



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107417579 A

(43)申请公布日 2017.12.01

(21)申请号 201710462453.X

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2017.06.19

G01N 33/531(2006.01)

(71)申请人 宁波市农业科学研究院

地址 315040 浙江省宁波市鄞州区德厚街
19号

(72)发明人 付岩 张艳 张亮 陈国 吴银良

(74)专利代理机构 宁波诚源专利事务所有限公
司 33102

代理人 袁忠卫 叶桂萍

(51)Int.Cl.

C07C 279/14(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 1/107(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页

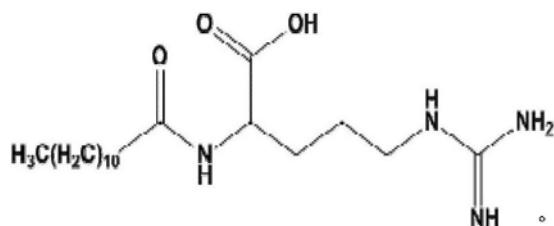
(54)发明名称

L-月桂酰胺精氨酸盐酸盐乙醇酯人工抗原、
特异抗体制备方法及其用途

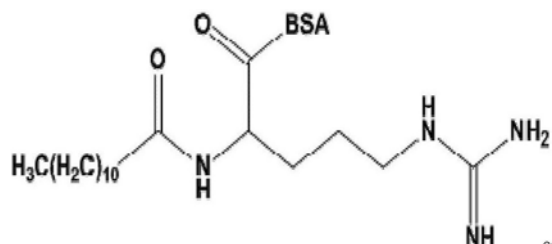
(57)摘要

本发明公开了L-月桂酰胺精氨酸盐酸盐乙醇酯人工抗原、特异抗体制备方法及其用途,属于免疫化学分析技术领域,专用于L-月桂酰胺精氨酸特异性抗体的制备及酶联免疫检测方法,合成了人工抗原LAS-BSA和LAS-OVA,免疫兔子获得L-月桂酰胺精氨酸的特异性多克隆抗体,最后利用合成的包被抗原和特异性抗体建立酶联免疫分析方法,该方法LAE最低检测限为0.005mg/L,回收率为82.4-109.8%,平均变异系数为3.2-5.8%,具有准确度和灵敏度高的特点,符合残留分析标准。

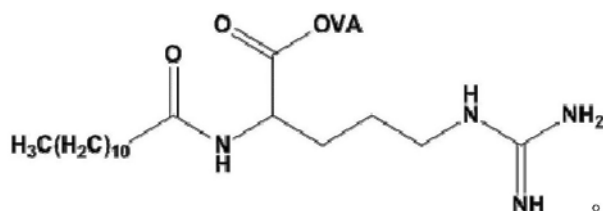
1. 一种L-月桂酰胺精氨酸半抗原,其结构式如下所示:



2. 由权利要求1所述的L-月桂酰胺精氨酸半抗原与载体牛血清蛋白BSA偶联而成的免疫抗原LAS-BSA,其分子结构式为:



3. 由权利要求1所述的L-月桂酰胺精氨酸半抗原与载体卵清白蛋白OVA偶联而成的包被抗原LAS-OVA,其分子结构式为:



4. 一种如权利要求2所述L-月桂酰胺精氨酸免疫抗原的制备方法,其特征在于包含以下步骤:

①将71.3~142.6mg的月桂酰精氨酸LAS溶解在1~2mL的N,N-二甲基甲酰胺中,依次加入81.6~163.2mg的N-羟基琥珀酰亚胺和72.9~145.8mg的二环己基碳二亚胺,室温下搅拌反应过夜,离心;

②取步骤1中的上清液0.5~1ml加入到10~20ml,10~20mg/mL的牛血清蛋白(BSA)碳酸盐缓冲溶液(CBS,0.1mol/L,pH9.6)中,磁力搅拌反应5~6小时,装入透析袋,4℃下先用蒸馏水透析3次,每次间隔2~3小时,然后用磷酸盐缓冲溶液(PBS,0.01mol/L,pH 7.4)透析3~5天,12小时换一次透析液,即得免疫抗原,分装保存于-20℃的冰箱中。

5. 一种如权利要求3所述L-月桂酰胺精氨酸包被抗原的制备方法,其特征在于包含以下步骤:

①将71.3~142.6mg的月桂酰精氨酸LAS溶解在1~2mL的N,N-二甲基甲酰胺中,加入60~120μL的三正丁胺和30~60μL的氯甲酸丁酯,室温下搅拌反应1~2小时;

