



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104237499 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 24

(21) 申请号 201410464952. 9

(22) 申请日 2014. 09. 13

(71) 申请人 佛山市质量计量监督检测中心
地址 528000 广东省佛山市禅城区影荫二街
2号

(72) 发明人 潘嘉慧 田峻 沈国权 赵亮亮
杨辉 朱海云

(74) 专利代理机构 佛山市南海智维专利代理有
限公司 44225

代理人 梁国杰

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

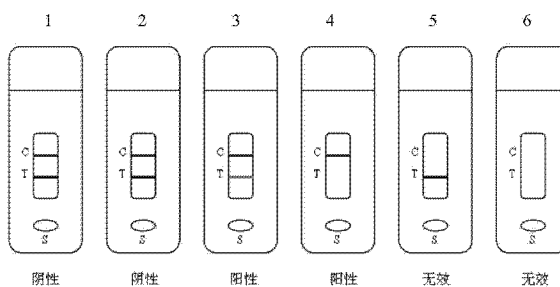
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

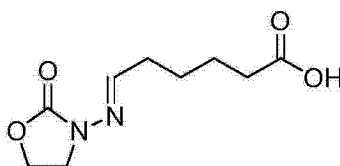
用于检测呋喃唑酮代谢物的免疫抗原和包被抗原的制备

(57) 摘要

本发明公开一种用于检测呋喃唑酮代谢物的免疫抗原和包被抗原的制备,其特征在於:采用活泼硫酯法,将呋喃唑酮代谢物半抗原与载体蛋白进行偶联,制备呋喃唑酮代谢物免疫抗原和包被抗原;所述呋喃唑酮代谢物半抗原通过缩醛法为呋喃唑酮代谢物引入间隔臂制备而成。本发明通过优化偶联技术路线,以达到结构优化,提高抗体质量,从而进一步增加呋喃唑酮代谢物免疫胶体金快速检测的灵敏度和特异性的免疫抗原和包被抗原。

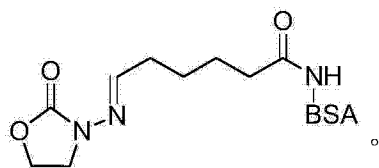


1. 一种用于检测呋喃唑酮代谢物的免疫抗原和包被抗原的制备,其特征在于:采用活泼硫酯法,将呋喃唑酮代谢物半抗原与载体蛋白进行偶联,制备呋喃唑酮代谢物免疫抗原和包被抗原;所述呋喃唑酮代谢物半抗原通过缩醛法为呋喃唑酮代谢物引入间隔臂制备而成,具有式(I)所示结构,



(I)

所述呋喃唑酮代谢物免疫抗原和包被抗原,具有式(II)所示结构,



(II)

2. 根据权利要求1所述的用于检测呋喃唑酮代谢物的免疫抗原和包被抗原的制备,其特征在于:所述载体蛋白是指常规的可作为免疫载体使用的可溶性蛋白质。

3. 根据权利要求1所述的用于检测呋喃唑酮代谢物的免疫抗原和包被抗原的制备,其特征在于:所述载体蛋白为牛血清白蛋白和/或卵清蛋白和/或血蓝蛋白和/或人血清蛋白。

用于检测呋喃唑酮代谢物的免疫抗原和包被抗原的制备

技术领域

[0001] 本发明涉及动物源性食品中呋喃唑酮代谢物检测技术领域,尤其是指用于检测呋喃唑酮代谢物的免疫抗原和包被抗原的制备。

背景技术

[0002] 呋喃唑酮,即 3-(5-硝基糠醛缩氨基)-2-唑烷酮,又称痢特灵,是硝基呋喃类广谱抗生素中最具代表性的一种。该类药物的基本结构为一个呋喃环,位于第五个碳原子连接有一个硝基,具有较强的抗菌作用。呋喃唑酮价格便宜,疗效确切,在畜禽及水产养殖上应用非常广泛。呋喃唑酮在生物体内代谢速率很快,在很短时间内即代谢完全,研究证明呋喃唑酮在动物体内可代谢为 3-氨基-2-恶唑烷酮(AOZ)。代谢的部分化合物分子与组织蛋白结合成为可保持长期稳定的结合态,从而在体内残留,残留时间达数周之久,甚至进入食物链中,在自然环境中长期残留。近年来研究表明呋喃唑酮及其代谢物具有相当大的毒性和副作用,能诱导有机体基因突变、畸胎、癌症,因而引起了人们的高度重视。

