



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103539853 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 29

(21) 申请号 201210237948. X

(22) 申请日 2012. 07. 11

(71) 申请人 天津科技大学

地址 300222 天津市河西区大沽南路 1038
号

(72) 发明人 张燕 王俊平 王硕 生威

(51) Int. Cl.

C07K 14/765 (2006. 01)

C07K 16/06 (2006. 01)

C07D 251/50 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书5页

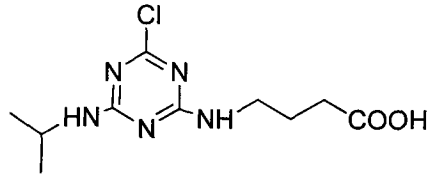
(54) 发明名称

一种抗除草剂阿特拉津的特异性抗体

(57) 摘要

除草剂阿特拉津的半抗原、人工抗原和抗体的制备涉及具有除草剂阿特拉津基本结构的半抗原、人工抗原和抗体的制备。本发明以简便的方法制备了特异性良好的除草剂阿特拉津的抗体。该抗体是以三聚氯氰为原料经过两步取代合成半抗原,然后分别与牛血清白蛋白(BSA)和辣根过氧化物酶(HRP)连接合成人工抗原和酶标抗原。人工抗原再经动物免疫,取血,分离抗血清,纯化制得抗体。该抗体稳定,具有良好的特异性和灵敏度,且合成方法简单,可用于环境和食品中除草剂阿特拉津残留的快速免疫检测,具有良好的应用前景。

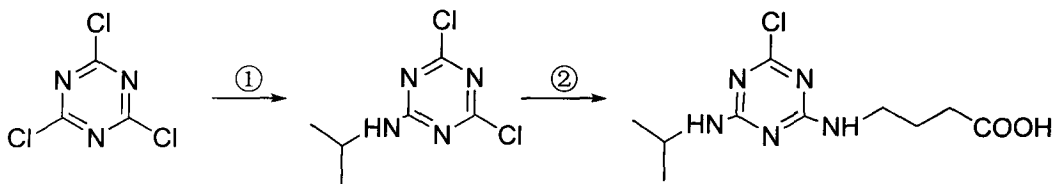
1. 除草剂阿特拉津的人工抗原和抗体其特征在于使用分子式为



的半抗原与牛血清白蛋白 (BSA) 连接合成人工抗原, 与辣根过氧化物酶 (HRP) 连接合成酶标抗原, 其中人工抗原再经过免疫新西兰大耳兔, 取血, 分离出抗血清, 纯化制得抗体;

2. 权利要求 1 所述的除草剂阿特拉津人工抗原的制备方法, 其特征在于是用下述步骤制得:

(1) 半抗原的合成



①准确称取 3.00g 的三聚氯氰溶于 120mL 的乙醚溶液中 (溶液 I), 分别取异丙胺 1.45mL 和三乙胺 2.43mL 于 15mL 的乙醚溶液中 (溶液 II), 溶液 I 和 II 均放置于 -20°C 冰箱预冷, 在冰浴搅拌的条件下, 将溶液 II 逐滴加入溶液 I 中, 滴加过程中会产生大量的白色沉淀, 加完后, 室温搅拌反应 16h, 薄层色谱法追踪是否反应完全, 所用展开剂中正己烷、乙酸乙酯和冰醋酸的体积比为 10 : 1 : 0.2。反应完全后, 将上述溶液过滤除去沉淀, 滤液依次用 4°C 预冷的 HCl (7.5mL, 0.1mol L^{-1}), NaHCO_3 (7.5mL, 0.1mol L^{-1}) 和饱和 NaCl 水溶液 (15mL, 2 次) 洗去杂质, 有机相中加入适量的无水 Na_2SO_4 过夜, 除去溶液中的水后, 蒸干乙醚便得到三聚氯氰的取代物。

