



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103159648 A

(43) 申请公布日 2013. 06. 19

(21) 申请号 201110417904. 0

C12N 5/20 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 12. 14

G01N 33/53 (2006. 01)

(71) 申请人 中国计量学院

地址 310018 浙江省杭州市下沙高教园学源
街-258 号

申请人 中国农业科学院农产品加工研究所

(72) 发明人 王磊 睢珂 王志伟 潘家荣
赵杰 郑月明

(74) 专利代理机构 北京海虹嘉诚知识产权代理
有限公司 11129

代理人 张涛

(51) Int. Cl.

C07C 311/51 (2006. 01)

C07C 303/40 (2006. 01)

C07K 14/765 (2006. 01)

C07K 14/77 (2006. 01)

C07K 16/06 (2006. 01)

C07K 16/44 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书6页 附图3页

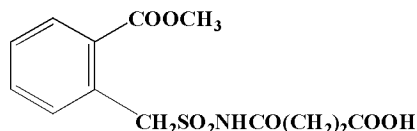
(54) 发明名称

苄嘧磺隆通用半抗原、人工抗原及其制备方法与应用

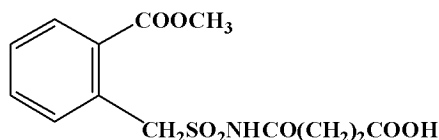
(57) 摘要

本发明属于免疫检测及生物化工技术领域,涉及苄嘧磺隆通用半抗原、人工抗原及其制备方法与应用。本发明提供的苄嘧磺隆通用半抗原制备得到的人工抗原免疫得到的抗体能够光谱的识别具有上述人工半抗原结构的苄嘧磺隆类农药分子,使得采用该人工抗原及其得到的抗体的间接 Elisa 方法的可检测谱较宽;本发明制备人工抗原采用了改进的混合酸酐法,偶联效率高,简便。

1. 一种苄嘧磺隆半抗原,具有如下分子结构:



2. 一种苄嘧磺隆的人工抗原,其特征在于:使用如下结构的分子,



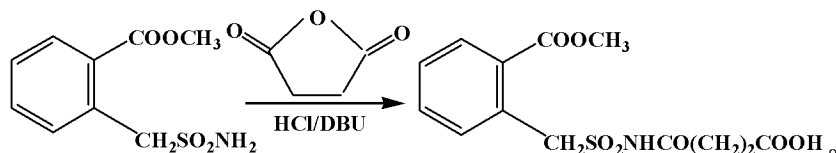
与载体蛋白偶联得到的分子。

3. 根据权利要求2所述人工抗原,所述载体蛋白指牛血清白蛋白 BSA 或卵白蛋白 OVA,制备得到的抗原分别为免疫原和包被原。

4. 一种苄嘧磺隆通用的人工抗原的制备方法,包括如下制备步骤:

- (1) 合成通用半抗原;
- (2) 所述通用半抗原通过与载体蛋白偶联;

所述合成通用半抗原的合成路线为:



5. 根据权利要求4所述的制备方法,所述通用半抗原的制备步骤为:2-甲酸甲酯苄磺酰胺和琥珀酸酐于乙腈中在 DBU/HCl 催化下发生酰胺化反应,纯化得通用半抗原 Hapten,所述酰胺化反应是在 22℃ 水浴中进行的,反应时间是 2h,所述催化剂 DBU 是在 10min 内逐滴加入,所述纯化是指将反应溶液倒入蒸馏水中,乙酸乙酯洗涤,去除有机相, HCl 调节水相 pH 至 2 后用乙酸乙酯提取,合并有机相无水 MgSO_4 干燥,蒸干溶剂,乙酸乙酯重结晶得 Hapten。

6. 根据权利要求4所述的制备方法,所述通用半抗原与载体蛋白的偶联采用混合酸酐法制备,步骤如下:

(a) 制备 A 液:Hapten 溶于四氢呋喃中,边搅拌边加入三正丁胺,冷却,加氯甲酸异丁酯,搅拌,为 A 液,所述 Hapten 溶于四氢呋喃是在 4℃ 下进行的,所述冷却是指冷却到 0℃,所述搅拌是指冰浴下搅拌 60min;

(b) 制备 B 液:BSA 或 OVA 溶于硼酸盐缓冲液,为 B 液,所述硼酸盐缓冲液浓度为 0.2mol/L, pH = 9.0;

(c) 将 A 液滴加至 B 液中,搅拌过夜,将反应液于 PBS 缓冲液中透析,换液,透析液离心,取上清液冷冻干燥,保存,所述 PBS 缓冲液 pH = 7.4,所述透析是 4℃ 透析 3d,所述换液是指换液 3 次/d,所述离心是 10000r/min 离心 5min,所述保存的温度为 -20℃。

7. 权利要求2所述的人工抗原作为免疫原在制备用于检测苄嘧磺隆的抗体或抗血清中的应用。

8. 权利要求2所述的人工抗原在采用间接 Elisa 法检测苄嘧磺隆中作为包被原的应用。

9. 根据权利要求8所述的应用,所述包被原的包被浓度为 $5.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,间接 Elisa 法中

