



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105085663 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201510515134. 1

(22) 申请日 2015. 08. 20

(71) 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

(72) 发明人 庄惠生 孙瑞艳

(74) 专利代理机构 上海汉声知识产权代理有限公司 31236

代理人 郭国中 陈少凌

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 1/10(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

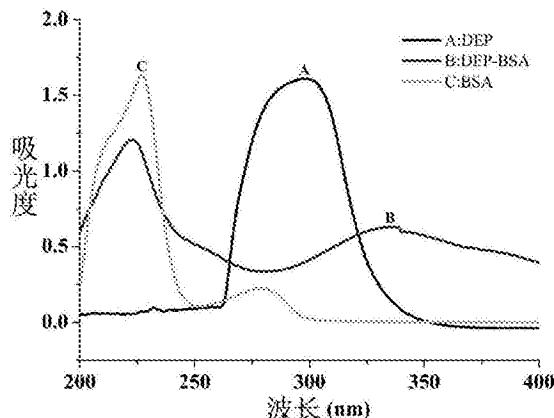
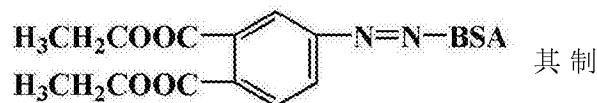
权利要求书2页 说明书11页 附图4页

(54) 发明名称

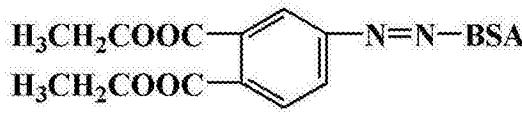
邻苯二甲酸二乙酯人工免疫原及其制备和用途

(57) 摘要

本发明提供了一种邻苯二甲酸二乙酯人工免疫原 DEP-BSA 及其制备和用途，所述 DEP-BSA 的结构式为：



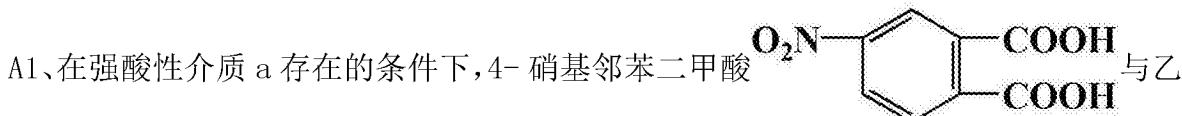
1. 一种邻苯二甲酸二乙酯的人工免疫原 DEP-BSA, 其特征在于, 结构式如式 (I) 所示 :



2. 一种如权利要求 1 所述的邻苯二甲酸二乙酯的人工免疫原 DEP-BSA 的制备方法, 其特征在于, 所述方法包括以下步骤 :

采用重氮化法将 DEP 半抗原与蛋白质分子 BSA 偶联制备人工免疫原 DEP-BSA。

3. 如权利要求 2 所述的邻苯二甲酸二乙酯的人工免疫原 DEP-BSA 的制备方法, 其特征在于, 所述 DEP 半抗原的制备方法包括如下步骤 :



醇发生酯化反应, 生成 4- 硝基邻苯二甲酸二乙酯 ;

A2、在非质子性有机溶剂存在的条件下, 所述 4- 硝基邻苯二甲酸二乙酯和锌粉、强酸 b 发生还原反应, 生成邻苯二甲酸二乙酯半抗原。

4. 如权利要求 3 所述的邻苯二甲酸二乙酯的人工免疫原 DEP-BSA 的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 A1 中, 4- 硝基邻苯二甲酸、乙醇、强酸性介质 a 的摩尔比为 1:(5~7):(0.6~0.8), 反应液 a 的温度为 86~90℃, 酯化反应时间为 8~10 小时 ; 所述步骤 A2 中, 4- 硝基邻苯二甲酸二乙酯、非质子性有机溶剂 a、强酸 b 和锌粉的摩尔比为 1:(550~580):(20~22):(18~20), 反应液 b 的温度为 25~35℃, 还原反应时间为 10~12 小时 ; 所述强酸性介质 a 和强酸 b 独立地选自浓盐酸、浓硫酸或浓硝酸中的一种, 所述非质子性有机溶剂选自苯或甲苯。

5. 如权利要求 2 所述的邻苯二甲酸二乙酯的人工免疫原 DEP-BSA 的制备方法, 其特征在于, 所述采用重氮化法将 DEP 半抗原与蛋白质分子 BSA 偶联制备人工免疫原 DEP-BSA 具体包括以下步骤 :

B、将 DEP 半抗原溶于强酸 c 中, 形成 DEP 半抗原溶液 ; 向 DEP 半抗原溶液中加入亚硝酸钠溶液, 反应, 生成重氮盐溶液 ;

C、将牛血清蛋白 BSA 溶于硼酸钠缓冲液中, 形成牛血清蛋白溶液 ;

D、向所述重氮盐溶液中加入牛血清蛋白溶液形成反应液, 搅拌反应。

6. 如权利要求 5 所述的邻苯二甲酸二乙酯的人工免疫原 DEP-BSA 的制备方法, 其特征在于, 步骤 B 中, 所述 DEP 半抗原、强酸 c、亚硝酸钠、牛血清蛋白 BSA 的摩尔比为 1:3~4:8~10:0.001~0.01 ; 所述强酸 c 为浓盐酸、浓硫酸或浓硝酸中的一种。

7. 如权利要求 5 所述的邻苯二甲酸二乙酯的人工免疫原 DEP-BSA 的制备方法, 其特征在于, 步骤 B 的反应过程还包括用 pH 试纸控制反应酸度为 2.0~3.0, 反应结束后加尿素去除未反应的亚硝酸钠 ; 所述 DEP 半抗原与尿素的摩尔比为 1:300~320。

8. 如权利要求 5 所述的邻苯二甲酸二乙酯的人工免疫原 DEP-BSA 的制备方法, 其特征在于, 步骤 D 中, 所述搅拌时间为 2~4 小时。

9. 如权利要求 5 所述的邻苯二甲酸二乙酯的人工免疫原 DEP-BSA 的制备方法, 其特征在于, 所述步骤还包括步骤 D 的反应结束后, 离心分离反应液, 取上清液透析, 离心分离, 得

纯化后的邻苯二甲酸二乙酯人工免疫原 DEP-BSA。

10. 一种如权利要求 1 所述的邻苯二甲酸二乙酯的人工免疫原 DEP-BSA 的用途, 其特征在于, 用于痕量塑化剂邻苯二甲酸二乙酯的检测。

## 邻苯二甲酸二乙酯人工免疫原及其制备和用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种邻苯二甲酸二乙酯人工免疫原 DEP-BSA 及其制备和用途,具体涉及的是一种用于新兴持久性有机污染物——邻苯二甲酸二乙酯免疫检测的邻苯二甲酸二乙酯人工免疫原 DEP-BSA 及其制备方法和用途。

### 背景技术

[0002] 邻苯二甲酸酯类塑化剂(缩写为 PAEs),又称酞酸酯类,是一类由邻苯二甲酸与含有4-15个碳的醇发生费歇尔(Fischer)酯化反应所形成的酯的重要衍生物的统称。这类物质有特殊性气味,毒性较大,一般情况下状态为粘稠液体;液态条件下温度范围宽,流动性大,挥发性低,不溶于水,易溶于大多数有机溶剂。这类物质用途广泛,它不仅可作为食品包装材料、玩具、农药载体、驱虫剂、润滑剂、乙烯地板和壁纸、去泡剂、清洁剂、医用材料(如人工心脏瓣膜等人工器官、血袋、注射器和胶管)和个人护理用品(主要有化妆品、香饰品、指甲油、头发喷雾剂、香皂和洗发液)等近千种产品的生产原材料,还常作为塑料增塑剂被用于改造塑料制品性能。

