



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101870731 B

(45) 授权公告日 2012. 07. 18

(21) 申请号 201010179602. X

(56) 对比文件

(22) 申请日 2010. 05. 21

CN 1269971 A, 2000. 10. 18, 说明书全文.

CN 1969630 A, 2007. 05. 30, 说明书全文.

(73) 专利权人 江苏省农业科学院

地址 210014 江苏省南京市玄武区钟灵街  
50 号

审查员 唐华东

(72) 发明人 张存政 刘贤进 杨春龙 陈敏  
俞杰

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限  
公司 32200

代理人 孙忠浩

(51) Int. Cl.

C07K 16/44 (2006. 01)

C07K 16/06 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

C07F 9/24 (2006. 01)

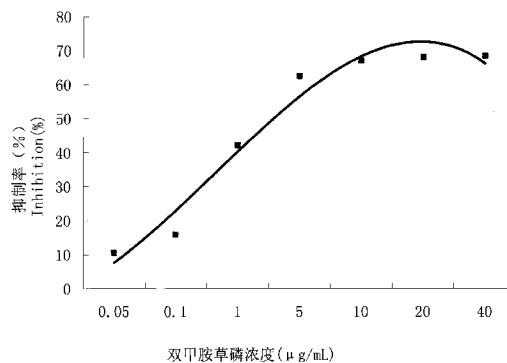
权利要求书 3 页 说明书 6 页 附图 6 页

(54) 发明名称

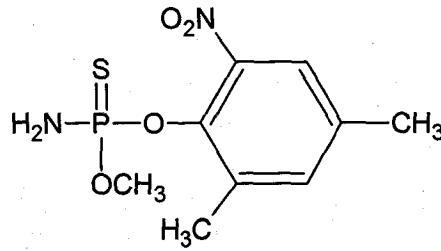
双甲胺草磷 (H-9201) 的多克隆抗体及其制  
备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及一种双甲胺草磷 (H-9201) 的多  
克隆抗体及其制备方法和应用, 多克隆抗体是由  
半抗原与牛血清白蛋白 BSA 偶联获得免疫抗原,  
免疫新西兰大白兔后获得, 其特征在于: 半抗原  
为设计合成的分子结构式 (4) 的双甲胺草磷过  
渡态类似化合物, 并引入羧基制备半抗原; 其次,  
采用活性酯法将半抗原与载体蛋白偶联获得完  
全抗原; 经动物免疫获得多克隆抗体, 建立了  
ELISA 检测方法, 本发明可对水体样本中双  
甲胺草磷 (H-9201) 农药残留进行检测。其  
优点是: 双甲胺草磷 (H-9201) 的多克隆抗  
体的制备可以用于水体中的双甲胺草磷 (H-  
9201) 农药残留进行快速, 大量样本的筛  
查。



1. 一种双甲胺草磷 (H-9201) 的多克隆抗体, 由半抗原与牛血清白蛋白 BSA 偶联获得免疫抗原, 免疫新西兰大白兔后获得, 其特征在于: 半抗原是由双甲胺草磷过渡态类似化合物引入羧基制备, 所述双甲胺草磷过渡态类似化合物为分子结构式 (4),

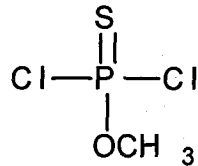


(4)

其化学名称为: 0-甲基-0-(2,4-二甲基-6-硝基苯氧基)-氨基硫代磷酰胺酯, 分子量为: 276.249;

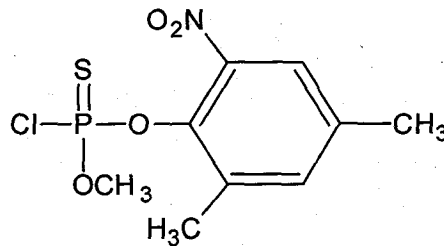
所述的双甲胺草磷过渡态类似化合物是这样合成的:

1) 以三氯硫磷与甲醇为原料, 溶液温度控制在  $-5^{\circ}\text{C}$  以下进行反应, 冰水洗涤溶液留取下层, 得到甲氧基硫代磷酰二氯, 为分子结构式 (6):



(6)

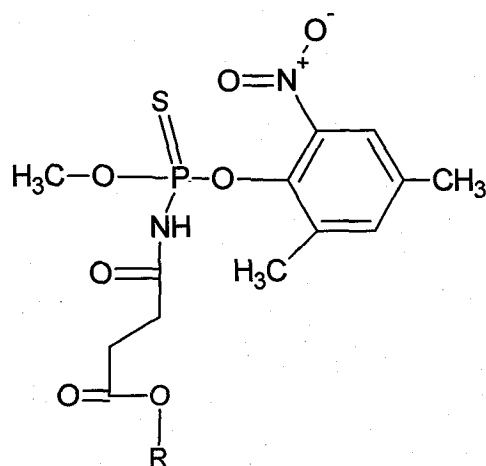
2) 在  $5 \sim 10^{\circ}\text{C}$  丙酮溶液温控条件下, 以三乙胺为催化剂, 甲氧基硫代磷酰二氯与 2,4-二甲基-6-硝基苯酚 (DMNT), 氢氧化钠 (NaOH) 反应获得含有分子结构式 (5) 化合物的丙酮溶液,



(5)

3) 在  $5 \sim 10^{\circ}\text{C}$  溶液温控条件下, 向预冷的含有分子结构式 (5) 化合物的丙酮溶液中滴加氨水, 以氢氧化钠调节溶液 pH 为 10 进行反应, 得到双甲胺草磷过渡态类似化合物, 分子结构式 (4);

适合动物免疫的半抗原-载体蛋白偶联物为分子结构式 (1),

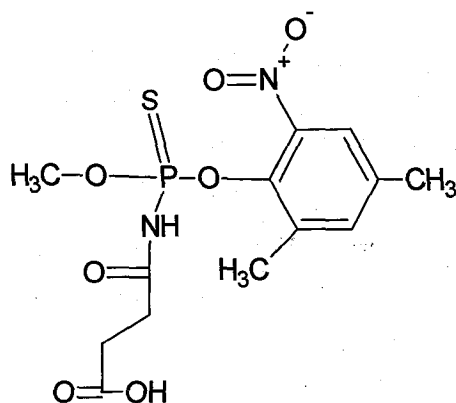


(1)

其中, R 为 BSA 或 OVA。

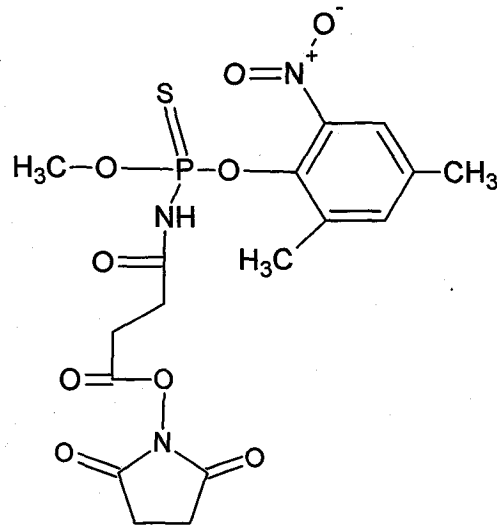
2. 一种如权利要求 1 所述双甲胺草磷 (H-9201) 的多克隆抗体的制备方法, 其特征在于:

a) 以 4-二甲氨基吡啶 (DMAP) 为催化剂, 使所述分子结构式 (4) 的双甲胺草磷过渡态类似化合物与琥珀酸酐 (Succinic anhydride) 在 50°C 温控乙腈溶液中反应, 获得分子结构式 (3) 的化合物, 形成半抗原,



