



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110938116 A

(43)申请公布日 2020.03.31

(21)申请号 201910534366.X

(22)申请日 2019.06.18

(71)申请人 南京农业大学

地址 210095 江苏省南京市玄武区卫岗1号

(72)发明人 王鸣华 华修德 陈贺 丁园

杨倩 宗凌烽

(51)Int.Cl.

C07K 14/00(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

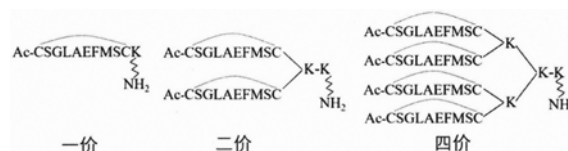
权利要求书1页 说明书5页 附图4页

### (54)发明名称

一种多价苯噻菌酯模拟表位多肽及其应用

### (57)摘要

本发明涉及一种多价苯噻菌酯模拟表位多肽及其应用,尤其是一种与苯噻菌酯单克隆抗体特异性结合的多价模拟表位多肽,以及所述多价多肽在免疫检测中的应用,属于生物技术领域。基于苯噻菌酯噬菌体展示多肽模拟表位的氨基酸序列,以赖氨酸为支架和间隔臂,固相合成获得多价模拟表位多肽;将多价多肽的氮端乙酰化,碳端的赖氨酸侧链提供唯一的游离氨基用于标记。这种多价模拟表位多肽与苯噻菌酯单克隆抗体的亲和力是单价模拟表位多肽的13.6倍,在均相免疫分析方法中可以显著降低检测方法的背景信号,提高检测分析方法的敏感性。该多价模拟表位多肽可作为化学合成半抗原的替代物,建立均相、一步的免疫检测方法,用于快速、灵敏、方便和经济的检测环境和农产品中残留的苯噻菌酯。



1. 一种与苯噻菌酯单克隆抗体特异性结合的多价模拟表位多肽, 其特征在于, 所述多价模拟表位多肽由多个苯噻菌酯模拟表位多肽组成。

2. 根据权利要求1所述具有与苯噻菌酯单克隆抗体特异性结合的多价模拟表位多肽, 其特征在于, 以赖氨酸为支架形成多价。

3. 根据权利要求1所述具有与苯噻菌酯单克隆抗体特异性结合的多价模拟表位多肽, 其特征在于, 由赖氨酸的侧链提供活性基团用于标记。

4. 权利要求1具有与苯噻菌酯单克隆抗体特异性结合的多价模拟表位多肽在检测苯噻菌酯中的应用。

## 一种多价苯噻菌酯模拟表位多肽及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种多价苯噻菌酯模拟表位多肽及其应用,尤其是一种与苯噻菌酯单克隆抗体特异性结合的多价模拟表位多肽,以及所述多价多肽在免疫检测中的应用,属于生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 噬菌体展示多肽技术可快速筛选到与抗体特异性结合的多肽,用于高敏感性免疫分析方法的开发,目前已在农药、毒素等检测对象中得到广泛应用。但噬菌体展示获得的活性多肽片段连接在噬菌体外壳蛋白上,造成整体粒径较大(880×6-7nm)、流动性差、并且存在污染其它生物试剂的风险。此外,噬菌体作为一种非常规试剂,不同批次间差异大、长期储存的稳定性差等问题导致其商业开发价值低。目前研究者已报道出两种有效途径来克服噬菌体的弊端:1) 化学合成多肽;2) 多肽与其他蛋白进行融合表达。化学合成多肽凭借标记简单、纯度高、可长期储存、易商品化等优点,被视为克服噬菌体颗粒缺陷的有效途径。

[0003] 噬菌体展示多肽技术是以多拷贝形式将多肽展示在噬菌体外壳蛋白上,如pIII展示为3至5个拷贝,pVIII展示为200个拷贝左右。基于噬菌体展示多肽模拟表位的氨基酸序列,固相合成制备的单价无噬菌体模拟表位多肽的亲合力常常较低,从而无法在免疫分析方法中应用,或建立的免疫分析方法的敏感性较低。因此,多肽模拟表位多肽的研制及应用具有重要的现实意义和重要的社会、经济价值。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是克服单价合成多肽模拟表位亲和力低的不足,提供一种与苯噻菌酯单克隆抗体特异性识别的多价模拟表位多肽,及其对环境或农产品中的苯噻菌酯进行免疫检测的用途。

