



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110240576 A

(43)申请公布日 2019.09.17

(21)申请号 201910566653.9

(22)申请日 2019.06.27

(71)申请人 广东达元绿洲食品安全科技股份有限公司

地址 510535 广东省广州市高新技术产业
开发区科学城开源大道11号A2栋第三
层

申请人 广州达元食品安全技术有限公司
广东中检达元检测技术有限公司

(72)发明人 李斌 石松 黄智永 江林峰
梁巧雯 邬秀锋 刘远高

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

代理人 郑莹

(51)Int.Cl.

C07D 279/16(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

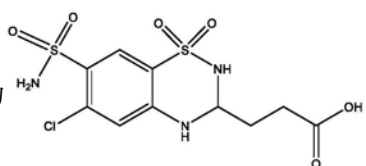
氢氯噻嗪半抗原和人工抗原及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了氢氯噻嗪半抗原和相应的人工抗原及其制备方法,所述氢氯噻嗪半抗原的结

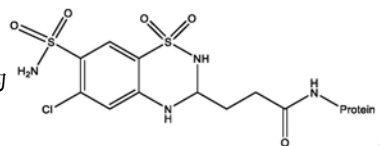
构式为
检测特异性强,IC50值为3.19 μg/L。本发明中的氢氯噻嗪人工抗原及单克隆抗体用于荧光定量免疫层析,可快速、便捷地实现氢氯噻嗪的检测,本发明中的荧光定量免疫层析试纸条灵敏度高,精密度高,稳定性好。

构式为



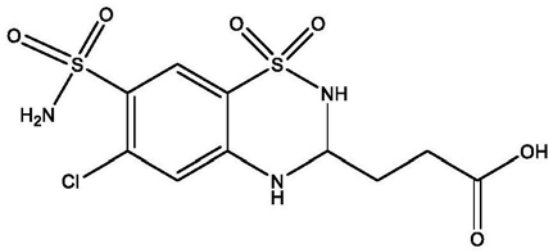
所述人工

抗原的结构式为



本发明还公开了所述氢氯噻嗪半抗原和相应的人工抗原在氢氯噻嗪单克隆抗体制备、ELISA检测、荧光定量免疫层析中的应用,以及氢氯噻嗪荧光定量免疫层析试纸条。本发明设计的氢氯噻嗪半抗原与待测目标物的电子云密度几乎一致,有效地提高了小分子半抗原的免疫原性。本发明中的氢氯噻嗪人工抗原及单克隆抗体用于ELISA

1. 一种半抗原,所述半抗原具有式1所示的结构:

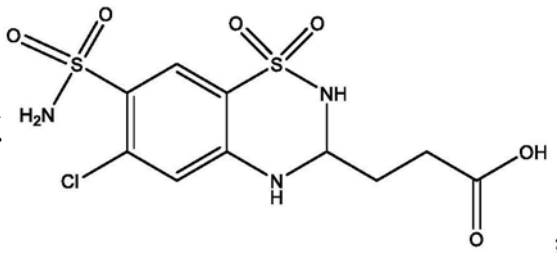


式 1。

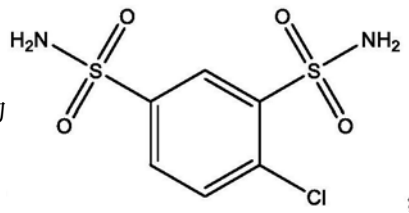
2. 权利要求1所述的半抗原的制备方法,包括如下步骤:

1) 化合物a和化合物b反应得到化合物c;

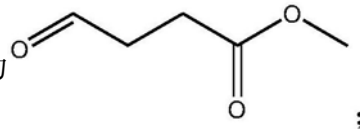
2) 化合物c水解得到半抗原



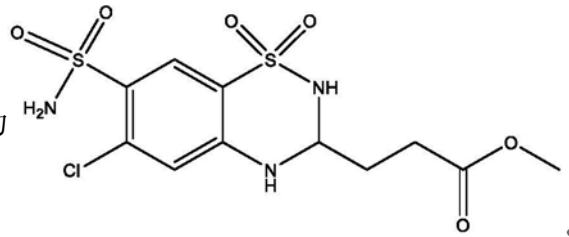
其中,化合物a的结构式为



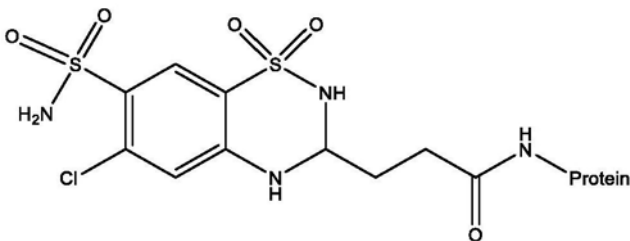
化合物b的结构式为



化合物c的结构式为



3. 一种人工抗原,所述人工抗原具有式2所示的结构:



式 2

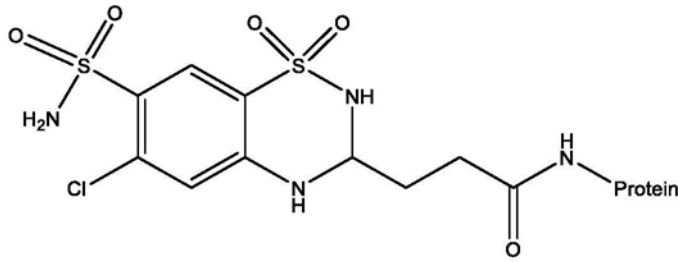
其中,protein为蛋白载体。

4. 根据权利要求3所述的人工抗原,其特征在于:蛋白载体为牛血清白蛋白、卵清蛋白、

人血清白蛋白或血蓝蛋白中的任意一种。

5. 权利要求3或4所述的人工抗原的制备方法,包括如下步骤:

将权利要求1所述半抗原与蛋白质载体连接,得到所述人工抗原



6. 一种氢氯噻嗪单克隆抗体,其特征在于:使用权利要求1所述的半抗原或权利要求3~4任一所述的人工抗原制备得到。

7. 权利要求3或4所述的人工抗原和权利要求6所述的氢氯噻嗪单克隆抗体在ELISA检测方法中的应用。

8. 权利要求3或4所述的人工抗原和权利要求6所述的氢氯噻嗪单克隆抗体在荧光定量免疫层析中的应用。

9. 一种氢氯噻嗪荧光定量免疫层析试纸条,其特征在于:试纸条中的反应膜包被有权利要求3或4所述的人工抗原;进一步地,其制备方法包括以下步骤:

1) 制备包被有人工抗原和兔IgG的反应膜:将人工抗原加到包被缓冲液中混合均匀喷到反应膜的检测区,将兔IgG加到包被缓冲液中混合均匀喷到反应膜的控制区,检测区和控制区相互分离,干燥处理后保存备用;

2) 样品垫的制备:将裁剪好的空白样品垫浸泡在样品垫处理液中浸泡,取出样品垫干燥处理后保存备用;

3) 荧光定量免疫层析试纸条的组装:在背衬中部叠置反应膜,两端分别叠置样品垫和吸水垫,反应膜和吸水垫、样品垫相搭连,检测区靠近样品垫,控制区靠近吸水垫,得到试纸板,将试纸条装载于试纸卡内,得荧光定量免疫层析试纸条。

10. 一种使用权利要求9所述的氢氯噻嗪荧光定量免疫层析试纸条检测氢氯噻嗪的方法:

1) 荧光微球标记的氢氯噻嗪单克隆抗体的制备:将荧光微球活化后与权利要求6所述的氢氯噻嗪单克隆抗体偶联,离心除杂,加入荧光缓冲液重悬荧光微球,得到荧光微球标记的氢氯噻嗪单克隆抗体;

2) 荧光微球标记的氢氯噻嗪单克隆抗体检测液的制备:用荧光缓冲液将荧光微球标记的氢氯噻嗪单克隆抗体稀释,得到荧光微球标记的氢氯噻嗪单克隆抗体检测液;

3) 用PBS缓冲液配备系列浓度的氢氯噻嗪标准溶液,取荧光微球标记的氢氯噻嗪单克隆抗体检测液和标准溶液混匀后滴加到荧光定量免疫层析试纸条的样品区,用荧光定量检测仪读取T/C值,通过标准溶液浓度对应的T/C值建立标准曲线,测定待测样品的T/C值,结合标准曲线即可实现氢氯噻嗪的快速定量检测。

氢氯噻嗪半抗原和人工抗原及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫化学技术领域,具体涉及一种氢氯噻嗪半抗原和人工抗原及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 氢氯噻嗪为利尿药、抗高血压药,在临床上广泛应用。高血压为一种慢性疾病如果在平常生活得到有效控制的话病情能够得到有效缓解,所以很多人选择长期服用具有降血压的保健品,以一种安全的方式控制和降低血压。在保健食品中非法添加氢氯噻嗪等具有降血压作用的药物,很容易引起药物的副作用,危害人们的身体健康。

[0003] 氢氯噻嗪的研究主要集中在药代动力学研究以及对高血压治疗效果的研究。对非法添加的研究的报道不多。丁一冰等人建立人血浆氢氯噻嗪的毛细管高效液相色谱(Cap-HPLC)定量分析方法,用于氢氯噻嗪的药代动力学研究。汤卫国等人采用HPLC法测定复方氨氯地平缬沙坦氢氯噻嗪片剂中氢氯噻嗪的含量。Kondawar Manish等人采用高效薄层色谱法检测降血压药中氢氯噻嗪的含量。孙晓翠等人建立薄层色谱法、高效液相色谱法对添加氢氯噻嗪的清脑降压片进行分离、分析,并用高效液相色谱法-二极管阵列检测,发现检测的样品中有非法添加氢氯噻嗪的样品。目前我国氢氯噻嗪含量的检测方法主要有高效薄层色谱法、毛细管高效色谱法(Cap-HPLC)等。尽管仪器方法是氢氯噻嗪检测的验证方法,但是由于其样本前处理过程须经多步稀释、过滤、提取,制备复杂,且对操作人员的专业知识要求比较高,很难达到大量样品的快速筛查检测的要求。ELISA属于免疫分析技术,弥补了仪器分析方法的缺陷并且检测灵敏度能达到要求。因此,建立快速检测氢氯噻嗪的免疫分析方法丰富了氢氯噻嗪的研究内容,对保健食品的安全监测和氢氯噻嗪药代动力学的研究具有非常积极的作用。

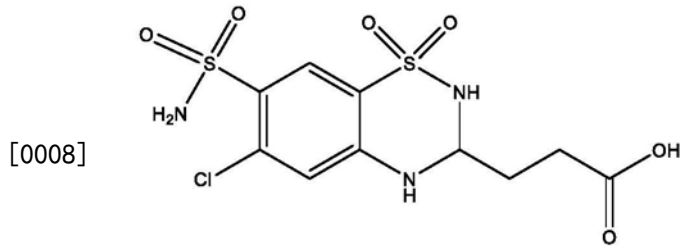
[0004] CN104447619A中公开了一种氢氯噻嗪半抗原和完全抗原及其制备方法,通过将氢氯噻嗪溶解于甲醇,加入碳酸钾后,与6-溴己酸乙酯反应,萃取分离得氢氯噻嗪半抗原。将氢氯噻嗪半抗原上的羧基与载体蛋白上的氨基进行偶联,得到氢氯噻嗪完全抗原。该方法是从仲胺上直接连活性手臂,仲胺极性基团直接与苯环相连,反应后的极性基团从仲胺变成叔胺,电子云密度有了明显改变,同时也在一定层度上影响了苯环的电子云密度。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种氢氯噻嗪半抗原和人工抗原及其制备方法和应用。

[0006] 本发明所采取的技术方案是:

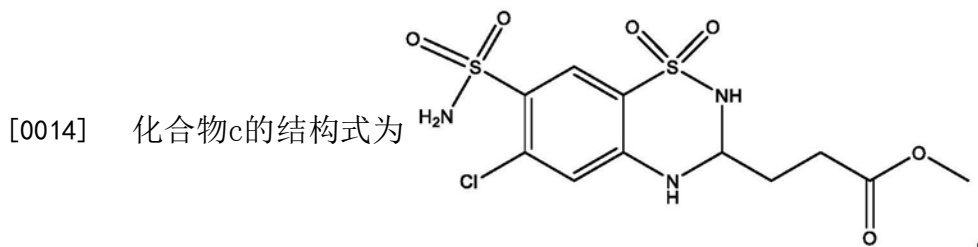
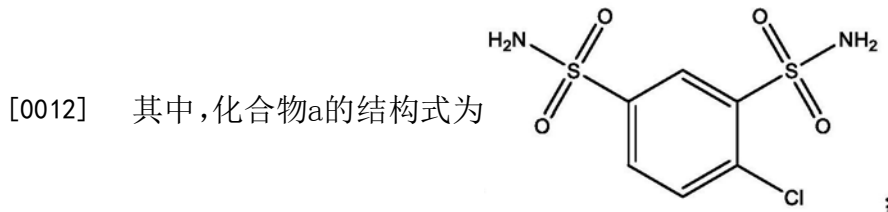
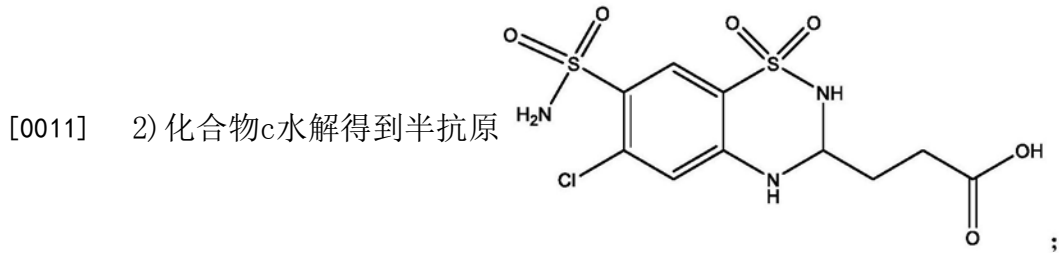
[0007] 一种半抗原,所述半抗原具有式1所示的结构:



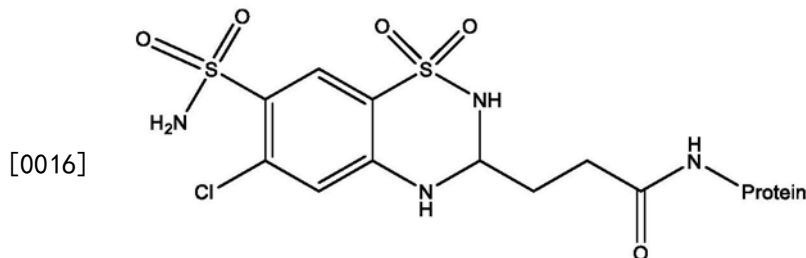
式 1。

[0009] 上述半抗原的制备方法,包括如下步骤:

[0010] 1) 化合物a和化合物b反应得到化合物c;



[0015] 一种人工抗原,所述人工抗原具有式2所示的结构:

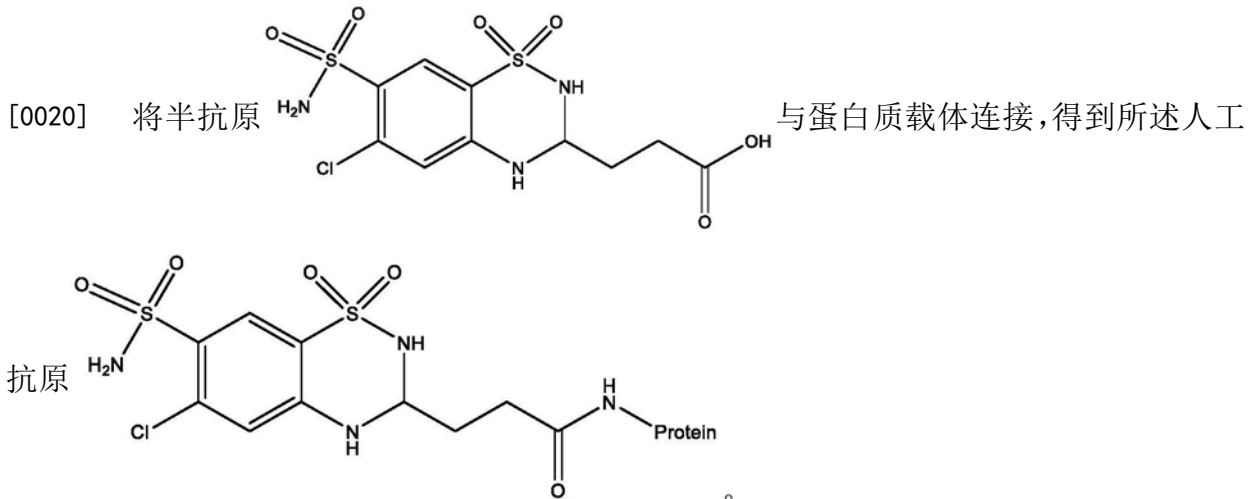


式 2

[0017] 其中,protein为蛋白载体。

[0018] 进一步地,蛋白载体为牛血清白蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白或血蓝蛋白中的任意一种。

[0019] 上述人工抗原的制备方法,包括如下步骤:



[0021] 一种氢氯噻嗪单克隆抗体,其特征在于:使用上述半抗原或上述人工抗原制备得到。

[0022] 上述人工抗原和上述氢氯噻嗪单克隆抗体在ELISA检测方法中的应用。

[0023] 上述人工抗原和上述氢氯噻嗪单克隆抗体在荧光定量免疫层析中的应用。

[0024] 一种氢氯噻嗪荧光定量免疫层析试纸条,试纸条中的反应膜包被有上述人工抗原;进一步地,其制备方法包括以下步骤:

[0025] 1) 制备包被有人工抗原和兔IgG的反应膜:将人工抗原加到包被缓冲液中混合均匀喷到反应膜的检测区,将兔IgG加到包被缓冲液中混合均匀喷到反应膜的控制区,检测区和控制区相互分离,干燥处理后保存备用;

[0026] 2) 样品垫的制备:将裁剪好的空白样品垫浸泡在样品垫处理液中浸泡,取出样品垫干燥处理后保存备用;

[0027] 3) 荧光定量免疫层析试纸条的组装:在背衬中部叠置反应膜,两端分别叠置样品垫和吸水垫,反应膜和吸水垫、样品垫相搭连,检测区靠近样品垫,控制区靠近吸水垫,得到试纸板,将试纸条装载于试纸卡内,得荧光定量免疫层析试纸条。

[0028] 一种使用上述氢氯噻嗪荧光定量免疫层析试纸条检测氢氯噻嗪的方法:

[0029] 1) 荧光微球标记的氢氯噻嗪单克隆抗体的制备:将荧光微球活化后与上述的氢氯噻嗪单克隆抗体偶联,离心除杂,加入荧光缓冲液重悬荧光微球,得到荧光微球标记的氢氯噻嗪单克隆抗体;

[0030] 2) 荧光微球标记的氢氯噻嗪单克隆抗体检测液的制备:用荧光缓冲液将荧光微球标记的氢氯噻嗪单克隆抗体稀释,得到荧光微球标记的氢氯噻嗪单克隆抗体检测液;

