



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108484752 A

(43)申请公布日 2018.09.04

(21)申请号 201810570441.3

(22)申请日 2018.06.05

(71)申请人 西南大学

地址 400715 重庆市北碚区天生路2号

(72)发明人 崔永亮 焦必宁 叶玉凤 赵其阳

张耀海 陈爱华 何悦 王成秋

(74)专利代理机构 成都方圆聿联专利代理事务

所(普通合伙) 51241

代理人 李鹏

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

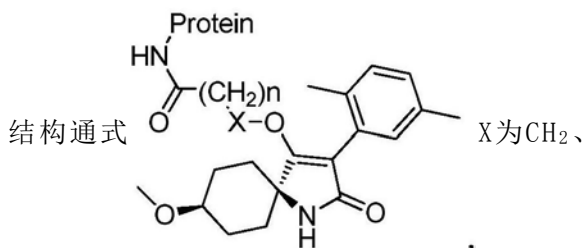
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

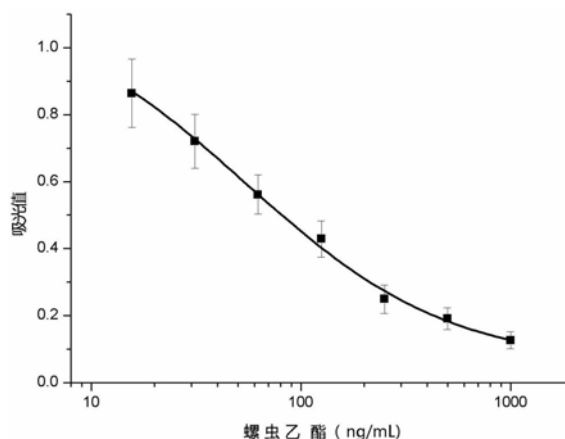
螺虫乙酯抗原及其制备方法与应用

(57)摘要

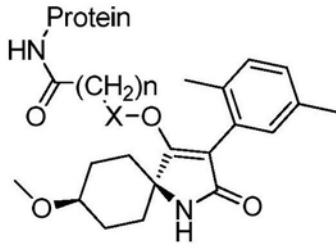
本发明涉及化合物制备与应用技术领域,特别涉及一种螺虫乙酯抗原及其制备方法与应用,



CO基团中的一种,n为0-6的整数;Protein表示载体蛋白,所述载体蛋白选自牛血清蛋白、卵清蛋白和血蓝蛋白中至少一种。是螺虫乙酯与载体蛋白通过酰胺键连接形成的偶联物;所述酰胺键是式C上的羧基通过活泼酯与载体蛋白上的氨基形成的;制备用于检测样品中螺虫乙酯的酶联免疫试剂盒、螺虫乙酯的发光免疫试剂盒或免疫亲和色谱柱中的应用。该方法能够方便、快捷地获得螺虫乙酯抗原,合成步骤简洁明了、合成成本低,效果好。



1. 一种螺虫乙酯抗原,其特征在于,结构通式如式A所示,

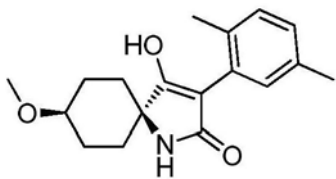


式 A 结构式

所述式A中,X为CH₂、CO基团中的一种,n为0-6的整数;Protein表示载体蛋白,所述载体蛋白选自牛血清蛋白、卵清蛋白和血蓝蛋白中至少一种。

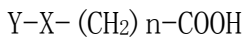
2. 根据权利要求1所述的一种螺虫乙酯抗原的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤1,将螺虫乙酯水解得到式B所示化合物;

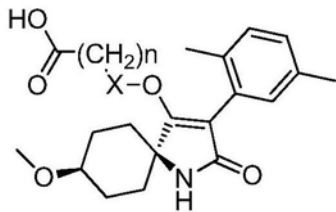


式 B 结构式

步骤2,将式B化合物与式C所示同时含有氨基和羧基的化合物进行反应得到式D所示化合物;



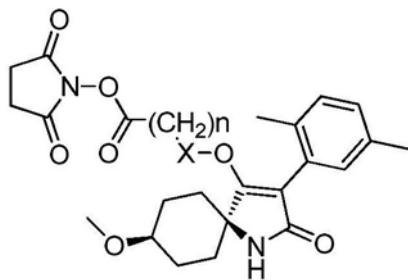
式C结构式



式 D 结构式

所述式C和式D中,X为CH₂、CO基团中的一种,Y为Cl、Br和I基团中的一种,n为0-6的整数;

步骤3,式D所示化合物和N-羟基琥珀酰亚胺在二环己基碳二亚胺或1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐存在的条件下进行偶联反应得到式E所示化合物;



式 E 结构式

所述式E中,X为CH₂、CO基团中的一种,n为0-6的整数;

步骤4,式E所示化合物与载体蛋白经偶联反应即得式A所示螺虫乙酯抗原;所述载体蛋白选自牛血清蛋白、卵清蛋白和血蓝蛋白中至少一种。

3.根据权利要求2所述的一种螺虫乙酯抗原的制备方法,其特征在于,步骤2中,式C所示化合物选自氯乙酸、溴乙酸、碘乙酸、氯丙酸、溴丙酸、碘丙酸、氯丁酸、溴丁酸、碘丁酸中至少一种。

