

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.⁷
C07K 14/765
G01N 33/531



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 01114706.7

[45] 授权公告日 2004 年 3 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 1141320C

[22] 申请日 2001.5.18 [21] 申请号 01114706.7

[71] 专利权人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山

[72] 发明人 孙远明 赵肃清 乐学义 黄晓钰

审查员 孙大龙

[74] 专利代理机构 广州粤高专利代理有限公司

代理人 伍宏达

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称 甲胺磷人工抗原制备方法

[57] 摘要

本发明是关于甲胺磷人工抗原制备方法。属于免疫学领域。O, S - 二甲基硫代磷酰氯在碱性条件下与载体蛋白质侧链上的活性基团直接磷酸化而偶联, 制备出人工完全结合抗原。通过用钼锑抗比色、红外光谱扫描和免疫动物实验, 证明人工抗原合成成功。本方法操作简便, 一步完成反应, 不使用桥结构, 因此, 不会产生针对桥的抗体, 方便特异性抗体的筛选。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、甲胺磷人工抗原合成方法，其特征在于用 O,S-二甲基硫代磷酰氯作为本抗原的合成前体物与蛋白质上氨基基因在碱性水溶液中，磁力搅拌下，直接磷酸化而偶联合成甲胺磷人工抗原，制备时，将蛋白质用蒸馏水配成 1—15%蛋白质溶液，在蛋白质溶液加入三乙胺，使 1—15%蛋白质溶液中的蛋白质与三乙胺的摩尔比为 1：600—1000，蛋白质溶液于冰浴中磁力搅拌 30 分钟后，逐滴加入稀释 3—5 倍的 O,S-二甲基硫代磷酰氯稀释液，其加入量为蛋白质与三乙胺混合溶液的总容积的 0.2—0.5 倍，继续冰浴磁力搅拌反应 30 分钟，静置分层后取水层透析 3 天，再将透析液冷冻干燥即得合成的甲胺磷人工抗原，上述的蛋白质为牛血清白蛋白（BSA），卵清蛋白（OVA），血兰蛋白（KLH）或人血清蛋白（HAS）。

2、根据权利要求 1 所说的甲胺磷人工抗原合成方法，其特征在于半抗原合成前体物 O,S-二甲基硫代磷酰氯用氯仿或甲苯作稀释溶剂。

甲胺磷人工抗原制备方法

本发明涉及利用蛋白质磷酸化的方法，将甲胺磷（O,S-二甲基硫代磷酰氨）生产过程中的一种非常活泼的前体产物 O,S-二甲基硫代磷酰氯与载体分子（蛋白质）直接交联制备甲胺磷人工抗原的方法，属于免疫学技术领域。

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，再注射进小鼠诱发产生抗体，提纯抗体以后，即可用于免疫分析，它是当前临床医学检测和食品残留分析中最活跃的领域之一。

众所周知，甲胺磷是国内外广泛使用的一种剧毒、高效有机磷农药，曾经是我国生产吨位最大的农药，对昆虫具有强烈的触杀和胃毒作用，对人畜也有很大的危害性；有的国家已经禁止使用。我国对甲胺磷农药的使用，有明文限制，禁止在短期作物上使用，如禁止在蔬菜作物上使用。但因食用甲胺磷残留过高的食品造成的中毒的现象仍时有发生，所以很有必要加强其安全监测工作。

目前对甲胺磷的检测方法主要有气相色谱法、高效液相色谱法、单扫描示波极谱法、薄层层析法、分光光度法、直接电位法等，这些方法需用复杂昂贵的仪器，而且每种方法都要经过繁琐的前处理，很难达到快速、简便的现场检测要求。如果能采用象医学上检测早孕、乙肝和爱滋病等类似的金标免疫或酶联免疫方法，则可达到快速、灵敏并能现场检测甲胺磷残留的需要。

为了建立其免疫分析方法，首先必须得到抗甲胺磷的抗体。甲胺磷分子结构简单，分子量（141）小，属于半抗原，不能直接免疫制取抗体。必须首先将其与载体蛋白质偶联制备出它的完全抗原，才能诱发动动物产生抗体。我们曾多

