



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108191934 B

(45)授权公告日 2020.02.07

(21)申请号 201711483627.7

(22)申请日 2017.12.29

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108191934 A

(43)申请公布日 2018.06.22

(73)专利权人 武汉市农业科学院  
地址 430070 湖北省武汉市洪山区白沙洲  
大道173号

(72)发明人 何斌 刘武 姚艳丰 杨文海  
邵志勇 吴利军 陈夏冰 陈洁  
金尔光 冉志平 陶弼菲 邓蓉蓉  
周华 苏志宏

(74)专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001  
代理人 余晓雪 王敏锋

(51)Int.Cl.

C07H 17/08(2006.01)

C07H 1/00(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

(56)对比文件

CN 102816196 A,2012.12.12,

CN 102816196 A,2012.12.12,

CN 105254693 A,2016.01.20,

JP 昭59-211863 A,1984.11.30,

CN 101029067 A,2007.09.05,

CN 105820202 A,2016.08.03,

CN 104710488 A,2015.06.17,

审查员 臧乐芸

权利要求书2页 说明书8页 附图2页

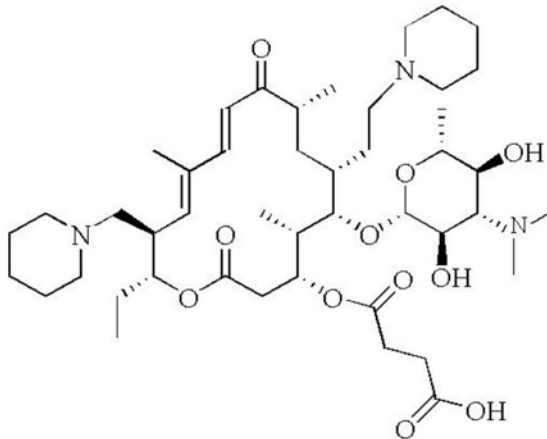
(54)发明名称

一种泰地罗新半抗原衍生物及其制备方法和检测试剂盒

(57)摘要

本发明涉及免疫学领域,具体涉及一种泰地罗新半抗原衍生物及其制备方法和检测试剂盒,具体包括:首先采用三甲基氯硅烷(TMSCl)与泰地罗新反应得到C-2'位-OH TMS保护的泰地罗新,然后再与丁二酸酐反应使C-3位-OH酯化,最后脱保护得到C-3位酯化产物,即泰地罗新半抗原衍生物,再与载体蛋白偶联完成完全抗原的合成,将泰地罗新完全抗原作为人工免疫原免疫小鼠得到血清,泰地罗新-VOA完全抗原作为包被原,完成单克隆抗体的制备、亚克隆筛选、泰地罗新酶联免疫试剂盒的制备等。本试剂盒的主要试剂以工作液的形式提供,检验方法方便易行,具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点。

1. 一种泰地罗新半抗原衍生物, 其特征在于, 所述泰地罗新半抗原衍生物的化学式为  $C_{45}H_{75}N_3O_{11}$ , 分子量为 833.5241, 其分子结构如下:



2. 一种权利要求1所述泰地罗新半抗原衍生物的制备方法, 其特征在于, 所述制备方法包括以下步骤:

(1) 将泰地罗新溶解于溶剂中, 加入三甲基氯硅烷和咪唑, 在室温下搅拌反应后, 水洗, 保留有机相, 干燥后蒸除溶剂;

(2) 将步骤(1)的产物溶于溶剂中, 向其中加入丁二酸酐和吡啶, 在室温下搅拌至反应完全;

(3) 将反应后的溶液水洗, 保留有机相, 干燥后, 加入三氟乙酸脱保护, 蒸干溶剂后得到泰地罗新半抗原衍生物。

3. 根据权利要求2所述的制备方法, 其特征在于: 所述泰地罗新、三甲基氯硅烷、咪唑、丁二酸酐以及吡啶的用量比为: 1mmol:1-1.5mmol:10mg:1.2-1.8mmol:10mL。

4. 根据权利要求3所述的制备方法, 其特征在于: 步骤(1)、(2)中所述溶剂为二氯甲烷, 泰地罗新与步骤(1)、(2)中溶剂用量比为1mmol:10mL:10mL。

5. 一种泰地罗新完全抗原的制备方法, 其特征在于, 所述制备方法步骤如下: 将权利要求1所述的泰地罗新半抗原衍生物、N-羟基琥珀酰亚胺和N,N'-二环己基碳酰亚胺加入溶剂中溶解, 在室温下搅拌反应过夜, 再将其滴入载体蛋白溶液中, 在室温下反应8h; 反应完后, 在4℃下用透析液透析3天, 透析结束后离心, 得到泰地罗新完全抗原。

