



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105061339 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201510381440. 0

C07K 14/795(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 07. 02

G01N 33/53(2006. 01)

(71) 申请人 中国兽医药品监察所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街 8 号

(72) 发明人 白玉惠 王鹤佳 刘智宏 黄耀凌
徐士新 张聪敏

(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 何叶喧

(51) Int. Cl.

C07D 241/44(2006. 01)

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/77(2006. 01)

C07K 14/47(2006. 01)

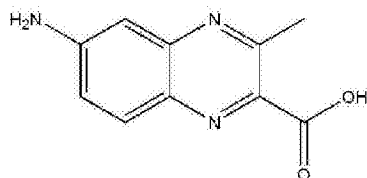
权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

一种半抗原、其人工抗原及其在检测喹乙醇残留标志物中的应用

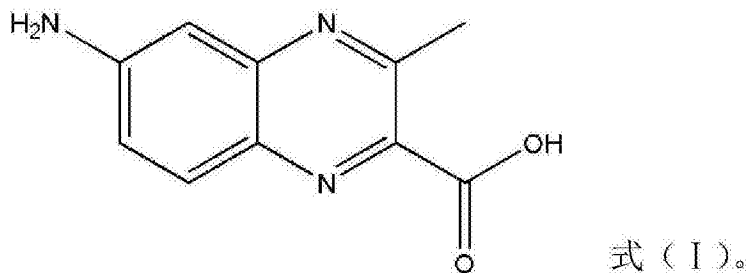
(57) 摘要

本发明公开了一种半抗原、其人工抗原及其在检测喹乙醇残留标志物中的应用。本发明提供的半抗原为式(I)所示的化合物。本发明还保护一种人工抗原,为式(I)所示化合物与载体蛋白的偶联物。以所述人工抗原为免疫原得到的抗体也属于本发明的公开范围。本发明还保护用标记酶标记式(I)所示化合物得到的酶标抗原。本发明可在喹乙醇残留标志物检测中发挥重要作用。



式(I)

1. 式 (I) 所示的化合物 ;



2. 权利要求 1 所述化合物的制备方法,包括如下步骤:

(1) 乙酰乙酸乙酯、N- 溴代丁二酰亚胺和 4- 硝基邻苯二胺发生反应,用乙酸乙酯萃取,减压蒸干;

(2) 取步骤 (1) 的产物,在无水乙醇中与氯化亚锡发生反应,用二氯甲烷萃取,减压蒸干;

(3) 取步骤 (2) 的产物,在甲醇和水中与氢氧化锂发生反应,减压蒸干,得到权利要求 1 所述化合物。

3. 权利要求 1 所述化合物与载体蛋白的偶联物。

4. 如权利要求 3 所述的偶联物,其特征在于:所述偶联物的制备方法包括如下步骤:权利要求 1 所述化合物与载体蛋白进行重氮偶联反应,得到偶联物。

5. 权利要求 3 或 4 所述偶联物在制备抗体中的应用。

6. 以权利要求 3 或 4 所述偶联物为抗原得到的抗体。

7. 权利要求 6 所述抗体在检测喹乙醇残留标志物中的应用。

8. 用标记酶标记权利要求 1 所述化合物得到的酶标抗原。

9. 权利要求 8 所述酶标抗原在检测喹乙醇残留标志物中的应用。

10. 一种用于检测喹乙醇残留标志物的试剂盒,包括权利要求 6 所述抗体和权利要求 8 所述酶标抗原。

一种半抗原、其人工抗原及其在检测喹乙醇残留标志物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种半抗原、其人工抗原及其在检测喹乙醇残留标志物中的应用。

背景技术

[0002] 喹乙醇 (OLA), 分子式 $C_{12}H_{13}N_3O_4$, 是喹噁啉类抗菌药物的典型代表, 其主要代谢物为 3-甲基喹噁啉-2-羧酸 (MQCA)。由于 OLA 对大多数动物有明显的致畸作用, 对人也有潜在的三致性 (即致畸、致突变和致癌), 很多国家规定禁止或限制使用 OLA, 我国规定只能用于 35kg 以下的仔猪。MQCA 为指定的喹乙醇的主要残留标志物, 用于监控 OLA 在畜牧生产中的违禁使用情况。欧盟、美国和中国分别制定了 MQCA 的最高残留限量 (MRLs)。我国规定 MQCA 在猪肝和猪肉中的最高残留限量分别为 $50 \mu\text{g/kg}$ 和 $4 \mu\text{g/kg}$ 。

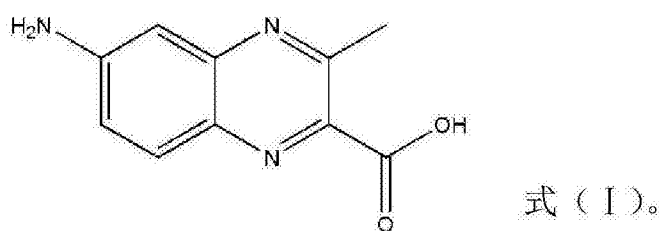
[0003] 利用仪器方法检测 MQCA 的技术相对复杂、耗时长、成本高, 而酶联免疫方法 (ELISA) 具有快速、灵敏、简便、高效等优点, 能满足目前生产链所需要的大量样本的快速筛选和现场检测的要求。该技术研究的关键是半抗原分子的设计与合成、人工抗原与抗体的制备。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种半抗原、其人工抗原及其在检测喹乙醇残留标志物中的应用。

[0005] 本发明提供的半抗原为式 (I) 所示的化合物;

[0006]



[0007] 本发明还保护式 (I) 所示化合物的制备方法, 包括如下步骤:

[0008] (1) 乙酰乙酸乙酯、N-溴代丁二酰亚胺和 4-硝基邻苯二胺发生反应, 用乙酸乙酯萃取, 减压蒸干;

[0009] (2) 取步骤 (1) 的产物, 在无水乙醇中与氯化亚锡发生反应, 用二氯甲烷萃取, 减压蒸干;

[0010] (3) 取步骤 (2) 的产物, 在甲醇和水中与氢氧化锂发生反应, 减压蒸干, 得到式 (I) 所示化合物。

[0011] 式 (I) 所示化合物的制备方法具体包括如下步骤:

[0012] (1) 将 650mg 乙酰乙酸乙酯溶于 20mL 蒸馏水, 然后加入 1.06g N-溴代丁二酰亚胺并室温反应 0.5h, 然后加入 750mg 4-硝基邻苯二胺并室温反应 16 小时, 然后用乙酸乙酯萃

取,收集有机相,减压蒸干,得到化合物 2;

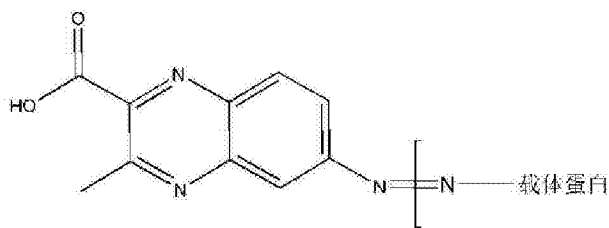
[0013] (2) 将 500mg 化合物 2 溶于 15mL 无水乙醇,然后加入 570mg 氯化亚锡并室温反应 4h,然后加入 20mL 1M NaOH 水溶液,然后用二氯甲烷萃取,收集有机相,减压蒸干,得到化合物 3;

[0014] (3) 取 230mg 化合物 3,溶于甲醇-水混合液(将 5mL 甲醇和 2mL 水混合,得到甲醇-水混合液),然后加入 120mg 氢氧化锂并室温反应 16 小时,减压蒸干,得到式(I)所示的化合物。

[0015] 本发明还保护一种人工抗原,为式(I)所示化合物与载体蛋白的偶联物。

[0016] 所述人工抗原的结构式具体如下:

[0017]



[0018] 所述载体蛋白可为人血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、兔血清白蛋白(RSA)、甲状腺球蛋白(TG)、卵清蛋白(OVA)或血兰蛋白(KLH)等。

[0019] 所述人工抗原具体可为式(I)所示的化合物与人血清白蛋白的偶联物。所述人工抗原中,式(I)所示的化合物和人血清白蛋白的偶联物的偶联比具体可为 1:8。

[0020] 所述人工抗原的制备方法包括如下步骤:式(I)所示化合物与人血清白蛋白进行重氮偶联反应,得到偶联物。

[0021] 所述人工抗原的制备方法具体如下:将 25mg 式(I)所示化合物溶于 2mL 水,然后加入 2mL 1M 盐酸水溶液,然后依次加入 20mg 亚硝酸钠和 200mg 人血清白蛋白,混匀,然后 2-8℃ 搅拌反应 1-2 小时(具体可 4℃、120rpm 搅拌反应 2 小时),然后在 PBS 缓冲液中透析,得到人工抗原。

[0022] 本发明还保护所述人工抗原在制备抗体中的应用。

[0023] 以所述人工抗原为免疫原得到的抗体也属于本发明的公开范围。所述抗体可为单克隆抗体或多克隆抗体。所述多克隆抗体可为兔源抗体、鼠源抗体、马源抗体、羊源抗体、猪源抗体或豚鼠源抗体。所述抗体具体可为将所述人工抗原免疫新西兰大耳兔后得到的血清。

[0024] 本发明还保护所述抗体在检测喹乙醇残留标志物中的应用。

[0025] 本发明还保护用标记酶标记式(I)所示化合物得到的酶标抗原。所述标记酶可为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶。所述酶标抗原中,所述辣根过氧化物酶可通过 EDC 法或高碘酸钠法与式(I)所示化合物交联。

[0026] 本发明还包括所述酶标抗原在检测喹乙醇残留标志物中的应用。

[0027] 本发明还保护一种用于检测喹乙醇残留标志物的试剂盒,包括所述酶标抗原和所述抗体。

[0028] 所述试剂盒由如下组件组成:包被有多克隆抗体的酶标板,标准溶液 1,标准溶液 2,标准溶液 3,标准溶液 4,标准溶液 5,标准溶液 6,酶标抗原溶液,浓缩洗涤液,浓缩显色

液,显色液稀释液,终止液;

[0029] 标准溶液 1 :PBS 缓冲液;

[0030] 标准溶液 2 :含有 0.30 μg /LMQCA 的 PBS 缓冲液;

[0031] 标准溶液 3 :含有 1.00 μg /LMQCA 的 PBS 缓冲液;

[0032] 标准溶液 4 :含有 3.00 μg /LMQCA 的 PBS 缓冲液;

[0033] 标准溶液 5 :含有 10.00 μg /LMQCA 的 PBS 缓冲液;

[0034] 标准溶液 6 :含有 30.00 μg /LMQCA 的 PBS 缓冲液;

[0035] 酶标抗原溶液:将 5mg 式 (I) 所示化合物溶于 1mL 水,然后逐滴加入 0.5mLEDC 水溶液 (含 5mg EDC) 和 0.5mL NHS 水溶液 (含 3mg NHS) 并混匀,然后 4℃ 搅拌 5min,然后加入 1mL 20mg/mL HRP 溶液 (将辣根过氧化物酶溶于 PBS 缓冲液,得到 HRP 溶液) 并 4℃、120rpm 搅拌反应 16 小时,然后在生理盐水中透析,得到酶标抗原溶液;