4.根据权利要求2所述的一种螺虫乙酯抗原的制备方法,其特征在于,所述步骤2中,式B化合物和C化合物的投料摩尔配比为0.1-10:1;反应的温度为0~100℃,时间为3~48小时;反应的溶剂选自吡啶、N,N-二甲基甲酰胺、二甲亚砜和四氢呋喃中至少一种。

5.根据权利要求2所述的一种螺虫乙酯抗原的制备方法,其特征在于,所述步骤3中,式D所示化合物、N-羟基琥珀酰亚胺与二环己基碳二亚胺的摩尔份数比为1:1~5:1~5;

式D所示化合物、N-羟基琥珀酰亚胺与1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐的摩尔份数比为1:1~5:1~5;

所述偶联反应的温度为0~50℃,时间为4~24小时。

6.根据权利要求2所述的一种螺虫乙酯抗原的制备方法,其特征在于,步骤4中,式E所示化合物与所述载体蛋白的摩尔份数比为5~30:1;

所述偶联反应的温度为0~50℃,时间为4~36小时;所述偶联反应在pH值为5~9的条件下进行;

式E所示化合物在所述载体蛋白的溶液中进行偶联反应,所述载体蛋白的溶液是由所述载体蛋白加入至缓冲溶液中得到的,所述缓冲溶液选自碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液和4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液中至少一种,所述缓冲液的pH值均为7.4。

7.根据权利要求2所述的一种螺虫乙酯抗原的制备方法,其特征在于,还包括将所述偶联反应的反应体系进行透析;所述透析步骤中,所用透析液为pH值为4~10、浓度为0.01~0.2mol/L的磷酸盐缓冲溶液。

8.根据权利要求2所述的一种螺虫乙酯抗原的应用,其特征在于,用于制备检测样品中螺虫乙酯的酶联免疫试剂盒、螺虫乙酯的发光免疫试剂盒或免疫亲和色谱柱中的应用。

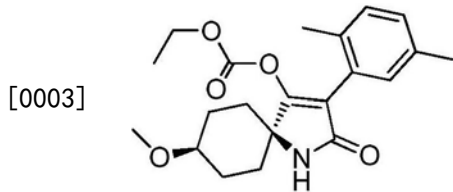
螺虫乙酯抗原及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及化合物制备与应用技术领域,特别涉及一种螺虫乙酯抗原及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 螺虫乙酯(spirotetramat)是由德国拜耳公司开发研制的新颖内吸型季酮酸类杀虫剂,属于高效广谱杀虫剂,可有效防治各种刺吸式口器害虫。螺虫乙酯为低毒性杀虫剂,在土壤中易降解,可有效防治木虱、粉虱、介壳虫、棉盲蝽等害虫。其化学结构式如下:



[0004] 2007年10月,拜耳公司在英国格拉斯哥植保会议上介绍了螺虫乙酯,2007年底,螺虫乙酯在突尼斯获准在全球的首个登记。2008年,拜耳在美国和加拿大登记并上市了螺虫乙酯,继而在哥伦比亚、墨西哥、土耳其和新西兰等国家登记上市。2011年3月16日,螺虫乙酯在中国正式登记上市。螺虫乙酯的销售额逐年上升,从2008年的不足0.3亿美元已经上升到2012年为1.40亿美元。随着螺虫乙酯的大量使用,其残留问题也引起人们的关注。虽然螺虫乙酯属于低毒性杀虫剂,但是从环境安全性评价来说,螺虫乙酯难挥发、难光解,在土壤中可以降解,但是其降解产物在土壤中有一定的移动性,很容易交叉污染。

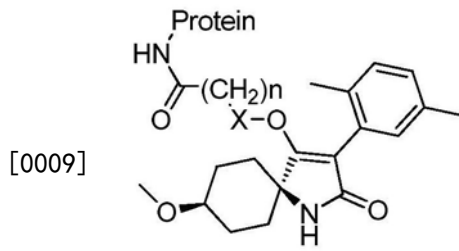
[0005] 目前,螺虫乙酯在农产品中的残留检测方法主要是高效液相色谱法(HPLC)和高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS)尽管仪器法检测具有灵敏度高、准确可靠等优点,但样品前处理繁琐,检测时间长,耗资大,技术性要求高,且仪器昂贵,不适合大量样品的快速检测,也不具备现场快速检测的能力。与仪器分析法相比,免疫分析法具有快速、简便、实时、易于进行现场检测、样品前处理简单、灵敏度高、选择性强、适合于高通量分析等优点,而且还能大幅度降低检测成本。

发明内容

[0006] 本发明针对现有技术的缺陷,提供了一种螺虫乙酯抗原及其制备方法与应用,能有效的解决上述现有技术存在的问题。

[0007] 为了实现以上发明目的,本发明采取的技术方案如下:

[0008] 一种螺虫乙酯抗原,其结构通式如式A所示,

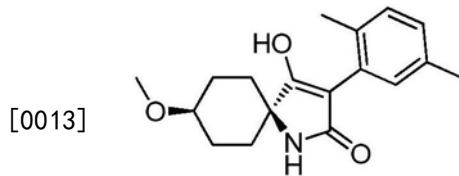


式 A 结构式

[0010] 所述式A中,X为CH₂、CO基团中的一种,n为0-6的整数;Protein表示载体蛋白,所述载体蛋白选自牛血清蛋白、卵清蛋白和血蓝蛋白中至少一种。

[0011] 该螺虫乙酯抗原的制备方法,螺虫乙酯抗原是螺虫乙酯与载体蛋白通过酰胺键连接形成的偶联物;所述酰胺键是式C上的羧基通过活泼酯与载体蛋白上的氨基形成的。包括如下步骤:

[0012] 步骤1,将螺虫乙酯水解得到式B所示化合物;

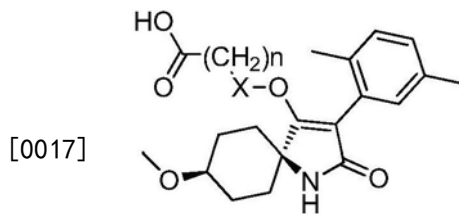


式 B 结构式

[0014] 步骤2,将式B化合物与式C所示同时含有氨基和羧基的化合物进行反应得到式D所示化合物;

[0015] Y-X-(CH₂)_n-COOH

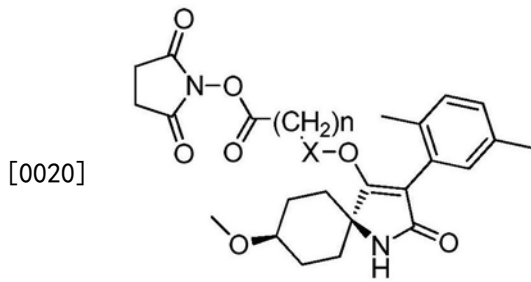
[0016] 式C结构式



式 D 结构式

[0018] 所述式C和式D中,X为CH₂、CO基团中的一种,Y为Cl、Br和I基团中的一种,n为0-6的整数;

[0019] 步骤3,式D所示化合物和N-羟基琥珀酰亚胺在二环己基碳二亚胺或1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐存在的条件下进行偶联反应得到式E所示化合物;



式 E 结构式

[0021] 所述式E中, X为CH₂、CO基团中的一种, n为0-6的整数;

[0022] 步骤4, 式E所示化合物与载体蛋白经偶联反应即得式A所示螺虫乙酯抗原; 所述载体蛋白选自牛血清蛋白、卵清蛋白和血蓝蛋白中至少一种。

[0023] 作为优选, 步骤2中, 式C所示化合物选自氯乙酸、溴乙酸、碘乙酸、氯丙酸、溴丙酸、碘丙酸、氯丁酸、溴丁酸、碘丁酸中至少一种。

[0024] 作为优选, 所述步骤2中, 式B化合物式和C化合物的投料摩尔配比为0.1-10:1, 反应的温度为0~100℃, 时间为3~48小时; 反应的溶剂选自吡啶、N,N-二甲基甲酰胺、二甲亚砜和四氢呋喃中至少一种。

[0025] 作为优选, 所述步骤3中, 式D所示化合物、N-羟基琥珀酰亚胺与二环己基碳二亚胺的摩尔份数比为1:1~5:1~5; 式D所示化合物、N-羟基琥珀酰亚胺与1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐的摩尔份数比为1:1~5:1~5; 所述偶联反应的温度为0~50℃, 时间为4~24小时。

[0026] 作为优选, 步骤3中, 式E所示化合物与所述载体蛋白的摩尔份数比为5~30:1; 所述偶联反应的温度为0~50℃, 时间为4~36小时; 所述偶联反应在pH值为5~9的条件下进行; 式E所示化合物在所述载体蛋白的溶液中进行偶联反应, 所述载体蛋白的溶液是由所述载体蛋白加入至缓冲溶液中得到的, 所述缓冲溶液选自碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液和4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液中至少一种, 所述缓冲液的pH值均为7.4。

[0027] 作为优选, 步骤4之后, 所述方法还包括将所述偶联反应的反应体系进行透析的步骤; 所述透析步骤中, 所用透析液为pH值为4~10、浓度为0.01~0.2mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0028] 基于上述螺虫乙酯抗原的应用, 包括: 在制备用于检测样品中螺虫乙酯的酶联免疫试剂盒、螺虫乙酯的发光免疫试剂盒或免疫亲和色谱柱中的应用。所述检测样品为水体、药品、食品或土壤。

[0029] 与现有技术相比本发明的优点在于: 能够方便、快捷地获得螺虫乙酯抗原, 合成步骤简洁明了、合成成本低, 效果好。本发明方法制备的螺虫乙酯抗原进行免疫得到的抗体的特异性好、最低检测限值低。本发明的制备螺虫乙酯抗原的方法及由该方法获得的螺虫乙酯抗原在螺虫乙酯的快速免疫检测应用中将有广阔的前景。

