



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104788383 B

(45)授权公告日 2018.06.22

(21)申请号 201410021591.0

(22)申请日 2014.01.17

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104788383 A

(43)申请公布日 2015.07.22

(73)专利权人 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号中

关村环保科技示范园地锦路9号院3号

楼

(72)发明人 王世恩 江海洋 温凯 吴小平

张桂亮 金兴 杨艳红 成芳

沈星辰 邢佑尚 许舒婷 姚琳

(51)Int.Cl.

C07D 233/88(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 14/47(2006.01)

C07K 1/107(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(56)对比文件

US 4094964 A,1978.06.13,

US 4094964 A,1978.06.13,

(54)发明名称

可乐定半抗原、抗原及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种可乐定半抗原,相应的人工抗原和单克隆抗体,同时本发明也公开了所述可乐定半抗原,相应的人工抗原和单克隆抗体的制备方法及其应用。本发明提供的可乐定半抗原是式I所示产物,用式I所示产物与载体蛋白连接可以得到可乐定抗原。所述可乐定抗原可应用于制备可乐定特异性抗体。本发明制备方法简便可行、成本较低,半抗原产率较高。本发明的可乐定

Charles D. Thompson等.A Proposed Mechanism for p-Aminoclonidine Allergenicity Based on Its Relative Oxidative Lability.《Chemical Research in Toxicology》.1997,第10卷(第9期),第1032-1036页.

CHARLES D. THOMPSON等.Mechanisms of Adrenergic Agonist Induced Allergy Bioactivation and Antigen Formation.《Experimental Eye Research》.1997,第64卷(第5期),第767-773页.

M.Dontenwill等.Production and characterization of an iminoimidazolidine specific monoclonal antibody using para-aminoclonidine as antigen.《Life Sciences》.1992,第50卷(第24期),第1859-1868页.

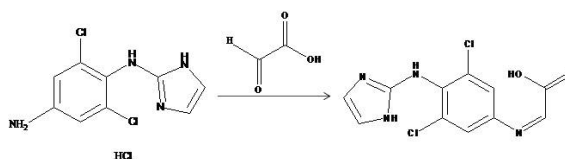
B. Ramamurthy等.Synthesis and Antitubercular Activity of N-(2-Naphthyl) glycine Hydrazid Analogues.《Journal of Medicinal Chemistry》.1989,第32卷(第11期),第2422页方案I,第2424页右栏倒数第一段.

王建华,等.小分子抗原人工合成进展.《应用化学》.2011,第28卷(第4期),第367-375页.

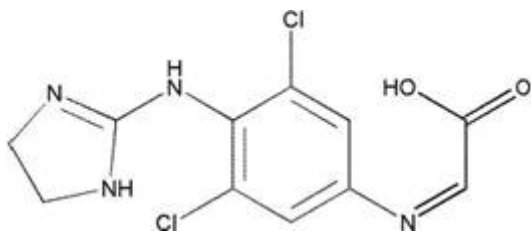
审查员 李小宏

权利要求书1页 说明书8页 附图1页

人工抗原,通过免疫动物可产生了针对可乐定的特异性抗体,可用于制备检测可乐定残留的酶联免疫检测试剂盒,具有简单、快速、处理样品量大、灵敏度高、特异性强等诸多优点。



1. 一种可乐定半抗原, 为式I所示化合物:



式I;

式I所示化合物的制备方法, 包括如下步骤:

将100mg阿可乐定和49mg乙醛酸溶于乙醇中, 室温搅拌16h, 减压浓缩, 使用制备薄层色谱分离纯化, 展开剂二氯甲烷: 甲醇 (V/V)=5:1, 得白色固体, 即为式I所示的可乐定半抗原。

2. 一种可乐定抗原, 是将权利要求1所述的式I所示化合物和载体蛋白偶联得到的偶联物。

3. 权利要求2所述可乐定抗原的制备方法, 包括如下步骤:

(1) 取权利要求1所述的式I所示化合物13mg, 溶解于2mL二甲基甲酰胺中, 磁力搅拌使其充分溶解;

(2) 取步骤1溶液, 加入17mg 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺 (EDC) 和15mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 室温活化反应2h;

(3) 称取载体蛋白50mg, 加入0.1mol/L碳酸氢钠缓冲溶液4ml, 搅拌使其充分溶解;

