



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110498766 A

(43)申请公布日 2019. 11. 26

(21)申请号 201910789678.5

(22)申请日 2019.08.26

(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 崔廷婷 冯才伟 何方洋 刘玉梅
冯月君 魏力杰 赵正苗 马玉华

(51)Int.Cl.

C07D 213/74(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

C07K 1/02(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

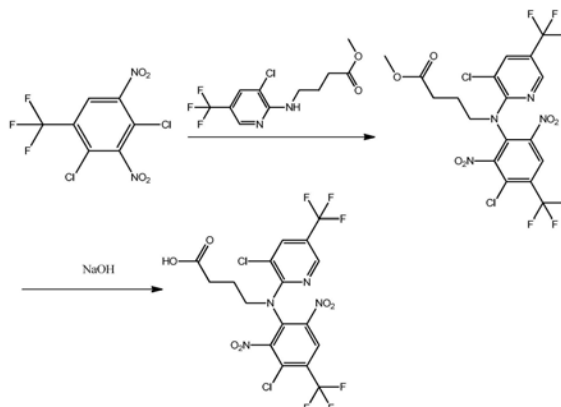
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

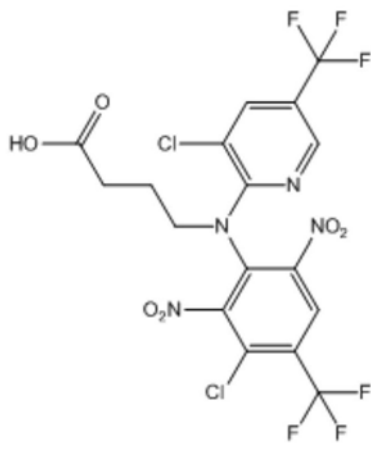
氟啶胺半抗原、人工抗原和抗体及其制备方
法和应用

(57)摘要

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



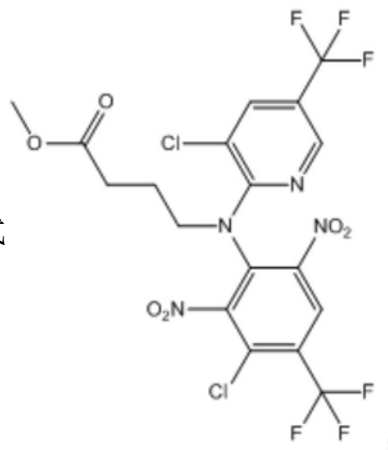
1. 一种氟啶胺半抗原, 其特征在于, 其具有如下结构式:



2. 如权利要求1所述的氟啶胺半抗原的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

1) 2,4-二氯-3,5-二硝基三氟甲苯与2-氨基丁酸甲酯-3-氯-5-三氟甲基吡啶发生反

应, 得到中间体1, 所述中间体1具有结构式



2) 将所述中间体1进行水解反应, 得到氟啶胺半抗原。

3. 如权利要求2所述的氟啶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2,4-二氯-3,5-二硝基三氟甲苯加有机溶剂溶解, 加入无水碳酸钾和2-氨基丁酸甲酯-3-氯-5-三氟甲基吡啶, 油浴加热反应, 反应结束后, 旋蒸, 加入水, 用乙酸乙酯进行萃取, 收集有机相, 有机相经蒸干后用二氯甲烷-环己烷打浆, 抽滤, 用正己烷洗涤, 得到中间体1; 其中, 所述2,4-二氯-3,5-二硝基三氟甲苯、无水碳酸钾和2-氨基丁酸甲酯-3-氯-5-三氟甲基吡啶的物质的量之比为1: (2-3) : (0.5-1.0)。

4. 如权利要求2所述的氟啶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: 称取中间体1, 加入碱性溶液, 加热回流, 进行水解反应; 反应结束后用盐酸调节pH至微酸性, 再用乙酸乙酯萃取, 有机相经蒸干、过柱纯化后得到所述氟啶胺半抗原。

5. 一种氟啶胺人工抗原, 其特征在于, 所述氟啶胺人工抗原包括氟啶胺免疫抗原和氟啶胺包被抗原, 所述氟啶胺人工抗原是载体蛋白和权利要求1所述的氟啶胺半抗原偶联得到的偶联物。

