



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109212200 A

(43)申请公布日 2019.01.15

(21)申请号 201710520105.3

(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 秦誉 邢维维 贾良曦  
刘薇 王照鹏

(51)Int.Cl.

G01N 33/544(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

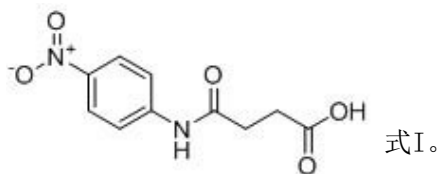
权利要求书2页 说明书9页 附图3页

(54)发明名称

一种尼卡巴嗪半抗原、人工抗原及其制备方法与应用

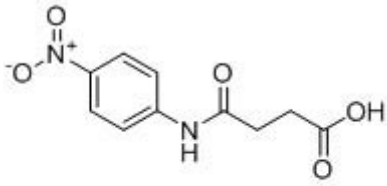
(57)摘要

本发明公开了一种尼卡巴嗪半抗原、人工抗原及其制备方法与应用。本发明所提供的尼卡巴嗪人工抗原为将式I所示的尼卡巴嗪半抗原与载体蛋白偶联所得的抗原。本发明所提供尼卡巴嗪人工抗原合成方法简单,纯度高和产率高,对于尼卡巴嗪抗体的制备,以及尼卡巴嗪药物残留检测具有重大价值。



Chemical Formula: C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>  
Molecular Weight: 238.20

1. 一种化合物,其结构如式I所示:



Chemical Formula:  $C_{10}H_{10}N_2O_5$   
Molecular Weight: 238.20

式I。

2. 制备权利要求1所述化合物的方法,包括步骤为:

(1) 苯胺中加入二甲基甲酰胺(DMF),搅拌后再加入琥珀酸酐,所述苯胺、DMF、琥珀酸酐的配比为1000mg:25ml:1290mg,所述反应温度为65-70℃,获得反应液;

(2) 将反应液滴加到100ml冰水中,25ml乙酸乙酯萃取,合并乙酸乙酯相,无水硫酸钠干燥4小时,过滤除去干燥剂,滤液旋干,获得尼卡巴嗪半抗原中间体1870mg;

(3) 冰浴下15ml浓硫酸中缓慢加入5ml浓硝酸,搅拌,再缓慢加入尼卡巴嗪半抗原中间体1500mg,室温下磁力搅拌2-3h,将反应液倾入冰水中析出黄色固体,过滤、水洗、收集滤饼,50℃鼓风干燥5-6小时,得到尼卡巴嗪半抗原924.6 mg。

3. 尼卡巴嗪抗原,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所述的尼卡巴嗪抗原,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所述的尼卡巴嗪抗原的制备方法,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,获得所述尼卡巴嗪抗原;权利要求1所述化合物与所述载体蛋白偶联的摩尔比为17.6:1。

6. 根据权利要求5所述的尼卡巴嗪抗原的制备方法,其特征在于:所述方法包括如下步骤:

(1) 将所述尼卡巴嗪半抗原(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,所述尼卡巴嗪半抗原(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24.88:10.66mg: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℃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,得到所述尼卡巴嗪抗原。

7. 权利要求1所述化合物或权利要求3所述尼卡巴嗪抗原的应用,其特征在于定性或定量检测尼卡巴嗪;制备尼卡巴嗪抗体。

8. 利用权利要求3所述尼卡巴嗪抗原制备的抗体。
9. 根据权利要求7所述的尼卡巴嗪抗原的应用,其特征在於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所述的尼卡巴嗪抗原的应用,其特征在於检测样本可以为动物肉、组织及鸡蛋,所述检测上述样本中尼卡巴嗪的检测限为 $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

## 一种尼卡巴嗪半抗原、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,涉及一种尼卡巴嗪人工抗原及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 尼卡巴嗪(Nicarbazin)又名硝脲嘧啶、球虫净,主要用于预防鸡盲肠球虫和堆型、巨型、毒害、布氏艾美耳球虫。1999年食品法典委员会(Codex Aliment Commission, CAC)确定尼卡巴嗪在鸡组织中的最大残留限量(MRL)为0.2 mg/kg,日许量(ADI)为0-400  $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ 。2002年,FAO/WHO公布禁止在进口动物源性食品中使用尼卡巴嗪,日本相继公布了进口禽肉中尼卡巴嗪的最大残留限量为0.2 mg/kg。我国农业部2002发布的235号公告《动物性食品中兽药最高残留限量》规定了尼卡巴嗪在鸡组织中的MRL为0.2 mg/kg。美国现行标准(鸡组织中)规定为4 ppm。

