

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018 年 11 月 1 日 (01.11.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/196572 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 5/20 (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/081834

(22) 国际申请日: 2018 年 4 月 4 日 (04.04.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710280910.3 2017年4月26日 (26.04.2017) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省无锡蠡湖大道 1800 号耿
晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 匡华(KUANG, Hua); 中国江苏省无锡蠡
湖大道 1800 号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。 姚

蕾琨(YAO, Leijun); 中国江苏省无锡蠡湖大道
1800 号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。 胥传来
(XU, Chuanlai); 中国江苏省无锡蠡湖大道 1800
号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。 徐丽广(XU,
Liguang); 中国江苏省无锡蠡湖大道 1800 号耿
晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。 马伟(MA, Wei); 中
国江苏省无锡蠡湖大道 1800 号耿晓岳, Jiangsu
214122 (CN)。 刘丽强(LIU, Liqiang); 中国江苏
省无锡蠡湖大道 1800 号耿晓岳, Jiangsu 214122
(CN)。 吴晓玲(WU, Xiaoling); 中国江苏省无锡
蠡湖大道 1800 号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。
宋珊珊(SONG, Shanshan); 中国江苏省无锡蠡湖
大道 1800 号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。 胡拥
明(HU, Yongming); 中国江苏省无锡蠡湖大道
1800 号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代
理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL

(54) Title: IPRODIONE MONOCLONAL ANTIBODY HYBRIDOMA CELL STRAIN ZXL-2 AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一株异菌脲单克隆抗体杂交瘤细胞株ZXL-2及其应用

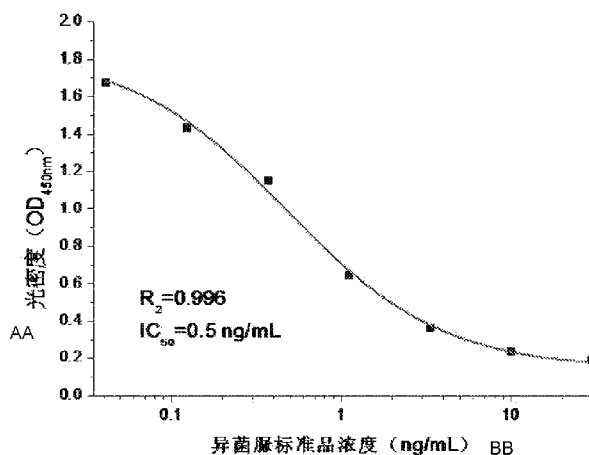


图 1

AA Optical density
BB Iprodione standard concentration

(57) Abstract: Provided is an iprodione monoclonal antibody hybridoma cell strain ZXL-2, which has been collected in the China General Microbiological Culture Collection Center, with the accession number being CGMCC No. 13093. A monoclonal antibody secreted by the hybridoma cell strain ZXL-2 has relatively good specificity and detection sensitivity (IC₅₀ value is 5 ng/mL) to iprodione. The hybridoma cell strain ZXL-2 is used for immunodetection of an iprodione residue in food.

(57) 摘要: 提供了一株异菌脲单克隆抗体杂交瘤细胞株ZXL-2, 已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号为CGMCC No.13093。该杂交瘤细胞株ZXL-2分泌的单克隆抗体对异菌脲具有较好的特异性和检测灵敏度(IC₅₀值为5ng/mL)。该杂交瘤细胞株ZXL-2用于食品中异菌脲残留的免疫检测。

PROPERTY AGENCY CO.,LTD.); 中国黑龙江省
哈尔滨松北区科技一街99号18栋E501耿
晓岳, Heilongjiang 150028 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
- 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于
生物材料保藏的说明 (细则13之二. 4(d)(i) 和
48.2(a)(viii))。

