



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103102300 B

(45)授权公告日 2016.08.03

(21)申请号 201110356497.7

(22)申请日 2011.11.11

(73)专利权人 北京勤邦生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观镇国际
信息产业基地高新四街8号

(72)发明人 何方洋 冯才伟 孙震 吴鹏
赵正苗 陈炜玲 刘琳

(51) Int. Cl.

C07D 211/62(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 14/75(2006.01)

C07K 14/435(2006.01)

C07K 1/113(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

(56)对比文件

CA 813334 A,1969.05.20,

CN 1861631 A,2006.11.15,

US 3388161 A,1968.06.11,

李利东,等.酶联免疫检测试剂盒应用于牛
奶中四环素残留的测定.《乳业科学与技术》
.2004,(第107期),全文.

武玉香,等.四环素多克隆抗体的制备、鉴定
及ELISA检测.《中国兽药杂志》.2007,第41卷(第

9期),全文.

张桂贤.盐酸四环素人工抗原的合成及鉴
定.《中国畜牧兽医》.2010,第37卷(第3期),全
文.

俎晶晶,等.四环素人工抗原的合成与鉴定.
《郑州大学学报(理学版)》.2007,第39卷(第4
期),全文.

刘智宏,等.四环素类药物多残留酶联免疫
检测方法.《中国农业科学》.2009,第42卷(第1
期),全文.

方莹,等.四环素胶体金免疫层析试纸条的
研制.《中国卫生检验杂志》.2009,第19卷(第11
期),全文.

乐涛,等.多西环素人工抗原的合成与鉴定.
《中国兽药杂志》.2010,第44卷(第1期),全文.

国占宝,等.食品中四环素类残留的酶联免
疫检测试剂盒的研制.《食品科学》.2011,第32卷
(第2期),全文.

肖理文,等.四环素人工抗原的合成与鉴定.
《细胞与分子免疫学杂志》.2008,第24卷(第4
期),全文.

武玉香,等.四环素与金霉素完全抗原的制
备研究.《武汉工业学院学报》.2007,第26卷(第4
期),全文.

武玉香,等.四环素与金霉素完全抗原的制
备研究.《武汉工业学院学报》.2007,第26卷(第4
期),全文.

审查员 府莹

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

四环素半抗原及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种半抗原及其制备方法和
应用,具体涉及一种四环素半抗原,四环素半抗
原是通过四环素与4-吡啶甲酸利用曼尼希反应,
在四环素的酰胺的胺基上引入了N-甲基-4-吡啶
甲酸基团所得到的衍生物.本发明还公开了所述
半抗原的制备方法及其应用.基于四环素半抗原

建立的试剂盒快速检测产品,能够同时快速检测
动物源性食品中多种四环素类药物,使用方便、
检测成本低、检测方法高效、准确、快速、可同时
检测大批量的样本,适于动物源性食品中四环素
类药物残留的现场监控和大量样本的筛查.

CN 103102300 B

1. 一种检测四环素类药物的酶联免疫试剂盒,其特征在于它含有:

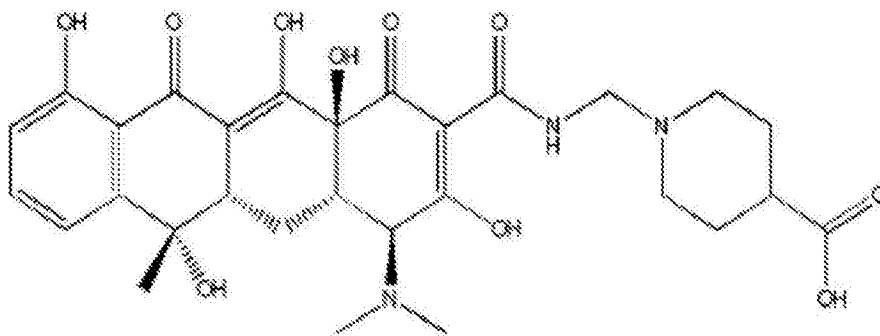
- (1)包被四环素半抗原-载体蛋白的酶标板;
- (2)用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;
- (3)四环素类药物单克隆抗体工作液;
- (4)系列标准品浓缩液6瓶,浓度分别为0 μ g/L、3 μ g/L、6 μ g/L、12 μ g/L、24 μ g/L、60 μ g/L;
- (5)底物显色液由A液和B液组成,A液为过氧化脲溶液,B液为四甲基联苯胺溶液;
- (6)终止液为2mol/L的硫酸溶液;