[0003] 呋喃唑酮及其代谢物的毒副作用导致各国禁止此类药物在治疗和饲料中使用。欧盟、美国、中国等国家均将呋喃唑酮列为禁用药。尽管我国政府和相关组织对该类药物的残留给予了高度重视,但其在动物源性食品中的残留仍时有发生。

[0004] 国内外已经发表有关硝基呋喃类抗生素残留检测方法的文献中,早期的文献报道多数是检测原药化合物。但研究表明原药半衰期通常只有几小时,而其代谢产物则长达数周仍能在动物组织中残留。因此各国已开始关注其代谢物的检出。目前,对呋喃唑酮代谢物的检测方法有色谱分析法、免疫检测法(酶联免疫分析方法)。色谱分析法(高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法)样品前处理复杂,费用高;免疫分析法具有快速、灵敏度高、高通量的特点。其中免疫分析方法有酶联免疫法、胶体金免疫层析技术等。酶联免疫分析法操作相对繁琐,对操作人员的专业知识要求较高,相比之下,胶体金免疫层析技术基于肉眼水平的检测,不需任何仪器设备和试剂,比酶联免疫法省略了加显色剂和终止液的步骤,更简化的操作,体积小,易携带,几分钟就可用肉眼观察到颜色鲜明的实验结果,并可保存实验结果。

[0005] 现有胶体金免疫层析技术在呋喃唑酮代谢物检测的灵敏度和特异性还是存在缺陷,因而,有必要在现有技术,从优化免疫抗原、包被抗原的结构及偶联技术角度出发,提高抗体的特异性、亲和力,从而增加呋喃唑酮代谢物免疫胶体金快速检测的灵敏度和特异性。

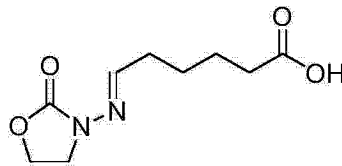
发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题是提供一种通过优化偶联技术路线,以达到结构优化,提高抗体质量,从而进一步增加呋喃唑酮代谢物免疫胶体金快速检测的灵敏度和特异性的免疫抗原和包被抗原。

[0007] 为解决上述技术问题所采用的技术方案:一种用于检测呋喃唑酮代谢物的免疫抗

原和包被抗原的制备,其特征在于:采用活泼硫酯法,将呋喃唑酮代谢物半抗原与载体蛋白进行偶联,制备呋喃唑酮代谢物免疫抗原和包被抗原;所述呋喃唑酮代谢物半抗原通过缩醛法为呋喃唑酮代谢物引入间隔臂制备而成,具有式(I)所示结构,

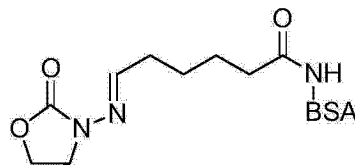
[0008]



(I)

[0009] 所述呋喃唑酮代谢物免疫抗原和包被抗原,具有式(II)所示结构,

[0010]



(II)

[0011] 在上述基础上,所述载体蛋白是指常规的可作为免疫载体使用的可溶性蛋白质。

[0012] 在上述基础上,所述载体蛋白为牛血清白蛋白和 / 或卵清蛋白和 / 或血蓝蛋白。

[0013] 采用本发明所带来的有益效果:

[0014] 1、保留呋喃唑酮代谢物的抗体识别部位,呋喃环部分,从胺基端引入间隔臂,提高了半抗原的免疫原性,同时保留呋喃唑酮代谢物的骨架结构,提高特异性,确保半抗原不受蛋白的屏蔽作用;

[0015] 2、引入的间隔臂具有一定的长度和适当的极性,将载体蛋白对小分子的电子排布和空间结构的影响降到最低;

[0016] 3、合成的半抗原有利于提高半抗原与载体蛋白的偶联比,并且能更好地暴露半抗原的抗原决定簇;

[0017] 4、对牛奶,蜂蜜,虾、鸡、鱼、猪肉组织,检测灵敏度达 $1.0_{\mu}g/kg$,特异性证明与呋喃唑酮代谢物的交叉反应率为100%,与其余三个硝基呋喃类化合物代谢物(呋喃妥因、呋喃它酮、呋喃西林代谢物)以及动物源性食品中常检的其他药物(氯霉素、四环素类、磺胺类、喹诺酮类)没有交叉反应。

