

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105092833 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201410200830. 9

(22) 申请日 2014. 05. 12

(71) 申请人 中国计量学院

地址 310018 浙江省杭州市下沙高教园学源
街 258 号中国计量学院

(72) 发明人 戴贤君 朱洁 杨维

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页 附图7页

(54) 发明名称

一种检测肟基乙酸酯类杀菌剂的 ELISA 方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测肟基乙酸酯类杀菌剂的 ELISA 方法，所述方法为利用 (E)-2-(2-溴甲基苯基)-2-甲氧亚氨基乙酸甲酯 (OEBr) 合成半抗原 (OESCH₂CH₂COOH)，并与牛血清蛋白 (BSA) 形成偶联物，免疫健康白兔得到多克隆抗体，此后以醚菌酯和肟菌酯 (肟基乙酸酯类杀菌剂) 为标准品，以 OESCH₂CH₂COOH 和卵清蛋白 (OVA) 的偶联物作为包被原，建立柑橘中肟基乙酸酯类杀菌剂的间接 ELISA 方法，为肟基乙酸酯类杀菌剂在柑橘中的残留检测提供了快速高效的检测手段，费用较低且重复性好。

1. 一种检测肟基乙酸酯类杀菌剂的 ELISA 方法,包括以下内容 :
 - (1) 通过活性基团肟基乙酸酯 ((E)-2(2-溴甲基苯基)-2-甲氧亚氨基乙酸甲酯(OEBr)) 为原料合成人工抗原 ;
 - (2) 制备含肟基乙酸酯类杀菌剂人工抗原的疫苗并免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体 ;
 - (3) 建立检测肟基乙酸酯类杀菌剂的间接 ELISA 检测方法,测定不同样品中杀菌剂的残留。
2. 根据权利要求 1 所述的一种肟基乙酸酯类杀菌剂的 ELISA 检测方法,其特征在于,肟基乙酸酯类杀菌剂人工半抗原的合成中巯基丙酸乙醇溶液、NaOH、OEBr 乙醇溶液的投料比为 1 : 2 : 1equiv;采用二氯甲烷进行液液分配时 pH 应为 2.8-3.2 左右。
3. 根据权利要求 1 所述的一种肟基乙酸酯类杀菌剂的 ELISA 检测方法,其特征在于,肟基乙酸酯类杀菌剂人工抗原 (免疫原和包被原) 制备中,合成的半抗原和 NHS 的摩尔比为 1 : 1,加入 DMF 溶液时为逐滴加入 ;三正丁胺和氯甲酸异丁酯的投料比为 1 : 1equiv ;所述半抗原与 BSA 或 OVA 的质量份数比为 60 ~ 150 : 1 ;制备免疫原的整个体系的 pH 应为 7.4,制备包被原的整个体系为 8.0 ;利用免疫原同免疫佐剂混合,制备含肟基乙酸酯类杀菌剂人工抗原的疫苗并免疫新西兰大白兔,采取大白兔血液并分离血清,制备能与肟基乙酸酯类杀菌剂特异反应的多克隆抗体。
4. 根据权利要求 1 所述的一种肟基乙酸酯类杀菌剂的 ELISA 检测方法,其特征在于,酶联免疫检测中包被原用包被液稀释至 10 μg/m ;用样品稀释液以体积比 1 : 2000 稀释抗体后,与标准品 (或样品) 1 : 1 预混过夜 ;将 HRP 酶标山羊抗兔 IgG 稀释 1000 倍。

一种检测肟基乙酸酯类杀菌剂的 ELISA 方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域, 具体涉及一种检测肟基乙酸酯类杀菌剂的人工抗原合成及 ELISA 检测方法。

背景技术

[0002] 脲基乙酸酯类杀菌剂属于甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的一类, 杀菌谱广, 安全高效。虽然这类农药毒性低, 但因用量逐年增加, 仍旧存在安全风险。因此国内外仍然对其在食品中的残留进行了监控并制定了严格的限量标准, 造成我国农产品出口壁垒, 影响我国的出口经济形势。

[0003] 当前, 该类杀菌剂常用的气相、液相等仪器检测方法灵敏度高、准确性好、检查范围广, 且已有较为成熟的检测标准, 但是所需仪器昂贵、样品前处理时间较长, 不适于现场监测。

[0004] 免疫检测方法 (immunoassay, IA) 也具有灵敏度高、特异性强的特点, 并且可以克服繁杂的前处理步骤, 广泛运用于现场检测, 是目前食品安全快速检测的重要方法之一, 在食品安全检测中发挥着越来越重要的作用。

[0005] 因此有必要开发一种免疫技术用于检测肟基乙酸酯类的甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂。本发明主要选取醚菌酯和肟菌酯为代表, 进行 ELISA 方法的建立。

[0006] 脲基乙酸酯类杀菌剂的毒杀基为甲氧亚胺基乙酸甲酯, 而 (E)-2-(2-溴甲基苯基)-2-甲氧亚氨基乙酸甲酯 (OEBr) 是一种常见的农药中间体 (图 1, 分子量 < 1000), 结构中包含肟基乙酸酯类杀菌剂的活性官能团, 因此将其作为半抗原合成原料之一与巯基丙酸 (图 2) 合成肟基乙酸酯类杀菌剂的人工半抗原 (AR)。该半抗原仍是一种小分子物质, 没有免疫原性, 需与大分子载体 (蛋白) 等偶联得到人工抗原后, 才可以作为动物免疫原料, 制备多克隆抗体。

[0007] 本发明根据以合成的与肟基乙酸酯类杀菌剂的化学结构类似的人工半抗原 (OESCH₂CH₂COOH) 与牛血清蛋白和卵清蛋白进行偶联, 分别制得免疫原和包被原。

发明内容

[0008] 本发明需要解决的第一个技术问题在于提供一种肟基乙酸酯类杀菌剂的人工抗原的合成方法及测定方法。

[0009] 1. 技术方案

[0010] (1) 人工半抗原合成

[0011] 在 50mL 三口瓶中, 加入 5mL 1equiv 的巯基丙酸乙醇溶液, 然后加入 2equiv 的 NaOH, 放在有加热功能的磁力搅拌器中搅拌反应, 直至溶解。加入 1equiv 的 OEBr 乙醇溶液, 加热回流反应 1.5h 后抽滤得到透明溶液, 旋转蒸发除去有机溶剂。然后用 5mL 5% NaHCO₃ 溶液溶解残留物并转移到分液漏斗中, 用正己烷萃取 2 次, 每次 5mL, 弃去有机相。然后用浓盐酸调水相 pH 至 3 左右, 和二氯甲烷进行液液分配, 反复 3 次, 收集有机相。有机相过无水