抗血清稀释 3.2×10^4 倍。

10. 权利要求 2 所述的人工抗原作为免疫原免疫动物制备得到的抗血清、抗体或杂交瘤细胞。

苄嘧磺隆通用半抗原、人工抗原及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测及生物化工技术领域,涉及一种苄嘧磺隆通用半抗原、人工抗原及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 磺隆类除草剂是目前世界上最大一类除草剂,自从杜邦公司 1982 年首次开发出麦田除草剂氯磺隆以后,通过在磺酰脲两端及脲桥上进行修饰等衍生化方法,目前已有近 40 个品种商品化。磺隆类除草剂通过抑制乙酰乳酸合成酶 (ALS)/ 乙酸羟酸合成酶 (AHAS), 从而破坏蛋白质合成、干扰 DNA 合成和细胞分裂与生长,是杂草正常生长受到破坏而死亡^[1]。它因高效、用量少、毒性低及半衰时间短而广泛应用于水稻、小麦、玉米等大田作物及花生、马铃薯等瓜果蔬菜^[2]。但是磺隆类化合物因不易挥发、不易光解、有机吸附系数低、随土壤 pH 上升半衰期延长的特点,造成对当地农作物及环境的危害和损失事件频繁报道及公众环保和健康意识的提高也迫使我们要加强对其残留的监测研究。欧盟已经对饮用水和果蔬中做出最低限量标准为 0.05ppm。

[0003] 传统的磺隆类除草剂残留检测方法有气相色谱、液相色谱和毛细管电泳等方法。气相色谱法由于酰脲类挥发性低和热不稳定需要衍生化;液相色谱配合质谱及固相微萃取等方法虽能对样品中磺酰脲类除草剂进行灵敏准确检测,国内外已有大量文献研究报道,但有毒试剂应用且分析成本高昂;Menne H J 等用毛细管电泳方法对土壤样品中磺隆类除草剂进行分析研究发现,由于进样量小,提取液需要高浓度浓缩,从而限制了毛细管电泳在毒物分析中的应用 (GARCIA F, HENION J. Fast capillary electrophoresis-ion spray mass spectrometric determination of sulfonylureas[J]. J Chromatogr A, 1992, 606(2): 237-247; MENNE H J, JANOWITZ K, BERGER B M. Comparison of capillary electrophoresis and liquid chromatography for determination of sulfonylurea herbicides in soil[J]. J AOAC Int, 1999, 82(6): 1534-1540)。免疫学检测法,其原理是在成功制备苄嘧磺隆人工抗原的基础上,利用间接酶联免疫检测法 (ELISA) 来检测样品中苄嘧磺隆的含量,该方法具有灵敏度高、操作简洁快速,无需精密仪器和专业人员在场等优点,在农残的分析检测中发展快速,近来也有磺隆类农残的 ELISA 分析的文献和专利研究报道 (KELLEY M M, ZAHNOW E W, PETERSEN W C, TOY S T. Chlorsulfuron determination in soil extracts by enzyme immunoassay[J]. J Agric Food Chem, 1985, 33(5): 962-965; ZHAO J, YI G X, HE S P, et al. Development of monoclonal antibody-based enzyme linked immunosorbent assay for the herbicide chlorimuron-ethyl[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(14): 4948-4953; SCHLAEPPI D, RAMSTEINER D. Immunological detection of triasulfuron; European, W0/1988/009798A[P]. 1997-01-15)。

[0004] 酶联免疫方法的关键点是制备具有免疫原性的人工抗原,高效价抗原的制备是得到特异性抗体及保证免疫检测灵敏性的重要前提,其中半抗原的制备又是抗原制备的关键。苄嘧磺隆因分子量小而不具有免疫原性 (分子量小于 1000),不能在动物体内产生抗

体,必须与大分子载体偶联制备人工抗原,才能诱导特异性抗体的产生。为此,必须设法先将苄嘧磺隆分子与载体蛋白质共价偶联苄嘧磺隆人工抗原。现有合成的苄嘧磺隆人工抗原保留了苄嘧磺隆的全分子结构(苯环部分、杂环部分和脲桥部分),如200910234686.X的发明专利中的记载,其免疫制备而得的抗体仅仅能识别一种苄嘧磺隆分子。

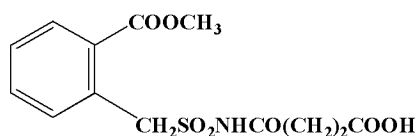
[0005] 在制备偶联苄嘧磺隆人工抗原的方法上,现有技术中通常采用的活化酯法将磺隆类化合物与载体蛋白进行偶联,而张丽杰(张丽杰,周映霞,王磊,等.有机磷农药通用抗原的合成及鉴定[J].农药,2010,49(3):164-166,169)等人研究发现如果反应时间过长活化酯存在部分分解,其产率反而会下降,同时反应中采用的溶剂的极性也会对活化酯的产率产生影响。专利号为200910234686.X的发明专利提出了一种苄嘧磺隆人工免疫原BE-BSA及其制备和用途,此篇专利文献在人工抗原合成上选择的是活化酯法,该方法耗时、低效,只抗原与载体蛋白的偶联反应就需5d以上。

