

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910085650. X

[51] Int. Cl.

C07C 245/10 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/77 (2006.01)

C07K 1/113 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

[43] 公开日 2010年2月10日

[11] 公开号 CN 101643436A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/531 (2006.01)

[22] 申请日 2009.5.27

[21] 申请号 200910085650. X

[71] 申请人 北京维德维康生物技术有限公司

地址 100085 北京市海淀区上地十街1号院4号楼

[72] 发明人 江海洋 王战辉 吴小平 徐飞  
米铁军 张静 王进

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关畅 任凤华

权利要求书2页 说明书11页 附图3页

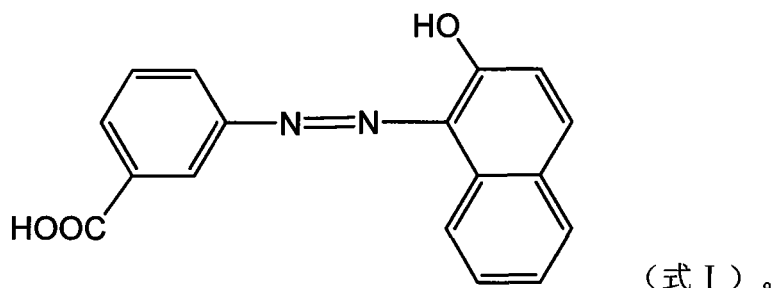
[54] 发明名称

一种苏丹红半抗原与抗原及其制备方法与应用

[57] 摘要

本发明公开了一种苏丹红半抗原与抗原及其制备方法与应用。苏丹红半抗原的制备方法包括如下步骤：1)将间氨基苯甲酸重氮化，得到式 III 所示的间氨基苯甲酸的重氮化离子；2)将步骤 1)得到的间氨基苯甲酸的重氮化离子与 2-萘酚发生偶合反应，得到式 I 所示化合物。实验结果表明，用本发明的抗原免疫动物得到的抗血清的效价可达  $1:3 \times 10^6$ ，最低检测限为  $0.05\text{ng/mL}$ ，半抑制浓度为  $0.4\text{ng/mL}$ ，产生的抗体的特异性高、灵敏度高、准确度高。用本发明的抗原和/或抗体检测苏丹红，较现有的色谱法比，具有成本低廉、操作简单、样品前处理简便、方便快捷的特点，适合于大规模检测。因此，本发明的抗原及抗体及检测方法具有广阔的应用前景。

1、一种化合物，其分子结构式如式 I 所示：

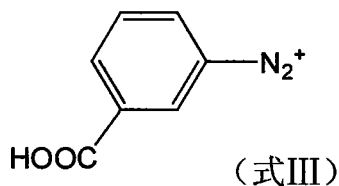


2、一种化合物，是权利要求 1 中所述化合物与载体蛋白的偶联物。

3、根据权利要求 2 所述的化合物，其特征在于：所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、兰素蛋白或卵清白蛋白。

4、一种制备权利要求 1 所述化合物的方法，包括如下步骤：

1) 将间氨基苯甲酸重氮化，得到式 III 所示的间氨基苯甲酸的重氮化离子；



2) 将步骤 1) 得到的间氨基苯甲酸的重氮化离子与 2-萘酚发生偶合反应，得到权利要求 1 中所述式 I 所示化合物。

5、根据权利要求 4 所述的方法，其特征在于：所述重氮化的方法包括如下步骤：在亚硝酸根离子和酸性条件下，在 5-10℃ 的温度下，将间氨基苯甲酸转化为重氮化离子。

6、根据权利要求 4 或 5 所述的方法，其特征在于：所述步骤 2) 中发生偶合反应的方法包括如下步骤：将 2-萘酚、间氨基苯甲酸的重氮化离子混合，在碱性、温度为 5-10℃ 的条件下，反应 20-30 分钟；

所述 2-萘酚与间氨基苯甲酸的重氮化离子的投料物质的量比为 (1-1.5) : (1-1.2)，优选为 1: 1。

7、一种制备权利要求 2 所述化合物的方法，包括如下步骤：将权利要求 1 中

所述式 I 所示化合物、N,N-二甲基甲酰胺、N,N'-二环己基碳化二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺混合，在 20-28℃的条件下，反应 8-10 小时，得到溶液 I；将载体蛋白加入到溶液 I 中，在 20-28℃的条件下，反应 8-10 小时，得到权利要求 2 所述化合物。

8、根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于：所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、兰素蛋白或卵清白蛋白。

