



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104950105 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 30

(21) 申请号 201410116705. X

(22) 申请日 2014. 03. 26

(71) 申请人 北京维德维康生物技术有限公司

地址 100095 北京市海淀区北清路 156 号中
关村环保科技示范园地锦路 9 号院 3 号
楼

(72) 发明人 吴小平 王文珺 王照鹏 王世恩

陈银辉 邢佑尚 李阳 李向梅

苏丽芳 许舒婷 姚琳 秦誉

朱庭华

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

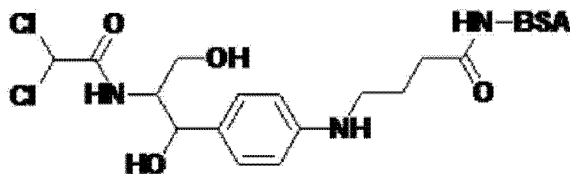
权利要求书1页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

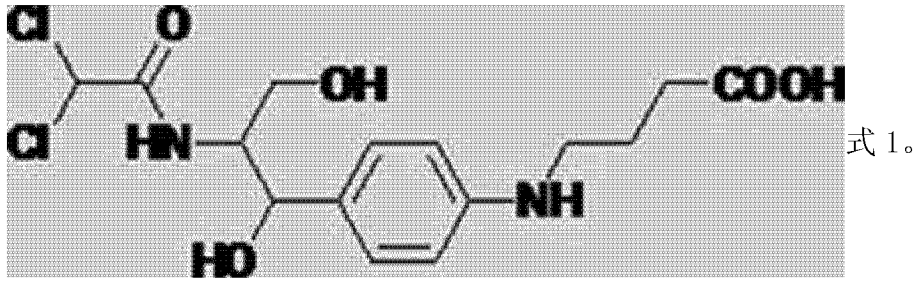
氯霉素半抗原和抗原的制备方法及其在化学发光免疫试剂盒中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种氯霉素半抗原,相应的人工抗原和单克隆抗体,同时本发明也公开了所述氯霉素半抗原,相应的人工抗原和单克隆抗体的制备方法及其应用。本发明提供的氯霉素半抗原与载体蛋白连接可以得到氯霉素抗原。所述氯霉素抗原可应用于制备氯霉素特异性抗体。本发明制备方法简便可行、成本较低,半抗原产率较高。本发明的氯霉素人工抗原,氯霉素特异性抗体,可用于制备检测氯霉素残留的化学发光酶联免疫检测试剂盒,具有简单、快速、处理样品量大、灵敏度高、特异性强等诸多优点。



1. 一种氯霉素半抗原, 为式 1 所示化合物:



2. 式 1 所示化合物的制备方法, 包括如下步骤:

- ①取氯霉素 644mg 溶于 10mL 1M 盐酸, 加入锌粉 300mg, 于 80°C 水浴中反应 15min;
- ②再次加入锌粉 300mg, 继续反应 15min;
- ③将反应后的溶液过滤, 调整滤液 pH 至 8.5, 用 10mL 乙酸乙酯萃取 2 次, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 真空干燥;
- ④将得到的固体产物溶于 10mL 二甲基甲酰胺(DMF), 加氢氧化钠 150mg, 4-溴丁酸 501mg, 于 80°C 水浴中搅拌反应 3h;
- ⑤冷却至室温, 加蒸馏水 50mL, 调整 pH 至 5.0, 用 50mL 乙酸乙酯萃取 2 次, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 真空干燥, 即可得到氯霉素半抗原。

3. 一种氯霉素抗原, 是将式 1 所示化合物和载体蛋白偶联得到的偶联物。

4. 根据权利要求 3 所述氯霉素抗原, 其特征在于, 所述载体蛋白为人血清白蛋白、牛血清白蛋白、卵清蛋白、鼠血清蛋白或兔血清蛋白。

5. 权利要求 3 或 4 所述的氯霉素抗原的制备方法, 包括如下步骤:

- ①称取氯霉素半抗原 8.5mg 溶于 2mL DMF, 加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC) 4.3mg, N-羟基丁二酰亚胺(NHS) 5.2mg, 室温搅拌反应 2h;
- ②称取载体蛋白 50mg, 溶于 5mL 0.1M 碳酸氢钠缓冲液;
- ③将氯霉素半抗原反应液逐滴加入到载体蛋白溶液中, 室温搅拌反应过夜;
- ④用 PBS 在 4°C 条件透析 72h, 期间换透析液 6 次;
- ⑤将透析液在无菌条件下用 0.22 μm 孔径的滤膜过滤, 分装于安培瓶中, -20°C 保存。