②取步骤1中的反应液1~2ml加入到10~20mL,10~20mg/mL的卵清蛋白(OVA)碳酸盐缓冲溶液(CBS,0.1mol/L,pH 9.6)中,磁力搅拌反应2~4小时,装入透析袋,4℃下先用蒸馏水透析3次,每次间隔2~3小时,然后用磷酸盐缓冲溶液(PBS,0.01mol/L,pH7.4)透析3~5天,12小时换一次透析液,即得包被抗原,分装保存于-20℃的冰箱中。

6. 一种用权利要求2所述L-月桂酰胺精氨酸免疫抗原制备的L-月桂酰胺精氨酸特异性抗体。

7.一种用权利要求6中所述的L-月桂酰胺精氨酸特异性抗体在检测乳制品中L-月桂酰胺精氨酸盐酸盐乙醇酯残留量中的应用。

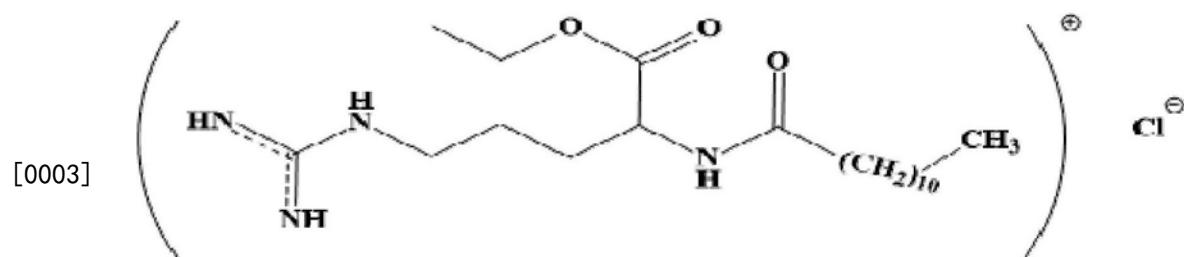
L-月桂酰胺精氨酸盐酸盐乙醇酯人工抗原、特异抗体制备方法及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于免疫化学分析技术领域,具体涉及一种新型食品防腐剂L-月桂酰胺精氨酸盐酸盐乙醇酯的抗原、特异抗体制备方法及其用途。

背景技术

[0002] L-月桂酰胺精氨酸盐酸盐乙醇酯(ethyl lauroyl arginate (LAE)),分子式为 $C_{20}H_{41}ClN_4O_3$,结构如下:



LAE 结构

[0004] LAE外观为白色粉末,在20℃水中的溶解度为247g/kg,在pH3-7范围内化学性质稳定,具有较高的抑菌活性,熔点50-58℃,它在水和油中的分配系数大于10。即主要存在于水相中,该性质使得LAE与其它化学结构不同功能相似的防腐剂相比,可以更方便地溶解到水基质的食品及化妆品体系中,更好地发挥其抑菌效能。LAE主要作用于微生物的细胞壁、细胞质膜及细胞壁和细胞膜的中间层,抑制微生物增殖。LAE以往主要用于医药、化妆品行业。目前作为一种新型的食品防腐剂得到越来越多的应用。2013年欧洲食品安全局(EFSA)应欧盟委员会的要求对作为食品添加剂的LAE进行了暴露评估,基于不同人群和场景的暴露数据设定LAE每日允许摄入量(ADI)为0.5mg/kg bw/d。

[0005] 目前对LAE的残留分析有紫外分光光度法、液相色谱串联四级杆飞行时间质谱法,这些方法需要使用大型仪器,检测费用高,过程繁琐,不适合大批量样品的检测与分析。免疫分析为农药残留研究提供了一个新的分析检测途径,以其快速、灵敏、方便、廉价,便于现场监控以及适用大批量样品检测等优点得到了迅速发展。但到目前为止,LAE的免疫分析方法,国内外尚未见报道。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的一个技术问题是针对现有技术的现状提供一种L-月桂酰胺精氨酸盐酸盐乙醇酯半抗原。

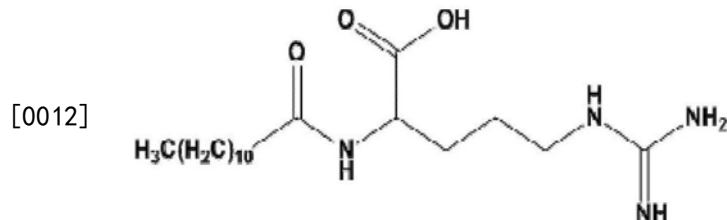
[0007] 本发明所要解决的又一个技术问题是针对现有技术的现状提供一种利用上述半抗原制备L-月桂酰胺精氨酸盐酸盐乙醇酯的免疫抗原。

