

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00817771.6

C07D 213/61 (2006.01)

C07D 277/32 (2006.01)

C07D 417/06 (2006.01)

C07D 401/06 (2006.01)

A01N 43/40 (2006.01)

A01N 43/50 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 4 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 100379725C

[51] Int. Cl. (续)

A01N 43/78 (2006.01)

A01N 43/88 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

[22] 申请日 2000.12.6 [21] 申请号 00817771.6

[30] 优先权

[32] 1999.12.8 [33] US [31] 09/456,782

[86] 国际申请 PCT/EP2000/012310 2000.12.6

[87] 国际公布 WO2001/042787 英 2001.6.14

[85] 进入国家阶段日期 2002.6.25

[73] 专利权人 辛根塔参与股份公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 J·F·布拉迪 D·P·西蒙斯

T·E·威尔逊

[56] 参考文献

CN1084171A 1994.3.23

US5723306A 1998.3.3

CN1229081A 1999.9.22

WO9827074A1 1998.6.25

审查员 戴年珍

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 唐伟杰

权利要求书 6 页 说明书 34 页

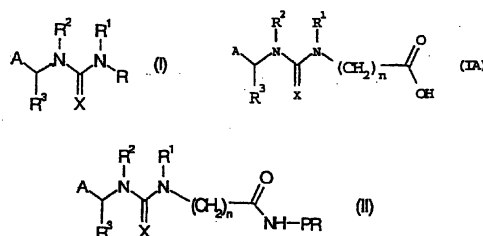
[54] 发明名称

用于新烟碱基杀虫剂的免疫测定法

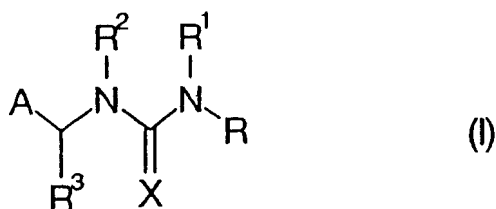
[57] 摘要

本发明提供了用于生成抗新烟碱类抗体的免疫原，以及用于通过免疫测定法来测定样品中一种或多种新烟碱类杀虫剂的存在情况的抗体、方法、试剂、和试剂盒。本发明可具体用于测定应用于植物繁殖材料(诸如种子)的新烟碱类杀虫剂的浓度，所述抗体对具有通式(I)的化合物具有选择性，其中 A 是 2-氯吡啶-5-基或 2-氯噻唑-5-基；R 和 R³ 独立地是氢或 C₁-C₄ 烷基；R¹ 和 R² 独立地是氢或 C₁-C₄ 烷基，或者 R¹ 和 R² 与它们所连接的氮原子一起形成咪唑烷或噁二嗪环；且 X 是 N-NO₂ 或 N-CN。本发明还要求保护具有通式(IA)的化合物和具有通式(II)的蛋白质缀合物，其中 PR 指选自下组的载体分子蛋白质残基：来自双翅目病毒的纯化蛋白质衍生物(PPD，结核菌素)、牛血清清蛋

清蛋白、和匙孔蛾血蓝蛋白；或者选自下组的酶残基：碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、和 β-半乳糖苷酶。



1. 在测定样品中新烟碱类杀虫剂含量的免疫测定法中有用的抗体,其中所述抗体(1)是通过用缀合了免疫原性载体蛋白的新烟碱类半抗原免疫动物而生成的多克隆抗体,且(2)可特异性结合新烟碱类杀虫剂,其中所述抗体对具有通式(I)的化合物具有选择性



其中 A 是 2-氯吡啶-5-基或 2-氯噻唑-5-基;

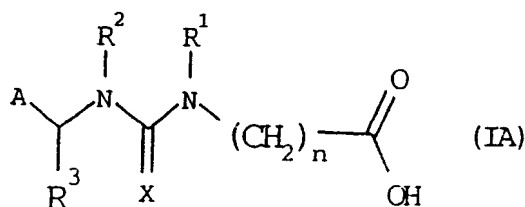
R 和 R³ 独立地是氢或 C₁-C₄ 烷基;

R¹ 和 R² 独立地是氢或 C₁-C₄ 烷基, 或者 R¹ 和 R² 与它们所连接的氮原子一起形成咪唑烷或噁二嗪环; 且

X 是 N-NO₂ 或 N-CN.

2. 权利要求1的抗体,其中所述抗体对选自下组的化合物具有选择性: 吡虫啉、噻虫嗪和氯噻啉。

3. 具有通式(IA)的化合物



其中 A 是 2-氯吡啶-5-基或 2-氯噻唑-5-基;

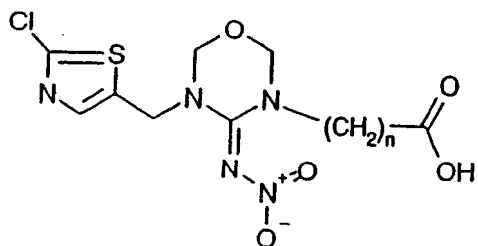
R³ 是氢或 C₁-C₄ 烷基;

R¹ 和 R² 独立地是氢或 C₁-C₄ 烷基, 或者 R¹ 和 R² 与它们所连接的氮原子一起形成咪唑烷或噁二嗪环;

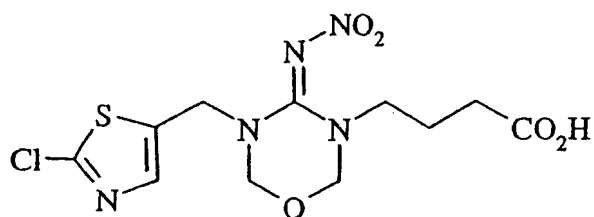
n 是 1-4 的整数; 且

X 是 N-NO₂ 或 N-CN.

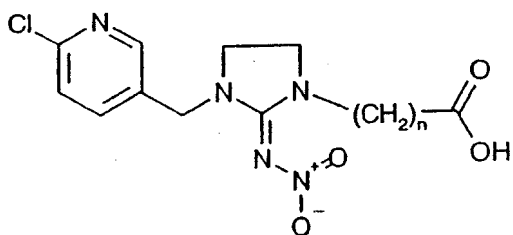
4. 权利要求3的化合物, 其具有通式



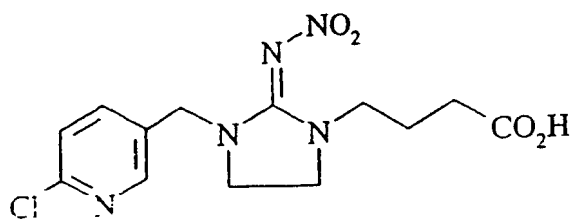
5. 权利要求4的化合物，其具有通式



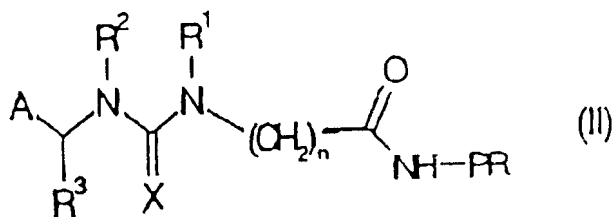
6. 权利要求3的化合物，其具有通式



7. 权利要求6的化合物，其具有通式



8. 具有通式 (II) 的蛋白质缀合物



其中 A 是 2-氯吡啶-5-基或 2-氯噻唑-5-基；

R^3 是氢或 $C_1 - C_4$ 烷基；

R^1 和 R^2 独立地是氢或 $C_1 - C_4$ 烷基，或者 R^1 和 R^2 与它们所连接的氮原子一起形成咪唑烷或噁二嗪环；

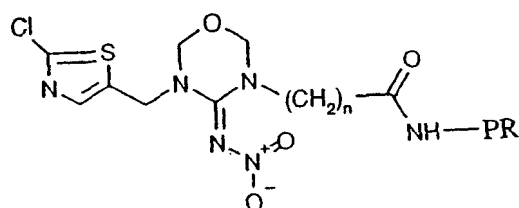
n 是 1-4 的整数；

X 是 $N-NO_2$ 或 $N-CN$ ；且

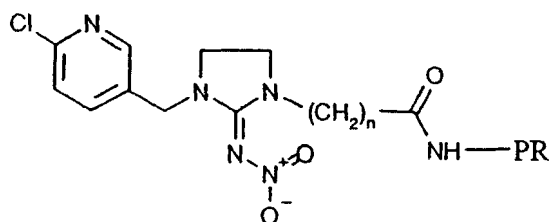
PR 是选自下组的载体分子蛋白质残基：来自双翅目病毒的纯化蛋白质衍生物、牛血清清蛋白、阳离子化的牛血清清蛋白、人血清清蛋白、卵清蛋白、和匙孔蛾血蓝蛋白；或者是选自下组的酶残基：碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、和 β -半乳糖苷酶。

9. 权利要求 8 的蛋白质缀合物，其中所述来自双翅目病毒的纯化蛋白质衍生物是结核菌素。

10. 权利要求 8 的蛋白质缀合物，其具有通式

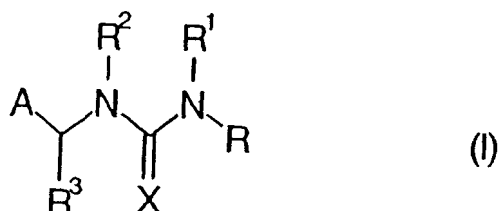


11. 权利要求 8 的蛋白质缀合物，其具有通式



12. 测定样品中新烟碱类杀虫剂浓度的方法，包括下列步骤：

(1) 提供具有对所述新烟碱类杀虫剂有选择性的固定化抗体的固相，其中所述抗体对具有通式 (I) 的化合物具有选择性



其中 A 是 2-氯吡啶-5-基或 2-氯噻唑-5-基;

R 和 R³ 独立地是氢或 C₁-C₄ 烷基;

