

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710020231.9

[43] 公开日 2007年8月15日

[11] 公开号 CN 101017165A

[22] 申请日 2007.3.9

[21] 申请号 200710020231.9

[71] 申请人 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心

地址 214081 江苏省无锡市滨湖区山水东路9号

[72] 发明人 吴伟 杨健 瞿建宏 刘洪波

[74] 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所

代理人 殷红梅

权利要求书1页 说明书6页

[54] 发明名称

甲氰菊酯人工抗原的制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种甲氰菊酯人工抗原的制备方法，属于免疫化学分析技术领域。其主要取甲氰菊酸，溶于乙醇溶液中，经溶解后离心，取上清液待用；再取牛血清白蛋白和碳二亚胺，分别溶于无菌水中；向牛血清白蛋白溶液中边搅拌边缓慢滴加甲氰菊酸和碳二亚胺溶液，于冰浴下遮光反应；再向上述混合液中滴加剩余的碳二亚胺溶液，于冰浴下继续遮光反应；经离心取上清液于透析袋中透析，经冻存获得人工抗原。本发明通过紫外光谱扫描、SDS 凝胶电泳和免疫动物的方法，证实人工抗原合成成功；本方法操作简便，一步完成反应，克服了其它方法繁琐、生产率低、特异性差等缺点，为以后筛选出它的特异性抗体和建立免疫分析方法提供基础。

1、一种甲氰菊酯人工抗原的制备方法，其特征是采用以下工艺步骤：

(1)、取 50~200mg 甲氰菊酸，溶于 1~5mL 25%的乙醇溶液中，经溶解 4~6h 后离心，取上清液；

(2)、取 100~400mg 牛血清白蛋白和 50~200mg 碳二亚胺，分别溶于 5~10mL 和 1~6mL 的无菌水中；

(3)、向牛血清白蛋白溶液中边搅拌边缓慢滴加 1~5mL 的甲氰菊酸和 1~3mL 的碳二亚胺溶液，于 3.8~4.2℃冰浴下遮光反应 5~7h；

(4)、再向上述混合液中滴加剩余的 1~3mL 碳二亚胺溶液，于 3.8~4.2℃冰浴下继续遮光反应 23~25h；

(5)、反应结束后，经离心后，取上清液于透析袋中，于 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 缓冲液中，在 3~5℃温度下透析 4~6d，透析后于 -18~-22℃冻存。

2、根据权利要求 1 所述的甲氰菊酯人工抗原的制备方法，其特征在于所述的牛血清白蛋白可采用卵清蛋白。

3、根据权利要求 1 所述的甲氰菊酯人工抗原的制备方法，其特征在于所述的离心速度为：3800~4200r/min，离心时间为：8~12 min。

4、根据权利要求 1 所述的甲氰菊酯人工抗原的制备方法，其特征在于所述的冻存时间：在六个月之内。

甲氰菊酯人工抗原的制备方法

技术领域

本发明涉及一种甲氰菊酯人工抗原的制备方法，具体地说是利用碳二亚胺法，将甲氰菊酯[Fenpropathrin, (RS)- α -氰基-3-苯氧苄基 2, 2, 3, 3-四甲基环丙烷羧酸酯]生产过程中的一种非常重要的前体物质甲氰菊酸(2, 2, 3, 3-四甲基环丙烷羧酸)与载体分子(蛋白质)直接交联制备甲氰菊酯人工抗原的方法，属于免疫化学分析技术领域。

背景技术

在免疫学领域中,为使无免疫原性的小分子物质(常称为半抗原,Hapten)能在动物体内诱发产生抗体,常要将这种半抗原与某种大分子载体如蛋白质或多肽等交联结合而成为人工抗原,再注射进动物体内产生抗体,提纯抗体之后,即可用于免疫分析,它是当前临床医学、食品检测、农药残留分析中最活跃的领域之一。

