

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510061971.8

[51] Int. Cl.

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/77 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07C 235/34 (2006.01)

[43] 公开日 2006年6月21日

[11] 公开号 CN 1789283A

[22] 申请日 2005.12.13

[21] 申请号 200510061971.8

[71] 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区玉古路 20 号

[72] 发明人 朱国念 金仁耀 程敬丽 桂文君
陈则利 金茂俊 王春梅

[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

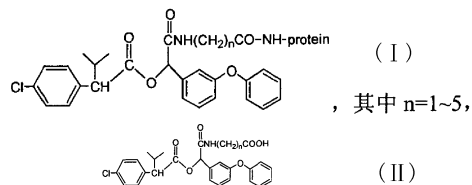
权利要求书 2 页 说明书 16 页

[54] 发明名称

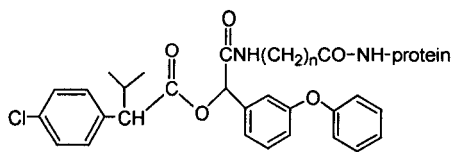
氰戊菊酯人工抗原、抗体及其用途

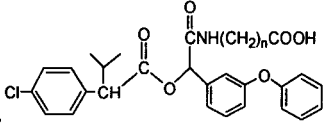
[57] 摘要

本发明公开了一种氰戊菊酯人工抗原，其分子结构式如式 I 其中 $n = 1 \sim 5$ ，是以如式 II 为半抗原，与蛋白质共价偶联合成的；其中半抗原与蛋白质的结合比在 $5 : 1 \sim 100 : 1$ 。本发明还公开了上述氰戊菊酯人工抗原免疫白鼠或兔子所得到的、能与氰戊菊酯发生特异性免疫反应的单克隆或多克隆免疫球蛋白 G，上述氰戊菊酯特异性抗体能用于检测样品中氰戊菊酯的残留量。本发明还公开了一种适用于氰戊菊酯残留分析的直接和间接竞争酶联免疫吸附测定试剂盒。本发明所得的抗体用于 ELISA 方法检测氰戊菊酯，最低检测限可达 $4.0 \pm 1.5 \mu\text{g/L} (0.004 \text{ppm})$ ，检测灵敏度高。

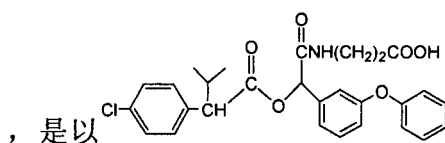
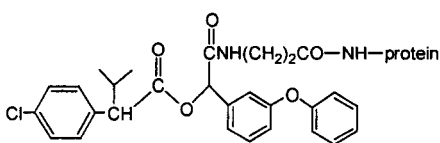


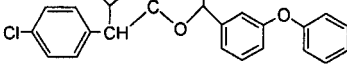
1、一种氰戊菊酯人工抗原，其特征在于它的分子结构式为：



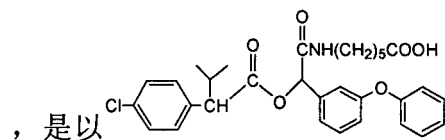
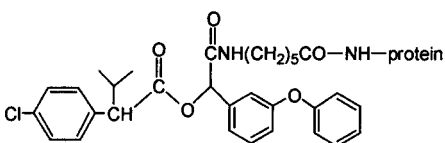
其中 $n=1\sim 5$ ，是以  (其中 $n=1\sim 5$) 为半抗原，与蛋白质共价偶联合成的；其中半抗原与蛋白质的结合比在 5: 1~100: 1。

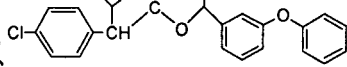
2、根据权利要求 1 所述的氰戊菊酯人工抗原，其特征在于 $n=2$ ，分子结构式为：



，是以  为半抗原，与蛋白质共价偶联合成的，其中半抗原与蛋白质的结合比在 5: 1~100: 1。

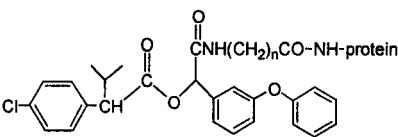
3、根据权利要求 1 所述的氰戊菊酯人工抗原，其特征在于 $n=5$ ，分子结构式为：



，是以  为半抗原，与蛋白质共价偶联合成的，其中半抗原与蛋白质的结合比在 5: 1~100: 1。

4、根据权利要求 1~3 所述的氰戊菊酯人工抗原，其特征在于：所述蛋白质为牛血清白蛋白、或卵清蛋白。

5、一种氰戊菊酯特异性抗体，其特征在于：是用分子结构式为



，其中 $n=1\sim 5$ 的氰戊菊酯人工抗原免疫白鼠或兔子所得到的、能与氰戊菊酯发生特异性免疫反应的单克隆或多克隆免疫球蛋白 G。

6、一种如权利要求 5 所述的氰戊菊酯特异性抗体的用途，其特征在于：用于检测样品中氰戊菊酯的残留量。

7、一种适用于氰戊菊酯残留分析的直接和间接竞争酶联免疫吸附测定试剂盒，其特征在于：在酶标板的每孔内，由包被液包被能与抗氰戊菊酯抗体特异性结合反应的包被抗原或直

接包被抗体，并用 1.0~3.0%脱脂奶粉进行封闭；盒内试剂包含洗涤液、底物稀释液、氰戊菊酯标准溶液、辣根过氧化物酶标记抗氰戊菊酯兔抗体或半抗原、底物、显色物质和反应终止液。

