

(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
2020 年 2 月 20 日 (20.02.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/034547 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 5/18 (2006.01) *C07K 16/44* (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C07D 417/06 (2006.01) *C12R 1/91* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/124376

(22) 国际申请日: 2018 年 12 月 27 日 (27.12.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810920563.0 2018 年 8 月 14 日 (14.08.2018) CN

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

(72) 发明人: 匡华(KUANG, Hua); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。叶丽雅(YE, Liya); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。胥传来(XU, Chuanlai); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。徐丽广(XU, Liguang); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。马伟(MA, Wei); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu

214122 (CN)。刘丽强(LIU, Liqiang); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。吴晓玲(WU, Xiaoling); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。宋珊珊(SONG, Shanshan); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。胡拥明(HU, Yongming); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, 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 PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街 99 号 18 栋 E501 张勇, 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,

(54) Title: HYBRIDOMA CELL LINE SECRETING MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST THIAMETHOXAM AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用

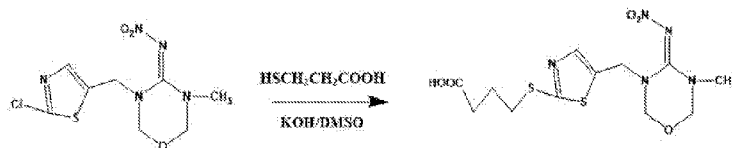


图 1

(57) Abstract: A hybridoma cell line secreting a monoclonal antibody against thiamethoxam, wherein the deposit number of the hybridoma cell line is: CGMCC No.14699. The cell line can be obtained by the steps of: immunizing BALB/c mice with a complete Freund's adjuvant for the first time, with an incomplete Freund's adjuvant for three booster immunizations, and with the thiamethoxam complete antigen without an adjuvant for one impact immunization to immunize the BALB/c mice; fusing the immunized mouse spleen cells with high titer and low IC50 with mouse myeloma cells by a PEG method, and subjecting same to the indirect competitive ELISA screening and three subclonings. The monoclonal antibody secreted by the cell line can be used for the detection of thiamethoxam residues in food.

(57) 摘要: 一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 所述杂交瘤细胞株的保藏编号为: CGMCC No.14699。通过将BALB/c小鼠用完全弗氏佐剂进行首次免疫, 不完全弗氏佐剂进行3次加强免疫, 不含佐剂的噻虫嗪完全抗原进行1次冲击免疫, 使得BALB/c小鼠获得免疫; 将高效价低IC50的获得免疫的小鼠脾细胞通过PEG方法与小鼠骨髓瘤细胞融合, 经过间接竞争ELISA筛选和三次亚克隆, 得到所述细胞株。该细胞株分泌的单克隆抗体可以用于食品中噻虫嗪的残留检测。

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))。

一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用

技术领域

本发明涉及一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用，属于食品安全免疫检测领域。

背景技术

噻虫嗪（Thiamethoxam, TMX）是先正达公司 1991 年研发的第二代新烟碱杀虫剂；从结构上看，以 2-氯-5-噻唑基和甲基作为药效基团是对恶二嗪先导物最理想的修饰结合；从作用靶标看，作为乙酰胆碱受体抑制剂干扰昆虫神经信号传导，方式新颖；从杀虫活性看，比第一代新烟碱杀虫剂活性更强，且使用方式多样化；从作用范围看，它对几乎所有咀嚼式口器和绝大多数刺吸口器害虫均有优良防效，尤其在控制对常规杀虫剂产生抗性的害虫方面优势突出；从安全性看，它对哺乳动物低毒，无致畸、致突变效应。

基于以上优点，近年来噻虫嗪在农业生产中被广泛应用，不仅使许多靶标害虫产生了抗药性，而且其在农产品中的高水平残留对消费者造成了潜在威胁。

噻虫嗪的传统检测方法有气质联用法、毛细管电泳法、高效液相色谱法和毛细管电泳质谱联用法等，然而这些方法的前处理比较复杂、费时，不适用于大量样品的快速检测，为了维护广大消费者的利益，有必要建立一种针对噻虫嗪的高效、快速的检测方法。

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，然而，使用酶联免疫法检测噻虫嗪的前提是得到对噻虫嗪具有高特异性和高灵敏度的单克隆抗体，因此，找到一种制备对噻虫嗪具有高特异性和高灵敏度的单克隆抗体的方法十分关键。

发明人尝试通过杂交瘤细胞制备噻虫嗪单克隆抗体，但在制备能分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株的过程中，如何制备噻虫嗪半抗原和噻虫嗪完全抗原、如何使小鼠产生强免疫，还需进一步的研究；如何使得制备出的杂交瘤细胞株能够成功分泌出噻虫嗪单克隆抗体，还需进一步的研究；如何使得分泌出的噻虫嗪单克隆抗体特异性强、灵敏度高，也还需进一步的研究。

发明内容

本发明的目的是获得一种能分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株。此杂交瘤细胞株分泌的噻虫嗪单克隆抗体对噻虫嗪具有较好的特异性和检测灵敏度（ IC_{50} 值为 0.81ng/mL ），可以用于建立噻虫嗪的免疫学检测方法，检测食品中噻虫嗪的残留。

本发明的技术方案如下：

本发明提供了一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株，所述杂交瘤细胞株已于 2017 年 9 月 5 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，保藏编号为 CGMCC No.14699，保藏地址为北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号。

本发明提供了上述一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株的制备方法，包含如下步骤：

步骤 1：制备噻虫嗪半抗原及噻虫嗪完全抗原，将获得的噻虫嗪完全抗原制备成弗氏佐剂与不完全弗氏佐剂；

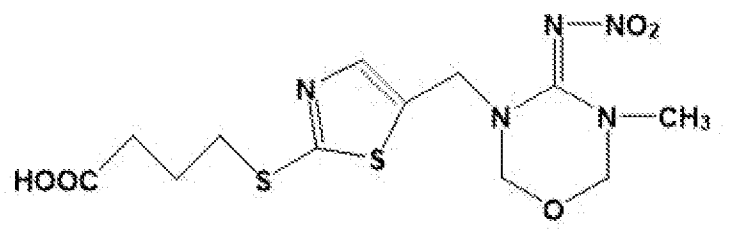
步骤 2：将得到的弗氏佐剂通过背部皮下注射，注射进入 BALB/c 小鼠体内进行多次免疫，首次免疫采用完全弗氏佐剂，加强免疫采用不完全弗氏佐剂；

