



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110818599 A

(43)申请公布日 2020.02.21

(21)申请号 201910953550.8

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2019.10.09

C07C 311/44(2006.01)

(71)申请人 广东达元绿洲食品安全科技股份有限公司

C07C 303/38(2006.01)

地址 510535 广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道11号A2栋第三层

C07C 303/40(2006.01)

申请人 广州达元食品安全技术有限公司
广东中检达元检测技术有限公司
广东达元食品药品安全技术有限公司

C07C 303/44(2006.01)

(72)发明人 李斌 王莹莹 邬秀锋 刘远高
苏振贤 黄家怡

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 1/107(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有限公司 44205

权利要求书2页 说明书12页 附图1页

代理人 郑莹

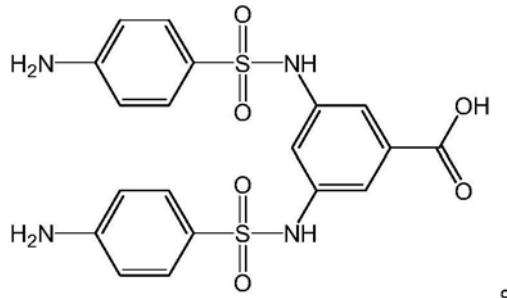
(54)发明名称

一种磺胺类药物半抗原、人工抗原及其在免疫检测中的应用

(57)摘要

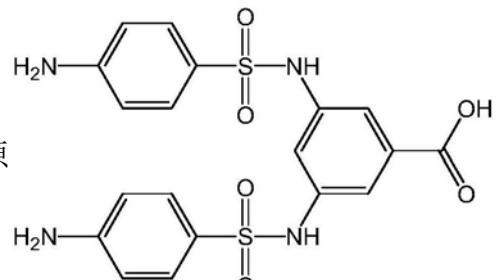
本发明公开了一种磺胺类药物半抗原、人工抗原及其在免疫检测中的应用，属于免疫检测领域。半抗原结构中具有两个氨基苯磺酰胺的结构，使得制备而成的人工抗原的空间结构更突出，更有利于呈现磺胺类药物的共有特征基团氨基苯磺酰胺，提高了抗原的免疫原性，将人工抗原结合ELISA检测技术，磺胺二甲嘧啶的IC50值为0.5 μg/L；使用本发明制备的磺胺类药物胶体金免疫层析试纸条，可以实行快速、准确的检测。

1. 一种半抗原, 所述半抗原的结构式如下:

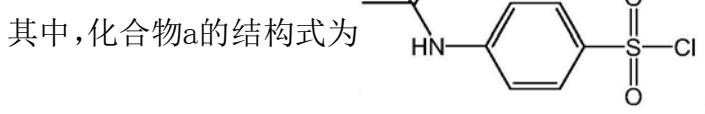


2. 一种如权利要求1所述的半抗原的制备方法, 其特征在于: 包括如下步骤:

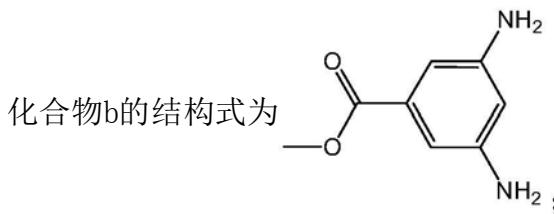
1) 化合物a和化合物b反应得到化合物c;



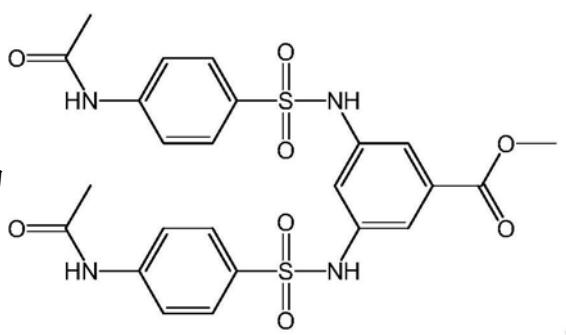
2) 化合物c水解得到半抗原



其中, 化合物a的结构式为



化合物b的结构式为



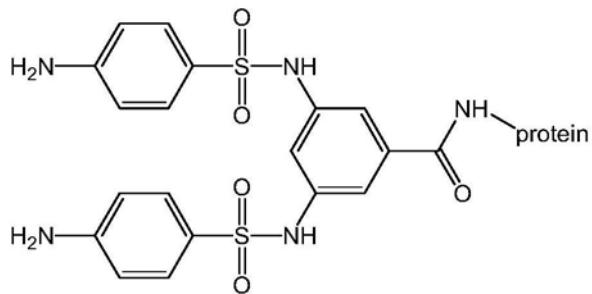
化合物c的结构式为

3. 根据权利要求2所述的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(1) 将化合物a和化合物b在三乙胺条件下发生取代反应, 经萃取和柱层析纯化后得化合物c;

(2) 化合物c在强碱条件下发生水解反应, 经萃取和重结晶后得半抗原。

4. 一种人工抗原, 所述人工抗原为权利要求1所述的半抗原与蛋白载体偶联得到, 所述人工抗原的结构式如下:

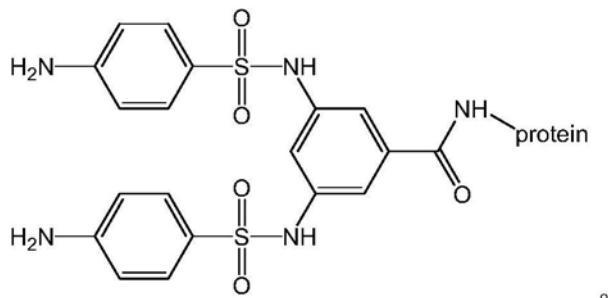


其中,protein为蛋白载体。

5. 根据权利要求4所述的人工抗原,其特征在于:蛋白载体为牛血清白蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白或血蓝蛋白中的任意一种。

6. 一种如权利要求4或5所述人工抗原的制备方法,包括如下步骤:

将权利要求1所述半抗原与蛋白载体连接,得到所述人工抗原



7. 一种磺胺类药物单克隆抗体,其特征在于:使用权利要求1所述的半抗原或权利要求4~5任一所述的人工抗原制备得到。

8. 权利要求4或5所述的人工抗原和权利要求7所述的磺胺类药物单克隆抗体在ELISA检测方法中的应用。

9. 权利要求4或5所述的人工抗原和权利要求7所述的磺胺类药物单克隆抗体在免疫层析中的应用。

10. 一种磺胺类药物胶体金免疫层析试纸条,其特征在于:试纸条中的反应膜包被有权利要求4或5所述的人工抗原;进一步地,其制备方法包括以下步骤:

1) 纳米金标记的磺胺类药物单克隆抗体的制备:将权利要求7所述的磺胺类药物单克隆抗体与纳米金在弱碱下混匀后,离心,加入金子保护剂重悬,得到纳米金标记的磺胺类药物单克隆抗体;

2) 金垫的制备:用金子稀释液将纳米金标记的磺胺类药物单克隆抗体稀释,涂抹在玻纤纤维膜上得到纳米金标记的磺胺类药物单克隆抗体金垫;

3) 用PBS缓冲液配制系列浓度的磺胺类药物标准溶液,取标准溶液滴入试纸条的上样孔中,肉眼判读T/C线显色深度,当T线显色比C线深或者一样深,则判为阴性,但T线显色比C线浅则判为阳性;通过标准溶液加标空白样本,判读结果,可实现样本中磺胺类药物的快速定量检测。

一种磺胺类药物半抗原、人工抗原及其在免疫检测中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测领域,特别涉及一种磺胺类药物半抗原、人工抗原及其在免疫检测中的应用。

背景技术

[0002] 磺胺类药物(Sulfonamides,SAs)是一类具有对氨基苯磺酰胺结构特征、用于预防和治疗细菌感染性疾病的人工合成类治疗药物。因其具有广谱、方便易得等特点,通常以亚治疗浓度的药物做为饲料添加剂以预防疾病,提高饲料的转化率和促进动物生长。但人类不合理使用甚至滥用,易造成SAs在动物组织中残留,继而通过食物链等途径在人体内蓄积,危害人类健康。世界规定了动物性食品中磺胺类药物的最高残留限量(MRLs)。除了从源头上控制SAs的滥用外,对动物源食品中药物的残留进行检测及监控,也是保障食品安全的重要措施。

[0003] 目前,磺胺类药物残留的检测方法主要有微生物学法、理化分析方法和免疫法等。微生物学法简便、费用低,但操作费时且敏感性、特异性等特性较差,在定性定量上都存在困难,不能满足现代残留检测的需要,甚至有些检测结果还达不到最高残留限量的要求。理化分析方法常作为验证方法用于测定动物组织中的药物残留,如气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)、气-质联用(GC-MS)、液-质联用(HPLC-MS)等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快速检测。而免疫学检测技术因其具有经济、快速、技术要点低、操作简便等特点,非常适用于复杂基质痕量组分的分离或检测。免疫分析检测技术现已逐渐成为快速筛选检测有毒有害残留物的主要方法之一,也为磺胺类药物的检测提供了新的途径。

[0004] 免疫分析检测技术的关键是抗原和抗体的性能决定的,而抗原和抗体的关键又是基于相应药物的半抗原。虽然磺胺类药物本身具有活性基团,但由于药物的活性基团就是磺胺类药物的强识别基团,直接制备的人工抗原存在灵敏度差、交叉反应率低的缺点,无法满足现有市场的需求。

[0005] 因此需设计出具有更高识别度的完全抗原成为亟需解决的问题。

发明内容

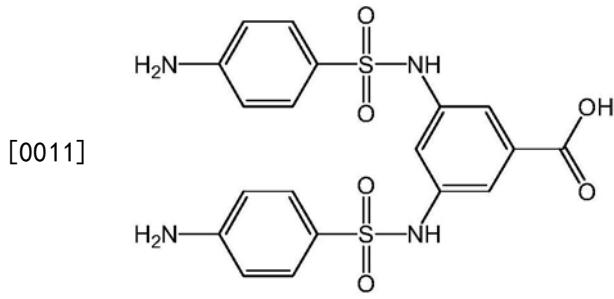
[0006] 本发明的首要目的提供一种磺胺类药物半抗原。

[0007] 本发明的再一目的提供一种磺胺类药物人工抗原。

[0008] 本发明的又一目的提供磺胺类药物人工抗原在免疫检测中的应用。

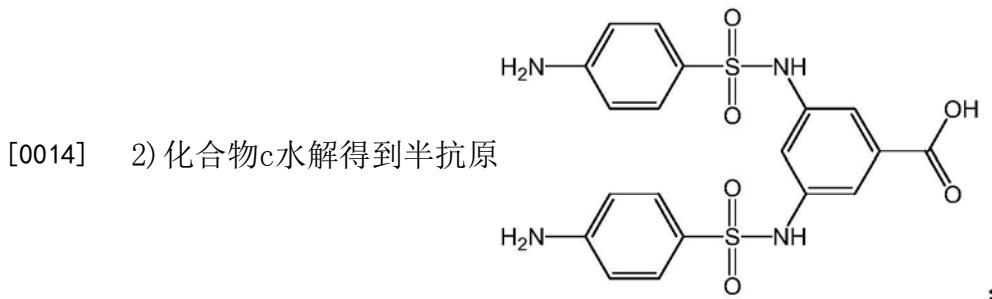
[0009] 为达到上述目的,本发明所采取的技术方案是:

[0010] 本发明第一个方面,提出了一种半抗原,所述半抗原具有的结构式如下:



