



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105732788 A

(43)申请公布日 2016.07.06

(21)申请号 201610159906.7

(22)申请日 2016.03.21

(71)申请人 贵州勤邦食品安全科学技术有限公司

地址 550009 贵州省贵阳市小河区小孟工业园标准厂房二期1#楼1-2楼

(72)发明人 冯才伟 汪善良 扶胜 蔡韬
陆苇 谢体波 刘红 李平
王大敏 牛治存

(51) Int. Cl.

C07K 14/435(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图2页

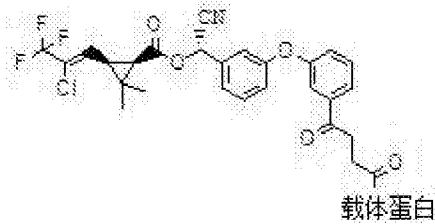
(54)发明名称

高效氯氟氰菊酯半抗原的制备方法及应用

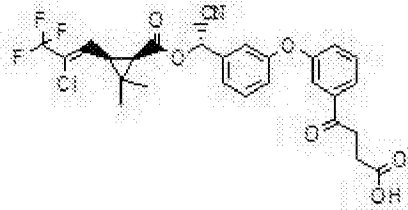
(57)摘要

本发明提供一种高效氯氟氰菊酯半抗原的制备方法和应用。本发明所提供的高效氯氟氰菊酯半抗原合成方法是以高效氯氟氰菊酯为原料与琥珀酸酐经一步反应合成制备获得,半抗原与载体蛋白偶联得到高效氯氟氰菊酯抗原。实验结果表明,本发明合成的高效氯氟氰菊酯半抗原的方法简单,所得到的高效氯氟氰菊酯半抗原产率和纯度都较高,利用本发明合成的半抗原与载体蛋白偶联获得的抗原对实验动物进行免疫,得到特异性好,灵敏度高的单克隆抗体,用该抗体建立的酶联免疫试剂盒和试纸条使用方便、经济实惠、检测方法高效、准确,可同时检测大批量的样本,能满足高效氯氟氰菊酯残留的现场监控和大量样本的筛查的需求。

1. 一种用于检测高效氯氟氰菊酯残留的抗原,是由高效氯氟氰菊酯为原料与琥珀酸酐反应合成的半抗原与载体蛋白偶联得到,具有下述分子结构式:



其中所述的高效氯氟氰菊酯为原料与琥珀酸酐的反应合成的半抗原的分子结构式为:



所述的高效氯氟氰菊酯为原料与琥珀酸酐的反应合成的半抗原的合成方法包括以下步骤:

1) 以高效氯氟氰菊酯为原料,溶解于经干燥后的二氯甲烷中,通入氮气进行保护,得到溶液I;

2) 在溶液I中加入琥珀酸酐,常温下搅拌溶解;

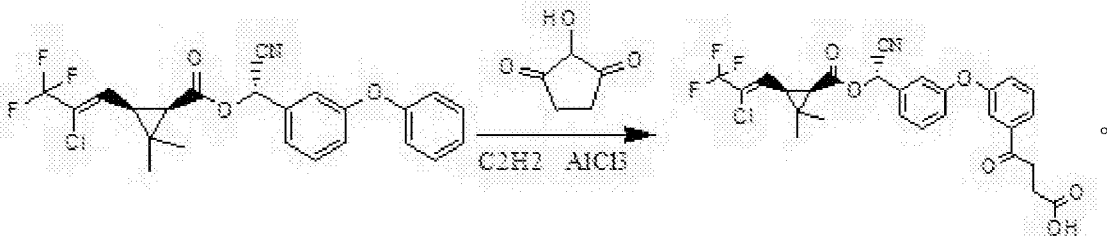
3) 加入催化剂三氯化铝固体进行催化反应;

4) TLC薄层板监测反应进行,直至没有原料,停止反应;

5) 硅胶柱净化,浓缩得到产物,即为半抗原;

其中所述的载体蛋白为:牛血清蛋白、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、甲状腺蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白;

所述的高效氯氟氰菊酯为原料与琥珀酸酐的反应合成的半抗原的合成路线如下:



2. 根据权利要求书1所述的一种用于检测高效氯氟氰菊酯残留的抗原,其特征在于:所述的高效氯氟氰菊酯与琥珀酸酐的反应摩尔比为1/1-1/3,催化剂三氯化铝固体与高效氯氟氰菊酯质量比为1%-5%。

3. 根据权利要求书1所述的一种用于检测高效氯氟氰菊酯残留的抗原的制备方法包括以下步骤:

1) 称取适量高效氯氟氰菊酯半抗原溶解于DMF溶液中,加入EDC和NHS水溶液,进行活化30分钟,得到溶液I;

2) 将载体蛋白溶于含30% DMF水溶液中,得到溶液II;将溶液I加入到溶液II中,进行偶联,得到溶液III;