步骤 3：将经过上述免疫过程的小鼠进行采血，通过间接 ELISA 检测小鼠血清免疫效价和免疫抑制能力，筛选出血清中噻虫嗪抗体含量高的获得免疫的小鼠；

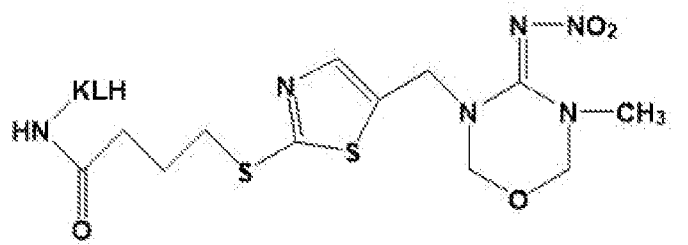
步骤 4：将筛选出的小鼠用不完全弗氏佐剂再进行最后一次加强免疫，然后通过腹腔注射进行冲击免疫，冲击免疫采用不含弗氏佐剂的噻虫嗪完全抗原进行；

步骤 5：将进行冲击免疫后的 BALB/c 小鼠的脾细胞和骨髓瘤细胞融合，将融合的细胞通过培养基培养，利用间接 ELISA 检测阳性细胞孔，并进一步利用间接竞争 ELISA 法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亚克隆，最终筛选出获得能分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株；

所述步骤 1 中的噻虫嗪半抗原的分子式如下：



所述步骤 1 中的噻虫嗪完全抗原的分子式如下：



在本发明的一种实施方式中，所述步骤 2、4 中的首次免疫与加强免疫之间间隔一个月，加强免疫之间间隔 21 天，加强免疫与冲击免疫之间间隔 18~21 天。

在本发明的一种实施方式中，所述步骤 2、4 中的首次免疫剂量为 100 μ g/只，加强免疫剂量为 50 μ g/只，冲击免疫剂量为 25 μ g/只。

在本发明的一种实施方式中，所述步骤 2、4 中的免疫过程，包含 1 次首次免疫、4 次加强免疫和 1 次冲击免疫；

在本发明的一种实施方式中，所述步骤 3 中的采血为第 3 次免疫过程结束后第 7 天进行采血。

在本发明的一种实施方式中，所述步骤 5 中的细胞融合是在冲击免疫结束 3 天后进行。

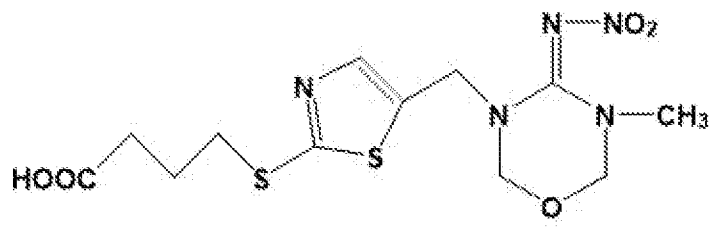
在本发明的一种实施方式中，所述步骤 5 中的细胞融合是通过聚乙二醇（PEG4000）法进行的。

在本发明的一种实施方式中，所述步骤 5 中的培养基为 RPMI-1640 培养基。

在本发明的一种实施方式中，所述步骤 5 中的亚克隆次数为 3 次。

本发明提供了上述一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株或上述一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株的制备方法在制备噻虫嗪单克隆抗体方面的应用。

本發明提供了一种噻虫嗪半抗原，所述噻虫嗪半抗原的分子式如下：



本发明提供了上述一种噻虫嗪半抗原的制备方法，所述方法为将二甲亚砜（DMSO）溶解于噻虫嗪（TMX），加入氢氧化钾，搅拌并滴加 β -巯基丙酸溶液，升温进行反应，得到反应液；待反应液自然冷却后，加入水，以 HCl 调反应液 pH，以二氯甲烷萃取，得到提取液；提取液经干燥、浓缩、结晶，得到噻虫嗪半抗原（TMX-COOH）。

在本发明的一种实施方式中，所述方法为将 20mL 二甲亚砜（DMSO）溶解于 5.8g 噻虫嗪（TMX），加入 2.25g 氢氧化钾，边搅拌边滴加 β -巯基丙酸溶液，油浴升温至 100 $^{\circ}$ C 进行反应，得到反应液；待反应液自然冷却至室温后，加入 50mL 水，以 6mol/L 的 HCl 调反应液 pH 至 3，以 90mL 二氯甲烷萃取，得到提取液；提取液经无水 NaSO₄ 干燥、浓缩、结晶，得到黄色晶体，即为噻虫嗪半抗原（TMX-COOH）。

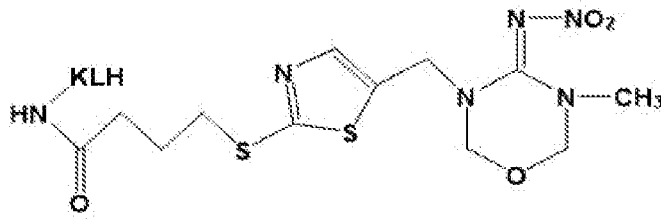
在本发明的一种实施方式中，所述 β -巯基丙酸溶液是通过将 β -巯基丙酸溶解于 DMSO 得到的。

在本发明的一种实施方式中，所述 β -巯基丙酸溶液是通过将 2.1g 的 β -巯基丙酸溶解于

10mL 的 DMSO 得到的。

本发明提供了上述一种噻虫嗪半抗原或上述一种噻虫嗪半抗原的制备方法在制备噻虫嗪完全抗原、分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株、噻虫嗪单克隆抗体方面的应用。

本发明提供了一种噻虫嗪完全抗原，所述噻虫嗪完全抗原的分子式如下：



本发明提供了上述一种噻虫嗪完全抗原的制备方法，所述方法为将噻虫嗪半抗原 (TMX-COOH)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶解于无水 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中，搅拌进行反应，得到噻虫嗪半抗原 (TMX-COOH) 溶液；将 N,N'-二环己基碳二亚胺 (DCC) 溶解于无水 DMF 后，加入到 TMX-COOH 溶液中，搅拌进行反应，得到 A 液；将钥孔血蓝蛋白 (KLH) 用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 稀释，得到 B 液；将 A 液加入到 B 液中进行反应，得到反应液；用 PBS 溶液透析反应液，得到完全抗原 (TMX-COOH-KLH)。

