



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102516148 A

(43) 申请公布日 2012.06.27

(21) 申请号 201110375159.8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011.11.23

C07D 207/38(2006.01)

(71) 申请人 华南农业大学

C07K 14/765(2006.01)

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 16/14(2006.01)

(72) 发明人 王弘 刘细霞 杨星星 沈玉栋
徐振林 孙远明 杨金易

G01N 33/53(2006.01)

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有
限公司 44245

代理人 杨晓松 裘晖

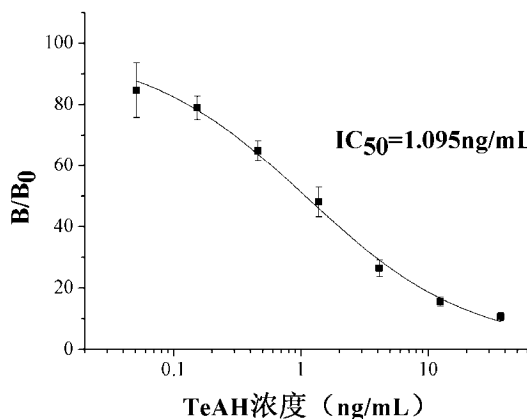
权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 2 页

(54) 发明名称

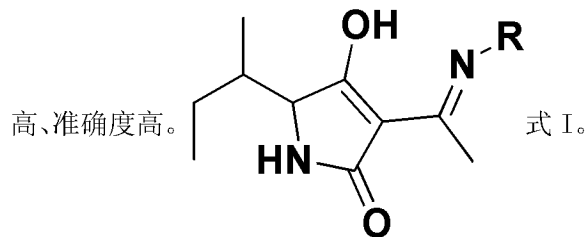
细交链孢菌酮酸的半抗原和抗原及其制备方法与应用

(57) 摘要

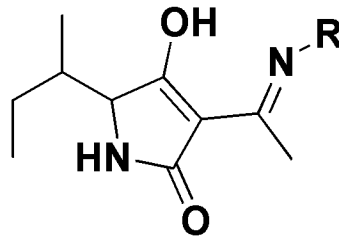
本发明公开了细交链孢菌酮酸的半抗原和抗原及其制备方法与应用。可作为细交链孢菌酮酸半抗原的化合物,具有如式 I 所示的结构。细交链孢菌酮酸的抗原是将 TeAH 和载体蛋白混合后溶解于 PBS 溶液中,滴入戊二醛溶液,搅拌反应,然后用生理盐水透析得到;或者是将 TeAHGA 溶于 N,N-二甲基甲酰胺中,加入二环己基碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺,搅拌过夜;离心,取上清液为 A 液;取载体蛋白溶解于 PBS 中,搅拌溶解为 B 液;将 A 液滴入 B 液中反应,然后用生理盐水透析得到。用本发明的抗原免疫动物得到的抗血清的效价可达 $1:3.2 \times 10^4$,对 TeAH 的线性范围为 $0.130\text{ng/mL} \sim 8.789\text{ng/mL}$ ($IC_{20} \sim IC_{80}$),半抑制浓度为 1.095ng/mL ,产生的抗体特异性高、灵敏度



CN 102516148 A



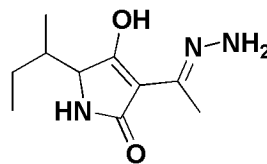
1. 一种可作为细交链孢菌酮酸半抗原的化合物,其特征在于:具有如式 I 所示的结构:



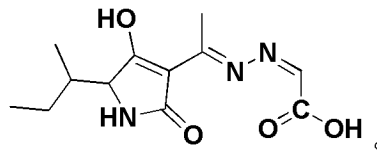
式 (I)

其中, R 为 $-\text{NH}_2$ 或 $-\text{NCHCOOH}$;

当 R 为 $-\text{NH}_2$ 时,一种可作为细交链孢菌酮酸半抗原的化合物是 TeAH, TeAH 的结构如下所示:



当 R 为 $-\text{NCHCOOH}$ 时,一种可作为细交链孢菌酮酸半抗原的化合物是 TeAHGA, TeAHGA 的结构如下所示:



2. 权利要求 1 所述的可作为细交链孢菌酮酸半抗原的化合物的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

将细交链孢菌酮酸溶于三氯甲烷中,20-30℃下滴加过量的水合肼过夜反应得到 TeAH;将 TeAH 用三氯甲烷溶解,然后加入 2-5 倍 TeAH 摩尔量的乙醛酸,20-30℃下反应 3 ~ 12h,然后过滤,沉淀用三氯甲烷洗涤、干燥即得 TeAHGA。