(7)浓缩洗涤液为含1%吐温-20的0.15~0.3mol/L pH7.4磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比;

(8)复溶工作液为含0.1%~10%BSA的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比;

其中,所述四环素半抗原-载体蛋白的制备方法包括如下步骤:取18mg四环素半抗原溶解于2ml二甲基甲酰胺中;取25mg碳化二亚胺用0.2ml水充分溶解后加入上述溶液中,室温下搅拌24h,即可得到反应液A;称取卵清蛋白36mg,使之充分溶解在8ml pH7.2的PBS中,将反应液A逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中,并于室温下搅拌24h,得到反应液B;反应液B用0.01mol/L PBS 4 $^{\circ}$ C透析3天,每天换3次透析液,以除去未反应的小分子物质,得到包被原,分装,于-20 $^{\circ}$ C保存备用;

所述四环素半抗原的制备方法为:取1.1g四环素,0.37g 4-吡啶甲酸,2ml 37%甲醛,在50ml乙醇中混合,在60%微波强度下反应3-5分钟;除去溶剂后,反相柱层析分离,得到黄色固体;所制备的四环素半抗原分子结构式为:



(式 I)。

2. 如权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于四环素类药物单克隆抗体是由四环素类药物免疫原免疫动物制备得到的。

3. 如权利要求2所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于所述四环素类药物免疫原的制备方法包括如下步骤:

取10mg四环素半抗原用1ml二甲基甲酰胺溶解,冷却至10 $^{\circ}$ C,加入10 μ l氯甲酸异丁酯,10 $^{\circ}$ C搅拌反应30min,得到溶液A;取40mg牛血清白蛋白用3ml 50mmol/L Na₂CO₃溶解,与溶液A混合,10 $^{\circ}$ C反应4h,然后4 $^{\circ}$ C过夜,得到溶液B;溶液B用0.01mol/L PBS 4 $^{\circ}$ C透析3天,每天换3次透析液,以除去未反应的小分子物质,得到免疫原,分装,于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

4. 如权利要求1-3任一项所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于所述酶联免疫试剂盒可应用于检测动物源性食品中四环素类药物残留。

5. 如权利要求4所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于所述四环素类药物为四环素、金霉素、土霉素、强力霉素、米诺环素、去甲金霉素、吡甲四环素。

四环素半抗原及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种半抗原及其制备方法和应用,具体涉及四环素半抗原及其制备方法和应用。

背景技术

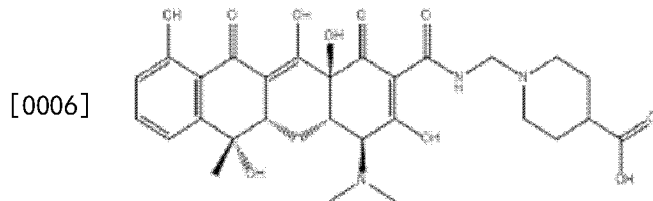
[0002] 四环素类药物(TCs)具有广谱高效的杀菌抗生功效,可以与大多数药物或饲料添加剂混用,已被广泛应用于畜禽生产中。但过量使用不可避免的造成了严重的药物残留,成为严重危害人类健康的食品安全隐患之一。为此世界各国对TCs残留的检测十分关注。欧盟第675/92号令中初步规定在肌肉及牛奶中的四环素族化合物的总量不得超过100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,在肾脏、肝脏及鸡蛋中分别不得超过600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。日本肯定列表制度规定奶和鸡蛋中四环素类化合物的总量分别不得超过100 ng/mL 和400 ng/mg 。

[0003] 已报道的四环素类药物残留的检测方法有微生物法、薄层色谱法、高效液相测定法、高效液相色谱-串联质谱法、毛细管电泳、电化学分析、化学发光、酶联免疫法等,仪器检测方法对待测样品的前处理要求高,操作繁琐,需要精密仪器设备。免疫学方法具有快速、灵敏、特异性高等特点,是药品残留检测的有效方法之一。目前常采用酶联免疫检测试剂盒对大量样品进行四环素类药物残留的初筛,筛选阳性样品再用仪器方法进行进一步确证。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种四环素半抗原及其制备方法。