9、由权利要求 2 或 3 所述化合物免疫动物得到的抗体，如单克隆抗体。

10、权利要求 1、2 或 3 所述化合物和/或权利要求 9 中所述抗体在检测苏丹红中的应用。

## 一种苏丹红半抗原与抗原及其制备方法与应用

### 技术领域

本发明涉及一种苏丹红半抗原与抗原及其制备方法与应用。

### 背景技术

苏丹红 I 号，即 1-苯基偶氮-2-萘酚，分子式为  $C_{16}H_{12}ON_2$ ，在标准状态下其溶解度小于 0.01g，易溶于有机溶剂，是一种人工合成的油溶性化工染色剂，1896 年科学家达迪将其命名为苏丹红并沿用至今。苏丹红主要用于石油、机油和其它的一些工业溶剂中，目的是使其增色，也用于鞋、地板等的增光。由于它的化学成份中含萘环和偶氮结构，它是一种潜在的致癌物，可以在环境中以不同途径还原降解为芳香胺类化合物，苯胺对人体具有强烈的致癌作用，所以苏丹红染料不能作为食品添加剂使用。当食品中的苏丹红含量达到千毫克以上，其诱发动动物肿瘤的机会就会上百倍增加，特别是有些代谢产物是人类可能的致癌物，能造成人类肝脏细胞的 DNA 突变。我国自 2005 年 2 月爆发苏丹红事件以来，虽经多次整治，食品“涉红”案件仍时有出现。苏丹红事件给我国食品安全敲响了警钟，加剧了人们对食品安全和质量的担忧，并直接影响到消费者对食品的消费信心。食品安全已成为全社会关注的热点，受到国内外研究机构以及政府部门的高度重视。为了加强食品监督，保障消费者的身体健康，迫切需要建立快速、简便、价廉、灵敏、特异的苏丹红测定新方法。

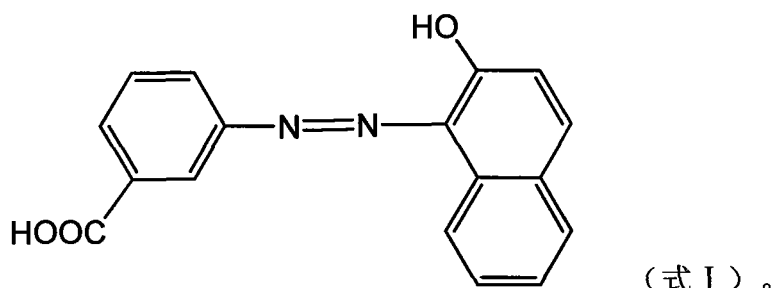
目前，食品中苏丹红染料的常用检测方法是高效液相色谱法、高效液相-质谱联用法、气相色谱-质谱联用法等理化分析方法。虽然这些方法特异性强、灵敏度高，但是样品前处理操作步骤繁琐，成本较高，不适用于大批量样品的筛选检测。免疫化学分析鉴于在抗原抗体的定性定量方面独特的优势弥补了理化分析的不足。免疫分析，特别是酶联免疫吸附分析法（ELISA）具有操作简便快速、成本低、灵敏度高、特异性强、分析样本量大的优点，而且还减少由于采用仪器方法检测而使用的甲醇、乙腈等有机溶剂对环境的污染。因此，ELISA 方法在食品中苏丹红的检测中起着越来越重要的作用。

### 发明内容

本发明的一个目的是提供一种可作为苏丹红半抗原及苏丹红抗原的化合物及

其制备方法。

本发明所提供的可作为苏丹红半抗原的化合物的分子结构式如式 I 所示：

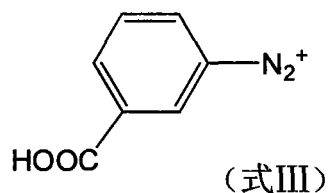


本发明所提供的可作为苏丹红抗原的化合物，是式 I 所述化合物与载体蛋白的偶联物。其结构示意图如图 4 所示。

所述载体蛋白可为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、兰素蛋白或卵清白蛋白，最优选为牛血清白蛋白。

本发明所提供的制备式 I 所示化合物的方法，包括如下步骤：

1) 将间氨基苯甲酸重氮化，得到式 III 所示的间氨基苯甲酸的重氮化离子；



2) 将步骤 1) 得到的间氨基苯甲酸的重氮化离子与 2-萘酚发生偶合反应，得到式 I 所示化合物。

其中，步骤 1) 中所述重氮化的方法包括如下步骤：在亚硝酸根离子和酸性条件下，在 5-10℃ 的温度下，将间氨基苯甲酸转化为重氮化离子。

所述重氮化方法具体可以包括如下操作步骤：将间氨基苯甲酸、酸或酸溶液、亚硝酸盐混合，在 5-10℃ 的温度下反应 25-30 分钟，得到间氨基苯甲酸的重氮化离子。其中，为了使反应充分和提高反应速度，在所述反应过程中还可以进行搅拌。