R¹ 和 R² 独立地是氢或 C₁-C₄ 烷基, 或者 R¹ 和 R² 与它们所连接的氮原子一起形成咪唑烷或噁二嗪环; 且

X 是 N-NO₂ 或 N-CN;

(2) 在存在已知量的新烟碱类杀虫剂半抗原-酶缀合物时, 使所述样品接触该固定化抗体;

(3) 清洗步骤 (2) 的固相, 以除去任何未结合的半抗原-酶缀合物或样品;

(4) 使对所述半抗原-酶缀合物具有特异性的显色底物与步骤 (3) 清洗的固相发生反应, 以生成色素原; 并

(5) 测量由步骤 (4) 生成的色素原的量, 以测定结合抗体的半抗原-酶缀合物的量, 由此得到所述样品中新烟碱类杀虫剂的量。

13. 权利要求 12 的方法, 其中所述样品是通过在合适溶剂中提取植物繁殖材料而获得的。

14. 权利要求 13 的方法, 其中所述植物繁殖材料是种子。

15. 权利要求 14 的方法, 其中所述种子选自下组: 芸苔、高粱、小麦、棉花、大田玉米、或甜玉米。

16. 权利要求 12 的方法, 其中所述抗体是通过用缀合了免疫原性载体蛋白的新烟碱类半抗原免疫动物而生成的多克隆抗体。

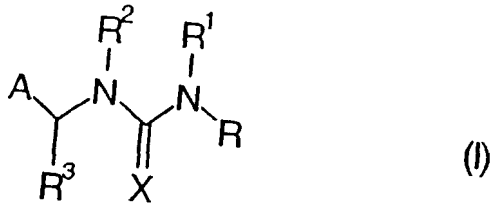
17. 权利要求 16 的方法, 其中所述免疫原性载体蛋白是选自下组的载体分子: 来自双翅目病毒的纯化蛋白质衍生物、牛血清清蛋白、阳离子化的牛血清清蛋白、人血清清蛋白、卵清蛋白、和匙孔蛾血蓝蛋白。

18. 权利要求 17 的方法, 其中所述来自双翅目病毒的纯化蛋白质衍生物是结核菌素。

19. 在测定样品中新烟碱类杀虫剂含量的免疫测定法中有用的试剂盒, 其中所述试剂盒在一个或多个容器中包含下列组合:

(1) 具有对所述新烟碱类杀虫剂有选择性的固定化抗体的固相, 其

中所述抗体对具有通式(I)的化合物具有选择性



其中 A 是 2-氯吡啶-5-基或 2-氯嘧啶-5-基；

R 和 R³ 独立地是氢或 C₁-C₄ 烷基；

R¹ 和 R² 独立地是氢或 C₁-C₄ 烷基，或者 R¹ 和 R² 与它们所连接的氮原子一起形成咪唑烷或噁二嗪环；且

X 是 N-NO₂ 或 N-CN；

(2) 包含缀合了新烟碱类半抗原的酶的酶缀合物。

20. 权利要求19的试剂盒，其中所述抗体是通过用缀合了免疫原性载体蛋白的新烟碱类半抗原免疫动物而生成的多克隆抗体。

21. 权利要求19的试剂盒，其中所述酶是辣根过氧化物酶。

22. 权利要求19的试剂盒，其中所述抗体可特异性结合选自下组的新烟碱类杀虫剂：吡虫啉、噻虫嗪和氯噻啶。

23. 在测定样品中新烟碱类杀虫剂含量的免疫测定法中有用的抗体，其中所述抗体(1)是通过用缀合了免疫原性载体蛋白的新烟碱类半抗原免疫动物而生成的多克隆抗体，且(2)可特异性结合新烟碱类杀虫剂，其中所述抗体对选自硝胺烯啶、吡虫啉和噻虫啉的化合物具有选择性。

24. 测定样品中新烟碱类杀虫剂浓度的方法，包括下列步骤：

(1) 提供具有对所述新烟碱类杀虫剂有选择性的固定化抗体的固相，其中所述抗体对选自硝胺烯啶、吡虫啉和噻虫啉的化合物具有选择性；

(2) 在存在已知量的新烟碱类杀虫剂半抗原-酶缀合物时，使所述样品接触该固定化抗体；

(3) 清洗步骤(2)的固相，以除去任何未结合的半抗原-酶缀合物或样品；

(4)使对所述半抗原-酶缀合物具有特异性的显色底物与步骤(3)清洗的固相发生反应,以生成色素原;并

(5)测量由步骤(4)生成的色素原的量,以测定结合抗体的半抗原-酶缀合物的量,由此得到所述样品中新烟碱类杀虫剂的量。

25. 权利要求24的方法,其中所述样品是通过在合适溶剂中提取植物繁殖材料而获得的。

26. 权利要求25的方法,其中所述植物繁殖材料是种子。

27. 权利要求26的方法,其中所述种子选自下组:芸苔、高粱、小麦、棉花、大田玉米、或甜玉米。

28. 权利要求24的方法,其中所述抗体是通过用缀合了免疫原性载体蛋白的新烟碱类半抗原免疫动物而生成的多克隆抗体。

29. 权利要求28的方法,其中所述免疫原性载体蛋白是选自下组的载体分子:来自双翅目病毒的纯化蛋白质衍生物、牛血清清蛋白、阳离子化的牛血清清蛋白、人血清清蛋白、卵清蛋白、和匙孔蛾血蓝蛋白。

30. 权利要求29的方法,其中所述来自双翅目病毒的纯化蛋白质衍生物是结核菌素。

31. 在测定样品中新烟碱类杀虫剂含量的免疫测定法中有用的试剂盒,其中所述试剂盒在一个或多个容器中包含下列组合:

(1)具有对所述新烟碱类杀虫剂有选择性的固定化抗体的固相,其中所述抗体对选自硝胺烯啶、吡虫清和噻虫啉的化合物具有选择性;

(2)包含缀合了新烟碱类半抗原的酶的酶缀合物。

32. 权利要求31的试剂盒,其中所述抗体是通过用缀合了免疫原性载体蛋白的新烟碱类半抗原免疫动物而生成的多克隆抗体。

33. 权利要求31的试剂盒,其中所述酶是辣根过氧化物酶。

用于新烟碱基杀虫剂的免疫测定法

发明领域

本发明涉及用于杀虫剂的免疫测定法，以及用于进行这种测定法的抗体和试剂。本发明还涉及进行这种测定法的方法，以及包含用于实践这种方法的试剂的试剂盒。本发明具体应用于样品中新烟碱类杀虫剂的检测和量化。

发明背景

杀虫剂

合成杀虫剂普遍用于控制农作物中的昆虫害虫。这种实践获得了高度的商业成功，因为这种控制可以显著的增加农作物的产量。但是，考虑到昆虫抗性以及环境和工人暴露的问题，杀虫剂的有效使用要求健全的管理。这个问题的一种解决方法是提供更加高度有活性的新杀虫剂，从而降低对过去急性毒性杀虫剂的需要，并降低环境负荷率。

在市场上正获得广泛认可的一类新杀虫剂是所谓的“新烟碱类”杀虫剂。这类化合物包括例如吡虫啉（imidacloprid）、吡虫清（acetamiprid）、和 thiamethoxam，分别描述于美国专利号 4,742,060、美国专利号 5,304,566、和 EP 580 553 A2。

用杀虫剂直接处理植物繁殖材料（诸如种子）的目标应用要求在单独应用或者联合叶或沟杀虫剂应用时降低环境和工人暴露以及害虫抗性建立。但是，必须当心，要确保正确校准了种子包被设备，使得杀虫剂均一的施加于种子材料，从而避免杀虫剂性能和种子植物毒性等等问题。分析测量可用于确定种子包被设备是否正确校准、是否正确操作、和处理的大批种子是否可以出货。但是，用于测定种子上杀虫剂残余量的传统方法是极其费时和费钱的，因为它们要求高度专业化和昂贵的分析流程，诸如气液层析或高效液相层析。这两种层析技

术都要求昂贵的设备，它们的维护也很昂贵，而且必须由高度熟练的技术人员进行操作。种子处理机构和种植者通常没有这种设备或人员，所以种子样品必须运到远方的分析实验室。当这些实验室以快速转变为基础而分析样品时，处理机构可能在出货后大约24小时收到分析数据。较慢的分析会导致更长的耽搁。这些耽搁导致包被机构的机器闲置很长时间。包被种子的运输同样招致耽搁。

本领域迫切需要改进现有测量技术，使之更加低廉、更加有效、且更加易于管理。期望的方法还应当可用于实验室以外的田间条件，从而能够快速且可靠的为种植者或种子处理机构提供关于种子样品上指定杀虫剂的存在和浓度的信息。在这点上，重要的是所述方法能够将有活性的杀虫物质与其它产物区分开来，从而能定量测定种子上存在的期望活性成份。但是，经典分析方法的许多严重限制仍然存在。其中的一些限制通过免疫测定法技术的使用将得到克服。

杀虫剂的免疫测定法和检测

尽管起初是为了医学和兽疫用途而开发了免疫测定法，然而它们已经开始在农业领域更多地应用。例如，免疫测定法可用于农作物病害、黄曲霉毒素、和某些抗生素的测定和量化。尽管在科学文献中已经描述了用于杀虫剂检测的免疫测定法（见下文），然而只是在过去的十年里才能够通过商业途径获得它们。

免疫测定法依赖高度特异性的抗体试剂和相对简单的分析仪器来检测和/或量化广泛的多种目标材料。抗体而非仪器或操作条件提供了分析的特异性。免疫测定法因此可用于相对粗制的样品。此外，已经为遥远的非实验室设置的使用优化了免疫测定法，使之能够像用于专门的实验室一样用于田间。

已知免疫学方法可用于检测某些除草剂，包括2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid)(J. Fleeker, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70: 874 - 878, 1986)、氯磺隆(chlorosulfuron)(M. Kelley等人, *J. Agric. Food Chem.*, 33: 962 - 965, 1985)、卤代乙酰胺