②分别取上述取代物 0.375-0.400g 和 4-氨基丁酸 0.205g 溶于 40mL 的无水乙醇中, 超声溶解完全后, 向其中加入三乙胺 0.55mL, 搅拌条件下, 80°C 加热回流反应 24h, 薄层色谱法追踪反应是否完全, 所用展开剂中正己烷、乙酸乙酯和冰醋酸的体积比为 5 : 1 : 0.1。反应完全后蒸干溶剂, 得到的沉淀用 100mL 5% 的 NaHCO_3 溶液复溶, 然后用 30mL CH_2Cl_2 萃取 3 次除去杂质, 最后, 水相用 6mol L^{-1} 的盐酸调 pH 至 1, 此过程会产生白色沉淀, 干燥即得到目标产物。

(2) 活化酯的制备

首先移取 $600\ \mu\text{L}$ 的无水 DMF 于 2mL 的小棕瓶中, 称取半抗原 (4.97mg, 0.018mmol) 溶于 DMF 中并超声 5min 使其溶解充分, 在搅拌的状态下, 依次向其中加入 DCC (18.75mg, 0.09mmol) 和 NHS (10.46mg, 0.09mmol), 溶解充分以后, 室温避光搅拌反应 24h。反应后溶液中有沉淀产生, 4°C , 10000r/min 离心 5min 除去沉淀, 上清即为活化酯液;

(3) 人工抗原的合成

将上述活化酯溶液逐滴加入冰浴条件下的 4mL 含 20mg BSA 的 PBS 溶液中, 室温搅拌 1h 后, 将该溶液置于 4°C 冰箱搅拌过夜, 然后将反应液吸出装入透析袋, 在 4°C 条件下用 pH7.4 的 0.01mol L^{-1} PBS 溶液透析三天, 每天换四次透析液, 最后将透析液取出分装, -20°C 保存;

3. 权利要求 1 所述的阿特拉津酶标抗原的制备方法, 其特征在于是用下述步骤制得:

首先移取 200 μ L 的无水 DMF 于 2mL 的小棕瓶中,称取半抗原 (1.64mg, 0.0006mmol) 溶于 DMF 中并超声 5min 使其充分溶解,在搅拌的状态下,向其中依次加入 EDC(5.75mg, 0.03mmol) 和 NHS(3.45mg, 0.03mmol),溶解完全以后,室温避光搅拌反应 24h。反应后将该活化酯溶液逐滴加入冰浴条件下的 2mL 含 5mg HRP 的 0.05mol L⁻¹ K₂HPO₄ 溶液 (pH 9.1) 中,室温搅拌 1h 后,将该溶液置于 4℃ 冰箱搅拌过夜,然后将反应液吸出装入透析袋,在 4℃ 条件下用 pH 7.4 的 PBS 溶液透析三天,每天换四次透析液,最后将透析液加入等体积的甘油,混匀后分装,并于 -20℃ 保存。

4. 权利要求 1 所述的除草剂阿特拉津抗体的制备方法,其特征在于是用下述步骤制得:

免疫动物选用雄性新西兰大白兔,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、6 周和 8 周后免疫四次,免疫后 9 天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 按照权利要求 2 所述方法合成的人工抗原溶于 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 1mg 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,获得抗阿特拉津的特异性抗体。

一种抗除草剂阿特拉津的特异性抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及选择一种具有 -COOH 的、又最大可能包含阿特拉津特征结构的化合物作为阿特拉津半抗原,并将半抗原制成抗原、进而产生抗体;以及此类半抗原、抗原的合成与抗体制备方法。本发明属于生物技术领域。

