

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610013124.9

[51] Int. Cl.

C07C 251/66 (2006.01)

C07C 249/04 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2007年8月8日

[11] 公开号 CN 101012183A

[22] 申请日 2006.1.25

[21] 申请号 200610013124.9

[71] 申请人 南开大学

地址 300071 天津市南开区卫津路94号

[72] 发明人 戴树桂 张彦峰 高志贤 张清敏

[74] 专利代理机构 天津佳盟知识产权代理有限公司
代理人 侯力

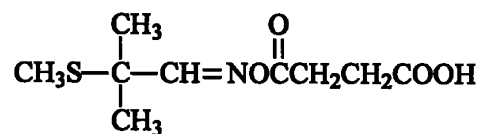
权利要求书2页 说明书3页 附图1页

[54] 发明名称

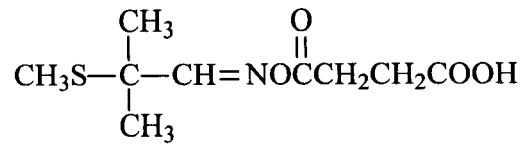
杀虫剂涕灭威的半抗原、抗原和抗体及其制备方法与应用

[57] 摘要

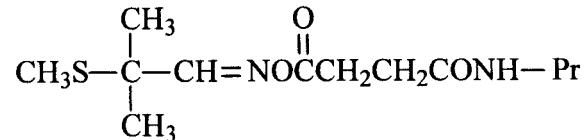
本发明提供分子结构为右式的涕灭威脲琥珀酸单酯为半抗原及其制备方法，以涕灭威脲琥珀酸单酯为半抗原，将其与载体蛋白共价结合制备抗原，再进行动物免疫并分离出含有涕灭威抗体的抗血清。本发明涕灭威脲琥珀酸单酯半抗原合成方法简单，所得抗体具有良好的特异性和灵敏度，可用于涕灭威的快速免疫检测。



1. 一种涕灭威半抗原，其特征在于：选择涕灭威脲琥珀酸单酯为半抗原，其分子结构为：



2. 一种涕灭威抗原，其特征在于：涕灭威脲琥珀酸单酯与载体蛋白共价结合形成抗原，其分子结构为：



式中 Pr 代表载体蛋白。

3. 一种涕灭威抗体，其特征在于：它是能与涕灭威发生特异性免疫反应的免疫球蛋白。

4. 权利要求 1 所述的一种涕灭威半抗原（涕灭威脲琥珀酸单酯）的制备方法，其特征在于：合成步骤为：

- (1) 涕灭威农药加入 1.5~3 倍体积的甲醇，振荡提取 9h，过滤后滤液浓缩至原滤液体积的 0.5~1.0 倍，再加入浓缩滤液 0.7~1.7 倍体积的水，静置后得到提纯后的白色涕灭威晶体；
- (2) 取制得的涕灭威纯品溶解于 0.3~0.9 mol/L 的 NaOH 溶液（溶剂水和甲醇的体积比 =3:1），室温振荡 36h，用盐酸调节 pH=7，再用异丙醚萃取，将有机相蒸去得到涕灭威脲；
- (3) 在涕灭威脲中加入丁二酸酐，涕灭威脲与丁二酸酐的摩尔比为 1:1~1.2，再加入无水四氢呋喃和三乙胺，回流反应 24h；
- (4) 蒸去三乙胺和四氢呋喃，加入乙酸乙酯，4℃搅拌下用盐酸调节 pH=3~4，分液后再用乙酸乙酯萃取，有机相用无水 Na₂SO₄ 干燥并过滤后，蒸去乙酸乙酯，加入冰冷的乙醚，过滤除去白色沉淀，滤液蒸去乙醚，得到的固体真空干燥，得到涕灭威半抗原（涕灭威脲琥珀酸单酯）。