所述间氨基苯甲酸、亚硝酸盐、酸的投料摩尔比为 (1-1.5) : (1-1.5) : (2-3)，优选为 1 : 1 : 2。

所述反应的温度优选为 5℃，所述反应的时间优选为 28 分钟。

所述酸可以为浓盐酸、硫酸、过氧酸或氟硼酸等无机酸；所述亚硝酸盐可为亚

硝酸钠、亚硝酸钾；优选为浓盐酸和亚硝酸钠的组合。

步骤2)中偶合方法可以包括如下步骤：将2-萘酚、间氨基苯甲酸的重氮化离子混合，在碱性、温度为5-10℃的条件下，反应20-30分钟，得到式I所示苏丹红半抗原。

所述2-萘酚与间氨基苯甲酸的重氮化离子的投料物质的量比为(1-1.5)：(1-1.2)，优选为1：1。

所述偶合方法中温度优选为5℃，所述反应的时间优选为23分钟。

所述碱性条件具体可以通过如下操作实现：将2-萘酚溶解于可溶性碱溶液中，再将得到的溶液加入步骤1)得到的间氨基苯甲酸的重氮化离子的溶液中，再在上述条件下进行反应。

所述可溶性碱溶液可为氢氧化钾、氢氧化钠溶液，优选为氢氧化钠溶液；所述可溶性碱溶液的浓度可为15-25%（质量百分含量），优选为20%；

本发明所提供的制备苏丹红抗原化合物的方法，包括如下步骤：

将式I所示化合物、N,N-二甲基甲酰胺、N,N'-二环己基碳化二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺混合，在20-28℃（优选为25℃）的条件下，反应8-10小时（优选为10小时），得到溶液I；将载体蛋白加入到溶液I中，在20-28℃（优选为25℃）的条件下，反应8-10小时（优选为10小时），得到所述偶联物。

式I所示化合物、N,N-二甲基甲酰胺、N,N'-二环己基碳化二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的投料物质的量比为(1-3)：(4-6)：(1-2)：(1-2)，优选为1：4：1：1。

所述载体蛋白与式I所示化合物的投料物质的量比为(10-5)：(3-1)，优选为5：1。

其中，载体蛋白可为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、兰素蛋白或卵清白蛋白，最优选为牛血清白蛋白。

所述载体蛋白可先溶解于碳酸溶液中，再加入到所述溶液II中。具体可以采取逐滴加入的方式。

所述反应也可以进行搅拌。

所述制备苏丹红抗原的方法中，在将载体蛋白加入到溶液II中反应后，还可以包括透析的步骤。

由上述式I所示化合物或苏丹红抗原免疫动物得到的抗体也属于本发明的保

护范围。所述抗体具体可为单克隆抗体。

上述任一所述化合物和/或苏丹红抗原和/或抗体在检测苏丹红中的应用也属于本发明的保护范围。

本发明以间氨基苯甲酸为起始物质，在亚硝酸根离子和酸性条件下，转化为重氮化离子。将这种重氮化离子与 2-萘酚发生偶合反应，从而形成偶氮化合物。然后以活性酯法与载体蛋白（牛血清蛋白 BSA）偶联制备人工抗原。将人工抗原免疫动物后产生了针对苏丹红的特异性抗体。

实验结果表明，用本发明的抗原免疫动物得到的抗血清的效价可达  $1: 3 \times 10^6$ ，最低检测限为 0.05 ng/mL，半抑制浓度为 0.4 ng/mL，产生的抗体的特异性高、灵敏度高、准确度高。本发明的抗原和/或抗体，可用于建立竞争酶联免疫吸附分析技术，从而用于快速检测食品中的苏丹红残留，较现有的色谱法比，具有成本低廉、操作简单、样品前处理简便、方便快捷的特点，还减少由于采用 HPLC、GC 检测而使用的甲醇、乙腈等有机溶剂对环境的污染，适合于大规模检测。本发明的制备方法的产率高。因此，本发明的抗原及抗体及检测方法具有广阔的应用前景。

### **附图说明**

图 1 为苏丹红半抗原及苏丹红抗原的合成。

图 2 为苏丹红半抗原的质谱图

图 3 为苏丹红半抗原、苏丹红抗原、牛血清白蛋白的紫外吸收图谱。

图 4 为苏丹红抗原的分子结构示意图。

### **具体实施方式**

下述实施例中所使用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材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

实施例 1、苏丹红半抗原及苏丹红抗原的制备

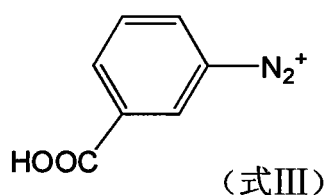
苏丹红半抗原及苏丹红抗原的制备流程如图 1 所示。

一、苏丹红半抗原的合成

（一）合成

1、重氮化反应：将间氨基苯甲酸溶解在浓盐酸中，在 5℃下，加入含亚硝酸钠的水溶液，搅拌反应 28 分钟，得到淡黄色重氮盐溶液，即得到式 III 所示的间氨基苯甲酸重氮化离子的溶液。

