



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112480167 B

(45) 授权公告日 2022. 07. 08

(21) 申请号 202011285140.X

C07K 16/44 (2006.01)

(22) 申请日 2020.11.17

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112480167 A

(56) 对比文件

(43) 申请公布日 2021.03.12

CN 111269262 A, 2020.06.12

CN 110627726 A, 2019.12.31

(73) 专利权人 北京勤邦生物技术有限公司

CN 110498766 A, 2019.11.26

地址 102206 北京市昌平区回龙观国际信

CN 107389927 A, 2017.11.24

息产业基地高新四街8号

CN 103288872 A, 2013.09.11

(72) 发明人 万宇平 王兆芹 何方洋 马玉华

US 2016207948 A1, 2016.07.21

崔海峰 王琳琛

审查员 杨杰

(51) Int. Cl.

C07F 9/24 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/77 (2006.01)

C07K 14/795 (2006.01)

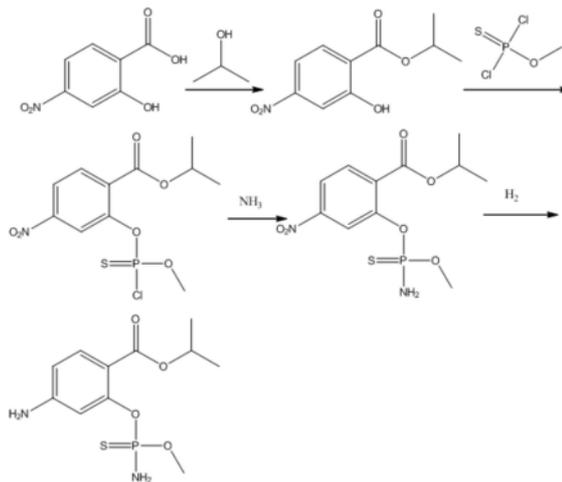
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

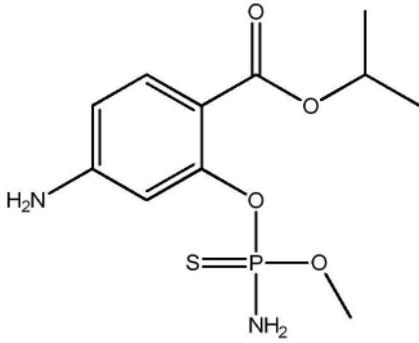
水胺硫磷半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了水胺硫磷半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用,本发明提供的水胺硫磷半抗原既最大程度保留了水胺硫磷的特征结构,使得水胺硫磷半抗原的免疫原性明显增强,又具有可以与载体蛋白发生偶联的氨基;用水胺硫磷半抗原与载体蛋白偶联后得到的水胺硫磷人工抗原去免疫动物,更有利于刺激动物免疫应答产生特异性更强、灵敏度更高的抗体,经检测水胺硫磷抗体的灵敏度可达0.03 μg/L,与其他有机磷杀虫剂的交叉反应率低,为后续建立水胺硫磷的各种免疫分析方法提供了基础。



1. 一种水胺硫磷半抗原,其特征在于,其具有如下结构式:



2. 如权利要求1所述的水胺硫磷半抗原的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 在催化剂存在下,将4-硝基水杨酸和异丙醇进行酯化反应,纯化后得到4-硝基水杨酸异丙酯;

2) 在催化剂存在和碱性条件下,将4-硝基水杨酸异丙酯和O-甲基硫代磷酰二氯进行缩合反应,纯化后得到4-硝基水杨酸异丙酯硫磷;

3) 将4-硝基水杨酸异丙酯硫磷和氨气进行氨化反应,纯化后得到硝基水胺硫磷;

4) 在催化剂存在下,将硝基水胺硫磷和氢气进行还原反应,纯化后得到水胺硫磷半抗原。

3. 如权利要求2所述的水胺硫磷半抗原的制备方法,其特征在于,所述步骤1)包括如下步骤:取4-硝基水杨酸1.83g,加入20mL异丙醇溶解,充分搅拌,加入0.5mL浓硫酸,室温搅拌3h,停止反应,加入200mL水,再加入100mL乙酸乙酯萃取,有机相加100mL水震荡、洗涤,浓缩蒸干,得到4-硝基水杨酸异丙酯。