氰戊菊酯人工抗原、抗体及其用途

技术领域

本发明涉及选择一种具有-COOH的、又最大可能包含氰戊菊酯原有结构的化合物作为氰戊菊酯半抗原制备的人工抗原、人工抗体以及抗体的用途。

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。

氰戊菊酯又名速灭杀丁、敌虫菊酯、杀灭菊酯，是日本住友化学公司于 1976 年开发成功的一种高效、广谱、快速性拟除虫菊酯类杀虫剂。目前是我国产量最大的拟除虫菊酯类农药。氰戊菊酯杀虫谱广，对天敌无选择性，以触杀和胃毒为主要作用方式，无内吸传导和熏蒸作用，其击倒力强，杀虫速度快，对鳞翅目幼虫效果好，对同翅目、直翅目、半翅目等害虫也有较高效果，但对螨类无效，适用于棉花、果树、蔬菜、茶树、大豆及早田和林业作物。

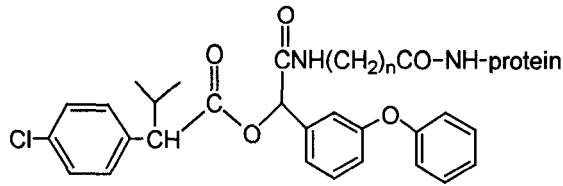
氰戊菊酯广泛应用于粮食、蔬菜、水果及经济作物等的害虫防治，但因其有效成分含量高导致施药后的原始沉积量高。氰戊菊酯对大鼠的毒性中等，对鱼和其他水生生物毒性大。人误服氰戊菊酯可能引起呕吐、神经过敏、悸惧、流涎等症状，严重时发生震颤和全身痉挛。目前，无论是单位面积用量还是总用量，氰戊菊酯是我国拟除虫菊酯类农药中使用量最大的品种，农产品中氰戊菊酯残留超标直接影响食品安全，对环境构成一定威胁。另外国际标准关于氰戊菊酯的最高残留限量（MRL）制定的比其它菊酯类农药低，而其在作物上的降解又比较慢，所以在蔬菜、茶叶、果树等无公害农药标准中，氰戊菊酯是必检的一种农药品种，其最大残留量都要求在 2mg/Kg（我国标准）以下，欧盟将采用的标准 0.1mg/Kg，因此开发一种简单、快速，适于农药残留现场监控的痕量分析法—免疫分析方法、并将免疫分析方法运用到实际中，研制其快速检测氰戊菊酯的酶联免疫试剂盒具有重要的现实意义。

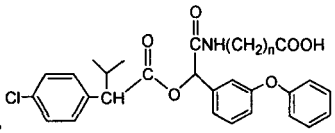
发明内容

针对现有技术中存在的不足之处，本发明提供一种用能最大程度保留了氰戊菊酯的化学结构，又由具有可调节长度的连接臂的半抗原制备的人工抗原、人工抗体；以及此类抗原、抗体的用途。

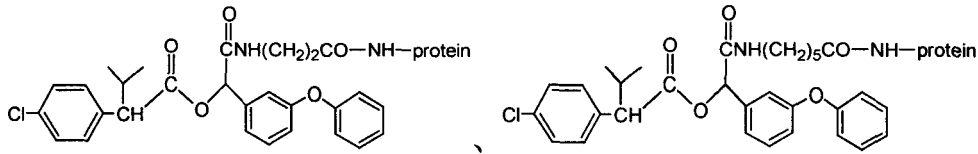
本发明提供了人工抗原化合物——氰戊菊酯人工抗原，是最大程度包含氰戊菊酯的结

构，又具有可以与氨基酸偶联的基团-COOH, 它的分子结构式为：



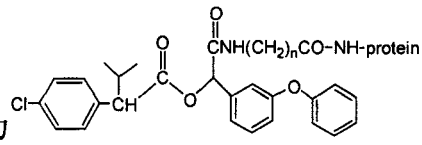
其中 $n=1\sim5$ ；是以  (其中 $n=1\sim5$) 为半抗原，与蛋白质共价偶联合成的，其中半抗原与蛋白质的结合比在 5: 1~100: 1。

优选的氰戊菊酯人工半抗原分子结构式为：



该蛋白质可选用牛血清白蛋白、或卵清蛋白。

本发明还提供了用这种抗原化合物免疫动物所得到的人工单克隆和多克隆抗体，是用

分子结构式为  ，其中 $n=1\sim5$ 的氰戊菊酯人工抗原免疫白鼠或兔子所得到的、能与氰戊菊酯发生特异性免疫反应的单克隆或多克隆免疫球蛋白G。

本发明同时提供了上述氰戊菊酯特异性抗体的用途，用于建立氰戊菊酯快速检测的直接和间接竞争酶联免疫吸附分析技术、并进一步开发成氰戊菊酯残留分析的直接竞争或间接竞争酶联免疫吸附测定试剂盒，可用于快速检测食品、农产品（蔬菜、茶叶等）和环境样品中（土壤样品或水样品）氰戊菊酯的残留量。

本发明同时提供了用上述抗体建立的适用于氰戊菊酯残留分析的直接和间接竞争酶联免疫吸附测定试剂盒，其特征在于：在酶标板的每孔内，由包被液包被能与抗氰戊菊酯抗体特异性结合反应的包被抗原，并用 1.0~3.0%脱脂奶粉进行封闭，盒内试剂包含洗涤液、底物稀释液、氰戊菊酯标准溶液、辣根过氧化物酶标记抗氰戊菊酯兔抗体、底物、显色物质和反应终止液。

为达到以上目的，是通过这样的技术方案来实现的：

以合成出的半抗原化合物与蛋白质偶联制备人工抗原，包括免疫抗原和包被抗原，然

后按照常规方法用免疫抗原对兔子、白鼠等动物进行免疫，一段时间后对活体动物进行抽血（或腹水）检验，当检验动物体内的抗血清（或腹水）的效价比较高时（效价在 25600:1），杀灭动物，制备大量抗体，用此氰戊菊酯的多克隆或单克隆抗体建立酶联免疫吸附法（ELISA）：

