



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110627726 A

(43)申请公布日 2019.12.31

(21)申请号 201910897483.2

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2019.09.23

(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 崔廷婷 崔海峰 张瑜  
何方洋 马玉华 崔娜 赵正苗

(51) Int. Cl.

C07D 233/56(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 1/113(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

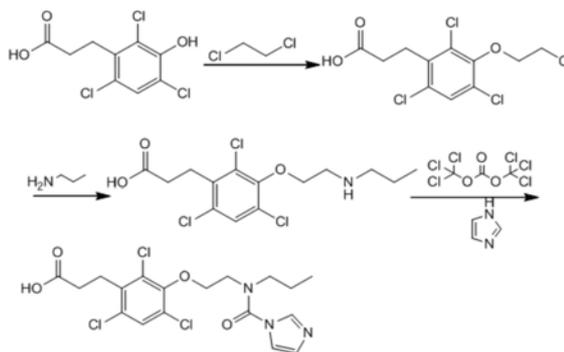
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

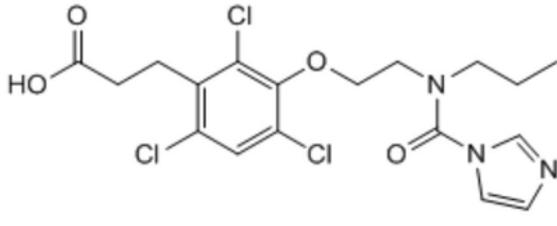
咪鲜胺半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了咪鲜胺半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用,本发明提供的咪鲜胺半抗原既最大程度保留了咪鲜胺的特征结构,使得咪鲜胺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;用咪鲜胺半抗原与载体蛋白偶联后得到的咪鲜胺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,经检测咪鲜胺抗体的灵敏度可达0.1 μg/L,与其他农药的交叉反应率低,为后续建立咪鲜胺的各种免疫分析方法提供了基础。

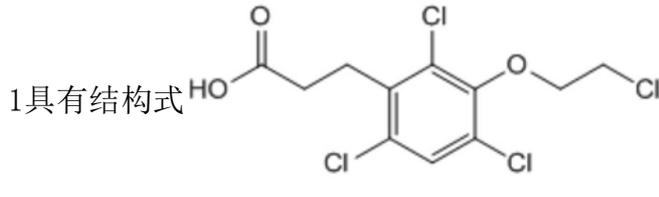


1. 一种咪鲜胺半抗原,其特征在于,其具有如下结构式:

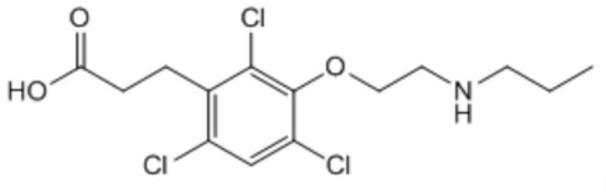


2. 如权利要求1所述的咪鲜胺半抗原的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 3-(3-羟基-2,4,6-三氯)-丙酸与1,2-二氯乙烷发生反应,得到中间体1,所述中间体



2) 将所述中间体1与正丙胺发生反应,得到中间体2,所述中间体2具有结构式



3) 将所述中间体2与二(三氯甲基)碳酸酯、咪唑发生反应,得到咪鲜胺半抗原。

3. 如权利要求2所述的咪鲜胺半抗原的制备方法,其特征在于,所述步骤1)包括如下步骤:取3-(3-羟基-2,4,6-三氯)-丙酸2.69g加1,2-二氯乙烷60mL溶解,加入KOH 0.57g,60℃反应6h,停止反应,加水洗涤,蒸干得到中间体1。

4. 如权利要求2所述的咪鲜胺半抗原的制备方法,其特征在于,所述步骤2)包括如下步骤:在中间体1中加入正丙胺40mL、无水碘化钠0.31g、碳酸钾1.38g,加热回流反应4h,停止反应,旋蒸,除去正丙胺,加水震荡,用乙酸乙酯萃取,收集有机相,有机相用正己烷-二氯甲烷重结晶,得到中间体2。