Na₂SO₄, 减压浓缩近干, 得黄色油状物。

[0012] (2) 人工抗原的合成

[0013] a. 免疫原(活化酯法): 将半抗原 0.1mmol 和 NHS 0.1mmol 用 1.0mL DMF 溶解。磁力搅拌下, 向上述溶液中逐滴加入 1.0mL 的 0.1mmol DCC 的 DMF 溶液, 室温搅拌反应 1h, 4℃ 冰箱中搅拌过夜。次日, 离心取上清液, 在搅拌状态下, 将上清液逐滴加入到 6.0mL, 60mg BSA 的 pH 8.0 硼酸缓冲液中, 约半小时加完, 室温磁力搅拌反应 1h, 4℃ 搅拌反应过夜, 次日取出, 溶液转入透析袋中, 悬于大烧杯中, 4℃, pH 7.4 的 PBS 缓冲液透析 3 天, 每 4h 换水一次。冻干保存。

[0014] b. 包被原(混合酸酐法): 称取 150mg OVA 溶于 10mL 的硼酸缓冲液中, 80 μmol 的半抗原溶解在 1mL 的 DMF 中, 然后在该溶液中加入等当量的三正丁胺和氯甲酸异丁酯, 室温反应 1h, 反应液 500 μL 加入到 8mL 的 15mg/mL 的 OVA 硼酸缓冲液中, 磁力搅拌, 反应 2h。反应完成后, 转入透析袋, 先用蒸馏水透析 1 次, 再换 pH 7.4 的 PBS 透析, 整个透析过程持续三天, 每 4 小时换透析液一次。冻干保存。

[0015] (3) 本发明同时对所制备的人工半抗原及抗原的鉴定方法进行了公开说明, 方法包括 TNBS 显色法、红外光谱法、紫外光谱法、SDS-PAGE, 具体包括下列步骤:

[0016] 1) 人工半抗原的鉴定: 称取合成的半抗原的样品, 适当稀释成合适的检测浓度, 进行 TLC(图 3)、紫外(图 4)、红外图谱扫描(图 5)、质谱(图 6) 和核磁(图 7)。读取半抗原的波峰与波谷的位置并分析半抗原的官能团的红外吸收情况、分子量及各官能团的原子组成。

[0017] 2) 人工免疫原和包被原的鉴定: 将 BSA 用蒸馏水配制成浓度为 0、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0mg/mL 的溶液, 取 1mL 加入到 1mL pH 10 的碳酸盐缓比色。根据吸光值和蛋白质浓度作出标准曲线。斜率即 BSA 单位浓度的吸光值。

[0018] 将制备的半抗原用蒸馏水配制成浓度为 0、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0mg/mL 的溶液, 其余步骤同上, 作出曲线, 曲线斜率即为样品单位浓度的吸光值。

$$\text{氨基消耗率} = (\text{OD}_{\text{蛋白单位浓度}} - \text{OD}_{\text{样品单位浓度}}) / \text{OD}_{\text{蛋白单位浓度}}$$

[0019] b. AR 与载体蛋白克分子结合比 = AR 氨基消耗率 × 每分子载体蛋白氨基个数载体蛋白的游离氨基大部分来自赖氨酸, 每分子 BSA 和 OVA 赖氨酸个数以 56 和 20 计。

[0020] 同时, 将制备的抗原进行紫外(图 4)、红外(图 8)、SDS-PAGE(图 9), 须保证所含的 BSA 的浓度在同一水平, 分析结构与分子量。

[0021] 本方法合成的目的半抗原保留了肟基乙酸酯类杀菌剂毒杀基的化学结构, 有利于后续的免疫分析的特异性, 合成过程简便, 适合大量生产。

[0022] 本方法合成的目的人工免疫原和包被原符合免疫要求, 操作易实现, 可以商品化。

[0023] (4) 在此基础上, 本发明的第二项技术问题是用制备的免疫原免疫动物, 得到针对肟基乙酸酯类杀菌剂的多克隆抗体, 对该抗体的进行鉴定并建立以酰菌酯和肟菌酯为代表的肟基乙酸酯类杀菌剂的 ELISA 检测方法。

[0024] 制备高效价和高特异性的多克隆抗体首先要有理想的免疫原, 合适的动物及可行的免疫方法。目前, 国内关于肟基乙酸酯类杀菌剂的免疫分析技术少见报道, 尚无快速检测方法的建立。本发明建立的肟基乙酸酯类杀菌剂 ELISA 检测技术, 灵敏度和特异性较好, 费用低, 仪器化要求低, 前处理简便, 有可观的经济效益。

[0026] 多克隆抗体制备的具体技术方案如下：

[0027] 1) 实验动物：雄性新西兰大白兔，体重约 2.5kg；

[0028] 2) 免疫及采血：首免前 7 天，耳缘静脉取血，分离阴性血清。首次免疫，将免疫原 (2mg/mL) 与等体积的 FCA 进行混合，充分乳化，形成油包水的状态，背部皮下 6 点，后腿肌肉 2 点免疫；间隔两周，二次免疫，免疫原 (1mg/mL) 与等体积的 FIA 制备疫苗，背部皮下 6 点，后腿肌肉 2 点免疫；从第三次免疫开始直到第七次，免疫原 (1mg/mL) 与等体积的 FIA 制备疫苗，背部皮下 6 点，后腿肌肉 2 点免疫，以两周为间隔期，进行耳缘采血，分离血清，测效价；末免，此时效价达到一定水平 ($3.2 \times 10^4 \sim 6.4 \times 10^4$)，将佐剂用生理盐水替代，耳缘静脉注射，一周后，动脉取血，分离血清。

[0029] 酶联免疫检测效价的具体步骤为：

[0030] 1) 包被原包板：将 Hapten-OVA 用包被液稀释至适当浓度，每孔 100 μL 加入 96 孔酶标板，盖上保鲜膜，37℃孵育 2h；

[0031] 2) 清洗酶标板：迅速倒去孔中液体，用 PBST 洗涤 2 遍，每次洗 3min；

[0032] 3) 封闭：每孔加入 200 μL 封闭液，置于 37℃恒温培养箱封闭 2h；接着用 PBST 洗涤 3 遍后拍干；

[0033] 4) 加入抗血清：按 1 : $10^3 \sim 1 : 128 \times 10^3$ 梯度稀释抗血清，加入酶标反应孔中，每样至少重复一次，每孔加 100 μL，37℃孵育半小时，倒空，洗涤 3 遍，每遍 3 分钟，拍干。

[0034] 5) 加二抗：将 HRP 酶标山羊抗兔 IgG 稀释 1000 倍，每孔加 50 μL 37℃，30–60min，倒净，洗板 3 次，每次 3 分钟，拍干；

[0035] 6) 加入 TMB 显色剂显色：每孔 100 μL，置 37℃避光放置 10–15min。

[0036] 7) 终止反应：每孔加入 100 μL 终止液结束反应，应在 20min 内测定结果。

[0037] 8) 酶标仪检测：TMB 反应后酶标仪 450nm 波长读取 OD₄₅₀。设空白及阴性对照，分别为 PBS 溶液和免疫前采集的阴性兔血清。

[0038] (5) 本发明的第三项技术问题是建立一种所述的肟基乙酸酯类杀菌剂免疫检测方法的应用，该方法应用于柑橘中醚菌酯和肟菌酯的检测，利用效价最高 (64000) 的抗体进行方阵滴定，选择 OD₄₅₀ ≈ 1 的抗原、抗体浓度作为最佳工作浓度，即抗原浓度为 10 μg/mL，抗体稀释 2000 倍。

