

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 1/02

C07K 14/00

G01N 33/53

G01N 33/531



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200310106274.0

[43] 公开日 2005 年 5 月 18 日

[11] 公开号 CN 1616481A

[22] 申请日 2003. 11. 13

[21] 申请号 200310106274.0

[71] 申请人 南京农业大学

地址 210095 江苏省南京市卫岗 1 号南京农业大学科技处刘凤权

[72] 发明人 刘凤权 张奇

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称 速灭威人工抗原合成方法

[57] 摘要

本发明速灭威人工抗原合成技术属于有机化学及免疫学技术范畴。根据有机化学反应的一般原理，合成速灭威半抗原及抗原(包括包被抗原与免疫原)，包括：间-甲基苯甲酰氯的合成， β -(间-甲基苯甲酰)氨基丙酸($H_{速}$)的合成，速灭威人工抗原的合成，速灭威人工抗原白色乳状液装于若干 1ml 离心管中，于 -20℃ 冰箱中存放备用。此抗原具有稳定性好、免疫原性较强等特点。此抗原可制备出高效价、高亲和力的速灭威抗体。抗原制备技术简便可行：抗原的整个制备过程无需要特别的仪器设备，成本低廉，容易工厂化规模生产。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

I.速灭威抗原合成方法,包括:

1) 间-甲基苯甲酰氯的合成: 称取双光气 28g, 小心加入 0.135g 活性碳, 36℃水浴加热, 用 51.5g 甲苯收集光气, 甲苯液在 23℃水浴中磁力搅拌, 尾气通入碱液, 光气剧毒, 且气味难闻, 应在通风橱中进行; 至双光气反应完, 甲苯相增重 16.5g, 得 24%光气/甲苯溶液, 称取间-甲基苯酚 7.7g, 溶进 100ml 10%的 NaOH 水溶液, 40℃水浴加热磁力搅拌 1 小时, 冷却到室温后缓慢加入上光气/甲苯溶液, 40 分钟加完, 开始计时, 4 小时后结束反应; 取有机相减压蒸馏得 9.012g 黄色油状物, GC 法测定目标物的含量, 5℃冰箱存放备用;

2) β -(间-甲基苯甲酰)氨基丙酸($H_{速}$)的合成: 称取间-甲基苯甲酰氯 3.275g, 溶进 4 ml 4M NaOH 溶液, 置 5℃冰箱冷却, 得 A 液; 称取 β -丙胺酸 1.989g, 溶进 4ml 4M NaOH 溶液, 置 5℃冰箱冷却, 得 B 液; 另取 3 ml 4M NaOH 溶液, 置 5℃冰箱冷却, 得 C 液。将 A 液与 C 液均分成 5 等份, 每间隔 5~10 分钟向 B 液中同时各加入 1 份, 整个反应置冰水中, 磁力搅拌下进行; 加样全部完成开始计时, 2 小时后结束反应。用浓盐酸调节反应终液的 pH 值为 4, 目标产物用乙酸乙酯 3 个 50ml 份抽提; 乙酸乙酯相用稀 HCl 洗涤数次, 用 1MNaHCO₃ 溶液 2 个 50ml 份抽提; 水相再用浓盐酸酸化, 乙酸乙酯再抽提; 无水 Na₂SO₄ 干燥, 所得物减压蒸馏浓缩至 13.8ml, 向浓缩液中逐渐加入 31ml 正己烷, 白色结晶物析出, 过滤。结晶物经低温干燥得 3.898g; 再经过甲苯与去离子水 5℃下洗涤, 低温干燥后称重得到 $H_{速}$ 结晶物 1.871g;

3) 速灭威人工抗原的合成: 称取 $H_{速}$ 结晶物 223mg 和 NHS 130mg, 用 1000 μ l DMF 溶解于反应装置中; 称取 300mg DCC, 用 500 μ l DMF 溶解; 将 DCC/DMF 溶液滴加到上反应装置中, 反应在磁力搅拌下室内温度进行 7 小时; 反应终液置 5℃冰箱冷却 2 小时以上, 经 1.2 万 rpm 离心 5 分钟, 取上清活泼酯液并将其均分为 2 等份, 分别缓慢滴加到 2.5ml 12mg/ml 的 BSA 溶液与 2.5ml 12mg/ml 的 OVA 溶液中反应, 反应缓冲液为 0.2M pH8.0 的 PB 液; 反应在磁力搅拌下室内温度进行 4 小时; 将反应液置透析袋内, 于 0.2M pH6.8 的 PB 中 4℃搅拌透析, 每 4 小时换一次透析液, 共透析 60 小时; 透析结束后将透析袋中的速灭威人工抗原白色乳状液装于若干 1ml 离心管中, 于 -20℃冰箱中存放备用。