3)用0.02mol/L PB缓冲液透析溶液III,获得高效氯氟氰菊酯抗原,分装并于-20℃保存备用。

4.根据权利要求书1所述的一种用于检测高效氯氟氰菊酯残留的抗原的应用包括:制备高效氯氟氰菊酯酶联免疫试剂盒和胶体金试纸卡。

高效氯氟氰菊酯半抗原的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种高效氯氟氰菊酯残留的半抗原的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 高效氯氟氰菊酯,英文名Lambda-Cyhalothrin,又称为爱克宁、 λ -三氟氯氰菊酯,属拟除虫菊酯类,具有触杀作用的卫生杀虫剂,化学名称: α -氰基-3-苯氧苄基-3-(2-氯-3,3,3-三氟-1-丙烯基)-2,2-二甲基环丙烷羧酸酯(Z)-(1R,3R),S-酯及(Z),(1S,3S),R-酯的1:1混合物。具有触杀作用,是对环境卫生害虫极为有效的一种广效杀虫剂,具有击倒速度快、击倒力强,用药量少等优点。能消灭传播疾病的媒介害虫和防治各种卫生害虫。拟除虫菊酯类被称为是杀虫剂农药的一个新突破,是杀虫剂历史上的第三个里程碑。在农业生产上,用途广泛。

[0003] 高效氯氟氰菊酯属于神经毒剂,接触量大时会引起头痛、头晕、恶心、呕吐、双手颤抖,全身抽搐或惊厥、昏迷、休克等,故国家制定了严格的高效氯氟氰菊酯残留检测标准,以保障食品安全,消除潜在的食品安全隐患。如GB/T 5009-2008《植物性食品中有机氯和拟除虫菊酯类农药多种残留的鉴定》、GB/T 19649-2006《粮谷中475种农药及相关化学平残留量的测定》、SN/T 1117-2008《进出口食品中多种菊酯类农药残留量测定方法气相色谱法》,现行的残留检测方法是气相色谱法和高效液相色谱法,该方法依赖于大型仪器和专业技术检测人员,检测时间长,需要使用有机溶剂,会造成环境污染。寻求一种快速、有效、准确的检测方法和手段,势在必行。酶联免疫检测方法具有灵敏度好、精确度高、检测成本低、操作简单、检测时间短、可实现多样本同时检测的特点,在食品安全快速检测中发挥重要的作用。

[0004] 高效氯氟氰菊酯是农药小分子化合物,必须与大分子物质连接后才能刺激动物产生特异性抗体,故酶联免疫技术研究的关键是半抗原的分子设计、合成和人工抗原及抗体的制备。拟除虫菊酯农药半抗原设计与合成主要有如下方法:1)以拟除虫菊酯的酸或醇部分衍生化作为半抗原;2)改变拟除虫菊酯分子的活性基团作为半抗原。半抗原就是在无免疫原性的化合物母体结果上通过一定的化学方法连接一个具有一定碳链长度的间隔臂,间隔臂的另一端具有可与载体蛋白质共价偶联的活性基团(如羧基、氨基、羟基等)的小分子物质。半抗原的设计应考虑结构中尽量保留芳香环。

[0005] 国内外对拟除虫菊酯类的研究较多且已有不少成果报道,如王利兵等人申请了发明专利《一种功夫菊酯半抗原的合成方法》(专利号:201110271124.X),该专利是以羟基苯丙酸作为原料,经过七步反应得到半抗原;中国农业大学许艇等人申请了发明专利《功夫菊酯残留的间接竞争酶联免疫吸附分析试剂盒》(专利号:200810101544.1),以羟基苯丙酸为原料,经六步反应,获得半抗原3-[(\pm)-(cis)-3-[(Z)-3-氯-4,4,4-三氟-1-乙基-2,2-二甲基]环丙基羰基氧]苯氧基]苯丙酸,上述两个技术方案,存在反应步骤多,转化率相关较低,得到的副产物较多,后续纯化工作量大的缺点。浙江大学程敬丽等人,申请了发明专利《一种高特异性拟除虫菊酯类半抗原化合物》(专利号:200810162533.4),以氯氟氰菊酯为原料,经调节pH至酸性、提取、水洗和纯化反应,得到半抗原化合物,(RS)- α -氰基-3-苯氧基苯

基(RS)-顺,反-2,2-二甲基-3-羧基环丙烷碳酸酯,该专利是针对拟除虫菊酯类设计的半抗原合成路线,而不是针对单一菊酯产品的半抗原合成。福建出入境检验检疫局检验检疫技术中心,获得了发明专利《拟除虫菊酯类农药残留的快速检测方法》(专利号:200410155382.1)的授权,该专利利用强碱试剂将检测物中的拟除虫菊酯农药残留分解成含氰化合物,该发明使用强酸强碱试剂,且生成物为含氰化合物,有毒且对环境不友好。

[0006] 李志茹优秀硕士毕业论文,《拟除虫菊酯类农药通用抗体制备及高效氯氟氰菊酯免疫检测技术研究》,研究以拟除虫菊酯农药的中间体-间苯氧基苯甲酸为半抗原、菊酸为主要原料,获得多克隆通用抗体。

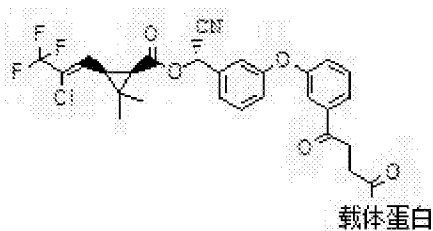
[0007] 北京勤邦生物技术有限公司申请了一项发明专利,《三聚氰胺半抗原及其制备方法和应用》(专利号:201110356771.0),该专利以三聚氰酸二酰胺与琥珀酸酐进行反应,制备得到三聚氰胺半抗原,制备出三聚氰胺快速检测试剂盒和试纸条,解决了三聚氰胺的快速检测。