[0008] 本发明所要解决的另一个技术问题是针对现有技术的现状提供一种利用上述半抗原制备L-月桂酰胺精氨酸盐酸盐乙醇酯的包被抗原。

[0009] 本发明所要解决的再一个技术问题是针对现有技术的现状提供一种利用上述免疫抗原制备L-月桂酰胺精氨酸盐酸盐乙醇酯的特异性抗体的制备方法。

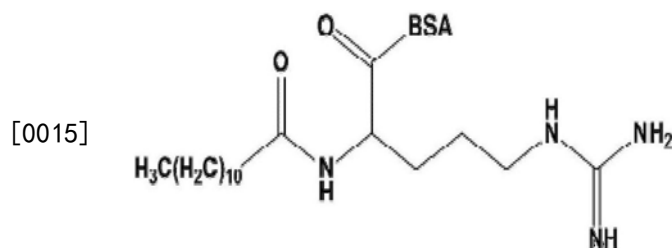
[0010] 本发明所要解决的最后一个技术问题是针对现有技术的现状提供一种上述特异性抗体的用途。

[0011] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案为:该L-月桂酰胺精氨酸半抗原,其结构式如下所示:

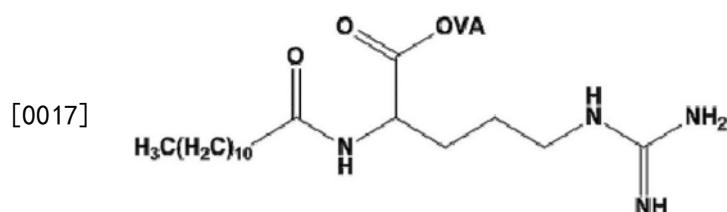


[0013] 其基于月桂酰精氨酸LAS是L-月桂酰胺精氨酸盐酸盐乙醇酯LAE分子结构中的主要组成部分,并能使该结构特征充分暴露且含有能与蛋白质偶联的羧基,因此将其作为半抗原。

[0014] 本发明利用碳二亚胺法与牛血清蛋白 (BSA) 偶联获得免疫抗原LAS-BSA,其分子结构如下:



[0016] 本发明利用混合酸酐法与卵清蛋白 (OVA) 偶联获得包被抗原LAS-OVA,其分子结构如下:



[0018] 本发明还提供一种L-月桂酰胺精氨酸免疫抗原的制备方法,其特征在于包含以下步骤:

[0019] ①将71.3~142.6mg的月桂酰精氨酸LAS溶解在1~2mL的N,N-二甲基甲酰胺中,加入81.6~163.2mg的N-羟基琥珀酰亚胺和72.9~145.8mg的二环己基碳二亚胺,室温下搅拌反应过夜,离心;

[0020] ②取步骤1中的上清液0.5~1ml加入到10~20ml的10~20mg/mL牛血清蛋白 (BSA) 碳酸盐缓冲溶液 (CBS, 0.1mol/L, pH9.6) 中,磁力搅拌反应5~6小时,装入透析袋,4℃下先用蒸馏水透析3次,每次间隔2~3小时,然后用磷酸盐缓冲溶液 (PBS, 0.01mol/L, pH7.4) 透析3~5天,12小时换一次透析液,即得免疫抗原,分装保存于-20℃的冰箱中。

[0021] 同时,本发明还提供一种L-月桂酰胺精氨酸包被抗原的制备方法,其特征在于包含以下步骤:

[0022] ①将71.3~142.6mg的月桂酰精氨酸LAS溶解在1~2mL的N,N-二甲基甲酰胺中,加入60~120 μ L的三正丁胺和30~60 μ L的氯甲酸丁酯,室温下搅拌反应1~2小时;

[0023] ②取步骤1中的反应液1~2mL加入到10~20mL的10~20mg/mL卵清蛋白(OVA)碳酸盐缓冲溶液(CBS,0.1mol/L,pH9.6)中,磁力搅拌反应2~4小时,装入透析袋,4℃下先用蒸馏水透析3次,每次间隔2~3小时,然后用磷酸盐缓冲溶液(PBS,0.01mol/L,pH7.4)透析3~5天,12小时换一次透析液,即得包被抗原,分装保存于-20℃的冰箱中。

[0024] 本发明用上述免疫抗原制备获得L-月桂酰胺精氨酸特异性抗体,L-月桂酰胺精氨酸特异性抗体是能与L-月桂酰胺精氨酸发生特异性免疫反应的免疫球蛋白。它用于检测农产品和食品(如乳制品)中L-月桂酰胺精氨酸的残留量。

