



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109265395 A

(43)申请公布日 2019.01.25

(21)申请号 201811104625.7

(22)申请日 2018.09.21

(71)申请人 中国烟草总公司郑州烟草研究院

地址 450001 河南省郑州市高新区枫杨街2号

申请人 国家烟草质量监督检验中心
北京勤邦生物技术有限公司(72)发明人 陈黎 范子彦 刘惠民 唐纲岭
颜权平 崔华鹏 樊美娟 万宇平
鲁亚辉 冯才伟(74)专利代理机构 郑州中民专利代理有限公司
41110

代理人 姜振东

(51)Int.Cl.

C07D 215/48(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

C07K 1/107(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

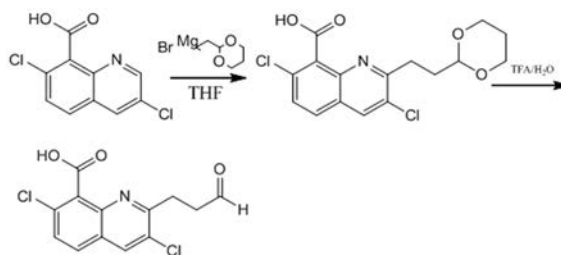
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

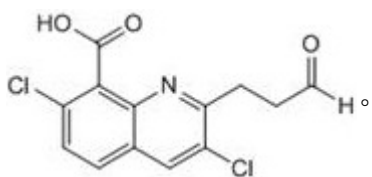
一种二氯喹啉酸半抗原与抗原的制备方法
及应用

(57)摘要

一种二氯喹啉酸半抗原与抗原的制备方法及应用,其特征在于:所述二氯喹啉酸半抗原是由二氯喹啉酸与(1,3-二氧杂环己基乙基)溴化镁反应生成丙缩醛二氯喹啉酸,再与三氟乙酸反应得到;所述二氯喹啉酸抗原是由二氯喹啉酸半抗原与载体蛋白偶联得到。本发明制备的抗原呈现出特异性的二氯喹啉酸抗原决定簇,使得筛选出高特异性的二氯喹啉酸单克隆抗体成为可能。产生的抗体特异性高、灵敏度高,可用于建立酶联免疫吸附测定方法和胶体金试纸快速测定法,从而实现食品及植烟土壤中二氯喹啉酸的快速检测。



1. 一种二氯喹啉酸半抗原的制备方法, 其特征在于: 是由二氯喹啉酸与(1,3-二氧杂环己基乙基) 溴化镁反应生成丙缩醛二氯喹啉酸, 再与三氟乙酸反应得到, 其分子结构式为:



2. 如权利要求1所述的二氯喹啉酸半抗原的制备方法, 其特征在于: 该制备方法的具体步骤如下:

1) 取二氯喹啉酸1.00 g, 加50 mL干燥无水四氢呋喃溶解澄清, 逐滴加入含有1.10 g (1,3-二氧杂环己基乙基) 溴化镁的无水四氢呋喃溶液10 mL, 0℃搅拌2 h; 迅速与100 mL 0-5℃的氯化铵水溶液混合, 立即加100 mL乙醚萃取, 振荡, 静置分层, 有机相无水硫酸钠干燥, 旋蒸, 浓缩, 蒸干, 上硅胶柱, 用体积比为10:1的二氯甲烷/甲醇洗脱分离, 得到中间体丙缩醛二氯喹啉酸1.41 g;

2) 取丙缩醛二氯喹啉酸1.40 g, 加10 mL三氟乙酸溶解, 加10 mL水, 50℃搅拌反应2 h; TLC检测, 原料基本反应完全; 停止反应, 冷却到室温, 旋蒸除去三氟乙酸, 加50 mL水, 用0.1 mol/L氢氧化钠调节pH值到5, 50 mL乙酸乙酯萃取, 浓缩, 用体积比为1:1的乙醇/正己烷重结晶, 得到二氯喹啉酸半抗原产物1.06 g。