[0003] 国内外以前多采用紫外分光法测定饲料和禽肉中尼卡巴嗪的含量。目前国内外大多采用高效液相色谱法测定,这些方法特异性强、灵敏度高、但是样品前处理操作步骤繁琐,成本较高,也不适用于大批量样品的筛选检测。免疫化学分析由于在抗原抗体的定性定量方面独特的优势和操作简便快速、成本低、灵敏度较高、分析样本量大的优点弥补了理化分析的不足。免疫化学分析由于在抗原抗体的定性定量方面独特的优势和操作简便快速、成本低、灵敏度较高、分析样本量大的优点弥补了理化分析的不足,尼卡巴嗪人工抗原的制备为这一方法的实施奠定了重要基础。

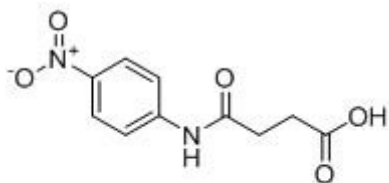
[0004] 影响免疫化学分析质量的根本因素是抗体的特异性与亲和性,这些性质又决定于免疫半抗原分子的结构,因此免疫半抗原的分子设计与合成是产生特异性抗体和建立小分子兽药残留快速检测技术的最基础、最关键的步骤。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种尼卡巴嗪人工抗原及其制备方法与应用。

[0006] 本发明所提供的尼卡巴嗪人工抗原是在尼卡巴嗪半抗原的基础上构建所得的抗原。

[0007] 所述尼卡巴嗪半抗原属于本发明的保护范围,其结构如式I所示。



Chemical Formula:  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_5$   
Molecular Weight: 238.20

[0008] 式I

本发明所提供的制备所述尼卡巴嗪半抗原的方法,具体可包括如下步骤:

苯胺中加入二甲基甲酰胺(DMF),搅拌后再加入琥珀酸酐,所述苯胺、DMF、琥珀酸酐的配比为1000mg:25ml:1290mg,所需反应温度为65-70°C(如65°C)反应6-7h(如6h),获得反应液;

将反应液滴加到100ml冰水中,25ml乙酸乙酯萃取3次,合并乙酸乙酯相,无水硫酸钠干燥4小时,过滤除去干燥剂,滤液旋干,获得尼卡巴嗪半抗原中间体1870mg;

15ml浓硫酸中充分搅拌缓慢加入5ml浓硝酸,冰浴下搅拌20min,缓慢加入尼卡巴嗪半抗原中间体1500mg,加毕撤去冰浴,缓慢升至室温20-24°C磁力搅拌2-3小时,将反应液缓慢倾入冰水中析出黄色固体,过滤,滤饼用100ml水洗,收集滤饼50°C鼓风干燥5-6小时得到924.6 mg尼卡巴嗪半抗原。

[0009] 在尼卡巴嗪半抗原的基础上构建所得的尼卡巴嗪抗原也属于本发明的保护范围。

[0010] 所述尼卡巴嗪抗原,为将所述尼卡巴嗪半抗原(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)。

[0011] 所述尼卡巴嗪抗原的制备方法也属于本发明的保护范围。

[0012] 所述尼卡巴嗪抗原的制备方法,具体可包括如下步骤:将所述尼卡巴嗪半抗原(式I)与载体蛋白通过酰胺键偶联,获得所述尼卡巴嗪抗原。

[0013] 其中,所述尼卡巴嗪半抗原(式I)与所述载体蛋白偶联的摩尔比为17.6:1。

[0014] 在本发明中,所述尼卡巴嗪抗原具体是按照包括如下步骤的方法制备获得的:

(1)将所述尼卡巴嗪半抗原(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°C磁力搅拌反应2-3h,得到溶液I;

其中,所述尼卡巴嗪半抗原(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10.66mg:1.5mL:21.5mg:13mg。

[0015] (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°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°C对所述溶液III搅拌透析3天,得到所述尼卡巴嗪抗原。

[0016] 所述尼卡巴嗪半抗原(式I)或所述尼卡巴嗪抗原在定性或定量检测尼卡巴嗪中的应用也属于本发明的保护范围。

[0017] 利用所述尼卡巴嗪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。

[0018] 本发明所提供的尼卡巴嗪半抗原,以及所述尼卡巴嗪抗原,合成方法简单、纯度高、产率高,对于尼卡巴嗪抗体的制备,以及尼卡巴嗪药物残留检测具有重大价值。

## 附图说明

- [0019] 图1为尼卡巴嗪半抗原中间体质谱图。  
 [0020] 图2尼卡巴嗪半抗原质谱图。  
 [0021] 图3为BSA的MALDI-TOF-MAS图。  
 [0022] 图4为尼卡巴嗪BSA复合物的MALDI-TOF-MAS图。