(1).将所述半抗原与抗体分别与辣根过氧化物酶共价偶联制备酶标半抗原和酶标抗体。用所述的包被抗原或抗体包被聚苯乙烯微孔板，加入待测样品（或氰戊菊酯标样）与酶标记物的混合液，氰戊菊酯、酶标记物与包被在微孔表面的包被原或抗体发生竞争性免疫结合反应，洗涤去除游离物，加入酶的底物和显色剂，酶促显色反应的强度与结合在包被原或抗体上的酶标记物的量成正比，与样品（或标样）中氰戊菊酯的含量成反比，据此建立氰戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析技术。运用该技术，在盒体内设置可拆卸式微孔板、包被抗原或对氰戊菊酯具特异性亲和力的抗体、碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、封闭液、氰戊菊酯标样、酶标抗体或酶标半抗原、底物液、显色剂、终止液和使用说明书，制备氰戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析试剂盒。

(2) 用所述的包被抗原或抗体包被聚苯乙烯微孔板，加入待测样品（或氰戊菊酯标样）再加入所述抗体稀释液，氰戊菊酯与包被在微孔表面的包被原与抗体发生竞争性免疫结合反应，洗涤去除游离物，加入酶标二抗，孵育、洗涤后加入酶的底物和显色剂，酶促显色反应的强度与结合在包被原或抗体上的酶标记物的量成正比，与样品（或标样）中氰戊菊酯的含量成反比，据此建立氰戊菊酯间接竞争酶联免疫吸附分析技术。运用该技术，在盒体内设置可拆卸式微孔板、包被抗原或对氰戊菊酯具特异性亲和力的抗体、酶标记二抗、碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、封闭液、氰戊菊酯标样、底物液、显色剂、终止液和使用说明书，制备氰戊菊酯间接竞争酶联免疫吸附分析试剂盒。

本发明与申请号为 200410065107.0 的中国专利相比具有一下不同：

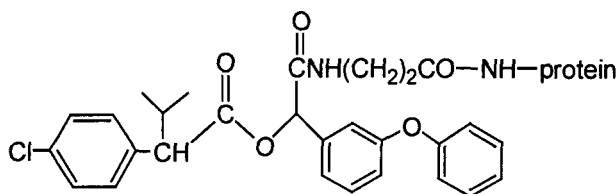
本发明中所用的氰戊菊酯半抗原的设计的位点在氰戊菊酯分子结构中—CN 位置，把—CN 通过化学合成改造成—CONH(CH₂)_nCOOH，使其具有一定的可长可短的连接臂（通过控制 n 的大小），同时又具有可以与蛋白质偶联的—COOH。本发明中制备的氰戊菊酯人工抗原化合物既最大程度地保留了氰戊菊酯的化学结构，又具有可调节长度的连接臂，用这种抗原体系免疫动物，所得的抗体的效价、特异性、亲和力都比较好，尤其是 n=2 时，所得的抗体用于 ELISA 方法检测氰戊菊酯，最低检测限可达 4.0±1.5ug/L(0.004ppm)，检测灵敏度高，与其他拟除虫菊酯类农药的交叉反应率低。

申请号为 200410065107.0 的中国专利中半抗原的结构式与氰戊菊酯的分子结构相比，只有对氯苯环部分相似，其他部分甚远，用这种半抗原与蛋白质偶联制备的人工抗原免疫动物得到的抗体效价不会太高，并且其专利中未提及所得的抗体的效价及其特异性，根据免疫学基本原理，这种抗体对氰戊菊酯的特异性与本专利相比，差距应该较大。

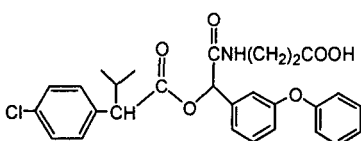
具体实施方式

实施例 1、

一种氰戊菊酯人工抗原，分子结构式为（此时 $n=2$ ）：



这种氰戊菊酯人工抗原，是由氰戊菊酯半抗原（QW-PS）与蛋白质偶联制备的，半抗

原分子结构式为：，其中半抗原化合物与蛋白质的结合比为：5:1~100:1。

上述氰戊菊酯半抗原（QW-PS）根据本人同时申请的发明专利《氰戊菊酯半抗原化合物、合成方法及其用途》获得，具体合成方法如下：

2-氰基-3-苯氧基苯甲醇的合成：250ml 二口烧瓶中加入 7.20g（0.14mol）氰化钠，20ml 水，搅拌溶解后，加入 40ml 甲苯、20.60g（0.1mol）间苯氧基苯甲醛，0.65g 四丁基溴化铵，室温下滴加 15ml 36~38% 的盐酸，加完后继续反应 1.5hr，再加入 12.5ml 水，溶解其中的固体，用分液漏斗分掉水层，得到淡黄色有机相。

淡黄色有机相投入 250ml 三口烧瓶中，加入 23.0ml（0.18mol）36~38% 的盐酸，室温下（23°C）磁力搅拌过夜，停止反应，静置分层，分出上层黄色略浑浊状，用水洗涤，加入 30ml 乙酸乙酯稀释，先用 5%NaOH 提取（30ml×3），合并，碱液用乙醚洗涤（20ml×3），然后用浓盐酸调节 pH 值至 3~5，析出大量白色固体。干燥称重，得到 12.8g 白色 2-羟基-3-苯氧基苯乙酸。收率为 52.5%（以间苯氧基苯甲醛计）。

在 250ml 烧瓶中投入 4.06g（15mmol）2-羟基-3-苯氧基苯乙酸、3.82g（35mmol）三乙胺，加入干燥过的 70ml 丙酮，冰水浴下（0~5°C）下滴加 11.44g（15mmol）30.3% 的异丙基对氯苯乙酰氯，慢慢升温，在室温下反应 10hr。反应液用稀盐酸调节 pH 至 4~5，用乙酸乙酯萃取三次（30ml×3），弃去水相；有机相无水 NaSO₄ 干燥，浓缩，硅胶柱层析分离（乙