4. 如权利要求2所述的水胺硫磷半抗原的制备方法,其特征在于,所述步骤2)包括如下步骤:在4-硝基水杨酸异丙酯中直接加入80mL二氯甲烷溶解,加入1.64g O-甲基硫代磷酰二氯,充分搅拌,加入3mL三乙胺,室温搅拌4h,停止反应,加入100mL水,补加100mL二氯甲烷萃取,有机相加60mL饱和食盐水震荡、洗涤,浓缩蒸干,上硅胶柱,用二氯甲烷和甲醇体积比为10:1的混合溶剂洗脱分离,得到4-硝基水杨酸异丙酯硫磷。

5. 如权利要求2所述的水胺硫磷半抗原的制备方法,其特征在于,所述步骤3)包括如下步骤:在4-硝基水杨酸异丙酯硫磷中直接加入100mL二氯乙烷溶解,在搅拌下通入氨气,室温反应2h,停止反应,加水50mL×3,洗涤3次,有机相浓缩蒸干,得到硝基水胺硫磷。

6. 如权利要求2所述的水胺硫磷半抗原的制备方法,其特征在于,所述步骤4)包括如下步骤:在硝基水胺硫磷中直接加入100mL甲醇溶解,加入0.5g润湿的钯-碳,排尽空气,通入氢气,室温搅拌2h,停止反应,抽滤,蒸干,上硅胶柱,用二氯甲烷和甲醇体积比为5:1的混合溶剂洗脱分离,得到水胺硫磷半抗原。

7. 一种水胺硫磷人工抗原,其特征在于,其是载体蛋白和权利要求1所述的水胺硫磷半抗原偶联得到的偶联物。

8. 如权利要求7所述的水胺硫磷人工抗原,其特征在于,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白或血蓝蛋白。

9. 一种水胺硫磷抗体,其特征在于,它是由权利要求7所述的水胺硫磷人工抗原经动物免疫得到,其能与水胺硫磷发生特异性免疫反应。

10. 一种权利要求9所述的水胺硫磷抗体在检测水胺硫磷残留中的应用。

水胺硫磷半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测领域。更具体地,本发明涉及水胺硫磷半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 水胺硫磷是一种速效广谱的有机磷杀虫剂,主要用于防治果树、水稻和棉花害虫,由于具有杀虫效率高、碱性条件下易分解等优点,一度成为农业生产中的主要杀虫剂之一。但水胺硫磷的滥用,不仅会造成农药在环境中残留,还可通过食物链的富集作用使动物和人中毒,进而对人体的代谢平衡产生影响,尤其是对儿童神经系统的正常发育产生更为严重的影响。我国国家标准GB 2763规定蔬菜及部分水果中水胺硫磷的最大残留限量为0.05mg/kg,因此,建立水胺硫磷残留快速检测技术,对于保障食品安全和人类健康、减少环境污染具有重要意义。

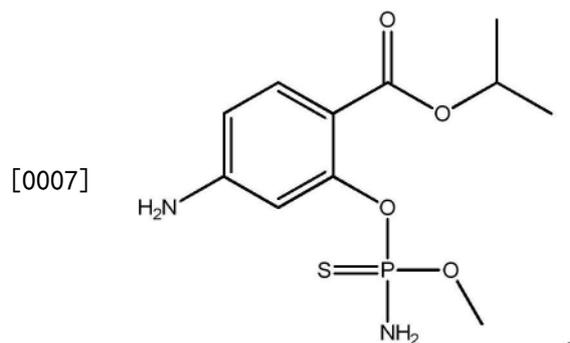
[0003] 目前,国内外检测水胺硫磷主要采用气相色谱法、气相色谱-质谱法和液相色谱串联质谱法等分析方法,存在样品前处理繁琐、检测时间长、仪器贵重等缺点,所以在我国无法得到广泛应用,并且不符合现场检测“在短时间内低成本对大量样品进行准确检测和筛选”的要求。而免疫学检测分析技术以其高灵敏、特异性高、快速、操作简便等优点在药物残留检测领域已被广泛应用,比起仪器等检验方法有很多优势。所以免疫分析为水胺硫磷残留研究提供了一条新的分析检测方法。

