



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106317153 A

(43) 申请公布日 2017. 01. 11

(21) 申请号 201510340100. 3

C07K 16/44(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 06. 18

G01N 33/53(2006. 01)

(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 号中
关村环保科技示范园地锦路 9 号院 3 号
楼

申请人 重庆市动物疫病预防控制中心

(72) 发明人 苏亮 胡宇莉 吴小平 苏丽芳

于书英 温凯 秦誉 王文珺

杨艳红 陈银辉

(51) Int. Cl.

C07J 5/00(2006. 01)

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/77(2006. 01)

C07K 14/795(2006. 01)

C07K 14/47(2006. 01)

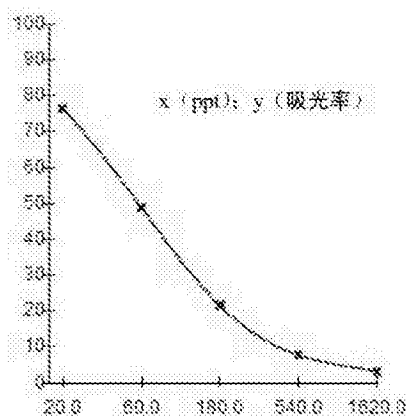
权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54) 发明名称

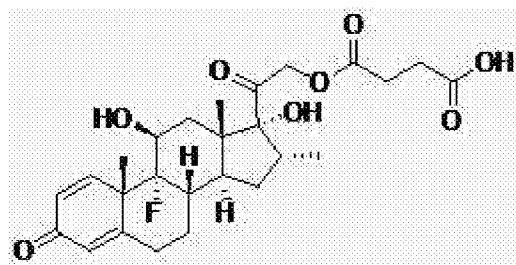
一种地塞米松半抗原制备方法及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种地塞米松半抗原和相应的人工抗原,同时本发明也公开了所述地塞米松半抗原和相应的人工抗原的制备方法及其应用。本发明提供的地塞米松半抗原是式 1 所示产物,用式 1 所示产物与载体蛋白连接可以得到地塞米松抗原。所述地塞米松抗原可应用于制备地塞米松特异性抗体。本发明制备方法简便可行、成本较低,半抗原产率较高。本发明的地塞米松人工抗原,通过免疫动物可产生了针对地塞米松的特异性抗体,可用于制备检测地塞米松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. 一种地塞米松半抗原, 为式 1 所示产物:



式 1。

2. 式 1 所示产物的制备方法, 包括如下步骤: 50ml 圆底烧瓶中加入地塞米松原料药 500mg, 5ml 吡啶溶解后加入琥珀酸酐 110mg, 80℃ 反应 3h, TLC 检测原料反应完毕后处理, 减压蒸除吡啶, 残余物中加入 10ml 冰水, 析出白色固体, 过滤, 水洗干燥得 350mg 产品, 即是半抗原。

3. 一种地塞米松抗原, 是将式 1 所示产物和载体蛋白偶联得到的偶联物。

4. 根据权利要求 3 所述的地塞米松抗原, 其特征在于, 所述载体蛋白可为牛血清白蛋白, 卵清蛋白, 人血清白蛋白, 鼠血清白蛋白, 甲状腺蛋白或血蓝蛋白。

5. 权利要求 3 所述地塞米松抗原的制备方法, 包括如下步骤: (1)、将半抗原 22mg 溶解于 1.5mL DMF 中, 完全溶解后, 依次加入 EDC 25mg, NHS 25mg, 室温磁力搅拌反应 3h; (2)、称取 50mgBSA, 溶解于 3.5mL 0.1M 碳酸缓冲液 pH=9.6 中, 400rpm 搅拌 10min, 充分溶解; (3)、取上述步骤 1 中活化溶液, 在冰水浴环境下逐滴加入到蛋白溶液中, 边加边搅拌, 室温磁力搅拌反应 24h; (4)、将反应产物装入 1 个蒸馏水冲洗干净透析袋 (15cm), 1LPBS 透析 3 天, 室温搅拌透析, 每天更换透析液 3 次, 透析产物 4500rpm 离心 6min, 0.5ml/管分装, 将抗原编号, -20℃ 保存备用。

