

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410020332.2

[51] Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 6 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 100392405C

[22] 申请日 2004.8.20

[21] 申请号 200410020332.2

[73] 专利权人 天津科技大学

地址 300222 天津市河西区大沽南路 1038 号

[72] 发明人 王 硕 王俊平 张 燕

[56] 参考文献

JP-2000191624A 2000.7.11

SU-958963A 1982.9.15

SU-1500937A 1989.8.15

Application of a monoclonal antibody - based ELISA to the determination of carbaryl in apple and grape juices. A. Abad et al. *Analytica chimica acta*, Vol. 31 No. 1. 1995

Selection and characterisation of membranes by means of an immunofiltration assay. Application to the rapid and sensitivedetermination of the. Sergi Morais et al. *Journal of immunological methods*, No. 224. 1999

甲萘威酶联免疫吸附分析技术研究. 刘曙照等. *农药学学报*, 第 1 卷第 1 期. 1999

杀虫剂西维因但克隆抗体的研制及鉴定. 许艇等. *免疫学杂志*, 第 20 卷第 1 期. 2004

审查员 石剑平

[74] 专利代理机构 天津市学苑有限责任专利代理事务所

代理人 李 明

权利要求书 3 页 说明书 11 页 附图 1 页

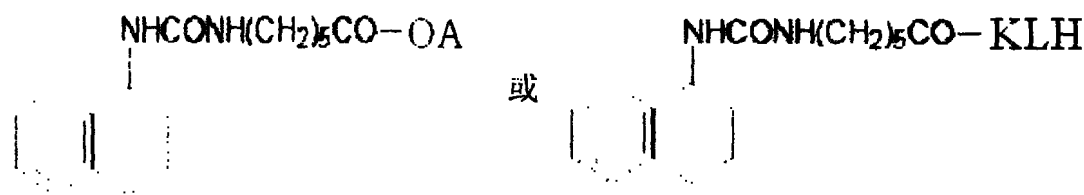
[54] 发明名称

农药西维因人工抗原和抗体及其制备方法与应用

[57] 摘要

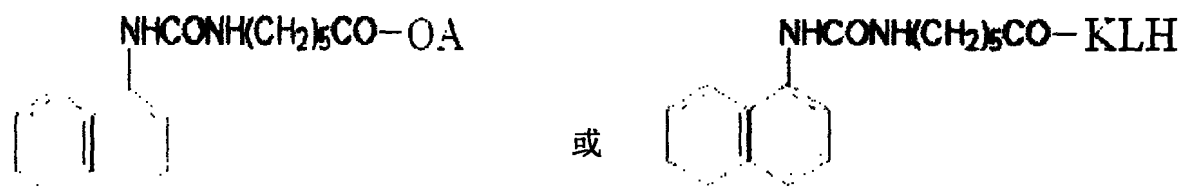
农药西维因人工抗原和抗体及其制备方法与应用, 涉及具有 6-氨基己酸分子结构的氨基甲酸酯类农药西维因小分子化合物人工半抗原、抗原和抗体的制备及其在建立免疫分析方法方面的应用。本发明克服了传统的理化分析方法繁琐复杂、成本较高、分析速度慢的问题, 提供了简便、快速、灵敏、准确的免疫分析技术。它以 1-(5-羧戊基)-3-(1-萘基)脲和 N-(2-萘甲酰基)-6-氨基己酸为半抗原, 分别与血蓝蛋白等载体蛋白、辣根过氧化物酶连接合成人工抗原和酶标抗原。人工抗原再经动物免疫、取血、分出抗血清、纯化制得抗体。该抗体稳定、具有良好的特异性和灵敏度, 且合成方法简便, 可用于农药西维因的快速免疫检

1. 农药西维因人工抗原，其特征在于以1-(5-羧戊基)-3-(1-萘基)脲为半抗原，与载体蛋白相连接合成分子式为



的化合物为人工抗原。

2. 农药西维因抗体，其特征于是以1-(5-羧戊基)-3-(1-萘基)脲为半抗原，与载体蛋白相连接合成的人工抗原



经动物免疫，取血，分出抗全血清，纯化制得抗体。

3. 权利要求1所述的农药西维因人工抗原的制备方法，其特征于是用下述步骤制得：

(1) 半抗原设计与合成

采用具有甲酰基活性基团的含萘基化合物与氨基己酸反应，合成含1-萘基-N-氨基甲酸酯结构的半抗原，具体做法是：

半抗原1-(5-羧戊基)-3-(1-萘基)脲的合成

取1-萘基异氰酸和6-氨基己酸混合在的四氢呋喃(THF)中，其三者摩尔比为1:120-130:120-130，在22-25℃下搅拌12-16小时，再经过滤获得半抗原，最后将固体在乙腈中重结晶，蒸发溶剂，即可得到纯化合物半抗原；

(2) 人工抗原的合成

用半抗原1-(5-羧戊基)-3-(1-萘基)脲，以酰胺基CONH为桥梁，通过活性酯法，分别连接到卵清蛋白(ovalbumin, OA)或血蓝蛋白(keyhole limpet

hemocyanin, KLH) 上, 合成人工抗原: 具体做法是:

取半抗原 1-(5-羧戊基)-3-(1-萘基) 脲溶于 N,N-二甲基甲酰胺 DMF 中, 加入 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶于 DMF 溶液和 N,N-二环己基碳二亚胺溶于 DMF 溶液, 使半抗原 1-(5-羧戊基)-3-(1-萘基) 脲、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 与 N,N-二环己基碳二亚胺三者摩尔比为 1: 4-5: 3-4, 在 22-25℃ 下, 搅拌反应 1 小时, 然后放于 4℃ 冰箱内 18 小时, 离心除去沉淀, 再将上层活化酯液加入到 pH=7.0 蛋白质 PBS 溶液中, 其半抗原与蛋白质摩尔比为 10-50: 1, 经搅拌后于 4℃ 下反应 5 小时, 最后将反应液装入透析袋, 4℃ 下、pH=7.4 的 PBS 中透析, 精确量取蛋白质偶联物溶液的体积, 测定浓度和结合比, 分装, -20℃ 保存。

4. 权利要求 2 所述的农药西维因抗体的制备方法, 其特征在于免疫与特异性抗体制备方法如下:

- 免疫: 免疫动物选用雌性大白兔, 免疫方法采用皮下和肌肉注射法, 初免后进行四次加强免疫, 加强免疫分别于初次免疫后 2 周、4 周和 6 周后免疫三次, 此后间隔一个月, 第五次免疫完后 9 天时由兔子的耳缘静脉取血, 进行效价检测; 具体做法是:

初次免疫: 取 1mg 上述人工抗原溶于 0.9% 的 NaCl 溶液和弗氏完全佐剂等体积所配制的溶液中, 进行动物免疫;

加强免疫: 用 0.5mg 上述人工抗原溶于 0.9% 的 NaCl 溶液和弗氏不完全佐剂等体积所配制的溶液, 进行动物免疫;

- 抗体纯化: 定时监测动物抗体效价, 当抗体对一定的包被抗原达到适宜效价时, 采集血液, 并离心获得抗血清, 使用 G-Sepharose 蛋白亲和层析柱对抗血清进行纯化, 制备 IgG 抗体。

5. 权利要求 1 或 2 所述的农药西维因人工抗原或抗体在西维因的免疫检测方法中的应用, 其特征在于方法如下:

- 包被: 将上述抗体溶于 50mmol、pH9-10 的碳酸缓冲液中, 配制成 10 mg/mL 的包被液, 酶标条的每个孔加 100 μ l 包被液 12-16 小时, 将包被好酶标条的每个孔, 用 PBST 即磷酸盐缓冲液 0.05% (v/v), Tween20 洗液洗涤三次;

- 封闭: 每孔加入 150-200 μ l、1% 牛血清蛋白 (BSA) / PBS 封闭液, 封闭一小时;

- 加样: 将待测样品溶于含有 1% BSA 的 PBS 中, 西维因标样也溶于含有 1% BSA 的 PBS 中, 加样时每孔加入 50 μ l 上述待测样品或标样;

• 竞争反应：将酶标抗原溶于含有0.1%鱼皮胶(FG)-PBS缓冲液中，加入待测样品或标样后，每孔加入50 μ l酶标抗原溶液，孵育10分钟或60分钟后用洗板液洗涤三次：

• 显色：显色底物使用四甲基联苯胺（TMB），每孔加入150 μ l四甲基联苯胺（TMB）-双氧水溶液，显色5分钟或30分钟后每孔加入50 μ l 5mol/L的硫酸终止，其中所用的四甲基联苯胺（TMB）-双氧水溶液是用5mg四甲基联苯胺溶液溶于1ml底物缓冲液配制；反应液在自动酶标仪上读数。

6. 按照权利要求5所述的农药西维因人工抗原或抗体在西维因免疫检测方法中的应用，其特征在于待测样品为待测物品的农药西维因提取物，该提取物的快速提取方法采用甲醇提取法，其具体做法是：用5倍体积的甲醇，浸泡未经粉碎的样品12-16小时；或用10g粉碎后的样品浸泡于50ml甲醇中，振荡2分钟；或用10g粉碎后的样品浸泡于50ml甲醇中，搅拌2分钟，静置、取上清液。

农药西维因人工抗原和抗体及其制备方法与应用

技术领域

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,生物化学及物化测试技术等;特别涉及具有 6-氨基己酸分子结构的氨基甲酸酯类农药西维因小分子化合物人工半抗原、特异性抗原的设计合成,和免疫动物特异性抗体的制备及其在建立免疫分析方法方面的应用。

背景技术

西维因(亦称甲萘威)是氨基甲酸酯类农药的代表性商品。在我国西维因可用于 141 种作物,防治 565 种害虫,是目前注册范围最广的杀虫剂。西维因被广泛应用于蔬菜、棉花、大田粮食作物,在果树上甲萘威被用作疏花剂,在水产养殖中用于鱼塘有害生物的防除。由于西维因在我国使用广泛,我国许多农产品中存在西维因残留。随着农药使用规模不断扩大,农药残留造成环境影响和对人类健康的慢性和长期效应,日益受到人们关注和担忧。为此,对农药残留的限制也因此越来越严格,并且对分析测定对象、种类、数量、范围、指标等诸方面,都提出新的要求和更高的标准。我国对于西维因在农产品中的残留量,有较严格的检测标准。按照 GB 5009.21 对粮、油、菜中甲萘威残留量的规定:粮食 $\leq 5.0\text{mg/kg}$,蔬菜 $\leq 2.0\text{mg/kg}$,水果 $\leq 2.5\text{mg/kg}$,食用油 $\leq 0.5\text{mg/kg}$,烟草 $\leq 1.0\text{mg/kg}$ 。