酸乙酯：石油醚：甲酸=10：90：1)，得到 3.76g 黄色粉末状物，收率为 57.1%。

100ml 三口烧瓶中加入干燥过的叔丁醇 50ml，冷却至 0°C 以下；滴加 13ml (0.1822mol) 氯化亚砷，滴加完毕，室温反应 12hr 后，加入 5.0g (0.0562mol) β -丙氨酸，升温回流反应 12hr，至固体物消失，再室温反应 12hr。反应液浓缩至干，得到淡黄色粘稠状固体，用无水乙醇重结晶，得到 7.46g β -丙氨酸叔丁酯盐酸盐。收率为 73.2% (以 β -丙氨酸计)。

三口烧瓶中加入 87.8mg (0.2mol) 上述黄色粉末状物，加入 1.5 ml DMF 使其溶解成透明状，然后加入 69mg (0.6mol) N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)，60°C 下搅拌反应 45min，再加入 70.8mg (0.3 mol) 二环己基碳二亚胺 (DCC)，80°C 下反应过夜，反应液溶于二氯甲烷，缓慢加入到 36.3mg (0.2mol) β -丙氨酸叔丁酯盐酸盐和几滴三乙胺的 DMF 溶液中，磁力搅拌反应 4hr。反应液用二氯甲烷稀释，分别用 0.1MHCl、1MNaHCO₃、饱和盐水各洗涤三次，无水 NaSO₄ 干燥，浓缩得到淡黄色固体，硅胶板分离 (乙酸乙酯：石油醚：甲酸=25：75：0.6, Rf=0.35)，得到白色粉状物质氰戊菊酯半抗原 (QW-PS)。

一种氰戊菊酯特异性抗体，是将上述氰戊菊酯人工抗原免疫白鼠或兔子所得到的、能与氰戊菊酯发生特异性免疫反应的单克隆或多克隆免疫球蛋白 G。用于检测食品、农产品和环境样品中氰戊菊酯的残留量；环境样品为土壤样品或水样品。

利用上述氰戊菊酯人工半抗原所得的抗原、抗体制作方法如下：

1、免疫原的合成与纯化

免疫原的合成利用碳二亚胺法。将 50~80 微摩尔半抗原 QW-PS，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 μ L 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：

按合成氰戊菊酯免疫抗原反应所用半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例，进行紫外测定，通过比较三者 278nm 的吸光值并建立不同半抗原和 BSA 的比例下吸光值变化的标准曲线计算其结合比。

经计算结果如下：半抗原 QW-PS 与 BSA 的结合比为 15:1。

2、包被抗原的合成

包被抗原的合成利用混合酸酐法。将 50~80 微摩尔半抗原 QW-PS，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正三丁胺和氯甲酸异丁酯, 让其在室温下反应 1 小时后, 取 500~800 μ L 反应液加入到 4~8mL 15~20mg/mL 的卵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 2~6 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 $^{\circ}$ C 的冰箱中。

人工抗原的鉴定

按合成氰戊菊酯包被抗原反应所用半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例, 进行紫外 (200nm~400nm) 扫描测定, 通过比较三者 278nm 的吸光值并建立不同半抗原和 OVA 的比例下吸光值变化的标准曲线计算其结合比。

经计算结果如下: 半抗原 QW-PS 与 OVA 的结合比为 8:1。

3、抗体的制备

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 QW-PS-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, 从兔子心脏或耳缘静脉采血, 测定效价和特异性。

待免疫血清效价上去后, 就可进行采血。本实验采用心脏取血法。采血后, 将采血管放置于 37 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 QW-PS-BSA 交联物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 50 μ g/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2E3，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：

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1:51200（指OD_{490nm}值等于1.0）。小鼠腹水效价在10⁶左右

抗体的特异性

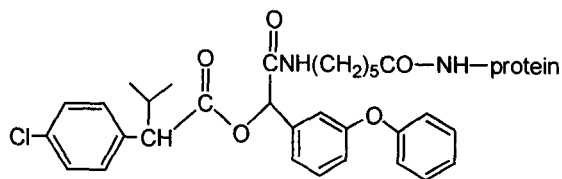
用具有多种抗原决定簇的免疫原（蛋白质或多肽）制备的抗体，其中含的抗体分子往往是混合体。当有甲、乙两种抗原，其分子结构中具有相同或部分相同的抗原决定簇时，甲抗原可与乙抗原的抗体反应，而乙抗原也可与甲抗原抗体反应，称为交叉反应。抗体的特异性就是指它同特异性抗原结合的能力与同该抗原类似物结合能力的比较。常用交叉反应活性作为评价的重要标准。交叉反应越小，抗体的特异性则越好。

将特异性抗原及其类似物做系列稀释，分别与同一种QW-PS-BSA抗体，按制作标准曲线同样方法制作标准曲线，并在曲线上找出抑制率50%的剂量和类似物抑制率50%时的用量。然后计算出各类似物的交叉反应率。

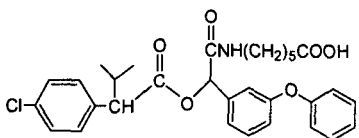
抗QW-PS-BSA抗体对各类似物的交叉反应率：苯氧苯甲酸为0.01%，(S)-氰戊菊酸为0.19%，氯菊酯为0.9%，氯氰菊酯为0.12%，溴氰菊酯为0.16%。由此可知，所制备的抗体的特异性较强。

