

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610043204.9

[51] Int. Cl.
C07K 14/435 (2006.01)
C07D 413/04 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年4月15日

[11] 授权公告号 CN 100478357C

[22] 申请日 2006.3.14

[21] 申请号 200610043204.9

[73] 专利权人 山东大学

地址 250100 山东省济南市历下区山大南路27号

[72] 发明人 郝日沫 卢圣欣 张玉兰

[56] 参考文献

CN1731167A 2006.2.8

二氟沙星人工抗原的合成与鉴定. 邹明, 陈杖榴. 中国兽医学杂志, 第6期. 2003

氟喹诺酮类药物在动物性食品中的残留检测研究进展. 邓国东, 杨桂香, 陈杖榴. 中国兽药杂志, 第34卷第3期. 2000

诺氟沙星与牛血清白蛋白及卵清蛋白结合物的合成. 周大勇, 戚晓玉, 陈舜胜等. 上海水产大学学报, 第11卷第4期. 2002

氧氟沙星人工抗原的合成及鉴定. 潘孝成, 祁克宗, 朱良强等. 安徽农业科学, 第34卷第3期. 2006

审查员 张建

[74] 专利代理机构 济南圣达专利商标事务所有限公司

代理人 郑华清

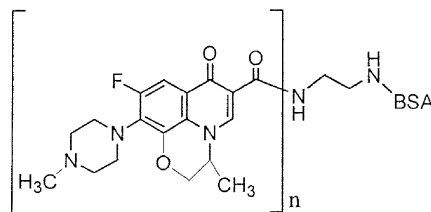
权利要求书1页 说明书7页

[54] 发明名称

氧氟沙星的偶联物的制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种通式(I)的氧氟沙星的偶联物, 由氧氟沙星半抗原与产生免疫原性的载体物质牛血清蛋白或卵清蛋白偶联构成。其中n为与一个牛血清蛋白分子结合的氧氟沙星的分子数, 所述n为整数1~20, BSA为牛血清蛋白, 分子量范围是6.6KDa~6.9KDa。本发明还公开了所述的偶联物的制备方法, 即将氧氟沙星与产生免疫原性的载体物质连接起来, 结合为具有诱发动物免疫系统产生抗体的偶联物。本发明的氧氟沙星的偶联物通过免疫新西兰大白兔, 制备了效价达1:512,000的抗血清, 其最低检测限为0.1ppb。本发明具有方法简便, 快速, 特异, 准确的特点, 为制备氧氟沙星的酶联免疫检测试剂盒提供了基础。



(I)

1. 一种氧氟沙星的偶联物的制备方法，由如下步骤完成：

- (1) 溶液 A 的制备：将氧氟沙星，羟基琥珀酰亚胺，乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺，以摩尔比 1 : 2~8 : 5~15 溶解在二甲基甲酰胺中，反应生成氧氟沙星与乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺的活性中间体，备用；
- (2) cBSA 的制备：在 0~4℃条件下，先将乙二胺溶于 pH 为 7.38~7.56，浓度为 0.01 M~0.02 M 磷酸缓冲溶液中，用浓盐酸调 pH 为 7.38~7.56；以乙二胺 : 牛血清蛋白 : 乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺的摩尔比为 15~25 : 1 : 15~25 的量称取牛血清蛋白和乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺，然后加入乙二胺溶液中，在 20℃±5℃条件下搅拌反应 2~4 小时；之后将反应溶液在 0~4℃条件下，用上述浓度为 0.01 M~0.02 M 磷酸缓冲液搅拌透析 70~80 小时，然后改用蒸馏水透析 20~30 小时，每 6 小时更换一次透析液；在 0~4℃，以 13000 转/分钟离心上述透析后的溶液 15 分钟，取上清液；冻干上清液，得到白色粉末固体 cBSA，备用；
- (3) 溶液 B 的配制：把 cBSA 溶于 pH 为 7.38~7.56，浓度为 0.01 M~0.02 M 的磷酸缓冲溶液中，配成 10.0±5.0 mg/ml 的溶液，备用；
- (4) 按氧氟沙星与 cBSA 的摩尔比为 15~50 : 1 量分别取溶液 A 和溶液 B，在 20℃±5℃温度下，把溶液 A 逐滴加入到不断搅拌状态下的溶液 B 中，反应 4~6 小时，得到溶液 C；
- (5) 溶液 C 用上述浓度为 0.01 M~0.02 M 磷酸缓冲液搅拌透析 70~80 小时，再改用蒸馏水透析 20~30 小时，每 6 小时更换一次透析液；然后在 0~4℃下，以 13000 转/分钟离心上述透析后的溶液 15 分钟，取上清液；
- (6) 冻干上清液，得到白色氧氟沙星的偶联物。