[0025] 与现有技术相比,本发明具有如下优点:1、本发明通过首次利用LAS作为LAE半抗原,经免疫兔子产生特异性抗体,为LAE残留的高效快速分析提供了一种新的方法,同时样品前处理简单快速,避免了大量使用有机溶剂,成本低廉,一次可同时检测大批量样品,便于进行现场监控,可以与传统仪器分析方法互为补充;

[0026] 2、利用LAE抗原抗体免疫反应和酶促反应建立LAE酶联免疫分析法。在检测分析样品中LAE残留是具有较高的特异性和灵敏度。抗体特异性识别LAE,与其他同类化合物没有明显的交叉反应。该方法LAE最低检测限为0.005mg/L,回收率为82.4-109.8%,平均变异系数为3.2-5.8%,具有准确度和灵敏度高的特点,符合残留分析标准。

具体实施方式

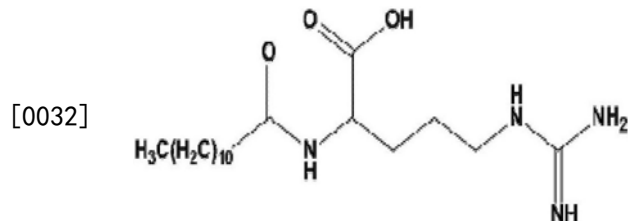
[0027] 以下通过结合实施例对本发明作进一步说明。

[0028] 实施例1

[0029] 1、人工抗原的合成

[0030] 基于月桂酰精氨酸(LAS)是LAE分子结构中的主要组成部分,并能使该结构特征充分暴露且含有能与蛋白质偶联的羧基,因此将其作为半抗原。

[0031] 半抗原的结构如下:



[0033] 1.1免疫抗原的合成与纯化

[0034] 免疫抗原的合成采用碳二亚胺法:将71.3mg的月桂酰精氨酸LAS(约0.2mmol)溶解在1mL的N,N-二甲基甲酰胺DMF中,加入81.6mg的N-羟基琥珀酰亚胺NHS(约0.6mmol),室温下搅拌反应15min后加入72.9mg的二环己基碳二亚胺DCC(0.3mmol),室温下搅拌反应过夜,离心,取上清液0.5mL缓慢加入到10mL 10mg/mL的牛血清蛋白BSA碳酸盐缓冲溶液(CBS,0.1mol/L,pH9.6)中,磁力搅拌反应5小时。将反应完成的溶液装入透析袋,4℃下先用蒸馏水透析3次,每次透析的间隔时间为2小时,然后用0.01mol/L、pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液PBS透析3天,12小时换一次透析液,即得免疫抗原,分装保存于-20℃的冰箱中。

[0035] 1.2免疫抗原的鉴定

[0036] 对半抗原、载体蛋白及偶联物进行紫外(200nm~400nm)扫描。从紫外谱图看到偶联物紫外吸收光谱较载体蛋白和半抗原的吸收光谱发生了明显的变化,具有载体蛋白和半抗原的紫外吸收特征,说明半抗原和载体蛋白偶联成功。根据它们在280nm波长下的摩尔吸光系数估算得到免疫抗原的结合比为15:1。

[0037] 1.3免疫抗体的制备

[0038] ①免疫动物制备抗血清

[0039] 实验选用半周岁左右,体重为2-3公斤,健康的雄性新西兰大白兔。免疫三只兔子,分别编号为兔子1-3。实验免疫剂量基础免疫为0.25~4.0mg/kg,加强免疫剂量为0.5~4.0mg/kg,用生理盐水分别稀释相应剂量人工抗原复合物,加入等体积弗氏完全佐剂,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。3~4周后进行加强免疫,以后每隔2周再次加强免疫,加强免疫时采用弗氏不完全佐剂。从第三次免疫开始,每次免疫后第8~10天,从兔子耳缘静脉采血,测定效价和特异性。待免疫血清效价合格后,就进行采血。

[0040] 本实验采用心脏取血法。每只兔子可得血80mL左右。采血后,先待收集在三角烧瓶中的血液凝固后,然后用接种针沿三角烧瓶边缘将血块与玻璃脱离,放置于37℃温箱中半小时,再放到4℃冰箱中3~4小时,待血块收缩后,用吸管将血清吸入试管中,以3000rpm离心15分钟,分离出血清。

[0041] ②抗体的纯化与鉴定

[0042] 一般采用辛酸-硫酸铵盐析法,也可采用蛋白A柱层析。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免疫球蛋白G(Immunoglobulin G,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70μl/ml,兔血清为75μl/ml,小鼠血清为40μl/ml,小鼠腹水为33μl/ml。这种方法IgG的回收率达90%以上。