6. 权利要求 3 或 4 所述氯霉素抗原在制备氯霉素特异性抗体中的应用。

7. 应用权利要求 3 或 4 所述氯霉素抗原制备得到的特异性抗体。

8. 权利要求 3 或 4 所述氯霉素抗原、权利要求 7 所述特异性抗体在检测氯霉素中的应用。

9. 应用权利要求 3 或 4 所述氯霉素抗原、权利要求 7 所述特异性抗体制备得到的化学发光酶联免疫检测试剂盒。

10. 权利要求 9 所述化学发光酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于, 它包括: 包被有氯霉素抗原的化学发光微孔板、酶标抗体工作液、氯霉素标准溶液、发光底物液、浓缩复溶液、浓缩洗涤液。

氯霉素半抗原和抗原的制备方法及其在化学发光免疫试剂盒中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种半抗原、抗原及其制备方法,具体涉及一种氯霉素半抗原和抗原的制备方法及其在化学发光免疫试剂盒中的应用。

背景技术

[0002] 氯霉素 (Chloramphenicol, CAP) 是一种对革兰氏阳性和阴性细菌都有很好的抑制作用的廉价高效广谱抗生素,一度被广泛应用于农牧业中。但是动物源性食品随着食物链被人体长期摄入,可引发多种疾病。轻者破坏人体内正常菌群的平衡状态,菌群失调,使人体产生耐药菌株,给今后患病使用抗生素治疗带来不良影响;抗生素过敏体质的人会出现过敏反应,危及健康。严重时可干扰骨髓细胞蛋白质的合成,并抑制幼稚细胞 DNA 合成,导致粒细胞减少,引发再生障碍性贫血、溶血、紫癜等恶性疾病。

[0003] 鉴于氯霉素的毒副作用,国际食品学界将其列为禁药,欧盟、美国等均在法规中规定氯霉素残留限量标准为“零容许量”(Zerotolerance),即不得检出,根据欧盟“2002/657/EC”标准规定,动物源性食物中氯霉素的最高要求检出极限是 $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。不久美国 FDA 也做出相应的规定。我国农业部规定了 CAP 在所有食品动物的可食用组织中不得检出,并将其从《中国兽药典》中删除,列为禁药。并相应制定了 SN0219-93 和 SCT3018-2004 行业标准,与国际接轨。

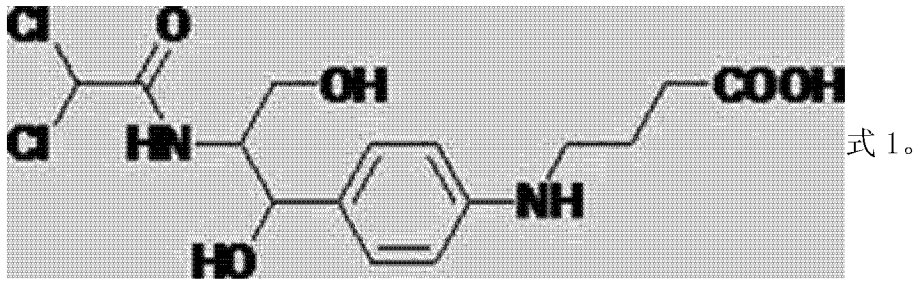
[0004] 氯霉素的检测方法分为物理化学法和免疫化学法,前者有液相色谱法 (LC)、高效液相色谱法 (HPLC)、质谱法 (MS) 等,后者主要是酶免法 (ELISA),检测的灵敏度均达到 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) 级别。近几年,国内外学者又研发出液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS)、液相色谱电喷雾电离质谱法 (LC-EITMS)、微生物分析等物理检测新方法,对 ELISA 方法的应用也有了进一步研究。

[0005] 化学发光免疫检测方法具有特异性强、稳定快速、检测范围宽、操作简单自动化程度高、试剂稳定且有效期长 (6~18 个月) 等优点,其检测限比 ELISA 和理化检测方法高几个数量级。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种氯霉素半抗原及其制备方法和在化学发光试剂盒中的应用。

[0007] 本发明提供的氯霉素半抗原,为式 1 所示的化合物;



[0008] 本发明还公开了式 1 所示化合物的制备方法,包括如下步骤:

- ①取氯霉素 644mg 溶于 10mL 1M 盐酸,加入锌粉 300mg,于 80℃水浴中反应 15min;
- ②再次加入锌粉 300mg,继续反应 15min;
- ③将反应后的溶液过滤,调整滤液 pH 至 8.5,用 10mL 乙酸乙酯萃取 2 次,合并有机相,用无水硫酸钠干燥,真空干燥;
- ④将得到的固体产物溶于 10mL 二甲基甲酰胺(DMF),加氢氧化钠 150mg,4- 溴丁酸 501mg,于 80℃水浴中搅拌反应 3h;
- ⑤冷却至室温,加蒸馏水 50mL,调整 pH 至 5.0,用 50mL 乙酸乙酯萃取 2 次,合并有机相,无水硫酸钠干燥,真空干燥,即可得到氯霉素半抗原。

[0009] 本发明提供的氯霉素抗原,是将式 1 所示化合物和载体蛋白偶联得到的偶联物。

[0010] 常用载体蛋白均可采用,如牛血清白蛋白 (BSA),卵清蛋白 (OVA),人血清白蛋白 (HSA),鼠血清白蛋白 (MSA),甲状腺蛋白 (TG) 或血蓝蛋白 (KLH) 等。

[0011] 所述式 1 所示化合物与 BSA 偶联得到的氯霉素抗原的结构示意图见图 1。

[0012] 本发明还公开了所述氯霉素抗原的制备方法,包括如下步骤:

- ①称取氯霉素半抗原 8.5mg 溶于 2mL DMF,加入 1-(3- 二甲氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺(EDC) 4.3mg, N- 羟基丁二酰亚胺(NHS) 5.2mg,室温搅拌反应 2h;
- ②称取载体蛋白 50mg,溶于 5mL 0.1M 碳酸氢钠缓冲液;
- ③将氯霉素半抗原反应液逐滴加入到载体蛋白溶液中,室温搅拌反应过夜;
- ④用 PBS 在 4℃条件透析 72h,期间换透析液 6 次;
- ⑤将透析液在无菌条件下用 0.22 μm 孔径的滤膜过滤,分装于安培瓶中,-20℃保存。

[0013] 所述氯霉素抗原可以作为免疫原制备氯霉素特异性抗体,也可以作为包被原制备化学发光微孔板。

[0014] 应用氯霉素抗原制备得到的特异性抗体具体可为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0015] 所述氯霉素抗原、所述特异性抗体均可应用于检测氯霉素。

[0016] 本发明还公开了应用氯霉素抗原和氯霉素特异性抗体制备得到的化学发光酶联免疫试剂盒。

[0017] 所述化学发光酶联免疫检测试剂盒,包括:包被有氯霉素抗原的化学发光微孔板、酶标抗体工作液、氯霉素标准溶液、发光底物液、浓缩复溶液、浓缩洗涤液。

[0018] 本发明依靠免疫学、免疫化学基本原理和残留分析技术手段,设计、合成小分子目标分析物半抗原,并与载体蛋白偶联,制备有效人工抗原,免疫动物制备针对小分子分析物的特异性抗体。利用抗原抗体的特异性免疫学反应,定量的检测样品中微量小分子目标分析物。本发明制备方法简便可行、成本较低,半抗原产率较高。本发明克服了现有检测技术中对氯霉素样品预处理复杂、耗时、且需要大量有机溶剂萃取,以及在检测过程中要用到精

①称取氯霉素半抗原 8.5mg 溶于 2mL DMF, 加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC) 4.3mg, N-羟基丁二酰亚胺(NHS) 5.2mg, 室温搅拌反应 2h;

②称取 OVA50mg, 溶于 5mL 0.1M 碳酸氢钠缓冲液;

③将氯霉素半抗原反应液逐滴加入到 OVA 溶液中, 室温搅拌反应过夜;

④用 PBS 在 4℃ 条件透析 72h, 期间换透析液 6 次;

⑤将透析液在无菌条件下用 0.22 μm 孔径的滤膜过滤, 分装于安培瓶中, -20℃ 保存。

[0027] 实施例 3、氯霉素特异性抗体制备

一、氯霉素多克隆抗体的制备

取实施例 1 制备的免疫原 (CAP-BSA) 溶液, 用 pH7.4、0.01M 的 PBS 缓冲液稀释, 得到免疫原稀释液, 用于多克隆抗体的制备。采用新西兰大白兔作为免疫动物。