[0003] 其中,邻苯二甲酸二乙酯(英文名称:Diethylphthalate,简称 DEP),又名酞酸二乙酯, CAS 号为 84-66-2,分子式为  $C_{12}H_{14}O_4$ ,分子量为 222.24,无色至微黄色澄清油状液体,极易溶解于乙醇,几乎不溶于水;遇明火、高热可燃烧,具有刺激性。该物质低毒,对皮肤、眼睛、上呼吸道有刺激作用;经皮肤吸收或摄入后可引起头痛、头晕和呕吐;具潜在的光毒性、轻度致敏;对女性子宫有影响,可能导致胎儿畸形或死亡<sup>1</sup>。由于它能与大多数树脂的相容性比较好,因此,它主要作为树脂的增塑剂而广泛应用;此外,还可作为润滑剂、起泡剂、香水及药用包衣材料的辅料。近些年来,有研究学者发现该物质在食品(如:酒、饮料等)中的含量过高从而危及食品安全,因此便备受人们关注。

[0004] 目前,关于邻苯二甲酸二乙酯的研究主要集中在水体、沉积物、大气等环境领域和生物体的毒性方面,但样品的检测方法方面研究较少。目前对邻苯二甲酸二乙酯的检测手段主要为气相色谱和高效液相色谱等仪器检测方法,这些方法虽然准确可靠,但对样品的预处理方法和操作人员的专业性有很高的要求。正因为这些方法的处理复杂、耗时、仪器价格昂贵而不适合推广使用,也不利于在环境污染事故现场快速检测。为克服这些缺点,寻求一种快速、简便、灵敏且经济实用的分析方法就成为环境监测领域的主要研究方向。

[0005] 20世纪60年代发展起来的免疫分析(Immunoassay, IA)是基于抗原和抗体的特异性、可逆性结合反应的分析技术。免疫分析具有常规理化分析技术无可比拟的选择性和高灵敏性,非常适合复杂介质中痕量组分的分析。因此免疫分析具有的特异性强、灵敏度高、方法快捷简单、分析通量大、检测成本低等优点,使得该类方法可以满足简单、快速、灵敏地检测持久性有机污染物的要求。1971年Engvall, VanWeerman等报道了检测体液中微量物质的固相免疫分析技术,即酶联免疫吸附分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。目前,ELISA方法已经成为免疫分析方法中重要的组成部分。ELISA方法是将抗原-抗体之间的免疫反应与酶的高效催化特性有机结合而发展起来的一种免疫分析

方法。其中,以亲和素-生物素信号放大系统为基础的亲和素-生物素化酶联免疫吸附分析法,以生物素标记抗体(抗原),并以酶标亲和素代替ELISA方法中酶标抗体。亲和素是卵白蛋白中的一种碱性糖蛋白,分子量约为68kDa。一个亲和素分子由4个亚单位组成,每个亚单位都可以与一个生物素分子(分子量为244)特异性结合。生物素与亲和素结合特异性强,其亲和力比抗原抗体反应大得多,亲和常数高达 $1015M^{-1}$ 。由于一个亲和素能与4个生物素分子结合,因此在检测中可提高被固相结合酶的数量,进而提高检测方法的灵敏度。

[0006] 现有技术中,一篇名为“环境激素邻苯二甲酸二甲酯(二乙酯)的荧光免疫分析新方法研究”的硕士论文中公开了一种邻苯二甲酸二乙酯的荧光免疫分析方法,但该方法中免疫原制备方法粗糙,不易重复出来。

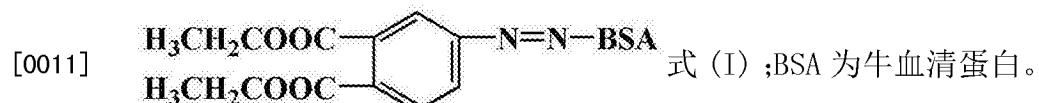
[0007] 目前尚没有亲和素-生物素化酶联免疫吸附分析法检测邻苯二甲酸二乙酯的相关报道。而制备合格的DEP人工免疫原是生物免疫得到高特异性抗DEP抗体的前提,更是建立DEP免疫检测分析方法的关键,这将具有重要的应用价值和理论研究意义。

## 发明内容

[0008] 针对现有技术中的缺陷,本发明的目的是提供一种步骤简单,速度快,产率高的邻苯二甲酸二乙酯人工免疫原(DEP-BSA)制备方法,为免疫得到特异性抗体和利用人工抗原、抗体建立免疫检测方法奠定基础。

[0009] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

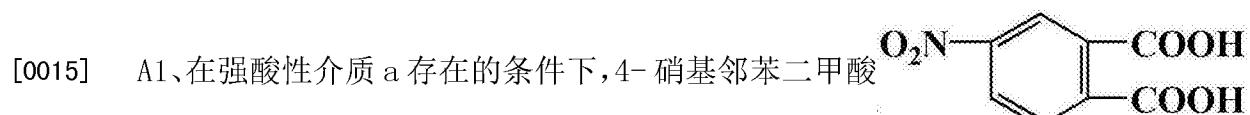
[0010] 本发明提供了一种邻苯二甲酸二乙酯的人工免疫原DEP-BSA,其特征在于,结构式如式(I)所示:



[0012] 本发明还提供了一种邻苯二甲酸二乙酯的人工免疫原DEP-BSA的制备方法,所述方法包括以下步骤:

[0013] 采用重氮化法将DEP半抗原与蛋白质分子BSA偶联制备人工免疫原DEP-BSA。

[0014] 优选地,所述DEP半抗原的制备方法包括如下步骤:



与乙醇发生酯化反应,生成4-硝基邻苯二甲酸二乙酯;

[0016] A2、在非质子性有机溶剂存在的条件下,所述4-硝基邻苯二甲酸二乙酯和锌粉、强酸b发生还原反应,生成邻苯二甲酸二乙酯半抗原,即DEP半抗原。

[0017] DEP半抗原化学名称为4-氨基邻苯二甲酸二乙酯,分子式为 $C_{12}H_{15}NO_4$ ,分子量:237.25。

[0018] 优选地,所述步骤A1中,4-硝基邻苯二甲酸、乙醇、强酸性介质a的摩尔比为1:(5~7):(0.6~0.8),反应液a的温度为86~90℃,酯化反应时间为8~10小时;所述步骤A2中,4-硝基邻苯二甲酸二乙酯、非质子性有机溶剂a、强酸b和锌粉的摩尔比为1:(550~580):(20~22):(18~20),反应液b的温度为25~35℃,还原反应时间为10~

12 小时 ; 所述强酸性介质 a 和强酸 b 独立地选自浓盐酸、浓硫酸或浓硝酸中的一种, 所述非质子性有机溶剂选自苯或甲苯。

[0019] 理想状态下, 4- 硝基邻苯二甲酸、乙醇的摩尔比是 1:2, 但为了反应顺利进行, 一般乙醇的用量是 4- 硝基邻苯二甲酸的摩尔量的 5 倍以上, 但不能超过 4- 硝基邻苯二甲酸的摩尔量的 7 倍 ; 此外, 强酸作为酯化反应的催化剂, 所用量一般是原料 4- 硝基邻苯二甲酸摩尔量的 0.6 倍以上, 但不超过原料 4- 硝基邻苯二甲酸摩尔量的 0.7 倍 ; 乙醇在 86℃ 处于沸腾状态, 那么 90℃ 更处于沸腾状态, 反应向右进行。此外, 理想状态下 4- 硝基邻苯二甲酸二乙酯、强酸和纯锌粉的摩尔比是 1:10:10, 但为了反应顺利向右进行, 一般纯锌粉的用量是原料 4- 硝基邻苯二甲酸二乙酯摩尔量的 18 倍以上, 但不能超过原料 4- 硝基邻苯二甲酸二乙酯、摩尔量的 20 倍 ; 此外, 强酸作为还原反应的强氧化剂, 所用量一般是原料纯锌粉摩尔数的 1 倍以上, 但不超过原料纯锌粉摩尔数的 1.1 倍, 而非质子性有机溶剂苯的摩尔数需要是强氧化剂摩尔数的 25 倍以上, 但不超过强氧化剂摩尔数的 28 倍。

[0020] 优选地, 所述步骤 A1 还包括酯化反应完全后, 蒸馏除去未反应的乙醇和生成的水, 再趁热将液体倒入冰水中, 析出的油状粗品用 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液洗涤至水层呈无色, 干燥 DEP 半抗原中间体的步骤。

[0021] 优选地, 所述步骤 A2 还包括还原反应完全后, 用冰水和强碱溶液以终止反应, 萃取反应液, 分离, 除杂质, 干燥, 重结晶, 层析柱分离纯化 DEP 半抗原的步骤。