[0031] 3) 用PBS缓冲液配备系列浓度的氢氯噻嗪标准溶液,取荧光微球标记的氢氯噻嗪单克隆抗体检测液和标准溶液混匀后滴加到荧光定量免疫层析试纸条的样品区,用荧光定量检测仪读取T/C值,通过标准溶液浓度对应的T/C值建立标准曲线,测定待测样品的T/C值,结合标准曲线即可实现氢氯噻嗪的快速定量检测。

[0032] 本发明的有益效果是:

[0033] 1、本发明设计的氢氯噻嗪半抗原引入的手臂不仅具有活性基团,还完整保留了待测目标物的所有极性基团,使得半抗原与待测目标物的电子云密度几乎一致,有效的提高

了小分子半抗原的免疫原性。

[0034] 2、本发明中的氢氯噻嗪人工抗原及单克隆抗体用于ELISA检测特异性强, IC50值为3.19 μ g/L。

[0035] 3、本发明中的氢氯噻嗪人工抗原及单克隆抗体用于荧光定量免疫层析技术, 可快速、便捷地实现氢氯噻嗪的检测, 本发明中制备的荧光定量免疫层析试纸条对氢氯噻嗪检测灵敏度为2 μ g/L, 另外该荧光定量免疫层析试纸条精密度高, 且可在室温下稳定保存一年以上, 可以满足市场在保存和运输过程中的要求。

附图说明

[0036] 图1为氢氯噻嗪半抗原质谱图。

[0037] 图2为ELISA检测标准曲线;

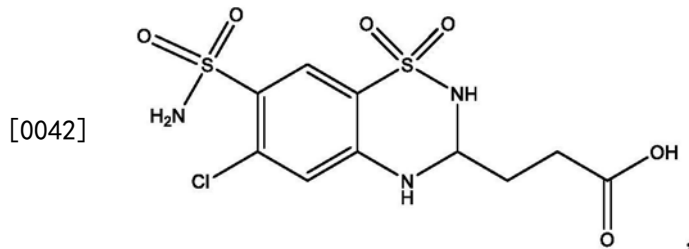
[0038] 图3为荧光定量免疫层析定量检测标准曲线。

具体实施方式

[0039] 下面进一步列举实施例以详细说明本发明。同样应理解, 以下实施例只用于对本发明进行进一步说明, 不能理解为对本发明保护范围的限制, 本领域技术人员根据本发明阐述的原理做出的一些非本质的改进和调整均属于本发明的保护范围。下述示例具体的工艺参数等也仅是合适范围中的一个示例, 即本领域技术人员可以通过本文的说明做合适范围内的选择, 而并非要限定于下文示例的具体数据。

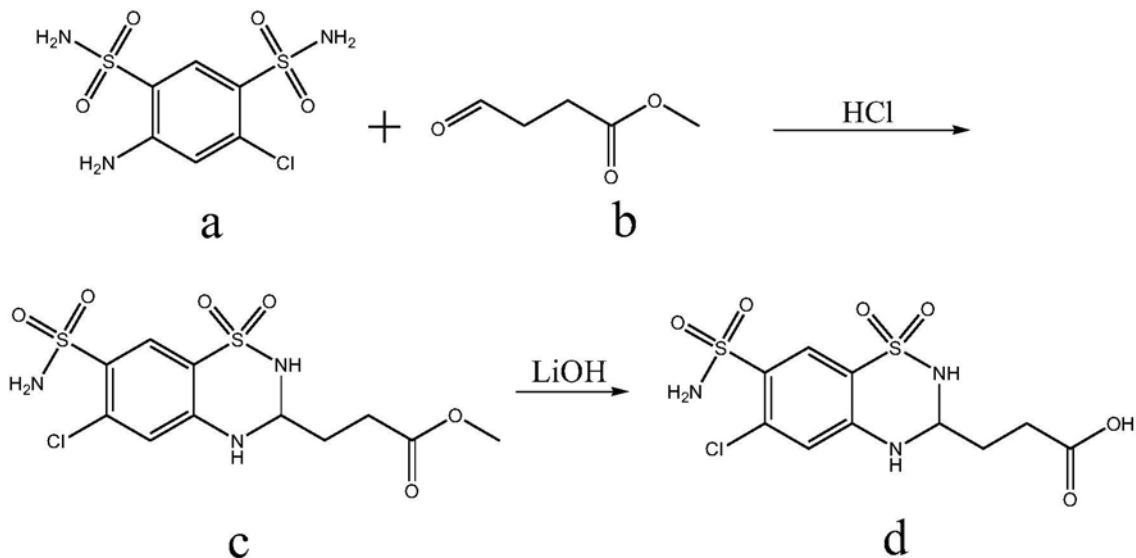
[0040] 实施例1氢氯噻嗪半抗原及其制备方法

[0041] 一种氢氯噻嗪半抗原, 其结构式为:



[0043] 该半抗原的合成路线为:

[0044]



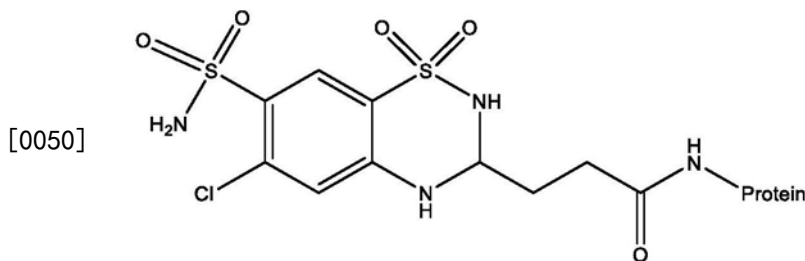
[0045] 制备方法如下:

[0046] (1) 取3.0g (10.5mmol) 化合物a于50mL圆底烧瓶中,再依次加入20mL 1,4-二氧六环,1.8g (15.7mmol) 化合物b和0.3mL浓盐酸。于70~90℃反应1.5h以上。反应完毕,减压去溶剂,加入50mL饱和碳酸氢钠水溶液,用乙酸乙酯萃取两次,再减压去溶剂,重结晶得1.7g 化合物c(乙酸乙酯/石油醚,2/5,v/v)。