[0012] 本发明第二个方面，提出了前面所述半抗原的制备方法，包括如下步骤：

[0013] 1) 化合物a和化合物b反应得到化合物c；



[0015] 其中，化合物a的结构式为

；

[0016] 化合物b的结构式为

；

[0017] 化合物c的结构式为

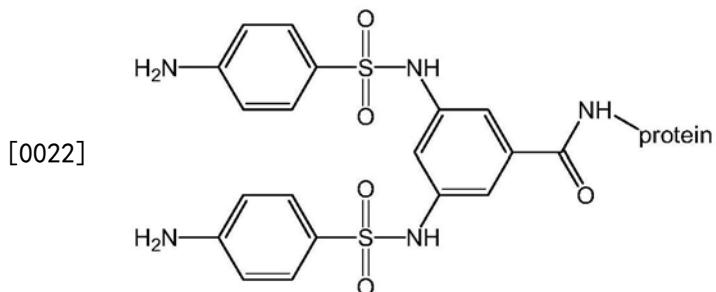
。

[0018] 根据本发明的实施例，包括以下步骤：

[0019] (1) 将化合物a和化合物b在三乙胺条件下发生取代反应，经萃取和柱层析纯化后得化合物c；

[0020] (2) 化合物c在强碱条件下发生水解反应，经萃取和重结晶后得半抗原。

[0021] 本发明第三个方面，提出了一种人工抗原，所述人工抗原为前面所述的半抗原与蛋白载体偶联得到，所述人工抗原结构式如下：

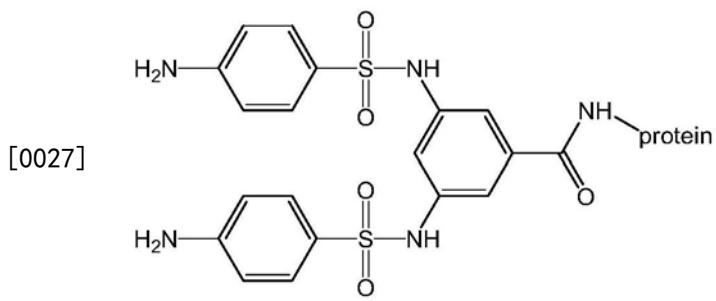


[0023] 其中,protein为蛋白载体。

[0024] 根据本发明的实施例,蛋白载体为牛血清白蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白或血蓝蛋白中的任意一种。

[0025] 本发明第四个方面,提出了一种如前面所述人工抗原的制备方法,包括如下步骤:

[0026] 将前面所述半抗原与蛋白载体连接,得到所述人工抗原



[0028] 本发明第五个方面,提出了一种碘胺类药物单克隆抗体,使用前面所述的半抗原或前面任一所述的人工抗原制备得到。

[0029] 本发明第六个方面,提出了前面所述的人工抗原和前面所述的碘胺类药物单克隆抗体在ELISA检测方法中的应用。

[0030] 本发明第七个方面,提出了前面所述的人工抗原和前面所述的碘胺类药物单克隆抗体在免疫层析中的应用。

[0031] 本发明第八个方面,提出了一种碘胺类药物胶体金免疫层析试纸条,所述试纸条中的反应膜包被有前面所述的人工抗原,在一些实施例中,制备方法包括以下步骤:

[0032] 1) 纳米金标记的碘胺类药物单克隆抗体的制备:将前面所述的碘胺类药物单克隆抗体与纳米金在弱碱下混匀后,离心,加入金子保护剂重悬,得到纳米金标记的碘胺类药物单克隆抗体;

[0033] 2) 金垫的制备:用金子稀释液将纳米金标记的碘胺类药物单克隆抗体稀释,涂抹在玻璃纤维膜上得到纳米金标记的碘胺类药物单克隆抗体金垫;

[0034] 3) 用PBS缓冲液配备系列浓度的碘胺类药物标准溶液,取标准溶液滴入试纸条的上样孔中,肉眼判读T/C线显色深度,当T线显色比C线深或者一样深,则判为阴性,但T线显色比C线浅则判为阳性;通过标准溶液加标空白样本,判读结果,可实现样本中碘胺类药物的快速定量检测。

[0035] 根据本发明的实施例,所述的碘胺类药物胶体金免疫层析试纸条,所述的金子稀释液包括Tris、牛血清蛋白、硫柳汞和蔗糖。

[0036] 本发明的有益效果是:

[0037] 本发明制备的半抗原不仅保留了碘胺类药物的共有特征基团氨基,而且在一个半

抗原的分子结构上具有了两个胺基苯磺酰胺的特征结构,使得制备的人工抗原的空间结构更突出,更有利于呈现磺胺类药物的共有特征基团胺基苯磺酰胺,提高了抗原的免疫原性和灵敏度,且对磺胺类药物具有较高的交叉反应率,将人工抗原结合ELISA检测技术,磺胺二甲嘧啶的IC50值为0.5μg/L;使用本发明制备的磺胺类药物胶体金免疫层析试纸条,实行了快速、准确的检测。

附图说明

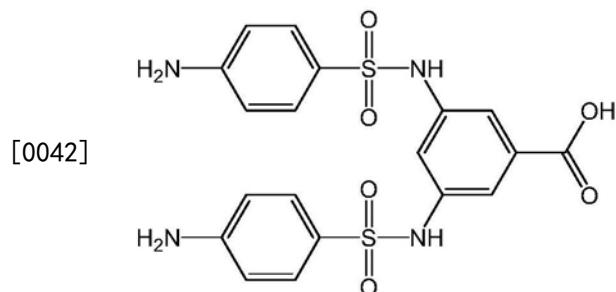
[0038] 图1为本发明制备的磺胺类半抗原质谱图。

具体实施方式

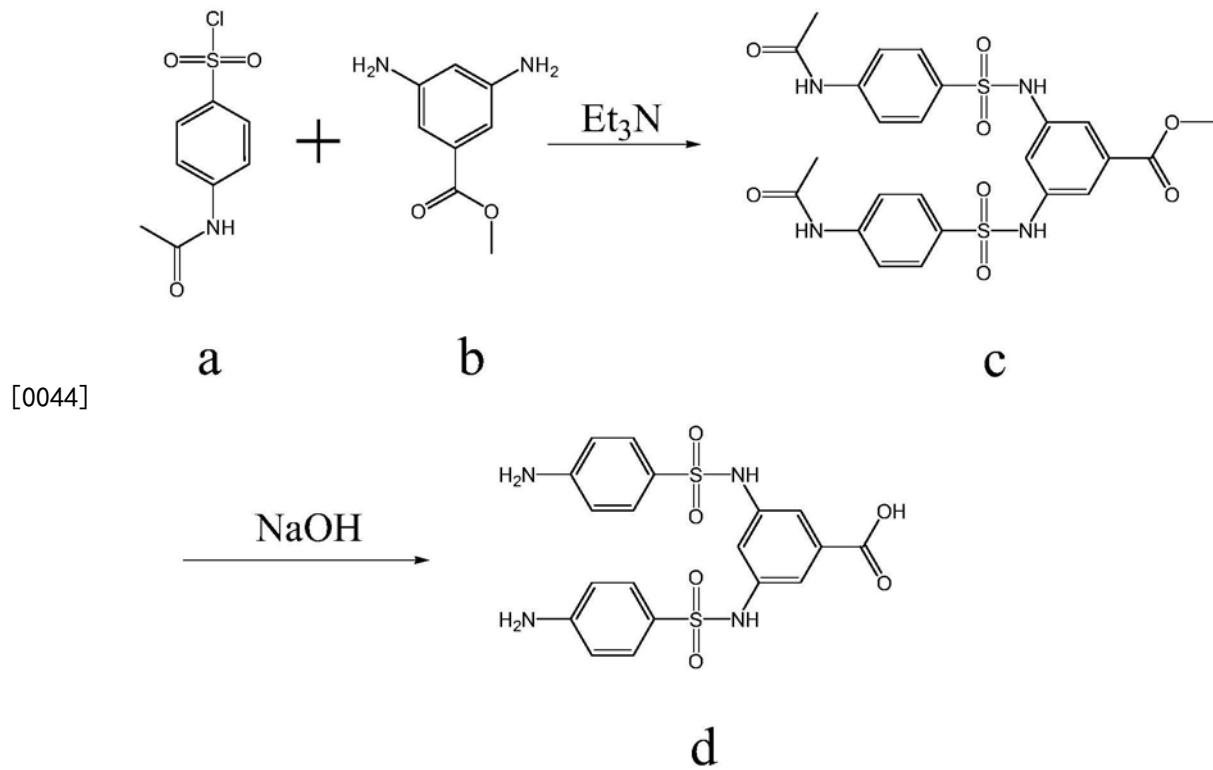
[0039] 下面结合实施例对本发明中的技术方案进行清楚、完整的说明,但并不局限于此。

