



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106966996 A

(43)申请公布日 2017.07.21

(21)申请号 201710158844.2

(22)申请日 2017.03.17

(71)申请人 海南大学

地址 570228 海南省海口市人民大道58号

(72)发明人 赵洪伟 靳晓拓 刁晓平

(74)专利代理机构 深圳市千纳专利代理有限公司 44218

代理人 李平

(51)Int.Cl.

C07D 249/08(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

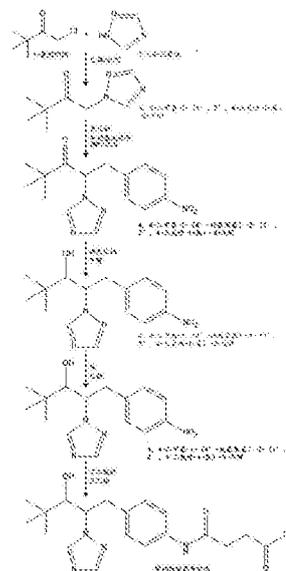
权利要求书3页 说明书6页 附图4页

(54)发明名称

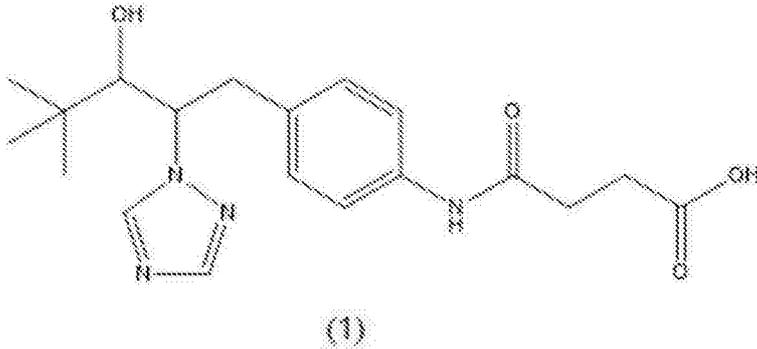
一种多效唑半抗原及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种半抗原及其制备方法和应用,具体涉及一种多效唑半抗原。本发明还公开了所述多效唑半抗原的制备方法及其应用。本发明提供的多效唑半抗原既最大程度地保留了多效唑的化学结构,又通过化学合成改造引入了可以与蛋白质偶联的-COOH,合成方法简单,纯度、产率较高;用该半抗原作为原料,制备适于动物免疫的抗原体系免疫动物,所得抗体的效价、特异性、亲和力都比较好;所得的抗体可用于酶联免疫试剂盒,使用方便、检测成本低、检测方法高效、准确、快速、可同时检测大批量的样本,适于土壤和水果食品中多效唑残留的现场监控和大量样本的筛查。本发明的多效唑半抗原在多效唑的检测中发挥重要作用。

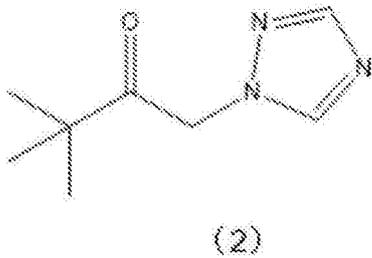


1. 一种多效唑半抗原, 其特征在于, 其分子结构式如(1)所示:

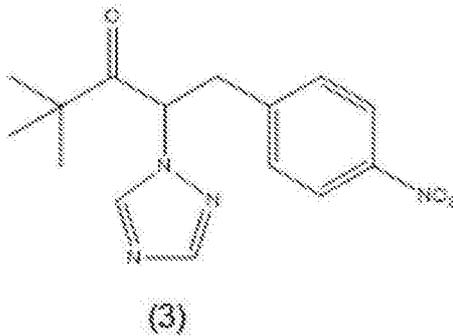


2. 一种如权利要求1所述的多效唑半抗原的制备方法, 包括以下步骤:

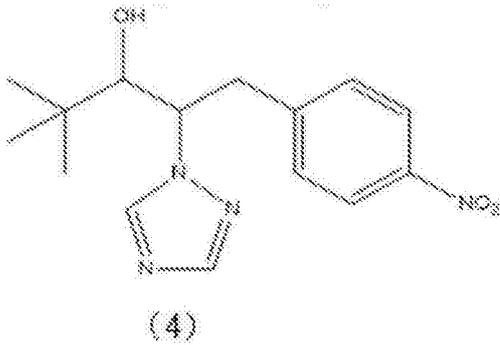
步骤1, 取1,2,4-三氮唑, 加无水碳酸钾、乙醇, 60℃反应完全, 纯化, 得到3,3-二甲基-1-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-2-丁酮, 其分子结构式如式(2)所示, 其中1,2,4-三氮唑和无水碳酸钾的用量比为: 8.4g:15-20g;



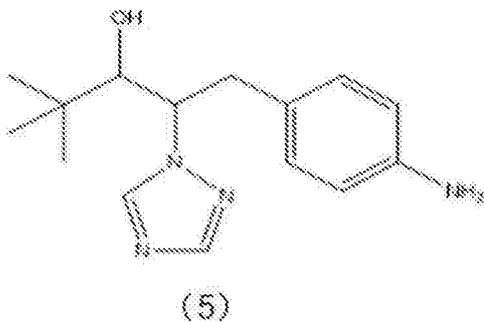
步骤2, 取3,3-二甲基-1-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-2-丁酮溶于无水DMF中, 取NaH溶于无水DMF中, 将3,3-二甲基-1-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-2-丁酮的DMF溶液逐滴加入到NaH的DMF溶液中, 反应完全冷却后, 加4-硝基氯化苄溶于无水DMF溶液, 并逐滴将4-硝基氯化苄的DMF溶液滴加到反应液中, 反应完全, 纯化, 得产物4,4-二甲基-1-(4'-硝基苯基)-2-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-3-戊酮, 其分子结构式如式(3)所示, 其中3,3-二甲基-1-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-2-丁酮、NaH、4-硝基氯化苄的用量比为: 3.38g:0.4-0.6g:3-4g;