(3)

b) 在温控为 0°C 的除水的二氯甲烷溶液中, 以 DMAP 为催化剂的条件下, 分子结构式 (3) 的化合物与 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS), N, N'-二环己基碳二亚胺 (DCC) 反应过夜, 获得溶有分子结构式 (2) 的化合物活化酯,



(2)

c) 以 pH 为 9 的溶有牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液与溶有分子结构式 (2) 的化合物活化酯的 DMF 溶液在 4℃ 温度条件下反应过夜, 获得含有分子结构式 (1) 的半抗原 - 载体蛋白偶联物的反应混合液;

d) 将含有半抗原 - 载体蛋白偶联物的反应混合液装入透析袋中, 在去离子水中 4℃ 透析 3 天, 每 8 小时换水一次, 透析结束后获得免疫抗原;

e) 再将免疫抗原用于免疫新西兰大白兔, 获得双甲胺草磷的多克隆抗体。

3. 根据权利要求 2 所述的双甲胺草磷 (H-9201) 的多克隆抗体的制备方法, 其特征在于: 免疫新西兰大白兔前, d 步骤获得的免疫抗原应该分装保存于 -20℃ 冰箱中备用。

4. 一种如权利要求 1 所述双甲胺草磷 (H-9201) 的多克隆抗体的应用, 其特征在于: 将多克隆抗体建立的间接竞争性 ELISA 法对水样中双甲胺草磷 (H-9201) 农药的残留进行检测, 检测中使用的包被抗原是这样获得的:

在权利要求 2 所述多克隆抗体的制备方法的 a ~ b 步骤的基础上, 以 pH 为 9 的溶有卵清蛋白 OVA 的磷酸盐缓冲液, 与溶有分子结构式 (2) 的化合物活化酯的 DMF 溶液在 4℃ 温度条件下反应过夜, 获得含有分子结构式 (1) 的半抗原 - 载体蛋白偶联物的反应混合液;

将含有半抗原 - 载体蛋白偶联物的反应混合液装入透析袋中, 在去离子水中 4℃ 透析 3 天, 每 8 小时换水一次, 透析结束后获得包被抗原。

5. 根据权利要求 4 所述双甲胺草磷 (H-9201) 的多克隆抗体的应用, 其特征在于: 多克隆抗体采用间接竞争性 ELISA 法对水样中双甲胺草磷 (H-9201) 农药的残留进行检测是指: 将被测水样经简单过滤净化处理、提取后制备得到 ELISA 待测液, 然后利用间接竞争性 ELISA 法进行检测, 计算得出待测样品中的双甲胺草磷 (H-9201) 含量。

## 双甲胺草磷 (H-9201) 的多克隆抗体及其制备方法和应用

### 技术领域：

[0001] 本发明涉及一种双甲胺草磷 (H-9201) 多克隆抗体的制备方法及其应用。

### 背景技术：

[0002] 双甲胺草磷 (H-9201) 是由我国自主研发的,具有独立知识产权的一种新型农用除草剂,该化合物是利用活性与构效关系 (QSAR) 预测了其活性,并合成的新化合物,其化学名称为:0-甲基-0-(2,4-二甲基-6-硝基苯氧基)-N-异丙基硫代磷酰胺酯,分子量为 318.5,是一种硫化磷酰胺酯类化合物,商品名为双甲胺草磷。该化合物是一种内吸传导型选择性土壤处理水旱两用除草剂,可用于大豆、水稻、小麦、玉米、蔬菜等作物,防除多种一年生单、双子叶杂草,杀草谱广,且可与多种除草剂品种复配,田间药效试验未发现对后茬作物生长的影响,是一种具有广泛应用价值的新型除草剂品种。

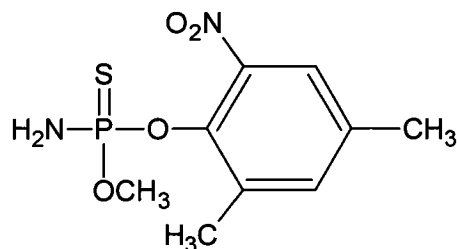
[0003] 目前对双甲胺草磷 (H-9201) 残留检测的研究报道仅见气相色谱法 (参见张存政,张志勇,刘媛,王冬兰,刘贤进. 新型除草剂双甲胺草磷 (H-9201) 在胡萝卜和土壤中的残留动态研究. 分析科学学报,2007,23(3):337-339.),有关双甲胺草磷 (H-9201) 的抗体制备以及免疫分析法及其在残留检测中的应用,国内外均未见文献报道。

### 发明内容：

[0004] 本发明的目的在于:针对目前双甲胺草磷 (H-9201) 抗体匮乏,提供一种半抗原为设计合成的结构为分子式 (4) 的双甲胺草磷过渡态类似化合物的双甲胺草磷 (H-9201) 的多克隆抗体及其制备方法和应用。

[0005] 本发明的目的是这样实现的:一种双甲胺草磷 (H-9201) 的多克隆抗体,由半抗原与牛血清白蛋白 BSA 偶联获得免疫抗原,免疫新西兰大白兔后获得,其特征在于:半抗原是由的双甲胺草磷过渡态类似化合物引入羧基制备,所述双甲胺草磷过渡态类似化合物为分子结构式 (4),

[0006]

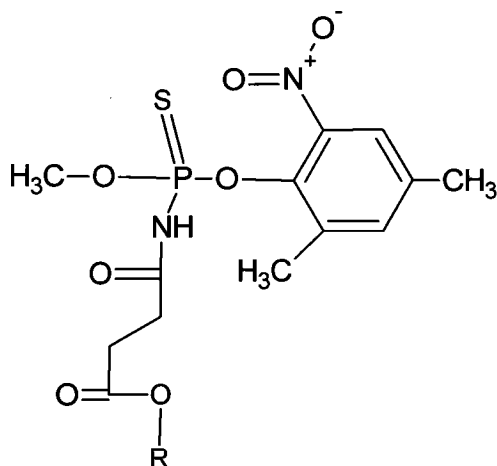


(4)

[0007] 化学名称为:0-甲基-0-(2,4-二甲基-6-硝基苯氧基)-氨基硫代磷酰胺酯,分子量为:276.249。

[0008] 在双甲胺草磷 (H-9201) 的多克隆抗体中,适合动物免疫的半抗原-载体蛋白偶联物的结构为分子式 (1),

[0009]

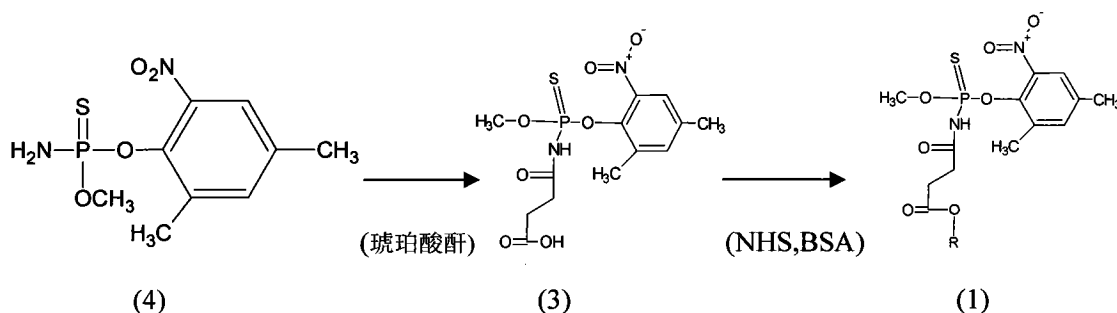


(1)