发明内容

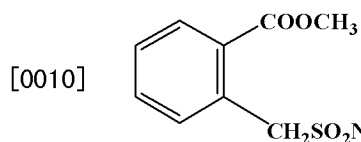
[0006] 本发明根据上述领域的需求,提供一种苄嘧磺隆人工抗原的制备方法及应用。本发明采用混合酸酐法利用半抗原分子上的游离羧基和氯甲酸异丁酯在三正丁胺存在的无水条件下先形成混合酸酐中间体,而后再与载体蛋白进行偶联,经试验数据验证,该抗原具有较高的免疫原性,制备得到的抗血清与苄嘧磺隆类物质具有良好的亲和性,而且本发明产率高效果好,简便快捷。

[0007] 一种苄嘧磺隆半抗原,具有如下分子结构:

[0008]



[0009] 一种苄嘧磺隆的人工抗原,其特征在于:使用如下结构的分子,



[0010] 与载体蛋白偶联得到的分子。

[0011] 所述人工抗原,所述载体蛋白指牛血清白蛋白BSA或卵白蛋白OVA,制备得到的抗原分别为免疫原和包被原。

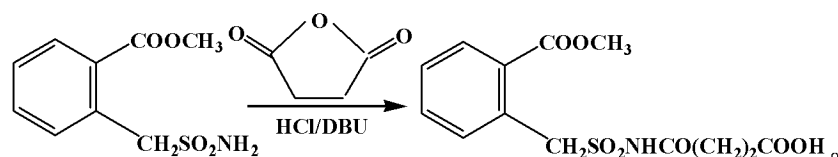
[0012] 一种苄嘧磺隆通用的人工抗原的制备方法,包括如下制备步骤:

[0013] (1) 合成通用半抗原;

[0014] (2) 所述通用半抗原通过与载体蛋白偶联;

[0015] 所述合成通用半抗原的合成路线为:

[0016]



[0017] 所述通用半抗原的制备步骤为:2-甲酸甲酯苄磺酰胺和琥珀酸酐于乙腈中在DBU/HCl催化下发生酰胺化反应,纯化得通用半抗原Hapten,所述酰胺化反应是在22℃水

浴中进行的,反应时间是 2h,所述催化剂 DBU 是在 10min 内逐滴加入,所述纯化是指将反应溶液倒入蒸馏水中,乙酸乙酯洗涤,去除有机相, HCl 调节水相 pH 至 2 后用乙酸乙酯提取,合并有机相无水 MgSO_4 干燥,蒸干溶剂,乙酸乙酯重结晶得 Hapten。

[0018] 所述通用半抗原与载体蛋白的偶联采用混合酸酐法制备,步骤如下:

[0019] (a) 制备 A 液: Hapten 溶于四氢呋喃中,边搅拌边加入三正丁胺,冷却,加氯甲酸异丁酯,搅拌,为 A 液,所述 Hapten 溶于四氢呋喃是在 4°C 下进行的,所述冷却是指冷却到 0°C ,所述搅拌是指冰浴下搅拌 60min;

[0020] (b) 制备 B 液: BSA 或 OVA 溶于硼酸盐缓冲液,为 B 液,所述硼酸盐缓冲液浓度为 0.2mol/L , $\text{pH} = 9.0$;

[0021] (c) 将 A 液滴加至 B 液中,搅拌过夜,将反应液于 PBS 缓冲液中透析,换液,透析液离心,取上清液冷冻干燥,保存,所述 PBS 缓冲液 $\text{pH} = 7.4$,所述透析是 4°C 透析 3d,所述换液是指换液 3 次/d,所述离心是 10000r/min 离心 5min,所述保存的温度为 -20°C 。

[0022] 所述人工抗原作为免疫原在制备用于检测苄嘧磺隆的抗体或抗血清中的应用。

[0023] 所述人工抗原在采用间接 Elisa 法检测苄嘧磺隆中作为包被原的应用。

[0024] 所述包被原的包被浓度为 $5.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,间接 Elisa 法中抗血清稀释 3.2×10^4 倍。

[0025] 所述的人工抗原作为免疫原免疫动物制备得到的抗血清、抗体或杂交瘤细胞。

[0026] 高效价抗原的制备是得到特异性抗体及保证免疫检测灵敏性的重要前提,其中半抗原的制备又是抗原制备的关键。苄嘧磺隆因分子量小而不具有免疫原性,不能在动物体内产生抗体。所以酶联免疫方法的关键点是制备具有免疫原性的人工抗原。本发明以 2-甲酸甲酯苄磺酰胺和琥珀酸酐为原料制备的半抗原具有磺隆类的除草剂分子结构的共同特征,与现有技术中公开的苄嘧磺隆半抗原结构相比,本发明的半抗原只是取苄嘧磺隆分子的苯环和脲桥部分构成通用半抗原,能够对苄嘧磺隆、环丙嘧磺隆、氯嘧磺等多种磺隆类农药同时检测,如实施例 8。该人工抗原作为免疫原免疫动物制备得到的抗血清能够能够对具有该分子结构特征的物质特异性结合,即特异性识别磺隆类除草剂分子。

