



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106866568 A

(43)申请公布日 2017.06.20

(21)申请号 201710022552.6

C07K 16/44(2006.01)

(22)申请日 2017.01.12

G01N 33/531(2006.01)

(71)申请人 广州润坤生物科技有限公司

地址 510800 广东省广州市花都区新华街
天贵路88号科技大楼A座811、813、813
室

(72)发明人 胡睿 李斌

(74)专利代理机构 深圳市千纳专利代理有限公司
44218

代理人 胡坚

(51)Int.Cl.

C07D 263/26(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

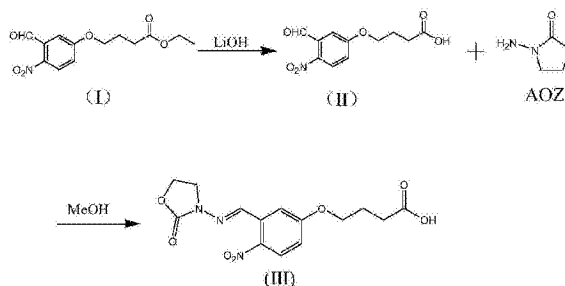
权利要求书3页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

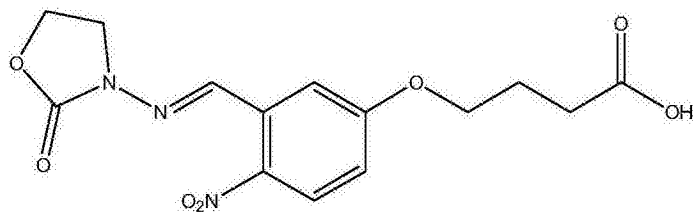
呋喃唑酮代谢物AOZ衍生化半抗原、人工抗原的制备方法及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种呋喃唑酮代谢物AOZ衍生化半抗原、人工抗原的制备方法及其应用,所述的半抗原引入的活性手臂,完整的保留了AOZ衍生物的特征结构,对其电子云密度无影响,又具有可以与载体蛋白偶联的活性基团,反应条件温和,操作步骤简单;制备的人工抗原可与抗体特异性的结合,具有高效价、高灵敏度、高精度性等特点,可快速检测各类产品中呋喃唑酮代谢物的残留。



1. 一种呋喃唑酮代谢物的半抗原, 其特征在于, 为如下结构式 III:

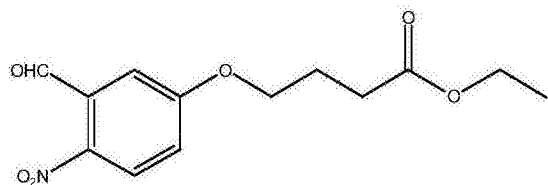


(III)

2. 一种呋喃唑酮代谢物的半抗原的制备方法, 其特征在于, 步骤如下:

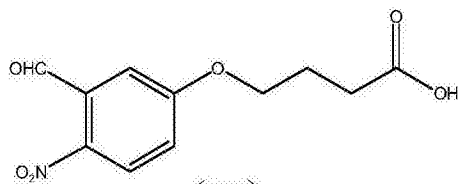
(a) 将化合物 I 溶解于乙醇中, 通过氢氧化锂溶液将 PH 值调至 10-11, 反应获得化合物 II;

所述化合物 I 的结构式为:



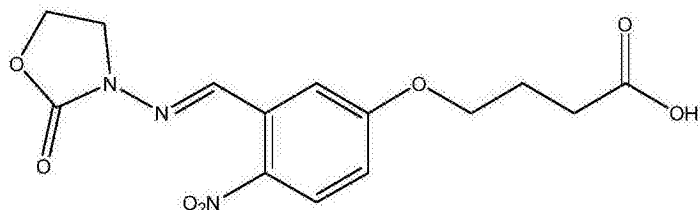
(I)

所述化合物 II 的结构式为:



(II)

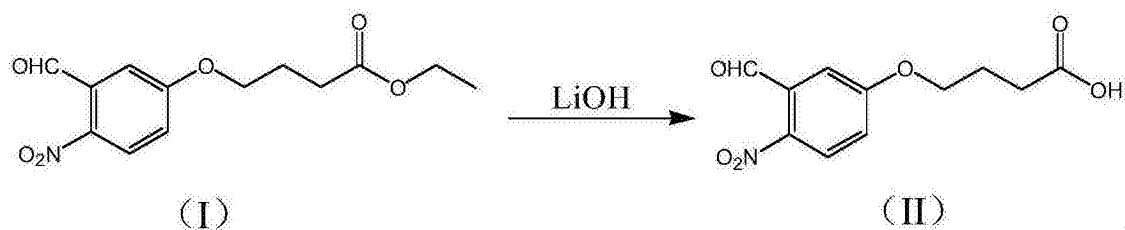
(b) 将所述化合物 II 与呋喃唑酮代谢物在甲醇条件下反应, 既得所述呋喃唑酮代谢物的半抗原; 其为如下结构式 III:



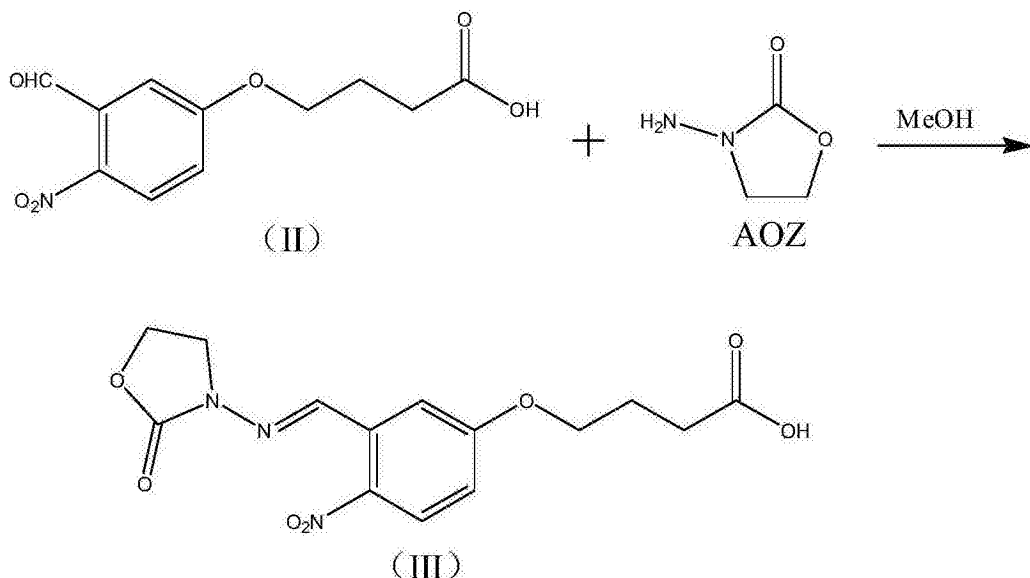
(III)