[0040] 实施例1磺胺类药物半抗原及其制备方法

[0041] 一种磺胺类药物半抗原,其结构式为:



[0043] 该半抗原的合成路线为:

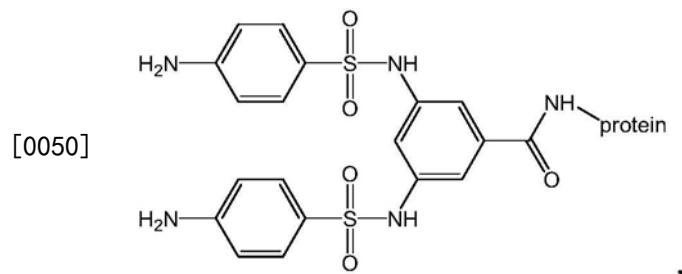


[0046] (1) 取2.0g (12.0mmol) 化合物b于100ml圆底烧瓶中,再依次加入20ml四氢呋喃,3.9g (38.5mmol) 三乙胺(Et₃N),搅拌溶解后,逐滴加入含8.4g (36.0mmol) 化合物a的四氢呋喃溶液40ml。滴加完毕后,反应混合物在55~65℃反应5h以上。反应完毕,减压去溶剂,加入80ml 1mol/L的Na₂CO₃水溶液,用乙酸乙酯萃取两次,再减压去溶剂,柱层析纯化得3.6g化合物c(乙酸乙酯/石油醚,2/5,v/v)。

[0047] (2) 将3.6g (6.4mmol) 的化合物c加入20ml 1mol/L的氢氧化钠水溶液中,反应混合物在85~95℃反应5h以上,冷却至室温,用2M的稀盐酸将pH值调至4~5,然后加入乙酸乙酯萃取3次,收集有机相溶液,减压去溶剂,残留物重结晶纯化得磺胺类药物半抗原d 1.1g,质谱图如图1所示,ESI-MS:463[M+1]。

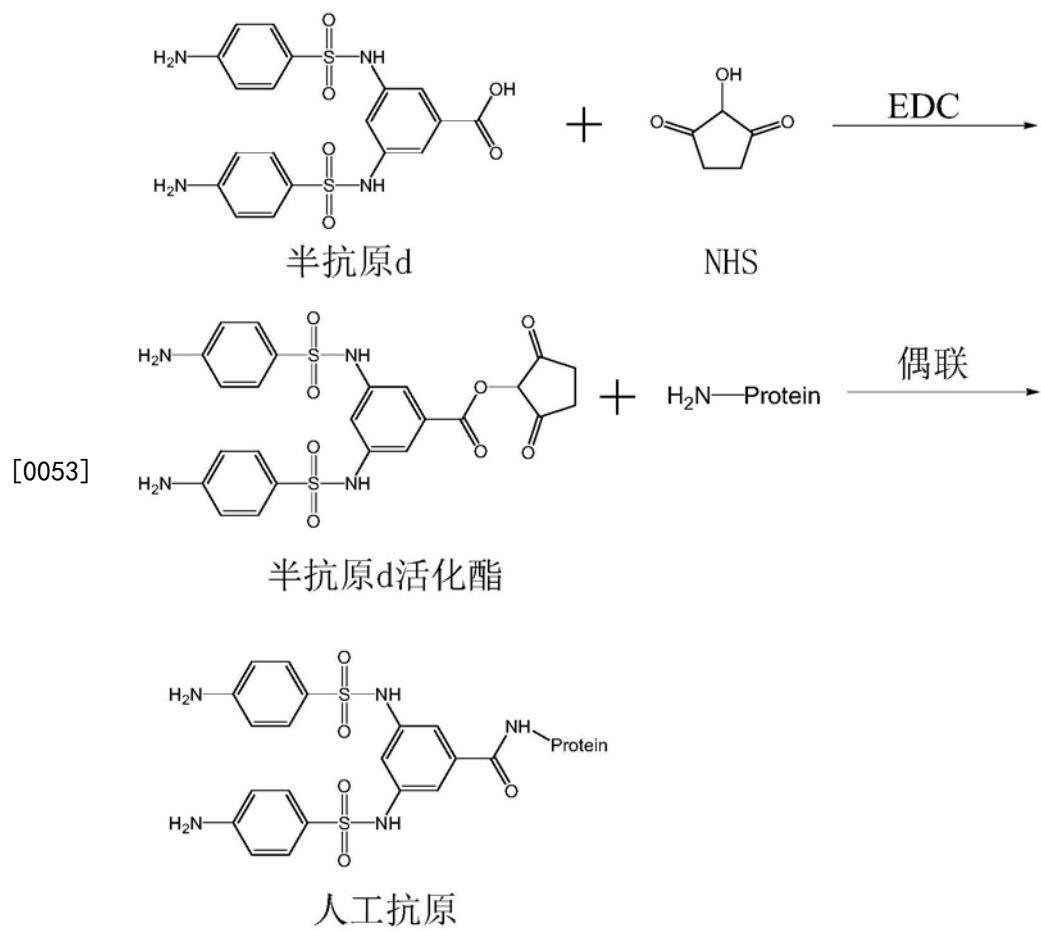
[0048] 实施例2磺胺类药物人工抗原及其制备方法

[0049] 一种磺胺类药物人工抗原,其结构式为:



[0051] 其中Protein为载体蛋白,载体蛋白选自牛血清白蛋白、血蓝蛋白中的任意一种,

[0052] 该人工抗原的合成线路为:



[0054] 1. 载体蛋白为牛血清白蛋白的碘胺类药物人工抗原,合成方法如下:

[0055] 1) 取10mg实施例1中制备的碘胺类药物半抗原,溶解于0.5mL二甲基甲酰胺(DMF)中,搅拌充分后,加入10mg碳二亚胺(EDC)和10mg 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;

[0056] 2) 称取30mg牛血清蛋白(BSA),使其充分溶解在4mL、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;

[0057] 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;

[0058] 4) 分装,于4℃保存备用。

[0059] 2. 载体蛋白为血蓝蛋白的碘胺类药物人工抗原,合成方法如下:

[0060] 1) 取10mg实施例1中制备的碘胺类药物半抗原,溶解于0.5mL二甲基甲酰胺(DMF)中,搅拌充分后,加入10mg EDC和10mg 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;

[0061] 2) 称取30mg血蓝蛋白(KLH),使其充分溶解在4mL、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;

[0062] 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;

[0063] 4) 分装,于4℃保存备用。

[0064] 实施例3碘胺类药物人工抗原在制备抗碘胺类药物单克隆抗体中的应用

[0065] 抗碘胺类药物单克隆抗体的制备方法如下:

[0066] 将实施例2制备的载体蛋白为血蓝蛋白的碘胺类药物人工抗原为免疫原,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2周,免疫3次后,采小鼠尾部静脉血检测血清效价。如抗体效价不达要求,需加强免疫,待抗体效价不再升高后,以100μg全抗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。

[0067] 实施例4碘胺类药物人工抗原在ELISA中的应用与效果评价

[0068] 用pH为9.6的碳酸盐缓冲液作包被稀释液,将实施例2制备的载体蛋白为牛血清白蛋白的碘胺类药物人工抗原稀释至0.5μg/mL,按100μL/孔加入聚苯乙烯微孔板中,4℃包被过夜,甩干,按250μL/孔添加1%BSA,磷酸盐缓冲液中37℃封闭1h,甩干,干燥后真空包装保存。

[0069] 用含0.05%叠氮钠,pH7.4的磷酸盐缓冲液,将单克隆抗体稀释至0.03μg/mL,4℃保存备用。

[0070] 向包被有碘胺类药物人工抗原的微孔酶标板中,加入碘胺类药物标准溶液50μL/

孔,再加入碘胺类药物单克隆抗体溶液50 μ L/孔,37℃反应0.5h;甩干后,加入洗液(含0.05%叠氮钠,1%蔗糖,pH7.4的磷酸盐缓冲液)280 μ L/孔,洗涤3次后拍干;再加入酶标二抗(用0.01M PBS稀释4000倍使用,酶标二抗购买于sigma,货号为A5278-1ML)100 μ L/孔,37℃反应0.5h;再次洗涤3次后拍干,加入50 μ L/孔的TMB显色液(购买于阿拉丁,货号为T117926-500ml),37℃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。

[0071] 以OD 450nm值为纵坐标,碘胺类标准品溶液浓度为横坐标,用ELISA Calc软件进行四参数Logistic曲线拟合绘制标准曲线,线性方程公式为: $y = (A-D) / [1 + (x/C)^B] + D$ 。其中参数A、B、C、D可从标准曲线中得出数值,x表示待测物浓度,y表示OD值。通过把阴性孔OD值的一半数值作为y值代入方程,计算出的x值即为相应标准品的IC50值,结果如表1所示。

[0072] 表1碘胺类药物及其IC50

碘胺类药物名称	IC50 (μ g/L)	碘胺类药物名称	IC50 (μ g/L)	碘胺类药物名称	IC50 (μ g/L)	
碘胺二甲嘧啶	0.5	碘胺恶唑	0.4	碘胺噁恶唑	2.5	
碘胺甲恶唑	0.6	碘胺苯吡啶	14.8	碘胺吡啶	1.9	
碘胺间甲氧嘧啶	0.2	碘胺苯吡唑	5.4	碘胺甲氧嗪	3.2	
[0073]	碘胺甲基嘧啶	1.3	碘胺邻二甲氧嘧啶	22.4	碘胺多辛	7.4
	碘胺氯达嗪	1.8	碘胺嘧啶	0.4	碘胺噻唑	0.2
	碘胺二甲氧嗪	0.9	碘胺异恶唑	19.6	碘胺吡唑	15.9
	碘胺甲噻二唑	3.2	碘胺间二甲氧嘧啶	0.3	碘胺对甲氧嘧啶	0.2

[0074] 实施例5碘胺类药物胶体金定性免疫层析试纸条

[0075] 碘胺类药物胶体金定性免疫层析试剂条的制备方法如下:

[0076] (1) 制备包被有人工抗原和羊抗鼠 IgG的反应膜:

[0077] 以硝酸纤维素膜(NC膜)为反应膜,将载体蛋白为牛血清白蛋白的人工抗原用包被缓冲液调节浓度至0.1~0.5mg/mL,并将羊抗鼠 IgG用包被缓冲液也调节浓度至0.1~1mg/mL。按照0.8~1.2 μ L/cm的膜液量,将抗原和羊抗鼠 IgG喷到反应膜对应的检测区(T线)和控制区(C线),检测区和控制区之间间隔为2.5mm,放置37℃烘箱处理12~16h,置于恒温恒湿保藏箱里备用;包被缓冲液为含有1%蔗糖、0.05%叠氮化钠的pH=7.6 0.01M PBS缓冲液。

[0078] (2) 制备纳米金标记的碘胺类药物单克隆抗体的金垫:

[0079] 1、纳米金的制备:

[0080] 纳米金溶液的制备:取1g氯金酸,用纯水及超声溶解后定容至100ml,4℃避光保存备用。取1ml上述溶液至100ml纯水中,加热至沸腾后再添加0.5ml 0.06%的柠檬酸钠溶液,继续加热10分钟,冷却至室温后,用纯水恢复至原体积(100ml),避光常温放置备用。所用全

部玻璃器皿需使用高锰酸钾及硫酸混合液过夜浸泡,清洗晾干后使用。

[0081] 2、磺胺类药物单克隆抗体的标记:

[0082] 纳米金标记的磺胺类药物单克隆抗体的制备:

[0083] 将5 μ g磺胺类药物单克隆抗体加入到1ml 0.01%的纳米金溶液中,室温反应5分钟,加入10 μ l 10%牛血清蛋白进行封闭,12,000rpm离心,弃去全部清液。

[0084] 3、金垫的制备:

[0085] 加入含有2%Tris、5%牛血清蛋白、0.05%硫柳汞、5%蔗糖的金子稀释液1ml复溶,均匀涂抹在面积为5cm*5cm的玻纤上,37℃干燥处理16小时后保存备用。

[0086] (3) 样品垫的制备:

[0087] 将裁剪好的30*30cm空白样品垫浸泡在样品垫处理液中,浸泡5min后,取出在37℃干燥16h,置于恒温恒湿保藏箱里备用;样品垫处理液为含有0.3%吐温20、1%蔗糖、0.5%BSA、0.05%叠氮化钠的0.1M PB缓冲液。

[0088] (4) 胶体金定性免疫层析试剂条的组装:

[0089] 在PVC板背衬中部叠置步骤(1)制得的反应膜,两端分别叠置步骤(2)的金垫和吸水垫,反应膜和金垫、吸水垫相搭连,金垫与样品垫相搭连,检测区靠近样品垫,控制区靠近吸水垫,得到试纸板,将试纸板切割成3nm试纸条,将试纸条装载于试纸卡内,得胶体金定性免疫层析试纸卡。

[0090] 对本发明制备的磺胺类药物胶体金免疫层析试纸卡作进一步检测。

[0091] 磺胺类药物胶体金免疫层析试纸卡检测限测试:

[0092] 用0.01M PBS缓冲液配备一系列不同浓度的磺胺类药物的标准溶液,然后取100 μ l的标准溶液加入到本发明中磺胺类药物胶体金免疫层析试纸卡的加样孔中,加样后开始计时,5~8min即可观察结果,8min后判读无效。

[0093] 肉眼判读方法:T线显色强于C线显色或与C线显色无明显差异,表示检测结果阴性(-)。T线显色明显弱于C线显色或T线不显色,表示检测结果阳性(+)。无效:未出现C线,表明操作不正确或试纸条已失效。检测试验设置3组重复。即可实现胶体金免疫层析试纸卡的快速定性检测。

[0094] 测定结果如下:

[0095] 表2胶体金定性免疫层析试纸卡检测不同浓度磺胺类药物标准液的测定结果

标准液浓度 ($\mu\text{g/L}$)	1	2	5	10	20	40	60
磺胺二甲嘧啶	—	—	—	+	+	+	+
磺胺甲恶唑	—	+	+	+	+	+	+
磺胺间甲氧嘧啶	+	+	+	+	+	+	+
磺胺甲基嘧啶	—	—	+	+	+	+	+
磺胺氯达嗪	—	—	+	+	+	+	+
磺胺二甲氧嗪	—	—	+	+	+	+	+
磺胺甲噻二唑	—	—	—	+	+	+	+
磺胺恶唑	—	+	+	+	+	+	+
磺胺苯吡啶	—	—	—	—	—	+	+
[0096]	磺胺苯吡唑	—	—	—	—	+	+
磺胺邻二甲氧嘧啶	—	—	—	—	—	—	+
磺胺嘧啶	+	+	+	+	+	+	+
磺胺异恶唑	—	—	—	—	—	—	+
磺胺间二甲氧嘧啶	+	+	+	+	+	+	+
磺胺喹恶啉	—	—	—	+	+	+	+
磺胺吡啶	—	—	+	+	+	+	+
磺胺甲氧嗪	—	—	—	+	+	+	+
磺胺多辛	—	—	—	—	+	+	+
磺胺噻唑	+	+	+	+	+	+	+
磺胺吡唑	—	—	—	—	—	—	+
磺胺对甲氧嘧啶	+	+	+	+	+	+	+

[0097] 通过对磺胺类药物系列标准液的浓度值进行了检测,结果如表2所示,本发明的试纸条可检测到不同浓度的磺胺类药物(表2),故本发明制备的胶体金定性免疫层析试纸条对磺胺类药物检测具有高灵敏度。

[0098] 表3胶体金定性免疫层析试纸条检测磺胺类药物的检测限

[0099]	磺胺类药物 名称	检测限浓度 ($\mu\text{g/L}$)	磺胺类药物 名称	检测限浓度 ($\mu\text{g/L}$)	磺胺类药物 名称	检测限浓度 ($\mu\text{g/L}$)
--------	-------------	------------------------------	-------------	------------------------------	-------------	------------------------------

	磺胺二甲嘧啶	10	磺胺恶唑	2	磺胺喹恶啉	10
	磺胺甲恶唑	2	磺胺苯吡啶	40	磺胺吡啶	5
	磺胺间甲氧嘧啶	1	磺胺苯吡唑	20	磺胺甲氧嗪	10
[0100]	磺胺甲基嘧啶	5	磺胺邻二甲氧嘧啶	60	磺胺多辛	20
	磺胺氯达嗪	5	磺胺嘧啶	1	磺胺噻唑	1
	磺胺二甲氧嗪	5	磺胺异恶唑	60	磺胺吡唑	60
	磺胺甲噻二唑	10	磺胺间二甲氧嘧啶	1	磺胺对甲氧嘧啶	1

[0101] 从表3可得,本发明的磺胺类药物胶体金定性免疫层析试剂条可以检测不同种类的磺胺类药物,其中检测限最低可达1μg/L。

[0102] 胶体金定性免疫层析试纸卡的稳定性测试

[0103] 胶体金定性免疫层析试纸卡保存的条件为室温,为了确保试纸条的稳定性,对试纸条进行了加速破坏性实验。在37℃条件下连续放置90天,并在第0天,第7天,第14天,第30天,第45天,第60天,第75天和第91天分别检测阴性及磺胺二甲嘧啶标准溶液显色变化,实验设置3组重复,结果如表4所示:(“+”代表阳性,“-”代表阴性)

