



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109956908 A

(43)申请公布日 2019.07.02

(21)申请号 201711427691.3

(22)申请日 2017.12.26

(71)申请人 贵州勤邦食品安全科学技术有限公司

地址 550009 贵州省贵阳市经济技术开发区小孟工业园区科技路1号

(72)发明人 何方洋 万宇平 冯才伟 扶胜
谢体波 袁光宇 钟新敏 吴紫洁

(51)Int.Cl.

C07D 239/69(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

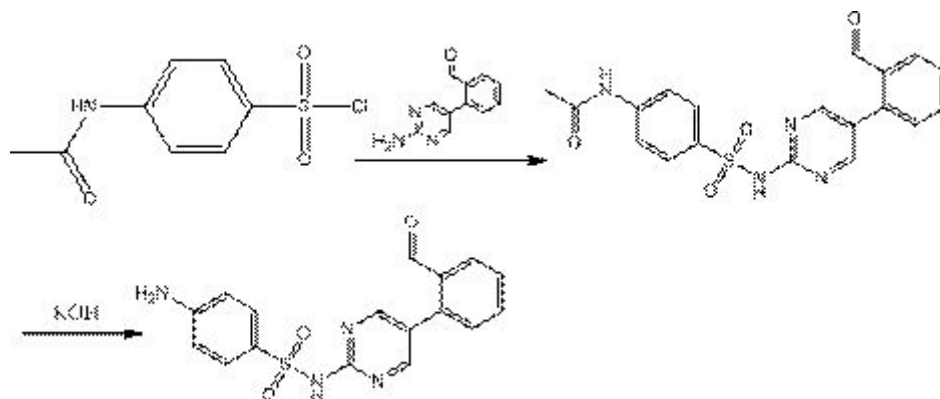
(54)发明名称

一种磺胺嘧啶半抗原改造及其应用

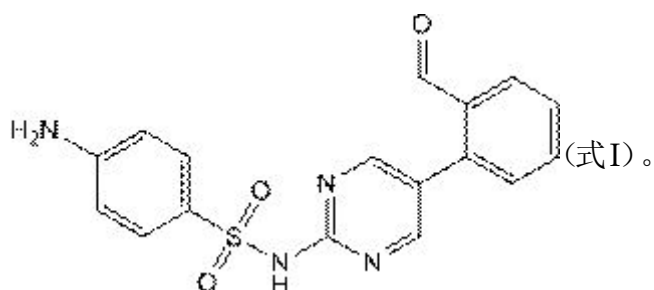
(57)摘要

本发明公开了一种磺胺嘧啶半抗原改造及其应用,本发明提供了一种磺胺嘧啶改造方法,收率可达88.75%;最大限度保留了磺胺嘧啶的化学结构,提高了半抗原的特异性,为抗原制备加入连接点。经过柱净化浓缩以该半抗原为基础,可与载体蛋白偶联,用于免疫小鼠制备抗体,并以抗原抗体为基础开发胶体金试纸条检测产品。本发明的试纸条由微孔试剂和试纸条两部分构成,所述试纸条由PVC板、吸水垫、反应膜、吸收垫、保护膜五部分构成。所述吸收垫,反应膜,吸水垫和保护膜按顺序粘贴在PVC板上,反应膜上固定检测区(T)和质控区(C)。检测区包被有磺胺嘧啶半抗原-牛血清白蛋白偶联物,质控区包被有羊抗鼠IgG。

1. 一种磺胺嘧啶半抗原改造及其应用, 其特征在于涉及磺胺嘧啶药物半抗原及其制备方法, 所述磺胺嘧啶半抗原合成路径如下所示:



根据权利1所述的一种磺胺嘧啶半抗原改造及其应用, 所述磺胺嘧啶半抗原结构式如式I所示:



2. 根据权利1、2所述的一种磺胺嘧啶半抗原改造及其应用, 所述应用为一种快速检测磺胺嘧啶残留试纸条, 其特征在于由微孔试剂和试纸条两部分构成, 所述试纸条包括PVC板、吸水垫、反应膜、吸收垫、保护膜五部分构成。

3. 根据权利3所述的一种快速检测磺胺嘧啶残留试纸条制备步骤包括:

- 1) 制备冻干磺胺嘧啶特异性抗体-胶体金标记物的微孔试剂;
- 2) 制备包被磺胺嘧啶半抗原-载体蛋白的检测区和羊抗鼠IgG的质控区反应膜;
- 3) 试纸条的组装。

