

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.⁷
C07K 14/765
G01N 33/531



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410023718.9

[43] 公开日 2005年1月5日

[11] 公开号 CN 1560077A

[22] 申请日 2004.3.5

[21] 申请号 200410023718.9

[71] 申请人 山东大学

地址 250100 山东省济南市历城区山大南路
27号

[72] 发明人 郗日沫 卢圣欣

[74] 专利代理机构 山东济南齐鲁科技专利事务所
有限公司
代理人 王井养

权利要求书2页 说明书5页

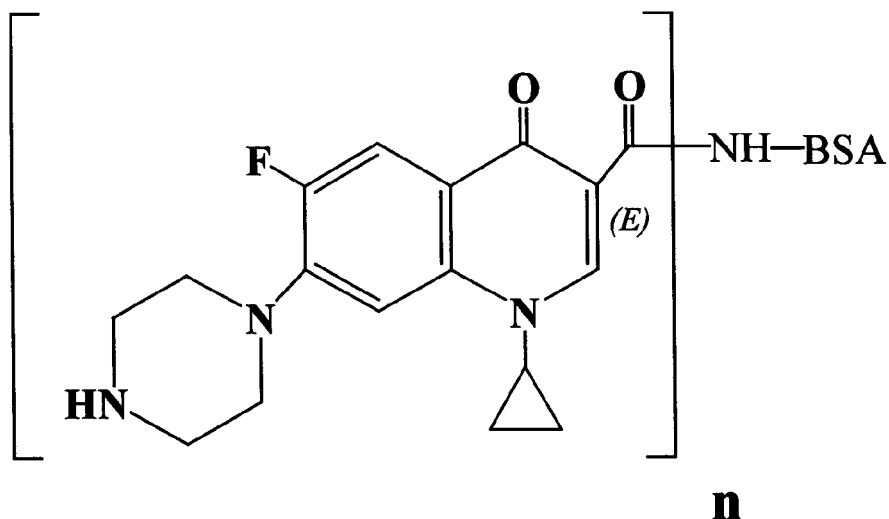
[54] 发明名称 一种环丙沙星免疫原及其制备方法

[57] 摘要

一种环丙沙星免疫原是由环丙沙星和牛血清蛋白在室温下，进行偶联反应，用 PBS 缓冲液进行透析，经高速离心，冻干上清液，得到环丙沙星免疫原粗品。再用葡聚糖凝胶层析纯化，冻干得到环丙沙星免疫原纯品。研究表明，该发明使用的方法成功地合成了这种可用于制备环丙沙星特异抗体的免疫原。本发明为开发环丙沙星药物残留酶联免疫检测方法奠定了基础。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种环丙沙星免疫原，其代表式为：



式中： BSA: 牛血清蛋白 (Bovine Serum Albumin),

n : 为与一个牛血清蛋白分子结合的环丙沙星的分子数,

在本发明中, $n = 2 - 6$;

该偶联体显示如下物化特征:

- (1) 外观: 白色粉末固体,
- (2) 紫外吸收光谱 (nm): 275, 322, 332 ;
- (3) 红外吸收光谱 (cm^{-1} , KBr): 3310, 2960, 1656, 1538, 1452, 1397, 1163, 1075, 948, 860, 547;

该偶联体可用于制备环丙沙星的酶联免疫检测试剂。

2. 依照权利要求 1 所述的环丙沙星免疫原的制备方法, 其特征在于包括以下主要步骤:

- (1) 溶液 A 的制备：将环丙沙星，羟基琥珀酰亚胺，碳二亚胺盐溶液，以摩尔比 1：4：6 溶解在二甲基甲酰胺中，反应生成环丙沙星与碳二亚胺的活性中间体，备用；
- (2) 溶液 B 的配置：把 BSA 溶于 PBS 缓冲溶液中，配成 9.5 mg/ml 的溶液，备用；
- (3) 在室温和不断搅拌下，把溶液 A 逐渐加入到溶液 B 中，环丙沙星和 BSA 的摩尔比为 6：1；
- (4) 用 PBS 缓冲溶液透析，高速离心，取上清液；
- (5) 冻干上清液，得到环丙沙星免疫原粗品；
- (6) 用葡聚糖凝胶层析作纯化分离，PBS 缓冲溶液为洗脱液，收集偶合物纯品，再经冻干得到环丙沙星免疫原的白色固体粉末。