然而,由于分子量小于 1000dalton(道尔顿)的小分子有毒化学品,如农药及其代谢产物,其传统的残留分析方法,主要是依靠气相色谱(GC)、液相色谱(HPLC)或质谱等物化分析手段。该传统的理化分析方法,繁琐复杂、成本较高、分析速度慢,难以满足实际分析的需要,因此迫切要求发展简便、快速、灵敏的分析技术。

与大分子不同,小分子化合物免疫分析有自身特点:

(1)小分子化合物($MW \leq 1000\text{dalton}$)一般不具有免疫原性,不能直接免疫动物产生特异性抗体、必须合成突出分子立体结构特异性部位的半抗原,并与大分子载体连接构成接合物,才能免疫动物产生针对这一目标小分子化合物的特异性抗体。这种半抗原与大分子载体的结合物称为人工抗原。人工抗原的制备不是任意的,包括结合位点、结合方式、载体种类、以及半抗原与目标分析物任何结构上的差异如大小、形状、成份、构型、构象、极性、电子云密度等等在内的诸

因素,都可能极大地影响着相应抗体的性质,因此它们是决定产生其特异性抗体和建立免疫分析方法的关键。

(2)虽然小分子化合物不具有免疫原性,但具有反应原性,即具有与相应抗体发生免疫学反应的能力,并可体外定量进行,遵循质量作用定律。

(3)基于抗原抗体免疫反应检测小分子化合物的分析技术,目前多采用酶联免疫分析(ELISA)。利用酶促反应显示抗原抗体的定量结合,操作简单,又具有相当的灵敏度,近年来发展很快。80年代以来发展起来的农药ELISA和简易酶免疫EIA技术,使农药残留分析在方法上获得更大的生命力;对使用快速分析样本基质过于复杂,用普通理化方法难以分析的农药残留,具有相当的应用价值。

免疫分析技术被引入农药残留分析领域,成为一种最有发展和应用潜力的微量分析技术之一,受到广泛的重视。第一个农药免疫分析的报道是1967年Centen等人制备的农药马拉硫磷的抗血清。1980年Hammock和Mumma,进一步探讨了农药免疫分析方法的理论和技术之后,使ELISA农药分析技术,进入了一个崭新的阶段。

农药小分子化合物(分子量小于1000道尔顿),依靠免疫学、免疫化学基本原理和生物技术手段。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,是该领域重要的研究内容。这一技术目前已成为微量分析研究的一个崭新领域,可与传统分析方法并列作为一项新的分析途径。西维因人工抗原和特异性抗体以及以此为基础建立免疫分析方法尚未见报道。

发明内容

需要解决的问题:

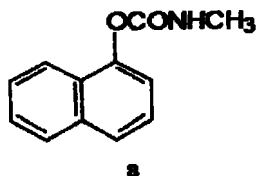
针对上述情况,当前急需一种简易快速有效地检测农药西维因方法。本发明的目的是通过设计合成具有6-氨基己酸分子结构的氨基甲酸酯类农药西维因的半抗原和人工抗原;独特之处在于突出了这类农药分子特异性抗原决定簇,又克服了化学合成的困难,免疫动物诱导产生亲合性很高的特异性抗体;并以此为基础建立了ELISA方法即快速免疫分析方法,准确检测氨基甲酸酯农药西维因。

技术方案:

本发明设计、合成了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,从而定性定量地检测样本中超微量小分子目标分析物,即可用于样本测定。其选择性决定于免疫学反应的特异性,其灵敏度取决于抗体的亲合性和标记物的可检性。因此可以快速准确地分析检测具有1-萘基-N-氨基甲酸酯结构的西维因在样本中的残用量。该技术研究

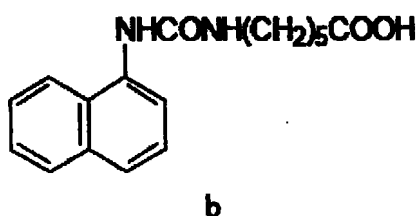
的关键是半抗原的分子设计、合成和人工全抗原及抗体的制备。

西维因的结构如下图所示：



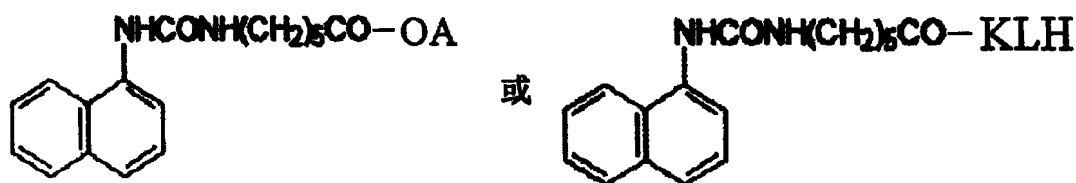
西维因的分子结构可以分为两个结构单元：一部分是萘基，另一部分是氨基甲酸酯。从免疫学的角度分析，萘基的空间结构复杂，分子量较大，可以作为抗原决定簇，而氨基甲酸酯可以在总体结构上视为一个线性长链分子，可以作为与载体蛋白连接的臂。因此在合成半抗原时，必须保留萘基结构，而可以对氨基甲酸酯链进行适当的修饰，形成可以与载体蛋白连接的臂。因此，本专利在设计合成西维因半抗原时，采用具甲酰基等活性基团的含萘基化合物与氨基己酸反应，引入结构不同的活性侧链的合成方法来合成西维因半抗原，这样既保持了西维因半抗原与西维因在结构上的相似性，又使半抗原分子具有了与载体蛋白连接合适结构。