4. 根据权利3、4所述的一种快速检测磺胺嘧啶残留试纸条, 其主要内容包括:

- 1) 牛奶的检测方法;
- 2) 牛奶样本检测及结果分析。

一种磺胺嘧啶半抗原改造及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种半抗原及其制备方法和应用,具体涉及磺胺嘧啶药物半抗原及其制备方法和应用。

背景技术

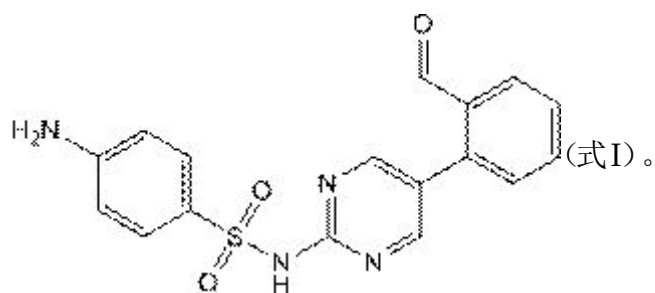
[0002] 磺胺嘧啶,其性质稳定、较强抗菌活性、对革兰氏菌产生抑制作用,价格低廉、易生产、易获得,因而在畜牧业上被广泛应用。磺胺嘧啶药物在生物体内易吸收、代谢时间长、易残留,因而更易在生物体内积累。长期滥用磺胺嘧啶药物,最终导致过敏性反应、肝肾损伤、磺胺嘧啶药抗药性、细菌耐药性感染、甚至具有致癌性。

[0003] 目前,检测磺胺嘧啶主要经微生物法、高效液相色谱、气相色谱-质谱、高效液相色谱-串联质谱等,微生物法检测速度慢,并且对磺胺药缺乏灵敏性和特异性,液相、气相、质谱等方法则存在前处理繁琐,需要专业人员操作、需要昂贵仪器等缺陷,进样单一检测数度慢,在大规模检测中并不适用。本发明磺胺嘧啶经改造后,用于免疫动物产生特异性抗体,采用抗原抗体免疫反应法,能够实现方便、快捷,而且对人员培训要求低等特点。

发明内容

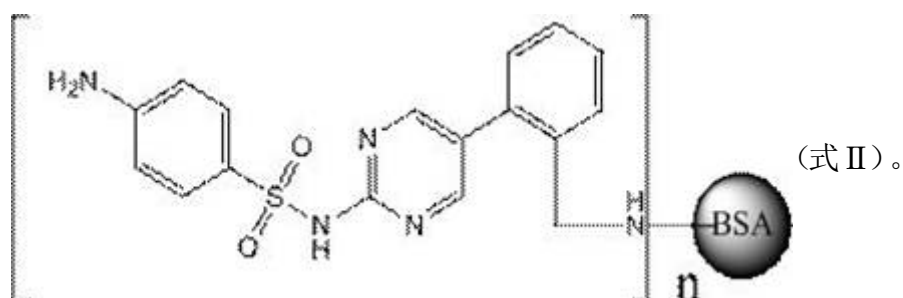
[0004] 本发明提供一种磺胺嘧啶抗体制备的关键物质半抗原的合成方法,该方法具有工艺简单,反应率高的特点,收率可达89.55%;最大限度保留了磺胺嘧啶的化学结构,提高了半抗原的特异性。

[0005] 本发明是提供一种用于检测磺胺嘧啶残留的半抗原制备的技术方法,分子结构式为式I:



[0006]

反应合成的抗原的分子结构式为式II:



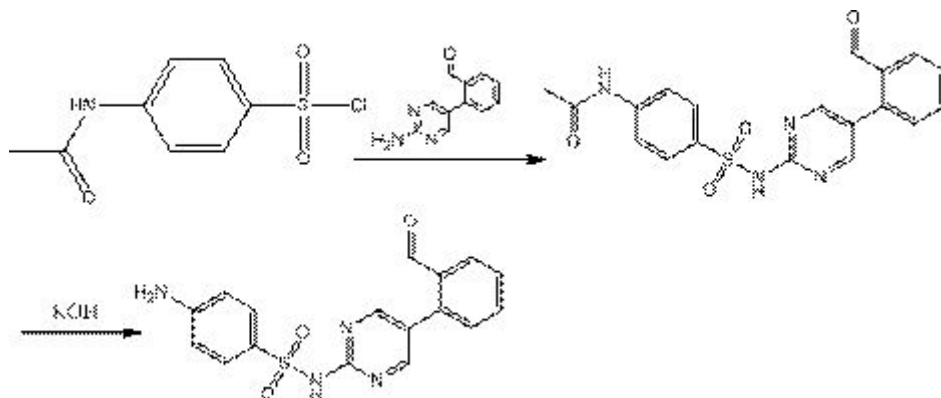
[0007]