[0022] 优选地, 所述强碱选自氢氧化钠或氢氧化钾。

[0023] 优选地, 所述锌粉为纯锌粉, 即化学级别分析纯, 国药试剂公司生产。

[0024] 优选地, 所述采用重氮化法将 DEP 半抗原与蛋白质分子 BSA 偶联制备人工免疫原 DEP-BSA 具体包括以下步骤 :

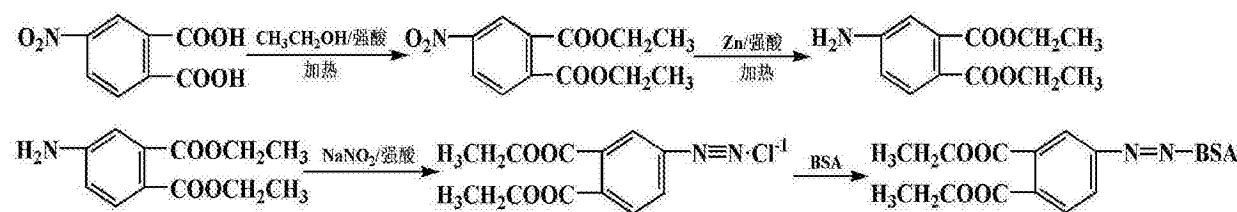
[0025] B、将 DEP 半抗原溶于强酸 c 中, 形成 DEP 半抗原溶液 ; 向 DEP 半抗原溶液中加入亚硝酸钠溶液, 反应, 生成重氮盐溶液 ;

[0026] C、将牛血清蛋白 BSA 溶于硼酸钠缓冲液中, 形成牛血清蛋白溶液 ;

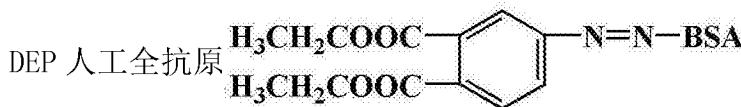
[0027] D、向所述重氮盐溶液中加入牛血清蛋白溶液形成反应液, 搅拌反应。

[0028] 本发明采用重氮化法合成邻苯二甲酸二乙酯人工免疫原, 其反应方程式如下 :

[0029]



[0030] 上述反应方程式中, 中间产物重氮盐与牛血清蛋白 BSA 结合, 偶联脱水, 生成了



[0031] 优选地, 步骤 B 中, 所述 DEP 半抗原、强酸 c 、亚硝酸钠、牛血清蛋白 BSA 的摩尔比为 1:3 ~ 4:8 ~ 10:0.001 ~ 0.01 ; 所述强酸 c 为浓盐酸、浓硫酸或浓硝酸中的一种。

[0032] 优选地, 步骤 B 的反应过程还包括用 pH 试纸控制反应酸度为 2.0~3.0, 反应结束后

加尿素去除未反应的亚硝酸钠;所述 DEP 半抗原与尿素的摩尔比为 1:300 ~ 320。

[0033] 优选地,步骤 D 中,所述搅拌时间为 2 ~ 4 小时。

[0034] 为充分反应,根据经验,当半抗原与强酸、亚硝酸钠、BSA 的摩尔比为 1:3:8:0.001,半抗原与尿素的摩尔比为 1:300 时搅拌反应 2 小时就可以,当半抗原与与强酸、亚硝酸钠、BSA 的摩尔比为 1:4:10:0.005,半抗原与尿素的摩尔比为 1:320 时反应就需要 4 小时。

[0035] 优选地,步骤 B 中,所述将 DEP 半抗原溶液加入亚硝酸钠溶液是在 0 ~ 4℃ 低温磁力搅拌下进行。一方面,为了后面加入蛋白质的时候不会使其变性或失活,所有需要保持蛋白活性的长时间反应都需要在低温情况下进行,经验表明 0 ~ 4℃ 最合适;另一方面,亚硝酸钠加入与 4-氨基邻苯二甲酸二乙酯反应生成重氮盐的过程会放出热量,为保持反应顺利进行,低温是最合适的。

[0036] 优选地,所述步骤还包括步骤 D 的反应结束后,离心分离反应液,取上清液透析,离心分离,得纯化后的邻苯二甲酸二乙酯人工免疫原 DEP-BSA。

[0037] 本发明还提供了一种邻苯二甲酸二乙酯的人工免疫原 DEP-BSA 的用途,用于痕量塑化剂邻苯二甲酸二乙酯的检测。

[0038] 人工免疫原的表征:

[0039] 将制备的人工免疫原适当稀释,使其吸光度在 0.1 ~ 2 之间,以 PBS 为空白对照,用紫外分光光度计在 200 ~ 500nm 分别测定 DEP 半抗原和 DEP-BSA 吸光值,绘制紫外吸收光谱图,并根据以下公式计算偶联比:

[0040]

$$\text{偶联比} = \frac{\epsilon_{\text{conjugate}} - \epsilon_{\text{protein}}}{\epsilon_{\text{hapten}}} = \frac{(OD_{\text{conjugate}} - OD_{\text{protein}}) \times C_{\text{hapten}} \times M_{\text{protein}}}{OD_{\text{hapten}} \times M_{\text{hapten}} \times C_{\text{protein}}}$$

[0041] 式中:OD<sub>conjugate</sub>——偶联物吸光度;OD<sub>protein</sub>——蛋白质吸光值;OD<sub>hapten</sub>——半抗原吸光值;C<sub>hapten</sub>——半抗原浓度;C<sub>protein</sub>——蛋白质浓度;M<sub>hapten</sub>——半抗原分子量;M<sub>protein</sub>——蛋白质分子量。

[0042] 本发明的邻苯二甲酸二乙酯人工免疫原 DEP-BSA 的应用,通过免疫动物制备抗邻苯二甲酸二乙酯特异性抗体,能与邻苯二甲酸二乙酯发生特异性免疫反应的免疫球蛋白 IgG 反应,用于水体、土壤、大气等环境样品和各类食品中痕量塑化剂邻苯二甲酸二乙酯的检测。

[0043] 由于邻苯二甲酸二乙酯是小分子物质,只具有反应原性而没有免疫原性,而且该分子上没有能与蛋白质分子直接结合的氨基、仲氨基等官能团,故本发明通过选择 4-硝基邻苯二甲酸为原料,经两步反应制备带有氨基活性基团的 DEP 半抗原,然后用重氮化法将这个含氨基的半抗原与蛋白质分子偶联制备人工免疫原,在将制备的免疫原对新西兰大白兔免疫,得到高特异性的抗邻苯二甲酸二乙酯多克隆抗体,此抗体将用于建立针对邻苯二甲酸二乙酯的亲和素-生物素化酶联免疫吸附分析方法。

[0044] 与现有技术相比,本发明具有如下的有益效果:

[0045] (1) 抗原实用性强:邻苯二甲酸二乙酯抗原制备和抗体制备具有重要的实用价值和现实意义。利用本专利中的方法,成功制备了邻苯二甲酸二乙酯人工免疫原 DEP-BSA。本发明的制备方法中各条件明确细化,再制备成功率提高,制备效果理想。该人工免疫原保留了邻苯二甲酸二乙酯的结构,具有针对邻苯二甲酸二乙酯的抗原决定簇,为制备特异性好、

效价高的抗体和建立亲和素-生物素化酶联免疫吸附分析方法提供了保障。

[0046] (2) 抗原稳定性好:此法合成的邻苯二甲酸二乙酯人工抗原具有较好的稳定性,在0~4℃环境下可保存1年不变性,-20℃环境下可保存3年。

[0047] (3) 抗原制备技术简便可行:抗原的整个制备过程无需特别的仪器设备,成本低廉,容易工业化规模生产。

[0048] (4) 与现有技术制备的DEP免疫原相比,该免疫原偶联比更高,更适合用于免疫动物制备多克隆抗体,且制备的多克隆抗体效价高,为建立免疫分析方法奠定更好的基础;且基于此技术建立的检测方法是目前批量检测DEP最为高效、快速的方法。

## 附图说明

[0049] 通过阅读参照以下附图对非限制性实施例所作的详细描述,本发明的其它特征、目的和优点将会变得更明显:

[0050] 图1为邻苯二甲酸二乙酯半抗原红外光谱;

[0051] 图2为邻苯二甲酸二乙酯半抗原的核磁共振谱图;

