



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102627628 B

(45) 授权公告日 2013. 12. 11

(21) 申请号 201210060248. 8

G01N 33/53(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 03. 08

(56) 对比文件

(73) 专利权人 中国农业大学
地址 100193 北京市海淀区圆明园西路 2 号

CN 101337959 A, 2009. 01. 07, 权利要求 1、5.
CN 101511795 A, 2009. 08. 19, 权利要求 1、28.

(72) 发明人 刘尚钟 崔永亮 徐川 王毅
刘峰 王磊 欧俊军 南铁贵
谭桂玉 王敏 曹振 孙硕

CN 101801191 A, 2010. 08. 11, 权利要求 1.
WO 2011049233 A1, 2011. 04. 28, 权利要求 1-4.

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

步海燕等. 高效液相色谱法测定水体中的氯虫酰胺残留量. 《光谱实验室》. 2008, 第 25 卷 (第 6 期), 1230-1234.

代理人 关畅

George P. Lahm et al.. New and selective ryanodine receptor activators for insect control. 《Bioorganic & Medicinal Chemistry》. 2009, 第 17 卷 4127-4133.

(51) Int. Cl.

- C07D 401/04(2006. 01)
- C07D 401/14(2006. 01)
- C07K 14/765(2006. 01)
- C07K 14/77(2006. 01)
- C07K 14/795(2006. 01)
- C07K 1/113(2006. 01)
- C07K 16/44(2006. 01)

审查员 龙巧云

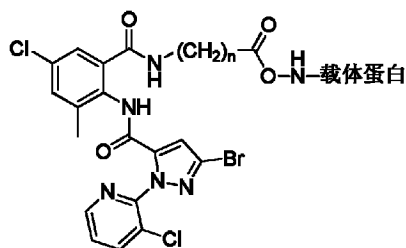
权利要求书3页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称

氯虫苯甲酰胺抗原及其制备方法与应用

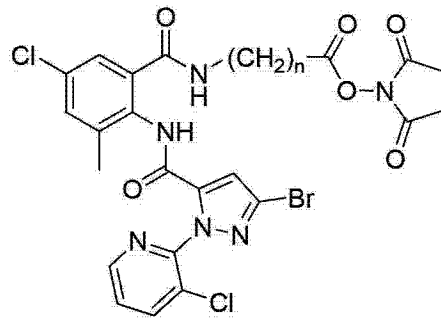
(57) 摘要

本发明公开了一种氯虫苯甲酰胺抗原及其制备方法与应用。该氯虫苯甲酰胺抗原如式 C 所示, 是氯虫苯甲酰胺与载体蛋白通过酰胺键连接形成的偶联物。本发明提供的制备氯虫苯甲酰胺抗原的方法, 能够方便、快捷地获得氯虫苯甲酰胺抗原, 且合成步骤简洁明了、合成成本低, 效果好。用本发明方法制备的氯虫苯甲酰胺抗原进行免疫得到的抗体的特异性好、最低检测限值低。本发明的制备氯虫苯甲酰胺抗原的方法及由该方法获得的氯虫苯甲酰胺抗原在氯虫苯甲酰胺的快速免疫检测应用中将有广阔的前景。



式 C。

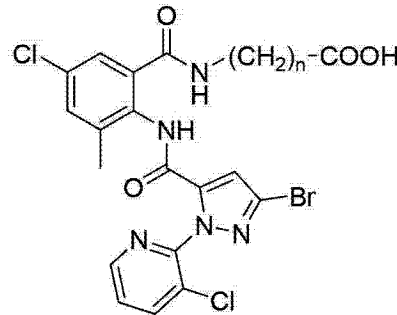
1. 式 B 所示化合物,



式 B

所述式 B 中, n 为 2-6 的整数。

2. 一种制备权利要求 1 所述式 B 所示化合物的方法, 包括如下步骤: 将式 A 所示化合物、N- 羟基琥珀酰亚胺与下述两化合物中的任意一种于有机溶剂或水中混匀进行反应得到所述式 B 所示化合物: 二环己基碳二亚胺或 1- 乙基-(3- 二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐;



式 A

式 A 中, n 为 2-6 的整数。

3. 根据权利要求 2 所述的方法, 其特征在于: 所述有机溶剂均选自 N, N- 二甲基甲酰胺、二甲基亚砷和四氢呋喃中的至少一种;

所述式 A 所示化合物、N- 羟基琥珀酰亚胺与二环己基碳二亚胺或 1- 乙基-(3- 二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐的投料摩尔比为 1 : 1-5 : 1-5;

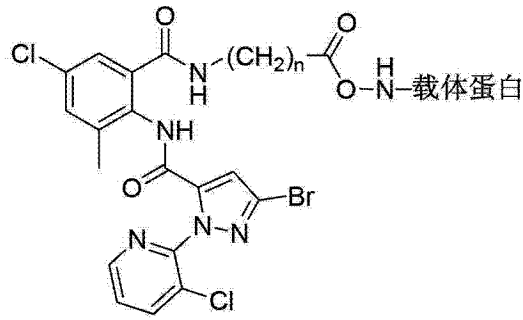
所述反应步骤中, 温度为 0-50°C, 时间为 4-24 小时。

4. 根据权利要求 3 所述的方法, 其特征在于: 所述有机溶剂为 N, N- 二甲基甲酰胺;

所述式 A 所示化合物、N- 羟基琥珀酰亚胺与二环己基碳二亚胺或 1- 乙基-(3- 二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐的投料摩尔比为 1 : 1.3 : 1.1;

所述反应步骤中, 温度为 25°C, 时间为 8 小时。

5. 式 C 所示化合物,



式 C

所述式 C 中, n 为 2-6 的整数。

6. 根据权利要求 5 所述的化合物,其特征在於:所述载体蛋白选自牛血清蛋白、卵清蛋白和血蓝蛋白中的至少一种。

7. 根据权利要求 6 所述的化合物,其特征在於:所述载体蛋白为牛血清蛋白或卵清蛋白。

8. 一种制备权利要求 5 所述式 C 所示化合物的方法,包括如下步骤:将权利要求 1 所述式 B 所示化合物与载体蛋白溶液混匀进行偶联反应,反应完毕得到所述式 C 所示化合物。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其特征在於:所述载体蛋白选自牛血清蛋白、卵清蛋白和血蓝蛋白中的至少一种;所述式 B 所示化合物与载体蛋白溶液中所述载体蛋白的投料摩尔比为 5-30:1;

