

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/535

G01N 33/53

G01N 30/00

G01N 33/52

A61K 39/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510008704.4

[43] 公开日 2005 年 11 月 23 日

[11] 公开号 CN 1700001A

[22] 申请日 2005.2.24

[21] 申请号 200510008704.4

[71] 申请人 黄 永

地址 610041 四川省成都市高新区高朋大道 5
号创业园成都澳立生态科技公司

[72] 发明人 王 硕

权利要求书 4 页 说明书 11 页 附图 4 页

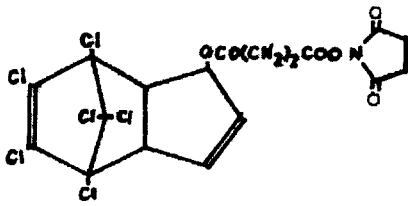
[54] 发明名称 有机氯农药硫丹人工抗原和抗体及其制备方法与应用

[57] 摘要

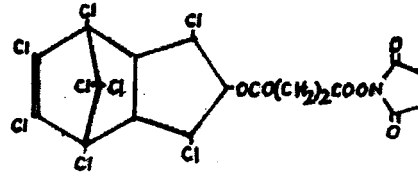
本发明涉及农药硫丹人工抗原抗体及其制备方法与应用，具体涉及环戊二烯类杀虫剂硫丹等小分子化合物人工半抗原、抗原和抗体的制备及其在建立免疫分析方法方面的应用。它以硫丹的衍生物为半抗原，分别与血蓝蛋白等载体蛋白、辣根过氧化物酶连接合成人工抗原和酶标抗原。所合成的半抗原不仅最大程度保留了硫丹的核心结构，而且在空间结构上与硫丹分子高度相似。同时半抗原上的活性基团位置合适，反应活性高，利于半抗原与载体蛋白的连接。人工抗原再经动物免疫、取血、分出抗血清、纯化制得抗体。该抗体稳定、具有良好的特异性和灵敏度，合成方法简便，可用于农药硫丹的快速免疫检测，具有良好的应用前景。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 有机氯农药硫丹人工抗原和抗体，其特征在于：合成了两种环戊二烯类杀虫剂衍生物的半抗原，其结构为：

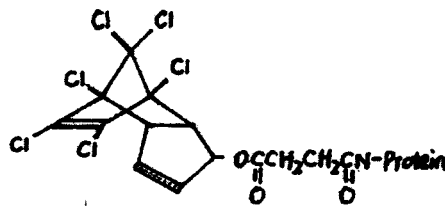


半抗原A



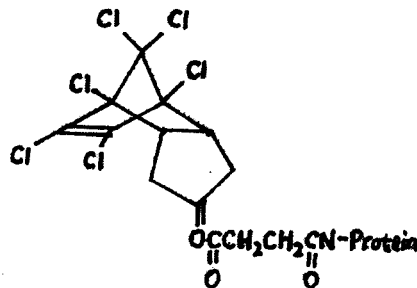
半抗原B

以半抗原A为基础，与载体蛋白KLH相连接，合成分子式为：



的化合物为人工抗原；

以半抗原B为基础



与辣根过氧化物酶连接作为酶标抗原；

其中人工抗原再经动物免疫，取血，分出抗全血清，纯化制得抗体。

2. 权利要求1所述的农药硫丹人工抗原和抗体的制备方法，其特征在于：是由下述步骤制得：

I. 半抗原的设计与合成：

为制备硫丹抗体和酶标记物，合成了两种环戊二烯类杀虫剂衍生物的半抗原；半抗原A和B的合成：

1) 把琥珀酸酐 1-1.5mmol 加到 1-hydroxychloridene(1-1.5mmol)的 2mL 无水

吡啶溶液中，再加入二甲氨基吡啶 DMAP，混合体系搅拌过夜；加入 30mL 乙酸乙酯，有机层用酸 HCl、水和盐水洗，再用硫酸镁干燥；浓缩溶液，残留物过硅胶柱（甲醇/氯仿/乙酸 1-3：90-100：0.1-0.5），得到白色固体产物 1：mp 117-118°C，氯仿/石油醚，

质谱分析： $^1\text{H NMR}$ δ 6.01 (m, H₂), 5.93 (m, H₃), 5.61 (bs, H₁), 3.99 (m, H_{3a}), 3.26 (dd, J_{H_{3a}, H_{7a}} = 7.3 Hz, J_{H₁, H_{7a}} = 1.8 Hz), 2.67 (d, J_{H, H} = 8.8 Hz, COCH₂), 2.67 (d, COCH₂); $^{13}\text{C NMR}$ δ 177.7 (CO₂H), 171.1 (CO), 135.1, 133.6 (C₂, 3), 131.2 (C₅, 6), 102.9 (C₈), 81.6, 79.3 (C₄, 7), 60.5 (C_{3a}), 56.6 (C₁, 7a), 28.8 (2 CH₂);