6. 根据权利要求5所述的制备方法, 其特征在于: 所述泰地罗新半抗原衍生物、N-羟基琥珀酰亚胺、N,N'-二环己基碳酰亚胺的摩尔比为1:2:2。

7. 根据权利要求6所述的制备方法, 其特征在于: 所述载体蛋白为牛血清白蛋白、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、甲状腺蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白。

8. 根据权利要求7所述的制备方法, 其特征在于: 所述载体蛋白溶液的浓度为0.04mmol/L。

9. 根据权利要求8所述的制备方法, 其特征在于: 所述溶剂为二甲基甲酰胺和1,4-二氧六环以体积比1:1配制而成。

10. 一种基于权利要求5-9任一所述的制备方法制备得到的泰地罗新完全抗原。

11. 一种检测动物性食品中泰地罗新残留的酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于, 包含包被有包被原的酶标板以及泰地罗新单克隆抗体工作液, 所述包被原为权利要求10所述的泰

地罗新完全抗原,所述泰地罗新单克隆抗体工作液是由人工免疫原免疫小鼠得到的血清,其中人工免疫原是权利要求10所述的泰地罗新完全抗原。

## 一种泰地罗新半抗原衍生物及其制备方法和检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学领域,具体涉及一种泰地罗新半抗原衍生物及其制备方法和检测动物性食品中泰地罗新残留的酶联免疫检测试剂盒。

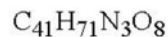
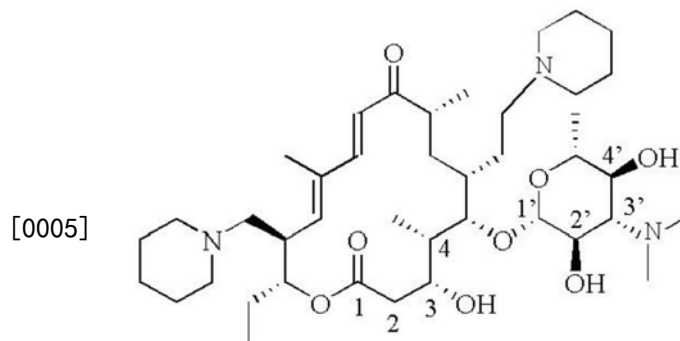
### 背景技术

[0002] 在兽药的免疫化学残留分析中,能否合成稳定的具有良好免疫原性的人工抗原是制备抗体和建立免疫分析方法的最关键步骤。目前国内外关于人工抗原的合成已做了大量的工作,有不少经验可以借鉴,但是由于免疫应答的复杂性和兽药结构的多样性。对于一个新的、具体的兽药待测物,其人工抗原的合成要根据结构特征,具体问题需具体对待。最理想的情况是设计、组合出多套方案,如在半抗原的设计中从不同位置引入不同性质、长度的连接臂,所合成的半抗原与多种载体相结合,采用不同的投料比,控制反应条件,最终得到不同性质、不同结合比的人工抗原,同时进行免疫试验,以达到优化筛选之目的。

### 发明内容

[0003] 为了达到上述目的,本发明通过以下技术方案来实现:

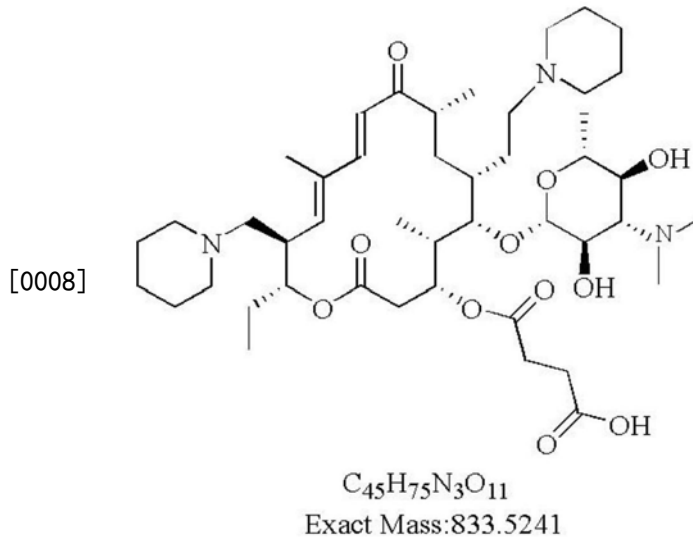
[0004] 泰地罗新的化学结构为:



Exact Mass: 733.5241

[0006] 其在C-3,C-2' 和C-4' 位各有一个羟基,根据大环内酯化合物的结构特点,C-4' 的羟基由于空间位阻活性最低,一般条件下很难反应,C-3位的羟基次之,C-2' 位的羟基最活泼。