所述偶联反应步骤中,温度为 0-50°C,时间为 8-36 小时, pH 值为 5-9。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其特征在於:所述载体蛋白为牛血清蛋白或卵清蛋白;所述式 B 所示化合物与载体蛋白溶液中所述载体蛋白的投料摩尔比为 15:1;

所述偶联反应步骤中,温度为 4°C,时间为 12 小时, pH 值为 7.5。

11. 根据权利要求 8-10 中任一所述的方法,其特征在於:所述载体蛋白溶液按照包括如下步骤的方法制备而得:将载体蛋白与缓冲液混匀得到所述载体蛋白溶液;其中,所述缓冲液选自碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液和 4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液中的至少一种,所述缓冲液的 pH 值均为 7.5;

所述制备式 C 所示化合物的方法,还包括如下步骤:在所述偶联反应之后,将反应体系进行透析;所述透析步骤中,所用透析液为 pH 值为 7-10、浓度为 0.01-0.2mol/L 的 PBS 溶液;

所述透析步骤中,所述 pH 值为 7-10、浓度为 0.01-0.2mol/L 的 PBS 溶液按照如下方法制备而得:将 NaCl、 KH_2PO_4 和 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 以质量比 8.0:0.2:2.96 的比例溶于水中,用水定容到 1L。

12. 根据权利要求 11 所述的方法,其特征在於:所述透析步骤中,所述透析液的 pH 值为 7.5,浓度为 0.1mol/L。

13. 由权利要求 5-7 中任一所述化合物得到的抗体。

14. 权利要求 5-7 中任一所述化合物和 / 或权利要求 13 所述抗体在检测样品中氯虫苯甲酰胺中的应用;

权利要求 5-7 中任一所述化合物和 / 或权利要求 13 所述抗体在制备用于检测样品中氯虫苯甲酰胺的酶联免疫试剂盒、氯虫苯甲酰胺的发光免疫试剂盒或免疫亲和色谱柱中的

应用 ;所述检测样品为水体、药品、食品或土壤。

氯虫苯甲酰胺抗原及其制备方法与应用

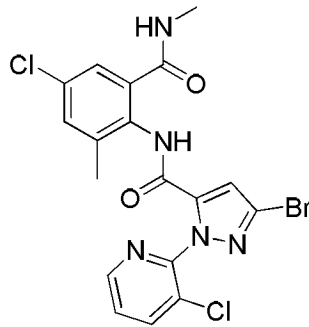
技术领域

[0001] 本发明涉及一种氯虫苯甲酰胺抗原及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 氯虫苯甲酰胺通用名为 Chlorantraniliprole, 化学名为 3-溴-N-[4-氯-2-甲基-6-[(甲氨基)羰基]苯基]-1-(3-氯-2-吡啶基)-1H-吡唑-5-酰胺, 试验代号 DPX-E2Y45, 商品名为: Altaco, Coragen 和 Rynaxypyr; CAS 登记号: 500008-45-7; 分子式为: $C_{18}H_{14}BrCl_2N_5O_2$; 相对分子量为: 483.1。氯虫酰胺 (chlorantraniloprole) 是美国杜邦公司在日本农药公司工作的基础上, 以氟虫酰胺 (flubendiamide) 为先导, 于 2000 年发现的第一个具有邻甲酰胺基苯甲酰胺类化学结构的化合物, 该化合物虽然在结构上同氟虫酰胺有一定差别, 但是都作用于鱼尼丁受体, 且对哺乳动物安全。其化学结构式如下:

[0003]



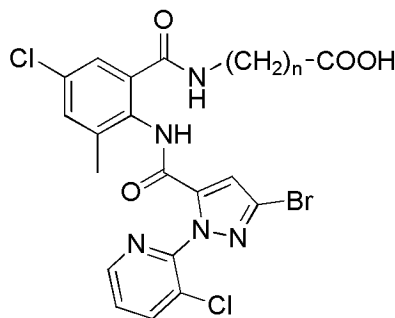
[0004] 目前, 氯虫苯甲酰胺的分析方法主要有高效液相色谱法 (HPLC)、液质联用法 (HPLC-MS/MS) 等。但是这几种检测方法需要使用昂贵的仪器设备, 检测费用高, 耗时长, 不适用于现场快速检测。与仪器分析法相比, 免疫分析法具有快速、简便、实时、易于进行现场检测、样品前处理简单、灵敏度高、选择性强、适合于高通量分析等优点, 而且还能大幅度降低检测成本。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种氯虫苯甲酰胺抗原及其制备方法与应用。

[0006] 本发明提供的制备氯虫苯甲酰胺抗原 (也即式 C 所示化合物) 的中间体式 A 所示化合物, 其结构通式如式 A 所示,

[0007]



[0008] 式 A

[0009] 所述式 A 中, n 为 2-6 的整数;

[0010] 本发明提供的制备所述式 A 所示化合物的方法, 包括如下步骤: 将氨基酸和 2-[3-溴-1-(3-氯-2-吡啶基)-1H-5-吡唑]-6-氯-8-甲基-4H-苯并[d][1,3]恶嗪-4-酮于有机溶剂中混匀进行反应, 反应完毕得到式 A 所示化合物。

[0011] 上述方法中, 所述氨基酸选自氨基乙酸、氨基丙酸、氨基丁酸、氨基戊酸和氨基己酸中的至少一种, 优选氨基丁酸;

[0012] 所述氨基酸和 2-[3-溴-1-(3-氯-2-吡啶基)-1H-5-吡唑]-6-氯-8-甲基-4H-苯并[d][1,3]恶嗪-4-酮的投料摩尔配比为 10 : 1, 优选 1.2 : 1;