3. 一种呋喃唑酮代谢物的半抗原的制备方法, 其特征在于, 步骤如下:

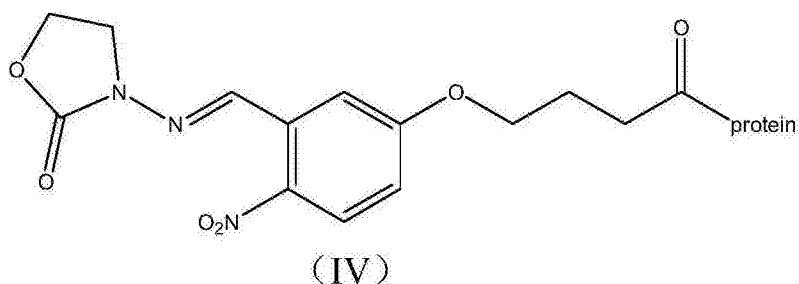
(a') 将化合物 I 溶于乙醇中, 通过氢氧化锂溶液将 PH 值调至 10-12, 进行反应, 加入纯化水, 用稀盐酸将 PH 值调至 4~5, 过滤, 得到化合物 II, 所述化合物 I 反应生成所述化合物 II 的过程如下:



(b') 将所述化合物 II 溶解于甲醇中,加1.2-1.5摩尔当量的呋喃唑酮代谢物AMOZ,在60~70℃进行反应,反应完毕,过滤,既得所述呋喃唑酮代谢物的半抗原;所述半抗原的结构式III及其合成路线如下:



4. 一种呋喃唑酮代谢物的人工抗原,其特征在于,是载体蛋白与所述呋喃唑酮代谢物的半抗原偶联得到的偶联物,其为如下结构式IV:



5. 根据权利要求4所述的呋喃唑酮代谢物的人工抗原,其特征在于:所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白或血蓝蛋白中的任意一种。

6. 一种呋喃唑酮代谢物的人工抗原的制备方法,其特征在于,步骤如下:

(1) 取权利要求1所述的呋喃唑酮代谢物的半抗原,溶解于二甲基甲酰胺中,搅拌后,加入碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺,其中,所述半抗原、碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的重量比为5:4:3,室温下搅拌,既得半抗原活化酯;

(2) 称取载体蛋白,所述载体蛋白与所述半抗原的摩尔当量比为30:1,使所述载体蛋白充分溶解在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滴加至所述载体蛋白溶液中,搅拌;

(3) 将步骤(2)所得溶液通过PBS溶液室温透析,既得。

7. 根据权利要求6所述的呋喃唑酮代谢物的人工抗原的制备方法, 其特征在于: 所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白或血蓝蛋白中的任意一种。

8. 一种通过权利要求4所述的呋喃唑酮代谢物的人工抗原制备的单克隆抗体的方法, 其特征在于, 步骤如下:

(i) 以权利要求4所述的呋喃唑酮代谢物的人工抗原为免疫原, 与等体积弗氏佐剂乳化后, 免疫BALB/C小鼠;

(ii) 取所述步骤(i)处理后的小鼠尾部静脉血检测血清效价, 如抗体效价不达60000, 需加强免疫, 待抗体效价不再升高后, 以100 μ g免疫原进行皮下加强免疫, 5天后取小鼠的脾细胞与SP20细胞融合;

(iii) 融合后的细胞在HAT培养基中筛选, 然后以完全培养基替换成HAT培养基进行培养;

(iv) 用ELISA对所述步骤(iii)处理后的细胞上清进行检测, 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;

(v) 将所述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, 既得。

9. 权利要求4所述的呋喃唑酮代谢物的人工抗原和权利要求8所述的单克隆抗体在检测呋喃唑酮代谢物中的应用, 其特征在于, 步骤如下: 将权利要求4所述的人工抗原作为包被原包被在酶标板上, 将权利要求8所述的单克隆抗体加入微孔板中; 采用竞争法检测待检样本中呋喃唑酮代谢物的含量。

10. 权利要求8所述的单克隆抗体在检测水产品中呋喃唑酮代谢物残留分析中应用。

呋喃唑酮代谢物AOZ衍生化半抗原、人工抗原的制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫化学技术领域,尤其涉及一种呋喃唑酮代谢物AOZ衍生化半抗原、人工抗原的制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 呋喃类是人工合成的一类共有5-硝基呋喃环结构的抗生素,对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、部分真菌都具有抗菌效果。因价格低廉,被广泛地应用在畜禽和鱼类养殖中,用于治疗由沙门氏杆菌、大肠杆菌引起的肠炎,球虫病等,并且常作为畜牧动物以及水产鱼虾类的生长促进剂被添入饲料中。硝基呋喃类主要包括:呋喃它酮、呋喃西林、呋喃妥因和呋喃唑酮。但在食品安全中,呋喃唑酮的大量或连续使用不仅对养殖动物有毒性作用,而且具有致癌、致畸、致突变作用,其代谢物还对人类健康有恶性影响。因此,许多国家已经明令禁止在饲养动物源性食品过程中使用呋喃唑酮,并规定了在动物源性食品中的检验检疫标准。