一株异菌脲单克隆抗体杂交瘤细胞株 ZXI-2 及其应用

技术领域

本发明涉及一株异菌脲单克隆抗体杂交瘤细胞株 ZXI-2 及其应用，属于食品安全免疫检测领域。

背景技术

异菌脲 (iprodione, 又称扑海因) 是一种二甲酰亚胺类高效广谱、触杀型低毒杀菌剂, 适用于防治多种果树、蔬菜、瓜果类等作物早期落叶病、灰霉病、早疫病等病害。科学研究信息表明, 若根据现有标签使用, 异菌脲对人类健康造成的风险已不符合标准, 因此加拿大有害生物管理局 (PMRA) 于 2016 年建议取消杀菌剂异菌脲的所有用途。我国农药残留限量标准规定香蕉、苹果、油菜籽中异菌脲的最大残留限量值 (MRL) 分别为 10、5、2 mg/kg。CAC、日本、美国和欧盟也制定了其在水果、蔬菜和粮食中的 MRL 值, 并对其残留量进行监测。

为了有效监督监测食品中使用异菌脲的情况, 需要寻找一种特异性好, 灵敏度高的测定方法, 而目前检测方法如薄层层析法、气相色谱法、液相色谱法等, 分离纯化过程冗长, 灵敏度低, 加上食品中干扰物多, 难以获得准确结果。因此建立快速简便的异菌脲检测方法具有重要意义。酶联免疫法 (ELISA) 是一种极为高效、敏感、快速的检测方法, 检测时对样本的纯度要求不高而且操作简便, 适用于大量样本的现场快速检测。建立高效的免疫学检测方法, 筛选高特异性的单克隆抗体是重要前提。

发明内容

本发明的目的是提供一株异菌脲单克隆抗体杂交瘤细胞株, 由该细胞株制备的抗体对异菌脲具有较好特异性和检测灵敏度, 可以用来建立异菌脲的免疫学检测方法。

本发明的技术方案: 一株异菌脲单克隆抗体杂交瘤细胞株 ZXI-2, 已于 2016 年 10 月 31 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 简称 CGMCC, 保藏编号为 CGMCC No.13093。

本发明还提供异菌脲单克隆抗体, 它由所述保藏编号为 CGMCC No.13093 的异菌脲单克隆抗体杂交瘤细胞株 ZXI-2 分泌产生。

本发明还提供所述异菌脲单克隆抗体或交瘤细胞株 ZXI-2 在食品安全检测中用于分析检测异菌脲残留的用途。例如, 用于制备检测异菌脲的工具或者直接用于检测异菌脲。例如开发基于酶联免疫技术的试剂盒或者基于免疫层析的试纸条。

本发明还提供异菌脲单克隆抗体杂交瘤细胞株 ZXL-2 的制备方法，包括以下步骤：

1) 半抗原的合成：

将异菌脲 (15.0 g, 45.45 mmol)，三乙胺 (4.59 g, 45.45 mmol)，3-巯基丙酸 (4.82 g, 45.45 mmol) 和四三苯基磷钨 (5.24 g, 4.545 mmol) 加入到乙二醇二甲醚 (50.0 mL) 中，氮气保护下升温至 100℃ 过夜。向反应液中加纯水 (100 mL)，二氯甲烷萃取 (100 mL×3 次)，饱和食盐水洗一次，无水硫酸钠干燥，浓缩得粗品，制备得半抗原 IPMA。

2) 完全抗原的制备：

免疫原 IPMA-KLH 的制备：称取 4.2mg IPMA，1-乙基碳二亚胺盐酸盐 7mg，N-羟基琥珀酰亚胺 4mg，用 300μL 无水 N,N-二甲基甲酰胺溶解(称为 A 液)，室温搅拌反应 4~5h。取匙孔血蓝蛋白 KLH 1.47mL(6.8mg/mL, IPMA 与 KLH 摩尔比为 4500:1)，加入等体积硼酸缓冲溶液 (称为 B 液)，在室温条件，逐滴将 A 液加入到 B 液中，室温反应过夜，即得偶联物 IPMA-KLH 混合液，通过透析分离完全抗原和未偶联的小分子半抗原；

包被原 IPMA-BSA 的制备：称取 2.5mg IPMA，1-乙基碳二亚胺盐酸盐 4mg，N-羟基琥珀酰亚胺 2.5mg，用 300μL 无水 N,N-二甲基甲酰胺溶解(称为 A 液)，室温搅拌反应 4~5h。称取 10mg 牛血清蛋白 BSA (IPMA 与 BSA 摩尔比为 30:1)，溶解于 2mL 硼酸缓冲溶液中，在室温条件下，逐滴将 A 液加入到 B 液中，室温反应过夜，即得偶联物 IPMA-BSA 混合液，通过透析分离完全抗原和未偶联的小分子半抗原。