在本发明的一种实施方式中，所述方法为将 2.8mg 噻虫嗪半抗原 (TMX-COOH)、2.8mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶解于 300 μ L 无水 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中，室温搅拌反应 10min，得到噻虫嗪半抗原 (TMX-COOH) 溶液；将 4.8mg N,N'-二环己基碳二亚胺 (DCC) 溶解于 100 μ L 无水 DMF 后，加入到 TMX-COOH 溶液中，室温搅拌进行反应 6-8h，得到 A 液；将 6.8mg 钥孔血蓝蛋白 (KLH) 用 1mL 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 稀释，得到 B 液；将逐滴将 A 液缓慢加入到 B 液中进行反应，得到反应液；用 PBS 溶液透析反应液，除去未反应的小分子半抗原，得到完全抗原 (TMX-COOH-KLH)。

在本发明的一种实施方式中，所述磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 为浓度为 0.01mol/L、pH 为 7.4。

本发明提供了上述一种噻虫嗪完全抗原或上述一种噻虫嗪完全抗原的制备方法在制备分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株、噻虫嗪单克隆抗体方面的应用。

本发明提供了一种噻虫嗪单克隆抗体，所述噻虫嗪单克隆抗体是由保藏编号为 CGMCC No.14699 的杂交瘤细胞株分泌获得的。

本发明提供了上述一种噻虫嗪单克隆抗体的制备方法，所述方法为取 BALB/c 小鼠，腹腔注射石蜡油，再腹腔注射保藏编号为 CGMCC No.14699 的杂交瘤细胞株，注射后收集腹水，将腹水纯化，将获得的单抗低温保存。

在本发明的一种实施方式中，所述方法为取 8-10 周龄 BALB/c 小鼠，每只小鼠腹腔注射石蜡油 1mL，7 天后每只小鼠腹腔注射 1×10^6 保藏编号为 CGMCC No.14699 的杂交瘤细胞株，从第 7 天开始收集腹水，将腹水通过辛酸-硫酸铵法纯化，获得的单抗置于 -20°C 保存。

本发明提供了上述一种噻虫嗪单克隆抗体或上述一种噻虫嗪单克隆抗体的制备方法在识别噻虫嗪方面的应用。

本发明提供了应用上述一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株或上述一种噻虫嗪完全抗原或上述一种噻虫嗪单克隆抗体制备得到的检测试剂盒。

有益效果：

(1) 本发明获得的噻虫嗪单克隆抗体，对噻虫嗪有较好的检测灵敏度和特异性 (IC_{50} 值为 0.81ng/mL 、对噻虫嗪类似物交叉小于 10%，其中，交叉率 = (噻虫嗪的 IC_{50} /类似物的 IC_{50}) $\times 100\%$)；

(2) 本发明提供了一种全新的噻虫嗪完全抗原及其合成思路；

(3) 本发明获得的噻虫嗪单克隆抗体细胞株可以用于免疫分析检测。

生物材料保藏

一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株，分类命名为：单克隆细胞株，保藏单位为：中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏地址为：北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号，保藏编号为：CGMCC No.14699，保藏日期为：2017 年 9 月 5 日。

附图说明

图 1 为本发明噻虫嗪半抗原的合成过程；

图 2 为本发明噻虫嗪单克隆抗体对噻虫嗪的抑制标准曲线。

具体实施方式

本发明下面的实施例仅作为本发明内容的进一步说明，不能作为本发明的限定内容或范围。下面通过实施例对本发明作进一步说明。

下述实施例中涉及的培养基如下：

RPMI-1640 培养基 (mg/L)：L-精氨酸 290、L-门冬酰胺 50、L-门冬氨酸 20、L-胱氨酸二盐酸盐 65.15、L-谷氨酸 20、甘氨酸 10、L-组氨酸 15、L-羟脯氨酸 20、L-异亮氨酸 50、L-亮氨酸 50、L-赖氨酸盐酸盐 40、L-甲硫氨酸 15、L-苯丙氨酸 15、L-脯氨酸 20、L-丝氨酸 30、L-苏氨酸 20、L-色氨酸 5、L-酪氨酸 23.19、L-缬氨酸 20、对氨基苯甲酸 1、硝酸钙 100、无水硫酸镁 48.84、无水磷酸二氢钠 676.13、氯化钾 400、氯化钠 6000、葡萄糖 2000、还原谷胱甘肽 1、酚红 5、L-谷氨酰胺 300、生物素 0.2、D-泛酸钙 0.25、叶酸 1、i-肌醇 35、烟酰胺

1、氯化胆碱 3、盐酸吡哆醇 1、核黄素 0.2、盐酸硫胺素 1、维生素 B12 0.005、碳酸氢钠 2000。

下述实施例中涉及的试剂如下：

碳酸盐缓冲液（CBS）：称取 Na_2CO_3 1.59 g， NaHCO_3 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 KH_2PO_4 ，2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ，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： $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 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 5：1 混合即为 TMB 显色液，现用现混。

下述实施例中涉及的检测方法如下：

噻虫嗪抑制率检测方法：通过棋盘试验选择 ic-ELISA 中最合适的抗原和抗体浓度，用包被缓冲液液抗原稀释至 0.01、0.03、0.1 和 0.3 $\mu\text{g/mL}$ ，并用抗体稀释液将抗体稀释至 0.03、0.1、0.3 和 1 $\mu\text{g/mL}$ ，选择最佳工作点后，将噻虫嗪标准品稀释为 8 个浓度（0、0.125、0.25、0.5、1、2、4、8 ng/mL），按照 ic-ELISA 操作步骤，最后用 OriginPro 8.5 做图（结果如图 2 所示），获得 TMX 标准抑制曲线，计算 IC_{50} 。

实施例 1：噻虫嗪半抗原的合成

合成路径如图 1。

由于噻虫嗪小分子不具有免疫原性，不能刺激小鼠产生免疫应答，进而产生抗体，因此需通过蛋白连接技术将噻虫嗪偶联到蛋白上，使其获得免疫原性；蛋白偶联技术中常用的活泼基团有氨基，羧基，羟基，巯基等，鉴于 TMX 分子结构式中不含有这些活泼基团，因此需要衍生。

