



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106083890 A

(43)申请公布日 2016. 11. 09

(21)申请号 201610513422.8

G01N 33/53(2006.01)

(22)申请日 2016.07.04

(71)申请人 北京明日达科技发展有限责任公司

地址 100095 北京市海淀区地锦路9号院3号楼3层

(72)发明人 曹罡 吴雨洋 王照鹏 刘薇
秦誉 覃丹凤

(51) Int. Cl.

C07D 498/06(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/47(2006.01)

C07K 1/107(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

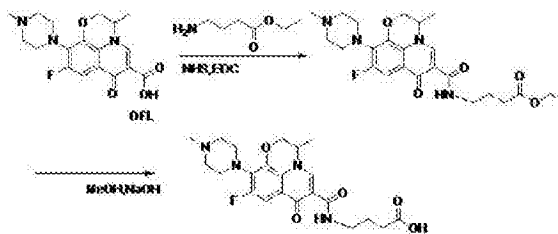
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

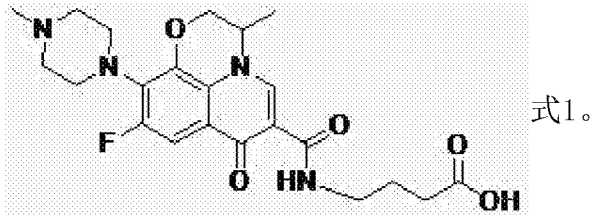
一种氧氟沙星半抗原制备方法及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种氧氟沙星半抗原和相应的人工抗原,同时本发明也公开了所述氧氟沙星半抗原和相应的人工抗原的制备方法及其应用。本发明提供的氧氟沙星半抗原是式1所示产物,用式1所示产物与载体蛋白连接可以得到氧氟沙星抗原。所述氧氟沙星抗原可应用于制备氧氟沙星特异性抗体。本发明制备方法简便可行、成本较低,半抗原产率较高。本发明的氧氟沙星人工抗原,通过免疫动物可产生针对氧氟沙星的特异性抗体,可用于制备检测氧氟沙星残留的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. 一种氧氟沙星半抗原, 为式1所示产物:



2. 式1所示产物的制备方法, 包括如下步骤:

100ml圆底烧瓶中加入氧氟沙星原料药1000mg, DMF 50ml, 20-24℃磁力搅拌30-60min后加入NHS 797.0mg, EDC 1327.6mg, 20-24℃磁力搅拌3-4小时后加入4-氨基丁酸乙酯盐酸盐 696.0mg, 20-24℃磁力搅拌反应过夜, 将反应液滴加到300ml冰水中, 搅拌30-40min析出类白色固体, 过滤, 滤饼用20ml水洗, 收集滤饼50℃鼓风干燥5-6小时得到 1052.6mg氧氟沙星4-氨基丁酸乙酯中间体;

50ml圆底烧瓶中加入1052mg氧氟沙星4-氨基丁酸乙酯中间体, 甲醇30ml, 20-24℃磁力搅拌30-60min后滴加1M氢氧化钠水溶液6.0ml, 20-24℃磁力搅拌3-4小时后35-40℃减压浓缩, 残留物中加入20ml水, 1M盐酸调PH到6.5-7, 析出类白色固体, 过滤, 滤饼用10ml水洗, 收集滤饼50℃鼓风干燥5-6小时得到 840 mg氧氟沙星4-氨基丁酸半抗原。

3. 一种氧氟沙星抗原, 是将式1所示产物和载体蛋白偶联得到的偶联物。

4. 根据权利要求3所述的氧氟沙星抗原, 其特征在于, 所述载体蛋白可为牛血清白蛋白, 卵清蛋白, 人血清白蛋白, 鼠血清白蛋白, 甲状腺蛋白或血蓝蛋白。

5. 权利要求3所述氧氟沙星抗原的制备方法, 包括如下步骤:

(1) 将20mg氧氟沙星半抗原用1.5ml DMF溶解, 200rpm搅拌10min, 加入EDC 21.5mg溶解后再加入NHS 13mg, 室温搅拌(500rpm)活化2-3h;