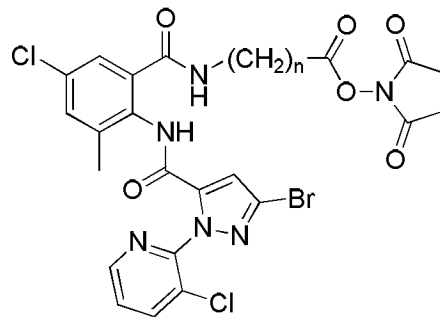
[0013] 所述反应步骤中, 温度为 0-50°C, 优选 25°C, 时间为 6-48 小时, 优选 12 小时;

[0014] 所述有机溶剂选自 N, N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砷和四氢呋喃中的至少一种, 优选 N, N-二甲基甲酰胺;

[0015] 所述制备式 A 所示化合物的方法, 还包括如下步骤: 在反应完毕后将反应体系倒入水中, 调节 pH 值为 3, 用乙酸乙酯萃取, 收集乙酸乙酯相后干燥, 旋转蒸发去除溶剂, 并用由体积比为 3 : 1 的正己烷和乙酸乙酯组成的混合液重结晶。

[0016] 本发明提供的用于制备氯虫苯甲酰胺抗原的化合物为式 B 所示化合物,

[0017]



[0018] 式 B

[0019] 所述式 B 中, n 为 2-6 的整数。

[0020] 本发明提供的制备所述式 B 所示化合物的方法, 包括如下步骤: 将所述式 A 所示化合物、N-羟基琥珀酰亚胺与下述两化合物中的任意一种于有机溶剂或水中混匀进行反应得到所述式 B 所示化合物: 二环己基碳二亚胺或 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐。

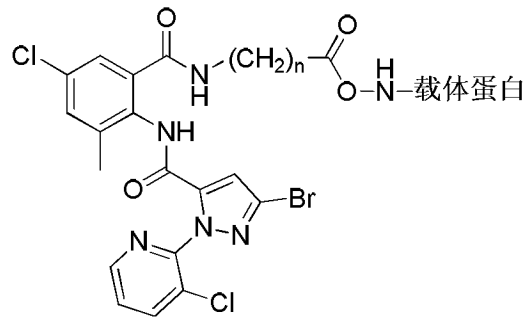
[0021] 上述方法中, 所述有机溶剂均选自 N, N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砷和四氢呋喃中的至少一种, 优选 N, N-二甲基甲酰胺;

[0022] 所述式 A 所示化合物、N-羟基琥珀酰亚胺与二环己基碳二亚胺或 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐的投料摩尔比为 1 : 1-5 : 1-5, 优选 1 : 1.3 : 1.1;

[0023] 所述反应步骤中, 温度为 0-50°C, 优选 25°C, 时间为 4-24 小时, 优选 8 小时。

[0024] 本发明提供的氯虫苯甲酰胺抗原, 也即式 C 所示化合物,

[0025]



[0026] 式 C

[0027] 所述式 C 中, n 为 2-6 的整数。

[0028] 该氯虫苯甲酰胺抗原是氯虫苯甲酰胺与载体蛋白通过酰胺键连接形成的偶联物; 所述酰胺键是式 A 上的羧基通过活泼酯与载体蛋白上的氨基形成的。

[0029] 本发明提供的制备式 C 所示氯虫苯甲酰胺抗原的方法, 包括如下步骤: 将前述本发明提供的式 B 所示化合物与载体蛋白溶液混匀进行偶联反应, 反应完毕得到式 C 所示化合物。

[0030] 上述制备式 A 至式 C 所示化合物方法的合成路线如图 1 所示。

[0031] 上述式 C 和方法中, 所述载体蛋白选自牛血清蛋白、卵清蛋白和血蓝蛋白中的至少一种, 优选牛血清蛋白或卵清蛋白; 所述式 B 所示化合物与载体蛋白溶液中载体蛋白的投料摩尔比为 5-30 : 1, 优选 15 : 1;

[0032] 所述偶联反应步骤中, 温度为 0-50°C, 优选 4°C, 时间为 8-36 小时, 优选 12 小时, pH 值为 5-9, 优选 7.5。

[0033] 所述载体蛋白溶液按照包括如下步骤的方法制备而得: 将载体蛋白与缓冲液混匀得到所述载体蛋白溶液; 其中, 所述缓冲液选自碳酸盐缓冲液、磷酸盐 (PBS) 缓冲液、硼酸盐缓冲液和 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) 缓冲液中的至少一种, 所述缓冲液的 pH 值均为 7.5;

[0034] 所述制备式 C 所示氯虫苯甲酰胺抗原的方法, 还包括如下步骤: 在所述偶联反应之后, 将反应体系进行透析; 所述透析步骤中, 所用透析液为 pH 值为 7-10、浓度为 0.01-0.2mol/L 的 PBS 溶液; 优选所述透析液的 pH 值为 7.5, 浓度为 0.1mol/L。

[0035] 所述透析步骤中, 所述 pH 值为 7-10、浓度为 0.01-0.2mol/L 的 PBS 溶液按照如下方法制备而得: 将 NaCl、KH₂PO₄ 和 Na₂HPO₄ · 12H₂O 以质量比 8.0 : 0.2 : 2.96 的比例溶于水中, 用水定容到 1L。

[0036] 由上述本发明提供的氯虫苯甲酰胺抗原得到的抗体, 以及上述抗原和 / 或抗体在检测样品中氯虫苯甲酰胺中的应用、在制备用于检测样品中氯虫苯甲酰胺的酶联免疫试剂盒、氯虫苯甲酰胺的发光免疫试剂盒或免疫亲和色谱柱中的应用, 均属于本发明的保护范围。其中, 所述检测样品为水体、药品、食品或土壤。

[0037] 本发明提供的制备氯虫苯甲酰胺抗原的方法, 能够方便、快捷地获得氯虫苯甲酰胺抗原, 合成步骤简洁明了、合成成本低, 效果好。用本发明方法制备的氯虫苯甲酰胺抗原进行免疫得到的抗体的特异性好、最低检测限值低。本发明的制备氯虫苯甲酰胺抗原的方法及由该方法获得的氯虫苯甲酰胺抗原在氯虫苯甲酰胺的快速免疫检测应用中将有广阔的前景。