[0027] 为了能与载体蛋白分子偶联,需要引入连接臂及羧基,本发明的抗原所采用的合成路线是基于考虑到了连接臂及羧基引入位置的选择对合成产物的三维空间结构的影响,尽量避免由于连接臂的引入而影响了合成产物的特征分子结构的构象,以保证作为抗原决定位点的结构不受影响。

[0028] 本发明的人工抗原采用混合酸酐法制备,利用半抗原分子上的游离羧基和氯甲酸异丁酯在三正丁胺存在的无水条件下先形成混合酸酐中间体,而后再与载体蛋白进行偶联,取得良好效果。在半抗原偶联人工免疫抗原的载体蛋白选择上,有兔血清蛋白 (RSA)、人血清蛋白 (HSA)、钥匙孔血蓝蛋白 (KLH)、甲状腺球蛋白 (TG) 等。实验采用的是 BSA,因为其物理化学性质稳定,且含有较高赖氨酸含量和自由氨基基团。本发明成功合成了人工抗原,为苄嘧磺隆的免疫分析检测提供了基础。

[0029] 制备得到的多克隆抗体对半抗原的抑制率通过间接竞争 ELISA (CI-ELISA) 进行测定。按照最佳抗原抗体工作浓度和优化条件进行,将半抗原用 PBST (0.01mol/L PBST, $\text{pH} = 7.4$, 含 0.05% Tween-20) 配制浓度分别为 0 、 0.001 、 0.01 、 0.1 、 1 、 10 、 50 、 100mg/L 的标准溶液,绘制标准抑制曲线,计算抑制中浓度 (IC_{50}) 及最低检测限 (IC_{10})。

[0030] 本发明制备的人工抗原 Hapten-BSA 能够很好地刺激动物产生抗体,同时由于动

物个体的差异,各个小鼠产生的效价略有不同。

[0031] 根据抗原抗体最佳工作浓度进行间接竞争 ELISA,从抑制曲线知 Hapten 作为竞争物能与包被原竞争性地结合血清中的抗体,抑制了抗体与包被原的结合。从以半抗原为研究对象,建立的回归方程,可以得知抗体对半抗原有较强的亲和力。

[0032] 本发明的合成方法在上述发明的基础上进行了优化而更简洁,现有常用的混合酸酐法中载体蛋白 B 液多用 $\text{pH} = 8.0$ 的硼酸缓冲溶液,而本发明混合酸酐法采用 $\text{pH} = 9.0$ 的硼酸缓冲溶液,对本发明的载体蛋白的溶解性更好,有利于半抗原与载体蛋白的结合产率更高。

附图说明

[0033] 图 1 为磺隆类化合物分子结构图

[0034] 其中: $\text{R} = \text{CH}_3$, 烷基; $\text{R}_1 = \text{CH}_3, \text{OCH}_3, \text{Cl}, \text{NHCH}_3$; $\text{R}_2 = \text{CH}_2, \text{OCH}_3, \text{Cl}, \text{CH}_2\text{OF}_2, \text{OCH}_2\text{CH}_3, \text{CH}_2\text{SePH}$; $\text{X} = \text{N}, \text{CH}$; $\text{Y} = \text{Cl}, \text{CH}_3, \text{CF}_3, \text{SCH}_3, \text{OCH}_3, \text{CH}_2\text{Cl}, \text{SO}_2\text{CH}_3, \text{COOCH}_3, \text{COOC}_2\text{H}_5, \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}, \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3, \text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2, \text{SO}_2\text{NHOCH}_3$ 。

[0035] 图 2 为通用半抗原合成路线图

[0036] 图 3 为 Hapten TLC 检测结果图

[0037] 其中 A: 2- 甲酸甲酯苄磺酰胺 B: 通用半抗原

[0038] 图 4 为通用半抗原 1 的 ^1H 核磁图谱图

[0039] 图 5 为 Hapten、载体蛋白及其偶联物紫外吸收光谱图

[0040] 图 6 为多克隆抗体效价图

[0041] 其中: 横坐标为抗血清稀释倍数; 纵坐标为吸光度值 OD

[0042] 图 7 为间接竞争 ELISA 曲线图

具体实施方式

[0043] 本发明提供下述实施例是为了更好地进一步理解本发明,并不局限于所述最佳实施方式,不对本发明的内容和保护范围构成限制,任何人在本发明的启示下得出的其他任何与本发明相同或相近似的产品,均落在本发明的保护范围之内。

