



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105061584 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201510415569. 9

(22) 申请日 2015. 07. 16

(71) 申请人 河南科技大学

地址 471000 河南省洛阳市涧西区西苑路  
48 号

(72) 发明人 陈秀金 康怀彬 马丽苹 李松彪  
曹力 李兆周 孙军杰 辛莉

(74) 专利代理机构 洛阳公信知识产权事务所  
(普通合伙) 41120

代理人 罗民健

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/77(2006. 01)

C07K 1/14(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

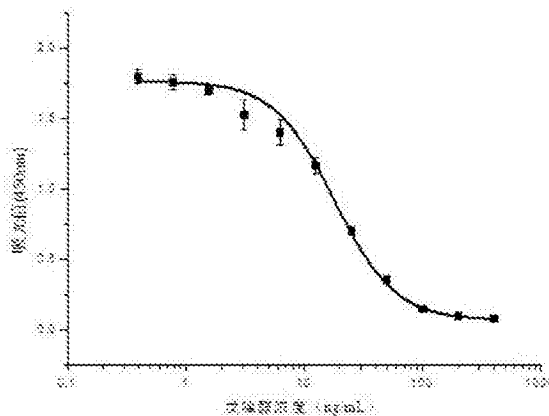
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种戊唑醇人工抗原的合成方法及其应用

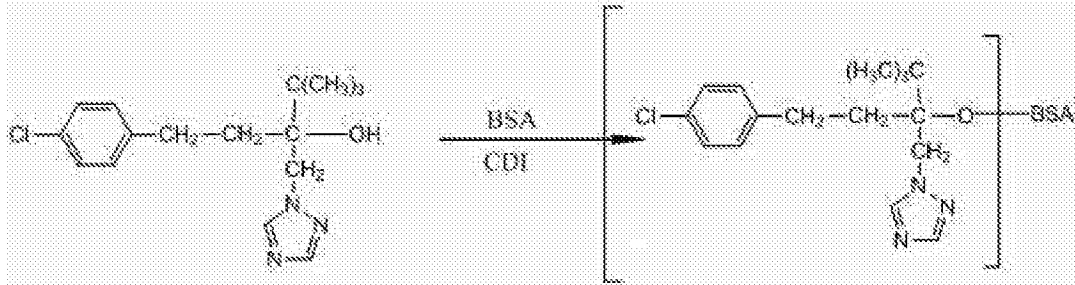
(57) 摘要

本发明涉及一种戊唑醇人工抗原的合成方法及其应用;所属戊唑醇人工抗原包括免疫原和包被原;其合成方法为,将戊唑醇即(RS)-1-对氯苯基-4,4-二甲基-3-(1H-1,2,4-三唑-1-基甲基)戊-3-醇,通过羧基二咪唑法和牛血清白蛋白BSA偶联,用作免疫原;然后将戊唑醇通过羧基二咪唑法和鸡卵清蛋白OVA相偶联,用作包被原;本发明成功合成了戊唑醇的人工抗原,合成步骤简单,有效,用该抗原可以制备出满足国内需求的戊唑醇抗体,并可以利用该抗体建立检测戊唑醇的各种免疫分析方法,为以后人们的研究提供了试验原料和简便的方法。

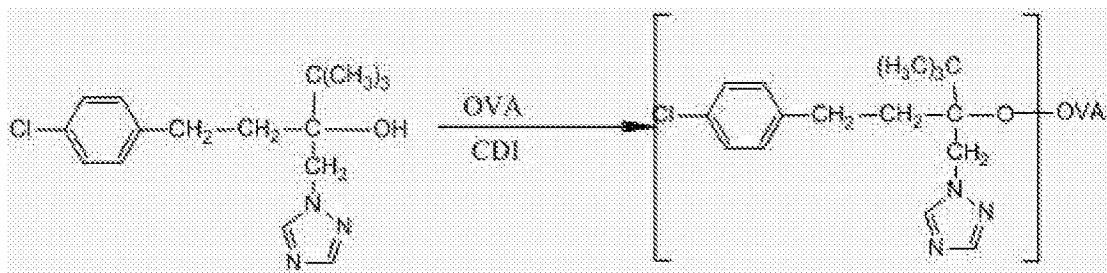


1. 一种戊唑醇人工抗原的合成方法,其特征在于:所述戊唑醇人工抗原包括免疫原和包被原,其合成方法包括以下步骤:

步骤一、将戊唑醇采用羧基二咪唑法和牛血清白蛋白偶联,得到戊唑醇免疫原混合液,反应如下:



将戊唑醇采用碳二亚胺法和鸡卵清蛋白偶联,得到戊唑醇包被原混合液,反应如下:



步骤二、戊唑醇人工抗原的纯化

采用透析法分别对戊唑醇免疫原混合液和戊唑醇包被原混合液,进行脱盐纯化,得到免疫原和包被原,即为戊唑醇人工抗原混合液。

2. 如权利要求 1 所述的戊唑醇人工抗原的合成方法,其特征在于:

所述步骤一的具体操作方法为,称取 0.025 mmol 的戊唑醇,向其中加入 0.5 mL 的 N,N'-二甲基甲酰胺,搅拌,溶解得到 A 液;取 N,N'-羧基二咪唑 0.2 mmol 加入到 A 液中,在 37°C 的水浴中搅拌,反应 30 min, 反应结束时,溶液无色透明,得到 B 液;称取 20 mg 的牛血清白蛋白溶于 4.5 mL pH 8.8 的硼酸盐缓冲溶液中,为 C 液;在冰浴下,将 B 液逐滴滴加到 C 液中,反应 4 h,即得到戊唑醇免疫原混合液;

称取 0.025 mmol 的戊唑醇,向其中加入 0.5 mL 的 N,N'-二甲基甲酰胺,搅拌,溶解得到 A 液;取 N,N'-羧基二咪唑 0.2 mmol 加入到 A 液中,在 37°C 的水浴中搅拌,反应 30 min, 反应结束时,溶液无色透明,得到 B 液;称取 20 mg 的牛血清白蛋白或 28 mg 的鸡卵清蛋白溶于 4.5 mL pH 8.8 的硼酸盐缓冲溶液中,为 C 液;在冰浴下,将 B 液逐滴滴加到 C 液中,反应 4 h,即得到戊唑醇包被原混合液。

3. 如权利要求 1 所述的戊唑醇人工抗原的合成方法,其特征在于:所述步骤二的具体操作方法为,分别将戊唑醇包被原混合液和戊唑醇包被原混合液移入处理过的透析袋中,用 0.01mol/L pH 7.2 的磷酸盐缓冲液透析,更换透析外液 6-8 次,分别除去戊唑醇免疫原和包被原,即戊唑醇人工抗原,分别对其进行分装和保存。

4. 如权利要求 1-3 其中之一所述的戊唑醇人工抗原的合成方法的应用,其特征在于:所制备戊唑醇人工抗原应用于戊唑醇农药残留检测。

## 一种戊唑醇人工抗原的合成方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种人工抗原,具体的说是一种戊唑醇人工抗原的合成方法及其应用。

### 背景技术

[0002] 戊唑醇(Tebuconazole, CAS 107534-96-3),化学名:(RS)-1-对氯苯基-4,4-二甲基-3-(1H-1,2,4-三唑-1-基甲基)戊-3-醇,为一种三唑类杀菌剂,是德国拜耳公司于1986年开发的,具有高效、广谱、低毒和持效期长的优势,其杀菌机理是破坏和阻止麦角甾醇的生物合成,导致病原菌因不能形成细胞膜而致死。它可以在植物组织内部转移,从而既可以杀死植物表面的病菌,也可以杀死植物内部的病菌。在农业上普遍用于防治白粉病、黑穗病、纹枯病、全蚀病、云纹病、锈病、菌核病、叶斑病、斑点落叶病、灰霉病等病害。但是,戊唑醇农药对肝脏与血液系统有一定的蓄积毒性,还可能是一种非遗传毒性的动物致癌物。戊唑醇对大鼠的急性经口半数致死量(median lethal dose, LD50)约为4000 mg/kg,对雌、雄小鼠的急性经口LD50分别为3933和2000 mg/kg,对大鼠的急性经皮LD50>5000 mg/kg。因此,戊唑醇农药在农产品、水体及土壤环境中的残留问题受到越来越广泛的关注。