2) 把N-羟基琥珀酰亚胺0.5-1mmol加到化合物1为0.5-1mmol的10mL DCM溶液中，再加入DMAP；混合体系搅拌过夜，过滤，蒸发，残留物过硅胶柱（丙酮/氯仿=1-5：5-10），得到白色固体；用二氯甲烷/石油醚重结晶，得到半抗原A；质谱分析： $^1\text{H NMR}$ δ 6.04 (m, H₂), 5.97 (m, H₃), 5.64 (bs, H₁), 4.06 (m, H_{3a}), 3.03 (dd, J_{H_{3a}, H_{7a}} = 7.3Hz, J_{H_{7a}, H₁} = 1.9 Hz, H_{7a}), 2.97 (t, J_{HH} = 6.8, COCl₂), 2.85 (s, 2 × NCOCH₂), 2.75 (t, COCH₂); $^{13}\text{C NMR}$ δ 169.8 (CO), 168.8 (2 × CON), 167.5 (CO), 134.9, 133.7 (C₂, 3), 131.4, 128.9 (C₅, 6); 103.8, 102.9 (C₈) (isomers at C₁), 81.6, 79.6 (C₄, 7), 60.4 (C_{3a}), 56.3 (C₁, 7a), 28.6 [C₃ (butane)], 26.1 [C₂ (butane)], 25.5, 25.4 (2 × CHCON);

3) 将1-hydroxychloridene 按化合物1 的处理方式，得到中间化合物A，性状为白色固体：mp 177-181°C；质谱分析： $^1\text{H NMR}$ δ 5.71 (dd, J_{H₁, H₂} = 9.6Hz, H₂), 3.85 (m, H₁, 3), 3.76 (2 × d, J_{H, H} = 2.3 Hz, H_{3a}, 7a), 2.81 [m (11 lines A₂B₂), 4H, 2 × CH₂]; $^{13}\text{C NMR}$ δ 173.7, (CO₂H), 170.9 (CO), 132.2 (C₅, 6); 103.6 (C₈), 81.7, 79.8 (C₄, 7), 56.6 (C_{3a}, 7a), 55.1 (C₁, 3), 28.8, 28.7 (2 × CH₂); 然后将中间化合物A按半抗原 I 的处理方法，得到琥珀酰亚胺酯的白色固体，即半抗B；

II. 人工抗原的合成：

用半抗原 A 以酰胺基 CONH 为桥梁，通过活性酯法，分别连接到卵清蛋白 (ovalbumin, OA) 或血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 上，合成人工抗原；具体做法如下：

取半抗原 A 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 DMF 中,加入 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶于 DMF 溶液和 N,N-二环己基碳二亚胺溶于 DMF 溶液,使半抗原 A、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)与 N,N-二环己基碳二亚胺三者摩尔比为 1: 4-5: 3-4,在 22-25℃下,搅拌反应 1 小时,然后放于 4℃冰箱内 18 小时,离心除去沉淀,再将上层活化酯液加入到 pH=7.0 蛋白质 PBS 溶液中,其半抗原与蛋白质摩尔比为 10-50: 1,经搅拌后于 4℃下反应 5 小时,最后将反应液装入透析袋,4℃下、pH=7.4 的 PBS 中透析,精确量取蛋白质偶联物溶液的体积,测定浓度和结合比,分装, -20℃保存;

III. 酶标抗原的制备:

用半抗原 B 与辣根过氧化物酶连接即制成酶标抗原,用于显色反应;其具体做法同人工抗原的合成 II;

IV. 免疫与特异性抗体制备:

• 免疫: 免疫动物选用雌性大白兔,免疫方法采用皮下和肌肉注射法,初免后进行四次加强免疫,加强免疫分别于初次免疫后 2 周、4 周和 6 周后免疫三次,此后间隔一个月,第五次免疫完后 9 天时由兔子的耳缘静脉取血,进行效价检测;具体做法是:

初次免疫: 取 1mg 上述人工抗原溶于 0.9%的 NaCl 溶液和弗氏完全佐剂等体积所配制的溶液中,进行动物免疫;

加强免疫: 用 0.5mg 上述人工抗原溶于 0.9%的 NaCl 溶液和弗氏不完全佐剂等体积所配制的溶液,进行动物免疫;

• 抗体纯化: 定时监测动物抗体效价,当抗体对一定的包被抗原达到适宜效价时,采集血液,并离心获得抗血清,使用 G-Sepharose 蛋白亲和层析柱对抗血清进行纯化,制备 IgG 抗体。

3. 权利要求 1 所述的农药硫丹人工抗原和抗体在硫丹的免疫检测方法中的应用,其特征在于: 该方法如下:

• 包被: 将制备好的抗体溶于 50mmol、pH9-10 的碳酸缓冲液中,配制成 10 mg/mL 的包被液,酶标条的每个孔加 100 μ l 包被液 12-16 小时,将包被好酶标条的每个孔,用 PBST 即磷酸盐缓冲液 0.05% (v/v), Tween20 洗液洗涤三次;

• 封闭: 每孔加入 150-200 μ l、1% 牛血清蛋白 (BSA) / PBS 封闭液,封闭一小时;

• 加样: 将待测样品溶于含有 1% BSA 的 PBS 中,硫丹标样也溶于含有 1% BSA

的PBS中，加样时每孔加入50 μ l 上述待测样品或标样：

- 竞争反应：将酶标抗原溶于含有0.1%鱼皮胶(FG)-PBS缓冲液中，加入待测样品或标样后，每孔加入50 μ l 酶标抗原溶液，孵育10分钟或60分钟后用洗板液洗涤三次；

- 显色：显色底物使用四甲基联苯胺(TMB)，每孔加入150 μ l 四甲基联苯胺(TMB)-双氧水溶液(5mg四甲基联苯胺溶液溶于1ml底物缓冲液)，显色5分钟或30分钟后每孔加入50 μ l 5mol/L的硫酸终止；反应液在自动酶标仪上读数。

4. 权利要求3所述的农药硫丹人工抗原和抗体在硫丹免疫检测方法中的应用，其特征在于：待测样品为待测物品的农药硫丹提取物，该提取物的快速提取方法采用甲醇提取法，其具体做法是：用5倍体积的甲醇，浸泡未经粉碎的样品1-2小时。