[0005] 本发明提供的四环素半抗原分子结构式为:



[0007] 本发明提供的四环素半抗原的制备方法,包括如下步骤:

[0008] 取1.1-2.2g四环素,四环素用量优选为1.1g,0.37-0.75g 4-哌啶甲酸,4-哌啶甲酸用量优选为0.37g,2-5ml 37%甲醛,甲醛用量优选为2ml,在50-100ml乙醇中混合,乙醇用量优选为50ml,在60%微波强度下反应3-5分钟;除去溶剂后,反相柱层析分离,得到黄色固体。

[0009] 本发明的另一个目的是上述四环素半抗原在免疫检测中的应用,具体包括由所述四环素半抗原与载体蛋白偶联得到的四环素类药物抗原,及由所得四环素类药物抗原免疫动物制备得到的四环素类药物抗体。

[0010] 其中所述载体蛋白可为牛血清蛋白、鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、兔血清蛋白、人血清蛋白、卵清白蛋白、血蓝蛋白或纤维蛋白原。

[0011] 所述抗体为四环素类药物单克隆抗体。

[0012] 本发明还提供由上述四环素类药物抗体制备的酶联免疫试剂盒,及其在检测动物

源性食品中四环素类药物残留的应用。

[0013] 本发明提供的四环素半抗原是利用曼尼希反应,在其酰胺的胺基上引入了N-甲基-4-哌啶甲酸基团的衍生物,合成方法简单,纯度、产率较高;用该半抗原作为原料,制备适于动物免疫的抗原体系免疫动物,所得抗体的效价、亲和力都比较好;所得的抗体用于酶联免疫试剂盒,该酶联免疫试剂盒可以检测四环素、金霉素、土霉素、强力霉素、米诺环素、去甲金霉素、吡甲四环素。试剂盒使用方便、检测成本低、检测方法高效、准确、快速、可同时检测大批量的样本,适于动物源性食品中四环素类药物残留的现场监控和大量样本的筛查。本发明的四环素半抗原在四环素类药物的检测中发挥重要作用。

附图说明

[0014] 图1:四环素半抗原合成图

[0015] 图2:四环素半抗原核磁共振氢谱图

[0016] 图3:四环素类药物ELISA标准曲线

具体实施方式

[0017] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。

[0018] 实施例1:四环素半抗原的合成和鉴定

[0019] 取1.1g四环素,0.37g 4-哌啶甲酸,2ml 37%甲醛,在50ml乙醇中混合,在60%微波强度下反应3-5分钟;除去溶剂后,反相柱层析分离,得到黄色固体。

[0020] 取上述产物经核磁共振氢谱测定,如图2所示,图谱中10.5ppm(mg/L)附近的峰为羧酸上的H,2~3ppm(mg/L)之间的峰为哌啶环上的H,初步说明半抗原合成成功。

[0021] 实施例2:四环素类药物抗原

[0022] 将四环素半抗原与载体蛋白偶联得到四环素类药物抗原。

[0023] 一、免疫原制备——四环素半抗原-牛血清白蛋白(BSA)偶联物合成

[0024] 取10mg四环素半抗原用1ml二甲基甲酰胺(DMF)溶解,冷却至10℃,加入10μl氯甲酸异丁酯,10℃搅拌反应30min,得到溶液A;取40mg BSA用3ml 50mmol/L Na₂CO₃溶解,与溶液A混合,10℃反应4h,然后4℃过夜,得到溶液B;溶液B用0.01mol/LPBS 4℃透析3天,每天换3次透析液,以除去未反应的小分子物质,得到免疫原,分装,于-20℃保存备用。

[0025] 二、包被原制备——四环素半抗原-卵清白蛋白(OVA)偶联物合成

[0026] 取18mg四环素半抗原溶解于2ml DMF中;取25mg碳化二亚胺(EDC)用0.2ml水充分溶解后加入上述溶液中,室温下搅拌24h,即可得到反应液A;称取OVA 36mg,使之充分溶解在8ml PBS(pH 7.2)中,将反应液A逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中,并于室温下搅拌24h,得到反应液B;反应液B用0.01mol/L PBS 4℃透析3天,每天换3次透析液,以除去未反应的小分子物质,得到包被原,分装,于-20℃保存备用。