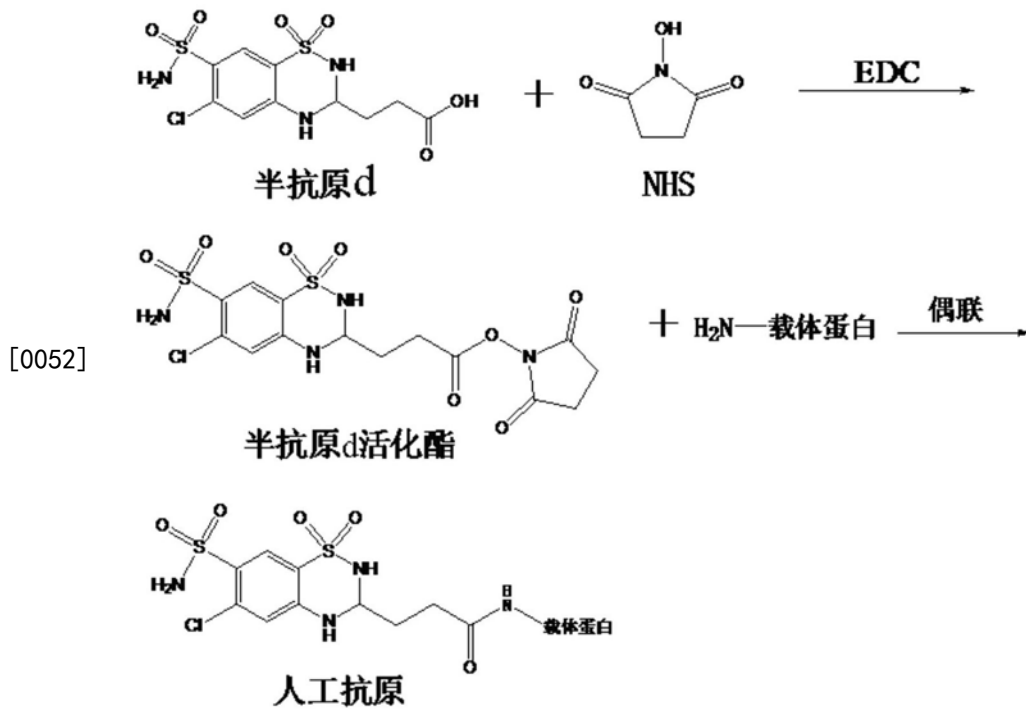
[0047] (2) 将1.7g (4.4mmol) 化合物c溶于10mL乙醇中,加入6M的氢氧化锂溶液将化合物c的乙醇溶液的pH值调至10以上,室温反应15h以上,减压去溶剂,再加入10mL纯化水,所得溶液通过1M的稀盐酸将pH值调至4,过滤,烘干得氢氯噻嗪半抗原d 645mg,质谱图如图1所示,ESI-MS:370[M+1],392[M+23]。

[0048] 实施例2氢氯噻嗪人工抗原及其制备方法

[0049] 一种氢氯噻嗪人工抗原,其结构式为:



[0051] 其中Protein为载体蛋白,载体蛋白选自牛血清白蛋白、血蓝蛋白中的任意一种,该人工抗原的合成线路为:



[0053] 载体蛋白为牛血清白蛋白的氢氯噻嗪人工抗原的合成方法如下：

[0054] 1) 取10mg实施例1中制备的氢氯噻嗪半抗原，溶解于0.5mL二甲基甲酰胺(DMF)中，搅拌充分后，加入10mg EDC和10mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)，室温下搅拌4h，即可得到半抗原活化酯；

[0055] 2) 称取30mg牛血清蛋白(BSA)，使其充分溶解在4mL的浓度为0.01mol/L的PBS溶液中，形成载体蛋白溶液，在搅拌下将所述半抗原活化酯逐滴缓慢滴加至所述载体蛋白溶液中，并在室温下搅拌16~24h；

[0056] 3) 步骤(2)制得的溶液用0.01mol/L的PBS室温透析3天，每天换3次透析液，以除去未反应的小分子物质；

[0057] 4) 分装，于4℃保存备用。

[0058] 载体蛋白为血蓝蛋白的氢氯噻嗪人工抗原的合成方法如下：

[0059] 1) 取10mg实施例1中制备的氢氯噻嗪半抗原，溶解于0.5mL二甲基甲酰胺(DMF)中，搅拌充分后，加入10mg EDC和10mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)，室温下搅拌4h，即可得到半抗原活化酯；

[0060] 2) 称取30mg血蓝蛋白(KLH)，使其充分溶解在4mL的浓度为0.01mol/L的PBS溶液中，形成载体蛋白溶液，在搅拌下将所述半抗原活化酯逐滴缓慢滴加至所述载体蛋白溶液中，并在室温下搅拌16~24h；

[0061] 3) 步骤(2)制得的溶液用0.01mol/L的PBS室温透析3天，每天换3次透析液，以除去未反应的小分子物质；

[0062] 4) 分装，于4℃保存备用。

[0063] 实施例3氢氯噻嗪人工抗原在制备抗氢氯噻嗪单克隆抗体中的应用

[0064] 抗氢氯噻嗪单克隆抗体的制备方法如下：

[0065] 以上述载体蛋白为血蓝蛋白的氢氯噻嗪人工抗原为免疫原，与等体积弗氏佐剂乳化后，免疫BALB/C小鼠。每只鼠免疫剂量为50~100μg，免疫间隔3周，免疫3次后，采小鼠尾

部静脉血检测血清效价。如抗体效价不达要求,需加强免疫,待抗体效价不再升高后,以100 μg 全抗原进行皮下加强免疫,5天后取小鼠脾细胞与SP20细胞融合。融合后的细胞在HAT培养基中筛选,5天后以完全培养基替换成HAT培养基进行培养。用ELISA对细胞上清进行检测,将检测结果为强阳性的孔内细胞进行有限稀释法克隆培养,经3次克隆培养检测后,均呈阳性的孔内细胞即为分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞。将杂交瘤细胞放大培养后,接种至小鼠腹腔,产生含抗体的腹水。用辛酸-硫酸铵沉淀法纯化腹水,即可得到高纯度、高特异性的单克隆抗体。

[0066] 用含0.05%叠氮钠,pH7.4的磷酸盐缓冲液,将单克隆抗体稀释至0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

[0067] 实施例4氢氯噻嗪人工抗原在ELISA中的应用与效果评价

[0068] 用pH9.6的碳酸盐缓冲液作包被稀释液,将载体蛋白为牛血清白蛋白的氢氯噻嗪人工抗原稀释至0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,按100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入聚苯乙烯微孔板中,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜,甩干,按250 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入1%BSA,磷酸盐缓冲液中37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭1h,甩干,干燥后真空包装保存。

[0069] 向包被有氢氯噻嗪人工抗原的微孔酶标板中加入氢氯噻嗪标准溶液50 $\mu\text{L}/\text{孔}$,再相应加入氢氯噻嗪单克隆抗体溶液50 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应0.5h;甩干后,加入洗液300 $\mu\text{L}/\text{孔}$,洗涤3次后拍干;再加入酶标二抗100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应0.5h;再次洗涤3次后拍干,分别加入50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的显色液A和显色液B,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应15min;加入2M硫酸50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 终止,设定酶标仪于450nm波长测定每孔的OD值。结果如下表。