(2) 称取BSA 50mg溶于3.5ml 0.1M碳酸氢钠溶液中, 200rpm搅拌10min, 将步骤(1)反应液在<4℃冰浴1000rpm搅拌条件下, 逐滴加入到BSA溶液中, 500rpm搅拌反应24h;

(3) 将反应产物装入蒸馏水冲洗干净透析袋, 1L 0.01M pH7.2 PBS, 4℃ 100rpm搅拌透析3天, 将透析产物5000rpm离心6min, 1.5ml/管分装, 将抗原编号, -20℃保存备用。

6. 权利要求3所述氧氟沙星抗原在制备氧氟沙星特异性抗体中的应用。

7. 应用权利要求3所述氧氟沙星抗原制备得到的特异性抗体。

8. 权利要求1所述产物、权利要求3所述氧氟沙星抗原、权利要求7所述抗体在检测氧氟沙星中的应用。

9. 应用权利要求1所述产物、权利要求3所述氧氟沙星抗原、权利要求7所述特异性抗体制备得到的酶联免疫检测试剂盒。

10. 权利要求9所述酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于, 它包括: 包被有氧氟沙星抗原的酶标板、酶标抗体工作液、氧氟沙星系列标准品、底物显色液、终止液、浓缩复溶液、浓缩洗涤液。

一种氧氟沙星半抗原制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测技术领域,具体涉及一种氧氟沙星半抗原、抗原制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 氧氟沙星(Ofloxacin),别名:氟洛沙星、氧洛沙星、奥氟哌酸,是一种人工合成的广谱抗菌药物。对葡萄球菌、链球菌(包括肠球菌)、肺炎链球菌、淋球菌、大肠杆菌、枸橼酸杆菌、志贺杆菌、肺炎克雷伯杆菌、肠杆菌属、沙雷杆菌属、变形杆菌、流感嗜血杆菌、不动杆菌、螺旋杆菌等有较好的抗菌作用,对铜绿假单胞菌和沙眼衣原体也有一定的抗菌作用。尚有抗结核杆菌作用,可与异烟肼、利福平并用于治疗结核病。

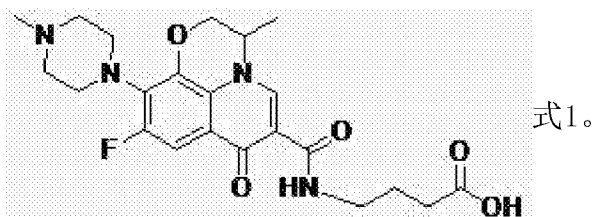
[0003] 该药已在畜禽、水产养殖业广泛使用。氧氟沙星药物的残留除其本身的毒副作用对人体造成直接危害外,更为严重的是人类长期食用含较低浓度氧氟沙星药物的动物源性食品,容易诱导人类致病菌产生耐药性,从而影响该类药物的临床疗效,故美国对生产食品动物使用的管理方式越来越严,并禁止在食用动物养殖中使用氟喹诺酮类药物;我国以及世界卫生组织、欧盟、日本等国家和组织都将喹诺酮类药物列入限制使用的兽药。

[0004] 国内外现已开发出检测氧氟沙星的酶联免疫试剂盒,但是现在国内生产的试剂盒在准确性、灵敏度、特异性等方面还不能完全达到检测的要求。本发明公开的氧氟沙星半抗原、抗原为进一步研制氧氟沙星抗体及氧氟沙星酶联免疫试剂盒提供了原料。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种氧氟沙星半抗原、抗原制备方法及其应用。

[0006] 本发明提供的氧氟沙星半抗原,是式1所示化合物:



[0007] 本发明还公开了式1所示产物的制备方法,包括如下步骤:

100ml圆底烧瓶中加入氧氟沙星原料药1000mg,DMF50ml,20-24℃磁力搅拌30-60min后加入NHS 797.0mg,EDC 1327.6mg,20-24℃磁力搅拌3-4小时后加入4-氨基丁酸乙酯盐酸盐696.0mg,20-24℃磁力搅拌反应过夜,将反应液滴加到300ml冰水中,搅拌30-40min析出类白色固体,过滤,滤饼用20ml水洗,收集滤饼50℃鼓风干燥5-6小时得到 1052.6 mg氧氟沙星4-氨基丁酸乙酯中间体。

[0008] 50ml圆底烧瓶中加入1052mg氧氟沙星4-氨基丁酸乙酯中间体,甲醇30ml,20-24℃磁力搅拌30-60min后滴加1M氢氧化钠水溶液6.0ml,20-24℃磁力搅拌3-4小时后35-40℃减压浓缩,残留物中加入20ml水,1M盐酸调PH到6.5-7,析出类白色固体,过滤,滤饼用10ml水

洗,收集滤饼50℃鼓风干燥5-6小时得到 840 mg氧氟沙星4-氨基丁酸半抗原。

[0009] 本发明提供的氧氟沙星抗原,是将式1所示产物和载体蛋白偶联得到的偶联物。

[0010] 本发明还保护所述氧氟沙星抗原的制备方法,包括如下步骤:

1、将20mg氧氟沙星半抗原用1.5ml DMF溶解,200rpm搅拌10min,加入EDC 21.5mg溶解后再加入NHS 13mg,室温搅拌(500rpm)活化2-3h。

[0011] 2、称取BSA 50mg溶于3.5ml 0.1M碳酸氢钠溶液中,200rpm搅拌10min,使其充分溶解,将步骤1反应液在<4℃冰浴1000rpm搅拌条件下,逐滴加入BSA溶液,500rpm搅拌反应24h。

[0012] 3、将反应产物装入蒸馏水冲洗干净透析袋(10cm),1L0.01M pH7.2 PBS,4℃搅拌(100rpm)透析3d,每天换液3次(早中晚各一次),共计换液9次,将透析产物5000rpm离心6min,1.5ml/管分装,将抗原编号,-20℃保存备用。

[0013] 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。

[0014] 所述氧氟沙星抗原可以作为免疫原免疫动物制备氧氟沙星特异性抗体,也可以作为包被原制备酶标板。

[0015] 所述抗体具体可为单克隆抗体。

[0016] 式1所示产物、所述氧氟沙星抗原、所述抗体均可应用于检测氧氟沙星。

[0017] 本发明还公布了应用氧氟沙星抗原和氧氟沙星单克隆抗体制备得到的酶联免疫试剂盒。

[0018] 所述酶联免疫检测试剂盒,是由包被有氧氟沙星抗原的酶标板、酶标抗体工作液、氧氟沙星系列标准品、底物显色液、终止液、浓缩复溶液、浓缩洗涤液。

[0019] 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。本发明制备方法简便可行、成本较低,半抗原产率较高。本发明的氧氟沙星人工抗原,通过免疫动物可产生了针对氧氟沙星的特异性抗体,用于快速检测食品中的氧氟沙星残留。

附图说明

[0020] 图1为氧氟沙星半抗原的合成路线图。

[0021] 图2为氧氟沙星半抗原的质谱检测结果。

[0022] 图3为氧氟沙星酶联免疫检测试剂盒标准曲线。

具体实施方式

[0023] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0024] 实施例1、氧氟沙星半抗原的制备

一、氧氟沙星半抗原的制备

100ml圆底烧瓶中加入氧氟沙星原料药1000mg,DMF50ml,20-24℃磁力搅拌30-60min后加入NHS 797.0mg,EDC 1327.6mg,20-24℃磁力搅拌3-4小时后加入4-氨基丁酸乙酯盐酸盐