(4) 将活化液加入到蛋白溶液中, 室温反应过夜;

(5) 用0.01mol/L的磷酸盐缓冲液于4℃透析3d, 每天换3次透析液, 以除去未反应的小分子物质;

(6) 分装, 于-20℃保存备用。

4. 权利要求2所述可乐定抗原在制备可乐定特异性抗体中的应用。

5. 应用权利要求2所述可乐定抗原制备得到的特异性抗体。

6. 权利要求1所述可乐定半抗原、权利要求2所述可乐定抗原、权利要求5所述抗体在检测可乐定中的应用。

7. 应用权利要求1所述可乐定半抗原、权利要求2所述可乐定抗原、权利要求5所述特异性抗体制备得到的酶联免疫检测试剂盒。

8. 根据权利要求7所述的酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于包括: 包被有可乐定抗原的酶标板、酶标抗体工作液、可乐定系列标准品、底物显色液、终止液、浓缩复溶液、浓缩洗涤液。

可乐定半抗原、抗原及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种可乐定半抗原、抗原、单克隆抗体制备方法及其应用,属于生物化工领域。

背景技术

[0002] 可乐定(Clonidine)化学名称为2-[(2,6-二氯苯基)亚氨基]咪唑烷盐酸盐,别名可乐宁,氯压定,催压降,血压得平,110降压片,可乐亭,压泰生,英文别名 2,6-dichloro-N-(2-imidazolin-2-yl)aniline。分子式 $C_9H_9Cl_2N_3$;分子量:230.1。可乐定为白色结晶性粉末;无臭。在水中或乙醇中溶解,在氯仿中极微溶解,在乙醚中几乎不溶,熔点为305℃。可乐定是一种抗高血压药物,其药理作用主要为通过刺激脑干 α_2 -肾上腺受体导致交感神经从中枢神经系统的传出减少,从而降低外周阻力、肾血管阻力、心率以及血压。可乐定口服吸收迅速,约50%在肝脏代谢,代谢物为对羟基可乐定和葡萄糖醛酸酯,对羟基可乐定不能通过血脑屏障,无降压活性;20%~40%以原型和代谢物的形式从尿中排出;约20%从粪便中排出。自2006年起在国内的饲料产品中已发现有添加的趋势,分析其作用机理应与瘦肉精等 β 受体激动剂类似,以提高饲料转化率达到增重的效果。2010年4月23日北京市怀柔区的北京水岸山吧餐饮有限责任公司发生的急性集体可乐定中毒事件已经引起全社会的高度重视。目前,可乐定对动物促生长及增重的作用已有文献报道,在国内已发现将这种药物违法添加在猪饲料中,2010年12月农业部1519号公告已明确把可乐定列入了《禁止在饲料和动物饮水中使用的物质》清单,世界卫生组织、美国、欧盟及一些发达国家等都禁止违法使用可乐定。其常见的副作用有口干、瞌睡、头晕、镇静、呼吸抑制等。食用含有可乐定残留的动物源性产品,对人体健康具有一定的危害性,对儿童的作用更为明显。

[0003] 目前国内外大多采用高效液相色谱法、气相色谱法测定,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。可乐定人工抗原的制备为这一方法的实施奠定了重要基础。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就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和最关键的步骤。

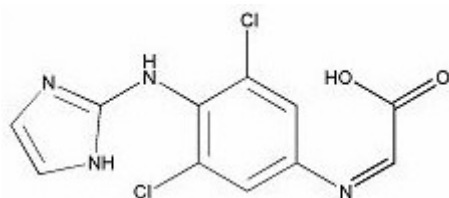
发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种可乐定人工抗原及其制备方法与应用。

[0005] 本发明所提供的可乐定人工抗原,是将可乐定半抗原与载体蛋白偶联获得的抗原。

[0006] 可乐定半抗原是一种化合物,其结构为式I所示。

[0007]



[0008] 式I

[0009] 可乐定半抗原也是属于本发明的保护范围。

[0010] 所述可乐定半抗原的合成路线示意图见图1。

[0011] 本发明还公开了式I所示产物的制备方法,包括如下步骤:

[0012] 将100mg阿可乐定和49mg乙醛酸溶于乙醇中,室温搅拌16h,减压浓缩。使用制备薄层色谱分离纯化,展开剂二氯甲烷:甲醇(V/V)=5:1,得白色固体CLD-EC0。

[0013] 本发明提供的可乐定抗原,是将式I所示产物和载体蛋白偶联得到的偶联物。

[0014] 所述可乐定抗原的结构示意图见图3。

[0015] 本发明还保护所述可乐定抗原的制备方法,包括如下步骤:

[0016] (1)取式I所示产物13mg,溶解于2mL二甲基甲酰胺中,磁力搅拌使其充分溶解;

[0017] (2)取步骤1溶液,加入17mg EDC和15mg NHS,室温活化反应2h;

[0018] (3)称取载体蛋白50mg,加入0.1mol/L碳酸氢钠缓冲溶液4ml,搅拌使其充分溶解;

[0019] (4)将活化液加入到蛋白溶液中,室温反应过夜;

[0020] (5)用0.01mol/L的磷酸盐缓冲液于4℃透析3d,每天换3次透析液,以除去未反应的小分子物质;

[0021] (6)分装,于-20℃保存备用。

[0022] 常用载体蛋白均可采用,如牛血清白蛋白(BSA),卵清蛋白(OVA),人血清白蛋白(HSA),鼠血清白蛋白(MSA),甲状腺蛋白(TG)或血蓝蛋白(KLH)等。

[0023] 所述可乐定抗原可以作为免疫原制备可乐定特异性抗体,也可以作为包被原制备酶标板。

[0024] 所述抗体具体可为单克隆抗体。

[0025] 式I所示产物、所述可乐定抗原、所述抗体均可应用于检测可乐定。

[0026] 本发明还公布了应用可乐定抗原和可乐定单克隆抗体制备得到的酶联免疫试剂盒。

[0027] 所述酶联免疫检测试剂盒,是由包被有可乐定抗原的酶标板、酶标抗体工作液、可乐定系列标准品、底物显色液、终止液、浓缩复溶液、浓缩洗涤液。

[0028] 本发明依靠免疫学、免疫化学基本原理和残留分析技术手段,设计、合成小分子目标分析物半抗原,并与载体蛋白偶联,制备有效人工抗原,免疫动物制备针对小分子分析物的特异性抗体。利用抗原抗体的特异性免疫学反应,定量的检测样本中微量小分子目标分析物,具有特异、灵敏、准确、快速、方便、廉价等特点。本发明制备方法简便可行、成本较低,半抗原产率较高。本发明克服了现有检测技术中对可乐定样品预处理复杂、耗时、且需要大量有机溶剂萃取,以及在检测过程中要用到精密昂贵的检测仪器而不适于推广使用等缺点。本发明的可乐定人工抗原,通过免疫动物可产生针对可乐定的特异性抗体,用于快速检测食品中的可乐定残留,具有简单、快速、处理样品量大、灵敏度高、特异性强等诸多优点。

附图说明

- [0029] 图1为可乐定半抗原合成路线图；
[0030] 图2为可乐定半抗原质谱图；
[0031] 图3为可乐定试剂盒标准曲线图。

具体实施方式

[0032] 以下的实施例便于更好地理解本发明，但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料，如无特殊说明，均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验，均设置三次重复实验，结果取平均值。

[0033] 实施例1、可乐定半抗原的制备和鉴定

[0034] 一、可乐定半抗原的制备

[0035] 将100mg阿可乐定和49mg乙醛酸溶于乙醇中，室温搅拌16h，减压浓缩。使用制备薄层色谱分离纯化，展开剂二氯甲烷：甲醇(V/V)=5:1，得到式1所示产物，即半抗原CLD-ECO。