2. 如权利要求 1 所述的氧氟沙星的偶联物的制备方法，其特征是：步骤 (1) 所述氧氟沙星与羟基琥珀酰亚胺、乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺摩尔比为 1 : 5 : 10。

3. 如权利要求 1 所述的氧氟沙星的偶联物的制备方法，其特征是：步骤 (2) 所述乙二胺与牛血清蛋白、乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺的摩尔比为 20 : 1 : 20。

4. 如权利要求 1 所述的氧氟沙星的偶联物的制备方法，其特征是：步骤 (4) 所述的氧氟沙星与 cBSA 的摩尔数比为 30 : 1。

氧氟沙星的偶联物的制备方法

技术领域

本发明涉及一种喹诺酮类抗生素的偶联物及其制备方法与应用,尤其涉及一种氧氟沙星(ofloxacin)的偶联物及其制备方法与应用。属抗生素药免疫检测领域。

背景技术

本发明涉及的下列名称适用于整个说明书和权利要求书:

BSA : 牛血清蛋白(Bovine Serum Albumin), Sigma 公司产品

PBS : 磷酸缓冲液(Phosphate Buffered Saline) (0.01 M, pH = 7.40)

Sephadex-G75 : 葡聚糖凝胶, Sigma 公司产品

cBSA : 经乙二胺修饰的牛血清蛋白

透析膜: 美国联合炭化(United Carbide)公司产品

氧氟沙星: 中国兽医药品监察所

EDC: 乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺, 简称 EDC, Sigma 公司产品

氧氟沙星(ofloxacin)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。氧氟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 非常必要的。

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, 且造成有机溶剂污染, 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物免疫系统产生抗体的免疫原（又称之为完全抗原）。经检索，现在世界上尚未有关于氧氟沙星的免疫原的合成及抗体制备的报道，而且目前国内检测氧氟沙星药物残留的ELISA试剂盒大都购于国外，保存期限短，价格高，远不能满足检测需要，因此研究氧氟沙星的免疫原的合成及抗体制备就显得十分必要。

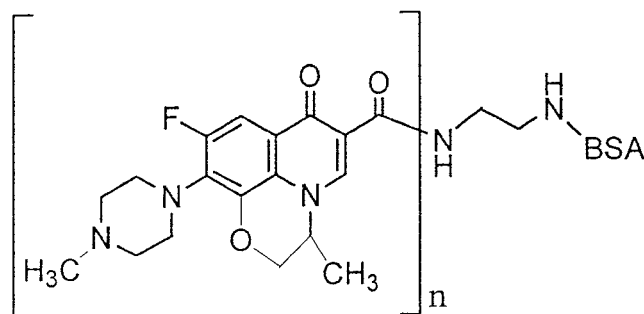
发明内容

针对上述现有技术的不足，本发明要解决的问题是：提供一种能引发动物免疫系统产生针对氧氟沙星有特异反应的抗体的免疫原，即氧氟沙星 (ofloxacin) 的偶联物及其制备方法。同时，本发明还提供了所述的氧氟沙星的偶联物作为免疫原在制备氧氟沙星特异反应抗体中的应用。

本发明的氧氟沙星的偶联物，由氧氟沙星半抗原与产生抗原性的载体物质牛血清蛋白或卵清蛋白偶联构成。

其中：上述产生免疫原性的载体物质优选是牛血清蛋白。

本发明所述的氧氟沙星的偶联物，其结构通式如 (I)



(I)

其中：n：为与一个牛血清蛋白分子结合的氧氟沙星的分子个数，所述 n 为整数 1~20，BSA 为牛血清蛋白 (Bovine Serum Albumin)，分子量范围是 6.6KDa~6.9Kda；