[0070] ELISA测试不同浓度的氢氯噻嗪标准溶液的OD值

浓度 ($\mu\text{g}/\text{L}$)	0	1	3	9	27	81
[0071] OD 值	2.334	1.725	1.192	0.675	0.327	0.152

[0072] 通过表中数据,采用ELISA Calc软件进行四参数Logistic曲线拟合绘制标准曲线(如图2),氢氯噻嗪的线性方程为: $y = (A-D) / [1 + (x/C)^B] + D$, $r^2 = 0.999$, $A = 2.33490$, $B = 0.89855$, $C = 3.06668$, $D = 0.03962$, x 表示待测物浓度, y 表示OD值,通过计算得到IC50值为3.19 $\mu\text{g}/\text{L}$,在1~81 $\mu\text{g}/\text{L}$ 呈线性关系。

[0073] 实施例5氢氯噻嗪荧光定量免疫层析试纸条的制备及性能评价

[0074] 荧光定量免疫层析试纸条的制备方法如下:

[0075] (1) 制备包被有人工抗原和兔IgG的反应膜:

[0076] 以硝酸纤维素膜(NC膜)为反应膜,将载体蛋白为牛血清白蛋白的人工抗原用包被缓冲液调节浓度至0.1~0.5 mg/mL ,并将兔IgG用包被缓冲液也调节浓度至0.1~1 mg/mL ,按照0.8~1.2 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的膜液量,将抗原和兔IgG喷到反应膜对应的检测区和控制区,检测区和控制区之间间隔为5mm,放置40~45 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱处理24~28h,置于恒温恒湿保藏箱里备用,所用包被缓冲液为含有0.5%PEG20000、1%蔗糖、0.5%BSA、0.05%叠氮化钠的0.01M PBS缓冲液;

[0077] (2) 样品垫的制备:

[0078] 将裁剪好的空白样品垫浸泡在样品本处理液中,浸泡5min后,取出在37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥16h,置于恒温恒湿保藏箱里备用,所用样品垫处理液为含有0.3%吐温20、1%蔗糖、0.5%

BSA、0.05%叠氮化钠的0.01M PBS缓冲液；

[0079] (3) 荧光定量免疫层析试纸条的组装：

[0080] 在PVC板背衬中部叠置步骤(1)制得的反应膜，两端分别叠置步骤(2)制得的样品垫和吸水垫，反应膜和吸水垫、样品垫相搭连，检测区靠近样品垫，控制区靠近吸水垫，得到试纸板，将试纸板切割成试纸条，将试纸条装载于试纸卡内，得荧光定量免疫层析试纸条。

[0081] 荧光定量免疫层析试纸条的性能评价

[0082] (1) 荧光微球标记的抗氢氯噻嗪单克隆抗体的制备：取500 μ L荧光微球溶液(荧光微球固含量1%，即含荧光微球5mg)，并用超声波处理；搅拌下分别加入5mg NHS和4mg DEC，控制荧光微球溶液的温度为4~10 $^{\circ}$ C，并在此温度下活化40min；活化完后，用0.1M碳酸钾溶液调pH为8~9，控制荧光微球溶液的温度为4~10 $^{\circ}$ C；加入0.25mg氢氯噻嗪单克隆抗体，搅拌均匀后，移去冰浴，让其自然升至室温，并在室温下搅拌4~6h；偶联完成后，反应液在12000rpm下离心10min，除去上清，加入1mL荧光缓冲液，超声重悬后，离心、除去上清，该操作重复3次，最后一次离心，除上清后，加入0.5mL荧光缓冲液超声重悬荧光微球，2~8 $^{\circ}$ C冰箱保存备用，所用荧光缓冲液为含有0.5%PEG20000、2%蔗糖、0.1%吐温20、0.5%BSA、0.05%叠氮化钠的0.01M PBS缓冲液。

[0083] (2) 荧光微球标记的抗氢氯噻嗪单克隆抗体检测液的制备：将上述荧光微球标记的氢氯噻嗪单克隆抗体取出放置至室温，用荧光缓冲液稀释100~1000倍成荧光微球标记的氢氯噻嗪单克隆抗体检测液，荧光缓冲液为含有0.5%PEG20000、2%蔗糖、0.1%吐温20、0.5%BSA、0.05%叠氮化钠的0.01M PBS缓冲液，然后置于2~8 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

[0084] (3) 用0.01M PBS缓冲液配备一系列不同浓度的氢氯噻嗪的标准溶液，然后取上述制备的荧光微球标记的氢氯噻嗪单克隆抗体检测液20 μ L和100 μ L配制好的系列标准品溶液混合1min后，取80 μ L滴加到本发明中的荧光定量免疫层析试纸条的样品区，15min后，用荧光定量检测仪读取T/C的荧光信号值比值，检测试验设置3组重复。再通过系列标品浓度对应的T/C值建立四参数Logistic曲线，曲线所得的四个参数值录入荧光定量检测仪的标定软件，即可实现荧光定量免疫层析试纸条在荧光免疫层析分析仪上的快速定量检测。

[0085] 测定结果如下：

[0086] 使用荧光定量免疫层析试纸条与对应的氢氯噻嗪标准液的测定结果

[0087]

标准液浓度 (μ g/L)	0	2	6	18	54	162
T/C 值	2.25	1.63	1.27	0.75	0.38	0.15
氢氯噻嗪 B/B0	100%	72.44%	56.44%	33.33%	16.89%	6.67%

[0088] 通过对氢氯噻嗪系列标准液的T/C值进行了测定，并计算了B/B0(不同浓度的标准品测试卡T/C值与含量为0的标准品测试卡T/C值的比值)，结果如上表所示。从表中可看出，当氢氯噻嗪的标准液含量为2 μ g/L时，其B/B0值为72.44%，说明此浓度下检测的T/C值与含0 μ g/L浓度的氢氯噻嗪标准液的测试卡T/C值有明显差异，故本发明制备的荧光定量免疫层

析试纸条对氢氯噻嗪检测灵敏度为2 μ g/L。

[0089] 通过上表数据,采用ELISA Calc软件进行四参数Logistic曲线拟合绘制荧光定量免疫层析试纸条的定量标准曲线(如图3所示),所得曲线的线性方程为: $y = (A-D) / [1 + (x/C)^B] + D$, $r^2 = 0.999$, $A = 2.24643$, $B = 0.73293$, $C = 8.79194$, $D = -0.10582$,线性方程中x表示待测物浓度,y表示T/C值。在荧光免疫层析分析仪的定量曲线设置界面当中,分别将A,B,C,D的值录入荧光免疫层析分析仪的标定软件,即可实现荧光定量免疫层析试纸条在荧光免疫层析分析仪上的快速定量检测。