3. 根据权利要求 2 所述的可作为细交链孢菌酮酸半抗原的化合物的制备方法,其特征在于:所述水合肼的纯度为 98%。

4. 一种细交链孢菌酮酸的抗原,其特征在于是由以下方法制备得到:

将 TeAH 和载体蛋白以摩尔比 80 : 1 混合后溶解于 PBS 溶液中,向上述混合溶液逐滴滴入戊二醛溶液,20-30℃下搅拌反应 3 ~ 12h,然后在 4℃下用生理盐水透析 3d,得到细交链孢菌酮酸的抗原。

5. 一种细交链孢菌酮酸的抗原,其特征在于是由以下步骤制备得到:

(1) 将 TeAHGA 溶于 N,N-二甲基甲酰胺中,搅拌下加入二环己基碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺,4℃下搅拌过夜;离心,取上清液,为 A 液;其中 TeAHGA、二环己基碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺三者的摩尔比为 1 : 1.5 ~ 4 : 1.5 ~ 4;

(2) 取载体蛋白溶解于 PBS 中,搅拌溶解,为 B 液;

(3) 4℃搅拌下将 A 液滴入 B 液中,反应 8 ~ 12h,然后用生理盐水透析 3d,得到细交链孢菌酮酸的抗原;其中 A 液中的 TeAHGA 与 B 液中的载体蛋白摩尔比为 80 : 1。

6. 根据权利要求 4 或 5 所述的细交链孢菌酮酸的抗原,其特征在于:

所述 PBS 溶液的 pH 值为 8.0；

所述的载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清蛋白、血蓝蛋白或卵清蛋白中的一种。

7. 根据权利要求 4 或 5 所述的细交链孢菌酮酸的抗原,其特征在于:所述的载体蛋白为牛血清白蛋白。

8. 一种细交链孢菌酮酸抗体,其特征在于:是由权利要求 1 所述的可作为细交链孢菌酮酸半抗原的化合物或权利要求 4-5 任一项所述的细交链孢菌酮酸的抗原制备得到的。

9. 根据权利要求 8 所述的细交链孢菌酮酸抗体,其特征在于:所述的细交链孢菌酮酸抗体为多克隆抗体、单克隆抗体或基因工程抗体。

10. 一种用于检测细交链孢菌酮酸的制剂,其特征在于:所述的制剂为权利要求 1 所述的可作为细交链孢菌酮酸半抗原的化合物、权利要求 4-5 任一项所述的细交链孢菌酮酸的抗原或权利要求 8 所述的细交链孢菌酮酸抗体中的一种。

细交链孢菌酮酸的半抗原和抗原及其制备方法与应用

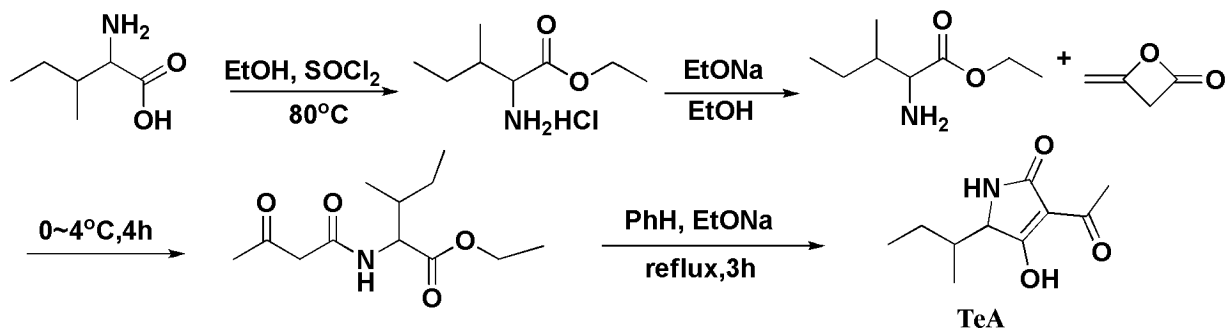
技术领域

[0001] 本发明涉及细交链孢菌酮酸的半抗原和抗原及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid, TeA, 化学名: 3-乙酰基-4-羟基-5-仲丁基吡咯啉-2-酮), 是链格孢菌产生的次级代谢物中毒性最高的毒素之一。该毒素自 20 世纪 60 年代分离鉴定后发现该毒素具有抗肿瘤性、微弱的抗病毒活性以及广谱、快速、高效的除草性等生物活性。该毒素目前已经能够人工合成, 其合成途径如下所示:

[0003]



[0004] 但随着近年来各国对该毒素的进一步生物学和毒理学研究发现该毒素污染农作物 (如番茄、橘子、谷物等) 的情况相当普遍, 由于人们平均每日的摄入量很低, 未能引起足够重视。虽然食用含少量毒素的食品不会引起急性中毒, 但是长期食用有可能引起慢性中毒。

[0005] 目前从食物里能同时检出两种甚至两种以上的链格孢菌产生链格孢霉毒素, 越来越多的证据表明这些毒素之间有协同作用。虽然国内外尚未制定该毒素在农作物中的限量标准, 国内外几篇文章报道利用液质联用等仪器方法对该毒素进行检测, 但仪器由于价格贵需专人操作等缺点不适合大规模筛选。

发明内容

[0006] 为了克服现有技术的缺点与不足, 本发明的首要目的在于提供一种可作为细交链孢菌酮酸半抗原的化合物。

[0007] 本发明的另一目的在于提供上述可作为细交链孢菌酮酸半抗原的化合物的制备方法。

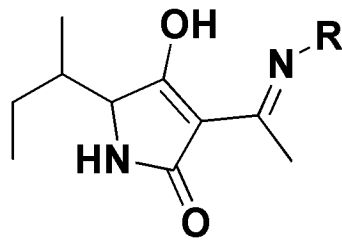
[0008] 本发明的再一目的在于提供一种细交链孢菌酮酸的抗原。

[0009] 本发明的第四个目的在于提供上述细交链孢菌酮酸抗原的用途。

[0010] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0011] 一种可作为细交链孢菌酮酸半抗原的化合物, 具有如式 I 所示的结构:

[0012]

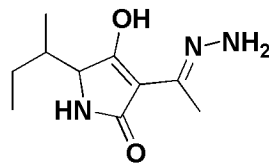


[0013] 式 (I)

[0014] 其中, R 为 $-\text{NH}_2$ 或 $-\text{NCHCOOH}$;

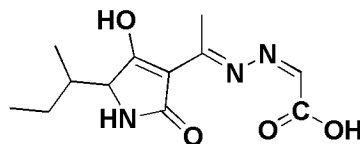
[0015] 当 R 为 $-\text{NH}_2$ 时, 一种可作为细交链孢菌酮酸半抗原的化合物是 TeAH, TeAH 的结构如下所示 :

[0016]



[0017] 当 R 为 $-\text{NCHCOOH}$ 时, 一种可作为细交链孢菌酮酸半抗原的化合物是 TeAHGA, TeAHGA 的结构如下所示 :

[0018]



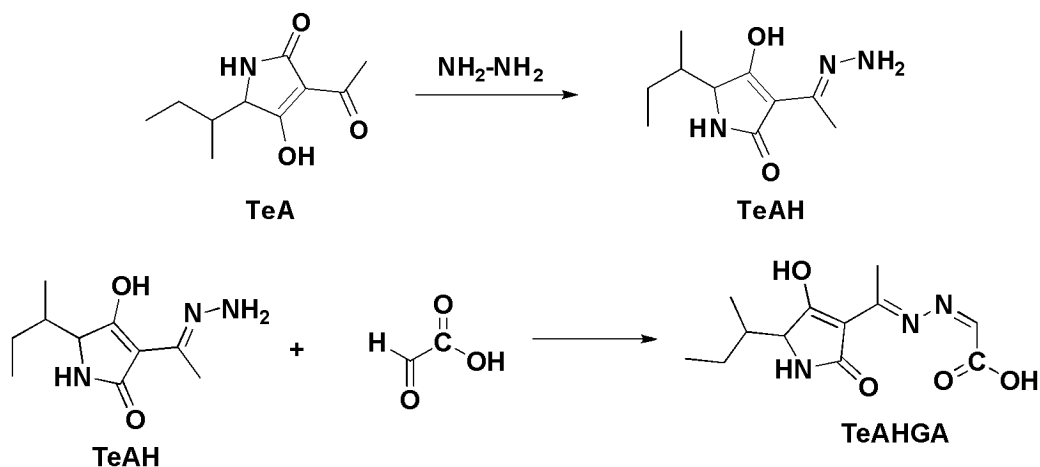
[0019] 上述可作为细交链孢菌酮酸半抗原的化合物的制备方法包括以下步骤 :