附图说明

[0030] 图1为实施例建立的螺虫乙酯间接ELISA法标准曲线。

具体实施方式

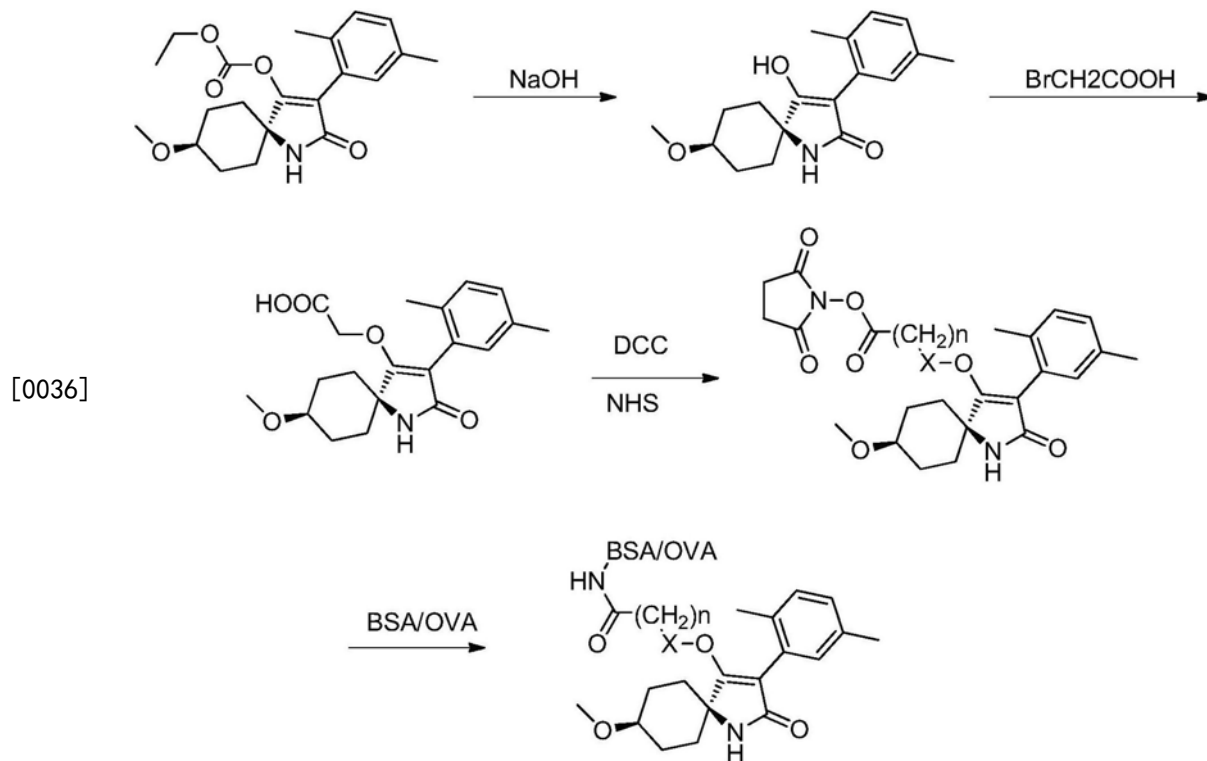
[0031] 为使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图并列举实施例,对本发明做进一步详细说明。

[0032] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0033] 二环己基碳二亚胺(DCC),1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC),N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),弗氏完全佐剂,弗氏不完全佐剂,牛血清白蛋白和卵清白蛋白均购于Sigma公司,羊抗小鼠IgG-HRP购自Jackson公司,单组分TMB显色液,溴乙酸、螺虫乙酯等其余常规试剂均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

[0034] 实施例1、螺虫乙酯-卵清白蛋白(螺虫乙酯-OVA)抗原的制备

[0035] 合成路线:



[0037] 1) 式I所示化合物的合成

[0038] 在100mL圆底烧瓶中加入1.5g螺虫乙酯和0.65g NaOH,加入20mL甲醇和4mL水,25℃下搅拌4h后,将反应液倒入100mL水中,用浓盐酸调节pH值为3,用乙酸乙酯(3×50mL)萃取,无水硫酸钠干燥。旋转脱溶,将得到的产物用正己烷和乙酸乙酯(3:1,v/v)重结晶,得白色固体0.88g,产率73%。

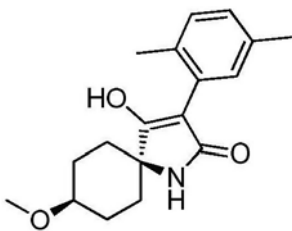
[0039] ¹H NMR (600MHz, dmsO) δ7.96 (s, 1H), 7.04 (d, J=7.7Hz, 1H), 6.94 (d, J=7.5Hz, 1H), 6.87 (s, 1H), 3.24 (s, 3H), 3.09 (t, J=10.7Hz, 1H), 2.22 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.92 (m, 4H), 1.49 (q, J=11.3Hz, 2H), 1.38 (d, J=12.4Hz, 2H) .

[0040] ¹³C NMR (151MHz, dmsO) δ178.56, 172.39, 134.64, 133.93, 131.99, 131.54, 129.71, 127.76, 93.27, 78.10, 59.64, 55.34, 32.61, 28.05, 20.97, 19.69.

[0041] ESI-MS m/z 302.13 [M+H]⁺.

