



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101717443 A

(43) 申请公布日 2010.06.02

(21) 申请号 200910234686.X

(22) 申请日 2009.11.27

(71) 申请人 南京工业大学

地址 210009 江苏省南京市鼓楼区新模范马路 5 号

(72) 发明人 李方实 岳娟 陆锤 夏金云

(51) Int. Cl.

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 1/10 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

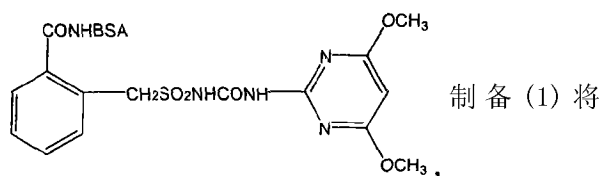
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种苄嘧磺隆人工免疫原 BE-BSA 及其制备和用途

(57) 摘要

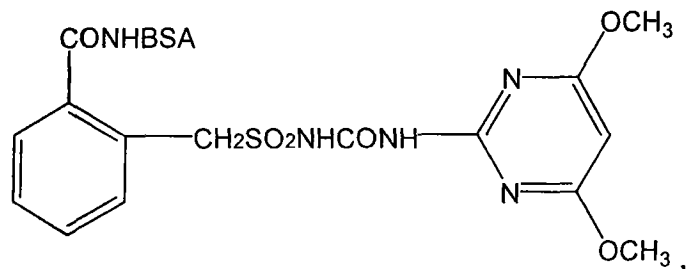
本发明涉及一种苄嘧磺隆人工免疫原 BE-BSA 及其制备和用途, 结构式



苄嘧磺隆溶解在 NaOH 溶液中反应, 用氯仿萃取分液, 将水层酸化, 减压过滤, 真空干燥后得纯品;

(2) 将苄嘧磺隆半抗原、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 N, N'-二环己基碳酰亚胺 (DCC) 溶于有机溶剂中, 搅拌反应, 离心取上清液, 得到活性酯。将牛血清蛋白 (BSA) 溶于硼酸盐缓冲溶液 (pH8), 在强烈搅拌下将活性酯加入蛋白质溶液中, 反应后透析, 分装, 并于 -20℃ 下保存; 本发明制备简便, 成本低, 容易工业化生产; 苄嘧磺隆人工免疫原 BE-BSA 通过免疫动物制备成苄嘧磺隆特异性抗体, 用于现场检测水体、土壤中痕量的苄嘧磺隆。

1. 一种苄嘧磺隆人工免疫原 BE-BSA, 结构式如下:



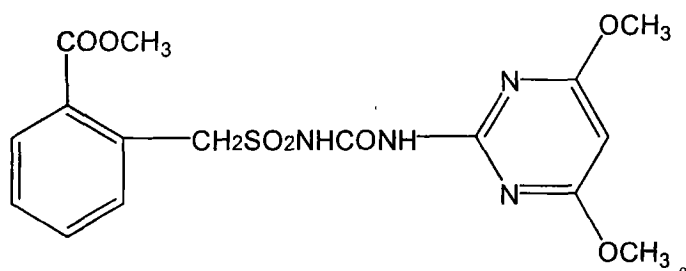
其中 BSA 是牛血清蛋白。

2. 一种苄嘧磺隆人工免疫原 BE-BSA 的制备方法, 其步骤如下:

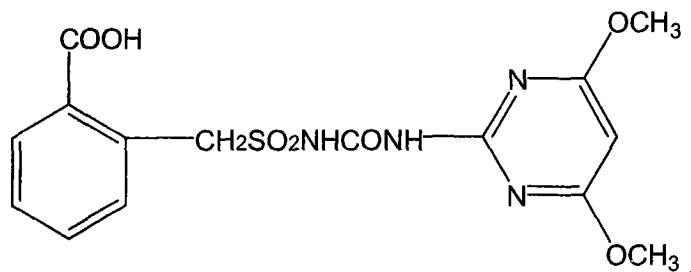
(1) 苄嘧磺隆半抗原 BE 的合成: 将苄嘧磺隆溶解在 NaOH 溶液中, 搅拌; 用氯仿萃取分液, 水层用盐酸酸化, 减压过滤, 真空干燥, 得到白色固体, 在甲醇-乙醚中重结晶获得白色晶体状的苄嘧磺隆半抗原 BE, 干燥后得纯品;

