



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110845444 A

(43)申请公布日 2020.02.28

(21)申请号 201911132184.6

(22)申请日 2019.11.19

(71)申请人 北京勤邦生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观国际信  
息产业基地高新四街8号

(72)发明人 万宇平 吴小胜 崔廷婷 崔海峰  
朱亮亮 崔娜 赵正苗 刘玉梅  
凡静静

(51)Int.Cl.

C07D 295/185(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

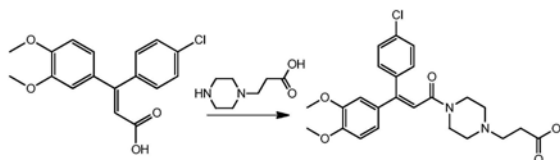
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

## (54)发明名称

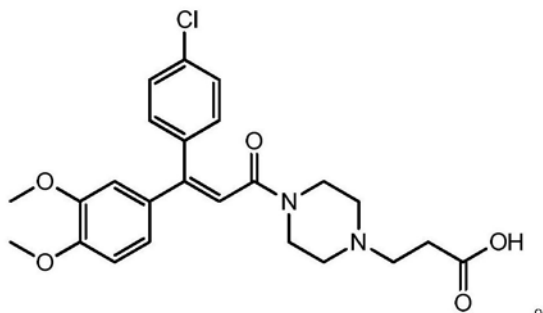
烯酰吗啉半抗原、人工抗原和抗体及其制备  
方法和应用

## (57)摘要

本发明公开了烯酰吗啉半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用,本发明提供的烯酰吗啉半抗原既最大程度保留了烯酰吗啉的特征结构,使得烯酰吗啉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羧基;用烯酰吗啉半抗原与载体蛋白偶联后得到的烯酰吗啉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,经检测烯酰吗啉抗体的灵敏度可达 $0.1\mu\text{g/L}$ ,与其他农药的交叉反应率低,为后续建立烯酰吗啉的各种免疫分析方法提供了基础。



1. 一种烯酰吗啉半抗原, 其特征在于, 其具有如下结构式:



2. 如权利要求1所述的烯酰吗啉半抗原的制备方法, 其特征在于, 其是由3-(4-氯苯基)-3-(3,4-二甲氧基苯基)-丙烯酸与3-哌嗪-1-丙酸反应得到。

3. 如权利要求2所述的烯酰吗啉半抗原的制备方法, 其特征在于, 该制备方法为: 取3-(4-氯苯基)-3-(3,4-二甲氧基苯基)-丙烯酸加二氯甲烷溶解, 加N,N-二甲基甲酰胺, 充分搅拌后, 加入草酰氯, 0-5℃搅拌反应40min, 反应完毕后, 加入3-哌嗪-1-丙酸和三乙胺, 室温搅拌反应3h, 反应完毕后, 进行分离纯化后得到烯酰吗啉半抗原; 其中, 所述3-(4-氯苯基)-3-(3,4-二甲氧基苯基)-丙烯酸、草酰氯和3-哌嗪-1-丙酸的物质的量之比为1:0.1:1。

4. 如权利要求2所述的烯酰吗啉半抗原的制备方法, 其特征在于, 该制备方法的具体步骤如下: 取3-(4-氯苯基)-3-(3,4-二甲氧基苯基)-丙烯酸3.18g加二氯甲烷150mL溶解, 加N,N-二甲基甲酰胺0.6mL, 充分搅拌后, 加入草酰氯0.13g, 0-5℃搅拌反应40min, 反应完毕后, 加入3-哌嗪-1-丙酸1.59g和三乙胺0.8mL, 室温搅拌反应3h, 反应完毕后, 加水100mL振荡、静置, 去除水相, 有机相蒸干, 上硅胶柱, 用体积比为1:1的石油醚-乙酸乙酯洗脱分离, 得到烯酰吗啉半抗原。

5. 一种烯酰吗啉人工抗原, 其特征在于, 所述烯酰吗啉人工抗原包括烯酰吗啉免疫抗原和烯酰吗啉包被抗原, 所述烯酰吗啉人工抗原是载体蛋白和权利要求1所述的烯酰吗啉半抗原偶联得到的偶联物。

6. 如权利要求5所述的烯酰吗啉人工抗原, 其特征在于, 所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白或血蓝蛋白。