上述偶联物显示出如下物化特征：

- (1) 外观：白色粉末固体；
- (2) 紫外吸收光谱：289 nm, 323 nm, 331 nm。

上述的氧氟沙星的偶联物，其中 n 优选为整数 5~15，BSA 分子量范围是 6.7KDa~6.8KDa。

上述的氧氟沙星的偶联物的制备方法是：将氧氟沙星与产生免疫原性的载体物质连接起来，结合为具有诱发动物免疫系统产生抗体的偶联物，并保持该偶联物的生物活性不变。

上述的氧氟沙星的偶联物的制备方法，由如下步骤完成：

- (1) 溶液 A 的制备：将氧氟沙星，羟基琥珀酰亚胺，乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳

- 二亚胺 (EDC), 以摩尔比 1 : 2~8 : 5~15 溶解在二甲基甲酰胺中, 反应生成氧氟沙星与乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺的活性中间体, 备用;
- (2) cBSA 的制备: 在 0~4°C 条件下, 先将乙二胺溶于 pH 为 7.38~7.56, 浓度为 0.01 M~0.02 M 磷酸缓冲溶液中, 用浓盐酸调 pH 为 7.38~7.56; 以乙二胺 : BSA : EDC 的摩尔比为 15~25 : 1 : 15~25 的量称取 BSA 和 EDC, 然后加入乙二胺溶液中, 在 20°C ± 5°C 条件下搅拌反应 2~4 小时; 将乙二胺与 BSA 的反应溶液在 0~4°C 条件下, 用上述磷酸缓冲液搅拌透析 70~80 小时, 然后改用蒸馏水透析 20~30 小时, 每 6 小时更换一次透析液; 在 0~4°C, 以 13000 转/分钟离心上述透析后的溶液 15 分钟, 取上清液; 冻干上清液, 得到白色粉末固体 cBSA, 备用;
 - (3) 溶液 B 的配制: 把 cBSA 溶于 pH 为 7.38~7.56, 浓度为 0.01 M~0.02 M 的磷酸缓冲溶液中, 配成 10.0 ± 5.0 mg/ml 的溶液, 备用;
 - (4) 按氧氟沙星与 cBSA 的摩尔比为 15~50 : 1 量分别取溶液 A 和溶液 B, 在 20°C ± 5°C 温度下, 把溶液 A 逐滴加入到不断搅拌状态下的溶液 B 中, 反应 4~6 小时, 得到溶液 C;
 - (5) 溶液 C 用上述磷酸缓冲液搅拌透析 70~80 小时, 再改用蒸馏水透析 20~30 小时, 每 6 小时更换一次透析液; 然后在 0~4°C 下, 以 13000 转/分钟离心上述透析后的溶液 15 分钟, 取上清液;
 - (6) 冻干上清液, 得到白色氧氟沙星的偶联物。

在上述的氧氟沙星的偶联物的制备方法中: 步骤 (1) 所述氧氟沙星与羟基琥珀酰亚胺、EDC 的摩尔比优选为 1 : 5 : 10。

在上述的氧氟沙星的偶联物的制备方法中: 步骤 (2) 所述乙二胺与牛血清蛋白、EDC 的摩尔比优选为 20 : 1 : 20。

在上述的氧氟沙星的偶联物的制备方法中: 步骤 (2) (3) 所述的磷酸缓冲液 pH 优选为 7.40, 浓度优选为 0.01 M。

在上述的氧氟沙星的偶联物的制备方法中: 步骤 (4) 所述的氧氟沙星与牛血清蛋白的摩尔数比优选为 30 : 1。

本发明所述的氧氟沙星的偶联物作为免疫原在制备氧氟沙星特异反应抗体中的应用。

利用本发明的技术方案可以成功地把半抗原氧氟沙星与载体蛋白特别是牛血清蛋白 BSA 偶联起来, 从而合成了能够在动物体内引发免疫反应, 产生抗体的完全免疫原——氧氟沙星的偶联物。

利用本发明所述的氧氟沙星的偶联物作为免疫原免疫新西兰大白兔, 成功地获得了对半抗原氧氟沙星有特异反应的抗体。经 ELISA 实验鉴定, 利用本发明所述的氧氟沙星的偶联物作为免疫原制备的氧氟沙星特异反应抗体, 其抗血清效价达到 1 : 512, 000, 其最低检测限为 0.1ppb。