[0010] 其中, R 为 BSA 或 OVA。

[0011] 它是设计合成的双甲胺草磷过渡态类似化合物为半抗原,以琥珀酸酐为桥梁,使一个羧基与半抗原的氨基联结,继而以活性酯法使之与载体蛋白偶联后获得的:

[0012]



[0013] 上述设计合成的双甲胺草磷过渡态类似化合物的合成具体步骤如下:

[0014] (1) 分子结构式 (6) 的甲氧基硫代磷酰二氯的合成

[0015] 三氯硫磷预冷后,缓慢滴加甲醇,溶液温度控制在  $-5^{\circ}\text{C}$  以下,三氯硫磷:甲醇的克分子比 1 : 5。甲醇滴加完毕后,持续搅拌 15min。冰水洗涤溶液。分层后,取下层,获得甲氧基硫代磷酰二氯,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存,分子结构式 (6)。

[0016] (2) 分子结构式 (5) 化合物的合成

[0017] 将 30ml 甲氧基硫代磷酰二氯、DMNT 的丙酮混合液预冷至  $5 \sim 10^{\circ}\text{C}$ ,滴加三乙胺催化反应,监测 pH 约为 6;将 20%氢氧化钠水溶液,滴加到反应液当中,滴加完后 pH 约为 12;反应体系中甲氧基硫代磷酰二氯: DMNT : NaOH 的克分子比为 1 : 1 : 1.1。反应溶液抽滤除去盐酸盐后保存滤液,获得含有结构为分子式 (5) 化合物的丙酮溶液。

[0018] (3) 分子结构式 (4) 的双甲胺草磷过渡态类似化合物的合成

[0019] 将含有为分子结构式 (5) 化合物的丙酮溶液预冷至  $5 \sim 10^{\circ}\text{C}$ ,向其中滴加氨水。氨水滴加完后 pH 约为 8,滴加 40%的氢氧化钠水溶液至 PH 为 10,脱去丙酮,加入 30mL 乙醚分两次萃取,水洗涤乙醚层,经无水硫酸镁干燥后,脱去乙醚。柱层析分离,取中间的组分,脱去溶剂,获得双甲胺草磷过渡态类似化合物,为分子结构式 (4)。

[0020] 上述双甲胺草磷 (H-9201) 的多克隆抗体的制备,其特征在于:用活性酯法使半抗

原与牛血清白蛋白偶联,合成免疫抗原,再将免疫抗原用于免疫新西兰大白兔,获得双甲胺草磷(H-9201)的多克隆抗体。

[0021] 在双甲胺草磷(H-9201)的多克隆抗体的制备中:活性酯法合成免疫抗原的步骤是:

[0022] 0.5mM的双甲胺草磷过渡态类似化合物与0.8mM的琥珀酸酐乙腈溶液共10ml充分混匀,滴加0.5mM DMAP乙腈溶液,50℃搅拌反应2小时;终止反应后加入50ml蒸馏水,用二氯甲烷萃取,有机相经无水硫酸镁除水后,脱去有机溶剂,获得分子结构式(3)的化合物,形成半抗原;向0.3mM分子结构式(3)化合物的二氯甲烷溶液中加入DMF溶解的0.23mM的NHS,0.33mM的DCC,0.033mM的DMAP,0℃搅拌反应过夜;次日10000g离心10min,弃去沉淀,脱去溶剂,以DMF溶解所得活化酯,分子结构式(2),将活化酯溶液缓慢加入到5mL预冷的含有40mg牛血清白蛋白BSA的磷酸盐缓冲液中,磷酸盐缓冲液的pH为9.0,4℃反应过夜;

[0023] 将反应混合液装入透析袋中,在去离子水中4℃透析3天,每8小时换水一次,透析结束后获得适合动物免疫的免疫抗原,如分子结构式(1),将它们分装-20℃保存中备用;

[0024] 将免疫抗原用于免疫新西兰大白兔,获得双甲胺草磷的多克隆抗体。

[0025] 上述双甲胺草磷(H-9201)的多克隆抗体的应用,其特征在于:将所述多克隆抗体采用间接竞争性ELISA法对水体中双甲胺草磷(H-9201)的残留进行检测,检测中使用的包被抗原为半抗原通过活性酯法与卵清蛋白OVA的偶联物。

[0026] 在双甲胺草磷(H-9201)的多克隆抗体的应用中:活性酯法合成包被抗原的步骤同前述与免疫抗原的BSA的合成过程,其区别仅在于在磷酸盐缓冲液中用卵清蛋白OVA替代牛血清白蛋白BSA;

[0027] 在双甲胺草磷(H-9201)的多克隆抗体的应用中:多克隆抗体采用间接竞争性ELISA法对水体中双甲胺草磷(H-9201)的残留进行检测是指:将被测样品提取、净化后制备得到ELISA待测液,然后利用间接竞争性ELISA法进行检测,最后通过标准曲线计算出待测样品中的双甲胺草磷(H-9201)含量。

[0028] 本发明的优点在于:双甲胺草磷(H-9201)的多克隆抗体的制备方法简单,可以用于对样本中的双甲胺草磷(H-9201)农药残留进行快速检测,适合大量样品快速筛查检测。

#### 附图说明

[0029] 图1是双甲胺草磷过渡态类似化合物的核磁共振图(NMR);

[0030] 图2是图1的局部放大图;

[0031] 图3是双甲胺草磷过渡态类似化合物的液相色谱-质谱图(LC/MS),其中a是化合物总离子流图,b是该化合物的多级质谱图;

[0032] 图4是分子结构式(3)的化合物的液相色谱/质谱图(LC/MS);

[0033] 图5是双甲胺草磷(H-9201)半抗原(hapten)、BSA及偶联物(hap-bsa)的紫外扫描图谱;

[0034] 图6是双甲胺草磷(H-9201)半抗原(hapten)、OVA及偶联物(hap-ova)的紫外扫描图谱;

[0035] 图7是间接竞争ELISA法建立的双甲胺草磷(H-9201)检测标准抑制曲线。

## 具体实施方式

[0036] 通过下述实施实例结合附图有助于进一步理解本发明,但并不限制本发明的内容。

[0037] 实施例 1. 双甲胺草磷过渡态类似化合物的制备

[0038] 以三氯硫磷与甲醇为原料,溶液温度控制在  $-5^{\circ}\text{C}$  以下进行反应,冰水洗涤溶液留取下层,得到甲氧基硫代磷酰二氯。

[0039] 在  $5 \sim 10^{\circ}\text{C}$  丙酮溶液温控条件下,以三乙胺为催化剂,甲氧基硫代磷酰)与 2,4-二甲基-6-硝基苯酚(DMNT),氢氧化钠(NaOH)反应获得含有分子结构式(5)化合物的丙酮溶液。

[0040] 将含有分子结构式(5)的化合物溶液预冷至  $5 \sim 10^{\circ}\text{C}$ ,向其中滴加氨水。氨水滴加完后 pH 约为 8,滴加 40% 的氢氧化钠水溶液至 PH 为 10,脱去丙酮,加入 30mL 乙醚分两次萃取,水洗涤乙醚层,经无水硫酸镁干燥后,脱去乙醚。柱层析分离,取中间的组分,脱去溶剂,获得双甲胺草磷过渡态类似化合物;TLC 监控反应出现新的产物斑点(展开剂:石油醚:乙酸乙酯=4:1);经 NMR, LC/MS 鉴定结构与分子量正确,产率为 78%。见图 1~图 3。