[0003] 目前用于检测呋喃唑酮及其代谢物的方法主要有传统的检测方法,如分光光度法、高效液相色谱法及其联用技术等,以上方法虽然可以精确定量,但由于设备仪器昂贵,检测时间长,且需专业人员操作,因此无法实现真正意义上的现场检测;以及免疫学检测技术,此方法具有高特异性和高选择性的特点,非常适用于复杂基质痕量组分的分离或检测,随着学科间的相互渗透,其检测方法层出不穷,应用范围亦日益扩大,与传统检测方法相比,免疫学检测技术具有经济、快速、技术要点低、操作简便等特点。免疫分析检测技术是近年来在环境及食品检测等领域开发出来的一种新型快速准确检测方法,现已逐渐成为世界各国有毒有害残留物快速筛选检测的主要方法之一,也为呋喃唑酮的检测提供了新的途径。

[0004] 虽然呋喃唑酮代谢物本身具有活性基团,但是,由于其分子量较小,空间结构不突出,直接制备的人工抗原存在灵敏度低的重大不足,无法满足现有市场的需求。因此需先通过化学方法设计出其半抗原,再进一步与载体蛋白结合获得具有免疫原性的完全抗原。

[0005] 其中,在发明专利号为CN200910085648.2的专利文件中,其检测的目标物为呋喃唑酮原料药,但是,由于呋喃唑酮进入动物体内后会代谢为AOZ,而AOZ又对人体有巨大的伤害,因此只检测呋喃唑酮原料药存在重大缺陷,无法满足市场要求。

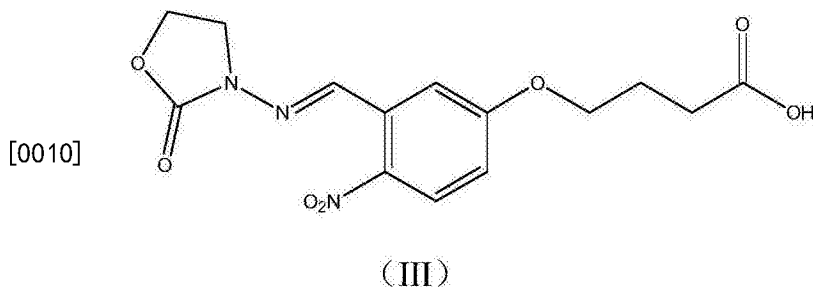
[0006] 另外,在发明专利号为CN200810052028.4和CN201210100649.1的专利文件中,其设计的半抗原结构均无法保留其待测目标物的硝基端,使得半抗原、抗原制备获得的抗体均存在特异性差、亲和力低等不足。

[0007] 再者,在发明专利号为CN200910085645.9的专利文件中,其设计的半抗原结构虽然也保留了硝基端,但半抗原的手臂是内酯类结构,存在稳定性差的缺陷,无法满足生产要求。同时半抗原与AOZ之间是通过酰胺键连接,与苯环不共轭,使半抗原的电子云密度与检测的目标物差异大,降低了灵敏度。

发明内容

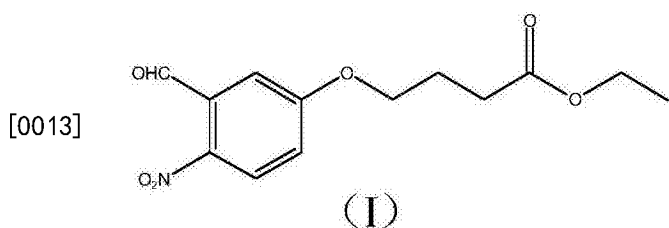
[0008] 本发明要解决的技术问题是克服传统的A0Z半抗原无法完整保留竞争物的特征结构,提供一种呋喃唑酮代谢物A0Z衍生化半抗原、人工抗原的制备方法及其应用,其可保留竞争物硝基端的半抗原,人工抗原,提高竞争物的特异性。

[0009] 本发明解决该技术问题所采用的技术方案是,一种呋喃唑酮代谢物的半抗原,为如下结构式Ⅲ:

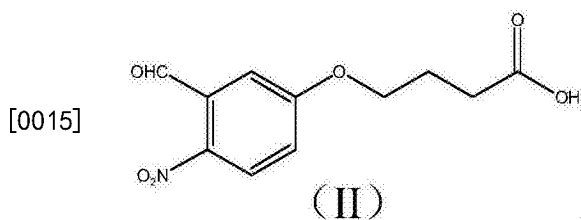


[0011] 本发明解决该技术问题所采用的另一技术方案是,一种呋喃唑酮代谢物的半抗原的制备方法,步骤如下:

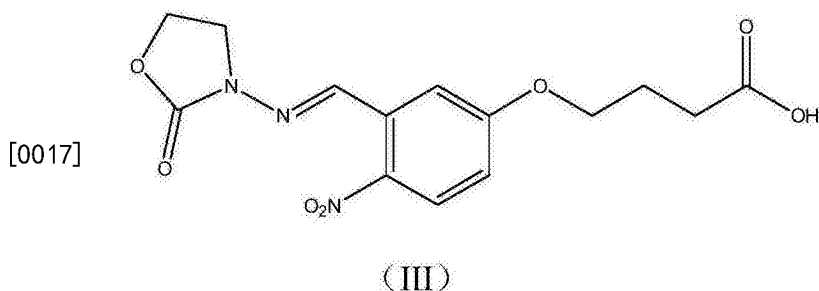
[0012] (a) 将化合物I溶解于乙醇中,所得溶液通过添加6mol/L的氢氧化锂溶液将PH值调至10-11,反应获得化合物II;所述化合物I的结构式为:



[0014] 所述化合物II的结构式为:

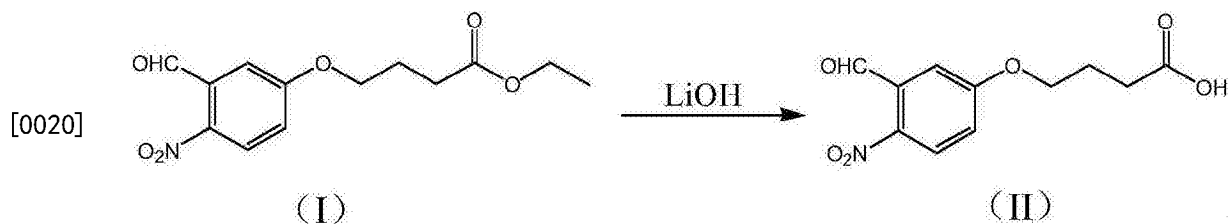


[0016] (b) 将所述化合物II与呋喃唑酮代谢物A0Z在甲醇条件下反应,既得所述呋喃唑酮代谢物的半抗原;为如下结构式Ⅲ:

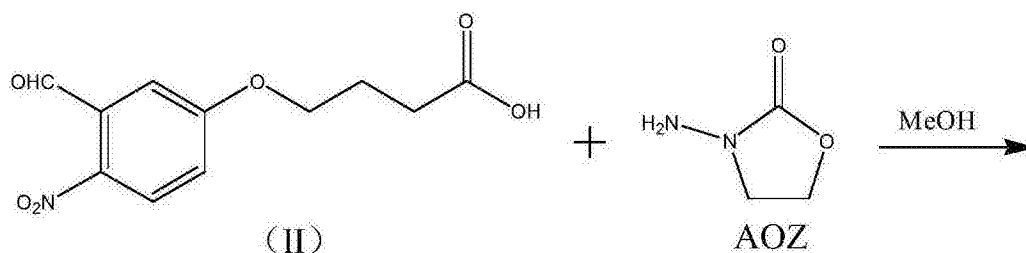


[0018] 本发明解决该技术问题所采用的另一技术方案是,一种呋喃唑酮代谢物的半抗原的制备方法,步骤如下:

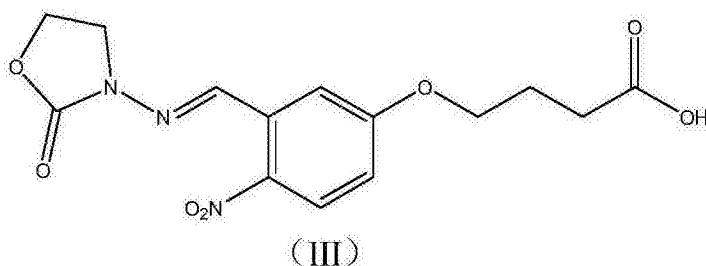
[0019] (a') 将化合物I溶于乙醇中,所得溶液通过加入6moI/L的氢氧化锂溶液将PH值调至10-12,室温反应15~26h,加入纯化水,所得溶液用1M的稀盐酸将PH值调至4-5,过滤,得到化合物II,所述化合物I反应生成所述化合物II的过程如下:



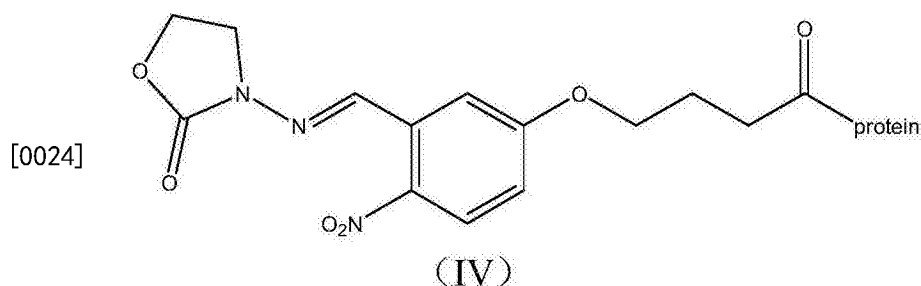
[0021] (b') 将所述化合物II溶解于甲醇中,加1.2-1.5摩尔当量的呋喃唑酮代谢物AMOZ,在60~70℃反应2h,反应完毕,过滤,既得所述呋喃唑酮代谢物的半抗原;所述半抗原的结构式III及其合成路线如下:



[0022]



[0023] 本发明解决该技术问题所采用的另一技术方案是,一种呋喃唑酮代谢物的人工抗原,是载体蛋白与所述呋喃唑酮代谢物的半抗原偶联得到的偶联物,其结构式IV如下:



[0025] 本发明解决该技术问题所采用的另一技术方案是,一种呋喃唑酮代谢物的人工抗原的制备方法,步骤如下:

[0026] (1) 取所述呋喃唑酮代谢物的半抗原,溶解于二甲基甲酰胺(DMF)中,搅拌充分后,加入碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),其中,所述半抗原、碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的重量比为5:4:3,室温下搅拌4-8h,既得半抗原活化酯;

[0027] (2) 称取载体蛋白,所述载体蛋白与半抗原的摩尔当量比为30:1,使所述载体蛋白充分溶解在0.01moI/L的PBS溶液中,形成载体蛋白溶液,在搅拌下将半抗原活化酯逐滴缓

慢滴加至所述载蛋白溶液中,并在室温下搅拌,16-24h;

[0028] (3) 将步骤(2)所得溶液通过0.01mol/L的PBS溶液室温透析3天,每天换3次透析液;

[0029] (4) 分装,于4℃保存备用。

[0030] 进一步,所述载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA),卵清蛋白(OVA),人血清白蛋白(HAS)或血蓝蛋白(KLH)中的任意一种。

[0031] 本发明解决该技术问题所采用的另一技术方案是,一种呋喃唑酮代谢物的单克隆抗体的制备方法,步骤如下:

[0032] (i) 以呋喃唑酮代谢物的人工抗原为免疫原,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;