有机氯农药硫丹人工抗原和抗体及其制备方法与应用

技术领域

本发明属于农药小分子化合物(分子量小于 1000 道尔顿)免疫化学和残留分析技术领域。尤其涉及具有环戊二烯类杀虫剂硫丹等小分子农药人工半抗原、特异性抗原的设计合成,和免疫动物特异性抗体的制备及其在建立免疫分析方法方面的应用。

背景技术

硫丹是一种极为广谱的杀虫剂,主要针对多种咀嚼式和刺吸式口器害虫,同时可兼治一些蛾类。可防治鳞翅目的蛾类和蝶类幼虫(如各种食叶性、蛀铃、蛀果和蛀茎幼虫等);鞘翅目的甲虫和象鼻虫;同翅目的蚜虫和叶蝉及白粉虱;半翅目的蝽象类;缨翅目的各种蓟马;双翅目的吸浆虫;蜱螨目的缨螨和跗线螨。对害虫不易产生抗性。杀虫谱广,并可与大多数农药混用,增效作用明显。除防治害虫外,亦可提高农作物品质,植株使用后,叶色更绿,更健壮。

硫丹为高毒的有机氯杀虫剂。对人有致突变作用。对中枢神经系统有损害。主要损害中枢神经系统的运动中枢、小脑、脑干和肝、肾、生殖系统,为致肿瘤物。可引起惊厥。一般表现为头痛、痉挛、口吐泡沫,嗜睡,震颤。

然而,由于分子量小于 1000dolton(道尔顿)的小分子有毒化学品,如农药及其代谢产物,其传统的残留分析方法,主要是依靠气相色谱(GC)、液相色谱(HPLC)或质谱等物化分析手段。该传统的理化分析方法,繁琐复杂、成本较高、分析速度慢,难以满足实际分析的需要,因此迫切要求发展简便、快速、灵敏的分析技术。

与大分子不同,小分子化合物免疫分析有自身特点:

(1)小分子化合物($MW \leq 1000dolton$)一般不具有免疫原性,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这一目标小分子化合物的特异性抗体。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,因此它们是决定产生其特异性抗体和建立免疫分析方法的关键。

(2)虽然小分子化合物不具有免疫原性,但具有反应原性,即具有与相应抗体发生免疫学反应的能力,并可体外定量进行,遵循质量作用定律。

(3)基于抗原抗体免疫反应检测小分子化台物的分析技术,目前多采用酶联

免疫分析 (ELISA)。利用酶促反应显示抗原抗体的定量结合, 操作简单, 又具有相当的灵敏度, 近年来发展很快。80 年代以来发展起来的农药 ELISA 和简易酶免疫 EIA 技术, 使农药残留分析在方法上获得更大的生命力; 对使用快速分析样本基质过于复杂, 用普通理化方法难以分析的农药残留, 具有相当的应用价值。

免疫分析技术被引入农药残留分析领域, 成为一种最有发展和应用潜力的微量分析技术之一, 受到广泛的重视。第一个农药免疫分析的报道是 1967 年 Centen 等人制备的农药马拉硫磷的抗血清。1980 年 Hammock 和 Mumma, 进一步探讨了农药免疫分析方法的理论和技术之后, 使 ELISA 农药分析技术, 进入了一个崭新的阶段。

农药小分子化合物(分子量小于 1000 道尔顿), 依靠免疫学、免疫化学基本原理和生物技术手段。该技术研究的关键是半抗原的分子设计、合成和人工全抗原及抗体的制备。因此, 目标分析物分子免疫学特性, 以及如何通过化学或生化技术突出和利用这些特性, 是该领域重要的研究内容。这一技术目前已成为微量分析研究的一个崭新领域, 可与传统分析方法并列作为一项新的分析途径。硫丹人工抗原和特异性抗体以及以此为基础建立免疫分析方法在国内尚未见报道。

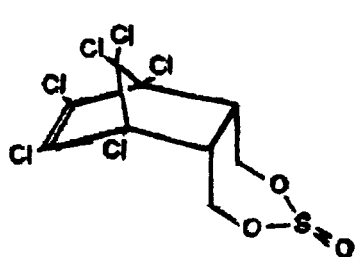
发明内容

针对上述情况, 当前急需一种简易快速有效地检测农药硫丹的方法。本发明的目的, 是设计合成具有环戊二烯分子结构的有机氯农药硫丹的半抗原和人工抗原, 独特之处在于突出了这类农药分子特异性抗原决定簇, 又克服了化学合成的困难, 免疫动物诱导产生亲合性很高的特异性抗体; 并以此为基础建立了 ELISA 方法即快速免疫分析方法, 准确检测有机氯农药硫丹。

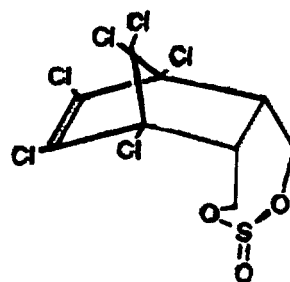
本发明的技术方案如下。

本发明设计、合成了小分子目标分析物半抗原, 并与载体蛋白质偶联, 制备有效人工抗原, 免疫动物制备对小分子分析物特异性抗体, 利用抗原抗体的特异性免疫学反应和易被检测识别的标记物的放大作用, 从而定性定量地检测样本中超微量小分子目标分析物, 即可用于样本测定。其选择性决定于免疫学反应的特异性, 其灵敏度取决于抗体的亲合性和标记物的可检性。因此可以快速准确地分析检测农药硫丹在样本中的残用量。该技术研究的关键是半抗原的分子设计、合成和人工全抗原及抗体的制备。