背景技术

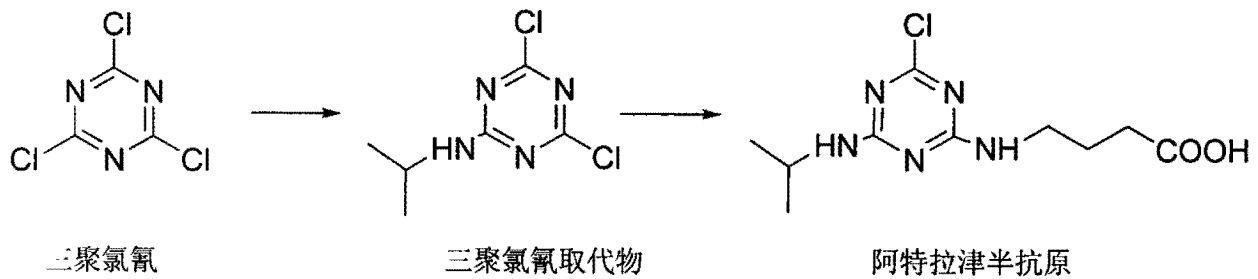
[0002] 除草剂是近 20 年来逐渐发展起来的一种农药类型,随着化学工业的发展,除草剂的品种也逐渐增多。在我国研制和投产的除草剂已达数十种。有些除草剂具有致畸作用,除草剂的安全性已经引起人们的关注,应注意除草剂对环境的污染和人畜毒性作用问题。使用除草剂能在粮食等中残留,通过食物链而使人畜发生慢性危害作用。我国国家标准《食品中阿特拉津最大残留限量标准》(GB 16323-1996),规定阿特拉津最大残留限量为:玉米 $\leq 0.05\text{mg/kg}$ 、甘蔗 $\leq 0.05\text{mg/kg}$,是食品必须检测的安全指标,一般传统上采用气相色谱(GC)、液相色谱(HPLC)或气相色谱质谱法联用等物化方法对其残留进行检测。虽然这些传统的理化分析方法灵敏度较高,而且较为准确,但由于它们普遍操作繁琐复杂、成本较高、分析速度慢,所以难于满足实际分析的需要,因此迫切需要发展一种简单、快速、灵敏的分析技术。免疫分析技术是一种快速、灵敏、操作简单、费用低的检测技术,开发阿特拉津的免疫分析方法是满足当前食品安全检测的需求的重要技术途径。

发明内容

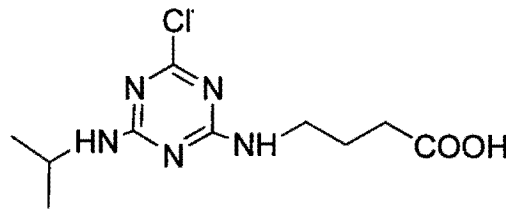
[0003] 本发明设计合成了小分子目标分析物半抗原,并与载体蛋白质偶联,制备有效人工抗原,免疫动物制备对小分子分析物特异性抗体,利用抗原抗体的特异性免疫学反应,从而定性定量测定阿特拉津的量。

[0004] 阿特拉津由于其分子量为 217.6991,小于 1000dalton(道尔顿),不具备免疫原性,不能直接免疫动物获得抗体,因此本发明为达到以上目的所设计的技术方案是按照式 1 所示的合成步骤合成分子结构式如式 2 所示的阿特拉津半抗原:

[0005]



式1 半抗原的合成步骤



式2 阿特拉津半抗原

[0006] 然后将半抗原与载体蛋白联接合成人工抗原,免疫动物,获得抗体。

[0007] 1、阿特拉津半抗原的合成

[0008] 1) 准确称取 3.00g 的三聚氯氰溶于 120mL 的乙醚溶液中 (溶液 I), 分别取异丙胺 1.45mL 和三乙胺 2.43mL 于 15mL 的乙醚溶液中 (溶液 II), 溶液 I 和 II 均放置于 -20°C 冰箱预冷, 在冰浴搅拌的条件下, 将溶液 II 逐滴加入溶液 I 中, 滴加过程中会产生大量的白色沉淀, 加完后, 室温搅拌反应 16h, 薄层色谱法追踪是否反应完全, 所用展开剂中正己烷、乙酸乙酯和冰醋酸的体积比为 10 : 1 : 0.2。反应完全后, 将上述溶液过滤除去沉淀, 滤液依次用 4°C 预冷的 HCl (7.5mL, 0.1mol L^{-1}), NaHCO_3 (7.5mL, 0.1mol L^{-1}) 和饱和 NaCl 水溶液 (15mL, 2 次) 洗去杂质, 有机相中加入适量的无水 Na_2SO_4 过夜, 除去溶液中的水后, 蒸干乙醚便得到三聚氯氰的取代物。