[0008] 针对目前现有技术方案的不足,本发明拟提供一种专门针对高效氯氟氰菊酯残留检测的半抗原合成方案,以半抗原为基础与载体蛋白偶联成抗原,从而进行免疫反应实验,经筛选获得单克隆抗体,具有经济、环保、特异性强的优点。

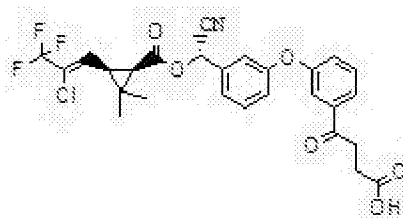
发明内容

[0009] 本发明提供一种高效氯氟氰菊酯抗体制备的关键物质半抗原的合成方法,该方法具有工艺简单,反应率高的特点,采用一步法完成,收率可达51.6%;最大限度保留了高效氯氟氰菊酯的化学结构,提高了半抗原的特异性,且引入了活性基团-OH,为抗原制备加入连接点。

[0010] 本发明是提供一种用于检测高效氯氟氰菊酯残留的抗原制备的技术方法,由高效氯氟氰菊酯为原料与琥珀酸酐的反应合成的半抗原与载体蛋白偶联得到,具有下述分子结构式:



高效氯氟氰菊酯为原料与琥珀酸酐的反应合成的半抗原的分子结构式为:



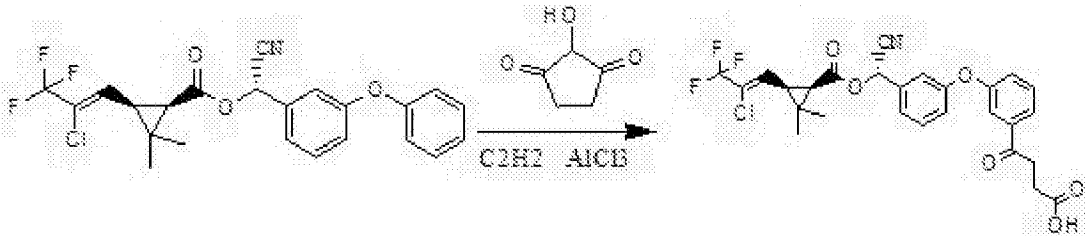
高效氯氟氰菊酯为原料与琥珀酸酐的反应合成的半抗原的合成方法包括以下步骤:

- 1) 以高效氯氟氰菊酯为原料,溶解于经干燥后的二氯甲烷中,通入氮气进行保护,得到溶液I;
- 2) 在溶液I中加入琥珀酸酐,常温下搅拌溶解;

- 3)加入催化剂三氯化铝固体进行催化反应;
- 4)TLC薄层板监测反应进行,直至没有原料,停止反应;
- 5) 硅胶柱净化,浓缩得到产物,即为半抗原;

载体蛋白为:牛血清蛋白、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、甲状腺蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白;

高效氯氟氰菊酯为原料与琥珀酸酐的反应合成的半抗原的合成路线如下:



反应温度为常温,反应压力为常压,高效氯氟氰菊酯与琥珀酸酐的反应摩尔比为1/1—1/3,催化剂与高效氯氟氰菊酯质量比为1%—5%。

[0011] 本发明还提供一种高效氯氟氰菊酯抗原的制备方法。

[0012] 1)称取适量高效氯氟氰菊酯半抗原溶解于DMF溶液中,加入EDC和NHS水溶液,进行活化30分钟,得到溶液I;

2)将载体蛋白溶于含30% DMF水溶液中,得到溶液II;将溶液I加入到溶液II中,进行偶联,得到溶液III;

3)用0.02mol/L PB缓冲液透析溶液III,获得高效氯氟氰菊酯抗原,分装并于-20℃保存备用。

[0013] 载体蛋白可为牛血清蛋白、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、甲状腺蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白。

[0014] 综上所述,本发明的方法具有工艺简单、可操作性强、收率高等优点;其所得物质为高效氯氟氰菊酯衍生物,该化合物经过净化、浓缩、结构鉴定,证实为高效氯氟氰菊酯半抗原化合物。以该化合物为基础,可与载体蛋白质进行偶联,制备抗体,以此为基础开发酶联免疫试剂盒及胶体金试纸卡等检测产品。

附图说明

[0015] 图1高效氯氟氰菊酯抗原结构图。

[0016] 图2高效氯氟氰菊酯半抗原结构图。

[0017] 图3高效氯氟氰菊酯半抗原合成反应路线。

[0018] 图4高效氯氟氰菊酯半抗原鉴定图(氢谱图)。

[0019] 图5高效氯氟氰菊酯半抗原鉴定图(碳谱图)。

具体实施方式

[0020] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明,应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不是用来限制本发明的范围。

