



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110938007 A

(43)申请公布日 2020.03.31

(21)申请号 201911061524.0

C07K 14/765(2006.01)

(22)申请日 2019.11.01

C07K 1/107(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

(71)申请人 深圳市易瑞生物技术股份有限公司

G01N 33/577(2006.01)

地址 518102 广东省深圳市宝安区新安街
道留仙一路2-1号易瑞生物园

G01N 33/53(2006.01)

(72)发明人 王西丽 杨星星 魏雄军 邓启福
杨中 黎维 杨林林 付辉 金虹
李城 张鑫

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 许青华

(51)Int.Cl.

C07C 215/68(2006.01)

C07C 213/02(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图1页

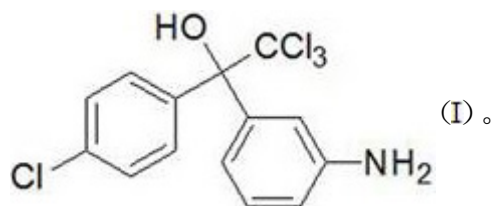
(54)发明名称

三氯杀螨醇半抗原、人工抗原、抗体及其合
成方法和应用

(57)摘要

本发明公开了三氯杀螨醇半抗原、人工抗原、抗体及其合成方法和应用,本发明首次公开了一种新型结构的三氯杀螨醇半抗原,该三氯杀螨醇半抗原与目标待测物三氯杀螨醇相似程度高,最大程度保留了三氯杀螨醇的特征结构,在三氯杀螨醇的苯氯基位置引入氨基,能更好地暴露半抗原的抗原决定簇,使得三氯杀螨醇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;该三氯杀螨醇半抗原与载体蛋白偶联后得到的三氯杀螨醇免疫抗原去免疫动物,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,经间接竞争ELISA检测三氯杀螨醇抗体的IC₅₀为23.5ug/L,为后续建立三氯杀螨醇的各种免疫分析方法提供基础。

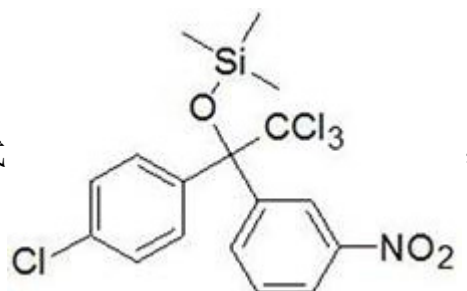
1. 一种三氯杀螨醇半抗原, 其特征在于, 其具有式(I)所示的结构:



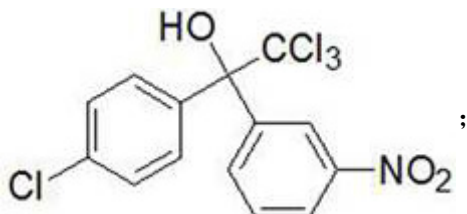
2. 如权利要求1所述三氯杀螨醇半抗原的合成方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

S1. 在催化剂的催化作用下, (三氯甲基) 三甲基硅烷与4-氯-3-硝基二苯甲酮发生反

应, 得到中间体1, 所述中间体1具有结构式



S2. 将所述中间体1进行水解反应, 得到中间体2, 所述中间体2具有结构式



S3. 将所述中间体2进行还原反应, 得到式(I)所示结构的三氯杀螨醇半抗原。

3. 如权利要求2所述三氯杀螨醇半抗原的合成方法, 其特征在于, 所述步骤S1包括如下步骤: 在反应器中先加入4-氯-3-硝基二苯甲酮、用DMF溶解的催化剂, 再在室温下缓慢滴加DMF溶解的(三氯甲基)三甲基硅烷, 滴加完毕之后, 室温持续搅拌反应, 反应结束后, 加入水, 用乙酸乙酯进行萃取, 收集有机相, 有机相经蒸干后过柱纯化, 得到中间体1。

4. 如权利要求3所述三氯杀螨醇半抗原的合成方法, 其特征在于, 所述催化剂选自甲酸钠、乙酸铵、碳酸钾、苯甲酸钠、和醋酸锂中的一种; 所述(三氯甲基)三甲基硅烷和4-氯-3-硝基二苯甲酮的物质的量之比大于1。

5. 如权利要求2所述三氯杀螨醇半抗原的合成方法, 其特征在于, 所述步骤S2包括如下步骤: 称取中间体1, 用有机溶剂溶解后, 加入酸性溶液, 加热回流, 进行水解反应; 反应结束后蒸干有机溶剂, 加水稀释, 再用乙酸乙酯萃取, 有机相经蒸干、过柱纯化后得到中间体2。

6. 如权利要求2所述三氯杀螨醇半抗原的合成方法, 其特征在于, 所述步骤S3包括如下步骤: 称取中间体2, 用有机溶剂溶解后, 加入还原剂、氯化铵, 再加入盐酸溶液, 加热回流, 进行还原反应; 反应结束后蒸干有机溶剂, 加碳酸氢钠溶液将溶液调为微碱性, 再用乙酸乙酯萃取, 有机相经蒸干、过柱纯化后得到式(I)所示结构的三氯杀螨醇半抗原; 其中, 所述还原剂选自铁粉、锌粉、和镁粉中的一种。