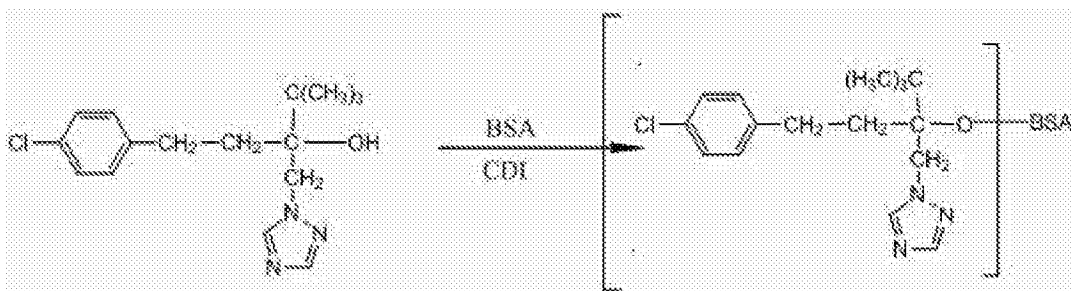
[0003] 目前,检测戊唑醇农药常用方法有气相色谱法和高效液相色谱法,但这些方法均存在检测成本高和样品前处理繁琐,尤其不适用于现场的快速检测。随着免疫分析技术的不断发展,酶联免疫分析法现已开始用于检测三唑类杀菌剂农药,具有操作简单、经济和高通量的优势。然而,建立戊唑醇农药酶联免疫分析法的关键在于抗原的设计与合成。到目前为止,国内尚没有针对戊唑醇农药抗原合成和抗体制备的有关报道。

### 发明内容

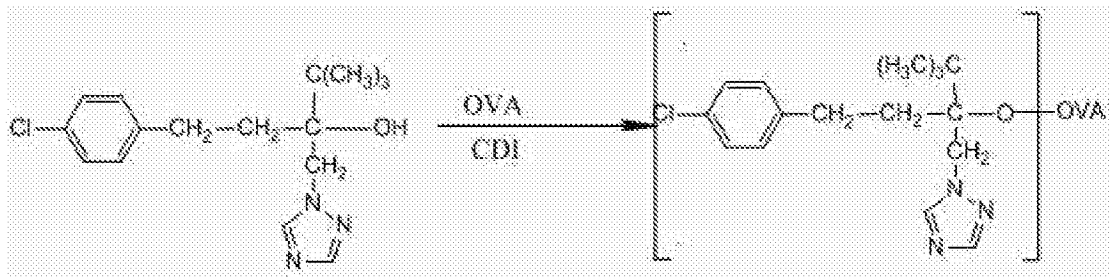
[0004] 本发明目的是为解决上述技术问题的不足,提供了一种新型的人工抗原制备方法,合成了针对戊唑醇农药残留检测的完全抗原,为国内农产品中戊唑醇农药的免疫分析检测提供技术支撑。

[0005] 一种戊唑醇人工抗原的合成方法,所述戊唑醇人工抗原包括免疫原和包被原,其合成方法包括以下步骤:

步骤一、将戊唑醇采用羧基二咪唑法和牛血清白蛋白偶联,得到戊唑醇免疫原混合液,反应如下:



将戊唑醇采用碳二亚胺法和鸡卵清蛋白偶联,得到戊唑醇包被原混合液,反应如下:



### 步骤二、戊唑醇人工抗原的纯化

采用透析法分别对戊唑醇免疫原混合液和戊唑醇包被原混合液,进行脱盐纯化,得到免疫原和包被原,即为戊唑醇人工抗原混合液。

[0006] 该步骤可以采用以下操作方法:称取 0.025 mmol (分子量 307.8, 7.7 mg)的戊唑醇,向其中加入 0.5 mL 的 N, N' -二甲基甲酰胺(DMF),搅拌,溶解得到 A 液;准确称量 N, N' -羧基二咪唑 0.2 mmol (Mw 162.2, 32.5 mg) 加入到 A 液中,在 37°C 的水浴中搅拌,反应 30 min, 反应结束时,溶液无色透明,得到 B 液;称取 20 mg 的牛血清白蛋白(BSA)溶于 4.5 mL pH 8.8 的硼酸盐缓冲溶液中,为 C 液。在冰浴下,将 B 液逐滴滴加到 C 液中,反应 4 h,得到戊唑醇免疫原混合液;

称取 0.025 mmol (分子量 307.8, 7.7 mg)的戊唑醇,向其中加入 0.5 mL 的 N, N' -二甲基甲酰胺(DMF),搅拌,溶解得到 A 液;准确称量 N, N' -羧基二咪唑 0.2 mmol (Mw 162.2, 32.5 mg) 加入到 A 液中,在 37°C 的水浴中搅拌,反应 30 min, 反应结束时,溶液无色透明,得到 B 液;称取 28 mg 的鸡卵清蛋白溶于 4.5 mL pH 8.8 的硼酸盐缓冲溶液中,为 C 液。在冰浴下,将 B 液逐滴滴加到 C 液中,反应 4 h,得到戊唑醇包被原混合液;

### 步骤二、戊唑醇人工抗原的纯化

采用透析法对戊唑醇人工抗原混合液进行脱盐纯化,即得到戊唑醇人工抗原。

[0007] 该步骤的具体操作方法,所述步骤二的具体操作方法为,分别将戊唑醇包被原混合液和戊唑醇包被原混合液移入处理过的透析袋中,用 0.01mol/L pH 7.2 的磷酸盐缓冲液透析,更换透析外液 6-8 次,分别除去戊唑醇免疫原和包被原,即戊唑醇人工抗原,分别对其进行分装和保存。

### [0008] 步骤三、戊唑醇人工抗原的鉴定

首先,采用考马斯亮蓝染色法对戊唑醇人工抗原的蛋白浓度进行估算;对牛血清白蛋白的浓度及其对应的吸光值采用 origin8.5 软件进行线性回归,再根据线性回归方程和稀释倍数计算可得所制备的戊唑醇人工抗原的蛋白浓度 3.2 mg/mL。

[0009] 其次,根据戊唑醇在 220nm 的吸光值,计算其摩尔吸光系数。

[0010] 最后,测定 200 mg/mL 的牛血清白蛋白和戊唑醇人工抗原在 220nm 下的吸光值,根据上述公式估算出戊唑醇免疫原的偶联比 15 :1,两种免疫原分子比为 8-25,可取得良好的免疫效果。

[0011] 所制备戊唑醇人工抗原可以应用于戊唑醇农药残留检测。

[0012] 有益效果是:

1、本发明成功合成了戊唑醇的人工抗原,合成步骤简单,有效,用该抗原可以制备出满足国内需求的戊唑醇抗体,并可以利用该抗体建立检测戊唑醇的各种免疫分析方法,为以后人们的研究提供了试验原料和简便的方法。

[0013] 2、提供一种戊唑醇人工抗原的合成方法,所制备的产品用于建立检测戊唑醇的免疫分析方法,为今后的研究提供了一种新型的人工抗原制备方法。为此,本专利设计并合成了针对戊唑醇农药残留检测的完全抗原,为国内农产品中戊唑醇农药的免疫分析检测提供技术支撑,还可以用于制备检测戊唑醇农药残留的酶联免疫试剂盒。

