



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106543163 A

(43)申请公布日 2017.03.29

(21)申请号 201610980256.2

(22)申请日 2016.11.08

(71)申请人 佛山市飞时达新材料科技有限公司

地址 528531 广东省佛山市高明区荷城街道江湾路78号403室

(72)发明人 叶青

(74)专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理有限公司 11246

代理人 连围

(51)Int.Cl.

C07D 413/12(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页

(54)发明名称

一种氟嘧菌酯半抗原的制备方法及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种氟嘧菌酯半抗原的制备方法及其应用,该制备方法以氟嘧菌酯工艺合成路线中的关键中间体3-[1-(2-羟基苯基)-1-(甲氧亚氨基)-甲基]-5,6-二氢-1,4,2-三噁嗪为原料,先与4,5,6-三氟嘧啶发生醚化反应,再与邻羟基苯乙酸甲酯反应得到氟嘧菌酯半抗原,合成的方法简单,产物纯度和产率高;采用碳二亚胺法将半抗原直接与牛血清蛋白偶联后免疫小鼠,产生针对氟嘧菌酯的特异性抗体;制备的检测氟嘧菌酯的试剂盒可用于直接竞争酶联免疫分析中,满足国内对氟嘧菌酯残留的检测需要。本发明提供的氟嘧菌酯半抗原为建立快速、简便、价廉、灵敏、特异的氟嘧菌酯的检测方法提供了新的物质基础。

1. 一种氟嘧菌酯半抗原的制备方法,其特征在于:以3-[1-(2-羟基苯基)-1-(甲氧亚氨基)-甲基]-5,6-二氢-1,4,2-二噁嗪为原料,先与4,5,6-三氟嘧啶发生酰化反应,再与邻羟基苯乙酸甲酯反应得到氟嘧菌酯半抗原;所述氟嘧菌酯半抗原的制备方法包括以下步骤:

(1) 在0℃下,将等摩尔比的3-[1-(2-羟基苯基)-1-(甲氧亚氨基)-甲基]-5,6-二氢-1,4,2-二噁嗪和4,5,6-三氟嘧啶溶于1L四氢呋喃中,再加入7.0g 80%的氯化钠植物油悬浮液得到混合液,在0℃下磁力搅拌反应3h,转速为1500-2000r/min,随后不再进行冷却,继续搅拌12-14小时,反应液用乙酸乙酯消化并用水反复洗涤,有机相用硫酸钠干燥并减压浓缩,得到黏稠油状物,待该油状物形成结晶,得到3-[1-[2-(4,5-二氟嘧啶-6-基氧基)-苯基]-1-(甲氧亚氨基)-甲基]-5,6-二氢-1,4,2-二噁嗪;

(2) 将步骤(1)制备的3-[1-[2-(4,5-二氟嘧啶-6-基氧基)-苯基]-1-(甲氧亚氨基)-甲基]-5,6-二氢-1,4,2-二噁嗪和等摩尔比的邻羟基苯乙酸甲酯溶于1L二甲基甲酰胺中,再加入32g碳酸钾和2.2g氯化亚铜,将该混合液加热到100℃反应12-14小时;

(3) 将步骤(2)的反应结束后得到的混合液恢复到室温,再加入10-30%浓度的盐酸,加热5-10h,静置并冷却到室温,过滤,滤饼用去离子水漂洗,烘干后得到氟嘧菌酯半抗原。

2. 一种氟嘧菌酯半抗原在制备氟嘧菌酯人工抗原方面的应用,其特征在于:将所述氟嘧菌酯半抗原与载体蛋白偶联后,利用碳二亚胺法制备氟嘧菌酯人工抗原,包括以下步骤:

(1) 将氟嘧菌酯半抗原先用DMSO溶解成50mg/mL的储存液,取50-100μL上述储存液,加入1mL浓度为0.1mol/L、pH为7.2的4-羟乙基哌嗪乙磺酸偶联缓冲液稀释,得到氟嘧菌酯半抗原稀释液;

(2) 称取2.5-5mg载体蛋白溶于0.4mL浓度为0.1mol/L、pH为7.2的4-羟乙基哌嗪乙磺酸偶联缓冲液中,得到载体蛋白溶液;

(3) 在室温磁力搅拌下,转速为1500-2000r/min,将步骤(1)得到的氟嘧菌酯半抗原稀释液加入步骤(2)得到的载体蛋白溶液中,再加入4mg(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐),继续搅拌反应2h,然后将反应液装入透析袋中,4℃下在磷酸缓冲盐溶液中透析72h,每天换三次透析液,得到的产物以5000rpm离心10min,弃沉淀,取上清液,上清液为氟嘧菌酯人工抗原,保存于-20℃冰箱中。

