



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103360328 B

(45) 授权公告日 2015. 12. 02

(21) 申请号 201310326004. 4

(22) 申请日 2013. 07. 30

(73) 专利权人 中国农业大学

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路 2 号

(72) 发明人 沈建忠 程林丽 王战辉 张素霞
高海祥

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

C07D 241/42(2006. 01)

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 16/44(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 103145631 A, 2013. 06. 12, 说明书第
[0044]—[0047] 段.

CN 102766213 A, 2012. 11. 07, 全文.

CN 102675455 A, 2012. 09. 19, 全文.

CN 102659693 A, 2012. 09. 12, 全文.

CN 102608316 A, 2012. 07. 25, 全文.

CN 101597266 A, 2009. 12. 09, 全文.

CN 101407501 A, 2009. 04. 15, 全文.

WO 2006047450 A2, 2006. 05. 04, 全文.

US 20040170634 A1, 2004. 09. 02, 全文.

US 4022878 A, 1977. 05. 10, 全文.

Anupama Ranganathan, 等. Indirect Homologous Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of a Class of Glycosylated Dihydrochalcones. 《J. Agric. Food Chem.》. 2013, 第 61 卷 (第 28 期), 第 6964-6970 页.

曹娟, 等. 脱二氧喹烯酮多克隆抗体的制备及其直接竞争 ELISA 检测方法的建立. 《化学与生物工程》. 2012, 第 29 卷 (第 7 期), 第 81-85 页.

戴述诚, 等. 喹烯酮合成方法的改进. 《中国兽药杂志》. 2005, 第 39 卷 (第 10 期), 第 42-43 页.

张丽芳, 等. 薄层色谱法监测脱二氧喹烯酮的合成. 《化学世界》. 2006, (第 05 期), 第 269-270 页.

赵晓丽, 等. 喹烯酮合成方法的研究. 《兽药与饲料添加剂》. 2008, 第 13 卷 (第 03 期), 第 4-5 页.

晁博. 喹烯酮残留标示物的 ELISA 检测方法研究及半抗原设计与合成. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库 农业科技辑》. 2006, 第 5-28 页.

审查员 陈昊

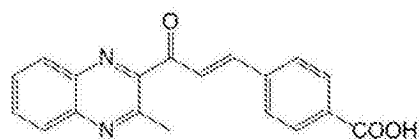
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种脱二氧喹烯酮半抗原及其制备方法和其应用

(57) 摘要

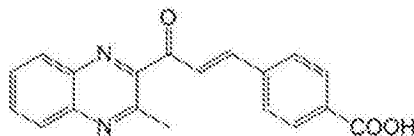
本发明公开了一种脱二氧喹烯酮半抗原及其制备方法和其应用。该脱二氧喹烯酮半抗原的结构式如式 I 所示:



式 (I)

氧喹烯酮半抗原在偶联蛋白后免疫动物, 可获得针对脱二氧喹烯酮的特异性抗体, 该抗体可用于快速检测动物性产品中脱二氧喹烯酮的残留。本发明提供的脱二氧喹烯酮半抗原为建立快速、简便、价廉、灵敏、特异的脱二氧喹烯酮的筛选方法提供了新的物质基础。

1. 一种脱二氧喹烯酮类化合物,其化学结构如式 I 所示:



式 I。

2. 权利要求 1 所述脱二氧喹烯酮类化合物的制备方法,包括下述步骤 (1) 和 (2):

(1) 将乙酰甲喹和低亚硫酸钠于 60℃ 反应 2 小时,即得 3- 甲基 -2- 乙酰喹噁啉;所述乙酰甲喹和低亚硫酸钠的摩尔比为 1:1.8;

