



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102372776 B

(45) 授权公告日 2013.08.07

(21) 申请号 201110271143.2

(22) 申请日 2011.09.14

(73) 专利权人 王利兵

地址 410004 湖南省长沙市湘府中路 188 号
湖南出入境检验检疫局检验检疫技术
中心

专利权人 胥传来

陈秀金

(72) 发明人 王利兵 胥传来 陈秀金

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G07K 14/765 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101215247 A, 2008.07.09, 全文.

CN 101407458 A, 2009.04.15, 全文.

殷祥刚等. 含氰基类拟除虫菊酯农药残留免

疫检测方法研究进展. 《食品科学》. 2008, (第 9 期), 664-667.

郝晓蕾. 含氰基拟除虫菊酯类农药多残留免疫检测方法的研究. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库(工程科技 I 辑)》. 2010, B024-15.

审查员 孙婷婷

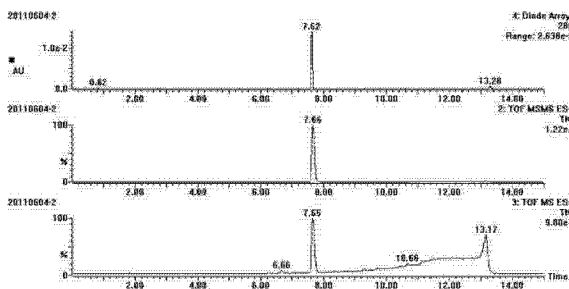
权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54) 发明名称

一种 II 类拟除虫菊酯人工抗原的合成方法

(57) 摘要

一种 II 类拟除虫菊酯人工抗原的合成方法, 属于生物化工技术领域。本发明以苯醚氰菊酯为原料, 采用高锰酸钾和高碘酸钠进行氧化, 得到人工半抗原, 采用活性酯法将半抗原与载体蛋白 BSA 相连, 用紫外分光光度法估算免疫原的偶联比。本方法成功地合成了 II 类拟除虫菊酯人工抗原, 合成步骤简单, 有效, 完全可以用于免疫学分析中, 为以后人们的研究提供了一种新型的人工抗原, 满足了国内对该研究的需要。



1. 一种 II 类拟除虫菊酯人工抗原的合成方法,其特征在于以苯醚氰菊酯为原料,采用高锰酸钾和高碘酸钠进行氧化,得到人工半抗原;采用活性酯法将半抗原与载体蛋白 BSA 相连,用紫外分光光度法和 SDS-PAGE 法估算免疫原的偶联比;步骤为:

(1) II 类拟除虫菊酯半抗原的制备

称取 1.20g 苯醚氰菊酯于 100mL 的具塞三角瓶中,再加入 25.0mL 的叔丁醇和 17.0mL 的水,混匀;然后称取 3.48mg 的 NaIO_4 , 42.57mg KMnO_4 和 9010mg Na_2CO_3 分别加入上述的三角瓶中;最后加入相转移催化剂甲基三辛基氯化铵,常温下反应过夜;反应结束后,用 6N 盐酸进行酸化,用乙酸乙酯萃取三次,合并有机相,然后用硫代硫酸钠溶液洗涤有机相,接着用无水硫酸镁干燥,浓缩,柱层析法纯化,洗脱液为以质量比石油醚:乙酸乙酯:醋酸=69.9:30:0.1 的混合溶剂,收集 $R_f=0.36$ 的组分,浓缩,得到淡黄色的油状物,为 II 类拟除虫菊酯半抗原;

(2) II 类拟除虫菊酯人工抗原的制备

称取 50.0mg 的半抗原,7.8mg 1-乙基-碳二亚胺盐酸盐 EDC, 0.66mg 二甲基吡啶 DMAP 和 4.1mg 三乙胺放入反应瓶 A 中,再加入 300 μL N,N-二甲基甲酰胺 DMF 溶解后,得到 A 液;然后在反应瓶 B 中加入 9.32mg N-羟基琥珀酸亚胺 NHS 和 100 μL N,N-二甲基甲酰胺 DMF,溶解后得到 B 液;将 B 液逐滴滴加到 A 液中,室温下反应 12h,得到 C 液;称取 18mg 的 BSA 溶于 4mL pH 8.4 的硼酸盐缓冲溶液中,得蛋白质溶液;在冰浴下,将 C 液逐滴滴加到蛋白质溶液中,反应 6h;反应结束后,离心,取上清,得到 II 类拟除虫菊酯人工抗原混合液;

透析袋前处理:剪取 9.0cm 的透析袋,煮沸 6-8min,再用去离子水冲洗 5 次,保存在 4°C 去离子水中备用;

将 II 类拟除虫菊酯人工抗原混合液移入透析袋中,用 0.01M pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 72h,6-8h 更换一次透析液,期间更换透析液 7-9 次,最后将 II 类拟除虫菊酯人工抗原分装在 1.0mL 的离心管中,保存在 -20°C,备用;

(3) II 类拟除虫菊酯人工抗原的鉴定

偶联比测定:采用紫外分光光度法对 II 类拟除虫菊酯人工抗原的偶联比进行测定;