实施例2、

一种氰戊菊酯人工抗原，分子结构式为（此时n=5）：



这种氰戊菊酯人工抗原，是由氰戊菊酯半抗原（QW-He）与蛋白质偶联制备的，半抗

原分子结构式为：，其中半抗原化合物与蛋白质的结合比为：5：1~100：1。

上述氰戊菊酯半抗原（QW-He）根据本人同时申请的发明专利《氰戊菊酯半抗原化合物、合成方法及其用途》获得，具体合成方法如下：

2-氰基-3-苯氧基苯甲醇的合成：250ml 二口烧瓶中加入 7.20g (0.14mol) 氰化钠，20ml 水，搅拌溶解后，加入 40ml 甲苯、20.60g (0.1mol) 间苯氧基苯甲醛，0.65g 四丁基溴化铵，用冰水浴冷却到 0 度以下，滴加 15ml 36~38% 的盐酸，控制速度，大约 30min 滴完，加完后继续反应 1.5hr，再加入 12.5ml 水，溶解其中的固体，用分液漏斗分掉水层，得到淡黄色有机相。

淡黄色有机相投入 250ml 三口烧瓶中，加入 23.0ml (0.18mol) 36~38% 的盐酸，室温下磁力搅拌过夜，停止反应，静置分层，分出上层黄色略浑浊状，用水洗涤，加入 30ml 乙酸乙酯稀释，先用 5% NaOH 提取 (30ml×3)，合并，碱液用乙醚洗涤 (20ml×3)，然后用浓盐酸调节 pH 值至 3~5，析出大量白色固体。干燥称重，得到 12.8g 白色 2-羟基-3-苯氧基乙酸。收率为 52.5% (以间苯氧基苯甲醛计)。

在 250ml 烧瓶中投入 4.06g (15mmol) 2-羟基-3-苯氧基乙酸、3.82g (35mmol) 三乙胺，加入干燥过的 70ml 丙酮，冰水浴下 (0~5°C) 下滴加 11.44g (15mmol) 30.3% 的异丙基对氯苯乙酰氯，慢慢升温，在室温下反应 10hr。反应液用稀盐酸调节 pH 至 4~5，用乙酸乙酯萃取三次 (30ml×3)，弃去水相；有机相无水 NaSO₄ 干燥，浓缩，硅胶柱层析分离 (乙酸乙酯：石油醚：甲酸=10：90：1)，得到 3.76g 黄色粉末状物，收率为 57.1%。

100ml 三口烧瓶中加入干燥过的叔丁醇 50ml，冷却至 0°C 以下；滴加 13ml (0.1822mol) 氯化亚砷，滴加完毕，慢慢升至室温，反应 12hr 后，加入 5.0g (0.0562mol) 6-氨基己酸，回流反应 12hr，至固体物消失，再室温反应 12hr。反应液浓缩至干，得到淡黄色粘稠状固体，用无水乙醇重结晶，得到 7.03g 6-氨基己酸叔丁酯盐酸盐。收率为 56.02% (以 6-氨基己酸计)。

三口烧瓶中加入 87.8mg (0.2mol) 上述黄色粉末状物，加入 1.5 ml DMF 使其溶解成透明状，然后加入 69mg (0.6mol) N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)，60°C 下搅拌反应 45min，再加入 70.8mg (0.3 mol) 二环己基碳二亚胺 (DCC)，80°C 下反应过夜，反应液溶于二氯甲

烷，缓慢加入到 36.3mg (0.2mol) 6-氨基己酸叔丁酯盐酸盐和几滴三乙胺的 DMF 溶液中，磁力搅拌反应 4hr。反应液用二氯甲烷稀释，分别用 0.1M HCl、1M NaHCO₃、饱和盐水各洗涤三次，无水 Na₂SO₄ 干燥，浓缩得到淡黄色固体，硅胶板分离（乙酸乙酯：石油醚：甲酸=20：80：1.0，Rf=0.33），得到白色粉状物质氰戊菊酯半抗原（QW-He）。

一种氰戊菊酯特异性抗体，是将上述氰戊菊酯人工抗原免疫白鼠或兔子所得到的、能与氰戊菊酯发生特异性免疫反应的单克隆或多克隆免疫球蛋白 G。用于检测食品、农产品（蔬菜、茶叶等）和环境样品中氰戊菊酯的残留量；环境样品为土壤样品或水样品。

利用上述氰戊菊酯人工半抗原所得的抗原、抗体制作方法如下：

1、人工免疫抗原的制备同实施例 1。

免疫抗原的鉴定

按合成氰戊菊酯免疫抗原反应所用半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例，进行紫外测定，通过比较三者 278nm 的吸光值并建立不同半抗原和 BSA 的比例下吸光值变化的标准曲线计算其结合比。

半抗原 QW-He 与 BSA 的结合比为 12:1。

2、人工包被抗原的制备同实施例 2。

按合成氰戊菊酯包被抗原反应所用半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例，进行紫外测定，通过比较三者 278nm 的吸光值并建立不同半抗原和 BSA 的比例下吸光值变化的标准曲线计算其结合比。

半抗原 QW-He 与 OVA 的结合比为 5:1。

3、抗体的制备方法同实施例 2。

所得兔子抗血清的效价为 1：51200（指 OD_{490nm} 值等于 1.0）。

小鼠腹水效价在 10⁶ 左右。

抗 QW-He-BSA 抗体对各类似物的交叉反应率：苯氧苯甲酸为 0.02%，(S)-氰戊菊酸为 0.23%，氯菊酯为 1.02%，氯氰菊酯为 1.50%，溴氰菊酯为 1.60%。