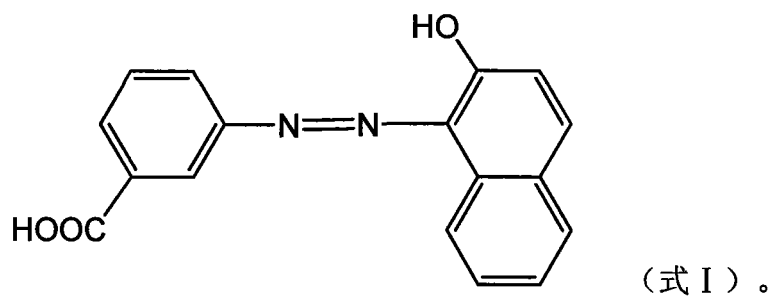
间氨基苯甲酸、浓盐酸、亚硝酸钠的投料物质的量比为 1：2：1。



2、偶合反应：将 2-萘酚溶解于 20%（质量百分含量）氢氧化钠中（2-萘酚与式III重氮化离子的投料物质的量比为 1：1），冷却至 5℃，再缓慢加入间氨基苯甲酸重氮化离子的溶液中，在 5℃的条件下反应 23 分钟，得到苏丹红半抗原。计算半抗原的产率。产率计算公式为：产率=实际得到的产物的量/理论上得到的产物的量×100%。实验设 3 次重复，结果取平均数。结果半抗原的产率为 46%。

## （二）鉴定

取上述产物经 ESI 质谱测定其结构，测得其分子离子峰 291 (M-1)（图 2）；半抗原化合物的元素分析结果（%）：C, 69.86；H, 4.14；N, 9.58；O, 16.42。由上可知，化合物的分子量为 292，分子中含有三个 O，两个 N。判断苏丹红半抗原合成成功。苏丹红半抗原的分子结构式如式 I 所示：



## 二、苏丹红抗原的合成与鉴定

### （一）合成

称取苏丹红半抗原溶解于 N, N-二甲基甲酰胺（DMF）中，超声使之完全溶解，得到溶液 I；N, N'-二环己基碳化二亚胺（DCC）和 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）加入到上述溶液 I 中（苏丹红半抗原、DMF、DCC 和 NHS 的投料物质的量比为 1：4：1：1），在 25℃的条件下，搅拌反应 10 小时，得到溶液 II；牛血清白蛋白溶解于 5 mL

碳酸钠溶液中，逐滴加入到上述溶液 II 中（牛血清白蛋白与式 I 所示化合物的投料物质的量比为 5: 1），继续搅拌，在 25℃ 的条件下，反应 10 小时；离心，取上层反应液，然后将反应液装入透析袋，在 4℃ 用生理盐水溶液透析 48 小时，换水 6 次。将透析液在无菌条件下通过 0.2 μm 的滤膜，分装于安培瓶中，-20℃ 保存。得到目的产物（即苏丹红抗原）。计算目的产物的产率。产率的计算公式为：产率 = 实际得到的产物的量 / 理论上得到的产物的量 × 100%。实验设 3 次重复，结果取平均数。结果表明，目的产物的产率为 38%。

## （二）鉴定

按合成苏丹红人工抗原反应所用的半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例，分别进行紫外（200 nm-400 nm）扫描鉴定，并通过比较三者在同一波长下的吸光值计算其结合比。实验设 3 次重复。由图 3 紫外光谱图可知，产物的紫外光谱图与牛血清蛋白（BSA）相比发生了明显变化，说明半抗原已经与 BSA 成功偶联制得苏丹红人工抗原。经计算，苏丹红半抗原与 BSA 的结合比为 19: 1。

## 实施例 2、苏丹红半抗原及苏丹红抗原的制备

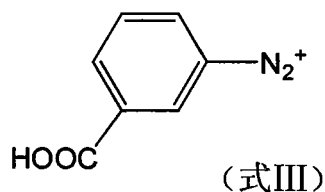
苏丹红半抗原及苏丹红抗原的制备流程如图 1 所示。

### 一、苏丹红半抗原的合成

#### （一）合成

1、重氮化反应：将间氨基苯甲酸溶解在浓盐酸中，在 8℃ 下，加入含亚硝酸钠的水溶液，搅拌反应 25 分钟，得到淡黄色重氮盐溶液，即得到式 III 所示的间氨基苯甲酸重氮化离子的溶液。

间氨基苯甲酸、浓盐酸、亚硝酸钠的投料物质的量比为 1: 1.5: 2.5。



2、偶合反应：将 2-萘酚溶解于 20%（质量百分含量）氢氧化钠中（2-萘酚与式 III 重氮化离子的投料物质的量比为 1: 1.2），冷却至 5℃，再缓慢加入间氨基苯甲酸重氮化离子的溶液中，在 8℃ 的条件下反应 30 分钟，得到苏丹红半抗原。计算

半抗原的产率。产率计算公式为：产率=实际得到的产物的量/理论上得到的产物的量 $\times$ 100%。实验设3次重复，结果取平均数。结果半抗原的产率为45%。