[0020] 将细交链孢菌酮酸 (TeA) 溶于三氯甲烷中, $20-30^\circ\text{C}$ 下滴加过量的水合肼过夜反应得到 TeAH ; 将 TeAH 用三氯甲烷溶解, 然后加入 2-5 倍 TeAH 摩尔量的乙醛酸, $20-30^\circ\text{C}$ 下反应 3 ~ 12h, 然后过滤, 沉淀用三氯甲烷洗涤、干燥即得 TeAHGA。

[0021] 所述水合肼的纯度为 98% ;

[0022] 以上过程分别发生如下反应 :

[0023]



[0024] 一种细交链孢菌酮酸 (TeA) 的抗原, 由以下方法制备得到 :

[0025] 将 TeAH 和载体蛋白以摩尔比 80 : 1 混合后溶解于 PBS 溶液中, 向上述混合溶液逐滴滴入戊二醛溶液, $20-30^\circ\text{C}$ 下搅拌反应 3 ~ 12h, 然后在 4°C 下用生理盐水透析 3d, 得到

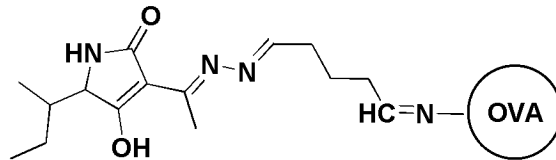
细交链孢菌酮酸 (TeA) 的抗原。

[0026] 所述 PBS 溶液的 pH 值为 8.0；

[0027] 所述的戊二醛溶液中戊二醛的体积百分比为 25%；

[0028] 所得到的抗原是 TeAH 与载体蛋白的偶联物,其分子结构如下所示(载体蛋白为卵清蛋白 (Ovalbumin, OVA) 时的结构)：

[0029]



[0030] 一种细交链孢菌酮酸 (TeA) 的抗原还可以由以下步骤制备得到：

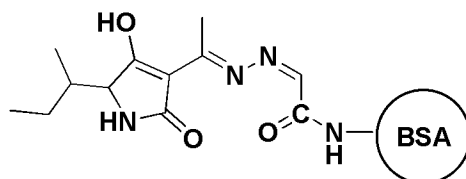
[0031] (1) 将 TeAHGA 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中,搅拌下加入二环己基碳二亚胺 (DCC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS),4°C 下搅拌过夜;离心,取上清液,为 A 液;其中 TeAHGA、DCC、NHS 三者的摩尔比为 1 : 1.5 ~ 4 : 1.5 ~ 4；

[0032] (2) 取载体蛋白溶解于 PBS 中,搅拌溶解,为 B 液；

[0033] (3) 4°C 搅拌下将 A 液滴入 B 液中,反应 8 ~ 12h,然后用生理盐水透析 3d,得到细交链孢菌酮酸 (TeA) 的抗原;其中 A 液中的 TeAHGA 与 B 液中的载体蛋白摩尔比为 80 : 1；

[0034] 所得到的抗原是 TeAHGA 与载体蛋白的偶联物,其分子结构如下所示(载体蛋白为牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 时的结构)：

[0035]



[0036] 所述的载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清蛋白、血蓝蛋白或卵清蛋白中的一种,优选牛血清白蛋白。

[0037] 所述 PBS 溶液的 pH 值为 8.0。

[0038] 上述的可作为细交链孢菌酮酸半抗原的化合物和细交链孢菌酮酸 (TeA) 的抗原可以用于制备细交链孢菌酮酸抗体。

[0039] 所述的细交链孢菌酮酸抗体包括多克隆抗体、单克隆抗体或基因工程抗体。

[0040] 上述的可作为细交链孢菌酮酸半抗原的化合物、细交链孢菌酮酸 (TeA) 的抗原和抗体可以用于检测细交链孢菌酮酸。

[0041] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果：

[0042] 实验结果表明,用本发明的抗原免疫动物得到的抗血清的效价可达 $1 : 3.2 \times 10^4$,对 TeAH 的线性范围为 $0.130 \text{ ng/mL} \sim 8.789 \text{ ng/mL}$ ($IC_{20} - IC_{80}$),半抑制浓度为 1.095 ng/mL ,产生的抗体特异性高、灵敏度高、准确度高。因此,本发明的抗原和 / 或抗体,可用于建立竞争酶联免疫吸附分析技术,从而用于快速检测农产品中的微生物产生的细交链孢菌酮酸 (TeA)。本发明的抗原及抗体及其制备方法具有广阔的应用前景。

附图说明

- [0043] 图 1 是 OVA、TeAH、TeAH-OVA 的紫外吸收图谱。
 [0044] 图 2 是 BSA、TeAHGA、TeAHGA-BSA 的紫外吸收图谱。
 [0045] 图 3 是细交链孢菌酮酸 ELISA 竞争标准曲线图。