将 20mL 二甲亚砜（DMSO）溶解于 5.8g 噻虫嗪（TMX），加入 2.25g 氢氧化钾，边搅拌边滴加 β -巯基丙酸溶液（ β -巯基丙酸溶液是通过将 2.1g 的 β -巯基丙酸溶解于 10mL 的 DMSO 得到的），油浴升温至 100℃进行反应，得到反应液；待反应液自然冷却至室温后，加入 50mL 水，以 6mol/L 的 HCl 调反应液 pH 至 3，以 90mL 二氯甲烷萃取，得到提取液；提取液经无水 NaSO_4 干燥、浓缩、结晶，得到黄色晶体，即为噻虫嗪半抗原（TMX-COOH）。

实施例 2：噻虫嗪完全抗原的合成

将 2.8mg 噻虫嗪半抗原（TMX-COOH）、2.8mg N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）溶解于 300 μL 无水 N,N-二甲基甲酰胺（DMF）中，室温搅拌反应 10min，得到噻虫嗪半抗原（TMX-COOH）溶液；将 4.8mg N,N'-二环己基碳二亚胺（DCC）溶解于 100 μL 无水 DMF 后，加入到 TMX-COOH

溶液中，室温搅拌进行反应 6-8h，得到 A 液；将 6.8mg 钥孔血蓝蛋白（KLH）用 1mL 浓度为 0.01mmol/L、pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液（PBS）稀释，得到 B 液；将逐滴将 A 液缓慢加入到 B 液中进行反应，得到反应液；用 PBS 溶液透析反应液，除去未反应的小分子半抗原，得到完全抗原（TMX-COOH-KLH）。

实施例 3：噻虫嗪包被原的合成

将 5mg 噻虫嗪半抗原（TMX-COOH）、4.8mgN-羟基琥珀酰亚胺（NHS）溶解于 300 μ L 无水 N,N-二甲基甲酰胺（DMF）中，室温搅拌反应 10min，得到噻虫嗪半抗原（TMX-COOH）溶液；将 7.6mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐（EDC）溶解于 100 μ L 无水 DMF 后，加入到 TMX-COOH 溶液中，室温搅拌进行反应 6-8h，得到 A 液；将 10mg 鸡卵白蛋白（OVA）用 1mL 浓度为 0.01mmol/L、pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液（PBS）稀释，得到 B 液；将逐滴将 A 液缓慢加入到 B 液中进行反应，得到反应液；用 PBS 溶液透析反应液，除去未反应的小分子半抗原，得到包被原（TMX-COOH-OVA）。

实施例 4：分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株的制备

1、动物免疫的获得

将 TMX 完全抗原与等量弗氏佐剂混合乳化后，对 BALB/c 小鼠进行颈背部皮下多点注射免疫（冲刺免疫除外）；首次免疫用完全弗氏佐剂，剂量为 100 μ g/只；多次加强免疫用不完全弗氏佐剂且剂量减半即为 50 μ g/只；冲刺免疫不用佐剂，直接用生理盐水稀释后腹腔注射，剂量再减半即为 25 μ g/只；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，冲刺免疫与最后一次加强免疫之间间隔 18-21 天；通过间接竞争酶联免疫法（ic-ELISA）观测小鼠免疫效果即检测小鼠血清的效价和抑制；

2、细胞融合

在冲刺免疫三天后，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 5min 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，8min），用 RPMI-1640 培养基洗涤脾细胞三次，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 $1\sim4\times10^7$ ，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 5min；离心(800rpm, 8min)，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。

3、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 法筛选出阳性细胞孔，第二步选用噻虫嗪为标准品，用 ic-ELISA 法对阳性细胞进行抑制效果测定。

选择对噻虫嗪标准品有较好抑制的细胞孔，采用有限稀释法进行亚克隆，七天后用同样的方法进行检测。

按上述方法进行三次亚克隆，最终获得噻虫嗪单克隆抗体细胞株。

实施例 5：噻虫嗪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 噻虫嗪杂交瘤细胞，从第七天开始收集腹水，将腹水通过辛酸-饱和硫酸铵法进行抗体纯化。

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 0.01M 的 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。

使用间接竞争 ELISA，测得噻虫嗪单克隆抗体的 IC₅₀ 值为 0.81ng/mL、对噻虫嗪类似物交叉小于 10%，说明对噻虫嗪有很好的灵敏度，可用于噻虫嗪免疫分析检测；

其中，交叉率 = (噻虫嗪的 IC₅₀/类似物的 IC₅₀) × 100%。

实施例 6：噻虫嗪单克隆抗体的应用

将杂交瘤细胞株通过体内腹水制备的单克隆抗体应用于 TMX 的 ELISA 添加回收试验，具体步骤如下：

(1) 将用碳酸盐缓冲液 (CBS) 稀释好的浓度为 0.3μg/mL 的包被原包被 96 孔酶标板，每孔 100μL，37℃ 包被 2h 后，用 PBST 洗液洗板三次，每次每孔 200μL，每次 3min，拍干；

(2) 用含 0.2%明胶的 CBS 进行封闭, 每孔 200 μ L, 37 $^{\circ}$ C 封闭 2h, 用 PBST 洗液洗板三次, 每次每孔 200 μ L, 每次 3min, 拍干;

(3) 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 分别配置 0、0.078125、0.15625、0.3125、0.625、1.25、2.5、5 μ g/L 的 TMX 标准溶液, 将标准溶液以及待检测样品提取液, 分别加入到已经封闭好的酶标板中, 每孔 50 μ L, 每个样品重复 3 个孔, 再每孔加入 50 μ L 以 1:32000 稀释的抗 DNSH 单克隆抗体, 37 $^{\circ}$ C 反应 0.5h 后, 洗板拍干;

(4) 每孔加入 100 μ L 用含 0.1%明胶的 PBS 以 1:3000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗, 37 $^{\circ}$ C 反应 0.5h 后, 洗板拍干;

(5) 每孔加入 100 μ L 的 TMB 显色液, 37 $^{\circ}$ C 显色 15min 后, 每孔加入 50 μ L 2M 的 H₂SO₄ 终止液, 450nm 测吸光值;

(6) 添加回收及样品前处理:

选择黄瓜为检测样品。

待测样品洗净、切碎, 分别称取三份样品, 每份 10g, 向样品中分别添加 5ppb、50ppb、100ppb 的 TMX 标准品 (根据抗体线性范围及 IC₅₀ 设定添加浓度), 加入 20mL 乙腈, 剧烈振荡 2min, 加入 1gNaCl, 4gMgSO₄, 剧烈振荡 2min, 4000rpm 离心 10min, 收集上清液, 取上清液 1mL, 氮气吹干, 用 5mLPBS 复溶 (即稀释了五倍以减少样品基质的影响)。

采用间接竞争 ELISA 进行添加回收试验, 其回收率分别为 97%, 89%, 93%。

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。

10
权 利 要 求 书

1.一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株,其特征在于,所述杂交瘤细胞株已于2017年9月5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,保藏编号为CGMCC No.14699,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

2.如权利要求1所述的一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株的制备方法,其特征在于,包含如下步骤:

步骤1:制备噻虫嗪半抗原及噻虫嗪完全抗原,将获得的噻虫嗪完全抗原分别用完全弗氏佐剂与不完全弗氏佐剂进行乳化;

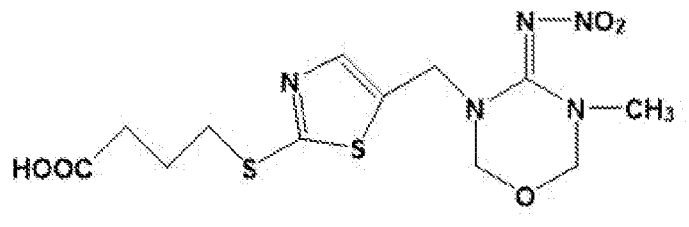
步骤2:将经完全弗氏佐剂乳化后的噻虫嗪完全抗原通过背部皮下注射到BALB/c小鼠体内对BALB/c小鼠进行首次免疫后,将经不完全弗氏佐剂乳化后的噻虫嗪完全抗原通过背部皮下注射到BALB/c小鼠体内对BALB/c小鼠进行加强免疫;

步骤3:采集经过步骤(2)免疫后的小鼠的血液,通过间接ELISA检测小鼠血清免疫效价和免疫抑制能力,筛选出血清中噻虫嗪抗体含量高的获得免疫的小鼠;

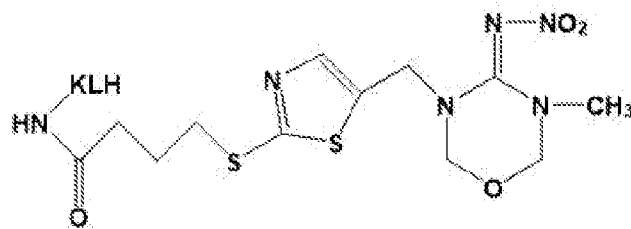
步骤4:对步骤(3)筛选出的小鼠用经不完全弗氏佐剂乳化后的噻虫嗪完全抗原再进行最后一次加强免疫,然后通过腹腔注射进行冲击免疫,冲击免疫采用不含弗氏佐剂的噻虫嗪完全抗原;

步骤5:将进行冲击免疫后的BALB/c小鼠的脾细胞和骨髓瘤细胞融合,将融合的细胞通过HAT培养基培养,利用间接ELISA检测阳性细胞孔,并进一步以噻虫嗪为标准品,利用间接ELISA法测定阳性细胞孔对噻虫嗪的抑制效果,通过有限稀释法对有最好抑制的阳性细胞进行亚克隆,最终筛选出获得能分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

所述步骤1中的噻虫嗪半抗原的分子式如下:



所述步骤1中的噻虫嗪完全抗原的分子式如下:



3.如权利要求2所述的一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株的制备方法,其特征

在于，所述步骤 2、4 中的首次免疫与加强免疫之间间隔一个月，加强免疫之间间隔 21 天，加强免疫与冲击免疫之间间隔 18~21 天。

4.如权利要求 2 或 3 所述的一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株的制备方法，其特征在于，所述步骤 2、4 中的首次免疫剂量为 100 μ g/只，加强免疫剂量为 50 μ g/只，冲击免疫剂量为 25 μ g/只。

5.如权利要求 2-4 任一所述的一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株的制备方法，其特征在于，所述步骤 2、4 中的免疫过程，包含 1 次首次免疫、4 次加强免疫和 1 次冲击免疫；

6.如权利要求 2-5 任一所述的一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株的制备方法，其特征在于，所述步骤 3 中的采血为第 3 次免疫过程结束后第 7 天进行采血。

7.如权利要求 2-6 任一所述的一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株的制备方法，其特征在于，所述步骤 5 中的细胞融合是在冲击免疫结束 3 天后进行。

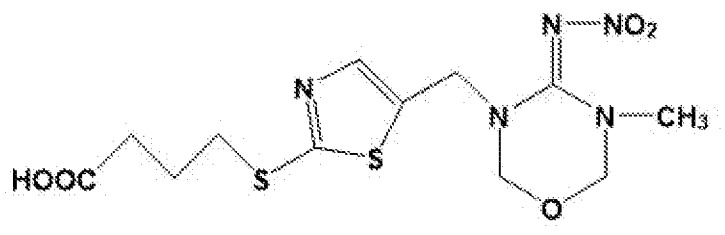
8.如权利要求 2-7 任一所述的一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株的制备方法，其特征在于，所述步骤 5 中的细胞融合是通过聚乙二醇（PEG4000）法进行的。

9.如权利要求 2-8 任一所述的一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株的制备方法，其特征在于，所述步骤 5 中的培养基为 RPMI-1640 培养基。

10.如权利要求 2-9 任一所述的一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株的制备方法，其特征在于，所述步骤 5 中的亚克隆次数为 3 次。

11.权利要求 1 所述的一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株或权利要求 2-10 任一所述的一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株的制备方法在制备噻虫嗪单克隆抗体方面的应用。

12.一种噻虫嗪半抗原，其特征在于，所述噻虫嗪半抗原的分子式如下：



13.如权利要求 12 所述的一种噻虫嗪半抗原的制备方法，其特征在于，所述方法为将二甲亚砜（DMSO）溶解于噻虫嗪（TMX），加入氢氧化钾，搅拌并滴加 β -巯基丙酸溶液，升温进行反应，得到反应液；待反应液自然冷却后，加入水，调反应液 pH，以二氯甲烷萃取，得到提取液；提取液经干燥、浓缩、结晶，得到噻虫嗪半抗原（TMX-COOH）。