[0039] 具体步骤为：

[0040] 1) 包被原包板：将 Hapten-OVA 用包被液稀释至适当浓度，每孔 100 μL 加入 96 孔酶标板，盖上保鲜膜，37℃孵育 2h；

[0041] 2) 清洗酶标板：迅速倒去孔中液体，用 PBST 洗涤 2 遍，每次洗 3min；

[0042] 3) 封闭：每孔加入 200 μL 封闭液，置于 37℃恒温培养箱封闭 2h；接着用 PBST 洗涤 3 遍后拍干；

[0043] 4) 加入抗体：用样品稀释液以体积比 1 : 2000 稀释抗体后，与标准品（或样品）1 : 1 预混过夜，每孔加 100 μL，37℃孵育半小时后洗涤 (PBST) 3–4 次。

[0044] 5) 加二抗：将 HRP 酶标山羊抗兔 IgG 稀释 1000 倍，每孔加 50 μL 37℃，30–60min，倒净，洗板 3 次，每次 3 分钟，拍干；

[0045] 6) 加入 TMB 显色剂显色：每孔 100 μL，置 37℃避光放置 10–15min。

[0046] 7) 终止反应：每孔加入 100 μL 终止液结束反应，应在 20min 内测定结果。

[0047] 8) 酶标仪检测 :TMB 反应后酶标仪 450nm 波长读取 OD₄₅₀。设空白及阴性对照, 分别为 PBS 溶液和免疫前采集的阴性兔血清。

[0048] 9) 用含 10% 甲醇的 PBST 缓冲液配置浓度为 200, 20, 2, 0.2, 0.02, 0.002 μg/mL Hapten、醚菌酯、肟菌酯标准溶液。用 IC-ELISA 方法检测灵敏性, 计算三者的抑制中浓度 IC₅₀ 及方法最低检测限 IC₁₀。

[0049] 10) 采用与肟基乙酸酯类杀菌剂相似的唑菌铵酯, 按建立的检测方法进行交叉反应。用含 10% 甲醇的 PBST 缓冲液配置浓度为 200, 20, 2, 0.2, 0.02, 0.002 μg/mL 的唑菌铵酯溶液, 用 IC-ELISA 方法检测特异性, 计算 IC₅₀ 和交叉反应率 CR = [IC₅₀(Hapten)/IC₅₀(唑菌铵酯)]。

[0050] 11) 橘肉样品打浆, 称取 10.0g, 分别添加不同浓度醚菌酯和肟菌酯标准液后旋窝混匀, 4℃静置半小时, 使药物与样品充分接触。后取出, 8000rpm 冷冻离心, 取上清液。采用上述建立的 IC-ELISA 检测方法, 测定回收率和 RSD%。

[0051] 2. 效益结果

[0052] 以上灵敏性和特异性实验方法显示, 半抗原的 IC₅₀ 为 9.5 μg/mL, IC₁₀ 为 0.005 μg/mL; 抗体对醚菌酯和肟菌酯有较好的特异性和灵敏性, IC₅₀ 分别为 15.3, 19.6 μg/mL, IC₁₀ 分别为 0.0074, 0.011 μg/mL; 但对唑菌铵酯的交叉反应率小于 0.1%。该方法具有良好的特异性和灵敏度。

[0053] 采用建立的 IC-ELISA 检测柑橘样品中醚菌酯和肟菌酯, 检测结果表明当加标浓度为 100, 10, 1 μg/mL 时, 醚菌酯回收率分别为 104.35%, 95.57%, 82.73%, RSD% 分别为 11.1%, 10.8%, 8.8%; 脲菌酯回收率分别为 92.43%, 91.75%, 91.10%, RSD% 分别为 7.4%, 10.2%, 10.9% 此方法符合杀菌剂痕量分析的要求。

具体实施方式

[0054] 1. 仪器

[0055]

集热式磁力加热搅拌器	DF-II	深圳金怡
旋转蒸发仪	RE-52A	山海亚荣
凝胶成像分析系统	CBIO-GelPro	北京赛百奥
紫外可见分光光谱仪	T6 新世纪	北京普析通用有限公司
红外可见分光光谱仪	T6 新世纪	北京普析通用有限公司
超纯水系统	Millipore	美国 Thermo Scientific 公司垂直电泳系统
全自动灭菌锅	Thermo	美国 Thermo Scientific 公司
超净工作台	SW-CJ-1G	海乔跃电子有限公司
酶标仪	MK3	美国 Thermo Scientific 公司
超速冷冻离心机	DL-5M	湖南星科科技科学仪器有限公司
电子天平	AL04	梅特勒-托利多有限公

[0056] 2. 试剂

[0057] 牛血清白蛋白 (BSA)、卵清白蛋白 (OVA) 购自 sigma 公司; N- 羟基丁二酰亚胺

(NHS)、R250 考马斯亮蓝、N, N' - 二环己基碳二亚胺 (DCC)、三正丁胺、氯甲酸异丁酯、无水乙醇、二氯甲烷、甲醇、DMF、硼酸、硼砂、氢氧化钠、碳酸氢钠购自杭州米克化工;Tris-base、丙烯酰胺、N, N' - 亚甲双丙烯酰胺、过硫酸胺 (AP)、N, N, N', N' - 四甲基乙二胺 (TEMED)、DTT、甘氨酸、购自杭州兰堡生物公司。弗氏完全佐剂 (FCA) 和弗氏不完全佐剂 (FIA) 购自 sigma 公司。Goat Anti-rabbit IgG/HRP 由上海博耀生物有限公司提供。TMB 单组份显色液, 氮代 DMSO 购自阿拉丁试剂公司。

[0058] 实施例 1 脯基乙酸酯类杀菌剂半抗原的合成

[0059] 按以下半抗原的合成反应途径按图 11 进行。具体步骤如下: 在 50mL 三口瓶中, 加入 5mL equiv 的巯基丙酸乙醇溶液, 然后加入 2equiv 的 NaOH, 放在有加热功能的磁力搅拌器中搅拌反应, 直至溶解。加入 1equiv 的 OEBr 乙醇溶液, 加热回流反应 1.5h 后抽滤得到透明溶液, 旋转蒸发除去有机溶剂。然后用 5mL 5% NaHCO₃ 溶液溶解残留物并转移到分液漏斗中, 用正己烷萃取 2 次, 每次 5mL, 弃去有机相。然后用浓盐酸调水相 pH 至 3 左右, 和二氯甲烷进行液液分配, 反复 3 次, 收集有机相。有机相过无水 Na₂SO₄, 减压浓缩近干, 得黄色油状物。