[0043] ③抗血清效价测定

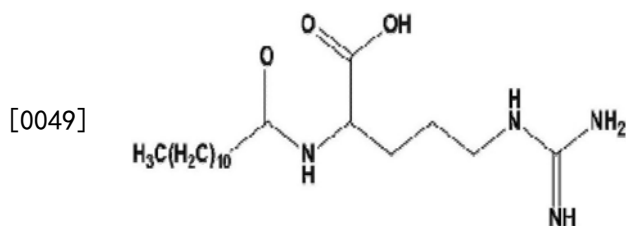
[0044] 免疫原复合物按常规方法免疫了三只兔子。从加强免疫第二次开始,在每次免疫后第8天于兔子耳缘静脉采血,血清经适当稀释后用间接ELISA测定效价。待第4次免疫时,兔子获得了高效价的抗体,经纯化制成冻干粉后的效价为 5.12×10^5 。

[0045] 实施例2

[0046] 2、人工抗原的合成

[0047] 基于月桂酰精氨酸(LAS)是LAE分子结构中的主要组成部分,并能使该结构特征充分暴露且含有能与蛋白质偶联的羧基,因此将其作为半抗原。

[0048] 半抗原的结构如下:



[0050] 2.1免疫抗原的合成与纯化

[0051] 免疫抗原的合成采用碳二亚胺法:将107.0mg的月桂酰精氨酸LAS(约0.3mmol)溶

解在2mL的N,N-二甲基甲酰胺DMF中,加入122.4mg的N-羟基琥珀酰亚胺NHS (0.9mmol),室温下搅拌反应15min后加入109.4mg的二环己基碳二亚胺DCC (0.45mmol),室温下搅拌反应过夜,离心,取上清液0.8mL缓慢加入到15mL 15mg/mL的牛血清蛋白BSA碳酸盐缓冲溶液(CBS, 0.1mol/L, pH9.6)中,磁力搅拌反应5.5小时。将反应完成的溶液装入透析袋,4℃下先用蒸馏水透析3次,每次透析的间隔时间为3小时,然后用0.01mol/L、pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液PBS透析5天,12小时换一次透析液,即得免疫抗原,分装保存于-20℃的冰箱中。

[0052] 2.2免疫抗原的鉴定

[0053] 对半抗原、载体蛋白及偶联物进行紫外(200nm~400nm)扫描。从紫外谱图看到偶联物紫外吸收光谱较载体蛋白和半抗原的吸收光谱发生了明显的变化,具有载体蛋白和半抗原的紫外吸收特征,说明半抗原和载体蛋白偶联成功。根据它们在280nm波长下的摩尔吸光系数估算得到免疫抗原的结合比为17:1。

[0054] 2.3免疫抗体的制备同实施例1

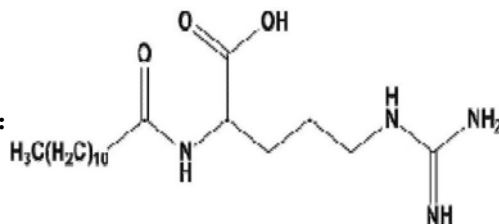
[0055] 经纯化制成冻干粉后的效价为 5.12×10^5 。

[0056] 实施例3

[0057] 3、人工抗原的合成

[0058] 基于月桂酰精氨酸(LAS)是LAE分子结构中的主要组成部分,并能使该结构特征充分暴露且含有能与蛋白质偶联的羧基,因此将其作为半抗原。

[0059] 半抗原的结构如下:



[0060] 3.1免疫抗原的合成与纯化

[0061] 免疫抗原的合成采用碳二亚胺法:将142.6mg的月桂酰精氨酸LAS(约0.4mmol)溶解在1.5mL的N,N-二甲基甲酰胺DMF中,加入163.2mg的N-羟基琥珀酰亚胺NHS (1.2mmol),室温下搅拌反应15min后加入145.8mg的二环己基碳二亚胺DCC (0.6mmol),室温下搅拌反应过夜,离心,取上清液1mL缓慢加入到20mL 20mg/mL的牛血清蛋白BSA碳酸盐缓冲溶液(CBS, 0.1mol/L, pH9.6)中,磁力搅拌反应6小时。将反应完成的溶液装入透析袋,4℃下先用蒸馏水透析3次,每次透析的间隔时间为2.5小时,然后用磷酸盐缓冲溶液(PBS, 0.01mol/L, pH7.4)透析4天,12小时换一次透析液,即得免疫抗原,分装保存于-20℃的冰箱中。