上述的氧氟沙星的偶联物以及高效价的氧氟沙星特异反应抗体的制备成功, 为制备

氧氟沙星的酶联免疫检测试剂盒提供了基础。在实际应用中,把所述制备的氧氟沙星特异反应抗体镀在微孔盘内,就可以用来检验动物源食品中氧氟沙星的残留。由于本发明所述方法具有简易,快速,特异,准确的特点,所以可以用于食品检验检疫中的初步扫描检测之用。这样不但可以节省大量的检验时间,还可以用于现场操作,从而弥补了仪器法费时较长,需要大型仪器设备支持,需要专门的技术人员操作,难用于现场的不足。所以,半抗原氧氟沙星与载体蛋白特别是牛血清蛋白BSA偶联物的合成及抗血清的成功制备为这种快速检验法奠定了基础。

具体实施方式

实施例 1

- (1) 液 A 的制备:称取氧氟沙星 10.00mg, 羟基琥珀酰亚胺 12.75mg, EDC 26.55mg, 溶解在 3ml 二甲基甲酰胺中, 反应生成氧氟沙星与 EDC 的活性中间体, 备用;
- (2) cBSA 的制备:在 0~4℃条件下, 先将乙二胺 18.03mg 溶于 20ml pH 为 7.40, 浓度为 0.01 M 磷酸缓冲溶液中, 用浓盐酸调 pH 为 7.40; 分别称取 1000.00mg BSA (分子量 68,000) 和 57.51mg EDC, 然后加入乙二胺溶液中, 在 20℃条件下搅拌反应 2 小时; 将乙二胺与 BSA 的反应溶液在 0~4℃条件下, 用上述磷酸缓冲液搅拌透析 70 小时, 然后改用蒸馏水透析 24 小时, 每 6 小时更换一次透析液; 在 0~4℃, 以 13000 转/分钟离心上述透析后的溶液 15 分钟, 取上清液; 冻干上清液, 得到白色粉末固体 cBSA, 备用;
- (3) 溶液 B 的配制:把 cBSA 溶于 pH 为 7.40, 浓度为 0.01 M 的磷酸缓冲溶液中, 配成 10.0mg/ml 的溶液, 备用;
- (4) 按氧氟沙星与 cBSA 的摩尔比为 20 : 1 量分别取溶液 A 和溶液 B, 在 20℃温度下, 把溶液 A 逐滴加入到不断搅拌状态下的溶液 B 中, 反应 6 小时, 得到溶液 C;
- (5) 溶液 C 用上述磷酸缓冲液搅拌透析 70 小时, 再改用蒸馏水透析 24 小时, 每 6 小时更换一次透析液; 然后在 0~4℃下, 以 13000 转/分钟离心上述透析后的溶液 15 分钟, 取上清液;
- (6) 冻干上清液, 得到白色氧氟沙星的偶联物。

实施例 2

- (1) A 的制备:称取氧氟沙星 10.00mg, 羟基琥珀酰亚胺 15.94mg, EDC 53.10mg, 溶解在 4.6ml 二甲基甲酰胺中, 反应生成氧氟沙星与 EDC 的活性中间体, 备用;
- (2) cBSA 的制备:在 0~4℃条件下, 先将乙二胺 18.03mg 溶于 20ml pH 为 7.40, 浓度为 0.01 M 磷酸缓冲溶液中, 用浓盐酸调 pH 为 7.40; 分别称取 1000.00mg BSA (分子量 68,000) 和 57.51mg EDC, 然后加入乙二胺溶液中, 在 25℃条件下搅拌反应 4 小时; 将乙二胺与 BSA 的反应溶液在 0~4℃条件下, 用上述磷酸缓冲液搅拌透析 72 小时, 然后改用蒸馏水透析 30 小时, 每 6 小时更换一次透析液; 在 0~4℃, 以 13000 转/分钟离心上述透析后的溶液 15 分钟, 取上清液; 冻干上清液, 得到白色粉末固体 cBSA, 备用;
- (3) 溶液 B 的配制:把 cBSA 溶于 pH 为 7.40, 浓度为 0.01 M 的磷酸缓冲溶液中, 配