[0005] 本发明提供了一种多价苯噻菌酯模拟表位多肽,其特征包括:基于苯噻菌酯噬菌体展示多肽模拟表位的氨基酸序列(CSGLAEFMSC),以赖氨酸为支架和间隔臂,固相合成获得多价模拟表位多肽;将多价多肽的氮端乙酰化,碳端的赖氨酸侧链提供唯一的游离氨基用于标记((Ac-CSGLAEFMSC)<sub>2</sub>K)<sub>2</sub>KK)。

[0006] 所述的苯噻菌酯多价模拟表位多肽在苯噻菌酯免疫检测中的应用。所述免疫检测方法为酶联免疫吸附分析方法、免疫层析分析方法或基于内滤效应的上转换荧光免疫分析方法。

[0007] 本发明具有以下有益效果:

[0008] (1) 新颖:与苯噻菌酯单克隆抗体特异性结合的多价模拟表位多肽为国内外首次报道;

[0009] (2) 亲和力强:多价模拟表位多肽与苯噻菌酯单克隆抗体的亲和力是单价模拟表位多肽的13.6倍;

[0010] (3) 实用:利用本发明提供的多价模拟表位多肽可作为化学合成半抗原的替代物,

用于建立免疫分析方法,更加环保;

[0011] (4)改善分析方法的特性:在均相免疫分析方法中可以显著降低检测方法的背景信号,提高检测分析方法的敏感性。

## 附图说明

[0012] 图1:多价苯噻菌酯模拟表位多肽示意图;

[0013] 图2:质谱检测及分子量比对;

[0014] 图中“A”表示一价苯噻菌酯模拟表位多肽质谱检测结果;“B”表示二价苯噻菌酯模拟表位多肽质谱检测结果;“C”表示四价苯噻菌酯模拟表位多肽质谱检测结果;图中“D”表示一价、二价和四价苯噻菌酯模拟表位多肽质核比(m/z)及质谱和ChemBioDraw软件计算的分子量;

[0015] 图3:等温滴定量热法测试结果;

[0016] 图中“A”表示一价苯噻菌酯模拟表位多肽与苯噻菌酯单克隆抗体亲和力拟合曲线;图中“B”表示二价苯噻菌酯模拟表位多肽与苯噻菌酯单克隆抗体亲和力拟合曲线;图中“C”表示四价苯噻菌酯模拟表位多肽与苯噻菌酯单克隆抗体亲和力拟合曲线;图中“D”表示一价、二价和四价苯噻菌酯模拟表位多肽与苯噻菌酯单克隆抗体亲和力曲线拟合结果及热力学参数;

[0017] 图4:不同价态多肽在相同免疫分析方法中的敏感性比较;

[0018] 图5:不同苯噻菌酯标准品溶液的荧光强度的变化及校正曲线。

## 具体实施方式

[0019] 以下结合附图详细描述本发明的技术方案。本发明实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围中。

[0020] 实施例1:多价模拟表位多肽的设计、合成与鉴定

[0021] 基于苯噻菌酯噬菌体展示多肽模拟表位的氨基酸序列(CSGLAEFMSC),以赖氨酸为支架和间隔臂,形成含有4个拷贝的苯噻菌酯模拟表位多肽;将多价多肽的氮端乙酰化,碳端额外增加一个赖氨酸,其侧链提供唯一的游离氨基用于标记(((Ac-CSGLAEFMSC)<sub>2</sub>K)<sub>2</sub>KK)(图1)。

[0022] 按照上述设计方案制备四价苯噻菌酯模拟表位多肽,并用质谱对其分子量进行检测(图2)。

[0023] 通过等温滴定量热法,采用多肽滴定抗体的策略对不同价态模拟表位多肽与抗体之间的亲和力进行评价。其中滴定液体积为150μL,一价、二价和四价多肽溶液的浓度分别为260μM、150μM、50μM,对应样品池中加入体积为400μL浓度分别为6.7μM、10μM和10μM的抗体溶液(硼酸缓冲液代替抗体溶液加入样品池最为阴性对照)。在动态矫正模式下,对热力学参数及亲和力进行分析。测得一价、二价和四价模拟表位多肽与苯噻菌酯当克隆抗体的结合力分别为 $3.72 \pm 0.61 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ 、 $6.94 \pm 2.51 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ 、 $5.06 \pm 2.5 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ 。四价模拟表位多肽相比一价亲和力提高了13.6倍(图3)。