[0060] 实施例 2 脯基乙酸酯类杀菌剂人工抗原的合成

[0061] 1. 免疫原合成的反应途径

[0062] 按图 12 免疫原合成的反应途径进行。具体步骤为: 将半抗原 0.1mmol 和 NHS 0.1mmol 用 1.0mL DMF 溶解。磁力搅拌下, 向上述溶液中逐滴加入 1.0mL 的 0.1mmol DCC 的 DMF 溶液, 室温搅拌反应 1h, 4℃ 冰箱中搅拌过夜。次日, 离心取上清液, 在搅拌状态下, 将上清液逐滴加入到 6.0mL, 60mg BSA 的 pH8.0 硼酸缓冲液中, 约半小时加完, 室温磁力搅拌反应 1h, 4℃ 搅拌反应过夜, 次日取出, 溶液转入透析袋中, 悬于大烧杯中, 4℃, pH7.4 的 PBS 缓冲液透析 3 天, 每 4h 换水一次。冻干保存。

[0063] 2. 包被原合成的反应途径

[0064] 按图 13 包被原合成的反应途径进行。具体步骤为: 称取 150mg OVA 溶于 10mL 的硼酸缓冲液中, 80 μmol 的半抗原溶解在 1mL 的 DMF 中, 然后在该溶液中加入等当量的三正丁胺和氯甲酸异丁酯, 室温反应 1h, 反应液 500 μL 加入到 8mL 的 15mg/mL 的 OVA 硼酸缓冲液中, 磁力搅拌, 反应 2h。反应完成后, 转入透析袋, 先用蒸馏水透析 1 次, 再换 pH7.4 的 PBS 透析, 整个透析过程持续三天, 每 4 小时换透析液一次。冻干保存。

[0065] 实施例 3 抗原的测定

[0066] 将获得的黄色油状物用甲醇溶解, 进行质谱检测; 用氮代 DMSO 溶解进行核磁检测; 用纯水溶解进行紫外吸收扫描; 用 KBr 压片法进行红外光谱检测。

[0067] 半抗原在 2000cm⁻¹ 以下有明显的吸收, 羧酸中的 O-H 伸缩的范围在 1720–1706cm⁻¹, 图中出现此吸收范围的羧基特征峰, 证明结构中含 COOH-; 在 1750cm⁻¹ 处可看见有一不明显的吸收峰为 C=O 的吸收峰, 这是因为羧基与苯环共轭降低吸收频率。在 1600 ~ 1450cm⁻¹ 有明显的一组吸收峰, 推断是半抗原中应有的苯环骨架振动峰及其 C=N 双键的振动峰, 在 1250cm⁻¹ 处有 -SCH₂- 中的 -CH₂- 的非平面摇摆振动吸收峰。由此证明化合物含目标物所有的特征吸收峰, 半抗原在紫外全波段处未见明显的波峰与波谷。质谱核磁测分子量及结构均符合预期结果, 初步推断半抗原合成成功。

[0068] 实施例 4 偶联物的测定

[0069] 对偶联产物进行光谱扫描与电泳检测。BSA 和 OVA 在 230–240nm 处有明显的波谷，而半抗原没有，同时 Hapten-BSA 和 Hapten-OVA 此处的波谷明显被掩盖一部分，说明 BSA 和 OVA 已被半抗原修饰且仍保留着蛋白原来的性质。偶联物的电泳条带较蛋白来说相对滞后，说明半抗原与蛋白进行了偶联。

[0070] 同时测定具体的结合比。采用 2,4,6- 三硝基苯磺酸 (TNBS) 比色法。将 BSA 用蒸馏水配制成浓度为 0、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0mg/mL 的溶液，取 1mL 加入到 1mL pH10 的碳酸盐缓冲液。根据吸光值和蛋白质浓度作出标准曲线。斜率即 BSA 单位浓度的吸光值。

[0071] 将样品用蒸馏水配制成浓度为 0、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0mg/mL 的溶液，其余步骤同上，作出曲线，曲线斜率即为样品单位浓度的吸光值。

[0072] a. 氨基消耗率 = $(OD_{\text{蛋白单位浓度}} - OD_{\text{样品单位浓度}}) / OD_{\text{蛋白单位浓度}}$

[0073] b. AR 与载体蛋白克分子结合比 = AR 氨基消耗率 × 每分子载体蛋白氨基个数载体蛋白的游离氨基大部分来自赖氨酸，每分子 BSA 和 OVA 赖氨酸个数以 56 和 20 计。

[0074] 按所述的结合比的方法得到结合比测定标准曲线：(BSA) $y = 1.646x - 0.1542$, $R^2 = 0.9976$ 。(OVA) $y = 1.712x - 0.1431$, $R^2 = 0.9916$ 。因此，BSA 和 OVA 单位浓度的吸光值分别为 1.646, 1.712。免疫原样品测定结合比曲线： $y = 1.269x - 0.3082$, $R^2 = 0.9568$ 。因此，样品单位浓度的吸光值为 1.269。经计算： $[(1.646 - 1.269) / 1.646] \times 56 \approx 12.8$ 。过多的半抗原可能不利于载体与淋巴细胞表面结合，不能使载体引起免疫反应。以 BSA 为例，每个分子上连接 5 ~ 20 个半抗原为宜。因此本次实验结合比为 12.8 在范围之内，偶联效果良好。而作为包被原其结合比曲线为 $y = 0.954x - 0.2132$, $R^2 = 0.9778$ 。因此，样品单位浓度的吸光值为 1.344。经计算： $[(1.712 - 0.954) / 1.712] \times 20 \approx 8.8$ 。

[0075] 由此确定，半抗原与 BSA 和 OVA 均偶联成功，且符合免疫分析技术所要的条件。

[0076] 实施例 5 多克隆抗体的制备

[0077] 采用人工合成的免疫原与 Freund adjuvant 充分乳化制成疫苗，免疫新西兰大白兔，通过测定效价，获得敏感性较高的多克隆抗体。

[0078] 1. 免疫过程

[0079] 首免前 7 天，耳缘静脉取血，分离阴性血清。首次免疫，将免疫原 (2mg/mL) 与等体积的 FCA 进行混合，充分乳化，形成油包水的状态，背部皮下 6 点，后腿肌肉 2 点免疫；间隔两周，二次免疫，免疫原 (1mg/mL) 与等体积的 FIA 制备疫苗，背部皮下 6 点，后腿肌肉 2 点免疫；从第三次免疫开始直到第七次，免疫原 (1mg/mL) 与等体积的 FIA 制备疫苗，背部皮下 6 点，后腿肌肉 2 点免疫，以两周为间隔期，进行耳缘采血，分离血清，测效价；末免，此时效价达到一定水平 ($3.2 \times 10^4 \sim 6.4 \times 10^4$)，将佐剂用生理盐水替代，耳缘静脉注射，一周后，动脉取血，分离血清。