[0044] 实施例 1 通用半抗原的制备与鉴定

[0045] 200mg 2- 甲酸甲酯苄磺酰胺和 87mg 琥珀酸酐溶于 5mL 乙腈,置于 22°C 水浴中,10min 内将 265.5mg DBU 逐滴加入,搅拌 2h 后将反应溶液倒入 50mL 蒸馏水中,50mL 乙酸乙酯洗涤,去除有机相, HCl 调节水相 pH 至 2 后用乙酸乙酯提取 ($2 \times 50\text{mL}$),合并有机相无水 MgSO_4 干燥,蒸干溶剂,乙酸乙酯重结晶得 Hapten,先经薄层层析 (TLC) 初步检测,后核磁鉴定。

[0046] ^1H NMR (CD_3OD): δ 7.91 (d, 1H, $J = 7.5\text{Hz}$ Ar), 7.61–7.42 (m, 3H, Ar), 4.78 (s, 2H, CH_2SO_2), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 2.48 (m, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 2.43 (m, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$)。见图 4。其中 5.0–5.5 和 11–13 处分别出现了点点杂峰,这可能是由于过柱子纯化未完全,但目标物质的峰已经出现,证明产物就是通用半抗原,可以进行人工抗原的偶联制备。

[0047] 实施例 2 人工抗原合成与鉴定

[0048] 16.45mg Hapten 溶于 1mL 四氢呋喃中,边搅拌边加入 $13\mu\text{L}$ 三正丁胺,冷却至 0°C

后,加 7 μ L 氯甲酸异丁酯,冰浴下搅拌 60min,为 A 液。称取 33.5mg BSA(或 21.5mg OVA)溶于硼酸盐缓冲液(0.2mol/L,Ph = 9.0),为 B 液。4℃缓慢将 A 液滴加至 B 液中,磁力搅拌过夜。次日,将反应液于 PBS 缓冲液(pH = 7.4)中 4℃透析 3d,换液 3 次/d,透析液 10000r/min 离心 5min,取上清液冷冻干燥,-20℃保存。

[0049] 紫外扫描仪在 190-400nm 波长对透析后样品进行扫描,鉴定偶联情况。根据各物质的特征吸收峰波长及吸光值,按照如下公式计算偶联比^[13]。

[0050]

$$\text{偶联比} = \frac{CD - A_{Cdm} \times KB_{bm} - A_{Cbm} \times KB_{dm}}{CB - A_{Cbm} \times KB_{dm} - A_{Cdm} \times KB_{bm}}$$

[0051] 其中:D、B、C 分别为通用半抗原、BSA(或 OVA)、反应产物;CD、CB 为通用半抗原和 BSA(或 OVA)的克分子浓度;A 为吸光度值;K 为克分子消光系数($K = A \times \text{分子量} / \text{浓度}$);dm、bm 分别为通用半抗原和 BSA(或 OVA)的最大吸收波长。

[0052] 实施例 3 多抗血清制备

[0053] Balb/c 小鼠观察一周无异样后取尾血保存作阴性对照。将免疫原的生理盐水溶液与弗氏完全佐剂等量混合,乳化完全后腹部皮下多点注射免疫小鼠,免疫剂量为 100 μ g/0.2ml。两周后改用弗氏不完全佐剂为乳化剂,以相同剂量和方法加强免疫小鼠。免疫过程每两周一次,免疫 4 次。第 3 次免疫后 10d 取小鼠尾血,间接非竞争 ELISA 测效价。

[0054] 多克隆抗体对通用半抗原的抑制率通过间接竞争 ELISA(CI-ELISA)进行测定。按照最佳抗原抗体工作浓度和优化条件进行,将通用半抗原用 PBST(0.01mol/LPBS, pH = 7.4,含 0.05% Tween-20)配制浓度分别为 0、0.001、0.01、0.1、1、10、50、100mg/L 的标准溶液,绘制标准抑制曲线,计算抑制中浓度(IC₅₀)及最低检测限(IC₁₀)。

[0055] 实施例 4 通用半抗原鉴定

[0056] 将原料 2-甲酸甲酯苄磺酰胺经合成路线反应后得到白色固体,将 2-甲酸甲酯苄磺酰胺和得到白色固体溶液进行 TLC 检测,展开剂为甲醇:二氯甲烷:乙酸 = 1:9:0.1(v/v/v),结果如图 3,得到白色固体的荧光点明显区别于原料点,计算白色固体 R_f = 0.48,初步说明得到白色固体为目标产物 Hapten,但还需合成进一步验证。

[0057] 通用半抗原 Hapten 用氘代甲醇(CD₃OD)溶剂溶解,经核磁氢谱鉴定结果如图 4 所示。

[0058] 由图可知,¹H NMR(CD₃OD): δ 7.91(d,1H, J = 7.5Hz Ar),7.61-7.42(m,3H, Ar),4.78(s,2H, CH₂SO₂),3.85(s,3H, OCH₃),2.48(m,2H, COCH₂CH₂COOH),2.43(m,2H, COCH₂CH₂COOH),其中 5.0-5.5 和 11-13 处分别出现了点点杂峰,这可能是由于过柱子纯化未完全,但目标物质的峰已经出现,证明产物就是通用半抗原,可以进行人工抗原的偶联制备。

