

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710070227.3

[51] Int. Cl.
C07K 14/76 (2006.01)
C07D 231/44 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008年1月9日

[11] 公开号 CN 101100486A

[22] 申请日 2007.7.26
[21] 申请号 200710070227.3
[71] 申请人 浙江大学
地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路 38 号
[72] 发明人 金茂俊 朱国念 程敬丽 桂文君

[74] 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公司
代理人 唐银益

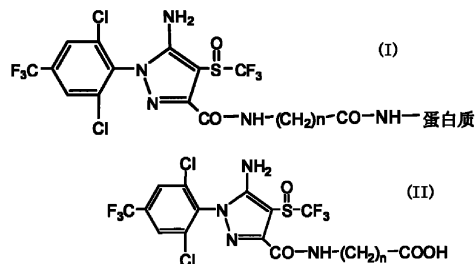
权利要求书 2 页 说明书 14 页

[54] 发明名称

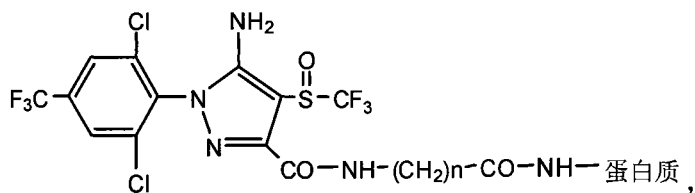
氟虫腈人工抗原、抗体及其用途

[57] 摘要

本发明公开了一种氟虫腈人工抗原，它的分子结构式为(I)， $n = 1 \sim 5$ ；是以(II)其中 $n = 1 \sim 5$ 为半抗原，与蛋白质共价偶联合成的，其中半抗原与蛋白质的结合比在 $5 : 1 \sim 100 : 1$ ；蛋白质为牛血清白蛋白或卵清蛋白。本发明还公开了由上述人工抗原制成的氟虫腈特异性抗体，该抗体能用于检测样品中氟虫腈的残留量。本发明还公开了适用于氟虫腈残留分析的直接或间接竞争酶联免疫吸附测定试剂盒。



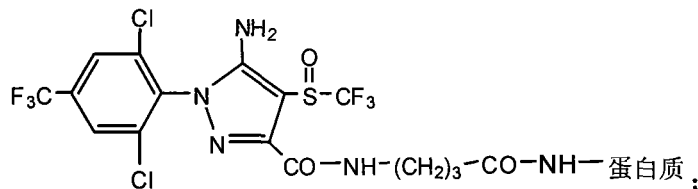
1、一种氟虫腈人工抗原，其特征在于它的分子结构式为：



$n=1\sim 5$ ；是以

其中 $n=1\sim 5$ 为半抗原，与蛋白质共价偶联合成的，其中半抗原与蛋白质的结合比在 5：1~100：1；所述蛋白质为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

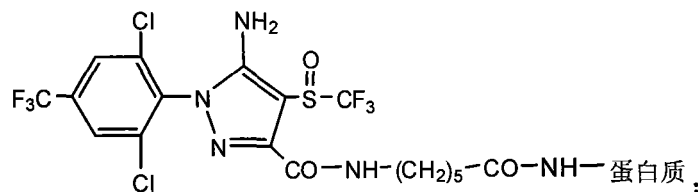
2、根据权利要求 1 所述的氟虫腈人工抗原，其特征在于 $n=3$ ，分子结构式为：



是以

为半抗原，与蛋白质共价偶联合成的，其中半抗原与蛋白质的结合比在 5：1~100：1。

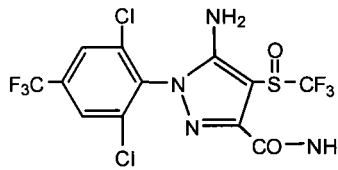
3、根据权利要求 1 所述的氟虫腈人工抗原，其特征在于 $n=5$ ，分子结构式为：



是以

为半抗原，与蛋白质共价偶联合成的，其中半抗原与蛋白质的结合比在 5：1~100：1。

4、一种氟虫腈特异性抗体，其特征在于：是用分子结构式为



CO-NH-(CH₂)_n-CO-NH-蛋白质，其中 n=1~5 的氟虫腈人工抗原免疫白鼠或兔子所得到的、能与氟虫腈发生特异性免疫反应的单克隆或多克隆免疫球蛋白 G。

5、一种如权利要求 4 所述的氟虫腈特异性抗体的用途，其特征在于：用于检测样品中氟虫腈的残留量。

6、一种适用于氟虫腈残留分析的直接或间接竞争酶联免疫吸附测定试剂盒，其特征在于：在酶标板的每孔内，由包被液包被氟虫腈特异性抗体并用 1.0~3.0%脱脂奶粉进行封闭；盒内试剂包含洗涤液、底物稀释液、氟虫腈标准溶液、辣根过氧化物酶标记的氟虫腈半抗原、底物、显色物质和反应终止液。

氟虫腈人工抗原、抗体及其用途

技术领域

本发明涉及选择一种具有-COOH的、又最大可能包含氟虫腈原有结构的化合物作为氟虫腈半抗原制备的人工抗原、人工抗体以及抗体的用途。

背景技术

本发明属于农药小分子化合物（分子量小于 1000 道尔顿）免疫化学和残留分析技术领域，涉及有机合成，免疫化学及生物化学等，依靠免疫学、免疫化学基本原理和生物技术手段，设计、合成小分子目标分析物半抗原，并与载体蛋白质偶联，制备有效人工抗原，免疫动物制备对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和易被检测识别的标记物的放大作用，定量地检测样本中超微量小分子目标分析物，具有特异、灵敏、准确、快速、方便、廉价等特点，该技术研究的关键是半抗原的分子设计、合成和人工全抗原及抗体的制备，因此，目标分析物分子免疫学特性以及如何通过化学或生化技术突出和利用这些特性是该领域极为重要的研究内容，这一技术目前已成为农药残留痕量分析研究的一个崭新领域，被列为当前优先研究、开发和利用的农药残留分析技术，世界粮农组织（FAO）已向许多国家推荐此项技术，美国化学将免疫分析与气相色谱，液相色谱共同列为农药残留分析的支柱技术。