## 具体实施方式

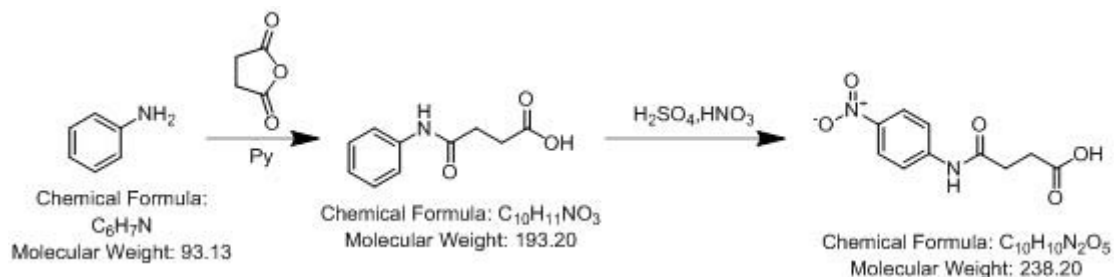
- [0023] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。  
 [0024] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。  
 [0025] 尼卡巴嗪:上海安谱实验科技股份有限公司产品,其产品编号CDCT-C15508000。  
 [0026] 实施例1、尼卡巴嗪半抗原的制备

## 一、尼卡巴嗪半抗原的制备

50ml圆底烧瓶中加入苯胺1000mg,25ml的DMF搅拌15min,20-24℃加入琥珀酸酐1290mg,65-70℃磁力搅拌反应6小时。将反应液滴加到100ml冰水中,25ml乙酸乙酯萃取3次,合并乙酸乙酯相,无水硫酸钠干燥4小时,过滤除去干燥剂,滤液旋干,得到淡黄色油状物1870mg,为尼卡巴嗪半抗原中间体。

[0027] 冰浴下,向50ml圆底烧瓶中加入浓硫酸15ml,充分搅拌缓慢加入浓硝酸5ml,冰浴下搅拌20min,缓慢加入尼卡巴嗪半抗原中间体1500mg,撤去冰浴,缓慢升至室温20-24℃磁力搅拌2-3小时,将反应液缓慢倾入冰水中析出黄色固体,过滤,滤饼用100ml水洗,收集滤饼50℃鼓风干燥5-6小时得到 924.6 mg尼卡巴嗪半抗原。

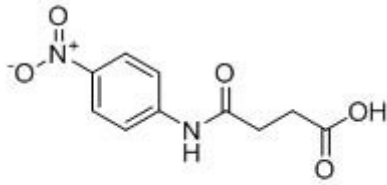
[0028] 反应方程式如下:



## 二、尼卡巴嗪半抗原中间体、尼卡巴嗪半抗原的结构鉴定

1、对尼卡巴嗪半抗原中间体进行质谱检测(图1),结果显示其MW=193.2,即为尼卡巴嗪半抗原中间体。

[0029] 2、对所得924.6 mg尼卡巴嗪半抗原进行质谱检测(图2),结果显示其化学结构式如式I所示(MW=238.20),即为尼卡巴嗪半抗原。



Chemical Formula: C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Molecular Weight: 238.20

### [0030] 式I

实施例2、尼卡巴嗪人工抗原的制备及结构鉴定

#### 一、尼卡巴嗪人工抗原的制备

##### 1、免疫原的合成

(1) 将10.66mg尼卡巴嗪半抗原用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。

[0031] (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。

##### [0032] 2、包被原的合成

(1) 将10.66mg尼卡巴嗪半抗原用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,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。

[0034] (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。

#### [0035] 二、尼卡巴嗪人工抗原的鉴定

免疫原MALDI-TOF-MS鉴定结果显示偶联比为: $R = (69034.671 - 64839.862) / 238.2 = 17.61$ (图3和图4)。即免疫原中,所述尼卡巴嗪半抗原(式I)与牛血清白蛋白(BSA)偶联的摩尔比为17.6:1。

#### [0036] 实施例3、尼卡巴嗪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(尼卡巴嗪-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Ba1b/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。

##### [0037] 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%CO<sub>2</sub>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。

