

[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 200710070229.2

[51] Int. Cl.
C07D 231/44 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 1 月 9 日

[11] 公开号 CN 101100457A

[22] 申请日 2007.7.26

[21] 申请号 200710070229.2

[71] 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路 38 号

[72] 发明人 王春梅 程敬丽 金茂俊 朱国念

[74] 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公司
代理人 唐银益

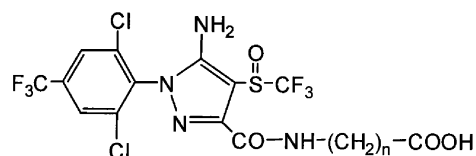
权利要求书 2 页 说明书 10 页

[54] 发明名称

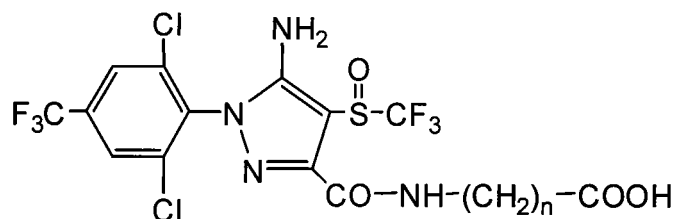
氟虫腈半抗原化合物、合成方法及其用途

[57] 摘要

本发明公开了一种氟虫腈人工半抗原，其分子结构式为，其中 $n = 1 \sim 5$ 。本发明还公开了上述氟虫腈人工半抗原的合成方法。本发明的半抗原化合物，能应用于合成适于动物免疫的抗原体系。采用本发明的氟虫腈人工半抗原最终制得的抗体用 ELISA 方法检测氟虫腈时，最低检测限可达 $4.8 \mu\text{g/L}$ 。

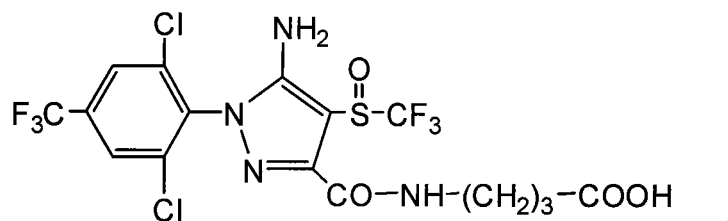


1、一种氟虫腈人工半抗原，其特征在于它的分子结构式为：

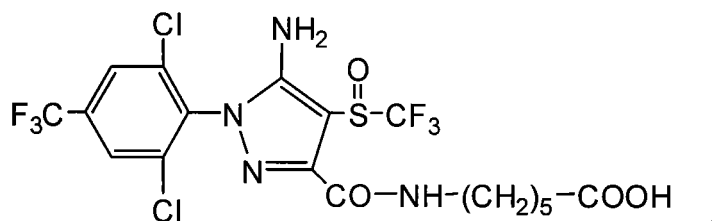


其中 $n=1\sim5$ 。

2、根据权利要求1所述的氟虫腈人工半抗原，其特征在于 $n=3$ ，分子结构式为：



3、根据权利要求2所述的氟虫腈人工半抗原，其特征在于 $n=5$ ，分子结构式为：



4、如权利要求1所述的氟虫腈人工半抗原的合成方法，其特征在于包括下列步骤：

1) 克分子比为 1: 6 的氟虫腈原药与硫酸在乙二醇溶剂中， $138\sim142^{\circ}\text{C}$ 下回流反应 48 小时，生成 5-氨基-1-(2, 6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-羧酸；

2) 克分子比为 1: 2~6 的 5-氨基-1-(2, 6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-羧酸与二氯亚砷反应生成 5-氨基-1-(2, 6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-酰氯；

3) 克分子比为 1: 1~3 的 5-氨基-1-(2, 6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-酰氯与 $n=1\sim5$ 时的直链氨基酸在碱性条件下发生取代反应，得氟虫腈人工半抗原。

5、如权利要求4所述的氟虫腈人工半抗原的合成方法，其特征在于：在步骤3)中5-氨

基-1-(2, 6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-酰氯与 γ -氨基丁酸在碱性条件下发生取代反应, 生成 4-(5-氨基-1-(2, 6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-甲酰胺基)丁酸。

6、如权利要求 4 所述的氟虫腈人工半抗原的合成方法, 其特征在于: 在步骤 3) 中 5-氨基-1-(2, 6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-酰氯与 6-氨基己酸在碱性条件下发生取代反应, 生成 6-(5-氨基-1-(2, 6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-甲酰胺基)己酸。