3) 小鼠的免疫：IPMA-KLH 完全抗原与等量弗氏佐剂混合乳化后，通过背部皮下注射免疫 BALB/c 小鼠。首次免疫用完全弗氏佐剂，多次加强免疫用不完全弗氏佐剂。首次免疫与第二次加强免疫之间间隔一个月，多次加强免疫之间间隔 21 天。最后一次用 IPMA-KLH 完全抗原 (不含佐剂) 冲击免疫；通过间接竞争酶联免疫法 (ic-ELISA) 检测血清效价和抑制；

4) 细胞融合与细胞株建立：通过聚乙二醇 (PEG4000) 法将小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞融合，通过 HAT 培养基培养，利用间接竞争酶联免疫法 (ic-ELISA) 检测阳性细胞孔，并进一步利用 ic-ELISA 测定阳性细胞孔的抑制效果，通过有限稀释法对有最好抑制的阳性细胞孔进行三次亚克隆，最终筛选获得异菌脲单克隆抗体杂交瘤细胞株 ZXL-2；

5) 杂交瘤细胞株性质的鉴定：通过 ic-ELISA 测定灵敏度和特异性。

取高效价低 IC₅₀ 小鼠的脾细胞，通过 PEG 方法与小鼠骨髓瘤细胞融合，经过间接竞争酶联免疫法筛选和三次亚克隆，得到一株杂交瘤细胞株 ZXL-2。

本发明的有益效果：本发明提供的细胞株 ZXL-2 分泌的单克隆抗体，对异菌脲具有较好的特异性和检测灵敏度 (IC₅₀ 值为 5 ng/mL)，可实现对水、果蔬、谷物中异菌脲残留量的检

测，为食品中异菌脲残留的免疫检测提供了原料，具有实际应用价值。

生物材料保藏

一株异菌脲单克隆抗体杂交瘤细胞株 ZXL-2，已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，简称 CGMCC，地址为：北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号，中国科学院微生物研究所，保藏日期 2016 年 10 月 31 日，保藏编号为 CGMCC No.13093，分类学命名为单克隆细胞株。

附图说明

图 1 ZXL-2 分泌的单克隆抗体对异菌脲的抑制标准曲线。

具体实施方式

本发明通过将异菌脲完全抗原免疫小鼠，通过细胞融合，HAT 选择性培养基培养，通过 ic-ELISA 筛选细胞上清，最终得到了对异菌脲有较好特异性和灵敏度的单克隆抗体杂交瘤细胞株。

实施例 1 杂交瘤细胞株 ZXL-2 的制备

(1) 半抗原的合成：

将异菌脲 (15.0 g, 45.45 mmol)，三乙胺 (4.59 g, 45.45 mmol)，3-巯基丙酸 (4.82 g, 45.45 mmol) 和四三苯基磷钼 (5.24 g, 4.545 mmol) 加入到乙二醇二甲醚 (50.0 mL) 中，氮气保护下升温至 100℃ 过夜。向反应液中加入纯水 (100 mL)，二氯甲烷萃取 (100 mL×3 次)，饱和食盐水洗一次，无水硫酸钠干燥，浓缩得粗品，制备得半抗原 IPMA。

(2) 完全抗原的合成：

免疫原 IPMA-KLH 的制备：称取 4.2mg IPMA，1-乙基碳二亚胺盐酸盐 7mg，N-羟基琥珀酰亚胺 4mg，用 300μL 无水 N,N-二甲基甲酰胺溶解(称为 A 液)，室温搅拌反应 4~5h。取匙孔血蓝蛋白 KLH 1.47mL(6.8mg/mL, IPMA 与 KLH 摩尔比为 4500 : 1)，加入等体积硼酸缓冲溶液 (称为 B 液)，在室温条件，逐滴将 A 液加入到 B 液中，室温反应过夜，即得偶联物 IPMA-KLH 混合液，通过透析分离完全抗原和未偶联的小分子半抗原；包被原 IPMA-BSA 的制备：称取 2.5mg IPMA，1-乙基碳二亚胺盐酸盐 4mg，N-羟基琥珀酰亚胺 2.5mg，用 300μL 无水 N,N-二甲基甲酰胺溶解(称为 A 液)，室温搅拌反应 4~5h。称取 10mg 牛血清蛋白 BSA (IPMA 与 BSA 摩尔比为 30 : 1)，溶解于 2mL 硼酸缓冲溶液中 (称为 B 液)，在室温条件下，逐滴将 A 液加入到 B 液中，室温反应过夜，即得偶联物 IPMA-BSA 混合液，通过透析分离完全抗原和未偶联的小分子半抗原。