次尝试利用甲胺磷分子内的氨基基团用经典的碳二亚胺法（EDC）或戊二醛法来合成甲胺磷人工抗原，但均不成功。分析原因主要是因为甲胺磷分子内氨基是磷酰氨，不是伯胺基团，没有反应活性的原故。国内刘凤权等报道用 EDC 法合成了甲胺磷的人工抗原，并用紫外光谱扫描推算出人工抗原中半抗原与载体蛋白的克分子比为 3000 以上，根据我们的实验经验，认为这是不可能的。

国家专利局于 95 年 6 月公开的申请号为 94105042.4 专利中，介绍了一种磷化合物的人工抗原交联方法，本专利涉及利用桥结构 L-赖氨酸及 O-乙基二氯磷酸酯（EDCP）等缩合剂将有机磷化合物半抗原与载体蛋白质交联制备人工抗原的方法。我们用这种方法制备的人工抗原免疫小鼠，用抑制 ELISA 试验几乎检测不到抗甲胺磷的特异性抗体，说明这种方法不适用于甲胺磷人工抗原的合成，推测原因可能是因为甲胺磷分子太简单，过长的赖氨酸桥减弱了抗体对甲胺磷的亲合力。而且，甲胺磷分子内的其中一个基团是甲硫基，因此，甲胺磷分子不被包括在该公开专利中提到磷化合物范围之内。

本发明的目的在于寻找一种适当的试剂，用简单、实用的方法合成出甲胺磷的人工抗原，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。

本发明选用合成甲胺磷的前体产物 O,S-二甲基硫化磷酰氯与蛋白质上的氨基基团在碱性水溶液中，磁力搅拌下，直接磷酸化而偶联，经透析和冷冻干燥后得甲胺磷人工抗原，产物上连结的小分子具有半抗原的结构，丝毫不破坏和改变半抗原的构型。上述蛋白质可以是牛血清白蛋白(BSA),卵清蛋白(OVA),血兰蛋白(KLH)或人血清蛋白(HSA)。

本发明可以这样实现的：

将蛋白质用双蒸水配成 1~15%的浓度，在配成的 1-15%浓度的蛋白质溶液中加入三乙胺，使 1-15%的蛋白质溶液中的蛋白质与三乙胺的摩尔比为 1:600-1000，将蛋白质与三乙胺混合溶液置于冰浴中磁力搅拌 30 分钟后，逐滴加入预

先用氯仿或甲苯 3-5 倍稀释的 O,S-二甲基硫代磷酰氯稀释液,O,S-二甲基硫代磷酰氯稀释液的加入量为上述蛋白质与三乙胺混合溶液总容积的 0.2-0.5 倍,继续冰浴磁力搅拌反应 30 分钟,然后将反应液转入分液漏斗内,静置待分层后取出中间水层放入透析袋内,在蒸馏水中于 4℃透析,每 4 小时换水一次,最后冷冻干燥,即得到合成的甲胺磷人工抗原。

本发明具有操作简便,一步完成反应;不使用桥结构,不会产生征对桥的抗体,因此,方便特异性抗体的筛选等优点。

实例: 8ml 10% 牛血清蛋白 (BSA) 中加入 1.0 ml 三乙胺后,冰浴下磁力搅拌 30 分钟,然后逐滴加入 2.7ml 用氯仿 4 倍稀释的 O,S-二甲基硫代磷酰氯,继续反应 30 分钟后,反应液转入一小分液漏斗内,静置分层后将水层转入透析袋(截止分子量 10000),用蒸馏水透析 3 天,其间每 4 小时换水一次,最后将透析液冷冻干燥即得合成的人工抗原(简称 BSAM)。用卵清蛋白(OVA)代替 BSA 可同法合成包被抗原(简称 OVAM)。

人工抗原的鉴定:

用钼锑抗比色法测定磷的浓度,计算人工抗原中的半抗原与载体蛋白(BSA)的分子偶联比为 26。

人工免疫抗原 BSAM 与原载体蛋白 BSA 红外光谱图比较,人工抗原 BSAM 红外光谱图中多出 1027cm^{-1} 和 789cm^{-1} 两个吸收峰,这两个峰分别为 $\nu\text{P}=\text{O}(\text{vs})$ 和 $\nu\text{P}-\text{N}(\text{s})$ 特征吸收峰,更进一步说明人工抗原合成成功。