附图说明

[0038] 图 1 为氯虫苯甲酰胺抗原的合成路线图。

[0039] 图 2 为建立的氯虫苯甲酰胺间接 ELISA 法标准曲线。

具体实施方式

[0040] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0041] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0042] 二环己基碳二亚胺 (DCC), 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 (EDC), N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 弗氏完全佐剂, 弗氏不完全佐剂, 牛血清白蛋白和卵清白蛋白均购于 Sigma 公司, 羊抗小鼠 IgG-HRP 购自 Jackson 公司, 邻苯二胺 (OPD), 氨基乙酸, 氨基丙酸等其余常规试剂均购自北京化学试剂公司。

[0043] 2-[3-溴-1-(3-氯-2-吡啶基)-1H-5-吡唑]-6-氯-8-甲基-4H-苯并[d][1,3]恶嗪-4-酮按照如下文献提供的方法制备而得: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2007), 17(22), 6274-6279。

[0044] 实施例 1、式 A 所示氯虫苯甲酰胺半抗原 4-(2-(3-溴-1-(3-氯-2-吡啶基)-1H-吡唑-5-甲酰氨基)-5-氯-3-甲基苯甲酰氨基)丁酸化合物的合成:

[0045] 在 25mL 圆底烧瓶中加入 0.26mmol 氨基丁酸和 0.45mmol NaOH, 加入 5mL 无水 DMF, 25 °C 下搅拌 1h 后, 加入 0.22mmol 2-[3-溴-1-(3-氯-2-吡啶基)-1H-5-吡唑]-6-氯-8-甲基-4H-苯并[d][1,3]恶嗪-4-酮, 继续搅拌 12h, 将反应液倒入 15mL 水中, 用浓盐酸调节 pH 值为 3, 用乙酸乙酯 (3×5mL) 萃取, 无水硫酸钠干燥。旋转脱溶, 将得到的产物用正己烷和乙酸乙酯 (3 : 1, v/v) 重结晶, 得白色固体 89mg, 产率 72%。

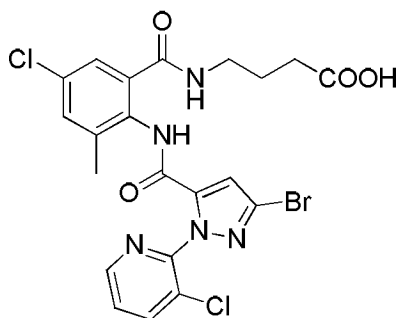
[0046] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO) : 1.64 (m, CH_2 , 2H), 2.16 (s, CH_3 , 3H), 2.24 (t, CH_2 , 2H), 3.14 (m, CH_2 , 2H), 7.34-8.49 (m, aromatic-H, 6H), 8.35 (t, CONHCH_2 , 1H), 10.25 (s, CONH , 1H), 12.07 (s, COOH , 1H) ;

[0047] $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO) : 17.8, 24.4, 31.2, 40.2, 110.7, 125.5, 126.7, 126.9, 128.0, 131.0, 131.2, 131.6, 136.2, 138.8, 139.3, 139.5, 147.2, 148.5, 155.6, 165.8, 174.3。

[0048] HRMS : m/z calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{BrCl}_2\text{N}_5\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 553.9997, found 553.9973。

[0049] 产品经 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 和高分辨质谱确证, 为式 A 所示氯虫苯甲酰胺半抗原 4-(2-(3-溴-1-(3-氯-2-吡啶基)-1H-吡唑-5-甲酰氨基)-5-氯-3-甲基苯甲酰氨基)丁酸化合物。

[0050]



[0051] 式 A

[0052] 实施例 2、氯虫苯甲酰胺和氯虫苯甲酰胺-卵清白蛋白(氯虫苯甲酰胺-OVA)抗原的制备

[0053] 制备氯虫苯甲酰胺:称取实施例 1 制备所得式 I 所示氯虫苯甲酰胺半抗原 4-(2-(3-溴-1-(3-氯-2-吡啶基)-1H-吡唑-5-甲酰氨基)-5-氯-3-甲基苯甲酰氨基)丁酸(0.036mmol),NHS(0.047mmol),和 DCC(0.040mmol)用 1mL 无水 DMF 溶解,在室温 25°C 搅拌反应 6 小时后,将反应液在 8000 转下离心 5 分钟,取上清液,其中含有式 B 所示化合物氯虫苯甲酰胺,反应后不分离产物,直接将上清液进行如下氯虫苯甲酰胺-卵清白蛋白(氯虫苯甲酰胺-OVA)抗原的制备;

[0054] 制备氯虫苯甲酰胺-卵清白蛋白(氯虫苯甲酰胺-OVA)抗原:

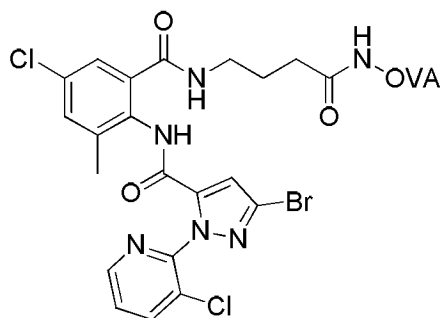
[0055] 将该实施例前述制备所得含有式 B 所示化合物氯虫苯甲酰胺的上清液缓慢滴加入载体蛋白 OVA 溶液(该载体蛋白溶液是由 105mg OVA 溶于 10mL pH 值为 7.5 的磷酸盐(PBS)缓冲液混匀而得)中,式 B 化合物与载体蛋白的投料摩尔比为 15:1,在 4°C 搅拌过夜后,将所得反应液用 pH 值为 7.5、浓度为 0.1mol/L 的 PBS 溶液透析三天,将透析完全的反应产物溶液(氯虫苯甲酰胺-OVA)稀释为 1mg/mL 的溶液,至于 -40°C 冻存待用。透析的作用在于去除未反应的 4-(2-(3-溴-1-(3-氯-2-吡啶基)-1H-吡唑-5-甲酰氨基)-5-氯-3-甲基苯甲酰氨基)丁酸或其它小分子,得到式 III1 所示 4-(2-(3-溴-1-(3-氯-2-吡啶基)-1H-吡唑-5-甲酰氨基)-5-氯-3-甲基苯甲酰氨基)丁酸与 OVA 的偶联物,也即式 C 所示氯虫苯甲酰胺抗原(如式 C1 所示)。