硫丹的结构如下图所示:

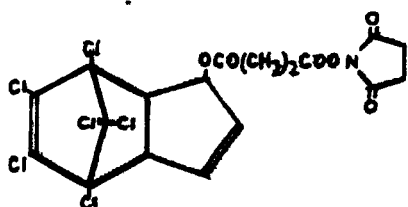


α-硫丹

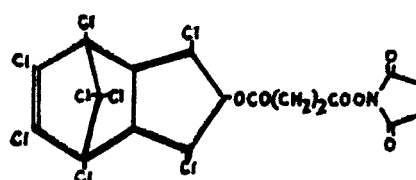


β-硫丹

硫丹的分子结构可以分为两个结构单元：一部分是六氯环戊二烯，另一部分是亚硫酸酯。从免疫学的角度分析，六氯环戊二烯的空间结构复杂，分子量较大，可以作为抗原决定簇。半抗原的设计、合成是本方法成败的关键所在。为突出该类农药分子特异性抗原决定簇，本发明选择合成了两种环戊二烯类杀虫剂衍生物的半抗原，其结构为：

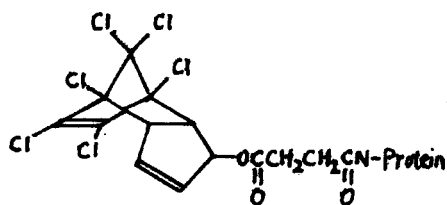


半抗原A



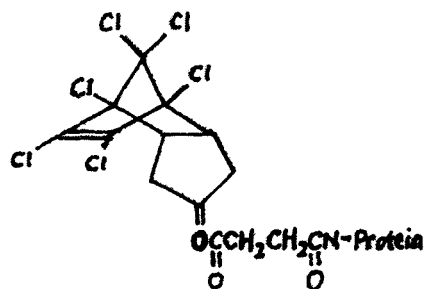
半抗原B

本发明以半抗原A为基础，与载体蛋白KLH相连接合成分子式为



的化合物为人工抗原；

本发明以半抗原B为基础



与辣根过氧化物酶连接作为酶标抗原；

其中人工抗原再经动物免疫，取血，分出抗全血清，纯化制得抗体。

农药硫丹特异性抗体的制备方法：

1. 半抗原设计与合成

为了制备硫丹抗体和酶标记物，合成了两种环戊二烯类杀虫剂衍生物的半抗原。

半抗原A和B的合成：

- 1) 把琥珀酸酐（1-1.5mmol）加到1-hydroxychlordehene(1-1.5mmol)的2mL无水吡啶溶液中，再加入二甲氨基吡啶（DMAP），混合体系搅拌过夜。加入30mL乙酸乙酯，有机层用酸（HCl），水和盐水洗，再用硫酸镁干燥。浓缩溶液，残留物过硅胶柱（甲醇/氯仿/乙酸 1-3：90-100：0.1-0.5），得到白色固体产物1：mp 117-118℃（氯仿/石油醚），质谱分析： $^1\text{H NMR}$ δ 6.01 (m, H₂), 5.93 (m, H₃), 5.61 (bs, H₁), 3.99 (m, H_{3a}), 3.26 (dd, J_{H_{3a}, H_{7a}} = 7.3 Hz, J_{H₁, H_{7a}} = 1.8 Hz), 2.67 (d, J_{H, H} = 8.8 Hz, COCH₂), 2.67 (d, COCH₂); $^{13}\text{C NMR}$ δ 177.7 (CO₂H), 171.1 (CO), 135.1, 133.6 (C_{2,3}), 131.2 (C_{5,6}), 102.9 (C₈), 81.6, 79.3 (C_{4, 7}), 60.5 (C_{3a}), 56.6 (C_{1,7a}), 28.8 (2 CH₂).
- 2) 把N-羟基琥珀酰亚胺(0.5-1mmol)加到化合物1(0.5-1mmol)的10mL DCM溶液中，再加入DMAP。混合体系搅拌过夜，过滤，蒸发，残留物过硅胶柱（丙酮/氯仿=1-5：5-10）得到白色固体：用二氯甲烷/石油醚重结晶，得到半抗原A。质谱分析： $^1\text{H NMR}$ δ 6.04 (m, H₂), 5.97 (m, H₃), 5.64 (bs, H₁), 4.06 (m, H_{3a}), 3.03 (dd, J_{H_{3a}, H_{7a}} = 7.3Hz, J_{H_{7a}, H₁} = 1.9 Hz, H_{7a}), 2.97 (t, J_{HH} = 6.8, COCl₂),

2.85 (s, 2 × NCOCH₂), 2.75 (t, COCH₂); ¹³C NMR δ 169.8 (CO), 168.8 (2 × CON), 167.5 (CO), 134.9, 133.7 (C2, 3), 131.4, 128.9 (C5, 6); 103.8, 102.9 (C8) (isomers at C1), 81.6, 79.6 (C4, 7), 60.4 (C3a), 56.3 (C1, 7a), 28.6 [C3 (butane)], 26.1 [C2 (butane)], 25.5, 25.4 (2 × CHCON).