[0038] 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100μg/mL的尼卡巴嗪等体积混合,37℃水浴作用30min,再加入到包被好的酶标板中。同时用PBS取代尼卡巴嗪作对照,其余步骤同上。若经尼卡巴嗪阻断后的OD<sub>450nm</sub>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。

### [0039] 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1~2×10<sup>5</sup>/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。

### [0040] 实施例4、尼卡巴嗪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获得的尼卡巴嗪人工抗原“尼卡巴嗪-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。

#### [0041] 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“尼卡巴嗪-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。

[0042] 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:Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>1.59g/L和NaHCO<sub>3</sub>2.93g/L)。

[0043] 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。

[0044] 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。

[0045] 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。

[0046] 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)。

[0047] 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 $\mu$ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育20至30min,洗涤4次,拍干。

[0048] 5) 显色:将20 $\times$ TMB稀释至1 $\times$ TMB,按100 $\mu$ l/孔加入,37 $^{\circ}$ C显色15-30min。

[0049] 6) 终止:加入终止液(2M $H_2SO_4$ ) 50 $\mu$ l/孔。

[0050] 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。

[0051] ELISA结果判定方法:以P/N>2.1的血清最大稀释倍数表示。

[0052] 结果表明血清中的抗体效价为1:16000。

[0053] 实施例5、尼卡巴嗪酶联免疫试剂盒检测尼卡巴嗪

#### 一、尼卡巴嗪酶联免疫试剂盒的组装

##### 1、尼卡巴嗪酶联免疫试剂盒的组成包括如下:

(1) 尼卡巴嗪标准品工作液:6瓶,1.5mL/瓶,浓度为0ng/mL、0.10 ng/mL、0.3ng/mL、0.9ng/mL、2.7ng/mL、8.1ng/mL;

(2) 尼卡巴嗪酶标板:1块(8孔 $\times$ 12条),为包被了实施例2制备得到的“尼卡巴嗪-OVA”的酶标板。

[0054] (3) 尼卡巴嗪抗体工作液: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,所述尼卡巴嗪抗体为实施例3制备得到的抗血清纯化所得的抗体。

[0055] (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。

[0056] (5) 样品稀释液:0.01M pH7.4的PBS。

[0057] (6) 洗涤液:0.01M pH7.4的PBST溶液。

[0058] (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。

[0059] (8) 终止液:1瓶(7mL),为2 M $H_2SO_4$ 溶液。

[0060] (9) 盖板膜;

(10) 自封袋。

[0061] 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。

[0062] (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)。

[0063] 3、贮存

该试剂盒贮存于2-8 $^{\circ}$ C,切勿冷冻,有效期1年。

[0064] 未使用完的酶标板条应密封,2-8 $^{\circ}$ C保存。

[0065] 4、试剂盒检测原理

样品中的尼卡巴嗪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尼卡巴嗪的含量。显色深,含量少,显色浅,含量多。

[0066] 二、尼卡巴嗪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 $1 \pm 0.05$ 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20 $\mu$ L进行检测。

#### [0067] (2) 鸡蛋(稀释系数:12)

a) 准确称取 $1 \pm 0.05$  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  $\mu$ L 进行检测。

### [0068] 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20 $\mu$ L各浓度的尼卡巴嗪标准品工作液(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50 $\mu$ L酶标记物工作液,再在每孔中加入80 $\mu$ L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260 $\mu$ L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100 $\mu$ LA、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50 $\mu$ L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。

### [0069] 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。

[0070] (2) 以各标准品的百分吸光度值为纵坐标,以对应的尼卡巴嗪浓度为横坐标绘制标准曲线。

[0071] (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,方得待测原样品中尼卡巴嗪的实际含量。

### [0072] 三、尼卡巴嗪酶联免疫试剂盒检测尼卡巴嗪

#### 1、特异性检测

尼卡巴嗪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。

[0073] 将尼卡巴嗪及其它类似物(4,4'-二硝基二苯脲,2-羟基-4,6-二甲基嘧啶)分别做系列稀释,分别按照如上步骤二2进行操作,以尼卡巴嗪及其它类似物的系列稀释液替代其

中的“尼卡巴嗪标准品工作液”，制作标准曲线，并在曲线上找出各自50%抑制浓度(IC<sub>50</sub>)，具体方法如下：得到纵坐标数值等于50%对应的尼卡巴嗪浓度(ng/mL)，即IC<sub>50</sub>值。用下式计算试剂盒对尼卡巴嗪和各类似物的交叉反应率。

