

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07K 16/44 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01)

C01N 33/53 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810041929.3

[43] 公开日 2009年1月14日

[11] 公开号 CN 101343325A

[22] 申请日 2008.8.21

[21] 申请号 200810041929.3

[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 张敏 陆贻通 唐建设 程国华

[74] 专利代理机构 上海交达专利事务所

代理人 王锡麟 王桂忠

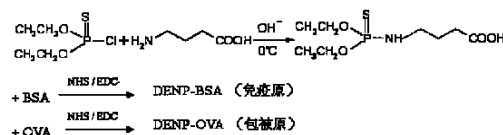
权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 1 页

## [54] 发明名称

可检测多种有机磷农药残留的抗体制备方法

## [57] 摘要

本发明公开一种农业技术领域的可检测多种有机磷农药残留的抗体制备方法及其应用。方法为：第一步，用 O，O - 二乙基硫代磷酰氯与 4 - 氨基丁酸反应，合成含有多种有机磷农药共同结构 - O，O - 二乙基 - N - (3 - 羧基丙基) 硫逐磷酰胺酯 DENP；第二步，采用碳二亚胺法分别与牛血清白蛋白 BSA、鸡卵清蛋白 OVA 进行偶联，制备通用免疫原 DENP - BSA 和通用包被原 DENP - OVA；第三步，通过免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体，所获得的抗体对甲拌磷，内吸磷，乙拌磷、氧乐果、辛硫磷、啶硫磷等多种有机磷农药有显著特异性，可用于这些有机磷类农药的免疫检测。



1、一种可检测多种有机磷农药残留的抗体制备方法，其特征在于，包括如下步骤：

第一步，用 O, O-二乙基硫代磷酰氯与 4-氨基丁酸反应，合成含有多种有机磷农药共同结构—O, O-二乙基硫代磷酰基的通用半抗原 O, O-二乙基-N-(3-羧基丙基)硫逐磷酰胺酯 DENP；

第二步，采用碳二亚胺法将第一步得到的通用半抗原 O, O-二乙基-N-(3-羧基丙基)硫逐磷酰胺酯 DENP 分别与牛血清白蛋白 BSA、鸡卵清蛋白 OVA 进行偶联，制备通用免疫原 DENP-BSA 和通用包被原 DENP-OVA；

第三步，采用第二步制备的免疫原免疫新西兰大白兔，得到多克隆抗体，即可检测多种有机磷农药残留的抗体。

2、根据权利要求 1 所述的可检测多种有机磷农药残留的抗体制备方法，其特征是，所述的第一步，具体为：

①取 1.0g O, O-二乙基硫代磷酰氯溶于 5ml 甲醇，置于冰浴；

②称取 KOH 0.69g 和 4-氨基丁酸 0.67g，溶于 5ml 甲醇；

③在搅拌中，将氨基丁酸和 KOH 的混合溶液逐滴加入 O, O-二乙基硫代磷酰氯溶液中，在冰浴中反应，过滤反应混合物，减压浓缩，然后用 20 ml NaHCO<sub>3</sub> 溶液将浓缩液转移到分液漏斗中，用 10ml 正己烷萃取，弃去有机相，再重复两次；

④然后用盐酸调节水相 pH 2，用 10ml 二氯甲烷萃取有机相，再重复两次；

⑤经无水硫酸钠干燥，减压浓缩得到淡黄色油状物 0.53g，即为产物通用半抗原 O, O-二乙基-N-(3-羧基丙基)硫逐磷酰胺酯 DENP。

3、根据权利要求 2 所述的可检测多种有机磷农药残留的抗体制备方法，其特征是，所述的在冰浴中反应，其时间为 2h。

4、根据权利要求 2 所述的可检测多种有机磷农药残留的抗体制备方法，其特征是，所述的 NaHCO<sub>3</sub> 溶液，其浓度为 50mg/ml。

5、根据权利要求 1 所述的可检测多种有机磷农药残留的抗体制备方法，其特征是，所述的第二步，具体为：

①取 52mg DFXP 溶于 3ml 无水二甲基甲酰胺 DMF，加入 116mg N-羟基琥珀酰亚胺 NHS，191mg N，N'-二环己基碳二亚胺 EDC，室温搅拌反应过夜；