[0028] 免疫过程如下:

首次免疫: 将免疫原稀释液与等体积的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂, 颈背部皮下多点注射, 免疫剂量为 2.5mg/只;

加强免疫: 首次免疫 4 周后、8 周后和 12 周后, 各进行一次加强免疫, 将免疫原稀释液与等体积的弗氏不完全佐剂混合乳化, 颈背部皮下多点注射, 单次免疫剂量为 2.5mg/只;

末次免疫: 首次免疫 16 周后进行末次免疫, 直接颈背部皮下多点注射免疫原稀释液, 免疫剂量为 2.5mg/只。

[0029] 末次免疫 1 周后, 采血并分离血清, 即为免疫原对应的多克隆抗体。

[0030] 二、氯霉素单克隆抗体的制备

①取实施例 1 制备的免疫原 (CAP-BSA) 溶液, 按 100 μg/只, 以生理盐水溶解免疫原与弗氏完全佐剂等体积混匀, 颈背部皮下注射免疫 6~8 周龄 Balb/c 雌鼠, 初次免疫后第 7、14、28 天以免疫原与弗氏不完全佐剂等体积混匀, 各追加免疫一次, 融合前 3 天以免疫复合物 100 μg/只, 不加弗氏佐剂再追加免疫一次。

[0031] ②按常规方法进行, 取免疫小鼠的脾细胞与处于对数生长期的小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 混合, 然后在 45s 内缓慢加入预热的融合剂 (PEG4000) 进行融合, 用 HAT 培养基悬浮均匀, 再加入适量的饲养细胞, 培养于 96 孔培养板, 于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 5 天后用 HT 培养基半换液, 9 天时候进行全换液。

[0032] ③细胞融合后, 待细胞长到培养孔面积的 1/4 时, 采用分步筛选法筛选杂交瘤细胞。初选采用间接 ELISA 方法, 以包被抗原 (预先用方阵法常规滴定其最佳包被浓度和阳性血清稀释度) 包被化学发光微孔板, 加入被测孔培养上清, 孵育, 清洗后加入羊抗鼠 IgG-HRP 和 IgM-HRP, OPD 进行显色反应。筛选出的阳性孔再用间接竞争 ELISA 方法筛选, 先将细胞上清与 100 μg/mL 的氯霉素等体积混合, 37℃ 水浴作用 30min, 再加入到包被好的化学发光微孔板中。同时用 PBS 取代氯霉素作对照, 其余步骤同上。若经氯霉素阻断后的 OD_{450nm} 值下降到对照孔的 50% 以下, 则判为阳性, 经 2~3 次检测都为阳性的孔, 立即用有限稀释法进行亚克隆化。

[0033] ④将 2~3 次亚克隆建株后的杂交瘤细胞扩大培养, 收集上清液用间接 ELISA 测定效价, 冻存; 并取 8~10 周龄 Balb/c 小鼠腹腔注射液体石蜡 0.5mL/只, 7~10 日后腹腔注射杂交瘤细胞 1~2×10⁶/只, 7~10 日后抽取小鼠腹水, 离心取上清, 测定效价, 并冻存备用。

[0034] 三、酶标抗体的制备

①称取辣根过氧化物酶(HRP)2 mg溶解于0.5 mL水中,加入0.5 mL 0.06 mol/L NaIO₄溶液,4℃避光作用30 min;

②加入160 mmol/L的乙二醇0.5mL,室温作用30 min;

③加入步骤一制备的氯霉素多克隆抗体或步骤二制备的氯霉素单克隆抗体2 mg,混匀后装入处理过的透析袋中,置1000 mL的0.05 mmol/L碳酸钠缓冲液中透析,4℃过夜;

④透析液吸至10 mL的离心管中,加0.25mL 5g/L的NaBH₄溶液,混匀后置4℃2 h;

⑤加入等体积的饱和硫酸铵溶液,4℃作用30 min后4℃下3000 r/min离心25 min,弃上清;

⑥将沉淀溶于1.5 mL0.02 mol/L pH 7.4的PBS中,吸入透析袋内,在0.02mol/L pH 7.4 PBS透析,4℃过夜(中途更换PBS 3次);