成 10.0mg/ml 的溶液，备用；

- (4) 按氧氟沙星与 cBSA 的摩尔比为 30 : 1 量分别取溶液 A 和溶液 B, 在 25℃ 温度下, 把溶液 A 逐滴加入到不断搅拌状态下的溶液 B 中, 反应 4 小时, 得到溶液 C;
- (5) 溶液 C 用上述磷酸缓冲液搅拌透析 72 小时, 再改用蒸馏水透析 30 小时, 每 6 小时更换一次透析液; 然后在 0~4℃ 下, 以 13000 转/分钟离心上述透析后的溶液 15 分钟, 取上清液;
- (6) 冻干上清液, 得到白色氧氟沙星的偶联物。

实施例 3

- (1) 液 A 的制备: 称取氧氟沙星 10.00mg, 羟基琥珀酰亚胺 25.50mg, EDC 79.65mg, 溶解在 10ml 二甲基甲酰胺中, 反应生成氧氟沙星与 EDC 的活性中间体, 备用;
- (2) cBSA 的制备: 在 0~4℃ 条件下, 先将乙二胺 18.52mg 溶于 20ml pH 为 7.56, 浓度为 0.02 M 磷酸缓冲溶液中, 用浓盐酸调 pH 为 7.56; 分别称取 1000.00mg BSA (分子量 67,000) 和 57.51mg EDC, 然后加入乙二胺溶液中, 在 22℃ 条件下搅拌反应 3 小时; 将乙二胺与 BSA 的反应溶液在 0~4℃ 条件下, 用上述磷酸缓冲液搅拌透析 80 小时, 然后改用蒸馏水透析 20 小时, 每 6 小时更换一次透析液; 在 0~4℃, 以 13000 转/分钟离心上述透析后的溶液 15 分钟, 取上清液; 冻干上清液, 得到白色粉末固体 cBSA, 备用;
- (3) 溶液 B 的配制: 把 cBSA 溶于 pH 为 7.56, 浓度为 0.02 M 的磷酸缓冲溶液中, 配成 12.0mg/ml 的溶液, 备用;
- (4) 按氧氟沙星与 cBSA 的摩尔比为 50 : 1 量分别取溶液 A 和溶液 B, 在 22℃ 温度下, 把溶液 A 逐滴加入到不断搅拌状态下的溶液 B 中, 反应 5 小时, 得到溶液 C;
- (5) 溶液 C 用上述磷酸缓冲液搅拌透析 80 小时, 再改用蒸馏水透析 20 小时, 每 6 小时更换一次透析液; 然后在 0~4℃ 下, 以 13000 转/分钟离心上述透析后的溶液 15 分钟, 取上清液;
- (6) 冻干上清液, 得到白色氧氟沙星的偶联物。
- (7) 用 Sephadex-G75 (Sigma) 进行纯化分离, 以 PBS (0.01M, pH=7.40) 为洗脱液。收集氧氟沙星的偶联物纯品。冻干得到氧氟沙星的偶联物即氧氟沙星免疫原固体粉末。

实施例 4

抗体的制备纯化及检测

1. 抗体的制备

选择上述实施例 2 所制备的氧氟沙星的偶联物作为免疫原进行动物免疫实验以制备抗体。

取 1mg/ml 的氧氟沙星的偶联物的溶液 1ml, 加入等体积的弗氏完全佐剂, 充分乳化后, 经皮下多点注射给四只体重 2kg 的雄性健康新西兰大白兔, 1ml/只, 15 天后以同量

抗原与弗氏不完全佐剂充分乳化后进行二免，二免以后，每隔15天加强免疫一次，抗原量减半，共免疫5次。最后一次免疫7天后，心脏采血，室温静置1小时，0-4℃过夜，13000转/分离心15分钟，收集血清，-20℃保存，备用。

2. 抗体的纯化

搅拌状态下向上述制备的抗血清中加入饱和硫酸铵至硫酸铵溶液的终浓度为体积百分比是50%，0-4℃放置过夜，有沉淀物析出；以13000转/分离心15分钟，弃上清液，向沉淀物中加入0.01M、pH7.4的PBS至沉淀溶解，然后加入饱和硫酸铵溶液至硫酸铵溶液的终浓度为体积百分比是33%，0-4℃放置过夜，有沉淀物析出；以13000转/分离心15分钟，弃上清液，向沉淀物中加入0.01M、pH7.4的PBS至沉淀溶解。将上述纯化物用0.01M、pH7.4的PBS，0-4℃透析，换透析液3次，然后加入质量体积百分比为0.02%的叠氮化钠，-20℃保存，备用。