[0009] 2) 分别取上述取代物 0.375-0.400g 和 4-氨基丁酸 0.205g 溶于 40mL 的无水乙醇中, 超声溶解完全后, 向其中加入三乙胺 0.55mL, 搅拌条件下, 80°C 加热回流反应 24h, 薄层色谱法追踪反应是否完全, 所用展开剂中正己烷、乙酸乙酯和冰醋酸的体积比为 5 : 1 : 0.1。反应完全后蒸干溶剂, 得到的沉淀用 100mL 5% 的 NaHCO_3 溶液复溶, 然后用 30mL CH_2Cl_2 萃取 3 次除去杂质, 最后, 水相用 6mol L^{-1} 的盐酸调 PH 至 1, 此过程会产生白色沉淀, 干燥即得到半抗原。

[0010] 2、免疫原的制备

[0011] 本发明还提供了上述阿特拉津半抗原的用途, 是用作动物免疫的抗原体系的原料

[0012] 1) 活化酯的制备

[0013] 首先移取 $600\ \mu\text{L}$ 的无水 DMF 于 2mL 的小棕瓶中, 称取半抗原 (4.97mg, 0.018mmol) 溶于 DMF 中并超声 5min 使其溶解充分, 在搅拌的状态下, 依次向其中加入 DCC (18.75mg, 0.09mmol) 和 NHS (10.46mg, 0.09mmol), 溶解充分以后, 室温避光搅拌反应 24h。反应后溶液中有沉淀产生, 4°C , 10000r/min 离心 5min 除去沉淀, 上清即为活化酯液;

[0014] 2) 人工抗原的合成

[0015] 将上述活化酯溶液逐滴加入冰浴条件下的 4mL 含 20mg BSA 的 PBS 溶液中, 室温搅拌 1h 后, 将该溶液置于 4°C 冰箱搅拌过夜, 然后将反应液吸出装入透析袋, 在 4°C 条件下用 pH7.4 的 0.01mol L⁻¹PBS 溶液透析三天, 每天换四次透析液, 最后将透析液取出分装, -20°C 保存;

[0016] 3、除草剂阿特拉津抗体的制备

[0017] 免疫动物选用雄性新西兰大白兔, 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、6 周和 8 周后免疫四次, 免疫后 9 天由兔子的耳缘静脉取血, 进行效价检测, 具体做法是:

[0018] 初次免疫: 取 1mg 按照权利要求 2 所述方法合成的人工抗原溶于 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;

[0019] 加强免疫: 用 1mg 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;

[0020] 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, 获得抗阿特拉津的特异性抗体。

[0021] 本发明的优点和积极效果

[0022] 1. 本发明最大程度地保留了阿特拉津的化学结构, 为国内外首创的新化合物, 用此半抗原制备的免疫抗原去免疫动物最大可能保留了原来阿特拉津的分子结构, 这为获得对阿特拉津有高度特异性的抗体提供了保证。

[0023] 2. 在合成阿特拉津半抗原的基础上, 合成其活化酯能大大提高半抗原与大分子蛋白的联结率。

[0024] 3. 本发明, 具有特异、灵敏、准确、快速、廉价等特点, 所设计、合成的半抗原为制备特异性良好的抗体奠定了基础。

[0025] 4. 经试验验证, 上述半抗原, 其合成方法较简单, 且所用主要原料价格低廉、容易获得, 在一般化学试剂公司均可购得。

[0026] 5. 本发明经试验验证上述半抗原, 其合成方法简便, 合成效率高, 反应步骤少, 提高了反应的可控性; 另外, 合成产物的提取、纯化方法简便, 易于推广普及。

具体实施方式

[0027] 下面对本发明实施例做进一步说明; 下述实施例是说明性的, 不是限定性的, 不能以下述实施例来限定本发明的保护范围。

[0028] 实施例 1:

[0029] 1、半抗原合成

[0030] 1) 准确称取 3.00g 的三聚氯氰溶于 120mL 的乙醚溶液中 (溶液 I), 分别取异丙胺 1.45mL 和三乙胺 2.43mL 于 15mL 的乙醚溶液中 (溶液 II), 溶液 I 和 II 均放置于 -20°C 冰箱预冷, 在冰浴搅拌的条件下, 将溶液 II 逐滴加入溶液 I 中, 滴加过程中会产生大量的白色沉淀, 加完后, 室温搅拌反应 16h, 薄层色谱法追踪是否反应完全, 所用展开剂中正己烷、乙酸乙酯和冰醋酸的体积比为 10 : 1 : 0.2。反应完全后, 将上述溶液过滤除去沉淀, 滤液

依次用 4℃ 预冷的 HCl (7.5mL, 0.1mol L⁻¹), NaHCO₃ (7.5mL, 0.1mol L⁻¹) 和饱和 NaCl 水溶液 (15mL, 2 次) 洗去杂质, 有机相中加入适量的无水 Na₂SO₄ 过夜, 除去溶液中的水后, 蒸干乙醚便得到三聚氯氰的取代物。

[0031] 2) 分别取上述取代物 0.375g 和 4-氨基丁酸 0.205g 溶于 40mL 的无水乙醇中, 超声溶解完全后, 向其中加入三乙胺 0.55mL, 搅拌条件下, 80℃ 加热回流反应 24h, 薄层色谱法追踪反应是否完全, 所用展开剂中正己烷、乙酸乙酯和冰醋酸的体积比为 5 : 1 : 0.1。反应完全后蒸干溶剂, 得到的沉淀用 100mL 5% 的 NaHCO₃ 溶液复溶, 然后用 30mL CH₂Cl₂ 萃取 3 次除去杂质, 最后, 水相用 6mol L⁻¹ 的盐酸调 PH 至 1, 此过程会产生白色沉淀, 干燥即得到半抗原。

[0032] 2、活化酯的制备

[0033] 首先移取 600 μL 的无水 DMF 于 2mL 的小棕瓶中, 称取半抗原 (4.97mg, 0.018mmol) 溶于 DMF 中并超声 5min 使其溶解充分, 在搅拌的状态下, 依次向其中加入 DCC (18.75mg, 0.09mmol) 和 NHS (10.46mg, 0.09mmol), 溶解充分以后, 室温避光搅拌反应 24h。反应后溶液中有沉淀产生, 4℃, 10000r/min 离心 5min 除去沉淀, 上清即为活化酯液;

[0034] 3、人工抗原的合成

[0035] 将上述活化酯溶液逐滴加入冰浴条件下的 4mL 含 20mg BSA 的 PBS 溶液中, 室温搅拌 1h 后, 将该溶液置于 4℃ 冰箱搅拌过夜, 然后将反应液吸出装入透析袋, 在 4℃ 条件下用 pH7.4 的 0.01mol L⁻¹ PBS 溶液透析三天, 每天换四次透析液, 最后将透析液取出分装, -20℃ 保存;

[0036] 4、除草剂阿特拉津抗体的制备

[0037] 免疫动物选用雄性新西兰大白兔, 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、6 周和 8 周后免疫四次, 免疫后 9 天由兔子的耳缘静脉取血, 进行效价检测, 具体做法是:

[0038] 初次免疫: 取 1mg 按照上述方法合成的人工抗原溶于 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;

[0039] 加强免疫: 用 1mg 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;

[0040] 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, 获得抗阿特拉津的特异性抗体。

[0041] 实施例 2:

[0042] 1、半抗原合成

[0043] 1) 准确称取 3.00g 的三聚氯氰溶于 120mL 的乙醚溶液中 (溶液 I), 分别取异丙胺 1.45mL 和三乙胺 2.43mL 于 15mL 的乙醚溶液中 (溶液 II), 溶液 I 和 II 均放置于 -20℃ 冰箱预冷, 在冰浴搅拌的条件下, 将溶液 II 逐滴加入溶液 I 中, 滴加过程中会产生大量的白色沉淀, 加完后, 室温搅拌反应 16h, 薄层色谱法追踪是否反应完全, 所用展开剂中正己烷、乙酸乙酯和冰醋酸的体积比为 10 : 1 : 0.2。反应完全后, 将上述溶液过滤除去沉淀, 滤液依次用 4℃ 预冷的 HCl (7.5mL, 0.1mol L⁻¹), NaHCO₃ (7.5mL, 0.1mol L⁻¹) 和饱和 NaCl 水溶液 (15mL, 2 次) 洗去杂质, 有机相中加入适量的无水 Na₂SO₄ 过夜, 除去溶液中的水后, 蒸干乙