[0021] 实施例一:高效氯氟氰菊酯半抗原的合成与鉴定

一、高效氯氟氰菊酯半抗原合成

分别称取0.42g(1mmol)高效氯氟氰菊酯、0.10g(1mmol)琥珀酸酐和0.05g 三氯化铝。

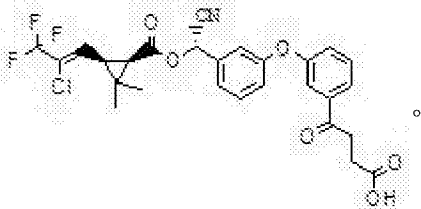
[0022] 1. 将0.42g高效氯氟氰菊酯,溶解于经干燥后的二氯甲烷中,通入氮气进行保护,得到溶液I;

2. 在溶液I中加入0.10g琥珀酸酐,常温下搅拌溶解;

3. 加入0.01g三氯化铝固体进行催化反应;

4. TLC薄层板监测反应进行,直至没有原料或原料点很浅,停止反应;

5. 硅胶柱净化,浓缩得到产物,即为半抗原,如图2所示,得到产物0.205g,收率48.8%



[0023] 二、高效氯氟氰菊酯半抗原鉴定

取上述图2化合物,经核磁共振氢谱进行结构分析,如图4所示,发现图谱中11ppm(mg/L)附近的峰为羟基上的H,同时,经核磁共振碳谱进行结构分析,如图5所示,碳谱图中177ppm附近的峰为羧基上的C,说明高效氯氟氰菊酯半抗原合成成功。

[0024] 三、高效氯氟氰菊酯抗原的制备

3.1 免疫原的合成

(1) 称取适量高效氯氟氰菊酯半抗原27.5mg溶解于4mL DMF溶液中,在2mL含有60mg EDC和60mg NHS水溶液中进行活化30分钟,得到溶液I;

(2) 110-264mg将载体蛋白溶于含5mL 30% DMF水溶液中,得到溶液II;将溶液I加入到溶液II中,进行偶联,得到溶液III;

(3) 用0.02mol/L PB缓冲液透析溶液III,透析3天,每天早晚更换透析液,以除去未反应的小分子物质,透析完成后,获得高效氯氟氰菊酯抗原,分装并于-20℃保存备用。载体蛋白可为牛血清蛋白、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、甲状腺蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白。

[0025] 3.2 包被原的合成

(1) 称取适量高效氯氟氰菊酯半抗原27.5mg溶解于4mL DMF溶液中,在2mL含有60mg EDC和60mg NHS水溶液中进行活化30分钟,得到溶液I;

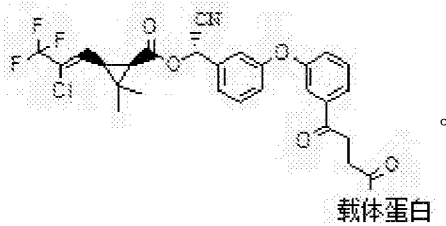
(2) 100-240mg将卵清蛋白溶于含5mL 30% DMF水溶液中,得到溶液II;将溶液I加入到溶液II中,进行偶联,得到溶液III;

(3) 用0.02mol/L PB缓冲液透析溶液III,透析3天,每天早晚更换透析液,以除去未反应的小分子物质,透析完成后,获得高效氯氟氰菊酯抗原,分装并于-20℃保存备用。

[0026] 3.3 高效氯氟氰菊酯抗原的鉴定

将载体蛋白、高效氯氟氰菊酯半抗原、高效氯氟氰菊酯半抗原-载体蛋白偶联物用pH 7.4的PB配成0.5mg/ml的溶液,以0.01mol/L pH 7.4 PB调零,用紫外分光光度计在波长260~750nm范围内进行扫描,绘制载体蛋白、高效氯氟氰菊酯半抗原、高效氯氟氰菊酯半抗原-载体蛋白偶联物的吸收曲线,并计算其结合比。结果显示,三者出现不同的吸收曲线,证明高效氯氟氰菊酯半抗原与载体蛋白偶联成功,高效氯氟氰菊酯半抗原与牛血清蛋白的结合比为15-21:1,高效氯氟氰菊酯半抗原与卵清白蛋白的结合比为20-25:1。分子结构式如图1

所示



[0027] 四、高效氯氟氰菊酯单克隆抗体

4.1 高效氯氟氰菊酯单克隆抗体制备

动物免疫：高效氯氟氰菊酯半抗原与载体蛋白偶联物免疫8-10周龄BaI b/c小鼠。

[0028] 细胞融合与克隆化：取免疫后的鼠脾细胞，与SP2/0骨髓瘤细胞在融合剂聚乙二醇(PEG)4000的作用下融合，筛选获得能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0029] 经筛选得到高效氯氟氰菊酯的单克隆杂交瘤细胞株。高效氯氟氰菊酯的单克隆杂交瘤细胞株可以无限量地产生高效氯氟氰菊酯特异性抗体，该抗体特异性是针对高效氯氟氰菊酯的，灵敏度达到1 μ g/L。

[0030] 细胞冻存和复苏：将杂交瘤细胞用冻存液制成1 \times 10⁹个/mL的细胞悬液，在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管，立即放入37 $^{\circ}$ C水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