[0027] 三、四环素类药物抗原的鉴定

[0028] 将载体蛋白、四环素半抗原、四环素半抗原-载体蛋白偶联物用pH7.4的PBS配成0.5mg/ml的溶液,以0.01mol/L pH7.4PBS调零,用紫外分光光度计在波长200~800nm范围内扫描,得到载体蛋白、四环素半抗原、四环素半抗原-载体蛋白偶联物的吸收曲线,并计算

其结合比。结果发现,三者出现不同的吸收曲线,表明四环素半抗原与载体蛋白偶联成功,半抗原与牛血清白蛋白的结合比为18~22:1,半抗原与卵清白蛋白的结合比为17~21:1。

实施例3四环素类药物单克隆抗体

[0029] 一、四环素类药物单克隆抗体的制备

[0030] 动物免疫:将免疫原注入到Ba1b/c小鼠体内,免疫剂量为150 μ g/只,使其产生多克隆抗体。

[0031] 细胞融合和克隆化:小鼠血清测定结果较高后,取其脾细胞,按8:1比例与SP2/0骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争ELISA测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,直到得到分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0032] 细胞冻存和复苏:将四环素类药物单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成 1×10^9 个/ml的细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入37 $^{\circ}$ C水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0033] 单克隆抗体的生产与纯化:将Ba1b/c小鼠腹腔注入灭菌石蜡油0.5ml/只,7天后腹腔注射链霉素的单克隆杂交瘤细胞株 6×10^5 个/只,7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化,-20 $^{\circ}$ C保存。

[0034] 二、单克隆抗体效价的测定

[0035] 用间接竞争ELISA法测定抗体的效价为1:100000~150000。

[0036] 间接竞争ELISA方法:用四环素半抗原-卵清白蛋白偶联物包被酶标板,加入四环素标准品工作液溶液和单克隆抗体工作液,25 $^{\circ}$ C反应60min,倒出孔内液体,用PBST洗涤液洗涤3~5次,用吸水纸拍干;加入酶标二抗,轻轻振荡混匀,25 $^{\circ}$ C反应30min,倒出孔内液体,用PBST洗涤液洗涤3~5次,用吸水纸拍干;加入底物显色液,25 $^{\circ}$ C反应30min后,加入终止液终止反应;设定酶标仪于波长450nm处测定每孔吸光度值。

[0037] 三、单克隆抗体的特异性

[0038] 抗体特异性是指它同特异性抗原结合的能力与同该类抗原类似物结合能力的比较,常用交叉反应率作为评价标准。交叉反应越小,抗体的特异性则越高。

[0039] 本实验将四环素、金霉素、土霉素、强力霉素、米诺环素、去甲金霉素、吡甲四环素7种药物做系列稀释,分别与单克隆抗体进行间接竞争ELISA,制作标准曲线,分析得到 $1C_{50}$,然后按下式计算交叉反应率:

[0040] 交叉反应率 (%) = $\frac{\text{引起50\%抑制的四环素浓度}}{\text{引起50\%抑制的其它四环素类药物浓度}} \times 100\%$

[0041] 结果显示各四环素类药物的交叉反应率为:四环素100%,金霉素96.8%,土霉素58.3%、强力霉素75.8%、米诺环素75.9%、去甲金霉素86.9%、吡甲四环素77.3%。本发明抗体可以同时检测四环素、金霉素、土霉素、强力霉素、米诺环素、去甲金霉素、吡甲四环素7种四环素类药物。

[0042] 实施例4 由四环素类药物单克隆抗体制备的酶联免疫试剂盒

[0043] 一、四环素类药物酶联免疫试剂盒的组成

[0044] (1)包被四环素半抗原-载体蛋白的酶标板;

[0045] (2)用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;

[0046] (3)四环素类药物单克隆抗体工作液;

[0047] (4)系列标准品浓缩液6瓶,浓度分别为0 μ g/L、3 μ g/L、6 μ g/L、12 μ g/L、24 μ g/L、60 μ g/L;

[0048] (5)底物显色液由A液和B液组成,A液为过氧化脲溶液,B液为四甲基联苯胺溶液;