(2) 将 3- 甲基 -2- 乙酰喹噁啉和对甲酰苯甲酸在碱催化剂作用下,于 40℃ 反应 12h,再室温反应过夜,即得脱二氧喹烯酮类化合物;所述 3- 甲基 -2- 乙酰喹噁啉和对甲酰苯甲酸的摩尔比为 1:1.2。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于:所述步骤 (1) 中,所述反应在溶剂中进行,所述溶剂为四氢呋喃、100% 乙醇和蒸馏水的混合溶剂,所述四氢呋喃、100% 乙醇和蒸馏水的体积比为 2:10:1;所述步骤 (2) 中,所述反应在溶剂中进行,所述溶剂为四氢呋喃、乙醇和水的混合物;所述步骤 (2) 中,所述碱催化剂为氢氧化钠。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的方法,其特征在于:所述步骤 (1) 中,所述反应完毕后还包括浓缩过程和纯化过程。

5. 根据权利要求 2 或 3 所述的方法,其特征在于:所述步骤 (2) 中,所述反应完毕后还包括纯化过程。

6. 权利要求 1 所述脱二氧喹烯酮类化合物作为半抗原的用途。

7. 权利要求 1 所述脱二氧喹烯酮类化合物在检测脱二氧喹烯酮中的用途。

8. 权利要求 1 所述脱二氧喹烯酮类化合物在制备检测脱二氧喹烯酮产品中的用途。

9. 一种抗原,为权利要求 1 所述脱二氧喹烯酮类化合物与牛血清白蛋白的偶联物。

10. 一种多克隆抗体,所述多克隆抗体是将权利要求 1 所述脱二氧喹烯酮类化合物与牛血清蛋白的偶联物作为抗原免疫动物后获得的。

11. 一种特异性检测脱二氧喹烯酮的试剂盒,所述试剂盒包括下述 1)-9):

1) 碳酸盐缓冲液:

Na_2CO_3 1.59g/L

NaHCO_3 2.93g/L

溶剂为蒸馏水;

2) 将权利要求 1 所述脱二氧喹烯酮类化合物与卵清蛋白的偶联物作为包被抗原;

3) 封闭液:

小牛血清 50 ml/L

蔗糖	50g/L
酪蛋白	2.5g/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	5.8g/L
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.593g/L
Proclin 300	300 μL /L

溶剂为蒸馏水；

4) 磷酸盐缓冲液：

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.12g/L

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.76g/L

溶剂为蒸馏水；

5) HRP-羊抗兔 IgG；

6) 底物缓冲液：

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 36.8g/L

柠檬酸 9.33g/L

溶剂为蒸馏水；

7) 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺溶液：

TMB 96.15 mg/L

乙二醇 38.46 mL/L

质量分数为 30% 的过氧化氢 961 μL /L

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 35.4 g/L

柠檬酸 8.97 g/L

溶剂为蒸馏水；

8) H_2SO_4 溶液：

质量分数为 98% 的浓硫酸 2mol/L

溶剂为蒸馏水；

9) 将权利要求 1 所述脱二氧喹烯酮类化合物与牛血清蛋白的偶联物作为抗原免疫动物后获得的多克隆抗体。

一种脱二氧喹烯酮半抗原及其制备方法和其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物化工技术领域,具体涉及一种脱二氧喹烯酮半抗原及其制备方法和其应用。

背景技术

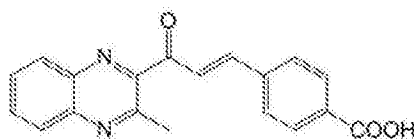
[0002] 喹烯酮 (Quinocetone) 分子式 $C_{18}H_{14}N_2O_3$, 属喹噁啉类药物, 是中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所研制的畜禽抗菌、止泻、促生长新药, 是我国在国际上首创的一类新兽药。该类药物对多种肠道致病菌 (特别是革兰氏阴性菌) 有抑制作用, 可明显降低畜禽腹泻发生率, 促进生长并提高饲料转化率。目前包括我国在内的许多国家和地区都广泛用作动物饲料添加剂。喹烯酮在畜牧业上广泛使用的同时, 由于畜牧业生产者不熟悉药物的理化性质和药理毒理特点, 存在一定的滥用情况, 导致畜产品中喹烯酮及其主要代谢产物脱二氧喹烯酮残留超标, 对人们的身体健康造成严重的潜在威胁。同时由于动物性产品具有不易储存、易变质等特点, 为了保障消费者的身体健康, 迫切需要建立一种快速、简便、价廉、灵敏、特异的喹烯酮及其主要代谢产物脱二氧喹烯酮的筛选方法。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种脱二氧喹烯酮半抗原及其制备方法和其应用。