[0036] 浓缩洗涤液:含有 0.5% (质量百分含量) 吐温 -20 的 PBS 缓冲液;

[0037] 浓缩显色液:浓度为 1mg/ml 的四甲基联苯胺溶液 (溶剂为二甲基甲酰胺);

[0038] 显色液稀释液:含有 0.2M 磷酸氢二钠和 0.2M 柠檬酸的水溶液, pH5.0;

[0039] 终止液:1mol/L 硫酸溶液;

[0040] 包被有多克隆抗体的酶标板的制备方法:①取所述抗体,用包被缓冲液 (pH9.6、0.05M 的碳酸盐缓冲液) 稀释,得到蛋白浓度为 0.2 μg /mL 的溶液;②取酶标板,每孔加入 150 μL 步骤①制备的溶液,37℃ 静置 2h,然后 4℃ 静置 16 小时,弃去孔内液体,用洗涤液 (将浓缩洗涤液用水稀释至 10 倍体积,即为洗涤液) 洗涤 3 次 (每次 30 秒),拍干;③完成步骤②后,取所述酶标板,每孔加入 250 μL 含 5% (质量百分含量) 脱脂牛奶的 PBS 缓冲液,37℃ 温育 1 小时,弃去孔内液体,干燥后得到包被有多克隆抗体的酶标板。

[0041] 以上任一所述喹乙醇残留标志物具体可为 3- 甲基喹噁啉 -2- 羧酸。

[0042] 兽药半抗原的设计总体来说就是对兽药分子的电性和空间性的模拟。半抗原与待测物结构尽可能相似是半抗原设计的一个主要原则。目前制备小分子半抗原的抗体常规方法是选择具有毒理学意义的原型药物或代谢产物作为待测物,设计合成保留待测物分子结构特征并带有活性基团的人工半抗原,通过键合的方法使半抗原和蛋白质载体偶联制备免疫原,经动物免疫程序制备针对半抗原的特异性抗体。待测物分子中存在 -COOH、-OH 或 -NH₂ 等易于和蛋白质或间隔臂发生偶联的官能团,常被用作连接点来制备免疫原。目前已有检测 MQCA 的方法大多数是直接在 MQCA 分子的 -COOH 位置设计改造抗原。实际上,在合成人工抗原的过程中,即使半抗原绝大部分的官能团与待测物都是一致的,但在药物分子与载体蛋白连接的部位很容易受到屏蔽。以测定喹噁啉类药物研究为例,如果选择在 -COOH 位置进行人工抗原设计和改造并偶联载体蛋白,MQCA 的部分特征性基团和结构 (-COOH、氮杂环) 不能充分暴露作为 B 淋巴细胞的抗原表位,进而影响抗体灵敏度或特异性。因此,连接位点的选择对于抗体质量至关重要,这就要求对半抗原进行科学合理的设计与改造。

[0043] 本发明提供的半抗原,既完整保留喹乙醇残留标志物分子特征性基团和结构 (-COOH、氮杂环),同时又带有便于发生键合反应的连接基团 -NH₂ (便于通过键合的方法使半抗原和蛋白质载体偶联制备人工抗原),使得相应的人工抗原能充分暴露并作为 B 淋巴细胞的抗原表位,进而利于高灵敏度和特异性抗体的制备。

[0044] 本发明提供的半抗原具有如下优点:(1) 制备所需的原料简单、低廉,易于购买;

(2) 制备所需的化学反应安全、易于操作、重现性好；(3) 将半抗原与载体蛋白偶联后免疫动物,所得抗体的效价、特异性都很高,可用于制备酶联免疫试剂盒。

[0045] 应用本发明提供的酶联免疫试剂盒检测喹乙醇残留标志物,具有如下优点:操作简单,1 小时之内可得出测定结果,可同时快速检测大批样品,具有最低检测限低、特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点,本发明可在喹乙醇残留标志物检测中发挥重要作用。

附图说明

[0046] 图 1 为喹乙醇残留标志物半抗原的合成路线示意图。

[0047] 图 2 为喹乙醇残留标志物半抗原的核磁共振谱图。

[0048] 图 3 为喹乙醇残留标志物酶联免疫检测试剂盒标准曲线。

具体实施方式

[0049] 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。如无特殊说明,实施例中所用的 PBS 缓冲液均为如下:PBS 缓冲液 (pH7.2):含有 0.01M 磷酸二氢钠和 0.01M 磷酸氢二钠的水溶液。MQCA:Sigma-Aldrich 公司, CAS 号:74003-63-7。

[0050] 实施例 1、半抗原的合成和鉴定

[0051] 一、半抗原的合成

[0052] 半抗原的合成路线示意图见图 1。

[0053] (1) 将 650mg 乙酰乙酸乙酯溶于 20mL 蒸馏水,然后加入 1.06g N-溴代丁二酰亚胺 (NBS) 并室温反应 0.5h,然后加入 750mg 4-硝基邻苯二胺 (化合物 1) 并室温反应 16 小时,然后用乙酸乙酯萃取,收集有机相,减压蒸干,得到化合物 2。

[0054] (2) 将 500mg 化合物 2 溶于 15mL 无水乙醇,然后加入 570mg 氯化亚锡并室温反应 4h,然后加入 20mL 1M NaOH 水溶液,然后用二氯甲烷萃取,收集有机相,减压蒸干,得到化合物 3。

[0055] (3) 取 230mg 化合物 3,溶于甲醇-水混合液 (将 5mL 甲醇和 2mL 水混合,得到甲醇-水混合液),然后加入 120mg 氢氧化锂并室温反应 16 小时,减压蒸干,得到化合物 4。化合物 4 即为半抗原。