[0052] 图3为邻苯二甲酸二乙酯半抗原、载体蛋白BSA和人工免疫原DEP-BSA紫外吸收光谱图;

[0053] 图4为免疫新西兰大白兔产生的抗DEP抗体效价的变化;

[0054] 图5为间接竞争BA-ELISA免疫分析方法检测邻苯二甲酸二乙酯的标准工作曲线。

## 具体实施方式

[0055] 下面结合具体实施例对本发明进行详细说明。以下实施例将有助于本领域的技术人员进一步理解本发明,但不以任何形式限制本发明。应当指出的是,对本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进。这些都属于本发明的保护范围。

[0056] 实施例1 邻苯二甲酸二乙酯半抗原的制备与鉴定

[0057] (1) 邻苯二甲酸二乙酯半抗原的制备

[0058] 取洁净的容积为100mL三口圆底烧瓶,向瓶底装入10g(0.0474mol)4-硝基邻苯二甲酸,随后缓慢加入16.6mL(0.2850mol)无水乙醇,边搅拌边加入1.65mL浓H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(0.0304mol)催化,86℃搅拌回流,直至薄板层析法(TLC)检测原料点消失为止(显色剂:丙酮溶剂中溶解少量的高锰酸钾;展开剂,正己烷:乙酸乙酯=5:1);搅拌回流9h后反应完成;蒸馏除去未反应的乙醇和生成的水;此时将液体趁热倒入冰水中,析出固体;过滤后得到的固体粗品用10%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液洗涤至水层无色(pH7.0~8.0);最后,油状粗品用无水乙醇重结晶纯化,-20℃冻干后得浅黄色针状晶体4-硝基邻苯二甲酸二乙酯即DEP半抗原中间体。

[0059] 将1.5g(0.0056mol)DEP半抗原中间体(4-硝基邻苯二甲酸二乙酯)装入容积为500mL三口圆底烧瓶底部,随后向瓶底边搅拌边加入280mL(3.1495mol)苯,待半抗原被苯溶解后再加入3.4g纯锌粉(0.0520mol),搅拌均匀后分次加入10mL浓HCl(0.1200mol),室温搅拌15min后再次加入3.4g纯锌粉(0.0520mol),35℃搅拌反应10h;反应结束后,将340mL冷水加入反应体系,并用1M氢氧化钠溶液中和至弱碱性(pH7.0~8.5);静置1h后分

离出苯层,再用苯萃取水层,合并萃取液,水洗后用无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  脱水干燥,萃取液减压蒸馏以除去苯,得到的浅黄色固体再用无水乙醇重结晶,硅胶柱层析(洗脱剂为,乙酸和正己烷的混合液( $V/V = 8:1$ ))后减压蒸馏,得到淡黄色晶体4-氨基邻苯二甲酸二乙酯,即DEP半抗原。邻苯二甲酸二乙酯半抗原分子式: $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ ;分子量237.25;产率76.2%;熔点:90~92℃,纯度98%。

[0060] (2) 邻苯二甲酸二乙酯半抗原的鉴定

[0061] 将制得的半抗原经红外光谱(图1)、核磁共振光谱(图2)鉴定,红外光谱结果为:IR(KBr)  $\nu / \text{cm}^{-1}$ :3466.06, 3369.16(-NH<sub>2</sub>), 1720.18(C=O), 1257.81, 1068.87(C-O-C), 2980.89, 2927.48(-CH<sub>3</sub>), 1449.97(d-OCH<sub>2</sub>-), 1630.07, 1564.19, 1449.97(C=C), 3227.98, 1604.33, 833.75(C-H, Ar)。核磁共振结果为:<sup>1</sup>HNMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>):  
 $\delta$  7.73(d, 1H, ArH), 6.73(d, 1H, ArH), 6.67(d, 1H, ArH), 4.36(q, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.30(q, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.26(b, 2H, -NH<sub>2</sub>), 1.39(t, 3H, OCH<sub>2</sub>), 1.33(t, 3H, OCH<sub>2</sub>) ppm。红外、核磁表征结果表明,DEP半抗原具有-NH<sub>2</sub>、-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、苯环等基团的特征吸收峰,证明制备的DEP半抗原分子中含有氨基官能团,最终实验中成功制备了DEP半抗原。

[0062] 从以上分析可知,所合成的产物为目标物。

[0063] 实施例2、邻苯二甲酸二乙酯半抗原的制备与鉴定

[0064] (1) 邻苯二甲酸二乙酯半抗原的制备

[0065] 取洁净的容积为100mL三口圆底烧瓶,向瓶底装入10g(0.0474mol)4-硝基邻苯二甲酸,随后缓慢加入13.7mL(0.2370mol)无水乙醇,边搅拌边加入1.55mL浓H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(0.0285mol)催化,90℃搅拌回流,直至薄板层析法(TLC)检测原料点消失为止(显色剂:丙酮溶剂中溶解少量的高锰酸钾;展开剂,正己烷:乙酸乙酯=5:1);搅拌回流8h后反应完成;蒸馏除去未反应的乙醇和生成的水;此时将液体趁热倒入冰水中,析出固体;过滤后得到的固体粗品用10%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液洗涤至水层无色(pH7.0~8.0)。最后,油状粗品用无水乙醇重结晶纯化,-20℃冻干后得浅黄色针状晶体4-硝基邻苯二甲酸二乙酯即DEP半抗原中间体。

[0066] 将1.5g(0.0056mol)DEP半抗原中间体(4-硝基邻苯二甲酸二乙酯)装入容积为500mL三口圆底烧瓶底部,随后向瓶底边搅拌边加入288mL(3.2480mol)苯,待半抗原被苯溶解后再加入3.3g纯锌粉(0.0504mol),搅拌均匀后分次加入10mL浓HCl(0.1232mol),室温搅拌15min后再次加入3.3g纯锌粉(0.0504mol),30℃搅拌反应11h;反应结束后,将330mL冷水加入反应体系,并用1M氢氧化钾溶液中和至弱碱性(pH7.0~8.5);静置1h后分离出苯层,再用苯萃取水层,合并萃取液,水洗后用无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>脱水干燥,萃取液减压蒸馏以除去苯,得到的浅黄色固体再用无水乙醇重结晶,硅胶柱层析(洗脱剂为,乙酸和正己烷的混合液( $V/V = 8:1$ ))后减压蒸馏,得到淡黄色晶体4-氨基邻苯二甲酸二乙酯,即DEP半抗原。邻苯二甲酸二乙酯半抗原分子式: $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ ;分子量237.25;产率76.2%;熔点:90~92℃,纯度98%。

[0067] (2) 邻苯二甲酸二乙酯半抗原的鉴定

[0068] 将制得的半抗原经红外光谱、核磁共振光谱鉴定,红外光谱结果为:IR(KBr)  $\nu / \text{cm}^{-1}$ :3466.06, 3369.16(-NH<sub>2</sub>), 1720.18(C=O), 1257.81, 1068.87(C-O-C), 2980.89, 2927.48(-CH<sub>3</sub>), 1449.97(d-OCH<sub>2</sub>-), 1630.07, 1564.19, 1449.97(C=C),

3227. 98, 1604. 33, 833. 75 (C-H, Ar)。核磁共振结果为:  $^1\text{H}$ NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 8 7. 73 (d, 1H, ArH), 6. 73 (d, 1H, ArH), 6. 67 (d, 1H, ArH), 4. 36 (q, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4. 30 (q, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4. 26 (b, 2H, -NH<sub>2</sub>), 1. 39 (t, 3H, OCH<sub>2</sub>), 1. 33 (t, 3H, OCH<sub>2</sub>) ppm。红外、核磁表征结果表明, DEP 半抗原具有 -NH<sub>2</sub>、-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、苯环等基团的特征吸收峰, 证明制备的 DEP 半抗原分子中含有氨基官能团, 最终实验中成功制备了 DEP 半抗原。

