

[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 200910085646.3

[51] Int. Cl.

C07D 277/18 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/77 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

C07K 1/113 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 2 月 10 日

[11] 公开号 CN 101643457A

[22] 申请日 2009.5.27

[21] 申请号 200910085646.3

[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 吴小平 江海洋 王战辉 李 娜
米铁军 王亚辉 张 静

[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

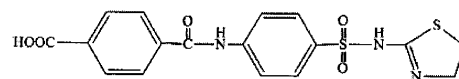
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

[54] 发明名称

磺胺甲噻唑人工抗原及其制备方法与应用

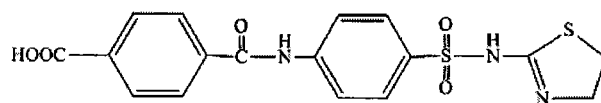
[57] 摘要

本发明公开了一种磺胺甲噻唑人工抗原及其制备方法与应用。该磺胺甲噻唑人工抗原，是将磺胺甲噻唑半抗原与载体蛋白偶联获得的抗原。磺胺甲噻唑半抗原是一种化合物，其结构为式 I 所示。磺胺甲噻唑的人工抗原在磺胺甲噻唑半抗原与载体蛋白间含有一个对醛基苯甲酸间隔臂，包被原与免疫原结构上的差异可以进一步提高检测的灵敏度和特异性。用该磺胺甲噻唑人工抗原免疫动物，可获得特性高的特异性抗体。该磺胺甲噻唑人工抗原与其他已经报道的磺胺甲噻唑人工抗原联合应用于免疫分析，可提高检测方法的灵敏度和特异性。本发明的磺胺甲噻唑的人工抗原可用于磺胺药物的残留检测。



式 I

1、一种化合物，其结构为式 I 所示。



式 I

2、磺胺甲噻唑抗原，是将权利要求 1 所述的化合物与载体蛋白偶联获得的抗原。

3、根据权利要求 2 所述的磺胺甲噻唑抗原，其特征在于：权利要求 1 所述的化合物与所述载体蛋白以酰胺键偶联。

4、根据权利要求 2 或 3 所述的磺胺甲噻唑抗原，其特征在于：所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

5、权利要求 1 所述化合物在磺胺药物的残留检测中的应用。

6、根据权利要求 2 或 3 所述磺胺甲噻唑抗原在磺胺药物的残留检测中的应用。

7、制备权利要求 1 所述化合物的方法，在乙醇中将磺胺甲噻唑与醛基苯甲酸反应，获得所述化合物。

8、根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于：所述磺胺甲噻唑与对醛基苯甲酸的物质的量比为 1：（1-3）。

9、制备权利要求 2-4 中任一所述磺胺甲噻唑抗原的方法，是先制备权利要求 1 所述化合物，然后将所述的化合物与载体蛋白偶联获得所述抗原。

磺胺甲噻唑人工抗原及其制备方法与应用

技术领域

本发明涉及磺胺甲噻唑人工抗原及其制备方法与应用。

背景技术

磺胺甲噻唑（Sulfamethylthiazole），又名甲噻磺胺，是一种人工合成的中效磺胺药，其性质稳定、抑菌谱广、毒性小、口服吸收良好且价格低廉，对畜禽疾病控制与治疗起重要作用，广泛应用于畜牧业。但是由于它在体内的作用时间和代谢时间较长，易残留在动物体内，通过任何途径摄入都有可能在人体中蓄积。药物蓄积浓度超过一定值对人体机能是有害的，长期蓄积则会导致磺胺药抗药性的产生，造成耐药菌的流行性感染，从而失去了治疗人类疾病的价值，对人类的健康产生很大危害。所以，有必要对动物性食品中的磺胺类药物残留进行监测。我国以及美国、欧盟等国家规定了动物性食品中总磺胺以及单个磺胺的最高残留限量（MRLs）为 0.1 mg/kg。

目前，兽药残留检测常用的方法有气相色谱、高效液相色谱以及气质联用等理化分析方法。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，也不适用于大批量样品的筛选检测。免疫化学分析由于在抗原抗体的定性定量方面独特的优势和操作简便快速、成本低、灵敏度较高、分析样本量大的优点弥补了理化分析的不足，在磺胺药物的残留检测中起着越来越重要的作用。

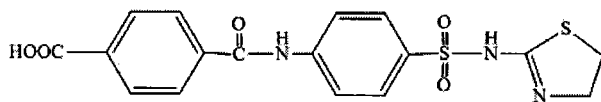
影响免疫化学分析质量的根本因素是抗体的特异性与亲和性，这些性质又决定于免疫半抗原分子的结构，因此免疫半抗原的分子设计与合成就是产生特异性抗体和建立小分子兽药残留快速检测技术的最基础和最关键的步骤。

