

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510110967.6

[51] Int. Cl.

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/77 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07C 235/34 (2006.01)

C07C 231/02 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 5 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 1314707C

[22] 申请日 2005.11.30

[21] 申请号 200510110967.6

[73] 专利权人 东华大学

地址 200051 上海市延安西路 1882 号

[72] 发明人 余宇燕 庄惠生

[56] 参考文献

农药人工抗原的合成研究进展 周思祥等,
农药,第 44 卷第 8 期 2005

水和废水中 2,4-二氯酚、2,4-二氯酚、2,
4,6-三氯酚的测定 王逸虹等,环境监测管
理与技术,第 7 卷第 3 期 1995

审查员 唐 慧

[74] 专利代理机构 上海新天专利代理有限公司

代理人 邬震中

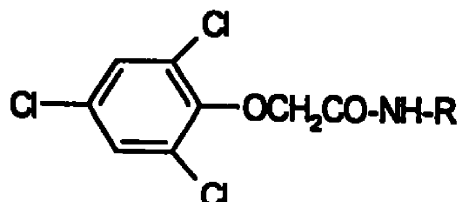
权利要求书 2 页 说明书 12 页

[54] 发明名称

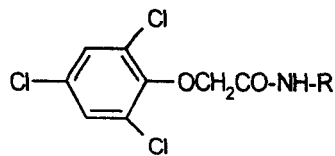
2,4,6-三氯酚人工抗原、制备方法及其用途

[57] 摘要

本发明涉及一种 2,4,6-三氯酚人工抗原、制备方法及其用途。其具有如下的结构式:其中, R = BSA 或 OVA, BSA 是牛血清白蛋白, OVA 是卵清蛋白。系由半抗原半抗原 2,4,6-三氯苯氧乙酸经过活化酯法或者混合酸酐法合成。该抗原可用于制备 2,4,6-三氯酚抗体、2,4,6-三氯酚间接竞争荧光免疫方法的建立或水环境中残留 2,4,6-三氯酚的检测。本发明的抗体实用性强、稳定性好;制备方法简便可行、成本低廉和容易工业化规模生产。



1. 一种 2,4,6-三氯酚人工抗原，其具有如下的结构式：

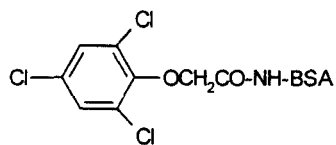


其中，R=BSA 或 OVA，BSA 是牛血清白蛋白，OVA 是卵清蛋白。

2. 如权利要求 1 所述的一种 2,4,6-三氯酚人工抗原的制备方法，其特征在于采用下述二种方法分别获得：

(1) 活化酯法合成免疫原，步骤如下：

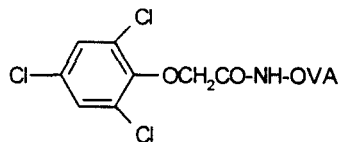
在有机溶剂和室温下中，半抗原 2,4,6-三氯酚苯氧乙酸、N-羟基琥珀酰亚胺 NHS 与 N,N-二环己基碳二亚胺反应 6~12h，4°C 保温 4~10 小时，离心分出上清液；将上层的活化酯液加入到牛血清白蛋白的 pH9.6 的碳酸盐缓冲溶液中，4°C 反应 2~6h；然后用蒸馏水透析或 pH6.8~7.4 磷酸盐缓冲溶液透析 5 天；离心分出上清液，即得免疫原；所述的 2,4,6-三氯酚苯氧乙酸、N-羟基琥珀酰亚胺、N,N-二环己基碳二亚胺和牛血清白蛋白的摩尔比是 1：2~4：2~4：0.01~0.05，所述的有机溶剂是 N,N-二甲基甲酰胺



免疫原结构式为：；或

(2) 混合酸酐法合成包被原，步骤如下：

在有机溶剂中，半抗原 2,4,6-三氯苯氧乙酸、正丁胺与氯甲酸异丁酯室温搅拌反应 2~4h；另取含有卵清蛋白的 pH9.6 的碳酸钠缓冲溶液和上述反应液在 4°C 反应 1~3h；然后用蒸馏水透析或 pH6.8~7.4 磷酸盐缓冲溶液 PBS 透析 5 天；离心得上清液，即得包被原；所述的半抗原 2,4,6-三氯苯氧乙酸、正丁胺、氯甲酸异丁酯和卵清蛋白的摩尔比为 1：2~4：1.5~3：0.01~0.05；



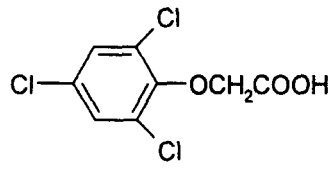
其中，包被原结构式为：，其中，BSA 和 OVA 如权利要求 1 所述。

3.如权利要求2所述的一种2,4,6-三氯酚人工抗原的制备方法,其特征是有机溶剂是N,N-二甲基甲酰胺或二甲亚砜。

4.如权利要求2所述的一种2,4,6-三氯酚人工抗原的制备方法,其特征在于所述的免疫原或包被原在等量甘油-20°C下保存,或-20°C冻干保存。

5.如权利要求2所述的一种2,4,6-三氯酚人工抗原的制备方法,其特征在于(1)所述的半抗原2,4,6-三氯酚苯氧乙酸由下述方法制得:

在水溶液中和催化剂聚乙二醇-6000存在下,含有2,4,6-三氯酚的20~50%氢氧化钠或钾的水溶液和氯乙酸钠溶液,70~90°C加热反应2~3h,用稀碱调节控制反应液pH9~10,于80~90°C保温2~5h,反应完毕,加少量活性炭脱色,煮沸5~10min,趁热过滤,滤液用1~2M盐酸调pH1~2,析出白色沉淀,过滤出沉淀并用水洗涤,离心干燥,得粗品,将粗品用醋酸:水(1:2~1:4)加热溶解,脱色后过滤冷却重结晶,得成品,产率在80%左右,



6.一种如权利要求1所述的2,4,6-三氯酚人工抗原的用途,其特征在于用于制备2,4,6-三氯酚抗体、2,4,6-三氯酚的间接竞争荧光免疫方法的试剂、环境中水体和土壤中残留2,4,6-三氯酚的检测。

7.如权利要求6所述的一种2,4,6-三氯酚人工抗原的用途,其特征在于所述的制备2,4,6-三氯酚抗体,步骤如下:

(1)实验选取成年的雄性新西兰白兔每组两只,体重约2~2.5Kg,饲养于标准实验动物房,用0.9%生理盐水或磷酸盐缓冲液将免疫原稀至1mg/ml,首次免疫加入等量弗氏完全佐剂,充分乳化,形成油包水状态,注射免疫;首免后间隔四周,以后每隔二周用由弗氏不完全佐剂乳化的免疫原,于兔背部、颈部皮下多点及腿部注射加强免疫,免疫剂量为每公斤兔体重2mg;从第三次开始,每次免疫后7天,于兔耳缘静脉采少量血,分离血清,测定抗体效价;当达到一定效价后,颈动脉取血,分离出血清,于-20°C保存;

(2)抗体的纯化采用辛酸-饱和硫酸铵二步盐析法、经葡聚糖凝胶柱除盐和二乙基氨基乙基纤维素柱反相吸附纯化血清得到纯度较高的免疫球蛋白IgG。

2,4,6-三氯酚人工抗原、制备方法及其用途

技术领域

本发明是一种 2,4,6-三氯酚人工抗原、制备方法及其用途，属于小分子有机污染物的免疫化学及残留分析生物技术领域。涉及有机合成、免疫化学、生物化学及理化测试技术等。特别涉及环境激素类物质 2,4,6-三氯酚半抗原、人工全抗原的设计合成和免疫动物特异性抗体的制备方法，及建立可应用于检测水体和土壤中残留 2,4,6-三氯酚的荧光免疫分析技术。

背景技术

环境激素是环境中的激素类似物，它能通过与激素受体结合，干扰正常的生理代谢、内分泌和生殖机能，引起种种负面的生物学效应。近 70 年来，随着工业的发展，大量的环境激素在制药、塑料制品添加剂生产、除草剂的使用和垃圾处理等过程中不断的释放，对生态环境造成了巨大的危害。环境激素问题已成为继臭氧层、地球气候变暖之后全球的第三大环境问题，成为环境科学研究领域中的热门课题。其主要研究范围是环境激素的筛选与调查、作用机制、监测方法、对人和动物的危害等。目前专家们已经筛选出 70 余种化学品为环境激素类物质，多用来制造人们日常用的涂料、洗衣剂、树脂、可塑剂等。其中酚类化合物中列入环境激素类物质的有烷基酚、氯酚及双酚 A 等。[姜保玺,李文兰. 环境荷尔蒙的研究现状及其趋势. 世界环境, 2002, 3:7-10]

由于环境激素在环境污染中具有“低剂量，长时间”的特性，因此，对环境激素类物质 2,4,6-三氯酚直接监测往往比较困难[齐文启, 孙宗光. 痕量有机污染物的监测. 北京: 化学工业出版社, 2002]。目前对分子量小于 1000 道尔顿的小分子类有毒污染物如环境激素类物质，传统的分析方法主要是色谱法，包括气相色谱、高效液相色谱法、色谱联用法（GC-MS、HPLC-MS）等。但这类分析方法体系中将待测物从样品中分离提取并去除共存杂质干扰的前处理过程十分复杂，需经提取、净化、浓缩和衍生等复杂的样品前处理，对实验室和仪器化程度要求高。

并且操作费时,分析成本昂贵,不利于推广使用,难以适应大量样本和现场检测的要求。因而寻求一种快速、简便、灵敏并且经济实用的分析方法成为当前研究的方向。

免疫分析法是一种形式特殊的试剂分析法,它的起点是抗体成为分析试剂,利用抗体与抗原的特异性结合作用来选择性识别和测定可以作为抗体或抗原的待测物。免疫分析法不受周围环境和样本内干扰物质的影响,具有灵敏度高,选择性好、稳定性强及简单方便经济的优点,在国内外的实际应用取得的成就不可低估,可进行百余项微量物质的检测,产生了良好的社会效益和经济效益[王钦富.免疫学及免疫学检验实验技术.北京:中国医药科技出版社,1995]。