[0041] 产物的  $^1\text{H}$  NMR 数据:2.77(t,  $J = 7.2$ , 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 2.04(s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.34(s, 3H,  $\text{PhCH}_3$ ), 2.44(s, 3H,  $\text{PhCH}_3$ ), 3.70(bd, 3H,  $\text{NH}_2$ ), 3.77, 3.80(ss, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.09(q,  $J = 7.1$ , 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 7.27(s, 1H,  $\text{PhH}$ ), 7.51(s, 1H,  $\text{PhH}$ )

[0042] 实施例 2. 分子结构式(3)的化合物的制备

[0043] 0.5mM 的双甲胺草磷过渡态类似化合物与 0.8mM 的琥珀酸酐乙腈溶液共 10ml 充分混匀,滴加 0.5mM DMAP 乙腈溶液,  $50^{\circ}\text{C}$  搅拌反应 2 小时;终止反应后加入 50ml 蒸馏水,用二氯甲烷萃取,有机相经无水硫酸镁除水后,脱去有机溶剂,获得分子结构式(3)的化合物。其液相色谱/质谱鉴定图(LC/MS)见图 4。

[0044] 实施例 3. 抗原的合成

[0045] 向含有 0.3mM 分子结构式(3)化合物的二氯甲烷溶液中加入 0.23mM 的 NHS, 0.33mM 的 DCC, 0.033mM 的 DMAP,  $0^{\circ}\text{C}$  搅拌反应过夜;次日 10000g 离心 10min, 弃去沉淀,脱去溶剂,以 DMF 溶解所得活化酯,将活化酯溶液缓慢加入到 5mL 预冷的含有 40mg 牛血清白蛋白 BSA 的磷酸盐缓冲液中,磷酸盐缓冲液的 pH 为 9.0,  $4^{\circ}\text{C}$  反应过夜;

[0046] 反应结束后,将反应混合液装入透析袋中,在去离子水中  $4^{\circ}\text{C}$  透析 3 天,每 8 小时换水一次,透析结束后获得分子结构式(1)的免疫抗原,分装并保存于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。如图 5 图 6 所示的紫外扫描图谱可见,半抗原(hapten)、载体蛋白(BSA 或 OVA)的最大吸收峰分别为 260nm 和 278nm,而偶联物(hap-bsa 或 hap-ova)的最大吸收峰介于 260nm ~ 278nm 之间,初步证明偶联成功。在图 5 中,由上至下分别为半抗原,BSA,偶联物;在图 6 中,由上至下分别为半抗原,偶联物,OVA。

[0047] 实施例 4. 双甲胺草磷(H-9201)多克隆抗体的制备

[0048] 用合成的偶联物作为免疫抗原 Hapten-BSA,选取 2 只 1.5 ~ 2.0kg 的纯种新西兰大白兔作为试验动物,进行皮下多点注射免疫,试验前一周采集阴性血清。首次免疫采用 1mg 免疫原与弗氏完全佐剂等体积混和,背部皮下多点注射。三周后用同样剂量免疫原与等

体积不完全弗氏佐剂进行加强免疫,每两周加强 1 次,共加强 4 次。最后一次免疫用 2mg 免疫原与等体积的生理盐水混合,耳缘静脉注射。七天后心脏采血,血液 4℃ 放置过夜,凝结后吸取清,40% 饱和硫酸铵溶液沉淀,离心去上清,沉淀用 PH7.4 的磷酸缓冲液溶解,超滤管脱盐纯化血清后,即得多克隆抗体。

[0049] 实施例 5 间接非竞争 ELISA 法测定抗体的滴度及工作浓度

[0050] (1) 工作浓度的确定

[0051] 方阵滴定法确定抗体及包被抗原的工作浓度。选择 OD 值为 1.0 时的抗原抗体稀释浓度作为包被抗原浓度、抗体工作浓度,最终选择的包被抗原稀释倍数为 1/512 (以蛋白计,包被抗原实际浓度为 2.3 μg/mL),抗体的工作浓度为 1/18,000。具体操作步骤如下:

[0052] ①包被: CBS 包被缓冲液将包被抗原倍比稀释  $2^n$  ( $n = 7, 8, 9, 10$ ) 4 组,分别加于 96 孔酶标微孔板的 A 和 B、C 和 D、E 和 F、G 和 H 的四组八行中,100 μL/孔,4℃ 过夜。

[0053] ②封闭: 每孔加 1% OVA 封闭液 200 μL,37℃ 孵育 1h。

[0054] ③加样: 将倍比稀释的六组抗体分别加于酶标板的 1 和 2、3 和 4、5 和 6、7 和 8、9 和 10、11 和 12 的六组十二列孔中,100 μL/孔,以阴性血清作对照,PBS 溶液为空白,37℃ 孵育 2h。

[0055] ④加酶标二抗: 用含 1% OVA 的 PBS 溶液稀释酶标二抗到工作浓度,100 μL/孔加入酶标板,37℃ 孵育 1h。

[0056] (以上每一步结束都用 PBST 洗涤液洗 3 次)

[0057] ⑤显色: 将底物溶液加到酶标板上,100 μL/孔,37℃ 显色 15min。

[0058] ⑥终止反应: 将 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 快速加到 96 孔中,50 μL/孔,450nm 读取光吸收值。

[0059] (2) 效价的测定

[0060] 用方阵滴定法确定的包被原工作浓度包被 96 孔酶标微孔板,将抗血清(阳性血清)和阴性血清进行倍比稀释,以 PBS 溶液作为空白对照,用间接非竞争 ELISA 法测定抗体效价,具体步骤按照以下步骤进行。以 A 阳/A 阴 > 2.1 的最大稀释倍数作为抗体的最终效价。抗体计算获得的最终效价为 1/102,400。具体操作步骤如下:

[0061] ①包被: CBS 包被缓冲液将 2 μg/ml 包被原倍加入 96 孔酶标微孔板中,100 μL/孔,4℃ 过夜。

[0062] ②封闭: 每孔加 1% OVA 封闭液 200 μL,37℃ 孵育 1h。

[0063] ③加样: 将倍比稀释  $1000 \times 2^n$  ( $n = 7, 8, 9, 10, 11, 12$ ) 的六组抗体分别加于酶标板的 1 和 2、3 和 4、5 和 6、7 和 8、9 和 10、11 和 12 的六组十二列孔中,100 μL/孔,以阴性血清作对照,PBS 溶液为空白,37℃ 孵育 2h。

[0064] ④加酶标二抗: 用含 1% OVA 的 PBS 溶液稀释酶标二抗到工作浓度,100 μL/孔加入酶标板,37℃ 孵育 1h。

[0065] (以上每一步结束都用 PBST 洗涤液洗 3 次)

[0066] ⑤显色: 将底物溶液加到酶标板上,100 μL/孔,37℃ 显色 15min。

[0067] ⑥终止反应: 将 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 快速加到 96 孔中,50 μL/孔,450nm 读取光吸收值。

[0068] 当光吸收值低于 0.2 时为阴性血清;当光吸收值高于 0.2 时为阳性血清。

[0069] 实施例 6. 间接竞争 ELISA(IC-ELISA) 的建立

[0070] 具体步骤如下:

[0071] (1) 抗体与标样(待测样)预混:用含有 10% (v/v) 甲醇的 PBS 缓冲液配置不同浓度的双甲胺草磷(H-9201)标样,浓度分别为 0.05  $\mu\text{g/ml}$ , 0.1  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$ 。用 PBS 将抗体稀释 9000 倍(两倍工作浓度),再与等体积的标样(待测样品)室温预混进行前抑制,对照用 PBS 与抗体等体积预混,过夜。