[0007] 一种泰地罗新半抗原衍生物,所述泰地罗新半抗原衍生物的化学式为 $C_{45}H_{75}N_3O_{11}$ ,分子量为833.5241,其分子结构如下:



[0009] 本发明还提供了一种上述泰地罗新半抗原衍生物的制备方法,包括以下步骤:

[0010] (1) 将泰地罗新溶解于溶剂中,加入三甲基氯硅烷(TMSCl)和咪唑,在室温下搅拌反应后,水洗,保留有机相,干燥后蒸除溶剂;(2) 将步骤(1)的产物溶于溶剂中,向其中加入丁二酸酐和吡啶,在室温下搅拌至反应完全;(3) 将反应后的溶液水洗,保留有机相,干燥后,加入三氟乙酸脱保护,蒸干溶剂后得到泰地罗新半抗原衍生物。

[0011] 进一步的,步骤(1)中搅拌反应的时间为4h,步骤(1)中脱保护的时间为2h。

[0012] 进一步的,所述泰地罗新、三甲基氯硅烷、咪唑、丁二酸酐、吡啶的用量比为:1mmol:1-1.5mmol:10mg:(1.2-1.8)mmol:10mL;优选为1mmol:1.1mmol:10mg:1.5mmol:10mL。

[0013] 进一步的,所述溶剂为二氯甲烷,泰地罗新与步骤(1)、(2)中溶剂用量比为1mmol:10mL:10mL。

[0014] 本发明还提供了一种泰地罗新完全抗原的制备方法,将泰地罗新半抗原衍生物、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、N,N'-二环己基碳酰亚胺(DCC)加入溶剂中溶解,在室温下磁力搅拌反应过夜,再将其滴入载体蛋白溶液中,在室温下反应8h;反应完后,在4°C下用透析液透析3天,透析结束后离心,得到泰地罗新-载体蛋白完全抗原,即泰地罗新完全抗原,所述溶剂为二甲基甲酰胺(DMF)和1,4-二氧六环以体积比1:1配制而成。

[0015] 进一步的,所述泰地罗新半抗原衍生物、N-羟基琥珀酰亚胺、N,N'-二环己基碳酰亚胺的摩尔比为1:2:2。

[0016] 进一步的,所述载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA)、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、甲状腺蛋白、卵清蛋白(VOA)、血蓝蛋白或人血清白蛋白,进一步的,所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

[0017] 进一步的,所述载体蛋白溶液的浓度为0.04mmol/L。

[0018] 所述室温的温度范围为23°C±2°C。

[0019] 一种检测动物性食品中泰地罗新残留的酶联免疫检测试剂盒,包含包被有包被原的酶标板、酶标记抗体、泰地罗新单克隆抗体工作液、标准溶液、底物显色液A液、底物显色液B液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液,其特征在于,所述包被原为泰地罗新-载体蛋白完全抗原,所述泰地罗新单克隆抗体工作液是由人工免疫原免疫小鼠得到的血清,其中人工

免疫原是泰地罗新-载体蛋白完全抗原。

[0020] 所述底物显色液A液为过氧化脲溶液,底物显色液B液为四甲基联苯胺溶液终止液为2mol/L的硫酸溶液;浓缩洗涤液为含0.6%~1.0%(质量百分数)吐温-20和0.01%~0.02%(质量百分数)的叠氮化钠防腐剂的0.3~0.6mol/L、pH=7.4的PBS缓冲液;浓缩复溶液为pH值为7.4,含有9%~12%(质量百分数)卵清白蛋白、0.1~0.3mol/L的pH=7.4的PBS缓冲液。

[0021] 进一步的,所述包被原为泰地罗新-VOA完全抗原,所述人工免疫原是泰地罗新-BSA完全抗原。

[0022] 与现有技术相比,本发明的优点和有益效果在于:

[0023] 首先采用三甲基氯硅烷(TMSCl)与泰地罗新反应得到C-2'位-OH TMS保护的泰地罗新,然后再与丁二酸酐反应使C-3位-OH酯化,最后脱保护得到C-3位酯化产物,即泰地罗新半抗原衍生物。本发明制备的泰地罗新半抗原能够最大程度的保持该药物分子的分子结构,能够制备出较好效价的单克隆抗体,并成功用于竞争ELISA试剂盒测试泰地罗新药物的浓度。

#### 附图说明

[0024] 图1为实施例一制备的泰地罗新半抗原衍生物的正离子质谱图;

[0025] 图2为实施例一制备的泰地罗新半抗原衍生物的负离子质谱图;