7. 三氯杀螨醇人工抗原, 其特征在于, 所述三氯杀螨醇人工抗原包括三氯杀螨醇免疫抗原和三氯杀螨醇包被抗原, 所述三氯杀螨醇免疫抗原和包被抗原均由权利要求1所述的式(I)所示结构的三氯杀螨醇半抗原与载体蛋白偶联而成。

8. 如权利要求7所述的三氯杀螨醇人工抗原,其特征在于,上述三氯杀螨醇人工抗原的合成方法包括如下步骤:在反应容器中加入三氯杀螨醇半抗原和HCl,在冰水浴条件下加入亚硝酸钠溶液,反应制备得到重氮液;将载体蛋白和碳酸钠缓冲液滴入上述重氮液中,再反应一定时间后加入水,用PBS透析,离心分装冻存。

9. 一种三氯杀螨醇抗体,它是由权利要求7所述的三氯杀螨醇免疫抗原经动物免疫得到。

10. 一种如权利要求9所述的三氯杀螨醇抗体在检测三氯杀螨醇残留中的应用。

三氯杀螨醇半抗原、人工抗原、抗体及其合成方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫化学分析技术领域,特别是涉及了三氯杀螨醇半抗原、人工抗原、抗体及其合成方法和应用。

背景技术

[0002] 三氯杀螨醇(Dicofol),别名开乐散,化学名称2,2,2-三氯-1,1-双(4-氯苯基)乙醇。一般为20%乳油,外观淡黄色至红棕色单相透明油状液体,纯品为固体,在酸性中稳定,遇碱易分解,其是以DDT为原理合成的一种广谱低毒的有机氯杀螨剂,对成螨、幼若螨和卵均有效,有较好选择性,不伤害天敌,对害螨以触杀为主,残效期长,无内吸作用,主要用于防治棉花、果树、花卉等的多种螨害。由于三氯杀螨醇不易分解,残留量高,是一种难降解的内分泌干扰物质,越来越多的证据证明,三氯杀螨醇在环境中暴露,干扰鱼类、鸟类、老鼠等动物的内分泌系统,对人类也有较强的雌激素效应,对水生生物有极高毒性,自2018年10月1日起,全面禁止三氯杀螨醇销售、使用。

[0003] 三氯杀螨醇的常见检测方法包括填充柱气相色谱法、毛细管气相色谱法、气质联用色谱法,这些检测方法的精确性比较高,但是实际操作难度高,对于工作的精确性要求比较高,而且检测成本也比较高,不适合进行大规模的推广及应用。上述方法中所用仪器设备操作复杂、成本高、对操作人员技术要求高,且不能立即显示结果,不适用于基层管理等部门对怀疑对象进行快速的在线检测和监控。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。所以免疫分析为三氯杀螨醇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三氯杀螨醇残留量时,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、制备出合适的三氯杀螨醇半抗原。但是,目前针对三氯杀螨醇半抗原合成的相关报道较少,CN107907687A公开了一种检测三氯杀螨醇的半抗原制备方法,以及它在时间分辨荧光试纸条和胶体金免疫层析试纸条中的应用。该发明的时间分辨荧光试纸条和胶体金免疫层析试纸条具有灵敏度高、准确度高、精密度高、成本低、操作简单、检测时间短、适合各种单位使用、储存简单、保质期长的优点,能同时快速检测大批量样品,可实现现场高通量快速检测。但本申请的发明人在实现本申请实施例的过程中,发现上述技术的三氯杀螨醇抗体的特异性与灵敏度有一定制约。

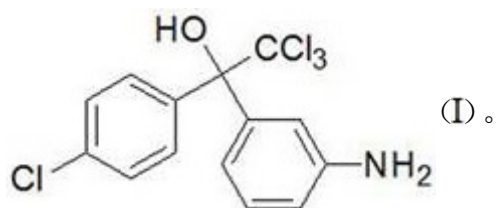
[0005] 因此建立一种经济、方便、可靠、特异、敏感、快速、准确的定量检测食品中三氯杀螨醇的方法,已经成为本领域亟待解决的技术问题。

发明内容

[0006] 为了弥补已有技术的缺陷,本发明提供三氯杀螨醇半抗原、人工抗原、抗体及其合成方法和应用,该三氯杀螨醇半抗原具有准确、灵敏、快速、能够检测三氯杀螨醇的优点,为三氯杀螨醇快速检测产品的开发提供了一定的理论指导,对食品安全监控具有重要意义。

[0007] 本发明所要解决的技术问题通过以下技术方案予以实现：

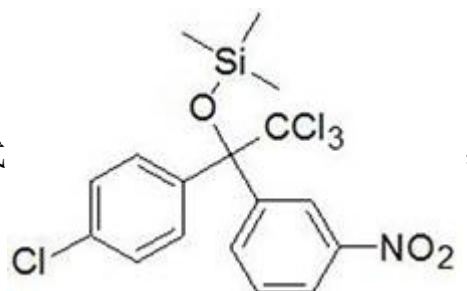
本发明的第一方面提供了三氯杀螨醇半抗原，其具有式Ⅰ所示的结构：



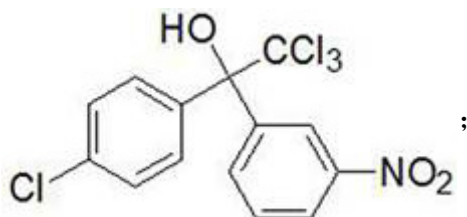
[0008] 本发明的第二方面，提供上述三氯杀螨醇半抗原的合成方法，包括如下步骤：