7、如权利要求 1~3 中任意一种氟虫腈半抗原的用途, 其特征在于: 是用作动物免疫的抗原体系的原料。

氟虫腈半抗原化合物、合成方法及其用途

技术领域

本发明涉及选择一种具有-COOH的、又最大可能包含氟虫腈原有结构的化合物作为氟虫腈半抗原以及该半抗原的合成方法和用途。

背景技术

本发明属于农药小分子化合物（分子量小于 1000 道尔顿）免疫化学和残留分析技术领域，涉及有机合成，免疫化学及生物化学等，依靠免疫学、免疫化学基本原理和生物技术手段；设计、合成小分子目标分析物半抗原，并与载体蛋白质偶联，制备有效人工抗原，免疫动物制备对小分子分析物特异性抗体，利用抗原抗体的特异性免疫学反应和易被检测识别的标记物的放大作用，定量地检测样本中超微量小分子目标分析物，具有特异、灵敏、准确、快速、方便、廉价等特点。该技术研究的关键是半抗原的分子设计、合成和人工全抗原及抗体的制备，因此，目标分析物分子免疫学特性以及如何通过化学或生化技术突出和利用这些特性是该领域极为重要的研究内容，这一技术目前已成为农药残留痕量分析研究的一个崭新领域，被列为当前优先研究、开发和利用的农药残留分析技术；世界粮农组织（FAO）已向许多国家推荐此项技术，美国化学将免疫分析与气相色谱，液相色谱共同列为农药残留分析的支柱技术。

影响免疫化学分析质量的根本因素是抗体的选择性（或特异性）与亲和性，这些性质又决定于免疫半抗原分子的结构，因此，免疫半抗原的分子设计与合成是建立小分子免疫化学分析的关键步骤。分子是构成物质的基础结构，化合物内部分子结构特征及分子间的组合方式等结构信息决定了化合物所表现的性质，也就是说，化合物的理化性质，生物活性及免疫原性等都是以分子为主体来表示和解释的。

农药小分子必须与大分子物质连接后才能刺激动物产生特异性抗体，这已成为小分子免疫分析的基本模式。因此，半抗原的合成与鉴定试验是产生特异性抗体和建立农药残留快速检测技术研究最基础和最关键的步骤。理想的半抗原一方面应具备待测物的特征结构，特别是立体化学特征；另一方面半抗原与载体连接后应保证待测物的特征结构能最大程度地为免疫活性细胞识别和结合，以制备出具有预期选择性的抗体。①半抗原通常由待

测物衍生化制备，或由原料合成，待测物的代谢或降解产物往往是有用的半抗原；②除待测物特征结构外，在半抗原的末端需有可直接或间接与载体蛋白质偶联的活性基团；③在活性基团与载体之间，必须有一定长度的间隔臂，以便使半抗原突出于载体表面，易为有机免疫系统识别；④间隔臂应远离待测物的特征结构部分和官能团；⑤半抗原的设计应考虑到农药原药和有毒理学意义的代谢物，以及测定对象是单一的农药或某一类农药；⑥机体的免疫应答是个十分复杂的生化过程，半抗原诱导的抗体的选择性和亲合性尚难预测，多数情况下宜合成几种结构的半抗原进行研究。

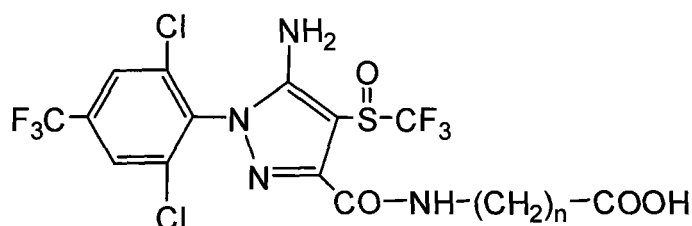
氟虫腈，商品名锐劲特，是拜耳作物科学公司（原罗纳普朗克农化公司）于 1987 年开发出来的一种苯基吡唑类杀虫剂，其杀虫谱广，对害虫以胃毒作用为主，兼有触杀和一定的内吸作用，对蚜虫、叶蝉、飞虱、鳞翅目幼虫、蝇类和鞘翅目等重要害虫有很高的杀虫活性，对作物无药害，与常规农药无交互抗性。适用于水稻、蔬菜、棉花、烟草、马铃薯、甜菜、大豆、油菜、茶叶、苜蓿、甘蔗、高粱、玉米、果树、森林、观赏植物、公共卫生、畜牧业、贮存产品及地面建筑等防除各类作物害虫和卫生害虫。该品种同时获得多国专利，全球销售额突破 1 亿美元，成为农药杀虫剂中支柱产品之一，在 90 个国家销售。