### 附图说明

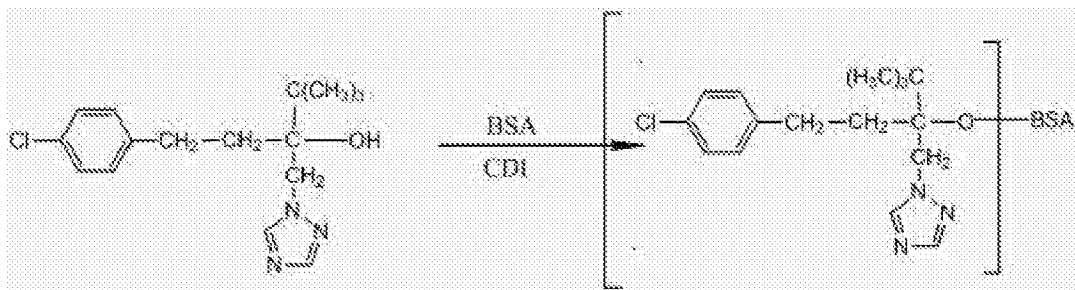
[0014] 图 1 是利用间接 ELISA 方法测定戊唑醇农药的标准抑制曲线图;

图 2 是戊唑醇抗体的亲和常数测定图。

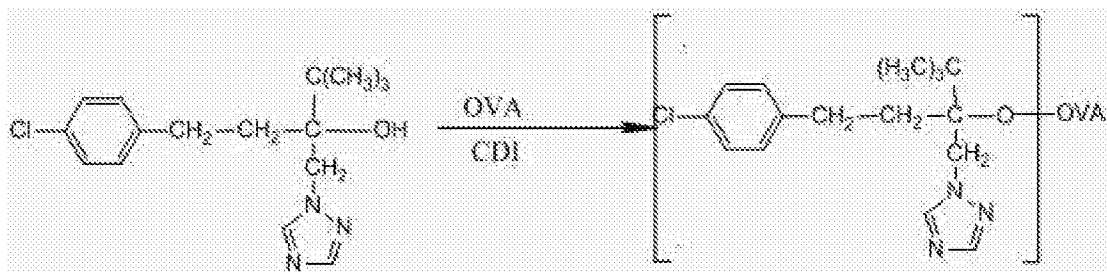
### 具体实施方式

[0015] 一种戊唑醇人工抗原的合成方法,所述戊唑醇人工抗原包括免疫原和包被原,其合成方法包括以下步骤:

步骤一、将戊唑醇采用羧基二咪唑法和牛血清白蛋白偶联,得到戊唑醇免疫原混合液,反应如下:



将戊唑醇采用碳二亚胺法和鸡卵清蛋白偶联,得到戊唑醇包被原混合液,反应如下:



步骤二、戊唑醇人工抗原的纯化

采用透析法分别对到戊唑醇免疫原混合液和戊唑醇包被原混合液,进行脱盐纯化,得到免疫原和包被原,即为戊唑醇人工抗原混合液。

[0016] 该步骤可以采用以下操作方法:称取 0.025 mmol (分子量 307.8, 7.7 mg)的戊唑醇,向其中加入 0.5 mL 的 N, N' -二甲基甲酰胺(DMF),搅拌,溶解得到 A 液;准确称量 N, N' -羧基二咪唑 0.2 mmol (Mw 162.2, 32.5 mg) 加入到 A 液中,在 37°C 的水浴中搅拌,反应 30 min, 反应结束时,溶液无色透明,得到 B 液;称取 20 mg 的牛血清白蛋白(BSA)溶于 4.5 mL pH 8.8 的硼酸盐缓冲溶液中,为 C 液。在冰浴下,将 B 液逐滴滴加到 C 液中,反应 4 h,得到戊唑醇免疫原混合液;