[0004] 本发明提供的脱二氧喹烯酮半抗原具有式 I 所示的化学结构:

[0005]



式 (I)

[0006] 本发明提供的脱二氧喹烯酮半抗原的制备方法, 包括下述步骤 (1) 和 (2):

[0007] (1) 将乙酰甲喹和低亚硫酸钠于 60°C 反应 2 小时, 即得 3-甲基-2-乙酰喹噁啉; 所述乙酰甲喹和低亚硫酸钠的摩尔比为 1:1.8;

[0008] (2) 将 3-甲基-2-乙酰喹噁啉和对甲酰苯甲酸在碱催化剂作用下, 于 40°C 反应 12h, 再室温反应过夜, 即得脱二氧喹烯酮半抗原; 所述 3-甲基-2-乙酰喹噁啉和对甲酰苯甲酸的摩尔比为 1:1.2。

[0009] 所述步骤 (1) 中, 需要先将乙酰甲喹在所述溶剂中溶解, 再加入低亚硫酸钠。

[0010] 所述溶解为加热溶解; 具体为 30°C 加热溶解。

[0011] 所述步骤 (2) 中, 所述室温具体为 $25-27^{\circ}\text{C}$; 所述反应过夜具体为反应 12-14 小时。

[0012] 所述步骤 (1) 中, 所述反应在溶剂中进行, 所述溶剂为四氢呋喃、100% 乙醇和蒸馏水的混合溶剂, 所述四氢呋喃、100% 乙醇和蒸馏水的体积比为 2:10:1; 所述步骤 (2) 中, 所述反应在溶剂中进行, 所述溶剂为四氢呋喃、乙醇和水的混合物; 所述步骤 (2) 中, 所述碱

催化剂为氢氧化钠。

[0013] 所述步骤(1)中,所述反应完毕后还包括浓缩过程和纯化过程。

[0014] 所述浓缩过程具体为于 0.1MP、50℃条件下旋转蒸发移除所述溶剂。

[0015] 所述纯化过程具体为用蒸馏水和三氯甲烷萃取,干燥合并的有机相,移除溶剂即得。

[0016] 所述纯化过程中,所述蒸馏水和三氯甲烷的体积比为 4:9;所述萃取具体为 3 次;所述干燥具体为用无水硫酸钠干燥。

[0017] 所述步骤(2)中,所述反应完毕后还包括纯化过程。

[0018] 所述纯化过程具体为过滤、产物依次用热乙醇和热丙酮清洗、干燥即得。

[0019] 所述纯化过程中,所述热乙醇和热丙酮指 35℃的乙醇和丙酮;所述热乙醇和热丙酮的体积数分各为 50ml;所述清洗具体为清洗 3 次;所述干燥具体为用无水硫酸钠干燥。

[0020] 本发明提供的脱二氧喹烯酮半抗原或由所述方法直接得到的脱二氧喹烯酮半抗原作为半抗原的用途。

[0021] 所述用途中,所述作为半抗原的用途具体指用所述半抗原偶联蛋白后免疫动物,可获得针对喹烯酮代谢产物的特异性抗体;所述喹烯酮代谢产物具体指脱二氧喹烯酮。

[0022] 本发明提供的脱二氧喹烯酮半抗原或由所述方法直接得到的脱二氧喹烯酮半抗原在检测脱二氧喹烯酮中的用途。

[0023] 本发明提供的脱二氧喹烯酮半抗原或由所述方法直接得到的脱二氧喹烯酮半抗原在制备检测脱二氧喹烯酮产品中的用途。

[0024] 本发明的另一个目的是提供一种抗原,为所述脱二氧喹烯酮半抗原或由所述方法直接得到的脱二氧喹烯酮半抗原与牛血清白蛋白的偶联物。

[0025] 本发明的还一个目的是提供一种多克隆抗体,所述多克隆抗体是将所述脱二氧喹烯酮半抗原或由所述方法直接得到的脱二氧喹烯酮半抗原与牛血清蛋白的偶联物作为抗原免疫动物后获得的。