附图说明

[0018] 图1为采用本发明的检测卡及结果判定示意图。

[0019] 图中,1、2为阴性结果,3、4为阳性结果,5、6为无效结果,C为控制线,T为检测线,S为加样孔。

具体实施方式

[0020] 1 缩醛法合成呋喃唑酮代谢物半抗原

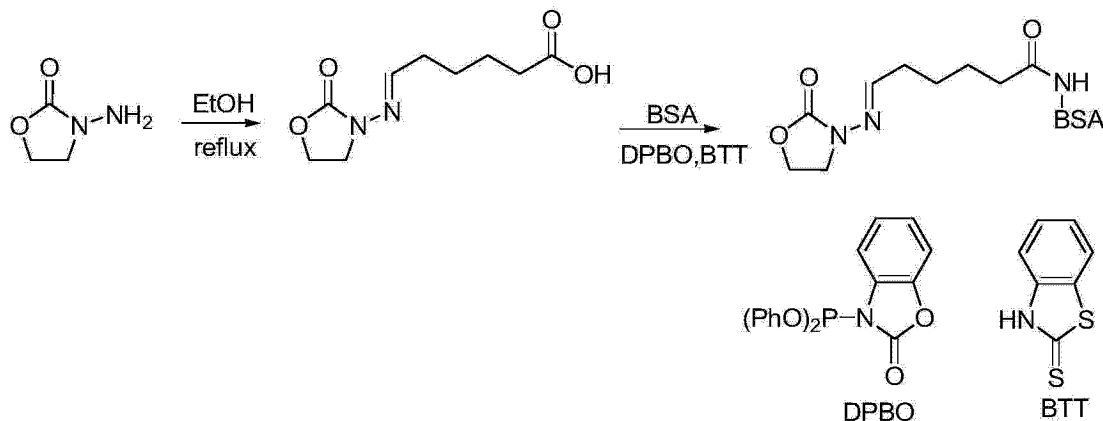
[0021] 将 200mL 乙醇加入到 500mL 的圆底烧瓶中,依次加入呋喃唑酮 (10.2g,0.1mol) 和 6-氧代己酸 (15.6g,0.12mol),加热回流 3 小时。停止加热,自然冷却反应液至室温,静置过夜。抽滤,滤饼用乙醇洗涤 (20.0mL×3),50℃干燥 5 小时后得到 20.4 克含有羧基的呋喃唑酮衍生物。制备的呋喃唑酮代谢物半抗原 (I)。

[0022] 2 活泼硫酯法合成呋喃唑酮代谢物免疫抗原

[0023] 取呋喃唑酮半抗原 (0.214g,1.0mmol) 溶于 30mL 二甲基甲酰胺 (Nimethylformamide,DMF) 中,冷却至 0-4℃,搅拌下加入 3-磷酰化二苯酯苯并 [D] 噁唑 -2-酮 [2(3H)-Benzoxazolone,3-(diphenoxyphosphiny)-(9CI),DPBO] (0.351g,1.0mmol) 和 苯并噻唑硫酮 (Benzothiazolethione,BTT) (0.167g,1.0mmol),保温反应过夜。加入 100mL 10% 碳酸氢钠溶液和 100mL 水,继续搅拌 1 小时,抽滤,滤饼用水洗涤 (50mL×2) 后用 20mL DMF 溶解为 A 液。称取 2.0g 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin,BSA) 溶于 200mL 的浓度为 1.0mol/L 的 PBS (pH = 8) 中,加入 5mL DMF,在 0-5℃ 下搅拌溶解为 B 液,将上述 A 液缓慢滴加到 B 液中,保温反应 8 小时,离心取上清液,4℃ 下用生理盐水恒温透析 3 天,每天更换 3 次透析液,冷冻干燥后得到呋喃唑酮免疫原 (II)。

[0024] 合成路线如下所示:

[0025]



[0026] 3 活泼硫酯法合成呋喃唑酮代谢物包被抗原

[0027] 取呋喃唑酮半抗原 (0.214g,1.0mmol) 溶于 30mL 的 DMF 中,冷却至 0-4℃,搅拌下加入 DPBO (0.351g,1.0mmol) 和 BTT (0.167g,1.0mmol),保温反应过夜。加入 100mL 10% 碳酸氢钠溶液和 100mL 水,继续搅拌 1 小时,抽滤,滤饼用水洗涤 (50mL×2) 后用 20mL DMF 溶解为 A 液。称取 3.8g 卵清白蛋白 (Ovalbumin,OVA) 溶于 200mL 的浓度为 1.0mol/L 的 PBS (pH = 8) 中,加入 5mL DMF,在 0-5℃ 下搅拌溶解为 B 液,将上述 A 液缓慢滴加到 B 液中,保温反应 8 小时,离心取上清液,4℃ 下用生理盐水恒温透析 3 天,每天更换 3 次透析液,冷冻干燥后得到呋喃唑酮包被原。