[0004] 在建立免疫学检测方法并应用该检测方法检测水胺硫磷残留量时,关键技术在于能够获取到特异性强、灵敏度高的抗体,而要实现这一目标,前提条件就是得合成、制备出合适的水胺硫磷半抗原。

发明内容

[0005] 针对现有技术中存在的不足之处,本发明提供一种能最大程度保留水胺硫磷的特征结构,又具有一定长度连接臂的半抗原以及这种半抗原的制备方法;以此半抗原制备的人工抗原、检测灵敏度高和特异性强的抗体;以及此半抗原的应用。

[0006] 为了实现本发明的目的,第一方面,本发明提供一种水胺硫磷半抗原,其具有如下结构式:



[0008] 本发明提供的水胺硫磷半抗原在水胺硫磷的分子结构上引入氨基活性基团,从而

可以与载体蛋白进行偶联得到人工抗原用于免疫;该水胺硫磷半抗原保留了水胺硫磷的所有特征基团,最小改变水胺硫磷原有结构特征,同时与载体蛋白偶联后,突出的是水胺硫磷本身独有的结构,为后续刺激动物免疫应答产生特异性更强、灵敏度更高的抗体奠定基础。

[0009] 第二方面,本发明提供上述水胺硫磷半抗原的制备方法,其包括如下步骤:

[0010] 1) 在催化剂存在下,将4-硝基水杨酸和异丙醇进行酯化反应,纯化后得到4-硝基水杨酸异丙酯;

[0011] 2) 在催化剂存在和碱性条件下,将4-硝基水杨酸异丙酯和0-甲基硫代磷酰二氯进行缩合反应,纯化后得到4-硝基水杨酸异丙酯硫磷;

[0012] 3) 将4-硝基水杨酸异丙酯硫磷和氨气进行氨化反应,纯化后得到硝基水胺硫磷;

[0013] 4) 在催化剂存在下,将硝基水胺硫磷和氢气进行还原反应,纯化后得到水胺硫磷半抗原。

[0014] 进一步地,上述步骤1) 包括如下步骤:取4-硝基水杨酸1.83g,加入20mL异丙醇溶解,充分搅拌,加入0.5mL浓硫酸,室温搅拌3h,停止反应,加入200mL水,再加入100mL乙酸乙酯萃取,有机相加100mL水震荡、洗涤,浓缩蒸干,得到4-硝基水杨酸异丙酯。

[0015] 进一步地,上述步骤2) 包括如下步骤:在4-硝基水杨酸异丙酯中直接加入80mL二氯甲烷溶解,加入1.64g 0-甲基硫代磷酰二氯,充分搅拌,加入3mL三乙胺,室温搅拌4h,停止反应,加入100mL水,补加100mL二氯甲烷萃取,有机相加60mL饱和食盐水震荡、洗涤,浓缩蒸干,上硅胶柱,用二氯甲烷和甲醇体积比为10:1的混合溶剂洗脱分离,得到4-硝基水杨酸异丙酯硫磷。

[0016] 进一步地,上述步骤3) 包括如下步骤:在4-硝基水杨酸异丙酯硫磷中直接加入100mL二氯乙烷溶解,在搅拌下通入氨气,室温反应2h,停止反应,加水50mL×3,洗涤3次,有机相浓缩蒸干,得到硝基水胺硫。

[0017] 进一步地,上述步骤4) 包括如下步骤:在硝基水胺硫磷中直接加入100mL甲醇溶解,加入0.5g润湿的钨-碳,排尽空气,通入氢气,室温搅拌2h,停止反应,抽滤,蒸干,上硅胶柱,用二氯甲烷和甲醇体积比为5:1的混合溶剂洗脱分离,得到水胺硫磷半抗原。

[0018] 本发明根据水胺硫磷的结构特点,以4-硝基水杨酸为起始原料,经过羧基酯化、与0-甲基硫代磷酰二氯缩合、氨化、还原等一系列反应,合成带有氨基的间隔臂,使用的原料易得,反应操作较为简单,反应条件易于控制,制备的水胺硫磷半抗原的纯度和收率较高。

[0019] 第三方面,本发明提供一种水胺硫磷人工抗原,其是载体蛋白和上述水胺硫磷半抗原偶联得到的偶联物。所述水胺硫磷人工抗原可以作为免疫原,也可以作为包被原。

[0020] 进一步地,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白或血蓝蛋白;优选牛血清白蛋白、卵清蛋白。