[0026] 本发明的再一个目的是提供一种特异性检测脱二氧喹烯酮的试剂盒,所述试剂盒包括下述 1)-9):

[0027] 1) 碳酸盐缓冲液:

[0028] Na_2CO_3 1.59g/L

[0029] NaHCO_3 2.93g/L

[0030] 溶剂为蒸馏水;

[0031] 2)将权利要求 1 所述脱二氧喹烯酮半抗原或由权利要求 2-5 任意所述方法直接得到的脱二氧喹烯酮半抗原与卵清蛋白的偶联物作为包被抗原;

[0032] 3) 封闭液:

[0033] 小牛血清 50ml/L

[0034] 蔗糖 50g/L

[0035] 酪蛋白 2.5g/L

[0036] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.8g/L

[0037] $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.593g/L

[0038] Proclin300 300 μl /L

- [0039] 溶剂为蒸馏水；
- [0040] 4) 磷酸盐缓冲液：
- [0041] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.12g/L
- [0042] $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.76g/L
- [0043] 溶剂为蒸馏水；
- [0044] 5) HRP- 羊抗兔 IgG；
- [0045] 6) 底物缓冲液：
- [0046] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 36.8g/L
- [0047] 柠檬酸 9.33g/L
- [0048] 溶剂为蒸馏水；
- [0049] 7) 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺溶液：
- [0050] TMB 96.15mg/L
- [0051] 乙二醇 38.46mL/L
- [0052] 质量分数为 30% 的过氧化氢 961 $\mu\text{L/L}$
- [0053] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 35.4g/L
- [0054] 柠檬酸 8.97g/L
- [0055] 溶剂为蒸馏水；
- [0056] 8) H_2SO_4 溶液：
- [0057] 质量分数为 98% 的浓硫酸 2mol/L
- [0058] 溶剂为蒸馏水；
- [0059] 9) 将权利要求 1 所述脱二氧喹烯酮半抗原或由权利要求 2-5 任意所述方法直接得到的脱二氧喹烯酮半抗原与牛血清蛋白的偶联物作为抗原免疫动物后获得的多克隆抗体。
- [0060] 本发明的脱二氧喹烯酮半抗原合成方法简单, 纯度和产率高, 可以直接与蛋白偶联后免疫动物产生针对脱二氧喹烯酮的特异性抗体, 该抗体可用于快速检测动物性产品中脱二氧喹烯酮的残留。

附图说明

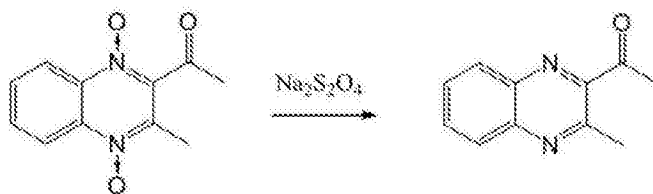
- [0061] 图 1 为脱二氧喹烯酮半抗原的化学结构图。
- [0062] 图 2 为脱二氧喹烯酮半抗原的质谱图。
- [0063] 图 3 为脱二氧喹烯酮半抗原的核磁谱图。

具体实施方式

- [0064] 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。
- [0065] 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。
- [0066] 下述实施例中所用的溶剂均为分析纯级别的试剂。
- [0067] 实施例 1、脱二氧喹烯酮半抗原的合成
- [0068] 脱二氧喹烯酮半抗原的化学结构式见图 1, 化学名称为 2- (3- (4- 羧苯基) 丙烯酰) -3- 甲基喹噁啉, 其合成过程如下所述。
- [0069] (一) 脱二氧反应