速灭威人工抗原合成方法

(一) 技术领域

本发明速灭威人工抗原合成方法,属于生物技术领域。专用于制备特异性识别化学农药速灭威的抗体和研制高效、快速检测速灭威微含量的免疫速测。

(二) 背景技术

速灭威(metolcarb)属于氨基甲酸酯类化学杀虫剂,是我国大吨位生产的农药品种之一。速灭威制剂毒性中等,主要用于防治棉花、水稻、茶树、柑橘等作物的害虫,具有杀虫谱广、残效长、杀死率高等特点。目前国内许有厂家进行原药或其复配制剂的大规模生产并得到很好的推广。

自20世纪70年代以来,由于有机氯农药受到禁用或限用,以及抗有机磷杀虫剂的昆虫品种日益增多,现在国家已经对一些高毒性如克百威等农药进行禁用,因而速灭威等氨基甲酸酯类农药的用量必然逐年增加,这就使得这类农药残留量的检测倍受关注。速灭威虽然相对已经被禁用的农药来说优点明显,但速灭威的大量使用及其具有的残留期较长、毒性较高等特点,都使得速灭威残留量的检测监控显得十分迫切和必要。

文献报道的对速灭威有效成分检测方法有分光光度法、气相色谱法、高效液相色谱法、薄层层析法等。但只靠这些常规的检测方法已经越来越不能满足农药残留大批量、快速检测工作的需求。

1971年 Ercegovich 等首次用酶联免疫吸附测定(ELISA)法对 DDT 和马拉硫磷进行了残留分析,这是免疫化学技术首次用于农药残留分析。20世纪80年代后,免疫化学分析技术已成为优先研究、开发和利用的农药残留快速检测技术,美国化学学会将免疫分析方法与 GC、HPLC 方法一起列为化学农药残留分析的三大支柱技术,是21世纪最具竞争性和挑战性的超微量检测技术。利用 ELISA(酶联免疫吸附分析)方法不仅可以定性而且可以定量检测样品中的农药残留,这种分析方法对仪器设备要求不高,快速简便,一般无需对样品进行复杂的预处理,灵敏度高,特异性强。而且价格便宜,易于标准化、自动化和适于大容量样本分析等优点。已有文献报道了60多种杀菌剂、杀虫剂、除草剂等 ELISA 检测方法的建立,其检测水平可达纳克(ng)甚至皮克(pg)。国外一些公司已开发出商品化的农药残留检测试剂盒,如 Immunosystems Inc. 的 Res-I-Mune 试剂盒, NeoGen 公司的 Agriscreen Tickets 试剂盒, Millipore 公司的 EnviroGard 试剂盒, Environmental Diagnostics 公司的 EZ-Screen 试剂盒等。我国在这方面起步较晚,只是90年代后才有越来越多的单位和研究人员重视并从事农药免疫速测技术研究,如刘曙照等已经先后报道了氨基甲酸酯类杀虫剂克百威和甲萘威的免疫检测技术研究等等。

氨基甲酸酯类杀虫剂免疫速测国外报道的除了克百威和甲萘威外,1998年, Antonio Abad 等人制备出了甲硫威(methiocarb)抗原与单克隆抗体;2001年,

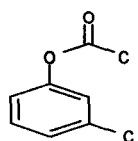
Maria J. Moreno 等人报道了识别残杀威(propoxur)的单克隆抗体的制备。速灭威抗原与抗体的制备目前在国内外还未见报道,半抗原结构改造与抗原制备是免疫速测研究技术的难点和关键所在。

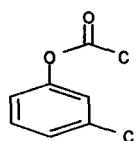
(三) 发明内容

技术问题 正在使用的化学农药速灭威无法与蛋白质(如牛血清白蛋白等)分子直接偶联,而速灭威自身又无法制备出特异性识别速灭威的抗体(化学小分子物质不具有免疫原性),本发明的目的就是解决这样的问题。提供速灭威人工抗原合成方法,能合成有效的速灭威抗原,并经对动物的免疫可生产出特异性识别速灭威农药的抗体。