3. 如权利要求1所述方法制备的二氯喹啉酸半抗原的应用, 其特征在于: 二氯喹啉酸半抗原可用于制作动物免疫的抗原体系原料。

4. 一种二氯喹啉酸抗原的制备方法, 其特征在于: 是由权利要求1制备的二氯喹啉酸半抗原与载体蛋白偶联得到。

5. 如权利要求4所述的二氯喹啉酸抗原的制备方法, 其特征在于: 所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白。

6. 如权利要求4或5所述的二氯喹啉酸抗原的制备方法, 其特征在于: 具体步骤如下: 取二氯喹啉酸半抗原11 mg, 加乙醇0.3 mL溶解, 澄清, 得到A液; 另取牛血清白蛋白50 mg, 加0.05 mol/L碳酸钠溶液溶解, 得到B液, 将A液逐滴加入到B液中, 室温搅拌反应16 h; 0.02 M磷酸盐缓冲液(PBS)透析纯化三天, 每天换液三次, 得到二氯喹啉酸-牛血清白蛋白偶联物即二氯喹啉酸抗原, 分装, -20℃保存。

7. 如权利要求4或5所述的二氯喹啉酸抗原的制备方法, 其特征在于: 具体步骤如下: 取二氯喹啉酸半抗原5 mg, 加甲醇0.2 mL溶解, 澄清, 得到A液; 另取卵清白蛋白50 mg, 加0.05 mol/L碳酸钠溶液溶解, 得到B液, 将A液逐滴加入到B液中, 室温搅拌反应16 h; 0.02 M PBS透析纯化三天, 每天换液三次, 得到二氯喹啉酸-卵清蛋白偶联物即二氯喹啉酸抗原, 分装, -20℃保存。

8. 如权利要求4所述方法制备的二氯喹啉酸抗原的应用, 其特征在于: 采用二氯喹啉酸抗原免疫动物得到的单克隆抗体, 可用于建立酶联免疫吸附测定方法和胶体金试纸快速测定法, 从而实现烟草、土壤及食品中二氯喹啉酸的快速检测。

一种二氯喹啉酸半抗原与抗原的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种二氯喹啉酸半抗原与抗原的制备方法及应用。属于农药免疫化学技术领域。

背景技术

[0002] 二氯喹啉酸属激素型喹啉羧酸类除草剂,主要用于防除稻田单子叶杂草,尤其对稗草有极高的活性,是我国稻田主要除草剂品种之一。该药能被萌发的种子、根及叶子吸收,具有激素性除草剂的特点,与生长素类物质的作用症状相似。由于二氯喹啉酸显酸性,在酸性土壤中降解缓慢,容易给后茬敏感作物造成严重危害,水稻田施用二氯喹啉酸后的近300天内,除水稻外,不能种植任何作物;两年内不能种植烟草、茄子、番茄、胡萝卜、芹菜等作物,不能用施过二氯喹啉酸的水灌上述作物。

[0003] 目前常用的二氯喹啉酸检测方法主要是仪器方法,如高效液相色谱法、液相色谱串联质谱法,采用这些分析方法需要昂贵的仪器和专门的技术人员,样品前处理过程复杂且花费高、费时长,难以满足大量样品和现场样品快速检测的需要。基于抗原抗体特异性识别的免疫分析方法可以定性定量检测样品中的农药残留。这种分析方法对仪器设备要求不高、快速简便,一般无需对样品进行复杂的预处理,灵敏度高、特异性强,对使用人员的专业技术要求不高,容易普及和推广,可满足快速分析检测的需要,尤其适宜现场筛选和大量样品的快速分析。免疫分析为二氯喹啉酸残留研究提供了一个新的分析检测途径。免疫分析目前已成为农药残留分析研究的一个崭新领域,美国化学会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三大支柱技术。我国农药免疫分析技术研究起步相对较晚,但近年来发展迅速,有关于对硫磷、甲基对硫磷、甲基对氧磷、多菌灵、毒死蜱、三唑磷、氟虫腈、克百威、三唑酮、甲胺磷、阿特拉津、2甲4氯等农药的人工抗原和高亲和力的特异性抗体的制备及用酶联免疫法进行样品中痕量农药分析的报道。