[0070] 乙酰甲喹脱二氧后生成 3-甲基-2-乙酰喹啉，反应式如下所示：

[0071]



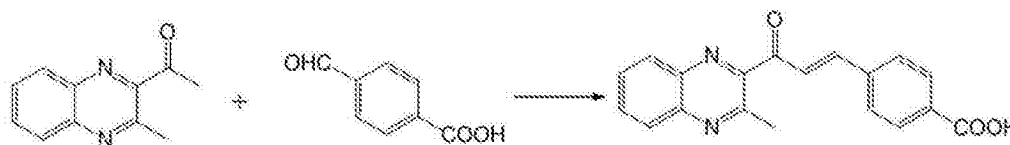
[0072] 脱二氧反应的具体过程为：

[0073] 称取 10g 乙酰甲喹，加入 40mL 四氢呋喃，200mL 无水乙醇，20mL 蒸馏水，在 30℃ 下搅拌加热溶解，加入 9g 低亚硫酸钠，保持溶液温度在 60℃，反应 2 小时后冷却至室温 (25-27℃)；0.1MP 左右和 50℃ 条件下旋转蒸发至 20mL 左右，加入 40mL 蒸馏水，用 90mL 三氯甲烷萃取三次，合并有机相；用无水硫酸钠干燥有机相后抽滤得到滤液，0.1MP 左右和 50℃ 条件下旋转蒸发至干，得到 7.8g 黄褐色 3-甲基-2-乙酰喹啉粗品，备用。

[0074] (二) 间隔臂的形成反应

[0075] 间隔臂的形成反应的反应式如下所示：

[0076]



[0077] 脱二氧喹烯酮半抗原的合成具体过程为：

[0078] 在一个 500mL 的圆底烧瓶中加入 3-甲基-2-乙酰喹啉 7.8g、对甲酰基苯甲酸 (购自力德士化工公司) 5.3g 和氢氧化钠 0.9g，于 100mL 无水乙醇中搅拌、加热升温到 40℃，反应 12h，然后室温 (25-27℃) 下反应过夜，即反应 12 小时。

[0079] 将反应液抽滤后，将抽滤漏斗中的混合物依次用 35℃ 无水乙醇和 35℃ 丙酮各清洗 3 遍，每遍使用的溶剂量为 50mL；将在抽滤漏斗中清洗完的产物转移至圆底烧瓶中，再经无水硫酸钠 (干燥时无水硫酸钠不与产物混合或接触) 干燥 6 小时后，移开无水硫酸钠，将转入抽滤漏斗中的液固混合物抽滤，抽滤漏斗中所得黄色块状产物即脱二氧喹烯酮半抗原，收率 59% (计算公式如下)。所得脱二氧喹烯酮半抗原可直接与蛋白偶联后免疫动物产生针对喹烯酮主要代谢产物脱二氧喹烯酮的特异性抗体。

[0080] 产率计算公式：

[0081] (1) 产率 = 半抗原的实际质量 / 半抗原的理论质量 $\times 100\%$

[0082] (2) 半抗原的理论质量 = 反应物乙酰甲喹的质量 $\times 318/219$

[0083] 说明：318 为半抗原的摩尔质量；219 为乙酰甲喹的摩尔质量。

[0084] (三) 脱二氧喹烯酮半抗原的鉴定

[0085] 1、质谱鉴定

[0086] 质谱鉴定结果见图 2。图 2 中 m/z 319 的峰为合成产物的准分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 m/z 291 峰可能为合成的产物的准分子离子经分子重排后失去羰基后获得的碎片离子。 m/z 273 峰可能为合成的产物分子失去 $-\text{COOH}$ 形成的碎片离子。 m/z 143 峰为合成的产物分子离子侧链断裂产生的碎片离子。因此，图 2 结果表明上述方法合成的化合物即为图 1 所示的化