[0026] 图3为实施例二制备的泰地罗新-OVA、泰地罗新-BSA的抗原质控,Lane1:10uLMarker,从上到下依次为116、66.2、45、35、25、18.4、14.4KD;Lane2:10uL泰地罗新-OVA完全抗原;Lane3:10uL泰地罗新-BSA完全抗原;

[0027] 图4为实施例三中以5A9-1E9抗体为例绘制的标准曲线。

#### 具体实施方式

[0028] 下面结合附图和实施方式对本发明做进一步的详细说明。以下实施例仅是范例性的,仅用以对本发明的技术方案做更进一步的详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,在不偏离本发明技术方案的精神和范围内,对技术方案进行的修改或者替换均应涵盖在本发明的权利要求保护范围内。

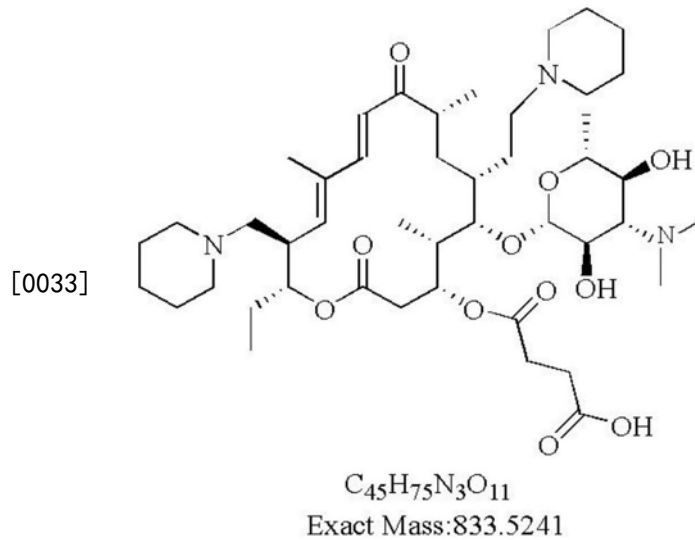
[0029] 以下实施例中,未进行特别说明的试剂和方法均选用本领域内常用的试剂和方法。

[0030] 实施例一:泰地罗新半抗原衍生物的制备

[0031] 称取750mg泰地罗新溶解于10mL二氯甲烷中,然后加入1.1倍泰地罗新摩尔量当量的TMSCl和10mg咪唑,于25℃下搅拌反应4h,反应后的溶液经水洗,保留下层二氯甲烷有机相,将其用无水硫酸钠干燥后,蒸除溶剂二氯甲烷;将蒸除溶剂后的产物全部溶于10mL二氯甲烷中,再加入1.5倍泰地罗新摩尔量当量的丁二酸酐和10mL吡啶,在25℃下搅拌反应过夜,用薄层层析TLC监测,当反应原料反应完后,停止反应,反应后的溶液经少量水洗,保留下层二氯甲烷有机相,将其用无水硫酸钠干燥后,加入三氟乙酸脱保护2h,蒸干溶剂二氯甲烷后得到产物:泰地罗新半抗原衍生物。

[0032] 结果:得到产物为淡黄色,其质谱检测见图2和3,图2为泰地罗新半抗原衍生物的

正离子质谱图,图3为泰地罗新半抗原衍生物的负离子质谱图,可以看出主要是泰地罗新与丁二酸酐成酯后的产物(分子量:正离子834,负离子832),泰地罗新半抗原衍生物的化学式为 $C_{45}H_{75}N_3O_{11}$ ,分子量为833.5241,其分子结构式为:



[0034] 实施例二:泰地罗新完全抗原的合成

[0035] 取10mg实施例1得到的泰地罗新半抗原衍生物(0.012mmol)、3mg N-羟基琥珀酰亚胺NHS(0.024mmol)和5mg DCC(0.024mmol)加入0.5mL溶剂中(DMF和1,4-二氧六环按体积比1:1配制而成)溶解,在室温25℃下,磁力搅拌反应过夜,反应完后的溶液即为A液(A液中如有沉淀,则过滤取上清后再进行下一步操作);取16mgBSA(0.0002mmol),用5mL纯水溶解,为B液;将A液逐滴滴入B液中,然后在室温25℃下反应8h;反应完后,在4℃下用0.01mol/L、pH=7.4的PBS缓冲液作为透析液透析3天,每天更换2次透析液,透析结束后离心,得到泰地罗新-BSA偶联物,即为泰地罗新-BSA完全抗原。

[0036] 将上述BSA替换成0.0002mmol的卵清蛋白OVA后制备得到泰地罗新-OVA完全抗原。

[0037] 实施例三:单克隆抗体的制备,包括以下步骤:

[0038] 一、抗原免疫动物

[0039] 实施例二制备的泰地罗新-OVA完全抗原、泰地罗新-BSA完全抗原的抗原质控,如图3所示。

[0040] 免疫方式

[0041] 使用皮下注射,弗氏免疫及快速免疫两种方式,分6批次共免疫22只SPF级Balb/c小鼠,8周,雌性,来自中国疾病预防控制中心。

[0042] 实验操作

[0043] 弗氏免疫

[0044] 小鼠免疫每次剂量按实施例一制备的泰地罗新-BSA完全抗原50μg/只、注射总量500μL配制,其中弗氏完全佐剂250μL,完全抗原和0.01mol/L、pH=7.4的PBS缓冲液总量250μL,配制完成后用乳化搅拌器乳化40min,然后分多点注射到小鼠背部皮下,共免疫4次,每次免疫间隔2周。

[0045] 快速免疫

[0046] 小鼠免疫每次剂量按泰地罗新-BSA完全抗原25μg/只、注射总量100μL配制,其中

QuickAntibody快速佐剂50 $\mu$ L,完全抗原和0.01mol/L、pH=7.4的PBS缓冲液总量50 $\mu$ L,配制完成后震荡混匀,立即注射到小鼠腿部肌肉处,共免疫2次,每次免疫间隔3周。

[0047] 二、血清效价检测

[0048] 检测方法

[0049] 本实验采用常规Elisa检测法,通过检测免疫小鼠血清效价判断是否满足融合条件。

[0050] 实验操作依次包括以下步骤:

[0051] 包被:将泰地罗新-OVA以0.5 $\mu$ g/mL浓度(将实施例二的泰地罗新-OVA完全抗原用0.01mol/L、pH=7.4的PBS缓冲液进行配制得到)、100 $\mu$ L/孔加入酶标板条中,于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中包被2h;

[0052] 封闭:除去上清,以200 $\mu$ L/孔加入5%脱脂奶粉,然后于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中封闭2h;

[0053] 洗板:除去上清,用洗液(洗涤液为含0.6%~1.0%(质量百分数)吐温-20和0.01%~0.02%(质量百分数)叠氮化钠防腐剂的0.3~0.6mol/L、pH=7.4的PBS缓冲液)清洗3遍,每遍之间隔1min;

[0054] 一抗:用毛细管通过眼球取血方式取约20 $\mu$ L免疫后的小鼠血,于4 $^{\circ}$ C、10000r/min离心5min后收集血清,将小鼠血清用0.01mol/L、pH=7.4的PBS缓冲液稀释1000倍,再2倍比稀释至8个梯度,将稀释好的血清以100 $\mu$ L/孔加入上步酶标板条中,于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱1h;

[0055] 二抗:去除上清后用洗液清洗3遍,将辣根过氧化物酶-羊抗鼠抗抗体用二抗稀释液(0.01mol/L、pH=7.4的PBS缓冲液)按1/10000稀释后,以100 $\mu$ L/孔加到酶标板条内,于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中温浴40min;

[0056] 3,3',5,5'-四甲基联苯胺TMB:去除上清后用洗液清洗5遍,以90 $\mu$ L/孔将TMB加入到酶标板条内,于37 $^{\circ}$ C温浴15min;

[0057] 终止液:将加有TMB的酶标板条取出,加入50 $\mu$ L/孔终止液:2mol/L的硫酸,约1min后检测读数;

[0058] 读数:用酶标仪读取波长在450nm下的OD值,实验结束。

[0059] 当抗血清稀释1:10000时,OD读值大于阴性血清读值的2.2倍,即为满足融合条件。

[0060] 从每个批次的效价检测结果来看,各批次均满足融合条件,其中批次5和批次6的效价最高,小鼠抗血清在1:128000稀释,450nm条件检测时,OD检测值依然大于2.0(阳性标准值),但是在进行竞争ELISA法测试时,发现批次1和批次2的竞争效果稍微优于其他批次。

三免和四免血清学检测效价如下表1:

[0061] 表1免疫后血清效价检测结果

免疫批次	免疫类型	检测方法	检测效价 1	检测效价 2
1	弗氏免疫	竞争 ELISA	1:16K-1:32K	1:32K-1:64K
2	弗氏免疫	竞争 ELISA	1:4K-1:32K	1:16K-1:32K
[0062] 3	弗氏免疫	竞争 ELISA	1:2K-1:16K	1:4K-1:32K
4	快速免疫	竞争 ELISA	1:8K-1:16K	1:8K-1:16K
5	弗氏免疫	竞争 ELISA	1:128K	1:128K
6	弗氏免疫	竞争 ELISA	1:128K	1:128K