影响免疫化学分析质量的根本因素是抗体的选择性（或特异性）与亲和性，这些性质又决定于免疫半抗原分子的结构，因此，免疫半抗原的分子设计与合成是建立小分子免疫化学分析的关键步骤。分子是构成物质的基础结构，化合物内部分子结构特征及分子间的组合方式等结构信息决定了化合物所表现的性质，也就是说，化合物的理化性质，生物活性及免疫原性等都是以分子为主体来表示和解释的。

农药小分子必须与大分子物质连接后才能刺激动物产生特异性抗体，这已成为小分子免疫分析的基本模式。因此，半抗原的合成与鉴定试验是产生特异性抗体和建立农药残留快速检测技术研究最基础和最关键的步骤。理想的半抗原一方面应具备待测物的特征结构，特别是立体化学特征，另一方面半抗原与载体连接后应保证待测物的特征结构能最大程度地为免疫活性细胞识别和结合，以制备出具有预期选择性的抗体。①半抗原通常由待

测物衍生化制备，或由原料合成，待测物的代谢或降解产物往往是有用的半抗原；②除待测物特征结构外，在半抗原的末端需有可直接或间接与载体蛋白质偶联的活性基团；③在活性基团与载体之间，必须有一定长度的间隔臂，以便使半抗原突出于载体表面，易为有机免疫系统识别；④间隔臂应远离待测物的特征结构部分和官能团；⑤半抗原的设计应考虑到农药原药和有毒理学意义的代谢物，以及测定对象是单一的农药或某一类农药；⑥机体的免疫应答是个十分复杂的生化过程，半抗原诱导的抗体的选择性和亲合性尚难预测，多数情况下宜合成几种结构的半抗原进行研究。

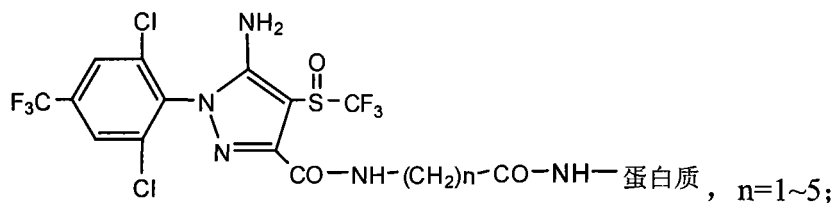
氟虫腈，商品名锐劲特，是拜耳作物科学公司（原罗纳普朗克农化公司）于 1987 年开发出来的一种苯基吡唑类杀虫剂，其杀虫谱广，对害虫以胃毒作用为主，兼有触杀和一定的内吸作用，对蚜虫、叶蝉、飞虱、鳞翅目幼虫、蝇类和鞘翅目等重要害虫有很高的杀虫活性，对作物无药害，与常规农药无交互抗性。适用于水稻、蔬菜、棉花、烟草、马铃薯、甜菜、大豆、油菜、茶叶、苜蓿、甘蔗、高粱、玉米、果树、森林、观赏植物、公共卫生、畜牧业、贮存产品及地面建筑等防除各类作物害虫和卫生害虫。该品种同时获得多国专利，全球销售额突破 1 亿美元，成为农药杀虫剂中支柱产品之一，在 90 个国家销售。

氟虫腈对水稻二化螟、稻飞虱、蝗虫、小菜蛾等害虫有较好的防治效果。随着该农药在全球的销量不断上升，以及人们对农药的误用、滥用，环境样品中氟虫腈的残留情况日趋严重。而且该农药具有慢性神经毒性作用，300mg/kg 的经口剂量可致小鼠甲状腺癌，被定为 C 类致癌物质。尤其是该农药对水生甲壳类动物鱼、虾、蟹的毒性特高（剧毒），对蜜蜂的毒性也相当高（高毒），并且在环境中代谢缓慢，其中有两种代谢产物的毒性高出母体农药对哺乳动物毒性的 10 倍以上，且在生物体脂肪内有富集作用，是一种生态环境毒副作用较大的农药，需要对其进行严格的监控。

发明内容

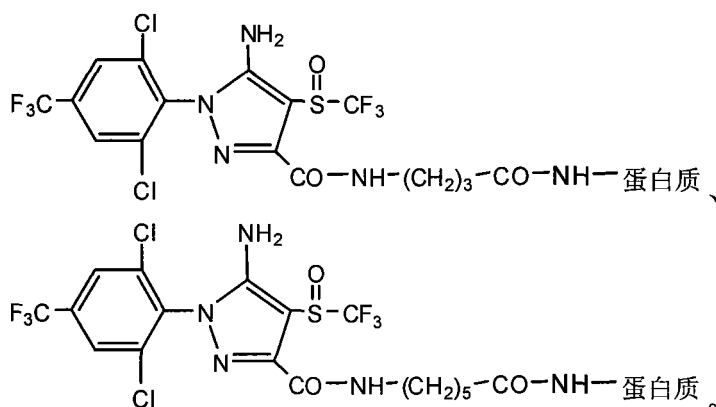
针对现有技术中存在的不足之处，本发明提供一种能最大程度保留了氟虫腈的化学结构，又由具有可调节长度的连接臂的半抗原制备的人工抗原、人工抗体；以及此类抗原、抗体的用途。