反应合成的半抗原的合成方法包括以下步骤：

取1.0g对乙酰氨基苯磺酰氯，加吡啶50mL溶解，加2-(2-氨基-5-嘧啶) 苯甲醛0.85g，充分搅拌溶解，100℃搅拌4h，停止反应，冷却到室温，旋蒸，除去吡啶，加二氯甲烷/乙醇(v/v, 5/1) 40mL重结晶，得到磺酰嘧啶1.5g，收率88.75%

取磺酰嘧啶1.5g，加2mol/L KOH水溶液80mL溶解，90℃搅拌3h，停止反应，冷却到室温，加6mol/L盐酸调节pH值到7，加乙酸乙酯萃取100mL×3，萃取三次，合并有机相，无水硫酸钠干燥，蒸干，上硅胶柱，乙酸乙酯/正己烷(v/v, 1/1)洗脱分离，得到苯甲醛-磺胺嘧啶半抗原1.2g，收率89.55%。

[0008] 磺胺嘧啶反应合成的半抗原的合成路线如下：



本发明还提供一种磺胺嘧啶抗原的制备方法。

[0009] 1) 称取适量磺胺嘧啶半抗原25mg溶解于DMF溶液中，加入EDC和NHS水溶液，进行活化30min，得到溶液I；

2) 将载体蛋白溶于水溶液中，得到溶液II；将溶液I加入到溶液II中，常温搅拌24h进行偶联，得到溶液III；

3) 用0.01mol/L PB透析溶液III 3d，每天更换3次透析袋，-20℃保存。

[0010] 综上所述，本发明提供了一种磺胺嘧啶改造方法，涉及工艺简单、易操作、回收率高等优点。经过柱净化浓缩以该半抗原为基础，可与载体蛋白偶联，用于免疫小鼠制备抗体，并以抗原抗体为基础开发胶体金试纸条检测产品。

[0011] 本发明提供一种磺胺嘧啶半抗原的应用方案，由磺胺嘧啶半抗原为基础制备试纸条。

[0012] 本发明的试纸条由微孔试剂和试纸条两部分构成，所述试纸条由PVC板、吸水垫、反应膜、吸收垫、保护膜五部分构成。

[0013] 所述吸收垫，反应膜，吸水垫和保护膜按顺序粘贴在PVC板上，反应膜上固定检测区(T)和质控区(C)。检测区包被有磺胺嘧啶半抗原-牛血清白蛋白偶联物，质控区包被有羊抗鼠IgG。

附图说明

[0014] 图1 半抗原结构图式I。

[0015] 图2 抗原结构图式II。

[0016] 图3 半抗原合成技术路线。

[0017] 图4 试纸条剖面结构示意图。

[0018] 图5 试纸条结果判定。

具体实施方式

[0019] 实施例1 磺胺嘧啶抗原的制备

1、半抗原合成

取1.0g对乙酰氨基苯磺酰氯,加吡啶50mL溶解,加2-(2-氨基-5-嘧啶) 苯甲醛0.85g,充分搅拌溶解,100℃搅拌4h,停止反应,冷却到室温,旋蒸,除去吡啶,加二氯甲烷/乙醇(v/v, 5/1)40mL重结晶,得到磺酰嘧啶1.5g,收率88.75%

取磺酰嘧啶1.5g,加2mol/L KOH水溶液80mL溶解,90℃搅拌3h,停止反应,冷却到室温,加6mol/L盐酸调节pH值到7,加乙酸乙酯萃取100mL×3,萃取三次,合并有机相,无水硫酸钠干燥,蒸干,上硅胶柱,乙酸乙酯/正己烷(v/v, 1/1)洗脱分离,得到苯甲醛-磺胺嘧啶半抗原1.2g,收率89.55%。