[0033] (ii) 采步骤(i)处理后的小鼠尾部静脉血检测血清效价,如抗体效价不达60000,需加强免疫,待抗体效价不再升高后,以100μg免疫原进行皮下加强免疫,5天后取小鼠脾细胞与SP20细胞融合;

[0034] (iii) 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;

[0035] (iv) 用ELISA对步骤(iii)处理后的细胞上清进行检测,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;

[0036] (v) 将所述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,既得呋喃唑酮代谢物的单克隆抗体。

[0037] 所述制备方法可得到高纯度、高特异性的单克隆抗体,所述单克隆抗体在检测水产品中呋喃唑酮代谢物残留分析中应用。

[0038] 本发明解决该技术问题所采用的另一技术方案是,呋喃唑酮代谢物的人工抗原和呋喃唑酮代谢物的单克隆抗体在检测呋喃唑酮代谢物AOZ中的应用,包括如下步骤:将所述的人工抗原作为包被原包被在酶标板上,将所述呋喃唑酮代谢物的单克隆抗体加入微孔板中;采用竞争法检测待检样本中呋喃唑酮代谢物AOZ的含量。

[0039] 与现有技术相比,具有如下积极效果:传统方案的AOZ半抗原结构均无法保留待测物的硝基端,使得半抗原、抗原制备获得的抗体均存在特异性差、亲和力低等不足。本发明中提供了一种新型AOZ衍生物半抗原,以及基于该半抗原制备的一种人工抗原,阐述了两者的制备方法与应用。其思路是将AOZ衍生化,获得具有活性基团和双键刚性支撑手臂的衍生物,同时还完整的保留了AOZ衍生物的特征结构,对其电子云密度无影响,同时为了增强半抗原的免疫原性制备出高质量的抗体,该抗体可以特异性识别AOZ衍生物。

[0040] 该思路的有益效果体现在:(1) 引入具有刚性支撑作用的双键手臂,使得AOZ的结构特征明显增强,利于决定簇的良好呈现;(2) 制备的半抗原完整的保留了AOZ衍生物的特征结构,对其电子云密度无影响,使得小分子半抗原的免疫原性明显增强,有利于刺激动物免疫应答产生特异性更强、灵敏度更高的抗体;(3) 本发明提供的AOZ的快速检测方法最低检测限可达0.05ng/g。

[0041] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步说明。

附图说明

- [0042] 图1是本发明的呋喃唑酮代谢物的半抗原的合成路线。
- [0043] 图2是本实施例1中化合物 II 的ESI-MS图谱。
- [0044] 图3是本实施例1中化合物 II 的核磁共振氢谱图谱。
- [0045] 图4是本实施例1中呋喃唑酮代谢物的半抗原的ESI-MS图谱。
- [0046] 图5是本实施例1中呋喃唑酮代谢物的半抗原的核磁共振氢谱图谱。
- [0047] 图6是本实施例4中的呋喃唑酮代谢物的人工抗原为免疫原制备的抗体建立的对AOZ衍生物的抑制曲线。

具体实施方式

[0048] 实施例1

[0049] 如图1-图5所示,本实施例1的呋喃唑酮代谢物AOZ衍生半抗原通过以下方法制备,步骤如下:

[0050] (a) 将2.0g (即7.1mmol) 的化合物I溶于10mL乙醇中,加入6mol/L的氢氧化锂溶液将化合物I的乙醇溶液的PH值调至10-12,室温反应15~26h,然后加入40mL纯化水,所得溶液通过1M的稀盐酸将PH值调至4~5,过滤,烘干得到1.1g化合物 II。

[0051] ESI-MS: 167 [M-CH₂CH₂CH₂COOH-1], 252 [M-1], 288 [M+2H₂O-1], 315 [2×167-H₂O-1], 505 [2M-1], 537 [2M+MeOH-1];

[0052] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃, TMS): δ 10.50 (s, 1H), 8.20 (d, 1H), 7.35 (d, 1H), 7.15-7.19 (dd, 1H), 4.23 (t, 2H), 2.66 (t, 2H), 2.26 (m, 2H)。

[0053] (b) 将0.5g (即2.0mmol) 的化合物 II 溶解于10mL甲醇中,加入0.24g (即2.4mmol) 的呋喃唑酮代谢物AOZ,于60~70℃反应2h,反应完毕,冷却至室温,过滤,得0.32g呋喃唑酮代谢物的半抗原。所述半抗原的结构式III及其合成路线见图1。

[0054] ESI-MS: 338 [M+1];

[0055] ¹H NMR (600MHz, DMSO, TMS): δ 12.16 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.16 (d, 1H), 7.39 (d, 1H), 7.23 (dd, 1H), 4.55 (m, 2H), 4.19 (t, 2H), 3.98 (t, 2H), 2.45 (t, 2H), 2.04 (m, 2H)。

[0056] 实施例2

[0057] 本实施例2是呋喃唑酮代谢物AOZ的人工抗原,所述人工抗原包括免疫原和包被原。免疫原与包被原的不同之处在于偶联的载体蛋白种类,所述免疫原采用实施例1的半抗原,载体蛋白采用牛血清蛋白(BSA);所述包被原采用实施例1的半抗原,载体蛋白采用卵清蛋白(OVA)。

[0058] 本实施例2是呋喃唑酮代谢物AOZ的包被原通过以下方法制备,其步骤依次如下:

[0059] (1) 取10.0mg实施例1的半抗原,溶解于0.5mL二甲基甲酰胺(DMF)中,搅拌充分后,加入8.0mgEDC和6.0mg 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30.6mg卵清蛋白(OVA),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1的半抗原与卵清蛋白(OVA)的摩尔比为30:1。

[0064] 本实施例2是呋喃唑酮代谢物AOZ的免疫原通过以下方法制备,其步骤依次如下:

[0065] (1') 取10.0mg实施例1的半抗原,溶解于0.5mI二甲基甲酰胺(DMF)中,搅拌充分后,加入8.0mgEDC和6.0mg 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;