⑦将透析袋中液体吸至微量离心管中,4℃下10000r/min离心30min,将上清液吸出,加等量甘油,混匀,-20℃保存备用。

[0035] 四、酶标氯霉素抗体效价的测定

氯霉素标准品购自Sigma公司。

[0036] 用方阵滴定法确定氯霉素包被抗原和制备的氯霉素特异性酶标抗体的工作浓度,氯霉素包被抗原的工作浓度为2 μg/L,酶标多克隆抗体的工作浓度为1:4000,酶标单克隆抗体的工作浓度为1:64000。

[0037] 实施例4、检测氯霉素的化学发光酶联免疫试剂盒及其制备方法

①包被氯霉素抗原(CAP-OVA)的化学发光微孔板;

取实施例2制备的CAP-OVA溶液,用包被缓冲液稀释,得到蛋白浓度为2ng/mL的包被原稀释液。按每孔100 μL包被96孔化学发光微孔板,37℃温育2h,倾去包被液,用洗涤液洗涤3次,每次10s,拍干,然后在每孔中加入150 μL封闭液,37℃温育2h,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0038] 包被缓冲液:pH9.6,0.05mol/L的碳酸钠缓冲液;

封闭液:将BSA10g、0.1mL proclin 300和1000mL pH7.4、0.01M的磷酸盐缓冲液混合,得到封闭液。

[0039] ②酶标抗体工作液:

将实施例3制备的多克隆抗体用抗体稀释液稀释4000倍或将实施例3制备的单克隆抗体用抗体稀释液稀释64000倍,得到氯霉素抗体工作液。

[0040] 抗体稀释液:取BSA10mg,用pH7.4、0.02M的PBS缓冲液溶解并定容至1000mL,得到抗体稀释液。

[0041] ③氯霉素标准溶液:将氯霉素溶于pH7.4、0.05M的磷酸盐缓冲液,分别得到浓度为0.02 μg/L、0.06 μg/L、0.18 μg/L、0.54 μg/L和1.62 μg/L的标准溶液。将pH7.4、0.05M的磷酸盐缓冲液作为标准溶液的阴性对照溶液,称为0溶液。

[0042] ④发光底物液:发光液由A液和B液组成,A液和B液各一瓶。

[0043] A液的制备方法:取0.2g鲁米诺单钠盐、0.1g对碘苯酚、0.16g氯化钠和0.18g EDTA-Na₂,用pH8.4、0.1M的Tris-HCl缓冲液溶解并定容至1000mL。

[0044] B液:含0.3mM H₂O₂、5mM EDTA-Na₂的pH8.4、0.1M的Tris-HCl缓冲液。

[0045] ⑤浓缩洗涤液:将10mL吐温-20、5g叠氮化钠和990mL磷酸盐缓冲液混合,得到所

述洗涤液；所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.01M pH 值为 7.4；

⑥浓缩复溶液：0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液。

实施例 5、检测氯霉素的化学发光酶联免疫试剂盒使用方法

一、组织(猪肉、鸡肉、鱼肉、虾肉)前处理方法

①准确称取 3 ± 0.03 g 均质后的样品于 50 mL 离心管中；

②加入 6 mL 乙酸乙酯,充分涡动 1 min；

③ 4000 r/min 以上,离心 10 min；

④取 4 mL 上层乙酸乙酯于新的离心管中；

⑤ $50 \sim 60^\circ\text{C}$ 水浴中,氮气吹干；

⑥加入 2 mL 正己烷,充分涡动 10 s,再加入 1 mL 复溶液,充分涡动 30 s；

⑦ 4000r/min 以上,离心 5 min,完全弃去上层正己烷及中间层杂质；

⑧取 50 μL 进行检测。

[0046] 组织(猪肉、鸡肉、鱼肉、虾肉)样品稀释系数:0.5

二、应用化学发光试剂盒检测

将 50 μL 各标准工作液 / 样品溶液分别加入对应的标准 / 样品孔中；在每孔中加入 50 μL 酶标抗体工作液；盖好盖板膜,轻轻振荡化学发光微孔板 10s,充分混匀,室温下 ($25 \pm 2^\circ\text{C}$),避光反应 20 min；揭开盖板膜；倒掉板孔中液体,在每孔加入 260 μL 洗涤工作液,浸泡 $15 \sim 30$ s；再重复上一步骤 3 次；倒掉板孔中液体,将化学发光微孔板倒置于吸水纸上,拍干；立即在每孔中加入 50 μL 发光底物 A 液、发光底物 B 液按体积 1:1 混合的混合液；盖好盖板膜,轻轻振荡化学发光微孔板 10 s,充分混匀,室温下 ($25 \pm 2^\circ\text{C}$),避光反应 5 min；揭开盖板膜,放入化学发光仪内读取发光值。