(2) 苄嘧磺隆人工免疫原 BE-BSA 的合成: 将苄嘧磺隆半抗原、N-羟基琥珀酰亚胺和 N, N'-二环己基碳酰亚胺溶于有机溶剂中, 磁力搅拌 5~6h, 然后在 4℃ 下继续反应 12~15h, 离心取上清液, 得到活性酯; 将牛血清蛋白溶于硼酸盐缓冲溶液; 在强烈搅拌下将活性酯缓慢加入蛋白质溶液中, 反应 20~30h; 所得混合液用磷酸盐缓冲溶液透析 5 天; 分装所得免疫原, 并于 -20℃ 下保存。

3. 根据权利要求 2 所述的一种苄嘧磺隆人工免疫原 BE-BSA 的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 (1) 中的苄嘧磺隆的分子结构式为:



4. 根据权利要求 2 所述的一种苄嘧磺隆人工免疫原 BE-BSA 的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 (1) 中的苄嘧磺隆半抗原的化学名称为苄嘧磺隆酸, 分子量为 396.4, 分子结构式如下:



5. 根据权利要求 2 所述的一种苄嘧磺隆人工免疫原 BE-BSA 的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 (2) 中的有机溶剂是 N, N'-二甲基甲酰胺或二甲基亚砷。

6. 根据权利要求 2 所述的一种苄嘧磺隆人工免疫原 BE-BSA 的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 (2) 中的半抗原、NHS、DCC、蛋白质的摩尔比为 1 : 0.1-0.2 : 1-2 : 0.003-0.005。

7. 一种苄嘧磺隆人工免疫原 BE-BSA 的应用, 通过免疫动物制备成苄嘧磺特异性抗体,

用于现场检测。

一种苄嘧磺隆人工免疫原 BE-BSA 及其制备和用途

技术领域

[0001] 本发明属苄嘧磺隆的多克隆抗体领域,特别是涉及一种苄嘧磺隆人工免疫原 BE-BSA 及其制备和用途。

背景技术

[0002] 苄嘧磺隆是 20 世纪 80 年代中期由美国杜邦公司开发的一种新型的磺酰脲类除草剂,是目前广泛用于稻田杂草防治的主要除草剂之一。苄嘧磺隆属于内吸性除草剂,对一年生及多年生阔叶杂草和莎草科杂草都有很好的防除效果。如鸭舌草、眼子草、节节菜、陌上菜、矮慈姑等及莎草科杂草如牛毛草、异型莎草、水莎草、碎米莎草、萤蔺等。对禾本科杂草防效差,高剂量下对稗草有一定的抑制作用。

[0003] 苄嘧磺隆使用方法灵活,可用药肥、药土、药砂、喷雾、浇灌等方法,用量 20-30g/hm²,可与丁草胺、杀草丹、优克稗、禾大壮、甲磺隆、乙草胺等剂混用,是我国水稻田中使用面广、时间长、量大的一种除草剂。

[0004] 但是,苄嘧磺隆在土壤中的残留可能会对后茬作物油菜等形成药害,所以研究苄嘧磺隆在土壤中的残留很有必要。国内外检测苄嘧磺隆残留的方法是以仪器分析法为主,但是仪器分析法前处理过程复杂、操作繁琐、效率低,难以进行快速的测定和现场监测。因此,建立操作便捷、高灵敏度并适应现场测定的免疫分析方法对检测苄嘧磺隆残留具有重要的意义。