[0024] 实施例2:多价模拟表位多肽在基于内滤效应的免疫分析中的应用

[0025] 上转换发光材料的制备与鉴定:准确称取63.3mg  $\text{Y}_2\text{O}_3$ 、276.6mg  $\text{Yb}_2\text{O}_3$ 、7.6mg  $\text{Er}_2\text{O}_3$ 和60mL浓硝酸加入到平底烧瓶中,加热至澄清并干燥成粉末,溶解在6mL超纯水中(超声5min),加入2mL 0.7M的柠檬酸钠搅拌10min,逐滴加入1.08g溶解在24mL水中的NaF,将pH调至5.0之后搅拌2小时。放入高压反应釜205℃反应12h。取出后将溶液离心(4000rpm, 5min),沉淀物用水和乙醇各洗涤三次,60摄氏度烘干,室温储存备用。称取40mg上述合成材料重悬于120mL异丙醇中并超声分散30min。转移至35℃培养箱中孵育10min。在快速搅拌条件下加入5mL氨水和40mL超纯水。反应1小时后逐滴加入40mL含50μL TEOS的异丙醇,35℃混合液搅拌反应5h后滴加60mL含400μL APTES的异丙醇,继续反应1小时。离心后用超纯水和乙醇各洗涤三次,干燥后得到氨基功能化的UCNPs。用透射电子显微镜对上转化发光材料进行了表征,所得纳米颗粒呈规则球形,平均粒径为100nm。经X射线衍射鉴定所得晶型结构为高发光效率六角相。上转化发光材料氨基化前后的傅里叶红外光谱检测结果显示在1089 $\text{cm}^{-1}$ 处的强吸收峰是硅氧键的伸缩振动;3382 $\text{cm}^{-1}$ 和1633 $\text{cm}^{-1}$ 处出现羟基的伸缩振动和氨基的拉伸和弯曲振动吸收峰; $\text{CH}_2$ 基团的不对称和对称拉伸振动分布在2988 $\text{cm}^{-1}$ 和2890 $\text{cm}^{-1}$ ,这些特征吸收峰的变化表明上转换发光材料表层已成功氨基化。

[0026] 上转换发光材料探针的制备与鉴定:称取10mg氨基功能化的上转换发光材料重悬于2.5mL 0.01M BB中,超声分散30min。加入50mg硼氢化钠和0.64mL 25%戊二醛溶液,室温震荡1小时。4000rpm离心5min,沉淀物用0.01M BB洗涤3次后重悬于5mL BB中。加入40nmol多肽和50mg硼氢化钠,室温震荡1小时。未结合的位点用50mg Tris封闭1小时。重复上述离心洗涤过程除去未反应的多肽,离心、重悬后存放于4℃保存备用。当上转换发光材料与多肽偶联后,苯噻菌酯单克隆抗体可以与其表层多肽特异性结合。再用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体结合苯噻菌酯单克隆抗体,加入底物显色。与封闭的上转换发光材料相比,上转换发光材料探针的颜色由无色变为蓝色,表明多肽成功地结合在UCNPs表层且活性良好。

[0027] 金纳米花制备与鉴定:将100mL含1% $\text{HAuCl}_4$ 的超纯水加热至沸腾,然后在剧烈搅拌的条件下快速加入3mL 1%柠檬酸钠溶液。当溶液颜色由深蓝色变成酒红色,再持续加热搅拌5min。反应结束后自然冷却至室温作为金种子使用。在快速搅拌的条件下,将300μL 1%的 $\text{HAuCl}_4$ ,150μL的金种子,110μL的1%柠檬酸钠溶液,500μL的0.03M对苯二酚依次加入到50mL的超纯水中。室温下持续搅拌30min后得到金纳米花。用透射电子显微镜对金种子形态进行表征,结果显示所得单分散的球形纳米金平均直径约为19nm。场发射扫描电子显微镜鉴定金纳米花粒径约为105nm,且在表层具有许多光滑分枝状亚单元围绕在一个成核的中心区域,整体呈现花状。