②取 133mgBSA 或 90mgOVA 溶于 15mL 硼酸盐缓冲液；

③然后将活化半抗原溶液加入 BSA 或 OVA 溶液中，使半抗原与 BSA 或 OVA 的摩尔比为 100:1，室温反应 2h 后，于 4℃ 反应过夜，透析获得纯化的完全抗原溶液。

6. 根据权利要求 5 所述的可检测多种有机磷农药残留的抗体制备方法，其特征是，所述硼酸盐缓冲液，其浓度为 0.2mol/L，pH8.7。

7. 根据权利要求 5 所述的可检测多种有机磷农药残留的抗体制备方法，其特征是，所述室温反应，其时间为 2h。

8. 根据权利要求 1 所述的可检测多种有机磷农药残留的抗体制备方法，其特征是，所述第三步，具体为：以合成的通用免疫原，与等量弗氏佐剂混合后，采用皮内注射的方式免疫新西兰大白兔。

## 可检测多种有机磷农药残留的抗体制备方法

### 技术领域

本发明涉及一种农业技术领域的农药残留抗体的制备方法，尤其是一种可检测多种有机磷农药残留的抗体制备方法。

### 背景技术

农药是当前农业生产用于防治病、虫、杂草对农作物危害不可缺少的物质，对促进农业增产有极重要的作用，但同时带来严重的环境问题：生态失衡，农产品品质下降，人类身体健康受威胁。目前，有机磷、拟除虫菊酯农药具有高效的杀虫效果，是植物化学保护的主力军。随着近年来环境保护的呼声越来越高，有机磷类农药使用带来的环境问题日益引起人们的重视。但就目前的形势而言，人类仍面临饥饿，贫穷的困扰，全面禁止农药的使用是不现实的，为了达到高产、高效的目标，农药的地位在短期内是无法取代的。鉴于此，为保障人民的身体健康，有效控制生产中农药的合理使用和对其残留量进行监控，开发一种快速、可靠、灵敏，适于农药残留现场监控的痕量分析方法具有重要的现实意义。目前有机磷类农药的残留分析方法主要是通过提取、净化后，再配以高效HPLC或GC，这种检测方法费用相对昂贵、样品前处理过程复杂、对仪器设备要求较高、而且需要消耗大量的有机溶剂，从而造成对环境的二次污染。免疫分析是一种快速、灵敏、操作简单、费用低的一种检测方法。农药多为小分子化合物，需要通过与大分子蛋白质类物质偶联后才可用于免疫动物，刺激动物免疫系统来产生针对小分子农药的抗体。由于大多数农药本身不具备直接与蛋白质类大分子物质偶联的位点，因此，通常需要对农药进行改造，前期研发费用较高。而且，由于抗体通常对特定物质的特异性较强，建立的免疫分析方法多只适用于单一农药残留量的检测分析，限制了免疫分析方法的应用，不能充分发挥免疫测定法的快速、操作简单、检测费用低的优点。

经对现有技术文献的检索发现，Alcocer 等人在《J. Agric. Food Chem》(农业食品化学)48卷(2000年)2228-2233页上发表的“Use of Phosphonic Acid as

a Generic Hapten in the Production of Broad Specificity Anti-Organophosphate Pesticide Antibody” (以二乙基磷丁烯酸为通用半抗原制备抗有机磷农药广谱特异性抗体), 该文提及利用反式-4-(0,0-二乙基磷酰基)-2-丁烯酸作为有机磷农药通用半抗原, 制备针对有机磷农药具有广谱特异性的抗体。所得到的多克隆抗体与二甲氧基磷酸酯类及硫代磷酸酯类化合物结合力较弱, 对较多农药的检测灵敏度不高。