S1. 在催化剂的催化作用下，(三氯甲基)三甲基硅烷与4-氯-3-硝基二苯甲酮发生反

应，得到中间体1，所述中间体1具有结构式



S2. 将所述中间体1进行水解反应，得到中间体2，所述中间体2具有结构式



S3. 将所述中间体2进行还原反应，得到式Ⅰ所示结构的三氯杀螨醇半抗原。

[0009] 进一步地，所述步骤S1包括如下步骤：在反应器中先加入4-氯-3-硝基二苯甲酮、用DMF溶解的催化剂，再在室温下缓慢滴加DMF溶解的(三氯甲基)三甲基硅烷，滴加完毕之后，室温持续搅拌反应，反应结束后，加入水，用乙酸乙酯进行萃取，收集有机相，有机相经蒸干后过柱纯化，得到中间体1。

[0010] 进一步地，所述催化剂选自甲酸钠、乙酸铵、碳酸钾、苯甲酸钠、和醋酸锂中的一种；所述(三氯甲基)三甲基硅烷和4-氯-3-硝基二苯甲酮的物质的量之比大于1。

[0011] 进一步地，所述步骤S2包括如下步骤：称取中间体1，用有机溶剂溶解后，加入酸性溶液，加热回流，进行水解反应；反应结束后蒸干有机溶剂，加水稀释，再用乙酸乙酯萃取，有机相经蒸干、过柱纯化后得到中间体2。

[0012] 进一步地，所述步骤S3包括如下步骤：称取中间体2，用有机溶剂溶解后，加入还原剂、氯化铵，再加入盐酸溶液，加热回流，进行还原反应；反应结束后蒸干有机溶剂，加碳酸氢钠溶液将溶液调为微碱性，再用乙酸乙酯萃取，有机相经蒸干、过柱纯化后得到式Ⅰ所示结构的三氯杀螨醇半抗原；其中，所述还原剂选自铁粉、锌粉、和镁粉中的一种。

[0013] 本发明的第三方面，提供三氯杀螨醇人工抗原，所述三氯杀螨醇人工抗原包括三氯杀螨醇免疫抗原和三氯杀螨醇包被抗原，所述三氯杀螨醇免疫抗原和包被抗原均由上述的式Ⅰ所示结构的三氯杀螨醇半抗原与载体蛋白偶联而成。

[0014] 进一步地，上述三氯杀螨醇人工抗原的合成方法包括如下步骤：在反应容器加

入三氯杀螨醇半抗原和HCl，在冰水浴条件下加入亚硝酸钠溶液，反应制备得到重氮液；将载体蛋白和碳酸钠缓冲液滴入上述重氮液中，再反应一定时间后加入水，用PBS透析，离心分装冻存。

[0015] 本发明的第四方面，还提供一种三氯杀螨醇抗体，它是由上述三氯杀螨醇免疫抗原经动物免疫得到。

[0016] 本发明的第五方面，还提供一种上述三氯杀螨醇抗体在检测三氯杀螨醇残留中的应用。

[0017] 本发明具有如下有益效果：

本发明首次公开了一种新型结构的三氯杀螨醇半抗原，该三氯杀螨醇半抗原与目标待测物三氯杀螨醇相似程度高，最大程度保留了三氯杀螨醇的特征结构，在三氯杀螨醇的苯氯基位置引入氨基，能更好地暴露半抗原的抗原决定簇，使得三氯杀螨醇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；该三氯杀螨醇半抗原与载体蛋白偶联后得到的三氯杀螨醇免疫抗原去免疫动物，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，经间接竞争ELISA检测三氯杀螨醇抗体的 IC_{50} 为23.5ug/L，为后续建立三氯杀螨醇的各种免疫分析方法提供基础。

[0018] 本发明中创造性地合成三氯杀螨醇半抗原并将其分别与载体蛋白偶联后制得三氯杀螨醇免疫抗原和三氯杀螨醇包被抗原，这种方法对三氯杀螨醇灵敏度高、特异性强，适合三氯杀螨醇残留的分析。

[0019] 本发明中三氯杀螨醇半抗原的合成方法，使用的原料易得，反应操作较为简单，反应条件易于控制。本发明的三氯杀螨醇半抗原合成方法，三氯杀螨醇半抗原的纯度和收率高，整体的合成成本更具优势。

附图说明

[0020] 图1为本发明三氯杀螨醇半抗原的合成路线；

图2为本发明实施例1中三氯杀螨醇半抗原的质谱图。

具体实施方式

[0021] 本发明中所用原料、设备，若无特别说明，均为本领域的常用原料、设备；本发明中所用方法，若无特别说明，均为本领域的常规方法。

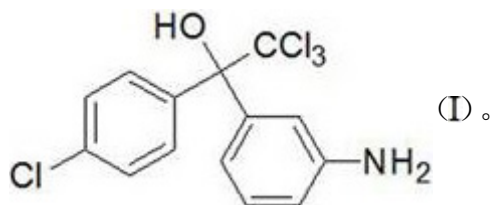
[0022] 如无特殊说明，本说明书中的术语的含义与本领域技术人员一般理解的含义相同，但如有冲突，则以本说明书中的定义为准。