[0028] 4 呋喃唑酮代谢物单克隆抗体的制备

[0029] 用呋喃唑酮代谢物免疫抗原多次免疫 BALB/C 小鼠,免疫剂量为 120 μg/只,取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞在体外融合形成杂交瘤细胞,经选择性培养基筛选,得到阳性杂交瘤细胞株。将其注入小鼠腹腔获取腹水,或利用体外细胞培养收集培养上清液等方式,制备呋喃唑酮代谢物单克隆抗体。

[0030] 5 羊抗鼠 IgG 的制备

[0031] 以上述步骤 3 制备的鼠源抗体为免疫原,对无病原体羊进行免疫,得到羊抗鼠 IgG。

[0032] 6 胶体金的制备

[0033] 用柠檬酸三钠还原法制备得万分之二的胶体金溶液,其紫外-可见光扫描最大吸收波长为 525nm,金溶胶粒径约为 30nm。

[0034] 7 胶体金标记呋喃唑酮代谢物单克隆抗体的制备

[0035] 量取胶体金溶液 10mL,将其 pH 值调整到 7.8,搅拌并加入呋喃唑酮代谢物单克隆抗体 0.8mg 进行标记,持续搅拌 30min 后,加入 20%的 BSA 终止反应,10000rpm 离心 30min,取沉淀用金标缓冲液溶解至 1mL 备用。

[0036] 8 免疫金的处理及干燥

[0037] 使用划膜喷金一体机将制备好的金标抗体均匀喷涂到金标垫上,喷金参数 4uL/cm,晾干备用。

[0038] 9 抗原偶联物包被

[0039] 将呋喃唑酮代谢物包被抗原配制成浓度 5 ~ 10mg/mL,包被到 NC 膜的 T 线位置,C 线位置包被质控线羊抗鼠 IgG,浓度为 1.0mg/mL,包膜参数 1.0 μ g/cm²,晾干备用。

[0040] 10 检测卡的组装和制备

[0041] 将干燥好的样品垫,金标垫,NC 膜,吸水纸,按顺序粘贴到 PVC 底板上,切割成条,组装成卡,分装到铝箔袋,袋内装入干燥剂,密封保存。

[0042] 11 呋喃唑酮代谢物快速检测卡的实施操作方法

[0043] 11.1 样品准备

[0044] 11.1.1 鸡肉、猪肉、虾肉、鱼肉组织

[0045] 取 2g 待测样品,用均质器充分均质后,置于 50mL 离心管中。加入 4mL 去离子水,0.5mL 1mol/L 盐酸溶液,200 μ L 0.01mol/L 对羟基苯甲醛或邻氨基苯甲醛,涡旋震荡 3min,在 60°C 中放置 2h 或超声 1h。取出冷却至室温,依次加入 5mL 0.1mol/L 磷酸氢二钾溶液,0.4mL 1mol/L 氢氧化钠溶液,5mL 乙酸乙酯,涡旋振荡 1min,4000r/min 离心 10min,将上层乙酸乙酯层提取液取至另一洁净容器中,水相再用 5mL 乙酸乙酯重复萃取两次,合并乙酸乙酯层,于 60°C 下氮气吹干,加入 1mL 正己烷涡旋震荡 1min,再加入 1mL 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液,涡旋震荡 1min,5000r/min 离心 10min,吸取下层水相溶液用于分析。

[0046] 11.1.2 牛奶

[0047] 取 5mL 待测样品于 50mL 离心管中。加入 250 μ L 0.5mol/L 亚硝基铁氰化钾 ($K_2Fe(CN)_5 \cdot NO_3 \cdot H_2O$) 水溶液,250 μ L 1mol/L 硫酸锌 ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) 水溶液,涡旋震荡 1min,4°C 下 4000r/min 离心 10min,取上清液,以下步骤同 11.1.1。