[0104] 表4稳定性测试

	浓度	0ng/ml	5ng/ml	10ng/ml	20ng/ml
	时间				
[0105]	第0天	-	-	+	+
	第7天	-	-	+	+
	第14天	-	-	+	+
	第30天	-	-	+	+
	第45天	-	-	+	+
	第60天	-	-	+	+
	第75天	-	-	+	+
	第91天	-	-	+	+

[0106] 由表4可知,在37℃下密封保存的胶体金定性免疫层析试纸条90天后,试纸条的T/C显色深度判读结果均无明显变化,说明胶体金定性免疫层析试纸条在加速实验37℃下最少可稳定保存90天。因此,本发明制备的磺胺类胶体金定性免疫层析试纸条可在室温下稳定保存一年以上,完全可以满足市场在保存和运输过程中的要求。

[0107] 胶体金定性免疫层析试纸卡的样品检测性能测试

[0108] 1) 畜禽、水产样本处理:

[0109] 取100g以上的样品(如猪牛羊,水产中的鱼肉等)去皮、去脂肪后均匀搅碎,称取2.0g样品加入到10mL离心管中,加入2mL乙酸乙酯,震荡混匀提取2min;4000rpm,离心3min;离心后取1mL上清液放于10mL离心管,于65℃水浴中空气下吹干;加入300μL的0.01M PBS复溶混匀待测。

[0110] 2) 蜂蜜、蛋类样本处理:

[0111] 称取3g搅拌均匀样品(如蜂蜜、鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋、蜂蜜等)加入到10mL离心管中,加入3mL乙酸乙酯,2g氯化钠粉末,盖上盖子,上下混匀2min;4000rpm,离心3min,离心后取全部上清液于10mL离心管,65℃水浴氮气(空气)下吹干;加入300μL的0.01M PBS复溶混匀待测。

[0112] 3) 液态奶样本处理:

[0113] 吸取100μL样本(如牛、羊类的鲜奶、纯奶、常温奶、乳品饮料等)直接检测。

[0114] 检测过程及结果分析:

[0115] 取100μL的待测液加入本发明中磺胺类药物胶体金免疫层析的加样孔中,加样后开始计时,5~8min即可观察结果,8min后判读无效。肉眼判读方法:T线显色强于C线显色或与C线显色无明显差异,表示样本阴性(-)。阳性(+):T线显色明显弱于C线显色或T线不显色,表示样本阳性(+)。无效:未出现C线,表明不正确的操作过程或试纸条已失效。

[0116] 最低检测限:每一种磺胺类药物对20份空白样本进行梯度加标检测,加标递度为0、0.25、0.5、1、2、4、10、20、30、40、50、60μg/kg,结果得该方法畜禽、水产、蜂蜜、蛋类及液态奶样本的最低检测限结果如表5~6示,表5和表6说明本专利制备的磺胺类药物胶体金免疫层析试剂卡在各类样本(包括畜禽、水产、蜂蜜、蛋类、乳品)中对磺胺类21种药物均能检出,交叉反应率高,符合磺胺类药物的总量检测要求。

[0117] 表5畜禽、水产、蜂蜜、蛋类样本加标检测限

	磺胺类药物 名称	检测限浓度 (μg/kg)	磺胺类药物 名称	检测限浓度 (μg/kg)	磺胺类药物 名称	检测限浓度 (μg/kg)
[0118]	磺胺二甲嘧啶	5	磺胺恶唑	1	磺胺喹恶啉	5
	磺胺甲恶唑	1	磺胺苯吡啶	20	磺胺吡啶	2
	磺胺间甲氧嘧啶	0.5	磺胺苯吡唑	10	磺胺甲氧嗪	5
	磺胺甲基嘧啶	1	磺胺邻二甲氧嘧啶	40	磺胺多辛	20
	磺胺氯达嗪	2	磺胺嘧啶	0.5	磺胺噻唑	1
	磺胺二甲氧嗪	2	磺胺异恶唑	30	磺胺吡唑	30
[0119]	磺胺甲噻二唑	5	磺胺间二甲氧嘧啶	0.5	磺胺对甲氧嘧啶	0.5

[0120] 表6液态奶样本加标检测限

磺胺类药物名称	检测限浓度(μg/L)	磺胺类药物名称	检测限浓度(μg/L)	磺胺类药物名称	检测限浓度(μg/L)	
[0121]	磺胺二甲嘧啶	10	磺胺恶唑	2	磺胺喹恶啉	10
	磺胺甲恶唑	2	磺胺苯吡啶	40	磺胺吡啶	5
	磺胺间甲氧嘧啶	1	磺胺苯吡唑	20	磺胺甲氧嗪	10
	磺胺甲基嘧啶	5	磺胺邻二甲氧嘧啶	60	磺胺多辛	20
	磺胺氯达嗪	5	磺胺嘧啶	1	磺胺噻唑	1
	磺胺二甲氧嗪	5	磺胺异恶唑	60	磺胺吡唑	60
	磺胺甲噻二唑	10	磺胺间二甲氧嘧啶	1	磺胺对甲氧嘧啶	1

[0122] 胶体金定性免疫层析试纸卡的特异性检测

[0123] 磺胺类快速胶体金定性免疫层析试纸卡的特异性检测,共做样品100份N1~N100。

[0124] 其中N1~N75为阴性,N1~N7分别是浓度为100μg/ml的喹诺酮类、氯霉素、孔雀石绿、呋喃唑酮、呋喃西林、呋喃它酮和呋喃妥因,N7~N20水产类样本,N21~N35为畜禽类样本,N36~N60为蜂蜜、蛋类样本,N61~N75为液态奶类样本。

[0125] P1~P25为阳性,P1~P8为水产类样本,P9~P15为畜禽类样本、P16~P22为蜂蜜、蛋类样本、P23~P25为液态奶类样本,其结果如表7:

[0126] 表7特异性检测

编号	结果
N1~N75	75份阴性
P1~P25	25份全为阳性

[0128] 结果表明,使用本发明的免疫层析试纸卡检测畜禽、水产、蜂蜜、蛋类、液态奶样品的阳性符合率均为100%,阴性符合率均为100%。说明本发明的免疫层析试纸卡可以满足快筛方法用于市场上对磺胺类药物残留的快速检测。

