



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107473961 A

(43)申请公布日 2017.12.15

(21)申请号 201710462455.9

C07K 14/77(2006.01)

(22)申请日 2017.06.19

C07K 1/107(2006.01)

(71)申请人 宁波市农业科学研究院

C07K 16/44(2006.01)

地址 315040 浙江省宁波市鄞州区德厚街
19号

G01N 33/531(2006.01)

(72)发明人 付岩 张亮 张艳 陈国 吴银良

(74)专利代理机构 宁波诚源专利事务有限公
司 33102

代理人 袁忠卫 叶桂萍

(51)Int.Cl.

C07C 62/38(2006.01)

C07C 51/47(2006.01)

C07C 51/48(2006.01)

C07C 27/02(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页

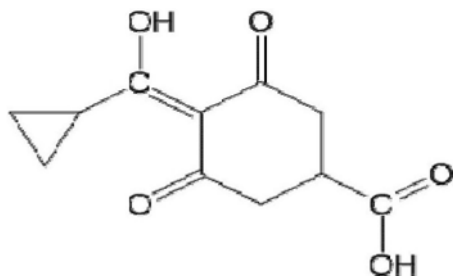
(54)发明名称

抗倒酯人工抗原、特异抗体制备方法及其用
途

(57)摘要

本发明公开了抗倒酯抗原、抗体及其应用，属于免疫化学分析技术领域，专用于抗倒酯特异性抗体的制备及酶联免疫检测方法。合成了人工抗原TNC-BSA和TNC-OVA，免疫兔子获得抗倒酯的特异性多克隆抗体，最后利用合成的包被抗原和特异性抗体建立酶联免疫分析方法，该方法抗倒酯最低检测限为0.005mg/L，回收率为85.2~103.1%，平均变异系数为2.1~7.9%，符合残留分析标准。

1. 一种抗倒酯半抗原,其结构式如下所示:



4-环丙基(羟基)亚甲基-3,5-二氧代环己烷甲酸。

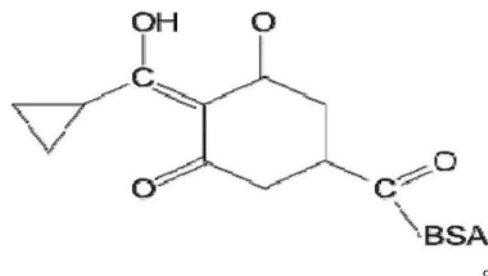
2. 权利要求1所述的抗倒酯半抗原的制备方法,其步骤如下:

①称取5.04~10.08g抗倒酯原药和30~60mL四氢呋喃加入到三角瓶中,加入24~48mL5%氢氧化钠甲醇溶液,室温下搅拌反应4~5h加入20~40mL水混合;

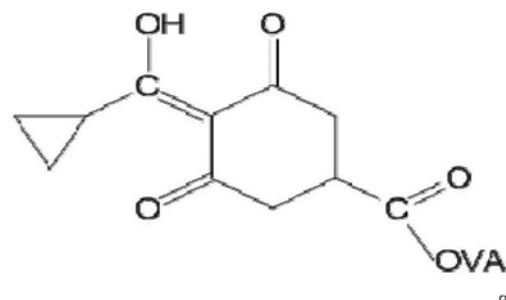
②反应后的混合液用乙酸乙酯萃取,弃去有机相,水相用浓盐酸调节pH值至2.0,再用乙酸乙酯萃取,合并有机相,无水硫酸钠干燥后减压浓缩,得黄色油状物;

③硅胶柱纯化,洗脱液为体积比为1:40~60的甲醇:二氯甲烷的混合液110~200ml,收集馏分,浓缩近干得到抗倒酯人工半抗原。

3. 由权利要求1所述的抗倒酯半抗原与载体牛血清蛋白BSA偶联而成的免疫抗原TNc-BSA,其分子结构式为:



4. 由权利要求1所述的抗倒酯半抗原与载体卵清白蛋白OVA偶联而成的包被抗原TNc-OVA,其分子结构式为:



5. 一种如权利要求3所述抗倒酯免疫抗原的制备方法,其特征在于包含以下步骤:

①将44.8~89.7mg的抗倒酯半抗原溶解在1~2mL的N,N-二甲基甲酰胺中,依次加入81.6~163.2mg的N-羟基琥珀酰亚胺和72.9~145.8mg的二环己基碳二亚胺,室温下搅拌反应过夜,离心;