(3) 动物免疫：选择健康的 6~8 周龄的 BALB/c 小鼠进行免疫。取异菌脲完全抗原与

等量弗氏佐剂混合乳化后，通过背部皮下注射免疫 BALB/c 小鼠。第一次免疫用完全弗氏佐剂，之后都用不完全弗氏佐剂。首次免疫与第二次加强免疫之间间隔一个月，多次加强免疫之间间隔 21 天。第 3 次免疫后 7 天采血，使用 ic-ELISA 测定小鼠血清效价和抑制，选择效价高抑制好的小鼠，在第 5 次免疫后 21 天冲击免疫，腹腔注射，要求冲免剂量减半且不含任何佐剂。

(4) 细胞融合：在冲击免疫三天后，按照常规 PEG（聚乙二醇，分子量为 4000）方法进行细胞融合，具体步骤如下：

a、摘眼球取血，颈椎脱臼法处死小鼠后，立即放入 75% 酒精中消毒，浸泡 5 min 左右，无菌操作取出小鼠的脾脏，用注射器的胶头适度研磨并通过 200 目细胞筛网得到脾细胞悬液，收集，离心（1200rpm，8 min），用 RPMI-1640 培养基洗涤脾细胞 3 次，最后一次离心后，将脾细胞稀释到一定体积，计数，备用；

b、收集 SP2/0 细胞：融合前 7~10 天，将 SP2/0 瘤细胞用含 10% FBS（胎牛血清）RPMI-1640 培养基在 5% CO₂ 培养箱中。融合前要求 SP2/0 瘤细胞数量达到 $1\sim 4\times 10^7$ ，保证融合前 SP2/0 瘤细胞处于对数生长期。融合时，收集瘤细胞，悬浮于 RPMI-1640 基础培养液中，进行细胞计数；

c、融合过程 7min。第 1min，将 1mL 的 PEG 1500 由慢到快滴加到细胞中；第 2min，静置。第 3min 和第 4min，在 1min 内滴加 1mL RPMI-1640 培养基；第 5min 和第 6min，在 1min 内滴加 2mL RPMI-1640 培养基；第 7min，每 10s 滴加 1mL 的 RPMI-1640 培养基。然后 37℃ 温浴 5 min。离心（800 rpm，8 min），弃上清，重悬入含 20% 胎牛血清、2% 的 50×HAT 的 RPMI-1640 筛选培养液中，按照 200μL/孔加到 96 孔细胞板，置于 37℃，5% CO₂ 培养箱中培养。

(5) 细胞筛选与细胞株建立：在细胞融合的第 3 天对融合细胞进行 RPMI-1640 筛选培养液半换液，第 5 天进行用含 20% 胎牛血清、1% 的 100×HT 的 RPMI-1640 过渡培养液进行全换液，在第 7 天取细胞上清进行筛选。筛选分两步：第一步先用 ic-ELISA 筛选出阳性细胞孔，第二步选用异菌脲为标准品，用 ic-ELISA 对阳性细胞进行抑制效果测定。选择对异菌脲标准品均有较好抑制的细胞孔，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，获得细胞株 ZXL-2。

(6) 单克隆抗体的制备与鉴定：取 8~10 周龄 BALB/c 小鼠，每只小鼠腹腔注射无菌石蜡油 1mL；7 天后每只小鼠腹腔注射 1×10^6 杂交瘤细胞，从第 7 天开始收集腹水，将腹水通过辛酸-硫酸铵法纯化。在偏酸条件下，正辛酸可以沉淀腹水中除 IgG 免疫球蛋白外的其他杂