[0023] 本文中“包括”、“包含”、“含”、“含有”、“具有”或其它变体意在涵盖非封闭式包括，这些术语之间不作区分。术语“包含”是指可加入不影响最终结果的其它步骤和成分。术语“包含”还包括术语“由…组成”和“基本上由…组成”。本发明的组合物和方法/工艺包含、由其组成和基本上由本文描述的必要元素和限制项以及本文描述的任一的附加的或任选的成分、组分、步骤或限制项组成。

[0024] 在说明书和权利要求书中使用的涉及组分量、工艺条件等的所有数值或表述在所有情形中均应理解被“约”修饰。涉及相同组分或性质的所有范围均包括端点，该端点可独立地组合。由于这些范围是连续的，因此它们包括在最小值与最大值之间的每一数值。还应

理解的是,本申请引用的任何数值范围预期包括该范围内的所有子范围。

[0025] 正如背景技术所描述的,现有技术中存在针对三氯杀螨醇半抗原合成的相关报道较少,已报道的三氯杀螨醇半抗原获得的三氯杀螨醇抗体的特异性与灵敏度有一定制约的技术问题。为了解决上述技术问题,本发明提供了一种三氯杀螨醇半抗原,其具有式(I)所示的结构:



[0026] 本发明中,提供一种三氯杀螨醇半抗原结构,该半抗原与目标待测物三氯杀螨醇相似程度高,最大程度保留了三氯杀螨醇的特征结构,能更好地暴露半抗原的抗原决定簇,使得三氯杀螨醇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;该三氯杀螨醇半抗原与载体蛋白偶联后得到的三氯杀螨醇免疫抗原去免疫动物,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,为后续建立三氯杀螨醇的各种免疫分析方法提供基础。

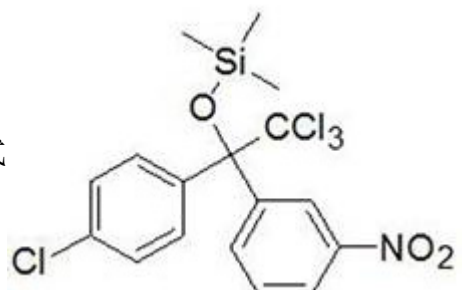
[0027] 本发明的三氯杀螨醇半抗原,不仅合成方法简便、纯度较高,而且能应用于合成适于动物免疫的抗原体系,为三氯杀螨醇免疫检测方法的进一步发展奠定了基础。

[0028] 第二方面,本发明提供上述三氯杀螨醇半抗原的合成方法。

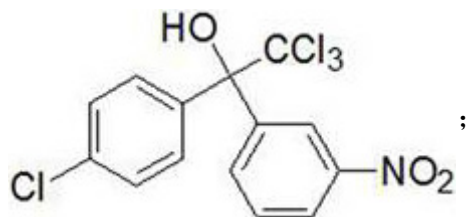
[0029] 具体地,式(I)所示结构的三氯杀螨醇半抗原的合成方法包括如下步骤:

S1. 在催化剂的催化作用下,(三氯甲基)三甲基硅烷(TMSCCl₃)与4-氯-3-硝基二苯甲

酮发生反应,得到中间体1,所述中间体1具有结构式



S2. 将所述中间体1进行水解反应,得到中间体2,所述中间体2具有结构式



S3. 将所述中间体2进行还原反应,得到式(I)所示结构的三氯杀螨醇半抗原。

[0030] 其中,所述步骤S1包括如下步骤:在反应器中先加入4-氯-3-硝基二苯甲酮、用DMF溶解的催化剂,再在室温下缓慢滴加DMF溶解的(三氯甲基)三甲基硅烷,滴加完毕之后,室温持续搅拌反应,反应结束后,加入水,用乙酸乙酯进行萃取,收集有机相,有机相经蒸干后过柱纯化,得到中间体1。其中,所述(三氯甲基)三甲基硅烷和4-氯-3-硝基二苯甲酮的物质的量之比大于1,通过这种比例设置,使得过量的(三氯甲基)三甲基硅烷与4-氯-3-硝基二

苯甲酮可以完全反应,而过量的(三氯甲基)三甲基硅烷可以直接蒸除,不仅可以提高中间体1的产率,而且分离纯化操作简单,中间体1的纯度高。所述催化剂包括但不限于甲酸钠、乙酸铵、碳酸钾、苯甲酸钠、醋酸锂中的一种;更优选地,所述催化剂为甲酸钠,所述甲酸钠的质量为所述4-氯-3-硝基二苯甲酮质量的5%以上。

[0031] 所述步骤S2包括如下步骤:称取中间体1,用有机溶剂溶解后,加入酸性溶液,加热回流,进行水解反应;反应结束后蒸干有机溶剂,加水稀释,再用乙酸乙酯萃取,有机相经蒸干、过柱纯化后得到中间体2;其中,所述有机溶剂优选但不局限为甲醇;所述酸性溶液为本领域进行该反应常用的酸性溶液,作为优选,所述酸性溶液采用质量浓度均为20%以上的盐酸或氢溴酸水溶液。本发明中并不具体限定所述酸性溶液的添加量,可以采用本领域进行该类反应常用的酸性溶液的添加量。该步骤下,反应具有更高的效率和稳定性。