早在上个世纪三十年代,2,4,6-三氯酚就广泛应用于杀虫剂、杀菌剂和防腐剂。它也是生产苯氧酸类杀虫剂和其它化学品的中间体,是水体中有机氯降解的副产物。在印染和造纸行业中也广泛应用,因而其大量的使用污染了土壤和水源,造成环境污染。由于2,4,6-三氯酚具有致癌、致畸和致突变的潜在毒性,已被中国、欧盟和美国环保署列入环境优先控制污染物名单[I.Intergrated-Risk-Information-System (IRIS electronic database). Cincinnati. OH. USA, 2001][M. Fielding, D.Barceló, A. Helweg. S.Galassi, L.Tortensson, P.Van Zonen, R.Wolter, G.Angeletti, Pesticides in Ground and Drinking Water, European Commission, Brussels, 1992]。

2,4,6-三氯酚带来的环境影响及它对生物体的潜在毒性已引起人们的广泛关注。根据世界卫生组织和美国环境保护局给出其环境健康标准,2,4,6-三氯酚在水体中允许最大浓度为 $5\mu\text{g/l}$,空气中嗅觉阈浓度在 $0.001\sim 0.0016\text{mg/m}^3$ [World Health Organization. Environmental health criteria for chlorophenols. Supplement. Draft. July 31, 1986][U.S. Environmental Protection Agency. Ambient water quality criteria for chlorinated phenols. EPA-440 / 5-80-032. NTIS Publ. No. PB81-117434. Office of Water Regulations and Standard(1980)]。我国执行的《地表水环境质量标准》(GHZB1-1999)中规定2,4,6-三氯酚的限定标准值为 0.0012mg/L [《地表水环境质量标准》(GHZB1-1999), 2001]。

现代制备技术已获得较高纯度($>99\%$)的2,4,6-三氯酚[草枯醚中间体2,4,6-三氯酚制备技术. 精细化工中间体.1980.2:296],而有关2,4,6-三氯酚免疫分析的

研究, 国内外有见报道较少, Roger Glave等人通过免疫兔获得抗2,4,6-三氯酚抗血清, 运用酶联免疫分析法(ELISA)对检测条件优化, 但并未运用于具体环境检测中[Roger Glave, Franciso Sanchez-Baeze, Franciso Camps, M. Pilar Marco, Indirect competitive immunoassay for trichlorophenol determination rational evaluation of the competitor heterology effect, *Analytica Chimica Acta*, 2002, 452: 191-206][Patricia Noguera,^a Angel Maquieira,^a Rosa Puchades,^{*a} Ernesto Brunet,^b Ma Mar Carramolin^b and Juan Carlos Rodri'guez-Ubis. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for screening contamination by chlorophenols in environmental waters. *J. Environ. Monit.*, 2002(4):442-448]。而对于荧光免疫分析法(FIA)国内外还未见报道。荧光免疫分析技术始创于40年代初, 其基本原理是将特异性的抗体或抗原标记上荧光基团使之成为特异性的试剂, 与相应的抗原或抗体结合, 形成抗原抗体复合物, 再用荧光检测仪检测荧光信号。此法将免疫学反应的特异性和荧光技术的敏感性相结合, 比ELISA法具有更高的灵敏度与更低的检测限。

本发明利用制备的2,4,6-三氯酚人工抗原免疫动物获得具有有效价高、特异性好的抗2,4,6-三氯酚多克隆抗体。所选用方法简便易行。

发明内容

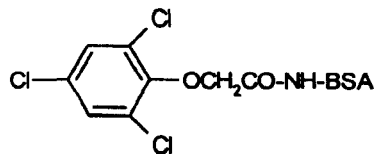
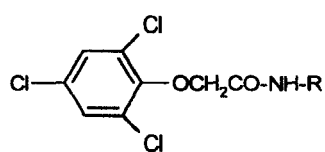
本发明目的是提供一种2,4,6-三氯酚人工抗原。

本发明的目的还提供一种上述2,4,6-三氯酚人工抗原的制备方法。

本发明的另一目的是提供一种上述2,4,6-三氯酚人工抗原的用途。可以用于制备特异性抗体和检测水体和土壤中残留的环境激素类物质2,4,6-三氯酚。

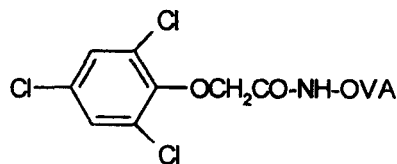
首先根据小分子免疫化学基本原理设计合成小分子目标分析物半抗原, 通过适当的方法与载体蛋白质偶联合成了人工全抗原, 以纯化后的全抗原免疫动物获得了小分子分析物特异性抗体。利用抗原抗体的特异性免疫学反应从而定性定量地检测样品中痕量小分子目标分析物, 其选择性决定于免疫学反应的特异性, 其灵敏度取决于抗体的亲合性。因此该技术可用于快速检测水体和土壤中残留的环境激素类物质2,4,6-三氯酚。该技术的关键是半抗原的分子设计、人工抗原的合成及抗体的制备。

