



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109206378 A

(43)申请公布日 2019.01.15

(21)申请号 201710520104.9

G01N 33/544(2006.01)

(22)申请日 2017.06.30

(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号环
保示范园9号院3号楼

(72)发明人 聂靖东 邢维维 刘薇 贾良曦
王照鹏

(51)Int.Cl.

C07D 253/075(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 14/435(2006.01)

C07K 1/02(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图3页

(54)发明名称

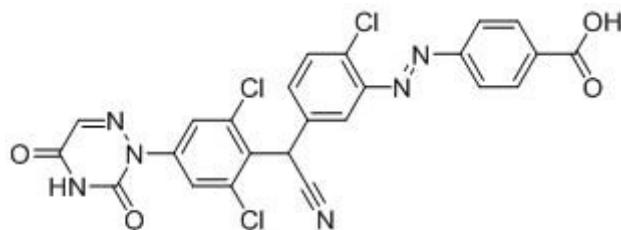
一种地克珠利半抗原、人工抗原及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种地克珠利半抗原、人工抗原及其制备方法与应用。本发明所提供的地克珠利人工抗原为将式I所示的地克珠利半抗原与载体蛋白偶联所得的抗原。本发明所提供地克珠利人工抗原合成方法简单,纯度高和产率高,对于地克珠利抗体的制备,以及地克珠利药物残留检测具有重大价值。



1. 一种化合物,其结构如式I所示:



Chemical Formula: $C_{24}H_{13}Cl_3N_6O_4$

Molecular Weight: 555.76

式I。

2. 制备权利要求1所述化合物的方法,包括步骤为:

(1) 重氮化溶液的制备:纯水混合浓盐酸,加入对氨基苯甲酸,搅拌,冰浴条件下加入亚硝酸钠溶液,所述纯水、浓盐酸、对氨基苯甲酸的配比为4-5mL:500-520 μ l:335-340mg,所述亚硝酸钠溶液为200-210mg亚硝酸钠溶解于5mL纯水中,所述反应时间为1h;

(2) 纯水中加入地克珠利原料药搅拌,呈白色浊液,冰浴下加入步骤(1)中的重氮化溶液,体系为黄色浊液溶液,4 $^{\circ}$ C反应过夜;所述纯水、地克珠利原料药的配比为5mL:1000mg;将溶剂旋干,残余物柱层析纯化,得到地克珠利半抗原(式I)652mg。

3. 地克珠利抗原,为将权利要求1所述化合物与载体蛋白偶联所得的抗原。

4. 根据权利要求3所述的地克珠利抗原,其特征在于:所述载体蛋白可以是牛血清白蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白、血蓝蛋白、鼠血清蛋白、甲状腺蛋白或兔血清蛋白。

5. 权利要求3或4所述的地克珠利抗原的制备方法,包括如下步骤:将权利要求1所述化合物与载体蛋白通过酰胺键偶联,获得所述地克珠利抗原;权利要求1所述化合物与所述载体蛋白偶联的摩尔比为19.5:1。

6. 根据权利要求5所述的地克珠利抗原的制备方法,其特征在于:所述方法包括如下步骤:

(1) 将所述地克珠利半抗原(式I)溶解于二甲基甲酰胺(DMF)中,然后加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),20-25 $^{\circ}$ C磁力搅拌反应2-3h,得到溶液I;

其中,所述地克珠利半抗原(式I)、所述二甲基甲酰胺(DMF)、所述1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、所述N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的配比为24.88mg:1.5mL:21.5mg:13mg;

(2) 将所述载体蛋白置于0.1M碳酸氢钠缓冲液中,200rpm搅拌10min,充分溶解,得到溶液II;所述载体蛋白与所述0.1M碳酸氢钠缓冲液的配比为33.6-50mg:3.5mL;

(3) 将所述溶液I和所述溶液II混合,具体为在0-4 $^{\circ}$ C条件下,1000rpm搅拌下,将溶液I逐滴加入到所述溶液II中,500rpm搅拌反应24h,得到溶液III;

(4) 用磷酸盐缓冲液(0.01M PBS, pH7.2),于4 $^{\circ}$ C对所述溶液III搅拌透析3天,得到所述地克珠利抗原。

7. 权利要求1所述化合物或权利要求3所述地克珠利抗原的应用,其特征在于定性或定量检测地克珠利;制备地克珠利抗体。

8. 利用权利要求3所述地克珠利抗原制备的抗体。

9. 根据权利要求7所述的地克珠利抗原的应用, 其特征在于可以为制备酶联免疫试剂盒和胶体金检测卡。

10. 根据权利要求7或9所述的地克珠利抗原的应用, 其特征在于检测样本可以为动物肉、组织及鸡蛋, 所述检测上述样本中地克珠利的检测限为 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

一种地克珠利半抗原、人工抗原及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于药物残留快速检测领域,涉及一种地克珠利人工抗原及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 在集约化的养殖模式中,球虫是最常见的流行暴发性寄生虫疾病,具有高度的易感性,而且死亡率较高,一旦发生往往对养殖者造成极严重的经济损失。球虫作为一种寄生虫,使用疫苗进行免疫难以产生良好的免疫效果,而且代价昂贵,所以长期药物预防一直是畜禽球虫病防治的唯一可靠手段。20世纪80年代出现的均三嗪类抗球虫药因其高效、广谱、毒性低,在畜牧业生产中受到了广泛的重视。地克珠利(diclazuril)又名氯嗪苯乙氰,属三嗪苯乙腈化合物,属于高效、低毒的新型抗球虫药,被广泛应用于治疗和预防禽类及哺乳动物的球虫感染。对球虫主要作用峰期,随球虫的不同种属而异。