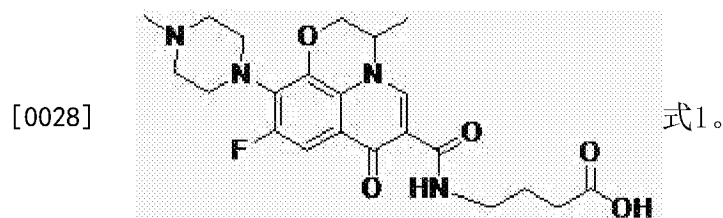
696.0mg, 20-24℃磁力搅拌反应过夜, 将反应液滴加到300ml冰水中, 搅拌30-40min析出类白色固体, 过滤, 滤饼用20ml水洗, 收集滤饼50℃鼓风干燥5-6小时得到 1052.6 mg氧氟沙星4-氨基丁酸乙酯中间体。

[0025] 50ml圆底烧瓶中加入1052mg氧氟沙星4-氨基丁酸乙酯中间体, 甲醇30ml, 20-24℃磁力搅拌30-60min后滴加1M氢氧化钠水溶液6.0ml, 20-24℃磁力搅拌3-4小时后35-40℃减压浓缩, 残留物中加入20ml水, 1M盐酸调PH到6.5-7, 析出类白色固体, 过滤, 滤饼用10ml水洗, 收集滤饼50℃鼓风干燥5-6小时得到 840 mg氧氟沙星4-氨基丁酸半抗原。反应方程式如图1。

[0026] 二、氧氟沙星半抗原的鉴定

对所得产品进行质谱鉴定, 见图2。

[0027] 结果显示其化学结构式如式1所示(MW=446), 即为氧氟沙星半抗原。



[0029] 实施例2、氧氟沙星人工抗原的制备和鉴定

一、氧氟沙星免疫抗原的合成

1、将20mg氧氟沙星半抗原用1.5ml DMF溶解, 200rpm搅拌10min, 加入EDC 21.5mg溶解后再加入NHS 13mg, 室温搅拌(500rpm)活化2-3h。

[0030] 2、称取BSA 50mg溶于3.5ml 0.1M碳酸氢钠溶液中, 200rpm搅拌10min, 使其充分溶解, 将步骤1反应液在反应盒中冰浴(<4℃)搅拌(1000rpm)中逐滴加入(1ml/min), 搅拌(500rpm)反应24h。

[0031] 3、将反应产物装入蒸馏水冲洗干净透析袋(10cm), 1L 0.01M pH7.2 PBS, 4℃ 100rpm搅拌, 透析3d, 每天换液3次(早中晚各一次), 共计换液9次, 将透析产物5000rpm离心6min, 1.5ml/管分装, 将抗原编号, -20℃保存备用。

[0032] 二、氧氟沙星包被抗原的合成

1、将20mg氧氟沙星半抗原用1.5ml DMF溶解, 200rpm搅拌10min, 加入EDC 21.5mg溶解后再加入NHS 13mg, 室温搅拌(500rpm)活化2-3h。

[0033] 2、称取OVA 33.6mg溶于3.5ml 0.1M碳酸氢钠溶液中, 200rpm搅拌10min, 使其充分溶解, 将步骤1反应液在<4℃冰浴1000rpm搅拌条件下, 逐滴加入BSA溶液, 500rpm室温搅拌反应24h。

[0034] 3、将反应产物装入蒸馏水冲洗干净透析袋(10cm), 1L 0.01M pH7.2PBS, 4℃ 100rpm搅拌透析3d, 每天换液3次(早中晚各一次), 共计换液9次, 将透析产物5000rpm离心6min, 1.5ml/管分装, 将抗原编号, -20℃保存备用。

[0035] 实施例3、酶标单抗的制备和特异性鉴定

一、氧氟沙星单抗的制备

1、用上述制备出的免疫原按100μg/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 μ g/只,不加弗氏佐剂再追加免疫一次。

[0036] 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 $^{\circ}$ C,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。

[0037] 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)包被酶标板,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 μ g/mL的氧氟沙星等体积混合,37 $^{\circ}$ C水浴作用30min,再加入到包被好的酶标板中。同时用PBS取代氧氟沙星作对照,其余步骤同上。若经氧氟沙星阻断后的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。