半抗原的设计、合成是本方法成败的关键所在。为突出该类农药分子特异性抗原决定簇，本发明选择1-萘基-N-氨基甲酸酯（b）结构



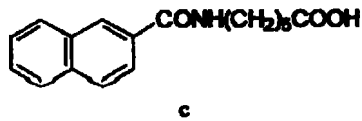
为半抗原的基本结构，其分子量MW为300。

本发明以1-（5-羧戊基）-3-（1-萘基）脲为半抗原，与载体蛋白相连接合成分子式为



的化合物为人工抗原。

本发明以N-(2-萘甲酰基)-6-氨基己酸(c)为半抗原



与辣根过氧化物酶连接作为酶标抗原，其分子量MW为285。

其中上述人工抗原再经动物免疫，取血，分出抗全血清，纯化制得特异性抗体。

农药西维因(甲萘威)特异性抗体的制备方法：

(1) 半抗原设计与合成

采用具有甲酰基活性基团的含萘基化合物与氨基己酸反应，合成含1-萘基-N-氨基甲酸酯结构的半抗原，具体做法是：

①半抗原1-(5-羧戊基)-3-(1-萘基)脲的合成：

取1-萘基异氰酸和6-氨基己酸混合在的四氢呋喃(THF)中，其三者摩尔比为1:120-130:120-130，在22-25℃下搅拌12-16小时，再经过滤获得半抗原，最后将固体在乙腈中重结晶，蒸发溶剂，即可得到纯化合物半抗原；

②半抗原N-(2-萘甲酰基)-6-氨基己酸(c)的合成：

称取2-萘甲酰氯溶在1,4-二氧杂环己烷中，在冰浴里，将该物质滴加到含有6-氨基己酸和氢氧化钾的水溶液中混合，使2-萘甲酰氯、1,4-二氧杂环己烷和6-氨基己酸三者摩尔比为1:12-13:1，混合物在22-25℃下，搅拌4小时，再经盐酸酸化后，过滤获得白色固体半抗原，最后经醚提取滤液，从中结晶出白色晶体半抗原；

(2) 人工抗原的合成

用半抗原1-(5-羧戊基)-3-(1-萘基)脲，以酰胺基CONH为桥梁，通过活性酯法，分别连接到卵清蛋白(ovalbumin, OA)或血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)上，合成人工抗原；具体做法是：取半抗原1-(5-羧戊基)-3-(1-萘基)脲，溶于N,N-二甲基甲酰胺DMF中，加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶于DMF溶液和N,N-二环己基碳二亚胺溶于DMF溶液，使半抗原1-(5-羧戊基)-3-(1-萘基)脲、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)与N,N-二环己基碳二亚胺三者摩尔比为1:4-5:3-4，在22-25℃下，搅拌反应1小时，然后放于4℃冰箱内18小时，离心除去沉淀，再将上层活化酯液加入到pH=7.0蛋白质PBS溶液中，其半抗原与蛋白质摩尔比为10-50:1，搅拌后于4℃下反应5小时，最后将反应液装入透析袋，4℃下、pH=7.4的PBS中透析，精确量取蛋白质偶联物溶液的体积，测定浓度和结合比，分装，-20℃保存。

(3) 酶标抗原的制备

用半抗原 N-(2-萘甲酰基)-6-氨基己酸与辣根过氧化物酶连接即制成酶标抗原，用于显色反应，具体做法同人工抗原的合成(2)；

(4) 免疫与特异性抗体制备

• 免疫：免疫动物选用雌性大白兔，免疫方法采用皮下和肌肉注射法，初免后进行四次加强免疫，具体做法是：

初次免疫：取 1mg 上述人工抗原溶于 0.9% 的 NaCl 溶液和弗氏完全佐剂等体积所配制的溶液中，进行动物免疫；

加强免疫：用 0.5mg 上述人工抗原溶于 0.9% 的 NaCl 溶液和弗氏不完全佐剂等体积所配制的溶液，进行动物免疫；加强免疫分别于初次免疫后 2 周、4 周和 6 周后免疫三次，此后间隔一个月。第五次免疫后 9 天时由兔子的耳缘静脉取血，进行效价检测；

• 抗体纯化：定时监测动物抗体效价，当抗体对一定的包被抗原达到适宜效价时，采集血液，并离心获得抗血清，使用 G-Sepharose 蛋白亲和层析柱对抗血清进行纯化，制备 IgG 抗体。

上述制备的农药西维因抗体可用于西维因的免疫检测。

免疫分析方法的建立和测定条件的优选：

利用方阵实验分别确定抗原抗体结合效价、亲和性以及 ELISA 方法的抗体和酶标记物的最适效价。本发明建立了西维因的快速免疫检测方法和实验室标准检测方法，并对 pH 值、离子强度等影响测定的因素进行分析，确定最佳工作条件，建立标准曲线：即目标分析物浓度对抗体的抑制率（或结合率 B/B_0 ）的相关曲线。目标分析物浓度对抗体的抑制率 $I = (A_{max} - A_{min}) - (A_i - A_{min}) / (A_{max} - A_{min}) * 100$

$$\text{抗体与抗原的结合率 } B/B_0 = (A_i - A_{min}) / (A_{max} - A_{min}) * 100$$

式中： A_{max} 空白孔平均吸光值； A_{min} 免疫前免血清对照孔平均吸光值。 A_i 加样孔平均吸光值。以抑制率或结合率 B/B_0 为纵坐标、分析物浓度 C 为横坐标绘制标准曲线。