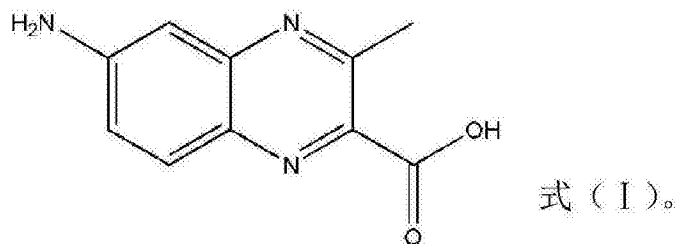
[0056] 二、半抗原的鉴定

[0057] 化合物 4 的 LC-MS 图谱结果如下 (ESI, m/z): 204 [M+H]⁺。图谱中,得到 m/z 比为 204 的主峰,对应半抗原的 [M+H]⁺。

[0058] 化合物 4 的核磁共振谱图见图 2。¹H NMR (300MHz, Chloroform-d) δ 7.71 (d, J = 9.0Hz, 1H), 7.29 (dd, J = 9.0, 1.8Hz, 1H), 6.92 (d, J = 1.8Hz, 1H), 6.13 (br, 2H), 2.68 (s, 3H)。

[0059] 以上鉴定结果表明,化合物 4 的结构式如下:

[0060]



[0061] 实施例 2、人工抗原的制备和鉴定

[0062] 一、人工抗原的合成

[0063] 将 25mg 实施例 1 制备的化合物 4 溶于 2mL 水, 然后加入 2mL 1M 盐酸水溶液, 然后依次加入 20mg 亚硝酸钠和 200mg 人血清白蛋白, 混匀, 然后 4℃、120rpm 搅拌反应 2 小时 (实际应用中 2-8℃ 搅拌反应 1-2 小时均可, 重氮偶联反应), 然后在 PBS 缓冲液中透析, 得到人工抗原溶液 (人工抗原即半抗原-人血清白蛋白的偶联物), -20℃ 保存备用。

[0064] 二、人工抗原的鉴定

[0065] 取步骤一制备的人工抗原溶液, 用 PBS 缓冲液稀释至 1mg/mL (以蛋白浓度计), 作为溶液甲; 将含 1mg/mL 化合物 4 的 PBS 缓冲液作为溶液乙; 将含 1mg/mL 人血清白蛋白的 PBS 缓冲液作为溶液丙。分别将溶液甲、溶液乙和溶液丙进行紫外 (250-400nm) 光谱扫描。

[0066] 与溶液丙相比溶液甲的紫外图谱发生了明显变化, 说明半抗原与人血清白蛋白成功偶联。溶液乙在 260nm 处有最大吸收值, 溶液丙在 278nm 处有最大吸收值。根据公式 $K = A/CL$ (A 为最大吸收波长值下的吸光度, C 为溶液浓度, L 为液层的厚度) 分别计算乙、丙化合物的消光系数 (K)。分别采用溶液乙和溶液丙的最大吸收波长值对溶液甲进行紫外光谱扫描, 并根据已经计算出的半抗原的消光系数反向计算该化合物在溶液甲中的浓度, 用浓度值除以分子量得到该化合物的摩尔浓度, 计算偶联比。半抗原和人血清白蛋白的偶联比为 8:1, 即 8 个半抗原结合 1 个人血清白蛋白。

[0067] 实施例 3、多克隆抗体的制备

[0068] 一、多克隆抗体的制备

[0069] 采用新西兰大耳兔作为免疫动物, 以实施例 2 中制备的人工抗原为免疫原。首次免疫用乳液按照如下方法配制: 2mL 浓度为 2mg/mL (以蛋白浓度计) 的免疫原水溶液与 2mL 完全弗氏佐剂乳化。加强免疫用乳液按照如下方法配制: 2mL 浓度为 2mg/mL (以蛋白浓度计) 的免疫原水溶液与 2mL 不完全弗氏佐剂乳化。首次免疫采用背部皮下多点注射以及后脚掌趾间注射 (免疫原的剂量为 1mg/只); 加强免疫采用大腿肌肉注射 (免疫原的剂量为 0.5mg/只), 每次免疫间隔 2 周, 共加强免疫 10 次, 最后一次不加免疫佐剂直接肌肉注射, 最后一次加强免疫 7 天后采血, 收集血清, 即为多克隆抗体。

[0070] 二、多克隆抗体的效价检测 (直接竞争 ELISA 法)

[0071] 1、取步骤一制备的多克隆抗体, 用包被缓冲液 (pH9.6、0.05M 的碳酸盐缓冲液) 梯度稀释, 得到各个抗体稀释液。

[0072] 2、取酶标板, 每孔加入 150 μL 步骤 1 制备的抗体稀释液, 37℃ 静置 2h, 然后 4℃ 静置 12 小时, 弃去孔内液体, 用洗涤液洗涤 3 次 (每次 30 秒), 拍干。

[0073] 3、完成步骤 2 后, 取所述酶标板, 每孔加入 250 μL 含 5% (质量百分含量) 脱脂牛奶的 PBS 缓冲液, 37℃ 温育 1 小时, 弃去孔内液体, 干燥。

[0074] 4、完成步骤 3 后, 取所述酶标板, 在不同的孔中分别加入 0 浓度标准溶液 (即 PBS

缓冲液)和含 10ng/mL MQCA 的 PBS 缓冲液 (50 μ L/孔),然后每孔加入 100 μ L 酶标抗原溶液并静置孵育 30 分钟,用洗涤液洗涤酶标板 3 次并用吸水纸拍干,然后每孔加入 100 μ L 显色液并避光显色 15min,最后每孔加入 100 μ L 终止液,用酶标仪测定 450nm 处吸光值 (A_{450} 值)。加入 0 浓度标准溶液的孔的吸光度值为 B_0 。加入含 10ng/mL MQCA 的 PBS