抗体效价测定:采用酶标板法进行测定。

一种 II 类拟除虫菊酯人工抗原的合成方法

技术领域

[0001] 一种 II 类拟除虫菊酯农药的人工抗原的合成方法,属于生物化工技术领域。

背景技术

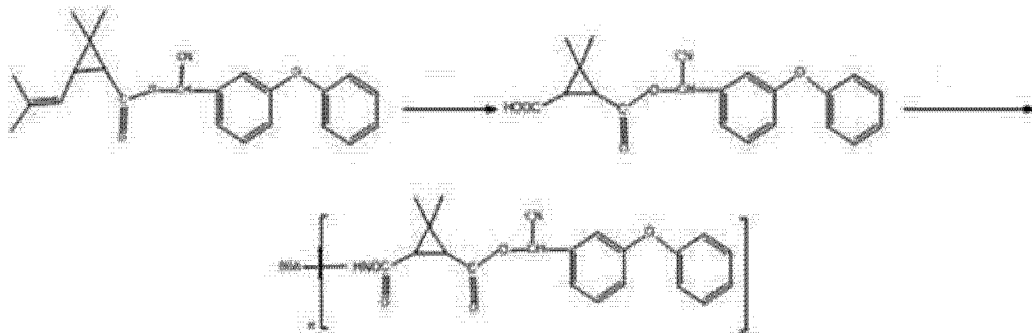
[0002] II 类拟除虫菊酯农药是一类重要的合成杀虫剂,具有广谱、高效、低毒、低残留的特点,广泛用于农业、林业、动物养殖和公共卫生等领域的害虫防治。随着 II 类拟除虫菊酯类农药的大量使用,农药残留不仅造成了环境污染,而且还危害到人类健康。研究表明:菊酯类农药具有潜在的遗传毒性、生殖毒性以及免疫毒性,因此,发达国家对农产品中农药残留已提出了针对技术壁垒的倾向性限量指标,从而使农畜产品中的农残问题引起全球性的关注。目前拟除虫菊酯的残留检测方法较多,如高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱-电子捕获法(GC-ECD)以及气相色谱-质谱(GC-MS)等。对于这些色谱检测方法来讲,尽管其灵敏度高,准确性好,但样品的前处理净化技术步骤繁多,造成耗时长,而且仪器贵,需要专业人员操作,特别不适用于现场快速检测的要求。上个世纪 80 年代以来,随着免疫学技术在农药残留检测中的应用,酶联免疫分析(ELISA)技术测定农药残留现已发展为菊酯类农药多残留检测的重要方法之一,具有专一性强,操作简单,快速、灵敏的优点,而酶联免疫的关键技术之一是免疫原的设计和合成。到目前为止,国内关于 II 类拟除虫菊酯多残检测的报道尚没有针对其全部共同结构的半抗原合成的免疫原,为此设计合成了含有 II 类拟除虫菊酯全部共同结构的半抗原来检测 II 类拟除虫菊酯的完全抗原的制备。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种通用人工抗原的合成方法。所制备的产品用于 II 类拟除虫菊酯农药的免疫分析方法研究,为今后的研究提供了一种新型的人工抗原。

[0004] 本发明的技术方案:一种 II 类拟除虫菊酯人工抗原的合成方法,以苯醚氰菊酯为原料,通过高锰酸钾和高碘酸钠进行氧化,得到 II 类拟除虫菊酯农药的半抗原,用活性酯法将其与载体蛋白 BSA 偶联,用紫外分光光度法和 SDS-PAGE 法估算偶联物的偶联比。其反应方程式为:

[0005]



[0006] 其合成步骤为：

[0007] (1) II 类拟除虫菊酯半抗原的制备

[0008] 称取 1.20g (3.2mmol) 苯醚氰菊酯于 100mL 的具塞三角瓶中,再加入 25.0mL 的叔丁醇和 17.0mL 的水,混匀;然后称取 3.48mg (0.22mmol)的 NaIO_4 , 42.57mg (3.6mmol) KMnO_4 和 9010mg (85mmol) Na_2CO_3 分别加入上述的三角瓶中。最后加入相转移催化剂甲基三辛基氯化铵,常温下反应过夜。反应结束后,用 6N 盐酸进行酸化,用乙酸乙酯萃取三次,合并有机相,然后用硫代硫酸钠溶液洗涤有机相,接着用无水硫酸镁干燥,浓缩,柱层析法纯化,以质量比石油醚:乙酸乙酯:醋酸=69.9:30:0.1,收集 $R_f=0.36$ 的组分,浓缩,得到淡黄色的油状物即为 II 类拟除虫菊酯半抗原。

[0009] (2) II 类拟除虫菊酯人工抗原制备

[0010] 称取 50.0mg (0.027mmol) 的半抗原,7.8mg (0.04mmol) 1-乙基-碳二亚胺盐酸盐 (EDC), 0.66mg (0.0054mmol) 二甲基吡啶 (DMAP) 和 4.1mg (0.04mmol) 三乙胺放入反应瓶 A 中,加入 300 μL N,N -二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解后,得到 A 液;然后在反应瓶 B 中加入 9.32mg (0.081 mmol) N -羟基琥珀酸亚胺 (NHS) 和 100 μL N,N -二甲基甲酰胺 (DMF), 溶解后得到 B 液。将 B 液逐滴滴加到 A 液中,室温下反应 12 小时,得到 C 液。称取 18mg (0.27 μmol) 的 BSA 溶于 4mL pH 8.4 的硼酸盐缓冲溶液中,得蛋白质溶液。在冰浴下,将 C 液逐滴滴加到蛋白质溶液中,反应 6 小时。反应结束后,离心,取上清,得到 II 类拟除虫菊酯人工抗原混合液。