7. 如权利要求5所述的烯酰吗啉人工抗原的制备方法, 其特征在于, 所述烯酰吗啉免疫抗原的制备包括如下步骤: 将50mg牛血清白蛋白用0.05mol/L PB缓冲液溶解, 得到蛋白A液; 将17mg烯酰吗啉半抗原用1mL N,N-二甲基甲酰胺溶解, 加入13.2mg碳二亚胺, 混匀, 反应10min, 加入9.1mg N-羟基琥珀酰亚胺, 吹打混匀, 室温反应2h, 然后滴加到上述蛋白A液中, 4℃反应12h, 用0.02mol/L PBS缓冲液透析纯化3天, 分装冻存;

所述烯酰吗啉包被抗原的制备包括如下步骤: 将50mg卵清蛋白用0.05mol/L PB缓冲液溶解, 得到蛋白B液; 将9.8mg烯酰吗啉半抗原用1mL N,N-二甲基甲酰胺溶解, 加入0.2mL三乙胺, 混匀, 加入0.21mL氯甲酸异丁酯, 0-5℃反应2h, 然后滴加到上述蛋白B液中, 4℃反应12h, 用0.02mol/L PBS缓冲液透析纯化3天, 分装冻存。

8. 一种烯酰吗啉抗体, 其特征在于, 它是由权利要求5所述的烯酰吗啉免疫抗原经动物免疫得到, 其能与烯酰吗啉发生特异性免疫反应。

9. 一种权利要求8所述的烯酰吗啉抗体在检测烯酰吗啉残留中的应用。

## 烯酰吗啉半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测领域。更具体地,本发明涉及烯酰吗啉半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 烯酰吗啉是一种高效卵菌纲真菌杀菌剂,具有内吸、治疗和抗孢子形成等特性,对卵菌生命周期的各个阶段都有效。烯酰吗啉影响病原菌细胞壁分子结构的重排,干扰细胞壁聚合体的组装,进而干扰细胞壁的形成。其可用于防治多种作物上由霜霉属和疫霉属病菌引发的病害,且与甲霜灵、苯霜灵等苯基酰胺类杀菌剂无交互抗性。烯酰吗啉广泛用于蔬菜和水果,因此,其残留具有较高的检出率。

[0003] 目前,烯酰吗啉的测定方法主要有气相色谱法、气相色谱-串联质谱法、液相色谱法及液相色谱-串联质谱法等。仪器检测法存在样品前处理繁琐、检测时间长、仪器贵重等缺点,所以在我国无法得到广泛应用,并且不符合现场检测“在短时间内低成本对大量样品进行准确检测和筛选”的要求。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。所以免疫分析为烯酰吗啉残留研究提供了一条新的分析检测方法。

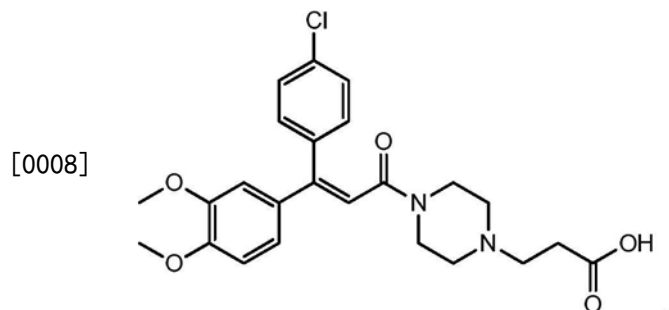
[0004] 在建立免疫学检测方法并应用该检测方法检测烯酰吗啉残留量时,关键技术在于能够获取到特异性强、灵敏度高的抗体,而要实现这一目标,前提条件就是得合成、制备出合适的烯酰吗啉半抗原。

### 发明内容

[0005] 针对现有技术中存在的不足之处,本发明提供一种能最大程度保留烯酰吗啉的特征结构,又具有一定长度连接臂的半抗原以及这种半抗原的制备方法;以此半抗原制备的人工抗原、检测灵敏度高和特异性强的抗体;以及此半抗原的应用。

[0006] 本发明所要解决的技术问题是通过以下技术方案来实现的:

[0007] 本发明的第一个目的是提供一种烯酰吗啉半抗原,其具有如下结构式:



[0009] 本发明的第二个目的是提供一种烯酰吗啉半抗原的制备方法,其是由3-(4-氯苯基)-3-(3,4-二甲氧基苯基)-丙烯酸与3-哌嗪-1-丙酸反应得到。

[0010] 进一步地,该制备方法为:取3-(4-氯苯基)-3-(3,4-二甲氧基苯基)-丙烯酸加二

氯甲烷溶解,加N,N-二甲基甲酰胺,充分搅拌后,加入草酰氯,0-5℃搅拌反应40min,反应完毕后,加入3-哌嗪-1-丙酸和三乙胺,室温搅拌反应3h,反应完毕后,进行分离纯化后得到烯酰吗啉半抗原;其中,所述3-(4-氯苯基)-3-(3,4-二甲氧基苯基)-丙烯酸、草酰氯和3-哌嗪-1-丙酸的物质的量之比为1:0.1:1。

[0011] 进一步地,该制备方法的具体步骤如下:取3-(4-氯苯基)-3-(3,4-二甲氧基苯基)-丙烯酸3.18g加二氯甲烷150mL溶解,加N,N-二甲基甲酰胺0.6mL,充分搅拌后,加入草酰氯0.13g,0-5℃搅拌反应40min,反应完毕后,加入3-哌嗪-1-丙酸1.59g和三乙胺0.8mL,室温搅拌反应3h,反应完毕后,加水100mL振荡、静置,去除水相,有机相蒸干,上硅胶柱,用体积比为1:1的石油醚-乙酸乙酯洗脱分离,得到烯酰吗啉半抗原。

[0012] 本发明的第三个目的是提供一种烯酰吗啉人工抗原,所述烯酰吗啉人工抗原包括烯酰吗啉免疫抗原和烯酰吗啉包被抗原,所述烯酰吗啉人工抗原是载体蛋白和上述烯酰吗啉半抗原偶联得到的偶联物。

[0013] 进一步地,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白或血蓝蛋白。

[0014] 本发明的第四个目的是提供一种烯酰吗啉人工抗原的制备方法,其中所述烯酰吗啉免疫抗原的制备包括如下步骤:将50mg牛血清白蛋白用0.05mol/L PB缓冲液溶解,得到蛋白A液;将17mg烯酰吗啉半抗原用1mL N,N-二甲基甲酰胺溶解,加入13.2mg碳二亚胺,混匀,反应10min,加入9.1mg N-羟基琥珀酰亚胺,吹打混匀,室温反应2h,然后滴加到上述蛋白A液中,4℃反应12h,用0.02mol/L PBS缓冲液透析纯化3天,分装冻存;

[0015] 所述烯酰吗啉包被抗原的制备包括如下步骤:将50mg卵清蛋白用0.05mol/L PB缓冲液溶解,得到蛋白B液;将9.8mg烯酰吗啉半抗原用1mL N,N-二甲基甲酰胺溶解,加入0.2mL三乙胺,混匀,加入0.21mL氯甲酸异丁酯,0-5℃反应2h,然后滴加到上述蛋白B液中,4℃反应12h,用0.02mol/L PBS缓冲液透析纯化3天,分装冻存。

[0016] 本发明的第五个目的是提供一种烯酰吗啉抗体,它是由上述烯酰吗啉免疫抗原经动物免疫得到,其能与烯酰吗啉发生特异性免疫反应。

[0017] 进一步地,所述烯酰吗啉抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0018] 本发明的第六个目的是提供上述烯酰吗啉抗体在检测烯酰吗啉残留中的应用。

[0019] 本发明具有如下有益效果:

[0020] 本发明提供的烯酰吗啉半抗原既最大程度保留了烯酰吗啉的特征结构,使得烯酰吗啉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羧基;用烯酰吗啉半抗原与载体蛋白偶联后得到的烯酰吗啉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,为后续建立烯酰吗啉的各种免疫分析方法提供基础。

[0021] 本发明中采用3-(4-氯苯基)-3-(3,4-二甲氧基苯基)-丙烯酸与3-哌嗪-1-丙酸反应制备烯酰吗啉半抗原,反应步骤简单,所需实验条件温和、易于控制,制备的烯酰吗啉半抗原的纯度和产率较高。