14.如权利要求 13 所述的一种噻虫嗪半抗原的制备方法，其特征在于，所述方法为将 20mL 二甲亚砜（DMSO）溶解于 5.8g 噻虫嗪（TMX），加入 2.25g 氢氧化钾，边搅拌边滴加 β -巯基

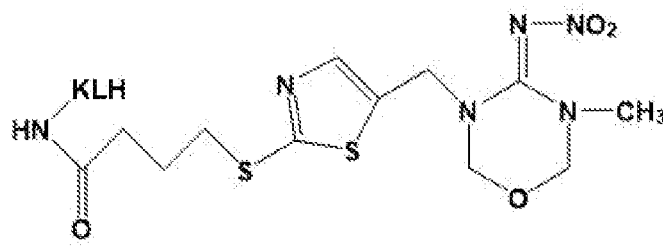
丙酸溶液，油浴升温至 100℃进行反应，得到反应液；待反应液自然冷却至室温后，加入 50mL 水，以 6mol/L 的 HCl 调反应液 pH 至 3，以 90mL 二氯甲烷萃取，得到提取液；提取液经无水 NaSO₄干燥、浓缩、结晶，得到黄色晶体，即为噻虫嗪半抗原（TMX-COOH）。

15.如权利要求 13 或 14 所述的一种噻虫嗪半抗原的制备方法，其特征在于，所述β-巯基丙酸溶液是通过将β-巯基丙酸溶解于 DMSO 得到的。

16.如权利要求 13-15 任一所述的一种噻虫嗪半抗原的制备方法，其特征在于，所述β-巯基丙酸溶液是通过将 2.1g 的β-巯基丙酸溶解于 10mL 的 DMSO 得到的。

17.权利要求 12 所述的一种噻虫嗪半抗原或权利要求 13-16 任一所述的一种噻虫嗪半抗原的制备方法在在制备噻虫嗪完全抗原、分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株、噻虫嗪单克隆抗体方面的应用。

18.一种噻虫嗪完全抗原，其特征在于，所述噻虫嗪完全抗原的分子式如下：



19.如权利要求 18 所述的一种噻虫嗪完全抗原的制备方法，其特征在于，所述方法为将噻虫嗪半抗原（TMX-COOH）、N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）溶解于无水 N,N-二甲基甲酰胺（DMF）中，搅拌进行反应，得到噻虫嗪半抗原（TMX-COOH）溶液；将 N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)溶解于无水 DMF 后，加入到 TMX-COOH 溶液中，搅拌进行反应，得到 A 液；将钥孔血蓝蛋白（KLH）用磷酸盐缓冲溶液（PBS）稀释，得到 B 液；将 A 液加入到 B 液中进行反应，得到反应液；用 PBS 溶液透析反应液，得到完全抗原（TMX-COOH-KLH）。

20.如权利要求 19 所述的一种噻虫嗪完全抗原的制备方法，其特征在于，所述方法为将 2.8mg 噻虫嗪半抗原（TMX-COOH）、2.8mgN-羟基琥珀酰亚胺（NHS）溶解于 300μL 无水 N,N-二甲基甲酰胺（DMF）中，室温搅拌反应 10min，得到噻虫嗪半抗原（TMX-COOH）溶液；将 4.8mg N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)溶解于 100μL 无水 DMF 后，加入到 TMX-COOH 溶液中，室温搅拌进行反应 6-8h，得到 A 液；将 6.8mg 钥孔血蓝蛋白（KLH）用 1mL 磷酸盐缓冲溶液（PBS）稀释，得到 B 液；将逐滴将 A 液缓慢加入到 B 液中进行反应，得到反应液；用 PBS 溶液透析反应液，除去未反应的小分子半抗原，得到完全抗原(TMX-COOH-KLH)。

21.如权利要求 19 或 20 所述的一种噻虫嗪完全抗原的制备方法，其特征在于，所述磷酸盐缓冲溶液（PBS）为浓度为 0.01mol/L、pH 为 7.4。

22. 权利要求 18 所述的一种噻虫嗪完全抗原或权利要求 19-21 任一所述的一种噻虫嗪完全抗原的制备方法在制备分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株、噻虫嗪单克隆抗体方面的应用。

23. 一种噻虫嗪单克隆抗体, 其特征在于, 所述噻虫嗪单克隆抗体是由保藏编号为 CGMCC No.14699 的杂交瘤细胞株分泌获得的。

24. 如权利要求 23 所述的一种噻虫嗪单克隆抗体的制备方法, 其特征在于, 所述方法为取 BALB/c 小鼠, 腹腔注射石蜡油, 再腹腔注射保藏编号为 CGMCC No.14699 的杂交瘤细胞株, 注射后收集腹水, 将腹水纯化, 将获得的单抗低温保存。

25. 如权利要求 24 所述的一种噻虫嗪单克隆抗体的制备方法, 其特征在于, 所述方法为取 8-10 周龄 BALB/c 小鼠, 每只小鼠腹腔注射石蜡油 1mL, 7 天后每只小鼠腹腔注射 1×10^6 保藏编号为 CGMCC No.14699 的杂交瘤细胞株, 从第 7 天开始收集腹水, 将腹水通过辛酸-硫酸铵法纯化, 获得的单抗置于 -20°C 保存。

26. 权利要求 23 所述的一种噻虫嗪单克隆抗体或权利要求 24 或 25 所述的一种噻虫嗪单克隆抗体的制备方法在识别噻虫嗪方面的应用。

27. 应用权利要求 1 所述的一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株或权利要求 12 所述的一种噻虫嗪半抗原或权利要求 18 所述的一种噻虫嗪完全抗原或权利要求 23 所述的一种噻虫嗪单克隆抗体制备得到的检测试剂盒。