氟虫腈对水稻二化螟、稻飞虱、蝗虫、小菜蛾等害虫有较好的防治效果。随着该农药在全球的销量不断上升，以及人们对农药的误用、滥用，环境样品中氟虫腈的残留情况日趋严重。而且该农药具有慢性神经毒性作用，300mg/kg 的经口剂量可致小鼠甲状腺癌，被定为 C 类致癌物质。尤其是该农药对水生甲壳类动物鱼、虾、蟹的毒性特高（剧毒），对蜜蜂的毒性也相当高（高毒），并且在环境中代谢缓慢，其中有两种代谢产物的毒性高出母体农药对哺乳动物毒性的 10 倍以上，且在生物体脂肪内有富集作用，是一种生态环境毒副作用较大的农药，需要对其进行严格的监控。

发明内容

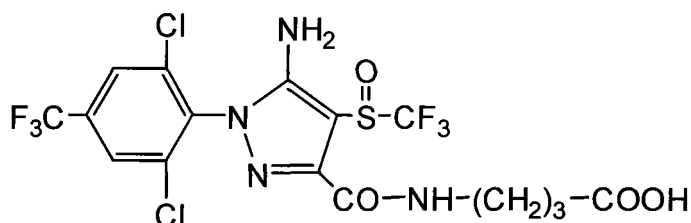
本发明要解决的技术问题是提供一种氟虫腈人工半抗原及其半抗原的合成方法和用途。

为了解决上述技术问题，本发明提供一种氟虫腈人工半抗原，其分子结构式为：

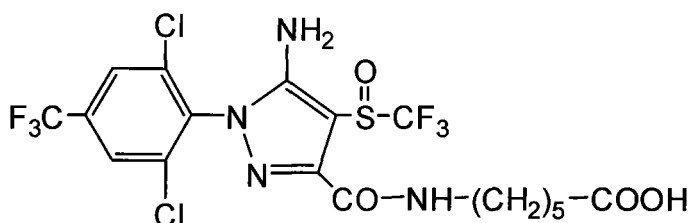


其中 $n=1\sim5$ 。此种半抗原化合物是从氟虫腈-CN 活性基团出发最大程度保留氟虫腈的结构，在腈基水解为羧酸的基础上再接入不同长度的连接臂，并具有可以与氨基酸偶联的基团-COOH。

其中优选的是：当 $n=3$ 时，分子结构式为：



当 $n=5$ 时，分子结构式为：



本发明还提供了上述氟虫腈人工半抗原的合成方法，包括下列步骤：

1) 克分子比为 1: 6 的氟虫腈原药与硫酸在乙二醇溶剂中， $138\sim142^{\circ}\text{C}$ 下回流反应 48 小时，生成 5-氨基-1-(2, 6-二氯-4-(三氟甲基) 苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-羧酸；

2) 克分子比为 1: 2~6 的 5-氨基-1-(2, 6-二氯-4-(三氟甲基) 苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-羧酸与二氯亚砷，即 SOCl_2 反应生成 5-氨基-1-(2, 6-二氯-4-(三氟甲基) 苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-酰氯；

3) 克分子比为 1: 1~3 的 5-氨基-1-(2, 6-二氯-4-(三氟甲基) 苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-酰氯与 $n=1\sim5$ 时的直链氨基酸在碱性条件下发生取代反应，得氟虫腈人工半抗原。