[0069] 从以上分析可知, 所合成的产物为目标物。

[0070] 实施例 3、邻苯二甲酸二乙酯半抗原的制备鉴定

[0071] (1) 邻苯二甲酸二乙酯半抗原的制备

[0072] 取洁净的容积为 100mL 三口圆底烧瓶, 向瓶底装入 10g (02. 0474mol) 4- 硝基邻苯二甲酸, 随后缓慢加入 19. 2mL (0. 3318mol) 无水乙醇, 边搅拌边加入 2. 06mL 浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0. 0379mol) 催化, 90℃搅拌回流, 直至薄板层析法 (TLC) 检测原料点消失为止 (显色剂: 丙酮溶剂中溶解少量的高锰酸钾; 展开剂, 正己烷: 乙酸乙酯 = 5:1); 搅拌回流 10h 后反应完成; 蒸馏除去未反应的乙醇和生成的水; 此时将液体趁热倒入冰水中, 析出固体; 过滤后得到的固体粗品用 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液洗涤至水层无色 (pH7. 0-8. 0)。最后, 油状粗品用无水乙醇重结晶纯化, -20℃冻干后得浅黄色针状晶体 4- 硝基邻苯二甲酸二乙酯即 DEP 半抗原中间体。

[0073] 称取 10g (0. 0474mol) 4- 硝基邻苯二甲酸加入到圆底烧瓶中, 随后缓慢加入 9. 6mL (0. 2370mol) 乙醇, 边搅拌边加入 1. 29mL (0. 0237mol) 浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 催化, 逐渐升温至 80℃ 回流加热 6 小时, 直至薄板层析法 (TLC) 检测原料点消失为止 (显色剂: 丙酮溶剂中溶解少量的高锰酸钾; 展开剂, 正己烷: 乙酸乙酯 = 5:1); 反应结束后将反应液转移至旋转蒸发仪中减压蒸馏除去未反应的乙醇和生成的水, 再趁热将液体倒入冰水中, 析出固体; 随后油状粗品用 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液洗涤至水层呈无色 (pH7. 0-8. 0), 油状粗品用无水乙醇重结晶, 得浅黄色针状晶体 4- 硝基邻苯二甲酸二乙酯即 DEP 半抗原中间体。4- 硝基邻苯二甲酸二乙酯分子式: C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>6</sub>; 分子量: 239. 18; 产率: 53. 8%; 熔点: 64 ~ 66℃, 纯度 98%。

[0074] (2) 邻苯二甲酸二乙酯半抗原的鉴定

[0075] 将制得的半抗原经红外光谱、核磁共振光谱鉴定, 红外光谱结果为: IR (KBr)  $\nu$  / cm<sup>-1</sup>: 3466. 06, 3369. 16 (-NH<sub>2</sub>), 1720. 18 (C = O), 1257. 81, 1068. 87 (C-O-C), 2980. 89, 2927. 48 (-CH<sub>3</sub>), 1449. 97 (d-OCH<sub>2</sub>-), 1630. 07, 1564. 19, 1449. 97 (C = C), 3227. 98, 1604. 33, 833. 75 (C-H, Ar)。核磁共振结果为:  $^1\text{H}$ NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 8 7. 73 (d, 1H, ArH), 6. 73 (d, 1H, ArH), 6. 67 (d, 1H, ArH), 4. 36 (q, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4. 30 (q, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4. 26 (b, 2H, -NH<sub>2</sub>), 1. 39 (t, 3H, OCH<sub>2</sub>), 1. 33 (t, 3H, OCH<sub>2</sub>) ppm。红外、核磁表征结果表明, DEP 半抗原具有 -NH<sub>2</sub>、-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、苯环等基团的特征吸收峰, 证明制备的 DEP 半抗原分子中含有氨基官能团, 最终实验中成功制备了 DEP 半抗原。

[0076] 从以上分析可知, 所合成的产物为目标物。

[0077] 实施例 4、邻苯二甲酸二乙酯人工免疫原的合成

[0078] 采用重氮化法制备 DEP 免疫原 DEP-BSA, 具体合成步骤: 将 0. 0209g (0. 1mmol) DEP 半抗原装入容积为 25mL 的锥形瓶中, 边滴加 0. 75mL H<sub>2</sub>O 边搅拌, 混合后再加入 0. 025mL 浓 HCl (0. 3mmol), 待混合物加热溶解后置冰浴中冷却; 随后, 在 4℃ 低温搅拌的情况下, 逐滴滴加 1M 亚硝酸钠溶液 (0. 8mmol), 用 pH 试纸控制反应酸度为 2. 0-3. 0, 同时用淀粉碘化钾

试纸显色,显色时间为滴加后的 1-3s,试纸由白色瞬间变成灰蓝色时停止滴加,再继续反应 30min,加 1.92g(0.0320mol) 尿素以去除未反应的亚硝酸钠;然后,向上述重氮盐中逐滴加入 0.08mMBSA 溶液 (0.01M pH9.18 硼酸钠缓冲液溶解) 10mL(0.0008mmol),直至溶液逐渐呈橙红色,继续反应 2h 后,将得到的抗原粗品装入透析袋,置于 0.01M pH7.40 磷酸盐缓冲液中透析 3d,每隔 8h 换水 1 次,最后将终产物 4000r·min<sup>-1</sup> 离心 15min,取其上清液即 DEP 免疫原 DEP-BSA。免疫原经紫外-可见分光光度计鉴定后,小量分装,-20℃冷冻干燥、分装并于 -20℃ 保存。

[0079] 实施例 5 邻苯二甲酸二乙酯人工免疫原的合成

[0080] 采用重氮化法制备 DEP 免疫原 DEP-BSA,具体合成步骤:将 0.0209g(0.1mmol) DEP 半抗原装入容积为 25mL 的锥形瓶中,边滴加 0.75mL H<sub>2</sub>O 边搅拌,混合后再加入 0.033mL 浓 HCl (0.4mmol),待混合物加热溶解后置冰浴中冷却;随后,在 4℃ 低温搅拌的情况下,逐滴滴加 1M 亚硝酸钠溶液 (1.0mmol),用 pH 试纸控制反应酸度为 2.0-3.0,同时用淀粉碘化钾试纸显色,显色时间为滴加后的 1-3s,试纸由白色瞬间变成灰蓝色时停止滴加,再继续反应 30min,加 1.8g(0.03mol) 尿素以去除未反应的亚硝酸钠;然后,向上述重氮盐中逐滴加入 0.08mMBSA 溶液 12.5mL (0.01M pH9.18 硼酸钠缓冲液溶解) (0.001mmol),直至溶液逐渐呈橙红色,继续反应 3h 后,将得到的抗原粗品装入透析袋,置于 0.01M pH7.40 磷酸盐缓冲液中透析 3d,每隔 8h 换水 1 次,最后将终产物 4000r·min<sup>-1</sup> 离心 15min,取其上清液即 DEP 免疫原 DEP-BSA。免疫原经紫外-可见分光光度计鉴定后,小量分装,-20℃冷冻干燥、分装并于 -20℃ 保存。

[0081] 实施例 6 邻苯二甲酸二乙酯人工免疫原的合成

[0082] 采用重氮化法制备 DEP 免疫原 DEP-BSA,具体合成步骤:将 0.0209g(0.1mmol) DEP 半抗原装入容积为 25mL 的锥形瓶中,边滴加 0.75mL H<sub>2</sub>O 边搅拌,混合后再加入 0.029mL 浓 HCl (0.35mmol),待混合物加热溶解后置冰浴中冷却;随后,在 4℃ 低温搅拌的情况下,逐滴滴加 1M 亚硝酸钠溶液 (0.9mmol),用 pH 试纸控制反应酸度为 2.0-3.0,同时用淀粉碘化钾试纸显色,显色时间为滴加后的 1-3s,试纸由白色瞬间变成灰蓝色时停止滴加,再继续反应 30min,加 1.86g(0.031mol) 尿素以去除未反应的亚硝酸钠;然后,向上述重氮盐中逐滴加入 0.08mMBSA 溶液 (0.01M pH9.18 硼酸钠缓冲液溶解) (0.0001mmol),直至溶液逐渐呈橙红色,继续反应 3h 后,将得到的抗原粗品装入透析袋,置于 0.01M pH7.40 磷酸盐缓冲液中透析 2.5d,每隔 8h 换水 1 次,最后将终产物 4000r·min<sup>-1</sup> 离心 15min,取其上清液即 DEP 免疫原 DEP-BSA。免疫原经紫外-可见分光光度计鉴定后,小量分装,-20℃冷冻干燥、分装并于 -20℃ 保存。