[0028] 金纳米花探针制备与鉴定:用0.2M  $\text{K}_2\text{CO}_3$ 调节50mL金纳米花溶胶至pH=10.0,室温条件下加入125μg抗苯噻菌酯单克隆抗体震荡反应1小时。未结合的活性位点用10%的牛血清白蛋白(BSA)封闭1小时。3000g离心15min去除游离抗体,再用2.5mL 0.01M BB重悬沉淀,4℃保存供后续实验使用。当苯噻菌酯单克隆抗体成功吸附在金纳米花表层后,其等离子共振峰红移15nm,且表观Zeta电位从 $51.32 \pm 3.99\text{mV}$ 变化到 $-40.71 \pm 3.78\text{mV}$ 。

[0029] 将500μL检测样品、50μL上转换发光材料探针、60μL金纳米花探针加入到2mL离心管,用硼酸缓冲液定容至1mL。涡旋混匀后于37℃孵育1小时。用荧光分光光度计检测657nm处的荧光强度。根据荧光强度变化为纵坐标、苯噻菌酯标准溶液浓度的对数为横坐标建

立标准曲线和建立线性方程。一价、二价和四价模拟表位多肽在相同免疫分析方法中敏感度分别为 $65.6\text{ ng mL}^{-1}$ 、 $31.3\text{ ng mL}^{-1}$ 、 $11.4\text{ ng mL}^{-1}$  (图4)。

[0030] 实施例3:基于内滤效应的免疫分析对苯噻菌酯农药标准品的检测

[0031] 1. 苯噻菌酯农药标准品的配置

[0032] 用甲醇配制苯噻菌酯标准品母液( $1\text{ mg/mL}$ ),用含有5%甲醇的硼酸盐缓冲液将母液稀释成 $2000\text{ ng/mL}$ 至 $0.5\text{ ng/mL}$ 系列浓度用于免疫检测。

[0033] 2. 上转换发光材料探针与分析物竞争结合金纳米花探针

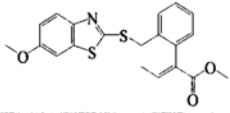
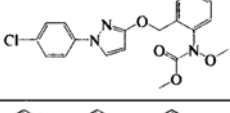
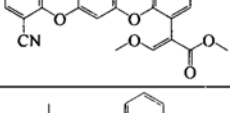
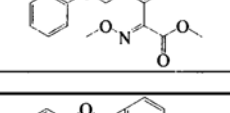
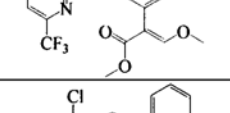
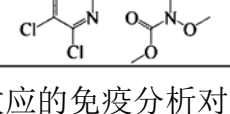
[0034] 将 $500\mu\text{L}$ 检测样品、 $50\mu\text{L}$ 上转换发光材料探针、 $60\mu\text{L}$ 金纳米花探针加入到 $2\text{ mL}$ 离心管,用硼酸缓冲液定容至 $1\text{ mL}$ 。涡旋混匀后于 $37^\circ\text{C}$ 振荡孵育1小时。

[0035] 3. 荧光信号检测

[0036] 在 $980\text{ nm}$ 外接光源激发下,荧光分光光度计检测 $657\text{ nm}$ 处的荧光强度。以校正荧光强度(荧光强度值减去阴性对照荧光强度值)为纵坐标,苯噻菌酯标准溶液浓度的对数为横坐标建立标准曲线,并获得校正曲线(图5)。根据标准曲线计算出饱和信号中浓度( $\text{SC}_{50}$ )为 $11.81\text{ ng mL}^{-1}$ ,最低检测限( $\text{LOD}, \text{SC}_{10}$ )为 $2.04\text{ ng mL}^{-1}$ 。

[0037] 本发明提供的免疫分析方法,特异性通过交叉反应率(CR)进行评价,其计算公式为 $\text{CR}(\%) = \text{SC}_{50}(\text{苯噻菌酯}) / \text{SC}_{50}(\text{苯噻菌酯结构类似物}) \times 100$ ,5种苯噻菌酯农药类似物的交叉反应率如表1所示。

[0038] 表1基于内滤效应的免疫分析方法对苯噻菌酯结合类似物的交叉反应率

化合物	结构	$\text{SC}_{50} (\text{ng mL}^{-1})$	CR (%)
苯噻菌酯		11.81	100
吡唑醚菌酯		>12000	<0.1
啉菌酯		>12000	<0.1
醚菌酯		>12000	<0.1
啉氧菌酯		>12000	<0.1
氯啉菌酯		>12000	<0.1