上述 $n=1\sim5$ 时的直链氨基酸即指氨基乙酸、3-氨基丙酸、 γ -氨基丁酸、5-氨基戊酸、6-氨基己酸。

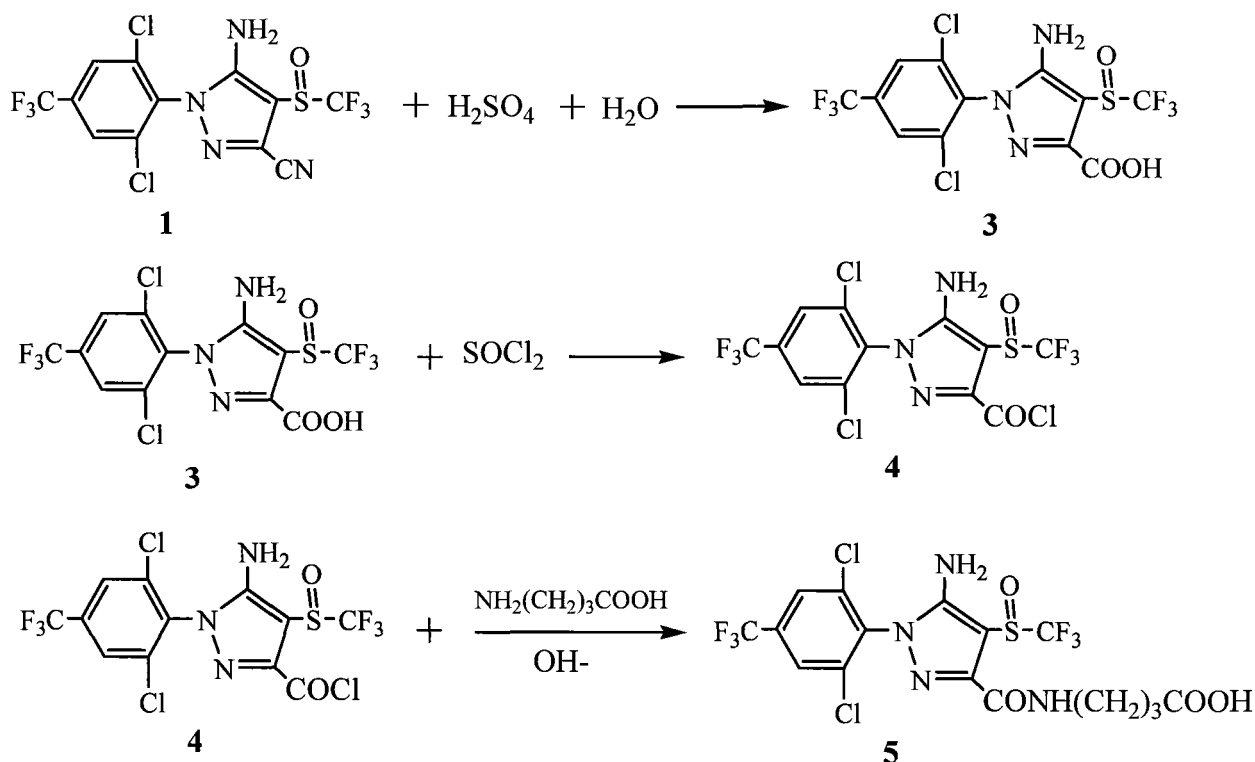
作为本发明的氟虫腈人工半抗原的合成方法的改进：在步骤 3) 中 5-氨基-1-(2, 6-二氯-4-(三氟甲基) 苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-酰氯与氨基丁酸在碱性条件下发生取代反应，生成 4-(5-氨基-1-(2, 6-二氯-4-(三氟甲基) 苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-甲酰胺基) 丁酸，即下述反应路线中的化合物 5。

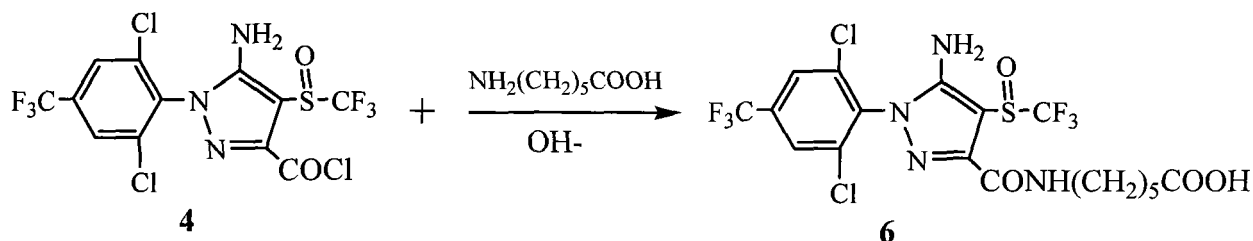
作为本发明的氟虫腴人工半抗原的合成方法的另一种改进：在步骤3)中 5-氨基-1-(2, 6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-酰氯与 6-氨基己酸在碱性条件下发生取代反应，生成 6-(5-氨基-1-(2, 6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-甲酰胺基)己酸，即下述反应路线中的化合物 6。

本发明还提供了上述半抗原化合物的用途：是用作动物免疫的抗原体系的原料。

本发明的氟虫腴人工半抗原的合成方法，是通过这样的技术方案来实现的：

以氟虫腴原药 **1** 为原料，通过与硫酸反应使腴基水解成羧基得到 5-氨基-1-(2, 6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-羧酸，即化合物 **3**；化合物 **3** 与 SOCl_2 反应生成 5-氨基-1-(2, 6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-酰氯，即化合物 **4**；化合物 **4** 在碱性条件下与 γ -氨基丁酸（或 6-氨基己酸）反应，生成 4-(5-氨基-1-(2, 6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-甲酰胺基)丁酸（或 6-(5-氨基-1-(2, 6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-甲酰胺基)己酸），即生成化合物 **5** 或化合物 **6**，反应路线如下所示：