本发明提供了基于人工半抗原的氟虫腈人工抗原，是最大程度包含氟虫腈的结构，又具有可以与氨基酸偶联的基团-COOH，它的分子结构式为：



是以 (其中 $n=1\sim5$) 为半抗原, 与蛋白质共价偶联合成的, 其中半抗原与蛋白质的结合比在 5:1~100:1; 该蛋白质可选用牛血清白蛋白或卵清蛋白。

其中优选的氟虫腈人工抗原分子结构式为:



本发明还提供了氟虫腈特异性抗体, 是用上述氟虫腈人工抗原免疫白鼠或兔子所得到的、能与氟虫腈发生特异性免疫反应的单克隆或多克隆免疫球蛋白 G。

本发明同时提供了上述氟虫腈特异性抗体的用途, 用于建立氟虫腈快速检测的直接和间接竞争酶联免疫吸附分析技术、并进一步开发成氟虫腈残留分析的直接竞争或间接竞争酶联免疫吸附测定试剂盒, 可用于快速检测食品、农产品(蔬菜、稻米等)和环境样品中(土壤样品或水样品)氟虫腈的残留量。

本发明同时提供了用上述抗体建立的适用于氟虫腈残留分析的直接和间接竞争酶联免疫吸附测定试剂盒, 其特征在于: 在酶标板的每孔内, 由包被液包被氟虫腈特异性抗体并用 1.0~3.0%脱脂奶粉进行封闭; 盒内试剂包含洗涤液、底物稀释液、氟虫腈标准溶液、辣根过氧化物酶标记的氟虫腈半抗原、底物、显色物质和反应终止液。

为达到以上目的, 是通过这样的技术方案来实现的:

以合成出的半抗原化合物与蛋白质偶联制备人工抗原, 包括免疫抗原和包被抗原, 然后按照常规方法用免疫抗原对兔子、白鼠等动物进行免疫, 一段时间后对活体动物进行少量采血检验, 当检验动物体内的抗血清的效价达到一定程度时, 杀灭动物, 制备大量抗体(多抗血清采用兔子颈动脉放血; 单抗采用取脾融合后高通量筛选能分泌特异性抗体的细

胞株，后体外大量制备小鼠腹水)，用此氟虫腈的多克隆或单克隆抗体建立酶联免疫吸附法(ELISA)：

(1).将所述半抗原与抗体分别与辣根过氧化物酶共价偶联制备酶标半抗原和酶标抗体。用所述的包被抗原或抗体包被聚苯乙烯微孔板，加入待测样品(或氟虫腈标样)与酶标记物的混合液，氟虫腈、酶标记物与包被在微孔表面的包被原或抗体发生竞争性免疫结合反应，洗涤去除游离物，加入酶的底物和显色剂，酶促显色反应的强度与结合在包被原或抗体上的酶标记物的量成正比，与样品(或标样)中氟虫腈的含量成反比，据此建立氟虫腈直接竞争酶联免疫吸附分析技术。运用该技术，在盒体内设置可拆卸式微孔板、包被抗原或对氟虫腈具特异性亲和力的抗体、碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、封闭液、氟虫腈标样、酶标抗体或酶标半抗原、底物液、显色剂、终止液和使用说明书，制备氟虫腈直接竞争酶联免疫吸附分析试剂盒。

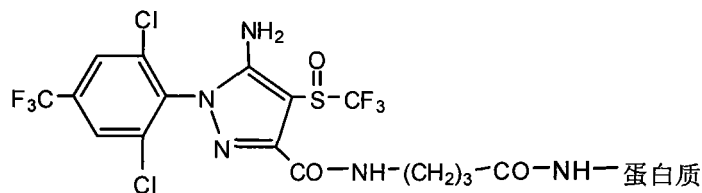
(2)用所述的包被抗原包被聚苯乙烯微孔板，加入待测样品(或氟虫腈标样)再加入所述抗体稀释液，氟虫腈与包被在微孔表面的包被原与抗体发生竞争性免疫结合反应，洗涤去除游离物，加入酶标二抗，孵育、洗涤后加入酶的底物和显色剂，酶促显色反应的强度与结合在包被原或抗体上的酶标记物的量成正比，与样品(或标样)中氟虫腈的含量成反比，据此建立氟虫腈间接竞争酶联免疫吸附分析技术。运用该技术，在盒体内设置可拆卸式微孔板、包被抗原或对氟虫腈具特异性亲和力的抗体、酶标记二抗、碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、封闭液、氟虫腈标样、底物液、显色剂、终止液和使用说明书，制备氟虫腈间接竞争酶联免疫吸附分析试剂盒。

用本发明的抗原体系免疫动物，所得的抗体的效价、特异性、亲和力都比较好。采用ELISA方法检测氟虫腈，最低检测限可达4.8ug/L(0.0048ppm)，检测灵敏度高。所建立的氟虫腈试剂盒适用于氟虫腈农药残留的快速检测，保存期试验表明该试剂盒在4℃下至少可保存6个月以上。

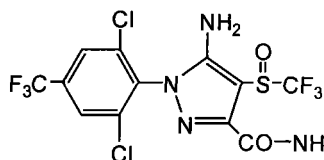
具体实施方式

实施例1、氟虫腈人工抗原及抗体的制备：

一种氟虫腈人工抗原，分子结构式为(此时 $n=3$)：



这种氟虫腓人工抗原，是由氟虫腓半抗原 FH1 与蛋白质偶联制备的，该半抗原 FH1



分子结构式为： $\text{CO-NH-(CH}_2\text{)}_3\text{-COOH}$ ，其中半抗原化合物与蛋白质的结合比为 5: 1~100: 1。