[0047] 三、标准曲线的制作

每个浓度的标准溶液的发光强度平均值 (RLU) 除以 0 溶液的发光强度平均值 (RLU₀),再乘以 100%,即抑制率。计算公式:抑制率(%)= $\text{RLU}/\text{RLU}_0 \times 100\%$ 。以标准溶液中的氯霉素浓度 ($\mu\text{g}/\text{L}$) 的半对数值为 X 轴,抑制率为 Y 轴,绘制标准曲线图。

[0048] 根据标准曲线的回归方程可以求出待测样品溶液中氯霉素或氯霉素衍生物的浓度。本发明中检测结果的分析可以利用专业软件,可以实现大量样品的快速分析,整个检测过程只需 30 分钟就可以完成。为方便检测人员计算结果,专业软件在绘制完成标准曲线后,再次以标准溶液中的氯霉素浓度 ($\mu\text{g}/\text{L}$) 替代标准溶液中的氯霉素浓度 ($\mu\text{g}/\text{L}$) 的半对数值。最终得到的标准曲线如图 2 所示。抑制率 (RLU/RLU₀) 为 50% 时对应的标准溶液中的氯霉素浓度即为 IC₅₀ 值。根据标准曲线图,本发明所提供的氯霉素化学发光酶联免疫试剂盒 IC₅₀=0.059 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

[0049] 四、样品中氯霉素浓度的测定

用每个检测样品溶液的发光强度平均值 (RLU) 除以 0 溶液的发光强度平均值 (RLU₀),再乘以 100%,得到抑制率。相对应每一个检测样品溶液的抑制率,则可从标准曲线上读出检测样品溶液的半对数值,再根据样品溶液的半对数值换算出样品溶液中氯霉素的残留量,最后再乘以各样品前处理过程的稀释倍数,即可计算出样品中氯霉素的浓度。

[0050] 实施例 6、氯霉素化学发光酶联免疫试剂盒检测效果评价

一、试剂盒灵敏度

以最低检测限作为本发明试剂盒的灵敏度指标。取 20 份空白样品,按实施例 5 的使用方法进行检测,计算空白样品发光强度值(RLU)的平均值,并将此平均值带入标准曲线得到对应的样品浓度,计算各对应浓度值的标准差(SD),由平均值加三倍标准差即为该样品的最低检测限(LOD),结果见表 1。

[0051] 表 1 试剂盒在猪肉、鸡肉、鱼肉、虾肉中的最低检测限

样品	样品平均值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$, n=20)	SD (n=20)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
猪肉	0.005	0.003	0.014
鸡肉	0.004	0.003	0.013
鱼肉	0.011	0.004	0.023
虾肉	0.007	0.005	0.022

二、准确度和精密度试验

向不含氯霉素的猪肉、鸡肉、鱼肉、虾肉样品中添加氯霉素标准品,使氯霉素标准品在猪肉、鸡肉样品中的终浓度分别为 0.015、0.03、0.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$;在鱼肉、虾肉样品中的终浓度分别为 0.025、0.05、0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,将添加后的样品分别按照实施例 5 中所述方法进行前处理,得到检测样品溶液。

[0052] 从 3 个不同批次的试剂盒中各抽取 3 个试剂盒进行检测,检测方法如实施例 5 中所述,每个样品重复 5 次,分别计算批内批间变异系数。结果分别见表 2~5。

[0053] 结果表明:猪肉、鸡肉、鱼肉、虾肉样品的平均添加回收率在 75.0~100.0%,说明试剂盒的准确度良好;批内变异系数在 4.2~10.0%,批间变异系数在 4.5~8.1%。批内批间变异系数均 < 10%,说明试剂盒的精密性良好。

[0054] 表 2 猪肉中氯霉素检测准确度和精密度试验结果

添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	批次	检测结果 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					批内变异系数 (%)	批间变异系数 (%)
0.015	第一批	0.014	0.012	0.014	0.015	0.014	7.8	8.0
	第二批	0.012	0.015	0.012	0.014	0.013	10.0	
	第三批	0.015	0.014	0.015	0.013	0.014	6.0	
0.03	第一批	0.027	0.026	0.025	0.028	0.026	4.4	6.4
	第二批	0.027	0.025	0.029	0.029	0.027	6.2	
	第三批	0.024	0.028	0.024	0.027	0.029	8.9	
0.06	第一批	0.054	0.046	0.047	0.047	0.053	7.7	7.9
	第二批	0.052	0.046	0.057	0.051	0.051	7.7	
	第三批	0.051	0.046	0.053	0.059	0.052	9.0	