6. 如权利要求5所述的氟啶胺人工抗原, 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。

7. 如权利要求5所述的氟啶胺人工抗原的制备方法, 其特征在于, 所述氟啶胺免疫抗原

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21mg氟啶胺半抗原用1mL N,N-二甲基甲酰胺溶解,加入16mg碳二亚胺、13mg N-羟基琥珀酰亚胺,吹打混匀,室温反应4h,然后滴加到上述蛋白A液中,反应2h,用0.02mol/L PBS缓冲液透析纯化3天,分装冻存;

所述氟啶胺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11mg氟啶胺半抗原用1mL N,N-二甲基甲酰胺溶解,加入0.3mL乙二胺,冷却到0-5℃,滴加86μL氯甲酸异丁酯,继续反应4h,然后滴加到上述蛋白B液中,反应2h,用0.02mol/L PBS缓冲液透析纯化3天,分装冻存。

8.一种氟啶胺抗体,其特征在于,它是由权利要求5所述的氟啶胺免疫抗原经动物免疫得到,其能与氟啶胺发生特异性免疫反应。

9.一种权利要求8所述的氟啶胺抗体在检测氟啶胺残留中的应用。

氟啶胺半抗原、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,本发明涉及氟啶胺半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 氟啶胺(Fluazinam)是日本石原产业自主研发生产的2,6-二硝基苯胺类低毒、广谱性杀菌剂,已在我国大白菜、番茄、黄瓜、辣椒、马铃薯等多种作物上取得登记,对食植性螨类和十字花科植物根肿病具有良好的防效。但其环境毒性令人担忧,有研究表明,氟啶胺可引发哮喘病和皮炎等破坏人免疫系统的疾病。

[0003] 目前,国内外检测氟啶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。所以免疫分析为氟啶胺残留研究提供了一条新的分析检测方法。

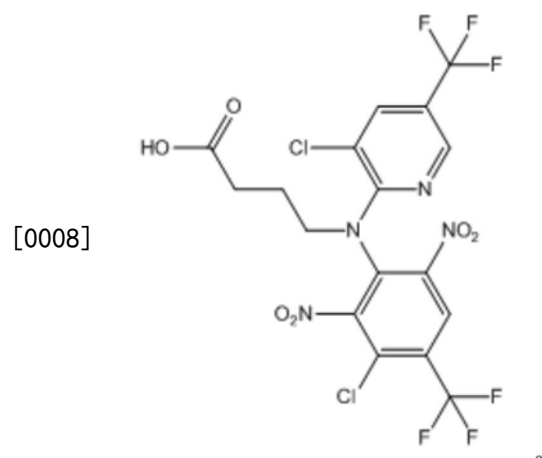
[0004] 在建立免疫学检测方法并应用该检测方法检测氟啶胺残留量时,关键技术在于能够获取到特异性强、灵敏度高的抗体,而要实现这一目标,前提条件就是得合成、制备出合适的氟啶胺半抗原。但是,目前国内还没有针对氟啶胺半抗原的相关报道。

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氟啶胺的特征结构,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:

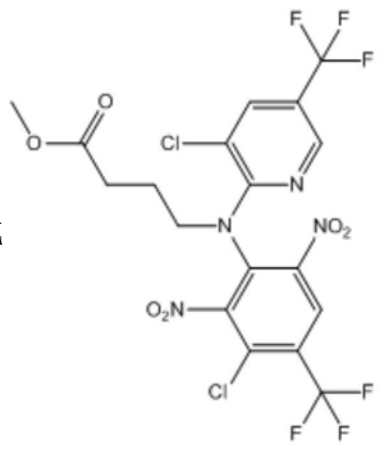
[0007] 本发明的第一个目的是提供一种氟啶胺半抗原,其具有如下结构式:



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

[0010] 1) 2,4-二氯-3,5-二硝基三氟甲苯与2-氨基丁酸甲酯-3-氯-5-三氟甲基吡啶发生

反应,得到中间体1,所述中间体1具有结构式



[0011] 2) 将所述中间体1进行水解反应,得到氟啶胺半抗原。

[0012] 进一步地,所述步骤1) 包括如下步骤:取2,4-二氯-3,5-二硝基三氟甲苯加有机溶剂溶解,加入无水碳酸钾和2-氨基丁酸甲酯-3-氯-5-三氟甲基吡啶,油浴加热反应,反应结束后,旋蒸,加入水,用乙酸乙酯进行萃取,收集有机相,有机相经蒸干后用二氯甲烷-环己烷打浆,抽滤,用正己烷洗涤,得到中间体1;其中,所述2,4-二氯-3,5-二硝基三氟甲苯、无水碳酸钾和2-氨基丁酸甲酯-3-氯-5-三氟甲基吡啶的物质的量之比为1:(2-3):(0.5-1.0)。

[0013] 进一步地,所述步骤2) 包括如下步骤:称取中间体1,加入碱性溶液,加热回流,进行水解反应;反应结束后用盐酸调节pH至微酸性,再用乙酸乙酯萃取,有机相经蒸干、过柱纯化后得到所述氟啶胺半抗原。

[0014] 本发明的第三个目的是提供一种氟啶胺人工抗原,所述氟啶胺人工抗原包括氟啶胺免疫抗原和氟啶胺包被抗原,所述氟啶胺人工抗原是载体蛋白和上述氟啶胺半抗原偶联得到的偶联物。

[0015] 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。

[0016] 本发明的第四个目的是提供一种氟啶胺人工抗原的制备方法,其中所述氟啶胺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21mg氟啶胺半抗原用1mL N,N-二甲基甲酰胺溶解,加入16mg碳二亚胺、13mg N-羟基琥珀酰亚胺,吹打混匀,室温反应4h,然后滴加到上述蛋白A液中,反应2h,用0.02mol/L PBS缓冲液透析纯化3天,分装冻存;

[0017] 所述氟啶胺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11mg氟啶胺半抗原用1mL N,N-二甲基甲酰胺溶解,加入0.3mL乙二胺,冷却到0-5℃,滴加86μL氯甲酸异丁酯,继续反应4h,然后滴加到上述蛋白B液中,反应2h,用0.02mol/L PBS缓冲液透析纯化3天,分装冻存。

[0018] 本发明的第五个目的是提供一种氟啶胺抗体,它是由上述氟啶胺免疫抗原经动物免疫得到,其能与氟啶胺发生特异性免疫反应。

[0019] 进一步地,所述氟啶胺抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0020] 本发明的第六个目的是提供上述氟啶胺抗体在检测氟啶胺残留中的应用。

[0021] 本发明具有如下有益效果:

[0022] 本发明提供的氟啶胺半抗原既最大程度保留了氟啶胺的特征结构,使得氟啶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;用氟啶胺半抗原与载体蛋白偶联后得到的氟啶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,为后续建立氟啶胺的各种免疫分析方法提供基础。

[0023] 本发明中氟啶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,制备的氟啶胺半抗原的纯度和收率较高。

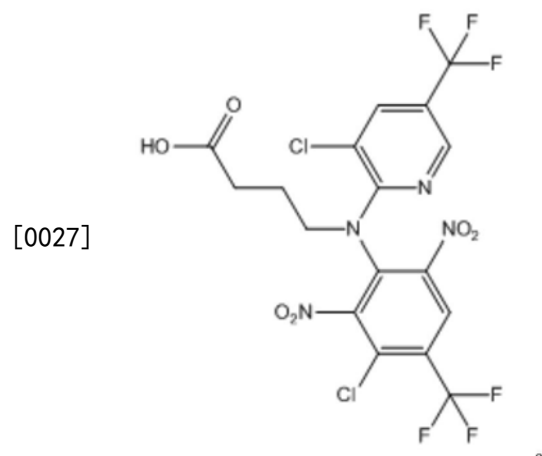
[0024] 采用本发明的氟啶胺免疫抗原得到的氟啶胺抗体的效价、特异性、亲和力都较好,灵敏度可达到0.1 μ g/L,与其他农药的交叉反应率低。

附图说明

[0025] 图1是本发明氟啶胺半抗原的合成路线

具体实施方式

[0026] 第一方面,本发明提供一种氟啶胺半抗原,其具有如下结构式:

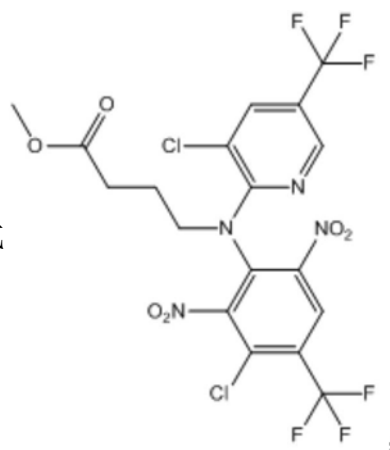


[0028] 本发明提供的氟啶胺半抗原既最大程度保留了氟啶胺的特征结构,使得氟啶胺半抗原的免疫原性明显增强,又具有可以与载体蛋白发生偶联的羧基;用氟啶胺半抗原与载体蛋白偶联后得到的氟啶胺免疫抗原去免疫动物,更有利于刺激动物免疫应答产生特异性更强、灵敏度更高的抗体。本发明的氟啶胺半抗原弥补了国内氟啶胺免疫学检测方法技术领域的空白,为氟啶胺免疫检测方法的进一步发展奠定了基础。

[0029] 第二方面,本发明提供上述氟啶胺半抗原的制备方法,其包括如下步骤:

[0030] 1) 2,4-二氯-3,5-二硝基三氟甲苯与2-氨基丁酸甲酯-3-氯-5-三氟甲基吡啶发生

反应,得到中间体1,所述中间体1具有结构式



[0031] 2) 将所述中间体1进行水解反应,得到氟啶胺半抗原。

[0032] 优选地,所述步骤1) 包括如下步骤:取2,4-二氯-3,5-二硝基三氟甲苯加有机溶剂溶解,加入无水碳酸钾和2-氨基丁酸甲酯-3-氯-5-三氟甲基吡啶,油浴加热反应,反应结束后,旋蒸,加入水,用乙酸乙酯进行萃取,收集有机相,有机相经蒸干后用二氯甲烷-环己烷打浆,抽滤,用正己烷洗涤,得到中间体1;其中,所述2,4-二氯-3,5-二硝基三氟甲苯、无水碳酸钾和2-氨基丁酸甲酯-3-氯-5-三氟甲基吡啶的物质的量之比为1: (2-3) : (0.5-1.0)。

[0033] 本发明在氟啶胺半抗原的制备中,无水碳酸钾起到为后续反应提供碱性条件的作用;所述2,4-二氯-3,5-二硝基三氟甲苯和2-氨基丁酸甲酯-3-氯-5-三氟甲基吡啶的物质的量之比 ≥ 1 ,通过这种设置,使得2,4-二氯-3,5-二硝基三氟甲苯过量,2-氨基丁酸甲酯-3-氯-5-三氟甲基吡啶可以完全反应,而过量的2,4-二氯-3,5-二硝基三氟甲苯可以直接蒸除,不仅可以提高中间体1的产率,而且分离纯化操作简单,中间体1的纯度高。

[0034] 优选地,所述步骤2) 包括如下步骤:称取中间体1,加入碱性溶液,加热回流,进行水解反应;反应结束后用盐酸调节pH至微酸性,再用乙酸乙酯萃取,有机相经蒸干、过柱纯化后得到所述氟啶胺半抗原。

[0035] 其中,所述碱性溶液为本领域进行该反应常用的碱性溶液,作为优选,所述碱性溶液采用2mol/L的氢氧化钠水溶液。本发明中并不具体限定所述碱性溶液的添加量,可以采用本领域进行该类反应常用的碱性溶液的添加量。该步骤下,反应具有更高的效率和稳定性。

[0036] 本发明根据氟啶胺的结构特点,合理设计氟啶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,制备的氟啶胺半抗原的纯度和收率较高。

[0037] 第三方面,本发明还提供一种氟啶胺人工抗原,所述氟啶胺人工抗原包括氟啶胺免疫抗原和氟啶胺包被抗原,所述氟啶胺人工抗原是载体蛋白和上述氟啶胺半抗原偶联得到的偶联物。