[0066] (2') 称取50.4mg牛血清白蛋白(BSA),使其充分溶解在4mI的浓度为0.01moI/L的PBS溶液中,形成载体蛋白溶液,在搅拌下将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;

[0067] (3') 步骤(2')制得的溶液用0.01moI/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;

[0068] (4') 分装,于4℃保存备用。

[0069] 实施例1的半抗原与牛血清白蛋白的摩尔比为30:1。

[0070] 其中,以下提及的免疫原式(III)-BSA即本实施例2的呋喃唑酮代谢物AOZ的免疫原;包被原式(III)-OVA即本实施例2的呋喃唑酮代谢物AOZ的包被原。

[0071] 实施例3

[0072] 本实施例的呋喃唑酮代谢物的单克隆抗体通过以下方法制备,其步骤如下:

[0073] 将实施2的免疫原式(III)-BSA,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60000,需加强免疫,待抗体效价不再升高后,以100μg免疫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。

[0074] ELISA间接竞争法测定抗体阳性滴度以3倍于阴性血清的测定值为准,结果表明包被原式(III)-OVA对应的抗血清(Ab-式(III))效价为1:81000。

[0075] 实施例4

[0076] 单克隆抗体的特异性及灵敏度。

[0077] 4.1酶标板的制备方法

[0078] 用PH9.6的碳酸盐缓冲液作包被稀释液,将实施例2的式(III)-OVA稀释至0.2μg/mI,按100μL/孔加入聚苯乙烯微孔板中,4℃包被过夜,甩干,按250μL/孔加入含1%BSA,磷酸盐缓冲液中37℃封闭1h,甩干,干燥后真空包装保存。

[0079] 4.2抗体的配制

[0080] 用含0.05%叠氮钠,PH7.4的磷酸盐缓冲液,将实施例3的单克隆抗体稀释至0.05μg/mI,4℃保存。

[0081] 4.3标准溶液的配制

[0082] 呋喃唑酮代谢物AOZ的衍生物标准溶液为精确称量呋喃唑酮代谢物AOZ的衍生物

标准品10mg,先用乙腈1mL溶解,再用PH7.4的磷酸盐缓冲液配制系列浓度为0 μ g/L,0.05 μ g/L,0.1 μ g/L,0.2 μ g/L,0.4 μ g/L,以及0.8 μ g/L的呋喃唑酮代谢物AOZ的衍生物标准溶液。

[0083] 4.4评价结果

[0084] 向包被有(III)-OVA的微孔酶标板中加入呋喃唑酮代谢物AOZ的衍生物标准溶液50 μ L/孔,再加入配制好的单克隆抗体溶液50 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C反应0.5h;甩干后,加入洗液300 μ L/孔,洗涤3次后拍干;再加入酶标二抗100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C反应0.5h;再次洗涤3次后拍干,分别加入50 μ L/孔的显色液A和显色液B,37 $^{\circ}$ C反应15min;加入2M硫酸50 μ L/孔终止,设定酶标仪于450nm波长测定每孔的OD值。结果如表1和图6。

[0085] 表1:ELISA测试不同浓度呋喃唑酮代谢物AOZ的衍生物标准品OD值

[0086]	AOZ 衍生物浓度 (μ g/L)	0	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8
	OD 值	2.2502	1.6464	1.0253	0.6431	0.3618	0.1994
	B/B0	100%	73.17%	45.56%	28.56%	16.08%	8.86%

[0087] 其中,B/B0是指不同浓度的标准品测试孔OD值与含量为0的标准品测试孔OD值的比值。从表1中可看出,当呋喃唑酮代谢物AOZ的衍生物含量为0.05 μ g/L时,其B/B0值为73.17%,说明其检测OD与含0 μ g/L浓度的呋喃唑酮代谢物AOZ的衍生物测试孔OD值有明显差异,故ELISA对呋喃唑酮代谢物AOZ的衍生物检测灵敏度均可达0.05 μ g/L。

[0088] 以上对本发明实施例所提供的技术方案进行了详细介绍,本文中应用了具体个例对本发明实施例的原理以及实施方式进行了阐述,以上实施例的说明只适用于帮助理解本发明实施例的原理;同时,对于本领域的一般技术人员,依据本发明实施例,在具体实施方式以及应用范围上均会有改变之处,综上所述,本说明书内容不应理解为对本发明的限制。