5. 如权利要求2所述的咪鲜胺半抗原的制备方法,其特征在于,所述步骤3)包括如下步骤:取中间体2 1.2g加二氯甲烷80mL溶解,加入二(三氯甲基)碳酸酯1.1g和三乙胺0.3mL,室温搅拌3h,加入咪唑0.27g,继续搅拌7h,停止反应,加水萃取洗涤,蒸干,得到红色油状物,上硅胶柱,石油醚-乙酸乙酯洗脱分离纯化,得到咪鲜胺半抗原。

6. 一种咪鲜胺人工抗原,其特征在于,其是载体蛋白和权利要求1所述的咪鲜胺半抗原偶联得到的偶联物。

7. 如权利要求6所述的咪鲜胺人工抗原,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。

8. 如权利要求6所述的咪鲜胺人工抗原的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

将所述咪鲜胺半抗原溶于有机溶剂中,加入碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺,充分混匀后,反应4h,即为A液,其中所述咪鲜胺半抗原、碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的物质的量之比为1:(2-3):(2-3);

将载体蛋白溶解在0.05mol/L的PB缓冲液中,得到B液;以及  
将所述A液滴加到所述B液中,4℃反应24h,纯化后得到所述咪鲜胺人工抗原。

9. 一种咪鲜胺抗体,其特征在于,它是由权利要求6所述的咪鲜胺人工抗原经动物免疫得到,其能与咪鲜胺发生特异性免疫反应。

10. 一种权利要求9所述的咪鲜胺抗体在检测咪鲜胺残留中的应用。

## 咪鲜胺半抗原、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,本发明涉及咪鲜胺半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 咪鲜胺(Prochloraz)是一种广谱杀菌剂,对大田作物、水果蔬菜、草皮及观赏植物上的多种病害具有防治作用;另外,咪鲜胺还可用于柑橘、香蕉等水果收获后的产品保鲜,其应用范围较为广泛。有关咪鲜胺的用量各国都有严格的规定,如CAC、欧盟和日本都规定了咪鲜胺在生乳中的MRL值,分别为0.05、0.4、0.05mg/kg,我国国家标准GB 2763-2016《食品安全国家标准食品中农药最大残留限量》中也规定了不同食品中咪鲜胺的残留限量。

[0003] 目前,国内外检测咪鲜胺主要有气相色谱法、高效液相色谱法和液相色谱质谱法等分析方法。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。所以免疫分析为咪鲜胺残留研究提供了一条新的分析检测方法。

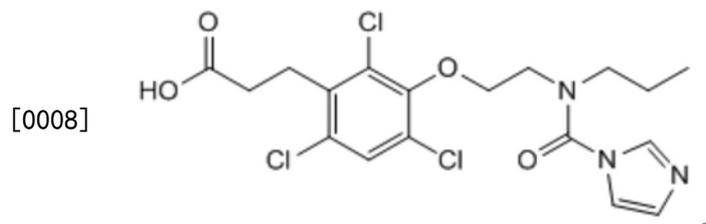
[0004] 在建立免疫学检测方法并应用该检测方法检测咪鲜胺残留量时,关键技术在于能够获取到特异性强、灵敏度高的抗体,而要实现这一目标,前提条件就是得合成、制备出合适的咪鲜胺半抗原。但是,目前国内还没有针对咪鲜胺半抗原的相关报道。

### 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咪鲜胺的特征结构,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。

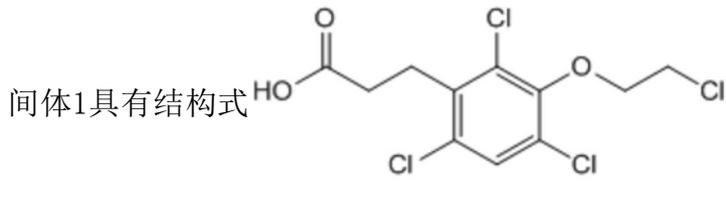
[0006] 本发明所要解决的技术问题是通过以下技术方案来实现的:

[0007] 本发明的第一个目的是提供一种咪鲜胺半抗原,其具有如下结构式:

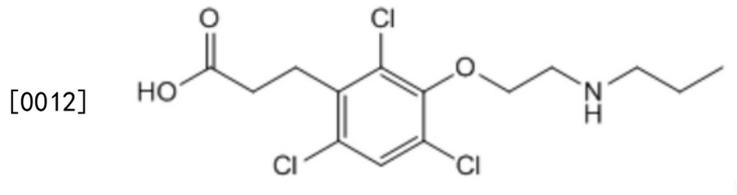


[0009] 本发明的第二个目的是提供一种咪鲜胺半抗原的制备方法,其包括如下步骤:

[0010] 1) 3-(3-羟基-2,4,6-三氯)-丙酸与1,2-二氯乙烷发生反应,得到中间体1,所述中



[0011] 2) 将所述中间体1与正丙胺发生反应,得到中间体2,所述中间体2具有结构式



[0013] 3) 将所述中间体2与二(三氯甲基)碳酸酯、咪唑发生反应,得到咪鲜胺半抗原。

[0014] 进一步地,所述步骤1)包括如下步骤:取3-(3-羟基-2,4,6-三氯)-丙酸2.69g加1,2-二氯乙烷60mL溶解,加入KOH 0.57g,60℃反应6h,停止反应,加水洗涤,蒸干得到中间体1。

[0015] 进一步地,所述步骤2)包括如下步骤:在中间体1中加入正丙胺40mL、无水碘化钠0.31g、碳酸钾1.38g,加热回流反应4h,停止反应,旋蒸,除去正丙胺,加水震荡,用乙酸乙酯萃取,收集有机相,有机相用正己烷-二氯甲烷重结晶,得到中间体2。

[0016] 进一步地,所述步骤3)包括如下步骤:取中间体2 1.2g加二氯甲烷80mL溶解,加入二(三氯甲基)碳酸酯1.1g和三乙胺0.3mL,室温搅拌3h,加入咪唑0.27g,继续搅拌7h,停止反应,加水萃取洗涤,蒸干,得到红色油状物,上硅胶柱,石油醚-乙酸乙酯洗脱分离纯化,得到咪鲜胺半抗原。

[0017] 本发明的第三个目的是提供一种咪鲜胺人工抗原,其是载体蛋白和上述咪鲜胺半抗原偶联得到的偶联物。

[0018] 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。

[0019] 本发明的第四个目的是提供一种咪鲜胺人工抗原的制备方法,包括如下步骤:

[0020] 将上述咪鲜胺半抗原溶于有机溶剂中,加入碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺,充分混匀后,反应4h,即为A液,其中所述咪鲜胺半抗原、碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的物质的量之比为1:(2-3):(2-3);

[0021] 将载体蛋白溶解在0.05mol/L的PB缓冲液中,得到B液;以及

[0022] 将所述A液滴加到所述B液中,4℃反应24h,纯化后得到所述咪鲜胺人工抗原。

[0023] 本发明的第五个目的是提供一种咪鲜胺抗体,它是由上述咪鲜胺人工抗原经动物免疫得到,其能与咪鲜胺发生特异性免疫反应。

[0024] 进一步地,所述咪鲜胺抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0025] 本发明的第六个目的是提供上述咪鲜胺抗体在检测咪鲜胺残留中的应用。

[0026] 本发明具有如下有益效果:

[0027] 本发明提供的咪鲜胺半抗原既最大程度保留了咪鲜胺的特征结构,使得咪鲜胺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;用咪鲜胺半抗原与载体蛋白偶联后得到的咪鲜胺人工抗原去免疫动物,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,为后续建立咪鲜胺的各种免疫分析方法提供基础。