[0056] 实施例 3、氯虫苯甲酰胺和氯虫苯甲酰胺-卵清白蛋白(氯虫苯甲酰胺-OVA)抗原的制备

[0057] 氯虫苯甲酰胺的制备:称取实施例 1 制备所得式 I 所示氯虫苯甲酰胺半抗原 4-(2-(3-溴-1-(3-氯-2-吡啶基)-1H-吡唑-5-甲酰氨基)-5-氯-3-甲基苯甲酰氨基)丁酸(0.036mmol),NHS(0.047mmol),和 EDC(0.040mmol)用 1mL 水溶解,在室温 25°C 搅拌反应 6 小时后,将反应液在 8000 转下离心 5 分钟,取上清液,其中含有式 B 所示化合物氯虫苯甲酰胺。

[0058] 氯虫苯甲酰胺-卵清白蛋白(氯虫苯甲酰胺-OVA)抗原的制备:将该实施例前述制备所得含有式 B 所示化合物氯虫苯甲酰胺的上清液按照实施例 2 所示方法进行氯虫苯甲酰胺-卵清白蛋白(氯虫苯甲酰胺-OVA)抗原的制备,得到式 III1 所示 4-(2-(3-溴-1-(3-氯-2-吡啶基)-1H-吡唑-5-甲酰氨基)-5-氯-3-甲基苯甲酰氨基)丁酸与 OVA 的偶联物,也即式 C 所示氯虫苯甲酰胺抗原(如式 C1 所示);

[0059]



[0060] (式 C1)

[0061] 其中,该 PBS 溶液按照如下方法制备而得:将 NaCl、 KH_2PO_4 和 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 以质量比 8.0 : 0.2 : 2.96 的比例溶于水中,用水定容到 1L。

[0062] 实施例 4、氯虫苯甲酰胺和氯虫苯甲酰胺-牛血清白蛋白(氯虫苯甲酰胺-BSA)抗原的制备

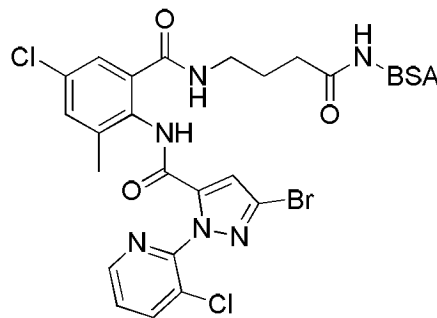
[0063] 氯虫苯甲酰胺的制备:

[0064] 称取实施例 1 制备所得式 I 所示氯虫苯甲酰胺半抗原 4-(2-(3-溴-1-(3-氯-2-吡啶基)-1H-吡唑-5-甲酰氨基)-5-氯-3-甲基苯甲酰氨基)丁酸(0.036mmol), NHS(0.047mmol), 和 DCC(0.040mmol) 用 1mL 无水 DMF 溶解,在室温搅拌反应 6 小时后,将反应液在 8000 转下离心 5 分钟,取上清液,其中含有式 B 所示化合物氯虫苯甲酰胺,反应后不分离产物,直接将上清液进行如下氯虫苯甲酰胺-牛血清白蛋白(氯虫苯甲酰胺-BSA)抗原的制备;

[0065] 氯虫苯甲酰胺-牛血清白蛋白(氯虫苯甲酰胺-BSA)抗原的制备:

[0066] 将该实施例前述制备所得含有式 B 所示化合物氯虫苯甲酰胺的上清液缓慢滴加到载体蛋白溶液中(该载体蛋白溶液是由 157.5mg BSA 溶于 10mL pH 值为 7.5 的磷酸盐缓冲液(PBS)),式 B 化合物 4-(2-(3-溴-1-(3-氯-2-吡啶基)-1H-吡唑-5-甲酰氨基)-5-氯-3-甲基苯甲酰氨基)丁酸与载体蛋白的投料摩尔比为 15 : 1,在 4℃ 搅拌过夜后,将所得反应液用 pH 值为 7.5、浓度为 0.1mol/L 的 PBS 溶液透析三天,将透析完全的反应产物溶液(氯虫苯甲酰胺-BSA)稀释为 1mg/mL 的溶液,至于 -40℃ 冻存待用。透析的作用在于去除未反应的 4-(2-(3-溴-1-(3-氯-2-吡啶基)-1H-吡唑-5-甲酰氨基)-5-氯-3-甲基苯甲酰氨基)丁酸或未反应的其它小分子,得到式 II2 所示 4-(2-(3-溴-1-(3-氯-2-吡啶基)-1H-吡唑-5-甲酰氨基)-5-氯-3-甲基苯甲酰氨基)丁酸与 OVA 的偶联物,也即式 C 所示氯虫苯甲酰胺抗原(如式 C2 所示)。

[0067]



[0068] 式 C2

[0069] 其中,该 PBS 溶液按照如下方法制备而得:将 NaCl、 KH_2PO_4 和 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 以质量比 8.0 : 0.2 : 2.96 的比例溶于水中,用水定容到 1L。

[0070] 实施例 5、氯虫苯甲酰胺-牛血清白蛋白(氯虫苯甲酰胺-BSA)抗原的应用

[0071] 一、利用氯虫苯甲酰胺-牛血清白蛋白(氯虫苯甲酰胺-BSA)抗原制备抗体

[0072] (1) 取 8-10 周龄的 Ba1 b/c 小白鼠作为实验动物。

[0073] (2) 基础免疫:由实施例 4 中得到稀释好的氯虫苯甲酰胺-BSA 抗原溶液(浓度为 1mg/mL),经无菌过滤器过滤后加入等体积弗氏完全佐剂,用磁力搅拌器充分搅拌乳化,直

到滴入水中不扩散。用乳化好的完全抗原采用腹腔及背部皮下多点注射 Ba1 b/c 小鼠,注射剂量为 0.1mg 乳化抗原 / 只。

[0074] (3) 加强免疫:基础免疫 2 周后,取 1mL 上述稀释好的氯虫苯甲酰胺 -BSA 抗原溶液,然后加入 1mL 弗氏不完全佐剂,用磁力搅拌器充分搅拌乳化,直到滴入水中不扩散。将乳化好的抗原采用腹腔及背部皮下多点注射 Ba1 b/c 小鼠,每只小鼠的注射剂量为 0.1mg 乳化稀释抗原 (8 周龄的 Ba1 b/C 小鼠体重约 23-25g)。