5. 权利要求 2 所述的一种涕灭威抗原的制备方法，其特征在于：采用涕灭威脲琥珀酸单酯半抗原与载体蛋白质共价结合的方法制备抗原：

涕灭威半抗原、N-羟基琥珀酰亚胺、二环己基碳二亚胺（摩尔比为 1:1:1）溶解于 N,N-二甲基甲酰胺，放置过夜后离心，上层清液为活性酯；4℃搅拌下，将活性酯缓慢地滴加入载体蛋白溶液中，继续搅拌 4h；反应后的溶液用 pH7.4、0.01mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液充分透析，将透析后的半抗原和载体蛋白结合物溶液进行真空冷冻干燥；以半抗原与牛血清白蛋白(BSA)的结合物作为动物实验的免疫原，半抗原与卵白蛋白(OVA)的结合物作为免疫分析的包被原。

6. 权利要求 3 所述的一种涕灭威抗体的制备方法，其特征在于：涕灭威抗体含在抗血清中，含有涕灭威抗体抗血清的制备方法步骤：

将权利要求 5 制备的免疫原用生理盐水溶解，与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化，对大白兔进行皮下多点注射免疫接种，每只白兔 1mL；首次免疫以后用弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂，每两周加强免疫一次；免疫四次以后，在接种后的第 3~5 天从兔耳缘静脉取血，分离血清，琼脂双向扩散法测定抗血清效价。继续加强免疫至效价符合要求后颈动脉放血，分离血清并分装后于-20℃保存。

7. 权利要求 1、2、3 所述的涕灭威的半抗原、抗原和抗体的应用，其特征在于：将其应用于免疫分析，方法步骤如下：

包被：将涕灭威脲琥珀酸单酯与载体蛋白的结合物溶解于 pH9.6、0.05mol/L 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液作为包被液，以每孔 100 μL 包被液包被酶标板，4℃静置过夜；

洗涤：以 pH7.4、0.01mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠-0.85%氯化钠-0.05%吐温 20 溶液作为洗涤液，以每孔 350 μ L 洗涤液浸泡洗涤酶标板 3 次；

封闭：将卵白蛋白溶解于 pH7.4、0.01mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠-0.85%氯化钠溶液，配制为 0.5%的卵白蛋白溶液作为封闭液，以每孔 200 μ L 封闭液进行封闭，37 $^{\circ}$ C 振荡温育 30min；

第一步免疫反应：如上洗涤，加入 50 μ L 样品或涕灭威标准溶液和 50 μ L 抗血清溶液，37 $^{\circ}$ C 振荡温育 60min；

第二步免疫反应：如上洗涤，加入 100 μ L 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白 G 溶液，37 $^{\circ}$ C 振荡温育 60min；

酶促显色反应：如上洗涤，将 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)用 pH5.0、0.1 mol/L 的磷酸氢二钠-0.05mol/L 柠檬酸缓冲液稀释至 0.1mg/mL(其中含有 30 μ g/mL 的过氧化氢，现用现配)作为底物液，加入 100 μ L 底物液，37 $^{\circ}$ C 避光振荡温育 15min，再加入 50 μ L 的 2mol/L 的硫酸溶液终止反应；

比色测定：在 450nm 波长下测定各板孔中溶液的吸光度。

杀虫剂涕灭威的半抗原、抗原和抗体及其制备方法与应用

技术领域

本发明属于农药小分子化合物免疫化学和残留分析技术领域，涉及有机合成、免疫化学、生物化学分析领域。

背景技术

涕灭威(Aldicarb, 2-methyl-2-(methylthio)propionaldehyde O-(methylcarbamoyl)oxime, [116-06-3])是一种高效、剧毒、广谱、内吸性的杀虫、杀螨、杀线虫剂，自1962年由美国联合碳化物(Union Carbide)公司开发出该农药以来，已经被广泛用于棉花、花生、玉米、大豆、高粱、甜菜、甘蔗、麦子、橘柑、果树、马铃薯、烟叶等许多农作物以防治螨类、蚜虫及线虫等多种害虫，目前全世界已有70多个国家与地区在不同的农作物上登记使用。试验表明在花生、棉田使用具有广泛的治虫增产效果。我国于1986、1987年分别在花生、棉花与烟草上登记使用。