本发明的 2,4,6-三氯酚人工抗原具有如下的结构式：



进一步的描述可以是

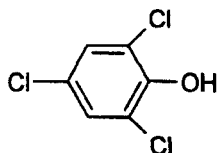
或



，其中，R=BSA 或 OVA，BSA 是牛血清白蛋白，

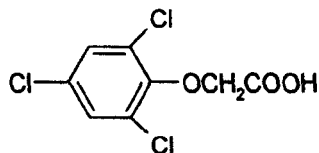
OVA 是卵清蛋白。

2,4,6-三氯酚的分子结构式为：



其结构单元一部分是苯环，另一部分是苯环上的取代基羟基和卤基。从免疫学角度上看，苯环空间结构相对较大，可作为抗原决定簇。而酚羟基与卤基相比，具有较高的化学活性，可作为与载体蛋白连接的臂。因而在合成半抗原时，保留苯基，而对苯环上的羟基进行修饰，形成与蛋白质偶联的臂。因此本专利在设计半抗原时，采用具有活性的酚羟基与氯乙酸反应，引入结构不同的活性侧链的合成方法来合成半抗原，这样既可保持 2,4,6-三氯酚半抗原与 2,4,6-三氯酚在结构上的相似性，又可使半抗原具有与载体蛋白偶联的合适结构。

本发明合成的 2,4,6-三氯酚半抗原的分子结构为：



化学名称：2,4,6-三氯苯氧乙酸，分子量为 255.5。

2,4,6-三氯酚半抗原合成的技术方案是：

用碱性溶液溶解氯乙酸，用强碱溶液溶解 2,4,6-三氯酚，加入少量催化剂聚乙二醇-6000，在 60~100°C 下回流搅拌反应 4~6h。然后冷却、过滤、洗涤、干

燥后即得粗产品，粗产品经过重结晶得成品。合成步骤如下：

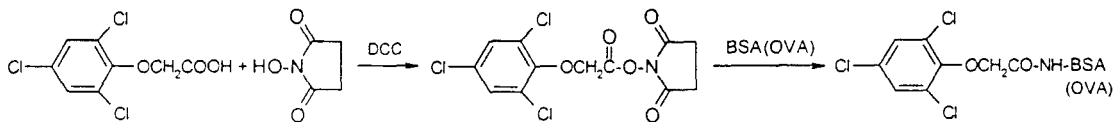
将一定量的氯乙酸溶于 5~10ml 水中，搅拌下慢慢加入 2~3g 碳酸钠粉末，至 pH7~8，取一定量的 2,4,6-三氯酚加入适量的水和 5ml 20~50%氢氧化钠（或氢氧化钾），使之完全溶解，调节 pH7~8，然后搅拌下加入上述氯乙酸钠溶液，并加入少量催化剂聚乙二醇-6000(0.01~0.05g)，加完保持 pH7~8，继续加热 70~90°C 反应 2~3h，同时注意控制反应液 pH9~10（用稀碱调节），于 80~90°C 保温 2~5h，反应完毕，加少量活性炭脱色，煮沸 5~10min，趁热过滤，滤液用 1~2M 盐酸调 pH1~2，析出白色沉淀，过滤出沉淀并用水洗涤，离心干燥，得粗品。将粗品用醋酸：水（1：2~1：4）加热溶解，脱色后过滤冷却重结晶，得成品，产率在 80% 左右。

2,4,6-三氯酚人工抗原合成的技术方案是：

(1)活化酯法合成免疫原，步骤如下：

以酰胺基 CONH 为桥，将半抗原通过活化酯法，分别连接到载体蛋白质（Protein）上，半抗原上的羧基先与 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）反应生成一个中间物，然后再与蛋白质上的氨基偶联，形成半抗原-蛋白质的偶联物。

反应式如下：



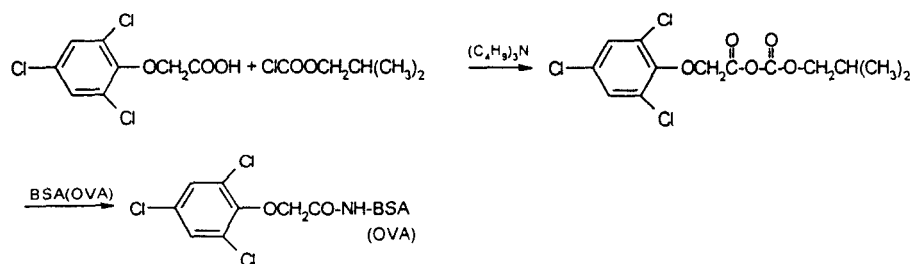
将溶有 NHS 和 DCC 的有机溶剂逐滴加入溶有半抗原 2,4,6-三氯苯氧乙酸的有机溶剂中，室温搅拌反应 6~12 小时，4°C 过夜，离心分出上清液。将上层的活化酯液加入到溶于缓冲溶液的蛋白质溶液中，4°C 反应 2~6h。所述的半抗原、NHS、DCC、蛋白质四者摩尔比分别为 1：2~4；2~4；0.01~0.05。