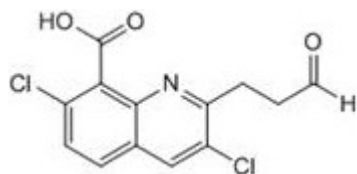
[0004] 本发明属于农药小分子化合物免疫化学和残留分析技术领域,涉及有机合成、免疫化学及生物化学等,依靠免疫学、免疫化学基本原理和生物技术手段,设计、合成小分子目标分析物半抗原,并与载体蛋白质偶联,制备有效人工抗原。制备的抗原可以通过免疫动物制备对小分子分析物特异性识别的抗体,利用抗原抗体的特异性免疫学反应和易被检测识别的标记物的放大作用,定量的检测样品中超微量小分子目标物。半抗原的分子设计与合成是产生特异性抗体和建立农药残留免疫分析方法的关键步骤。人工抗原的制备,包括结合位点、结合方式、载体种类及半抗原与目标分析物质任何结构上的差异,诸如分子大小、形状、成分、构型、构象、极性、电子云密度等在内的拓扑性征,都可能极大的影响着相应抗体的性质。能否设计出性能、效果更好的半抗原与抗原,正是本发明所关注的重点。

发明内容

[0005] 本发明的目的正是基于上述现有技术状况而提供一种二氯喹啉酸半抗原与抗原的制备方法。

[0006] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的：

一种二氯喹啉酸半抗原的制备方法，是由二氯喹啉酸与(1,3-二氧杂环己基乙基)溴化镁反应生成丙缩醛二氯喹啉酸，再与三氟乙酸反应得到，其分子结构式为：



具体步骤如下：

1) 取二氯喹啉酸1.00 g，加50 mL干燥无水四氢呋喃溶解澄清，逐滴加入含有1.10 g (1,3-二氧杂环己基乙基)溴化镁的无水四氢呋喃溶液10 mL，0℃搅拌2 h；迅速与100 mL 0-5℃的氯化铵水溶液混合，立即加100 mL乙醚萃取，振荡，静置分层，有机相无水硫酸钠干燥，旋蒸，浓缩，蒸干，上硅胶柱，用体积比为10:1的二氯甲烷/甲醇洗脱分离，得到中间体丙缩醛二氯喹啉酸1.41 g；

2) 取丙缩醛二氯喹啉酸1.40 g，加10 mL三氟乙酸溶解，加10 mL水，50℃搅拌反应2 h；TLC检测，原料基本反应完全；停止反应，冷却到室温，旋蒸除去三氟乙酸，加50 mL水，用0.1 mol/L氢氧化钠调节pH值到5，50 mL乙酸乙酯萃取，浓缩，用体积比为1:1的乙醇/正己烷重结晶，得到二氯喹啉酸半抗原产物1.06 g。

[0007] 所述二氯喹啉酸半抗原可用于制作动物免疫的抗原体系原料。

[0008] 一种二氯喹啉酸抗原的制备方法，是由按上述制备方法得到的二氯喹啉酸半抗原与载体蛋白偶联得到，所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白。

[0009] 具体步骤如下：

免疫抗原的制备：取二氯喹啉酸半抗原11 mg，加乙醇0.3 mL溶解，澄清，得到A液；另取牛血清白蛋白50 mg，加0.05 mol/L碳酸钠溶液溶解，得到B液，将A液逐滴加入到B液中，室温搅拌反应16 h。0.02 M PBS透析纯化三天，每天换液3次，得到二氯喹啉酸-BSA偶联物抗原，即为免疫原。

[0010] 包被抗原的制备：取二氯喹啉酸半抗原5 mg，加甲醇0.2 mL溶解，澄清，得到A液；另取卵清白蛋白50 mg，加0.05 mol/L碳酸钠溶液溶解，得到B液，将A液逐滴加入到B液中，室温搅拌反应16 h。0.02 M PBS透析纯化三天，每天换液3次，得到二氯喹啉酸-OVA偶联物抗原，即为包被原。

[0011] 采用二氯喹啉酸抗原免疫动物得到的单克隆抗体，可用于建立酶联免疫吸附测定方法和胶体金试纸快速测定法，从而实现烟草及食品中二氯喹啉酸的快速检测，可快速检测食品及植烟土壤中的二氯喹啉酸残留。