②取步骤1中的上清液0.5~1ml加入到10~20ml,10~20mg/mL的牛血清蛋白(BSA)碳酸盐缓冲溶液(CBS,0.1mol/L,pH9.6)中,磁力搅拌反应5~6小时,装入透析袋,4℃下先用蒸馏水透析3次,每次间隔2~3小时,然后用磷酸盐缓冲溶液(PBS,0.01mol/L,pH7.4)透析3

~5天,12小时换一次透析液,即得免疫抗原,分装保存于-20℃的冰箱中。

6.一种如权利要求4所述抗倒酯包被抗原的制备方法,其特征在于包含以下步骤:

①将44.8~89.7mg的抗倒酯半抗原溶解在1~2mL的N,N-二甲基甲酰胺中,加入60~120μL的三正丁胺和30~60μL的氯甲酸丁酯,室温下搅拌反应1~2小时;

②取步骤1中的反应液1~2ml加入到10~20mL,10~20mg/mL的卵清蛋白(OVA)碳酸盐缓冲溶液(CBS,0.1mol/L,pH9.6)中,磁力搅拌反应2~4小时,装入透析袋,4℃下先用蒸馏水透析3次,每次间隔2~3小时,然后用磷酸盐缓冲溶液(PBS,0.01mol/L,pH7.4),透析3~5天,12小时换一次透析液,即得包被抗原,分装保存于-20℃的冰箱中。

7.一种用权利要求5所述抗倒酯免疫抗原制备的抗倒酯特异性抗体。

8.一种用权利要求6中所述的抗倒酯特异性抗体在检测检测食品、农产品和环境样品中抗倒酯的残留量中的应用。

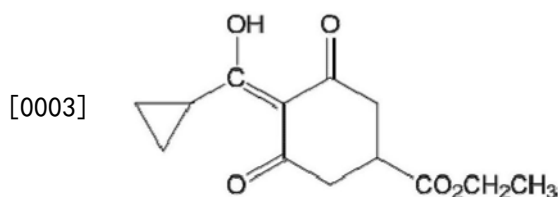
抗倒酯人工抗原、特异抗体制备方法及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于免疫化学分析技术领域,具体涉及一种环己烷羧酸类植物生长调节剂的抗原、特异抗体制备方法及其用途。

背景技术

[0002] 抗倒酯(Trinexapac-ethyl),化学名称为4-环丙基(羟基)亚甲基-3,5-二氧代环己烷甲酸乙酯,结构如下式:



[0004] 属环己烷羧酸类植物生长调节剂,为赤霉素生物合成抑制剂,通过降低赤霉素的含量控制植物生长。抗倒酯可被植物茎、叶迅速吸收,根部吸收很少。施于叶部,可转移到生长的枝条上,减少节间的伸长,可在禾谷类作物、小麦、甘蔗等多种作物上使用。它克服了许多其他植物生长调节剂由于土质、植株及施药时间等的影响而使药效减弱或不稳定、毒性大、价格昂贵等缺点。为预防抗倒酯应用存在的潜在风险,需要一种灵敏、快速、选择性的残留检测方法。

[0005] 目前对抗倒酯的残留分析主要应用液相色谱法、液相色谱串联质谱法,这些方法需使用大型仪器,检测费用高,过程繁琐,不适合大批量样品检测分析。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。通过化学合成抗倒酯半抗原和人工抗原,制备针对抗倒酯的特异性抗体,建立抗倒酯免疫学检测方法。该发明方法的完成,将解决抗倒酯半抗原合成,抗体制备等关键技术,建立抗倒酯的ELISA快速检测技术,该发明为环境和食品安全监测提供有效的技术手段和检测方法。对保证食品安全具有重要的现实意义和社会、经济价值。目前国内外尚未见有关抗倒酯的人工半抗原、人工抗原和抗体的报道。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的一个技术问题是针对现有技术的现状提供一种抗倒酯人工半抗原。

[0007] 本发明所要解决的另一个技术问题是针对现有技术的现状提供一种制备上述抗倒酯人工半抗原的方法。

[0008] 本发明所要解决的又一个技术问题是针对现有技术的现状提供一种利用上述抗倒酯半抗原制备抗倒酯的免疫抗原。

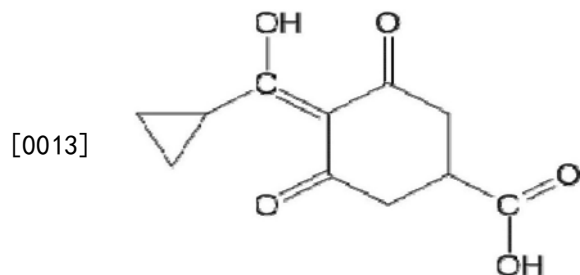
[0009] 本发明所要解决的另一个技术问题是针对现有技术的现状提供一种利用上述抗