[0038] 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 \times 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。

[0039] 二、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 $^{\circ}$ C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)加入步骤一制备的氧氟沙星单抗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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C 2 h;

(5)加入等体积的饱和硫酸铵溶液,4 $^{\circ}$ C作用30 min后4 $^{\circ}$ C下3000 r/min离心25 min,弃上清;

(6)将沉淀溶于1.5 mL 0.02 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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C下10000r/min离心30min,将上清液吸出,加等量甘油,混匀,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0040] 三、酶标氧氟沙星抗体效价的测定

氧氟沙星标准品购自Sigma公司。

[0041] 用方阵滴定法确定氧氟沙星包被抗原和步骤一制备的单抗的工作浓度,氧氟沙星包被抗原的工作浓度为1.6 μ g/mL,单克隆抗体的工作浓度为1:60000。

[0042] 用不同浓度的氧氟沙星标准品溶液做实验溶液,其浓度如下:0、0.6、1.8、5.4、16.2、48.6 μ g/L。采用8组平行试验(n=8)。间接竞争性ELISA方法:

(1)用上述工作浓度的氧氟沙星抗原包被酶标板,将氧氟沙星标准品实验溶液与酶标抗体溶液同时加入酶标板微孔中,再在每孔中加入50 μ L抗体工作液,同时设置空白孔(将添加的抗体溶液换成高纯水,其它一致)和阴性对照孔(将标准品实验溶液用PBS溶液代替,其它一致),25 $^{\circ}$ C避光环境中反应30min;

- (2)倒出孔内液体,用洗涤液洗涤3~5次,将酶标板倒置在吸水纸上拍干;
- (3)加入底物显色溶液到酶标板微孔中,25℃避光环境中反应15min;
- (4)加入终止液,轻轻振荡混匀,用酶标仪在波长450nm处测定OD值。

[0043] 以OD值为纵坐标,以氧氟沙星实验溶液浓度的log10值为横坐标,绘制半对数标准曲线图。标准曲线具有完整的反S形状,并具有上平台和下平台,标准曲线的平行测定次数8次,实验重复性良好,相对标准偏差(变异系数)均在10%以内。

[0044] 根据标准曲线得出半数抑制量(1C₅₀),确定检测灵敏度。

[0045] 抑制率用以下式计算:

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{(\text{OD}_{\text{max}} - \text{OD}_{\text{min}}) - (\text{OD}_x - \text{OD}_{\text{min}})}{(\text{OD}_{\text{max}} - \text{OD}_{\text{min}})} \times 100\%$$

式中:OD_{max}:为不加标准品时的吸光值,OD_x为标准品x时的吸光值,OD_{min}为空白对照孔的吸光值。

[0046] 由上述公式计算得氧氟沙星抗体在缓冲液中的半数抑制量(1C₅₀)为1.9μg/L。

[0047] 实施例4、检测氧氟沙星的酶联免疫试剂盒及其制备

一、酶联免疫试剂盒由下述物质组成:

- (1)包被氧氟沙星抗原的酶标板;
- (2)酶标氧氟沙星抗体工作液:实施例3中所述酶标抗体溶液;
- (3)氧氟沙星标准品:氧氟沙星标准品溶液浓度分别为0、0.6、1.8、5.4、16.2、48.6μg/L;

(4)底物显色液:由A液和B液组成,A液为2%过氧化脲的水溶液,B液为1%四甲基联苯胺(TMB)的水溶液;

(5)终止液:0.2M硫酸水溶液;

(6)浓缩洗涤液:每1升所述洗涤液是按照如下方法配制得到的: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;

(7)浓缩复溶液:0.04mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0048] 二、包被有氧氟沙星抗原的酶标板及其制备

包被氧氟沙星抗原的聚苯乙烯酶标板:用0.05M的碳酸盐溶液将抗原稀释至1.6μg/mL,包被96孔聚苯乙烯酶标板,每孔100μL,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150μL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。