6. 权利要求 3 所述地塞米松抗原在制备地塞米松特异性抗体中的应用。

7. 应用权利要求 3 所述地塞米松抗原制备得到的特异性抗体。

8. 权利要求 1 所述产物、权利要求 3 所述地塞米松抗原、权利要求 7 所述抗体在检测地塞米松中的应用。

9. 应用权利要求 1 所述产物、权利要求 3 所述地塞米松抗原、权利要求 7 所述特异性抗体制备得到的酶联免疫检测试剂盒。

10. 权利要求 8 所述酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于, 它包括: 包被有地塞米松抗原的酶标板、酶标抗体工作液、地塞米松系列标准品、底物显色液、终止液、浓缩复溶液、浓缩洗涤液。

一种地塞米松半抗原制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测技术领域,具体涉及一种地塞米松半抗原、抗原制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 地塞米松 (Dexamethasone, DSMS) 又名氟美松、氟甲强地松龙、德沙美松,是一种人工合成的肾上腺皮质激素。是糖皮质激素类抗炎、抗过敏药物,其药理作用主要是抗炎、抗毒、抗过敏、抗风湿,临床使用较广泛。此外,地塞米松还作为动物生长调节剂,促进动物蛋白质合成和代谢,增加产肉量,曾经被广泛应用作为家畜、家禽、使用。

[0003] 但通过长期的实验室研究发现,地塞米松可以使实验动物发生癌变和基因突变,地塞米松及其残留对人、畜均有明显的毒副作用,使用高剂量的地塞米松可导致肌肉萎缩、生长抑制等副作用。并由此推断,人类长期使用该类药物或长期食用添加该类促生长剂的家畜、家禽、同样也可发生癌变和基因突变。所以此类药物禁止在治疗和饲料中使用。

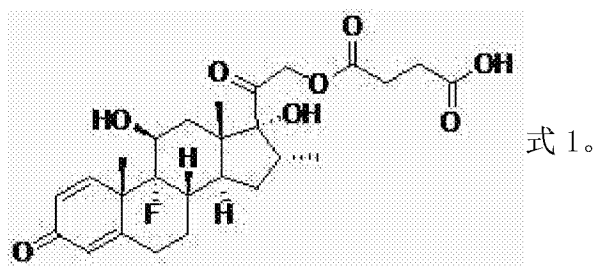
[0004] 我国于 2002 年在农业部发布的 235 号公告的《动物性食品中兽药最高残留限量》中,地塞米松在所有食品动物肌肉中不得超过 $0.75 \mu\text{g/kg}$,肝脏中不得超过 $2.0 \mu\text{g/kg}$ 。因此,为确保动物源性食品的安全和对外出口贸易的发展,建立准确可靠,灵敏度高的定性定量方法是十分必要的。

[0005] 国内外现已开发出检测地塞米松的酶联免疫试剂盒,但是现在国内生产的试剂盒在准确性、灵敏度、特异性等方面还不能完全达到检测的要求。本发明公开的地塞米松半抗原、抗原为进一步研制地塞米松抗体及地塞米松酶联免疫试剂盒提供了原料。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种地塞米松半抗原、抗原制备方法及其应用。

[0007] 本发明提供的地塞米松半抗原,是式 1 所示化合物:



[0008] 本发明还公开了式 1 所示产物的制备方法,包括如下步骤:

50ml 圆底烧瓶中加入地塞米松原料药 500mg, 5ml 吡啶溶解后加入琥珀酸酐 110mg, 80°C 反应 3h, TLC 检测原料反应完毕后处理,减压蒸除吡啶,残余物中加入 10ml 冰水,析出白色固体,过滤,水洗干燥得 350mg 产品,即是半抗原。

[0009] 本发明提供的地塞米松抗原,是将式 1 所示产物和载体蛋白偶联得到的偶联物。

[0010] 本发明还保护所述地塞米松抗原的制备方法,包括如下步骤:

(1)、将半抗原 22mg 溶解于 1.5mL DMF 中,完全溶解后,依次加入 EDC 25mg,NHS 25mg,室温磁力搅拌反应 3h;

(2)、称取 50mgBSA,溶解于 3.5mL 0.1M 碳酸缓冲液 pH=9.6 中,400rpm 搅拌 10min,充分溶解;

(3)、取上述步骤 1 中活化溶液,在冰水浴环境下逐滴加入到蛋白溶液中,边加边搅拌,室温磁力搅拌反应 24h;