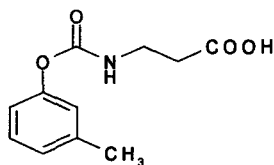
技术方案

速灭威抗原合成,包括以下:



1) 间-甲基苯氧甲酰氯(分子式: $C_8H_7O_2Cl$, 结构式: )的合成: 称取双光气 28g, 小心加入 0.135g 活性碳, 36℃水浴加热, 用 51.5g 甲苯收集光气, 甲苯液在 23℃水浴中磁力搅拌, 尾气通入碱液(注意: 光气剧毒, 且气味难闻, 应在通风橱中进行)。至双光气反应完, 甲苯相增重 16.5g, 得 24%光气/甲苯溶液。称取间-甲基苯酚 7.7g, 溶进 100ml 10%的 NaOH 水溶液, 40℃水浴加热磁力搅拌 1 小时, 冷却到室温后缓慢加入上光气/甲苯溶液, 40 分钟加完, 开始计时, 4 小时后结束反应。取有机相减压蒸馏得 9.012g 黄色油状物。GC 法测定目标物的含量, 5℃冰箱存放备用。

2) β - (间-甲基苯氧甲酰) 氨基丙酸 ($H_{速}$) (分子式: $C_{11}H_{13}O_4N$, 结构式:



)的合成: 称取间-甲基苯氧甲酰氯 3.275g (约 12.1mmol),

溶进 4 ml 4M NaOH 溶液, 置 5℃冰箱冷却, 得 A 液; 称取 β -丙氨酸 1.989g (约 22.3mmol), 溶进 4ml 4M NaOH 溶液, 置 5℃冰箱冷却, 得 B 液; 另取 3 ml 4M NaOH 溶液, 置 5℃冰箱冷却, 得 C 液。将 A 液与 C 液均分成 5 等份, 每间隔 5~10 分钟向 B 液中同时各加入 1 份, 整个反应置冰水中, 磁力搅拌下进行。加样全部完成开始计时, 2 小时后结束反应。用浓盐酸调节反应终液的 pH 值为 4, 目标产物用乙酸乙酯(3 个 50ml 份)抽提; 乙酸乙酯相用稀 HCl 洗涤数次, 用 1MNaHCO₃ 溶液(2 个 50ml 份)抽提; 水相再用浓盐酸酸化, 乙酸乙酯再抽提; 无水 Na₂SO₄ 干燥, 所得物减压蒸馏浓缩至 13.8ml, 向浓缩液中逐渐加入 31ml 正己烷, 白色结晶物析出, 过滤。结晶物经低温干燥得 3.898g; 再经过甲苯与去离子水 5℃下洗涤, 低温干燥后称重得到 $H_{速}$ 较纯品 1.871g, 回收率为 48%。

3) 速灭威人工抗原($H_{速}$ -OVA、 $H_{速}$ -BSA)的合成: 称取 $H_{速}$ 结晶物 223mg 和 NHS 130mg, 用 1000 μ l DMF 溶解于反应装置中; 称取 300mg DCC, 用 500 μ l DMF 溶解; 将 DCC/DMF 溶液滴加到上反应装置中。反应在磁力搅拌下室内温度进行 7 小时(过夜)。反应终液置 5℃冰箱冷却 2 小时以上, 经 1.2 万 rpm 离心 5 分钟, 取上清活酯液并将其均分为 2 等份, 分别缓慢滴加到 2.5ml 12mg/ml 的 BSA

溶液与 2.5ml 12mg/ml 的 OVA 溶液中反应, 反应缓冲液为 0.2M pH8.0 的 PB 液。反应在磁力搅拌下室内温度进行 4 小时(从加样结束开始计时)。将反应液置透析袋内, 于 0.2M pH6.8 的 PB 中 4℃ 搅拌透析, 每 4 小时换一次透析液, 共透析 60 小时。透析结束后将透析袋中的白色乳状液装于若干 1ml 离心管中, 于 -20℃ 冰箱中存放备用。所合成的速灭威保存期限为 3 年。

上述抗原用常规免疫方案即可制备得到特异性识别速灭威的抗体。

有益效果 本发明与现有技术相比, 其优点和积极效果表现在:

(1) 抗原实用性强: 速灭威抗原合成与抗体制备技术具有重要的使用价值和实际意义。用上述方法能够合成具有活性基团的速灭威农药类似结构, 有效地制备出速灭威抗原, 并用此抗原生产出高特异性识别速灭威农药的抗体, 为速灭威农药免疫速测试剂盒的研制解决了一个技术难点, 为速灭威农药高效快速简便的残留量分析开山辟路, 必将推动速灭威免疫速测试剂盒的问世。

(2) 抗原稳定性好: 此法合成的速灭威抗原具有较好的稳定性, 5℃ 环境下 4 个月不影响其免疫原性。-20℃ 冰箱至少可以存放 3 年。

(3) 抗原制备技术简便可行: 抗原的整个制备过程无需要特别的仪器设备, 成本低廉, 容易工厂化规模生产。

具体实施方式

实施例 1

速灭威抗原免疫新西兰白兔

将制备好的抗原 H_速-OVA、H_速-BSA 分别用来免疫 2 kg 以上的新西兰白兔。平均每次抗原用量约 3mg(以蛋白质的量计)。首次免疫采用由等体积的弗氏完全佐剂乳化的免疫原, 于兔皮下多点注射; 首免后间隔 3 周、以后每隔 2 周用由等体积的弗氏不完全佐剂乳化的免疫原, 于兔背部皮下或皮内多点以及后腿肌肉注射。从第四次开始, 每次免疫后一周, 兔耳缘静脉采血测效价(琼脂糖双扩散法或间接竞争 ELISA 法)。待效价达到一定程度(以阳性结果所用抗血清的最大稀释倍数表示, 琼脂糖双扩散法效价达 32 以上, 间接非竞争 ELISA 法效价达 10⁴ 以上)后, 兔心脏采血至其死亡。以此方法制备得高效价的速灭威抗体。

实施例 2 速灭威农药竞争性与速灭威抗体结合

采用间接竞争 ELISA 方法, 对检测曲线进行初步探索。方法如下:

包被: 用碳酸盐缓冲液将包被抗原稀释一定的倍数, 每孔加 100 μl 到 96 孔酶联微量分析板上, 至 5℃ 环境放置过夜。

洗涤: PBS 洗涤 3 次

封闭: PBS 稀释 OVA 至 1%, 200 μl/孔, 37℃ 1 小时。

洗涤: PBS 洗涤 3 次

加样: 将农药以 10 倍逐级稀释(速灭威原药先用丙酮助溶后再用 PBS 稀释), 与含 0.5%OVA 的 PBS 稀释到一定倍数的相应抗血清溶液等体积(鞣旋震荡 30 秒, 充分混匀)室温(36℃)反应 0.5 小时后, 加入到酶联板上 100 μl/孔(相当于农药与抗血清溶液各 50 μl/孔), 37℃ 1 小时。

洗涤: PBS 洗涤 4 次

加酶标二抗：含 1%OVA 的 PBS 溶液稀释 HRP-羊抗兔 IgG, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 1 小时。

洗涤：PBS 洗涤 8 次

显色：TMB 底物溶液 100 μ l/孔, 室温 (36 $^{\circ}$ C左右) 10 分钟

终止反应：加 2M 的硫酸, 50 μ l/孔

酶联仪上 450nm 处读数, 并计算抑制率。当速灭威原药浓度为 10^{-12} g/ml 时仍有 10%的抑制率。结果表明, 制备的抗体对速灭威农药具有识别作用。可用于研制速灭威免疫速测试剂盒。

专利名称(译)	速灭威人工抗原合成方法		
公开(公告)号	CN1616481A	公开(公告)日	2005-05-18
申请号	CN200310106274.0	申请日	2003-11-13
[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	刘凤权 张奇		
发明人	刘凤权 张奇		
IPC分类号	C07K1/02 C07K14/00 G01N33/53 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明速灭威人工抗原合成技术属于有机化学及免疫学技术范畴。根据有机化学反应的一般原理，合成速灭威半抗原及抗原(包括包被抗原与免疫原)，包括：间 - 甲基苯甲酰氯的合成， β - (间 - 甲基苯甲酰)氨基丙酸(H速)的合成，速灭威人工抗原的合成，速灭威人工抗原白色乳状液装于若干1ml离心管中，于 - 20°C冰箱中存放备用。此抗原具有稳定性好、免疫原性较强等特点。此抗原可制备出高效价、高亲和力的速灭威抗体。抗原制备技术简便可行：抗原的整个制备过程无需要特别的仪器设备，成本低廉，容易工厂化规模生产。