抗体特异性：以抗体与结构类似化合物的交叉反应程度，以抑制抗体最大结合率的 50% 所需目标分析物的浓度 I_{50i} 与所需各种结构类似化合物的浓度 I_{50M} 之比的百分数表示，即交叉反应率 $C.R(\%)$ 。

$$C.R(\%) = I_{50i} / I_{50M} * 100$$

交叉反应越小，抗体特异性越高。

上述制备的农药西维因抗体可用于西维因的免疫检测方法中，其方法如下：

• 包被：将制备好的抗体溶于 50mmol、pH9-10 的碳酸缓冲液中，配制成 10 mg/mL 的包被液，酶标条的每个孔加 100 μ l 包被液 12-16 小时，将包被好的酶标条的每个孔，用 PBST 即磷酸盐缓冲液 0.05% (v/v)，Tween20 洗液洗涤三次；

- 封闭：每孔加入150-200 μ l、1%牛血清蛋白(BSA)/PBS封闭液，封闭一小时；
- 加样：将待测样品溶于含有1% BSA的PBS中，西维因标样也溶于含有1% BSA的PBS中，加样时每孔加入50 μ l上述待测样品或标样；
- 竞争反应：将酶标抗原溶于含有0.1%鱼皮胶(FG)-PBS缓冲液中，加入待测样品或标样后，每孔加入50 μ l酶标抗原溶液，孵育10分钟或60分钟后用洗板液洗涤三次；
- 显色：显色底物使用四甲基联苯胺(TMB)，每孔加入150 μ l四甲基联苯胺(TMB)-双氧水溶液(5mg四甲基联苯胺溶液溶于1ml底物缓冲液)，显色5分钟或30分钟后每孔加入50 μ l 5mol/L的硫酸终止；反应液在自动酶标仪上读数。

需要说明的是：

上述待测样品为待测物品的农药西维因提取物，该提取物的快速提取方法采用甲醇提取法。

甲醇提取法的具体做法是：用5倍体积的甲醇，浸泡未经粉碎的样品12-16小时；或用10g粉碎后的样品浸泡于50ml甲醇中，振荡2分钟；或用10g粉碎后的样品浸泡于50ml甲醇中，搅拌2分钟，静置、取上清液，即得到待测样品。

附图说明：

图1：不同浓度的西维因与抑制率关系曲线

有益效果：

与其他同类方法相比，本发明具有特异、灵敏、准确、快速、方便、廉价等特点。该设计、合成的半抗原与目标待测物相似程度高，对待测物的特征结构保留完整，为制备特异性良好的抗体奠定了基础。其抗体具有良好的特异性和灵敏度，检测极限达到 $1/1 \times 10^{10}$ ng/ml，而且抗体的稀释度可达到 $1/1 \times 10^6$ 。所得抗体和酶标抗原稳定，具有常温保藏时间长的优点。

经试验验证，上述半抗原，其合成方法简便，且所用主要原料如1-萘甲酰氯、1,4-二氧杂环己烷、6-氨基己酸价格较为低廉、容易获得，在一般化学试剂公司都可购买。由于合成效率高、反应步骤少，半抗原只需三步反应既可合成，从而提高了反应的可控性，反应产率分别达到了96%和86%。另外，合成产物的提取、纯化方法简便，只需要对合成产物进行结晶，即可获得高纯度的目的产物。因此，本发明合成半抗原的方法与其他方法相比较，更加易于推广普及。

本发明提供的快速检测方法操作简便、快速，完成全部检测操作过程只需40-60分钟，而且检测的精确度可达90%以上，非常适合现场检测的需要。由于抗体和酶标抗原，在常温下可以保藏1周、酶标抗原包备的酶标板在4℃下可以保藏6个月以上，从而为进行大规模样品的集中检测，提供了极大的方便。因此，

本发明不仅在实验室检测中表现出色，并为开发出成本低廉、检测效率高、操作简便的酶联免疫快速检测工具，奠定了基础，具有良好的应用前景；既有经济效益又有社会效益。

具体实施方式

实施例 1:

1. 半抗原的合成

本发明选择1-萘基-N-氨基甲酸酯 (b) 结构为半抗原的基本结构,其分子量 MW为300。设计合成了:

1) 半抗原 4 1-(5-羧戊基)-3-(1-萘基) 脲

用 1.7g(0.01mol) 的 1-萘基异氰酸和 0.1g(1.30mol) 6-氨基己酸混合在 100mL 的四氢呋喃 (THF) 中, 在 22℃下, 搅拌 12 小时, 经过滤可以获得 2.0g 的半抗原固体; 使其在乙腈中重结晶, 蒸发溶剂即可得到 0.9g 纯的化合物, 其总产率为 96%。

2) 半抗原 3 (N-(2-萘甲酰基)-6-氨基己酸)

3.8g(0.02mol) 的 2-萘甲酰氯溶于 20ml 的 1,4-二氧杂环己烷中, 在冰浴里, 将此物质滴加到 100ml 含有 2.6g(0.02mol) 的 6-氨基己酸和 8.0g(0.30mol) 的氢氧化钾的水溶液中混合。混合物在 25℃下, 搅拌 4 小时。盐酸酸化后, 过滤获得白色固体半抗原 3, 醚提取滤液从中结晶出白色晶体半抗原, 其总产率为 86%。