[0075]

$$\text{百分吸光度值} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

[0076] 缓冲液的孔的吸光度值为 B。

[0077] B_0 大于 1.5 且百分吸光度值为 50% 以下判断为阳性。百分吸光度值越低,抗体灵敏度越高。按此要求血清抗体效价达 1:5000。

[0078] 酶标抗原溶液的制备方法、洗涤液的制备方法、显色液的制备方法和终止液的制备方法见实施例 4。

[0079] 实施例 4、酶联免疫试剂盒

[0080] 一、酶联免疫试剂盒的组成

[0081] 试剂盒的组成如下:包被有多克隆抗体的酶标板;A 试剂瓶(装有标准溶液 1),B 试剂瓶(装有标准溶液 2),C 试剂瓶(装有标准溶液 3),D 试剂瓶(装有标准溶液 4),E 试剂瓶(装有标准溶液 5),F 试剂瓶(装有标准溶液 6);G 试剂瓶(装有酶标抗原溶液);H 试剂瓶(装有浓缩洗涤液;使用时,将浓缩洗涤液用水稀释至 10 倍体积,即为洗涤液);I 试剂瓶(装有浓缩显色液;使用时,将浓缩显色液用显色液稀释液稀释,使四甲基联苯胺浓度为 0.1mg/mL,即为显色液);J 试剂瓶(装有显色液稀释液);K 试剂瓶(装有终止液)。

[0082] 二、所用试剂的配制

[0083] 标准溶液 1:PBS 缓冲液;

[0084] 标准溶液 2:含有 0.30 μ g/LMQCA 的 PBS 缓冲液;

[0085] 标准溶液 3:含有 1.00 μ g/LMQCA 的 PBS 缓冲液;

[0086] 标准溶液 4:含有 3.00 μ g/LMQCA 的 PBS 缓冲液;

[0087] 标准溶液 5:含有 10.00 μ g/LMQCA 的 PBS 缓冲液;

[0088] 标准溶液 6:含有 30.00 μ g/LMQCA 的 PBS 缓冲液。

[0089] 酶标抗原溶液:将 5mg 实施例 1 制备的化合物 4 溶于 1mL 水,然后逐滴加入 0.5mL EDC 水溶液(含 5mg EDC)和 0.5mL NHS 水溶液(含 3mg NHS)并混匀,然后 4℃ 搅拌 5min,然后加入 1mL 20mg/mL HRP 溶液(将辣根过氧化物酶溶于 PBS 缓冲液,得到 HRP 溶液;辣根过氧化物酶购自 Roche 公司, CAS 号为 9003-99-0)并 4℃、120rpm 搅拌反应 16 小时,然后在生理盐水中透析,得到酶标抗原溶液,-20℃ 保存备用。

[0090] 浓缩洗涤液:含有 0.5% (质量百分含量)吐温-20 的 PBS 缓冲液。

[0091] 浓缩显色液:浓度为 1mg/mL 的四甲基联苯胺溶液(溶剂为二甲基甲酰胺)。

[0092] 显色液稀释液:含有 0.2M 磷酸氢二钠和 0.2M 柠檬酸的水溶液, pH5.0。

[0093] 终止液:1mol/L 硫酸溶液。

[0094] 三、包被有多克隆抗体的酶标板的制备

[0095] 包被缓冲液:pH9.6、0.05M 的碳酸盐缓冲液。

[0096] 1、取实施例 3 制备的多克隆抗体,用包被缓冲液稀释,得到蛋白浓度为 0.2 μ g/mL

的溶液。

[0097] 2、取酶标板,每孔加入 150 μL 步骤 1 制备的溶液,37℃静置 2h,然后 4℃静置 16 小时,弃去孔内液体,用洗涤液洗涤 3 次(每次 30 秒),拍干。

[0098] 3、完成步骤 2 后,取所述酶标板,每孔加入 250 μL 含 5% (质量百分含量) 脱脂牛奶的 PBS 缓冲液,37℃温育 1 小时,弃去孔内液体,干燥后得到包被有多克隆抗体的酶标板。

[0099] 包被有多克隆抗体的酶标板用铝膜真空密封保存。

[0100] 实施例 5、试剂盒灵敏度、特异性、精密度和准确度试验

[0101] 检测实施例 4 制备的试剂盒的灵敏度、特异性、精密度和准确度。

[0102] 一、样品的前处理及检测方法

[0103] 1、猪肝、猪肉、鸡肉、鸡蛋样品前处理

[0104] (1) 称取 2(± 0.02)g 均质样品至 50mL 离心管中,加入 8mL 乙酸乙酯,涡旋混匀;

[0105] (2) 完成步骤(1)后,取所述离心管,加入 4mL 1.5M 盐酸水溶液,涡旋混匀,用振荡器振荡 5min,5000r/min 室温离心 5min,取上清液;

[0106] (3) 取 5mL 步骤(2)得到的上清液至另一新的 50mL 离心管中,加入 3mL 33.3% (质量百分比) NaCl 水溶液,涡旋混匀,5000r/min 室温离心 5min,取上清液;

[0107] (4) 取 4mL 步骤(3)得到的上清液至 10mL 干净玻璃试管中,于 50-60℃水浴氮气流下吹干;

[0108] (5) 完成步骤(4)后,取所述玻璃试管,加入 1mL 正己烷,涡旋溶解干燥残留物,然后加入 1mL 水,涡旋混匀,静置分层;