[0075] 加强免疫每隔 15 天免疫一次,从第三次加强免疫开始,每次免疫后第 3-5 天,从小鼠眼眶采血,测定抗体效价,包被原为 1mg/mL 氯虫苯甲酰胺 -OVA 稀释 500 倍用,待效价大于 1 : 8000 后 (效价定义为零孔显色值为 1 时,血清的稀释倍数),眼球摘除采血,血液室温静置 1 小时后,再于 4℃ 冰箱中静置 2 小时,然后于离心机中 8000r/min 离心 5 分钟后,分离出抗血清,即得到氯虫苯甲酰胺 -BSA 抗体。用于下述各实验。

[0076] 二、抗体效果检测

[0077] 下述实验中所用的各种缓冲液如下:

[0078] (1) 包被缓冲液:0.05M、pH 9.6 的碳酸盐缓冲液;

[0079] (2) 磷酸盐缓冲液 PBS (pH 7.5): 称量 4.0g NaCl、0.1g KH_2PO_4 、1.48g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 用蒸馏水定容到 500mL,浓度为 0.1M、pH 为 7.5 磷酸盐缓冲液;

[0080] (3) 样品稀释液 PBSTG:由 0.5mL 吐温 20、0.5g 明胶和 500mL 浓度为 0.1M、pH 为 9.6 的 PBS 缓冲液混合得到;

[0081] (4) 柠檬酸盐 - 磷酸盐缓冲液:由柠檬酸三钠、 Na_2HPO_4 和水组成;柠檬酸三钠在柠檬酸盐 - 磷酸盐缓冲液中的浓度为 0.01M, Na_2HPO_4 在柠檬酸盐 - 磷酸盐缓冲液中的浓度为 0.03M;柠檬酸盐 - 磷酸盐缓冲液的 pH 值为 5.5;

[0082] (5) 底物缓冲液:将 20.0mg 邻苯二胺 (OPD) 溶解于 10.0mL 柠檬酸盐 - 磷酸盐缓冲液中,然后加入 4 μL 体积百分含量为 30% 的 H_2O_2 水溶液得到的溶液,柠檬酸盐 - 磷酸盐缓冲液为 (4) 中所述;

[0083] (6) 终止缓冲液:2.0M 的硫酸水溶液;

[0084] (7) 洗涤液:由 NaCl、 KH_2PO_4 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、Tween-20 和水组成;NaCl 在洗涤液中的浓度为 8.0g/L, KH_2PO_4 在洗涤液中的浓度为 0.2g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 在洗涤液中的浓度为 2.96g/L, Tween-20 在洗涤液中体积百分含量为 1 : 1000。

[0085] (一) 抗体抑制实验

[0086] 1、氯虫苯甲酰胺 -OVA 包被抗原溶液的配制

[0087] 将上述实施例 1 制备的稀释后的 1mg/mL 的氯虫苯甲酰胺 -OVA 抗原完全解冻后,用包被缓冲液按 1 : 500、1 : 1000、1 : 2000、1 : 4000、1 : 8000、1 : 16000 进行梯度稀释,得到不同浓度的氯虫苯甲酰胺 -OVA 的包被抗原溶液。

[0088] 2、氯虫苯甲酰胺标准品溶液的配制

[0089] (1) 称取 5mg 氯虫苯甲酰胺标样,充分溶解于 10mL 无水甲醇中,即得到 0.5mg/mL 氯虫苯甲酰胺标准品溶液;

[0090] (2) 用样品稀释液将上述步骤 (1) 的 0.5mg/mL 氯虫苯甲酰胺标准品溶液配成浓度为 2000ng/mL 的氯虫苯甲酰胺标准品溶液。

[0091] 3、氯虫苯甲酰胺 -BSA 抗血清稀释液的配制

[0092] 将上述步骤一制备的氯虫苯甲酰胺-BSA 抗体用样品稀释液按 1 : 1000、1 : 2000、1 : 4000、1 : 8000、1 : 16000 进行梯度稀释,得到氯虫苯甲酰胺-BSA 抗血清稀释液。

[0093] 4、抗原、抗体的棋盘格实验

[0094] 包被:在 96 孔酶标板中每孔加入 100 μ L 步骤 1 制备得到的氯虫苯甲酰胺-OVA 包被抗原溶液,37 $^{\circ}$ C 包被 3 小时,用洗涤液洗涤 4 次。

[0095] 封闭:封闭液 150 μ L/ 孔,在 37 $^{\circ}$ C 湿盒中封闭 1h,弃封闭液,洗涤 3 次。

[0096] 竞争:零孔每孔加 50 μ l 样品稀释液,抑制孔每孔加入 50 μ l 步骤 2 制备得到的氯虫苯甲酰胺标准品溶液。将上述步骤 3 得到的氯虫苯甲酰胺-BSA 抗血清稀释液(从 2.5×10^3 倍到 40×10^3 倍)加入酶标板中(50 μ l/ 孔),置湿盒中 37 $^{\circ}$ C 条件下 30min,洗板 4 次。

[0097] 加酶标二抗:将羊抗鼠酶标二抗(IgG-HRP, Jackson 公司,产品目录号为 79556)(0.1mg/mL)稀释 1000 倍,稀释液是 0.1M, pH 为 9.6 的 PBSTG,每孔加 100 μ L,置湿盒中 37 $^{\circ}$ C 条件下 30min,洗板 4 次。

[0098] 显色:将底物缓冲液加入酶标板中,每孔 100 μ l。避光显色 15min。

[0099] 终止:每孔加入 50 μ L 终止缓冲液,用酶标仪 492nm 处测定各孔的 OD 值。

[0100] 效价的定义为零孔 OD 值为 1 时的血清稀释倍数。

[0101] 结果如表 1 所示。

[0102] 表 1、抗氯虫苯甲酰胺小鼠的血清效价检测(OPD 37 $^{\circ}$ C 显色 15min,2000ng 标样抑制)