3. 抗体的酶联免疫检测

(1) 效价测定：方法采用常规的间接酶联免疫吸附检测法：

在96孔的酶标板上，用100 μl/孔的氧氟沙星与卵清蛋白的偶联物（10 μg/ml）包被，0-4℃放置过夜，然后用PBST（1000ml pH7.4、浓度0.01M的PBS+体积百分比是0.05% Tween20）洗板四次；用250 μl/孔封闭液（1000ml PBST+质量体积百分比是1%卵清蛋白）封闭，室温放置3小时，洗板；在洗去封闭液后，加100 μl/孔的抗血清，室温放置2小时，洗板；在洗去抗血清以后，每孔加入1：1000的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG 100 μl，室温放置1小时，洗板；加入底物邻苯二胺显色，室温放置10min，再加入2M HCl终止。酶标仪A492nm检测。

经测定：本发明所述氧氟沙星的偶联物抗体效价达1：512,000。

效价的判定以P/N大于2：1的血清最高稀释倍数为该抗体的酶联免疫检测效价。

其中：上述P为代测血清在某一稀释倍数测定的吸光度值，上述N为阴性对照在相应稀释倍数测定的吸光度值。

(2) 特异性测定：

测定步骤与效价测定类似，在上述最佳的包被抗原与抗体浓度条件下，加抗体的同时加入氧氟沙星溶液（从100ppm-1ppt），与包被抗原竞争结合有限的抗体，氧氟沙星药的浓度越高，抗体与包被抗原就结合得越少，从而显色越浅，吸光度值越低。再与空白对照（只加抗体，未加氧氟沙星药的吸光度值）相比较，以确定抗体特异性。

通过测定抗体特异性较好，其最低检测限可达到0.1ppb，检测灵敏度较高，并且与喹诺酮类其它药物的交叉反应较小。

实施例 5

制备氧氟沙星与卵清蛋白的偶联物：

(1) A 的制备：称取氧氟沙星 10.00mg，羟基琥珀酰亚胺 16.00mg，EDC 53.10mg，溶解在 4.6ml 二甲基甲酰胺中，反应生成氧氟沙星与 EDC 的活性中间体，备用；

(2) 溶液 B 的配制：把卵清蛋白溶于 pH 为 7.40，浓度为 0.01 M 的磷酸缓冲溶液中，配成 10.0mg/ml 的溶液，备用；

(3) 按氧氟沙星与卵清蛋白的摩尔比为 30 : 1 量分别取溶液 A 和溶液 B, 在 25 °C 温度下, 把溶液 A 逐滴加入到不断搅拌状态下的溶液 B 中, 反应 4 小时, 得到溶液 C;

(4) 溶液 C 用上述磷酸缓冲液搅拌透析 72 小时, 再改用蒸馏水透析 24 小时, 每 6 小时更换一次透析液; 然后在 0~4 °C 下, 以 13000 转/分钟离心上述透析后的溶液 15 分钟, 取上清液;

(5) 冻干上清液, 得到白色氧氟沙星与卵清蛋白的偶联物。

专利名称(译)	氧氟沙星的偶联物的制备方法		
公开(公告)号	CN100478357C	公开(公告)日	2009-04-15
申请号	CN200610043204.9	申请日	2006-03-14
[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 张玉兰		
发明人	郗日沫 卢圣欣 张玉兰		
IPC分类号	C07K14/435 C07D413/04 C07K1/00 C07K16/18 G01N33/53		
代理人(译)	郑华清		
审查员(译)	张建		
其他公开文献	CN1827642A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种通式(I)的氧氟沙星的偶联物，由氧氟沙星半抗原与产生免疫原性的载体物质牛血清蛋白或卵清蛋白偶联构成。其中n为与一个牛血清蛋白分子结合的氧氟沙星的分子数，所述n为整数1~20，BSA为牛血清蛋白，分子量范围是6.6KDa~6.9KDa。本发明还公开了所述的偶联物的制备方法，即将氧氟沙星与产生免疫原性的载体物质连接起来，结合为具有诱发动物免疫系统产生抗体的偶联物。本发明的氧氟沙星的偶联物通过免疫新西兰大白兔，制备了效价达1:512,000的抗血清，其最低检测限为0.1ppb。本发明具有方法简便，快速，特异，准确的特点，为制备氧氟沙星的酶联免疫检测试剂盒提供了基础。