[0021] 更具体的如:水胺硫磷半抗原-牛血清白蛋白(BSA)形成的免疫原;水胺硫磷半抗原-卵清蛋白(OVA)形成的包被原。

[0022] 水胺硫磷半抗原分子仅具有免疫反应性,而不具有免疫原性。因此,为了赋予水胺硫磷半抗原分子以免疫原性,还需要将该水胺硫磷半抗原分子与合适的载体蛋白分子偶联、结合在一起,由此产生既具有免疫反应性又具有免疫原性的水胺硫磷人工抗原。

[0023] 第四方面,本发明提供一种水胺硫磷抗体,它是由上述水胺硫磷人工抗原经动物免疫得到,其能与水胺硫磷发生特异性免疫反应。

[0024] 进一步地,所述水胺硫磷抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。另外,对于所述水胺硫磷抗体,可以采用本领域常规方法来进行制备。

[0025] 在一个具体的实施方案中,所述水胺硫磷抗体为特异性针对上述水胺硫磷半抗原的水胺硫磷人工抗原的鼠源单克隆抗体。

[0026] 采用本发明的水胺硫磷人工抗原得到的水胺硫磷抗体的效价、特异性、亲和力都较好,与其他有机磷杀虫剂的交叉反应率低。

[0027] 第五方面,本发明提供上述水胺硫磷抗体在检测水胺硫磷残留中的应用。

[0028] 本发明通过水胺硫磷人工抗原诱导免疫动物产生抗体,从而用于水胺硫磷免疫检测分析中。

[0029] 所述的水胺硫磷免疫检测包括但不限于水胺硫磷ELISA试剂盒、水胺硫磷胶体金试纸条、水胺硫磷时间分辨荧光试纸条。

[0030] 借由上述技术方案,本发明至少具有如下优点及有益效果:

[0031] 本发明提供的水胺硫磷半抗原既最大程度保留了水胺硫磷的特征结构,使得水胺硫磷半抗原的免疫原性明显增强,又具有可以与载体蛋白发生偶联的氨基;用水胺硫磷半抗原与载体蛋白偶联后得到的水胺硫磷人工抗原去免疫动物,更有利于刺激动物免疫应答产生特异性更强、灵敏度更高的抗体,为后续建立水胺硫磷的各种免疫分析方法提供基础。

[0032] 本发明中水胺硫磷半抗原的制备方法,使用的原料易得,反应操作较为简单,反应条件易于控制,制备的水胺硫磷半抗原的纯度和收率较高。

[0033] 采用本发明的水胺硫磷人工抗原得到的水胺硫磷抗体的效价、特异性、亲和力都较好,灵敏度可达到0.03 μ g/L,与其他有机磷杀虫剂的交叉反应率低。

附图说明

[0034] 图1是本发明水胺硫磷半抗原的合成路线

具体实施方式

[0035] 下面结合具体实施例进一步详细说明本发明,但实施例仅是本发明的优选实施方式,并不是对本发明的限定。

[0036] 实施例1

[0037] 一种水胺硫磷半抗原的制备方法,其包括如下步骤:

[0038] 1) 取4-硝基水杨酸1.83g,加入20mL异丙醇溶解,充分搅拌,加入0.5mL浓硫酸,室温搅拌3h,停止反应,加入200mL水,再加入100mL乙酸乙酯萃取,有机相加100mL水震荡、洗涤,浓缩蒸干,得到4-硝基水杨酸异丙酯;

[0039] 2) 在上述4-硝基水杨酸异丙酯中直接加入80mL二氯甲烷溶解,加入1.64g O-甲基硫代磷酰二氯,充分搅拌,加入3mL三乙胺,室温搅拌4h,停止反应,加入100mL水,补加100mL二氯甲烷萃取,有机相加60mL饱和食盐水震荡、洗涤,浓缩蒸干,上硅胶柱,用二氯甲烷和甲醇体积比为10:1的混合溶剂洗脱分离,得到4-硝基水杨酸异丙酯硫磷;