[0072] (2) 包被:PBS 缓冲液将 2 $\mu\text{g/ml}$  包被抗原,100  $\mu\text{L}$ /孔分别加入酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$  过夜。

[0073] (3) 封闭:每孔加封闭液 200  $\mu\text{L}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$  温浴 1h。

[0074] (4) 加样品:将预混液加入酶标板,100  $\mu\text{L}$ /孔,以 PBS 为空白对照,37 $^{\circ}\text{C}$  温浴 2h。

[0075] (5) 加酶标二抗:用含 1% OVA 的 PBS 将酶标二抗稀释到工作浓度加入酶标板,100  $\mu\text{L}$ /孔,37 $^{\circ}\text{C}$  温浴 1h。

[0076] (以上每一步结束都用洗涤液 PBST 洗 3 次)

[0077] (6) 显色:将底物溶液加到酶标板上,100  $\mu\text{L}$ /孔,37 $^{\circ}\text{C}$  显色 15min。

[0078] (7) 终止反应:50  $\mu\text{L}$ /孔 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  快速加到 96 孔酶标板中,于 450nm 读取光吸收值。

[0079] 将不同浓度双甲胺草磷(H-9201)标样对应的吸光值(OD)结果,按照公式抑制率(I) = 100[(OD 对照 - OD 标样)/OD 对照],计算抑制率(I)。以抑制率为纵坐标,标样浓度(C)为横坐标绘制标准抑制曲线。建立双甲胺草磷(H-9201)的标准抑制曲线(如图 5 所示),并对线性范围进行回归分析。计算得到,双甲胺草磷(H-9201)对抗体的抑制中浓度( $I_{50}$ )为 1.554  $\mu\text{g/mL}$ ,双甲胺草磷(H-9201)最低检测限  $I_{10}$  为 0.0945  $\mu\text{g/mL}$ ,线性检测范围在 0.1524 ~ 12.4135  $\mu\text{g/mL}$ 。见图 8。

[0080] 实施例 7. 本发明对水体中双甲胺草磷(H-9201)农药残留的检测

[0081] 具体操作如下:

[0082] (1) 样品提取:采集田间无污染的水沉淀杂质,过 0.45 $\mu\text{m}$  微孔滤膜后备用,分别取 10ml 水样,添加双甲胺草磷(H-9201)标样(用含有 10% 甲醇(v/v)的 PBS 溶液配置),使得样品中双甲胺草磷(H-9201)的含量分别为 1mg/kg、2mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg 五个水平,第六组添加甲醇作为空白对照,每组重得 4 次,室温下放置 2 小时。水样中加入 2g NaCl,3ml X 3 正己烷提取,合并提取液后,氮气浓缩至干,用 PBST 缓冲液稀释至检测浓度范围,进行 ELISA 检测。

[0083] (2) ELISA 检测方法

[0084] 用间接竞争性 ELISA 方法测定,将添加样品的提取液与等体积抗体预混两小时,根据实施例 6 的步骤进行间接竞争性 ELISA 测定,计算水体中双甲胺草磷(H-9201)的残留量及添加回收率及变异系数。

[0085] 结果表明,当水体中双甲胺草磷(H-9201)浓度在 1mg/kg-20mg/kg 的范围内,添加回收率为 72.5 $\pm$ 5.5% ~ 85.2 $\pm$ 4.3%。