上述氟虫腓半抗原 FH1 根据本人同时申请的发明专利《氟虫腓半抗原化合物、合成方法及其用途》获得，具体合成方法如下：

1) 250ml 三口烧瓶中加入 4.51g 96.7%的氟虫腓原药 (0.01mol)，50ml 乙二醇，缓慢加热并搅拌使其溶解，待完全溶解后，缓慢滴加 6.92g85%的浓硫酸，继续加热搅拌 138~142⁰C 下回流反应 48 小时；反应结束后加入乙酸乙酯 30ml，乙醚 10ml 再加 100ml 水，转入 250ml 分液漏斗分层，再用 30ml 乙酸乙酯和 10ml 乙醚提取乙二醇与水层 2 次；合并乙酸乙酯和乙醚层，用饱和 NaHCO_3 溶液提取乙酸乙酯乙醚层 4 次，30ml/次； NaHCO_3 水层用浓盐酸调节 pH 至 3-4，有白色固体物质析出，再用乙酸乙酯提取水层 3 次，30ml/次；合并乙酸乙酯层，用无水 Na_2SO_4 干燥，减压浓缩，得淡黄色油状物 1.00g (化合物 3，即 5-氨基-1-(2,6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)-4-(三氟亚硫酸基)-1H-吡唑-3-甲酸，分子式为： $\text{C}_{12}\text{H}_5\text{N}_3\text{Cl}_2\text{F}_6\text{SO}_3$ ，收率 22.1%。

2) 称取化合物 3 粗品 0.64g 置 100ml 三口烧瓶中，恒压漏斗滴加 10ml 重蒸二氯亚砷 (SOCl_2 剧毒，操作在通风柜进行，并带防毒面具)，在 90⁰C 油浴上搅拌回流反应 3 小时，待反应物冷却后，减压脱去过量的二氯亚砷，得棕色油状物 (化合物 4，即 5-氨基-1-(2,6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-酰氯)，用 10ml 二噁烷 (1,4-二氧六环) 溶解后，成二噁烷溶液备用。

3) 称取 γ -氨基丁酸 0.3g，溶解于 2ml NaOH (4mol/L) 溶液中，将此溶液置于 100ml 三口烧瓶中，烧瓶置于冰浴，开动搅拌；分 5 次加入上述二噁烷溶液，间隔 5~10 分钟，后四次同时加入 1ml NaOH (4mol/L) 溶液，加液完毕后继续搅拌反应 2 小时。反应结束后，反应液中加 50ml 水，用 6N 盐酸溶液调节 pH 值为 4，将此混合液转移到 250ml 分液漏斗中，用乙酸乙酯提取 3 次，30ml/次；合并乙酸乙酯层，用饱和盐水洗涤至中性后用 7~8

%NaHCO₃ 溶液提取 4 次, 30ml/次; 30ml 乙醚去杂, NaHCO₃ 水层用浓盐酸调至 pH 至 3-4, 然后用乙酸乙酯提取水层 3 次, 30ml/次; 该乙酸乙酯层经无水 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩得淡黄色固体, 硅胶板分离 (乙酸乙酯: 石油醚: 甲酸=25: 75: 1.0), 得白色固体物质氟虫腓半抗原 FH1 (化合物 5, 即 4-(5-氨基-1-(2, 6-二氯-4-(三氟甲基) 苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-甲酰胺基) 丁酸, 分子式 C₁₆H₁₂N₄Cl₂F₆SO₄)。

一种氟虫腓特异性抗体, 是将上述氟虫腓人工抗原免疫白鼠或兔子所得到的、能与氟虫腓发生特异性免疫反应的单克隆或多克隆免疫球蛋白 G。用于检测食品、农产品和环境样品中氟虫腓的残留量; 环境样品为土壤样品或水样品。

上述氟虫腓人工抗原、抗体制作方法如下:

1、免疫原的合成与纯化

免疫原的合成利用碳二亚胺法。将 50~80 微摩尔半抗原 FH1, 溶解在 1~2mL 的 N, N-二甲基甲酰胺中, 然后在该溶液中加入等当量的二环己基碳二亚胺和 N-羧基琥珀酰亚胺, 让其在室温下反应过夜后, 离心, 取上清液 500~800μL 加入到 4~8mL 15~20mg/mL 的牛血清蛋白的碳酸盐缓冲溶液中, 加入时应缓慢, 然后在伴有磁力搅拌情况下反应 4~6 小时, 待反应完成后, 装入透析袋, 先用蒸馏水透析 2~4 次, 然后用 0.8~0.9% 生理盐水透析, 分装保存于 -20℃ 的冰箱中。

免疫抗原的鉴定:

按合成氟虫腓免疫抗原反应所用半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例, 分别进行紫外 (200nm~400nm) 扫描测定, 通过比较三者分别在 260nm 和 280nm 的吸光值计算其结合比。

半抗原 FH1 与 BSA 的结合比为 11:1。

2、包被抗原的合成

包被抗原的合成利用混合酸酐法。将 50~80 微摩尔半抗原 FH1, 溶解在 1~2mL 的 N, N-二甲基甲酰胺中, 然后在该溶液中加入等当量的正三丁胺和氯甲酸异丁酯, 让其在室温下反应 1 小时后, 取 500~800μL 反应液加入到 4~8mL 15~20mg/mL 的卵清蛋白的碳酸盐缓冲溶液中, 加入时应缓慢, 然后在伴有磁力搅拌情况下反应 2~6 小时, 待反应完成后, 装入透析袋, 先用蒸馏水透析 2~4 次, 然后用 0.8~0.9% 生理盐水透析, 分装保存于 -20℃ 的冰箱中。