[0042] 产品经¹H-NMR、¹³C-NMR和质谱确证,为式I所示化合物。

[0043]



式 I

[0044] 2) 式 II 所示化合物的合成

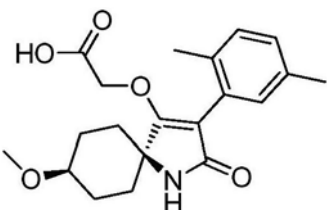
[0045] 在 50mL 三口瓶中加入式 I 所示化合物 0.45g, 加入 20mL DMF 使其溶解, 滴加入溴乙酸 0.3g, 加入 NaOH 0.2g, 搅拌加热至 100 度, 反应 24h。将反应液冷去至室温, 然后倒入 100mL 水中, 搅拌 4h 后, 用浓盐酸调节 pH 值为 3, 用乙酸乙酯 (3 × 50mL) 萃取, 无水硫酸镁干燥。旋转脱溶, 柱层析得到产物 0.3g, 产率 56%。

[0046] ^1H NMR (600MHz, dmsO) δ 12.92 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.08 (m, 2H), 6.87 (s, 1H), 4.31 (dd, 2H), 3.24 (m, 3H), 3.15 (s, 1H), 2.25 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.99 (m, 2H), 1.89 (m, 2H), 1.52 (m, 4H).

[0047] ^{13}C NMR (151MHz, dmsO) δ 171.19, 171.12, 169.02, 135.05, 134.46, 131.97, 131.27, 129.72, 128.89, 106.95, 77.93, 66.87, 60.15, 55.36, 33.31, 27.89, 20.89, 19.47.

[0048] ESI-MS m/z 360.31 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 382.28 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

[0049]



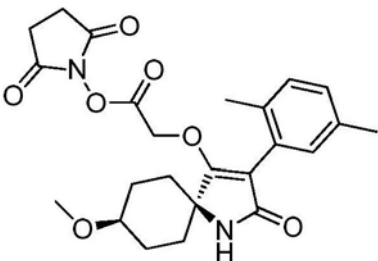
式 II

[0050] 3) 偶联反应

[0051] 方法 (1): 称取步骤 2) 得到的式 II 所示螺虫乙酯半抗原 (0.036mmol), NHS (0.047mmol), 和 DCC (0.040mmol) 用 1mL 无水 DMF 溶解, 在室温 25°C 搅拌反应 6 小时后, 将反应液在 8000 转下离心 5 分钟, 取上清液, 得到式 III 所示化合物;

[0052] 方法 (2): 称取步骤 2) 得到的式 II 所示螺虫乙酯半抗原 (0.036mmol), NHS (0.047mmol), 和 EDC (0.040mmol) 用 1mL 水溶解, 在室温 25°C 搅拌反应 6 小时后, 得到式 III 所示化合物;

[0053]

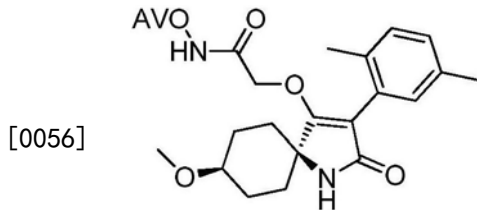


式 III

[0054] 4) 将步骤 3) 所得式 III 所示化合物缓慢滴加入载体蛋白 OVA 溶液中, 该载体蛋白溶液是由 105mg OVA 溶于 10mL pH 值为 7.4 的磷酸盐 (PBS) 缓冲液混匀而得; 式 III 化合物与载体

蛋白的投料摩尔比为15:1,在4℃搅拌过夜。

[0055] 5) 透析:将步骤4) 所得反应液用pH值为7.4、浓度为0.01mol/L的PBS溶液透析三天,将透析完全的反应产物溶液(螺虫乙酯-OVA) 稀释为1mg/mL的溶液,至于-40℃冻存待用。透析的作用在于去除未反应的螺虫乙酯半抗原和其它小分子,得到式IV-1所示螺虫乙酯与OVA的偶联物,也即式A所示螺虫乙酯抗原。



式IV-1

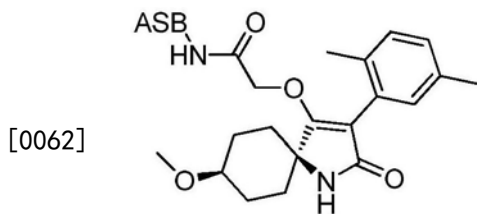
[0057] 其中,该PBS溶液按照如下方法制备而得:将NaCl、KH₂PO₄和Na₂HPO₄·12H₂O以质量比8.0:0.2:2.96的比例溶于水中,用水定容到1L。

[0058] 实施例2、螺虫乙酯-牛血清白蛋白(螺虫乙酯-BSA) 抗原的制备

[0059] 1) 式II所示螺虫乙酯半抗原的合成及其活化与实施例1中无差别,在此不再赘述。

[0060] 2) 将实施例1中步骤3) 所得式III所示化合物缓慢滴加到载体蛋白溶液中,该载体蛋白溶液是由157.5mg BSA溶于10mL pH值为7.4的磷酸盐缓冲液(PBS),式III化合物与载体蛋白的投料摩尔比为15:1,在4℃搅拌过夜。