[0003] 地克珠利的排泄速度很慢,大部分以原药形式排出。尽管地克珠利具有低毒性的特点,但很容易产生耐药性,随着使用剂量的逐渐增加,在禽类动物源食品中的残留量也有增加的趋势。食品添加剂联合专家委员会(JECFA)和欧盟药品管理局(European Medicines Agency)都分别对地克珠利的毒理学研究数据进行了评估,并推荐了日允许摄入量(Acceptable Daily Intakes)和最高残留限量MRLs。农业部第2002-235号公告也对地克珠利的MRLs进行了规定。地克珠利在畜禽生产中的广泛应用,使得建立一种高效灵敏的均三嗪类药物残留分析方法成为日益迫切的需要。

[0004] 目前对于地克珠利的检测方法,主要有高效液相法和液质联用法,虽然这些方法特异性强、灵敏度高,但是操作繁琐、仪器昂贵,不适用于大批量样品的筛选检测。免疫化学分析法在抗原抗体的定性定量方面具有独特的优势,其操作简便快速、成本低、灵敏度较高、分析样本量大,弥补了理化分析的不足。

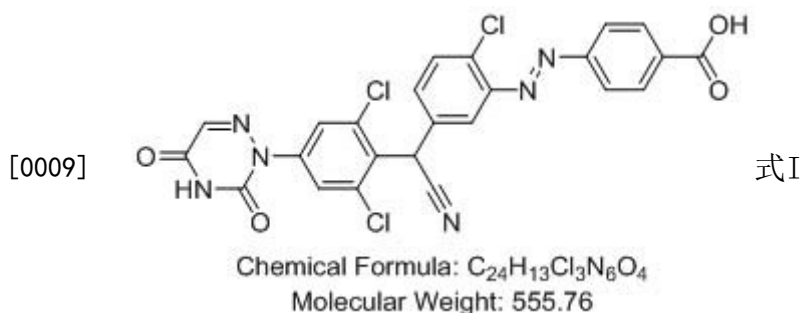
[0005] 影响免疫化学分析质量的根本因素是抗体的特异性与亲和性,这些性质又决定于免疫半抗原分子的结构,因此免疫半抗原的分子设计与合成是产生特异性抗体和建立小分子兽药残留快速检测技术的最基础、最关键的步骤。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种地克珠利人工抗原及其制备方法与应用。

[0007] 本发明所提供的地克珠利人工抗原是在地克珠利半抗原的基础上构建所得的抗原。

[0008] 所述地克珠利半抗原属于本发明的保护范围,其结构如式I所示。



本发明所提供的制备所述地克珠利半抗原的方法,具体可包括如下步骤:

1、重氮化溶液的制备:纯水混合浓盐酸,加入对氨基苯甲酸,搅拌,冰浴条件下加入亚硝酸钠溶液,所述纯水、浓盐酸、对氨基苯甲酸的配比为4mL:515 μ l:336mg,所述亚硝酸钠溶液为203mg亚硝酸钠溶解于5mL纯水中,所述反应时间为1h;

2、纯水中加入地克珠利原料药搅拌,呈白色浊液,冰浴下加入步骤1中的重氮化溶液,体系为黄色浊液溶液,4℃反应过夜。所述纯水、地克珠利原料药的配比为5mL:1000mg。

[0010] 将溶剂旋干,残余物柱层析纯化,得到地克珠利半抗原(式I)652mg。

[0011] 在地克珠利半抗原的基础上构建所得的地克珠利抗原也属于本发明的保护范围。

[0012] 所述地克珠利抗原,为将所述地克珠利半抗原(式I)与载体蛋白偶联所得的抗原。在本发明的一个实施例中,所述载体蛋白具体为牛血清白蛋白(BSA)或卵清蛋白(OVA)。

[0013] 所述地克珠利抗原的制备方法也属于本发明的保护范围。

[0014] 所述地克珠利抗原的制备方法,具体可包括如下步骤:将所述地克珠利半抗原(式I)与载体蛋白通过酰胺键偶联,获得所述地克珠利抗原。

[0015] 其中,所述地克珠利半抗原(式I)与所述载体蛋白偶联的摩尔比为19.5:1。

[0016] 在本发明中,所述地克珠利抗原具体是按照包括如下步骤的方法制备获得的:

(1)将所述地克珠利半抗原(式I)溶解于二甲基甲酰胺(DMF)中,然后加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),20-25℃磁力搅拌反应2-3h,得到溶液I;

其中,所述地克珠利半抗原(式I)、所述二甲基甲酰胺(DMF)、所述1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、所述N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的配比为24.88mg:1.5mL:21.5mg:13mg。

[0017] (2)将所述载体蛋白置于0.1M碳酸氢钠缓冲液中,200rpm搅拌10min,充分溶解,得到溶液II;所述载体蛋白与所述0.1M碳酸氢钠缓冲液的配比为33.6-50mg:3.5mL;

其中,若所述载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA),则所述牛血清白蛋白(BSA)与所述0.1M碳酸氢钠缓冲液的配比为50mg:3.5mL;若所述载体蛋白为卵清蛋白(OVA),则所述卵清蛋白(OVA)与所述0.1M碳酸缓冲液的配比为33.6mg:3.5mL;

(3)将所述溶液I和所述溶液II混合,具体为在0-4℃条件下,1000rpm搅拌下,将溶液I逐滴加入到所述溶液II中,500rpm搅拌反应24h,得到溶液III;