[0041] 实施例4:基于内滤效应的免疫分析对添加样品进行检测

[0042] 1. 添加样品的制备和处理

[0043] 经高效液相色谱验证无苯噻菌酯的田水、土壤、玉米、糙米、黄瓜样品进行添加回

收试验。准确量取过0.22 $\mu$ m滤膜的田水10mL,添加苯噻菌酯标准溶液至终浓度为20、80、100ng mL<sup>-1</sup>;土壤、玉米、糙米、黄瓜固体样品经粉碎、均质后准确称取10g,土壤、玉米添加苯噻菌酯标准溶液至终浓度为100,400,1000ng g<sup>-1</sup>;糙米、黄瓜添加苯噻菌酯标准溶液至终浓度为200,500,1000ng g<sup>-1</sup>。添加完成后将样品混匀并在暗处室温静置过夜。田水用2 $\times$ 硼酸缓冲液稀释后直接进行检测。土壤、玉米、糙米、黄瓜固体样品加入10mL含25%甲醇的硼酸缓冲液混匀,涡旋5min,超声15min,4000rpm离心5min,再加入10mL含25%甲醇的硼酸缓冲液重复提取一次,合并两次提取液并转移入25mL容量瓶内,用硼酸缓冲液定容至25mL。土壤、玉米提取液稀释4倍后用于检测,糙米、黄瓜提取液稀释8倍后用于检测。

[0044] 2.上转换发光材料探针与分析物竞争结合金纳米花探针

[0045] 将500 $\mu$ L检测样品、50 $\mu$ L上转换发光材料探针、60 $\mu$ L金纳米花探针加入到2mL离心管,用硼酸缓冲液定容至1mL。涡旋混匀后于37 $^{\circ}$ C振荡孵育1小时。

[0046] 3.荧光信号检测

[0047] 在980nm外接光源激发下,荧光分光光度计检测657nm处的荧光强度。去除阴性对照荧光强度后,带入校正曲线,计算溶液中苯噻菌酯含量,并用样品处理过程中的稀释倍数进行校正,获得样品中苯噻菌酯的实际残留量,结果如表2所示。

[0048] 本发明提供的免疫分析方法,对添加样品的检测准确,结果如表2所示。

[0049] 表2基于内滤效应的免疫分析方法对添加样品进行检测的结果

[0050]

样品	添加浓度 (ng mL <sup>-1</sup> or ng g <sup>-1</sup> )	平均回收率 (%)	RSD (%)
田水	20	88.0	5.7
	80	105.4	9.9
	200	74.2	7.9
土	100	76.1	10.3
	400	90.6	8.4
	1000	88.5	11.9
玉米	100	80.9	5.2

[0051]

	400	104.7	6.4
	1000	94.9	7.5
黄瓜	200	102.1	10.9
	500	87.7	7.2
	1000	100.9	8.1
糙米	200	81.1	6.7
	500	77.6	10.3
	1000	94.9	11.1