[0032] 所述步骤S3包括如下步骤:称取中间体2,用有机溶剂溶解后,加入还原剂、氯化铵再加入盐酸溶液,加热回流,进行还原反应;反应结束后蒸干有机溶剂,加碳酸氢钠溶液将溶液调为微碱性,再用乙酸乙酯萃取,有机相经蒸干、过柱纯化后得到式(I)所示结构的三氯杀螨醇半抗原。其中,所述有机溶剂优选但不局限为甲醇;其中,所述还原剂包括但不限于铁粉、锌粉、和镁粉中的一种;更优选地,所述还原剂为铁粉。本发明对所述还原反应的具体工艺参数和步骤没有特别限制,以本领域技术人员熟知的还原反应工艺的参数即可,本领域技术人员可以根据实际生产情况、产品要求或质量要求进行选择和调整。

[0033] 本发明根据三氯杀螨醇的结构特点,合理设计三氯杀螨醇半抗原的合成方法,使用的原料易得,反应操作较为简单,反应条件易于控制。本发明的三氯杀螨醇半抗原合成方法,三氯杀螨醇半抗原的纯度和收率高,整体的合成成本更具优势。

[0034] 第三方面,本发明提供三氯杀螨醇人工抗原,所述三氯杀螨醇人工抗原包括三氯杀螨醇免疫抗原和三氯杀螨醇包被抗原,所述三氯杀螨醇免疫抗原和包被抗原均由式(I)所示结构的三氯杀螨醇半抗原与载体蛋白偶联而成。。

[0035] 本发明中,所述三氯杀螨醇免疫抗原由式(I)所示结构的三氯杀螨醇半抗原与载体蛋白偶联而成,引入的连接臂将载体蛋白对小分子的电子排布和空间结构的影响降到最低,并且能更好地暴露半抗原的抗原决定簇,提高了半抗原的免疫原性,用这种三氯杀螨醇免疫抗原去免疫动物,所得的抗体的效价、特异性、亲和力都比较好。

[0036] 上述三氯杀螨醇人工抗原的合成方法包括如下步骤:在反应容器中加入三氯杀螨醇半抗原和HCl,在冰水浴条件下加入亚硝酸钠溶液,反应制备得到重氮液;将载体蛋白和碳酸钠缓冲液滴入上述重氮液中,再反应一定时间后加入水,用PBS透析,离心分装冻存。

[0037] 更具体地,上述三氯杀螨醇免疫抗原的合成方法包括如下步骤:在反应容器中加入三氯杀螨醇半抗原10.5mg,1mL水,0.12mL 1N HCl,在冰水浴条件下加入40uL 50mg/mL亚硝酸钠溶液,冰水中反应30 min制备得到重氮液;将12mg KLH和 2mL 0.1M pH9.5碳酸钠缓冲液滴入上述重氮液中,再反应3h,加入3mL水,用PBS透析3d,离心分装冻存。

[0038] 上述三氯杀螨醇包被抗原的合成方法,包括如下步骤:在反应容器中加入三氯杀螨醇半抗原10.5mg,1mL水,0.12mL 1N HCl,在冰水浴条件下加入40uL 50mg/mL亚硝酸钠溶液,冰水中反应30 min制备重氮液;将20mg BSA和2mL 0.1M pH9.5碳酸钠缓冲液滴入上述重氮液中,再反应3h,加入3mL水,用PBS透析3d,离心分装冻存。

[0039] 第四方面,本发明提供一种三氯杀螨醇抗体,它是由上述三氯杀螨醇免疫抗原经

动物免疫得到。

[0040] 采用本发明的三氯杀螨醇免疫抗原得到的三氯杀螨醇抗体的效价、特异性、亲和力都比较好。

[0041] 所述三氯杀螨醇抗体可以为单克隆抗体或者多克隆抗体。另外,对于所述三氯杀螨醇抗体,可以采用本领域常规方法来进行制备。例如,在所述三氯杀螨醇抗体为多克隆抗体的情况下,可以通过采用所述三氯杀螨醇免疫抗原免疫接种哺乳动物例如小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、灵长类动物(不包括人类)等、随后分离血清获得。在所述三氯杀螨醇抗体为单克隆抗体的情况下,可以通过制造和培养杂交瘤细胞并收集培养基获得单克隆抗体,或者可以将由此制备获得的杂交瘤细胞通过腹腔注射接种到哺乳动物例如小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、灵长类动物(不包括人类)等的体内,在被接种动物的腹部明显膨大时收集腹水,由此获得单克隆抗体。

[0042] 在一个具体的实施方案中,所述三氯杀螨醇抗体为鼠源单克隆抗体。

[0043] 第五方面,本发明提供一种上述三氯杀螨醇抗体在检测三氯杀螨醇残留中的应用。

[0044] 本发明通过免疫动物获得对三氯杀螨醇具有高度特异性的三氯杀螨醇抗体,利用抗原抗体的特异免疫学反应和易被识别的免疫标记放大技术,可以定性和半定量的检测食品中残留的三氯杀螨醇。