(4)用磷酸盐缓冲液(0.01M PBS, pH7.2),于4℃对所述溶液III搅拌透析3天,得到所述地克珠利抗原。

[0018] 所述地克珠利半抗原(式I)或所述地克珠利抗原在定性或定量检测地克珠利中的应用也属于本发明的保护范围。

[0019] 利用所述地克珠利抗原制备的抗体也属于本发明的保护范围。所述抗体可为多克隆抗体、单克隆抗体或抗血清。

[0020] 本发明所提供的地克珠利半抗原,以及所述地克珠利抗原,合成方法简单、纯度高、产率高,对于地克珠利抗体的制备,以及地克珠利药物残留检测具有重大价值。

附图说明

[0021] 图1为地克珠利半抗原质谱图。

[0022] 图2为BSA的MALDI-TOF-MAS图。

[0023] 图3为地克珠利BSA复合物的MALDI-TOF-MAS图。

具体实施方式

[0024] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0025] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0026] 地克珠利:上海安谱实验科技股份有限公司产品,其产品编号CDCT-C12533000。

[0027] 实施例1、地克珠利半抗原的制备

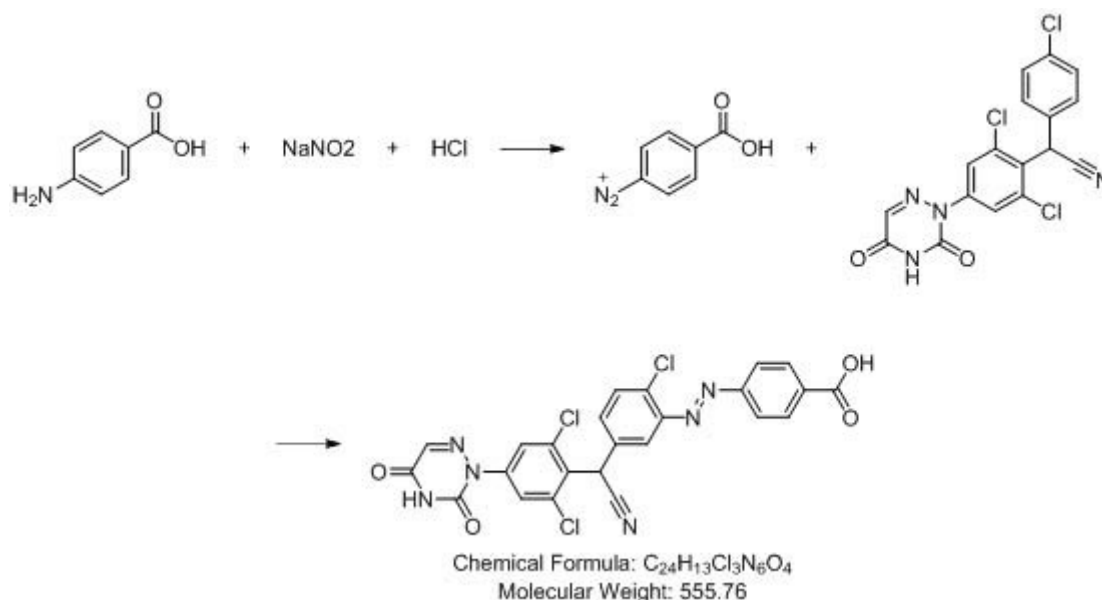
一、地克珠利半抗原的制备

50mL圆底烧瓶中加入4mL纯水,515μl浓盐酸,加入对氨基苯甲酸336mg,室温搅拌使体系搅拌均匀,冰浴下加入亚硝酸钠溶液(203mg亚硝酸钠溶解于5mL纯水中),冰浴下反应1h。

[0028] 50mL圆底烧瓶中加入5mL纯水,加入地克珠利1000mg,室温搅拌使体系搅拌均匀,呈白色浊液,冰浴下加入上述重氮化溶液,体系为黄色浊液溶液,4℃反应过夜。

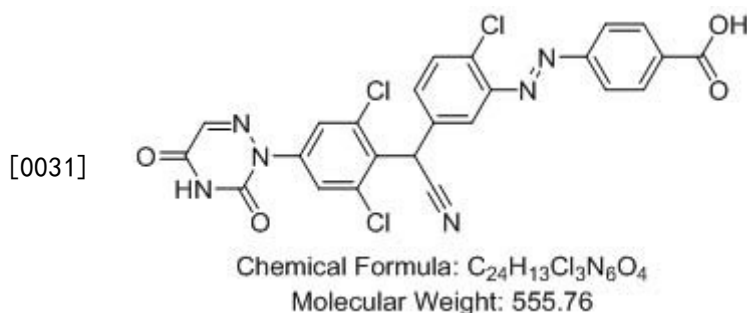
[0029] 将体系溶剂旋干,残余物柱层析纯化,得到地克珠利半抗原652mg。

[0030] 反应方程式如下:



二、地克珠利半抗原的结构鉴定

对所得652 mg地克珠利半抗原进行质谱检测(图1),结果显示其化学结构式如式I所示(MW=555.76),即为地克珠利半抗原。



式I

实施例2、地克珠利人工抗原的制备及结构鉴定

一、地克珠利人工抗原的制备

1、免疫原的合成

(1) 将24.88mg地克珠利半抗原用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。

[0032] (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, 冰浴降温0-4℃, 1000rpm搅拌下, 将步骤1反应液逐滴加入(1mL/min), 500rpm搅拌反应24h。