[0074] 交叉反应率(%) = (引起50%抑制的尼卡巴嗪浓度/引起50%抑制的尼卡巴嗪类似物浓度) × 100%

结果如表1所示，从表1中可以看出，尼卡巴嗪酶联免疫试剂盒对各种类似物的交叉反应率均小于0.1%。这说明尼卡巴嗪酶联免疫试剂盒对尼卡巴嗪具有极高的特异性，可有效的排除其它类似物的干扰，可专门用于尼卡巴嗪的检测。

[0075] 表1尼卡巴嗪酶联免疫试剂盒的特异性

药物名称	交叉反应率(%)
尼卡巴嗪	100
4,4'-二硝基二苯脲	<0.1
2-羟基-4,6-二甲基嘧啶	<0.1

## 2、不同样品的最低检测限测定

分别测定采用尼卡巴嗪酶联免疫试剂盒对动物肉、组织和鸡蛋中尼卡巴嗪进行检测时的最低检测限。具体方法如步骤二。

[0076] 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0.5μg/kg。

## 3、尼卡巴嗪酶联免疫试剂盒板内板间误差的测定

分别测定尼卡巴嗪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。

[0078] 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%。

## 4、尼卡巴嗪酶联免疫试剂盒检测尼卡巴嗪的回收率测定

测定采用尼卡巴嗪酶联免疫试剂盒检测尼卡巴嗪的回收率。具体方法如步骤二。