步骤3, 取产物4,4-二甲基-1-(4'-硝基苯基)-2-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-3-戊酮和NaBH₄溶于甲醇中, 室温反应完全, 纯化, 得产物4,4-二甲基-1-(4'-硝基苯基)-2-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-3-戊醇, 其分子结构式如式(4)所示, 其中4,4-二甲基-1-(4'-硝基苯基)-2-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-3-戊酮和NaBH₄的用量比为: 0.923g:0.16-0.2g;

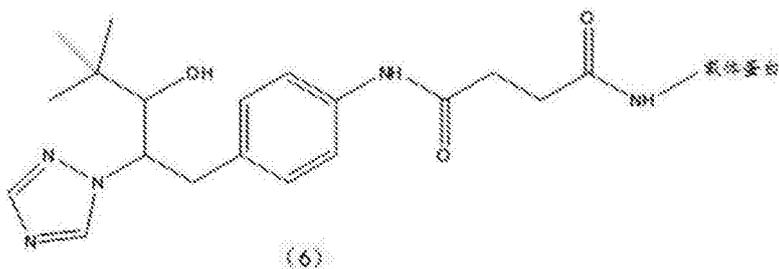


步骤4,取4,4-二甲基-1-(4'-硝基苯基)-2-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-3-戊醇,加最小量乙酸至完全溶解,然后分批慢慢加入4-6个当量的Fe粉,约0.8-1.5h加完,反应完全,纯化,得产物4,4-二甲基-1-(4'-氨基苯基)-2-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-3-戊醇,其分子结构式如式(5)所示;



步骤5,取4,4-二甲基-1-(4'-氨基苯基)-2-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-3-戊醇,加CH₂CH₂、丁二酸酐、三乙胺,室温搅拌反应完全,纯化,得到权利要求1所述的多效唑半抗原,其中4,4-二甲基-1-(4'-氨基苯基)-2-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-3-戊醇、CH₂CH₂、丁二酸酐、三乙胺的用量比为:1.2mmol:4-6ml:2.5-3.5mmol:1.5-2.5mmol。

3.一种多效唑抗原,由本发明第一个方面所述的多效唑半抗原与载体蛋白偶联得到,其分子结构式如式(6)所示:



4.一种制备如权利3所述的多效唑抗原的方法,包括以下步骤:

步骤a,取权利要求1所述的多效唑半抗原,加入无水二甲基甲酰胺混匀后,加入二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺,室温反应过夜,其中,多效唑半抗原、二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的用量比为:0.09mmol:0.08-0.12mmol:0.08-0.12mmol;

步骤b,离心,取溶液,将溶液缓慢加入载体蛋白溶液中,所用载体蛋白的量按照半抗原与载体蛋白的摩尔比15-60:1计;

步骤c,反应完全后,透析,得到多效唑抗原。

5.一种多效唑抗体,由权利要求3所述的多效唑抗原免疫动物制备得到。

6.由权利要求5所述的多效唑抗体制备的多效唑酶联免疫试剂盒。

7. 权利要求1所述的多效唑半抗原或权利要求3所述的多效唑抗原在制备多效唑抗体中的应用。

8. 权利要求5所述的多效唑抗体或权利要求6所述的多效唑酶联免疫试剂盒在检测土壤水体和水果食品中多效唑残留的应用。

一种多效唑半抗原及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种半抗原及其制备方法和应用,尤其涉及一种多效唑半抗原及其制备方法和应用。

背景技术

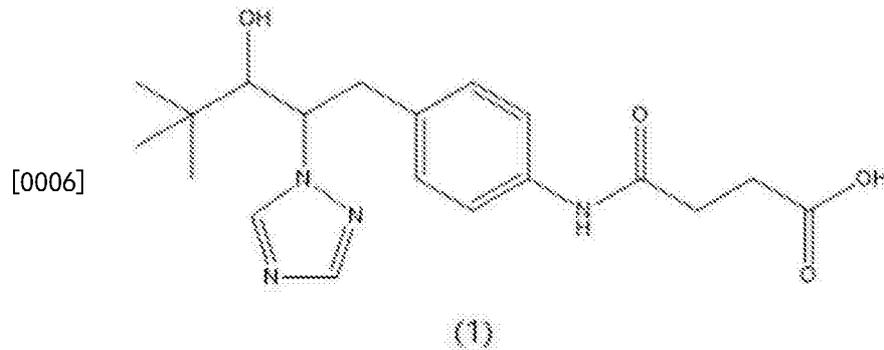
[0002] 多效唑(Paclobutrazol)是20世纪80年代研制成功的高效低毒的三唑类植物生长调节剂。可提高水稻吲哚乙酸氧化酶的活性,降低稻苗内源IAA的水平。明显减弱稻苗顶端生长优势,促进侧芽生长。多效唑的应用价值在于它对作物生长的控制效应,能有效提高植物观赏品质,抑制细菌和害虫的滋生,提高作物产量和抗逆性。但多效唑的大量使用会造成土地和作物污染等问题,多效唑性质稳定,降解较慢,在土壤中残留时间较长,常温(20℃)储存稳定期在两年以上,其半衰期在半年到一年左右。多效唑由于多效唑不易被生物降解,残留期长,因此对作物多效唑含量检测的问题亟待解决。