(3) 将反应产物装入蒸馏水冲洗干净透析袋(10cm), 1L0.01M PBS(1×, pH7.2) 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。

[0033] 2、包被原的合成

(1) 将24.88mg地克珠利半抗原用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。

[0034] (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, 冰浴降温0-4℃, 1000rpm搅拌下, 将步骤1反应液逐滴加入(1mL/min), 500rpm搅拌反应24h。

[0035] (3) 将反应产物装入蒸馏水冲洗干净透析袋(10cm), 1L0.01M PBS(1×, pH7.2) 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。

[0036] 二、地克珠利人工抗原的鉴定

免疫原MALDI-TOF-MS鉴定结果显示偶联比为: $R = (75469.538 - 64632.360) / 555.76 = 19.50$ (图2和图3)。即免疫原中, 所述地克珠利半抗原(式I)与牛血清白蛋白(BSA)偶联的摩尔比为19.5:1。

[0037] 实施例3、地克珠利人工抗原免疫动物制备单克隆抗体

一、动物免疫

用实施例2制备出的免疫原(地克珠利-BSA)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100μg/只, 不加弗氏佐剂再追加免疫一次。

[0038] 二、细胞融合与克隆

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。

[0039] 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 μg/mL的地克珠利等体积混合,37℃水浴作用30min,再加入到包被好的酶标板中。同时用PBS取代地克珠利作对照,其余步骤同上。若经地克珠利阻断后的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。

[0040] 三、单克隆抗体的制备及纯化

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1~2×10⁵/只,7~10日后抽取小鼠腹水。收集细胞上清或腹水,采用间接ELISA法测定其效价(测定效价时以P/N>2.1的细胞上清或腹水最大稀释倍数表示),结果表明细胞上清的效价为1:10000,腹水的效价为1:50000。接着,用辛酸-饱和硫酸铵法对其进行纯化,纯化后放入-20℃环境保存。

[0041] 实施例4、地克珠利人工抗原免疫动物制备抗血清

一、动物免疫

用步骤实施例2获得的地克珠利人工抗原“地克珠利-BSA”作为免疫原免疫新西兰大白兔。每次免疫剂量为100~200μg,免疫方式为双肩部和后大腿皮下多点注射,每个区域大约用1/4的免疫原。首免时将免疫原用生理盐水稀释,然后与弗氏不完全佐剂进行1:1(体积比)混合制成乳化剂,每间隔2周取相同剂量免疫原加等体积弗氏不完全佐剂混合乳化后加强免疫一次,采用此方式共加免3次后,间隔3~4周再取相同剂量免疫原加弗氏不完全佐剂进行末次免疫,耳动脉取血检测抗体效价。末次免疫7~10天后采用颈动脉放血,每只兔子可得血100~120mL左右,取完的血在4℃冰箱放置3~4小时,离心,分离出血清。

[0042] 二、抗血清效价测定

采用间接ELISA法测定步骤一所得血清的抗体效价,具体如下:

1) 包被:在96孔酶标板中加入100μL浓度为2μg/mL的“地克珠利-OVA”溶液(用包被缓冲液进行稀释),同时设置不包被抗原的对照,4℃包被过夜,用PBS缓冲液洗涤3次。

[0043] 包被缓冲液:pH9.6、0.05M的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液(溶剂为水,溶质及其浓度如下:Na₂CO₃1.59g/L和NaHCO₃2.93g/L)。

[0044] 2) 封闭:加入150μL/孔的封闭液,在37℃孵育2h,弃封闭液,洗涤3次,拍干。置于4℃冰箱保存备用。

[0045] 封闭液:含有0.5%(体积百分含量)小牛血清、3%(3g/100mL)酪蛋白的磷酸盐缓冲液,pH7.4。

[0046] 3) 加待测样品:吸取不同稀释度的待测血清100μl,加入对应的酶标板中,37℃孵育30min,洗板4次,拍干。

- [0047] 同时设置未经免疫的兔血清的对照;以PBS代替待检测样品的对照(阴性对照孔)。
- [0048] 4) 加酶标二抗:取辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG抗体,按体积比1:5000倍稀释后,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育20至30min,洗涤4次,拍干。
- [0049] 5) 显色:将20 $\times$ TMB稀释至1 $\times$ TMB,按100 μ l/孔加入,37 $^{\circ}$ C显色15-30min。
- [0050] 6) 终止:加入终止液(2M H_2SO_4) 50 μ l/孔。
- [0051] 7) 读数:以450nm单波长测定各孔OD值,以与阴性对照孔(以PBS代替待测样品的对照)OD值的比值(P/N)大于2.1为限,作为判断为血清效价的临界点。
- [0052] ELISA结果判定方法:以P/N>2.1的血清最大稀释倍数表示。
- [0053] 结果表明血清中的抗体效价为1:16000。
- [0054] 实施例5、地克珠利酶联免疫试剂盒检测地克珠利

一、地克珠利酶联免疫试剂盒的组装

1、地克珠利酶联免疫试剂盒的组成包括如下:

- (1) 地克珠利标准品工作液:6瓶,1.5mL/瓶,浓度为0ng/mL、0.3ng/mL、0.9ng/mL、2.7ng/mL、8.1ng/mL、24.3ng/mL;
- (2) 地克珠利酶标板:1块(8孔 $\times$ 12条),为包被了实施例2制备得到的“地克珠利-OVA”的酶标板。
- [0055] (3) 地克珠利抗体工作液:1瓶(10mL),为抗体稀释液将抗体进行1:8000稀释,抗体稀释液为含6%(体积分数)山羊血清的0.2MPBS,所述地克珠利抗体为实施例3制备得到的抗血清纯化所得的抗体。
- [0056] (4) 酶标记物工作液:经辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠的抗体。
- [0057] (5) 样品稀释液:0.01M pH7.4的PBS。
- [0058] (6) 洗涤液:0.01M pH7.4的PBST溶液。
- [0059] (7) 底物A液、底物B液各1瓶(7mL)。其中,底物A为2%过氧化脲水溶液。底物B为1%四甲基联苯胺水溶液。
- [0060] (8) 终止液:1瓶(7mL),为2 M H_2SO_4 溶液。
- [0061] (9) 盖板膜;
- (10) 自封袋。

2、需要而未提供的设备和材料

(1) 设备

酶标仪(检测波长450nm,参考波长630nm)、天平(精度:0.01g)、漩涡振荡器、离心机(4000g)、摇床(300rpm)、氮吹仪、微量移液器、计时器。

(2) 试剂

氯化钠、乙腈、正己烷、乙酸溶液(取1mL乙酸,加入到99 mL去离子水中,混匀)。

3、贮存

该试剂盒贮存于2-8 $^{\circ}$ C,切勿冷冻,有效期1年。

[0065] 未使用完的酶标板条应密封,2-8 $^{\circ}$ C保存。

4、试剂盒检测原理

样品中的地克珠利与酶标板上固定的抗原特异性竞争抗体,加入酶标记物,催化底物显色,根据显色的深浅来判断样品中地克珠利的含量。显色深,含量少,显色浅,含量多。

[0067] 二、地克珠利酶联免疫试剂盒的使用方法

1、样品前处理

(1) 动物肉和组织(稀释系数:12)

a) 取 1 ± 0.05 g组织样品于50mL离心管中;b) 加入0.1mL乙酸溶液、3 mL 正己烷和6 mL 乙腈,立即充分涡动1 min;c) 4000g以上,离心5min;d) 弃去上层正己烷;e) 取0.5mL上清液于新的4mL离心管中;f) 50-60℃水浴中,氮气吹干;g) 加入1mL样品稀释液,充分涡动30s;h) 取20μL进行检测。

[0068] (2) 鸡蛋(稀释系数:12)

a) 准确称取 1 ± 0.05 g 均质后的样品于50 mL 离心管中;b) 依次加入1 g 氯化钠、1.5mL 乙酸溶液(见4.2)、3 mL 正己烷和4.5 mL 乙腈,立即充分涡动1min;c) 4000 g 以上,离心5 min;d) 弃去上层正己烷;e) 取0.5 mL 乙腈层于新的4 mL 离心管中;f) 50-60℃水浴中,氮气吹干;g) 加入1 mL 样品稀释液,充分涡动30 s;h) 取20 μL 进行检测。

[0069] 2、检测步骤

(1) 将板条插入酶标板架上,并记录下各标准品和样品的位置,建议均做双孔平行,未使用的板条用自封袋密封后,立即保存于2-8℃环境中;

(2) 将20μL各浓度的地克珠利标准品工作液(或待测样品溶液)分别加入对应的标准品(或待测样品孔)中;

(3) 在每孔中加入50μL酶标记物工作液,再在每孔中加入80μL抗体工作液;

(4) 盖好盖板膜,轻轻振荡酶标板10s,充分混匀,室温下($25 \pm 2^\circ\text{C}$),避光反应30min;

(5) 揭开盖板膜;

(6) 倒掉板孔中液体,在每孔加入260μL洗涤工作液,充分洗涤4次,每次浸泡15-30s;

(7) 倒掉板孔中液体,将酶标板倒置于吸水纸上,拍干;

(8) 立即在每孔中加入100μLA、B混合液;

(9) 盖好盖板膜,轻轻振荡酶标板10s,充分混匀,室温下($25 \pm 2^\circ\text{C}$),避光反应15-20min;

(10) 揭开盖板膜,在每孔中加入50μL终止液,轻轻振荡酶标板10s,充分混匀;

(11) 终止后5min内用酶标仪在双波长450nm、630nm下读取酶标板吸光度值。

[0070] 3、结果计算或判定

(1) 各标准品(或待测样品)的平均吸光度值,除以零标(浓度为0ng/mL的标准品)吸光度值,乘以100,可以得到各标准品对应的吸光度的百分比,即百分吸光度值。

[0071] (2) 以各标准品的百分吸光度值为纵坐标,以对应的地克珠利浓度为横坐标绘制标准曲线。

[0072] (3) 将待测样品的百分吸光度值代入标准曲线方程,可得出待测样品对应的浓度,再乘以相应样品的稀释倍数,方得待测原样品中地克珠利的实际含量。

[0073] 三、地克珠利酶联免疫试剂盒检测地克珠利

1、特异性检测

地克珠利酶联免疫试剂盒的特异性是通过与相应的物质进行交叉反应试验来确定的。交叉反应越小,特异性越好。

[0074] 将地克珠利及其它类似物(妥曲珠利,妥曲珠利酮、克拉珠利)分别做系列稀释,分

别按照如上步骤二2进行操作,以地克珠利及其它类似物的系列稀释液替代其中的“地克珠利标准品工作液”,制作标准曲线,并在曲线上找出各自50%抑制浓度(IC₅₀),具体方法如下:得到纵坐标数值等于50%对应的地克珠利浓度(ng/mL),即IC₅₀值。用下式计算试剂盒对地克珠利和各类似物的交叉反应率。