[0059] 实施例 5 人工抗原鉴定

[0060] 将 Hapten-BSA、Hapten-OVA、Hapten-和载体蛋白用 PBS 稀释为 1mg $\cdot$ mL⁻¹,以 PBS 为空白对照,在 190-400nm 进行紫外扫描,结果如图 5

[0061] 从图中可看出, Hapten、BSA 和 Hapten-BSA 的特征吸收峰分别为 269nm、278nm 和 275nm,而 OVA 和 Hapten 1-OVA 的特征吸收峰分别为 276nm 和 271nm。偶联物的紫外吸收光谱区别于 Hapten 与 BSA 和 OVA,由此可以推断偶联物的某些基团已经被通用半抗原修饰,同时仍保留载体蛋白的性质,说明通用半抗原已经成功偶联。根据公式计算 Hapten 与 BSA

和 OVA 的偶联比分别为 8 : 1 和 13 : 1, 因此可初步说明 Hapten 与 BSA 和 OVA 偶联合成成功。

[0062] 实施例 6 抗体效价测定

[0063] 5 次免疫之后, 间接非竞争 ELISA 检测每只小鼠的抗血清效价, 以阴性血清为空白对照, 大于空白对照 2 倍以上的抗血清稀释倍数为阳性抗血清的效价。测定结果如图 6 所示: 小鼠均能产生较高效价的阳性抗血清, 其中 2 和 5 号小鼠效价为 6.4×10^4 , 而 1、3 和 4 号小鼠效价达 $1 : 1.28 \times 10^5$ 。结果表明合成的人工抗原 Hapten-BSA 能够很好地刺激动物产生抗体, 但由于动物个体的差异, 各个小鼠产生的效价略有不同。

[0064] 实施例 7 抗体亲和力测定

[0065] 选择效价较高的 4 号小鼠的抗血清用间接非竞争 ELISA 法确定抗原抗体最佳工作浓度为: 包被原浓度为 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 血清稀释倍数为 32000 倍。用所确定的抗原抗体最佳工作浓度进行间接竞争 ELISA 法, 绘制抑制曲线如图 7 所示:

[0066] 由图 7 可知, 抑制率与 Hapten 的浓度呈明显的正相关, 表明 Hapten 作为竞争物在 $0.001\text{--}100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 能与包被原竞争性地结合血清中的抗体, 抑制了抗体与包被原的结合。以通用半抗原为研究对象, 建立回归方程为 $y = 0.172x + 0.5513$ ($R^2 = 0.9923$), $\text{IC}_{50} = 0.5032 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{I}_{10} = 0.0024 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 这表明抗体对通用半抗原有较强的亲和力。

[0067] 实施例 8. 本发明的人工抗原的检测试验。

[0068] 用实施例 7 所确定的抗原抗体最佳工作浓度, 通过间接 Elisa 方法检测本发明的抗原制备得到的抗体对苄嘧磺隆、乙氧嘧磺隆、环丙嘧磺隆和氯嘧磺隆等农药分子的特异性, 结果如表 1 所示, 抗血清对具有本发明制备的抗原的结构类似物, 如苄嘧磺隆、乙氧嘧磺隆、环丙嘧磺隆和氯嘧磺隆等具有明显的交叉反应, 而对具有结构差异的四唑嘧磺隆和咪唑嘧磺隆却没有较差反应。

[0069] 表 1

	Compound	IC ₅₀ (mg/L)	CR (%)
	半抗原		
	Hapten	0.5023	100.00
	苄嘧磺隆		
	Bensulfuron-methyl	0.6418	78.26
[0070]	乙氧嘧磺隆 Ethoxysulfuron	2.5830	19.45
	环丙嘧磺隆 Cyclosulfamuron	7.3621	6.82
	氯嘧磺隆		
	Chlorimuron-ethyl	12.581	3.99
	四唑嘧磺隆 Azimsulfuron	> 1000	< 0.10
	咪唑嘧磺隆 Imazosulfuron	> 1000	< 0.10