[0049] (6)终止液为2mol/L的硫酸溶液;

[0050] (7)浓缩洗涤液为含1%吐温-20的0.15~0.3mol/LpH7.4磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比;

[0051] (8)复溶工作液为含0.1%~10%BSA的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比。

[0052] 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。

[0053] 二、酶联免疫试剂盒检测实际样本的应用

[0054] 1.样本的前处理

[0055] (1)组织(肌肉、肝脏)样本前处理方法

[0056] 前处理方法(a)

[0057] 用均质器均质组织样本;称取2.0 \pm 0.05g均质物至50ml聚苯乙烯离心管中,加入8mlMcIlvain-buffer(称取12.9g一水柠檬酸(Citric acid monohydrate)、10.9g十二水合磷酸氢二钠、37.2g乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA-Sodium salt)加1升去离子水溶解混匀,调pH至3.8)用振荡器振荡30min;3000g以上,10 $^{\circ}$ C离心10min;取5ml上层清亮液体(切勿取到悬浮杂质,以免堵塞柱子)滤液用R1DAC18柱按以下步骤纯化:

[0058] 用3ml甲醇洗涤柱子;

[0059] 用2ml去离子水洗涤柱子;

[0060] 取5ml滤液进柱;

[0061] 用2ml去离子水洗涤柱子;

[0062] 小心压出所有的液体;

[0063] 用1ml洗脱液(称取1.8g乙二酸(Oxalic acid)用甲醇溶解定容至1升)洗脱样品,流速为15滴/分钟,收集于10ml玻璃试管中;

[0064] 用复溶工作液按1:9体积比稀释,取50 μ l进行分析。

[0065] 前处理方法(b)

[0066] 用均质器均质组织样本;称取1.0 \pm 0.05g均质物加入5ml 3%三氯乙酸溶液(称取3.0g三氯乙酸加100ml去离子水溶解混匀),用振荡器振荡5min,使样本与溶液充分混合;3000g以上,10 $^{\circ}$ C离心5min;取400 μ l上清液至2ml聚苯乙烯离心管中,加入40 μ l 1M氢氧化钠溶液(称取4.0g氢氧化钠加100ml去离子水溶解混匀),充分混匀,调pH值在7~8;加入360 μ l复溶工作液,用涡旋仪涡动30s,混合均匀;取50 μ l进行分析。

[0067] (2)奶油、冰淇淋样本前处理方法

[0068] 称取1.0 \pm 0.05g样本(奶油样本需加入1ml甲醇,充分振荡,使样本溶解后操作同下),加入3.5ml 3%三氯乙酸溶液,用振荡器振荡5min,加入500 μ l 1M氢氧化钠溶液,充分振荡1min;3000g以上,室温(20-25 $^{\circ}$ C/68-77 $^{\circ}$ F)离心5min;取400 μ l上清液至2ml聚苯乙烯离心管中,加入400 μ l复溶工作液,调节pH在6.5-7.5之间,充分混匀;取50 μ l进行分析。

[0069] (3)蜂蜜样本前处理方法

[0070] 取1.0g蜂蜜加入10ml 0.02M PBS1缓冲液(称取5.36g十二水合磷酸氢二钠、0.2g二水合磷酸二氢钾、8.0g氯化钠和0.2g氯化钾加1升去离子水溶解混匀)溶解,振荡使样本完全溶解;超声波均质5min;强烈混合,用振荡器振荡5min;取50 μ l分析。

[0071] (4)蜂王浆的前处理方法

[0072] 取1.0g蜂王浆样本加入10ml王浆提取液(称取10.72g十二水合磷酸氢二钠、0.4g二水合磷酸二氢钾、16.0g氯化钠和0.4g氯化钾加1升去离子水溶解混匀)振荡器振荡混匀;加入1.0g中性氧化铝,充分振荡5min后,3000g以上,室温(20-25 $^{\circ}$ C/68-77 $^{\circ}$ F)离心10min;取上清50 μ l进行分析。

[0073] (5)牛奶样本前处理方法

[0074] 把牛奶样本振荡充分混匀;取1ml样本加入4ml牛奶专用提取液(量取80ml 4%氯化钠溶液,加入20ml甲醇混匀),用振荡器振荡5min,充分混匀;取50 μ l进行分析。