[0031] 4.2 单克隆抗体效价的测定

用间接竞争ELISA法测定抗体的效价为1:100000~150000。

[0032] 间接竞争ELISA方法：用高效氯氟氰菊酯半抗原-牛血清蛋白偶联物包被酶标板，加入高效氯氟氰菊酯标准品工作液溶液、单克隆抗体工作液和酶标二抗，25 $^{\circ}$ C反应30min，倒出孔内液体，用PBST洗涤液洗涤3~5次，用吸水纸拍干；加入底物显色液，25 $^{\circ}$ C反应15min后，加入终止液终止反应；设定酶标仪于波长450nm处测定每孔吸光度值。

[0033] 4.3 单克隆抗体的特异性

抗体特异性是指它同特异性抗原结合的能力与同该类抗原类似物结合能力的比较，常用交叉反应率作为评价标准。交叉反应越小，抗体的特异性则越高。

[0034] 本实验将高效氯氟氰菊酯、氰菊酯和氰戊菊酯3种药物做系列稀释，分别与单克隆抗体进行间接竞争ELISA，制作标准曲线，分析得到IC₅₀，然后按下式计算交叉反应率：

$$\text{交叉反应率} = \frac{\text{引起 50\%抑制的高效氯氟氰菊酯浓度}}{\text{引起 50\%抑制的其他高效氯氟氰菊酯类似物}} \times 100\%$$

结果显示交叉反应率为：高效氯氟氰菊酯100%，氰菊酯<50%，氰戊菊酯<10%。本发明抗体对高效氯氟氰菊酯有较强的特异性和亲和力。

[0035] 实施例二：高效氯氟氰菊酯半抗原的合成与鉴定

一、高效氯氟氰菊酯半抗原合成

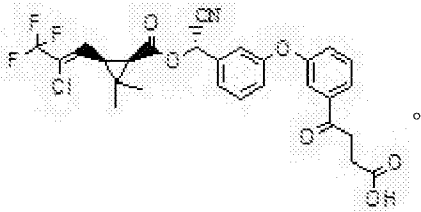
分别称取1g(2.4mmol)高效氯氟氰菊酯、0.48g(4.8mmol)琥珀酸酐和0.03g 三氯化铝。

[0036] 1. 将1g高效氯氟氰菊酯，溶解于经干燥后的二氯甲烷中，通入氮气进行保护，得到溶液I；

2. 在溶液I中加入0.48g琥珀酸酐，常温下搅拌溶解；

3. 加入0.03g三氯化铝固体进行催化反应；

4. TLC薄层板监测反应进行,直至没有原料或原料点很浅,停止反应;
5. 硅胶柱净化,浓缩得到产物,即为半抗原,如图2所示,得到产物0.516g,收率51.6%



[0037] 二、高效氯氟氰菊酯半抗原鉴定

取上述图2化合物,经核磁共振氢谱进行结构分析,如图4所示,发现图谱中11ppm(mg/L)附近的峰为羟基上的H,同时,经核磁共振碳谱进行结构分析,如图5所示,碳谱图中177ppm附近的峰为羧基上的C,说明高效氯氟氰菊酯半抗原合成成功。

[0038] 三、高效氯氟氰菊酯抗原的制备

3.1 免疫原的合成

(1) 称取适量高效氯氟氰菊酯半抗原27.5mg溶解于4mL DMF溶液中,在2mL含有60mg EDC和60mg NHS水溶液中进行活化30分钟,得到溶液I;

(2) 110-264mg将载体蛋白溶于含5mL 30% DMF水溶液中,得到溶液II;将溶液I加入到溶液II中,进行偶联,得到溶液III;

(3) 用0.02mol/L PB缓冲液透析溶液III,透析3天,每天早晚更换透析液,以除去未反应的小分子物质,透析完成后,获得高效氯氟氰菊酯抗原,分装并于-20℃保存备用。载体蛋白可为牛血清蛋白、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、甲状腺蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白。

[0039] 3.2 包被原的合成

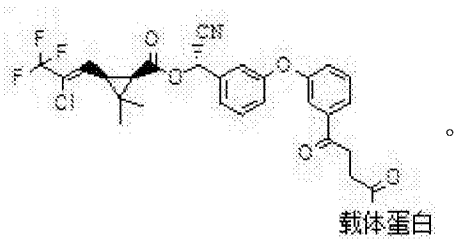
(1) 称取适量高效氯氟氰菊酯半抗原27.5mg溶解于4mL DMF溶液中,在2mL含有60mg EDC和60mg NHS水溶液中进行活化30分钟,得到溶液I;

(2) 100-240mg将卵清蛋白溶于含5mL 30% DMF水溶液中,得到溶液II;将溶液I加入到溶液II中,进行偶联,得到溶液III;

(3) 用0.02mol/L PB缓冲液透析溶液III,透析3天,每天早晚更换透析液,以除去未反应的小分子物质,透析完成后,获得高效氯氟氰菊酯抗原,分装并于-20℃保存备用。

[0040] 3.3 高效氯氟氰菊酯抗原的鉴定

将载体蛋白、高效氯氟氰菊酯半抗原、高效氯氟氰菊酯半抗原-载体蛋白偶联物用pH 7.4的PB配成0.5mg/ml的溶液,以0.01mol/L pH 7.4 PB调零,用紫外分光光度计在波长260~750nm范围内进行扫描,绘制载体蛋白、高效氯氟氰菊酯半抗原、高效氯氟氰菊酯半抗原-载体蛋白偶联物的吸收曲线,并计算其结合比。结果显示,三者出现不同的吸收曲线,证明高效氯氟氰菊酯半抗原与载体蛋白偶联成功,高效氯氟氰菊酯半抗原与牛血清蛋白的结合比为15-21:1,高效氯氟氰菊酯半抗原与卵清白蛋白的结合比为20-25:1。分子结构式如图1所示:



[0041] 四、高效氯氟氰菊酯单克隆抗体

4.1 高效氯氟氰菊酯单克隆抗体制备

动物免疫：高效氯氟氰菊酯半抗原与载体蛋白偶联物免疫8-10周龄BaI b/c小鼠。

[0042] 细胞融合与克隆化：取免疫后的鼠脾细胞，与SP2/0骨髓瘤细胞在融合剂聚乙二醇(PEG)4000的作用下融合，筛选获得能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0043] 经筛选得到高效氯氟氰菊酯的单克隆杂交瘤细胞株。高效氯氟氰菊酯的单克隆杂交瘤细胞株可以无限量的产生高效氯氟氰菊酯特异性抗体，该抗体特异性是针对高效氯氟氰菊酯的，灵敏度达到1 μ g/L。

[0044] 细胞冻存和复苏：将杂交瘤细胞用冻存液制成1 \times 10⁹个/ml的细胞悬液，在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管，立即放入37 $^{\circ}$ C水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

[0045] 4.2 单克隆抗体效价的测定

用间接竞争ELISA法测定抗体的效价为1:100000~150000。

[0046] 间接竞争ELISA方法：用高效氯氟氰菊酯半抗原-牛血清蛋白偶联物包被酶标板，加入高效氯氟氰菊酯标准品工作液溶液、单克隆抗体工作液和酶标二抗，25 $^{\circ}$ C反应30min，倒出孔内液体，用PBST洗涤液洗涤3~5次，用吸水纸拍干；加入底物显色液，25 $^{\circ}$ C反应15min后，加入终止液终止反应；设定酶标仪于波长450nm处测定每孔吸光度值。

[0047] 4.3 单克隆抗体的特异性

抗体特异性是指它同特异性抗原结合的能力与同该类抗原类似物结合能力的比较，常用交叉反应率作为评价标准。交叉反应越小，抗体的特异性则越高。

[0048] 本实验将高效氯氟氰菊酯、氯氰菊酯和氰戊菊酯3种药物做系列稀释，分别与单克隆抗体进行间接竞争ELISA，制作标准曲线，分析得到IC₅₀，然后按下式计算交叉反应率：

$$\text{交叉反应率} = \frac{\text{引起 50\%抑制的高效氯氟氰菊酯浓度}}{\text{引起 50\%抑制的其他高效氯氟氰菊酯类似物}} \times 100\%$$

结果显示交叉反应率为：高效氯氟氰菊酯100%，氯氰菊酯<50%，氰戊菊酯<10%。本发明抗体对高效氯氟氰菊酯有较强的特异性和亲和力。

[0049] 实施例三：高效氯氟氰菊酯半抗原的合成与鉴定

一、高效氯氟氰菊酯半抗原合成

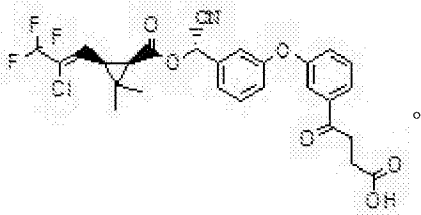
分别称取2.5g(6mmol)高效氯氟氰菊酯、1.8g(18mmol)琥珀酸酐和0.12g 三氯化铝。

[0050] 1. 将2.5g高效氯氟氰菊酯，溶解于经干燥后的二氯甲烷中，通入氮气进行保护，得到溶液I；

2. 在溶液I中加入1.8g琥珀酸酐，常温下搅拌溶解；

3. 加入0.12g三氯化铝固体进行催化反应；

4. TLC薄层板监测反应进行,直至没有原料或原料点很浅,停止反应;
5. 硅胶柱净化,浓缩得到产物,即为半抗原,如图2所示,得到产物1.26g,收率50.4%



[0051] 二、高效氯氟氰菊酯半抗原鉴定

取上述图2化合物,经核磁共振氢谱进行结构分析,如图4所示,发现图谱中11ppm(mg/L)附近的峰为羟基上的H,同时,经核磁共振碳谱进行结构分析,如图5所示,碳谱图中177ppm附近的峰为羧基上的C,说明高效氯氟氰菊酯半抗原合成成功。

[0052] 三、高效氯氟氰菊酯抗原的制备

3.1 免疫原的合成

(1) 称取适量高效氯氟氰菊酯半抗原27.5mg溶解于4mL DMF溶液中,在2mL含有60mg EDC和60mg NHS水溶液中进行活化30分钟,得到溶液I;

(2) 110-264mg将载体蛋白溶于含5mL 30% DMF水溶液中,得到溶液II;将溶液I加入到溶液II中,进行偶联,得到溶液III;

(3) 用0.02mol/L PB缓冲液透析溶液III,透析3天,每天早晚更换透析液,以除去未反应的小分子物质,透析完成后,获得高效氯氟氰菊酯抗原,分装并于-20℃保存备用。载体蛋白可为牛血清蛋白、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、甲状腺蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白。