3. 根据权利要求2所述的氟嘧菌酯半抗原在制备氟嘧菌酯人工抗原方面的应用,其特征在于:所述的载体蛋白为牛血清蛋白,氟嘧菌酯半抗原与牛血清蛋白的摩尔比为30-50:1,所述的氟嘧菌酯人工抗原为免疫原。

4. 根据权利要求2所述的氟嘧菌酯半抗原在制备氟嘧菌酯人工抗原方面的应用,其特征在于:所述的载体蛋白为卵清蛋白,氟嘧菌酯半抗原与卵清蛋白的摩尔比为15-20:1,所述的氟嘧菌酯人工抗原为包被原。

5. 一种氟嘧菌酯半抗原在制备氟嘧菌酯多克隆抗体方面的应用,其特征在于:通过将所述的氟嘧菌酯半抗原与牛血清蛋白偶联制备的免疫原免疫8周龄雌性小鼠得到氟嘧菌酯多克隆抗体,具体包括以下步骤:

(1) 选取8周龄雌性小鼠进行初次免疫,免疫剂量为1.0mg/kg,免疫原用生理盐水稀释,加入等体积弗氏完全佐剂,乳化后,进行背部多点皮内注射;

(2) 三周后,进行加强免疫,免疫剂量为1.0mg/kg,加入等体积弗氏不完全佐剂,背部多点皮下注射,以后每三周按同样的剂量和方法免疫一次;

(3) 第4次免疫一周后,从小鼠的耳缘静脉采血,分离抗血清;

(4) 抗血清采用硫酸铵沉淀法纯化得到多克隆抗体,透析后冷冻干燥成粉末,于-20℃下保存备用。

6. 用权利要求1所述方法制备的氟嘧菌酯半抗原的应用,其特征在于:所述氟嘧菌酯半抗原用于制备一种采用直接竞争ELISA法定量检测氟嘧菌酯的试剂盒,所述试剂盒由试剂组和包被板构成。

7. 根据权利要求6所述的氟嘧菌酯半抗原的应用,其特征在于:所述的试剂组包括:

(1) 磷酸盐缓冲液:浓度为0.01mol/L, pH为7.4;

(2) 洗涤液:含1%吐温-20的磷酸盐缓冲溶液;

(3) 底物缓冲液:3.67g/L的Na₂HP04和2.56g/L的柠檬酸混合溶液;

(4) 终止液:2mol/L H₂SO4溶液;

(5) 氟嘧菌酯标准溶液:氟嘧菌酯标准溶液母液为1g/L,使用时用PBS缓冲溶液稀释到5000、1000、500、100、10、1μg/L的系列质量浓度;

(6) 酶标记的氟嘧菌酯抗原溶液:氟嘧菌酯半抗原与辣根过氧化物酶的偶联物,使用时用PBS缓冲液稀释1万倍;

(7) 显色剂:96.15mg/L的3,3',5,5'-四甲基联苯胺的二甲基亚砜溶液。

8. 根据权利要求6所述的氟嘧菌酯半抗原的应用,其特征在于:所述的包被板为96孔或48孔酶标板,所述包被板是将氟嘧菌酯多克隆抗体包被于酶标板上,具体制备步骤如下:

将氟嘧菌酯多克隆抗体用pH为9.6,浓度为0.1mol/L的Na₂CO₃-NaHCO₃包被缓冲溶液稀释到10μg/mL,然后以每孔100μL包被于包被板中,4℃过夜,弃去包被缓冲液后,用洗涤液洗板三次,再加入200μL质量浓度为5%OVA的洗涤液,封闭1小时,最后用洗涤液洗板四次,冻干真空包装,于4℃保存。

一种氟嘧菌酯半抗原的制备方法及其应用

技术领域：

[0001] 本发明属于生物化工技术领域,具体涉及一种氟嘧菌酯半抗原的制备方法及其应用。

背景技术：

[0002] 氟嘧菌酯是拜耳公司2004年开发上市的甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂,其作用机理是线粒体呼吸抑制剂,即通过在细胞色素b和C1间电子转移抑制线粒体的呼吸。氟嘧菌酯属于内吸性茎叶处理用杀菌剂,具有广谱的杀菌活性,对几乎所有真菌纲病害如锈病、颖枯病、网斑病、白粉病、霜霉病等数十种病害均有很好的活性,推荐剂量下对禾谷类作物、马铃薯、蔬菜和咖啡等作物安全,对地下水、环境安全。2004年氟嘧菌酯首先在英国入市,随后进入荷兰、法国、墨西哥、意大利、阿根廷、美国和加拿大市场,入市后市场增长较快,2012年销售额达到1.65亿美元。