[0040] 3) 在上述4-硝基水杨酸异丙酯硫磷中直接加入100mL二氯乙烷溶解,在搅拌下通入氨气,室温反应2h,停止反应,加水50mL \times 3,洗涤3次,有机相浓缩蒸干,得到硝基水胺硫磷;

[0041] 4) 在上述硝基水胺硫磷中直接加入100mL甲醇溶解,加入0.5g润湿的钼-碳,排尽空气,通入氢气,室温搅拌2h,停止反应,抽滤,蒸干,上硅胶柱,用二氯甲烷和甲醇体积比为5:1的混合溶剂洗脱分离,得到水胺硫磷半抗原。

[0042] 实施例2

[0043] 一种水胺硫磷人工抗原的制备方法,步骤如下:

[0044] 取实施例1制备的水胺硫磷半抗原113mg,加乙醇1mL溶解,加水2mL、1mol/L HCl 1.2mL充分溶解,冷却至0~5℃,加1mL含亚硝酸钠25mg的水溶液,持续搅拌1h,得到半抗原活化液A液;取牛血清白蛋白(BSA) 500mg,加0.1mol/L CB缓冲液7mL溶解,冷却至0~5℃,滴加全部的A液,立刻变成红色溶液,继续反应2h,用0.02mol/L PB缓冲液透析纯化3天,每天换液3次,离心,分装,得到与牛血清白蛋白偶联的水胺硫磷人工抗原,分装,-20℃保存。

[0045] 实施例3

[0046] 一种水胺硫磷人工抗原的制备方法,步骤如下:

[0047] 取实施例1制备的水胺硫磷半抗原67mg,加乙醇1mL溶解,加水2mL、1mol/L HCl 0.87mL充分溶解,冷却至0~5℃,加1mL含亚硝酸钠15.2mg的水溶液,持续搅拌1h,得到半抗原活化液A液;取卵清蛋白(OVA) 500mg,加0.1mol/L CB缓冲液8mL溶解,冷却至0~5℃,滴加全部的A液,立刻变成红色溶液,继续反应2h,用0.02mol/L PB缓冲液透析纯化3天,每天换液3次,离心,分装,得到与卵清蛋白偶联的水胺硫磷人工抗原,分装,-20℃保存。

[0048] 实施例4

[0049] 一种水胺硫磷抗体,其制备方法为:

[0050] 1. 动物免疫

[0051] 取健康的6~8周雌性Ba1b/c小鼠10只(分为A与B两组,每组5只),初次免疫用弗氏完全佐剂乳化后颈背部皮下多点注射,每只小鼠免疫剂量为200μg与牛血清白蛋白偶联的水胺硫磷人工抗原;之后加强免疫每两周颈背部皮下多点注射一次,乳化用弗氏不完全佐剂;最后一次免疫使用生理盐水代替弗氏不完全佐剂,采用腹腔注射,注射剂量和前面几次相同。具体免疫步骤见表1。

[0052] 表1小鼠免疫程序

免疫次数	时间/d	免疫剂量/(μg/只)	免疫方法	佐剂
初免	0	200	颈背部皮下多点注射	弗氏完全佐剂
二免	15	200	同上	弗氏不完全佐剂
三免	30	200	同上	同上
四免	44	200	同上	同上
加强	58 (融合前三天)	200	腹腔注射	不加佐剂

[0054] 第三次、四次、加强免疫后7d,对小鼠断尾取血,ELISA方法测定小鼠血清效价,具体步骤如下:

[0055] (1) 用0.05mol/L pH9.6的碳酸盐缓冲液将与卵清蛋白偶联的水胺硫磷人工抗原做1:1000稀释,每孔100μL包被酶标板,37℃孵育2h,甩掉包被液,以PBST洗涤1次,拍干;

[0056] (2) 每孔加入150μL封闭液,37℃反应2h后倾去封闭液,拍干;

[0057] (3) 每孔加入50μL以PBS倍比稀释的抗血清,25℃反应30min后倾去反应液,以PBST洗涤3~5次,每次间隔30s,拍干;

[0058] (4) 加PBS稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体(1:1000) 100 μ L/孔, 25 $^{\circ}$ C反应30min, 以PBST洗涤3~5次, 每次间隔30s, 拍干;

[0059] (5) 每孔加入底物显色液A液和B液各50 μ L, 25 $^{\circ}$ C避光反应15min, 每孔加入50 μ L 2mol/L的H₂SO₄溶液终止反应;