本发明的氟虫腓半抗原化合物的合成方法进一步描述如下：

氟虫腓原药与硫酸（克分子比为 1：6）在乙二醇溶剂中，138~142⁰C 下回流反应 48 小时，反应结束后加水、乙酸乙酯和乙醚，分层后乙酸乙酯层用饱和 NaHCO₃ 溶液提取，NaHCO₃ 水层调酸后用乙酸乙酯提取水层；该乙酸乙酯层经无水 NaSO₄ 干燥，浓缩，硅胶板分离（乙酸乙酯：石油醚：甲酸=5:12:0.1），得白色固体物质 5-氨基-1-（2，6-二氯-4-（三氟甲基）苯基）-4-（三氟甲基亚磺酰基）-1H-吡唑-3-羧酸，即化合物 3。

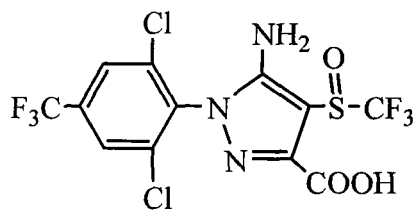
在化合物 3 的基础上，使其与 SOCl₂ 90℃回流反应 3 小时，使 Cl 原子取代—COOH 中的羟基生成酰氯（即化合物 4）；酰氯与等当量的 γ-氨基丁酸（或 6-氨基己酸）在碱性条件下发生取代反应 2 小时。反应结束后，加水，用 6N 盐酸调酸，酸水用乙酸乙酯提取，乙酸乙酯层用饱和盐水洗涤至中性后用 7~8%NaHCO₃ 溶液提取，NaHCO₃ 水层调酸后用乙酸乙酯提取水层；该乙酸乙酯层经无水 NaSO₄ 干燥，浓缩，硅胶板分离（乙酸乙酯：石油醚：甲酸=25：75：1.0），得白色固体物质氟虫腓半抗原，即化合物 5 或化合物 6。

本发明的氟虫腓半抗原的设计位点在氟虫腓分子结构中—CN 和—NH₂ 位置，而分子的特征集团（决定簇）是苯环和咪唑，在不改变这两个基团的前提下，以氨基作为活性基团可直接与载体蛋白偶联，本发明将该活性氨基与琥珀酸酐反应使其变成一个有臂长的羧基；以腈基作为活性基团可在酸性条件下使腈基水解成羧基，然后接上不同长度的连接臂。这一系列的半抗原可用来筛选提高氟虫腓抗体的特异性，进而为 ELISA 方法的建立和优化提供有力条件。

本发明的半抗原化合物，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。所得抗体用于 ELISA 方法检测氟虫腓时，最低检测限可达 4.8ug/L，与其他乙硫氟虫腓、氟虫脲、伏虫隆、氟乐灵、三氟氯氰菊酯、定虫隆农药的交叉反应率都很低。

具体实施方式

实施例 1、 5-氨基-1-（2，6-二氯-4-（三氟甲基）苯基）-4-（三氟甲基亚磺酰基）



-1H-吡唑-3-羧酸，分子结构式为：

，即化合物 **3** 的合成方法如下：

1)、250ml 三口烧瓶中加入 4.51g 96.7% 的氟虫腈原药 (0.01mol)，50ml 乙二醇，缓慢加热并搅拌使其溶解，待完全溶解后，缓慢滴加 6.92g 85% 的浓硫酸，继续加热搅拌 138~142°C 下回流反应 48 小时；反应结束后加入乙酸乙酯 30ml，乙醚 10ml 再加 100ml 水，转入 250ml 分液漏斗分层，再用 30ml 乙酸乙酯和 10ml 乙醚提取乙二醇与水层 2 次；合并乙酸乙酯和乙醚层，用饱和 NaHCO₃ 溶液提取乙酸乙酯乙醚层 4 次，30ml/次；NaHCO₃ 水层用浓盐酸调节 pH 至 3-4，有白色固体物质析出，再用乙酸乙酯提取水层 3 次，30ml/次；合并乙酸乙酯层，用无水 NaSO₄ 干燥，减压浓缩，得淡黄色油状物 1.00g (化合物 **3**)，收率 22.1%。

化合物 **3** 的结构鉴定：

5-氨基-1-(2,6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-羧酸，即 C₁₂H₅N₃Cl₂F₆SO₃。