[0011] 透析袋前处理:透析袋前处理:剪取 9.0cm 的透析袋,煮沸 6-8min,再用去离子水冲洗 5 次,保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 去离子水中备用;

[0012] 将 II 类拟除虫菊酯人工抗原混合液移入处理过透析袋中,用 0.01M pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS 溶液) 透析 72 小时,6-8 小时更换一次透析液,期间更换透析液 6-9 次。最后将 II 类拟除虫菊酯人工抗原混合液分装在 1.0mL 的离心管中,保存在 -20 $^{\circ}\text{C}$, 备用。

[0013] (3) II 类拟除虫菊酯农药人工抗原的鉴定

[0014] 偶联比测定:采用紫外分光光度法对 II 类拟除虫菊酯人工抗原的偶联比进行测定;

[0015] 抗体效价测定:采用酶标板法进行测定。

[0016] 本发明的有益效果:本发明成功合成了 II 类拟除虫菊酯的人工抗原,合成步骤简单,有效,完全可用于免疫分析当中,为以后人们的研究提供了方便的途径,此方法产生的多克隆抗体可以满足国内对其研究的需要。

附图说明

[0017] 图 1-a 半抗原的液相色谱图。1-b 半抗原质谱图。说明:6.52min 峰对应物质的分子量为 365,是 II 类拟除虫菊酯的半抗原的峰。

[0018] 图 2 II 类拟除虫菊酯人工半抗原核磁鉴定图, ^1H NMR (CDCl_3): δ ; 1.0-1.5 (6H, s, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 2.0-2.5 (2H, s, $\text{CO}(\text{CH}_2)_2$), 6.3-6.5 (1H, s, CNCH), 7.5-7.0 (9H, s, ArH)。

[0019] 图 3 II 类拟除虫菊酯免疫原 Hapten-BSA 的紫外扫描图, 1、BSA:牛血清白蛋白; 2、Hapten-BSA:半抗原与牛血清白蛋白的偶联物; 3、Hapten:II 类拟除虫菊酯的半抗原。

[0020] 图 4 II 类拟除虫菊酯包被原 Hapten-OVA 的紫外扫描图, OVA:鸡卵清蛋白; 2、

Hapten-OVA :半抗原与鸡卵清蛋白的偶联物 ;3、Hapten :II 类拟除虫菊酯的半抗原。

[0021] 图 5 利用间接 ELISA 方法测得的 II 类拟除虫菊酯标准抑制曲线。Fenpropathrin :甲氰菊酯 ; cypermethrin :氯氰菊酯 ;deltamethrin :溴氰菊酯 ;fenvalerate :氰戊菊酯。

具体实施方式

[0022] 实施例 1

[0023] (1) 半抗原的制备

[0024] 称取 1.20g (3.2mmol) 苯醚氰菊酯于 100mL 的具塞三角瓶中,再加入 25.0mL 的叔丁醇和 17.0mL 的水,混匀;然后称取 3.48mg (0.22mmol)的 NaIO_4 , 42.57mg (3.6mmol) KMnO_4 和 9010mg (85mmol) Na_2CO_3 分别加入上述的三角瓶中。最后加入相转移催化剂甲基三辛基氯化铵,常温下反应过夜。反应结束后,用 6N 盐酸进行酸化,用乙酸乙酯萃取三次,合并有机相,然后用硫代硫酸钠溶液洗涤有机相,接着用无水硫酸镁干燥,浓缩,柱层析法纯化,以石油醚:乙酸乙酯:醋酸=69.9:30:0.1,收集 $R_f=0.36$ 的组分,浓缩,得到淡黄色的油状物,为 II 类拟除虫菊酯的半抗原。

[0025] (2) 完全抗原制备

[0026] 称取 0.027mmol (50.0mg) 的半抗原,0.04mmol (7.8mg) 1-乙基-碳二亚胺盐酸盐 (EDC),0.0054mmol (0.66mg) 二甲基吡啶 (DMAP) 和 0.04mmol (4.1mg) 三乙胺放入反应瓶 A 中,加入 300 μL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解后,得到 A 液;然后在反应瓶 B 中加入 0.081mmol (9.32mg) N-羟基琥珀酸亚胺 (NHS) 和 100 μL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF),溶解后得到 B 液。将 B 液逐滴滴加到 A 液中,室温下反应 12 小时,得到 C 液。称取 18mg (0.27 μmol) 的 BSA 溶于 4mL pH 8.4 的硼酸盐缓冲溶液中,得蛋白质溶液。在冰浴下,将 C 液逐滴滴加到蛋白质溶液中,反应 6 小时。反应结束后,离心,取上清,得到 II 类拟除虫菊酯农药的抗原混合液。

[0027] 透析袋前处理:透析袋前处理:剪取 9.0cm 的透析袋,煮沸 6-8min,再用去离子水冲洗 5 次,保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 去离子水中备用;