#### 发明内容

本发明的目的在于针对现有技术的不足, 提供一种可检测多种有机磷农药残留的抗体制备方法, 解决了目前农药残留免疫检测中存在的抗体通常对特定物质的特异性较强, 建立的免疫分析方法多只适用于单一农药残留量的检测分析, 限制了免疫分析方法应用的实际问题。

本发明是通过以下技术方案实现的:

本发明包括如下步骤:

第一步, 用0,0-二乙基硫代磷酰氯与4-氨基丁酸反应, 合成含有多种有机磷农药共同结构—0,0-二乙基硫代磷酰基的通用半抗原0,0-二乙基-N-(3-羧基丙基)硫逐磷酰胺酯(DENP);

第二步, 采用碳二亚胺法将第一步得到的通用半抗原0,0-二乙基-N-(3-羧基丙基)硫逐磷酰胺酯(DENP)分别与牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清蛋白(OVA)进行偶联, 制备通用免疫原DENP-BSA和通用包被原DENP-OVA;

第三步, 采用第二步制备的免疫原免疫新西兰大白兔, 得到多克隆抗体, 即可检测多种有机磷农药残留的抗体。

所述的第一步, 具体为:

①取1.0g0,0-二乙基硫代磷酰氯溶于5mL甲醇, 置于冰浴;

②称取KOH 0.69g和4-氨基丁酸0.67g, 溶于5mL甲醇;

③在搅拌中, 将氨基丁酸和KOH的混合溶液逐滴加入0,0-二乙基硫代磷酰氯溶液中, 在冰浴中反应, 过滤反应混合物, 减压浓缩, 然后用20ml NaHCO<sub>3</sub>溶液将浓缩液转移到分液漏斗中, 用10mL正己烷萃取, 弃去有机相, 再重复两次;

所述的在冰浴中反应, 其时间为2h,

所述的NaHCO<sub>3</sub>溶液, 其浓度为50mg/mL。

④然后用盐酸调节水相 pH=2，用 10mL 二氯甲烷萃取有机相，再重复两次；

⑤经无水硫酸钠干燥，减压浓缩得到淡黄色油状物 0.53g，即为产物通用半抗原 O，O-二乙基-N(3-羧基丙基)硫逐磷酰胺酯 DENP。

所述的第二步，具体为：

①取 52mg DENP 溶于 3mL 无水二甲基甲酰胺 (DMF)，加入 116mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)，191mg N，N'-二环己基碳二亚胺 (EDC)，室温搅拌反应过夜；

②取 133mgBSA 或 90mgOVA 溶于 15mL 硼酸盐缓冲液；

所述硼酸盐缓冲液，其浓度为 0.2mol/L，pH8.7。

③然后将活化半抗原溶液加入 BSA 或 OVA 溶液中，使半抗原与 BSA 或 OVA 的摩尔比为 100:1，室温反应 2h 后，于 4℃反应过夜，透析获得纯化的完全抗原溶液。

所述室温反应，其时间为 2h。

所述第三步，具体为：以合成的通用免疫原，与等量弗氏佐剂混合后，采用皮内注射的方式免疫新西兰大白兔，当效价达最佳时，心脏采血，分离血清。

本发明能够应用于建立多种有机磷农药残留的免疫分析方法，即用于间接竞争性 ELISA、直接 ELISA 或免疫试纸对包括甲拌磷、内吸磷、氧乐果、啶硫磷、辛硫磷、乙拌磷等有机磷类农药的残留进行检测。

本发明的优点在于：在比较分析多种有机磷类农药结构的基础上，根据其共同结构特点而设计合成了 O，O-二乙基-N(3-羧基丙基)硫逐磷酰胺酯作为半抗原，所合成的半抗原具有多种有机磷类农药的通用结构，与蛋白质进行偶联后免疫动物，所制备的抗体对甲拌磷、内吸磷、乙拌磷、氧乐果、辛硫磷、啶硫磷等多种有机磷类农药均有特异性，可用于食品，水源中多种有机磷类农药的筛选检测，充分显示了免疫检测技术的快速、简便的特点。