2. 人工抗原的合成

采用半抗原 1-(5-羧戊基)-3-(1-萘基) 脲, 通过活性酯法 (Active ester method、简称 AE 法) 分别连接到血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 上, 合成人工抗原; 具体做法是:

精确称取半抗原 1-(5-羧戊基)-3-(1-萘基) 脲 10mg 溶于 300 μ l N,N-二甲基甲酰胺 DMF 中, 加入 13.6mg (0.14mmol) N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) (溶于 300 μ l DMF 溶液) 和 24mg N,N-二环己基碳二亚胺 (溶于 300 μ l 的 DMF 溶液), 在 22℃ 下, 搅拌反应 1 小时, 然后放于 4℃ 冰箱内, 待 18 小时, 有混浊物产生、离心除去沉淀, 将上层活化酯液加入到 5ml 浓度为 4mg/ml 的蛋白质 PBS 溶液 (pH=7.0, 0.01mol/ml) 中, 搅拌于 4℃ 下反应 5 小时, 然后将反应液装入透析袋, 4℃ 下、pH=7.4 的 0.01mol/ml 的 PBS 中透析, 然后精确量取蛋白质偶联物溶液的体积, 测定浓度和结合比, 分装, -20℃ 保存。

3. 酶标抗原的制备

用半抗原 N-(2-萘甲酰基)-6-氨基己酸与辣根过氧化物酶连接即制成酶标抗原, 用于显色反应。其具体做法同人工抗原的合成 (2);

4. 免疫与特异性抗体制备

• 免疫:

动物选择雄性大白兔, 月龄 3 个月, 体重 1.5 公斤, 饲养于标准实验动物房中, 连续观察 3 天, 确定身体状况正常后进行免疫。

初次免疫: 精确称取 1mg 人工抗原溶于 0.5ml 0.9% 的 NaCl 溶液和 0.5ml 弗氏完全佐剂所配制的溶液免疫。

加强免疫用 0.5mg 人工抗原溶于 0.5ml 0.9% 的 NaCl 溶液和 0.5ml 弗氏不完全佐剂所配制的溶液免疫。加强免疫分别于初次免疫后 2 周、4 周和 6 周后免疫三次, 此后间隔一个月。第五次免疫完后 9 天时由兔子的耳缘静脉取血, 进行效价检测。

• 由抗血清中纯化制备抗体

定时监测动物抗体效价, 当终点效价达到 20 万以上时, 由颈动脉采全血。将采集的全血 22℃ 静置 2 小时后在 4 度下静置 8 小时, 然后 3500 转/min 离心 10 分钟, 收集上清液于 -20℃ 保存。将离心后获得的血清用 G-SepharoseCL-4B 免疫亲和层析柱过滤, 对抗血清进行纯化, 制备 IgG 抗体。

5. 免疫检测方法的建立

拟测物品为: 高粱、大麦和小麦三种谷物。使用快速免疫检测方法, 检测它们西维因的含量步骤如下:

1) 提取待测样品——甲醇提取法①

分别用 50ml 甲醇浸泡 10 克大麦、小麦和高粱未经粉碎的样品 12 小时。其浸泡液即为待测样品。

2) 检测方法及方阵试验评价方法

采用快速免疫检测方法 (试验使用 8 孔酶标条):

• 包被: 将制备好的抗体溶于 50 mmol、pH9.6 的碳酸缓冲液中, 配制成 10 μ g/mL 的包被液。在标条的每个孔内, 加 100 μ l 包被液, 12 小时。将包被好的酶标条的每个孔用 PBST (磷酸盐缓冲液 0.05% (v/v), Tween 20) 洗液洗涤三次。

• 封闭: 每孔加入 150 μ l、1% 牛血清蛋白 (BSA)/PBS 封闭液, 封闭一小时。

• 加样: 将待测样品溶于含有 1% BSA 的 PBS 中, 西维因标样也溶于含有 1% BSA 的 PBS 中。加样时每孔加入 50 μ l 上述待测样品或标样。

• 竞争反应: 将酶标抗原溶于含有 0.1% 鱼皮胶 (FG)-PBS 缓冲液中, 加入待测样品或标样后, 每孔加入 50 μ l 酶标抗原溶液, 孵育 10 分钟后用洗板液洗涤三次。

• 显色: 显色底物使用四甲基联苯胺 (TMB)。每孔加入 150 μ l 四甲基联苯胺 (TMB)-双氧水溶液 (5mg 四甲基联苯胺溶液溶于 1ml 底物缓冲液), 显色 5 分钟后每孔加入 50 μ l 5mol/L 的硫酸终止。反应液在自动酶标仪上读数。

上述检测方法方阵试验结果如下西维因的抑制率标准曲线所示。在图1中(■)、(●)、(▲)、(▼)分别为1%的BSA-PBS标样、大麦提取液、高粱提取液和小麦提取液西维因抑制率标准曲线。从试验结果可以看出,西维因抗体的特异性很好。

• 灵敏度和特异性分析:

(1) 灵敏度

西维因检测方法灵敏度分析结果见下表:

检测方法	IC ₅₀ (ppb)	IC ₁₅ (ppb)	最优酶标抗原稀释比
实验室检测方法	15±3	1.5±0.6	1/300,000
快速检测方法	42±6	4.5±0.9	1/40,000