[0129] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

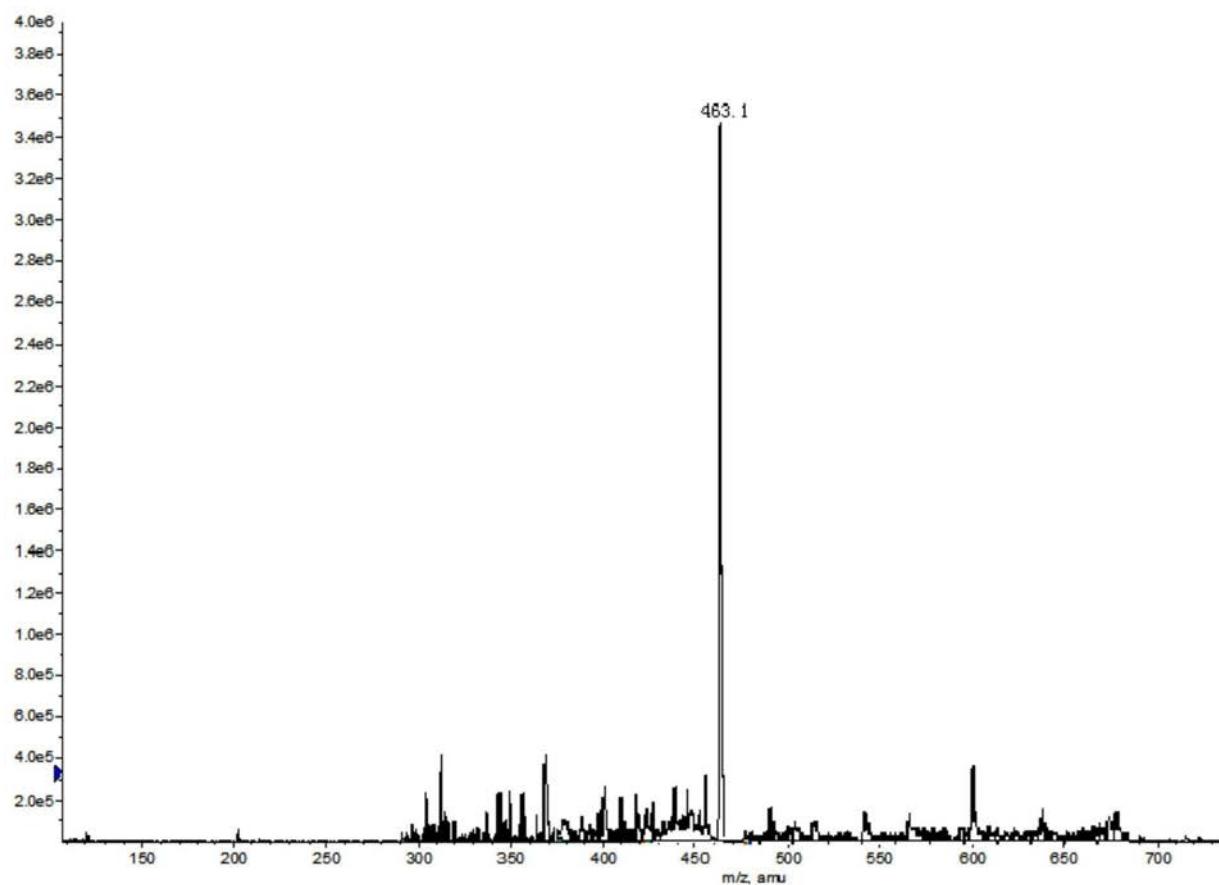
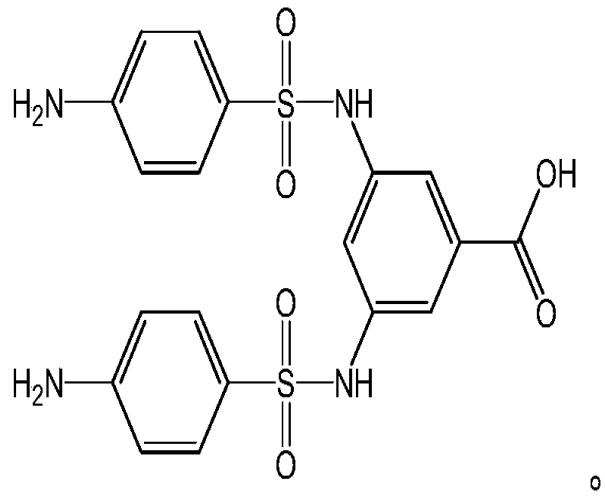


图1

专利名称(译)	一种磺胺类药物半抗原、人工抗原及其在免疫检测中的应用		
公开(公告)号	CN110818599A	公开(公告)日	2020-02-21
申请号	CN201910953550.8	申请日	2019-10-09
[标]申请(专利权)人(译)	广东达元绿洲食品安全科技股份有限公司 广州达元食品安全技术有限公司 广东中检达元检测技术有限公司 广东达元食品药品安全技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	广东达元绿洲食品安全科技股份有限公司 广州达元食品安全技术有限公司 广东中检达元检测技术有限公司 广东达元食品药品安全技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广东达元绿洲食品安全科技股份有限公司 广州达元食品安全技术有限公司 广东中检达元检测技术有限公司 广东达元食品药品安全技术有限公司		
[标]发明人	李斌 王莹莹 刘远高 苏振贤 黄家怡		
发明人	李斌 王莹莹 邬秀锋 刘远高 苏振贤 黄家怡		
IPC分类号	C07C311/44 C07C303/38 C07C303/40 C07C303/44 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K1/107 C07K16/44 G01N33/532 G01N33/543 G01N33/577		
CPC分类号	C07C303/38 C07C303/40 C07C303/44 C07C311/44 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/532 G01N33/54346 G01N33/577		
代理人(译)	郑莹		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种磺胺类药物半抗原、人工抗原及其在免疫检测中的应用，属于免疫检测领域。半抗原结构中具有两个氨基苯磺酰胺的结构，使得制备而成的人工抗原的空间结构更突出，更有利于呈现磺胺类药物的共有特征基团氨基苯磺酰胺，提高了抗原的免疫原性，将人工抗原结合ELISA检测技术，磺胺二甲嘧啶的IC50值为0.5μg/L；使用本发明制备的磺胺类药物胶体金免疫层析试纸条，可以实行快速、准确的检测。



o