[0075] (6)鱼样本前处理方法

[0076] 用均质器均质样本,称取1.0 \pm 0.05g均质物加入2ml 6%氯化钠溶液,3ml 3%三氯乙酸溶液,用振荡器振荡5min,使样本与溶液充分混合;3000g以上,10 $^{\circ}$ C离心5min;取400 μ l上清液至2ml聚苯乙烯离心管中,加入20 μ l 1M氢氧化钠溶液,充分混匀,调pH值在6~7;加入380 μ l复溶工作液,用涡旋仪涡动30s,混合均匀;取50 μ l进行分析。

[0077] (7)虾样本前处理方法

[0078] 用均质器均质样本,称取1.0 \pm 0.05g均质物加入2ml 15%氯化钠溶液,3ml 3%三氯乙酸溶液,用振荡器振荡5min,使样本与溶液充分混合;3000g以上,10 $^{\circ}$ C离心5min;取400 μ l上清液至2ml聚苯乙烯离心管中,加入20 μ l 1M氢氧化钠溶液,充分混匀,调pH值在6~7;加入380 μ l复溶工作液,用涡旋仪涡动30s,混合均匀;取50 μ l进行分析。

[0079] 2.用试剂盒进行检测

[0080] 向包被有包被原的酶标板微孔中加入50 μ l标准品工作液(用复溶工作液将每瓶标准品浓缩液根据所需量按1:9体积比进行稀释,需现配现用)/处理好的样本,再加入50 μ l单克隆抗体工作液,轻轻振荡混匀,盖上盖板膜,25 $^{\circ}$ C恒温箱中避光反应60min。倒出孔中的液体,用洗涤工作液(用去离子水将20 \times 浓缩洗涤液按1:19体积比进行稀释)250 μ l/孔充分洗涤4-5次,用吸水纸拍干以保证完全除去孔中的液体,加入100 μ l酶标记抗抗体工作液(用洗涤工作液将酶标记抗抗体浓缩液按1:9体积比进行稀释,现配现用),轻轻振荡混匀,盖上盖板膜,25 $^{\circ}$ C恒温箱中避光反应30min。倒出孔中的液体,重复洗板步骤,加入底物液A液50 μ l,再加入底物液B液50 μ l,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后25 $^{\circ}$ C恒温箱中避光显色30min。加入50 μ l终止液,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450nm处测量每孔的吸光度值。

[0081] 3.检测结果分析

[0082] 标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的吸光度值的平均值(双孔)除以第一个标准(0标准)的吸光度值,再乘以100%,即得到百分吸光率。以标准品百分吸光率为纵坐标,以四环素类药物标准品浓度(μ g/L)的对数为横坐标,绘制标准曲线图,如图3所示。将样本的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样本所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中四环素类药物实际浓度。

[0083] 三、酶联免疫试剂盒技术参数的确定

[0084] 最低检测限:对20份空白样本进行检测,从标准曲线上查出对应于各百分吸光度

值的浓度,以20份样本四环素浓度的平均值加上3倍标准差表示检测限,结果得该方法在组织、奶油、冰淇淋、蜂蜜、蜂王浆、鱼、虾样品中四环素检测限为 $3\mu\text{g}/\text{kg}$,牛奶中检测限为 $1.5\mu\text{g}/\text{L}$ 。

[0085] 准确度和精密度:ELISA测定的准确度以回收率表示,精密度以变异系数表示。取空白样本,以50、100、 $200\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个浓度的四环素对其进行添加回收试验,结果得该方法对组织样本的回收率为 $80\% \pm 15\%$,对奶油、冰淇淋样本的回收率为 $80\% \pm 20\%$,对蜂蜜样本的回收率为 $95\% \pm 15\%$,对蜂王浆样本的回收率为 $90\% \pm 20\%$,对牛奶样本的回收率为 $80\% \pm 20\%$,对鱼、虾样本的回收率为 $80\% \pm 15\%$,批内变异系数 $<15\%$,批间变异系数 $<25\%$ 。