(4)、将反应产物装入 1 个蒸馏水冲洗干净透析袋(15cm),1LPBS 透析 3 天,室温搅拌透析,每天更换透析液 3 次,透析产物 4500rpm 离心 6min,0.5ml/管分装,将抗原编号,-20℃ 保存备用。

[0011] 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。

[0012] 所述地塞米松抗原可以作为免疫原免疫动物制备地塞米松特异性抗体,也可以作为包被原制备酶标板。

[0013] 所述抗体具体可为单克隆抗体。

[0014] 式 1 所示产物、所述地塞米松抗原、所述抗体均可应用于检测地塞米松。

[0015] 本发明还公布了应用地塞米松抗原和地塞米松单克隆抗体制备得到的酶联免疫试剂盒。

[0016] 所述酶联免疫检测试剂盒,是由包被有地塞米松抗原的酶标板、酶标抗体工作液、地塞米松系列标准品、底物显色液、终止液、浓缩复溶液、浓缩洗涤液。

[0017] 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。本发明制备方法简便可行、成本较低,半抗原产率较高。本发明的地塞米松人工抗原,通过免疫动物可产生了针对地塞米松的特异性抗体,用于快速检测食品中的地塞米松残留。

附图说明

[0018] 图 1 为地塞米松半抗原的质谱检测结果。

[0019] 图 2 为 BSA 的质谱检测结果。

[0020] 图 3 为地塞米松抗原“地塞米松半抗原+BSA”的质谱检测结果。

[0021] 图 4 为地塞米松酶联免疫检测试剂盒标准曲线。

具体实施方式

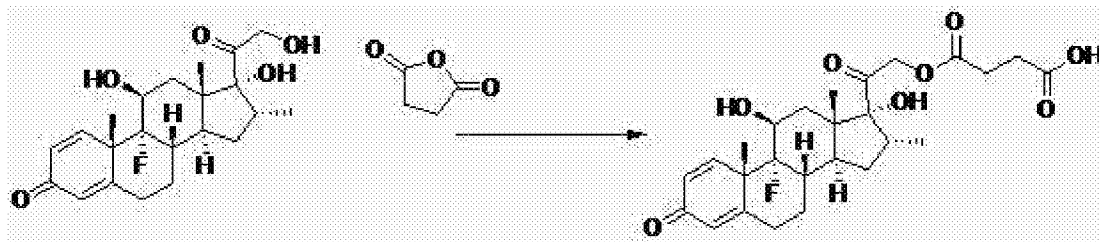
[0022] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0023] 实施例 1、地塞米松半抗原的制备

一、地塞米松半抗原的制备

50ml 圆底烧瓶中加入地塞米松原料药 500mg,5ml 吡啶 F 溶解后加入琥珀酸酐 110mg,80 度反应 3h,TLC 检测原料反应完毕后处理,减压蒸除吡啶,残余物中加入 10ml 冰水,析出白色固体,过滤,水洗干燥得 350mg 产品,即为半抗原。

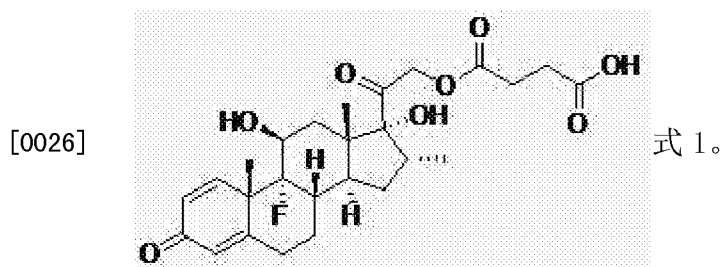
[0024] 反应方程式如下：



二、地塞米松半抗原的鉴定

对所得产品进行质谱鉴定， $-MS:M-1=491.2$ ， $+MS:M+K=531.7$ （图 1）。

[0025] 结果显示其化学结构式如式 1 所示（ $MW=492.53$ ），即为地塞米松半抗原。



[0027] 实施例 2、地塞米松人工抗原的制备和鉴定

一、地塞米松免疫抗原(DSMS-BSA)的合成

(1)、将半抗原 22mg 溶解于 1.5mL DMF 中，完全溶解后，依次加入 EDC 25mg, NHS 25mg, 室温磁力搅拌反应 3h；

(2)、称取 50mgBSA, 溶解于 3.5mL 0.1M 碳酸缓冲液 pH=9.6 中, 400rpm 搅拌 10min, 充分溶解；

(3)、取上述步骤 1 中活化溶液，在冰水浴环境下逐滴加入到蛋白溶液中，边加边搅拌，室温磁力搅拌反应 24h；

(4)、将反应产物装入 1 个蒸馏水冲洗干净透析袋(15cm)，1LPBS 透析 3 天，室温搅拌透析，每天更换透析液 3 次，透析产物 4500rpm 离心 6min, 0.5ml/管分装，将抗原编号， -20°C 保存备用。