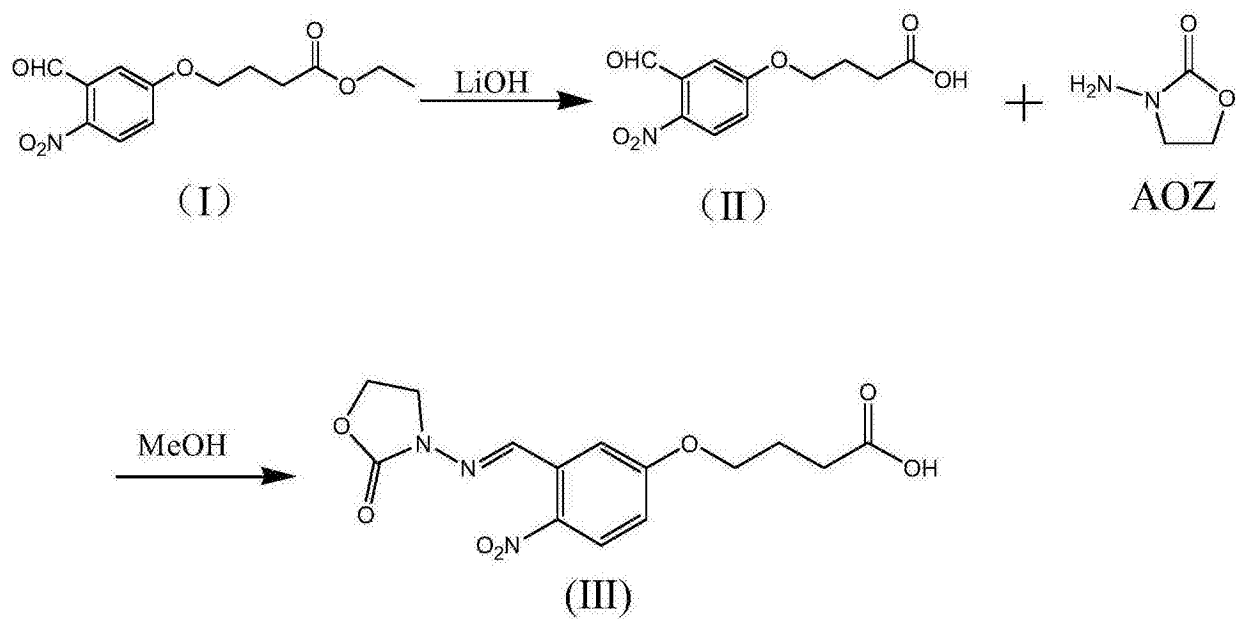


图1

■ -Q1: Exp 2: 0.140 to 0.321 min from Sample 12 (CHO) of 20161230S1612244.wiff (Heated Nebulizer), subtracted (1.765 to 2.126 min), Smoothed, ...