[0080] 2. 所需试剂的配制方法

[0081] 如图 14

[0082] 3. ELISA 反应原理

[0083] 1) 加抗原：包被原用包被液稀释至 $10 \mu \text{g/mL}$ ，每孔 $100 \mu \text{L}$ 加入 96 孔酶标板，盖上保鲜膜 37°C 孵育 2h，按常规方法封闭洗涤；

[0084] 2) 加抗体：用样品稀释液以体积比 1 : 2000 稀释抗体后，与标准品（或样品）1 : 1 预混过夜，每孔加 $100 \mu \text{L}$, 37°C 孵育半小时后洗涤 (PBST) 3-4 次。

[0085] 3) 加二抗 : 将 HRP 酶标山羊抗兔 IgG 稀释 1000 倍, 每孔加 50 μ L, 37°C, 30–60min, 倒净, 洗板 3 次, 每次 3 分钟, 拍干;

[0086] 4) 加入 TMB 显色剂显色 : 每孔 100 μ L, 置 37°C 避光放置 10–15min;

[0087] 5) 终止反应 : 每孔加入 100 μ L 终止液结束反应, 应在 20min 内测定结果;

[0088] 6) 酶标仪检测 : TMB 反应后酶标仪 450nm 波长读取 OD₄₅₀; 设空白及阴性对照, 分别为 PBS 溶液和免疫前采集的阴性兔血清。

[0089] 4. IC-ELISA 方法特异性检测

[0090] 特异性检测用于测定醚菌酯、肟菌酯与抗体的反应能力。采用最佳工作浓度的抗原和抗体的条件。采用同为 Strobilurin 类杀菌剂的唑菌铵酯, 按建立的检测方法进行交叉反应。用含 10% 甲醇的 PBST 缓冲液配置浓度为 200, 20, 2, 0.2, 0.02, 0.002 μ g/mL 的唑菌铵酯溶液, 用 IC-ELISA 方法检测特异性, 计算 IC₅₀ 和交叉反应率 CR = [IC₅₀(Hapten) / IC₅₀(唑菌铵酯)]。

[0091] 5. IC-ELISA 方法灵敏性检测

[0092] 用含 10 % 甲醇的 PBST 缓冲液配置浓度为 200, 20, 2, 0.2, 0.02, 0.002 μ g/mL Hapten、醚菌酯、肟菌酯标准溶液。用 IC-ELISA 方法检测灵敏性, 计算三者的抑制中浓度 IC₅₀ 及方法最低检测限 IC₁₀, 结果如图 15。

[0093] 唑菌铵酯 (Pyraclostrobin) 的交叉反应率 CR = IC₅₀(Hapten) / IC₅₀(Pyraclostrobin) < 0.1%。因其结构中不含甲氧亚氨基乙酸甲酯, 所以加入系列浓度后与抗体不产生竞争反应。多克隆抗体特异性较好, 对含有半抗原结构的肟基乙酸酯类 (醚菌酯、肟菌酯等) 杀菌剂具有较好的亲和力, 对不含该结构的杀菌剂不能有效识别。

[0094] 6. 样品检测及回收率

[0095] 橘肉样品打浆, 称取 10.0g, 分别添加不同浓度醚菌酯和肟菌酯标准液后旋窝混匀, 4°C 静置半小时, 使药物与样品充分接触。后取出, 8000rpm 冷冻离心, 取上清液。采用上述建立的 IC-ELISA 检测方法, 测定回收率和 RSD%。结果见图 16, 基本符合痕量检测要求。

[0096] 说明书附图

[0097] 图 1 为半抗原合成原料 OEBr

[0098] 图 2 为半抗原合成原料 2-巯基丙酸

[0099] 图 3 为半抗原合成 TLC 结果 1. 巯基丙酸 2. OEBr 3. 反应液

[0100] 图 4 为人工抗原紫外全波段扫描图

[0101] 图 5 为半抗原红外扫描图

[0102] 图 6 为半抗原质谱

[0103] 图 7 为半抗原核磁氢谱

[0104] 图 8 为半抗原-BSA(上) 和半抗原-OVA(下) 红外扫描图

[0105] 图 9 为人工抗原的蛋白电泳图

[0106] 图 10 为醚菌酯(左) 和肟菌酯(右)