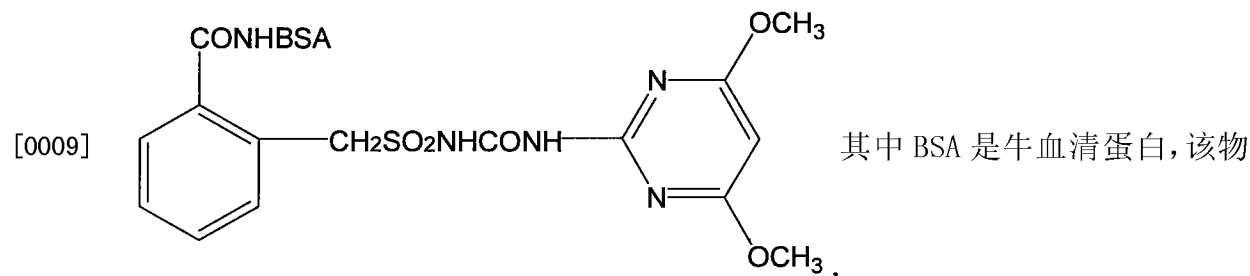
[0005] 合格的苄嘧磺隆抗原是免疫得到合格苄嘧磺隆抗体的前提,合格的苄嘧磺隆抗体是建立苄嘧磺隆免疫分析法的关键。目前,关于苄嘧磺隆抗原抗体的制备,国外已有相关研究,但国内尚无相关报道。

发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题是提供一种苄嘧磺隆人工免疫原 BE-BSA 及其制备和用途,以克服现有检测技术中对苄嘧磺隆样品预处理复杂、耗时、且需要大量有机溶剂萃取,以及在检测过程中要用到精密昂贵的仪器而不适于推广使用和不利于当环境污染事故发生在野外时的现场快速检测等缺点。

[0007] 技术方案为:

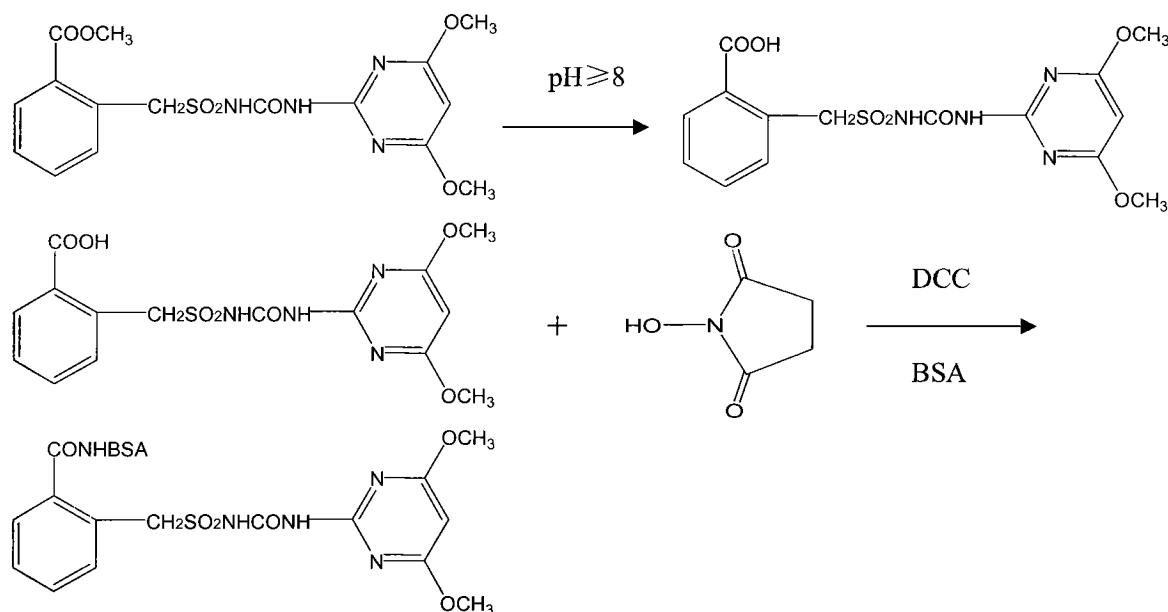
[0008] 一种苄嘧磺隆人工免疫原 BE-BSA,结构式如下:



质的合成方法见权利要求 2。

[0010] 本发明采用活化酯法合成苄嘧磺隆人工免疫原 BE-BSA, 其反应方程式如下:

[0011]



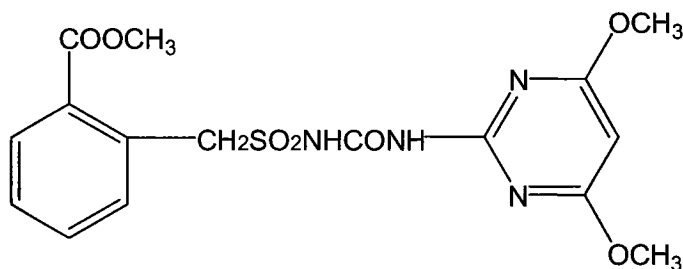
[0012] 本发明一种苄嘧磺隆人工免疫原 BE-BSA 的制备方法, 步骤如下:

[0013] (1) 苄嘧磺隆半抗原的合成: 将苄嘧磺隆溶解在 NaOH 溶液中, 在室温下搅拌 5 ~ 7 天。用氯仿萃取分液, 水层用盐酸酸化至 pH2 ~ 3, 减压过滤, 真空干燥, 得到白色固体, 在甲醇-乙醚中重结晶获得白色晶体状的苄嘧磺隆半抗原 BE, 干燥后得纯品。

[0014] (2) 苄嘧磺隆人工免疫原的合成: 将苄嘧磺隆半抗原、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 N, N'-二环己基碳酰亚胺 (DCC) 溶于有机溶剂中, 室温下磁力搅拌 5 ~ 6h, 然后在 4℃ 下继续反应 12 ~ 15h, 离心取上清液; 将上清液加入到溶有蛋白质的硼酸盐缓冲溶液 (pH8) 中, 室温反应 20 ~ 30h, 其中所述的半抗原、NHS、DCC、蛋白质的摩尔比为 1 : 0.1-0.2 : 1-2 : 0.003-0.005 : 反应完毕, 将溶液装入透析袋, 用磷酸盐缓冲溶液透析。透析后分离出上清液, 即得苄嘧磺隆人工免疫原 BE-BSA 偶联物, 分装免疫原, 并于 -20℃ 下保存。

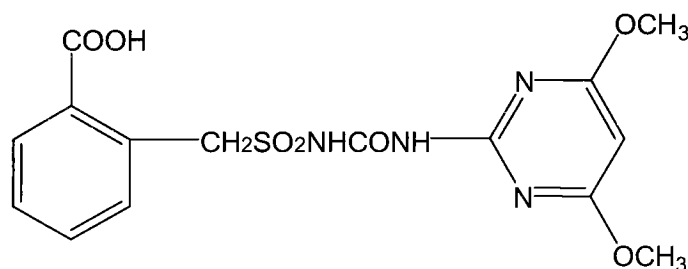
[0015] 所述步骤 (1) 中的苄嘧磺隆的分子结构式为:

[0016]



[0017] 所述步骤 (1) 中苄嘧磺隆半抗原的化学名称为苄嘧磺隆酸, 分子量为 396.4, 分子结构式如下:

[0018]



[0019] 所述步骤(2)中的有机溶剂是N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)或二甲基亚砜(DMSO)。

[0020] 本发明的一种苄嘧磺隆人工免疫原BE-BSA的用途,通过免疫动物制备特异性抗体,能与苄嘧磺隆发生特异性免疫反应的免疫球蛋白IgG,用于检测水体、土壤中痕量的苄嘧磺隆,便于进行现场检测。

[0021] 由于苄嘧磺隆是小分子物质,只具有免疫反应性而不具有免疫原性,而且该分子上没有能与蛋白质直接结合的氨基、羟基、羧基等基团,故本发明用水解的方法使苄嘧磺隆分子带上一个羧基,然后用活性酯法将含有羧基的半抗原与蛋白质偶联制备出苄嘧磺隆的人工免疫原。再利用此人工免疫原对新西兰大白兔免疫,获得高效价、高特异性的苄嘧磺隆多克隆抗体,此抗体应用于建立免疫分析法以检测环境中苄嘧磺隆。