[0086] 以上各实施例不是对本发明的具体限定。

zcz-0710 H1-NMR CDCl3 303K AV-500

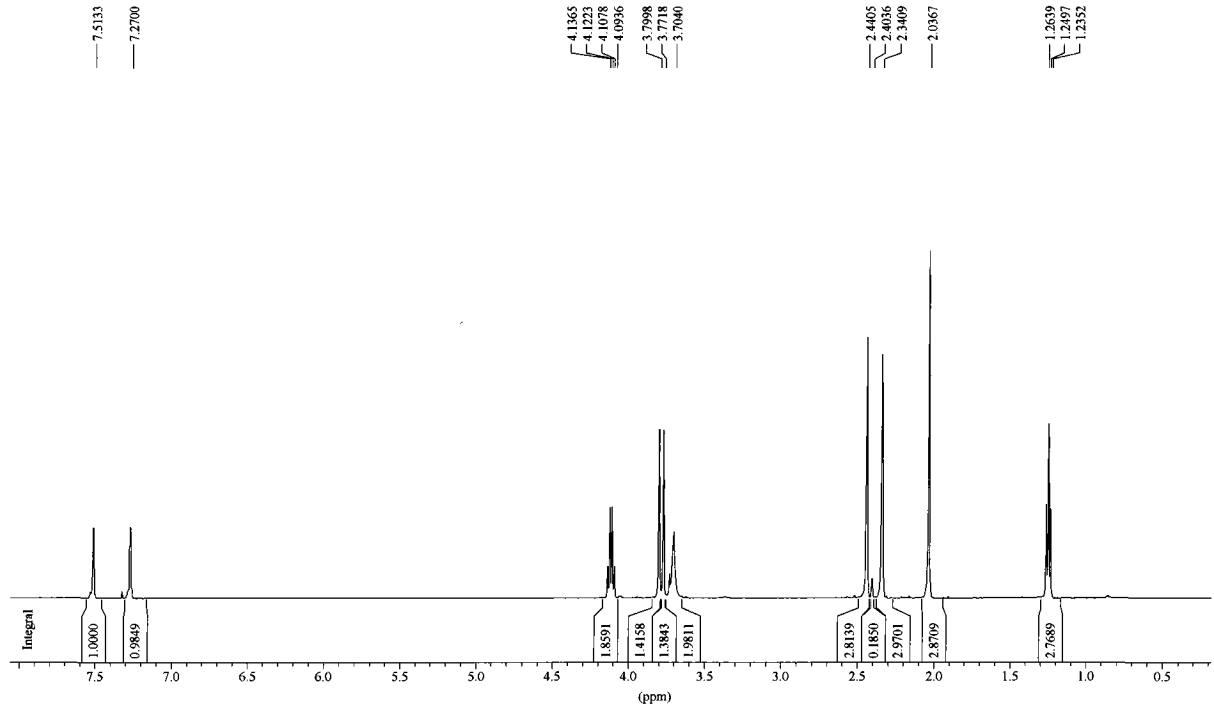


图 1

zcz-0710 H1-NMR CDCl3 303K AV-500

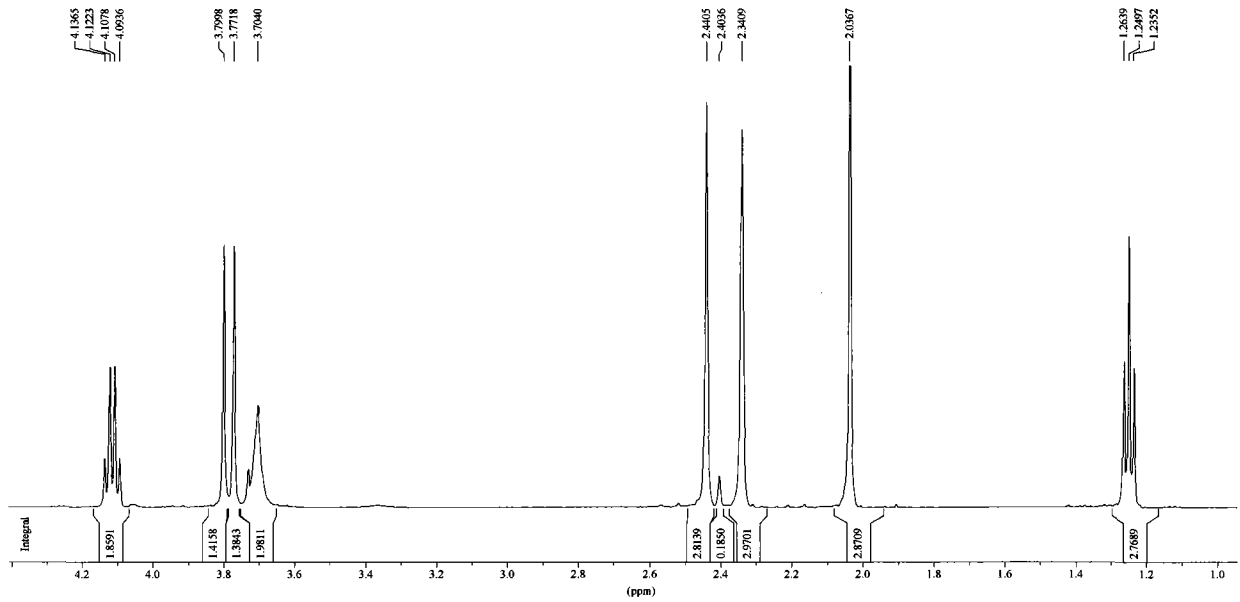


图 2

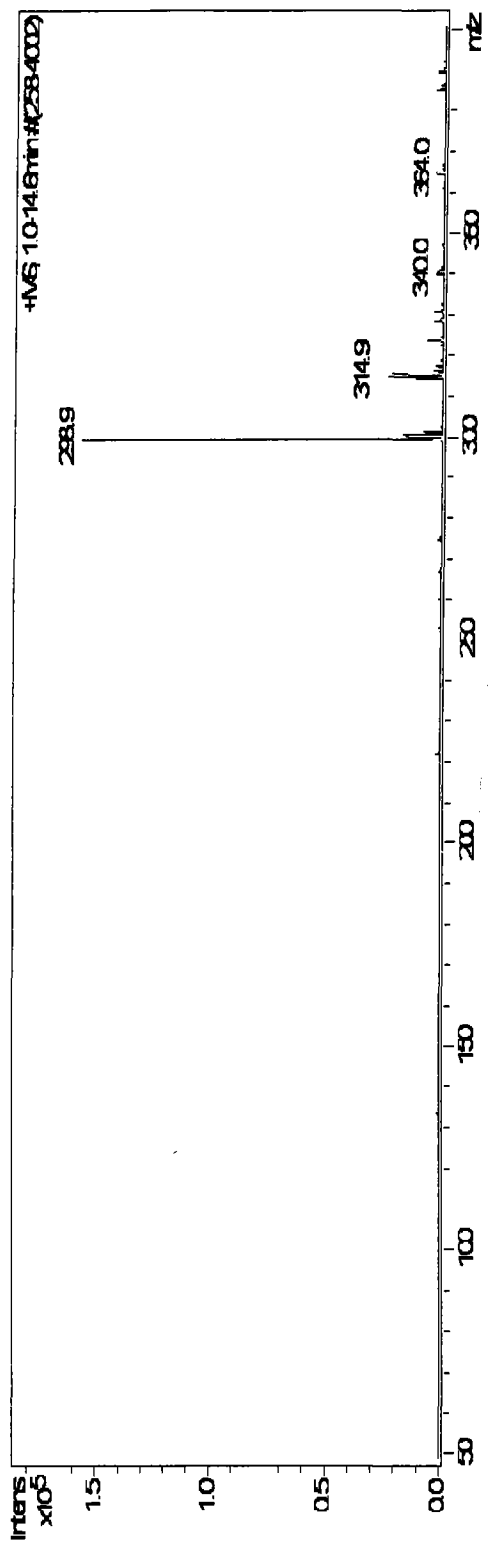


图 3(a)

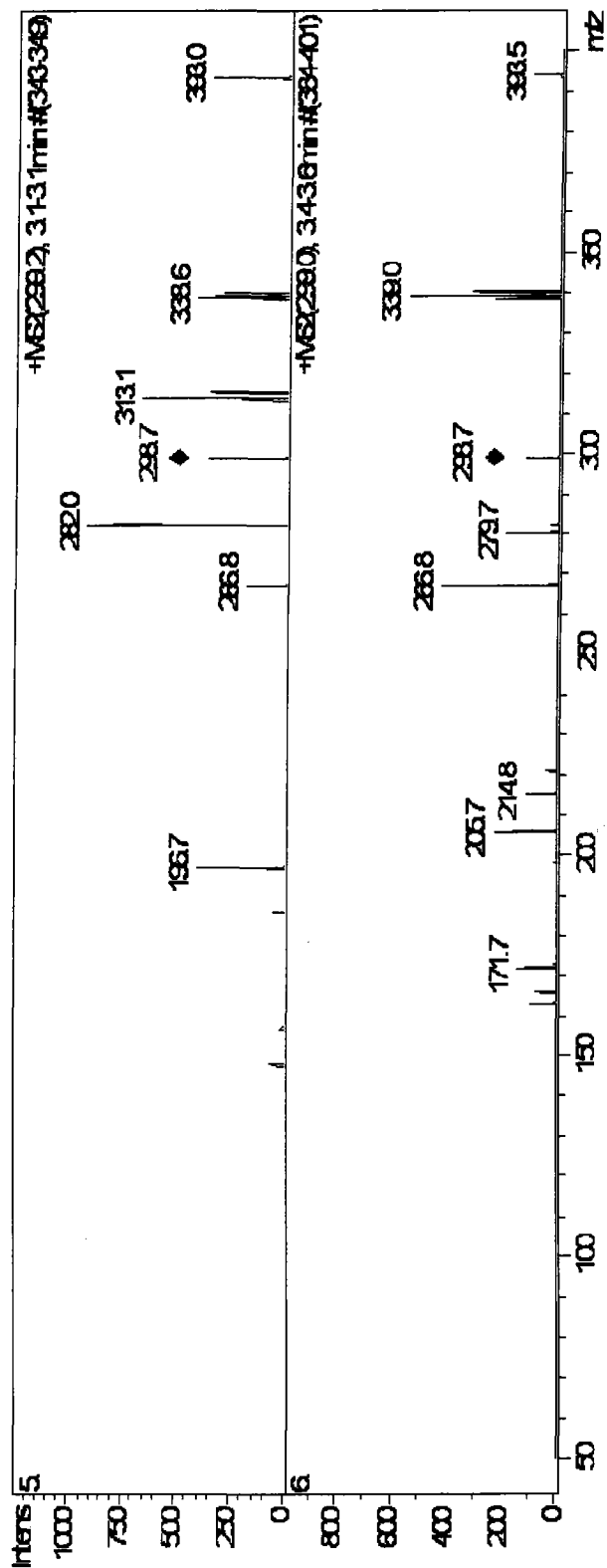


图 3(b)