类 (haloacetamides) (P. A. Winzenburger等人, 欧洲专利发表物EP 340 198, 1989), 和多种杀虫剂, 包括氟脲杀 (diflubenzuron) (S. I. Wie等人, *J. Agric. Food Chem.*, 30: 949 - 957, 1982)、甲霜灵 (metalaxyl) (W. H. Newsome, *J. Agric. Food Chem.*, 33: 528 - 530, 1985)、和对硫磷 (parathion) (C. D. Ercegovich等人, *J. Agric. Food Chem.*, 29: 559 - 563, 1981)。已经描述了用于莠去净 (atrazine) 的免疫学检测的方法 (美国专利号 4, 530, 786)。还知道用于草净清 (cyanazine)、氯甲草 (diclofop-methyl)、五氯酚 (phentachlorphenol)、2, 4, 5-涕 (2, 4, 5-T)、和去草净 (terbutryn) 的免疫学测定法。

所有上述免疫学方法都利用得自用适当抗原 (免疫原) 免疫的宿主动物 (通常是兔) 的多克隆抗血清。最近, 公开了对莠去净及其衍生物和分解产物具有特异性的单克隆抗体 (mAb), 以及这些 mAb 在免疫测定法中的用途 (Schlaeppli等人, 欧洲专利发表物 EP 365 818, 1990)。

因为杀虫剂的分子量低, 所以它们不具有免疫原性, 在动物宿主中不引发特异抗体。因此, 杀虫剂免疫测定法的开发需要许多步骤, 由半抗原的设计开始, 即维持杀虫剂分子的结构特异性同时允许缀合较高分子量的免疫原性“载体”蛋白的杀虫剂衍生物。此外, 为了在生成过程中筛选抗体, 还可以制备化学结构与用于免疫动物的半抗原不同的其它半抗原。最后, 一旦获得抗体制剂 (多克隆或单克隆), 就必须建立足够灵敏的免疫测定法。

在许多参考文献中已经描述了现代免疫测定法的基本策略 (参阅例如 A. Voller等人编, 《*Immunoassays For The 80's*》(80年代的免疫测定法), University Park, 1981; A. Voller, “The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)” (酶联免疫吸收测定法), *Diagnostic Horizons*, 2: 1 - 7, 1978, Microbiological Associates Quarterly Publication (微生物学联合会季刊), Walkersville, MD.; A. Voller等人, *J. Clin. Pathol.*, 31: 507 - 520, 1978; J. E. Butler, *Meth. Enzymol.*, 73: 482 - 523, 1981; E. Maggio编, 《*Enzyme Immunoassay*》

(酶免疫测定法), CRC出版社, Boca Raton, Fla., 1980)。每一种方法的要点都是使用已知量的期望分析物生成校准曲线。

常用的“已标记抗体”方法称为酶联免疫吸附测定法(ELISA)。因此,使用与杀虫剂免疫原(生成针对它的抗杀虫剂抗体)中所用载体蛋白在结构上无关的蛋白质制备杀虫剂的蛋白质缀合物(称为“包被”或“筛选抗原”)。将包被抗原缀合物固定在固相支持物上,诸如微量板孔的表面,使得每个反应的固相杀虫剂的量是固定的。与待测样品一起加入已知量的抗体。固定化杀虫剂与未知样品中的游离杀虫剂竞争有限数目的抗体结合位点。抗体与液相中分析物之间的相互作用抑制抗体与固相杀虫剂的结合。通过缀合了酶且对抗杀虫剂抗体重链恒定区具有特异性的二抗检测结合于固相的抗体。可购得许多酶联二抗用于这种用途。洗掉未结合的二抗后,通常加入酶的显色底物,从而产生有色反应产物,而且与二抗的结合量成正比例,由此检测固定的二抗。由此,反应产物的量与未知样品中分析物的量成反比例。

“已标记抗体”方法的改进方法不需要使用包被抗原。酶免疫测定法(EIA)将抗杀虫剂抗体固定在固相上。将杀虫剂半抗原共价偶联酶,并将得到的酶缀合物与样品在用抗杀虫剂抗体包被的微量孔或培养管中一起保温。样品中的杀虫剂与杀虫剂半抗原-酶缀合物竞争与固定化抗体的结合。清洗固相以除去未结合物质,并加入显色底物来检测结合抗体的酶缀合物。参阅例如R. J. Bushway、L. P. Perkins、S. A. Savage、S. L. Lekousi、和B. S. Ferguson, “Determination of atrazine residues in water and soil by enzyme immunoassay”(通过酶免疫测定法来测定水和土壤中的莠去净残留), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 40: 647 - 654, 1988; J. R. Fleeker和L. W. Cook, “Reliability of commercial enzyme immunoassay in detection of atrazine in water”(商品化的酶免疫测定法用于检测水中莠去净的可靠性), 在M. Vanderlann、L. H. Stanker、B. E. Watkins、和D. W. Roberts编的《*Immunoassays for Trace Chemical Analysis*》(用于痕量化学分析的免疫测定法)一书中, ACS Symposium

Series 451 (ACS讨论会系列451), Washington, D.C., American Chemical Society (美国化学学会), 第78-85页, 1991。

农业领域需要用于分析用活性成份(诸如可用于田间或种子处理机构的杀虫剂)处理的种子的方法。

发明简述

本发明提供了用于生成抗新烟碱类抗体的新烟碱类半抗原和免疫原, 以及用于通过免疫测定法来测定样品中一种或多种新烟碱类杀虫剂的存在的抗体、方法、试剂、和试剂盒。本发明具体用于测定施用于植物繁殖材料(诸如种子)的新烟碱类杀虫剂的浓度。

本发明的免疫测定法使得将新烟碱类杀虫剂应用于种子的种子处理机构的工作人员能够定量测量所应用活性成份的量。该方法包括由种子快速提取活性成份和对提取液进行基于快速免疫测定法的测量。这些测量可用于确定种子包被设备是否正确校准、是否正确操作、和处理的大批种子是否可以出货。该测定法设计成易于操作, 只需要普通实验室设备和试剂。因此, 缺乏进行免疫测定法的专门技术的工作人员在少数实践试验后将能够成功的进行测试。

已经发现, 通过新烟碱类杀虫剂半抗原与载体分子的缀合, 诸如来自双翅目(Dipteria)病毒的纯化蛋白质衍生物(PPD, 结核菌素)、牛血清清蛋白、人血清清蛋白、卵清蛋白、和匙孔蛾血蓝蛋白与新烟碱类半抗原的缀合, 可生成抗原性新烟碱类缀合物(免疫原)。还可生成衍生化材料(诸如衍生化的牛血清清蛋白、阳离子化的牛血清清蛋白等)的缀合物。参阅A. Muckerheide、R. Apple、A. Pesce、和J. G. Michael, *J. Immunol.*, 138: 833-837, 1987。然后, 可以将这些免疫原注射到宿主动物中, 它们将生成针对新烟碱类半抗原的抗体, 并可进行收获。然后, 使用多种已知标记物来标记杀虫剂或抗体, 可以将这些抗体用于多种免疫测定法流程, 以检测相应的新烟碱类杀虫剂。在免疫测定法的一些实施方案中, 对新烟碱类杀虫剂衍生物或抗体进行固定。多克隆和单克隆抗体都可用于本发明的实践。抗体可显示选择性结合期望的新

烟碱类杀虫剂，甚至在存在其它杀虫剂活性成份时，包括掺入种子包被配方的其它新烟碱类杀虫剂时也是如此。

可用于实践本发明（即用于测量样品中的新烟碱类杀虫剂）的检测方法包括生物传感器和酶、荧光、化学发光、和放射性系统。这些测定法可使用异型或同型形式，而且可使用微孔板、培养管、和乳胶珠或颗粒作为固相。

本发明的免疫测定法可用于测定样品（诸如植物繁殖材料）中新烟碱类杀虫剂化合物的浓度，诸如吡虫啉、硝胺烯啶（nitenpyram）、吡虫清（acetamiprid）、噻虫嗪（thiamethoxam）、噻虫啉（thiacloprid）、和氯噻啶（clothiadin）。

发明详述

本发明提供了用于测试样品中新烟碱类杀虫剂的存在免疫测定法。在这种免疫测定法中，通过多种方法检测新烟碱类（抗原）/抗体反应，使用多种标记物来标记抗原或抗体，从而能够检测反应产物。此外，抗原或抗体的固定在许多情况中将便于检测。

抗原/抗体测定法通常可分成两类，异型的和同型的。异型测定法需要在检测反应产物前将结合的已标记成份与游离的已标记成份分开。同型测定法不需要这种分离步骤。所述测定法还可以是（1）竞争性的，例如抗原与固相抗原竞争已标记抗体或抗原与已标记抗原竞争固相抗体，或者（2）非竞争性的，标记物与抗体或抗原之间存在直接关联。

可用于实践本发明（即检测样品中的新烟碱类杀虫剂）的免疫测定法包括酶、荧光、化学发光、和生物传感器免疫测定法，以及放射性免疫测定法。在酶联免疫测定法（ELISA）中，依照本发明，可以直接用酶标记对应于目的新烟碱类杀虫剂的半抗原，或者间接使用在适当条件下催化与底物发生反应的酶标记抗体。通常通过有色反应产物的形成（即易于通过眼睛检测或者通过分光或反射手段测量的有色终点）来检测酶活性。

在用于本发明的荧光免疫测定法技术中，可以用荧光色素直接标记对应于目的新烟碱类杀虫剂的半抗原，或者间接使用荧光色素标记

的抗体。荧光色素是吸收放射（如紫外线）、由此激发、并发光（如可见光）的染料。

在本发明的一个实施方案中，用于测定样品中新烟碱类杀虫剂浓度的方法包括下列步骤：

- (1) 提供具有对所述新烟碱类杀虫剂具有选择性的固定化抗体的固相；
- (2) 在存在已知量的新烟碱类杀虫剂半抗原-酶缀合物时，使所述样品接触固定化抗体；
- (3) 清洗步骤(2)的固相，以除去任何未结合的半抗原-酶缀合物或样品；
- (4) 使对所述半抗原-酶缀合物具有特异性的显色底物与步骤(3)的经清洗固相发生反应，以生成色素原；并
- (5) 测量由步骤(4)生成的色素原的量，以测定结合抗体的半抗原-酶缀合物的量，由此得到所述样品中新烟碱类杀虫剂的量。