[0028] 本发明中咪鲜胺半抗原的制备方法,使用的原料易得,反应操作较为简单,反应条件易于控制,制备的咪鲜胺半抗原的纯度和收率较高。

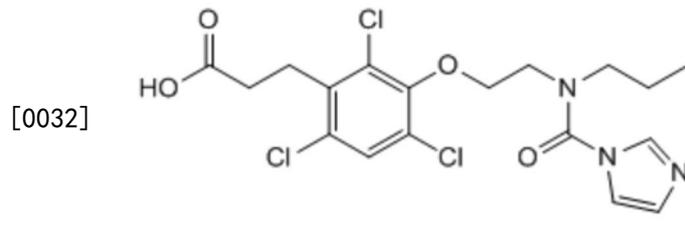
[0029] 采用本发明的咪鲜胺人工抗原得到的咪鲜胺抗体的效价、特异性、亲和力都较好,灵敏度可达到0.1 $\mu$ g/L,与其他农药的交叉反应率低。

## 附图说明

[0030] 图1是本发明咪鲜胺半抗原的合成路线

## 具体实施方式

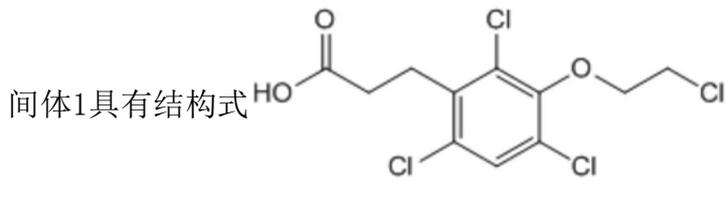
[0031] 第一方面,本发明提供一种咪鲜胺半抗原,其具有如下结构式:



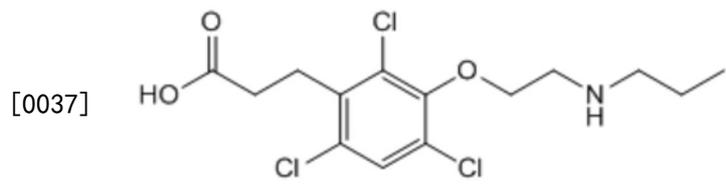
[0033] 本发明提供的咪鲜胺半抗原既最大程度保留了咪鲜胺的特征结构,使得咪鲜胺半抗原的免疫原性明显增强,又具有可以与载体蛋白发生偶联的羧基;用咪鲜胺半抗原与载体蛋白偶联后得到的咪鲜胺人工抗原去免疫动物,更有利于刺激动物免疫应答产生特异性更强、灵敏度更高的抗体。本发明的咪鲜胺半抗原弥补了国内咪鲜胺免疫学检测方法技术领域的空白,为咪鲜胺免疫检测方法的进一步发展奠定了基础。

[0034] 第二方面,本发明提供上述咪鲜胺半抗原的制备方法,其包括如下步骤:

[0035] 1) 3-(3-羟基-2,4,6-三氯)-丙酸与1,2-二氯乙烷发生反应,得到中间体1,所述中



[0036] 2) 将所述中间体1与正丙胺发生反应,得到中间体2,所述中间体2具有结构式



[0038] 3) 将所述中间体2与二(三氯甲基)碳酸酯、咪唑发生反应,得到咪鲜胺半抗原。

[0039] 优选地,所述步骤1)包括如下步骤:取3-(3-羟基-2,4,6-三氯)-丙酸2.69g加1,2-二氯乙烷60mL溶解,加入KOH 0.57g,60 $^{\circ}$ C反应6h,停止反应,加水洗涤,蒸干得到中间体1。