[0036] 二、可乐定半抗原的鉴定

[0037] 将步骤一制备得到的可乐定半抗原进行质谱鉴定。

[0038] 质谱图见图2。MS表征结果显示-MS结果为298.9，+MS结果为301，说明半抗原合成成功。

[0039] 实施例2、可乐定人工抗原的制备和鉴定

[0040] 一、可乐定免疫抗原(CLD-BSA)的合成

[0041] (1)取式1所示产物13mg，溶解于2mL二甲基甲酰胺中，磁力搅拌使其充分溶解；

[0042] (2)取步骤1溶液，加入17mg EDC和15mg NHS，室温活化反应2h；

[0043] (3)称取牛血清白蛋白(BSA) 50mg，加入0.1mol/L碳酸氢钠缓冲溶液4ml，搅拌使其充分溶解；

[0044] (4)将活化液加入到蛋白溶液中，室温反应过夜；

[0045] (5)用0.01mol/L的磷酸盐缓冲液于4℃透析3d，每天换3次透析液，以除去未反应的小分子物质；

[0046] (6)分装，于-20℃保存备用。

[0047] 二、可乐定包被抗原(CLD-OVA)的合成

[0048] (1)取式1所示产物13mg，溶解于2mL二甲基甲酰胺中，磁力搅拌使其充分溶解；

[0049] (2)取步骤1溶液，加入17mg EDC和15mg NHS，室温活化反应2h；

[0050] (3)称取卵清蛋白(OVA) 50mg，加入0.1mol/L碳酸氢钠缓冲溶液4ml，搅拌使其充分溶解；

[0051] (4)将活化液加入到蛋白溶液中，室温反应过夜；

[0052] (5)用0.01mol/L的磷酸盐缓冲液于4℃透析3d，每天换3次透析液，以除去未反应的小分子物质；

[0053] (6)分装，于-20℃保存备用。

[0054] 三、可乐定人工抗原的鉴定

[0055] 按合成可乐定免疫抗原和包被抗原反应所用的半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例,分别进行紫外(200nm~400nm)扫描鉴定,并通过比较三者在同一波长下的吸光值计算其结合比。产物的紫外光谱图与载体蛋白相比发生了变化,说明半抗原已经与载体蛋白成功偶联制得可乐定人工抗原。经计算,可乐定半抗原分子与BSA分子的结合比为16.5:1,可乐定半抗原分子与OVA分子的结合比为12.2:1。

[0056] 实施例3、酶标单抗的制备和特异性鉴定

[0057] 一、可乐定单抗的制备

[0058] 1、用上述制备出的免疫原(CLD-BSA)按100 μ g/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100 μ g/只,不加弗氏佐剂再追加免疫一次。

[0059] 2、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 $^{\circ}$ C,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。

[0060] 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 μ g/mL的可乐定等体积混合,37 $^{\circ}$ C水浴作用30min,再加入到包被好的酶标板中。同时用PBS取代可乐定作对照,其余步骤同上。若经可乐定阻断后的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。

[0061] 4、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 $\times 10^6$ /只,7~10日后抽取小鼠腹水,离心取上清,测定效价,并冻存储用。

[0062] 二、酶标抗体的制备

[0063] (1)称取辣根过氧化物酶(HRP)2 mg溶解于0.5 mL水中,加入0.5 mL 0.06 mol/L NaIO₄溶液,4 $^{\circ}$ C避光作用30 min;

[0064] (2)加入160 mmol/L的乙二醇0.5mL,室温作用30 min;

[0065] (3)加入步骤1制备的可乐定单抗2 mg,混匀后装入处理过的透析袋中,置1000 mL的0.05 mmol/L碳酸钠缓冲液中透析,4 $^{\circ}$ C过夜;

[0066] (4)透析液吸至10 mL的离心管中,加0.25mL 5g/L的NaBH₄溶液,混匀后置4 $^{\circ}$ C 2 h;

[0067] (5)加入等体积的饱和硫酸铵溶液,4 $^{\circ}$ C作用30 min后4 $^{\circ}$ C下3000 r/min离心25 min,弃上清;

[0068] (6)将沉淀溶于1.5 mL 0.02 mol/L pH 7.4的PBS中,吸入透析袋内,在0.02mol/L pH 7.4 PBS透析,4 $^{\circ}$ C过夜(中途更换PBS 3次);

[0069] (7)将透析袋中液体吸至微量离心管中,4 $^{\circ}$ C下10000r/min离心30min,将上清液吸出,加等量甘油,混匀,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0070] 三、酶标可乐定抗体效价的测定

[0071] 可乐定标准品购自Sigma公司。

[0072] 用方阵滴定法确定可乐定包被抗原和步骤一制备的单抗的工作浓度,可乐定包被抗原的工作浓度为0.5μg/mL,单克隆抗体的工作浓度为1:10000。

[0073] 用不同浓度的可乐定标准品溶液做实验溶液,其浓度如下:0、0.2、0.6、1.8、5.4、16.2μg/L。采用8组平行试验(n=8)。间接竞争性ELISA方法:

[0074] (1)用上述工作浓度的可乐定抗原(CLD-OVA)包被酶标板,将可乐定标准品实验溶液与酶标抗体溶液同时加入酶标板微孔中,同时设置空白孔(将添加的抗体溶液换成高纯水,其它一致)和阴性对照孔(将标准品实验溶液用PBS溶液代替,其它一致),25℃避光环境中反应30min;

[0075] (2)倒出孔内液体,用洗涤液洗涤3~5次,将酶标板倒置在吸水纸上拍干;

[0076] (3)加入底物显色溶液到酶标板微孔中,25℃避光环境中反应15min;

[0077] (4)加入终止液,轻轻振荡混匀,用酶标仪在波长450nm处测定OD值。

[0078] 以OD值为纵坐标,以可乐定实验溶液浓度的log10值为横坐标,绘制半对数标准曲线图。标准曲线具有完整的反S形状,并具有上平台和下平台,标准曲线的平行测定次数8次,实验重复性良好,相对标准偏差(变异系数)均在10%以内。

[0079] 根据标准曲线得出半数抑制量(IC₅₀),确定检测灵敏度。

[0080] 抑制率用以下公式计算:

[0081]
$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min}) - (\text{OD}_x - \text{OD}_{\min})}{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min})} \times 100\%$$

[0082] 式中:OD_{max}:为不加标准品时的吸光值,OD_x为标准品x的吸光值,OD_{min}为空白对照孔的吸光值。

[0083] 由上述公式计算得可乐定抗体在缓冲液中的半数抑制量(IC₅₀)为0.78μg/L。

[0084] 实施例4、检测可乐定的酶联免疫试剂盒及其制备

[0085] 一、酶联免疫试剂盒由下述物质组成:

[0086] (1)包被可乐定半抗原(CLD-OVA)的酶标板;

[0087] (2)酶标可乐定抗体工作液:实施例3中所述酶标抗体溶液;

[0088] (3)可乐定标准品:可乐定标准品溶液浓度分别为0、0.2、0.6、1.8、5.4、16.2μg/L;

[0089] (4)底物显色液:由A液和B液组成,A液为2%过氧化脲的水溶液,B液为1%四甲基联苯胺(TMB)的水溶液;

[0090] (5)终止液:0.2M硫酸水溶液;

[0091] (6)浓缩洗涤液:每1升所述洗涤液是按照如下方法配制得到的:将10mL吐温-20、5g叠氮化钠和990mL磷酸盐缓冲液混合,得到所述洗涤液;所述磷酸盐缓冲液的浓度为0.01M, pH值为7.4;

[0092] (7)浓缩复溶液:0.04mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0093] 二、包被有CLD-OVA的酶标板及其制备

[0094] 包被CLD-OVA的聚苯乙烯酶标板:用0.05M的碳酸盐溶液将抗原稀释至0.5μg/mL,包被96孔聚苯乙烯酶标板,每孔100μL, 37℃温育2h,倾去包被液,用洗涤液洗涤3次,每次10s,拍干,然后在每孔中加入150μL封闭液,37℃温育2h,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0095] 包被缓冲液:pH9.6,0.05mol/L的碳酸钠缓冲液;

[0096] 封闭液:每1升封闭液按照如下方法配制:将5mL马血清、1g叠氮化钠、30g酪蛋白混合,用磷酸盐缓冲液溶解并定容至1000mL,得到封闭液;其中,磷酸盐缓冲液的浓度为0.02M, pH值为7.2。

[0097] 三、试剂盒检测方法

[0098] (一) 尿液样品前处理

[0099] (1) 量取尿液样本400mL至2mL聚苯乙烯离心管中,3000g离心10min;

[0100] (2) 吸取上清与样品稀释液按1:1体积混合;