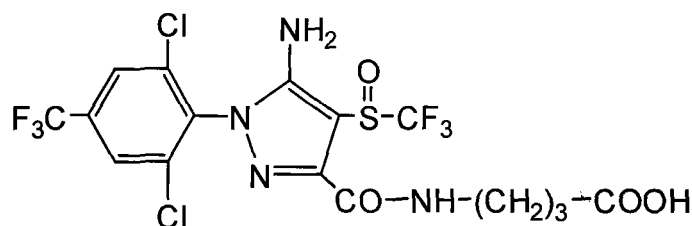
取上述合成的产物分别经 ESI-MS 和 ¹H-NMR 测定其分子结构。质谱 (MS, +c ESI) 测定结果：m/z 为 454 (M-H)⁺ (100%)，456 (M+2-H)⁺ (66.7%)，可以看出化合物 **3** 的分子量为 455，分子中含有两个 Cl。

核磁共振氢谱数据：¹H NMR (400MHz, CDCl₃, δ ppm)：

6.3 (s, 2H, -NH₂)；7.1 (s, 2H, -ArH)。

元素分析 (%，计算值)：C：31.71 (31.60)；H：1.20 (1.11)；N：9.29 (9.21)。

实施例 2、一种氟虫腈人工半抗原 FH1，分子结构式为：



是用作动物免疫的抗原体系的原料。

上述氟虫腈人工半抗原合成方法如下：

1) 称取化合物 **3** (实施例 1 所得) 0.64g 置 100ml 三口烧瓶中, 恒压漏斗滴加 10ml 重蒸二氯亚砷 (SOCl_2 剧毒, 操作在通风柜进行, 并带防毒面具), 在 90°C 油浴上搅拌回流反应 3 小时, 待反应物冷却后, 减压脱去过量的二氯亚砷, 得棕色油状物 (化合物 **4**), 用 10ml 二噁烷 (1, 4-二氧六环) 溶解后, 成二噁烷溶液备用。

2) 称取 γ -氨基丁酸 0.3g, 溶解于 2ml NaOH(4mol/L)溶液中, 将此溶液置于 100ml 三口烧瓶中, 烧瓶置于冰浴, 开动搅拌; 分 5 次加入上述二噁烷溶液, 间隔 5~10 分钟, 后四次同时加入 1ml NaOH(4mol/L)溶液, 加液完毕后继续搅拌反应 2 小时。反应结束后, 反应液中加 50ml 水, 用 6N 盐酸溶液调节 pH 值为 4, 将此混合液转移到 250ml 分液漏斗中, 用乙酸乙酯提取 3 次, 30ml/次; 合并乙酸乙酯层, 用饱和盐水洗涤至中性后用 7~8 %NaHCO₃ 溶液提取 4 次, 30ml/次; 30ml 乙醚去杂, NaHCO₃ 水层用浓盐酸调至 pH 至 3-4, 然后用乙酸乙酯提取水层 3 次, 30ml/次; 该乙酸乙酯层经无水 NaSO₄ 干燥, 浓缩得淡黄色固体, 硅胶板分离 (乙酸乙酯: 石油醚: 甲酸=25: 75: 1.0), 得白色固体物质: 氟虫腈半抗原 FH1, 即化合物 5。

氟虫腈半抗原 FH1 (化合物 5) 的结构鉴定:

4-(5-氨基-1-(2,6-二氯-4-(三氟甲基)苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡唑-3-甲酰胺基)丁酸, 即 $C_{16}H_{12}N_4Cl_2F_6SO_4$ 。

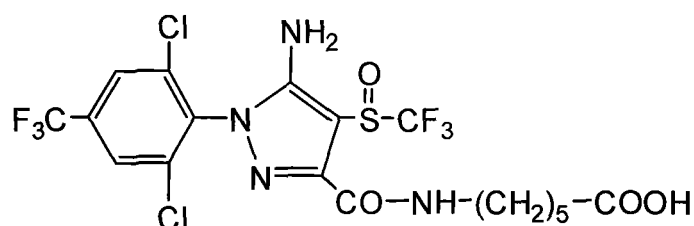
取上述合成的产物分别经 ESI-MS 和 $^1\text{H-NMR}$ 测定其分子结构。质谱 (MS, +c ESI) 测定结果: m/z 为 539 $(\text{M-H})^+$ (100%), 541 $(\text{M}+2-\text{H})^+$ (66.7%), 可以看出化合物 **5** 的分子量为 540, 分子中含有两个 Cl。

核磁共振氢谱数据: ^1H NMR (400MHz, CDCl_3 , δ ppm):

1.96 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 2.42 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{COOH}$); 3.24 (t, 2H, $-\text{NHCH}_2$); 6.4 (s, 2H, $-\text{NH}_2$); 7.2 (s, 2H, $-\text{ArH}$); 8.03 (s, 1H, $-\text{NH}$).