[0103]

血清	1×10^3		2×10^3		4×10^3		8×10^3		16×10^3	
抗原	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I
0.5×10^3	3.412	3.038	3.147	2.615	2.532	1.691	1.745	1.056	1.331	0.571
1×10^3	3.315	2.865	2.814	2.237	2.305	1.542	1.568	0.844	1.009	0.421
2×10^3	3.000	2.544	2.834	1.894	2.321	1.312	1.491	0.773	0.878	0.257
4×10^3	2.965	1.963	2.548	1.324	2.044	0.820	1.396	0.510	0.585	0.187
8×10^3	2.683	1.362	2.393	0.861	1.782	0.549	1.108	0.274	0.400	0.102
16×10^3	2.245	1.057	2.091	0.731	1.502	0.395	0.875	0.186	0.303	0.074

[0104] 注:I 表示酶标板中的抑制孔,C 表示酶标板中的对照孔。

[0105] 表 1 中结果表明,当包被抗原稀释度为 1 : 8000,抗血清稀释度为 1 : 8000 时,此时的抑制率最好,为 75.2% (抑制率 = $(A_0 - A_{2000}) / A_0 \times 100\%$),也即此时的抑制效果最好。说明上述实施例 4 制备的氯虫苯甲酰胺-BSA 可以作为免疫原制备出检测氯虫苯甲酰胺的抗体。

[0106] A_0 为对照孔 OD 值; A_{2000} 为抑制孔 OD 值;

[0107] 抑制率的计算公式:抑制率 = $(A_0 - A_{2000}) / A_0 \times 100\%$ 。

[0108] (二) 氯虫苯甲酰胺标准曲线的建立

[0109] 将上述制备的氯虫苯甲酰胺标准品溶液用样品稀释液分别稀释成如下不同的浓度:2000ng/mL、1000ng/mL、500ng/mL、250ng/mL、125ng/mL、62.5ng/mL、31.25ng/mL、

15. 6ng/mL、7. 8ng/mL。

[0110] (1) 包被原的包被 :将上述制备的氯虫苯甲酰胺-OVA 抗原按照 1 : 8000 稀释后加入到酶标板中,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C温育 3 小时 ;倒去酶标板中的溶液,用洗涤液洗板 4 次,甩干 ;

[0111] (2) 在步骤 (1) 的酶标板中分别加入上述不同浓度的氯虫苯甲酰胺标准品溶液 (实验孔),每孔 50 μ L,对照孔中不添加氯虫苯甲酰胺标准品溶液而加入 50 μ L 样品稀释液 ;

[0112] (3) 分别向上述实验孔和对照孔中加入稀释倍数为 1 : 8000 的氯虫苯甲酰胺-BSA 抗血清稀释液,每孔 50 μ L ;37 $^{\circ}$ C温育 30 分钟 ;倒掉酶标板中的溶液,用洗涤液洗板 4 次,甩干 ;

[0113] (4) 在实验孔和对照孔中分别加入 100 μ L 稀释倍数为 1 : 1000 的 IgG-HRP (Jackson 公司,产品目录号为 79556) (0. 1mg/mL),37 $^{\circ}$ C温育 30 分钟 ;用洗涤液洗板 4 次,倒掉酶标板中的溶液,甩干 ;

[0114] (5) 向实验孔和对照孔中分别加入 100 μ L 底物缓冲液,37 $^{\circ}$ C温育 15 分钟后,再向每孔中加入 50 μ L 2. 0M 的硫酸溶液终止反应 ;

[0115] (6) 在 492nm 下测定吸光值 ;

[0116] (7) 绘制标准曲线 :以不同浓度 (ng/mL) 的氯虫苯甲酰胺标准品溶液作为 X 轴,以吸光度值的比值 ($B/B_0 \times 100\%$,其中, B 为氯虫苯甲酰胺标准品溶液的平均吸光度值, B_0 为对照孔的平均吸光度值) 作为 Y 轴,绘制标准曲线图。

[0117] 实验设 3 次重复,取三次实验结果的平均值,得到的标准曲线图如图 2 所示。结果表明,其灵敏度 (IC_{50}) 为 257ng/mL,检测范围是 13. 5ng/mL-1683ng/mL。说明上述实施例 4 制备的氯虫苯甲酰胺-BSA 作为抗原免疫小鼠得到的抗体具有很好的效果。

[0118] (三) 抗体特异性检测

[0119] 1、氯虫苯甲酰胺类似物标准品溶液的配制

[0120] 氯虫苯甲酰胺类似物标准品的配制

[0121] 参照步骤 (一) 中氯虫苯甲酰胺标准品的配制方法,制备氟虫双酰胺的标准样品。

[0122] 用样品稀释液将上述氟虫双酰胺分别稀释成如下浓度 :20000ng/mL、10000ng/mL、5000ng/mL、2500ng/mL、1250ng/mL、625ng/mL、312. 5ng/mL。

[0123] 2、建立标准曲线,测定抑制中浓度 IC_{50} (抑制率达到 50% 的标样浓度值)。

[0124] 标准曲线的建立方法与上述氯虫苯甲酰胺标准曲线的建立方法相同。

[0125] 交叉反应率 (%) = (氯虫苯甲酰胺 IC_{50}) / (氯虫苯甲酰胺类似螯合物 IC_{50}) $\times 100\%$ 。

[0126] 实验设 3 次重复,取三次实验结果的平均值,结果如表 2 所示。

[0127] 表 2、由氯虫苯甲酰胺-BSA 制备的抗体的特异性检测

[0128]

分析物	IC_{50} (ng/mL)	交叉反应率 (%)
氯虫苯甲酰胺	242. 81	100

氟虫双酰胺	> 20000	---
-------	---------	-----

[0129] 表 2 中，“---”表示无交叉。

[0130] 结果表明，上述由氯虫苯甲酰胺-BSA 制备得到的抗体与其类似物氟虫双酰胺的交叉反应率很小，说明用氯虫苯甲酰胺-BSA 制备的抗体对氯虫苯甲酰胺具有很好的特异性。