具体实施方式

[0046] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0047] 下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0048] 下述实施例中所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,均为市售产品,均可从商业途径得到。

[0049] 实施例 1

[0050] 细交链孢菌酮酸半抗原的制备与鉴定

[0051] 1、细交链孢菌酮酸半抗原 TeAH、TeAHGA 的合成

[0052] 往三口烧瓶中加入已经过除水干燥的无水乙醇 30ml,投入 10mmol 的异亮氨酸,加入 15ml 氯化亚砷。80℃回流 3-4h 后,冷却到室温,60℃下真空浓缩除去多余的氯化亚砷。再用除水的无水乙醇溶解,搅拌下滴加新制备的乙醇钠 12mmol,反应 30min。0~4℃搅拌下,滴加双乙烯酮 12mmol,30min 内滴完,然后室温下搅拌反应 4h。加入苯 20ml,再滴加入新制备的乙醇钠 12mmol,搅拌回流反应 3h。冷却到室温后 60℃真空浓缩除去溶剂,加入稀盐酸调至酸性,用乙酸乙酯萃取,有机相用无水硫酸镁干燥,60℃真空浓缩后得到一棕红色粘稠液体,过柱纯化得到棕红色油状物 A。

[0053] 将棕红色油状物 A 溶解于氯仿中,25℃下滴入过量的 98% (纯度) 的水合肼,搅拌反应。过夜反应后反应完毕,加蒸馏水,用氯仿萃取两次,再用蒸馏水洗涤有机相一次即可。干燥,浓缩可得到棕褐色油状物,过柱纯化得到产物 B。

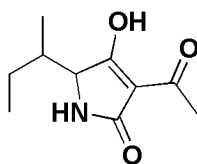
[0054] 将产物 B 1mmol 用氯仿溶解,于 25℃下搅拌,再向其中加入 3mmol 的乙醛酸,搅拌反应 3h 后即可见到有浅黄色固体出现,氯仿相上层有水出现。直接过滤,取沉淀,沉淀用氯仿洗涤两次,再用蒸馏水洗涤滤渣 3-5 次,40℃烘干,得到呈白色粉末状的产物 C。

[0055] 2、TeA、TeAH、TeAHGA 的鉴定

[0056] 棕红色油状物 A 的结构鉴定:

[0057] 棕红色油状物 A 的 APCI 负离子全质谱图,出现 m/z : 199.6 [M+H], 196.8 [M-H] 的正负离子峰,与 TeA 的分子质量对应。为进一步确认其结构,棕黄色油状物 A 经核磁共振鉴定其化学结构,其结果为:¹HNMR (600MHz, DMSO, TMS): δ : 0.89 (3H, t, CH₃CH₂), 0.90 (3H, d, CH₃CH), 1.27 (2H, m, CH₃CH₂), 1.74 (1H, m, CH₃CH), 2.51 (3H, s, COCH₃), 3.51 (1H, d, CHN); APCI-MS m/z : 196.8 [M-H]⁻。根据以上信息可以确定棕红色油状物 A 为 TeA,其结构如下所示:

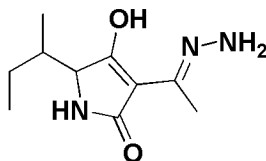
[0058]



[0059] 产物 B 的结构鉴定:

[0060] 产物 B 的 APCI 负离子全质谱图, 出现 m/z :212. 2[M+H]⁺, 210. 3[M-H]⁻ 的正负离子峰, 与 TeAH 的分子质量一致。可以确定产物 B 为 TeAH, 其结构如下所示:

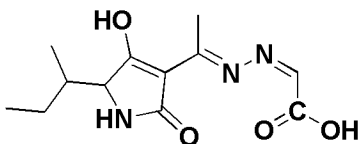
[0061]



[0062] 产物 C 的结构鉴定:

[0063] 产物 C 的 APCI 负离子全质谱图, 出现 m/z :268. 2[M+H]⁺, 266. 1[M-H]⁻ 的正负离子峰, 与 TeAHGA 的分子质量一致。为进一步确认其结构, 产物 C 经核磁共振鉴定其化学结构, 其结果为:¹HNMR(600MHz, DMSO, TMS): δ :0. 85(3H, t, CH₃CH₂), 0. 92(3H, d, CH₃CH), 1. 29(2H, m, CH₃CH₂), 1. 7(1H, m, CH₃CH), 2. 61(3H, s, COCH₃), 3. 70(1H, d, CHN), 7. 69(1H, s, COOHCH); APCI-MS m/z :266. 1[M-H]⁻。根据以上信息可以确定产物 C 为 TeAHGA, 其结构如下所示:

[0064]



[0065] 实施例 2

[0066] 细交链孢菌酮酸抗原的制备与鉴定

[0067] 1、制备细交链孢菌酮酸抗原

[0068] 戊二醛法联蛋白:称取 1mmol 的半抗原 TeAH 和 1/80mmol 的 OVA 一起溶解于 pH 值为 8.0 的 PBS 溶液中, 25℃ 下搅拌均匀, 将 50 ~ 200ul 的 25% (体积比) 戊二醛逐滴滴入上述混合溶液中, 滴加完毕后 25℃ 下搅拌反应 3h。反应完毕后, 将反应溶液装于透析袋, 4℃ 用生理盐水透析 72h, 期间换透析液 6 次, 即得到目的产物细交链孢菌酮酸抗原, 分装后 -20℃ 保存。

[0069] 活泼酯法联蛋白:将 1mmol 的 TeAHGA 溶于 DMF 中, 搅拌加入 3mmol 的 DCC 和 4mmol 的 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)。4℃ 下磁力搅拌反应过夜, 离心后取上清液, 为 A 液; 称取 1/80mmol 的 BSA 溶于 pH 值为 8.0 的 PBS 中, 搅拌溶解制备 B 液。4℃ 磁力搅拌下, 将所得 A 液逐渐滴入所得 B 液中, 4℃ 下反应 12h, 4℃ 下用生理盐水透析 3d, 分装后 -20℃ 保存。

[0070] 2、细交链孢菌酮酸抗原的鉴定

[0071] 取 TeAH、载体蛋白 OVA 和 TeAH-OVA 分别进行紫外 (200nm-400nm) 扫描鉴定, 并通过比较三者的最高吸光值发现 TeAH-OVA 的吸光值与 TeAH 半抗原和 OVA 明显不同 (如图 1 所示), TeAH 在 310nm 处有其特征吸收峰与载体蛋白 OVA 偶联成 TeAH-OVA 后特征吸收峰发生改变, 说明半抗原已经与 OVA 成功偶联制得 TeAH-OVA。用考马斯亮蓝法测定, 经计算, TeAH 半抗原与 OVA 的结合摩尔比为 15 : 1。

[0072] 取 TeAHGA、载体蛋白 BSA 和 TeAHGA-BSA 分别进行紫外 (200nm-400nm) 扫描鉴定, 并通过比较三者的最高吸光值发现 TeAHGA-BSA 的吸光值与 TeAHGA 半抗原和 BSA 明显不同 (如图 2 所示), TeAHGA-BSA 特征吸收峰出现在 354nm 处, 具有半抗原 TeAHGA 的吸收特征, 说明半抗原已经与 BSA 成功偶联制得 TeAHGA-BSA。用考马斯亮蓝法测定, 经计算, TeAHGA 半抗原与 BSA 的结合摩尔比为 12 : 1。

[0073] 实施例 3

[0074] 通过细交链孢菌酮酸抗体检测本发明抗原的效果

[0075] 1、细交链孢菌酮酸抗血清的制备

[0076] 实验选用 3 只 7 周龄、体重 2 公斤左右、健康的新西兰大白兔，分别编号。用免疫原 TeAHGA-BSA 免疫，实验免疫剂量基础免疫为 1mg/kg，加强免疫剂量为 1.5mg/kg，在兔背部皮下多点免疫，每两周加强免疫一次。从第三次加强免疫开始，每次免疫以后第 8 天于兔子耳静脉采血，测定效价。

[0077] 2、细交链孢菌酮酸抗体效价的测定

[0078] 从第三次加强免疫开始，每次第 8 天采血，经放置、离心后得到血清，血清适当稀释后用间接竞争性 ELISA 测定效价。4 兔后，兔子获得高效价的抗体，抗血清的效价为 $1 : 3.2 \times 10^4$ 。

[0079] 3、抗血清最低检测限 (LOD 值) 和半数抑制量 (IC_{50} 值) 的检测

[0080] 用方阵滴定法确定包被原 TeAH-OVA 和细交链孢菌酮酸抗体的工作浓度，包被原的工作浓度为 $0.156 \mu\text{g/mL}$ ，细交链孢菌酮酸抗体的工作浓度为 $1/32000$ 。

[0081] 用不同浓度的 TeAH 溶液做实验溶液，其浓度如下：0、0.050、0.150、0.45、1.35、4.05、12.15、35.45ng/mL，采用 9 组平行实验 ($n = 9$)。