表1分析结果显示:快速检测方法灵敏度低于标准检测方法,但是可以满足快速检测对灵敏度的要求。

(2) 特异性

本发明所制备的抗体和建立的免疫检测方法对毒死蜱、敌敌畏、杀螟松等常用农药和结构类似农药灭草隆、1-萘酚、萘、残杀威等没有交叉反应,这表明本发明所制备抗体对目标检测对象西维因具有高度特异性。

6. 抗体稳定性试验

快速检测方法对于抗体、酶标抗原在常温下的稳定程度有很高的要求,因此本发明对此进行了验证实验。

保藏条件	西维因检测结果
现包被酶标板(湿)	100
4℃保藏7天(干)	102
室温保藏7天(干)	97
37℃保藏7天(干)	90
<i>IC₅₀</i>	
现包被酶标板(湿)	100
4℃保藏7天(干)	100
室温保藏7天(干)	103
37℃保藏7天(干)	102

*表2中所示结果为保藏板与现包板的相对值(现包板为100%)

冻干和溶液状态酶标抗原的稳定性试验结果

表3

保藏条件	西维因检测结果	
	冻干酶标抗原	溶液态酶标抗原
4℃保藏7天	100	104
室温保藏7天	97	98
37℃保藏7天 (IC_{50}	120	103
4℃保藏7天	101	100
室温保藏7天	97	104
37℃保藏7天	106	105

*表3中所示结果为处理与4℃保藏液态HRP的相对值 (4℃保藏液态HRP =100%)

试验结果表明各种不同的保藏条件对抗体和酶标抗原的活性影响不明显, 抗体和酶标抗原的活性在各种保藏条件下均很稳定, 可以满足快速检测方法的需要。

实施例2:

免疫检测时, 提取样品采用甲醇提取法②即: 分别用 10g 粉碎后的大麦、小麦和高粱待测物品, 浸泡于 50ml 甲醇中振荡 2 分钟、静置、取上清液, 即得到待测样品。所得浸泡液即为待测样品。其它同实施例 1。

实施例3:

免疫检测时, 提取样品采用甲醇提取法③即: 分别用10g粉碎后的大麦、小麦和高粱待测物品, 浸泡于50ml甲醇中搅拌2分钟、静置、取上清液, 即得到待测样品。所得浸泡液即为待测样品。其它同实施例1。

实施例4:

人工抗原的合成, 使用卵清蛋白 (ovalbumin, OA);

检测方法采用实验室检测方法 (试验使用8孔酶标条):

- 包被: 将制备好的抗体溶于50 mmol、pH 9.6的碳酸缓冲液中, 配制成10 mg/mL的包被液。酶标条的每个孔加100 μ l包被液过夜。将包被好的酶标条的每个孔用PBST (磷酸盐缓冲液0.05% (v/v), Tween 20) 洗液洗涤三次。

- 封闭: 每孔加入150 μ l、1% 牛血清蛋白 (BSA)/PBS封闭液, 封闭一小时。

- 加样: 将待测样品溶于含有1% BSA的PBS中, 西维因标样也溶于含有1% BSA的PBS中。加样时每孔加入50 μ l上述待测样品或标样。

- 竞争反应: 将酶标抗原溶于含有0.1% 鱼皮胶 (FG)-PBS缓冲液中, 加入待测样品或标样后, 每孔加入50 μ l酶标抗原溶液, 孵育60分钟后用洗板液洗涤三次。

• 显色：显色底物使用四甲基联苯胺（TMB）。每孔加入150 μ l 四甲基联苯胺（TMB）-双氧水溶液（5mg四甲基联苯胺溶液溶于1ml底物缓冲液），显色30分钟后每孔加入50 μ l 5mol/L的硫酸终止。反应液在自动酶标仪上读数。其它同实施例1。

实施例5：

检测方法采用实验室检测方法（试验使用8孔酶标条）：

• 包被：将制备好的抗体溶于50 mmol、pH9.6的碳酸缓冲液中，配制成10 mg/mL的包被液。酶标条的每个孔加100 μ l 包被液过夜。将包被好的酶标条的每个孔用PBST（磷酸盐缓冲液0.05%（v/v），Tween 20）洗液洗涤三次。

• 封闭：每孔加入150 μ l、1%牛血清蛋白（BSA）/PBS封闭液，封闭一小时。

• 加样：将待测样品溶于含有1% BSA的PBS中，西维因标样也溶于含有1% BSA的PBS中。加样时每孔加入50 μ l 上述待测样品或标样。

• 竞争反应：将酶标抗原溶于含有0.1%鱼皮胶（FG）-PBS缓冲液中，加入待测样品或标样后，每孔加入50 μ l 酶标抗原溶液，孵育60分钟后用洗板液洗涤三次。

• 显色：显色底物使用四甲基联苯胺（TMB）。每孔加入150 μ l 四甲基联苯胺（TMB）-双氧水溶液（5mg四甲基联苯胺溶液溶于1ml底物缓冲液），显色30分钟后每孔加入50 μ l 5mol/L的硫酸终止。反应液在自动酶标仪上读数。其它同实施例2。

实施例6：

检测方法采用实验室检测方法（试验使用8孔酶标条）：

• 包被：将制备好的抗体溶于50 mmol、pH 9.6的碳酸缓冲液中，配制成10 mg/mL的包被液。酶标条的每个孔加100 μ l 包被液过夜。将包被好的酶标条的每个孔用PBST（磷酸盐缓冲液0.05%（v/v），Tween 20）洗液洗涤三次。