[0053] 3.2 包被原的合成

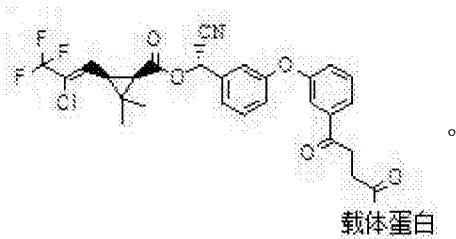
(1) 称取适量高效氯氟氰菊酯半抗原27.5mg溶解于4mL DMF溶液中,在2mL含有60mg EDC和60mg NHS水溶液中进行活化30分钟,得到溶液I;

(2) 100-240mg将卵清蛋白溶于含5mL 30% DMF水溶液中,得到溶液II;将溶液I加入到溶液II中,进行偶联,得到溶液III;

(3) 用0.02mol/L PB缓冲液透析溶液III,透析3天,每天早晚更换透析液,以除去未反应的小分子物质,透析完成后,获得高效氯氟氰菊酯抗原,分装并于-20℃保存备用。

[0054] 3.3 高效氯氟氰菊酯抗原的鉴定

将载体蛋白、高效氯氟氰菊酯半抗原、高效氯氟氰菊酯半抗原-载体蛋白偶联物用pH 7.4的PB配成0.5mg/ml的溶液,以0.01mol/L pH 7.4 PB调零,用紫外分光光度计在波长260~750nm范围内进行扫描,绘制载体蛋白、高效氯氟氰菊酯半抗原、高效氯氟氰菊酯半抗原-载体蛋白偶联物的吸收曲线,并计算其结合比。结果显示,三者出现不同的吸收曲线,证明高效氯氟氰菊酯半抗原与载体蛋白偶联成功,高效氯氟氰菊酯半抗原与牛血清蛋白的结合比为15-21:1,高效氯氟氰菊酯半抗原与卵清白蛋白的结合比为20-25:1。分子结构式如图1所示:



[0055] 四、高效氯氟氰菊酯单克隆抗体

4.1 高效氯氟氰菊酯单克隆抗体制备

动物免疫：高效氯氟氰菊酯半抗原与载体蛋白偶联物免疫8-10周龄BaI b/c小鼠。

[0056] 细胞融合与克隆化：取免疫后的鼠脾细胞，与SP2/0骨髓瘤细胞在融合剂聚乙二醇(PEG)4000的作用下融合，筛选获得能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0057] 经筛选得到高效氯氟氰菊酯的单克隆杂交瘤细胞株。高效氯氟氰菊酯的单克隆杂交瘤细胞株可以无限量地产生高效氯氟氰菊酯特异性抗体，该抗体特异性是针对高效氯氟氰菊酯的，灵敏度达到1 μ g/L。

[0058] 细胞冻存和复苏：将杂交瘤细胞用冻存液制成1 \times 10⁹个/mL的细胞悬液，在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管，立即放入37 $^{\circ}$ C水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

[0059] 4.2 单克隆抗体效价的测定

用间接竞争ELISA法测定抗体的效价为1:100000~150000。

[0060] 间接竞争ELISA方法：用高效氯氟氰菊酯半抗原-牛血清蛋白偶联物包被酶标板，加入高效氯氟氰菊酯标准品工作液溶液、单克隆抗体工作液和酶标二抗，25 $^{\circ}$ C反应30min，倒出孔内液体，用PBST洗涤液洗涤3~5次，用吸水纸拍干；加入底物显色液，25 $^{\circ}$ C反应15min后，加入终止液终止反应；设定酶标仪于波长450nm处测定每孔吸光度值。

[0061] 4.3 单克隆抗体的特异性

抗体特异性是指它同特异性抗原结合的能力与同该类抗原类似物结合能力的比较，常用交叉反应率作为评价标准。交叉反应越小，抗体的特异性则越高。

[0062] 本实验将高效氯氟氰菊酯、氯氰菊酯和氰戊菊酯3种药物做系列稀释，分别与单克隆抗体进行间接竞争ELISA，制作标准曲线，分析得到IC₅₀，然后按下式计算交叉反应率：

$$\text{交叉反应率} = \frac{\text{引起 50\%抑制的高效氯氟氰菊酯浓度}}{\text{引起 50\%抑制的其他高效氯氟氰菊酯类似物}} \times 100\%$$