称取 0.025 mmol (分子量 307.8, 7.7 mg)的戊唑醇,向其中加入 0.5 mL 的 N, N' -二甲基甲酰胺(DMF),搅拌,溶解得到 A 液;准确称量 N, N' -羧基二咪唑 0.2 mmol (Mw 162.2, 32.5 mg) 加入到 A 液中,在 37°C 的水浴中搅拌,反应 30 min, 反应结束时,溶液无色透明,

得到 B 液；称取 28 mg 的鸡卵清蛋白溶于 4.5 mL pH 8.8 的硼酸盐缓冲溶液中，为 C 液。在冰浴下，将 B 液逐滴滴加到 C 液中，反应 4 h，得到戊唑醇包被原混合液；

#### 步骤二、戊唑醇人工抗原的纯化

采用透析法对戊唑醇人工抗原混合液进行脱盐纯化，即得到戊唑醇人工抗原。

[0017] 该步骤的具体操作方法，所述步骤二的具体操作方法为，新的透析袋先蒸馏水中煮 15min 左右，分别将戊唑醇包被原混合液和戊唑醇包被原混合液移入处理过的透析袋中，用 0.01mol/L pH 7.2 的磷酸盐缓冲液透析，更换透析外液 6-8 次，每隔 8 h 更换一次透析液，分别除去戊唑醇免疫原和包被原，即戊唑醇人工抗原，分别对其进行分装和保存。

#### [0018] 步骤三、戊唑醇人工抗原的鉴定

偶联比测定：本专利采用紫外分光光度法对抗原中被偶联两种分子的比率进行估算，原理是基于物质对光的吸收与其浓度呈比例关系来分别测定被偶联的两种分子浓度，并且蛋白质和戊唑醇均有各自不同的紫外扫描光谱，并表现出光谱图迭加和偏移的性质进行计算。

[0019] 采用考马斯亮蓝染色法测定偶联物的蛋白浓度：采用 20% 甲醇磷酸盐缓冲溶液，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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，在酶标板孔内分别加入不同浓度的牛血清白蛋白溶液 48 mL，接着加入 240 mL 考马斯亮蓝染色液，在酶标仪上震荡，5 min 后进行测定，每个浓度做 5 个平行，在 595 nm 处测吸光值，以牛血清白蛋白的浓度为横坐标，以其对应的吸光值为纵坐标绘制标准曲线。然后将抗原溶液按一定比例稀释，按照相同的方法在 595 nm 处测定抗原溶液的吸光值，依据蛋白质标准曲线的回归方程和稀释倍数得到抗原溶液的蛋白浓度 3.2 mg/mL。

[0020] 摩尔吸收系数  $\epsilon$ ：配制戊唑醇浓度为 0, 25, 50, 75, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的甲醇溶液，在波长 200-600 nm 下进行紫外扫描，由扫描结果可知，戊唑醇的最大吸收波长在 225 nm 和 262 nm，选择 220 nm 处测吸光值，每个浓度做 5 个平行样，摩尔吸光系数计算为： $\epsilon = \text{吸光值} / \text{摩尔浓度}$ 。

[0021] 偶联比测定：配制 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  牛血清蛋白的 20% 甲醇溶液，将抗原用 20% 甲醇磷酸盐缓冲溶液稀释蛋白浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，在 220 nm 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： $r = ((A2 - A1) / \epsilon) / (200 \times 10^3 / 67000)$

其中  $\epsilon$  为摩尔吸光系数(L/mol)，67000 为牛血清蛋白的分子量， $200 \times 10^3$  为牛血清蛋白浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，计算偶联比率 r 为 15:1。

[0022] 采用本发明所制备的戊唑醇人工抗原制备抗体及其抗体检测：

所制备的抗体的亲和常数为  $5.21 \times 10^5$  L/mol，半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 17.86  $\pm$  1.45 ng/mL，检测限为 3.63 ng/mL，与三唑醇、三唑酮、烯唑醇的交叉反应率低于 10%；按照如下步骤进行操作：