[0049] 包被缓冲液:pH9.6,0.05mol/L的碳酸钠缓冲液;

封闭液:每1升封闭液按照如下方法配制:将5mL马血清、1g叠氮化钠、30g酪蛋白混合,用磷酸盐缓冲液溶解并定容至1000mL,得到封闭液;其中,磷酸盐缓冲液的浓度为0.02M,pH值为7.2。

[0050] 三、试剂盒检测方法

(一)样品前处理

(1)鸡肉、鸭肉

a) 准确称取1±0.01 g 新鲜样品于 50 mL离心管中;b) 鸡肉样本:加入4 mL鸡肉样

品提取液;鸭肉样本:加入4 mL鸭肉样品提取液,涡动2 min; c) 4000 g 离心10 min;d) 取500 mL上清液于心的离心管中;e) 加入500 mL样品稀释液,涡动10s;f)取50 mL上清液进行检测。

[0051] (2)纯牛奶

a) 将纯牛奶样品充分平衡至室温($25 \pm 2^\circ\text{C}$),混匀;b) 取50 mL纯牛奶样品于离心管中,加入450 mL 样品稀释液,涡动20 s;c) 取50 mL进行检测。

[0052] (3)牛肉、猪肉、猪肝、鸡肝

a) 准确称取 1 ± 0.01 g均质后的样品于离心管中;b) 加入0.5mL样品稀释液,涡动20s;c) 再加入4.5mL乙腈,立即涡动至组织完全分散;d) 室温($25 \pm 2^\circ\text{C}$)下,摇床300rpm振摇20min;e) 4000g以上,离心10min;f) 取1mL上清液于新的离心管中;g) $50-60^\circ\text{C}$ 水浴中,氮气吹干;h) 加入2mL正己烷,涡动20 s,再加入1 mL样品稀释液,涡动10s;i) 4000 g以上,离心5min,完全弃去上层正己烷及中间层杂质;j) 猪肉样品:直接取50 mL进行检测;牛肉、猪肝、鸡肝样品:取100 mL与100 μL 样品稀释液,涡动20s后,取50mL进行检测。

[0053] (二)用试剂盒检测

1、标准曲线的制作

向包被有氧氟沙星抗原的酶标板微孔中加入氧氟沙星标准品溶液50 μL ,然后加入酶标二抗工作液50 μL /孔,再在每孔中加入50 μL 抗体工作液,轻轻振荡混合均匀,用盖板膜盖板后置 25°C 避光环境中反应40min。小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,加入洗涤工作液260mL/孔,充分洗涤4~5次,每次间隔10s,弃去板孔内洗涤液,用吸水纸拍干。加入底物A液50 μL /孔、底物B液50 μL /孔,轻轻振荡混匀, 25°C 恒温箱避光显色15min,每孔加入终止液50 μL ,轻轻振荡混匀,用酶标仪,测定每孔吸光度值。

[0054] 用每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准品溶液(0标准)的吸光度值(B_0)再乘以100%,得到百分吸光度值。以氧氟沙星标准品浓度($\mu\text{g}/\text{L}$)的半对数值为X轴,百分吸光度值为Y轴,绘制标准曲线图。得到的标准曲线如图3所示。

[0055] 百分吸光度值($\%$)= $(B/B_0) \times 100\%$

2、样品中氧氟沙星浓度的测定

用每个检测样本溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准品溶液(0标准)的吸光度值(B_0)再乘以100%,得到百分吸光度值。相对应每一个检测样本溶液的百分吸光度值,则可从标准曲线上读出检测样本溶液的吸光度值,再根据标准品溶液的浓度值换算出样本溶液中氧氟沙星的残留量,最后再乘以各样品前处理过程的稀释倍数,即可计算出样品中氧氟沙星的浓度。

[0056] 四、试剂盒检测效果评价

(一)准确度和精密度试验

向不含氧氟沙星的鸡肉、猪肉样品中添加氧氟沙星标准品,使氧氟沙星标准品在样品中的终浓度分别为4、8、16 $\mu\text{g}/\text{L}$;将添加后的样品分别按照实验三中所述方法进行前处理,得到检测样本溶液。