[0048] 11.1.3 蜂蜜

[0049] 取 2g 待测样品于 50mL 离心管中,以下步骤同 11.1.1。

[0050] 11.2 检测

[0051] 撕开铝箔包装,取出检测卡。使用包装内的滴管,滴两滴检体(约 75 μ L)于加样孔中,等待检体吸附移动至测试区中,等待 5 分钟后即可判读结果。

[0052] 11.3 结果判读

[0053] 11.3.1 阴性结果:T 线比 C 线深或一样深,表示检品呋喃唑酮代谢物浓度低于

0.1 μ g/kg。

[0054] 11.3.2 阳性结果 :T 线比 C 线淡或几乎看不见,表示检品呋喃唑酮代谢物浓度高于或等于 0.1 μ g/kg(包括看不到 T 线)。

[0055] 11.3.3 无效结果 :如果测试结果未出现任何色带或是 C 线未出现,此时表示此试剂已失效、过期或操作不当,需另做一次测试。

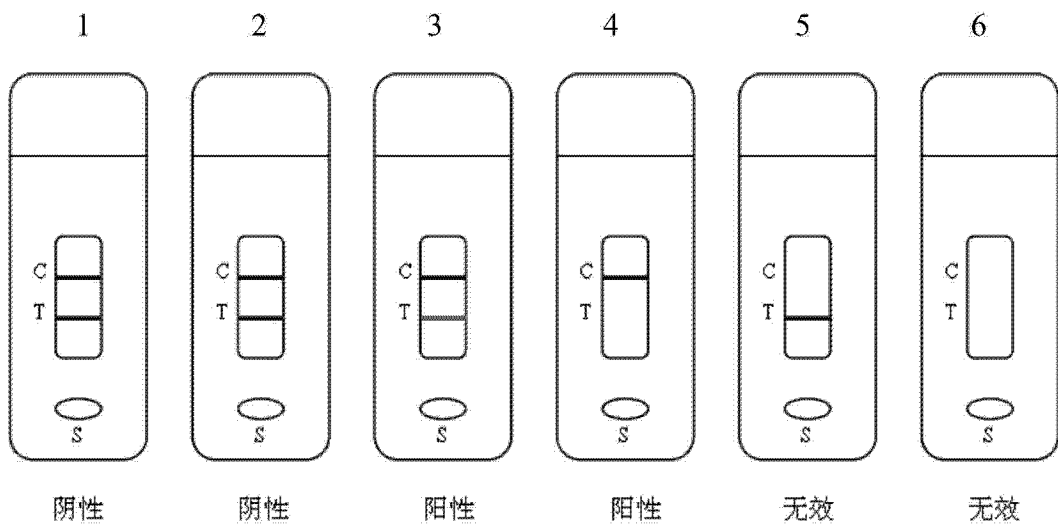
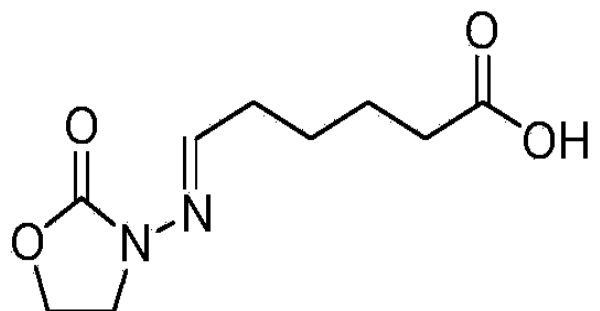


图 1

专利名称(译)	用于检测呋喃唑酮代谢物的免疫抗原和包被抗原的制备		
公开(公告)号	CN104237499A	公开(公告)日	2014-12-24
申请号	CN201410464952.9	申请日	2014-09-13
[标]申请(专利权)人(译)	佛山市质量计量监督检测中心		
申请(专利权)人(译)	佛山市质量计量监督检测中心		
当前申请(专利权)人(译)	佛山市质量计量监督检测中心		
[标]发明人	潘嘉慧 田峻 沈国权 赵亮亮 杨辉 朱海云		
发明人	潘嘉慧 田峻 沈国权 赵亮亮 杨辉 朱海云		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/532		
代理人(译)	梁国杰		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种用于检测呋喃唑酮代谢物的免疫抗原和包被抗原的制备，其特征在于：采用活泼硫酸酯法，将呋喃唑酮代谢物半抗原与载体蛋白进行偶联，制备呋喃唑酮代谢物免疫抗原和包被抗原；所述呋喃唑酮代谢物半抗原通过缩醛法为呋喃唑酮代谢物引入间隔臂制备而成。本发明通过优化偶联技术路线，以达到结构优化，提高抗体质量，从而进一步增加呋喃唑酮代谢物免疫胶体金快速检测的灵敏度和特异性的免疫抗原和包被抗原。



(I)