[0109] (6) 完成步骤(5)后,取所述玻璃试管,除去上层有机相,取下层水相,用水稀释至两倍体积,即为待测样本溶液。

[0110] 2、检测方法

[0111] (1) 制作标准曲线

[0112] 取包被有多克隆抗体的酶标板,每孔加入 50 μL 标准品溶液(标准溶液 1、标准溶液 2、标准溶液 3、标准溶液 4、标准溶液 5 或标准溶液 6),然后每孔加入 100 μL 酶标抗原溶液并 18℃-30℃放置 30min,然后用洗涤液洗涤酶标板 3 次并用吸水纸拍干,然后每孔加入 100 μL 显色液并避光显色 15min,最后每孔加入 100 μL 终止液,用酶标仪测定 450nm 处吸光值(A_{450} 值)。

[0113]

$$\text{百分吸光度值} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

[0114] (B—为标准溶液或待测样本溶液的吸光度平均值; B_0 —为标准溶液 1 的吸光度平均值)

[0115] 以标准溶液中喹乙醇残留标志物浓度的自然对数值为 X 轴,百分吸光度值为 Y 轴,用 Excel 绘制标准曲线。

[0116] 50%抑制浓度(即 IC_{50} ,指标准溶液 1 吸光度值的 50%处所对应的药物浓度)常作为评价竞争 ELISA 试剂盒灵敏度的指标。用实施例 4 制备的试剂盒分别测定 10 次标准曲线的 50%抑制浓度,确定该试剂盒的 IC_{50} 在 1.8-2.1 $\mu\text{g/L}$ 范围之内。试剂盒标准校正曲线见图 3。

[0117] (2) 待测样本的检测

[0118] 取包被有多克隆抗体的酶标板,每孔加入 50 μL 待测样本溶液,然后每孔加入 100 μL 酶标抗原溶液并 18 $^{\circ}\text{C}$ -30 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30min,然后用洗涤液洗涤酶标板 3 次并用吸水纸拍干,然后每孔加入 100 μL 显色液并避光显色 15min,最后每孔加入 100 μL 终止液,用酶标仪测定 450nm 处吸光值 (A_{450} 值)。从标准曲线上计算出待测样本溶液中喹乙醇残留标志物浓度。

[0119] 二、试剂盒灵敏度、特异性、精密度和准确度试验

[0120] 1、试剂盒灵敏度试验

[0121] 用实施例 4 制备的试剂盒测定各个空白样品(已确认不含喹乙醇残留标志物的猪肝、猪肉、鸡肉、鸡蛋,各 20 份)的 A_{450} 值,每个样品进行 3 次重复,取三次实验结果的平均值。将各样品的 A_{450} 平均值分别代入标准曲线中,获得各样品中的喹乙醇残留标志物浓度,计算最低检测限(即喹乙醇残留标志物浓度的平均值加 3 倍标准差)。

[0122] 实施例 4 制备的试剂盒对猪肝空白样品、猪肉空白样品、鸡肉空白样品、鸡蛋空白样品的最低检测限依次为 0.42、0.23、0.28、0.28 $\mu\text{g/kg}$ 。

[0123] 2、特异性测定

[0124] 选择与 MQCA 结构和功能类似的 5 种药物,配制成如下浓度的类似物溶液:0、10、30、100、300、1000 $\mu\text{g/L}$ 。用类似物溶液代替标准溶液,按照步骤 2 的方法制作标准曲线,得到各类似物的 50% 抑制浓度,与 MQCA 50% 抑制浓度相比,得出一系列交叉反应率,结果见表 1。

[0125]

$$\text{交叉反应率}(\%) = \frac{\text{引起 50\% 抑制的 MQCA 浓度}}{\text{引起 50\% 抑制的类似物浓度}} \times 100$$

[0126] 表 1 交叉反应率

[0127]

药物名称		交叉反应率%
MQCA	Sigma-Aldrich 公司	100
喹噁啉-2-羧酸	Sigma-Aldrich 公司	3.6
乙酰甲喹	Sigma-Aldrich 公司	<0.1
喹乙醇	Sigma-Aldrich 公司	<0.1
卡巴氧	百灵威科技有限公司	<0.1
喹烯酮	百灵威科技有限公司	<0.1

[0128] 3、准确度、精密度测定

[0129] 在空白猪肉中添加 MQCA 标准溶液至终浓度分别为 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 、2.0 $\mu\text{g/kg}$ 和 4.0 $\mu\text{g/kg}$ 。各浓度分别制备样品 6 份,然后采用实施例 4 制备的试剂盒分别测定其含量,重复 3 次。分别计算回收率(回收率=实测值/添加值 $\times 100\%$)、批内变异系数和批间变

异系数。

[0130] 结果见表 2。

[0131] 表 2 平均回收率与变异系数的结果

[0132]

添加浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	批 次	检测结果 ($\mu\text{g/kg}$)						平均 回收 率(%)	批内 变异 系数 (%)	批间 变异 系数 (%)
1.0	1	0.863	0.779	0.783	0.796	0.745	0.757	78.7	5.3	8.4
	2	0.844	0.878	0.838	0.895	0.882	0.918	87.6	3.5	
	3	0.773	0.762	0.973	0.961	0.791	0.821	84.7	11.3	
2.0	1	1.42	1.46	1.73	1.74	1.68	1.63	80.5	8.6	9.1
	2	1.740	1.690	1.400	1.470	1.420	1.520	77.0	9.3	
	3	1.630	1.700	1.870	1.560	1.650	1.860	85.6	7.4	
4.0	1	3.52	3.67	3.17	3.11	3.72	3.23	85.1	7.8	9.7
	2	2.970	2.840	2.930	3.330	3.120	2.790	74.9	6.7	
	3	2.870	2.940	3.470	3.670	2.910	3.110	79.0	10.5	