[0083] 实施例 7 邻苯二甲酸二乙酯人工免疫原的鉴定

[0084] 可进行人工免疫原鉴定的方法有色谱法、红外光谱法、紫外光谱法、SDS-PAGE 凝胶电泳等。其中最常用的方法是紫外可见光谱法。一般来说,只要人工免疫原的紫外-可见光谱与载蛋白和半抗原的紫外光谱不同,即可间接说明半抗原成功与蛋白质偶联,人工免疫原合成成功。因为根据朗伯-比尔定律,当波长一定时,混合物的紫外吸收具有加合性。采用全波长紫外分光光度计对半抗原、载体蛋白和人工免疫原进行扫描,根据特征吸收峰的位置确定偶联是否成功。元素分析结果进一步证明了产物的结构和所设计的路线一致。

[0085] 由图 3 的紫外光谱图可知,DEP 半抗原 4-氨基邻苯二甲酸二乙酯有一个紫外吸收

峰,位于 295nm 处;BSA 有两个紫外吸收峰,分别位于 227nm 和 278nm 处,其中 278nm 吸收峰处的吸收值很低;DEP 人工免疫原有两个紫外吸收峰,分别位于 222nm 和 336nm 处。此外,我们可以清晰发现,半抗原在 295nm 处的紫外吸收峰发生红移后转移到 336nm 处,这说明半抗原上的氨基发生了重氮化后已经成功与 BSA 相互偶联结合;而 BSA 紫外吸收峰有所偏移,由 227nm 处移至 222nm 处,这说明有一部分氨基酸与 DEP 半抗原发生了偶联反应,从而使 DEP 半抗原、BSA 与人工免疫原的紫外吸收光谱既有区别又有联系,综合得知:免疫原包含了 DEP 半抗原和蛋白质 BSA 的吸收特征,说明 DEP 半抗原已顺利偶联到载体蛋白表面,人工免疫原的合成制备成功。计算 DEP-BSA 中 DEP 与 BSA 的结合比为 15.8:1。

[0086] 实施例 8 邻苯二甲酸二乙酯免疫原蛋白质浓度的测定

[0087] 根据考马斯亮蓝 G250 法测定免疫原蛋白质浓度。考马斯亮蓝 G250 在游离时为红色,与蛋白质结合后为青蓝色,前者最大吸收值在 465nm,后者在 595nm 处。以 BSA 为标准物质配置不同浓度标准溶液,与一定量考马斯亮蓝 G250 反应后,分别在 595nm 处测定溶液吸光度值。标准溶液在 0~150 μg/mL 范围内线性关系良好。在稀释一定倍数的免疫原溶液中加入考马斯亮蓝染色,在相同波长处测量吸光度值,后与标准曲线比较,得制备的免疫原蛋白质浓度为 2.62mg/mL。这些 DEP 人工免疫原既可以用于免疫动物,通过动物产生的免疫反应得到可以用来做免疫分析的单克隆或多克隆抗体,又可以作为免疫竞争对象而使用。

[0088] 实施例 9 动物免疫实验验证制备抗 DEP 多克隆抗体

[0089] 为证实 DEP 半抗原偶联合成的人工免疫原具有免疫原性,故通过生物体免疫反应制备抗 DEP 多克隆抗体,具体如下:选择 2 只成年健康雄性新西兰白兔,合成出的人工免疫原经过与弗氏完全佐剂充分混合后,对大白兔进行颈部和背部点状注射免疫,经过 7 次加强免疫后,采用间接酶联免疫分析法测定抗血清效价,其抗血清效价均已达到 120000,具体效价变化见图 4。试验显示交叉反应均不明显,说明其特异性较好。

[0090] 实施例 10 间接竞争 BA-ELISA 免疫分析方法检测环境样品中邻苯二甲酸二乙酯

[0091] 间接竞争 BA-ELISA 免疫分析方法检测环境样品中邻苯二甲酸二乙酯具体步骤如下:用包被缓冲液 (0.05M pH9.60 碳酸盐缓冲液) 适当稀释 DEP 包被原溶液,100 μL/孔,加入 96 孔酶标板中,4℃包被过夜;次日倒掉包被液,每孔加入 200 μL 洗涤液 (0.01M pH7.40PBST),重复洗涤三次,每次 3min;用吸水纸拍干酶标板后,每孔加入封闭液 200 μL,37℃温育 1 小时;倒掉封闭液,重复上述洗涤过程三次,生物素化抗 DEP 多克隆抗体 (Bio-pAb-DEP) 稀释至适当浓度,每孔依次加入 50 μL 生物素化抗体及 50 μL DEP 标准样品 (用含 5% 二甲亚砜 (DMSO) 的 PBS (v/v) 梯度稀释),空白孔每孔加入 100 μL PBS 缓冲液,37℃温育 30 分钟;倒掉抗原-抗体反应液,重复洗涤三次,用 PBST 适当稀释辣根过氧化酶 (HRP) 标记的链霉亲和素 (HRP-SA),每孔加入 100 μL,37℃温育 1 小时;倒掉 HRP-SA 溶液,重复洗涤五次,每孔加入新鲜配制的显色液 (400 μL 2.5mg/mL 3',5,5'-四甲基联苯胺底物溶液与 10mL 磷酸盐-柠檬酸底物缓冲液、10 μL 30% 的 H2O2 混合形成显色液) 100 μL/孔,室温下避光反应 15min;每孔加入 50 μL 终止液 (2mol/L 硫酸溶液) 以终止显色,然后用酶标仪测定各孔在 450nm 和 630nm 处吸光度值 (OD 值),以  $OD = OD_{450} - OD_{630}$  作为最终读数。实验结果用抑制率来表示,并以抑制率为纵坐标,标准样品浓度的对数值为横坐标绘制标准曲线,建立的标准工作曲线如图 5 所示。其中,抑制率 (%) =  $(1 - A/A_0) \times 100$ ,其中 A 为有样品存在的孔的 OD 值,  $A_0$  为没有样品存在的孔的 OD 值。

[0092] 生物素化抗体的制备如下:用0.05M pH9.60碳酸盐缓冲液将纯化后的抗DEP多克隆抗体稀释至1.0mg/mL左右,取2mL加入锥形瓶中;用DMSO配制1.0mg/mL生物素-N-琥珀酰亚胺基酯(BNHS)溶液,向上述锥形瓶中加入BNHS溶液,使BNHS:抗DEP多克隆抗体的质量比为1:10,室温下搅拌反应4小时;反应结束后将反应液装入透析袋中,用PBS缓冲液透析3d,每天换水3次。离心分离去除少量沉淀后,即得相应的生物素化抗体溶液(Bio-pAb-DEP),抗体溶液小体积分装后,于-20℃冷冻保存。

[0093] 通过戊二醛法制备DEP包被原DEP-OVA,具体合成步骤:将0.0238g(0.1mmol)DEP半抗原装入容积为25mL的锥形瓶中,边滴加1mLN,N-二甲基甲酰胺(DMF)边搅拌,搅拌均匀后再逐滴加入到0.08mMOVA溶液(0.01M pH7.40磷酸盐缓冲液溶解)10mL(0.0008mmol)中,随后向该混合体系中缓慢加入0.036mL(0.5mmol)25%戊二醛,4℃低温闭光搅拌反应28h后,将得到的抗原粗品装入透析袋,置于0.01M pH7.40磷酸盐缓冲液中低温4℃透析3d,每隔8h换水1次,最后将终产物4000r·min<sup>-1</sup>离心15min,取其上清液即DEP包被原DEP-OVA。包被原经紫外-可见分光光度计鉴定后,冷冻干燥、小量分装,-20℃冷冻保存。

[0094] 间接竞争BA-ELISA免疫分析方法检测邻苯二甲酸二乙酯的标准曲线方程为Y=22.53LgC<sub>DEP</sub>+57.96,相关系数R=0.9832,其中IC<sub>50</sub>表示检测方法的灵敏度,即抑制率为50%时对应的分析物浓度0.443μg/L;IC<sub>10</sub>表示方法的检测下限,即抑制率为10%时对应的分析物浓度0.0079μg/L;IC<sub>20</sub>-IC<sub>80</sub>表示线性范围,即0.021μg/L~9.512μg/L。