[0040] 优选地,所述步骤2)包括如下步骤:在中间体1中加入正丙胺40mL、无水碘化钠0.31g、碳酸钾1.38g,加热回流反应4h,停止反应,旋蒸,除去正丙胺,加水震荡,用乙酸乙酯萃取,收集有机相,有机相用正己烷-二氯甲烷重结晶,得到中间体2。

[0041] 优选地,所述步骤3)包括如下步骤:取中间体2 1.2g加二氯甲烷80mL溶解,加入二

(三氯甲基)碳酸酯1.1g和三乙胺0.3mL,室温搅拌3h,加入咪唑0.27g,继续搅拌7h,停止反应,加水萃取洗涤,蒸干,得到红色油状物,上硅胶柱,石油醚-乙酸乙酯洗脱分离纯化,得到咪鲜胺半抗原。

[0042] 半抗原的制备方法主要包括:(1)利用待测物现有结构或中间体,通过氧化、还原、取代、水解等反应产生相应的功能基团;(2)利用其代谢产物或结构类似物作先导物,对其进行改造,得到需要的半抗原;(3)利用原料、试剂重新合成,在适当的位置引入带有功能基团的小分子。本发明利用3-(3-羟基-2,4,6-三氯)-丙酸为起始原料,通过3步反应合成了带有羧基的咪鲜胺半抗原,与前两种方法相比难度较大,但优点是易于确立最佳的偶联位点,也易于构建合理的间隔臂,使产生针对特征结构的抗体的可能性增大。

[0043] 本发明根据咪鲜胺的结构特点,合理设计咪鲜胺半抗原的制备方法,使用的原料易得,反应操作较为简单,反应条件易于控制,制备的咪鲜胺半抗原的纯度和收率较高。

[0044] 第三方面,本发明还提供一种咪鲜胺人工抗原,其是载体蛋白和上述咪鲜胺半抗原偶联得到的偶联物。

[0045] 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。

[0046] 咪鲜胺半抗原分子仅具有免疫反应性,而不具有免疫原性。因此,为了赋予咪鲜胺半抗原分子以免疫原性,还需要将该咪鲜胺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咪鲜胺人工抗原。

[0047] 第四方面,本发明还提供上述咪鲜胺人工抗原的制备方法,包括如下步骤:

[0048] 将上述咪鲜胺半抗原溶于有机溶剂中,加入碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺,充分混匀后,反应4h,即为A液,其中所述咪鲜胺半抗原、碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的物质的量之比为1:(2-3):(2-3);

[0049] 将载体蛋白溶解在0.05mol/L的PB缓冲液中,得到B液;以及

[0050] 将所述A液滴加到所述B液中,4℃反应24h,纯化后得到所述咪鲜胺人工抗原。

[0051] 第五方面,本发明还提供一种咪鲜胺抗体,它是由上述咪鲜胺人工抗原经动物免疫得到,其能与咪鲜胺发生特异性免疫反应。

[0052] 所述咪鲜胺抗体可以为单克隆抗体或多克隆抗体。另外,对于所述咪鲜胺抗体,可以采用本领域常规方法来进行制备。

[0053] 在一个具体的实施方案中,所述咪鲜胺抗体为特异性针对上述咪鲜胺半抗原的咪鲜胺人工抗原的鼠源单克隆抗体。

[0054] 采用本发明的咪鲜胺人工抗原得到的咪鲜胺抗体的效价、特异性、亲和力都较好,与其他农药的交叉反应率低。

[0055] 第六方面,本发明还提供上述咪鲜胺抗体在检测咪鲜胺残留中的应用。

[0056] 本发明通过咪鲜胺人工抗原诱导免疫动物产生抗体,从而用于咪鲜胺免疫检测分析中。

[0057] 所述的咪鲜胺免疫检测包括但不限于咪鲜胺ELISA试剂盒和咪鲜胺胶体金试纸条。

[0058] 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。

[0059] 实施例1

[0060] 一种咪鲜胺半抗原的制备方法,其包括如下步骤:

[0061] 1) 取3-(3-羟基-2,4,6-三氯)-丙酸2.69g加1,2-二氯乙烷60mL溶解,加入KOH 0.57g,60℃反应6h,停止反应,加水洗涤,蒸干得到中间体1;

[0062] 2) 在中间体1中加入正丙胺40mL、无水碘化钠0.31g、碳酸钾1.38g,加热回流反应4h,停止反应,旋蒸,除去正丙胺,加水震荡,用乙酸乙酯萃取,收集有机相,有机相用正己烷-二氯甲烷重结晶,得到中间体2;

[0063] 3) 取中间体2 1.2g加二氯甲烷80mL溶解,加入二(三氯甲基)碳酸酯1.1g和三乙胺0.3mL,室温搅拌3h,加入咪唑0.27g,继续搅拌7h,停止反应,加水萃取洗涤,蒸干,得到红色油状物,上硅胶柱,石油醚-乙酸乙酯洗脱分离纯化,得到咪鲜胺半抗原。

[0064] 实施例2

[0065] 一种咪鲜胺人工抗原的制备方法,步骤如下:

[0066] 取实施例1制备的咪鲜胺半抗原17mg溶于1mL DMF中,溶解澄清,加入碳二亚胺15.3mg和N-羟基琥珀酰亚胺11.2mg,充分混匀后,反应4h,得到A液;取牛血清白蛋白(BSA)50mg溶解在0.05mol/L PB缓冲液中,得到B液;将A液滴加到B液中,4℃反应24h,用0.02mol/L PBS透析纯化3天,每天换液3次,得到与牛血清白蛋白偶联的咪鲜胺人工抗原,分装,-20℃保存。

[0067] 实施例3

[0068] 一种咪鲜胺人工抗原的制备方法,步骤如下:

[0069] 取实施例1制备的咪鲜胺半抗原11mg溶于1mL DMF中,溶解澄清,加入碳二亚胺9.7mg和N-羟基琥珀酰亚胺7.45mg,充分混匀后,反应4h,得到A液;取卵清蛋白(OVA)50mg溶解在0.05mol/L PB缓冲液中,得到B液;将A液滴加到B液中,4℃反应24h,用0.02mol/L PBS透析纯化3天,每天换液3次,得到与卵清蛋白偶联的咪鲜胺人工抗原,分装,-20℃保存。

[0070] 实施例4

[0071] 一种咪鲜胺抗体,其制备方法为:

[0072] 1. 动物免疫

[0073] 取健康的6~8周雌性Ba1b/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与牛血清白蛋白偶联的咪鲜胺人工抗原;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。

[0074] 表1小鼠免疫程序

免疫次数	时间/d	免疫剂量/(μg/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
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

[0076] 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:

[0077] (1) 用0.05mol/L pH9.6的碳酸盐缓冲液将与卵清蛋白偶联的咪鲜胺人工抗原做1:1000稀释,每孔100 $\mu$ L包被酶标板,37 $^{\circ}$ C孵育2h,甩掉包被液,以PBST洗涤1次,拍干;

[0078] (2) 每孔加入150 $\mu$ L封闭液,37 $^{\circ}$ C反应2h后倾去封闭液,拍干;

[0079] (3) 每孔加入50 $\mu$ L以PBS倍比稀释的抗血清,25 $^{\circ}$ C反应30min后倾去反应液,以PBST洗涤3~5次,每次间隔30s,拍干;

[0080] (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 $\mu$ L/孔,25 $^{\circ}$ C反应30min,以PBST洗涤3~5次,每次间隔30s,拍干;

[0081] (5) 每孔加入底物显色液A液和B液各50 $\mu$ L,25 $^{\circ}$ C避光反应15min,每孔加入50 $\mu$ L 2mol/L的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液终止反应;