[0022] 有益效果

[0023] 本发明所制备的苄嘧磺隆特异性抗体具有如下优点:

[0024] (1) 实用性强:苄嘧磺隆多克隆抗体的制备技术具有重要的使用价值和实际意义,制备的抗体特异性好、效价高,以抗原抗体免疫学反应为基础可用于样品测定;此抗体及其制备方法为免疫分析法测定环境中痕量的苄嘧磺隆提供保障,也为磺酰脲类除草剂快速检测试剂盒的研制解决了一大技术难点。

[0025] (2) 稳定性好:本发明制备的苄嘧磺隆抗体具有较好的稳定性。

[0026] (3) 抗体制备技术简便可行:抗体整个制备过程无需特殊仪器设备,成本低廉,容易工业化规模生产。

附图说明

[0027] 图1是苄嘧磺隆人工免疫原BE-BSA的紫外光谱图;

[0028] 其中1为蛋白质BSA,2为苄嘧磺隆人工免疫原BE-BSA,3为苄嘧磺隆BE。

具体实施方式

[0029] 下面结合具体实例对本发明作进一步阐述,应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明讲授的内容之后,本领域技术人员可对本发明作各种改动或修改,这些等价同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0030] 实施例1

[0031] (1) 苄嘧磺隆半抗原的合成

[0032] 称取0.5g苄嘧磺隆溶解于60mL0.1mol/L NaOH溶液中,在室温下搅拌150h。用2×25mL氯仿萃取,水层用盐酸酸化至pH2,减压过滤,真空干燥,得到白色固体,在甲醇-乙醚中重结晶获得白色晶体状的苄嘧磺隆半抗原。

[0033] (2) 苄嘧磺隆半抗原的鉴定

[0034] 取上述合成的苄嘧磺隆半抗原少许,用溴化钾压片后红外扫描,结果如下 [$\nu(\text{cm}^{-1})$]:3423(s, N-H),3300-2500(w, O-H),1722(s, C=O),1610,1580,1500,1452(s, C=C),1365,1153(s, S=O),1200(s, C-O)。与文献报道的苄嘧磺隆的红外光谱比较,半抗原的红外光谱图中有明显的羧基(-COOH)吸收峰,说明苄嘧磺隆分子上已经引入了羧基,可以与蛋白质偶联。

[0035] 将苄嘧磺隆半抗原用二甲亚砜溶解(DMSO),测定样品的核磁共振谱(^1H NMR),结果如下(δ , DMSO):13.20(s, 1H, COOH-H),12.05(s, 1H, NH-H),10.64(s, 1H, NH-H),7.90-7.36(m, 4H, Ar-H),5.92(s, 1H, pyrimidine-H),5.35(s, 2H, CH_2 -H),3.73(s, 6H, CH_3 -H)。氢谱鉴定的结果表示:在苄嘧磺隆分子上成功引入了羧基,可以与蛋白质偶联合成免疫原。

[0036] (3) 苄嘧磺隆免疫原的合成

[0037] 称取步骤(1)中合成的苄嘧磺隆半抗原0.159g(0.39mmol)、NHS0.046g(0.06mmol)和DCC0.091g(0.44mmol)溶解于2mL无水DMF中,室温磁力搅拌5h,然后在4℃下继续反应12h,离心取上清液,得到活性酯2mL。称取0.1g BSA溶于10mL硼酸盐缓冲溶液(pH 8)。在强烈搅拌下将2mL活性酯缓慢(1h)加入BSA溶液中,室温反应24h。用磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4)透析5d所得混合液。前2d每天透析5次,后3d每天透析3次。离心分出上清液,即得到苄嘧磺隆人工全抗原BE-BSA。分装所得免疫原,并于-20℃下保存。