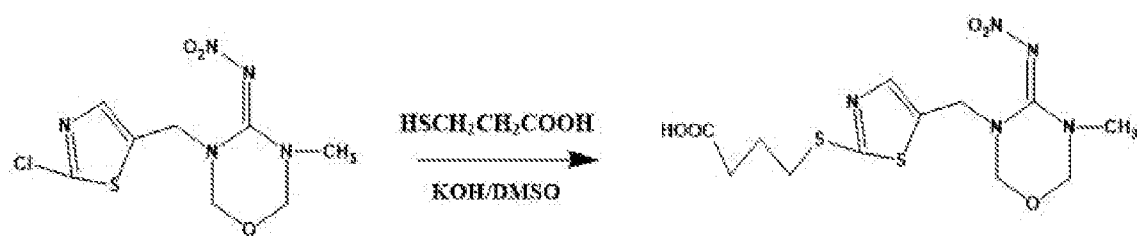


图 1

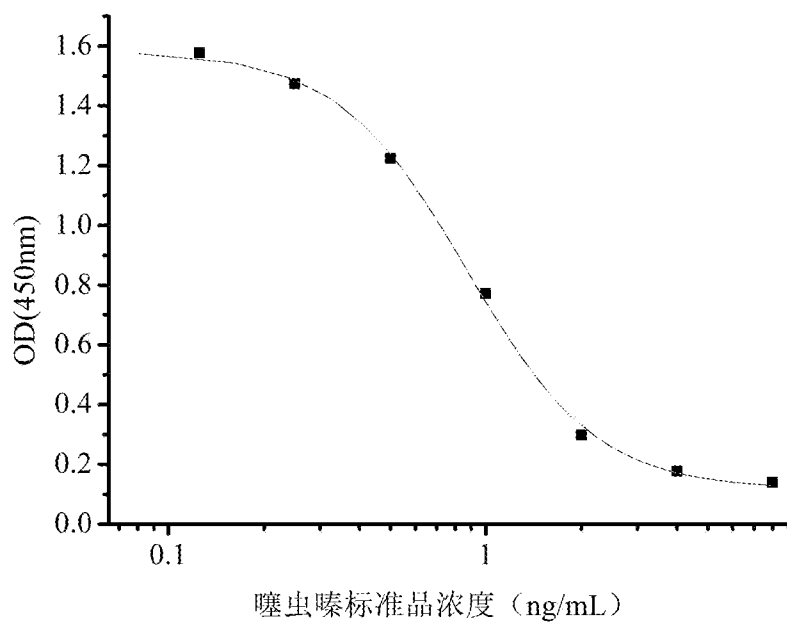


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/124376

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/18(2006.01)i; C12P 21/08(2006.01)i; C07D 417/06(2006.01)i; C07K 16/44(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i;
C12R 1/91(2006.01)n

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; C12P; C07D; C07K; G01N, C12R

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)

CNABS, CPRSABS, CNTXT, CSCD, CJFD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CPEA, CNKI, ISI WEB OF SCIENCE, PUBMED: 单克隆抗体, 单抗, 抗体, 杂交瘤, 噬虫毒素, mcab, mab, monoclonal antibody, hybridoma, thiamethoxam, tmx, KLH, CGMCC No.14699

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 108998422 A (JIANGNAN UNIVERSITY ET AL.) 14 December 2018 (2018-12-14) see claims 1-10	1, 11, 23, 26 and 27 (in part)
Y	KR 20070094159 A (SEOUL NAT UNIV IND. FOUNDATION) 20 September 2007 (2007-09-20) see claim 1	1, 11, 23, 26 and 27 (in part)
Y	CN 1413195 A (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG) 23 April 2003 (2003-04-23) see description, page 13, paragraph 2	1, 11, 23, 26 and 27 (in part)
Y	李广领等 (LI, Guangling et al.). "噬虫毒素单克隆抗体制备及酶联免疫吸附分析方法的建立 (Preparation of Monoclonal Antibodies Against Thiamethoxam and Establishment of Enzyme Linked Immunosorbent Aaasy Detection Method)" <i>分析化学 (Chinese Journal of Analytical Chemistry)</i> , Vol. 40, No. (7), 31 July 2012 (2012-07-31), ISSN: 1872-2040, pages 1098-1103, see abstract, and sections 2.3, 3.2 and 3.3	1, 11, 23, 26 and 27 (in part)

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

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "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)
 "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

"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
 "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
 "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
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 May 2019

Date of mailing of the international search report

28 May 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

**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

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/124376

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **2-10,24和25**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] relating to a method for treatment of an animal body through surgery.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] The first group of inventions: claims 1, 11, 23, 26 and 27 (in part)
- [2] relating to a hybridoma cell strain that secretes a thiamethoxam monoclonal antibody and an application thereof in preparation of a thiamethoxam monoclonal antibody, the thiamethoxam monoclonal antibody secreted by the hybridoma cell strain and an application thereof in identification of thiamethoxam, and a detection kit prepared by means of application of the hybridoma cell strain or the monoclonal antibody.
- [3] The second group of inventions: claims 12-22 and 27 (in part)
- [4] relating to a thiamethoxam hapten or a thiamethoxam complete antigen and a preparation method therefor and an application thereof in preparation of a hybridoma cell strain that secretes a thiamethoxam monoclonal antibody and the thiamethoxam monoclonal antibody, and a detection kit prepared by means of application of the thiamethoxam hapten or the thiamethoxam complete antigen.
- [5] The two groups of inventions do not share the same or corresponding technical feature, thus do not share the same or corresponding special technical feature. Therefore, the two groups of inventions lack unity of invention, and do not comply with PCT Rule 13.1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/124376

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **Claims 1, 11, 23, 26 and 27 (in part)**

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/124376

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	108998422	A	14 December 2018	None			
KR	20070094159	A	20 September 2007	None			
CN	1413195	A	23 April 2003	EA	200200620	A1	31 October 2002
				WO	0142787	A2	14 June 2001
				CA	2393084	C	14 May 2013
				EP	1235805	A2	04 September 2002
				HU	0203499	A3	28 December 2004
				ZA	200204582	A	30 July 2003
				CA	2393084	A1	14 June 2001
				ZA	200204582	B	30 July 2003
				NO	331464	B1	09 January 2012
				MA	25635	A1	31 December 2002
				JP	4980536	B2	18 July 2012
				JP	2003516423	A	13 May 2003
				NO	20022684	D0	06 June 2002
				DE	60031570	D1	07 December 2006
				PL	355630	A1	04 May 2004
				MX	PA02005514	A	02 September 2002
				US	2003108970	A1	12 June 2003
				CN	100379725	C	09 April 2008
				PL	205061	B1	31 March 2010
				US	7148029	B2	12 December 2006
				PT	1235805	E	31 January 2007
				AU	2672101	A	18 June 2001
				EP	1235805	B1	25 October 2006
				DK	1235805	T3	26 February 2007
				AU	778677	B2	16 December 2004
				NO	20022684	L	25 June 2002
				UA	76708	C2	16 September 2002
				NO	20022684	A	25 June 2002
				CZ	20021969	A3	14 August 2002
				IL	150009	D0	01 December 2002
				NZ	519152	A	27 February 2004
				AR	064873	A2	29 April 2009
				AT	343564	T	15 November 2006
				EA	005380	B1	24 February 2005
				BR	0016265	A	13 August 2002
				HU	229490	B1	28 January 2014
				AR	026735	A1	26 February 2003
				WO	0142787	A3	13 December 2001
				HU	0203499	A2	28 March 2003
				BR	0016265	B1	20 January 2015
				CZ	303174	B6	16 May 2012
				IL	150009	A	07 August 2008
				ES	2272357	T3	01 May 2007
				DE	60031570	T2	28 June 2007