- 3) 将1-hydroxychloridene 按化合物1 的处理方式, 得到中间化合物A, 性状为白色固体: mp 177-181°C; 质谱分析: ¹H NMR δ 5.71 (dd, J_{H1, H2} = 9.6Hz, H2), 3.85 (m, H1, 3), 3.76 (2 × d, J_{H, H} = 2.3 Hz, H3a, 7a), 2.81 [m (11 lines A₂B₂), 4H, 2 × CH₂]; ¹³C NMR δ 173.7, (CO₂H), 170.9 (CO), 132.2 (C5, 6); 103.6 (C8), 81.7, 79.8 (C4, 7), 56.6 (C3a, 7a), 55.1 (C1, 3), 28.8, 28.7 (2 × CH₂). 然后将中间化合物A按半抗原 I 的处理方法, 得到琥珀酰亚胺酯的白色固体, 即半抗原B。

2. 人工抗原的合成

用半抗原 A 以酰胺基 CONH 为桥梁, 通过活性酯法, 分别连接到卵清蛋白 (ovalbumin, OA) 或血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 上, 合成人工抗原; 具体做法是:

取半抗原 A 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 DMF 中, 加入 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶于 DMF 溶液和 N,N-二环己基碳二亚胺溶于 DMF 溶液, 使半抗原 A、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 与 N,N-二环己基碳二亚胺三者摩尔比为 1: 4-5: 3-4, 在 22-25 °C 下, 搅拌反应 1 小时, 然后放于 4°C 冰箱内 18 小时, 离心除去沉淀, 再将上层活化酯液加入到 pH=7.0 蛋白质 PBS 溶液中, 其半抗原与蛋白质摩尔比为 10-50: 1, 经搅拌后于 4°C 下反应 5 小时, 最后将反应液装入透析袋, 4°C 下、pH=7.4 的 PBS 中透析, 精确量取蛋白质偶联物溶液的体积, 测定浓度和结合比, 分装, -20 °C 保存;

3. 酶标抗原的制备

用半抗原 B 与辣根过氧化物酶连接即制成酶标抗原, 用于显色反应; 其具体做法同人工抗原的合成 II;

4. 免疫与特异性抗体制备

• 免疫：免疫动物选用雌性大白兔，免疫方法采用皮下和肌肉注射法，初免后进行四次加强免疫，加强免疫分别于初次免疫后2周、4周和6周后免疫三次，此后间隔一个月，第五次免疫完后9天时由兔子的耳缘静脉取血，进行效价检测；具体做法是：

初次免疫：取1mg上述人工抗原溶于0.9%的NaCl溶液和弗氏完全佐剂等体积所配制的溶液中，进行动物免疫；

加强免疫：用0.5mg上述人工抗原溶于0.9%的NaCl溶液和弗氏不完全佐剂等体积所配制的溶液，进行动物免疫；

• 抗体纯化：定时监测动物抗体效价，当抗体对一定的包被抗原达到适宜效价时，采集血液，并离心获得抗血清，使用G-Sepharose蛋白亲和层析柱对抗血清进行纯化，制备IgG抗体。

上述制备的农药硫丹抗体可用于硫丹的免疫检测。

免疫分析方法的建立和测定条件的优选：

利用方阵实验分别确定抗原抗体结合效价、亲和性以及ELISA方法的抗体和酶标记物的最适效价。本发明建立了的快速免疫检测方法和实验室标准检测方法，并对pH值、离子强度等影响测定的因素进行分析，确定最佳工作条件，建立标准曲线：即目标分析物浓度对抗体的抑制率（或结合率B/B₀）的相关曲线。

目标分析物浓度对抗体的抑制率 $I = (A_{\max} - A_{\min}) - (A_i - A_{\min}) / (A_{\max} - A_{\min}) * 100$

抗体与抗原的结合率 $B/B_0 = (A_i - A_{\min}) / (A_{\max} - A_{\min}) * 100$

式中：A_{max}空白孔平均吸光值；A_{min}免疫前免血清对照孔平均吸光值。A_i加样孔平均吸光值。以抑制率或结合率B/B₀为纵坐标、分析物浓度C为横坐标绘制标准曲线。

抗体特异性：以抗体与结构类似化合物的交叉反应程度，以抑制抗体最大结合率的50%所需目标分析物的浓度I_{50i}与所需各种结构类似化合物的浓度I_{50M}之比的百分数表示，即交叉反应率C.R(%)。

$C.R(\%) = I_{50i} / I_{50M} * 100$

交叉反应越小，抗体特异性越高。

上述制备的农药硫丹抗体可用于硫丹的免疫检测方法中，其方法如下：

• 包被：将制备好的抗体溶于50mmol、pH9-10的碳酸缓冲液中，配制成10mg/mL的包被液，酶标条的每个孔加100μl包被液12-16小时，将包被好的酶标条的每个孔，用PBST即磷酸盐缓冲液0.05%(v/v)，Tween20洗液洗涤三次；

• 封闭：每孔加入150-200μl、1%牛血清蛋白(BSA)/PBS封闭液，封闭一小时；

- 封闭：每孔加入150-200 μ l、1%牛血清蛋白(BSA)/PBS封闭液，封闭一小时；
- 加样：将待测样品溶于含有1% BSA的PBS中，西维因标样也溶于含有1% BSA的PBS中，加样时每孔加入50 μ l上述待测样品或标样；
- 竞争反应：将酶标抗原溶于含有0.1%鱼皮胶(FG)-PBS缓冲液中，加入待测样品或标样后，每孔加入50 μ l酶标抗原溶液，孵育10分钟或60分钟后用洗板液洗涤三次；
- 显色：显色底物使用四甲基联苯胺（TMB），每孔加入150 μ l四甲基联苯胺（TMB）-双氧水溶液（5mg四甲基联苯胺溶液溶于1ml底物缓冲液），显色5分钟或30分钟后每孔加入50 μ l 5mol/L的硫酸终止；反应液在自动酶标仪上读数。