蛋白，然后离心，弃沉淀；再用等量饱和度的硫酸铵溶液沉淀 IgG 型的单克隆抗体，离心，弃上清，用 0.01 M PBS 溶液 (pH7.4) 溶解后，透析脱盐，最终得到纯化后的单克隆抗体置于 -20℃ 保存。

6.1 包被：将包被原 IPMA-BSA 用 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液从 1μg/mL 开始倍比稀释，100μL/孔，37℃ 反应 2h；

6.2 洗涤：将板内溶液倾去，并用洗涤液洗涤 3 次，每次 3min；

6.3 封闭：拍干后，加入 200μL/孔封闭液，37℃ 反应 2h。洗涤后烘干备用；

6.4 加样：将抗血清从 1：1000 开始倍比稀释，并加入到各稀释度的包被孔中，100μL/孔，37℃ 反应 30min；充分洗涤后，加入 1：3000 稀释的 HRP-羊抗鼠 IgG，100μL/孔，37℃ 反应 30min；

6.5 显色：将酶标板取出，充分洗涤后，每孔加入 100μL 的 TMB 显色液，37℃ 避光反应 15min；

6.6 终止和测定：每孔加入 50μL 终止液 2M H₂SO₄ 以终止反应，然后用酶标仪测定各孔的 OD₄₅₀ 值。

用 ic-ELISA 测定单克隆抗体异菌脲的 IC₅₀ 为 5ng/mL，说明对异菌脲有很好的灵敏度，可用于异菌脲免疫分析检测。

上述实施例中：

溶液的配制：碳酸盐缓冲液 (CBS)：称取 Na₂CO₃ 1.59 g，NaHCO₃ 2.93 g，分别溶于少量双蒸水后混合，加双蒸水至约 800mL 混匀，调 pH 值至 9.6，加双蒸水定容至 1000mL，4℃ 贮存备用；

磷酸盐缓冲液 (PBS)：8.00g NaCl，0.2g KCl，0.2g KH₂PO₄，2.9g Na₂HPO₄·12 H₂O，溶于 800mL 纯水中，用 NaOH 或 HCl 调 pH 到 7.2~7.4，定容至 1000mL；

PBST：含 0.05 % 吐温 20 的 PBS；

TMB 显色液：A 液：Na₂HPO₄·12H₂O 18.43g，柠檬酸 9.33g，纯水定容至 1000mL；B 液：60mg TMB 溶于 100mL 乙二醇中。A、B 液按体积比 1：5 混合即为 TMB 显色液，现用现混。

虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

权 利 要 求 书

1、一株异菌脲单克隆抗体杂交瘤细胞株 ZXL-2，已于 2016 年 10 月 31 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，简称 CGMCC，保藏编号为 CGMCC No.13093。

2、异菌脲单克隆抗体，其特征在于：它由权利要求 1 所述保藏编号为 CGMCC No.13093 的异菌脲单克隆抗体杂交瘤细胞株 ZXL-2 分泌产生。

3、权利要求 2 所述异菌脲单克隆抗体的应用，其特征在于，用于制备检测异菌脲的工具或者直接用于检测异菌脲。

4、根据权利要求 3 所述的应用，其特征在于，用于食品安全中异菌脲的残留检测。

5、一种检测异菌脲的工具，其特征在于，含有权利要求 2 所述的异菌脲单克隆抗体或者权利要求 1 所述的异菌脲单克隆抗体杂交瘤细胞株 ZXL-2。

6、根据权利要求 5 所述的一种检测异菌脲的工具，其特征在于，所述工具是基于酶联免疫技术的试剂盒或者基于免疫层析的试纸条。

7、权利要求 5 或 6 所述工具在检测食品中异菌脲含量中的应用。

8、一种制备异菌脲抗原的方法，其特征在于，包括以下步骤：

1) 半抗原的合成：

将异菌脲、三乙胺、3-巯基丙酸和四三苯基磷钾加入到乙二醇二甲醚中，氮气保护下升温至 100℃过夜；向反应液中加纯水、二氯甲烷萃取，饱和食盐水洗一次，无水硫酸钠干燥，浓缩得粗品，制备得半抗原 IPMA；