[0012] 本发明中合成的二氯喹啉酸半抗原及抗原与申请号为200410018337.1、201610145337.0、201610151290.9的专利中的半抗原及抗原结构不同。本发明中合成的二氯喹啉酸半抗原既最大程度的保留了二氯喹啉酸的化学结构，又有合适长度的连接臂，用该半抗原制备的免疫原去免疫动物，得到的抗体的效价、特异性、亲和力都比较好，与其他农药的交叉反应率低，特异性更好，灵敏度更高。

[0013] 本发明制备的抗原呈现出特异性的二氯喹啉酸抗原决定簇，使得筛选出高特异性

的二氯喹啉酸单克隆抗体成为可能。产生的抗体特异性高、灵敏度高,可用于建立酶联免疫吸附测定方法和胶体金试纸快速测定法,从而实现食品及植烟土壤中二氯喹啉酸的快速检测。

附图说明

[0014] 图1 二氯喹啉酸半抗原合成路线图。

具体实施方式

[0015] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。

[0016] 实施例1 二氯喹啉酸半抗原的制备

1、二氯喹啉酸半抗原的制备

1) 取二氯喹啉酸1.00 g,加50 mL干燥无水四氢呋喃溶解澄清,逐滴加入含有1.10 g (1,3-二氧杂环己基乙基) 溴化镁的无水四氢呋喃溶液10 mL,0℃搅拌2 h;迅速与100 mL 0-5℃的氯化铵水溶液混合,立即加100 mL乙醚萃取,振荡,静置分层,有机相无水硫酸钠干燥,旋蒸,浓缩,蒸干,上硅胶柱,用体积比为10:1的二氯甲烷/甲醇洗脱分离,得到中间体丙缩醛二氯喹啉酸1.41 g,收率95.92%;

2) 取丙缩醛二氯喹啉酸1.40 g,加10 mL三氟乙酸溶解,加10 mL水,50℃搅拌反应2 h;TLC检测,原料基本反应完全;停止反应,冷却到室温,旋蒸除去三氟乙酸,加50 mL水,用0.1 mol/L氢氧化钠调节pH值到5,50 mL乙酸乙酯萃取,浓缩,用体积比为1:1的乙醇/正己烷重结晶,得到二氯喹啉酸半抗原产物1.06 g,收率90.60%。

[0017] 2、二氯喹啉酸半抗原的鉴定

核磁鉴定¹H NMR(CDC13,300MHZ) δ : 11.01 (1H, t), 8.223 (1H, dd, J=1.577, J=0.443), 3.205 (2H, t, J=6.096), 2.841 (2H, dt, J=6.370, J=6.096), 8.315 (1H, dd, J=8.532, J=1.577), 9.673 (1H, t, J=6.370), 7.738 (1H, dd, J=8.532, J=0.443)。

[0018] 化学位移 δ =9.672的为间隔臂上醛基氢共振吸收峰, δ =2.841、3.205的为间隔臂上亚甲基氢的共振吸收峰,这些峰的存在,证明间隔臂偶联成功,二氯喹啉酸半抗原结构正确。

[0019] 实施例2 二氯喹啉酸抗原的制备

1、免疫抗原的制备

二氯喹啉酸半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到免疫原。

[0020] 取二氯喹啉酸半抗原11 mg,加乙醇0.3 mL溶解,澄清,得到A液;另取牛血清白蛋白50 mg,加0.05 mol/L碳酸钠溶液溶解,得到B液,将A液逐滴加入到B液中,室温搅拌反应16 h。0.02 M PBS透析纯化三天,每天换液3次,得到二氯喹啉酸-BSA偶联物抗原,即为免疫原。分装,-20℃保存,备用。

[0021] 2、包被抗原的制备

取二氯喹啉酸半抗原5 mg,加甲醇0.2 mL溶解,澄清,得到A液;另取卵清白蛋白50 mg,加0.05 mol/L碳酸钠溶液溶解,得到B液,将A液逐滴加入到B液中,室温搅拌反应16 h。0.02 M PBS透析纯化三天,每天换液3次,得到二氯喹啉酸-OVA偶联物抗原,即为包被原。分装-20