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/124376

A. 主题的分类

C12N 5/18(2006.01)i; C12P 21/08(2006.01)i; C07D 417/06(2006.01)i; C07K 16/44(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; C12R 1/91(2006.01)n

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; C12P; C07D; C07K; G01N, C12R

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))

CNABS, CPRSABS, CNTXT, CSCD, CJFD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CPEA, CNKI, ISI WEB OF SCIENCE, PUBMED: 单克隆抗体, 单抗, 抗体, 杂交瘤, 噻虫嗪, mcab, mab, monoclonal antibody+, hybridoma+, thiamethoxam, tmx, KLH, CGMCC No.14699

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 108998422 A (江南大学等) 2018年 12月 14日 (2018 - 12 - 14) 参见权利要求1-10	1, 11, 23, 26 和27 (部分)
Y	KR 20070094159 A (SEOUL NAT UNIV IND FOUNDATION) 2007年 9月 20日 (2007 - 09 - 20) 参见权利要求1	1, 11, 23, 26 和27 (部分)
Y	CN 1413195 A (辛根塔参与股份公司) 2003年 4月 23日 (2003 - 04 - 23) 参见说明书第13页第2段	1, 11, 23, 26 和27 (部分)
Y	李广领等. “噻虫嗪单克隆抗体制备及酶联免疫吸附分析方法的建立” 分析化学, 第40卷, 第7期, 2012年 7月 31日 (2012 - 07 - 31), ISSN: 1872-2040, 第1098-1103页, 参见摘要, 第2.3, 3.2和3.3节	1, 11, 23, 26 和27 (部分)

☐ 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

2019年 5月 6日

国际检索报告邮寄日期

2019年 5月 28日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(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

受权官员

潘俊宇

电话号码 62411108

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 2-10, 24和25
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 涉及通过外科手术对动物体进行处置的方法。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

- [1] 第1组发明：权利要求1， 11， 23， 26和27（部分）
- [2] 涉及一种分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其在制备噻虫嗪单克隆抗体方面的应用，该杂交瘤细胞株分泌的噻虫嗪单克隆抗体及其在识别噻虫嗪方面的应用，应用该杂交瘤细胞株或该单克隆抗体制备得到的检测试剂盒。
- [3] 第2组发明：权利要求12-22， 27（部分）
- [4] 涉及一种噻虫嗪半抗原或噻虫嗪完全抗原及其制备方法和在制备分泌噻虫嗪单克隆抗体的杂交瘤细胞株、噻虫嗪单克隆抗体方面的应用，应用该噻虫嗪半抗原或噻虫嗪完全抗原制备得到的检测试剂盒。
- [5] 上述2组发明之间没有相同或相应的技术特征，从而也不具有相同或相应的特定技术特征。因此，上述2组发明不具备单一性，不符合PCT实施细则13.1的规定。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4. ☒ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是： 权利要求1， 11， 23， 26和27（部分）

对异议的意见

- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/124376

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	108998422	A	2018年 12月 14日	无			
KR	20070094159	A	2007年 9月 20日	无			
CN	1413195	A	2003年 4月 23日	EA	200200620	A1	2002年 10月 31日
				WO	0142787	A2	2001年 6月 14日
				CA	2393084	C	2013年 5月 14日
				EP	1235805	A2	2002年 9月 4日
				HU	0203499	A3	2004年 12月 28日
				ZA	200204582	A	2003年 7月 30日
				CA	2393084	A1	2001年 6月 14日
				ZA	200204582	B	2003年 7月 30日
				NO	331464	B1	2012年 1月 9日
				MA	25635	A1	2002年 12月 31日
				JP	4980536	B2	2012年 7月 18日
				JP	2003516423	A	2003年 5月 13日
				NO	20022684	D0	2002年 6月 6日
				DE	60031570	D1	2006年 12月 7日
				PL	355630	A1	2004年 5月 4日
				MX	PA02005514	A	2002年 9月 2日
				US	2003108970	A1	2003年 6月 12日
				CN	100379725	C	2008年 4月 9日
				PL	205061	B1	2010年 3月 31日
				US	7148029	B2	2006年 12月 12日
				PT	1235805	E	2007年 1月 31日
				AU	2672101	A	2001年 6月 18日
				EP	1235805	B1	2006年 10月 25日
				DK	1235805	T3	2007年 2月 26日
				AU	778677	B2	2004年 12月 16日
				NO	20022684	L	2002年 6月 25日
				UA	76708	C2	2002年 9月 16日
				NO	20022684	A	2002年 6月 25日
				CZ	20021969	A3	2002年 8月 14日
				IL	150009	D0	2002年 12月 1日
				NZ	519152	A	2004年 2月 27日
				AR	064873	A2	2009年 4月 29日
				AT	343564	T	2006年 11月 15日
				EA	005380	B1	2005年 2月 24日
				BR	0016265	A	2002年 8月 13日
				HU	229490	B1	2014年 1月 28日
				AR	026735	A1	2003年 2月 26日
				WO	0142787	A3	2001年 12月 13日
				HU	0203499	A2	2003年 3月 28日
				BR	0016265	B1	2015年 1月 20日
				CZ	303174	B6	2012年 5月 16日
				IL	150009	A	2008年 8月 7日
				ES	2272357	T3	2007年 5月 1日
				DE	60031570	T2	2007年 6月 28日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)