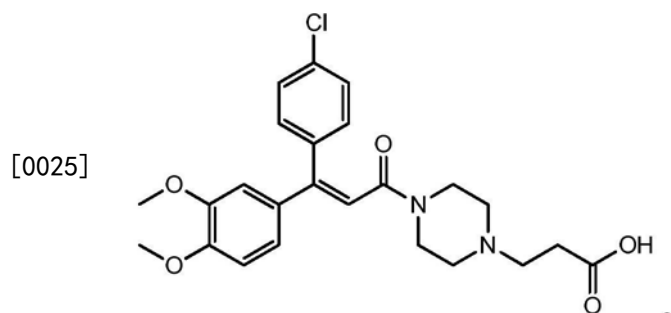
[0022] 采用本发明的烯酰吗啉免疫抗原得到的烯酰吗啉抗体的效价、特异性、亲和力都较好,灵敏度可达0.1μg/L,与其他农药的交叉反应率低。

## 附图说明

[0023] 图1是本发明烯酰吗啉半抗原的合成路线

## 具体实施方式

[0024] 第一方面,本发明提供一种烯酰吗啉半抗原,其具有如下结构式:



[0026] 本发明提供的烯酰吗啉半抗原既最大程度保留了烯酰吗啉的特征结构,使得烯酰吗啉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羧基;用烯酰吗啉半抗原与载体蛋白偶联后得到的烯酰吗啉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。

[0027] 第二方面,本发明提供上述烯酰吗啉半抗原的制备方法,其是由3-(4-氯苯基)-3-(3,4-二甲氧基苯基)-丙烯酸与3-哌嗪-1-丙酸反应得到。

[0028] 优选地,烯酰吗啉半抗原的制备方法为:取3-(4-氯苯基)-3-(3,4-二甲氧基苯基)-丙烯酸加二氯甲烷溶解,加N,N-二甲基甲酰胺,充分搅拌后,加入草酰氯,0-5℃搅拌反应40min,反应完毕后,加入3-哌嗪-1-丙酸和三乙胺,室温搅拌反应3h,反应完毕后,进行分离纯化后得到烯酰吗啉半抗原;

[0029] 其中,所述3-(4-氯苯基)-3-(3,4-二甲氧基苯基)-丙烯酸、草酰氯和3-哌嗪-1-丙酸的物质的量之比为1:0.1:1。

[0030] 本发明中采用3-(4-氯苯基)-3-(3,4-二甲氧基苯基)-丙烯酸与3-哌嗪-1-丙酸反应制备烯酰吗啉半抗原,反应步骤简单,所需实验条件温和、易于控制,制备的烯酰吗啉半抗原的纯度和产率较高。

[0031] 第三方面,本发明还提供一种烯酰吗啉人工抗原,所述烯酰吗啉人工抗原包括烯酰吗啉免疫抗原和烯酰吗啉包被抗原,所述烯酰吗啉人工抗原是载体蛋白和上述烯酰吗啉半抗原偶联得到的偶联物。

[0032] 优选地,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白或血蓝蛋白。

[0033] 烯酰吗啉半抗原分子仅具有免疫反应性,而不具有免疫原性。因此,为了赋予烯酰吗啉半抗原分子以免疫原性,还需要将该烯酰吗啉半抗原分子与合适的载体蛋白分子偶联、结合在一起,由此产生既具有免疫反应性又具有免疫原性的烯酰吗啉人工抗原。

[0034] 第四方面,本发明还提供上述烯酰吗啉人工抗原的制备方法,其中所述烯酰吗啉免疫抗原的制备包括如下步骤:将50mg牛血清白蛋白用0.05mol/L PB缓冲液溶解,得到蛋白A液;将17mg烯酰吗啉半抗原用1mL N,N-二甲基甲酰胺溶解,加入13.2mg碳二亚胺,混匀,反应10min,加入9.1mg N-羟基琥珀酰亚胺,吹打混匀,室温反应2h,然后滴加到上述蛋白A液中,4℃反应12h,用0.02mol/L PBS缓冲液透析纯化3天,分装冻存;