[0133] 结果表明：实施例 4 制备的试剂盒在猪肉中 $1.0 \mu\text{g/kg}$ 、 $2.0 \mu\text{g/kg}$ 和 $4.0 \mu\text{g/kg}$ MQCA 添加浓度的回收率为 70 % -97 %；批内变异系数 $\text{CV} \leq 12\%$ ，批间变异系数 $\text{CV} \leq 10\%$ 。

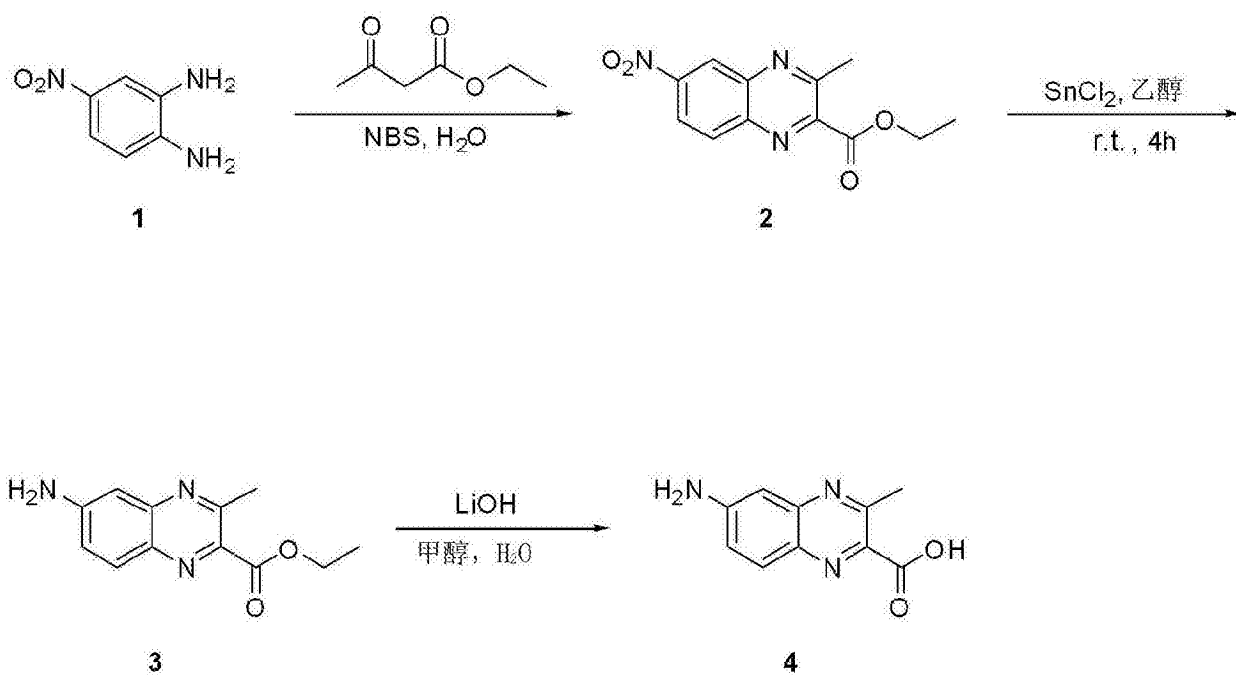


图 1

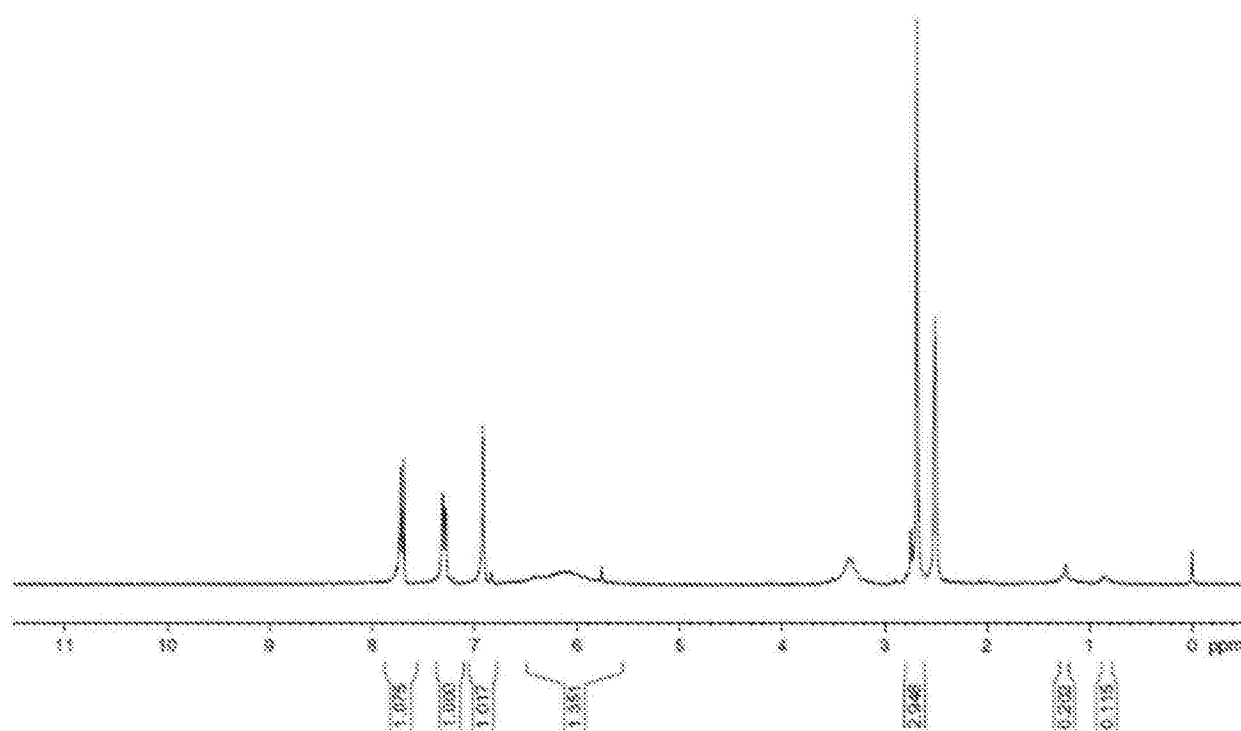


图 2

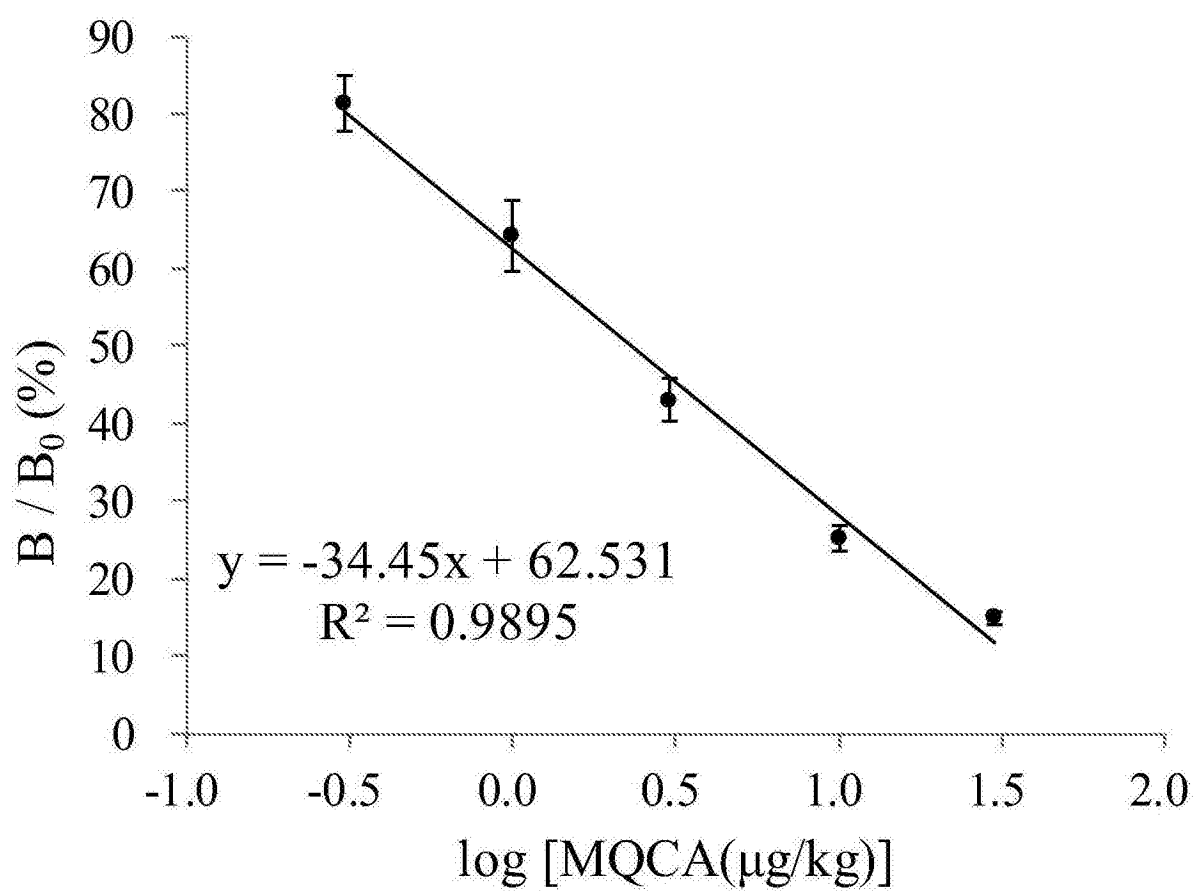


图 3

专利名称(译)	一种半抗原、其人工抗原及其在检测喹乙醇残留标志物中的应用		
公开(公告)号	CN105061339A	公开(公告)日	2015-11-18
申请号	CN201510381440.0	申请日	2015-07-02
[标]申请(专利权)人(译)	中国兽医药品监察所		
申请(专利权)人(译)	中国兽医药品监察所		
当前申请(专利权)人(译)	中国兽医药品监察所		
[标]发明人	白玉惠 王鹤佳 刘智宏 黄耀凌 徐士新 张聪敏		
发明人	白玉惠 王鹤佳 刘智宏 黄耀凌 徐士新 张聪敏		
IPC分类号	C07D241/44 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/47 C07K14/795 G01N33/53		
CPC分类号	C07D241/44 C07K14/47 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K19/00 G01N33/53		
代理人(译)	关畅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种半抗原、其人工抗原及其在检测喹乙醇残留标志物中的应用。本发明提供的半抗原为式(I)所示的化合物。本发明还保护一种人工抗原，为式(I)所示化合物与载体蛋白的偶联物。以所述人工抗原为免疫原得到的抗体也属于本发明的公开范围。本发明还保护用标记酶标记式(I)所示化合物得到的酶标抗原。本发明可在喹乙醇残留标志物检测中发挥重要作用。