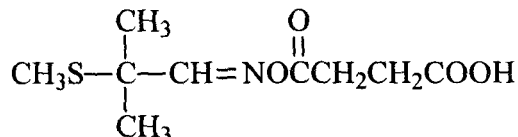
涕灭威属于氨基甲酸酯类农药，其作用机理通常认为是通过抑制乙酰胆碱酯酶(AchE)来影响正常的神经冲动过程，同时被怀疑是一种环境内分泌干扰物。涕灭威在环境或生物体内发生氧化反应生成涕灭威亚砷(Aldicarb sulfoxide, [1646-87-3])和涕灭威砷(Aldicarb sulfone, [1646-88-4])，都具有较高的水溶性和毒性。涕灭威是目前毒性最大的农药之一，由于具有较高的水溶性，在土壤中的淋溶与移动性强，容易对地下水造成污染。在美国已经实施了对涕灭威的监测和研究项目，从39个州采集了饮用水样品，在检测出涕灭威残留的饮用水样品中，很多都超过美国环保局(USEPA)和世界卫生组织(WHO)所建议的安全浓度 $10\mu\text{g/L}$ 。

气相色谱法(GC)和高效液相色谱法(HPLC)是测定环境样品中涕灭威及其代谢物的常规方法。由于涕灭威具有一定的极性和水溶性，高温下不稳定，所以HPLC比GC更为常用。涕灭威及其代谢物通过HPLC分离以后，可以用UV检测器进行定量测定，但是不够灵敏，而且会受到其它物质的干扰。目前对N-甲基氨基甲酸酯类农药及其代谢物进行残留分析最常用的测定方法是先对样品进行萃取和净化，然后用HPLC进行分离，柱后衍生并进行荧光测定。然而这些方法的灵敏度受样品的净化、浓缩、衍生化等步骤的影响很大，而且这些方法需要大多数实验室所不具备的复杂的仪器，过程繁琐，不适合大批量样品的检测与分析。

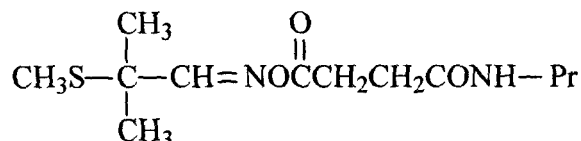
发明内容

本发明以抗原抗体的特异性结合为基本原理的免疫分析提供了一种新的涕灭威分析方法。本发明开发了一种具有丁二酸分子结构的涕灭威半抗原，涕灭威抗原，涕灭威抗体和涕灭威半抗原的制备方法，由涕灭威半抗原制得的抗原和抗体应用于涕灭威免疫分析。

一种涕灭威半抗原，其特征在于：选择涕灭威脲琥珀酸单酯为半抗原，其分子结构为：



一种涕灭威抗原，其特征在于：以涕灭威脲琥珀酸单酯为半抗原，将其与载体蛋白共价结合形成抗原，其分子结构为：



式中Pr代表载体蛋白。

一种涕灭威抗体，其特征在于：它是能与涕灭威发生特异性免疫反应的免疫球蛋白。

涕灭威半抗原(涕灭威脲琥珀酸单酯)的制备方法和步骤：

(1)涕灭威农药加入1.5~3倍体积的甲醇，振荡提取9h，过滤后滤液浓缩至原滤液体积的

- 0.5~1.0 倍，再加入浓缩滤液 0.7~1.7 倍体积的水，静置后得到提纯后的白色涕灭威晶体；
- (2) 取制得的涕灭威纯品溶解于 0.3~0.9 mol/L 的 NaOH 溶液(溶剂水和甲醇的体积比=3:1)，室温振荡 36h，用盐酸调节 pH=7，再用异丙醚萃取，将有机相蒸去得到涕灭威肟；
 - (3) 在涕灭威肟中加入丁二酸酐，涕灭威肟与丁二酸酐的摩尔比为 1:1~1.2，再加入无水四氢呋喃和三乙胺，回流反应 24h；
 - (4) 蒸去三乙胺和四氢呋喃，加入乙酸乙酯，4℃搅拌下用盐酸调节 pH=3~4，分液后再用乙酸乙酯萃取，有机相用无水 Na₂SO₄ 干燥并过滤后，蒸去乙酸乙酯，加入冰冷的乙醚，过滤除去白色沉淀，滤液蒸去乙醚，得到的固体真空干燥，得到一种涕灭威半抗原(涕灭威肟琥珀酸单酯)。