[0060] (6) 酶标仪测定波长在450nm的OD值, 以样品孔OD₄₅₀接近于1的稀释倍数作为阳性血清的效价。

[0061] 2. 细胞融合

[0062] (1) 饲养细胞制备: 断颈处死8~10周龄Balb/c小鼠, 浸泡在75%酒精中5min, 随即放入超净工作台内, 腹部朝上放于平皿内或固定于解剖板上。用眼科镊子夹起小鼠腹部皮肤, 用剪刀剪一小口, 注意切勿剪破腹膜, 以免腹腔液外流和污染。然后用剪刀向上下两侧做钝性分离, 充分暴露腹膜。用酒精棉球擦拭腹膜消毒。用注射器吸取5mL RPMI-1640基础培养液, 注入小鼠腹腔, 轻轻抽回注射器, 晃动小鼠腿部和尾部几次。用原注射器抽回腹腔内液体, 注入离心管。如此反复操作3~4次。1000r/min离心10min, 弃上清。用20~50mL完全培养液重悬细胞, 100 μ L/孔滴加到培养板, 置培养箱备用。

[0063] (2) 脾细胞制备: 加强免疫后3d, 取免疫Balb/c小鼠, 眼眶采血后脱臼处死, 在75%酒精中消毒后取脾脏, 去除结缔组织, 制备脾细胞悬液, 转移到50mL离心管中, 加RPMI-1640至30mL, 1500~2000r/min离心5min, 弃上清, 加RPMI-1640至30mL, 计数待用。

[0064] (3) 骨髓瘤细胞制备: 取3瓶生长状态良好的(活细胞数>95%)骨髓瘤细胞, 将之完全吹下, 转移到50mL离心管中, 加RPMI-1640至30mL, 1500~2000r/min离心5min, 弃上清, 加RPMI-1640至30mL, 计数待用。

[0065] (4) 细胞混合: 脾细胞:骨髓瘤细胞=8:1, 混合, 1500~2000r/min离心5min。

[0066] (5) 细胞融合: 将混合好的细胞离心, 倒干上清, 把沉淀细胞块弹成糊状, 置37 $^{\circ}$ C水浴, 在1min内加入1mL融合剂, 融合剂为聚乙二醇(PEG) 4000, 作用2min, 并轻轻搅拌细胞, 在随后4min内加入20mL无血清的PEG营养液, 1000r/min离心10min, 弃上清。用20~50mL完全培养液重悬细胞, 铺种于含饲养细胞的96孔细胞培养板, 每孔100 μ L, 置培养箱中。

[0067] 3. 细胞株筛选

[0068] 待细胞长至孔底的1/3~1/2时, 即可进行抗体检测。采用ELISA方法对有杂交瘤细胞生长的培养孔进行筛选, 筛选分两步: 第一步先用间接ELISA筛选出阳性细胞孔, 第二步选用水胺硫磷为标准品, 用间接竞争ELISA对阳性细胞进行抑制效果测定。选出对水胺硫磷标准品具有较好抑制的孔, 采用有限稀释法进行亚克隆, 用同样的方法进行检测。重复三次, 即可得到能稳定分泌水胺硫磷单克隆抗体的细胞株。

[0069] 4. 腹水制备

[0070] 将液体石蜡注射6~8周Balb/c小鼠, 500 μ L/只。10天后将处于对数生长期的杂交瘤细胞用RPMI-1640基础培养基收集, 用血球计数板和显微镜计数, 细胞浓度在1.0 $\times 10^6$ ~1.5 $\times 10^6$ 个/mL范围内。每只小鼠0.5mL杂交瘤细胞注射到腹腔。注意观察在一周后小鼠腹部膨大, 用无菌注射器于小鼠腹腔采集腹水, 每隔一到两天采集一次, 这样多次反复采集直到小鼠自然死亡。4 $^{\circ}$ C下5000r/min离心5min, 收集上清, 并去掉腹水上层漂浮的脂肪和蛋白质膜。