人工抗原的鉴定

按合成氟虫腈免疫抗原反应所用半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例，分别进行紫外（200nm~400nm）扫描测定，通过比较三者分别在 260nm 和 280nm 的吸光值计算其结合比。

半抗原 FH1 与 OVA 的结合比为 16:1。

3、 抗体的制备

1) 多抗制备：

实验选用半周岁左右，体重为 2~3 公斤，健康的雄性家兔。每种免疫原免疫三只兔子（由浙江省中医学院负责兔子的饲养工作），分别编号为兔子 1~3。

实验免疫剂量基础免疫为 0.5 ~ 1.0mg/kg，加强免疫剂量为 1.0 ~ 1.5mg/kg，用生理盐水稀释适量 FH1-BSA，加入等体积弗氏完全佐剂（加强免疫时采用弗氏不完全佐剂），充分乳化，直至滴入水中乳滴不分散。采用背部皮下多点注射与大腿肌肉注射相结合的方法。背部皮下免疫 6 点，大腿肌肉注射 2 点，3 周后进行加强免疫，以后每隔 2 周再次加强免疫。从第三次免疫开始，每次免疫后第 8 天，从兔子耳缘静脉采血，测定效价和特异性。

待免疫血清效价上去后，就可进行采血。本实验采用颈动脉取血法。采血后，将采血瓶放置于 37℃温箱中半小时，待瓶中的血液凝固，然后用接种针沿瓶内壁将血块与玻璃脱离，再放到 4℃冰箱中 3~4 小时，待血块收缩后，用毛细吸管将血清吸入试管中，离心，分离出血清。

2) 单抗制备：

实验选用 6-10 周龄的 BALB/C 小鼠，20-22g，免疫 5-10 只小鼠。取 6—8 周龄体重 18-20g BALB/C 雌性小鼠，将制备的 FH1-BSA 与等体积弗氏完全佐剂混合，充分乳化后，经背腹部皮下多点注射，剂量为 50μg/每只，以后每隔 3 周，取抗原（与一免等剂量）和等体积的弗氏不完全佐剂充分乳化后腹腔和皮下注射加强免疫，加强免疫共 4 次，未免以加倍剂量的抗原进行腹腔注射，3 天后取脾细胞进行融合。后经 3-4 次有限稀释法克隆筛选得到一株细胞株 5B6，经多次体外传代和多次冻存复苏后，细胞株均能良好生长，并稳定分泌抗体。经扩大培养后，用于抗体制备和液氮保存。

抗体的纯化：

辛酸-硫酸铵盐析法是一个经典的方法。辛酸在偏酸性的条件下能将血清中除 IgG 以外的蛋白质都沉淀下来，上清液中只有 IgG。辛酸加入因抗体的来源不同而不同，人血清

为 70ul/ml,兔血清为 75ul/ml,小鼠血清为 40ul/ml,小鼠腹水为 33ul/ml。这种方法 IgG 的回收率达 90%以上。最后将抗体制成冻干粉,分装, -20℃ 保存。

抗血清效价测定:

免疫原复合物按常规方法免疫了三只兔子。从加强免疫第二次开始,在每次免疫后第 8 天于兔子耳缘静脉采血,血清经适当稀释后用间接 ELISA 测定效价。第 5 次免疫后,兔子获得了高效价的抗体,抗血清的效价为 1: 1.28×10^5 (指 OD_{490nm} 值等于 1.0 时的稀释倍数)。

BALB/C 小鼠腹腔注射降植烷 0.3ml/只,7-10 天后同法注射单克隆细胞 (5B6) $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个 (0.4ml/只),待小鼠腹腔明显胀大后抽取腹水,离心除去油脂沉淀后,即得小鼠腹水 McAb,腹水采用辛酸-硫酸铵法纯化,腹水效价为 1: 5.12×10^5 (指 OD_{490nm} 值等于 1.0 时的稀释倍数)。

抗体的特异性

用具有多种抗原决定簇的免疫原 (蛋白质或多肽) 制备的抗体,其中含的抗体分子往往是混合体。当有甲、乙两种抗原,其分子结构中具有相同或部分相同的抗原决定簇时,甲抗原可与乙抗原的抗体反应,而乙抗原也可与甲抗原抗体反应,称为交叉反应。抗体的特异性就是指它同特异性抗原结合的能力与同该抗原类似物结合能力的比较。常用交叉反应活性作为评价的重要标准。交叉反应越小,抗体的特异性则越好。

将特异性抗原及其类似物做系列稀释,分别与同一种 FH1-BSA 抗体,按制作标准曲线同样方法制作标准曲线,并在曲线上找出抑制率 50% 的剂量和类似物抑制率 50% 时的用量。然后计算出各类似物的交叉反应率。

抗 FH1-BSA 抗体 (多抗为例) 对各类似物的交叉反应率: 氟虫腓 100%,乙硫氟虫腓 3.2%,氟虫脲 0.13%,伏虫隆 0.41%,氟乐灵 0.28%,三氟氯氰菊酯 0.75%,定虫隆 0.81% 。

由此可知,所制备的抗体的特异性较强。

实施例 2 氟虫腓酶联免疫吸附测定方法建立与鉴定:

1、氟虫腓 ELISA 测定方法的建立及其工作条件和基本参数

将所述半抗原与抗体分别与辣根过氧化物酶共价偶联制备酶标半抗原和酶标抗体。用

所述的包被抗原或抗体包被聚苯乙烯微孔板，加入待测样品（或氟虫腓标样）与酶标记物的混合液，氟虫腓、酶标记物与包被在微孔表面的包被原或抗体发生竞争性免疫结合反应，洗涤去除游离物，加入酶的底物和显色剂，酶促显色反应的强度与结合在包被原或抗体上的酶标记物的量成正比，与样品（或标样）中氟虫腓的含量成反比，因而可根据已知量农药的标准线和待检样品的抑制率，推算出待测农药的浓度。

2、酶标抗体的制备

采用改良过碘酸钠法，将抗体与等量的辣根过氧化物酶（HRP）偶联。偶联物加入甘油，混匀，分装，-20℃保存。

3、酶标半抗原的制备

采用混合酸酐法，半抗原被活化后偶联到HRP上，反应液中HRP的浓度为10 mg/ml（半抗原与HRP的摩尔比为20:1）。反应完后加入等体积的甘油，混匀，分装，-20℃保存。

4、抗原抗体最适工作浓度的确定（例包被抗体法，下同）

用方阵滴定法，同时稀释特异性抗体和酶标半抗原。在同一包被抗体浓度下，随着酶标半抗原的稀释，所得的OD值呈下降趋势，同样在同一酶标半抗原稀释浓度下，随着包被抗体浓度的下降，所得OD值也呈下降趋势。通常选择OD值1.0左右时的抗体和酶标半抗原浓度作为工作浓度。从实验可知，当抗FH1-BSA抗体（FH1-Ab）为 $8.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，酶标半抗原FH1-HRP浓度为 $0.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时，OD值约等于1.0。

5、标准曲线和检测灵敏度

从低温冰箱中取出FH1-Ab，使之完全解冻后用包被液稀释成工作浓度下的包被抗体溶液（FH1-Ab： $8.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ）。96孔微量反应板用蒸馏水洗涤后，每孔加入上述包被液100 μL ，于37℃温箱中孵育2h。甩掉包被液，用PBST缓冲液洗涤，每孔加入封闭液300 μL ，于37℃温箱中孵育0.5h。甩掉封闭液，用PBST缓冲液洗涤，加入预先配制的氟虫腓各浓度标准液50 μL /孔，每浓度4孔重复，再加入预先配制的对应的酶标半抗原稀释液（FH1-HRP酶标半抗原： $1.0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ）50 μL /孔，设不加药对照和空白对照。放入37℃温箱中孵育1h，甩去孔内液体，用PBST溶液洗涤。加入OPD-过氧化氢底物溶液100 μL /孔，37℃温箱中孵育15min后加入2mol/L H₂SO₄ 50 μL /孔终止反应。在酶联仪上测定490nm波长下的吸光值。根据抑制与农药浓度之间的半对数关系作图即得到标准曲线。

ELISA 方法的标准曲线以抑制率与农药浓度的半对数曲线表示, 抑制率以下式计算: 抑制率 (%) = $\frac{(OD_{max} - OD_{min}) - (OD_x - OD_{min})}{(OD_{max} - OD_{min})} \times 100\%$

式中: OD_{max} 为不加药时的吸光值, OD_x 为农药 x 时的吸光值, OD_{min} 为空白对照孔的吸光值。

由上述公式计算得氟虫腈各浓度的抑制率, 作图。用 FH1-Ab 测定时, $I_{50} = 46.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $I_{20} = 4.8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。从图中还可知, 氟虫腈在 $3-500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 抑制率与氟虫腈浓度的对数值呈显著的线性关系, FH1-Ab 的相关系数为 $r = 0.9917$ 。

6、精密度

在 ELISA 实验中, 常采用批内和批间误差来表示其精密度。

1) 批内误差: 以标准曲线的批内平均变异系数来表示。标准曲线各剂量点的批内平均变异系数 $CV\% = 5.7\%$ (以 FH1-OVA 建立的 ELISA 方法为例, 下同)。

2) 批间误差: 以 5 块不同板上的测定结果进行平均, 求得标准曲线各剂量点的批间平均变异系数 $CV\% = 9.3\%$ 。

从批内和批间的数据可以看出, 氟虫腈含量高的样品在测定过程中, 其重复性较好, 批内批间的变异也较小, 且批内批间相差也较小。

7、添加回收率试验

样品前处理方法:

水样: 水样经过滤, 分别添加氟虫腈的标准溶液, 使水样中氟虫腈含量分别为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 设 0 水平的对照备用。

土样: 土样风干后过 40 目筛, 称取 1.0g (精确至 0.001g) 过筛样品, 加入氟虫腈标准液, 使土样中的氟虫腈含量分别为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 设 0 水平的对照, 再以 2mL 乙腈旋涡震荡提取 1min。离心 (4000rpm, 5 min), 吸取 1mL 上清液, 氮气吹干, 精确加入一定量的 PBS (含 10% 甲醇), 旋涡震荡 1min, 备用。

稻米: 称取 5g 预先捣碎的样品, 加入 3mL 水, 搅拌成均匀湿粉状, 静置 30 min, 加入氟虫腈标准液, 使样品中的氟虫腈含量分别为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 设 0 水平的对照, 再以 10ml 乙腈震荡提取 1min, 加入 1g 氯化钠和 4g 硫酸镁, 振摇 1 min, 离心 (4000rpm, 5 min), 吸取 1ml 上清液, 氮气吹干, 加入一定量的 PBS (含 10% 甲醇), 旋涡震荡 1min, 备用。

ELISA 测定回收率:

在已包被好的 96 孔板内每孔加入系列提取浓缩液 50 μ L, 重复 4 孔, 再每孔加入酶标半抗原稀释液 50 μ L, 空白对照孔加入 100 μ L PBST, 同时作标准曲线。盖好板, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, 甩去孔内液体, 用 PBST 溶液洗涤。加入 OPD-过氧化氢底物溶液 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 温箱中孵育 15min 后加入 2mol/L H₂SO₄ 50 μ L/孔终止反应。在酶联仪上测定 490nm 波长下的吸光值。根据各添加样品的抑制率, 查标准曲线计算出氟虫腈浓度并计算回收率。

以 FH1-Ab 建立的 ELISA 方法为例, 经分析可知, 该方法对水样 10 μ g \cdot L⁻¹ 添加, 平均回收率为 79.8%, 平均变异系数为 6.89%, 20 μ g \cdot L⁻¹ 添加, 平均回收率为 82.6%, 平均变异系数为 5.94%; 该方法对土样 10 μ g \cdot L⁻¹ 添加, 平均回收率为 70.2%, 平均变异系数为 9.75%, 50 μ g \cdot L⁻¹ 添加, 平均回收率为 79.5%, 平均变异系数为 6.25%; 该方法对稻米样 50 μ g \cdot L⁻¹ 添加, 平均回收率为 111.2%, 平均变异系数为 10.2%, 100 μ g \cdot L⁻¹ 添加, 平均回收率为 93.1%, 平均变异系数为 4.64%, 均符合农药残留分析的要求, 可用来实现氟虫腈在环境及蔬菜样品中农药残留的快速检测。

实施例 3 氟虫腈直接竞争酶联免疫吸附分析试剂盒制备实施例:

测定原理是: 首先将抗氟虫腈的特异性抗体包被于固相载体上, 然后加入待测农药和酶标半抗原, 待测农药与酶标半抗原竞争结合固相载体上的特异性抗体, 待测农药含量多, 则被结合在固相抗体上的酶标半抗原少, 反之结合在固相抗体上的酶标半抗原多, 反应后加入底物进行显色加以测定, 当酶标半抗原量一定时, 加入的待测农药量越多, 与固相抗体结合的酶标半抗原就越少, 发色反应减弱, 抑制率增高, 反之, 则发色反应增强, 抑制率减低, 根据系列农药浓度与其相应抑制率之间的半对数关系作图得标准曲线, 再根据该标准曲线推算出待测样品中的农药浓度。

试剂盒制备的技术路线包括半抗原的结构设计、半抗原合成、人工抗原的制备、抗体的制备、ELISA 方法选择、ELISA 条件优化, 定性定量方法的确定、试剂盒的组装。

试剂盒的基本组装: 在 96 孔酶标板的每孔内, 由包被液包被氟虫腈特异性抗体, 并用 1.0~3.0% 脱脂奶粉进行封闭, 盒内试剂包含重组缓冲液、洗涤液、底物稀释液、氟虫腈标准溶液、辣根过氧化物酶标记氟虫腈半抗原、30% 过氧化氢、显色物质和反应终止液, 其中:

- 1) 预包被好氟虫腈特异性抗体的酶标板, 无需洗涤;

- 2) 封板胶膜, 用来将抗原抗体的反应体系与外界环境隔开;
- 3) pH7.4, 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲溶液 PBS (0.27g KH_2PO_4 , 1.14g 无水 Na_2HPO_4 , 8.0g NaCl , 0.2g KCl , 双蒸水定容至 1L), 用来稀释氟虫腈标样和酶标半抗原;
- 4) 氟虫腈的甲醇标准溶液, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.0mL/瓶(母液, 供稀释用); 氟虫腈不同浓度系列 7.80, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 500ng/mL, 1.0mL/瓶, 直接可用, 有效期 1 个月;
- 5) 氟虫腈酶标半抗原, 使用时用磷酸盐缓冲液稀释至两倍工作浓度下现配现用;
- 6) 洗涤液(稀释液)一瓶, 40~80mL/瓶, 内含有氯化钠 7~9g、磷酸二氢钾 0.1~0.3g、磷酸氢二钠 2~4g、氯化钾 0.1~0.3g、吐温-20 0.5~3mL、双蒸水, 为正常使用的 15~30 倍浓缩液;
- 7) 底物稀释液一瓶, 30~50mL/瓶, 配制如下: 柠檬酸 3~6g, 磷酸氢二钠 1~3g, 双蒸水, 为正常使用的 5~10 倍浓缩液;
- 8) 底物为过氧化氢一瓶, 1~5mL/瓶;
- 9) 显色物质为邻苯二胺(OPD)6~10 支, 8~15mg/支;
- 10) 反应终止液一瓶, 30~50mL/瓶, 为 2mol/L 硫酸;
- 11) 氟虫腈试剂盒的使用说明书;

检测所需设备: 酶标仪(490nm), 离心机, 氮吹仪, 混合振荡器, 微量振荡器, 微量移液器(单通道 1-10 μl , 单通道 2-20 μl , 单通道 10-100 μl , 单通道 20-200 μl , 单通道 100-1000 μl , 单通道 500-5000 μl , 8 通道 10-100 μl , 8 通道 30-300 μl), 恒温恒湿温育箱, 剪切机。

试剂盒的最低检测限, 线性检测范围, 样品检测的批内、批间、整体变异系数以及样品添加回收率均符合残留检测的要求。试剂盒在 4 $^{\circ}\text{C}$ 或 20 $^{\circ}\text{C}$ 下至少可保存 6 个月以上。