[0003] 现有的氟嘧菌酯制剂的分析方法采用高效液相色谱法,残留量的分析方法采用高效液相色谱-质谱法,高效液相色谱法以及气相色谱-质谱法,上述仪器分析法需要昂贵的仪器设备和专业技术人员,样品前处理复杂,分析时间长,不能满足现场监测方便、快速的要求。基于免疫反应的酶联免疫吸附法对样本要求不高,且特异性强、灵敏度高、操作简便、安全廉价、测定结果可靠,能在室外进行大批量样品的快速检测。酶联免疫分析法的前提是特异性抗体的制备,而氟嘧菌酯是小分子化合物,且本身不含有可偶联的功能基团,必须进行半抗原的合成,进而制备人工抗原。目前国内外关于氟嘧菌酯半抗原的制备方法尚无报道,因此,本发明设计了一种氟嘧菌酯半抗原的制备方法,并制备了人工抗原,制备的检测氟嘧菌酯的试剂盒可用于直接竞争酶联免疫分析中。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种氟嘧菌酯半抗原的制备方法,以3-[1-(2-羟基苯基)-1-(甲氧亚氨基)-甲基]-5,6-二氢-1,4,2-二噁嗪为原料,先与4,5,6-三氟嘧啶发生醚化反应,再与邻羟基苯乙酸甲酯反应得到氟嘧菌酯半抗原,制备的氟嘧菌酯半抗原可应用于制备人工抗原和多隆克抗体,也可用于进一步制备一种采用直接竞争ELISA法定量检测氟嘧菌酯的试剂盒。

[0005] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案如下:

[0006] 提供一种氟嘧菌酯半抗原的制备方法,该方法以3-[1-(2-羟基苯基)-1-(甲氧亚氨基)-甲基]-5,6-二氢-1,4,2-二噁嗪为原料,先与4,5,6-三氟嘧啶发生醚化反应,再与邻羟基苯乙酸甲酯反应得到氟嘧菌酯半抗原;

[0007] 所述氟嘧菌酯半抗原的制备方法包括以下步骤:

[0008] (1) 在0℃下,将等摩尔比的3-[1-(2-羟基苯基)-1-(甲氧亚氨基)-甲基]-5,6-二氢-1,4,2-二噁嗪和4,5,6-三氟嘧啶溶于1L四氢呋喃中,于该溶液中加入7.0g 80%的氢化钠植物油悬浮液得到混合液,在0℃下磁力搅拌反应3h,转速为1500-2000r/min,随后不再

进行冷却,继续搅拌12-14小时,反应液用乙酸乙酯消化并用水反复洗涤,有机相用硫酸钠干燥并减压浓缩,得到黏稠油状物,待该油状物形成结晶,得到3-[1-[2-(4,5-二氟嘧啶-6-基氧基)-苯基]-1-(甲氧亚氨基)-甲基]-5,6-二氢-1,4,2-三噁唑;

[0009] (2) 将步骤(1)制备的3-[1-[2-(4,5-二氟嘧啶-6-基氧基)-苯基]-1-(甲氧亚氨基)-甲基]-5,6-二氢-1,4,2-三噁唑和等摩尔比的邻羟基苯乙酸甲酯溶于1L二甲基甲酰胺中,再加入32g碳酸钾和2.2g氯化亚铜,将该混合液加热到100℃反应12-14小时;

[0010] (3) 将步骤(2)的反应结束后得到的混合液恢复到室温,再加入10-30%浓度的盐酸,加热5-10h,静置并冷却到室温,过滤,滤饼用去离子水漂洗,烘干后得到氟嘧菌酯半抗原。

[0011] 一种氟嘧菌酯半抗原在制备氟嘧菌酯人工抗原方面的应用,即将所述氟嘧菌酯半抗原和载体蛋白偶联后,利用碳二亚胺法制备氟嘧菌酯人工抗原,包括以下步骤:

[0012] (1) 将氟嘧菌酯半抗原先用DMSO溶解成50mg/mL的储存液,取50-100μL上述储存液,加入1mL浓度为0.1mol/L、pH为7.2的4-羟乙基哌嗪乙磺酸偶联缓冲液(HEPES)稀释,得到氟嘧菌酯半抗原稀释液;

[0013] (2) 称取2.5-5mg载体蛋白溶于0.4mL浓度为0.1mol/L、pH为7.2的HEPES缓冲液中,得到载体蛋白溶液;

[0014] (3) 在室温磁力搅拌下,转速为1500-2000r/min,将步骤(1)得到的氟嘧菌酯半抗原稀释液加入步骤(2)得到的载体蛋白溶液中,再加入4mg(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)(EDC),继续搅拌反应2h,然后将反应液装入透析袋中,4℃下在磷酸缓冲盐溶液(PBS)中透析72h,每天换三次透析液,得到的产物以5000rpm离心10min,弃沉淀,取上清液,上清液为氟嘧菌酯人工抗原,保存于-20℃冰箱中。

[0015] 所述的载体蛋白为牛血清蛋白(BSA)时,氟嘧菌酯半抗原与BSA的摩尔比为30-50:1,制备的人工抗原为免疫原;所述的载体蛋白为卵清蛋白(OVA)时,氟嘧菌酯半抗原与OVA的摩尔比为15-20:1,制备的人工抗原为包被原。

[0016] 一种氟嘧菌酯半抗原在制备氟嘧菌酯多克隆抗体方面的应用,即将所述的氟嘧菌酯半抗原与牛血清蛋白偶联制备的免疫原免疫8周龄雌性小鼠得到氟嘧菌酯多克隆抗体,具体包括以下步骤:

[0017] (1) 选取8周龄雌性小鼠进行初次免疫,免疫剂量为1.0mg/kg,免疫原用生理盐水稀释,加入等体积弗氏完全佐剂,乳化后,进行背部多点皮内注射;

[0018] (2) 三周后,进行加强免疫,免疫剂量为1.0mg/kg,加入等体积弗氏不完全佐剂,背部多点皮下注射,以后每三周按同样的剂量和方法免疫一次;

[0019] (3) 第4次免疫一周后,从小鼠的耳缘静脉采血,分离抗血清;

[0020] (4) 抗血清采用硫酸铵沉淀法纯化得到多克隆抗体,透析后冷冻干燥成粉末,于-20℃下保存备用。

[0021] 一种氟嘧菌酯半抗原在制备检测氟嘧菌酯试剂盒方面的应用,所述试剂盒采用直接竞争ELISA法定量检测氟嘧菌酯,由试剂组和包被板构成。

[0022] 所述的试剂组包括:

[0023] (1) 磷酸盐缓冲液(PBS):浓度为0.01mol/L, pH为7.4;

[0024] (2) 洗涤液(PBST):含1%吐温-20的PBS缓冲溶液;

- [0025] (3) 底物缓冲液:3.67g/L的Na₂HP04和2.56g/L的柠檬酸混合溶液;
- [0026] (4) 终止液:2mol/L H₂SO₄溶液;
- [0027] (5) 氟嘧菌酯标准溶液:氟嘧菌酯标准溶液母液为1g/L,使用时用PBS缓冲溶液稀释到5000、1000、500、100、10、1μg/L的系列质量浓度;
- [0028] (6) 酶标记的氟嘧菌酯抗原溶液:氟嘧菌酯半抗原与辣根过氧化物酶的偶联物,使用时用PBS缓冲液稀释1万倍;
- [0029] (7) 显色剂:96.15mg/L的3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)的二甲基亚砜溶液。
- [0030] 所述的的包被板为96孔或48孔酶标板,是将氟嘧菌酯多克隆抗体包被于酶标板上,具体制备步骤如下:
- [0031] 将氟嘧菌酯多克隆抗体用pH为9.6,浓度为0.1mol/L的Na₂CO₃-NaHCO₃包被缓冲溶液稀释到10μg/mL,然后以每孔100μL包被于包被板中,4℃过夜,弃去包被缓冲液后,用洗涤液洗板三次,再加入200μL质量浓度为5%OVA的PBST,封闭1小时,最后用洗涤液洗板四次,冻干真空包装,于4℃保存。
- [0032] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:
- [0033] 本发明以氟嘧菌酯工艺合成路线中的关键中间体3-[1-(2-羟基苯基)-1-(甲氧亚氨基)-甲基]-5,6-二氢-1,4,2-三噁唑为原料,先与4,5,6-三氟嘧啶发生醚化反应,再与邻羟基苯乙酸甲酯反应得到氟嘧菌酯半抗原,合成的方法简单,产物纯度和产率高;
- [0034] 采用碳二亚胺法将半抗原直接与牛血清蛋白偶联后免疫小鼠,产生针对氟嘧菌酯的特异性抗体;
- [0035] 制备的检测氟嘧菌酯的试剂盒可用于直接竞争酶联免疫分析中,满足国内对氟嘧菌酯残留的检测需要。