[0028] 将人工抗原混合液移入透析袋中,用 0.01M pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS 溶液) 透析 72 小时,6-8 小时更换一次透析液,期间更换透析液 7-9 次。最后将免疫原分装在 1.0mL 的离心管中,保存在 -20 $^{\circ}\text{C}$,备用。

[0029] (3) II 类拟除虫菊酯农药人工抗原的鉴定

[0030] 偶联比测定:估算偶联物中被偶联的两种分子的比率(偶联比率)的方法,本专利采用紫外分光光度法对完全抗原的偶联比进行估算。

[0031] 原理:是利用物质对光的吸收与其浓度呈比例关系的原理分别测定被偶联的两种分子浓度,在大分子与小分子偶联物中,两种分子均有各自不同的紫外扫描光谱,并表现出光谱图迭加的性质。

[0032] 考马斯亮蓝法测定偶联物的蛋白浓度:采用超纯水配制 1mg/mL 的牛血清白蛋白标准溶液,然后再将其浓度依次稀释为 0,40,60,80,100 $\mu\text{g/mL}$,在酶标板内分别加入 48 μL 的牛血清白蛋白的稀释液,接着加入 240 μL 考马斯亮蓝染色液,立即混匀,5min 后进行测定,每个浓度做 3 个平行样。在 595nm 处测吸光值,绘制蛋白浓度与吸光值的关系曲线。将抗原溶液按一定比例稀释,在 595nm 处测定抗原溶液的吸光值,从曲线上得到抗原溶

液的相应的蛋白浓度 3.0mg/mL。

[0033] 摩尔吸收系数 ϵ :配制半抗原浓度为 0, 10, 20, 30 $\mu\text{g/mL}$ 的 20% 甲醇溶液, 通过紫外扫描可知半抗原的最大吸收波长为 278nm, 在 278nm 处测吸光值, 每个浓度做 3 个平行样. 摩尔吸光系数计算为: $\epsilon = \text{吸光值} / \text{摩尔浓度}$ 。

[0034] 偶联比估算:配制 200 $\mu\text{g/mL}$ 牛血清蛋白的 20% 甲醇溶液, 将偶联产物用 20% 甲醇稀释到 200 $\mu\text{g/mL}$, 在 278nm 处测吸光值, 以 20% 甲醇为空白, 测出的吸光值为 A1, A2, 偶联比 r 为: $r = ((A2 - A1) / \epsilon) / (200 \times 10^{-3} / 66200)$ 其中 ϵ 为摩尔吸光系数(L/mol), 66200 为牛血清蛋白的分子量, 200×10^{-3} 为牛血清蛋白浓度($\mu\text{g/mL}$)。计算得偶联比率 $r = 21:1$ 。

[0035] 抗体效价测定:采用酶标板法进行测定。

[0036] (1) 抗血清的制备

[0037] 1) 实验动物:选 2 只 2 月龄、体重为 1.5-2 kg 的健康新西兰大白兔为实验动物。

[0038] 2) 抗原配置:将免疫原用生理盐水稀释, 配成 2 mg/mL 的溶液。

[0039] 3) 乳化:将上述溶液与等量完全或不完全福氏佐剂用混合搅拌法将其乳化, 直至将一滴乳剂滴入水中, 不散开漂在水面上为止。

[0040] 4) 免疫方法:初次免疫将乳化好的试剂于兔子背部多点注射, 1 mg/ 只。初次免疫后的免疫称为加强免疫, 加强免疫用福氏不完全佐剂乳化, 加强免疫为肌肉注射, 每两周加强免疫一次, 剂量与初次免疫相同。

[0041] 5) 采血:4 次加强免疫后从耳缘静脉采血, 采用间接竞争酶联免疫法测定抗血清效价。待效价达到要求后, 采用耳静脉放血与心脏放血相结合获得抗血清, 收集于 50 mL 灭菌塑料离心管中。

[0042] 6) 血清的制备:置于 37°C 下, 2h; 再转入冰箱中过夜, 离心(5000rpm, 10min), 得到抗血清, 4°C 下保存, 备用。

[0043] (2) 抗体效价测定步骤:

[0044] 1) 将包被原用包被缓冲液作系列稀释包被 96 孔酶标板, 100 μL / 孔, 于 4°C 冰箱过夜。次日取出酶标板回至室温, 每孔注入 200 μL PBST 溶液, 摇床上振荡 3 min, 用力甩掉洗涤液, 在吸水纸上拍干, 洗涤 3 次。以下洗涤方法相同。

[0045] 2) 充分洗涤后, 用封闭缓冲液封闭酶标板, 200 μL / 孔, 于 37°C 温育箱内温育 2 h 后取出, 烘干待用。

[0046] 3) 将阳性血清系列稀释对应加入到酶标板的前 6 列, 第 7 列加入阴性血清, 50 μL / 孔, 37 °C 孵育 30min 后洗涤、拍干。

[0047] 4) 每孔加入 100 μL , 1:3000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 37 °C 孵育 30min 后洗涤、拍干。