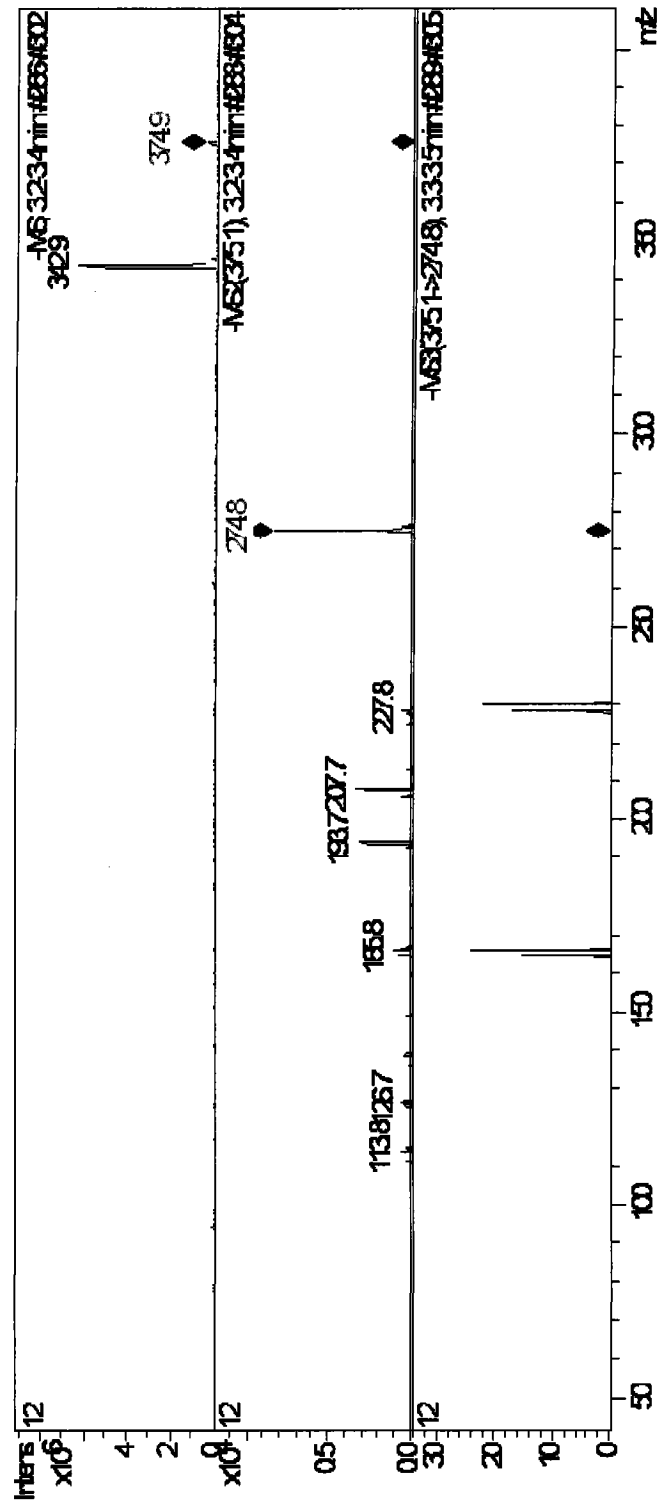


图 4

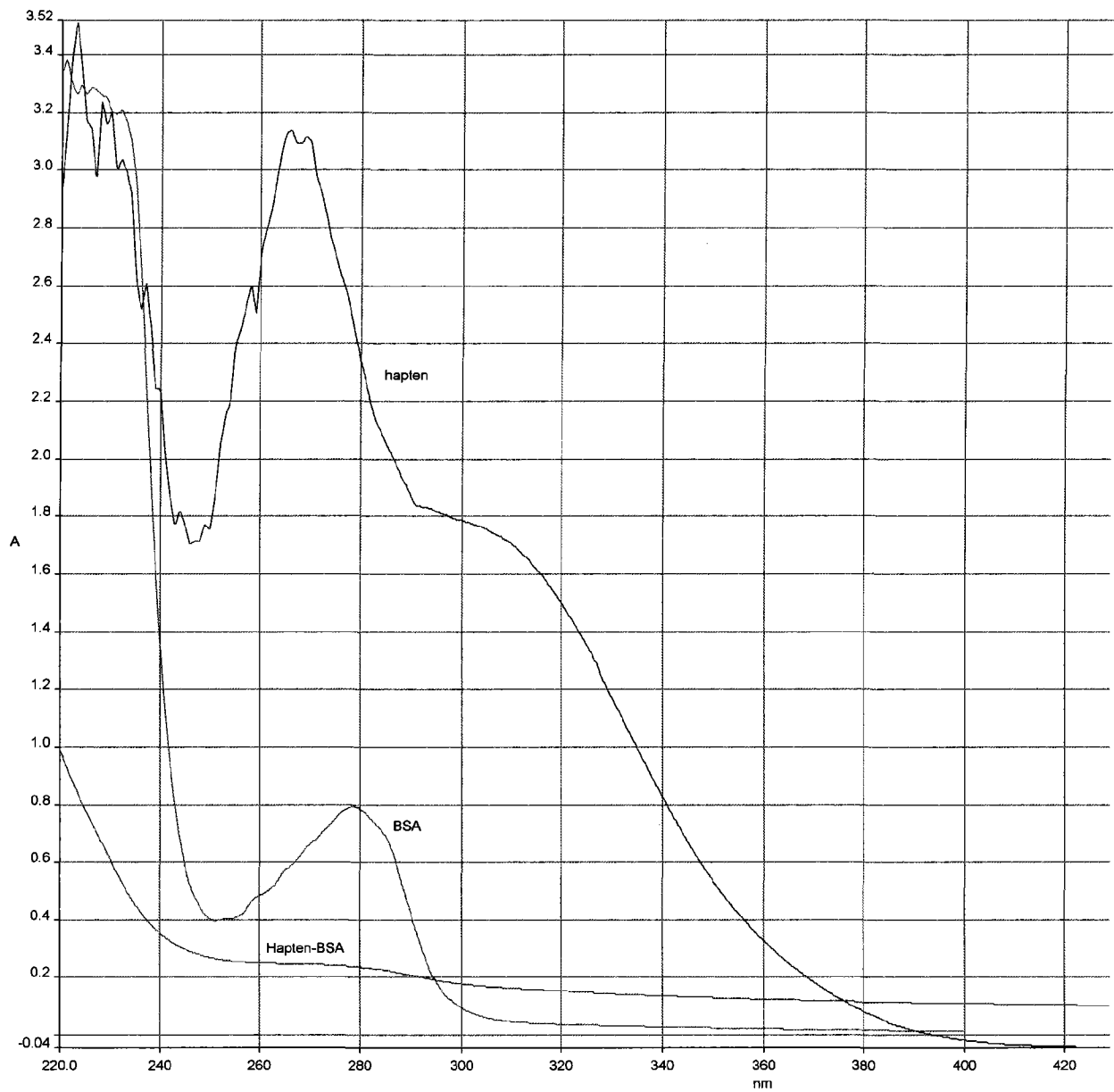


图 5

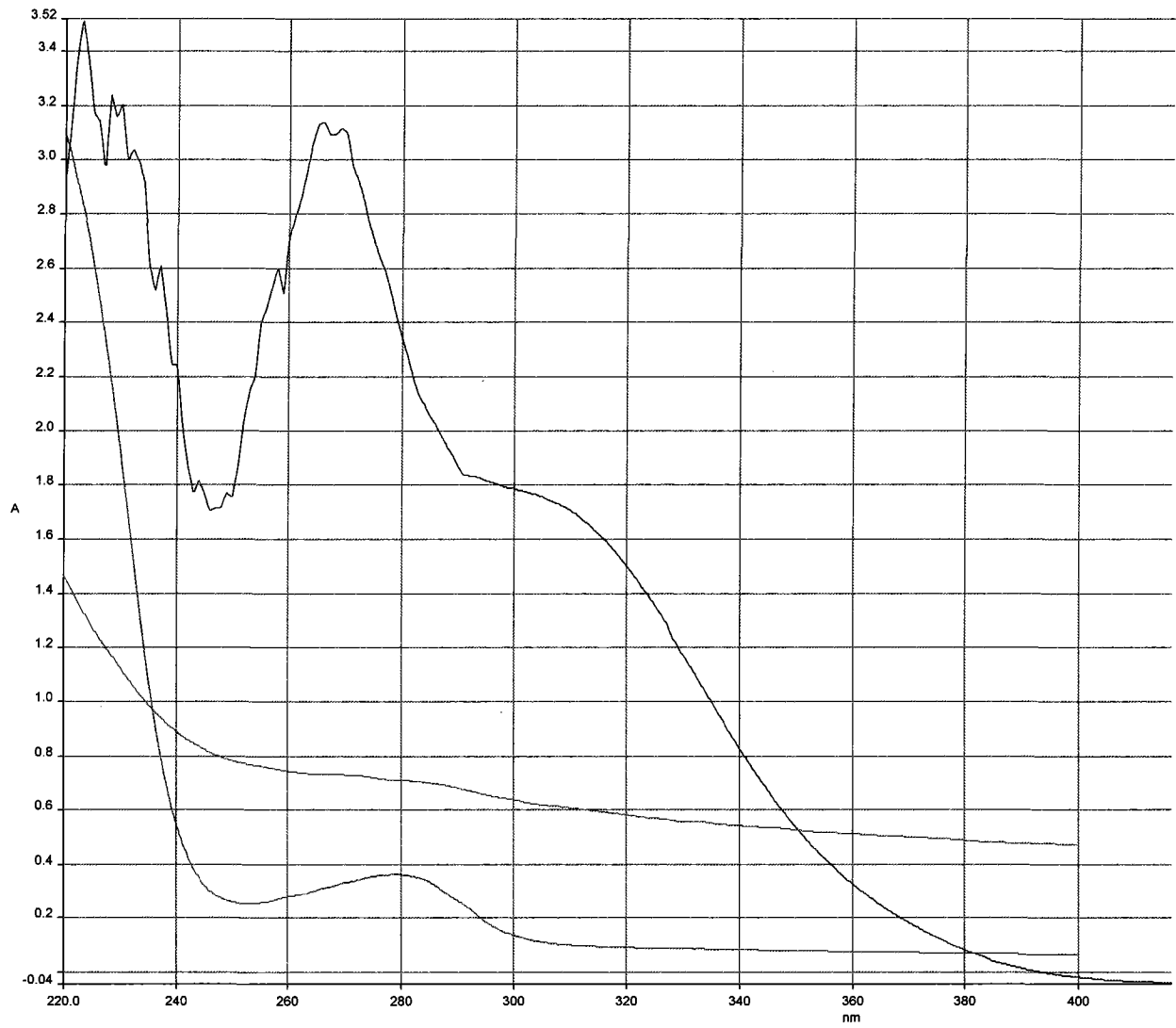


图 6

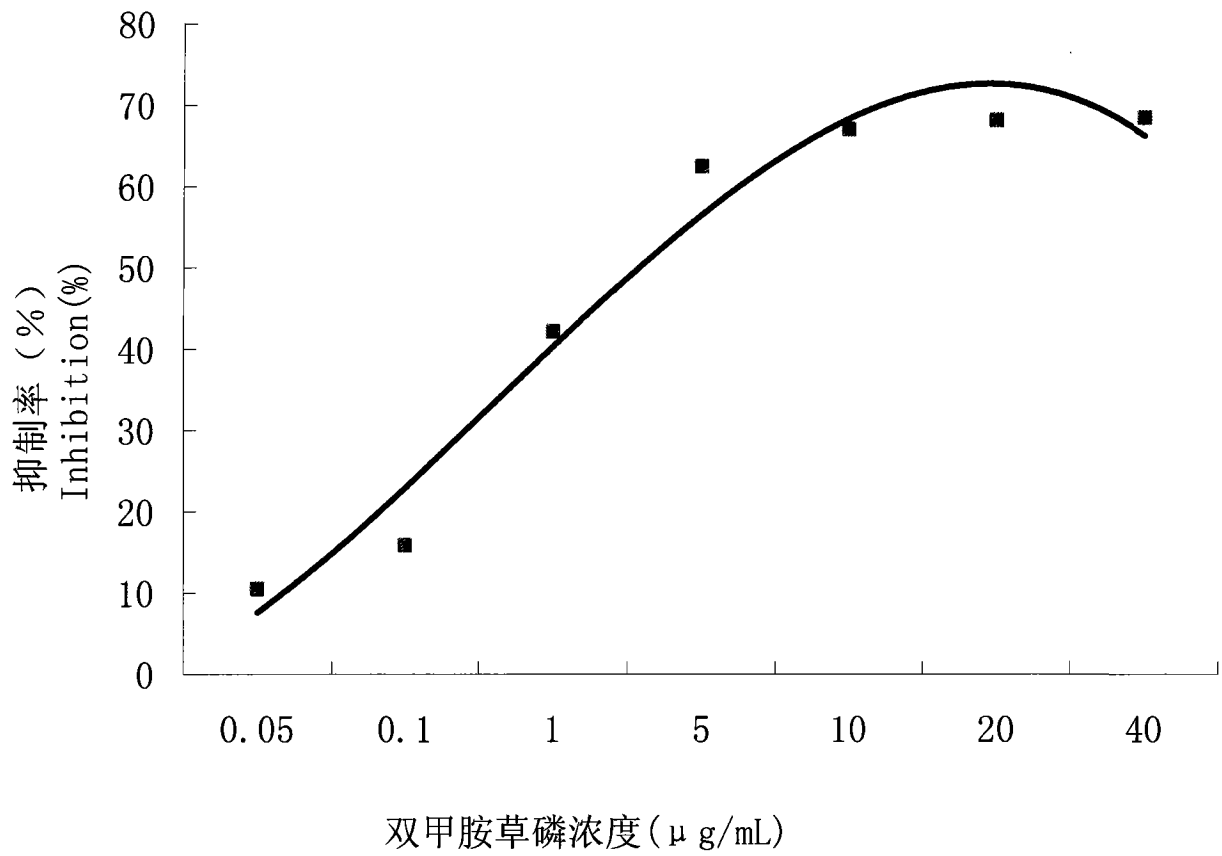


图 7

专利名称(译)	双甲胺草磷(H-9201)的多克隆抗体及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101870731B</a>	公开(公告)日	2012-07-18
申请号	CN201010179602.X	申请日	2010-05-21
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
[标]发明人	张存政 刘贤进 杨春龙 陈敏 俞杰		
发明人	张存政 刘贤进 杨春龙 陈敏 俞杰		
IPC分类号	C07K16/44 C07K16/06 G01N33/531 G01N33/53 C07F9/24		
代理人(译)	孙忠浩		
审查员(译)	唐华东		
其他公开文献	CN101870731A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种双甲胺草磷(H-9201)的多克隆抗体及其制备方法和应用，多克隆抗体是由半抗原与牛血清白蛋白BSA偶联获得免疫抗原，免疫新西兰大白兔后获得，其特征在于：半抗原为设计合成的分子结构式(4)的双甲胺草磷过渡态类似化合物，并引入羧基制备半抗原；其次，采用活性酯法将半抗原与载体蛋白偶联获得完全抗原；经动物免疫获得多克隆抗体，建立了ELISA检测方法，本发明可对水体样本中双甲胺草磷(H-9201)农药残留进行检测。其优点是：双甲胺草磷(H-9201)的多克隆抗体的制备可以用于水体中的双甲胺草磷(H-9201)农药残留进行快速，大量样本的筛查。

