C07K16/06 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及噻虫胺抗原、抗体及其应用，属于免疫化学分析技术领域。专用于噻虫胺特异性多克隆抗体制备和酶联免疫吸附分析方法(ELISA)，及其在环境和农产品中噻虫胺残留的高灵敏快速检测。通过对噻虫胺噻唑环上氯原子进行取代，合成了半抗原，化学名为3-(5-((3-甲基-2-硝基胍)-基甲基)噻唑-2-巯基)丙酸，将其分别于牛血清蛋白和卵清蛋白偶联制备免疫抗原和包被抗原。用免疫抗原免疫新西兰大白兔，获得噻虫胺的特异性多克隆抗体。建立的ELISA线性范围为1.1 μ g/L-2mg/L，检测限为1.1 μ g/L。本发明半抗原合成技术简便可行，抗体特异性高，适用于环境和农产品中大批量样品检测和现场监测。



人工半抗原