[0080] 结果显示，采用尼卡巴嗪酶联免疫试剂盒检测尼卡巴嗪的回收率范围为90%~110%。

## 5、尼卡巴嗪酶联免疫试剂盒的灵敏度测定

测定尼卡巴嗪酶联免疫试剂盒的灵敏度。具体方法如步骤二。

[0082] 结果显示，尼卡巴嗪酶联免疫试剂盒的灵敏度为0.1μg/kg，标准曲线范围0.1-8.1 μg/kg。

## [0083] 实施例6、尼卡巴嗪胶体金试纸条检测尼卡巴嗪

### 一、尼卡巴嗪胶体金试纸条的组成

尼卡巴嗪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得到的尼卡巴嗪单克隆抗体；

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 制备的尼卡巴嗪-OVA，质控区包被羊抗鼠二抗。

[0084] 样品孔位于样本吸收垫上远离胶体金垫末端的一端。

## [0085] 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。

#### [0086] (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。

[0087] (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。

[0088] (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。

[0089] (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。

[0090] 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。

[0091] 3、喷膜:在反应膜上的T 线位置喷上实施例2 制备的尼卡巴嗪-OVA、C 线位置喷上羊抗鼠抗体。

[0092] 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。

## [0093] 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。

[0094] 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。

### [0095] 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。

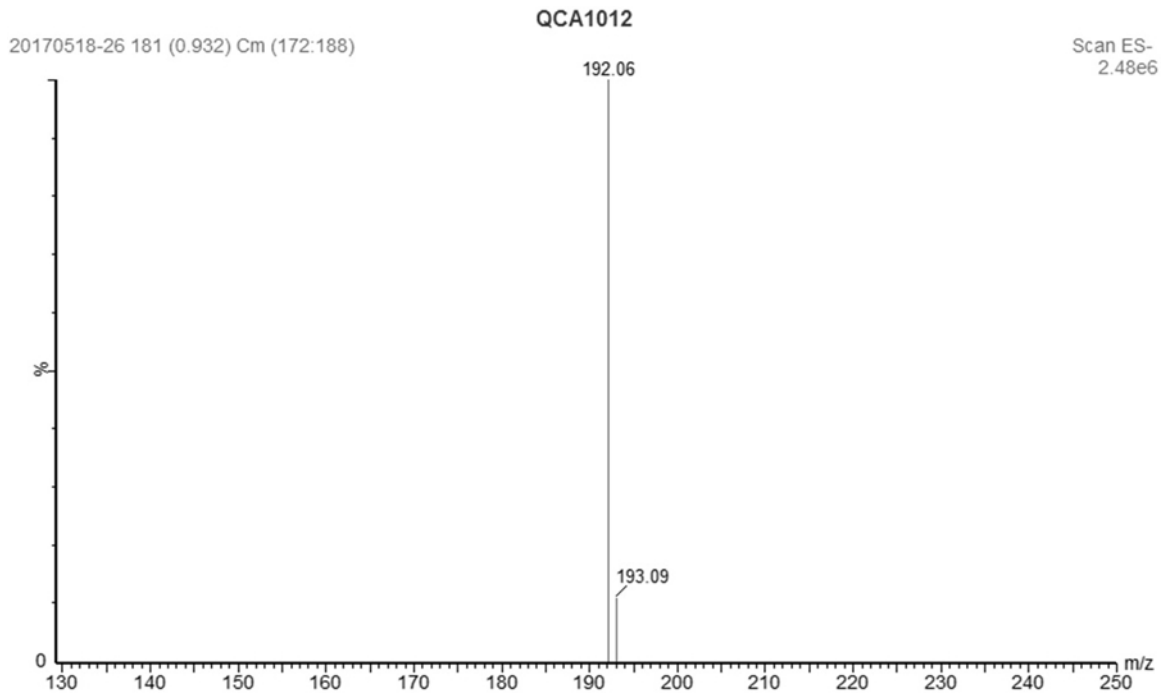


图1

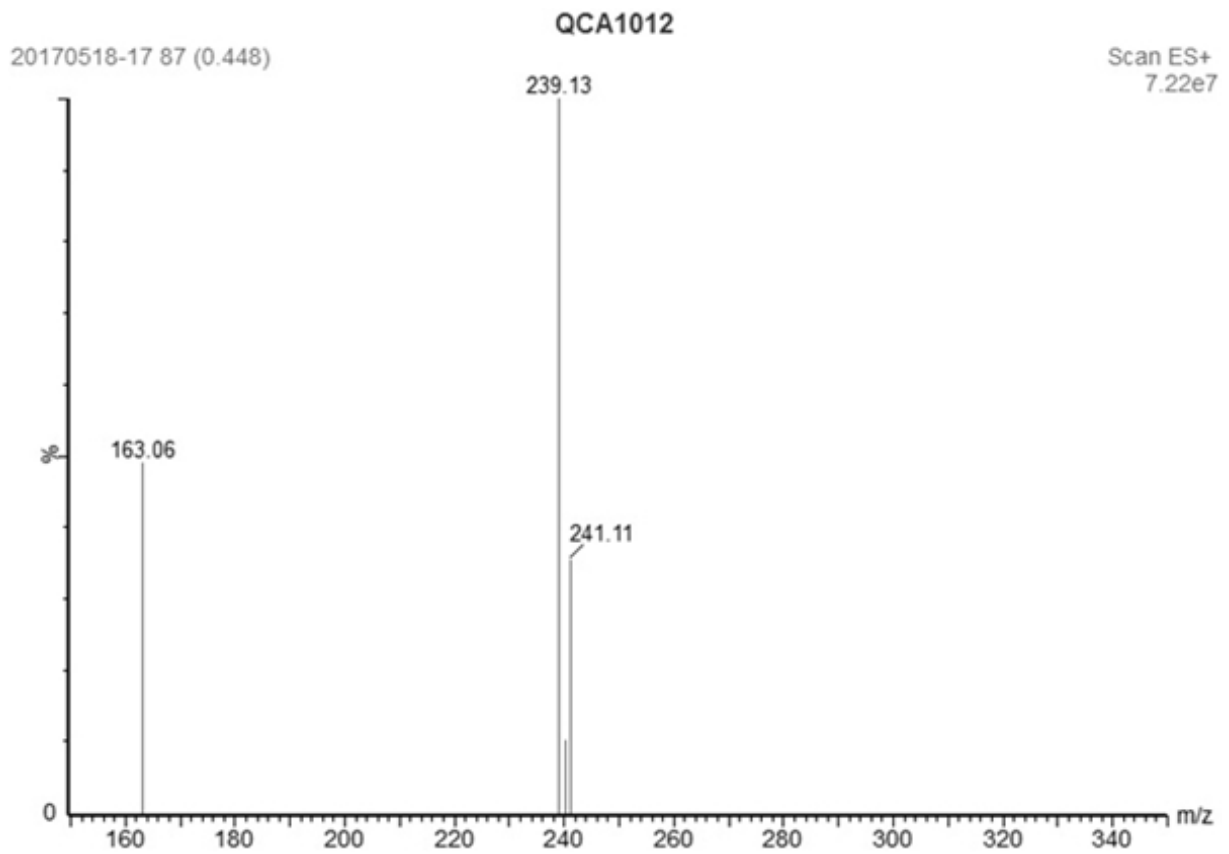


图2

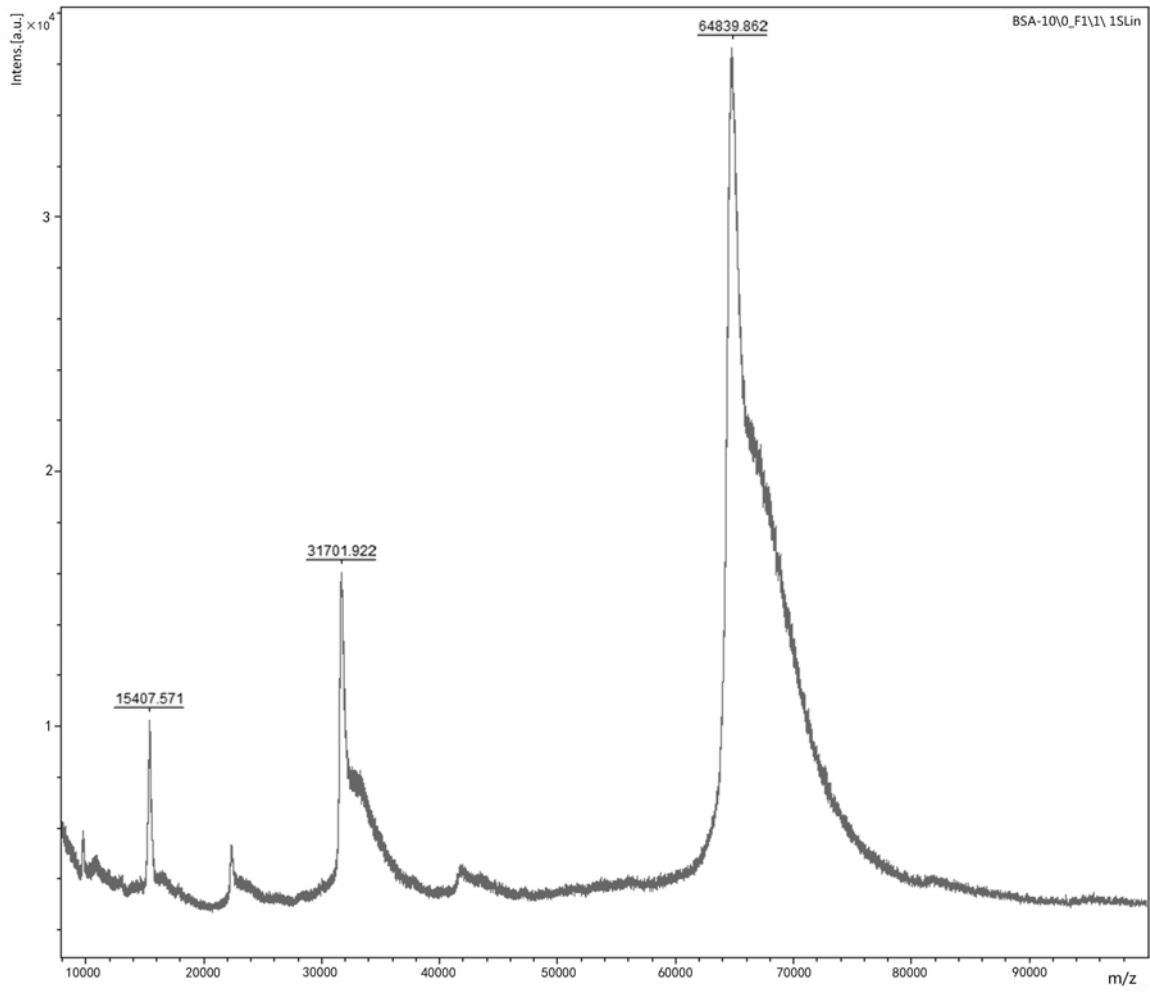


图3

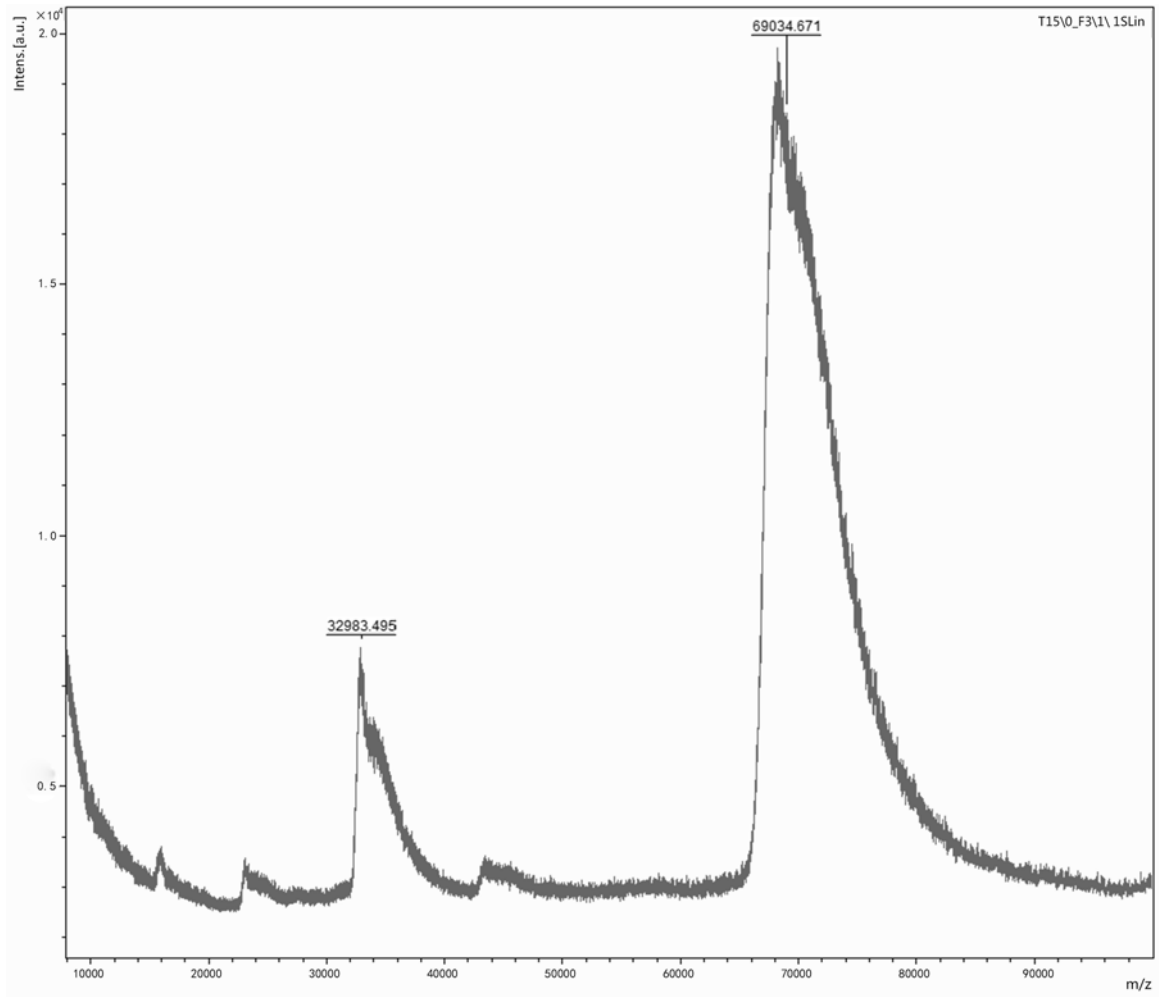