℃保存,备用。

[0022] 3、二氯喹啉酸抗原的鉴定

按合成二氯喹啉酸偶联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(200 ~ 400 nm)扫描测定,通过比较三者分别在260 nm和280 nm的吸光度值计算其结合比。偶联物二氯喹啉酸半抗原-载体蛋白的最大吸收峰与二氯喹啉酸半抗原、载体蛋白的最大吸收峰相比发生了明显的变化,表明二氯喹啉酸半抗原-载体蛋白的合成是成功的。经计算,半抗原与BSA的结合比为20:1,与OVA的结合比为12:1。

[0023] 实施例3 二氯喹啉酸单克隆抗体的制备

1、动物免疫

将步骤2得到的免疫原注入Balb/c小鼠体内,免疫剂量为150μg/只,使其产生抗血清。

[0024] 2、细胞融合和克隆化

取免疫Balb/c小鼠脾细胞,按8:1(数量配比)比例与SP2/0骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争ELISA法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0025] 3、细胞冻存和复苏

将杂交瘤细胞用冻存液制成 1×10^6 个/ml的细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0026] 4、单克隆抗体的制备与纯化

增量培养法:将杂交瘤细胞置于细胞培养基中,在37℃条件下进行培养,用辛酸-饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化,得到单克隆抗体,-20℃保存。

[0027] 所述细胞培养基为向RPMI1640培养基中添加小牛血清和碳酸氢钠,使小牛血清在细胞培养基中的终浓度为20%(质量分数),碳酸氢钠在细胞培养基中的终浓度为0.2%(质量分数);所述细胞培养基的pH为7.4。

[0028] 5、单克隆抗体效价的测定

用间接竞争 ELISA法测定抗体的效价为1:(100000~800000)。

[0029] 间接竞争ELISA方法:用二氯喹啉酸半抗原-OVA偶联物包被酶标板,加入二氯喹啉酸标准品溶液、二氯喹啉酸单克隆抗体溶液和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体溶液,25℃反应30 min,倒出孔内液体,用洗涤液洗涤3~5次,用吸水纸拍干;加入底物显色液,25℃反应15 min后,加入终止液终止反应;设定酶标仪于波长450 nm处测定每孔吸光度值。

[0030] 6、单克隆抗体特异性的测定

抗体特异性是指它同特异性抗原结合的能力与同该类抗原类似物结合能力的比较,常用交叉反应率作为评价标准。交叉反应越小,抗体的特异性则越高。

[0031] 本实验将二氯喹啉酸、氯钾喹啉酸、喹草酸、二甲戊灵、仲丁灵、氟节胺做系列稀释,分别与单克隆抗体进行间接竞争ELISA,制作标准曲线,分析得到IC₅₀,然后按下式计算交叉反应率:

交叉反应率 (%) =	引起 50%抑制的二氯喹啉酸浓度	×100%
	引起 50%抑制的其他除草剂浓度	

结果显示各类似物的交叉反应率为:二氯喹啉酸100%、氯钾喹啉酸<1%、喹草酸<1%、

二甲戊灵<1%、仲丁灵<1%、氟节胺<1%。本发明抗体对氯钾喹啉酸、喹草酸、二甲戊灵、仲丁灵、氟节胺等其他除草剂无交叉反应,只针对二氯喹啉酸有特异性结合。

[0032] 实施例4 检测二氯喹啉酸的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测二氯喹啉酸的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

1) 包被二氯喹啉酸偶联抗原的酶标板;

酶标板的制备:用包被缓冲液将包被原稀释成20 $\mu\text{g/mL}$,每孔加入100 μL ,25 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育2h,倾去孔中液体,用洗涤液洗涤2次,每次30 s,拍干,然后在每孔中加入200 μL 封闭液,25 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育2h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0033] 2) 二氯喹啉酸标准品溶液6瓶,浓度分别为0 $\mu\text{g/L}$ 、0.5 $\mu\text{g/L}$ 、1.5 $\mu\text{g/L}$ 、4.5 $\mu\text{g/L}$ 、13.5 $\mu\text{g/L}$ 、40.5 $\mu\text{g/L}$;

3) 二氯喹啉酸特异性抗体工作液;

4) 用辣根过氧化物酶标记的二氯喹啉酸二抗;

5) 底物显色液由A液和B液组成,A液为过氧化脲,B液为四甲基联苯胺;