元素分析 (%，计算值): C: 35.61 (35.51); H: 2.29 (2.23); N: 10.96 (10.35)。

实施例 3、一种氟虫腈人工半抗原 FH2，分子结构式为：



1) 称取化合物 **3** (实施例 1 所得) 0.64g 置 100ml 三口烧瓶中, 恒压漏斗滴加 10ml 重蒸二氯亚砷 (SOCl_2 剧毒, 操作在通风柜进行, 并带防毒面具), 在 90°C 油浴上搅拌回流反应 3 小时, 待反应物冷却后, 减压脱去过量的二氯亚砷, 得棕色油状物 (化合物 **4**), 用 10ml 二噁烷 (1, 4-二氧六环) 溶解后, 成二噁烷溶液备用。

2) 称取 6-氨基己酸 0.5g, 溶解于 2ml NaOH (4mol/L) 溶液中, 将此溶液置于 100ml 三口烧瓶中, 烧瓶置于冰浴, 开动搅拌; 分 5 次加入上述二噁烷溶液, 间隔 5~10 分钟, 后四次同时加入 1ml NaOH (4mol/L) 溶液, 加液完毕后继续搅拌反应 2 小时。反应结束后, 反应液中加 50ml 水, 用 6N 盐酸溶液调节 pH 值为 4, 将此混合液转移到 250ml 分液漏斗中, 用乙酸乙酯提取 3 次, 30ml/次; 合并乙酸乙酯层, 用饱和盐水洗涤至中性后用 7~8% NaHCO_3 溶液提取 4 次, 30ml/次; 30ml 乙醚去杂, NaHCO_3 水层用浓盐酸调至 pH 至 3-4, 然后用乙酸乙酯提取水层 3 次, 30ml/次; 该乙酸乙酯层经无水 Na_2SO_4 干燥, 浓缩得淡黄色固体, 硅胶板分离 (乙酸乙酯: 石油醚: 甲酸=25: 75: 1), 得白色固体物质: 氟虫腓半抗原 FH2, 即化合物 **6**。

氟虫腓半抗原 FH2 (化合物 **6**) 的结构鉴定:

6-(5-氨基-1-(2, 6-二氯-4-(三氟甲基) 苯基)-4-(三氟甲基亚磺酰基)-1H-吡啶-3-甲酰胺基) 己酸, 即 $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{Cl}_2\text{F}_6\text{SO}_4$ 。

取上述合成的产物分别经 ESI-MS 和 ^1H -NMR 测定其分子结构。质谱 (MS, +c ESI) 测定结果: m/z 为 567 ($\text{M}-\text{H}$) $^+$ (100%), 569 ($\text{M}+2-\text{H}$) $^+$ (66.7%), 可以看出化合物 **6** 的分子量为 568, 分子中含有两个 Cl。

核磁共振氢谱数据: ^1H NMR (400MHz, CDCl_3 , δ ppm):

1.36 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1.65, 1.67 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.32 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{COOH}$); 3.14 (t, 2H, $-\text{NHCH}_2$); 6.21 (s, 2H, $-\text{NH}_2$); 7.10 (s, 2H, $-\text{ArH}$); 7.93 (s, 1H, $-\text{NH}$)。

元素分析 (% , 计算值): C: 38.16 (37.97); H: 2.92 (2.83); N: 9.93 (9.84)。

实施例 4、免疫原的制备 (以 FH1 为例):

免疫原的合成利用碳二亚胺法。将化合物 **5** (50~80 微摩尔), 溶解在 1~2mL 的 N, N-二甲基甲酰胺中, 然后在该溶液中加入等当量的二环己基碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺, 让其在室温下反应过夜后, 离心, 取上清液 500~800 μL 加入到 4~8mL 15~20mg/mL 的牛血清蛋白碳酸盐缓冲溶液中, 加入时应缓慢, 然后在伴有磁力搅拌情况下反应 4~6 小时, 待反应完成后, 装入透析袋, 先用蒸馏水透析 2~4 次, 然后用 0.8~0.9% 生理盐水透析, 分装保存于 -20°C 的冰箱中。

人工抗原的鉴定:

按合成氟虫腈免疫抗原反应所用半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例，分别进行紫外（200nm~400nm）扫描测定，通过比较三者分别在 260nm 和 280nm 的吸光值计算其结合比。经计算结果如下：半抗原 FH1 与 BSA 的结合比为 11：1。