[0107] 图 11 半抗原合成的反应途径

[0108] 图 12 免疫原合成的反应途径

[0109] 图 13 包被原合成的反应途径

[0110] 图 14 所需试剂的配制方法

[0111] 图 15 抗体对不同抗原的交叉反应

[0112] 图 16 加标回收率和精密度结果

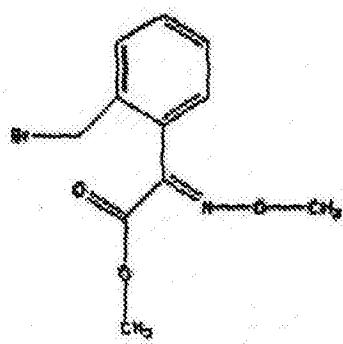


图 1

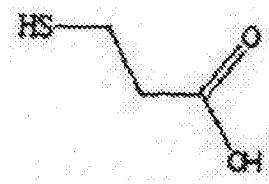


图 2

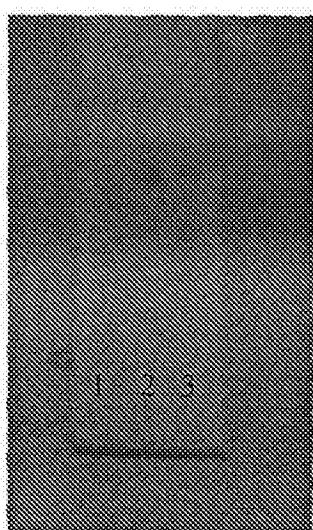


图 3

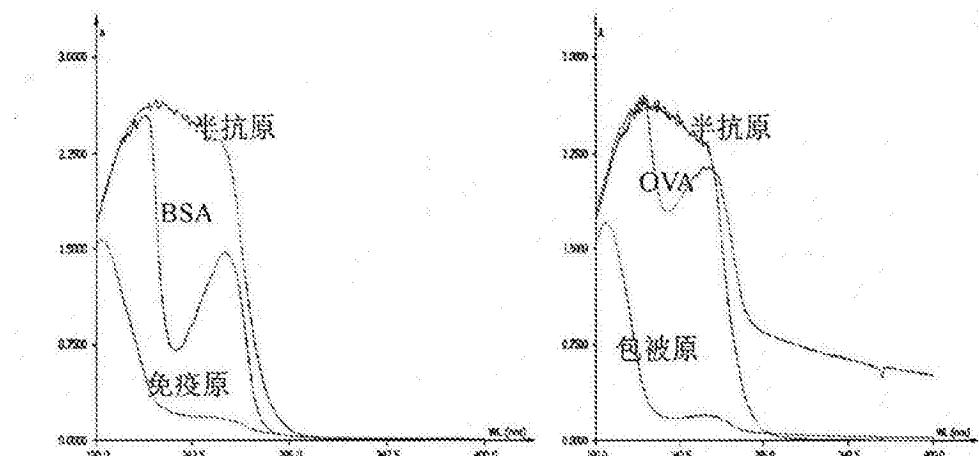