反应完毕，将溶液装入透析袋，用蒸馏水透析或 pH6.8~7.4 磷酸盐缓冲溶液 PBS 透析 5d。透析后离心分出上清液，即得免疫原 TCP-BSA，加入等量甘油-20°C 下冷冻保存，或-20°C 冻干保存。

(2)混合酸酐法合成包被原，步骤如下：

半抗原的羧基在正丁胺的存在下，与氯甲酸异丁酯反应，形成混合酸酐中间体，再与蛋白质的氨基反应，形成半抗原-蛋白质偶联物。

反应式如下：



取一定量的溶有半抗原 2,4,6-三氯苯氧乙酸有机溶剂，顺次加入正丁胺与氯甲酸异丁酯，室温搅拌反应 2~4h。将上述反应液逐滴入用缓冲溶液溶解的蛋白质溶液中，4°C 反应 1~3h。按半抗原、正丁胺、氯甲酸异丁酯、蛋白质四者摩尔比分别为 1: 2~4: 1.5~3: 0.01~0.05。

反应完毕，将溶液装入透析袋，用蒸馏水透析或 pH6.8~7.4 磷酸盐缓冲溶液 PBS 透析 5d。透析后离心得上清液，即得包被原 DCP-蛋白质偶联物，经过柱提纯后，加入等量甘油-20°C 下保存，或-20°C 冻干保存。

所述的有机溶剂是 N,N-二甲基甲酰胺 DMF 或二甲亚砜 DMSO。

利用上述的半抗原与蛋白质合成的 2,4,6-三氯酚人工抗原，其结构式如前所述。

利用上述的 2,4,6-三氯酚人工抗原，免疫动物制备的 2,4,6-三氯酚特异性抗体，它是能与 2,4,6-三氯酚发生特异性免疫反应的免疫球蛋白 IgG。

上述的 2,4,6-三氯酚特异性抗体用于检测水体及土壤中 2,4,6-三氯酚的残留量。

本发明通过设计合成 2,4,6-三氯酚半抗原和人工抗原，经免疫动物产生特异性抗体，以抗原抗体特异性免疫学反应为基础，并引入标记物来放大显示这一反应，可用于实际样品中 2,4,6-三氯酚残留量的测定。此法灵敏度高、特异性强，样品前处理简单，便于进行现场监测。

发明的特点

本发明提供一种 2,4,6-三氯酚半抗原的合成路线。本发明提供一种 2,4,6-三氯酚人工抗原的合成方法。本发明还提供一种具有较高特异性抗 2,4,6-三氯酚抗体的简便可行的制备方法。本发明提供一种 2,4,6-三氯酚抗体的荧光免疫检测和分析技术。

本发明还具有以下优点和积极效果：

(1) 抗体实用性强：2,4,6-三氯酚抗体制备技术具有重要的使用价值和实际意义。制备的特异性好、效价高的抗体，以抗原抗体免疫学反应为基础可用于样品测定。此抗体及其制备方法为免疫测定 2,4,6-三氯酚提供保障，也为环境激素 2,4,6-三氯酚快速检测试剂盒的研制解决了一个技术难点。

(2) 抗体稳定性好：此法制备的 2,4,6-三氯酚抗体具有较好的稳定性。

(3) 抗体制备技术简便可行：抗体的整个制备过程无需特别的仪器设备，成本低廉，容易工业化规模生产。

本发明的其它的目的、特点和优点可从优选实验方案的描述中得到证实。

具体实施例

实施例 1 2,4,6-三氯酚半抗原的合成与鉴定

1 2,4,6-三氯酚半抗原的合成

将 4.5g (47.6mmol) 氯乙酸溶于 7.5ml 水中，搅拌下慢慢加入 2.55g 碳酸钠粉末，溶液 pH7.5。取 6.7g (38.1mmol) 2,4,6-三氯酚及 10ml 水、5ml 25%氢氧化钠，使之完全溶解，溶液 pH8，然后搅拌下加入上述氯乙酸钠溶液，加完保持 pH7~8 (用稀碱调节)，加入 0.08g 催化剂聚乙二醇-6000，继续加热反应 2h，同时注意控制反应液 pH9~10 (用稀碱调节)，于 80~90°C 保温 3h，反应完毕，加少量活性炭脱色，煮沸 10min，趁热过滤，滤液用盐酸调 pH1，析出白色沉淀，过滤出沉淀并用水洗涤，离心干燥，得粗品。将粗品用醋酸：水 (1：2) 加热溶解，脱色后过滤冷却重结晶，得成品，产率约为 81%。

2 2,4,6-三氯酚半抗原的鉴定

取上述合成的产物经红外光谱 IR 及核磁共振谱 $^1\text{H-NMR}$ 测定分子结构。IR (KBr 压片) cm^{-1} : 3425(w, OH), 1765(w, C=O), 1697(s, 羧基 COOH), 1423(s, CH_2), 1251(m, C-O), 1079(m, C-O-C), 930(m, COOH), $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm): 7.35(2H, ArH), 4.47(2H, CH_2)。从以上分析综合可知，所合成的产物为目标物。