Max: 1

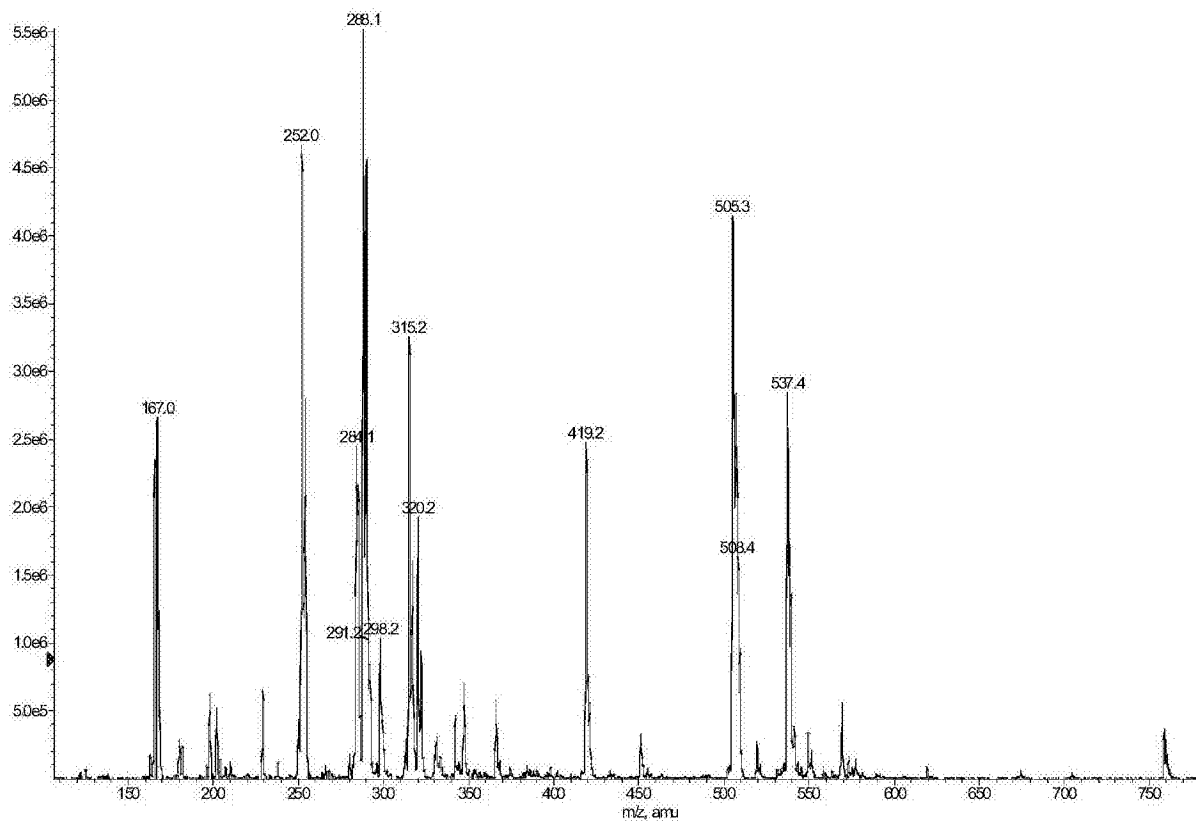


图2

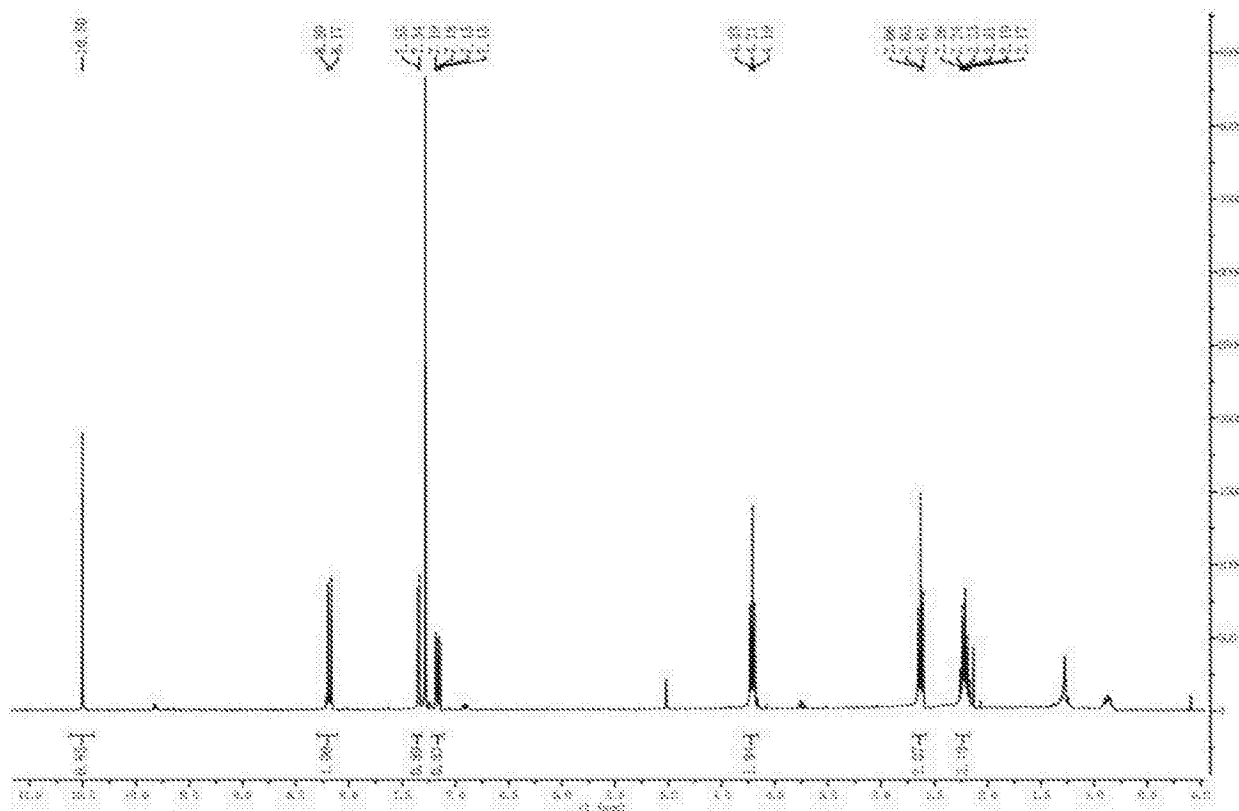


图3

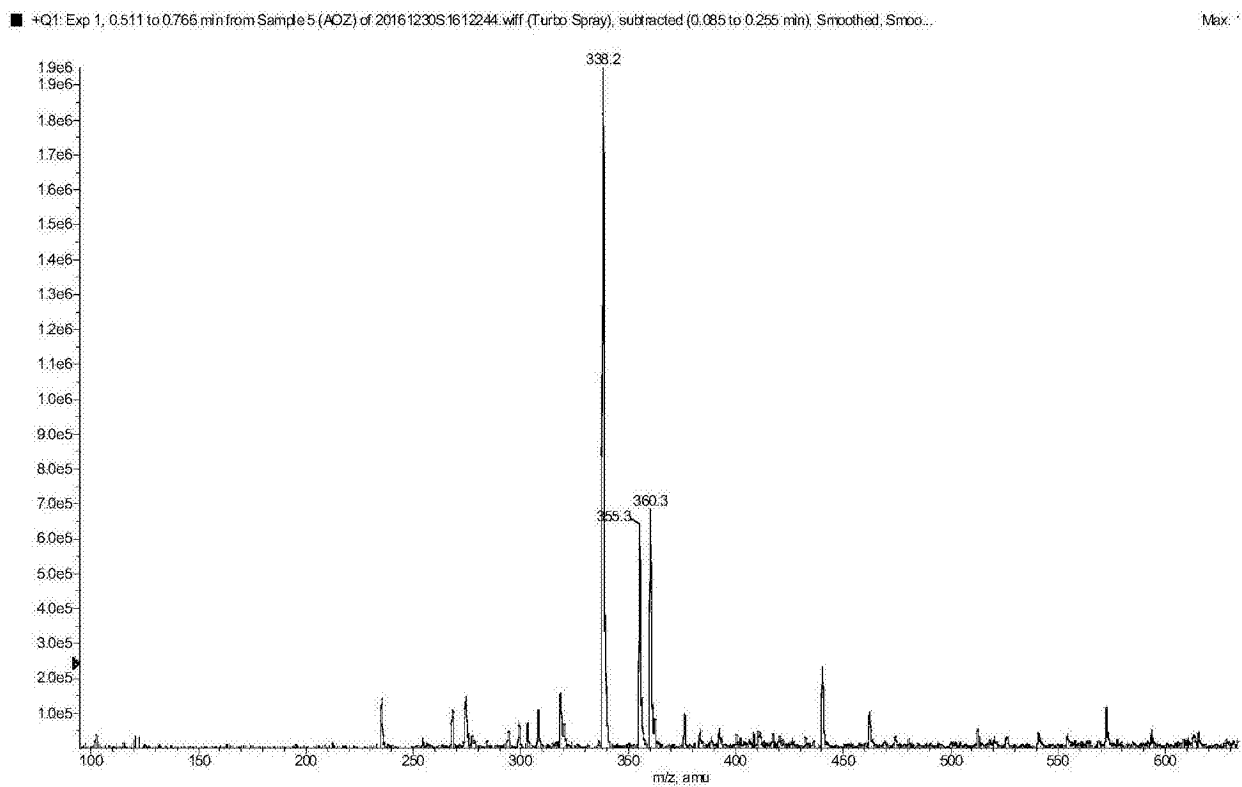


图4

专利名称(译)	呋喃唑酮代谢物AOZ衍生化半抗原、人工抗原的制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN106866568A	公开(公告)日	2017-06-20
申请号	CN201710022552.6	申请日	2017-01-12
[标]申请(专利权)人(译)	广州润坤生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州润坤生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州润坤生物科技有限公司		
[标]发明人	胡睿 李斌		
发明人	胡睿 李斌		
IPC分类号	C07D263/26 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/531		
CPC分类号	C07D263/26 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/531		
代理人(译)	胡坚		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种呋喃唑酮代谢物AOZ衍生化半抗原、人工抗原的制备方法及其应用，所述的半抗原引入的活性手臂，完整的保留了AOZ衍生物的特征结构，对其电子云密度无影响，又具有可以与载体蛋白偶联的活性基团，反应条件温和，操作步骤简单；制备的人工抗原可与抗体特异性的结合，具有高效价、高灵敏度、高精确性等特点，可快速检测各类产品中呋喃唑酮代谢物的残留。