采用半抗原与载体蛋白质共价结合的方法制备抗原：

涕灭威半抗原、N-羟基琥珀酰亚胺、二环己基碳二亚胺(摩尔比为 1:1:1) 溶解于 N,N-二甲基甲酰胺，放置过夜后离心，上层清液为活性酯；4℃搅拌下，将活性酯缓慢地滴加入载体蛋白溶液中，继续搅拌 4h；反应后的溶液用 pH7.4、0.01mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液充分透析，将透析后的半抗原和载体蛋白结合物溶液进行真空冷冻干燥；以半抗原与牛血清白蛋白(BSA)的结合物作为动物实验的免疫原，半抗原与卵白蛋白(OVA)的结合物作为免疫分析的包被原。

涕灭威抗体含在抗血清中，含有涕灭威抗体抗血清的制备方法步骤：

将涕灭威肟琥珀酸单酯与载体蛋白共价结合方法制备的免疫原用生理盐水溶解，与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化，对大耳白兔进行皮下多点注射免疫接种，每只白兔 1mL；首次免疫以后用弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂，每两周加强免疫一次；免疫四次以后，在接种后的第 3~5 天从兔耳缘静脉取血，分离血清，琼脂双向扩散法测定抗血清效价；继续加强免疫至效价符合要求后颈动脉放血，分离血清并分装后于-20℃保存。

涕灭威的半抗原、抗原和抗体应用于涕灭威免疫分析，方法步骤为：

包被：将涕灭威肟琥珀酸单酯与载体蛋白的结合物溶解于 pH9.6、0.05mol/L 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液作为包被液，以每孔 100 μL 包被液包被酶标板，4℃静置过夜；

洗涤：以 pH7.4、0.01mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠-0.85%氯化钠-0.05%吐温 20 溶液作为洗涤液，以每孔 350 μL 洗涤液浸泡洗涤酶标板 3 次；

封闭：将卵白蛋白溶解于 pH7.4、0.01mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠-0.85%氯化钠溶液，配制为 0.5%的卵白蛋白溶液作为封闭液，以每孔 200 μL 封闭液进行封闭，37℃振荡温育 30min；

第一步免疫反应：如上洗涤，加入 50 μL 样品或涕灭威标准溶液和 50 μL 抗血清溶液，37℃振荡温育 60min；

第二步免疫反应：如上洗涤，加入 100 μL 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白 G 溶液，37℃振荡温育 60min；

酶促显色反应：如上洗涤，将 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)用 pH5.0、0.1 mol/L 的磷酸氢二钠-0.05mol/L 柠檬酸缓冲液稀释至 0.1mg/mL(其中含有 30 μg/mL 的过氧化氢，现用现配)作为底物液，加入 100 μL 底物液，37℃避光振荡温育 15min，再加入 50 μL 的 2mol/L 的硫酸溶液终止反应；