在一个实施方案中，以试剂盒的形式提供免疫测定法，所述试剂盒包含已用抗体包被的管、新烟碱类半抗原-酶缀合物、酶底物、和用于终止比色信号生成的溶液。

尽管本发明参照多克隆抗体的使用进行了描述，然而本领域技术人员也将认识到，单克隆抗体可代替多克隆抗体使用。在用于本文时，术语“抗体”一般性地指多克隆抗体或单克隆抗体。

用于实践本发明的针对新烟碱类杀虫剂的单克隆抗体是使用本领域众所周知的免疫和杂交瘤培养技术生成的。优选通过将抗体生成细胞与衍生自鼠物种的骨髓瘤细胞融合来生成合适的杂交瘤细胞系。抗体生成细胞优选脾细胞。可使用任何合适的骨髓瘤细胞系，但是使用较好表征的细胞系比较理想，它们中的许多是常用的。

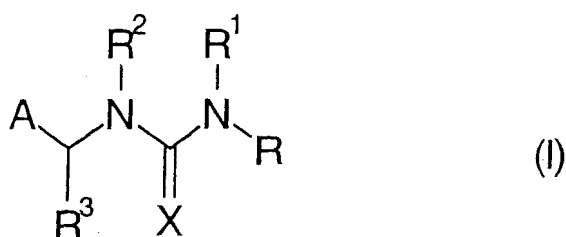
同样，用于实践本发明的针对新烟碱类杀虫剂的多克隆抗体也可使用本领域技术人员知道的技术而生成。

本发明还提供了可结合至少一种新烟碱类杀虫剂的多克隆IgG抗体制剂，该抗体制剂是通过包括下列步骤的方法生成的：(1) 对宿主施用预定量的组合物，所述组合物包含偶联了生物学可接受载体蛋白的

新烟碱类杀虫剂或免疫学等同物，(2)由宿主收集血清，并(3)由血清纯化IgG抗体。抗原的免疫学等同物在导入宿主后有能引起针对该抗原的抗体的生成。

如上所述，本发明的免疫测定法具体用于检测应用于植物繁殖材料的新烟碱类杀虫剂的量。术语“植物繁殖材料”理解为指植物的所有生殖部分，诸如可用于繁殖植物的种子，和营养性植物材料，诸如插条和块茎（例如马铃薯）。可以提到的有例如种子（严格意义）、根、果实、块茎、鳞茎、根状茎、和植物部分。还可以提到的有发芽或出土后将要移植的发芽植物和幼小植物。可以通过完全或部分浸没处理而在移植前保护这些幼小植物。

在一个实施方案中，可通过本发明测定法检测的新烟碱类杀虫剂由如下通式表示



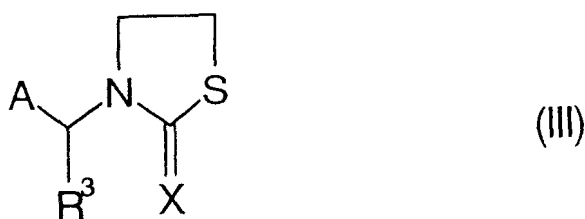
其中 A 是 2-氯吡啶-5-基或 2-氯噻唑-5-基；

R 和 R³ 独立地是氢或 C₁-C₄ 烷基；

R¹ 和 R² 独立地是氢或 C₁-C₄ 烷基，或者 R¹ 和 R² 与它们所连接的氮原子一起形成咪唑烷或噁二嗪环；且

X 是 N-NO₂ 或 N-CN。

在另一个实施方案中，可通过本发明测定法检测的新烟碱类杀虫剂由如下通式表示



其中 A、R³、和 X 的定义与上文通式 I 相同。

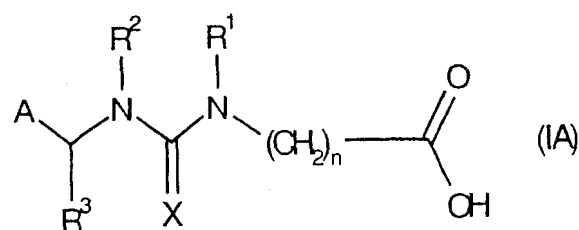
在优选的实施方案中，本发明的免疫测定法采用针对新烟碱类杀虫剂的多克隆抗体。这些抗体可以由经免疫动物的血清获得。可以通过将免疫原（半抗原-PPD抗原性缀合物）注射到抗体生成物种（通常是哺乳动物，优选兔或绵羊）中来实现免疫。通常，初始注射之后进行一系列的加强注射，使抗体应答最大化。理想的是，注射方案是给予雌性新西兰白兔以多剂量。免疫原的注射量可以变化，但应足以引发可检测量的抗体。可以通过使用EIA、ELISA、或间接荧光免疫测定法分析得自试验采血的血清来检验抗体生成。

用于已知免疫度量测定法的相同标记物可用于标记用于本发明的半抗原。其中，可以提及的有报告分子(RM)，包括酶，诸如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、和β-半乳糖苷酶。另外，可以使用荧光、发光、或放射性标记物，诸如荧光素、罗丹明、鲁米诺、吡啶鎓盐、和放射性同位素¹²⁵I等，或者胶状颗粒，诸如金和硒等。最后，铜系螯合物荧光团，诸如铈和铽，可用于生成时间分辨荧光信号。最常用的酶标记物是辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶。

在一个实施方案中，将分光光度计用于检测样品中新烟碱类的量。但是，本领域技术人员可以改动本发明的方法，以用于其它类型的产色检测仪。相似的，可检测反应产物不限于生色团，而包括上文所述其它标记物。

已经发现，具有下列通式(IA)、(IB)、和(IIA)的半抗原可用于生成抗原性新烟碱类缀合物（免疫学）和测定缀合物：

半抗原(IA)



其中 A 是 2-氯吡啶-5-基或 2-氯噻唑-5-基;

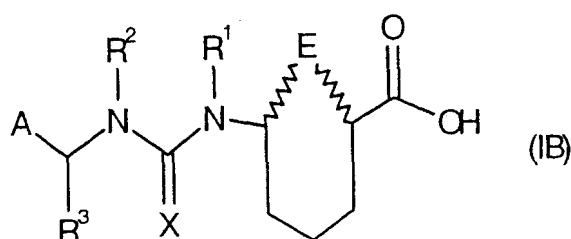
R^3 是氢或 $C_1 - C_4$ 烷基;

R^1 和 R^2 独立地是氢或 $C_1 - C_4$ 烷基, 或者 R^1 和 R^2 与它们所连接的氮原子一起形成咪唑烷或噁二嗪环;

n 是 1-5 的整数, 优选 3-5 的整数; 且

X 是 O、N-NO₂、或 N-CN.

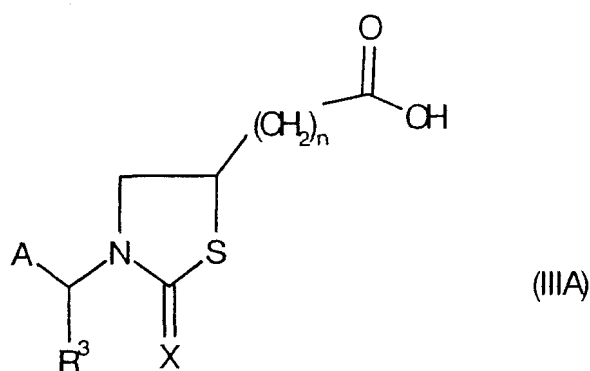
半抗原 (IB)



其中 A、 R^1 、 R^2 、 R^3 、和 X 的定义与通式 IA 相同; 且

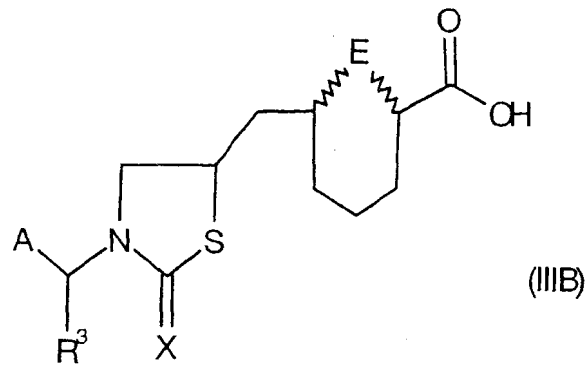
E 是共价单键或具有通式 $-(CH_2)_m-$ 的连接模块, 其中 m 是 1-3 的整数。

实例 1: 半抗原 (IIIA)



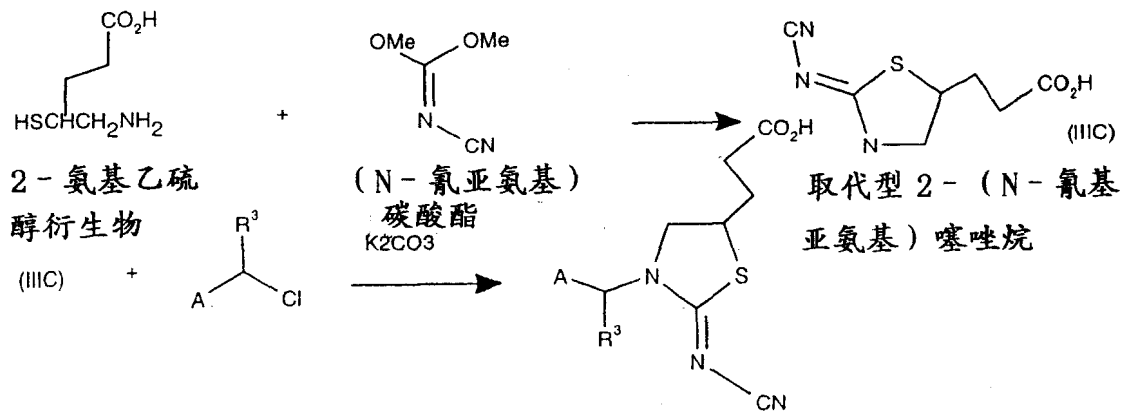
其中 A、 R^3 、X、和 n 的定义与通式 IA 相同。

半抗原 (IIIB)