图 4

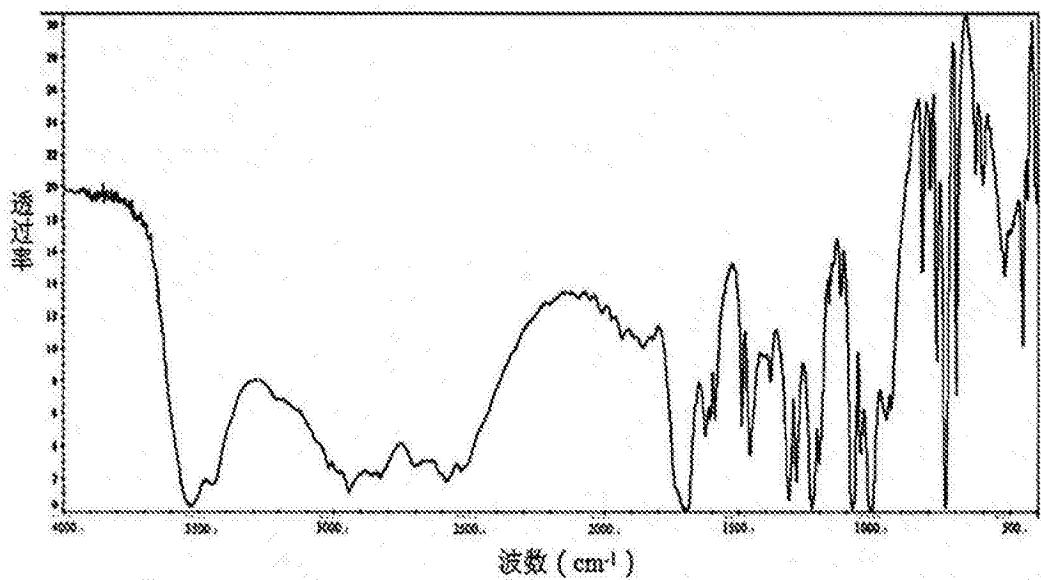


图 5

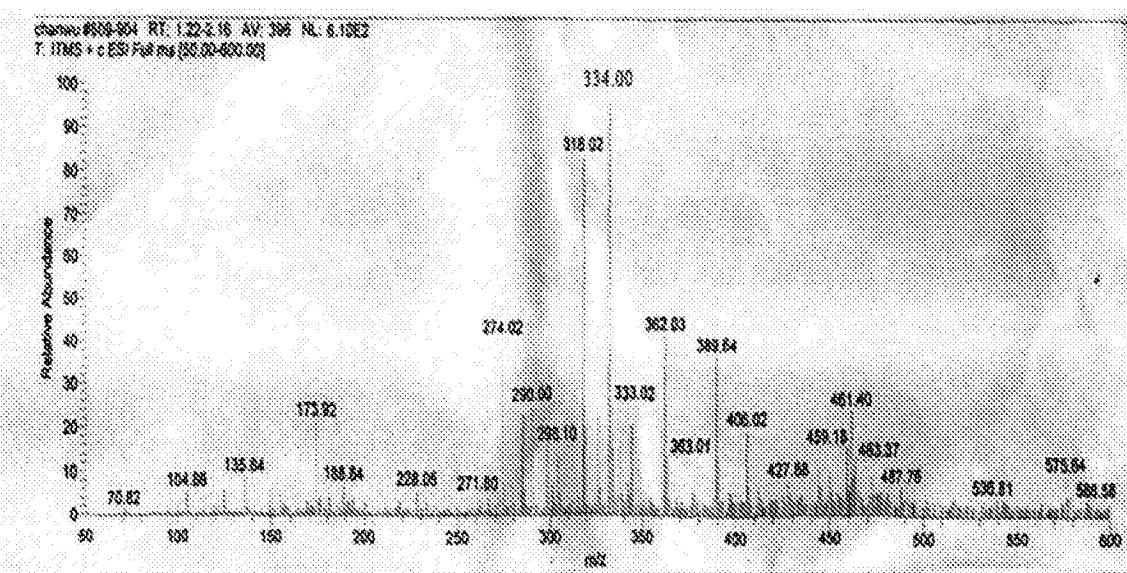


图 6

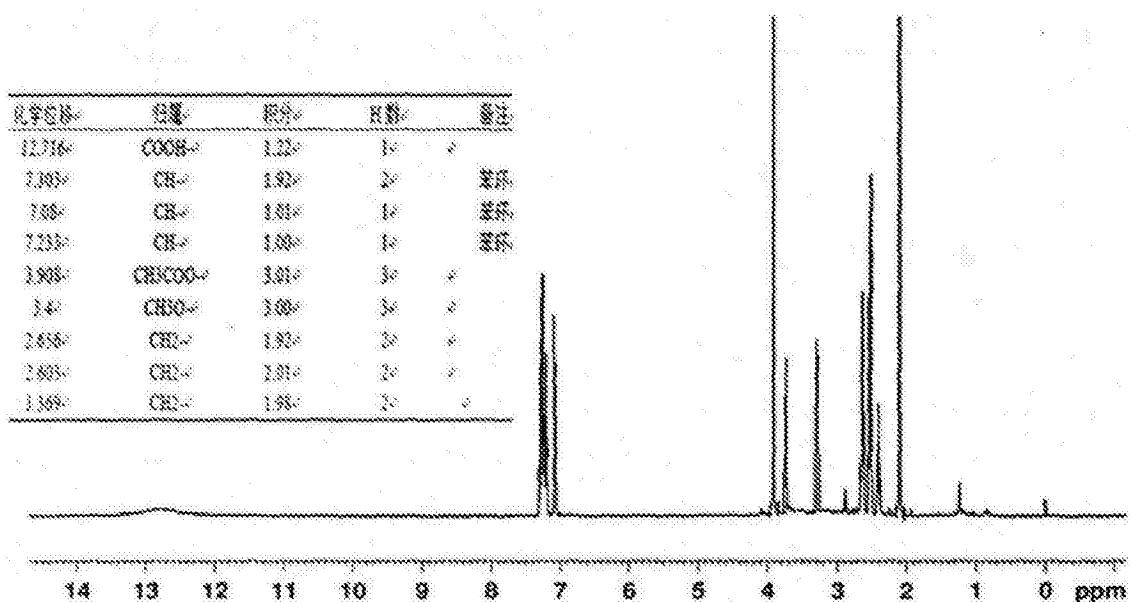


图 7

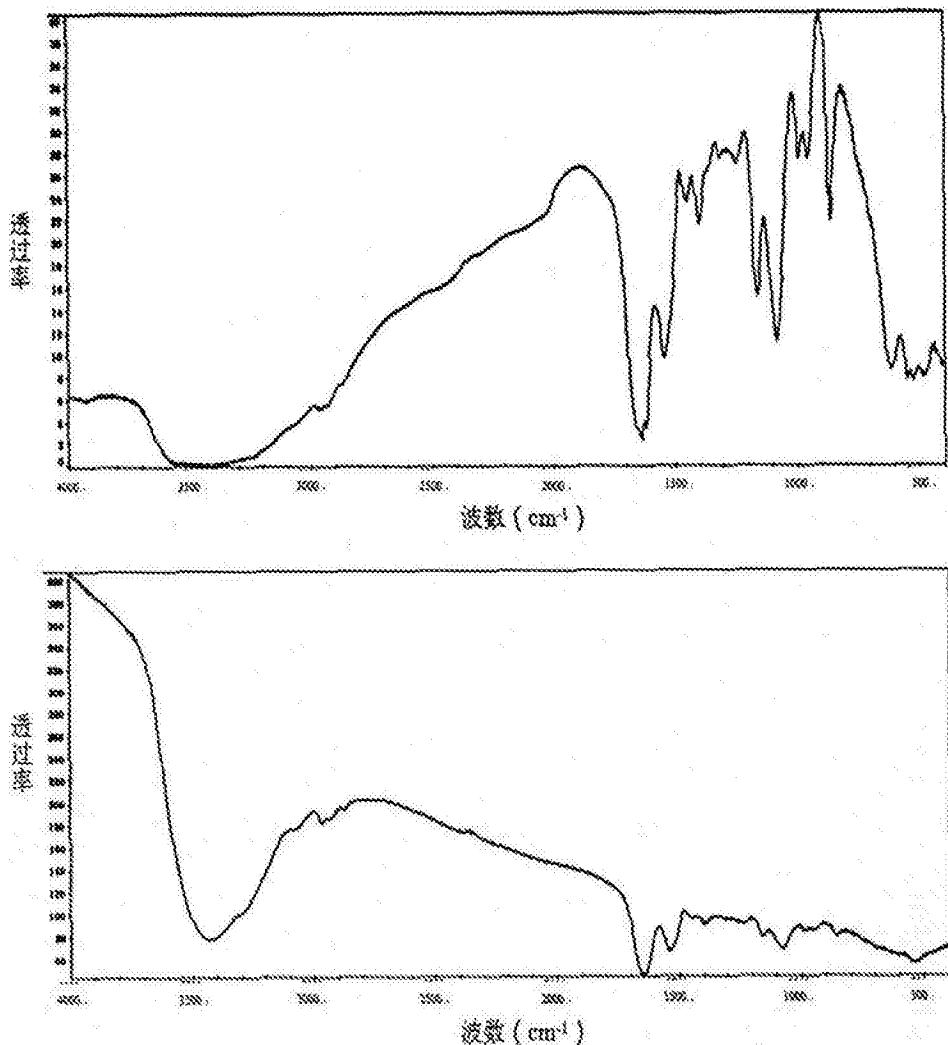
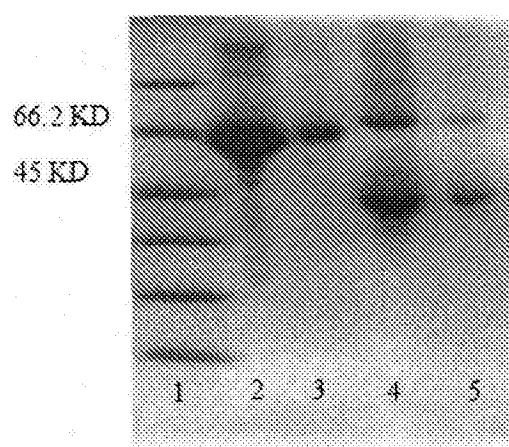


图 8



注：1.Maker,2. BSA,3. BSA-Hapten,4. OVA,5. OVA-Hapten.