[0048] 5) 每孔加入 100 μL 显色液 (TMB 与底物液比例为 1:5), 暗处 37 °C 反应 15 min, 取出后每孔加入 50 μL 终止液 (2 mol/L 的硫酸), 用酶标仪测定吸光值 A_{450} 。

[0049] (3) 抗体敏感性的测定步骤:

[0050] 1) 包被:用设定浓度的包被原包被酶联反应板, 100 μL / 孔, 4°C 过夜。

[0051] 2) 洗涤:用 PBST 洗涤反应板三次, 每次 3min, 200 μL / 孔, 然后甩干反应板。

[0052] 3) 封闭:采用封闭缓冲溶液进行封闭, 200 μL / 孔, 37°C 封闭 2h。

[0053] 4) 洗涤:同 2)

[0054] 5) 竞争：用 PBST 将标准品稀释成 0, 0.15, 0.31, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10 μ g/mL 系列浓度, 另设一个 PBST 空白对照, 50 μ L / 孔。然后每孔加入 50 μ L 稀释 4000 倍的抗血清, 于 37°C 温育 30min。

[0055] 6) 洗涤：同 2)

[0056] 7) 加酶标二抗（羊抗兔 HRP-IgG, 1:3000），100 μ L / 孔, 37 C 反应 30min。

[0057] 8) 洗涤：同 2)

[0058] 9) 显色：加底物 TMB 100 μ L / 孔, 显色 15min。

[0059] 10) 终止：加终止液 50 μ L / 孔。

[0060] 11) 测定：用酶标仪检测 OD_{450nm}。

[0061] 表 1 II 类拟除虫菊酯兔血清效价的测定

[0062]

1号血清 Hap-ova	2000	4000	8000	16000	32000	64000	N2000
4000	2.49	2.136	1.444	1.007	0.526	0.348	0.091
8000	1.915	1.535	0.969	0.63	0.358	0.231	0.065
16000	1.473	0.848	0.473	0.416	0.208	0.116	0.052
32000	0.927	0.559	0.357	0.16	0.111	0.085	0.041

[0063] 备注：1号血清代表了1号兔子五免后, 耳静脉采血测定的效价和抑制。Hap-ova 代表了半抗原和鸡卵清蛋白(OVA)的偶联物。血清的效价：当阳性血清的吸光值(OD值)大于或等于阴性对照孔的2.1倍(P/N \geq 2.1), 同时吸光值大于0.2, 此时血清的稀释倍数为血清的效价。由上表可得血清的效价为32000。