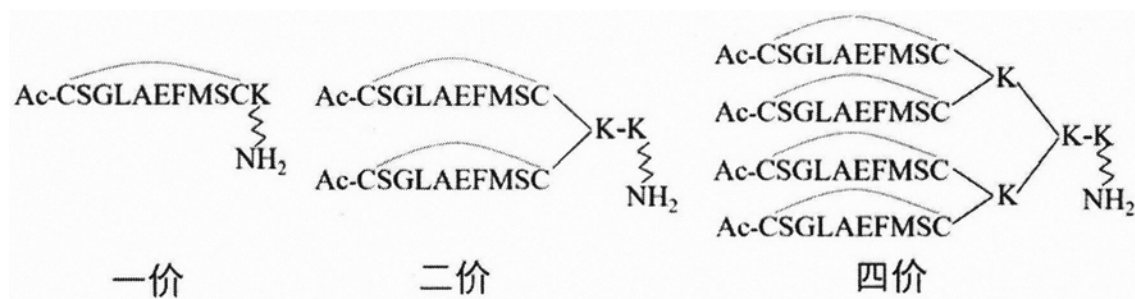


图1



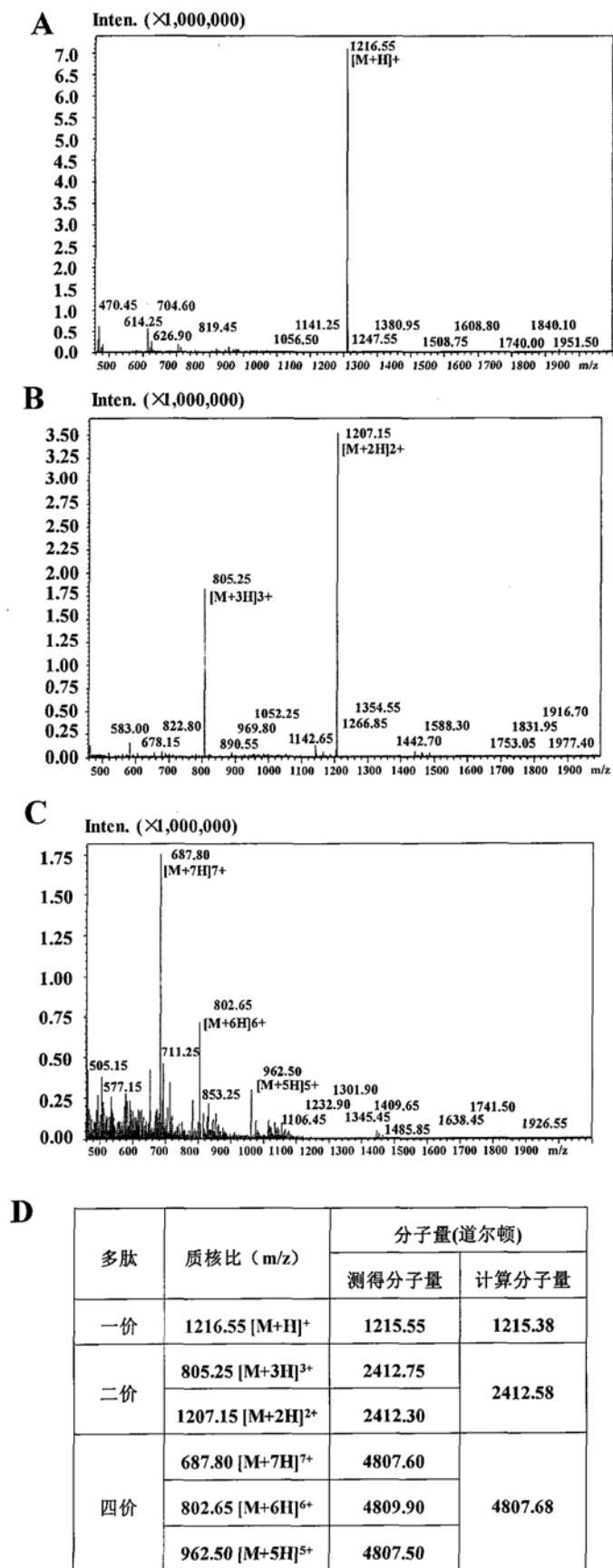


图2

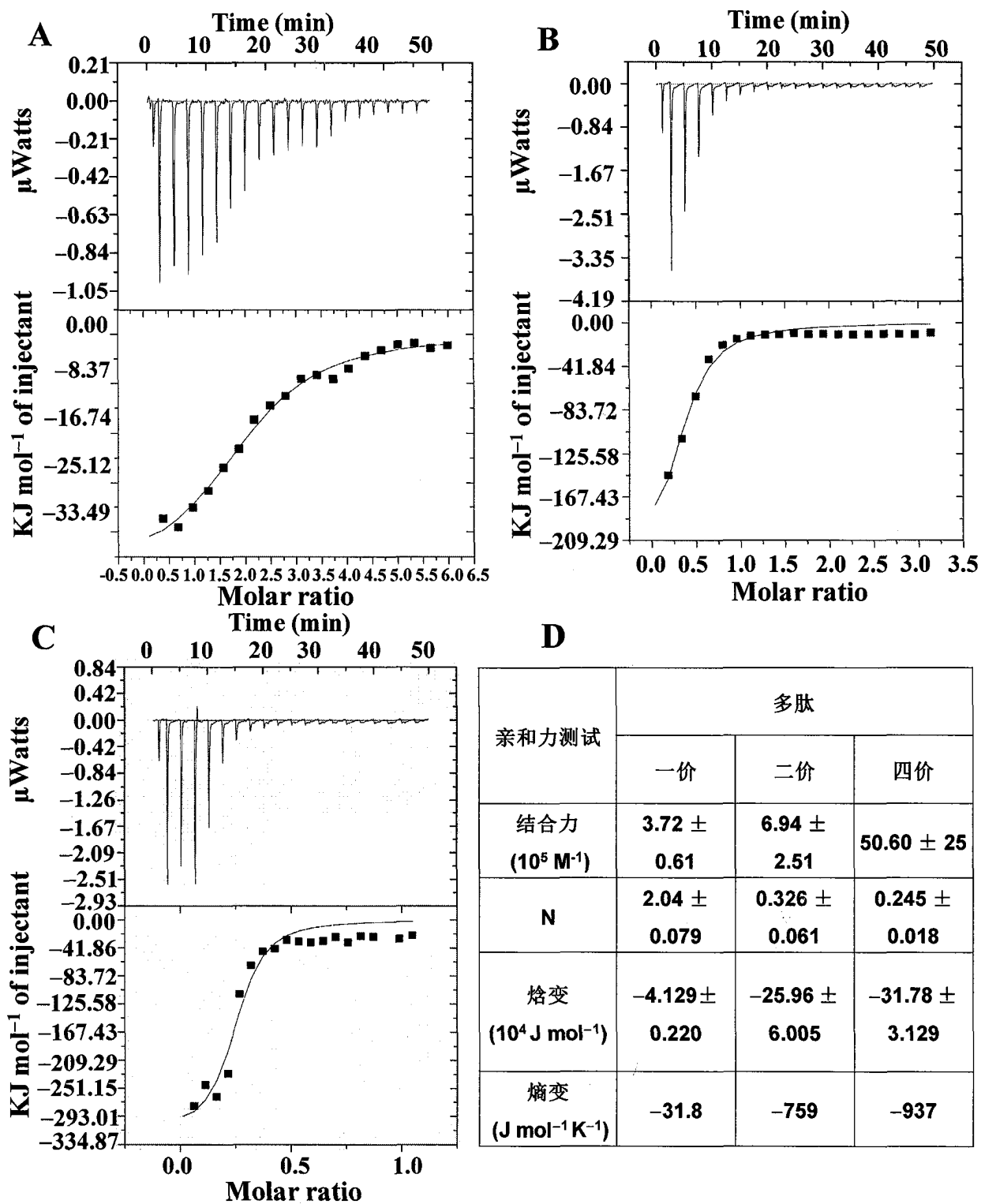


图3

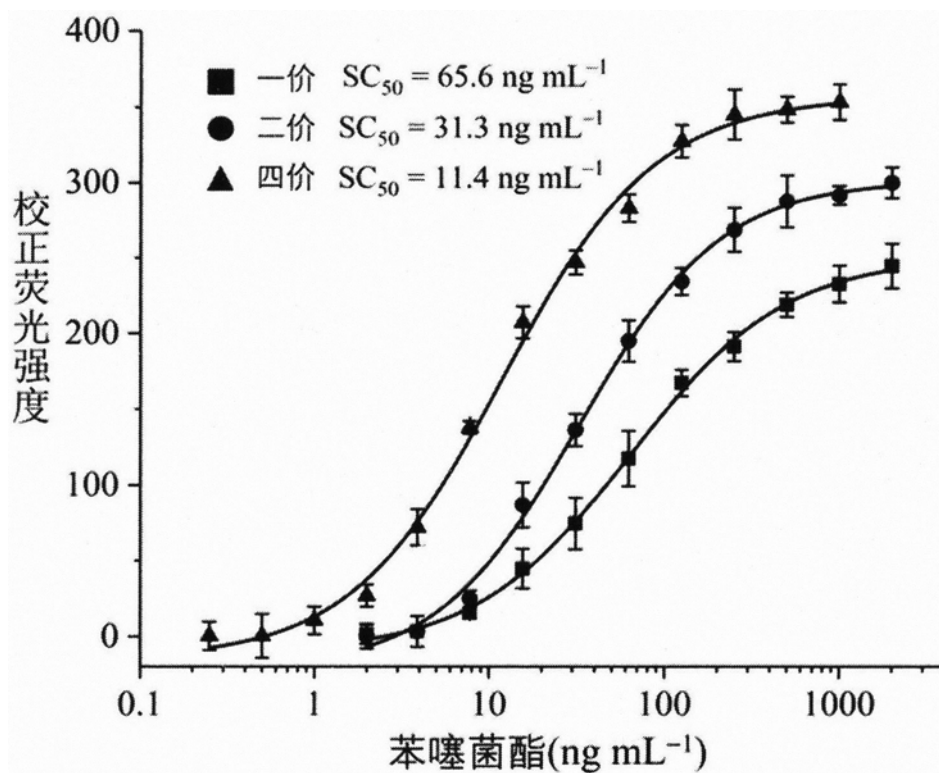


图4

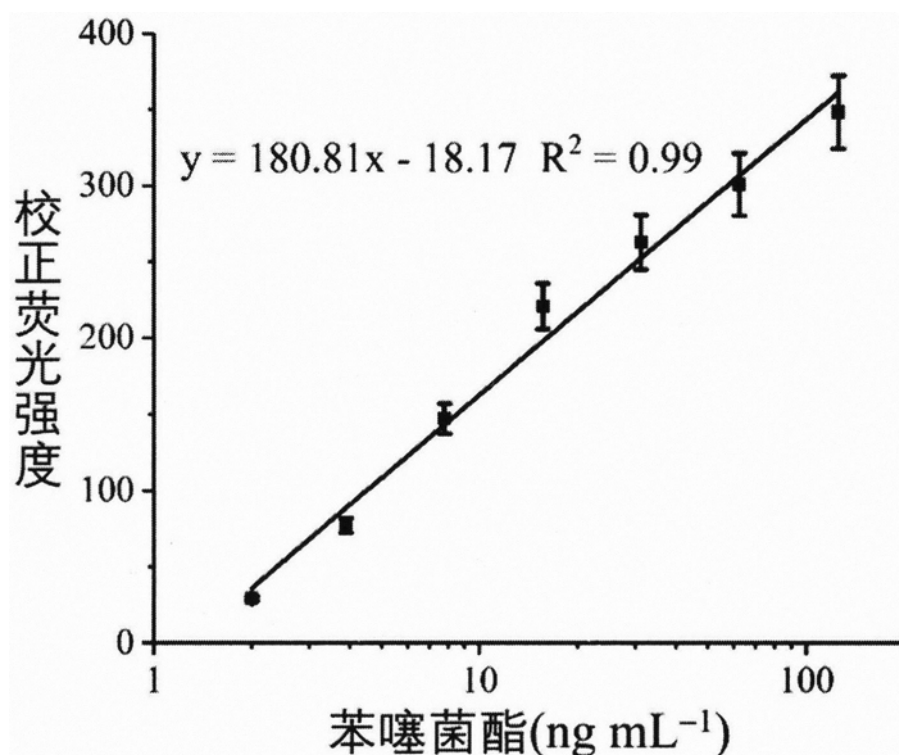


图5

专利名称(译)	一种多价苯噻菌酯模拟表位多肽及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110938116A</a>	公开(公告)日	2020-03-31