## （二）鉴定

取上述产物经ESI质谱测定其结构，测得其分子离子峰291(M-1)；半抗原化合物的元素分析结果(%)：C, 69.86；H, 4.14；N, 9.58；O, 16.42。由上可知，化合物的分子量为292，分子中含有三个O，两个N。判断苏丹红半抗原合成成功。苏丹红半抗原的分子结构式如式I所示。

## 二、苏丹红抗原的合成与鉴定

### （一）合成

称取苏丹红半抗原溶解于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中，超声使之完全溶解，得到溶液I；N,N'-二环己基碳化二亚胺(DCC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)加入到上述溶液I中(苏丹红半抗原、DMF、DCC和NHS的投料物质的量比为2:5:1.5:1.5)，在20℃的条件下，搅拌反应9小时，得到溶液II；牛血清白蛋白溶解于5 mL碳酸钠溶液中，逐滴加入到上述溶液II中(牛血清白蛋白与式I所示化合物的投料物质的量比为10:3)，继续搅拌，在20℃的条件下，反应9小时；离心，取上层反应液，然后将反应液装入透析袋，在4℃用生理盐水溶液透析48小时，换水6次。将透析液在无菌条件下通过0.2  $\mu$ m的滤膜，分装于安培瓶中，-20℃保存。得到目的产物(即苏丹红抗原)。计算目的产物的产率。产率的计算公式为：产率=实际得到的产物的量/理论上得到的产物的量 $\times$ 100%。实验设3次重复，结果取平均数。结果表明，目的产物的产率为37%。

### （二）鉴定

按合成苏丹红人工抗原反应所用的半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例，分别进行紫外(200 nm-400 nm)扫描鉴定，并通过比较三者在同一波长下的吸光值计算其结合比。实验设3次重复。结果，产物的紫外光谱图与牛血清蛋白(BSA)相比发生了明显变化，说明半抗原已经与BSA成功偶联制得苏丹红人工抗原。经计算，苏丹红半抗原与BSA的结合比为19:1。

## 实施例3、苏丹红半抗原及苏丹红抗原的制备

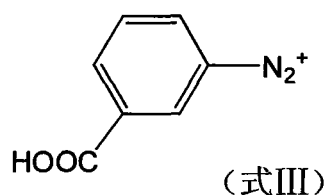
苏丹红半抗原及苏丹红抗原的制备流程如图1所示。

### 一、苏丹红半抗原的合成

### (一) 合成

1、重氮化反应：将间氨基苯甲酸溶解在浓盐酸中，在 10℃下，加入含亚硝酸钠的水溶液，搅拌反应 30 分钟，得到淡黄色重氮盐溶液，即得到式III所示的间氨基苯甲酸重氮化离子的溶液。

间氨基苯甲酸、浓盐酸、亚硝酸钠的投料物质的量比为 1.5: 1: 3。



2、偶合反应：将 2-萘酚溶解于 20%（质量百分含量）氢氧化钠中（2-萘酚与式III重氮化离子的投料物质的量比为 1: 1.5），冷却至 5℃，再缓慢加入间氨基苯甲酸重氮化离子的溶液中，在 10℃的条件下反应 20 分钟，得到苏丹红半抗原。计算半抗原的产率。产率计算公式为：产率=实际得到的产物的量/理论上得到的产物的量×100%。实验设 3 次重复，结果取平均数。结果半抗原的产率为 45.5%。

### (二) 鉴定

取上述产物经 ESI 质谱测定其结构，测得其分子离子峰 291 (M-1)；半抗原化合物的元素分析结果(%)：C, 69.86; H, 4.14; N, 9.58; O, 16.42。由上可知，化合物的分子量为 292，分子中含有三个 O，两个 N。判断苏丹红半抗原合成成功。苏丹红半抗原的分子结构式如式 I 所示。

#### 二、苏丹红抗原的合成与鉴定

##### (一) 合成

称取苏丹红半抗原溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中，超声使之完全溶解，得到溶液 I；N, N'-二环己基碳化二亚胺 (DCC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 加入到上述溶液 I 中（苏丹红半抗原、DMF、DCC 和 NHS 的投料物质的量比为 3: 6: 2: 2），在 28℃的条件下，搅拌反应 8 小时，得到溶液 II；牛血清白蛋白溶解于 5 mL 碳酸钠溶液中，逐滴加入到上述溶液 II 中（牛血清白蛋白与式 I 所示化合物的投料

物质的量比为 4: 1), 继续搅拌, 在 28℃的条件下, 反应 8 小时; 离心, 取上层反应液, 然后将反应液装入透析袋, 在 4℃用生理盐水溶液透析 48 小时, 换水 6 次。将透析液在无菌条件下通过 0.2 μm 的滤膜, 分装于安培瓶中, -20℃保存。得到目的产物 (即苏丹红抗原)。计算目的产物的产率。产率的计算公式为: 产率 = 实际得到的产物的量 / 理论上得到的产物的量 × 100%。实验设 3 次重复, 结果取平均数。结果表明, 目的产物的产率为 37.5%。