[0090] 荧光定量免疫层析试纸条的稳定性测试

[0091] 荧光定量免疫层析试纸条保存的条件为室温,为了确保试纸条的稳定性,对试纸条进行了加速破坏性实验,分别在室温、45 $^{\circ}$ C条件下连续放置60天,并在第3天,第6天,第15天,第30天和第60天分别检测荧光信号值,实验设置3组重复,结果如下表所示:

[0092]	天数		1	3	6	15	30	60
	室温	T/C	2.18	1.98	2.31	2.09	2.25	1.96
[0093]	45 $^{\circ}$ C加速	T/C	2.06	2.15	2.27	1.95	2.04	2.20

[0094] 由上表可知,在常温和45 $^{\circ}$ C下密封保存的荧光定量免疫层析试纸条60天后,四个项目的试纸条的T/C值均无明显变化,说明荧光定量免疫层析试纸条在加速实验45 $^{\circ}$ C下最少可稳定保存60天。因此,本发明制备的氢氯噻嗪荧光定量免疫层析试纸条可在室温下稳定保存一年以上,完全可以满足市场在保存和运输过程中的要求。

[0095] 荧光定量免疫层析试纸条的精密度测试

[0096] 以试纸条的T/C值的板内误差和板间误差来表示该方法的精密度,并分别以板内变异系数和板间变异系数来体现板内误差和板间误差。板内变异系数的测定是对同一板的10条荧光定量免疫层析试纸条的T/C值的数据,并对这些数据进行离散程度分析。板间变异系数的测定是对不同板的10条荧光定量免疫层析试纸条的T/C值的数据,并对这些数据进行离散程度分析。按变异系数公式 $CV\% = [\text{标准偏差SD值} / \text{平均值}] \times 100\%$ 即可分别计算出荧光定量免疫层析试纸条的板内变异系数和板间变异系数。结果如下表所示。

	板内 T/C 值	板间 T/C 值
	1.936	2.091
	1.98	2.088
	2.11	2.083
	2.166	2.075
[0097]	2.123	2.369
	2.133	2.166
	2.034	1.939
	2.162	2.109
	2.066	2.102
	1.988	1.965
CV 值	3.90%	5.55%

[0098] 由上表可知,通过同一板内和板间的各10张荧光定量免疫层析试纸条的测试,试纸条的T/C值均变化较小。通过变异系数计算公式得出试纸条的板内和板间的变异系数分别为3.90%和5.55%,说明试纸条的板内和板间变异系数小,精密度高,可满足试纸条的定量的要求。