[0038] 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。

[0039] 氟啶胺半抗原分子仅具有免疫反应性,而不具有免疫原性。因此,为了赋予氟啶胺半抗原分子以免疫原性,还需要将该氟啶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氟啶胺人工抗原。

[0040] 第四方面,本发明还提供上述氟啶胺人工抗原的制备方法,其中所述氟啶胺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21mg氟啶胺半抗原用1mL N,N-二甲基甲酰胺溶解,加入16mg碳二亚胺、13mg N-羟基琥珀酰亚胺,吹打混匀,室温反应4h,然后滴加到上述蛋白A液中,反应2h,用0.02mol/L PBS缓冲液透析纯化3天,分装冻存;

[0041] 所述氟啶胺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11mg氟啶胺半抗原用1mL N,N-二甲基甲酰胺溶解,加入0.3mL乙二胺,冷却到0-5℃,滴加86μL氯甲酸异丁酯,继续反应4h,然后滴加到上述蛋白B液中,反应2h,用0.02mol/L PBS缓冲液透析纯化3天,分装冻存。

[0042] 第五方面,本发明还提供一种氟啶胺抗体,它是由上述氟啶胺免疫抗原经动物免疫得到,其能与氟啶胺发生特异性免疫反应。

[0043] 所述氟啶胺抗体可以为单克隆抗体或多克隆抗体。另外,对于所述氟啶胺抗体,可以采用本领域常规方法来进行制备。

[0044] 在一个具体的实施方案中,所述氟啶胺抗体为特异性针对上述氟啶胺半抗原的氟啶胺免疫抗原的鼠源单克隆抗体。

[0045] 采用本发明的氟啶胺免疫抗原得到的氟啶胺抗体的效价、特异性、亲和力都较好,与其他农药的交叉反应率低。

[0046] 第六方面,本发明还提供上述氟啶胺抗体在检测氟啶胺残留中的应用。

[0047] 本发明通过氟啶胺免疫抗原诱导免疫动物产生抗体,从而用于氟啶胺免疫检测分析中。

[0048] 所述的氟啶胺免疫检测包括但不限于氟啶胺ELISA试剂盒和氟啶胺胶体金试纸条。

[0049] 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。

[0050] 实施例1

[0051] 一种氟啶胺半抗原的制备方法,其包括如下步骤:

[0052] 1) 取0.304g 2,4-二氯-3,5-二硝基三氟甲苯加80mL乙腈溶解,加入0.32g无水碳酸钾和0.21g 2-氨基丁酸甲酯-3-氯-5-三氟甲基吡啶,油浴加热反应12h,反应结束后,旋蒸除去乙腈,加入60mL水,用80mL乙酸乙酯进行萃取,收集有机相,有机相经蒸干后用20mL体积比为1:3的二氯甲烷-环己烷打浆,抽滤,用正己烷洗涤,得到中间体1;

[0053] 2) 称取中间体1,加入碱性溶液,加热回流,进行水解反应;反应结束后用盐酸调节pH至微酸性,再用乙酸乙酯萃取,有机相经蒸干、过柱纯化后得到所述氟啶胺半抗原;其中,所述碱性溶液采用2mol/L的氢氧化钠水溶液。

[0054] 实施例2

[0055] 一种氟啶胺半抗原的制备方法,其包括如下步骤:

[0056] 1) 取0.304g 2,4-二氯-3,5-二硝基三氟甲苯加80mL乙腈溶解,加入0.28g无水碳酸钾和0.17g 2-氨基丁酸甲酯-3-氯-5-三氟甲基吡啶,油浴加热反应12h,反应结束后,旋蒸除去乙腈,加入60mL水,用80mL乙酸乙酯进行萃取,收集有机相,有机相经蒸干后用20mL体积比为1:3的二氯甲烷-环己烷打浆,抽滤,用正己烷洗涤,得到中间体1;

[0057] 2) 称取中间体1,加入碱性溶液,加热回流,进行水解反应;反应结束后用盐酸调节pH至微酸性,再用乙酸乙酯萃取,有机相经蒸干、过柱纯化后得到所述氟啶胺半抗原;其中,