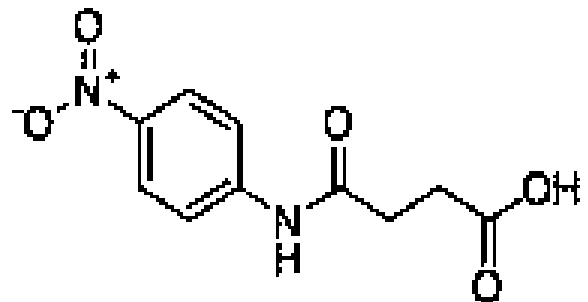


图4

专利名称(译)	一种尼卡巴嗪半抗原、人工抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN109212200A</a>	公开(公告)日	2019-01-15
申请号	CN2017110520105.3	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 秦誉 邢维维 贾良曦 刘薇 王照鹏		
发明人	聂靖东 秦誉 邢维维 贾良曦 刘薇 王照鹏		
IPC分类号	G01N33/544 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/544 G01N33/531 G01N2333/455 G01N2430/10		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种尼卡巴嗪半抗原、人工抗原及其制备方法与应用。本发明所提供的尼卡巴嗪人工抗原为将式I所示的尼卡巴嗪半抗原与载体蛋白偶联所得的抗原。本发明所提供尼卡巴嗪人工抗原合成方法简单，纯度高和产率高，对于尼卡巴嗪抗体的制备，以及尼卡巴嗪药物残留检测具有重大价值。式I。



Chemical Formula:  $C_{10}H_{10}N_2O_6$   
 Molecular Weight: 238.20