[0061] 3) 透析:将步骤2) 所得反应液用pH值为7.4、浓度为0.01mol/L的PBS溶液透析三天,将透析完全的反应产物溶液(螺虫乙酯-BSA) 稀释为1mg/mL的溶液,至于-40℃冻存待用。透析的作用在于去除未反应的螺虫乙酯半抗原和其它小分子,得到式IV-2所示螺虫乙酯与OVA的偶联物,也即式A所示螺虫乙酯抗原。



式IV-2

[0063] 其中,该PBS溶液按照如下方法制备而得:将NaCl、KH₂PO₄和Na₂HPO₄·12H₂O以质量比8.0:0.2:2.96的比例溶于水中,用水定容到1L。

[0064] 实施例3、螺虫乙酯-牛血清白蛋白(螺虫乙酯-BSA) 抗原的应用

[0065] 一、利用螺虫乙酯-牛血清白蛋白(螺虫乙酯-BSA) 抗原制备抗体

[0066] (1) 取8-10周龄的Ba1 b/c小白鼠作为实验动物。

[0067] (2) 基础免疫:由实施例2中得到稀释好的螺虫乙酯-BSA抗原溶液(浓度为1mg/mL),经无菌过滤器过滤后加入等体积弗氏完全佐剂,用磁力搅拌器充分搅拌乳化,直到滴入水中不扩散。用乳化好的完全抗原采用腹腔及背部皮下多点注射Ba1 b/c小鼠,注射剂量为0.1mg乳化抗原/只。

[0068] (3) 加强免疫:基础免疫2周后,取1mL上述稀释好的螺虫乙酯-BSA抗原溶液,然后加入1mL弗氏不完全佐剂,用磁力搅拌器充分搅拌乳化,直到滴入水中不扩散。将乳化好的

抗原采用腹腔及背部皮下多点注射Ba1 b/c小鼠,每只小鼠的注射剂量为0.1mg乳化稀释抗原(8周龄的Ba1 b/C小鼠体重约23-25g)。

[0069] 加强免疫每隔15天免疫一次,从第三次加强免疫开始,每次免疫后第3-5天,从小鼠眼眶采血,测定抗体效价,包被原为1mg/mL螺虫乙酯-OVA稀释500倍用,待效价大于1:8000后(效价定义为零孔显色值为1时,血清的稀释倍数),眼球摘除采血,血液室温静置1小时后,再于4℃冰箱中静置2小时,然后于离心机中8000r/min离心5分钟后,分离出抗血清,即得到螺虫乙酯-BSA抗体。用于下述各实验。

[0070] 二、抗体效果检测

[0071] 下述实验中所用的各种缓冲液如下:

[0072] (1) 包被缓冲液:0.05M、pH 9.6的碳酸盐缓冲液;

[0073] (2) 磷酸盐缓冲液PBS (pH 7.4):称量4.0g NaCl、0.1g KH_2PO_4 、1.48g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 用蒸馏水定容到500mL,浓度为0.01M、pH为7.4磷酸盐缓冲液;

[0074] (3) 样品稀释液PBSTG:由0.5mL吐温20、0.5g明胶和500mL浓度为0.1M、pH为7.4的PBS缓冲液混合得到;

[0075] (4) 终止缓冲液:2.0M的硫酸水溶液;

[0076] (5) 洗涤液:由NaCl、 KH_2PO_4 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、Tween-20和水组成;NaCl在洗涤液中的浓度为8.0g/L, KH_2PO_4 在洗涤液中的浓度为0.2g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 在洗涤液中的浓度为2.96g/L,Tween-20在洗涤液中体积百分含量为1:1000。

[0077] (一) 抗体抑制实验

[0078] 1、螺虫乙酯-OVA包被抗原溶液的配制

[0079] 将上述实施例1制备的稀释后的1mg/mL的螺虫乙酯-OVA抗原完全解冻后,用包被缓冲液按1:500、1:1000、1:2000、1:4000进行梯度稀释,得到不同浓度的螺虫乙酯-OVA的包被抗原溶液。

[0080] 2、螺虫乙酯标准品溶液的配制

[0081] (1) 称取10mg螺虫乙酯标样,充分溶解于10mL无水甲醇中,即得到1.0mg/mL螺虫乙酯标准品溶液;

[0082] (2) 用样品稀释液将上述步骤(1)的1.0mg/mL螺虫乙酯标准品溶液配成浓度为1000ng/mL的螺虫乙酯标准品溶液。

[0083] 3、螺虫乙酯-BSA抗血清稀释液的配制

[0084] 将上述步骤一制备的螺虫乙酯-BSA抗体用样品稀释液按1:1000、1:2000、1:4000、1:8000进行梯度稀释,得到螺虫乙酯-BSA抗血清稀释液。

[0085] 4、抗原、抗体的棋盘格实验

[0086] 包被:在96孔酶标板中每孔加入100 μL 步骤1制备得到的螺虫乙酯-OVA包被抗原溶液,37℃包被3小时,用洗涤液洗涤4次。

[0087] 封闭:称取5g脱脂奶粉,充分溶解于100mL样品稀释液中,即得到5%的封闭液。在96孔酶标板中每孔加入150 μL 封闭液,在37℃湿盒中封闭1h,弃封闭液,洗涤3次。