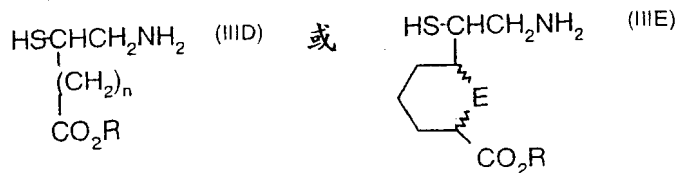


其中 A、R³、和 X 的定义与通式 IA 相同，E 的定义与通式 IB 相同。

可以如下方法学类似的制备具有通式 (IIIA) 和 (IIIB) 的半抗原：

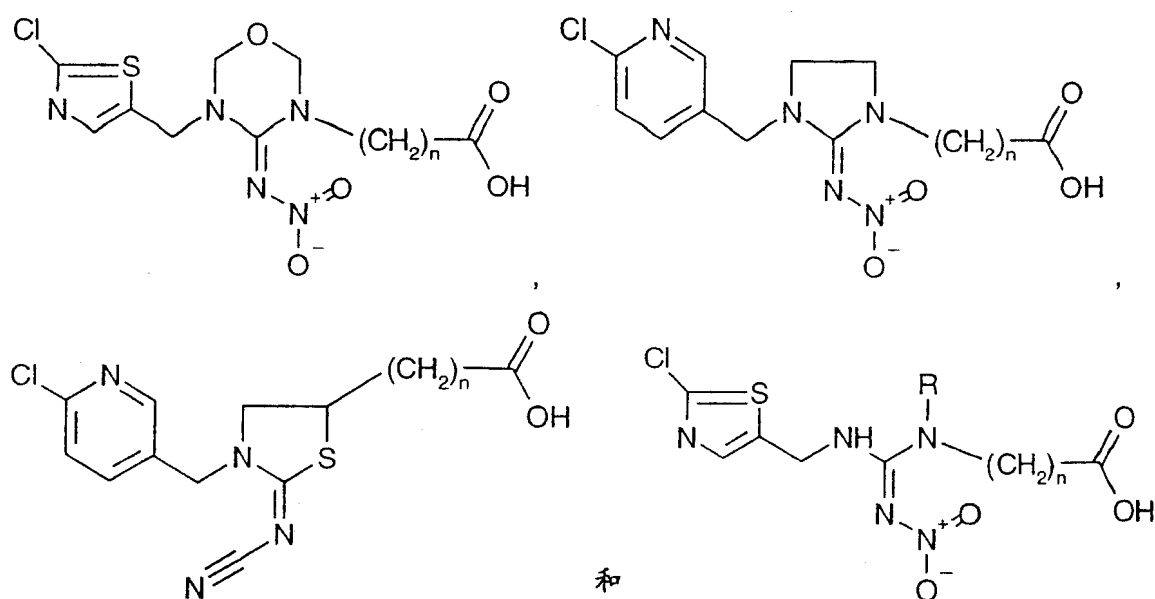


使用选自具有下列通式的化合物的适当 2-氨基乙硫醇衍生物来制备期望半抗原 (IIIA) 或 (IIIB)：



其中 R 具有上文通式 (I) 中给定的含义。

已经发现，下列半抗原在本发明的实践中特别有用：



其中每种情况中的 n 是 1-5 的整数, 优选 3-5 的整数。

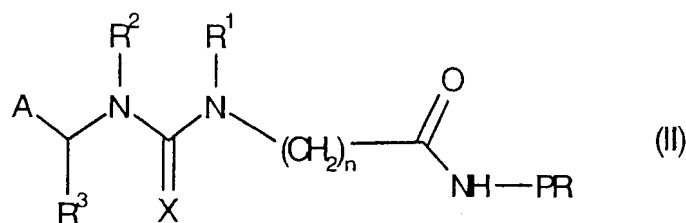
根据具体情况, 使用本领域技术人员知道的技术, 通过新烟碱类杀虫剂半抗原与载体分子或报告分子的缀合可生成抗原性新烟碱类缀合物(免疫原)和测定缀合物。采取了两种基本方法。第一种方法使用成为缀合物一部分的接头。这些接头是同型双功能的或异型双功能的, 包括能够通过底物蛋白质中半胱氨酸模块的硫醇基形成例如二硫键的接头, 或者能够在 N 末端氨基或氨基侧链或赖氨酸残基与活化后的酰基(诸如琥珀酰亚胺酯)之间形成酰胺键的接头。一般而言, 这种方法涉及接头上的高度反应性官能团, 而且对于缀合底物是相当容易的。但是, 通常采用反应性较低的官能团, 诸如能够形成脎的官能团。

在缀合两种蛋白质模块时特别有用的第二种方法是使用脱水剂(诸如碳二亚胺)来实现例如通过缀合物一个成员上的羧基与另一个成员上的游离氨基的反应而形成新肽键。在这种情况下, 试剂不成为缀合物的一部分。这种反应不是特别容易, 因为羧基没有活化; 碳二亚胺提供了活泼的中间物, 并通过除去水元素来转移平衡, 从而形成肽键。

这两种缀合方法通常都是在水溶剂中进行的, 因为形成缀合物的蛋白质材料易于变性。将蛋白质设计成在水环境中是稳定的, 且知道

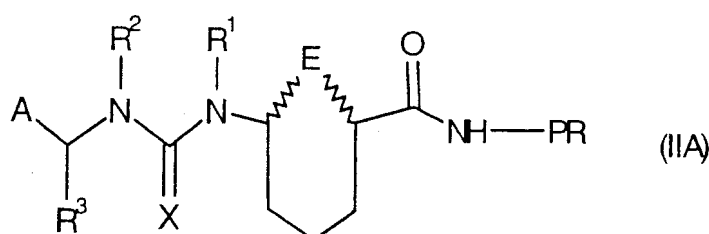
甚至在诸如乙醇（被认为与水介质相当相似）等溶剂中发生变性。同样，蛋白质缀合物成份倾向于在非水溶剂中相对不溶。

已经发现，具有下列通式的半抗原缀合物可用于实践本发明：



其中 A、R¹、R²、R³、n、和 X 具有上文通式 (IA) 中给定的含义，且 PR 指蛋白质残基：(1) 载体分子，诸如来自双翅目病毒的纯化蛋白质衍生物（PPD，结核菌素）、牛血清清蛋白、人血清清蛋白、卵清蛋白、或匙孔蛾血蓝蛋白（在免疫原的情况下），或者 (2) 报告分子 (RM)，诸如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、和 β-半乳糖苷酶。

另外，具有下列通式的半抗原缀合物同样有用：



其中 A、R¹、R²、R³、E、和 X 具有上文通式 (IB) 中给定的含义。

已经发现，下列缀合物在本发明的实践中特别有用：

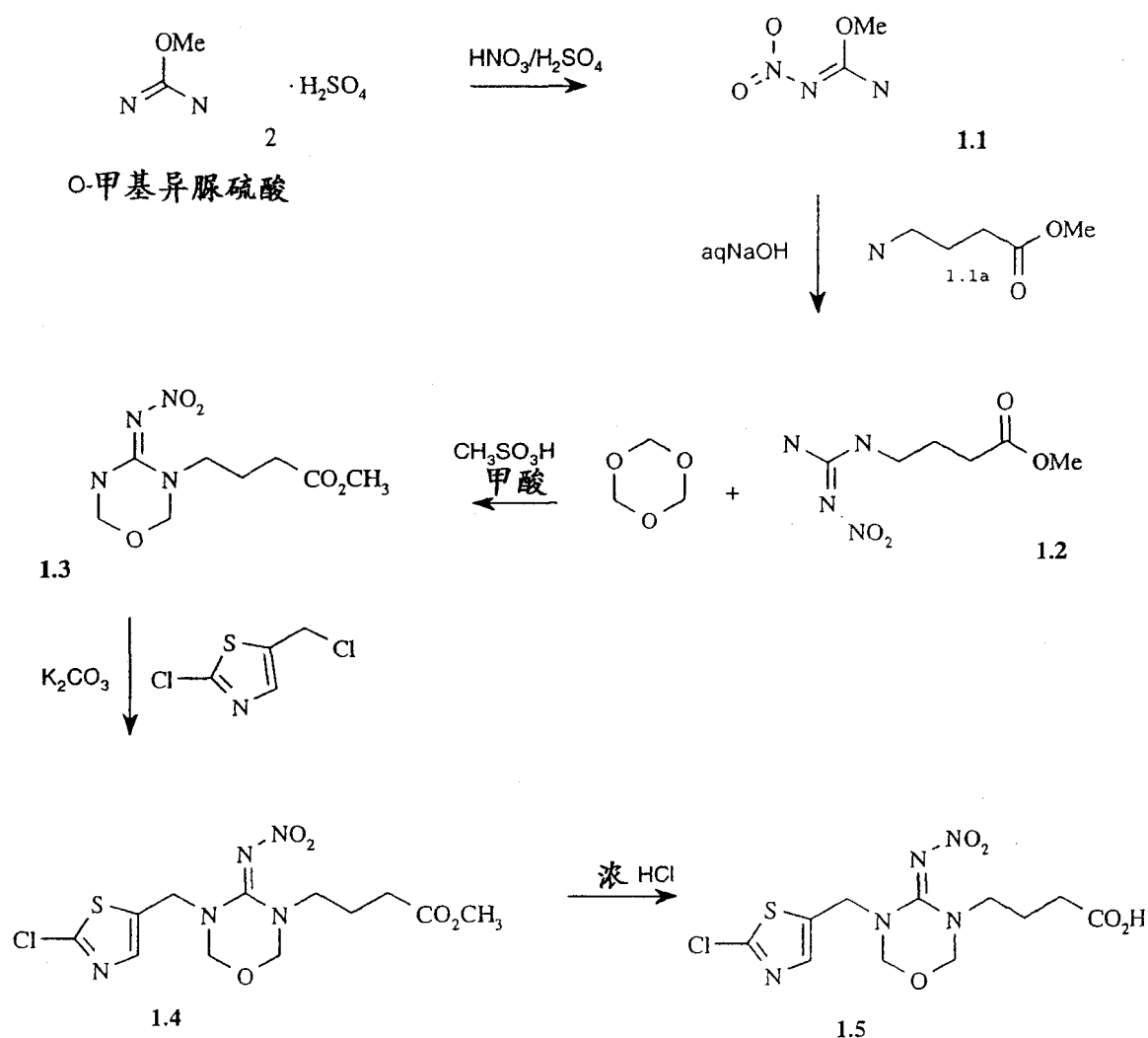
如5-100克芸苔 (canola) 种子; 来自10-200克高粱、小麦、棉花、大田玉米 (field corn)、或甜玉米种子) 的种子代表性小样散布在合适溶剂 (诸如丙酮、乙腈、乙醇、异丙醇、甲醇、或这些溶剂与水的各种百分比混合物) 中。合适的溶剂-水混合物包括例如1-50% MeOH/H₂O和1-20% 乙腈/H₂O。通过旋涡震动混匀散布的种子, 然后置于超声浴达大约20分钟, 随后再次旋涡震动。等待内含物沉降下来。取已知量的液态提取物, 并加到已知量的溶液 (例如1% 乙腈/水) 中。将提取物进一步稀释, 使得提取的新烟碱类的浓度落在校准曲线的范围内。发现1000-60000倍的稀释是有用的。免疫测定法需要大约35分钟完成。用于分析的提取物的提取和制备需要大约30分钟。因此, 可以在大约1小时5分钟内提取并分析种子样品。在一个实施方案中, 可以一次分析多达2份种子样品, 每份种子样品多达5份小样。