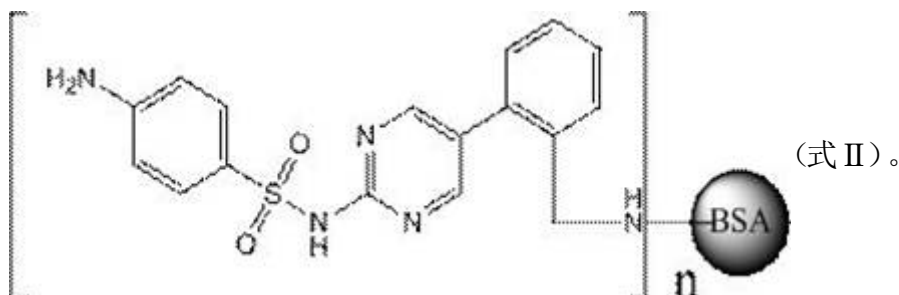
[0020] 2、抗原的制备及鉴定

(1) 抗原的合成

称取25mg磺胺嘧啶半抗原溶解于 DMF中,加入EDC和NHS活化30min,加入到 BSA水溶液中,调溶液pH7.2-7.6,常温搅拌24h;用0.01mol/L PB透析3d,每天更换3次透析袋,-20℃保存。

[0021] (2) 抗原的鉴定

将载体蛋白、磺胺嘧啶半抗原、磺胺嘧啶半抗原-载体蛋白偶联物用pH7.4的PB配成0.5mg/mL的溶液,以0.01mol/L pH7.4的PB调零,用紫外分光光度计在波长200-800nm范围内扫描。得到载体蛋白、磺胺嘧啶半抗原、磺胺嘧啶半抗原-载体蛋白偶联物的吸收曲线。结果显示三者出现不同的吸收曲线,表明磺胺嘧啶半抗原与载体蛋白偶联成功,分子结构式如式II所示:



[0022]

实施例2 构建检测试纸条

1、试纸条(图4)

吸收垫1,反应膜2,吸水垫3和保护膜7按顺序粘贴在PVC板6上,吸收垫末端与反应膜相连,反应膜末端与吸水垫相连,吸收垫始端与PVC板对齐,吸水垫末端与PVC板对齐,保护膜7覆盖吸收垫上,反应膜上固定(T)区4和(C)区5。检测区4包被有磺胺嘧啶半抗原-牛血清白蛋白偶联物,质控区5包被有羊抗鼠IgG。

[0023] 2、微孔试剂

微孔试剂含冻干磺胺嘧啶单克隆抗体-胶体金标记物,包被量为0.2-0.5cm³/孔。

[0024] 3、单克隆抗体

(1) 动物免疫

将免疫原注入Balb/c小鼠体内,剂量为50 μ g/只,使其产生多克隆抗体。

[0025] (2) 细胞融合和克隆化

取免疫Balb/c小鼠脾细胞,按6:1比例与SP2/0骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争ELISA法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株,并意外发现,其中一株效价显著高于其它杂交瘤细胞株。

[0026] (3) 细胞冻存和复苏

将磺胺嘧啶的单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成 1×10^6 个/mL的细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入37 $^{\circ}$ C水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0027] (4) 单克隆抗体的制备与纯化

将Balb/c小鼠腹腔注射灭菌石蜡油,剂量为0.4mL/只,7天后腹腔注射磺胺嘧啶的单克隆杂交瘤细胞株 5×10^5 个/只,7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化,纯化后的腹水放入-20 $^{\circ}$ C环境中保存。

[0028] 4、羊抗鼠IgG

以山羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫,得到羊抗鼠抗体。

[0029] 5、磺胺嘧啶单克隆抗体-胶体金标记物

(1) 胶体金的制备

用双蒸去离子水将1%氯金酸稀释成0.01%,置磁力加热搅拌煮沸,每100mL 0.01%的氯金酸加入1mL 2%的柠檬酸三钠,继续煮沸,液体呈红色时停止加热,冷却至室温后补足失水。制备好的胶体金外观应纯净、透亮、无沉淀和漂浮物,有效期为一个月。

[0030] (2) 磺胺嘧啶单克隆抗体-胶体金标记物的制备

在磁力搅拌下,用0.1M K_2CO_3 调胶体金的pH值至7.8,按1-1.5 μ g/mL抗体胶体金加入磺胺嘧啶单克隆抗体,继续搅拌混匀30min,加入10%BSA至终浓度为0.5%-1%,静置30min。12000rpm、4 $^{\circ}$ C离心30min,弃去上清液,用初始胶体金体积1/10 的复溶缓冲液将沉淀重悬,置4 $^{\circ}$ C备用,保存60d。

[0031] 6、吸收垫

将吸收垫放入磷酸盐缓冲液浸湿30s,37 $^{\circ}$ C烘2h备用;