倒酯半抗原制备抗倒酯的的包被抗原。

[0010] 本发明所要解决的再一个技术问题是针对现有技术的现状提供一种利用上述免疫抗原制备抗倒酯的特异性抗体的制备方法。

[0011] 本发明所要解决的最后一个技术问题是针对现有技术的现状提供一种上述特异性抗体的用途。

[0012] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案为:该抗倒酯人工半抗原,其结构式如下所示:



[0014] 4-环丙基(羟基)亚甲基-3,5-二氧代环己烷甲酸。

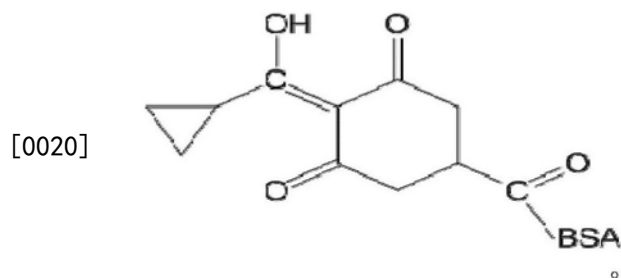
[0015] 本发明提供了上述抗倒酯人工半抗原的制备方法,其步骤如下:

[0016] ①称取5.04~10.08g抗倒酯原药和30~60mL四氢呋喃加入到三角瓶中,加入24~48 mL5%氢氧化钠甲醇溶液,室温下搅拌反应4~5h加入20~40mL水混合;

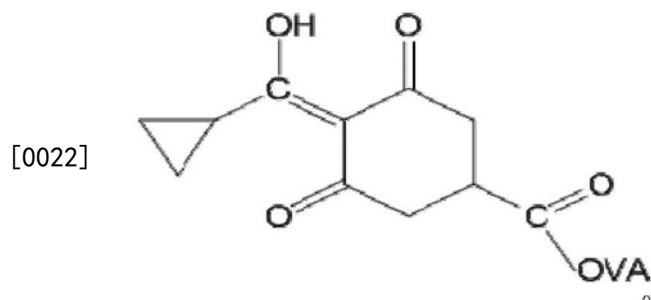
[0017] ②反应后的混合液用乙酸乙酯萃取,弃去有机相,水相用浓盐酸调节pH值至2.0,再用乙酸乙酯萃取,合并有机相,无水硫酸钠干燥后减压浓缩,得黄色油状物;

[0018] ③硅胶柱纯化,收集洗脱液为1:40~60的甲醇:二氯甲烷的混合液110~200ml,收集馏分,浓缩近干得到抗倒酯人工半抗原。

[0019] 本发明利用碳二亚胺法与牛血清蛋白(BSA)偶联获得免疫抗原TNC-BSA,其分子结构如下:



[0021] 本发明利用混合酸酐法与卵清蛋白(OVA)偶联获得包被抗原TNC-OVA,其分子结构如下:



[0023] 本发明还提供一种抗倒酯免疫抗原的制备方法,其特征在于包含以下步骤:

[0024] ①将44.8~89.7mg的抗倒酯半抗原溶解在1~2mL的N,N-二甲基甲酰胺中,加入81.6~163.2mg的N-羟基琥珀酰亚胺和72.9~145.8mg的二环己基碳二亚胺,室温下搅拌反应过夜,离心;

[0025] ②取步骤1中的上清液0.5~1ml加入到10~20ml,10~20mg/mL的牛血清蛋白(BSA) 碳酸盐缓冲溶液(CBS,0.1mol/L,pH9.6)中,磁力搅拌反应5~6小时,装入透析袋,4℃下先用蒸馏水透析3次,每次间隔2~3小时,然后用磷酸盐缓冲溶液(PBS,0.01mol/L,pH7.4)透析3~5天,12小时换一次透析液,即得免疫抗原,分装保存于-20℃的冰箱中。

[0026] 同时,本发明还提供一种抗倒酯包被抗原的制备方法,其特征在于包含以下步骤:

[0027] ①将44.8~89.7mg的抗倒酯半抗原溶解在1~2mL的N,N-二甲基甲酰胺中,加入60~120μL的三正丁胺和30~60μL的氯甲酸丁酯,室温下搅拌反应1~2小时;

[0028] ②取步骤1中的反应液1~2ml加入到10~20mL,10~20mg/mL的卵清蛋白(OVA) 碳酸盐缓冲溶液(CBS,0.1mol/L,pH9.6)中,磁力搅拌反应2~4小时,装入透析袋,4℃下先用蒸馏水透析3次,每次间隔2~3小时,然后用磷酸盐缓冲溶液(PBS,0.01mol/L,pH7.4)透析3~5天,12小时换一次透析液,即得包被抗原,分装保存于-20℃的冰箱中。

[0029] 本发明用上述免疫抗原制备获得抗倒酯半抗原特异性抗体,抗倒酯半抗原特异性抗体是能与抗倒酯半抗原发生特异性免疫反应的免疫球蛋白。它用于检测农产品和食品(如乳制品)中抗倒酯半抗原的残留量。

[0030] 与现有技术相比,本发明具有如下优点:1、本发明通过首次设计合成抗倒酯人工抗原,经免疫兔子产生特异性抗体,为抗倒酯残留的高效快速分析提供了一种新的方法,同时样品前处理简单快速,避免了大量使用有机溶剂,成本低廉,一次可同时检测大批量样品,便于进行现场监控,可以与传统仪器方法互为补充;

[0031] 2准确度和灵敏度高:利用抗倒酯抗原抗体免疫反应和酶促反应建立抗倒酯酶联免疫分析法。在检测分析农产品和环境土壤与水等样品中抗倒酯残留是具有较高的特异性和灵敏度。抗体特异性识别抗倒酯,与其他同类植物生长调节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抗倒酯在样本中的残留量。该方法抗倒酯最低检测限为0.005mg/L,回收率为85.2~103.1%,平均变异系数为2.1~7.9%,符合残留分析标准。

具体实施方式

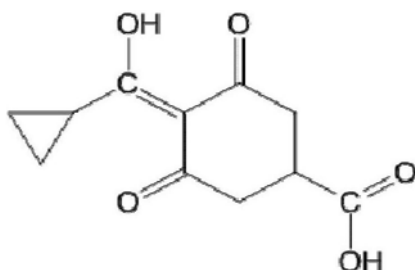
[0032] 以下通过结合实施例对本发明作进一步说明。

[0033] 实施例1

[0034] 1、人工半抗原的合成

[0035] 对抗倒酯六元环上羧酸酯进行碱性水解,合成半抗原,既最大限度的保留了抗倒酯特征基团,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(¹H-NMR)鉴定。抗倒酯人工半抗原的分子结构式为:

[0036]



[0037] 具体制备方法如下：称取5.04g (约0.02mol) 抗倒酯原药和30mL四氢呋喃加入到100mL的三角瓶中，然后加入24mL5%氢氧化钠甲醇溶液 (抗倒酯：氢氧化钠=1:1.5 摩尔比)，室温下搅拌反应4h加入20mL水；混合液用乙酸乙酯萃取，弃去有机相，水相用浓盐酸调节pH值至2.0，再用乙酸乙酯萃取，合并有机相，无水硫酸钠干燥后减压浓缩，得黄色油状物；用硅胶柱纯化，洗脱液为200mL的甲醇：二氯甲烷=1:60 (体积比) 的混合液，收集馏分，浓缩近干，得到半抗原。

[0038] 实施例2

[0039] 与实施例1的制备方法相同，区别在于各原料的配比不同：

[0040] 具体制备方法如下：称取7.56g (约0.03mol) 抗倒酯原药和40mL四氢呋喃加入到100mL的三角瓶中，然后加入36mL5%氢氧化钠甲醇溶液 (抗倒酯：氢氧化钠=1:1.5 摩尔比)，室温下搅拌反应4h加入30mL水；混合液用乙酸乙酯萃取，弃去有机相，水相用浓盐酸调节pH值至2.0，再用乙酸乙酯萃取，合并有机相，无水硫酸钠干燥后减压浓缩，得黄色油状物；用硅胶柱纯化，洗脱液为150mL的甲醇：二氯甲烷=1:40 (体积比) 的混合液，收集馏分，浓缩近干，得到半抗原。