表 3 鸡肉中氯霉素检测准确度和精密度试验结果

添加浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	批次	检测结果 ($\mu\text{g/kg}$)					批内变异系 数 (%)	批间变异系 数 (%)
0.015	第一批	0.014	0.014	0.015	0.015	0.012	8.7	7.6
	第二批	0.012	0.015	0.013	0.014	0.014	8.1	
	第三批	0.013	0.015	0.014	0.013	0.015	7.1	
0.03	第一批	0.027	0.027	0.026	0.029	0.028	4.2	4.5
	第二批	0.026	0.028	0.029	0.026	0.028	5.0	
	第三批	0.029	0.028	0.029	0.029	0.026	4.7	
0.06	第一批	0.057	0.055	0.052	0.050	0.048	7.0	7.3
	第二批	0.048	0.053	0.054	0.047	0.049	6.2	
	第三批	0.059	0.047	0.048	0.051	0.053	9.2	

表 4 鱼肉中氯霉素检测准确度和精密度试验结果

添加浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	批次	检测结果 ($\mu\text{g/kg}$)					批内变异系 数 (%)	批间变异系 数 (%)
0.025	第一批	0.020	0.024	0.024	0.022	0.020	9.1	8.0
	第二批	0.024	0.020	0.022	0.025	0.021	9.4	
	第三批	0.022	0.020	0.024	0.021	0.023	7.2	
0.05	第一批	0.046	0.040	0.044	0.048	0.049	8.0	7.8
	第二批	0.043	0.042	0.046	0.048	0.046	5.4	
	第三批	0.044	0.041	0.039	0.048	0.039	9.1	
0.1	第一批	0.088	0.080	0.086	0.092	0.078	6.8	7.4
	第二批	0.087	0.089	0.098	0.099	0.082	8.0	
	第三批	0.095	0.097	0.087	0.097	0.089	5.0	

表 5 虾肉中氯霉素检测准确度和精密度试验结果

添加浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	批次	检测结果 ($\mu\text{g/kg}$)					批内变异系 数 (%)	批间变异系 数 (%)
0.025	第一批	0.021	0.023	0.023	0.024	0.020	7.5	7.7
	第二批	0.021	0.025	0.023	0.023	0.023	6.1	
	第三批	0.024	0.020	0.022	0.022	0.019	9.3	
0.05	第一批	0.046	0.045	0.042	0.041	0.039	6.7	6.0
	第二批	0.045	0.048	0.043	0.044	0.048	5.0	
	第三批	0.043	0.047	0.045	0.042	0.047	5.1	
0.1	第一批	0.079	0.081	0.081	0.087	0.090	5.6	8.1
	第二批	0.081	0.077	0.096	0.089	0.084	8.7	
	第三批	0.075	0.088	0.095	0.091	0.097	9.7	

三、试剂盒保存期

试剂盒保存条件为 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ ，经过 15 个月的测定，试剂盒的 0 溶液发光强度值，50% 抑制浓度、样品添加回收率均在正常范围之内。考虑到运输和使用过程中，会有非正常保存条件出现，将试剂盒在 37°C 保存的条件下放置 9 天，进行加速老化实验，结果表明该试剂盒的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°C 冰箱冷冻 9 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 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 至少可以保存 12 个月以上。

[0055] 四、交叉反应率试验

选择与 CAP 结构或功能相似的其他药物按照实施例 4 所述方法配制标准溶液，并按照实施例 5 所述方法绘制标准曲线，通过各种药物的标准曲线分别计算其 50% 抑制浓度。用下列公式计算试剂盒对其它类似物的交叉反应率。与其他药物的交叉反应率越小，说明氯霉素化学发光酶联免疫检测试剂盒对氯霉素的检测特异性越好。结果见表 6。

$$[0056] \quad \text{交叉反应率}(\%) = (\text{氯霉素的 } IC_{50} \text{ 值} / \text{待测药物的 } IC_{50} \text{ 值}) \times 100\%$$