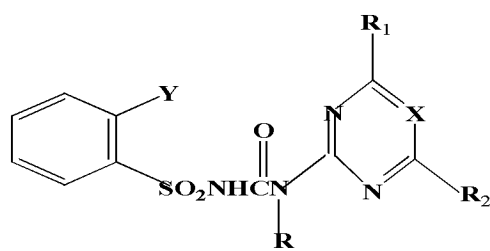


图 1

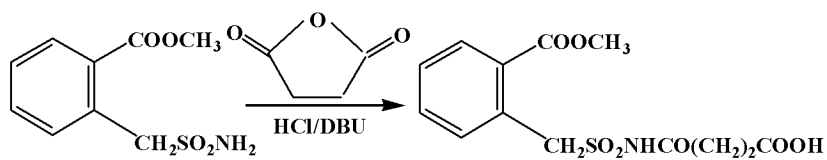


图 2

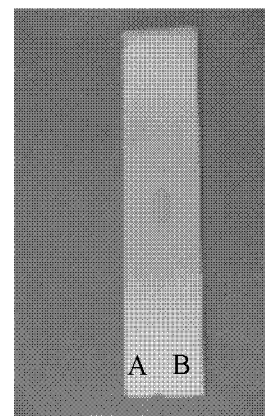


图 3

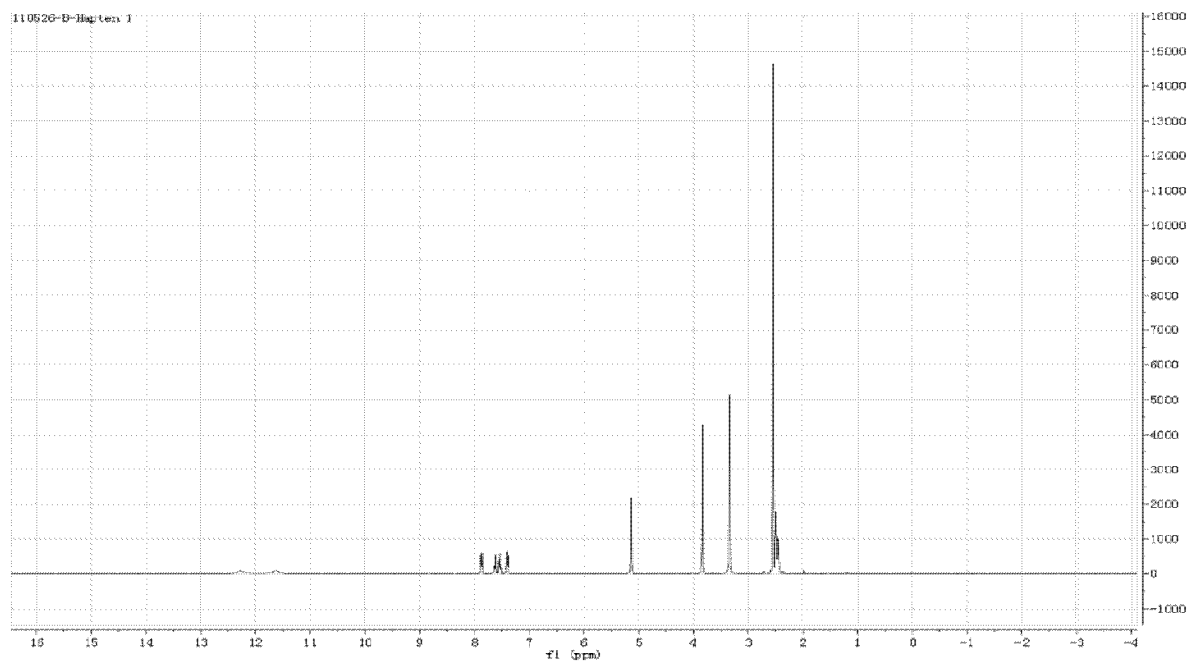


图 4

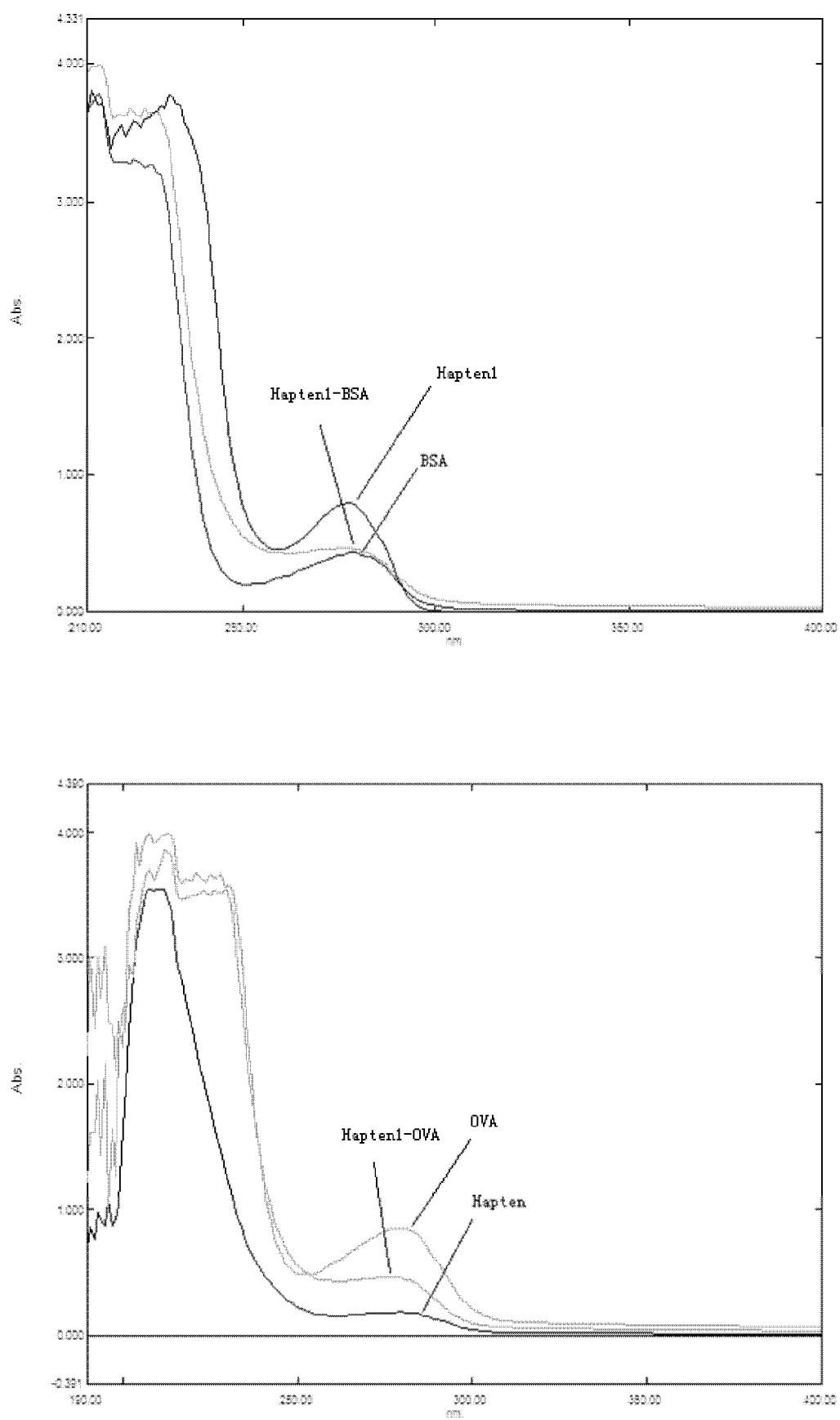


图 5

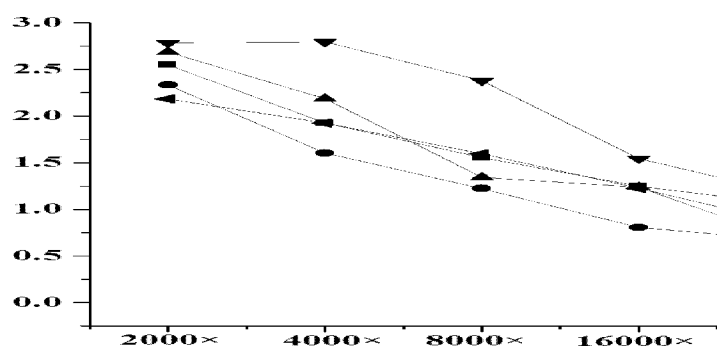


图 6

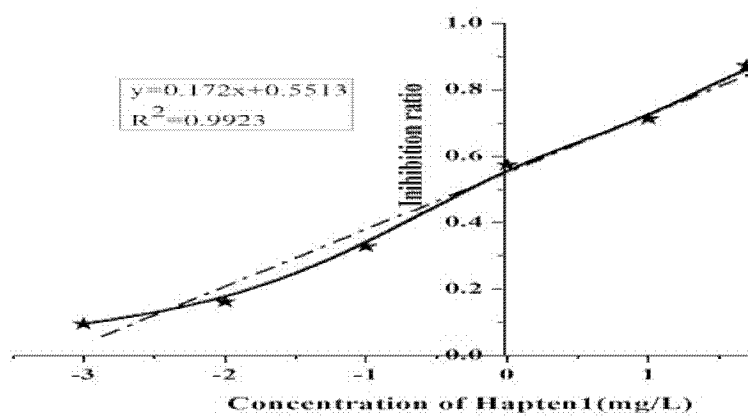


图 7

专利名称(译)	苄嘧磺隆通用半抗原、人工抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN103159648A	公开(公告)日	2013-06-19
申请号	CN201110417904.0	申请日	2011-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	中国计量大学 中国农业科学院农产品加工研究所		
申请(专利权)人(译)	中国计量学院 中国农业科学院农产品加工研究所		
当前申请(专利权)人(译)	CHINA JILIANG UNIVERSITY		
[标]发明人	王磊 睢珂 王志伟 潘家荣 赵杰 郑月明		
发明人	王磊 睢珂 王志伟 潘家荣 赵杰 郑月明		
IPC分类号	C07C311/51 C07C303/40 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/06 C07K16/44 C12N5/20 G01N33/53		
代理人(译)	张涛		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫检测及生物化工技术领域，涉及苄嘧磺隆通用半抗原、人工抗原及其制备方法与应用。本发明提供的苄嘧磺隆通用半抗原制备得到的人工抗原免疫得到的抗体能够光谱的识别具有上述人工半抗原结构的苄嘧磺隆类农药分子，使得采用该人工抗原及其得到的抗体的间接Elisa方法的可检测谱较宽；本发明制备人工抗原采用了改进的混合酸酐法，偶联效率高，简便。