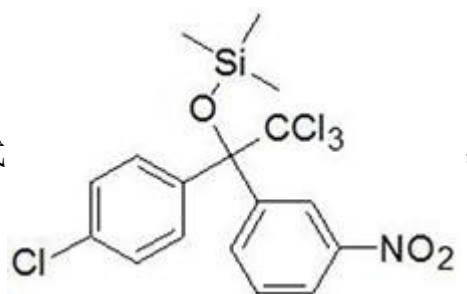
[0045] 下面结合实施例对本发明进行详细的说明,实施例仅是本发明的优选实施方式,不是对本发明的限定。

[0046] 实施例1

一种三氯杀螨醇半抗原,其合成方法的步骤如下:

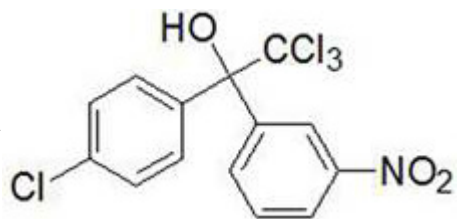
S1. 在单口瓶中先加入2.3g的4-氯-3-硝基二苯甲酮、用30mLDMF溶解的0.23g甲酸钠,再在室温下缓慢滴加DMF溶解的2g(三氯甲基)三甲基硅烷,滴加完毕之后,室温持续搅拌反应2h,反应结束后,加入水,用乙酸乙酯进行萃取2-3遍,收集有机相,有机相经蒸干后过柱

纯化,得到中间体1,所述中间体1具有结构式



S2. 称取2g中间体1,用50mL甲醇溶解后,加入10mL 20%盐酸溶液,加热回流,进行水解反应15h;反应结束后蒸干甲醇,加水稀释,再用乙酸乙酯萃取2-3遍,有机相经蒸干、过柱纯

化后得到中间体2,所述中间体2具有结构式



S3. 称取1.5g中间体2,用甲醇溶解后,加入0.8g铁粉、1.6g氯化铵,再加入5mL 2N盐酸溶液,加热回流反应30min,进行还原反应;反应结束后蒸干甲醇,加碳酸氢钠溶液将溶液调

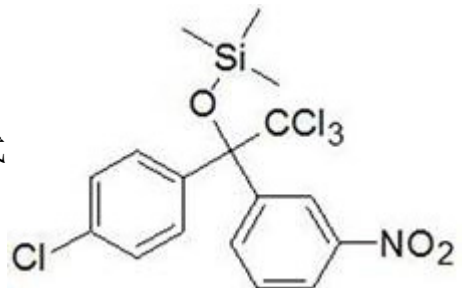
为微碱性,过滤除去不溶物,滤液再用乙酸乙酯萃取,有机相经蒸干、过柱纯化后得到式(I)所示结构的三氯杀螨醇半抗原1.2g;质谱鉴定EI-MS(positive) m/z :352.1[M+H]⁺。

[0047] 实施例2

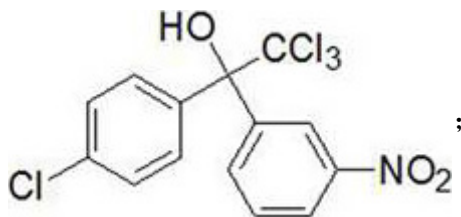
一种三氯杀螨醇半抗原,其合成方法的步骤如下:

S1. 在单口瓶中先加入2.3g的4-氯-3-硝基二苯甲酮、用30mLDMF溶解的0.77g乙酸铵,再在室温下缓慢滴加DMF溶解的2g(三氯甲基)三甲基硅烷,滴加完毕之后,室温持续搅拌反应1h,反应结束后,加入水,用乙酸乙酯进行萃取2-3遍,收集有机相,有机相经蒸干后过柱

纯化,得到中间体1,所述中间体1具有结构式



S2. 称取2g中间体1,用50mL甲醇溶解后,加入10mL 质量浓度为20%的氢溴酸水溶液,加热回流,进行水解反应24h;反应结束后蒸干甲醇,加水稀释,再用乙酸乙酯萃取2-3遍,有机相经蒸干、过柱纯化后得到中间体2,所述中间体2具有结构式



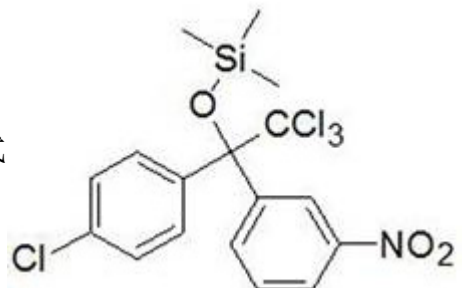
S3. 称取1.5g中间体2,用甲醇溶解后,加入1.6g锌粉、3.2g氯化铵,再加入5mL 2N盐酸溶液,加热回流反应60min,进行还原反应;反应结束后蒸干甲醇,加碳酸氢钠溶液将溶液调为微碱性,过滤除去不溶物,滤液再用乙酸乙酯萃取,有机相经蒸干、过柱纯化后得到式(I)所示结构的三氯杀螨醇半抗原。

[0048] 实施例3

一种三氯杀螨醇半抗原,其合成方法的步骤如下:

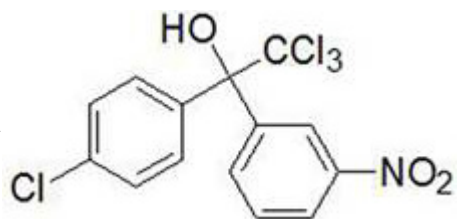
S1. 在单口瓶中先加入4.6g的4-氯-3-硝基二苯甲酮、用30mLDMF溶解的1.5g醋酸锂,再在室温下缓慢滴加DMF溶解的4.5g(三氯甲基)三甲基硅烷,滴加完毕之后,室温持续搅拌反应1.5h,反应结束后,加入水,用乙酸乙酯进行萃取2-3遍,收集有机相,有机相经蒸干后