[0028] 二、地塞米松包被抗原(DSMS-OVA)的合成

(1)、将上述半抗原 22mg 溶解于 1.5mL DMF 中，完全溶解后，依次加入 EDC 25mg, NHS 25mg, 室温磁力搅拌反应 3h。

[0029] (2)、称取 67.0mgOVA, 溶解于 3.5mL 0.1M 碳酸缓冲液 pH=9.6 中, 400rpm 搅拌 10min, 充分溶解。

[0030] (3)、取上述步骤 1 中活化溶液，在冰水浴环境下逐滴加入到蛋白溶液中，边加边搅拌，室温磁力搅拌反应 24h。

[0031] (4)、将反应产物装入 1 个蒸馏水冲洗干净透析袋(15cm)，1LPBS 透析 3 天，室温搅拌透析，每天更换透析液 3 次，透析产物 4500rpm 离心 6min, 0.5ml/管分装，将抗原编号， -20°C 保存备用。

[0032] 三、地塞米松人工抗原的鉴定

免疫原 MALDI-TOF-MS 鉴定结果显示偶联比为： $R=(\text{DMS-HS-BSA})-(\text{BSA})/492.53=(73828.009-67485.901)/492.53=12.88$ (图 2 和图 3)。即免疫原中，所述地塞

米松半抗原(式 1)与牛血清白蛋白(BSA)偶联的摩尔比为 12.88:1。

[0033] 实施例 3、酶标单抗的制备和特异性鉴定

一、地塞米松单抗的制备

1、用上述制备出的免疫原按 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。

[0034] 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。

[0035] 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 的地塞米松等体积混合,37℃水浴作用 30min,再加入到包被好的酶标板中。同时用 PBS 取代地塞米松作对照,其余步骤同上。若经地塞米松阻断后的 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。

[0036] 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。

[0037] 二、酶标抗体的制备

(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℃避光作用 30 min;

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

(3)加入步骤一制备的地塞米松单抗 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℃过夜;

(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℃ 2 h;

(5)加入等体积的饱和硫酸铵溶液,4℃作用 30 min 后 4℃下 3000 r/min 离心 25 min,弃上清;

(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℃过夜(中途更换 PBS 3 次);

(7)将透析袋中液体吸至微量离心管中,4℃下 10000r/min 离心 30min,将上清液吸出,加等量甘油,混匀,-20℃保存备用。

[0038] 三、酶标地塞米松抗体效价的测定

地塞米松标准品购自 Sigma 公司。

[0039] 用方阵滴定法确定地塞米松包被抗原和步骤一制备的单抗的工作浓度,地塞米松包被抗原的工作浓度为 1.5 μ g/mL,单克隆抗体的工作浓度为 1:50000。

[0040] 用不同浓度的地塞米松标准品溶液做实验溶液,其浓度如下:0、0.02、0.06、0.18、0.54、1.62 $\mu\text{g/L}$ 。采用8组平行试验($n=8$)。间接竞争性ELISA方法:

(1) 用上述工作浓度的地塞米松抗原包被酶标板,将地塞米松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;

(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;

(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;

(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。

[0041] 以OD值为纵坐标,以地塞米松实验溶液浓度的 $\log_{10}$ 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。

[0042] 根据标准曲线得出半数抑制量($1C_{50}$),确定检测灵敏度。

[0043] 抑制率用以下式计算:

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

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

[0044] 由上述公式计算得地塞米松抗体在缓冲液中的半数抑制量($1C_{50}$)为0.06 $\mu\text{g/L}$ 。

[0045] 实施例4、检测地塞米松的酶联免疫试剂盒及其制备

一、酶联免疫试剂盒由下述物质组成:

(1) 包被地塞米松半抗原的酶标板;