[0063] 注:表中,对于批次1-3和批次5-6,检测效价1指三免检测效价,检测效价2指四免检测效价,对于批次4,检测效价1指首次免检测效价,检测效价2指二免检测效价。

[0064] 本发明中,包被抗原也可选用泰地罗新-BSA完全抗原,相应的免疫抗原可选用泰地罗新-OVA完全抗原。

[0065] 三、细胞融合

[0066] 加强免疫

[0067] 对满足融合条件的小鼠进行加强免疫处理,处理方式为腹腔注射,剂量按泰地罗新-BSA完全抗原50 $\mu$ g/只、注射总量200 $\mu$ L配制,其中弗氏不完全佐剂100 $\mu$ L,完全抗原和0.01mol/L、pH=7.4的PBS缓冲液总量100 $\mu$ L,配制完成用乳化搅拌器乳化40min后进行腹腔注射。

[0068] 融合

[0069] 小鼠进行加强免疫处理三天后,将待融合小鼠处死后固定到操作台面,取出脾脏研磨均匀后以1500r/min离心5min,去上清,留底部细胞与已处理的SP2/0骨髓瘤细胞均匀混合后以800r/min离心5min,将上清去除干净后加1mL的聚乙二醇(PEG)-1450,使B淋巴细胞与SP2/0融合,待2种细胞融合完全后,加入15-20mL的DMEM培养基以终止融合反应,再以800r/min离心5min后,取底部细胞平均分成2份,分别用液体和半固体培养,液体培养基是高糖DMEM+20%胎牛血清,半固体培养基是琼脂糖+IMDM+20%胎牛血清,培养条件均为37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>。

[0070] 四、亚克隆筛选及抗体制备

[0071] 单克隆集落挑取:

[0072] 上述液体融合培养(培养条件为37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>),在第7天进行显微镜观察,长出明显可见的克隆团时,用20%HT培养基进行换液处理,1-2天后,进行第一次ELISA检测。

[0073] 上述半固体融合培养(培养条件为37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>),在7-12天时间段,半固体里长出肉眼可见的克隆团时,从培养基皿中挑出均等大小的克隆团至96孔培养板,用20%HT培养基培养2天后换液,1-2天后再进行第一次ELISA检测。

[0074] 抗体制备和纯化:

[0075] 第一次ELISA检测后,挑出阳性值高且状态好的单克隆,进行细胞计数有限稀释,然后在显微镜下观察,待第一次稀释的细胞形成克隆团后(6-8天),进行第二次ELISA检测,

挑出阳性值高且状态好的单克隆,进行细胞计数有限稀释,同时选用健康未经免疫小鼠的脾细胞作为饲养层。在显微镜下观察,待第二次稀释的细胞形成克隆团后(5-6天),挑出单克隆并标记出来,进行第三次的ELISA检测,挑出阳性值高且状态好的单克隆孔定株并扩大培养,收集上清进行一系列的检测,然后用层析法进行抗体的纯化。

[0076] 按照上述的细胞融合和亚克隆筛选及抗体制备方法,对第1批次弗氏免疫后的小鼠进行加强免疫处理,在经过半固体融合培养的底部细胞基础上进行抗体的制备和纯化,制备得到单克隆抗体:5A9-1E9。

[0077] 此过程所用检测方法为竞争Elisa检测法,实验操作与步骤二中的小鼠血清检测方法相似,区别在于本实验待检测的细胞上清无需稀释,故实验步骤不再赘述。

[0078] 制备的单克隆抗体(5A9-1E9)检测值如下表2:

[0079] 表2

	标准品浓度 ( $\mu\text{g/L}$ )	0	5	15	50	100	200
[0080] 5A9-1E9 单克隆抗体 OD 值		2.07 2	1.70 9	1.089	0.546	0.413	0.302

[0081]  $IC_{50}=16.83\mu\text{g/L}$ ,  $IC_{50}$ 表示:能使OD值降低到一半的标准品浓度,其线性相关性 $R^2=0.998$ 。

[0082] 以5A9-1E9抗体为例绘制标准曲线,以泰地罗新标准品的浓度 $\mu\text{g/L}$ 为横坐标,检测的OD值为纵坐标,经四参数拟合绘制得到标准曲线,如图4所示。

[0083] 实施例四:由泰地罗新单克隆抗体制备的酶联免疫试剂盒

[0084] 泰地罗新酶联免疫试剂盒,包含下述各组分:

[0085] (1) 包被有包被原的酶标板;

[0086] (2) 酶标记抗抗体:辣根过氧化物酶-羊抗鼠抗抗体;

[0087] (3) 泰地罗新单克隆抗体工作液;