## (二) 鉴定

按合成苏丹红人工抗原反应所用的半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例, 分别进行紫外 (200 nm-400 nm) 扫描鉴定, 并通过比较三者在同一波长下的吸光值计算其结合比。实验设 3 次重复。结果, 产物的紫外光谱图与牛血清蛋白 (BSA) 相比发生了明显变化, 说明半抗原已经与 BSA 成功偶联制得苏丹红人工抗原。经计算, 苏丹红半抗原与 BSA 的结合比为 19: 1。

## 实施例 4、通过检测抗体来检测抗原的效果

### 一、苏丹红抗血清的制备

实验选用 10 只 7 周龄, 体重 2-3 公斤, 健康的新西兰大白兔, 分别编号 1-10。实验免疫剂量基础免疫为 1.0 mg/kg, 加强免疫剂量为 1.5 mg/kg, 用稀释液稀释抗原, 加入等体积弗氏完全佐剂, 充分乳化, 在兔背部皮内多点注射进行首免, 2 周后, 取同样量抗原加弗氏不完佐剂乳化后进行背部皮下多点注射, 每 2 周加强免疫一次。从第三次加强免疫开始, 每次免疫后第 8 天与兔子耳缘静脉采血, 测定效价。

待免疫血清效价上去之后, 就可进行采血。采血后应将血液先置室温一段时间待其凝固, 再放 4℃冰箱中 3~4 小时, 待血块收缩后, 离心, 分离出血清。

### 二、苏丹红抗体效果的测定

免疫复合物按常规方法免疫了 10 只兔子。从第三次加强免疫开始, 每次免疫后第 8 天于兔子耳缘静脉采血。血清经适当稀释后用间接竞争性 ELISA 测定效价。

六兔后, 兔子获得了高效价的抗体, 抗血清的效价为 1: 3×10<sup>6</sup>。

### 三、抗血清最低检测限 (LOD 值) 和半数抑制量 (IC<sub>50</sub>) 的检测

苏丹红标准品购自 SIGMA, CAS 号为 842-07-9。

用方阵滴定法确定抗原 (载体蛋白为卵清蛋白, 制备方法同实施例 1 所示) 和

苏丹红抗体的工作浓度，抗原的工作浓度为 0.02 (ug/ml)，苏丹红抗体的工作浓度为 1/20000 (ug/ml)。

用不同浓度的苏丹红标准品溶液做实验溶液，其浓度如下(单位：ng/ml)：0ng/ml、0.05 ng/ml、0.1ng/ml、0.2 ng/ml、0.4 ng/ml、0.8 ng/ml、1.6 ng/ml、3.2 ng/ml。采用 8 组平行试验(n=8)。

间接竞争性 ELISA 方法：用上述工作浓度的抗原包被酶标板，将实验溶液与抗体溶液同时加入酶标板小孔中，同时设置空白孔（将添加的抗体溶液换成高纯水，其它一致）和阴性对照孔（将添加的实验溶液用高纯水代替，其它一致），37℃温育 0.5h，倒出孔内液体，用洗涤液(10×PBST)洗涤 2-5 次，将酶标板倒置在吸水纸上拍打；加入酶标二抗溶液于酶标板小孔中，37℃温育 0.5h，用洗涤液重复洗 3-5 次，吸干；加入底物显色溶液到酶标板小孔中，室温下反应 10-15min，用酶标仪在波长 450nm 处测定吸光度值 A。以吸光度值 A 为纵坐标，以苏丹红实验溶液浓度的  $\log_{10}$  值为横坐标，绘制半对数标准曲线图。结果表明标准曲线具有完整的反 S 形状，并具有上平台和下平台，标准曲线的平行测定次数 8 次，实验重复性良好，相对标准偏差(变异系数)均在 15%以内。

根据标准曲线得出得出 10%抑制量和半数抑制量 ( $IC_{50}$ )，比较检测灵敏度。

抑制率以下式计算：

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min}) - (\text{OD}_x - \text{OD}_{\min})}{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min})} \times 100\%$$

式中： $OD_{\max}$  为不加标准品时的吸光值（即阴性对照）， $OD_x$  为标准品 x 时的吸光值， $OD_{\min}$  为空白对照孔的吸光值。

由上述公式计算得苏丹红抗体的 LOD 值为 0.05 ng/mL，半数抑制量 ( $IC_{50}$ ) 为 0.4 ng/mL。

#### 四、苏丹红抗体特异性测定

本实验选择 3 种苏丹红同系物（苏丹红 II，苏丹红 III，苏丹红 IV）作为交叉反应实验的物质。

用样品稀释液将苏丹红 II、苏丹红 III、苏丹红 IV 分别稀释成如下浓度：0ng/ml、0.05 ng/ml、0.1ng/ml、0.2 ng/ml、0.4 ng/ml、0.8 ng/ml、1.6 ng/ml、3.2 ng/ml。。