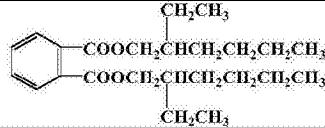
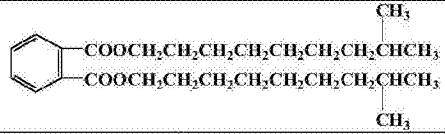
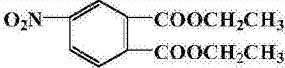
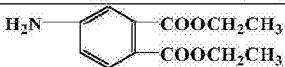
[0095] 此外,我们测定了7种DEP结构类似物的交叉反应率,其结果如下表1所示,DEP与邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二丙酯(DPrP)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、邻苯二甲酸二异丁酯(DIBP)、邻苯二甲酸二(乙基)己酯(DEHP)、邻苯二甲酸二异壬酯(DINP)等结构类似物的交叉反应率相对较小(均在5%以下),而与4-DENP和4-DEAP的交叉反应率则较高,分析其原因可能是由于这两种物质系DEP半抗原前体物和半抗原,与DEP具有类似的分子空间结构,由此导致它们的交叉反应较强。整体来看,抗DEP多克隆抗体具有较好的特异性,用间接BA-ELISA方法检测环境样品中DEP比较可行。

[0096] 表1 DEP结构类似物的交叉反应率

[0097]

类似物	结构式	IC <sub>50</sub> (μg·L <sup>-1</sup> )	交叉反应率 (%)
DEP		0.443	100
DMP		9.197	4.82
DBP		8.796	5.04
DPrP		9.028	4.91
DIBP		10.357	4.28

[0098]

DEHP		10.605	4.18
DINP		18.704	2.37
4-DENP		2.394	18.52
4-DEAP		2.229	19.89

[0099] 以上对本发明的具体实施例进行了描述。需要理解的是，本发明并不局限于上述特定实施方式，本领域技术人员可以在权利要求的范围内做出各种变形或修改，这并不影响本发明的实质内容。