[0075] 交叉反应率(%) = (引起50%抑制的地克珠利浓度/引起50%抑制的地克珠利类似物浓度) × 100%

结果如表1所示,从表1中可以看出,地克珠利酶联免疫试剂盒对各种类似物的交叉反应率均小于0.1%。这说明地克珠利酶联免疫试剂盒对地克珠利具有极高的特异性,可有效的排除其它类似物的干扰,可专门用于地克珠利的检测。

[0076] 表1地克珠利酶联免疫试剂盒的特异性

药物名称	交叉反应率(%)
地克珠利	100
妥曲珠利	<0.1
妥曲珠利砒	<0.1
克拉珠利	<0.1

2、不同样品的最低检测限测定

分别测定采用地克珠利酶联免疫试剂盒对动物肉、组织和鸡蛋中地克珠利进行检测时的最低检测限。具体方法如步骤二。

[0077] 结果显示,采用步骤二1(1)中的样品前处理方法处理动物肉、组织和鸡蛋,测得的最低检测限可达10μg/kg。

[0078] 3、地克珠利酶联免疫试剂盒板内板间误差的测定

分别测定地克珠利酶联免疫试剂盒的板内误差和板间误差。具体方法如步骤二。

[0079] 结果显示,试剂盒吸光度的板内误差小于5%,板间误差小于10%。

[0080] 4、地克珠利酶联免疫试剂盒检测地克珠利的回收率测定

测定采用地克珠利酶联免疫试剂盒检测地克珠利的回收率。具体方法如步骤二。

[0081] 结果显示,采用地克珠利酶联免疫试剂盒检测地克珠利的回收率范围为90%~110%。

[0082] 5、地克珠利酶联免疫试剂盒的灵敏度测定

测定地克珠利酶联免疫试剂盒的灵敏度。具体方法如步骤二。

[0083] 结果显示,地克珠利酶联免疫试剂盒的灵敏度为0.3μg/kg,标准曲线范围0.3~24.3μg/kg。

[0084] 实施例6、地克珠利胶体金试纸条检测地克珠利

一、地克珠利胶体金试纸条的组成

地克珠利胶体金试纸条由样品吸收垫、胶体金垫、反应膜和吸水垫组成;

沿试纸条的轴向,样品吸收垫、胶体金垫、反应膜和吸水垫依次按顺序连接,样品吸收垫的末端与胶体金垫的始端相连,胶体金垫的末端与反应膜的始端相连,反应膜的末端与吸水垫的始端相连;

所述胶体金垫上包被有胶体金标记的实施例3得到的地克珠利单克隆抗体;

所述反应膜上有检测区和质控区,检测区(T线)和质控区(C线)均为与试纸条轴向垂直

的条带状;检测区位于靠近胶体金垫末端的一侧;质控区位于远离胶体金垫末端的一侧;检测区包被实施例2 制备的地克珠利-OVA,质控区包被羊抗鼠二抗。

[0085] 样品孔位于样本吸收垫上远离胶体金垫末端的一端。

[0086] 二、试纸条的制备

1、胶体金标记抗体

(1)胶体金溶液的制备

取0.01%氯金酸水溶液100mL 用恒温电磁搅拌器加热至沸腾,持续搅拌的情况下加入1%柠檬酸三钠水溶液2.5mL,继续搅拌加热20min,溶液呈透亮的红色。室温冷却,用去离子水恢复到原体积,2-8℃保存。

[0087] (2)金标抗体溶液的制备

用0.1mol/L K_2CO_3 水溶液调节胶体金溶液的pH 至8.2,然后取10mL 加入50mL 烧杯中,电磁搅拌器250r/min 搅拌,逐滴加入单克隆抗体溶液,逐滴加入3mL 5g/100mL BSA 水溶液,持续搅拌10min。

[0088] (3)将金标抗体溶液20-24℃低速(1500r/min)离心20min,弃去由凝聚的金颗粒形成的沉淀,取红色上清溶液。

[0089] (4)将步骤(3)的溶液4℃、11000r/min 离心40min,溶液分为三层(透明上清、管底可流动的暗红色沉淀及管底壁上黑色致密的金颗粒层),将可流动的暗红色沉淀转移到另外一个离心管中,用含1g/100mL BSA 的0.01mol/L 磷酸盐缓冲液混悬至原金标抗体溶液的体积,过夜,4℃、11000r/min 离心40min,收集沉淀。

[0090] (5)用含1g/100mL BSA 和0.02g/100mL NaN_3 的0.01mol/L 磷酸盐缓冲液将步骤(4)的沉淀混悬至原金标抗体溶液的体积的1/40,2-8℃保存。

[0091] 2、喷金:将步骤(1)得到的混悬液喷到玻璃纤维膜上,制成胶体金垫。

[0092] 3、喷膜:在反应膜上的T 线位置喷上实施例2 制备的地克珠利-OVA、C 线位置喷上羊抗鼠抗体。

[0093] 4、组装:将样品吸收垫(纤维素滤膜)、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸水垫按常规方法进行组装,然后切条,即可检测。也可以将试纸条装入塑料制卡中,形成试纸卡用于检测。

[0094] 三、用试纸卡进行检测

1、样品前处理及检测

样品前处理方法如实施例五的步骤二1。

[0095] 取出试纸卡,开封后平放于桌面,吸取待测样本溶液逐滴加入3~5 滴于样品孔中;5-10min 判断结果,15min 后的判断结果无效。

[0096] 结果判断标准:

阴性:C 线显色,T 线肉眼可见,无论颜色深浅均判为阴性;

阳性:C 线显色,T 线不显色,判为阳性;

无效:C 线不显色,无论T 线是否显色,该试纸卡均判为无效。

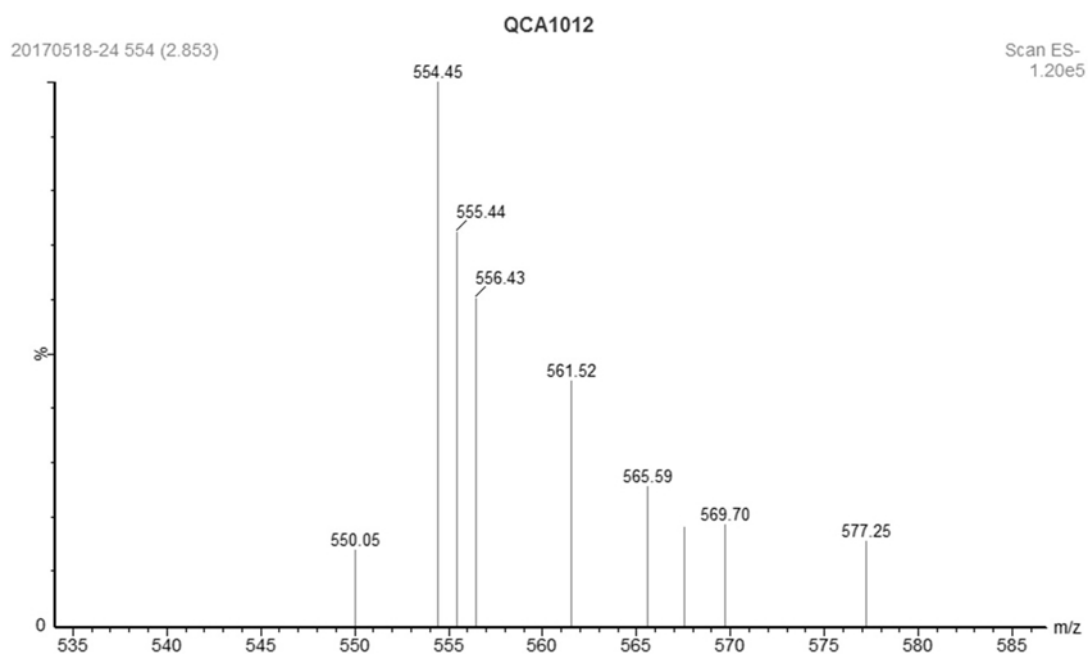


图1

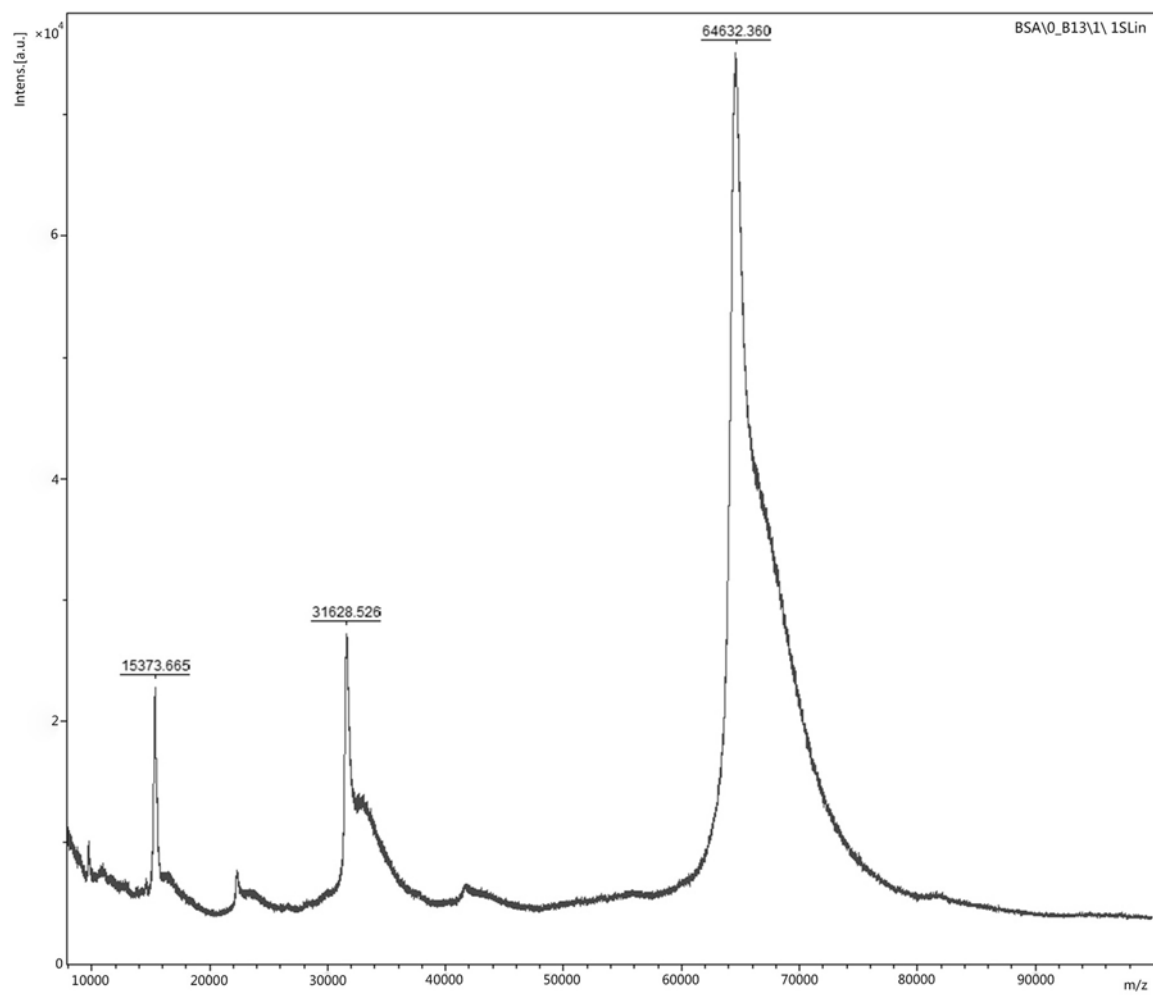


图2

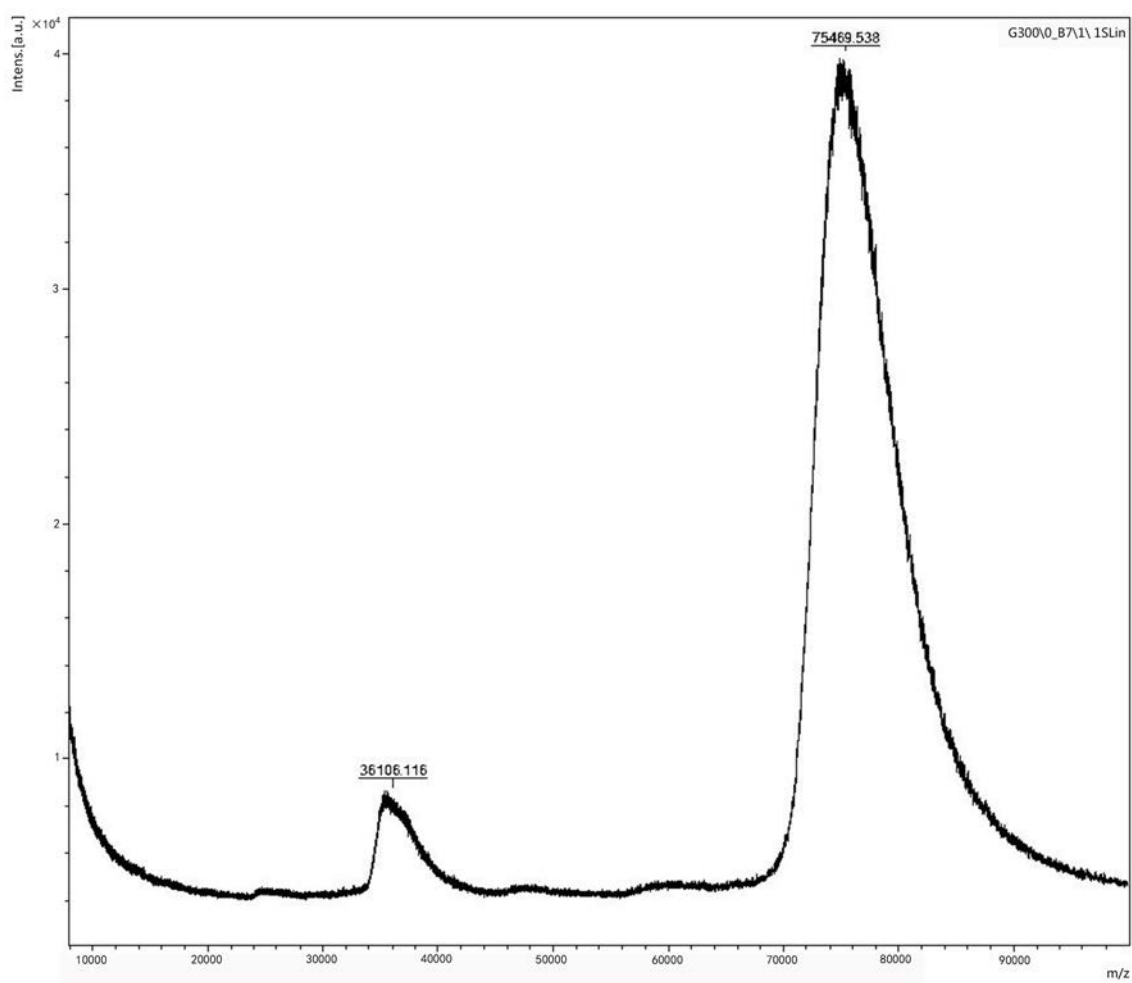


图3

专利名称(译)	一种地克珠利半抗原、人工抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN109206378A	公开(公告)日	2019-01-15
申请号	CN201710520104.9	申请日	2017-06-30
[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	聂靖东 邢维维 刘薇 贾良曦 王照鹏		
发明人	聂靖东 邢维维 刘薇 贾良曦 王照鹏		
IPC分类号	C07D253/075 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K14/435 C07K1/02 C07K16/44 G01N33/531 G01N33/544		
CPC分类号	C07D253/075 C07K14/435 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/531 G01N33/544		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种地克珠利半抗原、人工抗原及其制备方法与应用。本发明所提供的地克珠利人工抗原为将式I所示的地克珠利半抗原与载体蛋白偶联所得的抗原。本发明所提供地克珠利人工抗原合成方法简单，纯度高和产率高，对于地克珠利抗体的制备，以及地克珠利药物残留检测具有重大价值。式I。