[0003] 传统对作物中多效唑的研究方法是运用色谱分析技术,但色谱技术存在检测成本高、周期长及操作繁琐等缺陷,不适于大规模现场筛查。而酶联免疫分析技术具有操作简单、灵敏度高、特异性强、操作简便、适宜现场监控和大量样品的筛选等优点。加大对多效唑酶联免疫分析技术的研究开发,在农药残留快速检测中发挥着重要的作用。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种多效唑半抗原及其制备方法和应用。

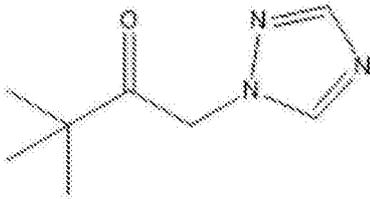
[0005] 本发明的第一个方面是提供一种多效唑半抗原,其分子结构式如(1)所示:



[0007] 本发明的第二个方面是提供一种如本发明第一个方面所述的多效唑半抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0008] 步骤1,取1,2,4-三氮唑,加无水碳酸钾、乙醇,60℃反应完全,纯化,得到3,3-二甲基-1-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-2-丁酮,其分子结构式如式(2)所示,其中1,2,4-三氮唑和无水碳酸钾的用量比为:8.4g:15-20g(优选为8.4g:17-19g,更优选为:8.4g:18.4g);

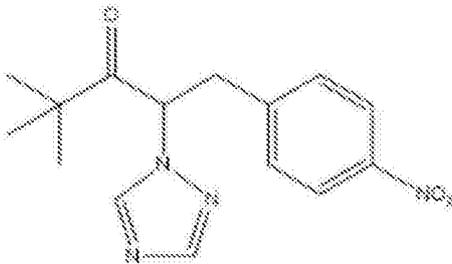
[0009]



(2)

[0010] 步骤2,取3,3-二甲基-1-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-2-丁酮溶于无水DMF中,取NaH溶于无水DMF中,将3,3-二甲基-1-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-2-丁酮的DMF溶液逐滴加入到NaH的DMF溶液中,反应完全冷却后,加4-硝基氯化苄溶于无水DMF溶液,并逐滴将4-硝基氯化苄的DMF溶液滴加到反应液中,反应完全,纯化,得产物4,4-二甲基-1-(4'-硝基苯基)-2-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-3-戊酮,其分子结构式如式(3)所示,其中3,3-二甲基-1-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-2-丁酮、NaH、4-硝基氯化苄的用量比为:3.38g:0.4-0.6g:3-4g(优选为3.38g:0.45-0.55g:3.2-3.6g,更优选为:3.38g:0.5g:3.4316g);

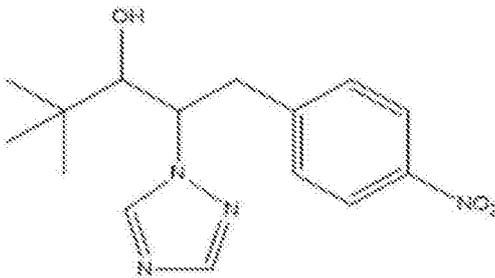
[0011]



(3)

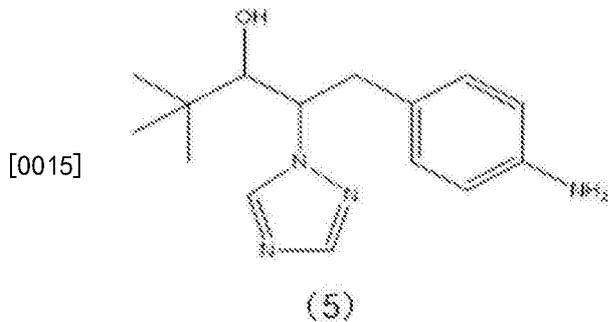
[0012] 步骤3,取产物4,4-二甲基-1-(4'-硝基苯基)-2-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-3-戊酮和NaBH₄溶于甲醇中,室温反应完全,纯化,得产物4,4-二甲基-1-(4'-硝基苯基)-2-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-3-戊醇,其分子结构式如式(4)所示,其中4,4-二甲基-1-(4'-硝基苯基)-2-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-3-戊酮和NaBH₄的用量比为:0.923g:0.16-0.2g(优选为0.923g:0.18-0.19g,更优选为:0.923g:0.185g);

[0013]



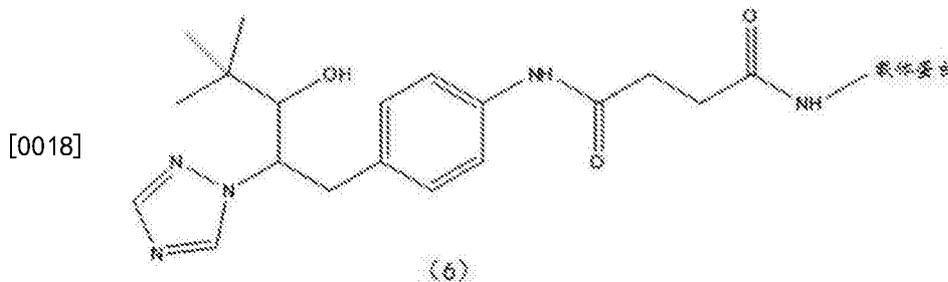
(4)