附图说明

图 1 是通用免疫原和包被原的合成途径图；

图 2 是透析后免疫原的红外扫描图谱。

具体实施方式

下面结合附图对本发明的实施例作详细说明：本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施，给出了详细的实施方式和具体的操作过程，但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

### 实施例一

如图1所示，本实施例合成包括三个步骤：

第一步，用O，O-二乙基硫代磷酰氯与4-氨基丁酸反应，合成了含有多种有机磷农药共同结构—O，O-二乙基硫代磷酰基的通用半抗原O，O-二乙基-N-(3-羧基丙基)硫逐磷酰胺酯(DENP)。具体如下：

称取1.0g，O，O-二乙基硫代磷酰氯溶于5mL甲醇，置于冰浴。

称取KOH 0.69g和4-氨基丁酸0.67g，溶于5mL甲醇。

在搅拌中，将氨基丁酸和KOH的混合溶液逐滴加入O，O-二乙基硫代磷酰氯溶液中。在冰浴中反应2h，过滤反应混合物，减压浓缩，然后用20ml浓度为50mg/mL的NaHCO<sub>3</sub>溶液将浓缩液转移到分液漏斗中，用10mL正己烷萃取，弃去有机相，再重复两次。

然后用盐酸调节水相pH=2左右，用10mL二氯甲烷萃取有机相，再重复两次。

经无水硫酸钠干燥，减压浓缩得到淡黄色油状物0.53g，即为产物DENP。

第二步，采用碳二亚胺法分别与牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清蛋白(OVA)进行偶联，制备了通用免疫原DENP-BSA和通用包被原DENP-OVA。具体如下：

取52mg DENP溶于3mL无水DMF，加入116mg NHS，191mg EDC。室温搅拌反应过夜。

取133mgBSA或90mgOVA溶于15mL浓度为0.2mol/L，pH8.7的硼酸盐缓冲液。

然后将活化半抗原溶液加入BSA或OVA溶液中，使半抗原与BSA或OVA的摩尔比为约100:1。室温反应2h后，于4℃反应过夜。透析获得纯化的完全抗原溶液。

如图2所示，图谱呈现了偶联物DENP-BSA和BSA含有蛋白质类共有的吸收，与文献值相符。将二者的红外光谱对比可发现：(1)DENP-BSA显示出了蛋白BSA在3306，1653和1538cm<sup>-1</sup>的特征吸收。(2)DENP-BSA在1024、952和781cm<sup>-1</sup>出现了BSA没有的特征吸收峰，1024cm<sup>-1</sup>处吸收峰与半抗原DENP中P-O键的吸收位置相吻合，952cm<sup>-1</sup>处的吸收峰对应于DENP中P-N键的特征吸收峰，而781cm<sup>-1</sup>的吸收峰可能对应于P=S键。因此DENP-BSA兼有BSA和DENP的吸收峰，初步证实半抗原与蛋白质偶联成功。

第三步，通过免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体。

根据如下免疫方案方法将制备的免疫原对新西兰大白兔进行免疫,具体免疫方案见表1:

表1 有机磷农药通用抗体的免疫方案

免疫次数	4
时间间隔	2周
免疫剂量	每只兔子注射 1mg 免疫原
佐剂类型	初免为弗氏完全佐剂, 加强免疫采用复式不完全佐剂
免疫方式	背部皮内多点注射、大腿肌肉注射
血清采集间隔期	每次免疫后第7天

完成表中免疫程序后,利用棋盘滴定法将两种抗血清分别用包被抗原进行检测,确定最佳的抗原-抗体组合及其最佳工作浓度。并利用建立的抗原-抗体最佳工作条件来分析不同种类的有机磷农药对该抗原-抗体结合反应的抑制作用。选取农药包括乐果、氧乐果、辛硫磷、毒死蜱、啶硫磷、二嗪农、甲拌磷、内吸磷、乙拌磷。在本实施例中,各有机磷农药用含5%甲醇的磷酸盐缓冲液(PBS)稀释。将药剂抑制率对药剂浓度进行回归分析,得出回归方程,并计算各药剂对抗体反应的半数抑制浓度( $IC_{50}$ )和20%抑制浓度( $IC_{20}$ )值,结果见表2。