实施例 5、动物免疫制备单克隆抗体与多克隆抗体：

1) 多抗制备：

实验选用半周岁左右，体重为 2~3 公斤，健康的雄性家兔。每种免疫原免疫三只兔子（由浙江省中医学院负责兔子的饲养工作），分别编号为兔子 1~3。

实验免疫剂量基础免疫为 0.5 ~ 1.0mg/kg，加强免疫剂量为 1.0 ~ 1.5mg/kg，用生理盐水稀释适量 FH1-BSA 与 FH2-BSA，加入等体积弗氏完全佐剂（加强免疫时采用弗氏不完全佐剂），充分乳化，直至滴入水中乳滴不分散。采用背部皮下多点注射与大腿肌肉注射相结合的方法。背部皮下免疫 6 点，大腿肌肉注射 2 点，3 周后进行加强免疫，以后每隔 2 周再次加强免疫。从第三次免疫开始，每次免疫后第 8 天，从兔子耳缘静脉采血，测定效价和特异性。

待免疫血清效价上去后，就可进行采血。本实验采用颈动脉取血法。采血后，将采血瓶放置于 37℃温箱中半小时，待瓶中的血液凝固，然后用接种针沿瓶内壁将血块与玻璃脱离，再放到 4℃冰箱中 3~4 小时，待血块收缩后，用毛细吸管将血清吸入试管中，离心，分离出血清。

2) 单抗制备：

实验选用 6-10 周龄的 BALB/C 小鼠，20-22g，免疫 5-10 只小鼠。取 6—8 周龄体重 18-20g BALB/C 雌性小鼠，将制备的 FH1-BSA 与 FH2-BSA 分别与等体积弗氏完全佐剂混合，充分乳化后，经背腹部皮下多点注射，剂量为 50μg/每只，以后每隔 3 周，取抗原（与一免等剂量）和等体积的弗氏不完全佐剂充分乳化后腹腔和皮下注射加强免疫，加强免疫共 4 次，末免以加倍剂量的抗原进行腹腔注射，3 天后取脾细胞进行融合。后经 3-4 次有限稀释法克隆筛选得到一株细胞株 5B6，经多次体外传代和多次冻存复苏后，细胞株均能良好生长，并稳定分泌抗体。经扩大培养后，用于抗体制备和液氮保存。

抗体的纯化：

辛酸-硫酸铵盐析法是一个经典的方法。辛酸在偏酸性的条件下能将血清中除 IgG 以外的蛋白质都沉淀下来，上清液中只有 IgG。辛酸加入因抗体的来源不同而不同，人血清为 70ul/ml,兔血清为 75ul/ml,小鼠血清为 40ul/ml，小鼠腹水为 33ul/ml。这种方法 IgG 的回收

率达 90%以上。最后将抗体制成冻干粉，分装，-20℃保存。

抗血清效价测定（以 FH1-BSA 免疫为例）：

免疫原复合物按常规方法免疫了三只兔子。从加强免疫第二次开始，在每次免疫后第 8 天于兔子耳缘静脉采血，血清经适当稀释后用间接 ELISA 测定效价。第 5 次免疫后，兔子获得了高效价的抗体，抗血清的效价为 $1: 1.28 \times 10^5$ （指 OD_{490nm} 值等于 1.0 时的稀释倍数）。

BALB/C 小鼠腹腔注射降植烷 0.3ml/只，7—10 天后同法注射单克隆细胞（5B6） $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个（0.4ml/只），待小鼠腹腔明显胀大后抽取腹水，离心除去油脂沉淀后，即得小鼠腹水 McAb，腹水采用辛酸-硫酸铵法纯化，腹水效价为 $1: 5.12 \times 10^5$ 。

最后，还需要注意的是，以上列举的仅是本发明的若干个具体实施例。显然，本发明不限于以上实施例，还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形，均应认为是本发明的保护范围。

专利名称(译)	氟虫腈半抗原化合物、合成方法及其用途		
公开(公告)号	CN101100457A	公开(公告)日	2008-01-09
申请号	CN200710070229.2	申请日	2007-07-26
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	王春梅 程敬丽 金茂俊 朱国念		
发明人	王春梅 程敬丽 金茂俊 朱国念		
IPC分类号	C07D231/44 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种氟虫腈人工半抗原，其分子结构式为，其中 $n=1\sim5$ 。本发明还公开了上述氟虫腈人工半抗原的合成方法。本发明的半抗原化合物，能应用于合成适于动物免疫的抗原体系。采用本发明的氟虫腈人工半抗原最终制得的抗体用ELISA方法检测氟虫腈时，最低检测限可达4.8ug/L。