具体实施方式

- [0036] 实施例1:
- [0037] 氟嘧菌酯半抗原的制备,步骤如下:
- [0038] (1) 在0℃下,将0.25mol的3-[1-(2-羟基苯基)-1-(甲氧亚氨基)-甲基]-5,6-二氢-1,4,2-三噁唑和0.25mol的4,5,6-三氟嘧啶溶于1L四氢呋喃中,于该溶液中加入7.0g 80%的氢化钠植物油悬浮液得到混合液,在0℃下磁力搅拌反应3h,转速为1500r/min,随后不再进行冷却,继续搅拌13小时,反应液用乙酸乙酯消化并用水反复洗涤,有机相用硫酸钠干燥并减压浓缩,得到黏稠油状物,待该油状物形成结晶,得到3-[1-[2-(4,5-二氟嘧啶-6-基氧基)-苯基]-1-(甲氧亚氨基)-甲基]-5,6-二氢-1,4,2-三噁唑。
- [0039] (2) 将0.2mol的3-[1-[2-(4,5-二氟嘧啶-6-基氧基)-苯基]-1-(甲氧亚氨基)-甲基]-5,6-二氢-1,4,2-三噁唑和0.2mol的邻羟基苯乙酸甲酯溶于1L二甲基甲酰胺中,再加入32g碳酸钾和2.2g氯化亚铜,将该混合液加热到100℃反应13小时。
- [0040] (3) 将步骤(2)的反应结束的混合液恢复到室温,再加入20%浓度的盐酸,加热8h,静置并冷却到室温,过滤,滤饼用去离子水漂洗,烘干后得到氟嘧菌酯半抗原。
- [0041] 实施例2:
- [0042] 氟嘧菌酯人工抗原的制备
- [0043] 利用碳二亚胺法将氟嘧菌酯半抗原和载体蛋白偶联后,制备氟嘧菌酯人工抗原,

包括以下步骤：

[0044] (1) 将氟嘧菌酯半抗原先用DMSO溶解成50mg/mL的储存液, 取80μL上述储存液, 加入1mL浓度为0.1mol/L、pH为7.2的4-羟乙基哌嗪乙磺酸偶联缓冲液(HEPES)稀释, 得到氟嘧菌酯半抗原稀释液。

[0045] (2) 称取4mg载体蛋白溶于0.4mL浓度为0.1mol/L、pH为7.2的HEPES缓冲液中, 得到载体蛋白溶液。

[0046] (3) 在室温磁力搅拌下, 转速为2000r/min, 将步骤(1)得到的氟嘧菌酯半抗原稀释液加入步骤(2)得到的载体蛋白溶液中, 再加入4mg(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)(EDC), 继续搅拌反应2h, 然后将反应液装入透析袋中, 4℃下在磷酸缓冲盐溶液(PBS)中透析72h, 每天换三次透析液, 得到的产物以5000rpm离心10min, 弃沉淀, 取上清液, 上清液为氟嘧菌酯人工抗原, 保存于-20℃冰箱中。

[0047] 载体蛋白为牛血清蛋白(BSA)时, 氟嘧菌酯半抗原与BSA的摩尔比为40:1, 制备的氟嘧菌酯人工抗原为免疫原; 所述的载体蛋白为卵清蛋白(OVA)时, 氟嘧菌酯半抗原与OVA的摩尔比为20:1, 制备的氟嘧菌酯人工抗原为包被原。

[0048] 免疫原鉴定: 对载体蛋白BSA, 半抗原和免疫原进行紫外扫描测定(200~400nm), 发现免疫原与BSA和半抗原相比, 吸收曲线有明显改变, 说明半抗原与BSA偶连成功。三硝基苯黄酸法测得半抗原与BSA的偶连比为40:1。

[0049] 包被原鉴定: 对载体蛋白OVA, 半抗原和包被原进行紫外扫描测定(200~400nm), 发现包被原与OVA和半抗原相比, 吸收曲线有明显改变, 说明半抗原与OVA偶连成功。三硝基苯黄酸法测得半抗原与KLH的偶连比为20:1。