[0086] 经测定本发明试剂盒在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 可以保存12个月。

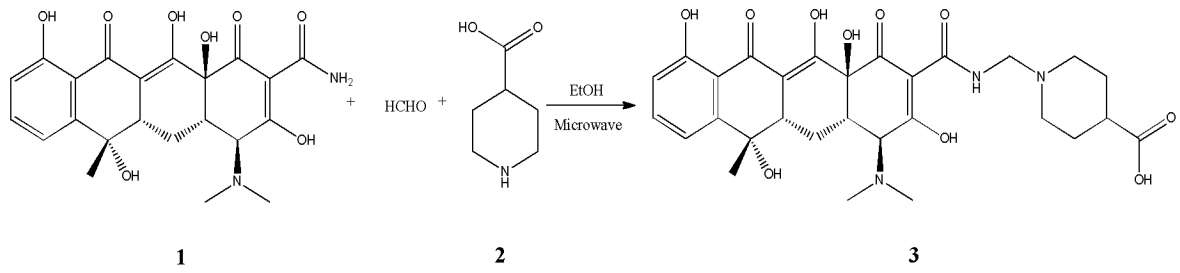


图1

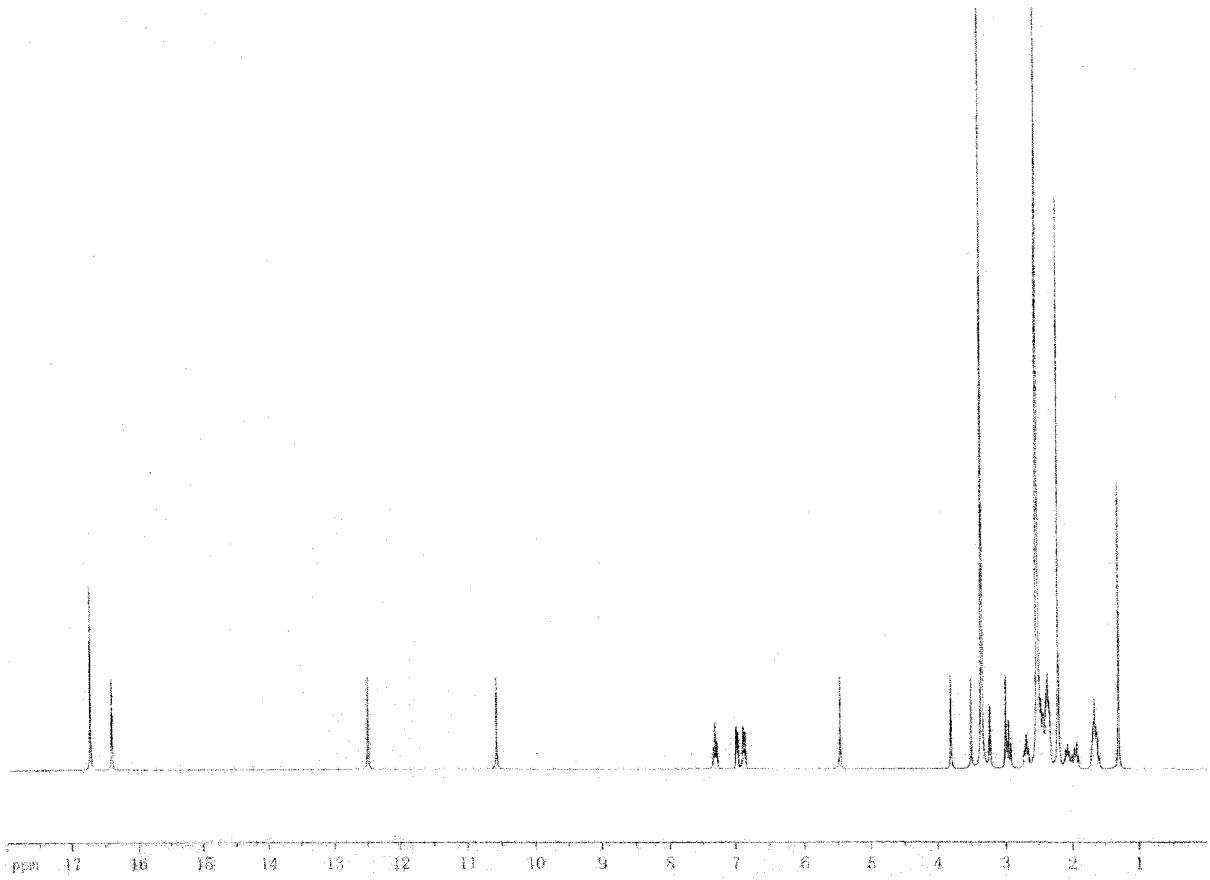


图2

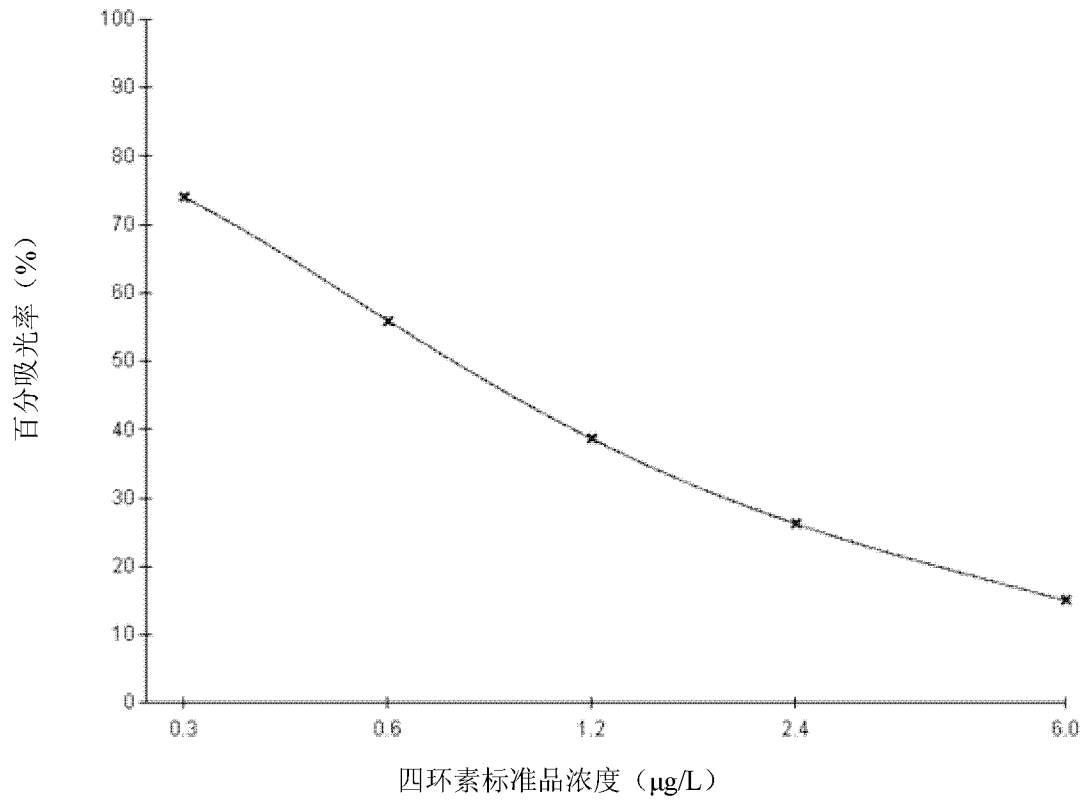


图3

专利名称(译)	四环素半抗原及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN103102300B	公开(公告)日	2016-08-03
申请号	CN201110356497.7	申请日	2011-11-11
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	何方洋 冯才伟 孙震 吴鹏 赵正苗 陈炜玲 刘琳		
发明人	何方洋 冯才伟 孙震 吴鹏 赵正苗 陈炜玲 刘琳		
IPC分类号	C07D211/62 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K14/75 C07K14/435 C07K1/113 C07K16/44 G01N33/577 G01N21/31 G01N33/535		
其他公开文献	CN103102300A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种半抗原及其制备方法和应用，具体涉及一种四环素半抗原，四环素半抗原是通过四环素与4-吡啶甲酸利用曼尼希反应，在四环素的酰胺的胺基上引入了N-甲基-4-吡啶甲酸基团所得到的衍生物。本发明还公开了所述半抗原的制备方法及其应用。基于四环素半抗原建立的试剂盒快速检测产品，能够同时快速检测动物源性食品中多种四环素类药物，使用方便、检测成本低、检测方法高效、准确、快速、可同时检测大批量的样本，适于动物源性食品中四环素类药物残留的现场监控和大量样本的筛查。