[0041] 实施例3

[0042] 与实施例1的制备方法相同，区别在于各原料的配比不同：

[0043] 具体制备方法如下：称取10.08g (约0.04mol) 抗倒酯原药和60mL四氢呋喃加入到100mL的三角瓶中，然后加入48mL5%氢氧化钠甲醇溶液 (抗倒酯：氢氧化钠=1:1.5摩尔比)，室温下搅拌反应5h加入40mL水；混合液用乙酸乙酯萃取，弃去有机相，水相用浓盐酸调节pH值至2.0，再用乙酸乙酯萃取，合并有机相，无水硫酸钠干燥后减压浓缩，得黄色油状物；用硅胶柱纯化，洗脱液为110mL的甲醇：二氯甲烷=1:50 (体积比) 的混合液，收集馏分，浓缩近干，得到半抗原。

[0044] 实施例4

[0045] 抗倒酯人工半抗原的鉴定

[0046] 将实施例1、2和3纯化后的半抗原经ESI-MS、¹H-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, 223 [M-H]⁻。 ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃), δ: 11.24 (s, 1H, COOH), 2.85 (m, 3H, O=CCH₂, CHC=O), 2.69 (m, 2H, O=CCH₂), 2.01 (m, 1H, CHC=O), 1.26 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 1.09 (m, 2H, CHCH₂CH₂)。

[0047] 实施例5

[0048] 人工抗原的合成

[0049] 5.1免疫抗原的合成与纯化

[0050] 免疫抗原的合成采用碳二亚胺法。将44.8mg的抗倒酯半抗原TNs (约0.2mmol) 溶解在1mL的N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中，加入81.6mg的N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) (约0.6mmol)，

室温下搅拌反应15min后加入72.9mg的二环己基碳二亚胺(DCC)(约 0.3mmol),室温下搅拌反应过夜,离心,取上清液0.5mL缓慢加入到10mL10mg/mL的牛血清蛋白(BSA)碳酸盐缓冲溶液(CBS,0.1mol/L,pH9.6)中,磁力搅拌反应5小时。将反应完成的溶液装入透析袋,4℃下先用蒸馏水透析3次(间隔2小时),然后用磷酸盐缓冲溶液(PBS,0.01mol/L,pH7.4),透析3天,12小时换一次透析液,即得免疫抗原,分装保存于-20℃的冰箱中。

[0051] 5.2免疫抗原的鉴定

[0052] 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结合比为13:1。

[0053] 5.3免疫抗体的制备

[0054] ①免疫动物制备抗血清

[0055] 实验选用半周岁左右,体重为2-3公斤,健康的雄性新西兰大白兔。免疫三只兔子,分别编号为兔子1-3。实验免疫剂量基础免疫为0.25~4.0mg/kg,加强免疫剂量为0.5~4.0mg/kg,用生理盐水分别稀释相应剂量人工抗原复合物,加入等体积弗氏完全佐剂,充分乳化,直至滴入水中乳滴不分散。采用背部皮下多点注射与大腿肌肉注射相结合的方法。3~4周后进行加强免疫,以后每隔2周再次加强免疫,加强免疫时采用弗氏不完全佐剂。从第三次免疫开始,每次免疫后第8~10天,从兔子耳缘静脉采血,测定效价和特异性。待免疫血清效价合格后,就进行采血。

[0056] 本实验采用心脏取血法。每只兔子可得血80mL左右。采血后,先待收集在三角烧瓶中的血液凝固后,然后用接种针沿三角烧瓶边缘将血块与玻璃脱离,放置于37℃温箱中半小时,再放到4℃冰箱中3~4小时,待血块收缩后,用吸管将血清吸入试管中,以3000 rpm离心15分钟,分离出血清。

[0057] ②抗体的纯化与鉴定

[0058] 一般采用辛酸-硫酸铵盐析法,也可采用蛋白A柱层析。辛酸-硫酸铵盐析法是一个经典的方法。辛酸在偏酸性的条件下能将血清中除免疫球蛋白G(Immunoglobulin G,IgG)以外的蛋白质都沉淀下来,上清液中只有IgG。辛酸加入因抗体的来源不同而不同,人血清为70μl/ml,兔血清为75μl/ml,小鼠血清为40μl/ml,小鼠腹水为33μl/ml。这种方法IgG的回收率达90%以上。