实施例 2 2,4,6-三氯酚人工抗原的合成与鉴定

将半抗原 2,4,6-三氯酚苯氧乙酸，分别采用活化酯法和混合酸酐法连接到

BSA 和 OVA 上，合成人工抗原（免疫原和包被原），具体方法为：

2.1 免疫原的合成

称取 0.2mmol 51mg 半抗原 2,4,6-三氯酚苯氧乙酸溶于 200 μ l DMF 中，将 19.4mg NHS 与 34.2mg DCC 溶于 300 μ l DMF，逐滴加入半抗原溶液中，室温搅拌反应 8h，4 $^{\circ}$ C 过夜，离心分出上清液。将上层的活化酯液加入到 60mg BSA 溶于 5ml 碳酸盐缓冲溶液（0.05M, pH9.6），4 $^{\circ}$ C 反应 4h。反应完毕，将溶液装入透析袋，用蒸馏水透析 2d，pH7.0 磷酸盐缓冲溶液 PBS 透析 3d。透析后离心分出上清液，即得免疫原 TCP-BSA，加入等量甘油-20 $^{\circ}$ C 下冷冻保存。

2.2 包被原的合成

称取 0.2mmol 51mg 半抗原 2,4,6-三氯苯氧乙酸溶于 200 μ l DMF 中，顺次加入 20 μ l 正丁胺与 20 μ l 氯甲酸异丁酯，室温搅拌反应 1h。另取 40mg OVA 溶于 3ml 碳酸钠缓冲溶液（0.05M, pH9.6），逐滴加上述反应液 100 μ l，4 $^{\circ}$ C 反应 2h。反应完毕，将溶液装入透析袋，用蒸馏水透析 2d，pH7.0 PBS 透析 3d。透析后离心得上清液，即得包被原 TCP-OVA，加入等量甘油 4 $^{\circ}$ C 下保存。

2.3 人工抗原的鉴定

采用全波长紫外分光光度计对半抗原、载体蛋白及偶联物进行扫描，根据吸收峰确定偶联是否成功。结果显示半抗原在 324nm 处有最大吸收峰，蛋白质 BSA 和 OVA 在 280nm 处有最大吸收峰，而偶联物免疫原特征吸收峰为 275nm 和 312nm，包被原特征吸收峰为 276nm 和 308nm，偶联物的吸收峰与蛋白质、半抗原比较都发生了位移。偶联物具备有半抗原的吸收特征也说明人工抗原的合成是成功的。根据半抗原-结合物在紫外吸收区域的吸收约等于游离蛋白和半抗原的吸光值的简单加和的特点，通过三者 280nm 的吸光值按下列公式计算结合比：

$$\text{结合比} = [\epsilon_{280\text{抗原}} - \epsilon_{280\text{蛋白质}}] / \epsilon_{280\text{半抗原}}$$

经过计算，结合比如下：免疫原 TCP-BSA 结合比为 17:1、包被原 TCP-OVA 结合比为 11:1。本文合成的 2,4,6-三氯酚人工抗原结合比值都在文献所建议的范围之内，证明了所合成的 2,4,6-三氯酚人工抗原比较理想。

实施例 3 2,4,6-三氯酚抗体的制备及纯化

3.1 抗血清的制备

选取成年的雄性新西兰白兔每组两只（编号 I 和 II），体重约 2~2.5Kg，饲养于标准实验动物房，观察一周后免疫（由上海交通大学农学院动物房饲养）。

将免疫原慢慢解冻，用 0.9%生理盐水（或磷酸盐缓冲溶液）稀至 1mg/ml，按免疫剂量吸入 5ml 消毒注射器中，首次免疫加入等量弗氏完全佐剂(CFA)，用聚氟乙烯塑胶管连接另一支 5ml 注射器，对推至充分乳化，形成油包水（W/O）状态，按免疫方案注射免疫。

首次免疫采用由等量弗氏完全佐剂乳化的免疫原，于兔背部皮内多点注射免疫。首免后间隔四周，以后每隔二周用由弗氏不完全佐剂乳化的免疫原，于兔背部、颈部皮下多点及腿部注射加强免疫，免疫剂量为每公斤兔体重 2mg。从第三次开始，每次免疫后 7 天，于兔耳缘静脉采少量血，分离血清，测定抗体效价。当达到一定效价后，采全血。本实验采用兔颈动脉取血法，每只兔子可采血约 60ml 左右，采血后，收集在 100ml 的三角锥形瓶中，待血液凝固后，用针头将三角瓶边缘的血块与离心管分离，置于 37°C 温箱中 30min，再放于 4°C 冰箱 3~4h，等血块收缩后，用吸管将血清吸入离心管中，以 4000rpm 离心 15min，分离出血清。于 -20°C 保存。I 号兔得血清 20ml，II 号兔得血清 25ml。