图 9

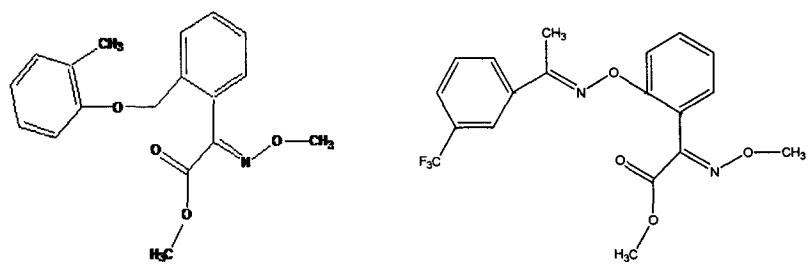


图 10

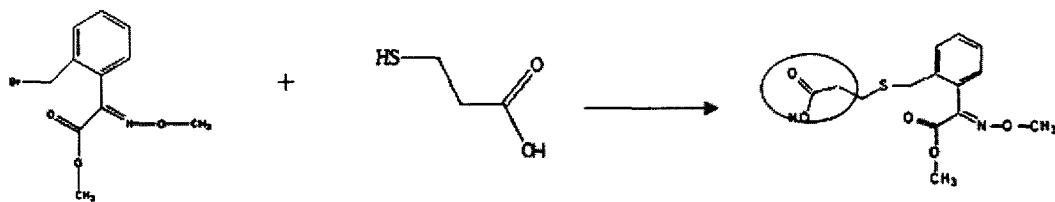


图 11

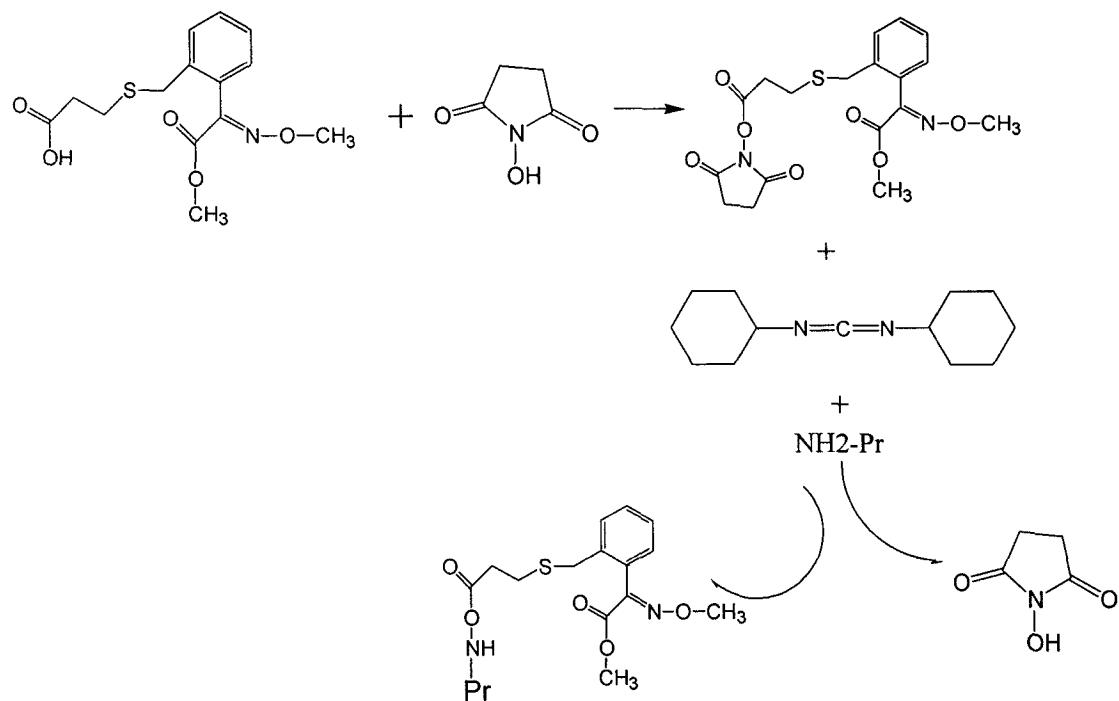


图 12

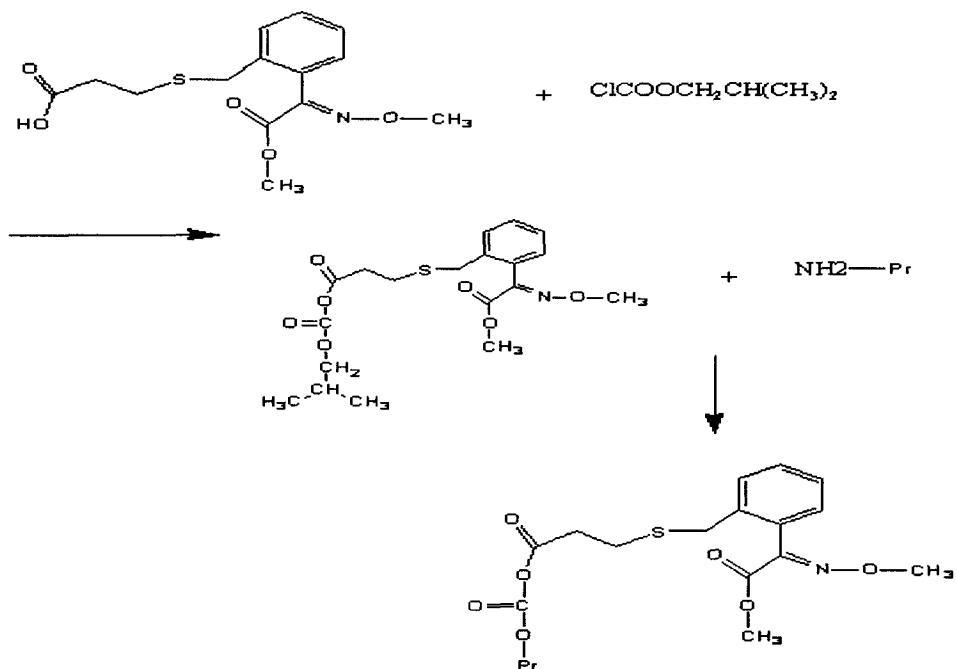


图 13

试剂	配制方法
磷酸盐缓冲液(PBS)， pH7.4	0.2 gKCl, 0.24 gKH ₂ PO ₄ , 3.628 gNa ₂ HPO ₄ ·H ₂ O, 8 gNaCl 溶于 1000mL 超纯水中
碳酸盐缓冲液(CBS), pH9.6	1.59 gNa ₂ CO ₃ , 2.93 gNaHCO ₃ 蒸馏水加至 1000 mL
洗涤液 (PBST)	0.01mol/L, pH7.4, PBS-0.5% 吐温-20
封闭液	含 5% 脱脂奶的 0.01 mol/L, pH7.4 PBS
终止液	2mol/L 硫酸溶液
包被液	Na ₂ CO ₃ -NaHCO ₃ (PH9.6, 0.05M)
酶标抗体 (二抗)	HRP 酶标记羊抗兔 IgG 用 PBS 按 1:500-4000 稀释
显色剂	TMB 单组份显色液

图 14

名称	结构	IC ₅₀ (μg/mL)	IC ₁₀ (μg/mL)
半抗原		9.5	0.005
醚菌酯		15.3	0.0074
肟菌酯		19.6	0.011
呻菌铵酯		-	-

“-”：未检出；IC₁₀：最小检测限；IC₅₀：半抑制浓度

图 15

杀菌剂	添加水平 (μg/mL)					
	100		10		1	
	回收率 %	RSD (%, n=3)	回收率 %	RSD (%, n=3)	回收率 %	RSD (%, n=3)
醚菌酯	104.35	11.1	95.57	10.8	82.73	8.8
肟菌酯	92.43	7.4	91.75	10.2	91.10	10.9

图 16

专利名称(译)	一种检测肟基乙酸酯类杀菌剂的ELISA方法		
公开(公告)号	CN105092833A	公开(公告)日	2015-11-25
申请号	CN201410200830.9	申请日	2014-05-12
[标]申请(专利权)人(译)	中国计量大学		
申请(专利权)人(译)	中国计量学院		
当前申请(专利权)人(译)	中国计量学院		
[标]发明人	戴贤君 朱洁 杨维		
发明人	戴贤君 朱洁 杨维		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/535		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种检测肟基乙酸酯类杀菌剂的ELISA方法，所述方法为利用(E)-2-(2-溴甲基苯基)-2-甲氧亚氨基乙酸甲酯(OEBr)合成半抗原(OESCH₂CH₂COOH)，并与牛血清蛋白(BSA)形成偶联物，免疫健康白兔得到多克隆抗体，此后以醚菌酯和肟菌酯(肟基乙酸酯类杀菌剂)为标准品，以OESCH₂CH₂COOH和卵清蛋白(OVA)的偶联物作为包被原，建立柑橘中肟基乙酸酯类杀菌剂的间接ELISA方法，为肟基乙酸酯类杀菌剂在柑橘中的残留检测提供了快速高效的检测手段，费用较低且重复性好。

集热式磁力加热搅拌器	DF-II	深圳金怡
旋转蒸发仪	RE-52A	山海亚荣
凝胶成像分析系统	CBIO-GelPro	北京赛百奥
紫外可见分光光谱仪	T6新世纪	北京普析通用有限公司
红外可见分光光谱仪	T6新世纪	北京普析通用有限公司
超纯水系统	Millipore	美国 Thermo Scientific 公司垂直电泳系统
全自动灭菌锅	Thermo	美国 Thermo Scientific 公司
超净工作台	SW-CJ-1G	海乔跃电子有限公司
酶标仪	MK3	美国 Thermo Scientific 公司
超速冷冻离心机	DL-5M	湖南星科科技科学仪器有限公司
电子天平	AL04	梅特勒-托利多有限公