[0082] 间接竞争性 ELISA 方法：用上述工作浓度的包被酶标板，将实验溶液与抗体溶液同时加入到酶标板小孔中，同时设置空白孔和阴性对照孔， 37°C 温育 40min，倒出孔内液体，用洗涤液洗涤 6 次，将酶标板倒置在吸水纸上拍打；加入稀释好的酶标二抗溶液， 37°C 温育 20min，用洗涤液洗涤 6 次，拍干；加入底物显色溶液， 37°C 温育 10min，加入终止液终止显色，用酶标仪在波长 450nm 处测定吸光值 OD，以吸光值 OD 为纵坐标，以 TeAH 实验溶液浓度的 \log_{10} 值为横坐标，绘制半对数标准曲线图（如图 3 所示）。结果表明标准曲线具有完整的反 S 形状，并且有上平台和下平台，标准曲线的平行测定次数 9 次，实验重复性良好，相对标准偏差却在 15% 以内。

[0083] 由公式计算得细交链孢菌酮酸抗体在缓冲溶液中的最低检测限 (LOD 值) 为 0.130ng/mL ，半数抑制量 (IC_{50} 值) 为 1.095ng/mL ，线性范围为 $0.130-8.789\text{ng/mL}$ 。说明本发明方法准确度和灵敏度较好，可用于农产品和食品样品中 TeA 检测。

[0084] 上述实施例为本发明较佳的实施方式，但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制，其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化，均应为等效的置换方式，都包含在本发明的保护范围之内。