实施例 4 氟虫腈快速检测酶联免疫试剂盒的使用:

试剂盒操作过程如下(在 18-27 $^{\circ}\text{C}$ 操作为佳):

- 1) 取酶标板, 待板恢复室温后, 记录板孔位置, 标准品和样品作双孔平行试验。用移液器吸取 100 μl 零标准缓冲液滴加于 A1 和 A2 孔中, 吸取 50 μl 零标准缓冲液和各氟虫腈标准液滴加于 B1、2—H1、2, 吸取 50 μl 各处理好的样品溶液滴加于其余微孔中;
- 2) 滴加 50 μl 酶结合物溶液于除 A1 和 A2 外的全部板孔;
- 3) 用封板胶膜封板, 用微量振荡器摇板 1 分钟;
- 4) 37 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温恒湿箱中温育 1 小时;
- 5) 洗板: 将酶标板上端朝下倒空各孔后, 再平稳快速向下垂直甩动, 并将酶标板倒

置在吸水纸上拍打以除去孔中的液体。再用洗涤缓冲液（300 μ l/孔）注入全部微孔，浸泡3min，若有微量振荡器可振荡20秒左右，再次倒掉微孔中液体。重复以上操作3遍。如使用自动洗板机，应确保全部酶标板孔已完全抽吸，以使在每一个清洗周期注入的清洗液可以达到每一个微孔的边缘，重复洗涤四次，在吸水纸上拍干。

6) 将100 μ l底物溶液加入各孔，用封板胶膜封板，37 $^{\circ}$ C下恒温恒湿箱中温育15分钟；

7) 将50 μ l终止液加入各孔；

8) 立即读取490nm吸光度值。

以所获得的标样和样品吸光值的平均值计算各孔的吸光值的抑制率

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min}) - (\text{OD}_x - \text{OD}_{\min})}{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min})} \times 100\%$$

OD_{\max} 为不加药时的吸光值， OD_x 为农药x时的吸光值， OD_{\min} 为空白对照孔的吸光值

计算的标样值绘成为一个对应氟虫腈浓度（mg/L）的半对数坐标系统曲线图，校正曲线在0.01~10mg/L范围内为线性，对应样品浓度可从校正曲线读出，也可根据标样的浓度与抑制率求出线性方程，然后求出对应样品的浓度。

实施例5 保存期试验：

1、冻融试验

冻融试验包括（1）酶标半抗原和（2）包被酶标板的冻融试验。方法（1）：将以优化的抗体浓度新包被的酶标板逐条编号（可拆卸式）和新制的酶标半抗原分装后（依次编号1~8号）密封包装，于-20 $^{\circ}$ C存放24h，取出1号酶标半抗原置于室温下0.5h后，重新于-20 $^{\circ}$ C存放1h，再取出1号和2号酶标半抗原置于室温下0.5h，再重新于-20 $^{\circ}$ C存放1h，重复上述过程，每次增加1个酶标半抗原，直至取到8号后，在酶标半抗原优化浓度条件下分别测定酶标板的OD值（每个编号的酶标半抗原用一条（12孔）板，板新包被），检查OD值发生明显变化的冻融次数；方法（2）：将新制的酶标半抗原和以优化的抗体浓度新包被的酶标板（可拆卸式，逐条编号，1~8号）密封包装，于-20 $^{\circ}$ C存放24h，包被好的酶标板按上述方法逐条取出，反复冻融，用未经冻融的酶标半抗原分别测定OD值，检查OD值发生明显变化的冻融次数。据此，氟虫腈试剂盒的冻融次数建议不大于8次。

2、（4 \pm 2） $^{\circ}$ C、（-20 \pm 2） $^{\circ}$ C保存期试验

将试剂盒放置于4 $^{\circ}$ C和-20 $^{\circ}$ C保存，分别取0，10，20，30，60，90，120，150和180d

的试剂盒，以最佳抗体抗原工作浓度为测定浓度，进行标准样品检测以测定其检测效果。保存期测定结果如下表：

表 1 试剂盒保存期试验结果（不同温度、保存时间下 OD 值变化情况）

Table1 Validity of ELISA kits

时间(d)		0	10	20	30	60	90	120	150	180
温度(°C)	4	1.103	1.100	1.102	1.099	1.098	1.090	1.087	1.077	1.076
	-20	1.103	1.102	1.100	1.101	1.100	1.099	1.095	1.090	1.087

以上结果可以看出，试剂盒在 4℃ 下至少可保存 6 个月以上。

最后，还需要注意的是，以上列举的仅是本发明的若干个具体实施例。显然，本发明不限于以上实施例，还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形，均应认为是本发明的保护范围。

专利名称(译)	氟虫腓人工抗原、抗体及其用途		
公开(公告)号	CN101100486A	公开(公告)日	2008-01-09
申请号	CN200710070227.3	申请日	2007-07-26
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	金茂俊 朱国念 程敬丽 桂文君		
发明人	金茂俊 朱国念 程敬丽 桂文君		
IPC分类号	C07K14/76 C07D231/44 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种氟虫腓人工抗原，它的分子结构式为(I)， $n = 1 \sim 5$ ；是以(II)其中 $n = 1 \sim 5$ 为半抗原，与蛋白质共价偶联合成的，其中半抗原与蛋白质的结合比在 $5:1 \sim 100:1$ ；蛋白质为牛血清白蛋白或卵清蛋白。本发明还公开了由上述人工抗原制成的氟虫腓特异性抗体，该抗体能用于检测样品中氟虫腓的残留量。本发明还公开了适用于氟虫腓残留分析的直接或间接竞争酶联免疫吸附测定试剂盒。