按照实验三中所述方法，各自建立标准曲线，测定抑制中浓度  $IC_{50}$ 。

交叉反应率 (%) = (引起 50%抑制苏丹红 I 的浓度/引起 50%抑制的苏丹红类似物浓度) × 100%。

---

实验设 3 次重复，结果取平均数。结果，各类似物的交叉反应率（%）：苏丹红 I 100.0，苏丹红 II 5.1，苏丹红 III 5.7，苏丹红 IV 2.3。本发明抗体与苏丹红类似物的交叉反应率很小，说明抗体的特异性好。

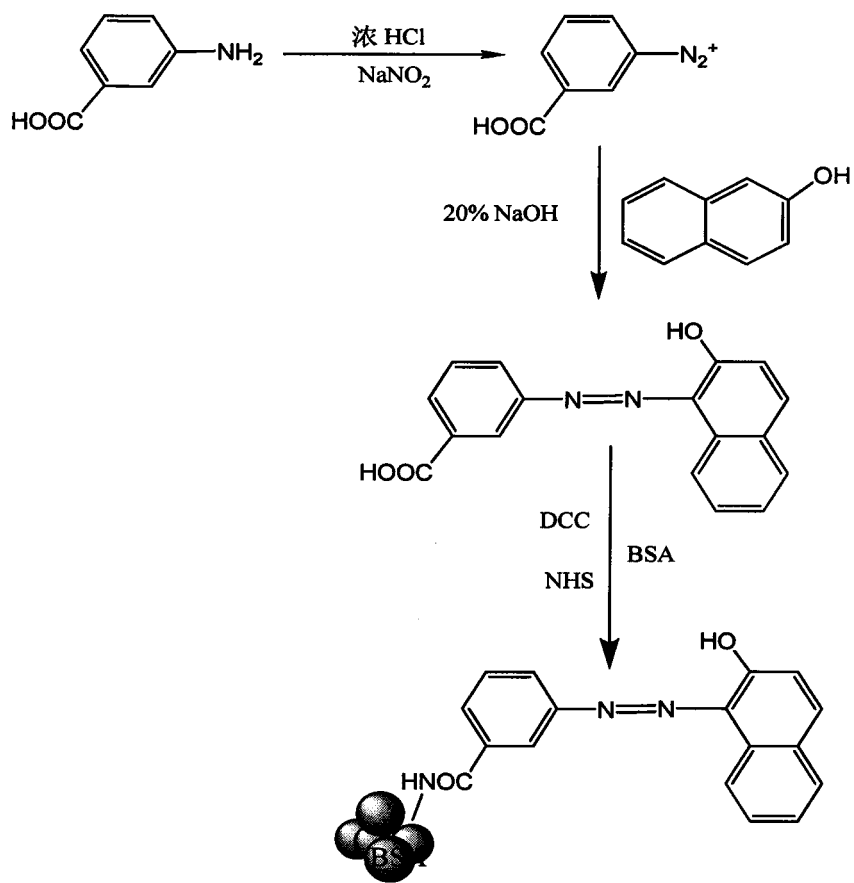


图 1

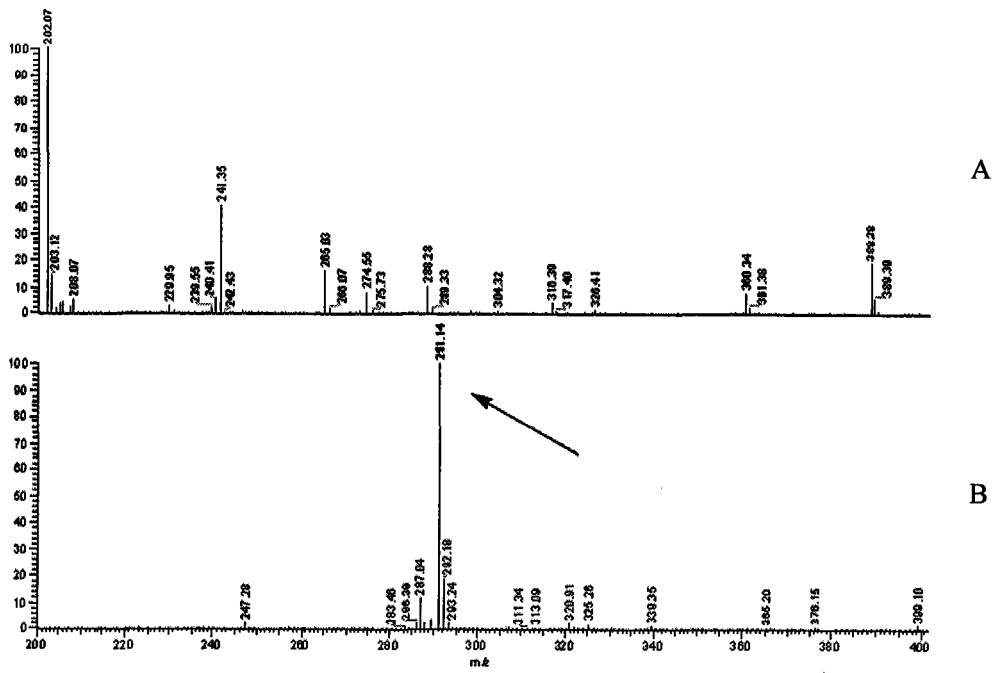


图 2

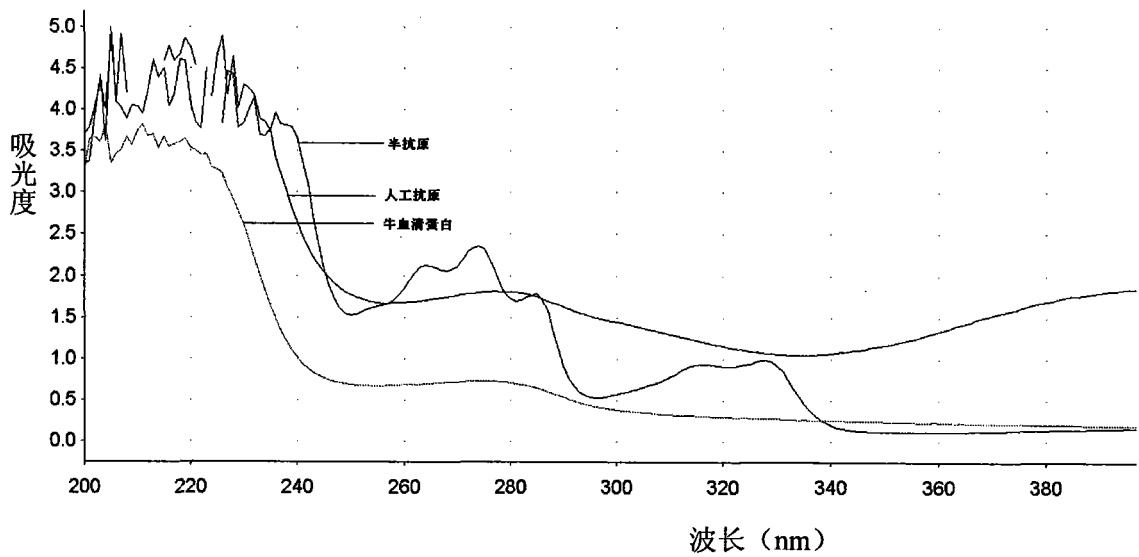


图 3

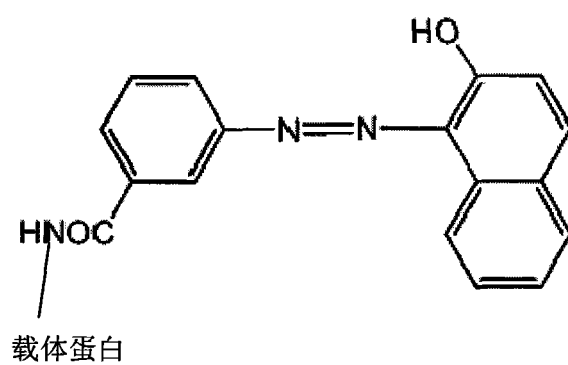


图 4

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种苏丹红半抗原与抗原及其制备方法与应用  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN101643436A</a>  | 公开(公告)日 | 2010-02-10 |
| 申请号            | CN200910085650.X  | 申请日     | 2009-05-27 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 北京维德维康生物技术有限公司  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 北京维德维康生物技术有限公司  |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 北京维德维康生物技术有限公司  |         |            |