[0101] (3) 取50mL混合液用于检测。

[0102] (二) 用试剂盒检测

[0103] 1、标准曲线的制作

[0104] 向包被有CLD-OVA的酶标板微孔中加入可乐定标准品溶液50 μ L,然后在每孔中加入50 μ L酶标二抗,再加入50 μ L抗体工作液,轻轻振荡混合均匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应30min。小心揭开盖板膜,倒掉板孔中液体,在每孔加入260 μ L洗涤工作液,浸泡 15-30s,重复3次,倒掉板孔内液体,将酶标板倒置于吸水纸上。立即在每孔中加入100 μ L底物A、B,轻轻振荡混匀,25℃恒温箱避光显色15min,每孔加入终止液50 μ L,轻轻振荡混匀,用酶标仪450 nm下读取酶标板吸光度值。

[0105] 用每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准品溶液(0标准)的吸光度值(B_0)再乘以100%,得到百分吸光度值。以可乐定标准品浓度(μ g/L)的半对数值为X轴,百分吸光度值为Y轴,绘制标准曲线图。得到的标准曲线如图3所示。

[0106] 2、样品中可乐定浓度的测定

[0107] 用每个检测样本溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准品溶液(0标准)的吸光度值(B_0)再乘以100%,得到百分吸光度值。相对应每一个检测样本溶液的百分吸光度值,则可从标准曲线上读出检测样本溶液的吸光度值,再根据标准品溶液的浓度值换算出样本溶液中可乐定的残留量,最后再乘以各样品前处理过程的稀释倍数,即可计算出样品中可乐定的浓度。

[0108] 四、试剂盒检测效果评价

[0109] (一) 准确度和精密度试验

[0110] 向不含可乐定的猪尿样品中添加可乐定标准品,使可乐定标准品在样品中的终浓度分别为0.5、1、2 μ g/L;将添加后的样品分别按照实验三中所述方法进行前处理,得到检测样本溶液。

[0111] 从三个不同批次的试剂盒中各抽取3个试剂盒进行检测,检测方法如实验三中所述,每个实验重复5次,分别计算变异系数。结果分别见表1。

[0112] 表1准确度和精密度试验结果

[0113]

样品 猪尿	添加浓度 (pg/L)								
	0.5			1			2		
	平均回收率	批内变异系数	批间变异系数	平均回收率	批内变异系数	批间变异系数	平均回收率	批内变异系数	批间变异系数
	85.7	7.6	10.1	93.9	6.6	8.9	107.6	7.1	9.8
	83.9	8.3		97.2	8.1		103.2	6.4	
	86.9	8.6		92.6	7.9		109.4	8.3	

[0114] 批内变异系数:同一次测定中各平行样本的变异系数。

[0115] 批间变异系数:同一样本在不同批次测定结果的变异系数。

[0116] 结果表明:猪尿样品的平均添加回收率在83.9~109.4%,批内变异系数在6.4~8.6%,批间变异系数在8.9~10.1 %。

[0117] (二) 试剂盒保存期

[0118] 试剂盒保存条件为2~8℃,经过15个月的测定,试剂盒的最大吸光度值(0标准),50%抑制浓度、可乐定添加实际测定值均在正常范围之内。考虑到运输和使用过程中,会有非正常保存条件出现,将试剂盒在37℃保存的条件下放置9天,进行加速老化实验,结果表明该试剂盒的各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生,将试剂盒放入-20℃冰箱冷冻9天,测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在2~8℃至少可以保存12个月以上。

[0119] (三) 交叉反应率试验

[0120] 选择与CLD结构或功能相似的其他药物进行交叉反应试验,通过各种药物的标准曲线分别得到其50%抑制浓度。用下式计算试剂盒对其它类似物的交叉反应率。与其他药物的交叉反应率越小,说明可乐定酶联免疫检测试剂盒对可乐定的检测特异性越好。结果见表2。

[0121]
$$\text{交叉反应率(\%)} = \frac{\text{引起 50\%抑制的可乐定浓度}}{\text{引起 50\%抑制的其他药物浓度}} \times 100\%$$

[0122] 表2 可乐定试剂盒交叉反应率

[0123]