[0088] 竞争:零孔每孔加50 μL 样品稀释液,抑制孔每孔加入50 μL 步骤2制备得到的螺虫乙酯标准品溶液。将上述步骤3得到的螺虫乙酯-BSA抗血清稀释液(从 1×10^3 倍到 8×10^3 倍)加入酶标板中(50 μL /孔),置湿盒中37℃条件下30min,洗板4次。

[0089] 加酶标二抗:将羊抗鼠酶标二抗(IgG-HRP, Jackson公司, 产品目录号为79556) (0.1mg/mL) 稀释1000倍, 稀释液是0.01M, pH为7.4的PBSTG, 每孔加100 μ L, 置湿盒中37 $^{\circ}$ C条件下30min, 洗板4次。

[0090] 显色:将单组分TMB显色液加入酶标板中, 每孔100 μ L。避光显色15min。

[0091] 终止:每孔加入50 μ L终止缓冲液, 用酶标仪450nm处测定各孔的OD值。

[0092] 效价的定义为零孔OD值为1时的血清稀释倍数。

[0093] 结果如表1所示。

[0094] 表1、抗螺虫乙酯小鼠的血清效价检测

[0095] (单组分TMB显色液室温显色15min, 1000ng标样抑制)

血清	1×10^3		2×10^3		4×10^3		8×10^3	
抗原	C	I	C	I	C	I	C	I
[0096] 1×10^3	3.138	1.552	2.824	1.155	2.470	0.613	2.177	0.451
2×10^3	3.027	1.377	2.791	0.764	2.257	0.433	2.076	0.371
4×10^3	2.894	0.789	2.583	0.548	2.398	0.283	2.092	0.254
8×10^3	2.600	0.516	2.206	0.258	2.131	0.197	1.801	0.149

[0097] 注:I表示酶标板中的抑制孔,C表示酶标板中的对照孔。

[0098] 结果说明上述实施例2制备的螺虫乙酯-BSA可以作为免疫原制备出检测螺虫乙酯的抗体。

[0099] (二) 螺虫乙酯标准曲线的建立

[0100] 将上述制备的螺虫乙酯标准品溶液用样品稀释液分别稀释成如下不同的浓度: 1000ng/mL、500ng/mL、250ng/mL、125ng/mL、62.5ng/mL、31.25ng/mL、15.6ng/mL。

[0101] (1) 包被原的包被:将上述制备的螺虫乙酯-OVA抗原按照1:8000稀释后加入到酶标板中, 每孔100 μ L, 37 $^{\circ}$ C温育3小时; 倒去酶标板中的溶液, 用洗涤液洗板4次, 甩干;

[0102] (2) 在步骤(1)的酶标板中分别加入上述不同浓度的螺虫乙酯标准品溶液(实验孔), 每孔50 μ L, 对照孔中不添加螺虫乙酯标准品溶液而加入50 μ L样品稀释液;

[0103] (3) 分别向上述实验孔和对照孔中加入稀释倍数为1:8000的螺虫乙酯-BSA抗血清稀释液, 每孔50 μ L; 37 $^{\circ}$ C温育30分钟; 倒掉酶标板中的溶液, 用洗涤液洗板4次, 甩干;

[0104] (4) 在实验孔和对照孔中分别加入100 μ L稀释倍数为1:1000的IgG-HRP (Jackson公司, 产品目录号为79556) (0.1mg/mL), 37 $^{\circ}$ C温育30分钟; 用洗涤液洗板4次, 倒掉酶标板中的溶液, 甩干;

[0105] (5) 向实验孔和对照孔中分别加入100 μ L单组分TMB显色液, 避光显色15min, 再向每孔中加入50 μ L 2.0M的硫酸溶液终止反应;

[0106] (6) 在450nm下测定吸光值;

[0107] (7) 绘制标准曲线:以不同浓度 (ng/mL) 的螺虫乙酯标准品溶液作为X轴, 以吸光度值作为Y轴, 绘制标准曲线图。

[0108] 实验设3次重复, 取三次实验结果的平均值, 得到的标准曲线图如图1所示。结果表明, 其灵敏度 (IC₅₀) 为60.0ng/mL, 检测范围是17ng/mL-232ng/mL。说明上述实施例1制备的

螺虫乙酯-BSA作为抗原免疫小鼠得到的抗体具有很好的效果。

[0109] (三) 抗体特异性检测

[0110] 1、螺虫乙酯类似物标准品溶液的配制

[0111] 螺虫乙酯类似物标准品的配制

[0112] 参照步骤(一)中螺虫乙酯标准品的配制方法,制备螺螨酯、螺虫乙酯代谢产物(BYI08330-enol-glucoside、BYI08330-mono-hydroxy、BYI08330-enol和BYI08330-ketohydroxy)的标准样品。

[0113] 用样品稀释液将上述螺螨酯、螺虫乙酯代谢产物(BYI08330-enol-glucoside、BYI08330-mono-hydroxy、BYI08330-enol和BYI08330-ketohydroxy)分别稀释成如下浓度:20000ng/mL、10000ng/mL、5000ng/mL、2500ng/mL、1250ng/mL、625ng/mL、312.5ng/mL。