7、检测区和质控区

将硝酸纤维素膜上分别包被磺胺嘧啶-载体蛋白偶联物构成测试区和羊抗鼠IgG构成质控区,再用含0.5%的酪蛋白的封闭液进行封闭。

[0032] 用含0.5%的蔗糖0.9% NaCl缓冲液将磺胺嘧啶-牛血清白蛋白偶联物稀释至5 μ g/mL,用点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜作为测试区,参数为1.5 μ g/cm,测试区靠近金标垫端,距金标垫端约8mm;用含0.5%的蔗糖0.9% NaCl缓冲液将羊抗鼠IgG 稀释到1 μ g/mL,用点膜仪将其包被于纤维素膜作为质控区,参数为1.5 μ g/cm,质控区靠近吸水垫,距吸水垫约8mm,两线距离5-8mm。37 $^{\circ}$ C烘干,封装。

[0033] 实施例3 牛奶中磺胺嘧啶的检测

1、检测方法

本发明检测时,将待测样本稀释液滴入微孔,将试纸条插入微孔中,当磺胺嘧啶在样本中浓度<50ng/mL 时,单克隆抗体-胶体金标记物与层析膜上固定的磺胺嘧啶半抗原-载体蛋白偶联抗原和羊抗鼠 IgG 结合,在 (T) 区和 (C) 区内各出现一条红色条带。如果磺胺嘧啶在样本中浓度>50ng/mL 时,单克隆抗体-胶体金标记物与样本中的磺胺嘧啶全部结合,在 (T) 区不与磺胺嘧啶半抗原-载体蛋白偶联抗原结合而不显色。阴性样本在 (T) 区与 (C) 区出现红色条带。如图5所示。

[0034] 阳性: (C) 区显红色条带, (T) 区不显色, 判为阳性, 表示磺胺嘧啶含量超过50ng/mL, 用“+”表示。

[0035] 阴性: (C) 区显红色条带, (T) 区显红色条带, (T) 区颜色接近或浅于 (C) 区时, 判为阴性, 表示磺胺嘧啶含量小于50ng/mL, 用“-”表示。

[0036] 无效: (C) 区不显色, 该试纸条判读无效。

2、检测示例

用滴管向试剂微孔内滴加2-3滴样本, 将试纸条插入微孔中5-8min 后观察结果。超过10min, 则样本检测判读结果无效。

[0038] 取已知磺胺嘧啶含量大于50ng/mL 阳性牛奶样本20份和磺胺嘧啶含量小于50ng/mL 的阴性样本, 用3批次生产的试纸条进行检测, 结果见表1。

[0039] 表1 检测样本结果

样本 批次	磺胺嘧啶阳性样本 (20 份)	磺胺嘧啶阴性样本(20 份)
1	20 份阳性	20 份阴性
2	20 份阳性	20 份阴性
3	20 份阳性	20 份阴性