[0062] 3.2免疫抗原的鉴定

[0063] 对半抗原、载体蛋白及偶联物进行紫外(200nm~400nm)扫描。从紫外谱图看到偶联物紫外吸收光谱较载体蛋白和半抗原的吸收光谱发生了明显的变化,具有载体蛋白和半抗原的紫外吸收特征,说明半抗原和载体蛋白偶联成功。根据它们在280nm波长下的摩尔吸光系数估算得到免疫抗原的结合比为14:1。

[0064] 3.3免疫抗体的制备同实施例2

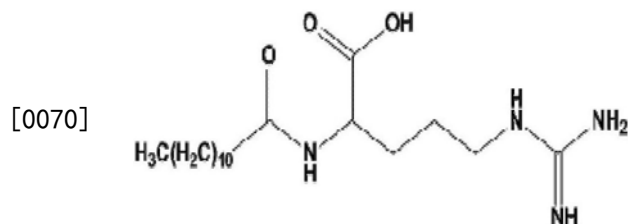
[0065] 经纯化制成冻干粉后的效价为 2.56×10^5 。

[0066] 实施例4

[0067] 4、人工抗原的合成

[0068] 基于月桂酰精氨酸(LAS)是LAE分子结构中的主要组成部分,并能使该结构特征充分暴露且含有能与蛋白质偶联的羧基,因此将其作为半抗原。

[0069] 半抗原的结构如下:



[0071] 4.1包被抗原的合成与纯化

[0072] 包被抗原的合成利用混合酸酐法:将71.3mg的月桂酰精氨酸LAS(约0.2mmol)溶解在1mL的N,N-二甲基甲酰胺中,加入60μL的三正丁胺(约0.2mmol)和30μL的氯甲酸丁酯(约0.2mmol),室温下反应1小时,1mL反应液缓慢加入到10mL 10mg/mL的卵清蛋白OVA碳酸盐缓冲溶液(CBS,0.1mol/L,pH 9.6)中,磁力搅拌反应4小时,反应完成后装入透析袋,4℃下先用蒸馏水透析3次,每次透析的间隔时间为2小时,然后用磷酸盐缓冲溶液(PBS,0.01mol/L,pH7.4)透析3天,12小时换一次透析液,即得包被抗原,分装保存于-20℃的冰箱中。

[0073] 4.2人工抗原的鉴定

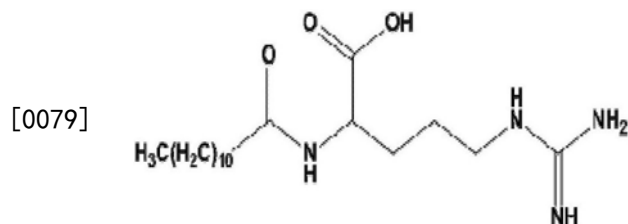
[0074] 对半抗原、载体蛋白及偶联物进行紫外(200nm~400nm)扫描。从紫外谱图看到偶联物紫外吸收光谱较载体蛋白和半抗原的吸收光谱发生了明显的变化,具有载体蛋白和半抗原的紫外吸收特征,说明半抗原和载体蛋白偶联成功。根据它们在280nm波长下的摩尔吸光系数估算得到包被抗原的结合比为9:1。

[0075] 实施例5

[0076] 5、人工抗原的合成

[0077] 基于月桂酰精氨酸(LAS)是LAE分子结构中的主要组成部分,并能使该结构特征充分暴露且含有能与蛋白质偶联的羧基,因此将其作为半抗原。

[0078] 半抗原的结构如下:



[0080] 5.1包被抗原的合成与纯化

[0081] 包被抗原的合成利用混合酸酐法:将107.0mg的月桂酰精氨酸LAS(约0.3mmol)溶解在1.5mL的N,N-二甲基甲酰胺中,加入90μL的三正丁胺(约0.3mmol)和45μL的氯甲酸丁酯(约0.3mmol),室温下反应1.5小时,1.5mL反应液缓慢加入到15mL 15mg/mL的卵清蛋白OVA碳酸盐缓冲溶液(CBS,0.1mol/L,pH 9.6)中,磁力搅拌反应4小时,反应完成后装入透析袋,4℃下先用蒸馏水透析3次,每次透析的间隔时间为3小时,然后用磷酸盐缓冲溶液(PBS,0.01mol/L,pH7.4)透析5天,12小时换一次透析液,即得包被抗原,分装保存于-20℃的冰箱中。