3.2 抗体效价测定

将免疫原按制定的免疫方案免疫了两只兔子。从加强免疫第三次开始，在每次免疫后第 7 天于兔耳缘静脉采少量血，血清经适当稀释后，用琼脂双向扩散法和荧光免疫法测定抗体效价。待第四次免疫后，兔子获得了较高的效价，琼脂双向扩散法测得的效价分别为 1:32 和 1:64，荧光免疫法测得效价分别为 1:25600 和 1:51200（抗血清荧光值/阴性对照荧光值>2）。

3.3 抗体的纯化和鉴定

抗体的纯化采用辛酸-饱和硫酸铵二步盐析法、经葡聚糖凝胶柱除盐和二乙基氨基乙基纤维素柱反相吸附纯化血清，纯化抗体冻干后于 -20°C 保存。辛酸在偏酸性的条件下能将血清中除免疫球蛋白 IgG 外的蛋白质都沉淀下来，上清液中只有 IgG。

实施例 4 2.4.6-三氯酚间接竞争荧光免疫方法（FIA）的建立

4.1 荧光免疫方法的原理

间接竞争荧光免疫分析法是将小分子的氯酚类环境激素与大分子载体偶联制备的复合物作为包被抗原吸附于固相载体（96孔荧光酶标板）上，制成固相抗原，然后加入待测氯酚，固相抗原中的氯酚和待测氯酚与抗体进行竞争结合反应，若待测氯酚含量越多，被结合在固相抗体原上的抗体就越少，反之结合在固相抗原的抗体则多，反应后加入荧光标记的二抗（只能与结合在固相抗原上的抗体结合），最后洗去游离未反应的待测物、2,4,6-三氯酚抗体和二抗，置于荧光酶标仪上读数。当抗体量一定时，加入的待测氯酚量越多，与固相抗原结合的抗体就越少，荧光强度就减弱，抑制率增高，反之，则荧光强度增大，抑制率增高，因此可以根据已知量的氯酚标准曲线和待测样品的抑制率，推算出待测氯酚的浓度。

4.2 抗原与抗体最佳工作浓度的确定

用方阵试验分别对间接竞争 FIA 法中抗原及抗体工作浓度进行筛选和认定。在同一包被液浓度下，随着抗体浓度的稀释，所得的荧光强度呈下降，同样在同一抗体浓度下，随着包被液浓度的下降，所得的荧光强度也呈下降。以抑制灵敏度高，线性好的试验组合为最佳工作浓度。结果判定以在荧光酶标仪读取的各孔荧光值 F 中，以 ΔF 读数较大，而抗原抗体用量较少的为抗原抗体的工作浓度。选择包被抗原浓度为 $2\mu\text{g/ml}$ ，抗体浓度为 $3.5\mu\text{g/ml}$ 为最佳工作浓度，

4.3 标准曲线的绘制

根据方阵试验结果，以空白吸收值最低，荧光强度较好，2,4,6-三氯酚对抗原抗体结合反应抑制率高，线性关系好的试验条件组合建立标准曲线。其步骤如下：

- (1)包被：以 0.05mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液将包被抗原稀释至工作浓度， $100\mu\text{L}$ /孔加至荧光酶标板， 4°C 过夜。
- (2)封闭：将包被好的板取出，待其恢复至室温，PBST 洗涤 3 次。加入 1%OVA 封闭， $150\mu\text{L}$ /孔， 37°C 温育 0.5h。
- (3)加样：将封闭好的板取出，待其恢复至室温，PBST 洗涤 3 次。每孔依次加入 $50\mu\text{L}$ 经 PBST 稀释的系列浓度的 2,4,6-三氯酚标准溶液和 $50\mu\text{L}$ 经 PBST 稀释的抗体，对照孔加入 $50\mu\text{L}$ PBST， 37°C 温育 1h。
- (4)二抗反应：将温育好的板取出，待其恢复至室温，PBST 洗涤 3 次。每孔加入

100 μ L PBST 稀释羊抗兔 FITC-IgG (1:1000), 37°C 温育 1h。

(5)测定: 将温育好的板取出, PBST 洗涤 5 次。用荧光酶标仪读取荧光强度值 F, λ 设为 528nm。

(6)根据抑制率对 2,4,6-三氯酚浓度作图, 得到 2,4,6-三氯酚的标准曲线的回归方程, 进行相关分析, 并计算 IC₅₀ 和 IC₂₀。

FIA 法的标准曲线以抑制率 I 对 2,4,6-三氯酚的对数作图。抑制率的计算公式如下:

$$I\% = \frac{(F_{Max} - F_{Min}) - (F_S - F_{Min})}{(F_{Max} - F_{Min})} \times 100$$

I—抑制率, F_{Max}—不加氯酚样品时的吸光值, F_S—加氯酚样品时的荧光值, F_{Min}—空白对照孔的荧光值 (或阴性对照值孔的荧光值)

由上式可得 2,4,6-三氯酚各浓度的抑制率, 作图。结果表明, 当 2,4,6-三氯酚的浓度在 1~100 μ g/L 范围内, 抑制率 I 与 2,4,6-三氯酚的对数呈明显的线性关系, 其线性回归方程为 $I=27.16x + 20.42$, 相关系数 $r=0.9965$, 抑制中浓度 (以抑制率为 50% 表示) IC₅₀=12.3 μ g/L, 最低检测限 (以抑制率为 20% 表示) IC₂₀=0.96 μ g/L。