[0059] ③抗血清效价测定

[0060] 免疫原复合物按常规方法免疫了三只兔子。从加强免疫第二次开始,在每次免

[0061] 疫后第8天于兔子耳缘静脉采血,血清经适当稀释后用间接ELISA测定效价。待

[0062] 第4次免疫时,兔子获得了高效价的抗体,经纯化制成冻干粉后的效价为 5.12×10^5 。

[0063] ④抗体的纯化

[0064] 一般采用辛酸-硫酸铵盐析法,也可采用蛋白A柱层析。辛酸-硫酸铵盐析法是一个经典的方法。辛酸在偏酸性的条件下能将血清中除免疫球蛋白G(Immunoglobulin G,IgG)以外的蛋白质都沉淀下来,上清液中只有IgG。辛酸加入因抗体的来源不同而不同,人血清为70μl/ml,兔血清为75μl/ml,小鼠血清为40μl/ml,小鼠腹水为33μl/ml。这种方法IgG的

回收率达90%以上。

[0065] 实施例6

[0066] 人工抗原的合成

[0067] 6.1免疫抗原的合成与纯化

[0068] 免疫抗原的合成采用碳二亚胺法。将67.2mg的抗倒酯半抗原TNs (约0.3mmol) 溶解在2mL的N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中,加入122.4mg的N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) (约0.9mmol),室温下搅拌反应15min后加入109.4mg的二环己基碳二亚胺 (DCC) (约0.45mmol),室温下搅拌反应过夜,离心,取上清液1mL缓慢加入到20mL 20mg/mL的牛血清蛋白 (BSA) 碳酸盐缓冲溶液 (CBS,0.1mol/L,pH9.6) 中,磁力搅拌反应5.5小时。将反应完成的溶液装入透析袋,4℃下先用蒸馏水透析3次(间隔3小时),然后用磷酸盐缓冲溶液 (PBS,0.01mol/L,pH7.4),透析5天,12小时换一次透析液,即得免疫抗原,分装保存于-20℃的冰箱中。

[0069] 6.2免疫抗原的鉴定

[0070] 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结合比为15:1。

[0071] 6.3免疫抗体的制备同实施例5

[0072] 经纯化制成冻干粉后的效价为 2.56×10^5 。

[0073] 实施例7

[0074] 人工抗原的合成

[0075] 7.1免疫抗原的合成与纯化

[0076] 免疫抗原的合成采用碳二亚胺法。将89.7mg的抗倒酯半抗原(约0.4mmol)溶解在1~2mL的N,N-二甲基甲酰胺中,加入163.2mg的N-羟基琥珀酰亚胺(1.2mmol)和145.8mg的二环己基碳二亚胺(0.6mmol),室温下搅拌反应过夜,离心,取上清液0.6 mL缓慢加入到12mL 15mg/mL的牛血清蛋白 (BSA) 碳酸盐缓冲溶液 (CBS,0.1mol/L, pH9.6) 中,磁力搅拌反应6小时。将反应完成的溶液装入透析袋,4℃下先用蒸馏水透析3次(间隔2.5小时),然后用磷酸盐缓冲溶液 (PBS,0.01mol/L,pH7.4),透析4天,12小时换一次透析液,即得免疫抗原,分装保存于-20℃的冰箱中。

[0077] 7.2免疫抗原的鉴定

[0078] 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结合比为14:1。

[0079] 7.3免疫抗体的制备同实施例5

[0080] 经纯化制成冻干粉后的效价为 5.12×10^5 。

[0081] 实施例8

[0082] 人工抗原的合成

[0083] 8.1包被抗原的合成与纯化

[0084] 包被抗原的合成利用混合酸酐法。将44.8mg的抗倒酯半抗原(约0.2mmol)溶解在1~2mL的N,N-二甲基甲酰胺中,加入60μL的三正丁胺(约0.2mmol)和30μL的氯甲酸丁酯(约0.2mmol),室温下反应2小时,1ml反应液缓慢加入到10mL,10mg/mL的卵清蛋白(OVA)的碳酸盐缓冲溶液(CBS,0.1mol/L,pH9.6)中,磁力搅拌反应2小时,反应完成后装入透析袋,4℃下先用蒸馏水透析3次(间隔2小时),然后用磷酸盐缓冲溶液(PBS,0.01mol/L,pH7.4)透析3天,12小时换一次透析液,即得包被抗原,分装保存于-20℃的冰箱中。