由此可知，所制备的抗体的特异性较强。

实施例 3 氰戊菊酯酶联免疫吸附测定方法建立与鉴定

1、氰戊菊酯 ELISA 测定方法的建立及其工作条件和基本参数

采用直接竞争酶联免疫分析方法。其测定原理是将农药分子与大分子载体（如蛋白质）偶联制得的复合物作为包被抗原吸附于固相载体（96 孔酶标板）上，制备

成固相抗原，然后加入待测农药和相应酶标抗体。固相抗原、待测农药与酶标抗体进行竞争结合反应，待测农药含量多，则被结合在固相抗原上的酶标抗体少，反之结合在固相抗原的酶标抗体多，最后用底物进行显色加以测定，当酶标抗体量一定时，加入的待测农药量越多，与固相抗原结合的酶标抗体就越少，发色反应就减弱，抑制率增高，反之，则发色反应增强，抑制率减低，因而可根据已知量农药的标准线和待检样品的抑制率，推算出待测农药的浓度。

2、酶标抗体的制备

采用改良过碘酸钠法，将抗体与等量的辣根过氧化物酶（HRP）偶联。偶联物加入甘油，混匀，分装， -20°C 保存。

3、最佳抗体工作浓度和包被抗原复合物浓度的确定

用方阵滴定法，同时稀释酶标抗体和固相抗原包被液。在同一包被液浓度下，随着酶标抗体的稀释，所得的 OD 值呈下降趋势，同样在同一酶标抗体稀释浓度下，随着包被液浓度的下降，所得 OD 值也呈下降趋势。通常选择 OD 值 1.0 左右时的抗体和包被抗原浓度作为工作浓度。从实验可知，当 QW-PS-BSA 酶标抗体 $5.0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，包被抗原 QW-PS-OVA 浓度为 $3.0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时 OD 值约等于 1.0；当 QW-He-BSA 酶标抗体为 $3.5.0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，包被抗原 QW-He-OVA 浓度为 $3.0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时，OD 值约等于 1.0。

4、标准曲线和检测灵敏度

从低温冰箱中取出 QW-PS-OVA 或 QW-He-OVA 偶联复合物，使之完全解冻后用包被液稀释成 $2.0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的包被抗原溶液。96 孔微量反应板用蒸馏水洗涤后，每孔加入上述包被液 $100\mu\text{L}$ ，于 37°C 温箱中孵育 2h。甩掉包被液，用 PBST 缓冲液洗涤，每孔加入封闭液 $300\mu\text{L}$ ，于 37°C 温箱中孵育 0.5h。甩掉封闭液，用 PBST 缓冲液洗涤，加入预先配制的氰戊菊酯各浓度标准液 $50\mu\text{L}/\text{孔}$ ，每浓度 8 孔重复，再加入预先配制的对应的酶标抗体稀释液（QW-PS-BSA 酶标抗体： $8.0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，QW-He-BSA 酶标抗体： $6.0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ） $50\mu\text{L}/\text{孔}$ ，设不加药对照和空白对照。放入 37°C 温箱中孵育 1h，甩去孔内液体，用 PBST 溶液洗涤。加入 OPD-过氧化氢底物溶液 $100\mu\text{L}/\text{孔}$ ， 37°C 温箱中孵育 15min 后加入 $2\text{mol}/\text{L}$ H_2SO_4 $50\mu\text{L}/\text{孔}$ 终止反应。在酶联仪上测定 490nm 波长下的吸光值。根据抑制与农药浓度之间的半对数关系作图即得到标准曲线。

ELISA 方法的标准曲线以抑制率与农药浓度的半对数曲线表示,抑制率以下式

$$\text{计算: 抑制率 (\%)} = \frac{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min}) - (\text{OD}_x - \text{OD}_{\min})}{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min})} \times 100\%$$

式中: OD_{\max} 为不加药时的吸光值, OD_x 为农药 x 时的吸光值, OD_{\min} 为空白对照孔的吸光值。

由上述公式计算得氰戊菊酯各浓度的抑制率,并可制得相应的抑制率图。用抗 QW-PS-BSA 抗体测定时,抑制率为 50% 时氰戊菊酯的浓度 (I_{50}) 为 $16.0\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,最低检测限[抑制率为 20% 时氰戊菊酯的浓度(I_{20})]为 $4.5\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;用抗 QW-He-BSA 抗体测定时, $I_{50}=27.6\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $I_{20} = 5.2\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。从该抑制率图中还可知,氰戊菊酯在 $1-500\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内,抑制率与氰戊菊酯浓度的对数值呈显著的线性关系,抗 QW-PS-BSA 抗体的相关系数为 $r=0.9883$,抗 QW-He-BSA 抗体的相关系数为 $r=0.9905$ 。

5、精密度

在 ELISA 实验中,常采用批内和批间误差来表示其精密度。

(1) 批内误差:以标准曲线的批内平均变异系数来表示。标准曲线各剂量点的批内平均变异系数 $\text{CV}\% = 11.6\%$ 。

(2) 批间误差:以 6 块不同板上的测定结果进行平均,求得标准曲线各剂量点的批间平均变异系数 $\text{CV}\% = 10.5\%$ 。

从批内和批间的数据可以看出,氰戊菊酯含量高的样品在测定过程中,其重复性较好,批内批间的变异也较小,且批内批间相差也较小。

6、准确度

准确度(Accuracy)是指测得值与真值的符合程度。在农药 ELISA 实验中,以回收率和健全性来表示其准确度。

6.1、回收率

将甘蓝样品切碎后,装入三角瓶中,每份 10g。加入一定量的氰戊菊酯标准溶液,配制成含氰戊菊酯浓度分别为 $1000\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $50\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甘蓝样品。每浓度 3 个重复,设空白对照。一定时间后,在样品中加入 50mL 的丙酮振荡提取 15 分钟。用布氏漏斗抽滤,用 30mL 的丙酮冲洗滤渣,抽滤完毕后,移入到 150mL 的容量瓶中,减压浓缩至 2mL 左右,用 PBST 定容至 10mL。配制 2 倍于