过柱纯化,得到中间体1,所述中间体1具有结构式



S2. 称取4g中间体1,用50mL甲醇溶解后,加入10mL 20%盐酸溶液,加热回流,进行水解反应48h;反应结束后蒸干甲醇,加水稀释,再用乙酸乙酯萃取2-3遍,有机相经蒸干、过柱纯

化后得到中间体2,所述中间体2具有结构式



S3. 称取3g中间体2,用甲醇溶解后,加入2.5g镁粉、5g氯化铵,再加入5mL 2N盐酸溶液,加热回流反应60min,进行还原反应;反应结束后蒸干甲醇,加碳酸氢钠溶液将溶液调为微碱性,过滤除去不溶物,滤液再用乙酸乙酯萃取,有机相经蒸干、过柱纯化后得到式(I)所示结构的三氯杀螨醇半抗原。

[0049] 实施例4

三氯杀螨醇免疫抗原,其合成方法包括如下步骤:在反应容器中加入三氯杀螨醇半抗原10.5mg,1mL水,0.12mL 1N HCl,在冰水浴条件下加入40 μ L 50mg/mL亚硝酸钠溶液,冰水中反应30 min制备得到重氮液;将12mg KLH和 2mL 0.1M pH9.5碳酸钠缓冲液滴入上述重氮液中,再反应3h,加入3mL水,用PBS透析3d,离心分装冻存。

[0050] 实施例5

三氯杀螨醇包被抗原,其合成方法包括如下步骤:在反应容器中加入三氯杀螨醇半抗原10.5mg,1mL水,0.12mL 1N HCl,在冰水浴条件下加入40 μ L 50mg/mL亚硝酸钠溶液,冰水中反应30 min制备重氮液;将20mg BSA和2mL 0.1M pH9.5碳酸钠缓冲液滴入上述重氮液中,再反应3h,加入3mL水,用PBS透析3d,离心分装冻存。

[0051] 实施例6

三氯杀螨醇抗体,其合成方法包括如下步骤:

使用实施例4中的三氯杀螨醇免疫抗原并鉴定后免疫10只8周龄BALB/C小鼠,加强免疫三次后,采血测效价,待血清效价不再上升,用两倍剂量的抗原不加佐剂免疫小鼠,三天后脱颈致死小鼠,在无菌条件下取脾脏制备脾细胞,与生长旺盛的小鼠骨髓瘤细胞按8:1的比例混合于50mL离心管,加入30mL无血清IPMI1640培养基,1100r/min离心5min弃上清,将细胞团轻轻振松,置于37℃水浴中。把 1mL50%PEG-4000缓缓加入细胞中,在1min内滴完,同时轻轻搅动底部沉淀,静置1min后,前30s沿管壁缓慢匀速加入无血清培养基 1mL,后30s加入2mL,然后快速加入27mL终止融合过程,1100r/min离心5min,弃上清,用HAT选择性培养基重悬后加到已铺有饲养细胞的96孔细胞培养板中,37℃、体积分数5%的CO₂条件下培养。7天后换成HT培养液,待孔内的杂交细胞数量达到300个以上时,用间接ELISA法筛选,选择强阳性、抑制效果好、细胞生长旺盛的孔进行有限稀释克隆化,经3次以上的克隆培养和检测,均呈阳性的孔内细胞即为分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞,将杂交瘤细胞扩大培养以备单克隆抗体的制备;

采用体内诱生腹水法生产抗三氯杀螨醇单克隆抗体。选4只经产昆明小鼠,腹腔注射液体石蜡油 0.5mL/只,7天后腹腔注射杂交瘤细胞3-5 $\times 10^6$ /只,10天后,待小鼠腹部明显膨大时收集腹水。用正辛酸-硫酸铵沉淀法来纯化腹水,经紫外测定三氯杀螨醇单克隆抗体的含量。