[0088] (4) 标准溶液:采用梯度稀释法配制泰地罗新标准品溶液,得到系列标准品6瓶,浓度分别为 $0\mu\text{g/L}$ 、 $5\mu\text{g/L}$ 、 $15\mu\text{g/L}$ 、 $50\mu\text{g/L}$ 、 $100\mu\text{g/L}$ 、 $200\mu\text{g/L}$ ,以及高浓度标准品 $10\text{mg/L}$ ;

[0089] (5) 底物显色液A液为过氧化脲溶液,底物显色液B液为四甲基联苯胺溶液;

[0090] (6) 终止液为 $2\text{mol/L}$ 的硫酸溶液;

[0091] (7) 浓缩洗涤液为含 $0.6\%\sim 1.0\%$ (质量百分数)吐温-20和 $0.01\%\sim 0.02\%$ (质量百分数)的叠氮化钠防腐剂的 $0.3\sim 0.6\text{mol/L}$ 、 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液;

[0092] (8) 浓缩复溶液为 $\text{pH}$ 值为 $7.4$ ,含有 $9\%\sim 12\%$ (质量百分数)卵清白蛋白、 $0.1\sim 0.3\text{mol/L}$ 的 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液。

[0093] 本试剂盒的检测方法与目前公开的大环内酯类兽药残留检测方法基本一致。

[0094] 在猪肌肉组织中添加泰地罗新,使其浓度达到 $5\mu\text{g/kg}$ 、 $10\mu\text{g/kg}$ 、 $100\mu\text{g/kg}$ 、 $500\mu\text{g/kg}$ 、 $1000\mu\text{g/kg}$ ;利用上述的试剂盒进行检测。

[0095] 结果表明,当泰地罗新浓度为 $5\mu\text{g/kg}$ 时,猪肌肉组织中的泰地罗新能检测出来,远低于2014年欧盟发布泰地罗新在猪肌肉组织中的最大残留限量 $1200\mu\text{g/kg}$ ,表明本试剂盒具有较好的灵敏度高和准确度。

[0096] 本试剂盒的主要试剂以工作液的形式提供,检验方法方便易行,具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点。