众所周知,拟除虫菊酯杀虫剂性质稳定,杀虫谱广,杀虫活性高,属神经性毒剂,在世界上应用非常广泛,在中国也是用量增长最快的农药之一。其中甲氰菊酯是应用较多的一种。甲氰菊酯对高等动物的毒性中等,但对鱼类等水生生物为高毒,1-2 μ g/L可致鱼死亡,而且常温下在底泥中的半衰期较长,可在水体环境及水生生物体内蓄积和残留,对水生生态环境存在一定的潜在风险。因此水体环境或水生生物体内甲氰菊酯的含量检测显得十分重要。

目前国际上惯用的甲氰菊酯残留的标准分析方法是气相色谱(GC)法和高效液相色谱(HPLC)法。但这些方法需要昂贵的仪器和试剂,冗长的样品前处理过程,无法满足大批样品现场快速检测的需要。近年来国际上十分重视酶联免疫(ELISA)检测技术,这种方法快速、灵敏,具有很好的选择性和专一性,并节省了复杂的样品前处理步骤。

为了建立甲氰菊酯的免疫测定方法,首先必须得到抗甲氰菊酯的抗体。甲氰菊酯分子结构简单,分子量(349.4)小,属于半抗原,不能直接免疫制备抗体。必须首先将其与载体蛋白偶联制备出它的完全抗原,才能诱发动物

产生抗体。在已有技术中，曾采用碳二亚胺法对甲氰菊酯与牛血清白蛋白（BSA）进行了直接偶联，但不成功，原因是甲氰菊酯本身无游离羧基，无法与BSA上的氨基脱水交联。由于采用ELISA方法测定甲氰菊酯国内至今无成功先例，国外的文献也仅有Wengatz的报导，其在甲氰菊酯的芳香环端引入羧基与BSA偶联，但反应条件比较苛刻，生产效率低，且实验过程比较复杂具备。因此甲氰菊酯人工抗原的合成十分重要。

发明内容

本发明的目的在于克服上述不足之处，从而提供一种甲氰菊酯人工抗原的制备方法，其应用碳二亚胺将甲氰菊酸和牛血清白蛋白偶联，构建出人工结合抗原；本方法操作简便，一步完成反应，克服了其它方法繁琐、生产率低、特异性差等缺点，为建立甲氰菊酯的免疫学分析技术奠定了基础。

本发明的主要解决方案是这样实现的：

本发明甲氰菊酯人工抗原的制备方法采用以下工艺步骤：

1、取50~200mg甲氰菊酸，溶于1~5mL 25%的乙醇溶液中，经溶解4~6h后离心，取上清液；

2、取100~400mg牛血清白蛋白（BSA）和50~200mg碳二亚胺（EDC），分别溶于5~10mL和1~6mL的无菌水中；

3、向牛血清白蛋白（BSA）溶液中边搅拌边缓慢滴加1~5mL的甲氰菊酸上清液和1~3mL的碳二亚胺（EDC）溶液，于3.8~4.2℃冰浴下遮光反应5~7h；

4、再向上述混合液中滴加剩余的1~3mL碳二亚胺（EDC）溶液，于3.8~4.2℃冰浴下继续遮光反应23~25h；

5、反应结束后，经离心后，取上清液于透析袋中，于0.01mol/L、pH7.4的PBS缓冲液中，在3~5℃温度下透析4~6d，每天更换2次透析液，透析完毕后分装，留小部份进行鉴定，其余于-18~-22℃冻存。

本发明所述的牛血清白蛋白（BSA）可采用卵清蛋白（OVA）。

本发明所述的离心速度为：3800~4200r/min，离心时间为：8~12min。

本发明所述的冻存时间：六个月之内。

本发明与已有技术相比具有以下优点：

本发明选用合成甲氰菊酯的前体物质甲氰菊酸，在碳二亚胺的作用下与牛血清白蛋白直接偶联，经透析和冷冻后得到甲氰菊酯的人工抗原，产物上所连接的小分子具有半抗原的结构，丝毫不改变其原有的构型；通过紫外光谱扫描、SDS 凝胶电泳和免疫动物的方法，证实人工抗原合成成功；本方法操作简便，一步完成反应，克服了其它方法繁琐、生产率低、特异性差等缺点，为以后筛选出它的特异性抗体和建立免疫分析方法提供基础。