步骤一、动物免疫：选择 1.5-2.0 kg 的新西兰大白兔(购自河南科技大学医学部)为试验动物，购买的试验动物先适应环境一周，然后开始试验；每 2 只新西兰兔子为一组，共 3 组；免疫原由戊唑醇和牛血清白蛋白通过羧基二咪唑法相偶联；将完全氟氏佐剂和免疫原按照 1:1 体积比进行乳化，采用背部多点注射的方式进行免疫，新西兰大白兔的初免剂量 1mg/只(以蛋白含量计算)，首免后四周进行加强免，加强免之间间隔 2 周，加强免剂量 0.65 mg/只。

[0023] 步骤二、抗血清的制备和筛选：四次免疫后 7-10 天，通过耳廓外缘静脉进行采血，先移到 37° C 的培养箱中放置 30 min，再转到 4° C 冰箱中放置 4 h，离心(5000 rpm, 10 min)，获得抗血清。采用间接竞争酶联免疫法测定抗血清的效价和抑制，选择效价高并抑制好的兔子采用心脏采血方式进行采血，收集于 50 mL 灭菌塑料离心管中，按照上述同样的方法制备抗血清。

#### [0024] 步骤三、抗体的纯化

采用辛酸-硫酸铵沉淀法纯化血清，得到抗戊唑醇的多克隆抗体，加入等体积的甘油，分装，-20° C 下保存，备用。

#### [0025] 步骤四、灵敏度的测定

采用间接竞争酶联免疫法(ic-ELISA)测定抗体对戊唑醇农药的抑制效果，选择包被原浓度为 0.4 mg/mL，抗体的蛋白浓度为 0.05 mg/mL，测定结果用 origin 8.5 软件进行四参数回归拟合，结果见图 1。根据拟合的回归方程，计算抗体 IC50 为 17.86±1.45 ng/mL；标准曲线的线性范围在 0-200 ng/mL 之间；检测限达到了 3.63 ng/mL。

#### [0026] 步骤五、特异性的测定

采用间接竞争酶联免疫法测定多克隆抗体对其类似物(三唑醇、三唑酮、烯唑醇、腈菌唑和联苯三唑醇)的抑制作用，每个试验做 5 次重复。根据测定结果用 origin 8.5 软件进行四参数回归拟合，根据拟合的回归方程计算抗体对各种类似物的半·数抑制浓度，根据下式计算各种类似物的交叉反应率，结果见表 1。

[0027] 交叉反应率(CR, %) = IC50 (戊唑醇) / IC50 (戊唑醇类似物)

表 1 戊唑醇抗体的交叉反应结果

农药	IC50 (ng/mL)				CR (%)
	1	2	3	平均值	
戊唑醇	17.95	17.78	17.85	17.86	100
三唑醇	238.65	245.28	240.12	241.35	7.3
三唑酮	321.89	328.75	323.55	324.73	5.5
烯唑醇	565.36	549.62	559.41	558.13	3.2

#### 步骤六、亲和常数的测定

包被原从 1 mg/mL 开始倍比稀·释 6 个不同的浓度进行测定，每个孔做五次平行；抗体从 1 mg/mL 开始倍比稀释 8 个浓度，采用间接竞争酶联免疫方法测定多克隆抗体(pAb)的效价；然后以多克隆抗体浓度(pAb 浓度, ng/mL)对数值为横坐标，以 Abs (450nm) 为纵坐标在 origin 8.5 软件中绘制出 6 条曲线，根据绘制曲线计算出 Abs (450nm)抑制 50% 时对应的抗体浓度，换算抗体浓度的单位 mol/L，然后两两一组，根据下式计算亲和常数(Ka)

$$K_a = (n-1) / 2(n[Ab']_t - [Ab]_t)$$

其中，n 为 2 个包被浓度的比值(大于 1)；[Ab']<sub>t</sub> 和 [Ab]<sub>t</sub> 分别为对应 Abs (450nm)抑制一半时对应的抗体浓度(mol/L)。