一种环丙沙星免疫原及其制备方法

所属技术领域

本发明涉及到动物源食品药物残留的检测领域。与酶联检测方法有关。更具体地说是关于环丙沙星的酶联免疫检测方法中所用检测试剂的生产技术。

背景技术

下列定义适用于整个说明书和权利要求书：

BSA = 牛血清蛋白 (Bovine Serum Albumin)

PBS = 磷酸生理盐水缓冲液 (Phosphate Buffered Saline) (0.01 M,
pH = 7.4)

Sephadex-G75 = 葡聚糖凝胶

Ciprofloxacin-EDC = 环丙沙星与碳二亚胺形成的活性中间体

环丙沙星 (Ciprofloxacin) 属于喹诺酮类抗生素。这类抗生素由于其抗菌谱广，杀菌能力强，是继土霉素之后在畜禽水产养殖中广泛应用的药物。这类药物可以有效地预防和治疗家禽细菌和霉形体疾病。环丙沙星是最常用最有效的药物之一。但人们通过研究逐渐发现，喹诺酮类抗生素在动物源食品中的残留对人体有毒害。作为一种人畜共用药，喹诺酮类抗生素在食品中的残留通过食物链对人体健康危害很大。新英格兰明尼苏达州卫生署的 KIRK E SMITH 为首的研究小组发现，家禽使用喹诺酮类药物使弯曲杆菌产生了耐药性。根据

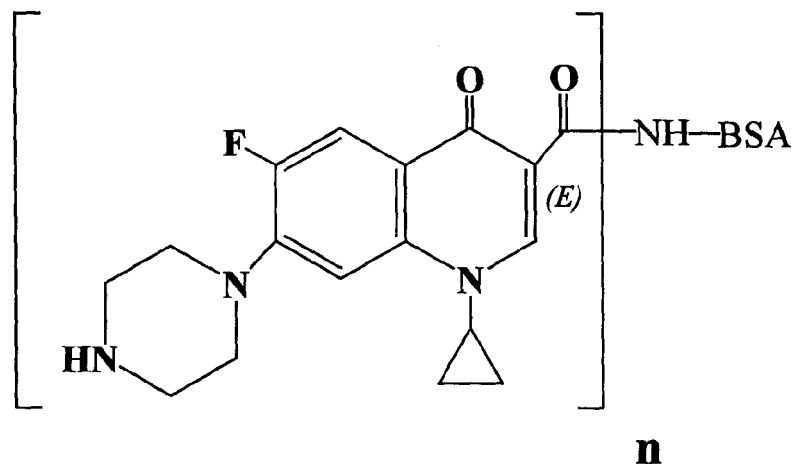
美国疾病控制与预防中心的调查，一种由食品引起疾病的弯曲杆菌对喹诺酮类药物的耐药性由1998年的13.6%上升到1999年的17.6%。而我国尚未颁布动物源食品中残留的喹诺酮类药物的检测方法和相应标准。美国由于考虑到这类药物的交叉感染，已经开始在畜禽养殖业中禁用喹诺酮类抗生素。我国虽尚未在畜禽水产养殖业中禁用喹诺酮类抗生素，但有严格的停药期规定。随着人民生活水平的提高及我国加入WTO，对动物源食品的品质要求也越来越高，食品中药物残留的检测必将法制化，常规化。因此，研究喹诺酮类药物在食品中的残留限量和检测方法是必要的。

在抗生素药物残留的检测中，仪器法如液相色谱和质谱以及液相质谱联用是应用最广泛的方法。这些方法准确，稳定，可靠，可以作为标准方法。但仪器法价格昂贵，费时较长，需要大型仪器设备，需要专门的技术人员，所以难于用于现场操作。酶联免疫检测法（ELISA）提供了一种极好的扫描手段。该法具有快速，准确，简易，不需要专门人员操作等优点，这使得ELISA法成为一种理想的，可用于常规扫描的检测方法。酶联免疫检测法的核心是需要高质量的抗体。大多数抗生素包括喹诺酮类药物都是小分子有机化合物，不具有免疫原性，称之为半抗原。所以，必须把这些化合物转变成能引发动动物免疫系统产生抗体的免疫原（又称之为完全抗原）。本发明所合成的环丙沙星-牛血清蛋白偶合物（Ciprofloxacin-BSA Conjugate），就是用来制备对环丙沙星有特异反应的抗体。据我们所知，现在世界上尚未有关于环丙沙星的免疫原的合成的报道。