[0071] 5. 抗体纯化

[0072] 单克隆抗体采用辛酸-硫酸铵方法纯化。

[0073] 6. 抗体效价测定

[0074] 采用间接ELISA方法测定抗体效价,步骤参考1.中动物免疫的血清效价测定。结果显示,水胺硫磷单克隆抗体的效价 ≥ 100000 。

[0075] 7. 抗体交叉反应性测定

[0076] 采用间接竞争ELISA方法测定,结果发现,水胺硫磷单克隆抗体对水胺硫磷及其他有机磷杀虫剂的交叉反应率为:水胺硫磷为100%,甲拌磷、对硫磷、甲基对硫磷、杀螟硫磷、辛硫磷、毒死蜱、甲基毒死蜱、倍硫磷、丙溴磷均 $< 1\%$ 。由此可见,所制备的抗体特异性较好。

[0077] 以上所述实施例仅表达了本发明的实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制,但凡采用等同替换或等效变换的形式所获得的技术方案,均应落在本发明的保护范围之内。

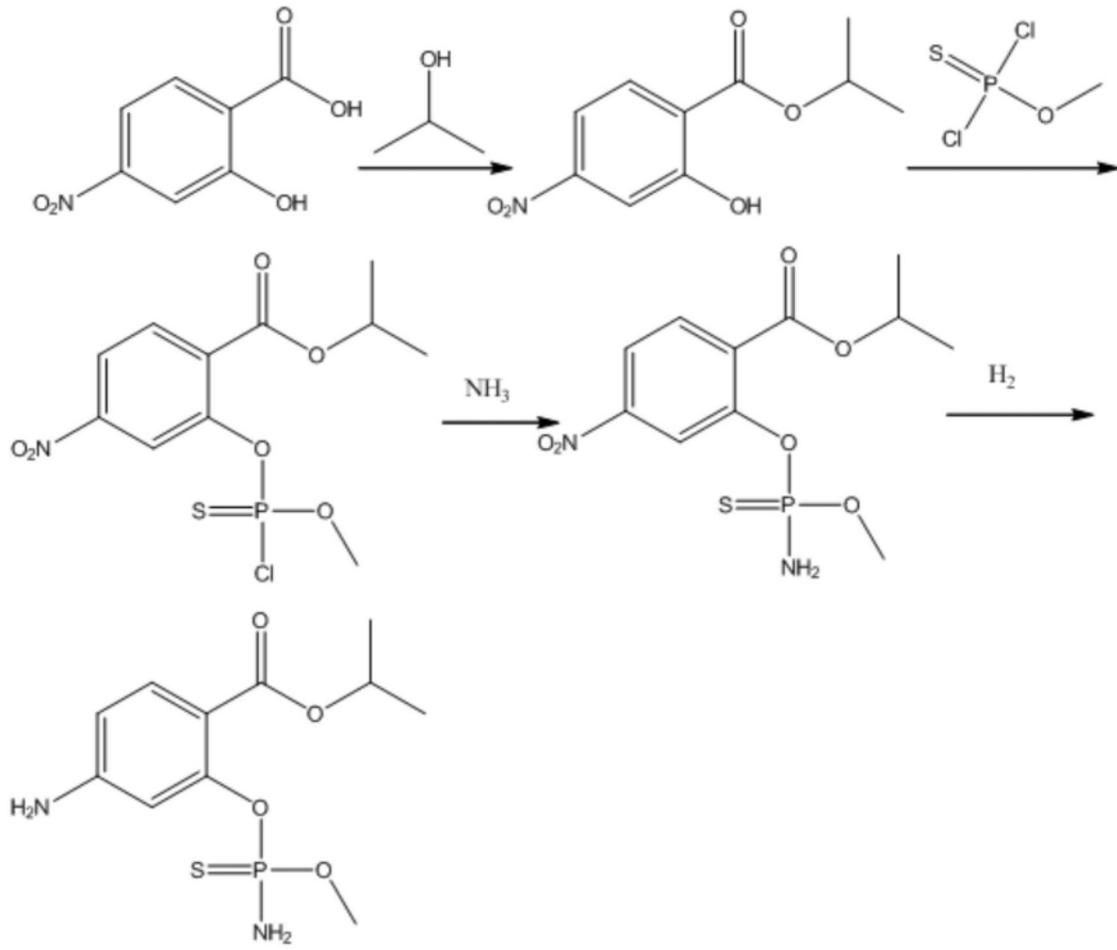


图1