[0035] 所述烯酰吗啉包被抗原的制备包括如下步骤:将50mg卵清蛋白用0.05mol/L PB缓冲液溶解,得到蛋白B液;将9.8mg烯酰吗啉半抗原用1mL N,N-二甲基甲酰胺溶解,加入0.2mL三乙胺,混匀,加入0.21mL氯甲酸异丁酯,0-5℃反应2h,然后滴加到上述蛋白B液中,4

℃反应12h,用0.02mol/L PBS缓冲液透析纯化3天,分装冻存。

[0036] 第五方面,本发明还提供一种烯酰吗啉抗体,它是由上述烯酰吗啉免疫抗原经动物免疫得到,其能与烯酰吗啉发生特异性免疫反应。

[0037] 所述烯酰吗啉抗体可以为单克隆抗体或多克隆抗体。另外,对于所述烯酰吗啉抗体,可以采用本领域常规方法来进行制备。

[0038] 在一个具体的实施方案中,所述烯酰吗啉抗体为特异性针对上述烯酰吗啉半抗原的烯酰吗啉免疫抗原的鼠源单克隆抗体。

[0039] 采用本发明的烯酰吗啉免疫抗原得到的烯酰吗啉抗体的效价、特异性、亲和力都较好,与其他农药的交叉反应率低。

[0040] 第六方面,本发明还提供上述烯酰吗啉抗体在检测烯酰吗啉残留中的应用。

[0041] 本发明通过烯酰吗啉人工抗原诱导免疫动物产生抗体,从而用于烯酰吗啉免疫检测分析中。

[0042] 所述的烯酰吗啉免疫检测包括但不限于烯酰吗啉ELISA试剂盒和烯酰吗啉胶体金试纸条。

[0043] 下面结合具体实施例进一步详细说明本发明,但实施例仅是本发明的优选实施方式,并不是对本发明的限定。

[0044] 实施例1

[0045] 一种烯酰吗啉半抗原的制备方法,步骤如下:取3-(4-氯苯基)-3-(3,4-二甲氧基苯基)-丙烯酸3.18g加二氯甲烷150mL溶解,加N,N-二甲基甲酰胺0.6mL,充分搅拌后,加入草酰氯0.13g,0-5℃搅拌反应40min,反应完毕后,加入3-哌嗪-1丙酸1.59g和三乙胺0.8mL,室温搅拌反应3h,反应完毕后,加水100mL振荡、静置,去除水相,有机相蒸干,上硅胶柱,用体积比为1:1的石油醚-乙酸乙酯洗脱分离,得到烯酰吗啉半抗原。

[0046] 实施例2

[0047] 一种烯酰吗啉免疫抗原的制备方法,步骤如下:

[0048] 将50mg牛血清白蛋白用0.05mol/L PB缓冲液溶解,得到蛋白A液;将17mg实施例1中的烯酰吗啉半抗原用1mL N,N-二甲基甲酰胺溶解,加入13.2mg碳二亚胺,混匀,反应10min,加入9.1mg N-羟基琥珀酰亚胺,吹打混匀,室温反应2h,然后滴加到上述蛋白A液中,4℃反应12h,用0.02mol/L PBS缓冲液透析纯化3天,分装冻存。

[0049] 实施例3

[0050] 一种烯酰吗啉包被抗原的制备方法,步骤如下:

[0051] 将50mg卵清蛋白用0.05mol/L PB缓冲液溶解,得到蛋白B液;将9.8mg实施例1中的烯酰吗啉半抗原用1mL N,N-二甲基甲酰胺溶解,加入0.2mL三乙胺,混匀,加入0.21mL氯甲酸异丁酯,0-5℃反应2h,然后滴加到上述蛋白B液中,4℃反应12h,用0.02mol/L PBS缓冲液透析纯化3天,分装冻存。

[0052] 实施例4

[0053] 一种烯酰吗啉抗体,其制备方法为:

[0054] 1.动物免疫

[0055] 取健康的6~8周雌性Balb/c小鼠10只(分为A与B两组,每组5只),初次免疫用弗氏完全佐剂乳化后颈背部皮下多点注射,每只小鼠免疫剂量为200μg烯酰吗啉免疫抗原;之后

加强免疫每两周颈背部皮下多点注射一次,乳化用弗氏不完全佐剂;最后一次免疫使用生理盐水代替弗氏不完全佐剂,采用腹腔注射,注射剂量和前面几次相同。具体免疫步骤见表1。