• 封闭：每孔加入150 μ l、1% 牛血清蛋白（BSA）/PBS封闭液，封闭一小时。

• 加样：将待测样品溶于含有1% BSA的PBS中，西维因标样也溶于含有1% BSA的PBS中。加样时每孔加入50 μ l 上述待测样品或标样。

• 竞争反应：将酶标抗原溶于含有0.1% 鱼皮胶（FG）-PBS缓冲液中，加入待测样品或标样后，每孔加入50 μ l 酶标抗原溶液，孵育60分钟后用洗板液洗涤三次。

• 显色：显色底物使用四甲基联苯胺（TMB）。每孔加入150 μ l 四甲基联苯胺（TMB）-双氧水溶液（5mg四甲基联苯胺溶液溶于1ml底物缓冲液），显色30分钟后每孔加入50 μ l 5mol/L的硫酸终止。反应液在自动酶标仪上读数。其它同实施例3。

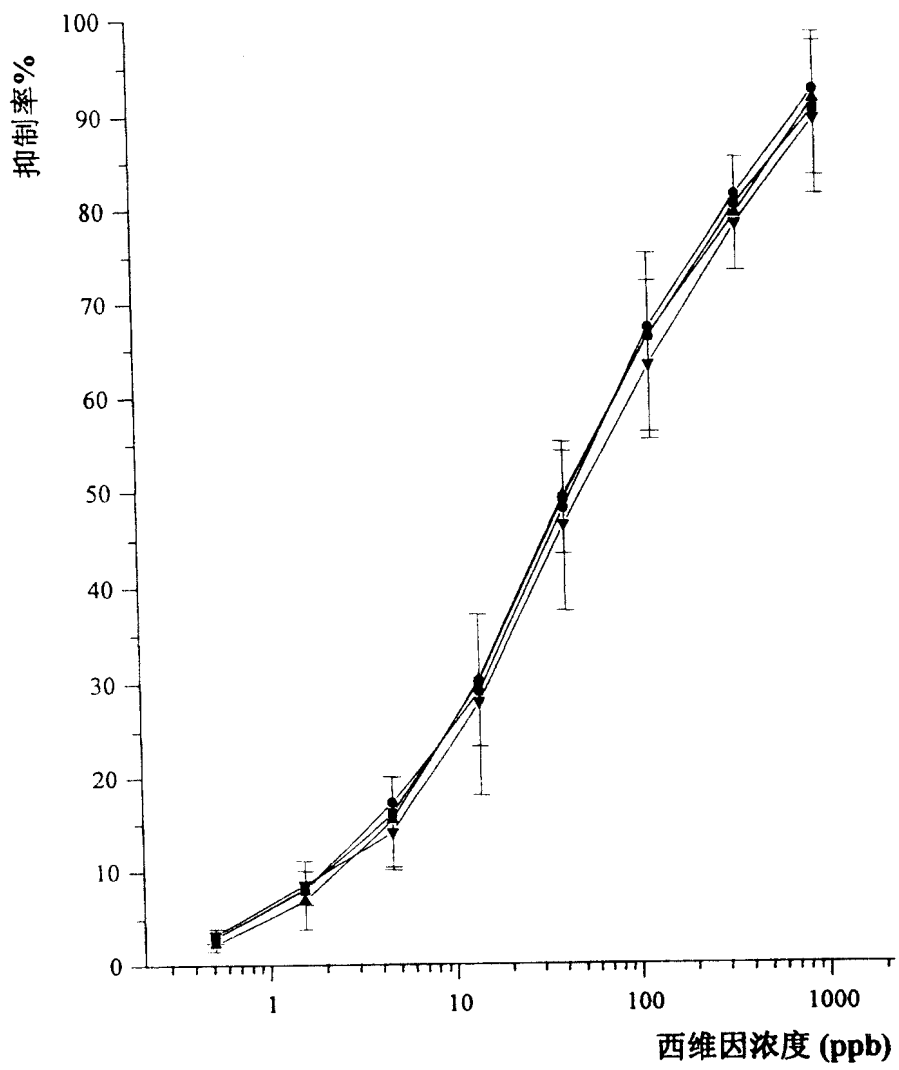


图 1

专利名称(译)	农药西维因人工抗原和抗体及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN100392405C	公开(公告)日	2008-06-04
申请号	CN200410020332.2	申请日	2004-08-20
[标]申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
[标]发明人	王硕 王俊平 张燕		
发明人	王硕 王俊平 张燕		
IPC分类号	G01N33/531 A61K39/395 A61K39/385 G01N33/532 G01N33/535 G01N33/547		
代理人(译)	李明		
其他公开文献	CN1598582A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

农药西维因人工抗原和抗体及其制备方法与应用，涉及具有6-氨基己酸分子结构的氨基甲酸酯类农药西维因小分子化合物人工半抗原、抗原和抗体的制备及其在建立免疫分析方法方面的应用。本发明克服了传统的理化分析方法繁琐复杂、成本较高、分析速度慢的问题，提供了简便、快速、灵敏、准确的免疫分析技术。它以1-(5-羧戊基)-3-(1-萘基)脲和N-(2-萘甲酰基)-6-氨基己酸为半抗原，分别与血蓝蛋白等载体蛋白、辣根过氧化物酶连接合成人工抗原和酶标抗原。人工抗原再经动物免疫、取血、分出抗血清、纯化制得抗体。该抗体稳定、具有良好的特异性和灵敏度，且合成方法简便，可用于农药西维因的快速免疫检测，具有良好的应用前景。