[0052] 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。

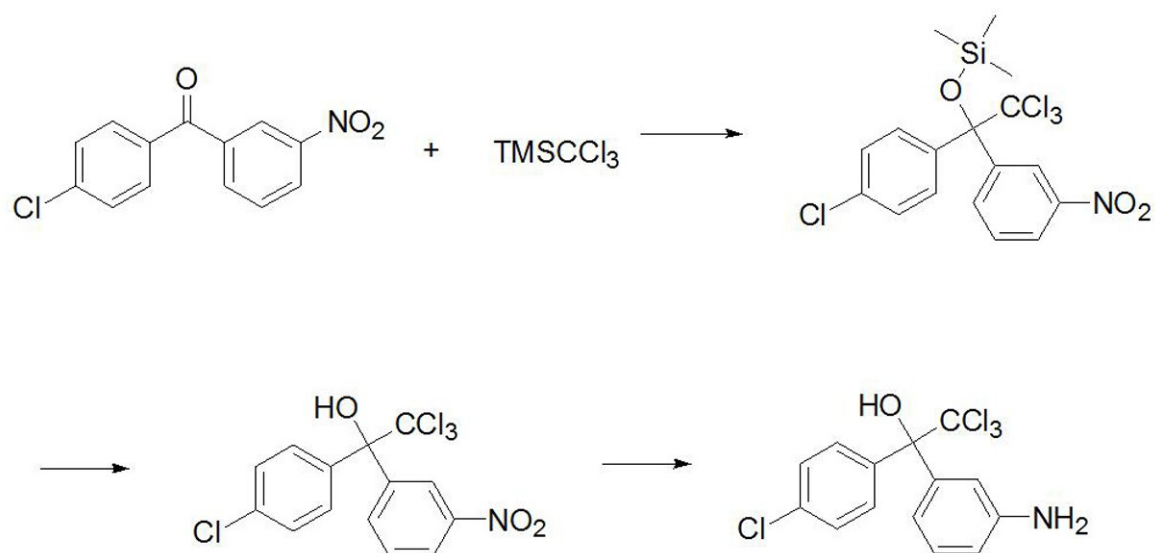


图1

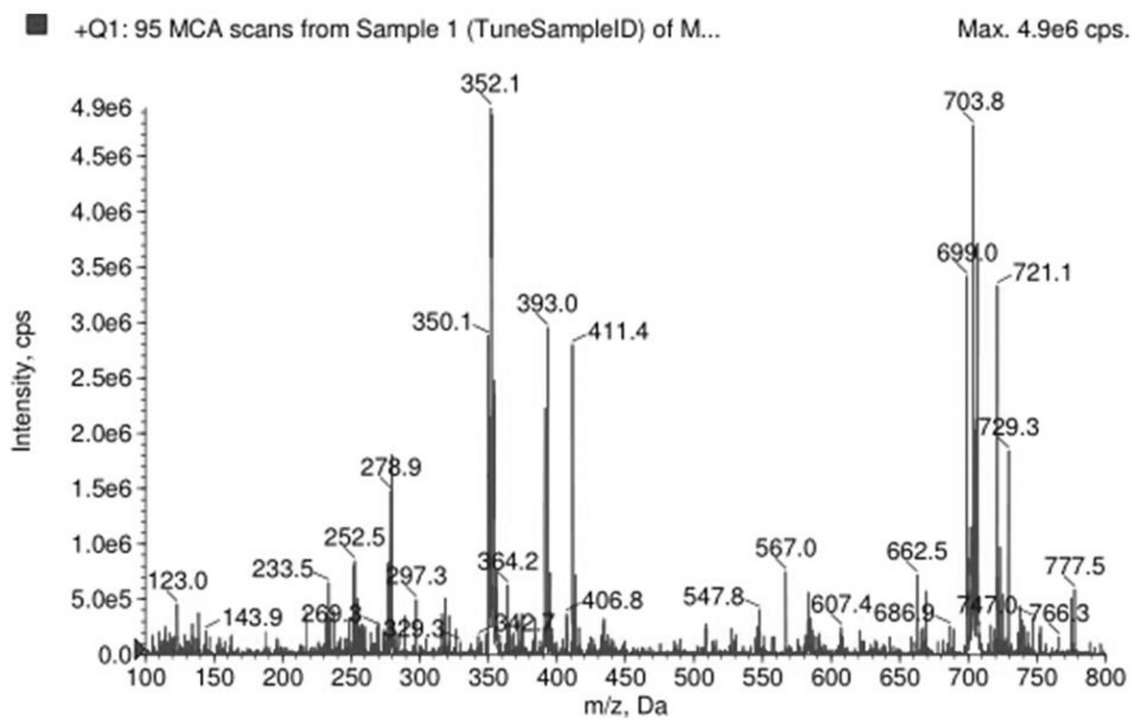


图2

专利名称(译)	三氯杀螨醇半抗原、人工抗原、抗体及其合成方法和应用		
公开(公告)号	CN110938007A	公开(公告)日	2020-03-31
申请号	CN201911061524.0	申请日	2019-11-01
[标]发明人	王西丽 杨星星 邓启福 杨中 黎维 杨林林 付辉 金虹 李城 张鑫		
发明人	王西丽 杨星星 魏雄军 邓启福 杨中 黎维 杨林林 付辉 金虹 李城 张鑫		
IPC分类号	C07C215/68 C07C213/02 C07K14/795 C07K14/765 C07K11/107 C07K16/44 G01N33/577 G01N33/53		
CPC分类号	C07C201/12 C07C213/02 C07C215/68 C07F7/188 C07K14/765 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/5308 G01N33/577 C07C205/19		
代理人(译)	许青华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了三氯杀螨醇半抗原、人工抗原、抗体及其合成方法和应用，本发明首次公开了一种新型结构的三氯杀螨醇半抗原，该三氯杀螨醇半抗原与目标待测物三氯杀螨醇相似程度高，最大程度保留了三氯杀螨醇的特征结构，在三氯杀螨醇的苯氧基位置引入氨基，能更好地暴露半抗原的抗原决定簇，使得三氯杀螨醇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；该三氯杀螨醇半抗原与载体蛋白偶联后得到的三氯杀螨醇免疫抗原去免疫动物，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，经间接竞争ELISA检测三氯杀螨醇抗体的IC50为23.5ug/L，为后续建立三氯杀螨醇的各种免疫分析方法提供基础。