[0014] 步骤4,取4,4-二甲基-1-(4'-硝基苯基)-2-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-3-戊醇,加最小量乙酸至完全溶解,然后分批慢慢加入4-6个当量的Fe粉,约0.8-1.5h加完,反应完全,纯化,得产物4,4-二甲基-1-(4'-氨基苯基)-2-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-3-戊醇,其分子结构式如式(5)所示;



[0016] 步骤5,取4,4-二甲基-1-(4'-氨基苯基)-2-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-3-戊醇,加 CH_2CH_2 、丁二酸酐、三乙胺,室温搅拌反应完全,纯化,得到权利要求1所述的多效唑半抗原,其中4,4-二甲基-1-(4'-氨基苯基)-2-(1',2',4'-三氮唑-1-基)-3-戊醇、 CH_2CH_2 、丁二酸酐、三乙胺的用量比为:1.2mmol:4-6ml:2.5-3.5mmol:1.5-2.5mmol(优选为1.2mmol:4.5-5.5ml:2.8-3.2mmol:1.8-2.2mmol,更优选为:1.2mmol:5ml:3mmol:2mmol)。

[0017] 本发明的第三个方面是提供一种多效唑抗原,由本发明第一个方面所述的多效唑半抗原与载体蛋白偶联得到,其分子结构式如式(6)所示:



[0019] 本发明的第四个方面是提供一种制备如本发明第三个方面所述的多效唑抗原的方法,包括以下步骤:步骤a,取权利要求1所述的多效唑半抗原,加入无水二甲基甲酰胺混匀后,加入二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺,室温反应过夜,其中,多效唑半抗原、二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的用量比为:0.09mmol:0.08-0.12mmol:0.08-0.12mmol;步骤b,离心,取溶液,将溶液缓慢加入载体蛋白溶液中,所用载体蛋白的量按照半抗原与载体蛋白的摩尔比15-60:1计;步骤c,反应完全后,透析,得到多效唑抗原。

[0020] 优选地,上述步骤a中,多杀菌素半抗原、二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的用量比为:0.09mmol:0.1mmol:0.1mmol。

[0021] 本发明的第五个方面是提供一种多效唑抗体,由本发明第三个方面所述的多效唑抗原免疫动物制备得到。

[0022] 本发明的第六个方面是提供由本发明第五个方面所述的多效唑抗体制备的多效唑酶联免疫试剂盒。

[0023] 本发明的第七个方面是提供本发明第一个方面所述的多效唑半抗原或本发明第三个方面所述的多效唑抗原在制备多效唑抗体中的应用。

[0024] 本发明的第八个方面是提供本发明第五个方面所述的多效唑抗体或本发明第六个方面所述的多效唑酶联免疫试剂盒在检测土壤水体和水果食品中多效唑残留的应用。

[0025] 本发明提供的多效唑半抗原既最大程度地保留了多效唑的化学结构,又通过化学合成改造引入了可以与蛋白质偶联的-COOH,合成方法简单,纯度、产率较高;用该半抗原作为原料,制备适于动物免疫的抗原体系免疫动物,所得抗体的效价、特异性、亲和力都比较

好;所得的抗体用于酶联免疫试剂盒,使用方便、检测成本低、检测方法高效、准确、快速、可同时检测大批量的样本,适于土壤水体和水果食品中多效唑残留的现场监控和大量样本的筛查。本发明的多效唑半抗原在多效唑的检测中发挥重要作用。

附图说明

- [0026] 图1为多效唑半抗原合成路线图。
[0027] 图2为多效唑半抗原核磁共振碳谱图。
[0028] 图3为多效唑半抗原核磁共振氢谱图。
[0029] 图4为多效唑间接ELISA标准曲线。

具体实施方式

[0030] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。

[0031] 实施例1:多效唑半抗原的合成

[0032] 步骤1:

[0033] 1、称取8.4g的1,2,4-三氮唑(0.12mol),18.4g无水碳酸钾,放入圆底烧瓶中,加50ml乙醇,用控温磁力搅拌器,设定温度为60℃,油浴加热,将15.67ml(0.12mol)的1-氯频哪酮在30min-1h之内滴入圆底烧瓶内,继续搅拌3h,薄层色谱法监控反应完全,此过程的最适展开剂为乙酸乙酯:正己烷=1:1。

[0034] 2、反应体系出现黄色溶液和白色固体沉淀,将黄色液体倒入另一圆底烧瓶内,旋干(目的是分离乙醇和反应产物)。加水25ml于含白色沉淀的圆底烧瓶中,充分溶解后转入烧杯中,再加25的水冲洗两次,倒入烧杯,摇匀,使白色沉淀完全溶解,倒入分液漏斗内,用100ml的EtOAc冲洗两次,倒入分液漏斗内,摇5min,静置10min,取上层,弃下层。将旋干产物溶于50ml水后倒入分液漏斗,用50ml的EtOAc冲洗两次,倒入分液漏斗,取上层。将萃取产物混合置于三角烧瓶中,加无水Na₂SO₄干燥。

[0035] 3、将三角瓶中液体倒入圆底烧瓶中,用EtOAc冲洗无水Na₂SO₄两次,旋干。将产物重结晶分离,将产物加适量正己烷加热至全部溶解,4℃静置,旋干,得到上层白色,下层黄色的沉淀。

[0036] 步骤2:

[0037] 1、取步骤1的白色反应产物3.38g(20mmol)溶于10ml的无水DMF中,称取0.5gNaH溶于10ml无水DMF中,将白色产物的DMF溶液逐滴加入到NaH的DMF溶液中(30min),搅拌3h,冰浴冷却15min。