合物。

[0087] 2、核磁共振鉴定

[0088] 磁共振鉴定结果见图 3。由图 3 得脱二氧喹烯酮半抗原的核磁数据为：¹H NMR：
d₆-DMSO δ :2.87(3H, s), 7.99(8H, m), 8.21(1H, d), 8.23(1H, d), 13.16(1H, s)。核磁数据表明上述方法合成的化合物即为图 1 所示的化合物。

[0089] 实施例 2、脱二氧喹烯酮半抗原的应用

[0090] (一) 脱二氧喹烯酮抗原的制备

[0091] 以 N-羟基琥珀酰亚胺法合成脱二氧喹烯酮半抗原与牛血清蛋白的偶联物作为抗原。其原理为：上述半抗原上的活性羧基与 N-羟基琥珀酰亚胺反应生成酸酐中间体，活化羧基，与蛋白质分子中的氨基反应生成酰胺键而合成免疫原。

[0092] 具体步骤为：称取脱二氧喹烯酮半抗原 15mg，用 N,N-二甲基甲酰胺 4mL 溶解，接着依次加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 50mg 和 N-羟基琥珀酰亚胺 50mg，室温下磁力搅拌 1 小时。称取 10mg 牛血清蛋白溶于 1mL 水中。将牛血清蛋白溶液缓缓加入脱二氧喹烯酮半抗原反应混合液中，磁力搅拌 6 小时。将混合物装入透析袋中，在磷酸盐缓冲液(0.01mol/L, pH7.4)中透析 6 天，每天早晚换透析液。将透析后的产物在 25-27℃ 下 3500r/min 离心 5min。取上清，采用紫外分光光度计法测得其蛋白浓度为 35mg/mL，分装，置于 -20℃ 保存。

[0093] 透析所用磷酸盐缓冲液(pH7.4)的组成成分及含量为：

[0094] Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9g

[0095] NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.59g

[0096] NaCl 8.5g

[0097] KCl 0.2g

[0098] 蒸馏水 1000mL

[0099] (二) 脱二氧喹烯酮多克隆抗体的制备

[0100] 选取 3 只 7 周龄的新西兰大白兔为试验对象。用 0.15mol/L 的氯化钠溶液将上述制备的抗原稀释成 1mg/mL (以载体蛋白计)。取稀释后的抗原 1mL，加入等量弗氏完全佐剂制成乳化剂，在家兔的背部皮内多点注射进行首免。2 周后，取同样浓度和体积的抗原加弗氏不完全佐剂乳化后进行背部皮下多点注射，每 2 周加强免疫一次(方法同二免)，共免疫 5 次。最后一次免疫，为耳缘静脉注射。

[0101] (三) 脱二氧喹烯酮多克隆抗体的采集及其效价检测

[0102] 用卵清蛋白代替牛血清蛋白，采用与抗原制备相同的方法制备包被抗原。第五次免疫后用耳后静脉采血的方式采集大白兔血液，离心取血清进行效价检测。用方阵滴定法确定包被抗原和多克隆抗体的最适工作浓度，选择 OD 值为 1.5 左右时的抗原和抗体稀释度为工作浓度。