工作浓度的酶标抗体稀释液。在已包被好的 96 孔板内每孔加入系列提取浓缩液 $50\ \mu\text{L}$, 重复 4 孔, 再每孔加入酶标抗体稀释液 $50\ \mu\text{L}$, 空白对照孔加入 $100\ \mu\text{L}$ PBST, 同时作标准曲线。盖好板, 37°C 孵育 1 小时, 甩去孔内液体, 用 PBST 溶液洗涤。加入 OPD-过氧化氢底物溶液 $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 温箱中孵育 15min 后加入 2mol/L H_2SO_4 $50\ \mu\text{L}/\text{孔}$ 终止反应。在酶联仪上测定 490nm 波长下的吸光值。根据各添加样品的抑制率, 查标准曲线计算出氰戊菊酯浓度并计算回收率。

经分析可知, 该方法的平均回收率为 95.3%, 平均变异系数为 12.4%, 且氰戊菊酯的添加量为 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上时, 方法的变异系数均小于 10%, 而小于 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 方法的变异系数为 10—20% 之间。随着农药添加量的降低, 回收率基本上也呈现下降的趋势。

在制作标准曲线时, 得到的检测极限为 $0.4\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 而在测定甘蓝样品的过程中, 对其提取液作了 100 倍的稀释, 换算可得用此方法检测甘蓝中的氰戊菊酯检测限可达 $4\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 而用气相色谱硫磷检测器时对氰戊菊酯的检测限为 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 从而可知用 ELISA 分析方法测定甘蓝中氰戊菊酯量是可行的。且与气相色谱相比, ELISA 分析方法样品的前处理快捷简单, 只用丙酮提取后浓缩定容即可进行检测, 而用气相色谱法分析, 样品前处理过程复杂, 先要用缓冲溶液提取, 然后用二氯甲烷萃取, 萃取后浓缩, 浓缩后又要用小型硅胶柱净化, 工作量大, 故建立氰戊菊酯的 ELISA 分析方法能够大大提高工作效率。

6.2、健全性

将添加 $1000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氰戊菊酯的甘蓝样品的提取液在作了 10 倍稀释后作系列稀释, 进行重叠性试验, 样品提取液的稀释曲线基本上与标准曲线平行。说明所测样品与标准样品的免疫化学性质相同, 可以通过标准曲线检测被测物质, 也说明测定结果不会因样品稀释度的改变而发生显著变化。

实施例 4 氰戊菊酯直接竞争酶联免疫吸附分析试剂盒制备实施例

测定原理是: 首先将农药分子与大分子载体(如蛋白质)偶联制得的复合物作为包被抗原吸附于固相载体上, 然后加入待测农药和酶标抗体, 固相抗原上的农药, 待测农药与酶标抗体进行竞争反应, 待测农药含量多, 则被结合在固相抗原上的酶标抗体少, 反之结合在固相抗原的酶标抗体多, 反应后加入底物进行显色加以测定, 当酶标抗体量一定时, 加入的待测农药量越多, 与固相抗原结合的酶标抗体就越少, 发色反应减弱, 抑制率增高,

反之,则发色反应增强,抑制率减低,因而根据已知量农药的标准线和待检样品的抑制率,再根据抑制率与农药浓度之间的半对数关系作图即得标准曲线,并推算出待测农药的浓度。

1) 试剂盒的基本组装

在酶标板的每孔内,由包被液包被能与抗氰戊菊酯抗体特异性结合反应的包被抗原,并用1.0~3.0%脱脂奶粉进行封闭,盒内试剂包含洗涤液(稀释液)、底物稀释液、氰戊菊酯标准溶液、辣根过氧化物酶标记抗氰戊菊酯兔抗体、30%过氧化氢、显色物质和反应终止液,其中:(1)包被抗原(QW-He-OVA)用pH9.6,0.05mol/L的碳酸盐缓冲溶液(含1~2g碳酸钠和2~4g碳酸氢钠,双蒸水1L)稀释成0.5~4 μ g/mL,(2)洗涤液(稀释液)一瓶,40~80mL/瓶,内含有氯化钠7~9g、磷酸二氢钾0.1~0.3g、磷酸氢二钠2~4g、氯化钾0.1~0.3g、吐温-20 0.5~3mL、双蒸水,为正常使用的15~30倍浓缩液;(3)底物稀释液一瓶,30~50mL/瓶,配制如下:柠檬酸3~6g,磷酸氢二钠1~3g,双蒸水,为正常使用的5~10倍浓缩液;(4)底物为过氧化氢一瓶,1~5mL/瓶;(5)显色物质为邻苯二胺(OPD)6~10支,8~15mg/支;(6)辣根过氧化物酶标记抗氰戊菊酯兔抗体一瓶,一瓶,200~400 μ L/瓶,为正常使用300~1000倍浓缩液;(7)反应终止液一瓶,30~50mL/瓶,为2mol/L硫酸;(8)氰戊菊酯不同浓度系列(0.1、0.5、2、10、50、100mg/L)标准液6瓶,1~4mL/瓶,甲醇定容,使用时用PBST稀释10倍。试剂盒的最低检测限为0.01mg/L,线性检测范围为0.01~10mg/L,样品检测的批内、批间、整体变异系数均低于10.0%,水、土壤、蔬菜回收率均高于90%。试剂盒在4 $^{\circ}$ C或20 $^{\circ}$ C下至少可保存6个月以上。

2) 酶标抗体的制备

采用改良过碘酸钠法,具体操作如下:称5~10mgHRP溶解于1mL蒸馏水中,于液中加入0.2~0.4mL新配的0.1mol/L NaIO₄溶液,室温下避光搅拌15~30分钟。将上述溶液装入透析袋中,用1mmol/L pH4.4的醋酸盐缓冲液透析,4 $^{\circ}$ C过夜。加20~40 μ l 0.2mol/L pH9.5碳酸盐缓冲液,使以上醛化HRP的pH升高到9.0~9.5,然后立即加入1~2ml含有10~20mg纯化氰戊菊酯抗体(抗QW-PS)的0.01mol/L碳酸盐缓冲液,室温避光轻轻搅拌2~3小时。加0.1~0.2mL新配的4mg/mLNaBH₄液,混匀,再置4 $^{\circ}$ C2~3小时。将反应液装入透析袋中,用0.15mol/LpH7.4 PBS透析,4 $^{\circ}$ C过夜。在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵溶液,置4 $^{\circ}$ C1~2小时。3000rpm离心半小时,弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵溶液洗二次,最后沉淀物溶于少量0.15mol/L pH7.4的PBS中。将上述溶液装入透析袋中,