比色测定：在 450nm 波长下测定各板孔中溶液的吸光度。

本发明的有益效果是克服了传统的涕灭威理化分析方法繁琐复杂、成本较高、分析速度慢的问题，提供了简便、快速、灵敏、准确的涕灭威免疫分析技术。

附图说明

图 1 是血清亲和力曲线。

具体实施方式

实施例 1: 涕灭威半抗原的合成与结构鉴定

称取涕灭威农药“神农丹”400g 加入 400mL 甲醇, 振荡提取 4h 后抽滤。残渣再用 300mL 甲醇提取 4h 后抽滤。将滤液蒸发浓缩至 200mL, 再加入 300mL 蒸馏水, 产生大量白色沉淀。4℃ 静置 2h 后抽滤, 并将白色涕灭威晶体用 20mL 蒸馏水洗涤, 真空干燥, 可制得涕灭威纯品。称取制备的涕灭威纯品 0.030mol 溶于 70mL 0.67mol/L 的 NaOH 溶液(溶剂水和甲醇的体积比=3:1), 室温振荡 36h; 用 1mol/L 的盐酸调节 pH=7; 用异丙醚萃取, 将有机相蒸去, 得到涕灭威肟; 加入 0.035mol 丁二酸酐, 再加入 20mL 无水四氢呋喃和 4mL 三乙胺, 回流反应 24h; 蒸去三乙胺和四氢呋喃, 再加入 30mL 乙酸乙酯, 4℃ 搅拌下用 0.2mol/L 的盐酸调节 pH=3~4。分取有机相, 再用乙酸乙酯萃取, 有机相用无水 Na₂SO₄ 干燥并过滤后, 蒸去乙酸乙酯; 加入 10mL 冰冷的乙醚, 过滤除去白色沉淀, 滤液蒸去乙醚; 得到涕灭威肟与丁二酸酐的酯化产物, 作为一种新的涕灭威半抗原, 命名为涕灭威肟琥珀酸单酯。

用 ¹H 核磁共振波谱和质谱对合成的半抗原涕灭威肟琥珀酸单酯进行结构分析, 结果如下:

¹H 核磁共振波谱 (¹H NMR, TMS 为内标, 共振频率 200.13MHz, 溶剂 CDCl₃) δ (ppm): 1.45(s, 6H, 2×-CH₃); 1.96(s, 3H, -SCH₃); 2.71(s, 4H, -CH₂CH₂-); 6.8(br, 1H, -COOH); 7.51(s, 1H, -CH=NO-)。质谱 (MS, FAB 源): [M+1]⁺ m/e=234.0。

实施例 2: 半抗原与载体蛋白质的共价结合

称取涕灭威半抗原 0.10mmol、N-羟基琥珀酰亚胺 0.10mmol、二环己基碳二亚胺 0.11mmol 溶解于 2mL 的 N,N-二甲基甲酰胺, 室温放置过夜后离心, 上层清液为活性酯; 4℃ 搅拌下, 将 1.6mL 活性酯缓慢地滴加入 8mL 的载体蛋白溶液中, 继续搅拌 4h; 反应后的溶液用 pH7.4、0.01mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液充分透析, 将透析后的半抗原和载体蛋白结合物溶液进行真空冷冻干燥; 以半抗原与牛血清白蛋白 (BSA) 的结合物作为动物实验的免疫原, 半抗原与卵白蛋白 (OVA) 的结合物作为免疫分析的包被原。

实施例 3: 抗血清的制备

将涕灭威肟琥珀酸单酯与载体蛋白质共价结合制备的免疫原用生理盐水配制成 2mg/mL 的溶液, 与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化, 对大耳白兔进行皮下多点注射免疫接种, 每只白兔 1mL; 首次免疫以后用弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂, 每两周加强免疫一次; 免疫四次以后, 在接种后的第 3~5 天从兔耳缘静脉取血, 分离血清, 琼脂双向扩散法测定抗血清效价; 继续加强免疫至效价符合要求后颈动脉放血, 分离血清并分装后于 -20℃ 保存。

实施例 4: 用免疫分析方法测定抗体的亲和力

包被: 将涕灭威肟琥珀酸单酯与载体蛋白的结合物溶解于 pH9.6、0.05mol/L 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液作为包被液, 以每孔 100 μL 包被液包被酶标板, 4℃ 静置过夜;

洗涤: 以 pH7.4、0.01mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠-0.85%氯化钠-0.05%吐温 20 溶液作为洗涤液, 以每孔 350 μL 洗涤液浸泡洗涤酶标板 3 次;

封闭: 将卵白蛋白溶解于 pH7.4、0.01mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠-0.85%氯化钠溶液, 配制为 0.5%的卵白蛋白溶液作为封闭液, 以每孔 200 μL 封闭液进行封闭, 37℃ 振荡温育 30min;

第一步免疫反应: 如上洗涤, 加入 50 μL 样品或涕灭威标准溶液和 50 μL 抗血清溶液, 37℃ 振荡温育 60min;

第二步免疫反应: 如上洗涤, 加入 100 μL 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白 G 溶液, 37℃ 振荡温育 60min;