需要说明的是：

上述待测样品为待测物品的农药硫丹提取物，该提取物的快速提取方法采用甲醇提取法。

甲醇提取法的具体做法是：用5倍体积的甲醇，浸泡未经粉碎的样品12-16小时；或用10g粉碎后的样品浸泡于50ml甲醇中，振荡2分钟；或用10g粉碎后的样品浸泡于50ml甲醇中，搅拌2分钟，静置、取上清液，即得到待测样品。

本发明的有益效果如下。

与其他同类方法相比，本发明具有特异、灵敏、准确、快速、方便、廉价等特点。该设计、合成的半抗原与目标待测物相似程度高，对待测物的特征结构保留完整，为制备特异性良好的抗体奠定了基础。其抗体具有良好的特异性和灵敏度，检测极限达到 0.8 μ g/kg，而且抗体的稀释度可达到 1/1 \times 10⁶。所得抗体和酶标抗原稳定，具有常温保藏时间长的优点。

经试验验证，上述半抗原，其合成方法简便，且所用主要原料价格较为低廉、容易获得，在一般化学试剂公司都可购买。由于合成效率高、反应步骤少，半抗原只需三步反应既可合成，从而提高了反应的可控性。另外，合成产物的提取、纯化方法简便，只需要对合成产物进行结晶，即可获得高纯度的目的产物。因此，本发明合成半抗原的方法与其他方法相比较，更加易于推广普及。

本发明提供的快速检测方法操作简便、快速，完成全部检测操作过程只需40-60分钟，而且检测的精确度可达90%以上，非常适合现场检测的需要。由于抗体和酶标抗原，在常温下可以保藏1周、酶标抗原包备的酶标板在4 $^{\circ}$ C下可以保藏6个月以上，从而为进行大规模样品的集中检测，提供了极大的方便。因此，本发明不仅在实验室检测中表现出色，并为开发出成本低廉、检测效率高、操作简便的酶联免疫快速检测工具，奠定了基础，具有良好的应用前景；既有经济效益又有社会效益。

附图说明

图1、图2分别为半抗原A、B；图3为人工抗原；图4为酶标抗原。

实施例 1:

1. 半抗原合成

半抗原A和B的合成:

把琥珀酸酐 (1-1.5mmol) 加到1-hydroxychloridene(1-1.5mmol)的2mL无水吡啶溶液中, 再加入二甲氨基吡啶 (DMAP), 混合体系搅拌过夜。加入30mL乙酸乙酯, 有机层用酸 (HCl), 水和盐水洗, 再用硫酸镁干燥。浓缩溶液, 残留物过硅胶柱 (甲醇/氯仿/乙酸 1-3: 90-100: 0.1-0.5), 得到白色固体产物1。

- 1) 把N-羟基琥珀酰亚胺(0.5-1mmol)加到化合物1(0.5-1mmol)的10mL DCM溶液中, 再加入DMAP。混合体系搅拌过夜, 过滤, 蒸发, 残留物过硅胶柱 (丙酮/氯仿=1-5: 5-10) 得到白色固体: 用二氯甲烷/石油醚重结晶, 得到半抗原A。
- 2) 将1-hydroxychloridene 按化合物1 的处理方式, 得到中间化合物A, 然后将中间化合物A按半抗原 I 的处理方法, 得到琥珀酰亚胺酯的白色固体, 即半抗原B。

2. 人工抗原的合成

用半抗原 A 以酰胺基 CONH 为桥梁, 通过活性酯法, 分别连接到卵清蛋白 (ovalbumin, OA) 或血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 上, 合成人工抗原; 具体做法是:

取半抗原 A 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 DMF 中, 加入 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶于 DMF 溶液和 N,N-二环己基碳二亚胺溶于 DMF 溶液, 使半抗原 A、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 与 N,N-二环己基碳二亚胺三者摩尔比为 1: 4-5: 3-4, 在 22-25 °C 下, 搅拌反应 1 小时, 然后放于 4 °C 冰箱内 18 小时, 离心除去沉淀, 再将上层活化酯液加入到 pH=7.0 蛋白质 PBS 溶液中, 其半抗原与蛋白质摩尔比为 10-50: 1, 经搅拌后于 4 °C 下反应 5 小时, 最后将反应液装入透析袋, 4 °C 下、pH=7.4 的 PBS 中透析, 精确量取蛋白质偶联物溶液的体积, 测定浓度和结合比, 分装, -20 °C 保存;

3. 酶标抗原的制备

用半抗原 B 与辣根过氧化物酶连接即制成酶标抗原, 用于显色反应; 其具体做法同人工抗原的合成 II;

4. 免疫与特异性抗体制备

• 免疫:

动物选择雄性大白兔，月龄 3 个月，体重 1.5 公斤，饲养于标准实验动物房中，连续观察 3 天，确定身体状况正常后进行免疫。

初次免疫：精确称取 1mg 人工抗原溶于 0.5ml 0.9% 的 NaCl 溶液和 0.5ml 弗氏完全佐剂所配制的溶液免疫。

加强免疫用 0.5mg 人工抗原溶于 0.5ml 0.9% 的 NaCl 溶液和 0.5ml 弗氏不完全佐剂所配制的溶液免疫。加强免疫分别于初次免疫后 2 周、4 周和 6 周后免疫三次，此后间隔一个月。第五次免疫完后 9 天时由兔子的耳缘静脉取血，进行效价检测。