[0103] 建立的间接 ELISA 法的步骤如下：

[0104] 1. 包被：用碳酸盐缓冲液(pH9.6)将包被抗原稀释为系列浓度，每一浓度包被一行，100 μL/孔，4℃ 过夜；

[0105] 所用碳酸盐缓冲液(pH9.6)的组成成分及含量为：

[0106] Na₂CO₃ 1.59g

- [0107] NaHCO_3 2.93g
- [0108] 蒸馏水 1000mL
- [0109] 2. 洗涤与封闭:倾去孔内液体,用磷酸盐缓冲液(pH7.2)洗涤3次。每孔加入150 μL 封闭液,37℃恒温封闭1小时,然后洗涤2次;
- [0110] 洗涤所用磷酸盐缓冲液(pH7.2)的组成成分及含量为:
- [0111] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.12g
- [0112] $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.76g
- [0113] 蒸馏水 1000mL
- [0114] 封闭液的组成成分及含量为:
- [0115] 小牛血清 50ml
- [0116] 蔗糖 50g
- [0117] 酪蛋白 2.5g
- [0118] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.8g
- [0119] $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.593g
- [0120] Proclin300 300 μL
- [0121] 蒸馏水 1000mL
- [0122] 3. 加样:各列孔加入从1:1000开始的倍比稀释的待检血清,每孔100 μL ,37℃反应1小时;洗涤同2。每孔加入100 μL HRP-羊抗兔IgG,37℃反应1小时。洗涤同2;
- [0123] 稀释待测血清的底物缓冲液(pH5.0)的组成成分及含量为:
- [0124] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.68g
- [0125] 柠檬酸 0.933g
- [0126] 加蒸馏水至100mL
- [0127] 4. 显色测定:每孔加入3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)溶液100 μL ,37℃显色20min,然后每孔加入的 H_2SO_4 溶液(2mol/L)50 μL 以终止反应,最后用酶标仪测定各孔在450nm处的OD值;
- [0128] 所用3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)溶液的组成成分及含量为:
- [0129] TMB 2.5mg
- [0130] 乙二醇 1mL
- [0131] 底物缓冲液 25mL
- [0132] 质量分数为30%的过氧化氢 25 μL
- [0133] 底物缓冲液为步骤3所述的稀释待测血清的缓冲液(pH5.0)。
- [0134] 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)溶液临用时新鲜配制。
- [0135] H_2SO_4 溶液(2mol/L)的组成成分及含量为:
- [0136] 质量分数为98%的浓硫酸(18.4mol/L) 21.74mL
- [0137] 蒸馏水 178.26mL
- [0138] 5. 判定结果:以OD450nm大于2倍阴性对照孔的血清最高稀释倍数为血清的ELISA效价。
- [0139] 获得的检测结果如下:包被抗原的最适工作浓度均为1:1000;来自3只大白兔的第五次免疫后抗血清中某抗血清获得最佳效价,即1:5000,该抗血清即为获得的脱二氧喹

烯酮多克隆抗体。

[0140] (四) 抗体 IgG 的特异性检测

[0141] 采用方阵法确定包被原和抗体的最适工作浓度,采用间接竞争 ELISA 法检测所得抗体 IgG 对其它喹噁啉类药物及代谢产物(喹乙醇、乙酰甲喹、卡巴氧、3-甲基喹噁啉-2-羧酸和喹噁啉-2-羧酸)的特异性,具体操作步骤同(三),结果表明,该抗体仅对喹烯酮的主要代谢产物脱二氧喹烯酮特异性结合,与其它喹噁啉类药物及代谢物交叉反应不明显。