6) 终止液为2 mol/L硫酸溶液;

7) 洗涤液为pH值为7.4,含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01‰~0.03‰叠氮化钠防腐剂、0.1~0.3 mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比;

8) 复溶液为pH值为7.0、0.02 mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0034] 实施例5 土壤中二氯喹啉酸的检测

1、样品前处理

称取 1.0 ± 0.05 g过筛后的土壤样本至15 mL聚苯乙烯离心管中,加入5 mL去离子水,涡旋3 min,混匀,3000 rpm室温(20~25 $^{\circ}\text{C}$)离心5 min;移取500 μL 上清液至2 mL聚苯乙烯离心管中,加入500 μL 样本复溶工作液,充分混匀。取50 μL 用于分析。

[0035] 2、用试剂盒检测

加入标准品/样本50 μL 到对应的微孔中,然后加入抗体工作液50 μL /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应30 min。小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,加入洗涤工作液250 μL /孔,充分洗涤4~5次,每次间隔10 s,泼掉板孔内洗涤液,用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破)。加入酶标二抗100 μL /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应30 min,取出重复洗板。加入底物液A液50 μL /孔,再加入底物液B液50 μL /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应15 min。加入终止液50 μL /孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450 nm处,参比波长620 nm,测定每孔OD值。

[0036] 3、检测结果分析

标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的吸光度值的平均值(双孔)除以第一个标准品(0标准)的吸光度值的平均值,再乘以100%,得到标准品或样本的百分吸光度值。以标准品百分吸光率为纵坐标,以二氯喹啉酸标准品浓度的对数为横坐标,绘制标准曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样本所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中二氯喹啉酸的实际浓度。

[0037] 实施例6 二氯喹啉酸技术参数的确定试验

1、试剂盒灵敏度和检测限

按照常规方法测定试剂盒灵敏度,标准曲线的范围为0~40.5 $\mu\text{g/L}$, IC_{50} (50%抑制浓度)浮动范围为2.3~5.8 $\mu\text{g/L}$;对20份样品进行检测,从标准曲线上查出对应于各百分吸光度值的浓度,以20份样本浓度的平均值加上3倍标准差表示检测限,结果显示,该方法对土壤的检测限均为5 $\mu\text{g/kg}$ 。

[0038] 2、样本精密度和准确度试验

以回收率作为准确度评价指标,重复测定某一浓度样品的检测结果相对标准偏差(RSD%)作为精密度评价指标。计算公式为:回收率(%)=实际测定值/理论值 $\times$ 100%,其中理论值为样品的添加浓度;相对标准偏差 $\text{RSD}\% = \text{SD}/\bar{X} \times 100\%$,其中SD为标准偏差, $\bar{X}$ 为测定数据的平均值。

[0039] 按5 $\mu\text{g/kg}$ 、10 $\mu\text{g/kg}$ 、50 $\mu\text{g/kg}$ 三个浓度的二氯喹啉酸分别对土壤样品进行添加回收测定,每个样品做4个平行,用三批不同试剂进行测定,计算样品的平均回收率及精密度结果见下表。

[0040] 表1 精密度及准确度试验

二氯喹啉酸	添加浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率范围 ($n=4$)%	批内 $\text{RSD}(n=4)\%$	批间 $\text{RSD}(n=3)\%$
土壤	5	85.6~96.1	8.9	9.4
	10	88.3~102.4	7.3	8.7
	50	82.0~104.7	8.2	9.7

以5 $\mu\text{g/kg}$ 、10 $\mu\text{g/kg}$ 、50 $\mu\text{g/kg}$ 三个浓度的二氯喹啉酸分别对土壤进行添加,土壤的平均回收率在82.0%~104.7%之间;批内、批间相对标准偏差均小于10%。

[0041] 3、试剂盒稳定性试验

试剂盒保存条件为2~8 $^{\circ}\text{C}$,经过12个月的测定,试剂盒的最大吸光度值(零标准)、50%抑制浓度、二氯喹啉酸添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中,会有非正常保存条件出现,将试剂盒在37 $^{\circ}\text{C}$ 保存条件下放置7天,进行加速老化实验,结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生,将试剂盒放入-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻7天,测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在2~8 $^{\circ}\text{C}$ 至少保存12个月以上。