[0085] 8.2包被抗原的鉴定

[0086] 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包被抗原结合比为9:1。

[0087] 实施例9

[0088] 人工抗原的合成

[0089] 9.1包被抗原的合成与纯化

[0090] 包被抗原的合成利用混合酸酐法。将67.2mg的抗倒酯半抗原(0.3mmol)溶解在2mL的N,N-二甲基甲酰胺中,加入90μL的三正胺(约0.3mmol)和45μL的氯甲酸丁酯(约0.3mmol),室温下反应1小时,2ml反应液缓慢加入到20mL,20mg/mL卵清蛋白(OVA)的碳酸盐缓冲溶液(CBS0.1mol/L,pH9.6)中,磁力搅拌反应3小时,反应完成后装入透析袋,4℃下先用蒸馏水透析3次(间隔3小时),然后用磷酸盐缓冲溶液(PBS,0.01mol/L,pH7.4)透析3天,12小时换一次透析液,即得包被抗原,分装保存于-20℃的冰箱中。

[0091] 9.2包被抗原的鉴定

[0092] 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包被抗原结合比为10:1。

[0093] 实施例10

[0094] 人工抗原的合成

[0095] 10.1包被抗原的合成与纯化

[0096] 包被抗原的合成利用混合酸酐法。将89.7mg的抗倒酯半抗原(约0.4mmol)溶解在1.5mL的N,N-二甲基甲酰胺中,加入120μL的三正丁胺(约0.4mmol)和60μL的氯甲酸丁酯(约0.4mmol),室温下反应1.5小时,1.5ml反应液缓慢加入到15mL,15mg/mL的卵清蛋白(OVA)的碳酸盐缓冲溶液(CBS,0.1mol/L,pH9.6)中,磁力搅拌反应4小时,反应完成后装入透析袋,4℃下先用蒸馏水透析3次(间隔2.5小时),然后用磷酸盐缓冲溶液(PBS,0.01mol/L,pH7.4)透析5天,12小时换一次透析液,即得包被抗原,分装保存于-20℃的冰箱中。

[0097] 10.2包被抗原的鉴定

[0098] 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包被抗原结合比为8:1。

[0099] 实施例11:抗倒酯酶联免疫吸附测定方法建立与鉴定

[0100] 11.1抗倒酯ELISA测定方法的原理

[0101] 采用间接竞争酶联免疫分析方法。它是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,固相抗原中的农药,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,显色反应就减弱,抑制率增高,反之,则显色反应增强,抑制率降低,因而可根据已知量农药的标准线和待检样品的抑制率,推算出待测农药的浓度。

[0102] 11.2最佳抗体工作浓度和包被抗原复合物浓度的确定

[0103] IC-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。在同一包被液浓度下,随着抗体的稀释,所得OD值呈下降趋势,同样在同一抗体稀释浓度下,随着包被液浓度的下降,所得OD值也呈下降趋势。经试验,包被抗原浓度0.5μg/mL,抗体浓度以10μg/mL作为最适工作浓度。

[0104] 11.3标准曲线和检测灵敏度

[0105] 11.3.1标准曲线的制备,其基本的操作步骤如下:

[0106] 11.3.1.1包被

[0107] 用CBS缓冲液(0.05mol/L, pH9.6)将包被抗原稀释至最适浓度,100μL/孔加入96孔酶标版(Maxisorp™透明聚乙烯板),4℃包被过夜;

[0108] 11.3.1.2封闭

[0109] 取出包被好的酶标版,甩掉包被液,用0.5%吐温-20的碳酸盐缓冲溶液(PBST, 0.01 mol/L, 0.5% Tween20, pH7.4)洗涤后,每孔加入用PBS(0.01mol/L, pH7.4)缓冲溶液稀释的1.0%的OVA封闭液200μL,于37℃温箱中温育0.5h。

[0110] 11.3.1.3加样

[0111] 1) 配制抗倒酯的标准溶液

[0112] 取抗倒酯标样配制100ppm的标准溶液,用PBS稀释成若干(5~

[0113] 8)个浓度,使每个浓度溶液中含有10%的甲醇。

[0114] 2) 抗倒酯抗体稀释液的配制

[0115] 从冰箱中取出抗体,用PBS稀释成工作浓度。

[0116] 3) 点板

[0117] 取出经封闭的板,经200μl PBST洗涤5次后,每孔加入系列浓度的抗倒酯标准液50μL,再加入抗体稀释液50μL,对照孔加入含10%甲醇的PBS 50μL和抗体稀释液50μL。放入37℃温箱中温育1h,弃去孔内液体,用PBST溶液洗涤。