[0038] 2、称取3.4316g(20mmol)4-硝基氯化苄溶于10ml的无水DMF溶液,并逐滴将4-硝基氯化苄的无水DMF溶液滴加到冷却的NaH的DMF溶液中,室温搅拌3h至过夜。薄层色谱法监控反应,此过程的最适展开剂为乙酸乙酯:正己烷=1:1。

[0039] 3、加300ml水于反应体系中,摇匀,静置,过滤。将沉淀溶于最少量的乙酸乙酯:正己烷=1:1的体系中,加热,摇匀至全部溶解,冷却结晶。弃上层液体,重复结晶(TLC监控反应,至无杂质为至。)在沉淀中加入适量的甲醇(约10ml),加热摇至溶解,静置得到白色固体沉淀。

[0040] 步骤3:

[0041] 1、取步骤2的产物0.923 (3.046mmol) 和NaBH₄ (185mg, 4.89mmol) 溶于40ml的甲醇中, 室温搅拌2.5h。薄层色谱法监控反应, 此过程的最适展开剂为乙酸乙酯: 正己烷=1:1。

[0042] 2、加5ml的水, 50EtoAc萃取产物。加无水Na₂SO₄干燥, 旋干, 用甲醇重结晶。(逐滴滴加至溶解, 4℃冷却)

[0043] 步骤4:

[0044] 1、称取步骤3的产物约0.445g, 在45℃水浴下, 加最小量乙酸至完全溶解。5个当量的Fe粉分批加入, 约1h加完。反应约4h。薄层色谱法监控反应, 此过程的最适展开剂为乙酸乙酯: 正己烷=6:4。

[0045] 2、反应溶液用抽滤漏斗垫滤纸除去沉淀, 用乙醇冲洗。收集溶液, 调PH=9 (饱和NaHCO₃调)。EtoAc浸泡滤纸, 收集合并溶液。EtoAc萃取, 旋干。用饱和NaCl再次萃取, 用旋转蒸发仪上旋干 (水浴温度为40℃, 转数60)。然后薄层色谱法分离产物, 展开剂为乙酸乙酯: 正己烷=6:4, 收集产物, 得产物0.1605g。

[0046] 步骤5:

[0047] 1、取步骤4的反应产物1.2mmol (328mg), 加5ml CH₂CH₂、3mmol (300mg) 丁二酸酐、2mmol (278微升) 三乙胺。室温搅拌反应, 薄层色谱法监控反应, 此过程的最适展开剂为乙酸乙酯: 石油醚=7:3。

[0048] 2、产物萃取 (EtoAc 50ml+30ml 饱和NH₄Cl), 加无水Na₂SO₄干燥, 旋干。薄层色谱法分离产物, 展开剂为二氯甲烷: 甲醇=9:1, 收集产物, 得产物约150mg。

[0049] 实施例2: 多效唑半抗原的鉴定

[0050] 上述实施例1步骤5的产物经核磁共振氢谱和碳谱测定, 核磁共振数据如下, 说明半抗原合成成功:

[0051] ¹H NMR (500MHz, CD₃OD) δ 8.55 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.40 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.01 (d, J=8.4Hz, 2H), 4.86-4.80 (m, 1H), 3.66 (s, 1H), 3.51 (d, J=1.1Hz, 1H), 3.20 (ddd, J=20.2, 13.8, 7.9Hz, 2H), 2.67-2.60 (m, 4H), 0.69 (s, 9H) .

[0052] ¹³C NMR (126MHz, CD₃OD) δ 176.30 (s), 172.71 (s), 150.33 (s), 145.33 (s), 138.59 (s), 134.23 (s), 130.33 (s), 121.08 (s), 78.81 (s), 64.39 (s), 41.26 (s), 36.06 (s), 32.29 (s), 29.97 (s), 26.29 (s) .

[0053] 实施例3: 多效唑抗原

[0054] 向0.09mmol所述琥珀酰胺基多效唑半抗原中加入0.6ml的无水DMF, 混匀后, 加入0.1mmol的DCC和0.1mmol的NHS活化半抗原上的羧基基团, 搅拌反应过夜后, 离心去沉淀, 将溶液平均分为三份, 分别逐滴加入到不同的载体蛋白溶液中, 所述载体蛋白为BSA, OVA, KLH等, 所述溶解蛋白的缓冲液为碳酸盐缓冲液或硼酸盐缓冲液, 所用蛋白的量按照半抗原与蛋白的摩尔比15-60:1计算。待羧基活化的半抗原与蛋白分子上的氨基偶联反应过夜后, 将反应液转移到半透膜中, 使用10mM的pH7.2的PBS缓冲液于4℃透析3-5天, 得到包被原, 经紫外鉴定, 多效唑半抗原与载体蛋白偶联成功。将透析完毕的溶液按照所用载体蛋白的量用PBS稀释成1mg/ml。

[0055] 实施例4: 抗血清制备

[0056] 将1mg/ml的多效唑-KLH作为免疫原与等体积的弗氏佐剂混合搅拌乳化, 首次免疫

用弗氏完全佐剂,以后免疫使用弗氏不完全佐剂,每间隔10至15天对小鼠免疫一次,第三次免疫后小鼠眼眶采血检测血清效价和抗体特异性。

[0057] 实施例5:血清效价及抗体特异性检测

[0058] 将1mg/ml的多效唑-OVA包被原使用碳酸盐缓冲液稀释合适的倍数后,加入到96孔酶标板中于37℃包被3小时,将多效唑标准品使用样品稀释液(PBS中含有0.1%的吐温20和明胶)稀释后,每孔加入50 μ l,以样品稀释液作为非抑制孔对照,随后加入经过样品稀释液稀释合适倍数的血清,于37℃温浴30min后,洗脱,再加入羊抗鼠酶标二抗反应30min,洗脱酶标二抗后,加入含有OPD或TMB的底物缓冲液显色5-10min,于酶标仪检测OD值。