(2) 酶标地塞米松抗体工作液:实施例3中所述酶标抗体溶液;

(3) 地塞米松标准品:地塞米松标准品溶液浓度分别为0、0.02、0.06、0.18、0.54、1.62 $\mu\text{g/L}$;

(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;

(5) 终止液:0.2M硫酸水溶液;

(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;

(7) 浓缩复溶液:0.04mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0046] 二、包被有DSMS-OVA的酶标板及其制备

包被DSMS-OVA的聚苯乙烯酶标板:用0.05M的碳酸盐溶液将抗原稀释至1.5 $\mu\text{g/mL}$,包被96孔聚苯乙烯酶标板,每孔100 μL ,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150 μL 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。

[0047] 包被缓冲液:pH9.6,0.05mol/L的碳酸钠缓冲液;

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。

[0048] 三、试剂盒检测方法

(一) 样品前处理

(1) 鸡肉、鸭肉(稀释系数:4)

a) 准确称取 1 ± 0.01 g 样品于 50 mL 离心管中;b) 鸡肉样本:加入 3 mL 鸡肉样品提取液;鸭肉样本:加入 3 mL 鸭肉样品提取液;c) 充分涡动 1 min;

(注:须涡动至组织完全分散!)d) 4000 g 离心 10 min;e) 取 50 mL 上清液进行检测;

(2) 原奶、还原乳(稀释系数:5)

a) 还原乳:准确称取 1 ± 0.01 g 新鲜奶粉于 50 mL 离心管中,加入 10mL 去离子水充分涡动溶解备用;b) 取 200 mL 混匀样品于离心管中;c) 加入 200 mL 原奶提取液和 600 mL 15% 甲醇水溶液,充分涡动 30 s;d) 取 50 mL 进行检测。

[0049] (3) 猪肉(稀释系数:10)

a) 准确称取 1 ± 0.01 g 样品于 50 mL 离心管中,加入 9 mL 猪肉样品提取液,充分涡动 1 min;b) 4000 g 离心 10 min;c) 取 50 mL 进行检测。

[0050] (4) 猪肝、鸡肝(稀释系数:5)

a) 准确称取 1 ± 0.01 g 新鲜样品于 50mL 离心管中,加入 1 mL 肝脏样品提取液,充分涡动至组织分散;b) 猪肝样品:加入 5 mL 猪肝样品提取液;鸡肝样品:加入 5 mL 鸡肝样品提取液;c) 高速涡动 1 min;d) 4000 g 离心 10 min;

e) 取 1 mL 上清液于 4 mL 离心管中;f) 50-60℃水浴中氮气吹干;g) 依次加入 2 mL 正己烷、1 mL 肝脏样品稀释液,高速涡动 1 min;h) 4000 g 离心 5 min;i) 去除上层正己烷及中间层杂质;j) 取 50 mL 进行检测。

[0051] (二) 用试剂盒检测

1、标准曲线的制作

向包被有 DSMS-OVA 的酶标板微孔中加入地塞米松标准品溶液 50 μ L,然后加入酶标抗体工作液 100 μ L/孔,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,将孔内液体甩干,加入洗涤工作液 250mL/孔,充分洗涤 4~5 次,每次间隔 10s,拨掉板孔内洗涤液,用吸水纸拍干。加入底物 A 液 50 μ L/孔、底物 B 液 50 μ L/孔,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,测定每孔吸光度值。

[0052] 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。以地塞米松标准品浓度 (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 4 所示。

[0053] 百分吸光度值 (%) = $(B/B_0) \times 100\%$

2、样品中地塞米松浓度的测定

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

液中地塞米松的残留量,最后再乘以各样品前处理过程的稀释倍数,即可计算出样品中地塞米松的浓度。

[0054] 四、试剂盒检测效果评价

(一) 准确度和精密度试验

向不含地塞米松的原奶样品中添加地塞米松标准品,使地塞米松标准品在样品中的终浓度分别为 0.1、0.2、0.4 $\mu\text{g/L}$;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。

[0055] 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。

[0056] 表 1 准确度和精密度试验结果

样 品	添加浓度 ($\mu\text{g/L}$)								
	0.1			0.2			0.4		
	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
原 奶	88.7	11.6	10.1	93.9	13.6	9.9	91.8	11.0	9.8
	96.9	7.3		91.2	9.1		97.3	6.4	
	86.9	9.4		92.6	7.9		95.1	12.5	