试验结果表明，本发明试剂盒对氯霉素、琥珀氯霉素交叉反应率较好，可用于同时检测样品中氯霉素盒琥珀氯霉素；对氯霉素碱、甲基氯霉素、红霉素、庆大霉素的交叉反应率均小于 1%，所以试剂盒对氯霉素的特异性好，即本发明试剂盒可以检测氯霉素。

[0057] 表 6 氯霉素试剂盒交叉反应率

药物名称	交叉反应率 (%)
氯霉素	100.0
琥珀氯霉素	12.1
氯霉素碱	4.3
甲基氯霉素	<0.1
氯苯尼考	<0.1
红霉素	<0.1
庆大霉素	<0.1

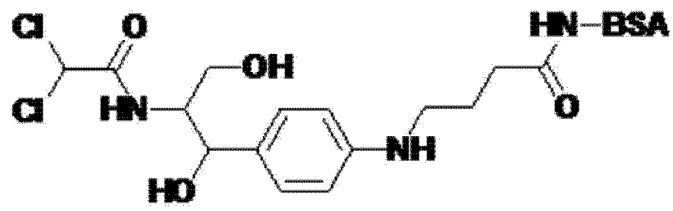


图 1

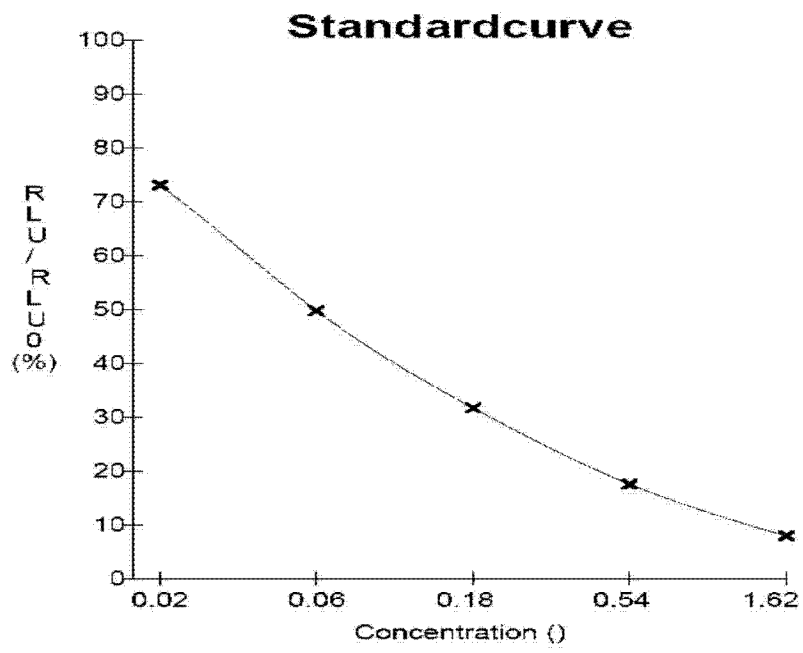


图 2

专利名称(译)	氯霉素半抗原和抗原的制备方法及其在化学发光免疫试剂盒中的应用		
公开(公告)号	CN104950105A	公开(公告)日	2015-09-30
申请号	CN201410116705.X	申请日	2014-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
[标]发明人	吴小平 王文珺 王照鹏 王世恩 陈银辉 邢佑尚 李阳 李向梅 苏丽芳 许舒婷 姚琳 秦誉 朱庭华		
发明人	吴小平 王文珺 王照鹏 王世恩 陈银辉 邢佑尚 李阳 李向梅 苏丽芳 许舒婷 姚琳 秦誉 朱庭华		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	C07C231/12 C07C233/18 C07K1/1077 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/543		
其他公开文献	CN104950105B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种氯霉素半抗原，相应的人工抗原和单克隆抗体，同时本发明也公开了所述氯霉素半抗原，相应的人工抗原和单克隆抗体的制备方法及其应用。本发明提供的氯霉素半抗原与载体蛋白连接可以得到氯霉素抗原。所述氯霉素抗原可应用于制备氯霉素特异性抗体。本发明制备方法简便可行、成本较低，半抗原产率较高。本发明的氯霉素人工抗原，氯霉素特异性抗体，可用于制备检测氯霉素残留的化学发光酶联免疫检测试剂盒，具有简单、快速、处理样品量大、灵敏度高、特异性强等诸多优点。