申请号	CN201910534366.X	申请日	2019-06-18
[标]申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
[标]发明人	王鸣华 华修德 陈贺 丁园 杨倩		
发明人	王鸣华 华修德 陈贺 丁园 杨倩 宗凌烽		
IPC分类号	C07K14/00 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/58 G01N33/68		
CPC分类号	C07K14/00 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/581 G01N33/582 G01N33/68		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种多价苯噻菌酯模拟表位多肽及其应用，尤其是一种与苯噻菌酯单克隆抗体特异性结合的多价模拟表位多肽，以及所述多价多肽在免疫检测中的应用，属于生物技术领域。基于苯噻菌酯噬菌体展示多肽模拟表位的氨基酸序列，以赖氨酸为支架和间隔臂，固相合成获得多价模拟表位多肽；将多价多肽的氮端乙酰化，碳端的赖氨酸侧链提供唯一的游离氨基用于标记。这种多价模拟表位多肽与苯噻菌酯单克隆抗体的亲和力是单价模拟表位多肽的13.6倍，在均相免疫分析方法中可以显著降低检测方法的背景信号，提高检测分析方法的敏感性。该多价模拟表位多肽可作为化学合成半抗原的替代物，建立均相、一步的免疫检测方法，用于快速、灵敏、方便和经济的检测环境和农产品中残留的苯噻菌酯。