依照本发明, 在免疫测定法中可检测到的新烟碱类杀虫剂浓度大约1万PPM (PPM: 百万分之一) - 0.5PPB (PPB: 十亿分之一)。但是, 该方法适用于存在的任何量的新烟碱类杀虫剂, 只要样品或样品提取物中新烟碱类杀虫剂的量落在或经过适当稀释后落在校准曲线的范围内。

下文非限制性实施例更详细的例述了抗原的制备、多克隆抗体的生成、和免疫测定法。

实施例

实施例1: thiamethoxam半抗原的合成流程



1.1 2-甲基-1-硝基异脲

于0℃将0-甲基异脲硫酸盐(38.5g)溶于硝酸(120ml)/硫酸(280ml)混合液,并于0℃搅动2小时。小心的将混合液倒到碎冰上并搅动,然后过滤除去碎冰。将针状晶体溶于乙酸乙酯,并加入碳酸钾使溶液变成碱性。将溶液在硫酸镁表面上干燥,并过滤。将滤出液浓缩,产生白色粉末(5g)。

1.2

由3g 4-氨基丁酸甲酯盐酸盐(1.1a)和15ml水配制溶液。逐滴加入2N NaOH将pH调至11,同时将溶液在冰浴中冷却。给反应瓶装备pH电极和温度计,快速搅动得到的澄清、碱性溶液,同时小量加入2-甲基-1-硝基异脲(2.38g),将溶液的温度维持在2℃以下。加完后,将

反应液于0℃搅动1.5小时；注意pH稳定在9.6。加入THF（1ml），再次搅动2小时。用水稀释反应液，并倒到乙酸乙酯上。将有机相分开后，将有机级分在硫酸镁表面上干燥，并将溶液过滤。将滤出液浓缩，产生澄清的油。将粗制油在硅胶上闪式层析，用3:1的二氯甲烷/乙腈洗脱，得到750mg期望产物，为白色固体。

1.3

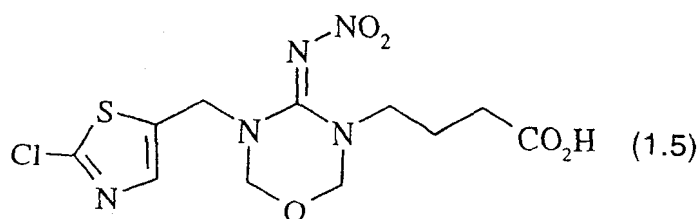
将来自1.2的产物（1.44g）与低聚甲醛（422mg）、甲磺酸（0.023ml）、和甲酸（10ml）混合，并于55℃加热15小时。真空浓缩反应液。将得到的褐色油悬浮于甲苯，并将溶液共沸汽提至干燥。将得到的油溶于1:1:1的THF/二噁烷/乙腈，并用过量重氮甲烷处理。搅动该溶液达30分钟，并用乙酸处理反应液。将反应液浓缩成油。将油在乙酸乙酯中重溶，用稀的碳酸氢钠溶液清洗，在硫酸镁上干燥，并再次浓缩成油。通过在3:1的二氯甲烷/乙腈中的闪式层析纯化该油，产生658mg期望的噁二嗪胺丁酯（1.3），为澄清油。

1.4

将1.3的产物（1.1g）溶于乙腈（50ml），并加入3g碳酸钾。一次性加入氯甲基氯噻唑，并将反应混合液于55℃加热20小时。将反应混合液冷却至室温，并过滤除去固相。将得到的褐色滤出液浓缩成油。通过在3:1的二氯甲烷/乙腈中的闪式层析纯化油，产生894mg期望化合物，为黄色/褐色油。

1.5

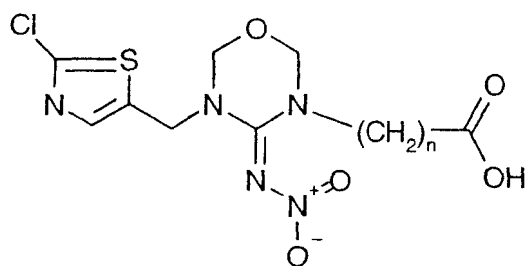
将1.4的化合物（372mg）溶于8ml浓HCl和1ml水，并于室温搅动6小时。用水稀释反应混合液，并小心加入1N NaOH使之碱化，直至pH达到4.5。用乙酸乙酯萃取，并在硫酸镁上干燥有机级分。将干燥后的有机级分浓缩成油，并通过在1:1的二氯甲烷/乙腈中的闪式层析进行纯化，产生100mg期望产物1.5。



实施例2 - 5: thiamethoxam半抗原

将实施例1的合成方法学用于制备表1所示的下列thiamethoxam半抗原, 其中用具有通式 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{R}$ (1.1b) (其中n是1-5的整数, R是H或 $\text{C}_1 - \text{C}_4$ 烷基)的适当类似化合物代替中间物1.1a进行。

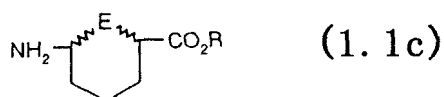
表 1



实施例	n
2	1
3	2
4	4
5	5

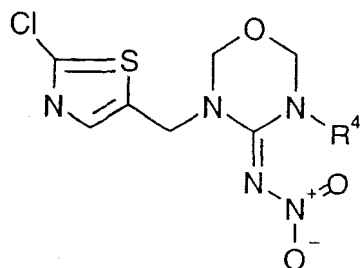
实施例6 - 9: thiamethoxam半抗原

将实施例1的合成方法学用于制备表2所示的下列thiamethoxam半抗原, 其中用具有通式



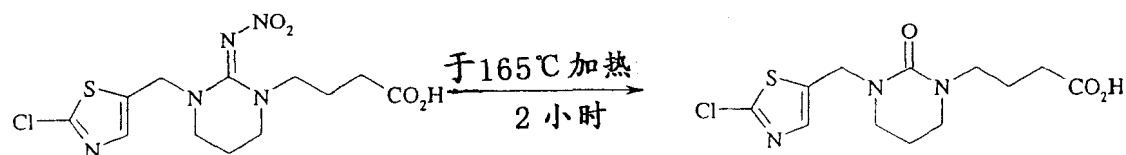
其中E是共价单键或连接模块 $-(\text{CH}_2)_m-$, 其中m是1-3的整数; R是H或 $\text{C}_1 - \text{C}_4$ 烷基的适当类似化合物代替中间物1.1a进行。

表 2



实施例	R ⁴
6	
7	
8	
9	

实施例10: 去硝基亚氨基thiamethoxam半抗原的合成流程



流程:

在装备了磁力搅拌棒和回流冷凝器的10ml圆底烧瓶中混合thiamethoxam-丁酸半抗原(100mg, 0.275mmol)和茴香醚(6.5ml)。将烧瓶置于油浴中,并于165℃加热2小时。在低压下于50℃5小时除去茴香醚。根据HPLC分析,得到的油产物(90.2mg)的纯度是93%。

用于表征的光谱数据:

HPLC: Keystone Scientific Aquasil C-18 5u(20x0.46cm); 乙腈:20mM 磷酸 (40:60) ; 1.0ml/min; T = 40℃; UV @ 240nm (BW = 100nm) ; 运行时间: 13min; 保留时间: 4.6min.

TLC: (二醇凝胶) 二氯甲烷/乙腈, 2:1 Rf = 0.25.

$^1\text{H NMR}$ (CD_3CN , 300MHz) : δ 7.43 (t, 1H), 4.78 (s, 4H), 4.75 (s, 4H), 4.48 (d, 2H), 3.29 (t, 2H), 2.27 (t, 2H), 1.73 (q, 2H).