对 0.15mol/L pH7.4 的 PBS 缓冲盐水透析，去除铵离子后(用萘氏试剂检测)，10,000rpm 离心 30 分钟，上清液即为酶结合物，用等量甘油分装后，分别于-4℃、-20℃保存。经直接 ELISA 法 (E-Ab 法) 测定，效价为 4000。

3) 包被酶标板的制备

包被抗原 (QW-He-OVA) 用 pH9.6, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液 (含 1~2g 碳酸钠和 2~4g 碳酸氢钠, 双蒸水 1L) 稀释成 0.5~4 μg/mL, 在酶标板的每孔加 100 μL, 4℃下包被过夜或 37℃包被 2h, 倾去包被液, 用 PBST 洗涤 3 次, 拍干, 然后在每孔中加入 150 μL 1.0~3.0% 脱脂奶粉, 放入 37℃温箱中 0.4~1 小时后用 PBST 洗涤 3 次, 拍干后干燥保存。

4) 检测样品的前处理:

水样: 过滤后即可取样进行 ELISA 分析。

土样: 取 10g 土壤用 20~40mL 甲醇提取三次, 合并提取液, 浓缩, 然后用 PBST 稀释定容至 10mL, 进行 ELISA 分析。

蔬菜样品: 取蔬菜样品用粉碎机绞碎后称取 10g, 20~40mL 甲醇提取三次, 合并提取液, 浓缩, 用 PBST 定容至 10mL, 取样进行 ELISA 分析。

血液: 取人体血液, 加抗凝素后直接用 ELISA 法进行分析。

实施例 5 氰戊菊酯快速检测酶联免疫试剂盒的使用

试剂盒操作过程如下: 取出一块包被有氰戊菊酯包被抗原酶标板, 恢复到室温后备用; 加入 50μL 标样或处理好的样品到各自孔中, 标样和样品做 2~4 个重复; 加入 50μL 稀释的酶标抗体, 37℃孵育 1~2 小时; 倒出孔中的液体, 将微孔板倒置在吸水纸上拍打, 以保证完全除去孔中的液体, 用 200μL 稀释好的 PBST 洗 2~6 次, 拍干; 底物溶于底物溶液后, 加入新开瓶的双氧水 40μL, 然后每孔加入 100μL 显色液, 轻微振匀, 并在 37℃暗处孵育 15~25 分钟; 加入 50μL 反应终止液, 混合好后, 测定 OD₄₉₀ 值判定结果。

以所获得的标样和样品吸光值的平均值计算各孔的吸光值的抑制率

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min}) - (\text{OD}_x - \text{OD}_{\min})}{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min})} \times 100\%$$

OD_{max} 为不加药时的吸光值, OD_x 为农药 x 时的吸光值, OD_{min} 为空白对照孔的吸光值

计算的标样值绘成为一个对应氰戊菊酯浓度 (mg/L) 的半对数坐标系统曲线图, 校正曲线在 0.01~10mg/L 范围内为线性, 对应样品浓度可从校正曲线读出, 也可根据标样的浓度与抑制率求出线性方程, 然后求出对应样品的浓度。

实施例 6 保存期试验

将试剂盒放置于 4℃和-20℃保存, 分别取 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 和 180d 的试剂盒, 以最佳抗体抗原工作浓度为测定浓度, 进行标准样品检测以测定其检测效果。

保存期测定结果如下表:

表 1 试剂盒保存期试验结果 (不同温度、保存时间下 OD 值变化情况)

Table1 Validity of ELISA kits

时间(d)		0	10	20	30	60	90	120	150	180
温度 (℃)	4	1.076	1.074	1.075	1.072	1.071	1.069	1.065	1.056	1.045
	-20	1.076	1.075	1.074	1.077	1.075	1.073	1.075	1.072	1.070

以上结果可以看出, 试剂盒在 4℃下至少可保存 6 个月以上。

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)	氟戊菊酯人工抗原、抗体及其用途		
公开(公告)号	CN1789283A	公开(公告)日	2006-06-21
申请号	CN200510061971.8	申请日	2005-12-13
[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	朱国念 金仁耀 程敬丽 桂文君 陈则利 金茂俊 王春梅		
发明人	朱国念 金仁耀 程敬丽 桂文君 陈则利 金茂俊 王春梅		
IPC分类号	C07K14/765 C07C235/34 C07K14/77 C07K16/18 G01N33/53		
其他公开文献	CN1331886C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种氟戊菊酯人工抗原，其分子结构式如式(I)其中 $n = 1 \sim 5$ ，是以如式(II)为半抗原，与蛋白质共价偶联合成的；其中半抗原与蛋白质的结合比在 $5:1 \sim 100:1$ 。本发明还公开了上述氟戊菊酯人工抗原免疫白鼠或兔子所得到的、能与氟戊菊酯发生特异性免疫反应的单克隆或多克隆免疫球蛋白G，上述氟戊菊酯特异性抗体能用于检测样品中氟戊菊酯的残留量。本发明还公开了一种适用于氟戊菊酯残留分析的直接和间接竞争酶联免疫吸附测定试剂盒。本发明所得的抗体用于ELISA方法检测氟戊菊酯，最低检测限可达 $4.0 \pm 1.5 \mu\text{g/L}$ (0.004 ppm)，检测灵敏度高。