所述碱性溶液采用2mol/L的氢氧化钠水溶液。

[0058] 实施例3

[0059] 一种氟啶胺半抗原的制备方法,其包括如下步骤:

[0060] 1) 取0.304g 2,4-二氯-3,5-二硝基三氟甲苯加80mL乙腈溶解,加入0.40g无水碳酸钾和0.27g 2-氨基丁酸甲酯-3-氯-5-三氟甲基吡啶,油浴加热反应12h,反应结束后,旋蒸除去乙腈,加入60mL水,用80mL乙酸乙酯进行萃取,收集有机相,有机相经蒸干后用20mL体积比为1:3的二氯甲烷-环己烷打浆,抽滤,用正己烷洗涤,得到中间体1;

[0061] 2) 称取中间体1,加入碱性溶液,加热回流,进行水解反应;反应结束后用盐酸调节pH至微酸性,再用乙酸乙酯萃取,有机相经蒸干、过柱纯化后得到所述氟啶胺半抗原;其中,所述碱性溶液采用2mol/L的氢氧化钠水溶液。

[0062] 实施例4

[0063] 一种氟啶胺免疫抗原的制备方法,步骤如下:

[0064] 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21mg实施例1中的氟啶胺半抗原用1mL N,N-二甲基甲酰胺溶解,加入16mg碳二亚胺、13mg N-羟基琥珀酰亚胺,吹打混匀,室温反应4h,然后滴加到上述蛋白A液中,反应2h,用0.02mol/L PBS缓冲液透析纯化3天,分装冻存。

[0065] 实施例5

[0066] 一种氟啶胺包被抗原的制备方法,步骤如下:

[0067] 将50mg卵清蛋白用0.05mol/L PB缓冲液溶解,得到蛋白B液;将11mg实施例1中的氟啶胺半抗原用1mL N,N-二甲基甲酰胺溶解,加入0.3mL乙二胺,冷却到0-5℃,滴加86μL氯甲酸异丁酯,继续反应4h,然后滴加到上述蛋白B液中,反应2h,用0.02mol/L PBS缓冲液透析纯化3天,分装冻存。

[0068] 实施例6

[0069] 一种氟啶胺抗体,其制备方法为:

[0070] 1. 动物免疫

[0071] 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氟啶胺免疫抗原;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。

[0072] 表1小鼠免疫程序

[0073]

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

[0074] 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:

[0075] (1) 用0.05mol/L pH9.6的碳酸盐缓冲液将氟脎胺包被抗原做1:1000稀释,每孔100μL包被酶标板,37℃孵育2h,甩掉包被液,以PBST洗涤1次,拍干;

[0076] (2) 每孔加入150μL封闭液,37℃反应2h后倾去封闭液,拍干;

[0077] (3) 每孔加入50μL以PBS倍比稀释的抗血清,25℃反应30min后倾去反应液,以PBST洗涤3~5次,每次间隔30s,拍干;

[0078] (4) 加PBS稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体(1:1000) 100μL/孔,25℃反应30min,以PBST洗涤3~5次,每次间隔30s,拍干;

[0079] (5) 每孔加入底物显色液A液和B液各50μL,25℃避光反应15min,每孔加入50μL 2mol/L的H₂SO₄溶液终止反应;

[0080] (6) 酶标仪测定波长在450nm的OD值,以样品孔OD₄₅₀接近于1的稀释倍数作为阳性血清的效价。

[0081] 2. 细胞融合

[0082] (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,100μL/孔滴加到培养板,置培养箱备用。

[0083] (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。

[0084] (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。

[0085] (4) 细胞混合:脾细胞:骨髓瘤细胞=8:1,混合,1500~2000r/min离心5min。

[0086] (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℃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100μL,置培养箱中。

[0087] 3. 细胞株筛选

[0088] 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,第二步选用氟脎胺为标准品,用间接竞争ELISA对阳性细胞进行抑制效果测定。选出对氟脎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氟脎胺单克隆抗体的细胞株。

[0089] 4. 腹水制备

[0090] 将液体石蜡注射6~8周Balb/c小鼠,500μL/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。