[0038] (4) 苄嘧磺隆免疫原的鉴定

[0039] 常用的鉴定人工免疫原结合比的方法是紫外光谱法。按常规来说,只要人工免疫原的紫外光谱图与原蛋白载体和半抗原的紫外图谱相比发生了变化,即可间接说明人工免疫原制备成功。

[0040] 由紫外光谱图可知,苄嘧磺隆半抗原BE在242nm处有特征吸收峰,蛋白质BSA在278nm处有最大吸收峰,而苄嘧磺隆人工免疫原BE-BSA偶联物的特征吸收峰在258nm处,与蛋白质和半抗原比较都发生了移动,偶联物具有半抗原和蛋白质的吸收特征,说明已经成功制备苄嘧磺隆人工免疫原。

[0041] 根据朗伯-比尔定律,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、载体蛋白及偶联物进行扫描,根据吸收峰可确定偶联是否成功。结合比计算公式如下:

[0042]

$$\text{结合比} = \frac{\varepsilon_{\text{conjugate}} - \varepsilon_{\text{protein}}}{\varepsilon_{\text{hapten}}} = \frac{(OD_{\text{conjugate}} - OD_{\text{protein}}) \times C_{\text{hapten}} \times M_{\text{protein}}}{OD_{\text{hapten}} \times M_{\text{hapten}} \times C_{\text{protein}}}$$

[0043] 根据在242nm处测得的人工免疫原、蛋白质和半抗原溶液的摩尔吸光系数 ε ,计算半抗原与载体蛋白的结合比为31,该结合比值在文献所建议的范围内,证明合成的苄嘧磺隆免疫原比较理想。

[0044] 实施例2

[0045] (1) 苄嘧磺隆抗血清的制备

[0046] 选取2只健康的雄性新西兰大白兔(约2.8kg),饲养于标准实验动物房(由江苏

省农业科学研究院动物房饲养), 每只兔子单笼饲养, 观察一周后免疫。

[0047] 将实施例 1 中所合成的苄嘧磺隆免疫原慢慢解冻, 用 0.9% 生理盐水或 PBS 稀释至 1mg/mL, 按免疫剂量吸入 5mL 消毒注射器中。首次免疫加入等量弗氏完全佐剂 (CFA), 用聚氟乙烯塑料管连接另一支 5mL 消毒注射器, 对推至充分乳化, 形成油包水 (W/O) 状态, 按免疫方案注射免疫。

[0048] 首次注射免疫采用由等量弗氏完全佐剂乳化的免疫原, 进行背部皮下多点注射 (40 点左右)。首次注射免疫后, 间隔四周, 以后每隔两周用弗氏不完全佐剂乳化的免疫原于皮下多点注射加强免疫, 免疫剂量为每公斤兔 1mg。从第二次开始, 每次免疫后 7 天, 于兔耳缘静脉采血 2mL, 分离血清, 测定抗体效价。当达到一定效价后, 采全血。本实验采用兔心脏采血法, 每只兔可采血 50mL 左右。采血后, 置于 37℃ 温箱中 1 小时, 待血液凝固后, 将分离出来的血清吸到离心管中, 于 4℃ 冰箱中保存; 再将未分离的血液置于 4℃ 冰箱中过夜, 待血块收缩后, 再将分离出来的血清吸到离心管中, 以 4000rpm 离心 20min, 分离出血清, 于 -20℃ 冻存。I 号兔得血清 16mL, II 号兔得血清 18mL。

[0049] (2) 苄嘧磺隆抗体效价的测定

[0050] 将免疫原按制定的方案免疫 2 只兔子, 从加强免疫第二次开始, 在每次免疫后第七天于兔耳缘静脉采血 2mL, 血清经适当稀释后, 用间接非竞争 ELISA 法测定效价。检测时用免疫前的兔血清作阴性对照, 血清按 10 倍连续稀释。兔 1 和兔 2 最终抗血清的效价分别是 $1 : 2.5 \times 10^4$ 和 $1 : 2.5 \times 10^5$ 。