具体实施方式

下面本发明甲氰菊酯人工抗原的制备方法将结合实施例作进一步描述：

实施例一：

本发明甲氰菊酯人工抗原的制备方法采用以下工艺步骤：

称取 50mg 甲氰菊酸[Fenprothrin, (RS) - α -氰基-3-苯氧苄基 2, 2, 3, 3-四甲基环丙烷羧酸酯]，溶于 2mL 25%（重量百分数）的乙醇溶液中，溶解 4h 后进行离心，（上海精科实业公司生产的 800 型离心沉淀器），离心速度：4000r/min，离心时间：10min，取上清液待用。再取 100mg 牛血清白蛋白（BSA）和 50mg 碳二亚胺（EDC），分别溶于 5mL 和 3mL 的无菌水中，向牛血清白蛋白 BSA 溶液中边搅拌边缓慢滴加 2mL 的甲氰菊酸上清液和 2mL 的碳二亚胺（EDC）溶液，于 4℃冰浴下遮光反应 6h，再向上述混合液中滴加剩余的 1mL 碳二亚胺（EDC）溶液，于 4℃冰浴下继续遮光反应 24h。反应结束后，以 4000r/min 离心 10 min，取上清液于透析袋中（存余的料液去除），于 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 缓冲液中 4℃透析 5d，每天更换 2 次透析液，透析完毕后分装，留小部份进行鉴定，其余于 -20℃冻存，冻存时间：六个月之内。经冷冻可获得人工抗原。

人工抗原的鉴定：人工免疫抗原的鉴定采用紫外光谱法、SDS 聚丙烯酰胺电泳法和免疫动物法。根据免疫复合物合成比例，取一定量 2mg/mL 甲氰菊酸溶液，4mg/mL 牛血清白蛋白（BSA）溶液，相当于 4mg/mL 蛋白的甲氰菊酸复合物稀释液，以含 25%（重量百分数）乙醇的 PBS 为参比，对牛血清白蛋白（BSA）、甲氰菊酸和甲氰菊酸-BSA 偶合物进行 200nm-800nm 的紫外光谱扫描，牛血清白蛋白（BSA）在 280nm 处有最大吸收，最大吸收值为 2.8；甲

氰菊酸在 230nm 处有最大吸收, 最大吸收值为 1.9; 甲氰菊酸-BSA 偶合物在 254nm 处有最大吸收, 最大吸收值为 2.2。三者的紫外扫描图谱出现明显交叉, 蛋白质大分子和化学小分子含有各自不同的紫外可见吸收峰, 但在偶联物紫外可见扫描光谱中表现各自光谱图迭加的性质, 说明甲氰菊酯和牛血清白蛋白 (BSA) 连接成功。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法可从样品的泳动率了解样品分子量的大小。样品分子量越小, 泳动率越大。甲氰菊酸与牛血清白蛋白 (BSA) 如果连接成功, 分子量就要大一些, 电泳时的谱带上就会有所差异。电泳结果可见牛血清白蛋白 (BSA) 和甲氰菊酯-BSA 有较为接近的电泳条带, 但牛血清白蛋白 (BSA) 的泳动率稍快于偶联物, 因为偶联物的分子量略大于牛血清白蛋白 (BSA)。