2) 完全抗原的制备：

免疫原 IPMA-KLH 的制备：称取 IPMA，1-乙基碳二亚胺盐酸盐，N-羟基琥珀酰亚胺，用无水 N,N-二甲基甲酰胺溶解得到 A 液，室温搅拌反应 4~5h；取匙孔血蓝蛋白 KLH 与 KLH，加入等体积硼酸缓冲溶液得到 B 液，在室温条件，逐滴将 A 液加入到 B 液中，室温反应过夜，即得偶联物 IPMA-KLH 混合液，通过透析分离完全抗原和未偶联的小分子半抗原。

9、根据权利要求 8 所述方法制备得到的异菌脲抗原。

10、权利要求 8 所述抗原在制备异菌脲抗体中的应用。

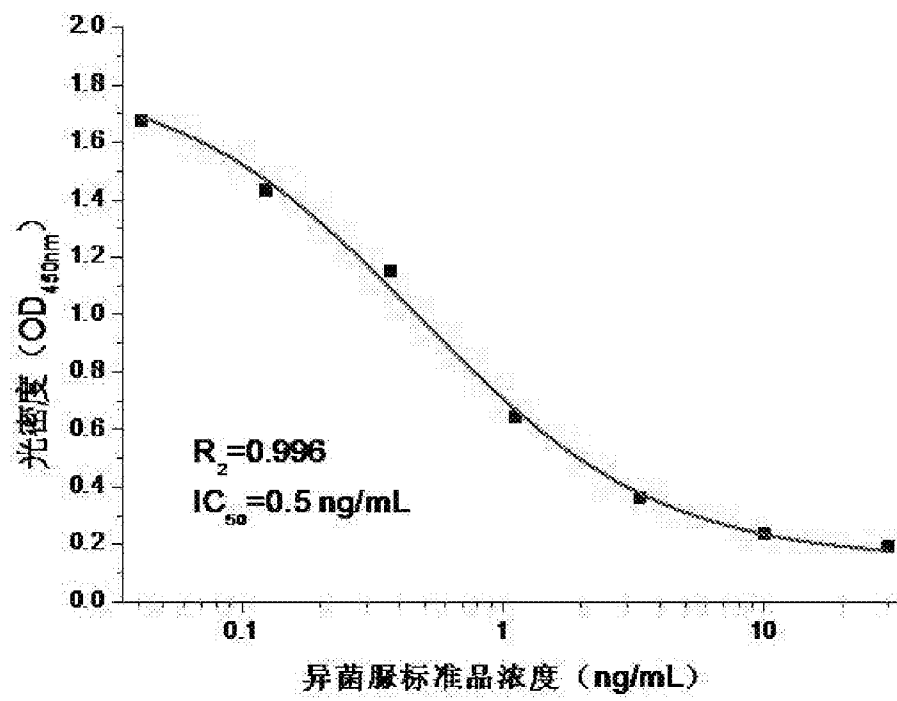


图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/081834

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/20 (2006.01) i; C07K 16/44 (2006.01) i; G01N 33/577 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, C07K, G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Database: CNABS, CPRSABS, CNKI, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, ISI Web of Knowledge, Google Scholar, WANFANG, Chaoxing, Keywords: 异菌脲, 扑海因, 单克隆抗体, 单抗, 杂交瘤, 试剂盒, 试纸, 免疫层析, iprodione, Hybridoma, Monoclonal antibodies, ZXL-2, CGMCC No. 13093, IPMA-BSA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 107119022 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 01 September 2017 (01.09.2017), see entire document	1-10
X	CN 105388286 A (ZHENGZHOU TOBACCO RESEARCH INSTITUTE OF CNTC; NATIONAL TOBACCO QUALITY SUPERVISION AND INSPECTION CENTER; BEIJING KWINBON BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 09 March 2016 (09.03.2016), see description, paragraph [0012], and claims 1, 6, 8 and 9	1-10
X	CN 105388281 A (ZHENGZHOU TOBACCO RESEARCH INSTITUTE OF CNTC; NATIONAL TOBACCO QUALITY SUPERVISION AND INSPECTION CENTER; BEIJING KWINBON BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 09 March 2016 (09.03.2016), see claims 1, 4 and 8	1-10
A	EP 1258729 A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD.) 20 November 2002 (20.11.2002), see entire document	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 20 June 2018	Date of mailing of the international search report 16 July 2018
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer LUO, Xiao Telephone No. (86-10) 62089158