[0059] 本发明以多效唑-OVA作为包被原,多效唑-KLH作为免疫原所获得的抗血清,所建立的ELISA标准曲线如图4所示,抑制中浓度为786ng/ml。

[0060] 以上对本发明的具体实施例进行了详细描述,但其只是作为范例,本发明并不限制于以上描述的具体实施例。对于本领域技术人员而言,任何对本发明进行的等同修改和替代也都在本发明的范畴之中。因此,在不脱离本发明的精神和范围下所作的均等变换和修改,都应涵盖在本发明的范围内。

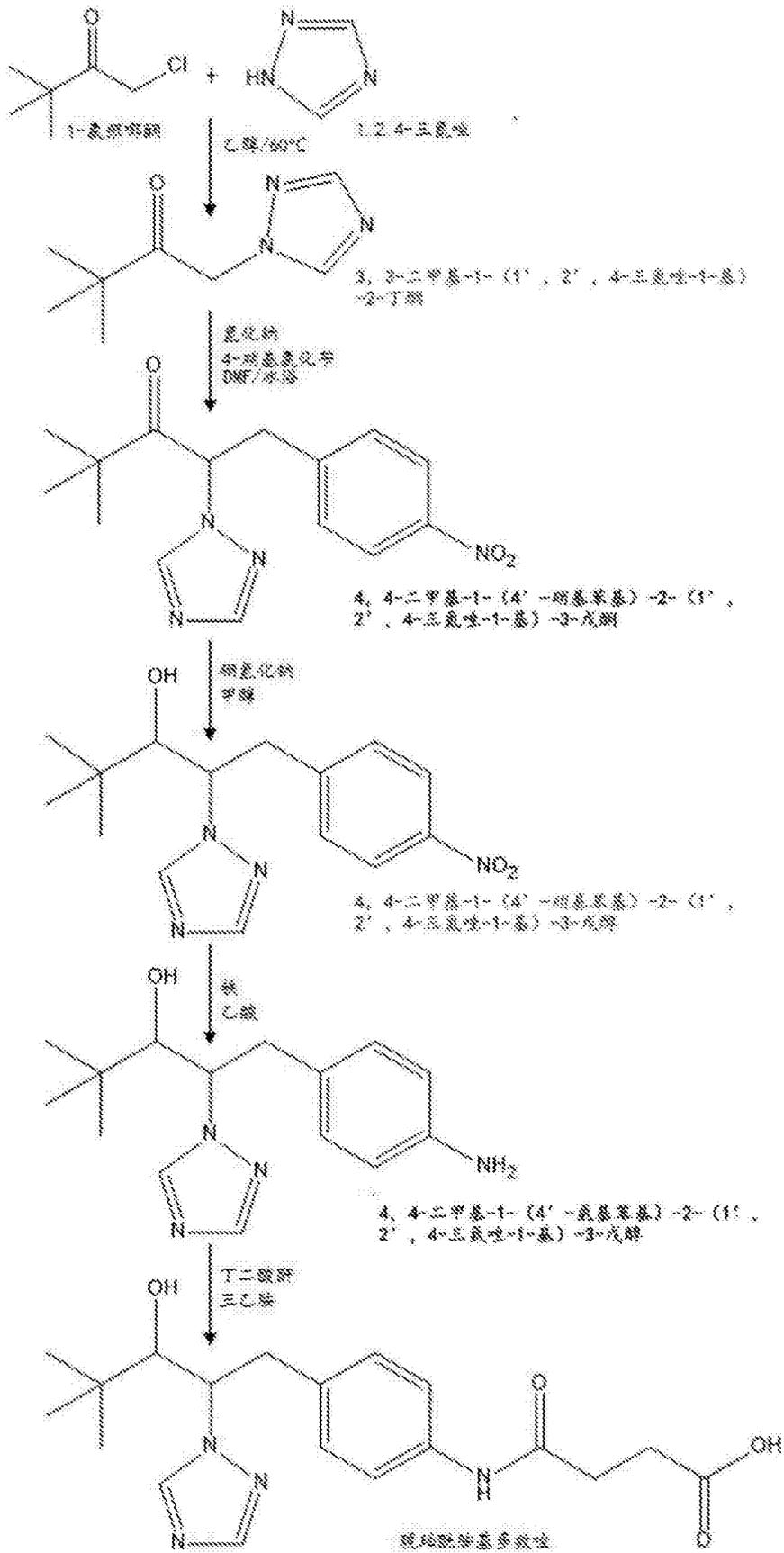


图1

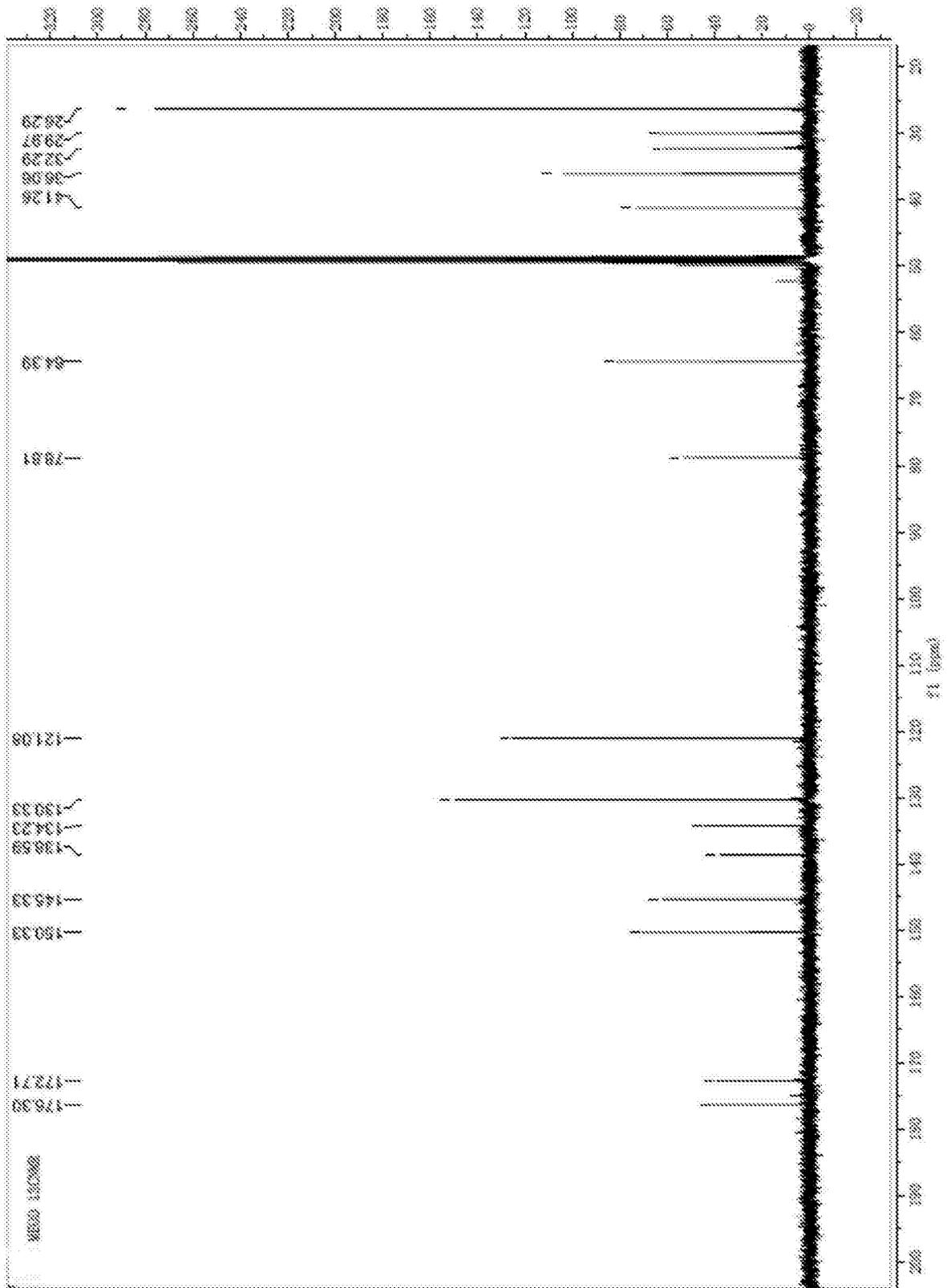


图2

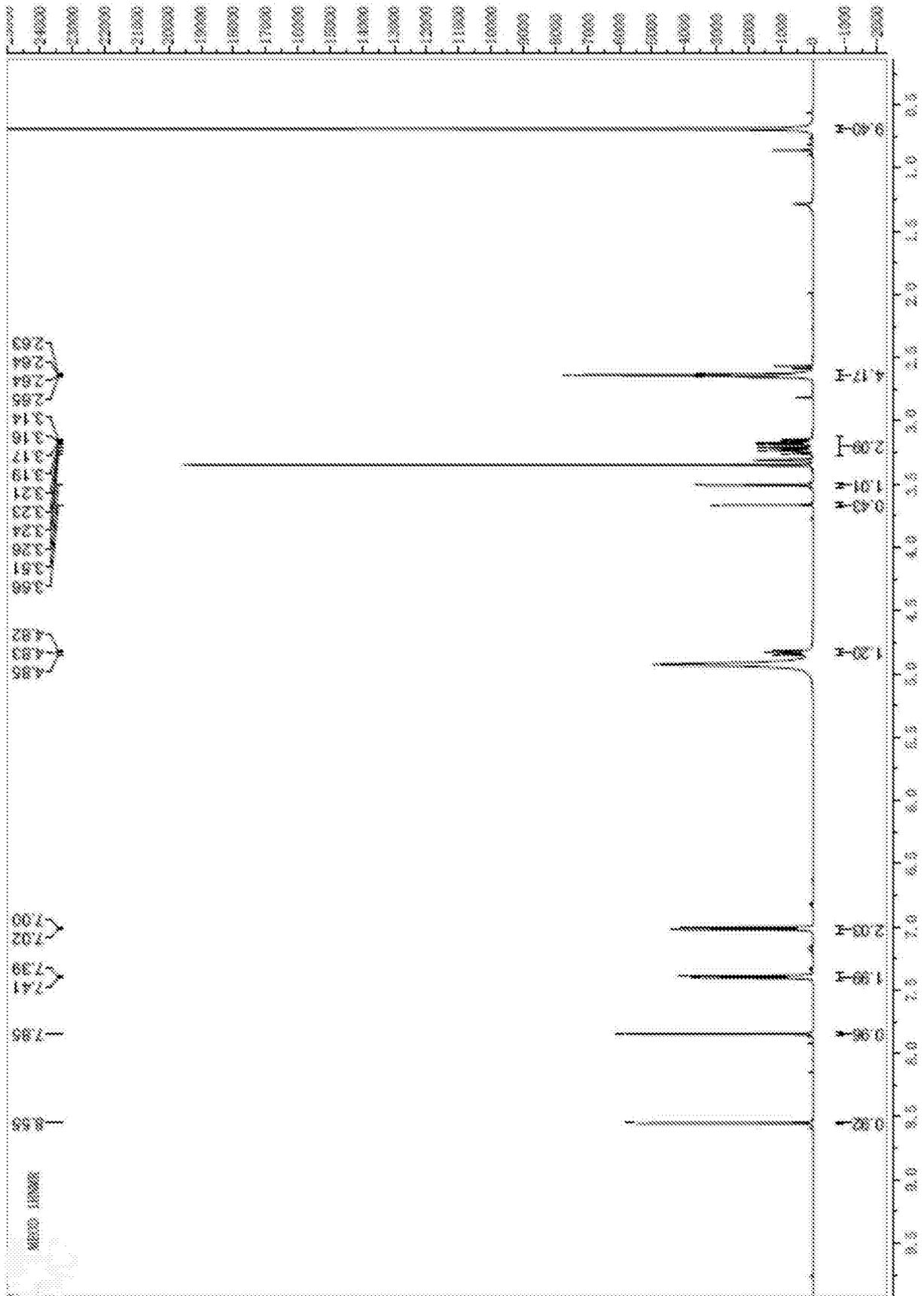


图3

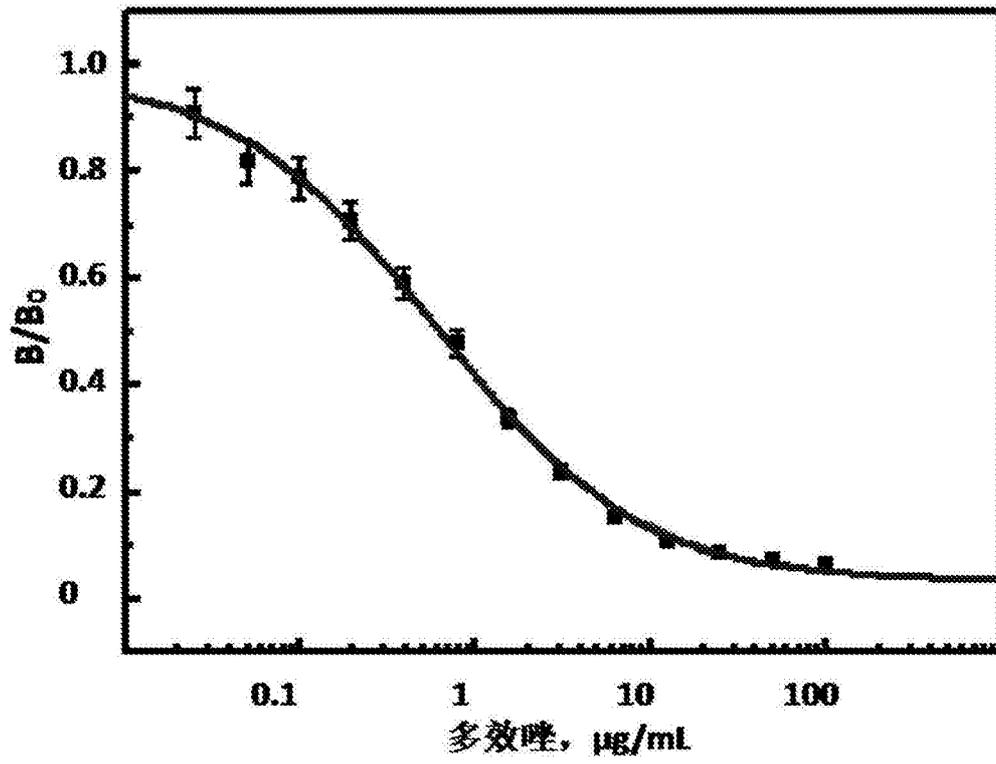