[0091] 5. 抗体纯化

[0092] 单克隆抗体采用辛酸-硫酸铵方法纯化。

[0093] 6. 抗体效价测定

[0094] 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,氟啶胺单克隆抗体的效价 ≥ 20000 。

[0095] 7. 抗体交叉反应性测定

[0096] 采用间接竞争ELISA方法测定,结果发现,氟啶胺单克隆抗体对氟啶胺及其他二硝基苯胺类农药的交叉反应率为:氟啶胺为100%,氟乐灵、二甲戊灵、氨磺乐灵、仲丁灵、氨氟乐灵、氨氟灵、甲磺乐灵、异丙乐灵均 $< 1\%$ 。由此可见,所制备的抗体特异性较好。

[0097] 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。

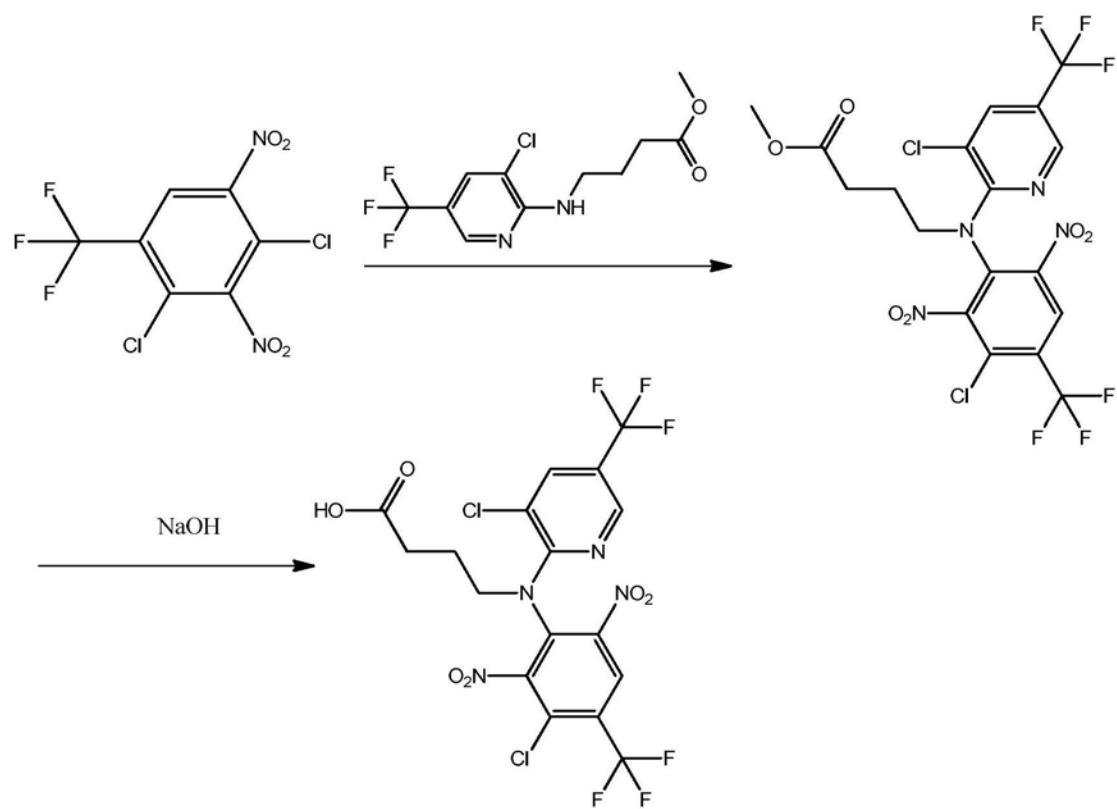


图1

专利名称(译)	氟啶胺半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN110498766A	公开(公告)日	2019-11-26
申请号	CN201910789678.5	申请日	2019-08-26
[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	崔廷婷 冯才伟 何方洋 刘玉梅 冯月君 魏力杰 赵正苗 马玉华		
发明人	崔廷婷 冯才伟 何方洋 刘玉梅 冯月君 魏力杰 赵正苗 马玉华		
IPC分类号	C07D213/74 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 C07K19/00 C07K1/02 G01N33/53		
CPC分类号	C07D213/74 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

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