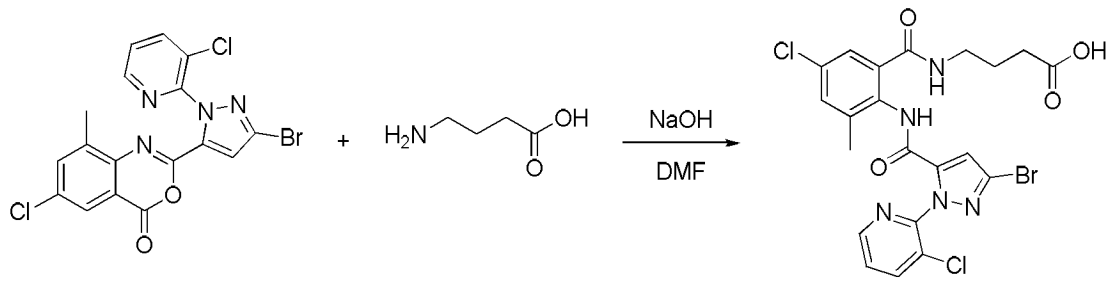


图 1

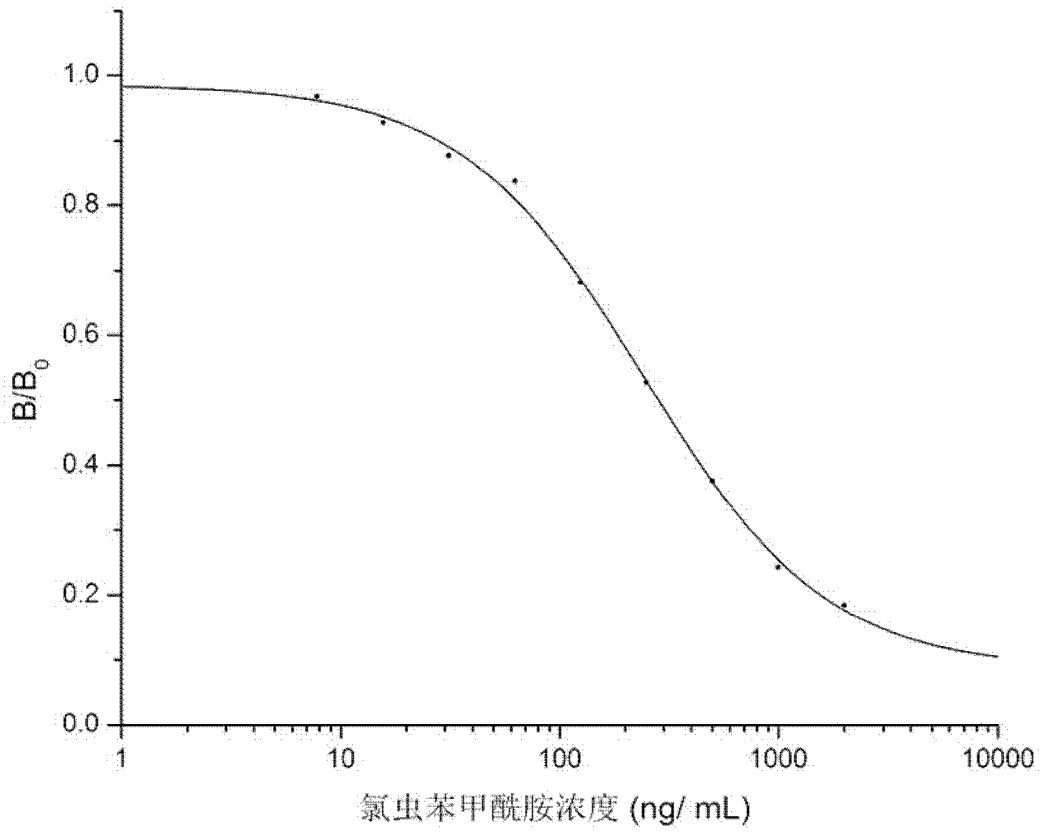
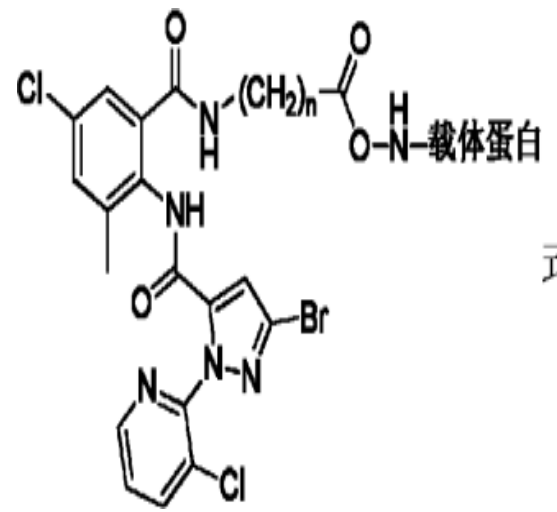


图 2

专利名称(译)	氯虫苯甲酰胺抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN102627628B	公开(公告)日	2013-12-11
申请号	CN201210060248.8	申请日	2012-03-08
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	刘尚钟 崔永亮 徐川 王毅 刘峰 王磊 欧俊军 南铁贵 谭桂玉 王敏 曹振 孙硕		
发明人	刘尚钟 崔永亮 徐川 王毅 刘峰 王磊 欧俊军 南铁贵 谭桂玉 王敏 曹振 孙硕		
IPC分类号	C07D401/04 C07D401/14 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K1/113 C07K16/44 G01N33/53		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	龙巧云		
其他公开文献	CN102627628A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种氯虫苯甲酰胺抗原及其制备方法与应用。该氯虫苯甲酰胺抗原如式C所示，是氯虫苯甲酰胺与载体蛋白通过酰胺键连接形成的偶联物。本发明提供的制备氯虫苯甲酰胺抗原的方法，能够方便、快捷地获得氯虫苯甲酰胺抗原，且合成步骤简洁明了、合成成本低，效果好。用本发明方法制备的氯虫苯甲酰胺抗原进行免疫得到的抗体的特异性好、最低检测限值低。本发明的制备氯虫苯甲酰胺抗原的方法及由该方法获得的氯虫苯甲酰胺抗原在氯虫苯甲酰胺的快速免疫检测应用中将有广阔的前景。式C。



式 C。