图4

专利名称(译)	一种多效唑半抗原及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN106966996A	公开(公告)日	2017-07-21
申请号	CN201710158844.2	申请日	2017-03-17
[标]申请(专利权)人(译)	海南大学		
申请(专利权)人(译)	海南大学		
当前申请(专利权)人(译)	海南大学		
[标]发明人	赵洪伟 靳晓拓 刁晓平		
发明人	赵洪伟 靳晓拓 刁晓平		
IPC分类号	C07D249/08 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/531		
CPC分类号	C07D249/08 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/531		
代理人(译)	李平		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种半抗原及其制备方法和应用，具体涉及一种多效唑半抗原。本发明还公开了所述多效唑半抗原的制备方法及其应用。本发明提供的多效唑半抗原既最大程度地保留了多效唑的化学结构，又通过化学合成改造引入了可以与蛋白质偶联的-COOH，合成方法简单，纯度、产率较高；用该半抗原作为原料，制备适于动物免疫的抗原体系免疫动物，所得抗体的效价、特异性、亲和力都比较好；所得的抗体可用于酶联免疫试剂盒，使用方便、检测成本低、检测方法高效、准确、快速、可同时检测大批量的样本，适于土壤和水果食品中多效唑残留的现场监控和大量样本的筛查。本发明的多效唑半抗原在多效唑的检测中发挥重要作用。