[0056] 表1 小鼠免疫程序

	免疫次数	时间/d	免疫剂量( $\mu\text{g}/\text{只}$ )	免疫方法	佐剂
	初免	0	200	颈背部皮下多点注射	弗氏完全佐剂
[0057]	二免	15	200	同上	弗氏不完全佐剂
	三免	30	200	同上	同上
	四免	44	200	同上	同上
	加强	58 (融合前三天)	200	腹腔注射	不加佐剂

[0058] 第三次、四次、加强免疫后7d,对小鼠断尾取血,ELISA方法测定小鼠血清效价,具体步骤如下:

[0059] (1) 用0.05mol/L pH9.6的碳酸盐缓冲液将烯酰吗啉包被抗原做1:1000稀释,每孔100 $\mu\text{L}$ 包被酶标板,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2h,甩掉包被液,以PBST洗涤1次,拍干;

[0060] (2) 每孔加入150 $\mu\text{L}$ 封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应2h后倾去封闭液,拍干;

[0061] (3) 每孔加入50 $\mu\text{L}$ 以PBS倍比稀释的抗血清,25 $^{\circ}\text{C}$ 反应30min后倾去反应液,以PBST洗涤3~5次,每次间隔30s,拍干;

[0062] (4) 加PBS稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体(1:1000) 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,25 $^{\circ}\text{C}$ 反应30min,以PBST洗涤3~5次,每次间隔30s,拍干;

[0063] (5) 每孔加入底物显色液A液和B液各50 $\mu\text{L}$ ,25 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应15min,每孔加入50 $\mu\text{L}$  2mol/L的 $\text{H}_2\text{SO}_4$ 溶液终止反应;

[0064] (6) 酶标仪测定波长在450nm的OD值,以样品孔 $\text{OD}_{450}$ 接近于1的稀释倍数作为阳性血清的效价。

## [0065] 2. 细胞融合

[0066] (1) 饲养细胞制备:断颈处死8~10周龄Balb/c小鼠,浸泡在75%酒精中5min,随即放入超净工作台内,腹部朝上放于平皿内或固定于解剖板上。用眼科镊子夹起小鼠腹部皮肤,用剪刀剪一小口,注意切勿剪破腹膜,以免腹腔液外流和污染。然后用剪刀向上下两侧做钝性分离,充分暴露腹膜。用酒精棉球擦拭腹膜消毒。用注射器吸取5mL RPMI-1640基础培养液,注入小鼠腹腔,轻轻抽回注射器,晃动小鼠腿部和尾部几次。用原注射器抽回腹腔内液体,注入离心管。如此反复操作3~4次。1000r/min离心10min,弃上清。用20~50mL完全培养液重悬细胞,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 滴加到培养板,置培养箱备用。

[0067] (2) 脾细胞制备:加强免疫后3d,取免疫Balb/c小鼠,眼眶采血后脱臼处死,在75%酒精中消毒后取脾脏,去除结缔组织,制备脾细胞悬液,转移到50mL离心管中,加RPMI-1640至30mL,1500~2000r/min离心5min,弃上清,加RPMI-1640至30mL,计数待用。

[0068] (3) 骨髓瘤细胞制备:取3瓶生长状态良好的(活细胞数>95%)骨髓瘤细胞,将之完全吹下,转移到50mL离心管中,加RPMI-1640至30mL,1500~2000r/min离心5min,弃上清,加RPMI-1640至30mL,计数待用。

[0069] (4) 细胞混合:脾细胞:骨髓瘤细胞=8:1,混合,1500~2000r/min离心5min。

[0070] (5) 细胞融合:将混合好的细胞离心,倒干上清,把沉淀细胞块弹成糊状,置37 $^{\circ}\text{C}$ 水

浴,在1min内加入1mL融合剂,融合剂为聚乙二醇(PEG) 4000,作用2min,并轻轻搅拌细胞,在随后4min内加入20mL无血清的PEG营养液,1000r/min离心10min,弃上清。用20~50mL完全培养液重悬细胞,铺种于含饲养细胞的96孔细胞培养板,每孔100 $\mu$ L,置培养箱中。