| [标]发明人         | 江海洋<br>王战辉<br>吴小平<br>徐飞<br>米铁军<br>张静<br>王进                                |         |            |
| 发明人            | 江海洋<br>王战辉<br>吴小平<br>徐飞<br>米铁军<br>张静<br>王进                                |         |            |
| IPC分类号         | C07C245/10 C07K14/765 C07K14/77 C07K1/113 C07K16/44 G01N33/566 G01N33/531 |         |            |
| 代理人(译)         | 关畅  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                            |         |            |

摘要(译)

本发明公开了一种苏丹红半抗原与抗原及其制备方法与应用。苏丹红半抗原的制备方法包括如下步骤：1)将间氨基苯甲酸重氮化，得到式III所示的间氨基苯甲酸的重氮化离子；2)将步骤1)得到的间氨基苯甲酸的重氮化离子与2-萘酚发生偶合反应，得到式I所示化合物。实验结果表明，用本发明的抗原免疫动物得到的抗血清的效价可达 $1:3 \times 10^6$ ，最低检测限为0.05ng/mL，半抑制浓度为0.4ng/mL，产生的抗体的特异性高、灵敏度高、准确度高。用本发明的抗原和/或抗体检测苏丹红，较现有的色谱法比，具有成本低廉、操作简单、样品前处理简便、方便快捷的特点，适合于大规模检测。因此，本发明的抗原及抗体及检测方法具有广阔的应用前景。