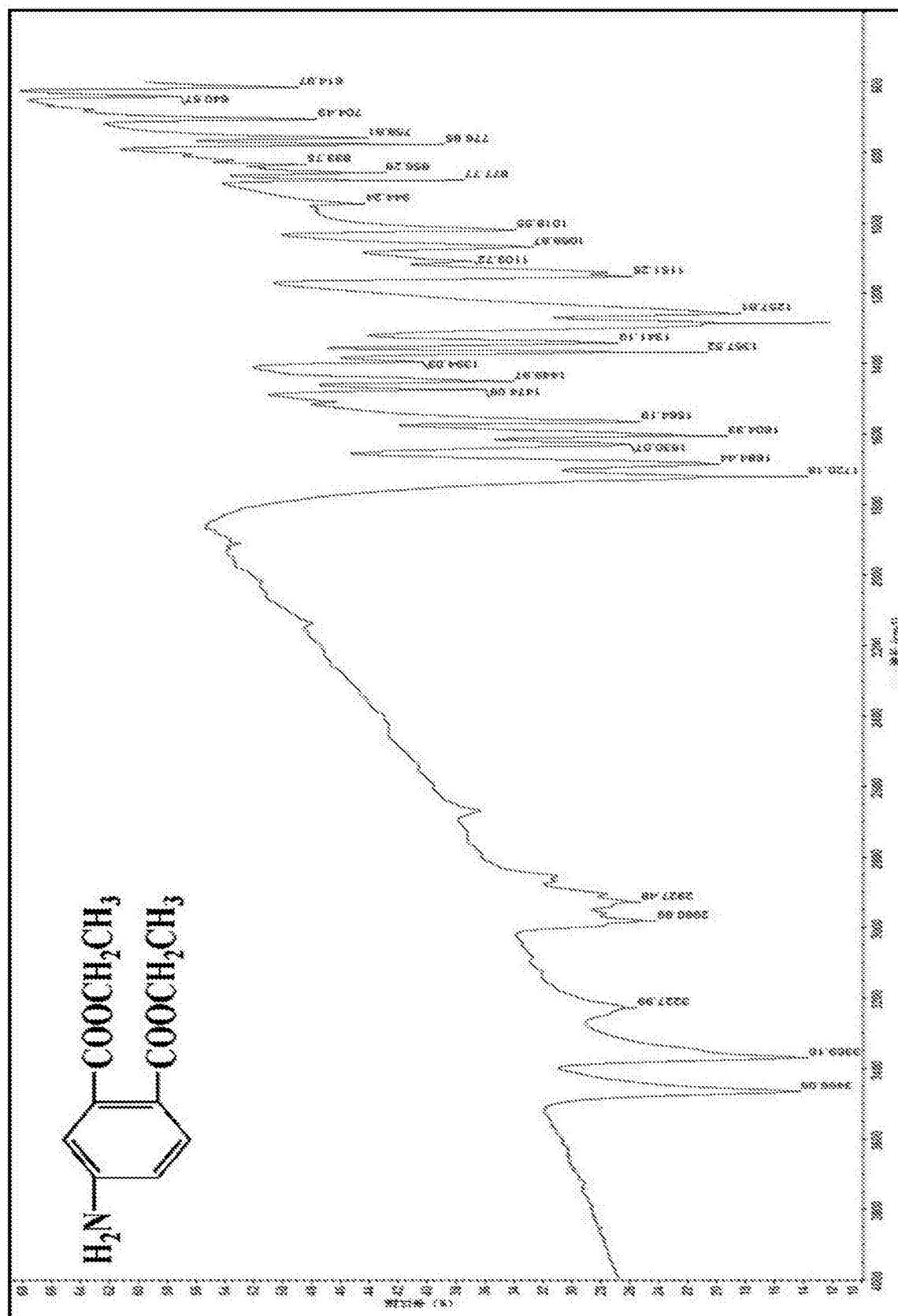


图 1

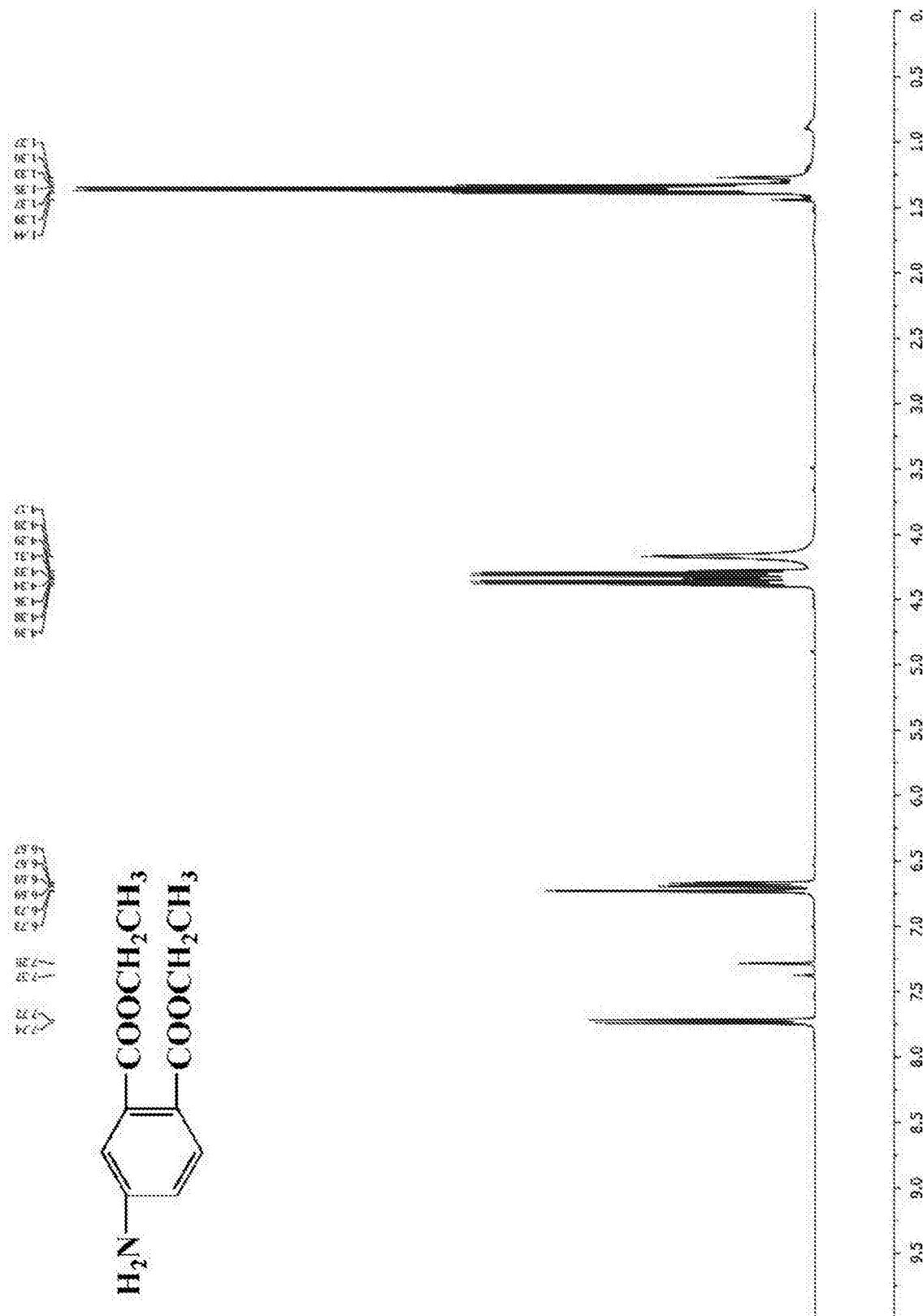


图 2

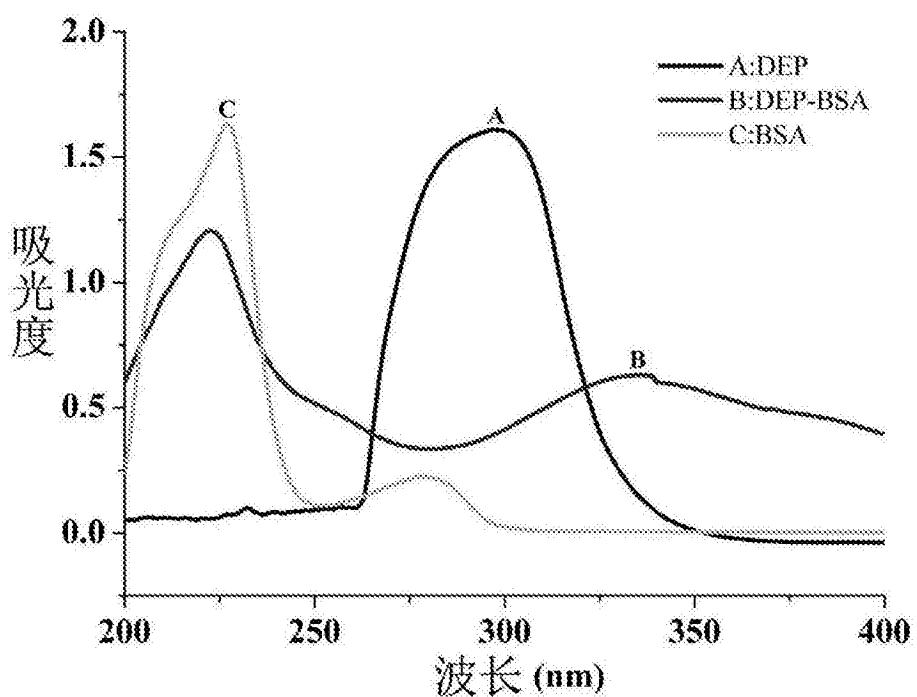


图 3

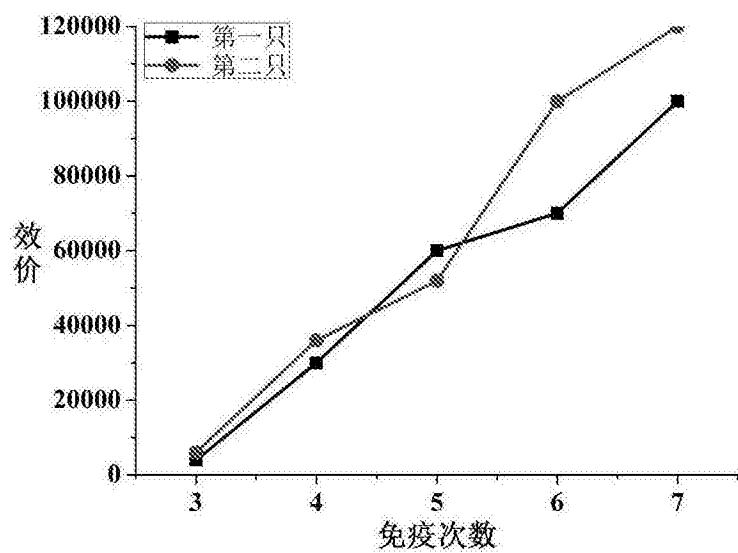


图 4

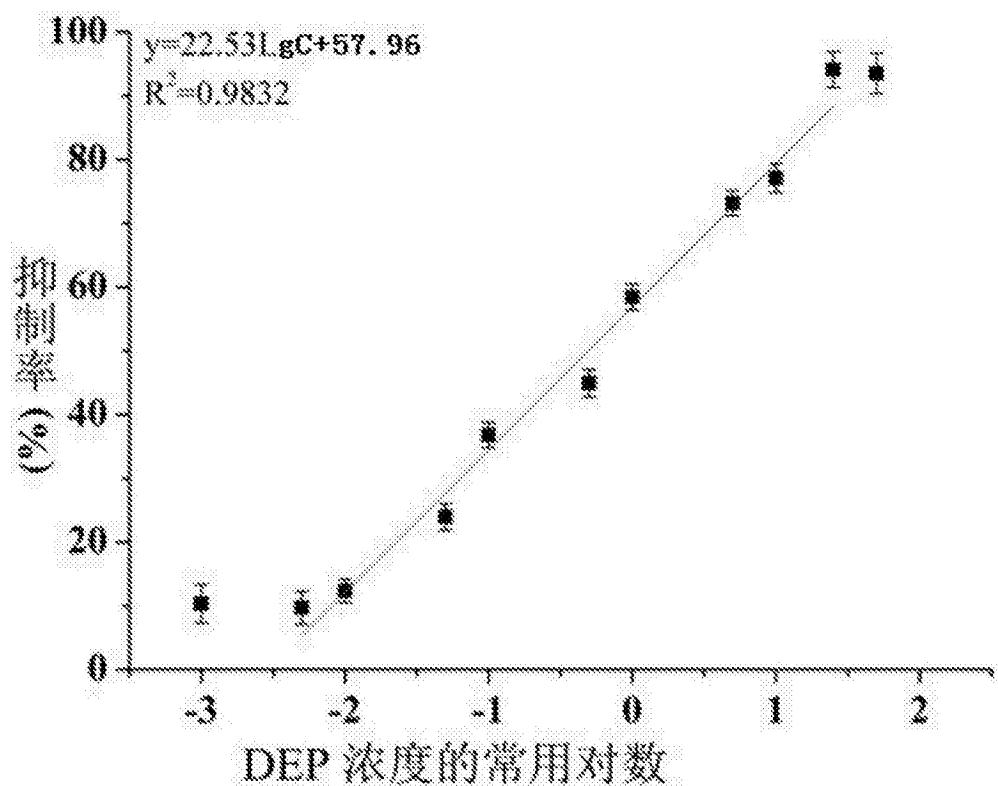


图 5

专利名称(译)	邻苯二甲酸二乙酯人工免疫原及其制备和用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN105085663A</a>	公开(公告)日	2015-11-25
申请号	CN201510515134.1	申请日	2015-08-20
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	庄惠生 孙瑞艳		
发明人	庄惠生 孙瑞艳		
IPC分类号	C07K14/765 C07K1/10 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/765 G01N33/53		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>	<a href="#">Sipo</a>	

#### 摘要(译)

本发明提供了一种邻苯二甲酸二乙酯人工免疫原DEP-BSA及其制备和用途，所述DEP-BSA的结构式为：其制备方法为采用重氮化法将DEP半抗原与蛋白质分子BSA偶联制备获得。本发明免疫原制备方法简单，稳定性好，成本低，易于工业化生产。邻苯二甲酸二乙酯人工免疫原DEP-BSA通过免疫动物后制备成特异性抗体，为建立免疫检测方法奠定基础。