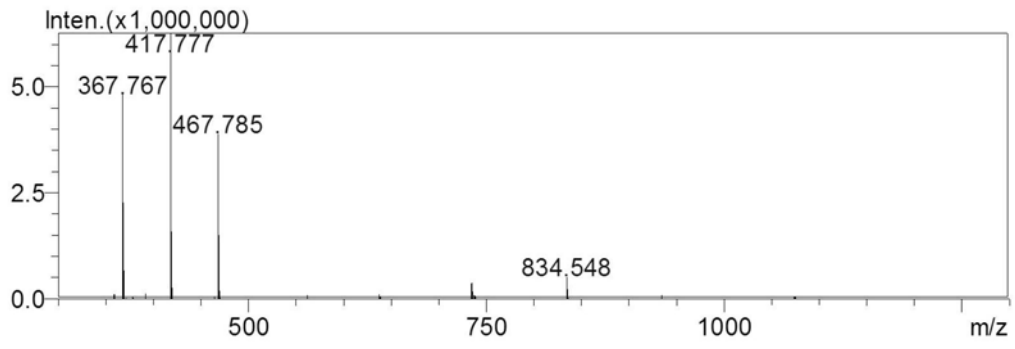


图1

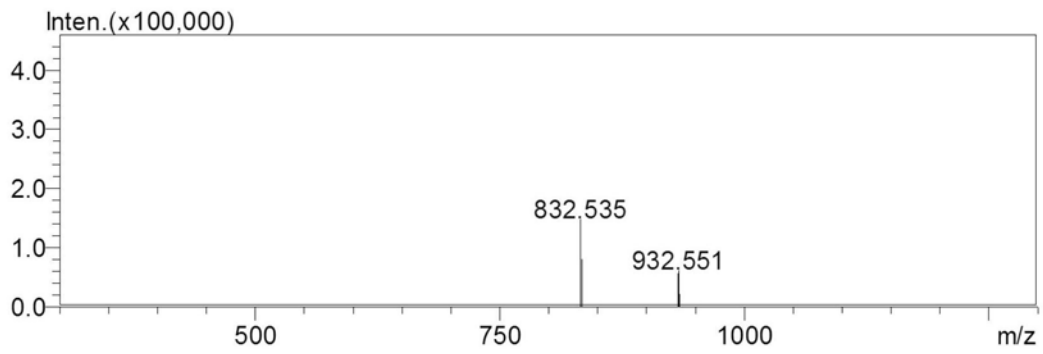


图2

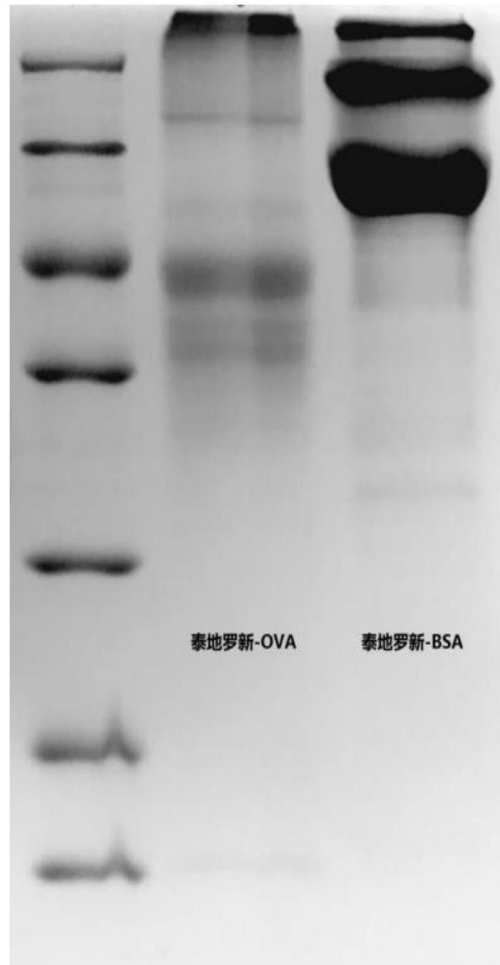


图3

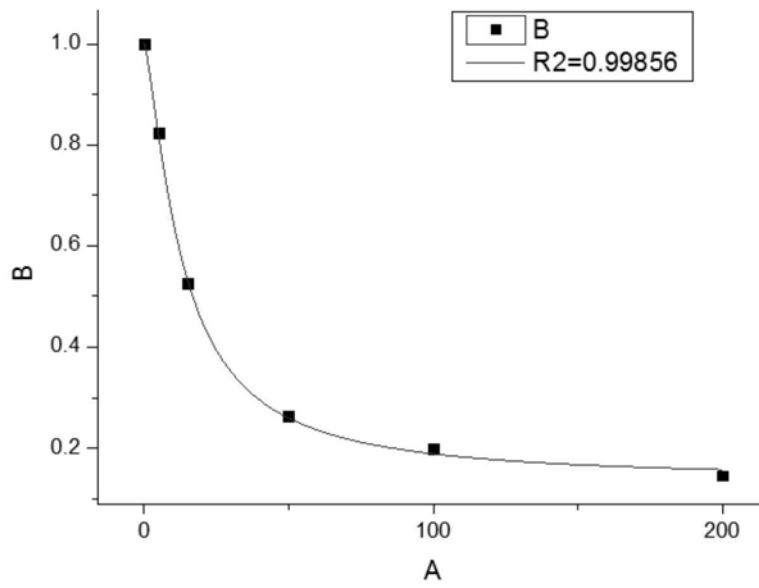


图4

专利名称(译)	一种泰地罗新半抗原衍生物及其制备方法和检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN108191934B</a>	公开(公告)日	2020-02-07
申请号	CN2017111483627.7	申请日	2017-12-29
[标]发明人	何斌 刘武 姚艳丰 杨文海 邵志勇 吴利军 陈夏冰 陈洁 金尔光 冉志平 陶弼菲 邓蓉蓉 周华 苏志宏		
发明人	何斌 刘武 姚艳丰 杨文海 邵志勇 吴利军 陈夏冰 陈洁 金尔光 冉志平 陶弼菲 邓蓉蓉 周华 苏志宏		
IPC分类号	C07H17/08 C07H1/00 G01N33/577 G01N33/535		
CPC分类号	C07H1/00 C07H17/08 G01N33/535 G01N33/577		
代理人(译)	王敏锋		
其他公开文献	CN108191934A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及免疫学领域，具体涉及一种泰地罗新半抗原衍生物及其制备方法和检测试剂盒，具体包括：首先采用三甲基氯硅烷(TMSCl)与泰地罗新反应得到C-2'位-OH TMS保护的泰地罗新，然后再与丁二酸酐反应使C-3位-OH酯化，最后脱保护得到C-3位酯化产物，即泰地罗新半抗原衍生物，再与载体蛋白偶联完成完全抗原的合成，将泰地罗新完全抗原作为人工免疫原免疫小鼠得到血清，泰地罗新-VOA完全抗原作为包被原，完成单克隆抗体的制备、亚克隆筛选、泰地罗新酶联免疫试剂盒的制备等。本试剂盒的主要试剂以工作液的形式提供，检验方法方便易行，具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点。