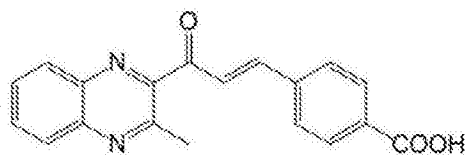


图 1

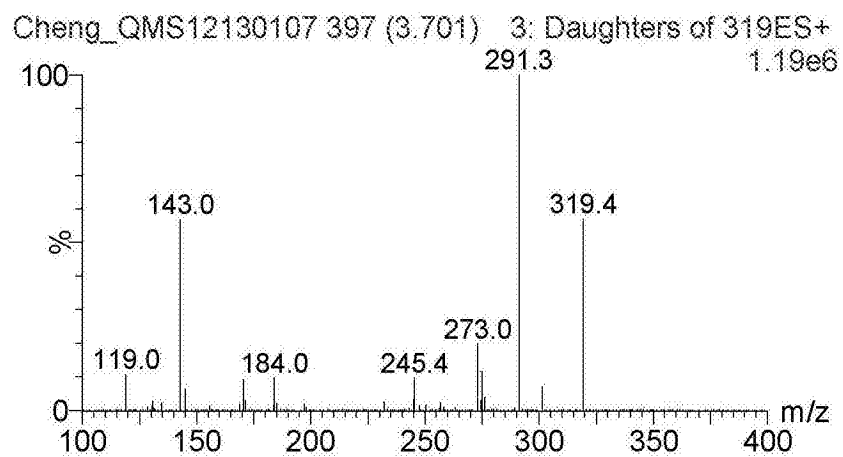


图 2

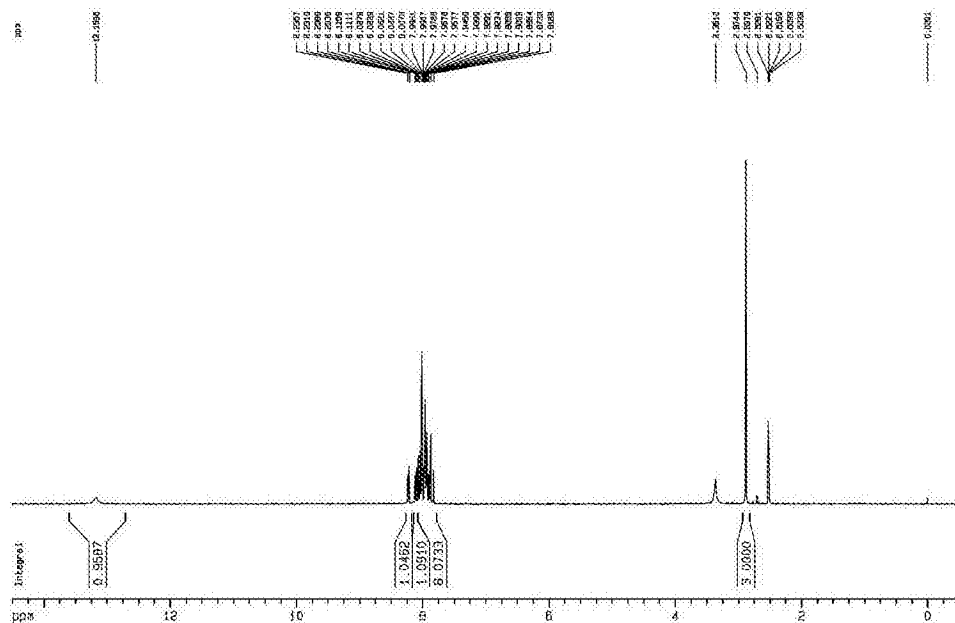
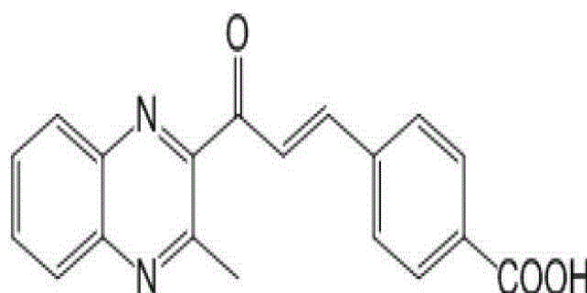


图 3

专利名称(译)	一种脱二氧喹烯酮半抗原及其制备方法和其应用		
公开(公告)号	CN103360328B	公开(公告)日	2015-12-02
申请号	CN201310326004.4	申请日	2013-07-30
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	沈建忠 程林丽 王战辉 张素霞 高海祥		
发明人	沈建忠 程林丽 王战辉 张素霞 高海祥		
IPC分类号	C07D241/42 C07K14/765 C07K16/44 G01N33/535		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	陈昊		
其他公开文献	CN103360328A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种脱二氧喹烯酮半抗原及其制备方法和其应用。该脱二氧喹烯酮半抗原的结构式如式I所示：本发明的脱二氧喹烯酮半抗原在偶联蛋白后免疫动物，可获得针对脱二氧喹烯酮的特异性抗体，该抗体可用于快速检测动物性产品中脱二氧喹烯酮的残留。本发明提供的脱二氧喹烯酮半抗原为建立快速、简便、价廉、灵敏、特异的脱二氧喹烯酮的筛选方法提供了新的物质基础。



式 (I)