EI/DEP 质谱: m/z 319 (M⁺).

燃烧分析:

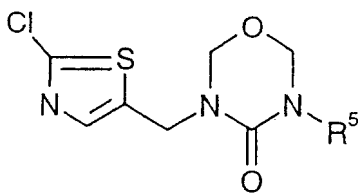
理论值: C, 41.32; H, 4.41; N, 13.14;

实测值: C, 40.13; H, 4.43; N, 12.99.

实施例11-18: 去硝基亚氨基thiamethoxam半抗原

将实施例10的合成方法学用于制备表3所示的下列去硝基亚氨基thiamethoxam半抗原, 其中用实施例2-9的适当类似化合物代替实施例1中得到的化合物进行。

表 3

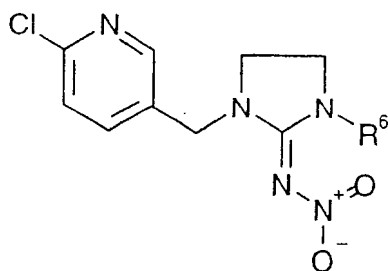


实施例	R^5
11	$-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
12	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
13	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
14	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
15	
16	
17	
18	

实施例19 - 27: 吡虫啉半抗原

将实施例1的合成方法学用于制备表4所示的下列吡虫啉半抗原, 其中使用1.2中得到的硝基胍衍生物或通过用实施例2-9所示具有通式1.1b或1.1c的适当类似物代替中间物1.1a而获得的其类似物进行。

表 4

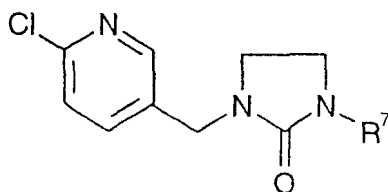


实施例	R^6
19	$-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
20	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
21	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
22	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
23	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
24	
25	
26	
27	

实施例28 - 36: 去硝基亚氨基吡虫啉半抗原

将实施例10的合成方法学用于制备表5所示的下列去硝基亚氨基吡虫啉半抗原，其中用实施例19 - 27的适当类似化合物代替实施例1中获得的化合物进行。

表 5

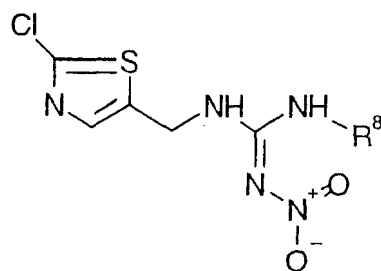


实施例	R ⁷
28	-CH ₂ CO ₂ H
29	-CH ₂ CH ₂ CO ₂ H
30	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CO ₂ H
31	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CO ₂ H
32	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CO ₂ H
33	
34	
35	
36	

实施例37 - 45: 氯噻啉半抗原

将实施例1的合成方法学用于制备表6所示的下列氯噻啉半抗原，其中使用1.2中得到的硝基胍衍生物或通过用实施例2 - 9所示具有通式1.1b或1.1c的适当类似物代替中间物1.1a而获得的其类似物进行。

表 6

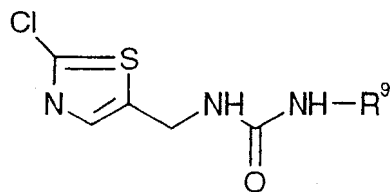


实施例	R^8
37	$-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
38	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
39	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
40	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
41	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
42	
43	
44	
45	

实施例46 - 54: 去硝基亚氨基氯噻啶半抗原

将实施例10的合成方法学用于制备表7所示的下列去硝基亚氨基氯噻啶半抗原, 其中用实施例37 - 45的适当类似化合物代替实施例1中获得的化合物进行。

表 7

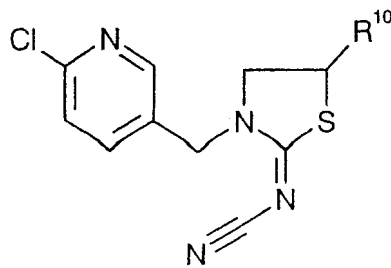


实施例	R^9
46	$-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
47	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
48	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
49	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
50	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
51	
52	
53	
54	

实施例55 - 63: thiacloprid半抗原

将专门用于具有通式IIIIA和IIIB的半抗原的合成方法学用于制备表8所示的下列氯噻啉半抗原。

表 8



实施例	R^{10}
55	$-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
56	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
57	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
58	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
59	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
60	
61	
62	
63	

实施例64: thiamethoxam免疫原的制备

64.1

在0.01M PBS pH7.4中配制浓度为1mg/ml的纯化蛋白质衍生物(结核菌素, PPD)溶液。用0.1M HCl将该溶液(0.5ml)的pH调至4.5-5.0。

64.2

将来自实施例1的thiamethoxam半抗原(1mg)溶于250 μ l 0.1M 2-(N-吗啉代)-乙烷磺酸pH4.5。混合半抗原和PPD溶液。

64.3

将1mg 1-(二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶于100 μ l蒸馏过的去离子水。立即将EDC溶液加到3.2的半抗原-PPD溶液中。于室温旋转2小时,以混合半抗原-PPD-EDC溶液。将反应混合液转移到截留分子量1000-2000道尔顿的透析袋中。在2升PBS中于4℃彻底透析,每天换液三次,达48小时。

实施例65: 吡虫啉免疫原的制备

将实施例64的方法学用于制备吡虫啉免疫原,其中使用实施例21的半抗原。

实施例66: 氯噻啉免疫原的制备

将实施例64的方法学用于制备氯噻啉免疫原,其中使用实施例39的半抗原。

实施例67: thiacloprid免疫原的制备

将实施例64的方法学用于制备thiacloprid免疫原,其中使用实施例57的半抗原。

实施例68: 免疫方案和抗体收获

对于初始免疫,将实施例64的免疫原溶于弗氏完全佐剂。接种雌性新西兰白兔。每个位点注射大约25 μ g免疫原。相似的免疫绵羊,只是每个位点注射大约38 μ g免疫原。

在随后的免疫中,将免疫原溶于弗氏不完全佐剂。在各免疫之间让动物休息4周,并在免疫后10天采血。

对动物执行加强注射和采血达9个月,此时将它们放血。

使用本领域技术人员知道的技术来收获多克隆抗体。

实施例69: 半抗原-酶缀合物的制备

69.1

在小瓶中混合来自实施例1的thiamethoxam半抗原(3.1mg)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)(4.0mg)、和EDC(4.6mg)。将这些物质在柔和氮流下于室温干燥15分钟。

69.2

加入无水二甲基甲酰胺(2.0ml),并将混合液超声处理1分钟。将得到的溶液于室温保温过夜。

69.3

在小瓶中将辣根过氧化物酶(8.5mg)溶于碳酸盐缓冲液(2.0ml, 0.05M, pH9.6)。将小瓶置于冰浴中。

69.4

在1小时的时间里缓慢加入合计100 μ l来自6.2的半抗原-NHS-EDC溶液,并将混合液保温2小时,同时搅动。

将反应混合液流过用PBS(0.01M, pH7.2)平衡的Sephadex G-25柱。在最初的3.0ml洗脱液中收集酶缀合物,并加入等体积的甘油;保存于-20 $^{\circ}$ C。

实施例70: 用thiamethoxam处理的芸苔种子的免疫测定法

将一部分种子提取物在1% MeOH/H₂O中稀释,直至thiamethoxam的预期浓度落在校准曲线的范围内,即0.5 - 120 PPB。给抗体包被管贴上标签,并置于管架上,其中第一根和最后一根管是标准,将剩余的标准品与样品混合。管架紧握每一根管,使得可以颠倒管架而管不会掉落。将一部分标准或样品(0.5ml)加到所有相应管中。将酶缀合物溶液(0.5ml)加到所有管中。温和摇动管架以混合所有管中的内含物。将管于室温保温20分钟。将管架颠倒以倒出所有管中的内含物。用翻转洗瓶将蒸馏水加到所有管中至溢出,并倒出洗涤液。将管再次清洗3次。最后一次清洗后,将管架颠倒,并将管在干净的纸巾上轻轻扣击,以除去过量洗涤液。将酶底物(0.5ml)加到所有管中,并于室温保温10分钟。在此保温过程中,每2.5分钟温和摇动管架。将酸性终止液(1M HCl, 0.5ml)加到所有管中以终止信号生成。如表10所示,于450nm

测量反应产物的吸光度。将标准的吸光度用于绘制校准曲线，为 $Y=m\ln(X)+B$ 的回归函数形式。将每份样品的吸光度代入函数，以测定稀释样品中新烟碱类杀虫剂的浓度。将得到的浓度乘以稀释因数，以计算原始样品中新烟碱类杀虫剂的含量。

表 10: thiamethoxam 免疫测定法的典型标准曲线

¹ thiamethoxam 的浓度	于 450nm 的吸光度 (分析应答)
120	0.3145
20	0.6636
3	1.0283
0.5	1.3618

¹单位是PPB。

描述 thiamethoxam 标准的应答的函数是通过回归分析生成的。这批数据生成标准曲线 $Y=-0.191\ln(X)+1.23$, $r=-0.999$, 其中 Y 是分析应答, X 是 thiamethoxam 标准的浓度。

实施例 71: 用 thiamethoxam 处理的农作物种子的交叉反应性测试

71.1 种子的提取

通过在 8 盎司广口瓶中随机加入 50g 棉花、大田玉米、高粱、甜玉米、和小麦或 40g 芸苔，对处理后种子的样品进行二次抽样。对芸苔进行 4 次二次抽样；其它种子类型使用 5 份小样。加入溶剂 (150ml)，并紧紧的封上盖。用 5% 乙腈/水提取棉花，其它种子使用 20% 甲醇/水溶剂系统。用手有力摇动广口瓶 30 秒钟，并置于超声水浴中于室温 20 分钟。如上所述再次摇动样品。静置 5 分钟等待每个广口瓶中的内含物沉降下来，并取一部分 (0.10ml) 用于分析。将这部分在 1% 甲醇/水中稀释，使得残余落在标准曲线的范围内。