[0028] 根据图 2 的测定结果，计算出抗体的亲和常数为 5.21' 10<sup>5</sup> L/mol。

[0029] 本发明所述试剂均可通过市场购买得到；

所述 pH 8.8 的硼酸盐缓冲溶液的组成成份为, 每 1L 硼酸盐缓冲溶液中含硼砂 13.349g, 硼酸 3.711g, 余量为水。

[0030] 所述 0.01mol/L pH 7.2 的的磷酸盐缓冲液的组成成份为, 每 1L 磷酸盐缓冲液中含磷酸二氢钠 0.296 g ; 磷酸氢二钠 2.9g ; 氯化钠 :9g ; 氢氧化钠 :0.16 g, 余量为水。

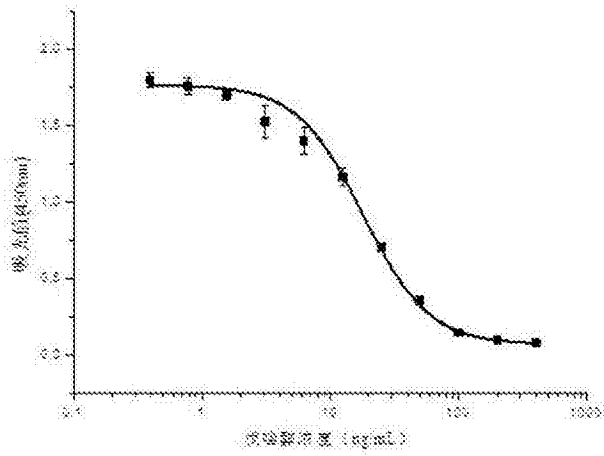


图 1

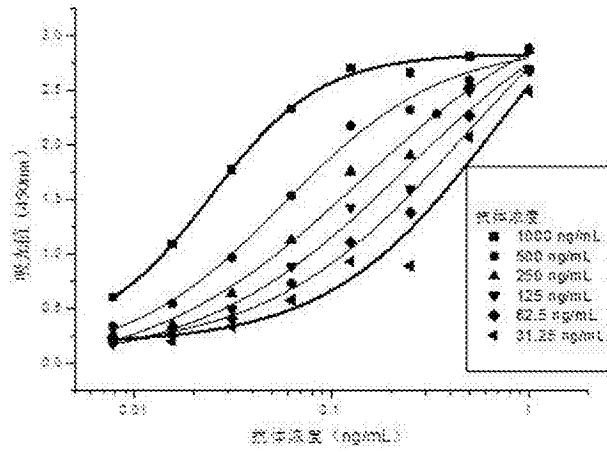


图 2

专利名称(译)	一种戊唑醇人工抗原的合成方法及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN105061584A</a>	公开(公告)日	2015-11-18
申请号	CN201510415569.9	申请日	2015-07-16
[标]申请(专利权)人(译)	河南科技大学		
申请(专利权)人(译)	河南科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	河南科技大学		
[标]发明人	陈秀金 康怀彬 马丽苹 李松彪 曹力 李兆周 孙军杰 辛莉		
发明人	陈秀金 康怀彬 马丽苹 李松彪 曹力 李兆周 孙军杰 辛莉		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K1/14 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 G01N33/53 G01N2033/184		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种戊唑醇人工抗原的合成方法及其应用；所属戊唑醇人工抗原包括免疫原和包被原；其合成方法为，将戊唑醇即(RS)-1-对氯苯基-4,4-二甲基-3-(1H-1,2,4-三唑-1-基甲基)戊-3-醇，通过羧基二咪唑法和牛血清白蛋白BSA偶联，用作免疫原；然后将戊唑醇通过羧基二咪唑法和鸡卵清蛋白OVA相偶联，用作包被原；本发明成功合成了戊唑醇的人工抗原，合成步骤简单，有效，用该抗原可以制备出满足国内需求的戊唑醇抗体，并可以利用该抗体建立检测戊唑醇的各种免疫分析方法，为以后人们的研究提供了试验原料和简便的方法。