结果显示交叉反应率为：高效氯氟氰菊酯100%，氯氰菊酯<50%，氰戊菊酯<10%。本发明抗体对高效氯氟氰菊酯有较强的特异性和亲和力。



图1

图2

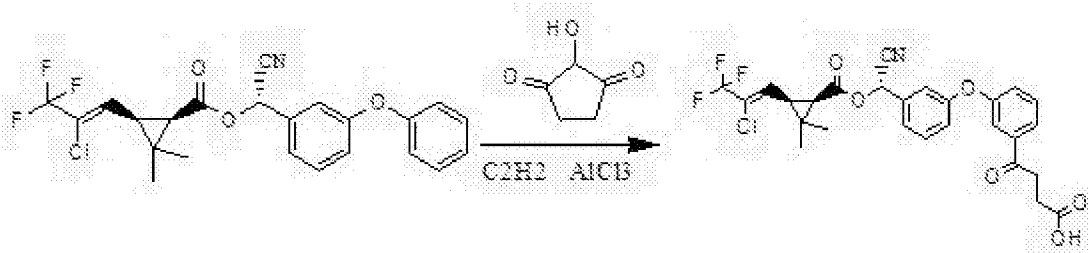


图3

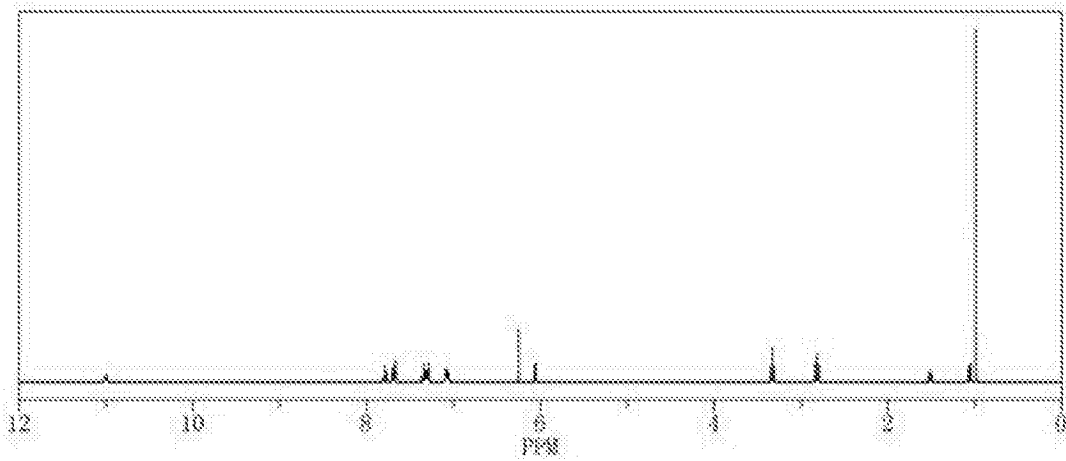


图4

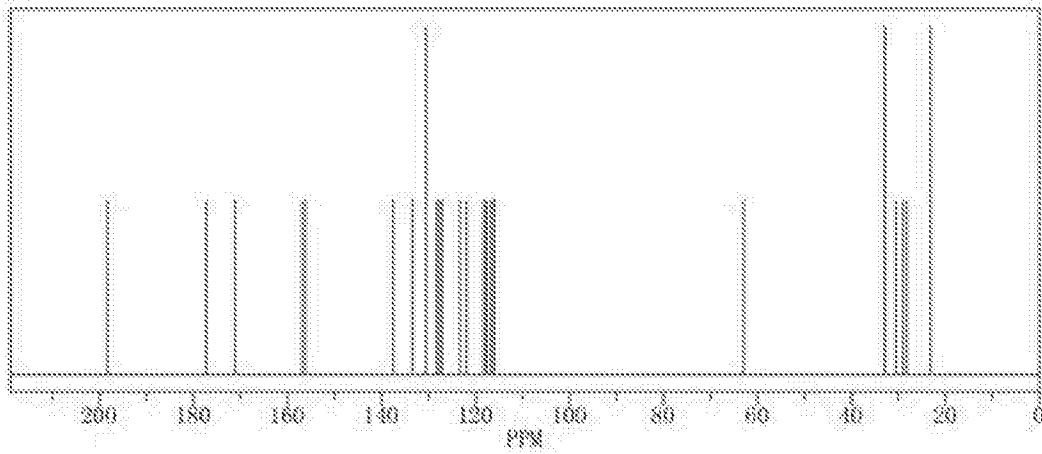


图5

专利名称(译)	高效氯氟氰菊酯半抗原的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN105732788A	公开(公告)日	2016-07-06
申请号	CN201610159906.7	申请日	2016-03-21
[标]申请(专利权)人(译)	贵州勤邦食品安全科学技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	贵州勤邦食品安全科学技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	贵州勤邦食品安全科学技术有限公司		
[标]发明人	冯才伟 汪善良 扶胜 蔡韬 陆苇 谢体波 刘红 李平 王大敏 牛治存		
发明人	冯才伟 汪善良 扶胜 蔡韬 陆苇 谢体波 刘红 李平 王大敏 牛治存		
IPC分类号	C07K14/435 C07K14/765 G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	C07K14/435 C07K14/765 G01N33/531 G01N33/68 G01N2333/47 G01N2333/765 G01N2430/12		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种高效氯氟氰菊酯半抗原的制备方法和应用。本发明所提供的高效氯氟氰菊酯半抗原合成方法是以高效氯氟氰菊酯为原料与琥珀酸酐经一步反应合成制备获得，半抗原与载体蛋白偶联得到高效氯氟氰菊酯抗原。实验结果表明，本发明合成的高效氯氟氰菊酯半抗原的方法简单，所得到的高效氯氟氰菊酯半抗原产率和纯度都较高，利用本发明合成的半抗原与载体蛋白偶联获得的抗原对实验动物进行免疫，得到特异性好，灵敏度高的单克隆抗体，用该抗体建立的酶联免疫试剂盒和试纸条使用方便、经济实惠、检测方法高效、准确，可同时检测大批量的样本，能满足高效氯氟氰菊酯残留的现场监控和大量样本的筛查的需求。