免疫动物证明产生了抗甲胺磷的抗体:(1) 小鼠免疫实验 用 0.8%的生理盐水将上述合成的 BSAM 配成 1.0mg/ml 的溶液,第一次免疫用 0.5ml 完全弗氏佐剂与上述配好的 BSAM 等量混合,充分乳化后,每只小鼠(Balb/c 鼠,6 周龄)注射 0.2ml,相当于 $100\mu\text{g}$ 蛋白质,共免疫 4 只小鼠。每隔 2 周,换用不完全弗氏佐剂同上法再加强免疫 3 次。第 4 次免疫后 15 天取小鼠尾部血,制备抗血清。(2)

ELISA 竞争抑制试验 在每条 12 孔的酶标条内每孔加入 100 μ l 用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释的包被抗原,内含 2 μ g OVAM,37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 1h 后,移置 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。取出用 PBST 洗三次 (PBST: PBS 20nmol/L, 0.05%Tween-20,pH 7.4), 甩干。从中取三条放在酶标板上, 在每条的前 1-2 孔 (共 6 孔) 加入 50 μ l 二抗稀释液 (PBS 配制, 内含 0.1%的明胶), 3-4 孔加入用二抗稀释液配制的标准甲胺磷液 50 μ l, 内含 5 μ g 标样甲胺磷, 5-6 孔同 3-4 孔, 内含 10 μ g 标样甲胺磷, 7-8 孔内含 20 μ g 标样甲胺磷, 9-10 孔内含 100 μ g 标样甲胺磷, 11-12 孔也加入 50 μ l 二抗稀释液, 然后每条的前 10 孔均加入用二抗稀释液配制的 1:200 上述抗血清 50 μ l, 11-12 孔还是加入 50 μ l 二抗稀释液, 加完后放在 37 $^{\circ}$ C 恒温水箱孵育 1h, 取出, 用 PBST 洗三次, 然后每孔加入 100 μ l 用二抗稀释液配制的 1:5000 的羊抗鼠酶标二抗, 37 $^{\circ}$ C 恒温水箱孵育 1h, 取出用 PBST 洗三次, 加入 100 μ l 用 pH5.0 磷酸-柠檬酸配制的邻苯二胺和过氧化氢底物液, 37 $^{\circ}$ C 恒温水箱密封放置 15min 后, 每孔加入 50 μ l 10% 硫酸, 然后在酶标仪上用 492nm 波长读取 OD 值, 取 6 孔平均计算结果如下:

竞争抑制 ELISA 实验结果

孔数	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12
OD 值	1.41	1.05	0.88	0.69	0.51	0.08

上表数据说明: 加入甲胺磷孔的颜色均比没加甲胺磷的孔颜色浅, 比对照深, 而且随着标准甲胺磷加入的增多, 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胺磷反应的抗体, 从而证明小鼠产生了抗甲胺磷的特异性抗体, 进一步证明人工抗原合成成功。

专利名称(译)	甲胺磷人工抗原制备方法		
公开(公告)号	CN1141320C	公开(公告)日	2004-03-10
申请号	CN01114706.7	申请日	2001-05-18
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	孙远明 赵肃清 乐学义 黄晓钰		
发明人	孙远明 赵肃清 乐学义 黄晓钰		
IPC分类号	C07K14/765 G01N33/531		
其他公开文献	CN1325908A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是关于甲胺磷人工抗原制备方法。属于免疫学领域。O, S-二甲基硫代磷酰氯在碱性条件下与载体蛋白质侧链上的活性基团直接磷酸化而偶联, 制备出人工完全结合抗原。通过用钼锑抗比色、红外光谱扫描和免疫动物实验, 证明人工抗原合成成功。本方法操作简便, 一步完成反应, 不使用桥结构, 因此, 不会产生针对桥的抗体, 方便特异性抗体的筛选。

竞争抑制 ELISA 实验结果

孔数	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12
OD 值	1.41	1.05	0.88	0.69	0.51	0.08