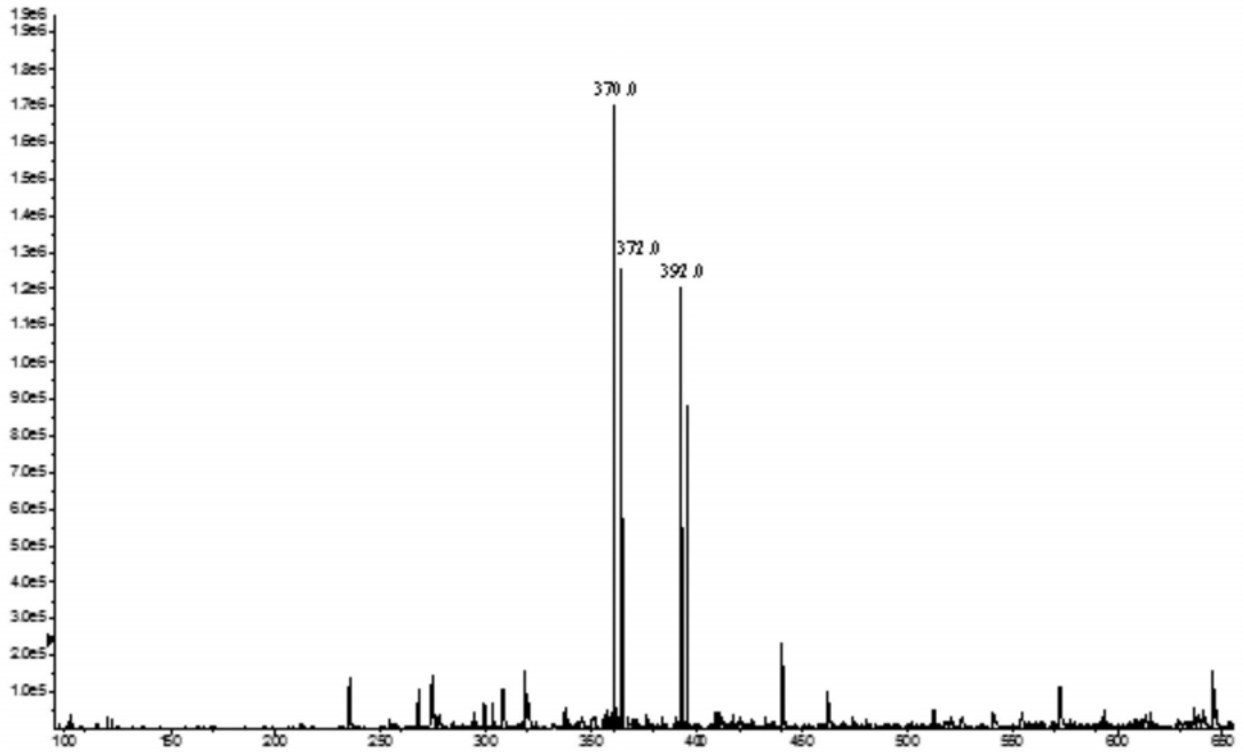


图1

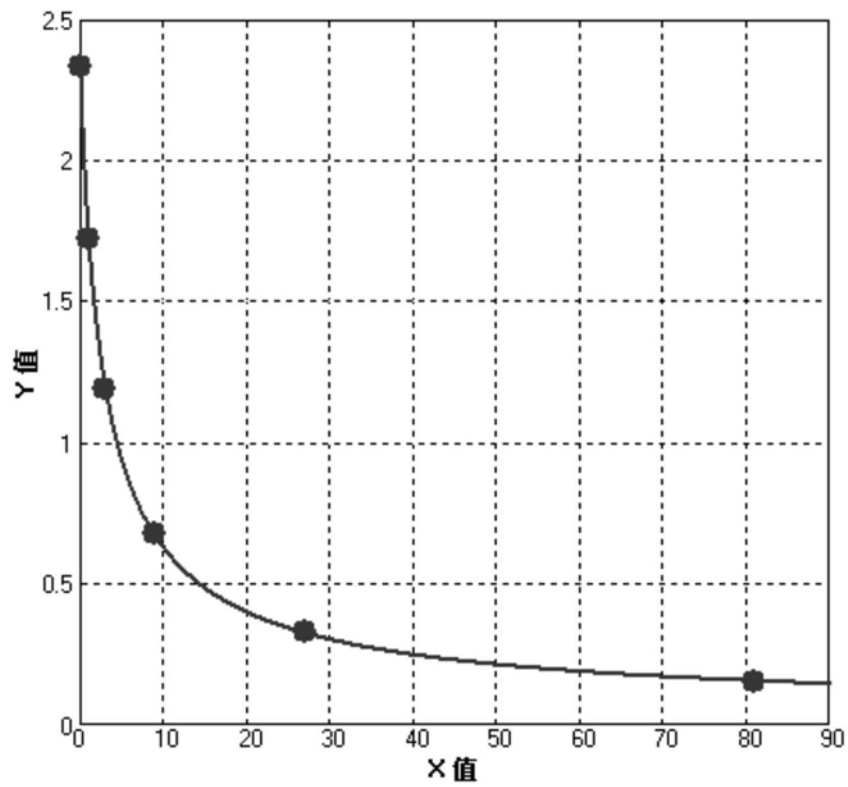


图2

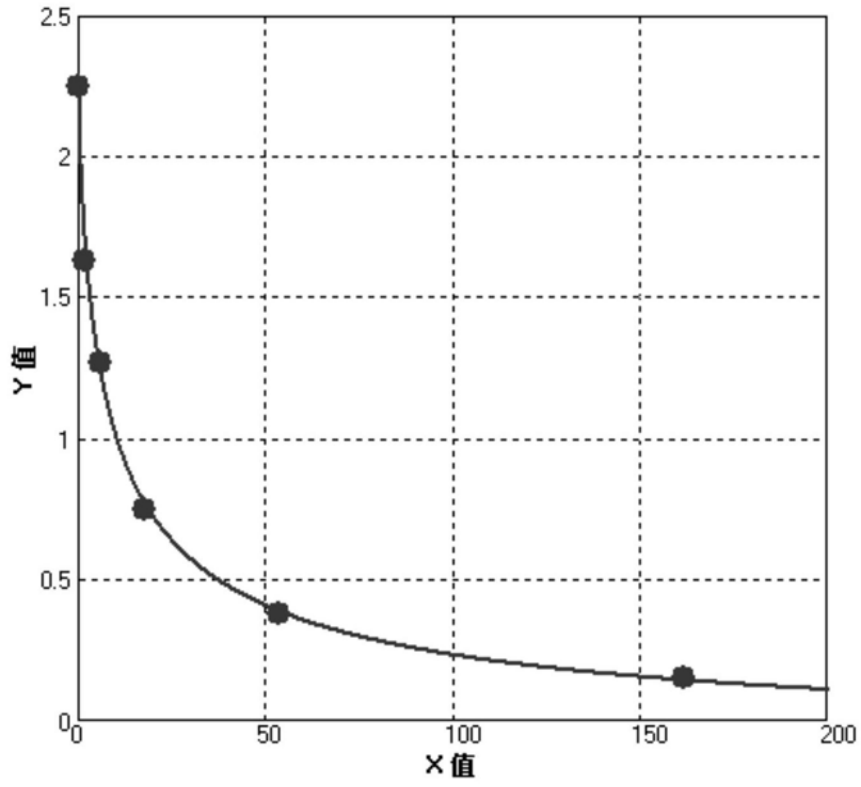
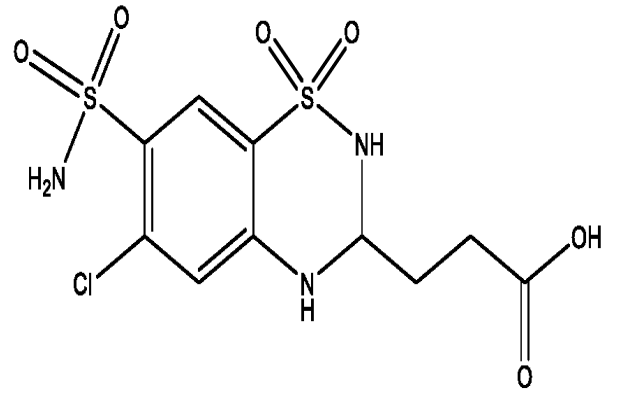


图3

专利名称(译)	氢氟噻嗪半抗原和人工抗原及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN110240576A	公开(公告)日	2019-09-17
申请号	CN201910566653.9	申请日	2019-06-27
[标]申请(专利权)人(译)	广东达元绿洲食品安全科技股份有限公司 广州达元食品安全技术有限公司 广东中检达元检测技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	广东达元绿洲食品安全科技股份有限公司 广州达元食品安全技术有限公司 广东中检达元检测技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广东达元绿洲食品安全科技股份有限公司 广州达元食品安全技术有限公司 广东中检达元检测技术有限公司		
[标]发明人	李斌 石松 黄智永 江林峰 梁巧雯 刘远高		
发明人	李斌 石松 黄智永 江林峰 梁巧雯 邬秀锋 刘远高		
IPC分类号	C07D279/16 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/577 G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	C07D279/16 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577		
代理人(译)	郑莹		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了氢氟噻嗪半抗原和相应的人工抗原及其制备方法，所述氢氟噻嗪半抗原的结构式为所述人工抗原的结构式为本发明还公开了所述氢氟噻嗪半抗原和相应的人工抗原在氢氟噻嗪单克隆抗体制备、ELISA检测、荧光定量免疫层析中的应用，以及氢氟噻嗪荧光定量免疫层析试纸条。本发明设计的氢氟噻嗪半抗原与待测目标物的电子云密度几乎一致，有效地提高了小分子半抗原的免疫原性。本发明中的氢氟噻嗪人工抗原及单克隆抗体用于ELISA检测特异性强，IC50值为3.19μg/L。本发明中的氢氟噻嗪人工抗原及单克隆抗体用于荧光定量免疫层析，可快速、便捷地实现氢氟噻嗪的检测，本发明中的荧光定量免疫层析试纸条灵敏度高，精密度高，稳定性好。



式1。