[0082] (6) 酶标仪测定波长在450nm的OD值,以样品孔OD<sub>450</sub>接近于1的稀释倍数作为阳性血清的效价。

### [0083] 2. 细胞融合

[0084] (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 $\mu$ L/孔滴加到培养板,置培养箱备用。

[0085] (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。

[0086] (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。

[0087] (4) 细胞混合:脾细胞:骨髓瘤细胞=8:1,混合,1500~2000r/min离心5min。

[0088] (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 $^{\circ}$ 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。

### [0089] 3. 细胞株筛选

[0090] 待细胞长至孔底的1/3~1/2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,第二步选用咪鲜胺为标准品,用间接竞争ELISA对阳性细胞进行抑制效果测定。选出对咪鲜胺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咪鲜胺单克隆抗体的细胞株。

### [0091] 4. 腹水制备

[0092] 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℃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。

[0093] 5. 抗体纯化

[0094] 单克隆抗体采用辛酸-硫酸铵方法纯化。

[0095] 6. 抗体效价测定

[0096] 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,咪鲜胺单克隆抗体的效价 $\geq 20000$ 。

[0097] 7. 抗体交叉反应性测定

[0098] 采用间接竞争ELISA方法测定,结果发现,咪鲜胺单克隆抗体对咪鲜胺及其他杀菌剂的交叉反应率为:咪鲜胺为100%,多菌灵、甲基硫菌灵、噻菌灵、异菌脲、抑霉唑、苯菌灵、腐霉利、百菌清、啞霉胺均 $< 1\%$ 。由此可见,所制备的抗体特异性较好。

[0099] 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。

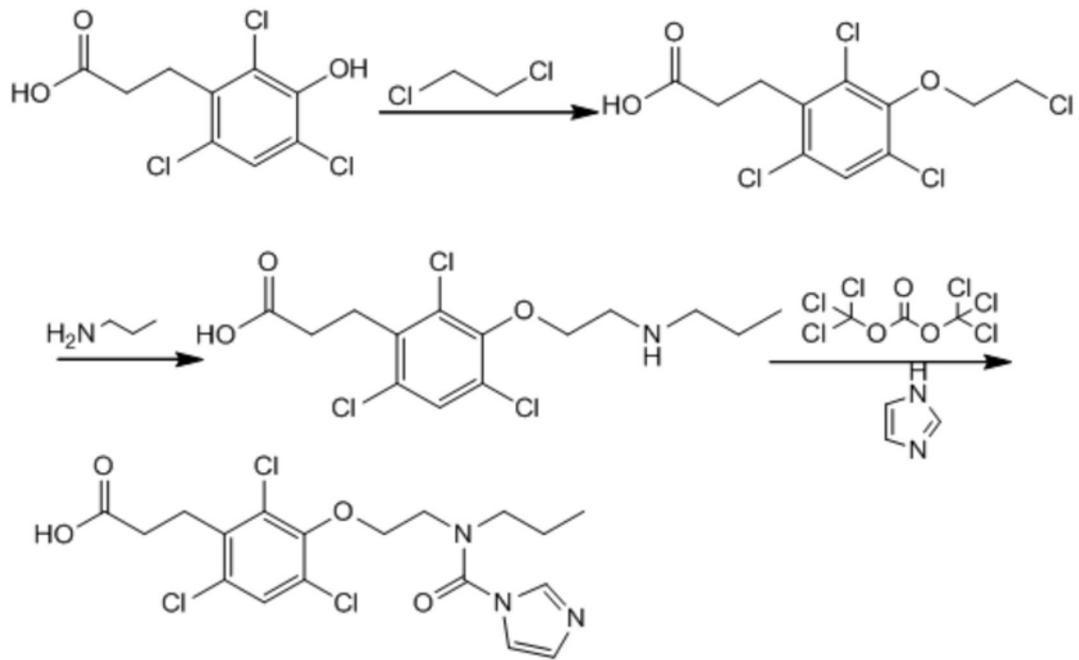


图1