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/081834

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	石超等. 酶联免疫吸附技术在食品检测分析中的研究进展. 食品安全质量检测学报. 31 October 2014 (31.10.2014), 5(10), ISSN: 2095-0381, see entire document. (SHI, Chao et al. Advances in Food Determination and Analysis of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Journal of Food Safety & Quality.)	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/081834

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 107119022 A	01 September 2017	None	
CN 105388286 A	09 March 2016	None	
CN 105388281 A	09 March 2016	None	
EP 1258729 A2	20 November 2002	CA 2385735 A1	18 November 2002
		US 2003064389 A1	03 April 2003
		EP 1258729 A3	02 January 2004
		US 7138241 B2	21 November 2006

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/081834

A. 主题的分类 C12N 5/20(2006.01)i; C07K 16/44(2006.01)i; G01N 33/577(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																				
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N, C07K, G01N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) 数据库: CNABS, CPRSABS, CNKI, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, ISI Web of Knowledge, google scholar, 万方, 超星图书, 谷歌学术 关键词: 异菌脲, 扑海因, 单克隆抗体, 单抗, 杂交瘤, 试剂盒, 试纸, 免疫层析, iprodione, Hybridoma, Monoclonal antibodies, ZXL-2, CGMCC No.13093, IPMA-BSA																				
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 107119022 A (江南大学) 2017年 9月 1日 (2017 - 09 - 01) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 105388286 A (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) 2016年 3月 9日 (2016 - 03 - 09) 参见说明书第12段, 权利要求1, 6, 8和9</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 105388281 A (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) 2016年 3月 9日 (2016 - 03 - 09) 参见权利要求1, 4和8</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>EP 1258729 A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 2002年 11月 20日 (2002 - 11 - 20) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>石超 等. “酶联免疫吸附技术在食品检测分析中的研究进展” 食品安全质量检测学报, 第5卷, 第10期, 2014年 10月 31日 (2014 - 10 - 31), ISSN: 2095-0381, 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 107119022 A (江南大学) 2017年 9月 1日 (2017 - 09 - 01) 参见全文	1-10	X	CN 105388286 A (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) 2016年 3月 9日 (2016 - 03 - 09) 参见说明书第12段, 权利要求1, 6, 8和9	1-10	X	CN 105388281 A (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) 2016年 3月 9日 (2016 - 03 - 09) 参见权利要求1, 4和8	1-10	A	EP 1258729 A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 2002年 11月 20日 (2002 - 11 - 20) 参见全文	1-10	A	石超 等. “酶联免疫吸附技术在食品检测分析中的研究进展” 食品安全质量检测学报, 第5卷, 第10期, 2014年 10月 31日 (2014 - 10 - 31), ISSN: 2095-0381, 参见全文	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
PX	CN 107119022 A (江南大学) 2017年 9月 1日 (2017 - 09 - 01) 参见全文	1-10																		
X	CN 105388286 A (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) 2016年 3月 9日 (2016 - 03 - 09) 参见说明书第12段, 权利要求1, 6, 8和9	1-10																		
X	CN 105388281 A (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) 2016年 3月 9日 (2016 - 03 - 09) 参见权利要求1, 4和8	1-10																		
A	EP 1258729 A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 2002年 11月 20日 (2002 - 11 - 20) 参见全文	1-10																		
A	石超 等. “酶联免疫吸附技术在食品检测分析中的研究进展” 食品安全质量检测学报, 第5卷, 第10期, 2014年 10月 31日 (2014 - 10 - 31), ISSN: 2095-0381, 参见全文	1-10																		
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																				
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件																				
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期																		
2018年 6月 20日		2018年 7月 16日																		
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员																		
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		罗霄 电话号码 62089158																		

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/081834

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	107119022	A	2017年 9月 1日	无			
CN	105388286	A	2016年 3月 9日	无			
CN	105388281	A	2016年 3月 9日	无			
EP	1258729	A2	2002年 11月 20日	CA	2385735	A1	2002年 11月 18日
				US	2003064389	A1	2003年 4月 3日
				EP	1258729	A3	2004年 1月 2日
				US	7138241	B2	2006年 11月 21日