• 由抗血清中纯化制备抗体

定时监测动物抗体效价，当终点效价达到 20 万以上时，由颈动脉采全血。将采集的全血 22℃ 静止 2 小时后在 4 度下静止 8 小时，然后 3500 转/min 离心 10 分钟，收集上清液于 -20℃ 保存。将离心后获得的血清用 G-SepharoseCL-4B 免疫亲和层析柱过滤，对抗血清进行纯化，制备 IgG 抗体。

5. 免疫检测方法的建立

拟测物品为：红葡萄。使用快速免疫检测方法，检测样品硫丹的含量步骤如下：

1) 提取待测样品——甲醇提取法①

分别用 50ml 甲醇浸泡 10 克红葡萄样品 1 小时。其浸泡液即为待测样品。

2) 检测方法及方阵试验评价方法

采用快速免疫检测方法（试验使用 8 孔酶标条）：

• 包被：将制备好的抗体溶于 50 mmol、pH9.6 的碳酸缓冲液中，配制成 10 μ g/mL 的包被液。在标条的每个孔内，加 100 μ l 包被液，12 小时。将包被好的酶标条的每个孔用 PBST（磷酸盐缓冲液 0.05% (v/v)，Tween 20）洗液洗涤三次。

• 封闭：每孔加入 150 μ l、1% 牛血清蛋白 (BSA)/PBS 封闭液，封闭一小时。

• 加样：将待测样品溶于含有 1% BSA 的 PBS 中，硫丹标样也溶于含有 1% BSA 的 PBS 中。加样时每孔加入 50 μ l 上述待测样品或标样。

• 竞争反应：将酶标抗原溶于含有 0.1% 鱼皮胶 (FG)-PBS 缓冲液中，加入待测样品或标样后，每孔加入 50 μ l 酶标抗原溶液，孵育 10 分钟后用洗板液洗涤三次。

• 显色：显色底物使用四甲基联苯胺 (TMB)。每孔加入 150 μ l 四甲基联苯胺 (TMB)-双氧水溶液 (5mg 四甲基联苯胺溶液溶于 1ml 底物缓冲液)，显色 5 分钟后每孔加入 50 μ l 5mol/L 的硫酸终止。反应液在自动酶标仪上读数。

上述检测方法方阵试验结果如下西维因的抑制率标准曲线所示。在图 1 中 (◆) 和 (■) 分别为 1% 的 BSA-PBS 标样和红葡萄提取液的硫丹抑制率标准曲线。从试验

结果可以看出，西维因抗体的特异性很好。

• 硫丹直接竞争 ELISA 检测方法性能指标的评价

1. 检测限

对于直接竞争 ELISA 法，检测限是指抑制率为 15% 时的标准物浓度，研究建立的硫丹直接竞争 ELISA 检测方法 $IC_{15} = 1.0 \pm 0.2 \text{ppb}$ ，其检测限为 $1.0 \pm 0.2 \text{ppb}$

2. 精密度

严格控制分析条件，按标准操作，对于建立的硫丹 ELISA 检测方法进行了精密度的测试，分别以板内变异和板间变异表示。

2.1 板内变异

取六个不同浓度的硫丹标准溶液，进行 ELISA 分析，每个浓度作 10 个复孔，测得抑制率（IC）进行分析，结果见表 2。

表 2 硫丹直接竞争 ELISA 板内变异

浓度	IC±SD	CV
1	7.92±2.28	28.79%
2	29.84±4.69	15.72%
3	48.68±4.01	8.24%
4	70.12±4.88	6.96%
5	91.77±2.89	3.15%
6	98.34±1.05	1.07%

2.2 板间变异

取六个不同浓度的硫丹标准溶液，进行 ELISA 分析，每个浓度每天作两次分析，综合 5 天测得的抑制率（IC）吸光度值进行分析，结果见表 3。

表 3 硫丹直接竞争 ELISA 板间变异

浓度	IC±SD	CV
1	7.43±2.41	32.44%
2	27.18±4.81	17.70%

3	47.59 ± 5.28	11.09%
4	72.16 ± 5.85	8.11%
5	89.98 ± 2.55	2.83%
6	97.53 ± 1.98	2.03%

试验结果表明本发明可以满足快速检测方法的需要。

实施例2:

免疫检测时, 提取样品采用甲醇提取法①即: 分别用 10g 绿葡萄, 胡萝卜, 菠菜, 茶叶, 烟草等五种样品为待测物品, 浸泡于 50ml 甲醇中振荡 60 分钟、静置、取上清液, 即得到待测样品。所得浸泡液即为待测样品。其它同实施例 1。

实施例3:

检测方法采用实验室检测方法 (试验使用8孔酶标条):

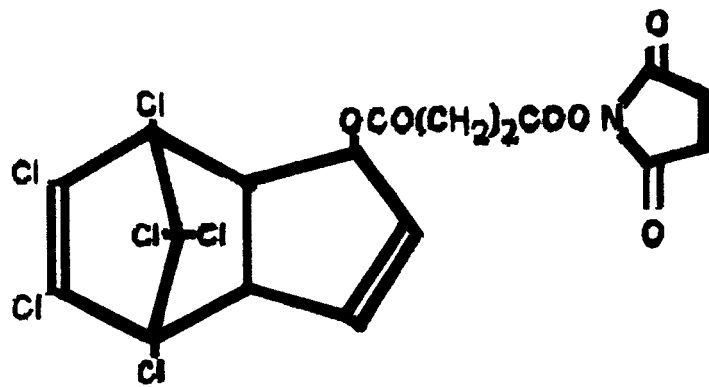
- 包被: 将制备好的抗体溶于50 mmol、pH9.6的碳酸缓冲液中, 配制成10 mg/mL的包被液。酶标条的每个孔加100 μ l包被液过夜。将包被好的酶标条的每个孔用PBST (磷酸盐缓冲液0.05%(v/v), Tween 20) 洗液洗涤三次。