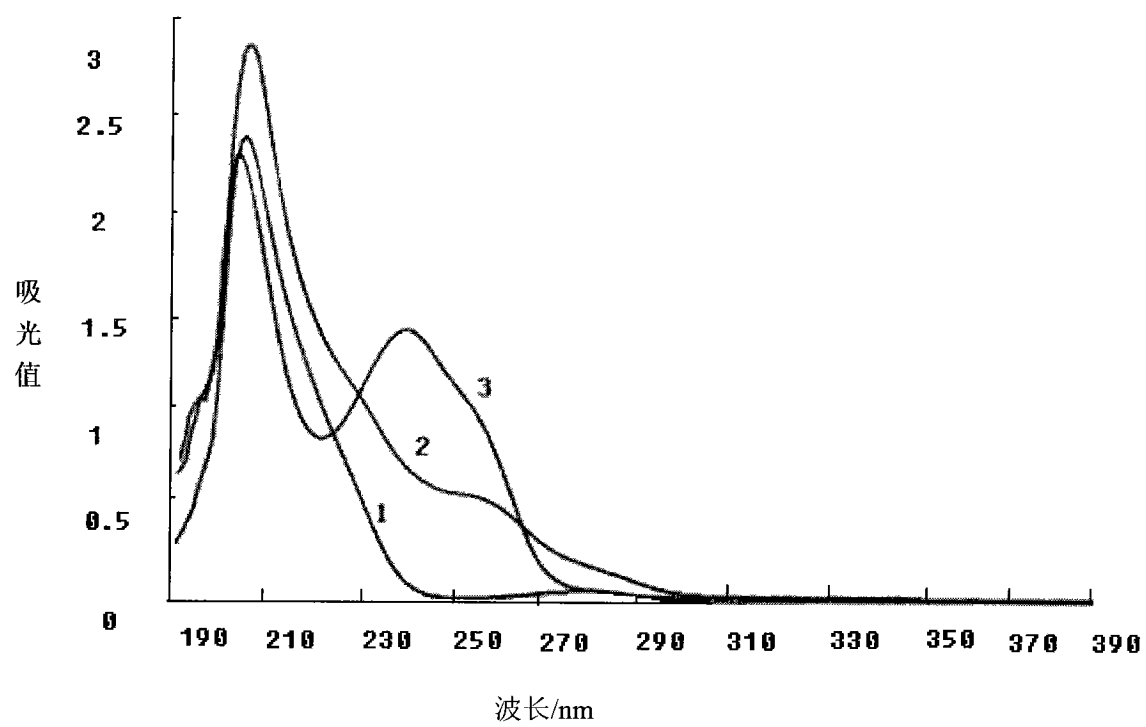


图 1

专利名称(译)	一种苄嘧磺隆人工免疫原BE-BSA及其制备和用途		
公开(公告)号	CN101717443A	公开(公告)日	2010-06-02
申请号	CN200910234686.X	申请日	2009-11-27
[标]申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
[标]发明人	李方实 岳娟 陆锤 夏金云		
发明人	李方实 岳娟 陆锤 夏金云		
IPC分类号	C07K14/765 C07K1/10 C07K16/44 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种苄嘧磺隆人工免疫原BE-BSA及其制备和用途，结构式，制备(1)将苄嘧磺隆溶解在NaOH溶液中反应，用氯仿萃取分液，将水层酸化，减压过滤，真空干燥后得纯品；(2)将苄嘧磺隆半抗原、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和N，N'-二环己基碳酰亚胺(DCC)溶于有机溶剂中，搅拌反应，离心取上清液，得到活性酯。将牛血清蛋白(BSA)溶于硼酸盐缓冲溶液(pH8)，在强烈搅拌下将活性酯加入蛋白质溶液中，反应后透析，分装，并于-20℃下保存；本发明制备简便，成本低，容易工业化生产；苄嘧磺隆人工免疫原BE-BSA通过免疫动物制备成苄嘧磺隆特异性抗体，用于现场检测水体、土壤中痕量的苄嘧磺隆。