### [0071] 3. 细胞株筛选

[0072] 待细胞长至孔底的1/2~1/3时,即可进行抗体检测。采用ELISA方法对有杂交瘤细胞生长的培养孔进行筛选,筛选分两步:第一步先用间接ELISA筛选出阳性细胞孔,第二步选用烯酰吗啉为标准品,用间接竞争ELISA对阳性细胞进行抑制效果测定。选出对烯酰吗啉标准品具有较好抑制的孔,采用有限稀释法进行亚克隆,用同样的方法进行检测。重复三次,即可得到能稳定分泌烯酰吗啉单克隆抗体的细胞株。

### [0073] 4. 腹水制备

[0074] 将液体石蜡注射6~8周Balb/c小鼠,500 $\mu$ L/只。10天后将处于对数生长期的杂交瘤细胞用RPMI-1640基础培养基收集,用血球计数板和显微镜计数,细胞浓度在 $1.0 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 个/mL范围内。每只小鼠0.5mL杂交瘤细胞注射到腹腔。注意观察在一周后小鼠腹部膨大,用无菌注射器于小鼠腹腔采集腹水,每隔一到两天采集一次,这样多次反复采集直到小鼠自然死亡。4 $^{\circ}$ C下5000r/min离心5min,收集上清,并去掉腹水上层漂浮的脂肪和蛋白质膜。

### [0075] 5. 抗体纯化

[0076] 单克隆抗体采用辛酸-硫酸铵方法纯化。

### [0077] 6. 抗体效价测定

[0078] 采用间接ELISA方法测定抗体效价,步骤参考1.中动物免疫的血清效价测定。结果显示,烯酰吗啉单克隆抗体的效价 $\geq 20000$ 。

### [0079] 7. 抗体交叉反应性测定

[0080] 采用间接竞争ELISA方法测定,结果发现,烯酰吗啉单克隆抗体对烯酰吗啉及其他羧酸酰胺类杀菌剂的交叉反应率为:烯酰吗啉为100%,氟吗啉为11.5%,异丙菌胺、苯噻菌胺、异苯噻菌胺、双炔酰菌胺均 $< 1\%$ 。由此可见,所制备的抗体特异性较好。

[0081] 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。



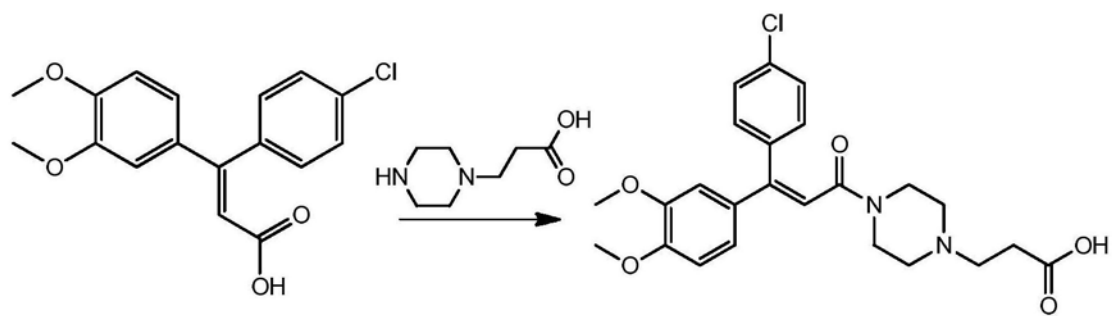


图1

专利名称(译)	烯酰吗啉半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110845444A</a>	公开(公告)日	2020-02-28
申请号	CN201911132184.6	申请日	2019-11-19
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	万宇平 吴小胜 崔廷婷 崔海峰 朱亮亮 崔娜 赵正苗 刘玉梅		
发明人	万宇平 吴小胜 崔廷婷 崔海峰 朱亮亮 崔娜 赵正苗 刘玉梅 凡静静		
IPC分类号	C07D295/185 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/53		
CPC分类号	C07D295/185 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/53		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了烯酰吗啉半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用，本发明提供的烯酰吗啉半抗原既最大程度保留了烯酰吗啉的特征结构，使得烯酰吗啉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羧基；用烯酰吗啉半抗原与载体蛋白偶联后得到的烯酰吗啉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，经检测烯酰吗啉抗体的灵敏度可达0.1μg/L，与其他农药的交叉反应率低，为后续建立烯酰吗啉的各种免疫分析方法提供了基础。