免疫动物证明产生了抗甲氰菊酯的抗体: (1) 选择健康新西兰白兔, 将免疫抗原用生理盐水稀释到 1.0 mg/mL, 吸入 1mL 到注射器中, 加入等量的弗氏完全佐剂(第 1 次免疫)或弗氏不完全佐剂(第 2 到第 5 次免疫), 通过医用 3 通阀将抗原和佐剂充分混合乳化。第 1-5 次背部皮下多点免疫; 第 6 次直接用免疫抗原 0.3 mL 耳静脉注射免疫。每次免疫间隔时间为 7d, 总计免疫 42d。免疫结束后从兔子的耳静脉取血 (约 0.5mL), 放置在 4℃冰箱中过夜。第 2 天取出, 4000r/min 离心, 可得约 0.2mL 左右的抗血清。也可在冰箱中放置 2 小时后离心。抗血清测定方法采用 ELISA 酶标仪法。(2) 间接竞争 ELISA 试验 在每条 12 孔的酶标板的每孔中加入 100 μL 用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液稀释的包被抗原, 内含 2.5 μg 的甲氰菊酸-OVA, 37℃孵育 1h 后, 移入 4℃冰箱放置过夜。取出后用含 0.5%Tween-20 的 PBS 缓冲液 (pH7.5, 0.01mol/L) 洗涤三次后甩干。在每条的前 1~2 孔加入 50 μL 含 0.1%明胶的 pH7.5, 0.01mol/L 的 PBS 稀释液, 3~4 孔加入用稀释液配制的标准甲氰菊酯溶液 50 μL, 内含 5 μg 甲氰菊酯标准品, 5~6 孔同 3~4 孔, 内含 10 μg 甲氰菊酯标准品, 7~8 孔内含 20 μg 甲氰菊酯标准品, 9~10 孔内含 100 μg 甲氰菊酯标准品, 11~12 孔加入 50 μL 稀释液, 然后在前 10 孔中加入用稀释液配制的 1:400 的抗血清 50 μL, 11~12 孔还是加入 50 μL 的稀释液, 加

完后放入 37℃ 恒温水浴中孵育 1h, 取出, 同上用 Tween-PBS 缓冲液洗涤三次, 然后每孔加入 100 μ L 用稀释液配制的 1: 5000 的羊抗兔酶标二抗, 37℃ 恒温水浴中孵育 1h, 取出用 Tween-PBS 缓冲液洗涤三次, 加入 100 μ L 用 pH5.0 柠檬酸配制的邻苯二胺和过氧化氢底物液, 37℃ 恒温水浴中放置 15min, 每孔加入 50 μ L 10% 硫酸, 然后在酶标仪上用 490nm 波长读取 OD 值, 取 6 孔平均计算结果。

竞争抑制 ELISA 试验结果

孔数	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12
OD ₄₉₀ 值	1.62	1.16	0.98	0.78	0.42	0.10

上表数据说明: 加入甲氰菊酯孔的颜色均比没加甲氰菊酯孔的颜色浅, 比对照孔深, 而且随着所加入的甲氰菊酯标准品的增加, 酶与底物反应的颜色变得越来越浅, 说明抗血清中存在能与甲氰菊酯反应的抗体, 从而证明兔子产生了抗甲氰菊酯的特异性抗体, 进一步证明人工抗原合成成功。

实施例二:

本发明甲氰菊酯人工抗原的制备方法采用以下工艺步骤:

称取 100mg 甲氰菊酸[Fenpropathrin, (RS) - α -氰基-3-苯氧苄基 2, 2, 3, 3-四甲基环丙烷羧酸酯], 溶于 3mL 25% 的乙醇溶液中, 溶解 4h 后离心, 取上清液。取 200mg 卵清蛋白 (OVA) 和 100mg 碳二亚胺 (EDC), 分别溶于 8mL 和 4mL 的无菌水中, 向卵清蛋白 (OVA) 溶液中边搅拌边缓慢滴加 3mL 的甲氰菊酸上清液和 3mL 的碳二亚胺 (EDC) 溶液, 于 4℃ 冰浴下遮光反应 6h, 再向混合液中滴加剩余的 1mL 碳二亚胺 (EDC) 溶液, 于 4℃ 冰浴下继续遮光反应 24h。反应结束后, 以 4000r/min 离心 10 min, 取上清液于透析袋中, 于 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 缓冲液中 4℃ 透析 5d, 每天更换 2 次透析液, 透析完毕后冷冻六个月可获得人工抗原。上述人工抗原采用实施例 1 中人工抗原的鉴定方法, 通过紫外光谱扫描、SDS 凝胶电泳和免疫动物的方法, 证实人工抗原合成成功, 为以后筛选出它的特异性抗体和建立免疫分析方法提供基础。