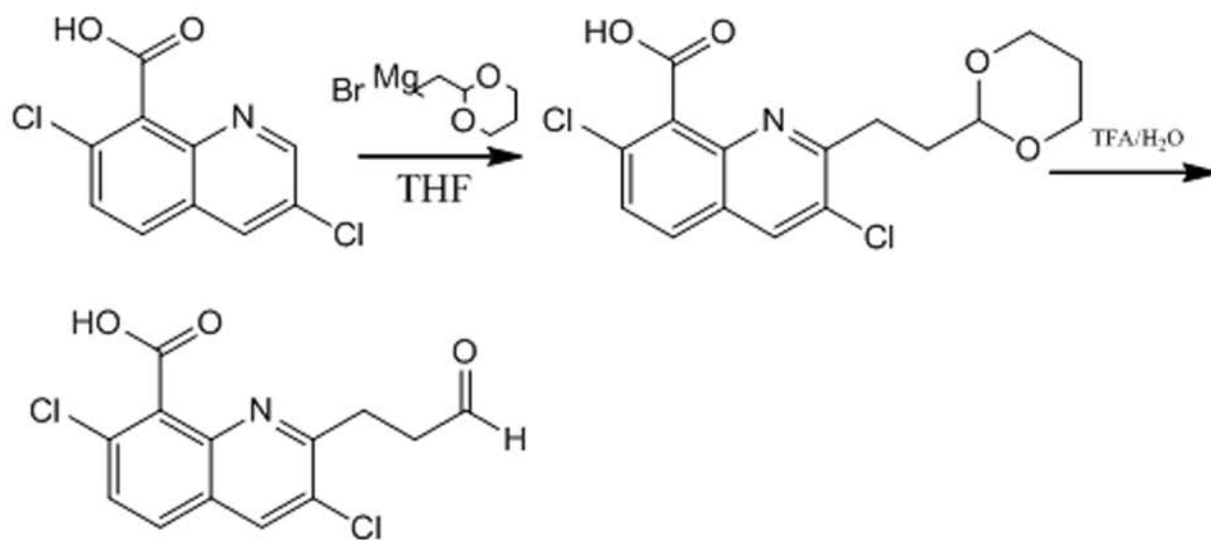


图1

专利名称(译)	一种二氯喹啉酸半抗原与抗原的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN109265395A	公开(公告)日	2019-01-25
申请号	CN201811104625.7	申请日	2018-09-21
[标]申请(专利权)人(译)	中国烟草总公司郑州烟草研究院 国家烟草质量监督检验中心 北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	中国烟草总公司郑州烟草研究院 国家烟草质量监督检验中心 北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中国烟草总公司郑州烟草研究院 国家烟草质量监督检验中心 北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	陈黎 范子彦 刘惠民 唐纲岭 颜权平 崔华鹏 樊美娟 万宇平 鲁亚辉 冯才伟		
发明人	陈黎 范子彦 刘惠民 唐纲岭 颜权平 崔华鹏 樊美娟 万宇平 鲁亚辉 冯才伟		
IPC分类号	C07D215/48 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 C07K11/107 G01N33/532 G01N33/535 G01N33/558 G01N33/577		
CPC分类号	C07D215/48 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/532 G01N33/535 G01N33/558 G01N33/577		
代理人(译)	姜振东		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种二氯喹啉酸半抗原与抗原的制备方法及应用，其特征在于：所述二氯喹啉酸半抗原是由二氯喹啉酸与(1,3-二氧杂环己基乙基)溴化镁反应生成丙缩醛二氯喹啉酸，再与三氟乙酸反应得到；所述二氯喹啉酸抗原是由二氯喹啉酸半抗原与载体蛋白偶联得到。本发明制备的抗原呈现出特异性的二氯喹啉酸抗原决定簇，使得筛选出高特异性的二氯喹啉酸单克隆抗体成为可能。产生的抗体特异性高、灵敏度高，可用于建立酶联免疫吸附测定方法和胶体金试纸快速测定法，从而实现食品及植烟土壤中二氯喹啉酸的快速检测。