4.4 抗体的特异性

抗体的特异性即是指它和同特异性抗原结合的能力与抗原类似物结合能力的比较, 常以交叉反应率作为评价的标准。交叉反应越小, 则抗体的特异性越好。选取与 2,4,6-三氯酚结构相似的化合物五氯酚、2,4-二氯酚、2-氯酚、4-氯酚等与 2,4,6-三氯酚在相同条件下通过 FIA 试验进行交叉反应试验, 从而测定 2,4,6-三氯酚抗体的特异性。根据 2,4,6-三氯酚类似物的抑制曲线, 求出不同氯酚的抑制中浓度 IC₅₀, 根据下列公式计算出交叉反应率:

$$\text{交叉反应率}\% = \frac{IC_{50}\text{时}2,4,6\text{-三氯酚的浓度}}{IC_{50}\text{时}2,4,6\text{-三氯酚类似物的浓度}} \times 100$$

2,4,6-三氯酚抗体对五氯酚、2,4-二氯酚、2-氯酚、4-氯酚等的交叉反应率分别为 0.6%、13.8%、6.2%、4.9%。从而可知, 所制备的三种抗体的特异性较强。

5 样品的 FIA 快速测定

5.1 样品预处理

(1)水样：取河水、自来水及湖水经沉淀过滤后，用盐酸调节 pH6.8，分别添加不同浓度的 2,4,6-三氯酚标准溶液，用间接竞争 FIA 法进行加标回收测定，计算回收率。

(2)土壤样品：分别称取本地不同区域采集的土壤 10g 经 100 目过筛，置于 100mL 三角瓶中，用 30mL 10%乙醇浸渍过夜，过滤、浓缩后，用 PBS 定容至 10mL，供检测用。移取经过多次测定后的样品溶液，分别添加不同浓度的 2,4,6-三氯酚标准溶液，用间接竞争 FIA 法进行加标回收测定，计算回收率。

5.2 样品的测定

样品测定方法与标准曲线的操作相同，将经包被和封闭好的板每孔加入系列已知添加浓度的样品液 50 μ l，对照孔加入 100 μ l 抗体，37 $^{\circ}$ C 温育 1h 后，洗涤，余后步骤同前。经分析可知，该方法用于水样中 2,4,6-三氯酚残留的测定，回收率在 96.0~116.4%之间，变异系数范围在 2.45~9.64%之间。随着样品添加量的降低，回收率基本呈下降趋势。该方法用于土壤中 2,4,6-三氯酚残留的测定，回收率在 91.7~109.6%之间，变异系数范围在 2.63~11.82%之间。随着样品添加量的降低，回收率基本呈下降趋势。

实施例 5 包被抗原与抗体稳定性实验

快速检测法对于人工抗原和抗体在常温下的稳定程度有很高的要求，因此本发明进行了验证实验。把经包被、封闭、洗涤后的荧光酶标板直接倒置或用保鲜膜密封后倒置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存，定期测定贮存时间对 FIA 分析的影响。本发明合成的人工抗原具有较好的稳定性，在 4 $^{\circ}$ C 环境下可保存 6 个月不变性，-20 $^{\circ}$ C 冰箱中至少可保存 12 个月。

冻干抗体的稳定性实验结果表明在-20 $^{\circ}$ C 保存，其稳定性至少可保持 12 个月以上；在 4 $^{\circ}$ C 保存，其稳定性至少可保持 6 个月以上；在 0~25 $^{\circ}$ C 室温保存，其稳定性至少可保持 2 个月以上。可以满足快速检测要求。

尽管参考目前被认为是优选的实施方案，但是本发明并不受所公开的发明的限制。相反，在所受权利要求的精神和范围内，本发明包括各种改变和等同的方案。下面权利要求的范围给予最广泛地解释，以便包括所有这些改变和等同结构和功能。

专利名称(译)	2,4,6 - 三氯酚人工抗原、制备方法及其用途		
公开(公告)号	CN1314707C	公开(公告)日	2007-05-09
申请号	CN200510110967.6	申请日	2005-11-30
[标]申请(专利权)人(译)	东华大学		
申请(专利权)人(译)	东华大学		
当前申请(专利权)人(译)	东华大学		
[标]发明人	余宇燕 庄惠生		
发明人	余宇燕 庄惠生		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K16/00 C07C235/34 C07C231/02 G01N33/533		
其他公开文献	CN1775806A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种2,4,6-三氯酚人工抗原、制备方法及其用途。其具有如下的结构式：其中，R = BSA或OVA，BSA是牛血清白蛋白，OVA是卵清蛋白。系由半抗原半抗原2,4,6-三氯苯氧乙酸经过活化酯法或者混合酸酐法合成。该抗原可用于制备2,4,6-三氯酚抗体、2,4,6-三氯酚间接竞争荧光免疫方法的建立或水环境中残留2,4,6-三氯酚的检测。本发明的抗体实用性强、稳定性好；制备方法简便可行、成本低廉和容易工业化规模生产。