[0082] 5.2人工抗原的鉴定

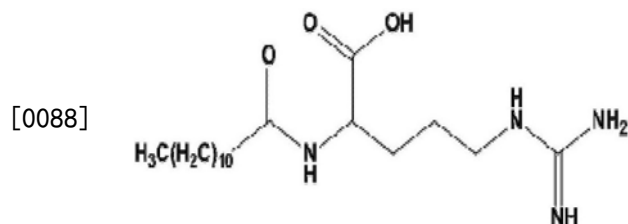
[0083] 对半抗原、载体蛋白及偶联物进行紫外(200nm~400nm)扫描。从紫外谱图看到偶联物紫外吸收光谱较载体蛋白和半抗原的吸收光谱发生了明显的变化,具有载体蛋白和半抗原的紫外吸收特征,说明半抗原和载体蛋白偶联成功。根据它们在280nm波长下的摩尔吸光系数估算得到包被抗原的结合比为8:1。

[0084] 实施例6

[0085] 6、人工抗原的合成

[0086] 基于月桂酰精氨酸(LAS)是LAE分子结构中的主要组成部分,并能使该结构特征充分暴露且含有能与蛋白质偶联的羧基,因此将其作为半抗原。

[0087] 半抗原的结构如下:



[0089] 6.1包被抗原的合成与纯化

[0090] 包被抗原的合成利用混合酸酐法:将142.6mg的月桂酰精氨酸LAS(约0.4mmol)溶解在2mL的N,N-二甲基甲酰胺中,加入120μL的三正丁胺(约0.4mmol)和60μL的氯甲酸丁酯(约0.4mmol),室温下反应2小时,2mL反应液缓慢加入到20mL 20mg/mL的卵清蛋白OVA碳酸盐缓冲溶液(CBS,0.1mol/L,pH 9.6)中,磁力搅拌反应4小时,反应完成后装入透析袋,4℃下先用蒸馏水透析3次,每次透析的间隔时间为2.5小时,然后用磷酸盐缓冲溶液(PBS,0.01mol/L,pH7.4)透析4天,12小时换一次透析液,即得包被抗原,分装保存于-20℃的冰箱中。

[0091] 6.2人工抗原的鉴定

[0092] 对半抗原、载体蛋白及偶联物进行紫外(200nm~400nm)扫描。从紫外谱图看到偶联物紫外吸收光谱较载体蛋白和半抗原的吸收光谱发生了明显的变化,具有载体蛋白和半抗原的紫外吸收特征,说明半抗原和载体蛋白偶联成功。根据它们在280nm波长下的摩尔吸光系数估算得到包被抗原的结合比为11:1。

[0093] 实施例7利用包被抗原对LAE的残留分析

[0094] 其中,LAE酶联免疫吸附测定方法建立与鉴定如下:

[0095] 7.1LAE ELISA测定方法的原理

[0096] 采用间接竞争酶联免疫分析方法。它是将农药分子与大分子载体(如蛋白质)偶联制得的复合物作为包被抗原吸附于固相载体(96孔酶标板)上,制备成固相抗原,然后加入待测农药和相应抗体,固相抗原中的农药,待测农药,与抗体进行竞争结合反应,待测农药含量多,被结合在固相抗原上的抗体就少,反之结合在固相抗原的抗体多,反应后加入酶标二抗(只能与结合在固相抗原上的抗体相结合),最后用底物进行显色加以测定,当抗体量一定时,加入的待测农药量越多,与固相抗原结合的抗体就越少,显色反应就减弱,抑制率增高,反之,则显色反应增强,抑制率降低,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。

[0097] 7.2最佳抗体工作浓度和包被抗原复合物浓度的确定

[0098] IC-ELISA抗原抗体工作浓度的确定用方阵滴定法,选择OD值为1.0时的抗原抗体稀释浓度。在同一包被液浓度下,随着抗体的稀释,所得OD值呈下降趋势,同样在同一抗体稀释浓度下,随着包被液浓度的下降,所得OD值也呈下降趋势。经试验,包被抗原浓度1.0μg/mL,抗体浓度以20μg/mL作为最适工作浓度。

[0099] 7.3标准曲线和检测灵敏度

[0100] 7.3.1标准曲线的制备,其基本的操作步骤如下:

[0101] 7.3.1.1包被

[0102] 用CBS缓冲液(0.05mol/L,pH9.6)将包被抗原稀释至最适浓度,100μL/孔加入96孔酶标版(Maxisorp™透明聚乙烯板),4℃包被过夜;

[0103] 7.3.1.2封闭

[0104] 取出包被好的酶标版,甩掉包被液,用0.5%吐温-20的磷酸盐缓冲溶液(PBST,0.01mol/L,0.5%Tween20,pH7.4)洗涤后,每孔加入用PBS(0.01mol/L,pH7.4)缓冲溶液稀释的1.0%的OVA封闭液200μL,于37℃温箱中温育0.5h。