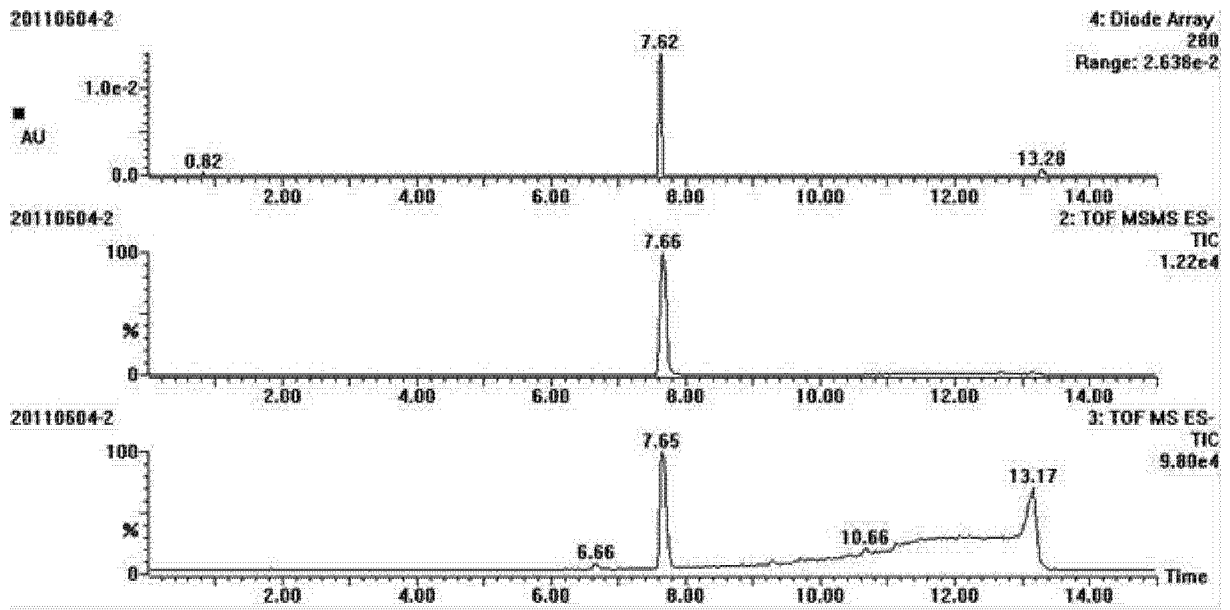


图 1-a

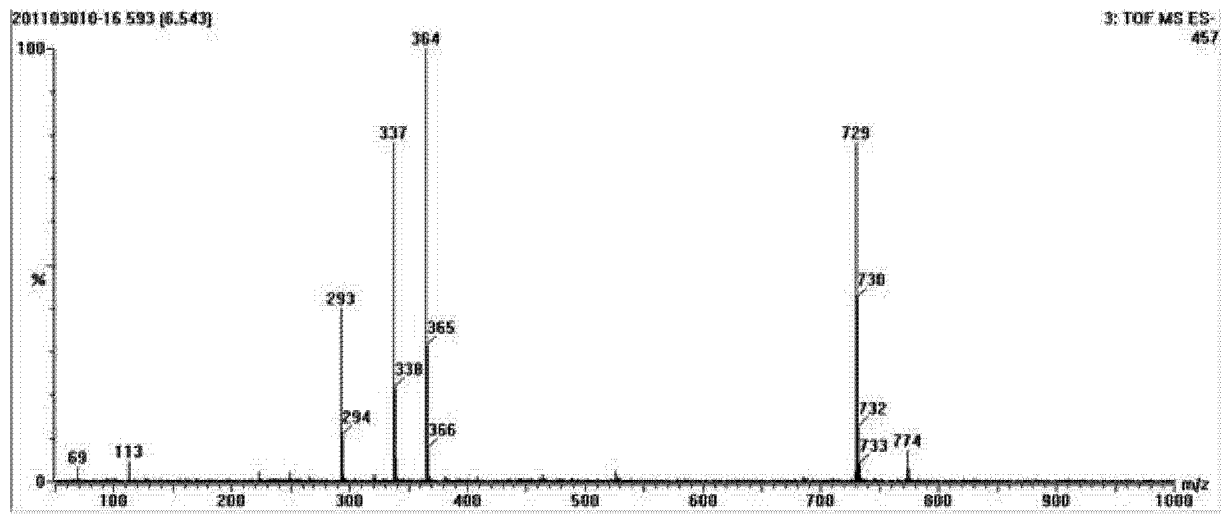


图 1-b

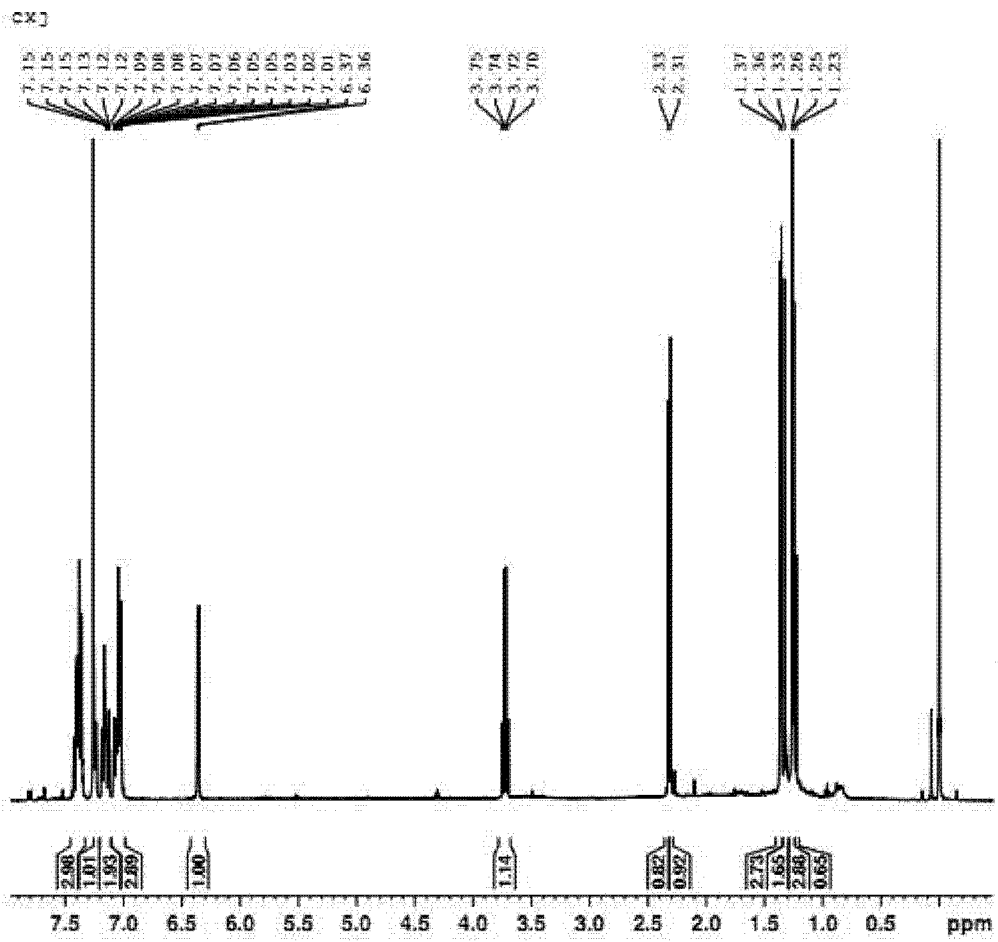


图 2

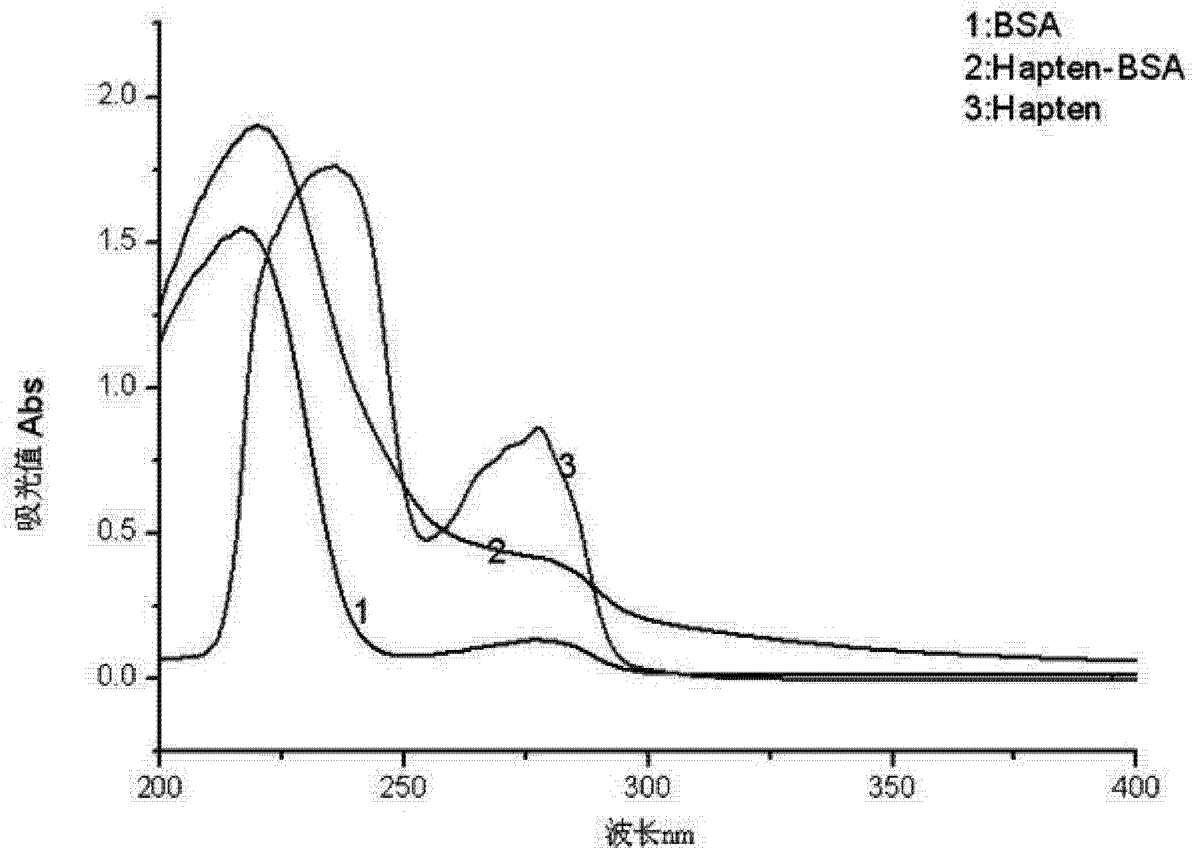


图 3

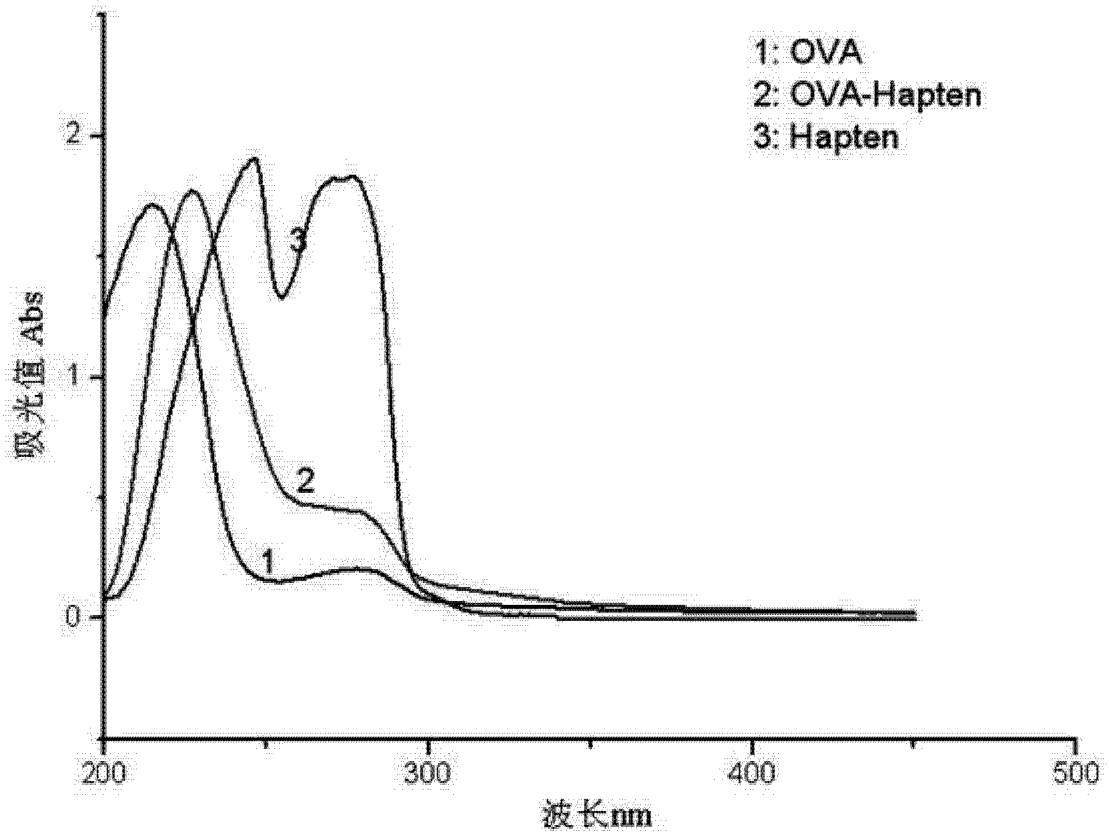


图 4

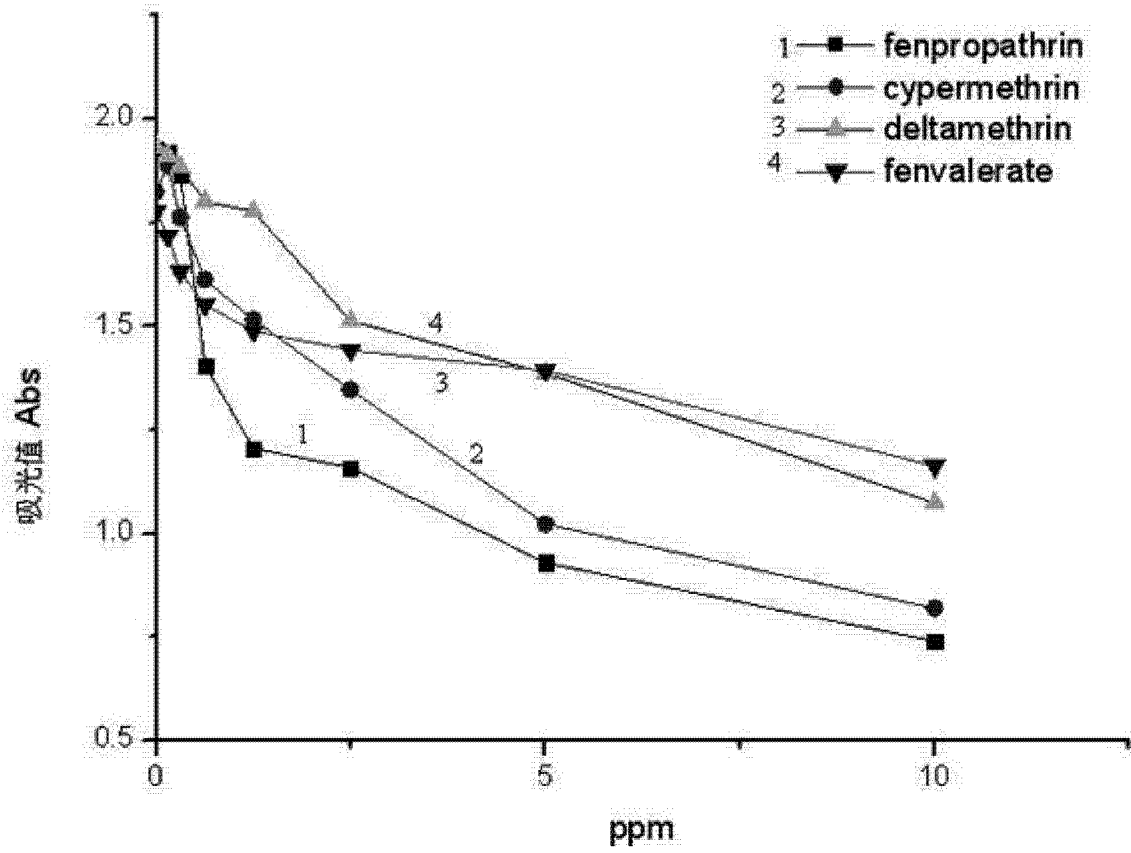


图 5

专利名称(译)	一种II类拟除虫菊酯人工抗原的合成方法		
公开(公告)号	CN102372776B	公开(公告)日	2013-08-07
申请号	CN201110271143.2	申请日	2011-09-14
[标]申请(专利权)人(译)	王利兵 胥传来 陈秀金		
申请(专利权)人(译)	王利兵 胥传来 陈秀金		
当前申请(专利权)人(译)	王利兵 胥传来 陈秀金		
[标]发明人	王利兵 胥传来 陈秀金		
发明人	王利兵 胥传来 陈秀金		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/765		
审查员(译)	孙婷婷		
其他公开文献	CN102372776A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种II类拟除虫菊酯人工抗原的合成方法，属于生物化工技术领域。本发明以苯醚氰菊酯为原料，采用高锰酸钾和高碘酸钠进行氧化，得到人工半抗原，采用活性酯法将半抗原与载体蛋白BSA相连，用紫外分光光度法估算免疫原的偶联比。本方法成功地合成了II类拟除虫菊酯人工抗原，合成步骤简单，有效，完全可以用于免疫学分析中，为以后人们的研究提供了一种新型的人工抗原，满足了国内对该研究的需要。