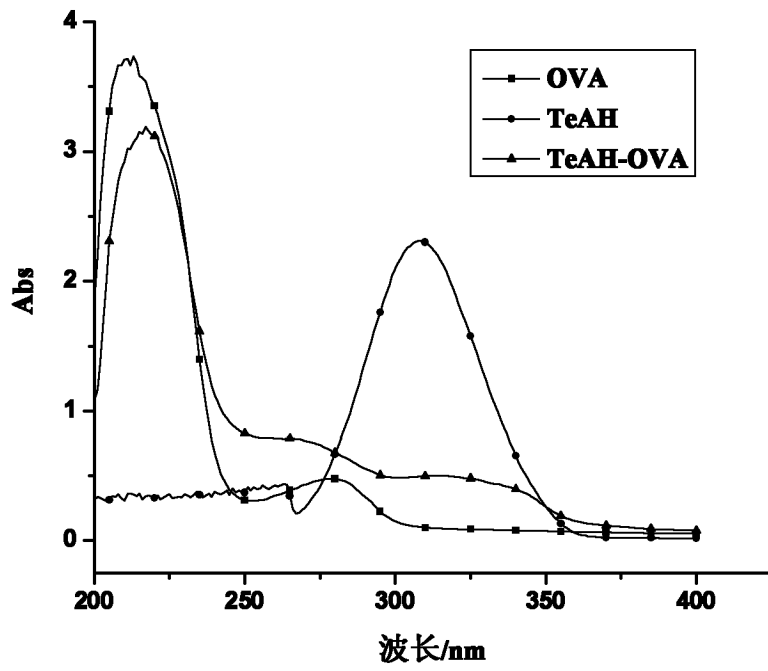


图 1

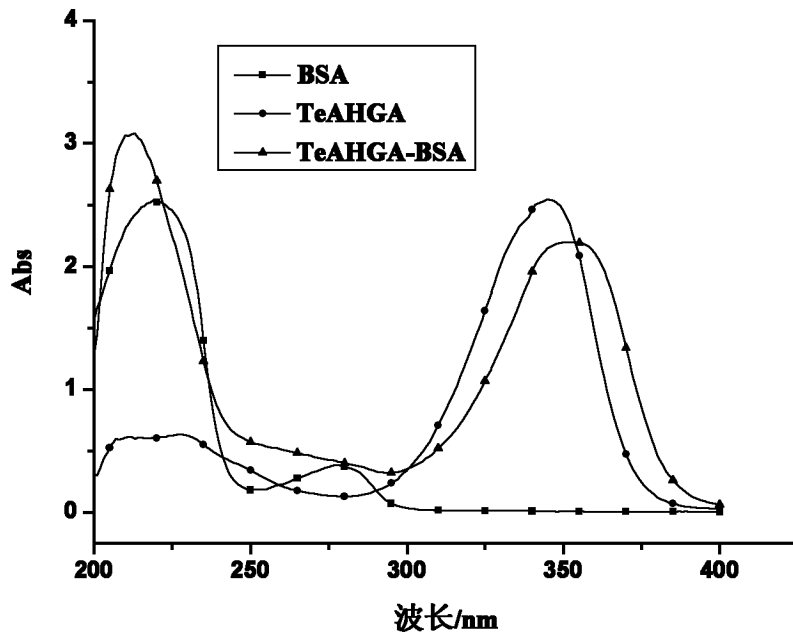


图 2

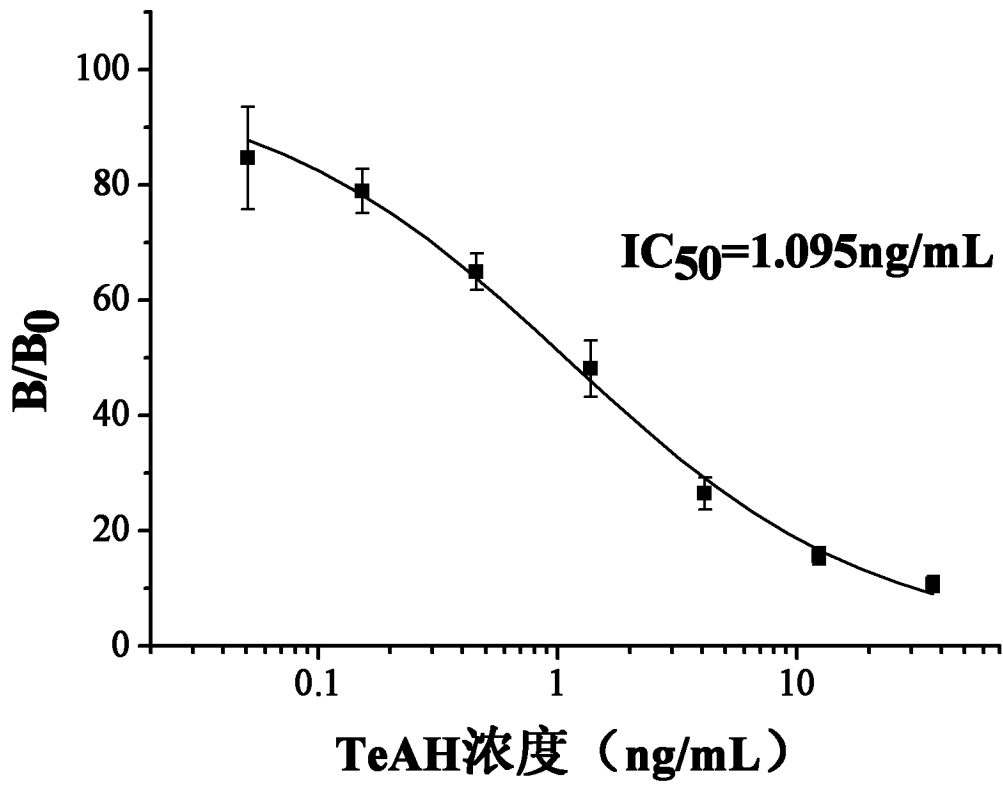


图 3

专利名称(译)	细交链孢菌酮酸的半抗原和抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN102516148A	公开(公告)日	2012-06-27
申请号	CN201110375159.8	申请日	2011-11-23
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	王弘 刘细霞 杨星星 沈玉栋 徐振林 孙远明 杨金易		
发明人	王弘 刘细霞 杨星星 沈玉栋 徐振林 孙远明 杨金易		
IPC分类号	C07D207/38 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/14 G01N33/53		
代理人(译)	杨晓松		
其他公开文献	CN102516148B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了细交链孢菌酮酸的半抗原和抗原及其制备方法与应用。可作为细交链孢菌酮酸半抗原的化合物，具有如式I所示的结构。细交链孢菌酮酸的抗原是将TeAH和载体蛋白混合后溶解于PBS溶液中，滴入戊二醛溶液，搅拌反应，然后用生理盐水透析得到；或者是将TeAHGA溶于N，N-二甲基甲酰胺中，加入二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺，搅拌过夜；离心，取上清液为A液；取载体蛋白溶解于PBS中，搅拌溶解为B液；将A液滴入B液中反应，然后用生理盐水透析得到。用本发明的抗原免疫动物得到的抗血清的效价可达1：3.2×10⁴，对TeAH的线性范围为0.130ng/mL～8.789ng/mL(IC₂₀-IC₈₀)，半抑制浓度为1.095ng/mL，产生的抗体特异性高、灵敏度高、准确度高。式I。