[0105] 7.3.1.3加样

[0106] 1) 配制LAE的标准溶液

[0107] 取LAE标样配制100ppm的标准溶液,用PBS稀释成若干(5~8)个浓度,使每个浓度溶液中含有10%的甲醇。

[0108] 2) LAE抗体稀释液的配制

[0109] 从冰箱中取出抗体,用PBS稀释成工作浓度。

[0110] 3) 点板

[0111] 取出经封闭的酶标板,经200μl PBST洗涤5次后,每孔加入系列浓度的LAE标准液50μL,再加入抗体稀释液50μL,对照孔加入含10%甲醇的PBS 50μL和抗体稀释液50μL。放入37℃温箱中温育1h,弃去孔内液体,用300μl PBST溶液洗涤5次,拍干。

[0112] 7.3.1.4加酶标二抗

[0113] 每孔加入经1:2000稀释的羊抗兔辣根过氧化物酶PBS溶液100μL,放入37℃温箱中1h,弃去孔内液体,用200μl PBST溶液洗涤5次,拍干。

[0114] 7.3.1.5显色

[0115] 每孔加入四甲基联苯胺(TMB)-过氧化氢尿素溶液100μL,37℃温箱中温育15min,用50μL 2mol/L H₂SO₄终止反应。在酶联仪上测定490nm波长下的吸光值。根据抑制率与农药浓度之间的半对数关系作图即得到标准曲线。

[0116] 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

[0117] 计算:抑制率(%) =
$$\frac{(OD_{\max}-OD_{\min})-(OD_x-OD_{\min})}{(OD_{\max}-OD_{\min})} \times 100\%$$

[0118] 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。

[0119] 由上述公式计算得LAE各浓度的抑制率,以LAE浓度为横坐标,抑制率为纵坐标作图。LAE的抑制中浓度(IC₅₀)为1.16mg/L,最低检测限(以IC₁₀表示)为0.005mg/L,LAE在0.005ppm~10ppm范围内,抑制率与LAE浓度呈线性关系,相关系数为r=0.9964。

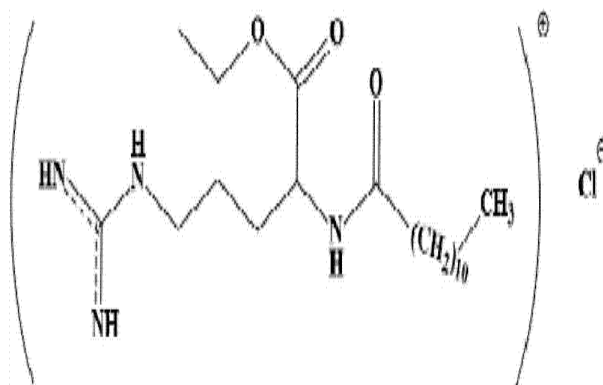
[0120] 7.4抗体的特异性

[0121] 抗体的特异性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LAE及其类似物做系列稀释,分别与同一种抗体竞争反应,按照7.3的方法制作标准曲线,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,然后计算出类似物的交叉反应率。抗体对非对称二甲基精氨酸的交叉反应率小于1%,从而可知,所制备的抗体特异性强,可以用于LAE的分析。

专利名称(译)	L-月桂酰胺精氨酸盐乙醇酯人工抗原、特异抗体制备方法及其用途		
公开(公告)号	CN107417579A	公开(公告)日	2017-12-01
申请号	CN201710462453.X	申请日	2017-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	宁波市农业科学研究院		
申请(专利权)人(译)	宁波市农业科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	宁波市农业科学研究院		
[标]发明人	付岩 张艳 张亮 陈国 吴银良		
发明人	付岩 张艳 张亮 陈国 吴银良		
IPC分类号	C07C279/14 C07K14/765 C07K14/77 C07K1/107 C07K16/44 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	C07C279/14 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/531 G01N33/543		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了L-月桂酰胺精氨酸盐乙醇酯人工抗原、特异抗体制备方法及其用途，属于免疫化学分析技术领域，专用于L-月桂酰胺精氨酸特异性抗体的制备及酶联免疫检测方法，合成了人工抗原LAS-BSA和LAS-OVA，免疫兔子获得L-月桂酰胺精氨酸的特异性多克隆抗体，最后利用合成的包被抗原和特异性抗体建立酶联免疫分析方法，该方法LAE最低检测限为0.005mg/L，回收率为82.4-109.8%，平均变异系数为3.2-5.8%，具有准确度和灵敏度高的特点，符合残留分析标准。



LAE 结构