[0057] 从三个不同批次的试剂盒中各抽取3个试剂盒进行检测,检测方法如实验三中所述,每个实验重复5次,分别计算变异系数。结果分别见表1。

[0058] 表1 准确度和精密度试验结果

样品	添加浓度 (ppb)								
	4			8			16		
	平均回收率	批内变异系数	批间变异系数	平均回收率	批内变异系数	批间变异系数	平均回收率	批内变异系数	批间变异系数
鸡肉	93.8	9.7	9.9	90.4	11.4	9.3	97.1	4.5	7.4
	95.8	12.0		91.3	11.4		95.3	4.2	
	95.3	10.0		97.5	4.4		95.4	9.7	
猪肉	97.5	11.7	9.7	99.6	6.2	8.4	97.1	7.6	8.5
	96.3	9.9		102.3	6.2		99.8	6.5	
	95.8	9.6		95.3	12.6		98.1	11.2	

批内变异系数:同一次测定中各平行样本的变异系数。

[0059] 批间变异系数:同一样本在不同批次测定结果的变异系数,取其平均值。

[0060] 结果表明:鸡肉样品的平均添加回收率在90.4~97.5%,批内变异系数在4.2~12.0%,批间变异系数在7.4~9.9%;猪肉样品的平均添加回收率在91.1~102.3%,批内变异系数在6.2~12.6%,批间变异系数在8.4~9.7%。

[0061] (二)试剂盒保存期

试剂盒保存条件为2~8℃,经过15个月的测定,试剂盒的最大吸光度值(0标准),50%抑制浓度、氧氟沙星添加实际测定值均在正常范围之内。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℃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℃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2~8℃至少可以保存12个月以上。

[0062] (三)交叉反应率试验

选择与氧氟沙星结构或功能相似的其他药物进行交叉反应试验,通过各种药物的标准曲线分别得到其50%抑制浓度。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,说明氧氟沙星酶联免疫检测试剂盒对氧氟沙星的检测特异性越好。结果见表2。

[0063] 表2 氧氟沙星试剂盒交叉反应率

药物名称	交叉反应率 (%)
氧氟沙星	100
培氟沙星	<1%
达氟沙星	<1%
洛美沙星	<1%
诺氟沙星	<1%

试验结果表明,本发明试剂盒对氧氟沙星的交叉反应率为100%、培氟沙星、达氟沙星、洛美沙星和诺氟沙星的交叉反应率均小于1%,所以试剂盒对氧氟沙星的特异性好,即本发明试剂盒可以用于检测氧氟沙星。