药物名称	交叉反应率 (%)
可乐定	100.0
莫索尼定	<1.0
利美尼定	<1.0
右美托咪定	<1.0
替扎尼定	<1.0
洛非西定	<1.0

[0124] 试验结果表明,本发明试剂盒对莫索尼定、利美尼定、右美托咪定、替扎尼定、洛非

西定的交叉反应率均小于1%，所以试剂盒对可乐定的特异性好，即本发明试剂盒可以检测可乐定。

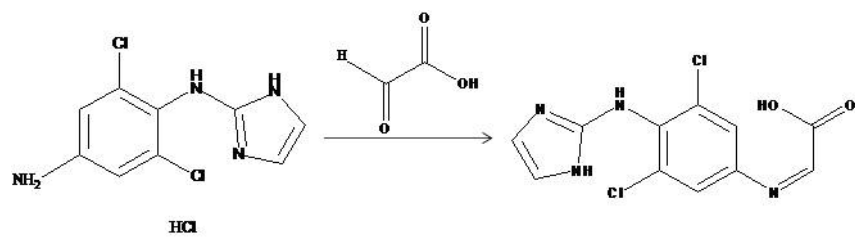


图1

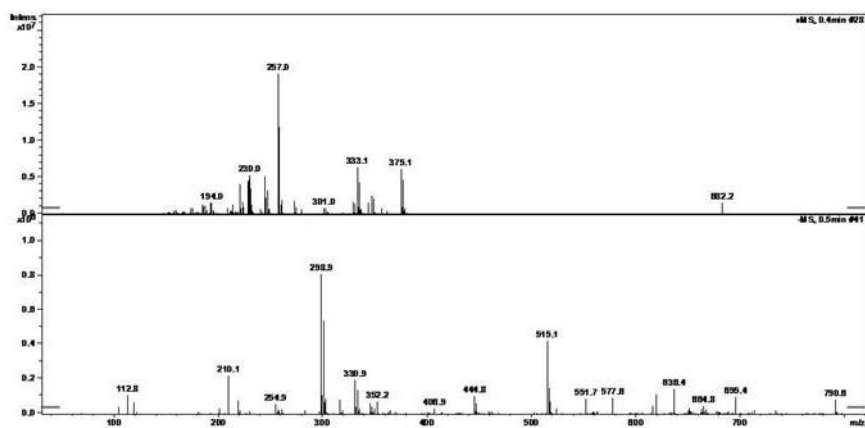


图2

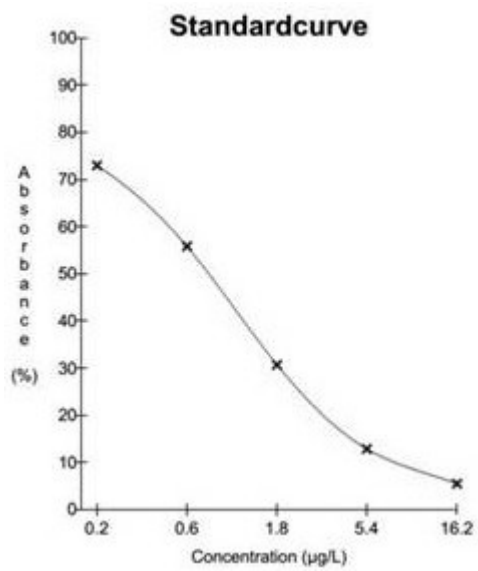


图3

专利名称(译)	可乐定半抗原、抗原及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN104788383B	公开(公告)日	2018-06-22
申请号	CN201410021591.0	申请日	2014-01-17
[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	王世恩 江海洋 温凯 吴小平 张桂亮 金兴 杨艳红 成芳 沈星辰 邢佑尚 许舒婷 姚琳		
发明人	王世恩 江海洋 温凯 吴小平 张桂亮 金兴 杨艳红 成芳 沈星辰 邢佑尚 许舒婷 姚琳		
IPC分类号	C07D233/88 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K14/47 C07K1/107 C07K16/44 G01N33/577 G01N33/531		
其他公开文献	CN104788383A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种可乐定半抗原，相应的人工抗原和单克隆抗体，同时本发明也公开了所述可乐定半抗原，相应的人工抗原和单克隆抗体的制备方法及其应用。本发明提供的可乐定半抗原是式I所示产物，用式I所示产物与载体蛋白连接可以得到可乐定抗原。所述可乐定抗原可应用于制备可乐定特异性抗体。本发明制备方法简便可行、成本较低，半抗原产率较高。本发明的可乐定人工抗原，通过免疫动物可产生了针对可乐定的特异性抗体，可用于制备检测可乐定残留的酶联免疫检测试剂盒，具有简单、快速、处理样品量大、灵敏度高、特异性强等诸多优点。