- 封闭: 每孔加入150 μ l、1%牛血清蛋白(BSA)/PBS封闭液, 封闭一小时。

- 加样: 将待测样品溶于含有1% BSA的PBS中, 硫丹标样也溶于含有1% BSA的PBS中。加样时每孔加入50 μ l上述待测样品或标样。

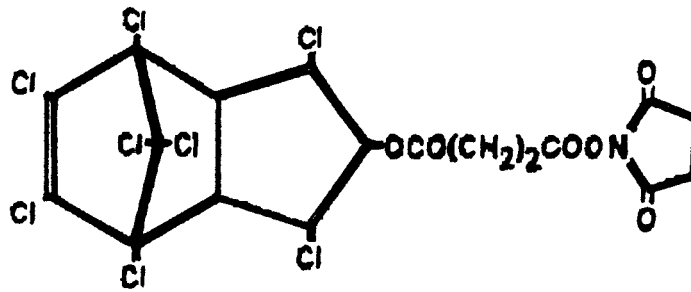
- 竞争反应: 将酶标抗原溶于含有0.1%鱼皮胶(FG)-PBS缓冲液中, 加入待测样品或标样后, 每孔加入50 μ l酶标抗原溶液, 孵育60分钟后用洗板液洗涤三次。

- 显色: 显色底物使用四甲基联苯胺 (TMB)。每孔加入150 μ l四甲基联苯胺 (TMB) -双氧水溶液 (5mg四甲基联苯胺溶液溶于1ml底物缓冲液), 显色30分钟后每孔加入50 μ l 5mol/L的硫酸终止。反应液在自动酶标仪上读数。其它同实施例1。



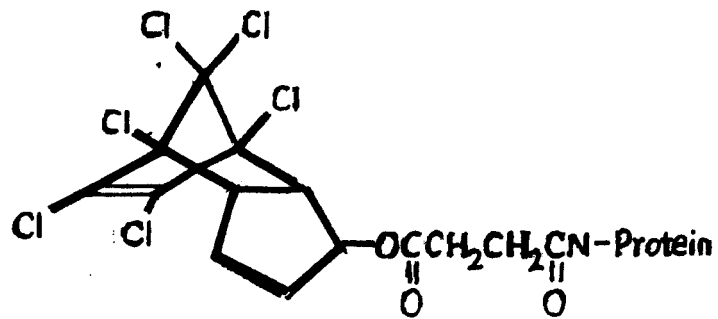
半抗原 A

图 1



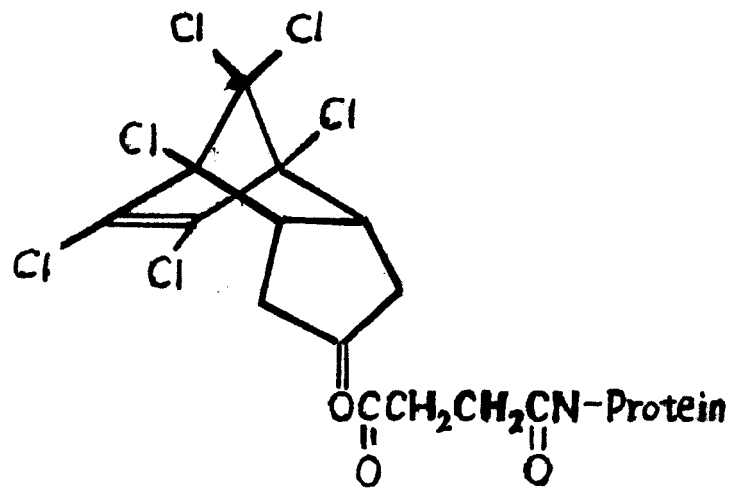
半抗原 B

图 2



以半抗原 A 为基础与载体蛋白 KLH 相连接合成的人工抗原

图 3



以半抗原 B 为基础与辣根过氧化物酶连接的酶标抗原

图 4

专利名称(译)	有机氯农药硫丹人工抗原和抗体及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN1700001A	公开(公告)日	2005-11-23
申请号	CN200510008704.4	申请日	2005-02-24
[标]申请(专利权)人(译)	黄永		
申请(专利权)人(译)	黄永		
当前申请(专利权)人(译)	黄永		
[标]发明人	王硕		
发明人	王硕		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/53 G01N30/00 G01N33/52 A61K39/00		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及农药硫丹人工抗原抗体及其制备方法与应用，具体涉及环戊二烯类杀虫剂硫丹等小分子化合物人工半抗原、抗原和抗体的制备及其在建立免疫分析方法方面的应用。它以硫丹的衍生物为半抗原，分别与血蓝蛋白等载体蛋白、辣根过氧化物酶连接合成人工抗原和酶标抗原。所合成的半抗原不仅最大程度保留了硫丹的核心结构，而且在空间结构上与硫丹分子高度相似。同时半抗原上的活性基团位置合适，反应活性高，利于半抗原与载体蛋白的连接。人工抗原再经动物免疫、取血、分出抗血清、纯化制得抗体。该抗体稳定、具有良好的特异性和灵敏度，合成方法简便，可用于农药硫丹的快速免疫检测，具有良好的应用前景。