发明内容

本发明的目的在于提供一种能引发动动物免疫系统产生抗体的环丙沙星免疫原以及制备这种免疫原的方法。

本发明所制备的环丙沙星免疫原，其代表式为：



式中： BSA: 牛血清蛋白 (Bovine Serum Albumin)。

n : 为与一个牛血清蛋白分子结合的环丙沙星的分子数。

在本发明中， $n = 2 - 6$ 。

该偶联体显示如下物化特征：

- (1) 外观：白色粉末固体。
- (2) 紫外吸收光谱：275 nm, 322 nm, 332 nm
- (3) 红外吸收光谱 (cm^{-1} , KBr): 3310, 2960, 1656, 1538, 1452, 1397, 1163, 1075, 948, 860, 547

该偶联体可用于制备环丙沙星的酶联免疫检测试剂。

本发明所述的环丙沙星免疫原就是通过环丙沙星与大分子蛋白偶联，得到能引发动物免疫系统而产生特异抗体的免疫原。在本发明中选用牛血清蛋白与环丙沙星的偶联反应来制备环丙沙星免疫原，主要包括以下步骤：

- (1) 溶液 A 的制备：将环丙沙星 (Ciprofloxacin)，N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)，

碳二亚胺盐溶液 (EDC.HCl), 以摩尔比 1:4:6 溶解在二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 反应生成环丙沙星与碳二亚胺的活性中间体 (Ciprofloxacin-EDC), 备用。

- (2) 溶液 B 的配置: 把 BSA 溶于 PBS 缓冲溶液中, 配成 9.52 mg/ml 的溶液, 备用。
- (3) 在室温和不断搅拌下, 把溶液 A 逐渐加入到溶液 B 中。环丙沙星和 BSA 的摩尔比为 6: 1。
- (4) 用 PBS 缓冲溶液透析, 高速离心, 取上清液。
- (5) 冻干上清液, 得到环丙沙星免疫原粗品。
- (6) 用葡聚糖凝胶层析作纯化分离。PBS 缓冲溶液为洗脱液。收集偶合物纯品, 再经冻干得到环丙沙星免疫原的白色固体粉末。

具体实施方式

(1) 溶液 A 的制备: 在 50ml 圆形反应瓶内, 搅拌中, 加入环丙沙星 13.9 mg (0.042 mmol), 羟基琥珀酸亚胺 (NHS) 19.33 mg (0.168 mmol), 乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸盐 (EDC.HCl) 48.3 mg (0.252 mmol), 溶解于 10ml 二甲基甲酰胺 (DMF) 中。反应 4 小时。得到溶液 A。备用。

(2) 溶液 B 的制备: 在 100 ml 圆形反应瓶内, 加入 476 mg BSA 50 ml PBS (pH = 7.4)。得到溶液 B。备用。

(3) 制备环丙沙星免疫原: 在 20° C 和搅拌下, 逐步把溶液 A 加入到溶液 B 中。反应 4 小时。得到环丙沙星免疫原溶液。用 PBS 缓冲液透析三天, 每 12 小时更换一次透析液。高速离心 (20, 000g) 30 分钟。冻干上清液, 得到 412 mg 白色固体粉末, 即为环丙沙星免疫原粗品。用 Sephadex-G75 (Sigma) 进行纯化

分离，以 PBS (0.01M, pH=7.4) 为洗脱液。收集偶合物纯品。冻干得到环丙沙星免疫原固体粉末。通过红外和紫外吸收光谱确定产物的偶联和偶联率。

本发明成功地制取了环丙沙星免疫原。这种免疫原可以用于制备环丙沙星抗体，从而为开发环丙沙星在食品中残留的酶联检测方法奠定基础。

专利名称(译)	一种环丙沙星免疫原及其制备方法		
公开(公告)号	CN1560077A	公开(公告)日	2005-01-05
申请号	CN200410023718.9	申请日	2004-03-05
[标]申请(专利权)人(译)	山东大学		
申请(专利权)人(译)	山东大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东大学		
[标]发明人	郗日沫 卢圣欣		
发明人	郗日沫 卢圣欣		
IPC分类号	C07K14/765 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种环丙沙星免疫原是由环丙沙星和牛血清蛋白在室温下，进行偶联反应，用PBS缓冲液进行透析，经高速离心，冻干上清液，得到环丙沙星免疫原粗品。再用葡聚糖凝胶层析纯化，冻干得到环丙沙星免疫原纯品。研究表明，该发明使用的方法成功地合成了这种可用于制备环丙沙星特异抗体的免疫原。本发明为开发环丙沙星药物残留酶联免疫检测方法奠定了基础。