[0114] 2、建立标准曲线,测定抑制中浓度IC₅₀(抑制率达到50%的标样浓度值)。

[0115] 标准曲线的建立方法与上述螺虫乙酯标准曲线的建立方法相同。

[0116] 交叉反应率(%) = (螺虫乙酯IC₅₀) / (螺虫乙酯类似化合物IC₅₀) × 100%。

[0117] 实验设3次重复,取三次实验结果的平均值,结果如表2所示。

[0118] 表2、由螺虫乙酯-BSA制备的抗体的特异性检测

[0119]

分析物	IC ₅₀ (ng/mL)	交叉反应率(%)
螺虫乙酯	60.0	100
BYI08330-enol	82.3	72.9
BYI08330-enol-glucoside	393	15.3
BYI08330-mono-hydroxy	>20000	-
BYI08330-ketohydroxy	>20000	-
螺螨酯	>20000	-

[0120] 结果表明,上述由螺虫乙酯-BSA制备得到的抗体不仅能识别螺虫乙酯,同时能识别螺虫乙酯的代谢物BYI08330-enol和BYI08330-enol-glucoside,但与其类似物螺螨酯交叉反应率很小,说明用螺虫乙酯-BSA制备的抗体对螺虫乙酯具有很好的特异性。

[0121] 本领域的普通技术人员将会意识到,这里所述的实施例是为了帮助读者理解本发明的实施方法,应被理解为本发明的保护范围并不局限于这样的特别陈述和实施例。本领域的普通技术人员可以根据本发明公开的这些技术启示做出各种不脱离本发明实质的其它各种具体变形和组合,这些变形和组合仍然在本发明的保护范围内。

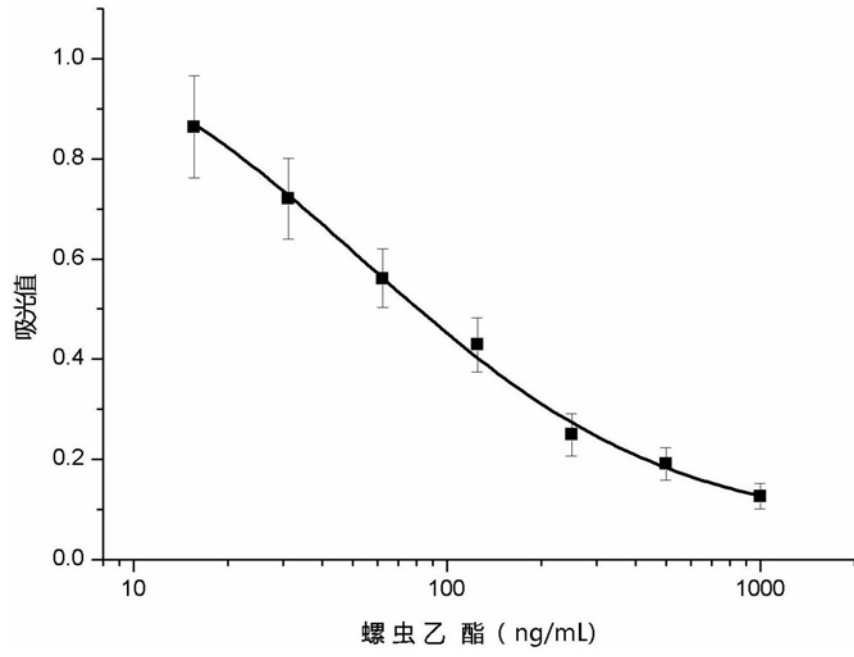


图1

专利名称(译)	螺虫乙酯抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN108484752A	公开(公告)日	2018-09-04
申请号	CN201810570441.3	申请日	2018-06-05
[标]申请(专利权)人(译)	西南大学		
申请(专利权)人(译)	西南大学		
当前申请(专利权)人(译)	西南大学		
[标]发明人	崔永亮 焦必宁 叶玉凤 赵其阳 张耀海 陈爱华 何悦 王成秋		
发明人	崔永亮 焦必宁 叶玉凤 赵其阳 张耀海 陈爱华 何悦 王成秋		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K19/00 G01N33/5308		
代理人(译)	李鹏		
其他公开文献	CN108484752B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及化合物制备与应用技术领域，特别涉及一种螺虫乙酯抗原及其制备方法与应用，结构通式X为CH₂、CO基团中的一种，n为0-6的整数；Protein表示载体蛋白，所述载体蛋白选自牛血清蛋白、卵清蛋白和血蓝蛋白中至少一种。是螺虫乙酯与载体蛋白通过酰胺键连接形成的偶联物；所述酰胺键是式C上的羧基通过活泼酯与载体蛋白上的氨基形成的；制备用于检测样品中螺虫乙酯的酶联免疫试剂盒、螺虫乙酯的发光免疫试剂盒或免疫亲和色谱柱中的应用。该方法能够方便、快捷地获得螺虫乙酯抗原，合成步骤简洁明了、合成成本低，效果好。