批内变异系数:同一次测定中各平行样本的变异系数。

[0057] 批间变异系数:同一样本在不同批次测定结果的变异系数,取其平均值。

[0058] 结果表明:原奶样品的平均添加回收率在 86.9~97.3%,批内变异系数在 6.4~13.6%,批间变异系数在 9.8~10.1%。

[0059] (二) 试剂盒保存期

试剂盒保存条件为 2~8 $^{\circ}\text{C}$,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、地塞米松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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 至少可以保存 12 个月以上。

[0060] (三) 交叉反应率试验

选择与 DSMS 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,说明地塞米松酶联免疫检测试剂盒对地塞米松的检测特异性越好。结果见表 2。

[0061] 引起 50%抑制的地塞米松浓度

$$\text{交叉反应率}(\%) = \frac{\text{引起 50\% 抑制的地塞米松浓度}}{\text{引起 50\% 抑制的其他药物浓度}} \times 100\%$$

表 2 地塞米松试剂盒交叉反应率

药物名称	交叉反应率 (%)
地塞米松	100.0
曲安西龙	52
泼尼松龙	14
倍他米松	24
氢化可的松	1.5

试验结果表明,本发明试剂盒对地塞米松的交叉反应率为 100%、曲安西龙的交叉反应率为 52%、泼尼松龙的交叉反应率为 14%、倍他米松的交叉反应率为 24%、氢化可的松的交叉反应率为 1.5%,所以试剂盒对地塞米松的特异性好,即本发明试剂盒可以检测地塞米松。