结果表明: 用3个批次生产试纸条检测牛奶样本时, 磺胺嘧啶阳性符合率为100%, 假阴性率为0。

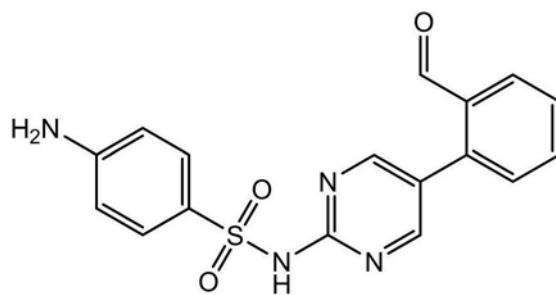


图1

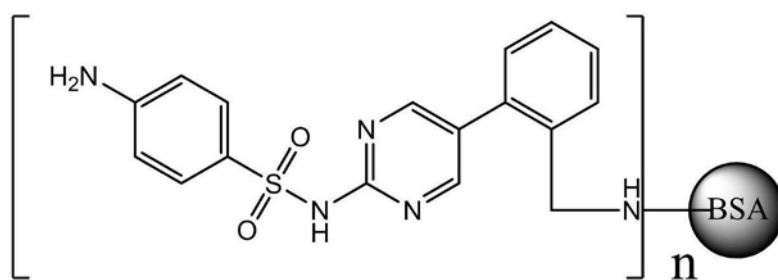


图2

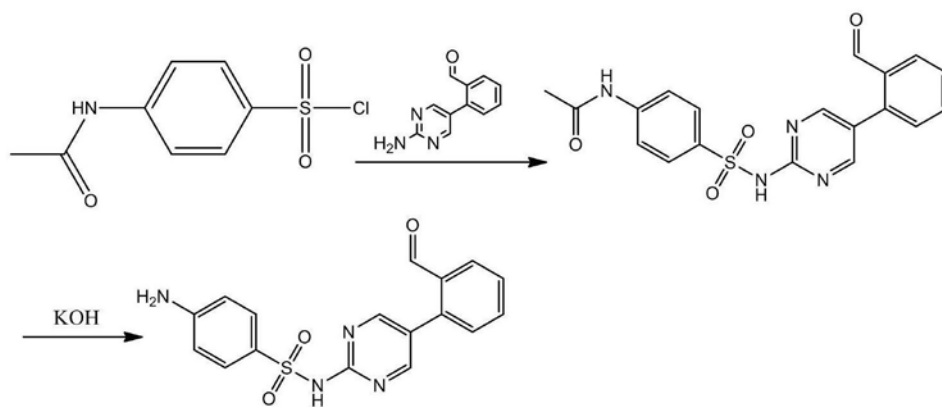


图3

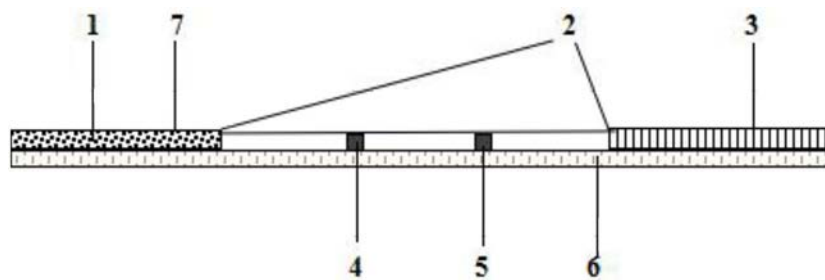


图4

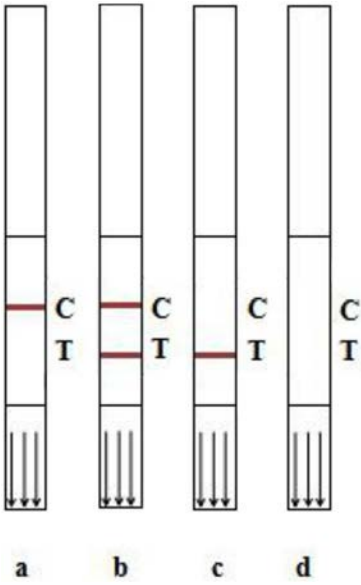


图5

专利名称(译)	一种磺胺嘧啶半抗原改造及其应用		
公开(公告)号	CN109956908A	公开(公告)日	2019-07-02
申请号	CN201711427691.3	申请日	2017-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	贵州勤邦食品安全科学技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	贵州勤邦食品安全科学技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	贵州勤邦食品安全科学技术有限公司		
[标]发明人	何方洋 万宇平 冯才伟 扶胜 谢体波 袁光宇 钟新敏 吴紫洁		
发明人	何方洋 万宇平 冯才伟 扶胜 谢体波 袁光宇 钟新敏 吴紫洁		
IPC分类号	C07D239/69 G01N33/531 G01N33/558		
CPC分类号	C07D239/69 G01N33/531 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种磺胺嘧啶半抗原改造及其应用，本发明提供了一种磺胺嘧啶改造方法，收率可达88.75%；最大限度保留了磺胺嘧啶的化学结构，提高了半抗原的特异性，为抗原制备加入连接点。经过柱净化浓缩以该半抗原为基础，可与载体蛋白偶联，用于免疫小鼠制备抗体，并以抗原抗体为基础开发胶体金试纸条检测产品。本发明的试纸条由微孔试剂和试纸条两部分构成，所述试纸条由PVC板、吸水垫、反应膜、吸收垫、保护膜五部分构成。所述吸收垫，反应膜，吸水垫和保护膜按顺序粘贴在PVC板上，反应膜上固定检测区(T)和质控区(C)。检测区包被有磺胺嘧啶半抗原-牛血清白蛋白偶联物，质控区包被有羊抗鼠IgG。

样本 批次	磺胺嘧啶阳性样本(20份)	磺胺嘧啶阴性样本(20份)
1	20份阳性	20份阴性
2	20份阳性	20份阴性
3	20份阳性	20份阴性