酶促显色反应: 如上洗涤, 将 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 用 pH5.0、0.1 mol/L 的磷酸氢二钠-0.05mol/L 柠檬酸缓冲液稀释至 0.1mg/mL (其中含有 30 μg/mL 的过氧化氢, 现用现配) 作为底物液, 加入 100 μL 底物液, 37℃ 避光振荡温育 15min, 再加入 50 μL 的 2mol/L 的硫酸溶液终止反应;

比色测定: 在 450nm 波长下测定各板孔中溶液的吸光度。见图 1 中: ■ 为抗血清与免疫原结合; ● 为抗血清与包被原结合 (RSD=1.1%~8.1%, n=4); ▲ 为阴性血清与包被原结合。

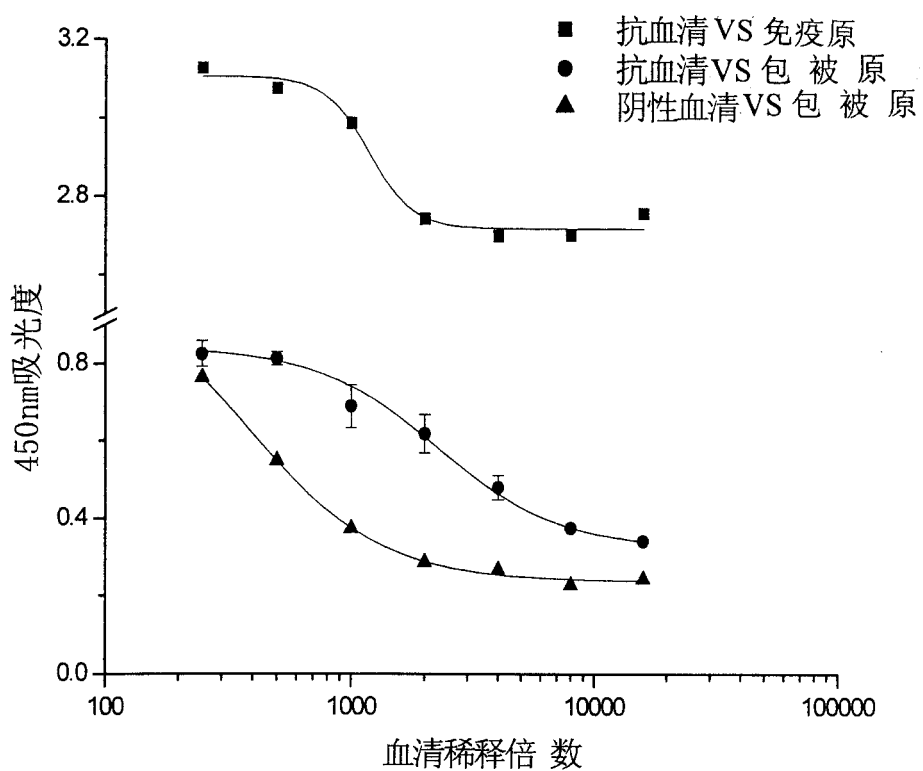


图 1

专利名称(译)	杀虫剂涕灭威的半抗原、抗原和抗体及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN101012183A	公开(公告)日	2007-08-08
申请号	CN200610013124.9	申请日	2006-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	南开大学		
申请(专利权)人(译)	南开大学		
当前申请(专利权)人(译)	南开大学		
[标]发明人	戴树桂 张彦峰 高志贤 张清敏		
发明人	戴树桂 张彦峰 高志贤 张清敏		
IPC分类号	C07C251/66 C07C249/04 C07K14/00 C07K16/00 G01N33/53		
代理人(译)	侯力		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供分子结构为右式的涕灭威脲琥珀酸单酯为半抗原及其制备方法，以涕灭威脲琥珀酸单酯为半抗原，将其与载体蛋白共价结合制备抗原，再进行动物免疫并分离出含有涕灭威抗体的抗血清。本发明涕灭威脲琥珀酸单酯半抗原合成方法简单，所得抗体具有良好的特异性和灵敏度，可用于涕灭威的快速免疫检测。