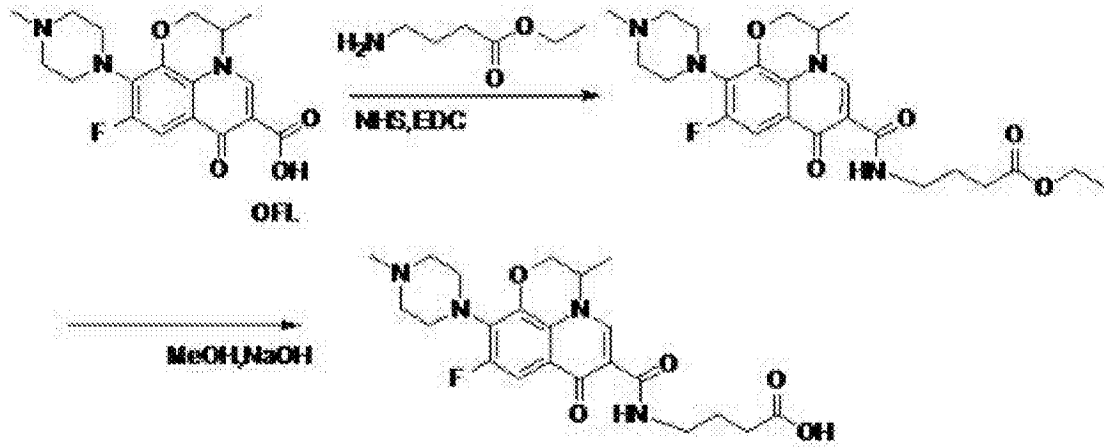


图1

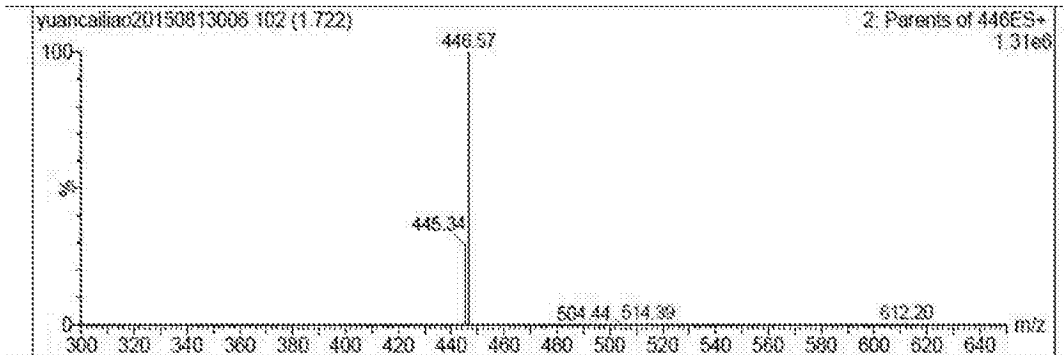


图2

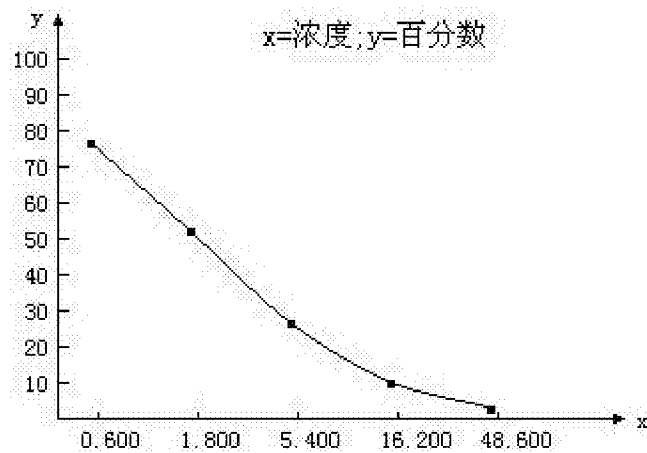


图3

专利名称(译)	一种氧氟沙星半抗原制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN106083890A	公开(公告)日	2016-11-09
申请号	CN201610513422.8	申请日	2016-07-04
[标]申请(专利权)人(译)	北京明日达科技发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京明日达科技发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京明日达科技发展有限公司		
[标]发明人	曹昱 吴雨洋 王照鹏 刘薇 秦誉 覃丹凤		
发明人	曹昱 吴雨洋 王照鹏 刘薇 秦誉 覃丹凤		
IPC分类号	C07D498/06 C07K14/795 C07K14/77 C07K14/765 C07K14/47 C07K1/107 C07K16/44 G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	C07D498/06 C07K14/47 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/53 G01N33/68 G01N2333/76 G01N2333/765 G01N2333/77 G01N2333/795		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种氧氟沙星半抗原和相应的人工抗原，同时本发明也公开了所述氧氟沙星半抗原和相应的人工抗原的制备方法及其应用。本发明提供的氧氟沙星半抗原是式1所示产物，用式1所示产物与载体蛋白连接可以得到氧氟沙星抗原。所述氧氟沙星抗原可应用于制备氧氟沙星特异性抗体。本发明制备方法简便可行、成本较低，半抗原产率较高。本发明的氧氟沙星人工抗原，通过免疫动物可产生针对氧氟沙星的特异性抗体，可用于制备检测氧氟沙星残留的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。