表2. 几种有机磷农药对所获得抗体的  $IC_{50}$  和  $IC_{20}$

农药名称	$IC_{50}$ (mg/L)	$IC_{20}$ (mg/L)	甲醇浓度
DENP	0.198	0.022	5%
甲拌磷	52.9	0.0195	5%
内吸磷	3.39	0.043	5%
乙拌磷	905.1	1.36	5%
氧乐果	/	5.55	5%
辛硫磷	/	3.60	5%
啶硫磷	/	16.2	5%
乐果	/	59.6	5%
二嗪农	/	/	5%
毒死蜱	/	/	5%

#### 实施例二

与实施例一相同的方式获得抗体后,在建立有机磷农药分析方法时,除稀释有机磷农药时采用10%甲醇的PBS外,其余同实施例一。各有机磷农药对获得抗体的抑制效果见表3,

表 3. 几种有机磷农药对所获得抗体的  $IC_{50}$  和  $IC_{20}$ 

农药名称	$IC_{50}$ (mg/L)	$IC_{20}$ (mg/L)	甲醇浓度
DENP	0.325	0.067	10%
甲拌磷	83.5	0.033	10%
内吸磷	4.05	0.098	10%
乙拌磷	/	7.90	10%
氧乐果	/	2.81	10%
辛硫磷	/	5.66	10%
啶硫磷	/	1.41	10%
乐果	/	72.9	10%
二嗪农	/	/	10%
毒死蜱	/	/	10%

### 实施例三

与实施例一相同的方式获得抗体后，在建立有机磷农药分析方法时，除稀释有机磷农药时采用 20% 甲醇的 PBS 外，其余同实施例一。各有机磷农药对获得抗体的抑制效果见表 4。

表 4. 几种有机磷农药对所获得抗体的  $IC_{50}$  和  $IC_{20}$ 

农药名称	$IC_{50}$ (mg/L)	$IC_{20}$ (mg/L)	甲醇浓度
DENP	0.305	0.028	20%
甲拌磷	389.2	0.96	20%
内吸磷	11.9	0.52	20%
乙拌磷	219.3	0.62	20%
氧乐果	/	2.14	20%
辛硫磷	/	10.3	20%
啶硫磷	/	3.89	20%
乐果	/	168.2	20%
二嗪农	/	294.7	20%
毒死蜱	/	/	20%

综上所述可见，所获得的抗体除与半抗原 DENP 有很强亲和力外，还与甲拌磷，内吸磷和乙拌磷这三种有机磷农药有交互反应性；此外氧乐果、辛硫磷、啶硫磷等有机磷农药与所获得抗体也有一定亲和力；抗体与乐果、二嗪农和毒死蜱的亲和力差。



专利名称(译)	可检测多种有机磷农药残留的抗体制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101343325A</a>	公开(公告)日	2009-01-14
申请号	CN200810041929.3	申请日	2008-08-21
[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	张敏 陆贻通 唐建设 程国华		
发明人	张敏 陆贻通 唐建设 程国华		
IPC分类号	C07K16/44 C07K1/00 G01N33/53		
代理人(译)	王锡麟 王桂忠		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开一种农业技术领域的可检测多种有机磷农药残留的抗体制备方法及其应用。方法为：第一步，用O，O - 二乙基硫代磷酰氯与4 - 氨基丁酸反应，合成含有多种有机磷农药共同结构 - O，O - 二乙基硫代磷酰基的通用半抗原O，O - 二乙基 - N - (3 - 羧基丙基)硫逐磷酰胺酯DENP；第二步，采用碳二亚胺法分别与牛血清白蛋白BSA、鸡卵清蛋白OVA进行偶联，制备通用免疫原DENP - BSA和通用包被原DENP - OVA；第三步，通过免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体，所获得的抗体对甲拌磷，内吸磷，乙拌磷、氧乐果、辛硫磷、啶硫磷等多种有机磷农药有显著特异性，可用于这些有机磷类农药的免疫检测。