71.2 免疫测定法分析

给用抗体包被的聚苯乙烯培养管贴上标签，并置于管架上，其中第一根和最后一根管是标准，将其它标准和样品混合。将样品和标准溶液 (0.5ml) 加到相应管中。加入相似体积的酶混合物溶液。温和摇

动管架以混合溶液，并于室温保温20分钟。将管架在不锈钢盘上颠倒以除去所有管中的内含物。清洗每根管，即加入蒸馏水至溢出。将管架在水槽中颠倒以倒出洗涤液。重复清洗4次。然后将管架颠倒，并将管在干净的纸巾上轻轻扣击，以除去大部分残余洗涤液。（管中残余的一些液体不会影响测定结果。）将酶底物溶液（0.50ml）加到管中，并于室温保温10分钟。每2.5分钟温和摇动管架，使得酶得到充足的底物供给。加入酸性终止液（0.5ml）以终止蓝色信号的生成。通过分光光度法于450nm测量每根管中溶液的吸光度。由形式为 $Y=m\ln(X)+b$ 的回归函数测定样品中分析物的浓度。

71.3 交叉反应性测定

评估免疫测定法的交叉反应性或特异性，以确定在种子包被中发现的其它测试物是否干扰thiamethoxam的测量。将测试物溶于1%甲醇/水至浓度范围1000 - 0.01ng/ml。如上所述由每个浓度取一部分进行分析。如以前J. F. Brady、J. Turner、D. H. Skinner, "Application of triasulfuron enzyme immunoassay to the analysis of incurred residues in soil and water samples"（醚苯磺隆酶免疫测定法用于分析土壤和水样品中遭受的残余的应用），*J. Agric. Food Chem.*, 43: 2542 - 2547, 1995中所述测定该范围内每份测试物的反应性。

71.4 结果

在分析的测试物中，发现只有thiamethoxam与免疫测定法有显著反应性（下文表9）。因此，这种免疫测定法对thiamethoxam是特异的。

通过免疫测定法和HPLC分析处理批次种子的小样。表11显示了这些分析的结果。表11列出了对40份种子样品针对thiamethoxam进行多克隆抗体和HPLC分析获得的平均免疫测定法结果的相关性。最佳拟合回归线指示每种方法都得到相似结果。

表 9: thiamethoxam 免疫测定法的交叉反应性	
测试物	¹ 反应性相对于 thiamethoxam 的百分比
thiamethoxam	100
氯噻啉	<0.1
吡虫啉	² NR
毒死蜱 (chlorpyrifos)	NR
噁醚唑 (difenoconazole)	NR
氟噁菌 (fludioxonil)	NR
五氯硝基苯	NR
甲霜灵	NR
mefenoxam (<i>R</i> -甲霜灵)	NR
肟草安 (fluxofenim)	NR
萎锈灵 (carboxin)	NR
克菌丹 (captan)	NR
腈菌唑 (systhane, myclobutanil)	NR
TCMTB	NR
primifos-methyl	NR
甲基硫菌灵 (thiophanate-methyl)	NR
¹ 表述成测试物反应性相对于 thiamethoxam 的反应性的百分比。	
² NR, 无反应性。	

本领域技术人员将认识到,可以对上述发明进行许多变更和修改,而不脱离广泛描述的本发明的精神或范围。

表 11: 通过免疫测定法和 HPLC 获得的分析结果的比较。

种子类型	样品	发现的 thiamethoxam (PPM)					HPLC	
		免疫测定法 ¹ 平行分析	免疫测定法 ¹ 平均值	免疫测定法 ¹ 平行分析	免疫测定法 ¹ 平均值	免疫测定法 ¹ 平行分析		
芸苔	294642	3517	2586	3403	4139	4327	3594	3724
	294681	4191	3416	3643	3591	4718	3912	3915
	294682	3034	3299	2687	3534	4254	3362	3769
	294683	3264	3104	3614	3860	3445	3457	3875
	294684	2761	3367	3617	3685	3409	3368	3920
高粱	294643	1659	1865	1662	1661	1929	1755	1732
	294643	1613	1654	1678	1771	1998	1743	1732
	294685	1348	1855	1601	1984	1979	1753	1853
	294686	1717	2054	1966	1981	1980	1940	1870
	294687	1943	1880	2244	1767	2165	2000	1861
294688	1972	1821	1746	1864	1626	1806	1923	
小麦	294644	651	664	611	573	612	622	624
	294689	628	688	684	569	741	662	712
	294689	690	732	655	753	710	708	712
	294690	930	817	690	794	898	826	745
	294691	757	565	625	700	806	691	731
294692	1057	994	893	740	845	906	731	
294692	915	861	604	658	599	727	731	

¹ 通过免疫测定法对每份样品进行平行分析 (5 份)。通过回归分析将每份样品的所有免疫测定法分析的平均值与样品的 HPLC 结果进行比较。这生成了回归函数 $Y=1.00X+10.9$, $r=0.976$, $N=40$, 其中 Y 是通过免疫测定法发现的 thiamethoxam PPM 浓度, X 是通过 HPLC 发现的 thiamethoxam PPM 浓度。

表 11: 通过免疫测定法和 HPLC 获得的分析结果的比较(续)。

种子类型	样品	发现的 thiamethoxam (PPM)					HPLC	
		免疫测定法 ¹ 平行分析		¹ 平均值				
棉花	294645	2149	2091	2309	2320	2505	2275	2694
	294677	2774	2477	2602	3369	3329	2910	2829
	294678	2220	3587	2945	2870	2853	2895	2907
	294679	2427	3275	2471	2795	2538	2701	2757
	294680	1967	2006	2255	2056	2119	2080	2933
	294680	2963	2750	2510	2934	2481	2728	2933
	294645	2115	2576	2865	3146	2649	2670	2694
甜玉米	298296	469	428	364	375	455	418	390
	298297	750	390	480	514	499	527	397
	298298	554	--	476	426	481	484	368
	298299	456	440	377	412	387	414	372
	298300	448	343	375	388	410	393	385
	298301	3931	3625	4350	4083	4485	4095	3640
	298302	4854	5058	4558	4286	5237	4798	4189
	298303	3431	3587	3176	3835	4296	3665	3657
298304	5379	5428	4246	4084	3697	4567	3792	
298305	3107	4301	2881	4397	4692	3876	3859	

¹通过免疫测定法对每份样品进行平行分析(5份)。通过回归分析将每份样品的所有免疫测定法分析的平均值与样品的 HPLC 结果进行比较。

表 11: 通过免疫测定法和 HPLC 获得的分析结果的比较(续)。

种子类型	样品	发现的 thiamethoxam (PPM)					HPLC	
		免疫测定法 ¹ 平行分析		¹ 平均值				
大田玉米	298307	469	464	567	451	422	475	424
	298308	409	384	409	422	386	402	389
	298309	379	408	368	378	333	373	400
	298310	428	395	493	417	552	367	373
	298311	320	407	307	402	398	457	383
	298312	3050	3656	2645	3622	3827	3360	3038
	298313	4322	3694	2955	3397	3185	3511	3529
	298314	3602	3347	3804	3055	3972	3556	3681
	298315	3563	3301	3271	3445	4037	3523	3712
	298316	4326	4903	5118	4590	4873	4762	3661

¹ 通过免疫测定法对每份样品进行平行分析 (5 份)。通过回归分析将每份样品的所有免疫测定法分析的平均值与样品的 HPLC 结果进行比较。

专利名称(译)	用于新烟碱基杀虫剂的免疫测定法		
公开(公告)号	CN100379725C	公开(公告)日	2008-04-09
申请号	CN00817771.6	申请日	2000-12-06
[标]申请(专利权)人(译)	先正达参股股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	辛根塔参与股份公司		
当前申请(专利权)人(译)	辛根塔参与股份公司		
[标]发明人	JF布拉迪 DP西蒙斯 TE威尔逊		
发明人	J·F·布拉迪 D·P·西蒙斯 T·E·威尔逊		
IPC分类号	C07D213/61 C07D277/32 C07D417/06 C07D401/06 A01N43/40 A01N43/50 A01N43/78 A01N43/88 G01N33/53 C07K16/00 C07D277/28 C07K14/435 C07K14/76 C07K16/44 C12N9/08 C12N9/16 C12N9/38 G01N21/78 G01N33/15 G01N33/543		
CPC分类号	C07D417/06 C07D277/32 C07D401/06 C07K16/44 C07D213/61		
代理人(译)	唐伟杰		
优先权	09/456782 1999-12-08 US		
其他公开文献	CN1413195A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了用于生成抗新烟碱类抗体的免疫原，以及用于通过免疫测定法来测定样品中一种或多种新烟碱类杀虫剂的存在情况的抗体、方法、试剂、和试剂盒。本发明可具体用于测定应用于植物繁殖材料(诸如种子)的新烟碱类杀虫剂的浓度，所述抗体对具有通式(I)的化合物具有选择性，其中A是2-嘧啶-5-基或2-嘧啶-5-基；R和R3独立地是氢或C1-C4烷基；R1和R2独立地是氢或C1-C4烷基，或者R1和R2与它们所连接的氮原子一起形成咪唑烷或二噁环；且X是N-NO₂或N-CN。本发明还要求保护具有通式(IA)的化合物和具有通式(II)的蛋白质缀合物，其中PR指选自下组的载体分子蛋白质残基：来自双翅目病毒的纯化蛋白质衍生物(PPD，结核菌素)、牛血清清蛋白、阳离子化的牛血清清蛋白、人血清清蛋白、卵清蛋白、和匙孔血蓝蛋白；或者选自下组的酶残基：碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、和β-半乳糖苷酶。