[0118] 11.3.1.4加酶标二抗

[0119] 每孔加入经1:2000稀释的羊抗兔辣根过氧化物酶PBS溶液100μL,放入37℃温箱中1h,弃去孔内液体,用PBST溶液洗涤。

[0120] 11.3.1.5显色

[0121] 每孔加入底物四甲基联苯胺(TMB)-过氧化氢尿素溶液100μL,37℃温箱中温育

15min,用50μL 2M H₂SO₄终止反应。在酶联仪上测定490nm波长下的吸光值。根据抑制率与农药浓度之间的半对数关系作图即得到标准曲线。

[0122] ELISA方法的标准曲线以抑制率与农药浓度的半对数曲线表示,抑制率以下式

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min}) - (\text{OD}_x - \text{OD}_{\min})}{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min})} \times 100\%$$

[0123] 计算:

[0124] 式中:OD_{max}为不加药时的吸光值,OD_x为农药x时的吸光值,OD_{min}为空白对照孔的吸光值。

[0125] 由上述公式计算得抗倒酯各浓度的抑制率,以抗倒酯浓度为横坐标,抑制率为纵坐标作图。抗倒酯的抑制中浓度(IC₅₀)为0.85mg/L,最低检测限(以IC₁₀表示)为0.005mg/L,抗倒酯在0.005ppm~10ppm范围内,抑制率与抗倒酯浓度呈线性关系,相关系数为r=0.9863。

[0126] 11.4抗体的特异性

[0127] 抗血清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

[0128] 比较。常用交叉反应活性作为评价的重要标准。交叉反应越小,抗血清的特异性则越好。将抗倒酯及其类似物做系列稀释,分别与同一种抗体竞争反应,按照4.3的方法制作标准曲线,并在曲线上找出抑制率50%的剂量和类似物抑制率50%时的用量,然后计算出类似物的交叉反应率。抗体对调环酸的交叉反应率小于1%,从而可知,所制备的抗体特异性强,可以用于抗倒酯的分析。

[0129] 实施例12:样品添加分析

[0130] 12.1提取方法

[0131] 12.1.1水样

[0132] 水样(或经过滤)添加抗倒酯制成三个不同浓度水平(0.01,0.1,1mg/kg)的样品,重复3次,设置对照。混匀,放置过夜后,用含10%甲醇的PBS与待测水样等量混匀进行测量。

[0133] 12.1.2土壤或植物样品(黄瓜、番茄、辣椒)

[0134] (1)称取土壤或植物样品10g,装入三角瓶中。添加抗倒酯配制成三个不同浓度水平(0.01,0.1,1mg/kg)的样品,重复3次,设置对照。混匀,放置过夜,在样品中加入20 mL乙腈超声萃取15min两次。在4000rpm离心5min,合并两次上清液,倒入盛有5 g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5%甲醇的PBS定容。

[0135] 12.2样品的ELISA分析

[0136] 样品分析步骤参考11.1。经分析可知,该ELISA的抗倒酯回收率为85.2-103.1%,平均变异系数为2.1-7.9%。实际样品中抗倒酯残留量检测参照12.1方法进行。本发明建立的抗倒酯残留的免疫分析方法符合抗倒酯残留分析标准。该方法可用于环境和农产品中抗倒酯的残留检测,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)	抗倒酯人工抗原、特异抗体制备方法及其用途		
公开(公告)号	CN107473961A	公开(公告)日	2017-12-15
申请号	CN2017110462455.9	申请日	2017-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	宁波市农业科学研究院		
申请(专利权)人(译)	宁波市农业科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	宁波市农业科学研究院		
[标]发明人	付岩 张亮 张艳 陈国 吴银良		
发明人	付岩 张亮 张艳 陈国 吴银良		
IPC分类号	C07C62/38 C07C51/47 C07C51/48 C07C27/02 C07K14/765 C07K14/77 C07K11/107 C07K16/44 G01N33/531		
CPC分类号	C07C51/09 C07C51/47 C07C51/48 C07C62/38 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了抗倒酯抗原、抗体及其应用，属于免疫化学分析技术领域，专用于抗倒酯特异性抗体的制备及酶联免疫检测方法。合成了人工抗原TNc-BSA和TNc-OVA，免疫兔子获得抗倒酯的特异性多克隆抗体，最后利用合成的包被抗原和特异性抗体建立酶联免疫分析方法，该方法抗倒酯最低检测限为0.005mg/L，回收率为85.2~103.1%，平均变异系数为2.1~7.9%，符合残留分析标准。