醚便得到三聚氯氰的取代物。

[0044] 2) 分别取上述取代物 0.400g 和 4-氨基丁酸 0.205g 溶于 40mL 的无水乙醇中,超声溶解完全后,向其中加入三乙胺 0.55mL,搅拌条件下,80℃加热回流反应 24h,薄层色谱法追踪反应是否完全,所用展开剂中正己烷、乙酸乙酯和冰醋酸的体积比为 5 : 1 : 0.1。反应完全后蒸干溶剂,得到的沉淀用 100mL 5%的 NaHCO_3 溶液复溶,然后用 30mL CH_2Cl_2 萃取 3 次除去杂质,最后,水相用 6mol L^{-1} 的盐酸调 PH 至 1,此过程会产生白色沉淀,干燥即得到半抗原。

[0045] 2、活化酯的制备

[0046] 首先移取 600 μL 的无水 DMF 于 2mL 的小棕瓶中,称取半抗原 (4.97mg, 0.018mmol) 溶于 DMF 中并超声 5min 使其溶解充分,在搅拌的状态下,依次向其中加入 DCC(18.75mg, 0.09mmol) 和 NHS(10.46mg, 0.09mmol),溶解充分以后,室温避光搅拌反应 24h。反应后溶液中有沉淀产生,4℃,10000r/min 离心 5min 除去沉淀,上清即为活化酯液;

[0047] 3、人工抗原的合成

[0048] 将上述活化酯溶液逐滴加入冰浴条件下的 4mL 含 20mg BSA 的 PBS 溶液中,室温搅拌 1h 后,将该溶液置于 4℃冰箱搅拌过夜,然后将反应液吸出装入透析袋,在 4℃条件下用 pH7.4 的 0.01mol L^{-1} PBS 溶液透析三天,每天换四次透析液,最后将透析液取出分装, -20℃保存;

[0049] 4、除草剂阿特拉津抗体的制备

[0050] 免疫动物选用雄性新西兰大白兔,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、6 周和 8 周后免疫四次,免疫后 9 天由兔子的耳缘静脉取血,进行效价检测,具体做法是:

[0051] 初次免疫:取 1mg 按照上述方法合成的人工抗原溶于 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;

[0052] 加强免疫:用 1mg 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;

[0053] 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,获得抗阿特拉津的特异性抗体。

专利名称(译)	一种抗除草剂阿特拉津的特异性抗体		
公开(公告)号	CN103539853A	公开(公告)日	2014-01-29
申请号	CN201210237948.X	申请日	2012-07-11
[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	张燕 王俊平 王硕 生威		
发明人	张燕 王俊平 王硕 生威		
IPC分类号	C07K14/765 C07K16/06 C07D251/50 G01N33/535		
CPC分类号	C07K14/765 C07K16/06 C07K16/44 C07K19/00 C12N9/0065 C12N9/96 C12Y111/01007		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

除草剂阿特拉津的半抗原、人工抗原和抗体的制备涉及具有除草剂阿特拉津基本结构的半抗原、人工抗原和抗体的制备。本发明以简便的方法制备了特异性良好的除草剂阿特拉津的抗体。该抗体是以三聚氰氰为原料经过两步取代合成半抗原，然后分别与牛血清白蛋白(BSA)和辣根过氧化酶(HRP)连接合成人工抗原和酶标抗原。人工抗原再经动物免疫，取血，分离抗血清，纯化制得抗体。该抗体稳定，具有良好的特异性和灵敏度，且合成方法简单，可用于环境和食品中除草剂阿特拉津残留的快速免疫检测，具有良好的应用前景。