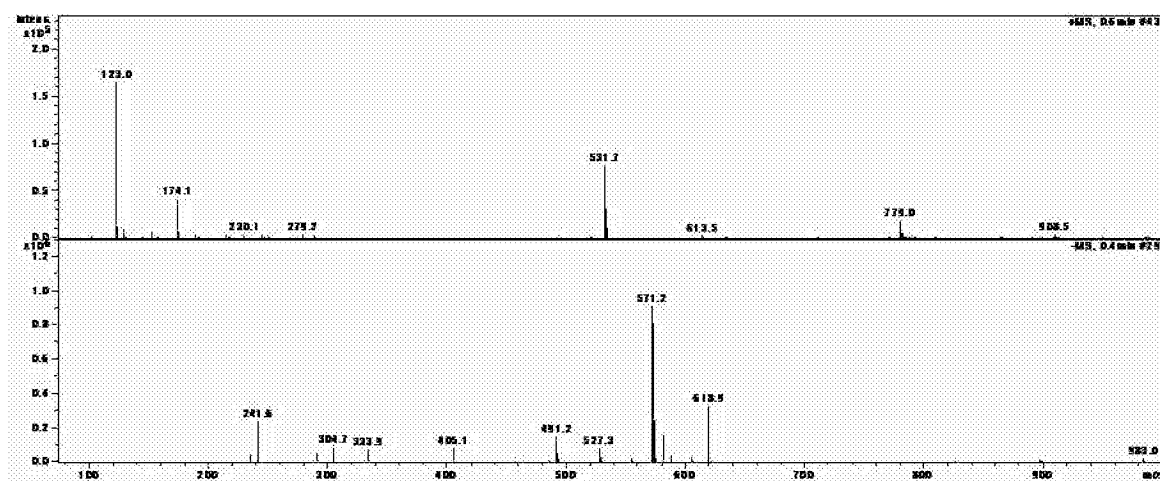


图 1

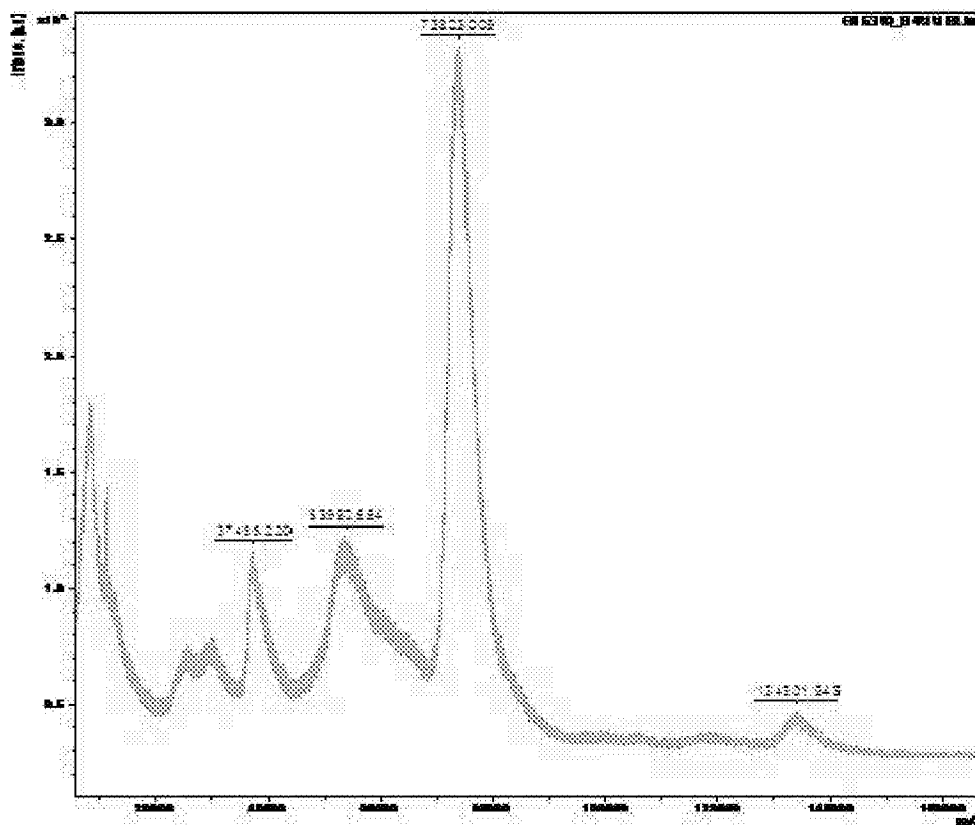


图 2

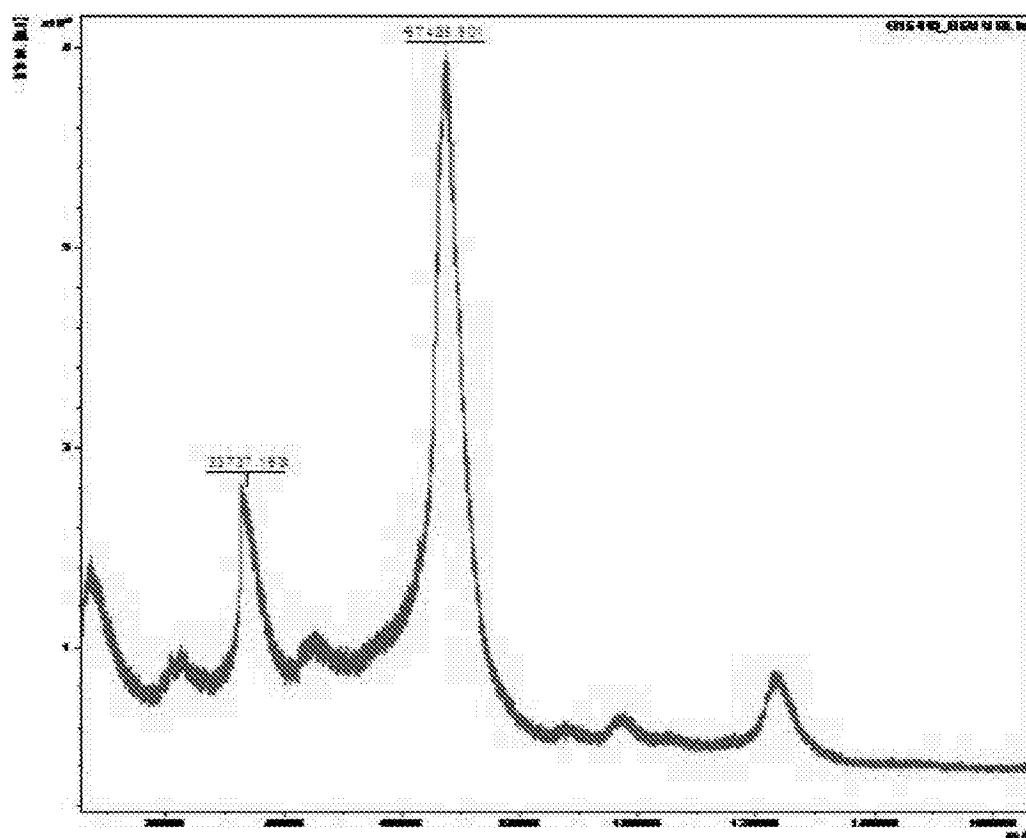


图 3

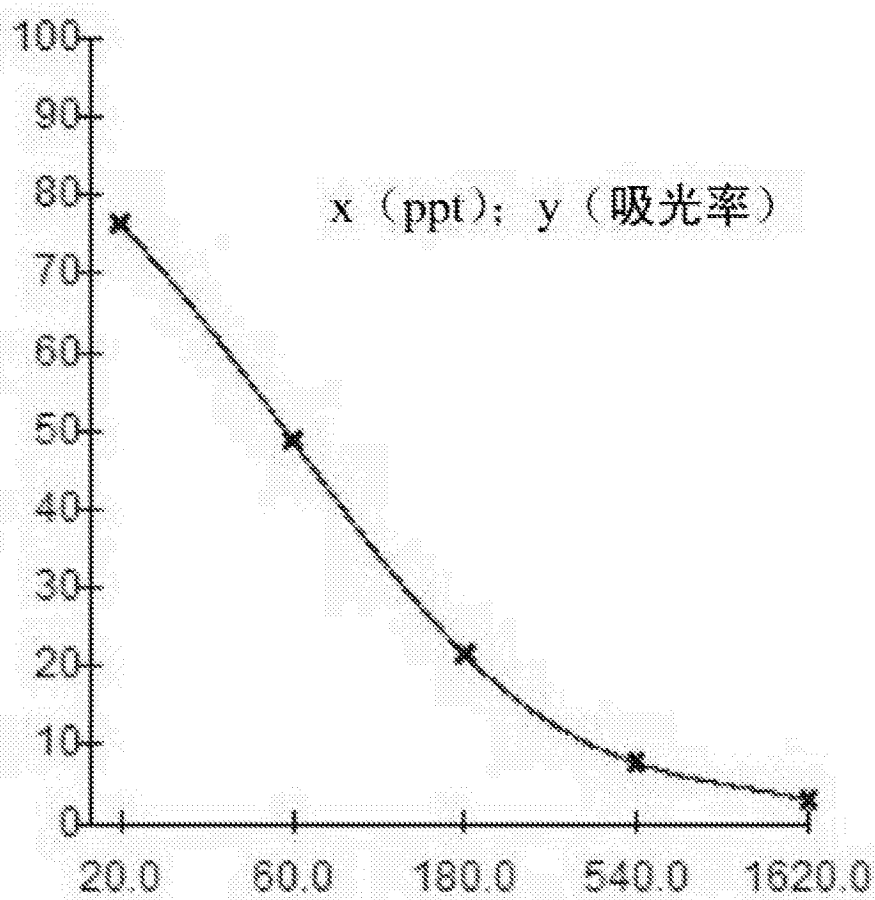


图 4

专利名称(译)	一种地塞米松半抗原制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN106317153A	公开(公告)日	2017-01-11
申请号	CN201510340100.3	申请日	2015-06-18
[标]申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司 重庆市动物疫病预防控制中心		
申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司 重庆市动物疫病预防控制中心		
当前申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司 重庆市动物疫病预防控制中心		
[标]发明人	苏亮 胡宇莉 吴小平 苏丽芳 于书英 温凯 秦誉 王文璐 杨艳红 陈银辉		
发明人	苏亮 胡宇莉 吴小平 苏丽芳 于书英 温凯 秦誉 王文璐 杨艳红 陈银辉		
IPC分类号	C07J5/00 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K14/47 C07K16/44 G01N33/53		
其他公开文献	CN106317153B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种地塞米松半抗原和相应的人工抗原，同时本发明也公开了所述地塞米松半抗原和相应的人工抗原的制备方法及其应用。本发明提供的地塞米松半抗原是式1所示产物，用式1所示产物与载体蛋白连接可以得到地塞米松抗原。所述地塞米松抗原可应用于制备地塞米松特异性抗体。本发明制备方法简便可行、成本较低，半抗原产率较高。本发明的地塞米松人工抗原，通过免疫动物可产生了针对地塞米松的特异性抗体，可用于制备检测地塞米松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。