实施例三:

本发明甲氰菊酯人工抗原的制备方法采用以下工艺步骤:

称取 50mg 甲氰菊酸[Fenpropathrin, (RS) - α -氰基-3-苯氧苄基 2, 2, 3, 3-四甲基环丙烷羧酸酯], 溶于 2mL 25%的乙醇溶液中, 溶解 4h 后离心, 取上清液。取 100mg 牛血清白蛋白(BSA)和 100mg 碳二亚胺(EDC), 分别溶于 5mL 和 3mL 的无菌水中, 向牛血清白蛋白(BSA)溶液中边搅拌边缓慢滴加 2mL 的甲氰菊酸上清液和 2mL 的碳二亚胺(EDC)溶液, 于 4℃冰浴下遮光反应 6h, 再向混合液中滴加剩余的 1mL 碳二亚胺(EDC)溶液, 于 4℃冰浴下继续遮光反应 24h。反应结束后, 以 4000r/min 离心 10 min, 取上清液于透析袋中, 于 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 缓冲液中 4℃透析 5d, 每天更换 2 次透析液, 透析完毕后冷冻可获得人工抗原。用卵清蛋白(OVA)取代 BSA 可同样制得包被抗原。本实施例中获得的人工抗原采用实施例 1 中人工抗原的鉴定方法, 通过紫外光谱扫描、SDS 凝胶电泳和免疫动物的方法, 同样可证实人工抗原合成成功。克服了其它方法繁琐、生产率低、特异性差等缺点, 为建立甲氰菊酯的免疫学分析技术奠定了基础。

专利名称(译)	甲氰菊酯人工抗原的制备方法		
公开(公告)号	CN101017165A	公开(公告)日	2007-08-15
申请号	CN200710020231.9	申请日	2007-03-09
[标]申请(专利权)人(译)	中国水产科学研究院淡水渔业研究中心		
申请(专利权)人(译)	中国水产科学研究院淡水渔业研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	中国水产科学研究院淡水渔业研究中心		
[标]发明人	吴伟 杨健 瞿建宏 刘洪波		
发明人	吴伟 杨健 瞿建宏 刘洪波		
IPC分类号	G01N33/53		
代理人(译)	殷红梅		
其他公开文献	CN101017165B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种甲氰菊酯人工抗原的制备方法，属于免疫化学分析技术领域。其主要取甲氰菊酸，溶于乙醇溶液中，经溶解后离心，取上清液待用；再取牛血清白蛋白和碳二亚胺，分别溶于无菌水中；向牛血清白蛋白溶液中边搅拌边缓慢滴加甲氰菊酸和碳二亚胺溶液，于冰浴下遮光反应；再向上述混合液中滴加剩余的碳二亚胺溶液，于冰浴下继续遮光反应；经离心取上清液于透析袋中透析，经冻存获得人工抗原。本发明通过紫外光谱扫描、SDS凝胶电泳和免疫动物的方法，证实人工抗原合成成功；本方法操作简便，一步完成反应，克服了其它方法繁琐、生产率低、特异性差等缺点，为以后筛选出它的特异性抗体和建立免疫分析方法提供基础。

竞争抑制 ELISA 试验结果

孔数	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12
OD ₄₉₀ 值	1.62	1.16	0.98	0.78	0.42	0.10

上表数据说明：加入甲氰菊酯孔的颜色均比没加甲氰菊酯孔的