[0050] 实施例3:

[0051] 氟嘧菌酯多克隆抗体的制备

[0052] 将实施例2所述的免疫原通过免疫8周龄雌性小鼠得到氟嘧菌酯多克隆抗体, 具体包括以下步骤:

[0053] (1) 选取8周龄雌性小鼠进行初次免疫, 免疫剂量为1.0mg/kg, 免疫原用生理盐水稀释, 加入等体积弗氏完全佐剂, 乳化后, 进行背部多点皮内注射。

[0054] (2) 三周后, 进行加强免疫, 免疫剂量为1.0mg/kg, 加入等体积弗氏不完全佐剂, 背部多点皮下注射, 以后每三周按同样的剂量和方法免疫一次。

[0055] (3) 第4次免疫一周后, 从小鼠的耳缘静脉采血, 分离抗血清;

[0056] (4) 抗血清采用硫酸铵沉淀法纯化得到多克隆抗体, 透析后冷冻干燥成粉末, 于-20℃下保存备用。

[0057] 实施例4:

[0058] 采用直接竞争ELISA法定量检测氟嘧菌酯的试剂盒

[0059] 试剂盒由试剂组和包被板构成, 所述的试剂组包括:

[0060] (1) 磷酸盐缓冲液(PBS): 浓度为0.01mol/L, pH为7.4;

[0061] (2) 洗涤液(PBST): 含1%吐温-20的PBS缓冲溶液;

[0062] (3) 底物缓冲液: 3.67g/L的Na₂HP04和2.56g/L的柠檬酸混合溶液;

[0063] (4) 终止液: 2mol/L H₂SO4溶液;

[0064] (5) 氟嘧菌酯标准溶液: 氟嘧菌酯标准溶液母液为1g/L, 使用时用PBS缓冲溶液稀

释到5000、1000、500、100、10、1 μ g/L的系列质量浓度；

[0065] (6) 酶标记的氟嘧啶抗原溶液：氟嘧啶半抗原与辣根过氧化物酶的偶联物，使用时用PBS缓冲液稀释1万倍；

[0066] (7) 显色剂：96.15mg/L的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)的二甲基亚砜溶液。

[0067] 包被板为96孔，是将氟嘧啶多克隆抗体包被于酶标板上，具体制备步骤如下：

[0068] 将氟嘧啶多克隆抗体用pH为9.6，浓度为0.1mol/L的Na₂CO₃-NaHCO₃包被缓冲液稀释到10 μ g/mL，然后以每孔100 μ L包被于包被板中，4℃过夜，弃去包被缓冲液后，用洗涤液洗板三次，再加入200 μ L质量浓度为5%OVA的PBST，封闭1小时，最后用洗涤液洗板四次，冻干真空包装，于4℃保存。

专利名称(译)	一种氟嘧菌酯半抗原的制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN106543163A	公开(公告)日	2017-03-29
申请号	CN201610980256.2	申请日	2016-11-08
[标]申请(专利权)人(译)	佛山市飞时达新材料科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	佛山市飞时达新材料科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	佛山市飞时达新材料科技有限公司		
[标]发明人	叶青		
发明人	叶青		
IPC分类号	C07D413/12 C07K14/77 C07K14/765 C07K16/44 G01N33/535		
CPC分类号	C07D413/12 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 G01N33/535		
外部链接	Espacenet	Sipo	

摘要(译)

本发明公开了一种氟嘧菌酯半抗原的制备方法及其应用，该制备方法以氟嘧菌酯工艺合成路线中的关键中间体3-[1-(2-羟基苯基)-1-(甲氧亚氨基)-甲基]-5,6-二氢-1,4,2-三唑为原料，先与4,5,6-三氟嘧啶发生醚化反应，再与邻羟基苯乙酸甲酯反应得到氟嘧菌酯半抗原，合成的方法简单，产物纯度和产率高；采用碳二亚胺法将半抗原直接与牛血清蛋白偶联后免疫小鼠，产生针对氟嘧菌酯的特异性抗体；制备的检测氟嘧菌酯的试剂盒可用于直接竞争酶联免疫分析中，满足国内对氟嘧菌酯残留的检测需要。本发明提供的氟嘧菌酯半抗原为建立快速、简便、价廉、灵敏、特异的氟嘧菌酯的检测方法提供了新的物质基础。