发明内容

本发明的目的是提供一种磺胺甲噻唑人工抗原及其制备方法与应用。

本发明所提供的磺胺甲噻唑人工抗原，是将磺胺甲噻唑半抗原与载体蛋白偶联获得的抗原。

磺胺甲噻唑半抗原是一种化合物，其结构为式 I 所示。



式 I

磺胺甲噻唑半抗原也是属于本发明的保护范围。

其中，所述的化合物与所述载体蛋白以酰胺键偶联。所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

所述磺胺甲噻唑半抗原可按如下的方法制备：

在乙醇中将磺胺甲噻唑与对醛基苯甲酸反应，获得所述化合物。所述磺胺甲噻唑与醛基苯甲酸的物质的量比为 1：（1-3）。

本发明的磺胺甲噻唑半抗原在磺胺甲噻唑苯环的氨基上引入一个对醛基苯甲酸结构，既最大程度保留了磺胺甲噻唑的特征结构，又具有可以与载体蛋白发生活性偶联的基团-COOH。磺胺甲噻唑半抗原经活性酯法与载体蛋白偶联可制备磺胺甲噻唑的人工抗原。磺胺甲噻唑的人工抗原在磺胺甲噻唑半抗原与载体蛋白间含有一个对醛基苯甲酸间隔臂，包被原与免疫原结构上的差异可以进一步提高检测的灵敏度和特异性。用该磺胺甲噻唑人工抗原免疫动物，可获得特性高的特异性抗体。该磺胺甲噻唑人工抗原与其他已经报道的磺胺甲噻唑人工抗原联合应用于免疫分析，可提高检测方法的灵敏度和特异性。本发明的磺胺甲噻唑半抗原和磺胺甲噻唑的人工抗原可用于磺胺药物的残留检测。

附图说明

图 1 为磺胺甲噻唑半抗原质谱图。

图 2 为磺胺甲噻唑人工抗原的紫外光谱图。

具体实施方式

下述实施例中如无特殊说明所用方法均为常规方法，所用试剂均可从商业途径获得。

实施例 1、制备磺胺甲噻唑半抗原

1. 磺胺甲噻唑半抗原的制备

1) 称取 100 mg 磺胺甲噻唑，置于 10 mL 三角烧瓶中，滴加 2 mL 无水乙醇，充分搅拌使其完全溶解；

2) 称取 100 mg 对醛基苯甲酸，置于 10 mL 三角烧瓶，滴加 2 mL 无水乙醇，

充分搅拌使其完全溶解；

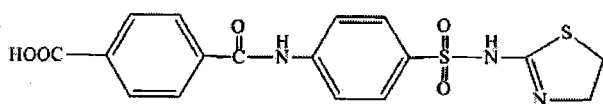
3) 将磺胺甲噻唑乙醇溶液和对醛基苯甲酸乙醇溶液混合，置于室温磁力搅拌过夜。过夜之后，离心，弃上清液，获得浅黄色沉淀，60° C 干燥，获得磺胺甲噻唑半抗原 121 mg，产率为 30%。

2. 磺胺甲噻唑半抗原的鉴定

取磺胺甲噻唑半抗原进行 ESI 质谱鉴定。该物质的 ESI 分子离子峰为 405(M-1) 和 407 (M+1)，见图 1。

元素分析，结果(%, 计算值)如下：C, 50.36; H, 3.73; N, 10.36; O, 19.73; S, 15.82。

磺胺甲噻唑半抗原的结构式如式 I 所示：



式 I

实施例 2、制备磺胺甲噻唑人工抗原

1) 磺胺甲噻唑人工抗原的制备

10 mg 实施例 1 的磺胺甲噻唑半抗原溶解于 5 mL N,N-二甲基甲酰胺中，超声使之完全溶解，并以冷乙醇冷却；加入 10 mg 的 N,N'-二环己基碳化二亚胺 (DCC) 和 5 mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)，室温反应过夜；最后逐滴加入牛血清白蛋白或卵清蛋白的 PBS 溶液 (50 mg 牛血清白蛋白或卵清蛋白溶解于 5 mL 0.01 M 的 pH 7.4 的 PBS 中)，继续搅拌 4 小时；然后将反应液装入透析袋，在 4° C 用 PBS 溶液透析 72 小时，获得磺胺甲噻唑人工抗原 (SM₂-BSA) 或磺胺甲噻唑包被抗原 (SM₂-OVA)，分装于安培瓶中，-20° C 保存。

2) 磺胺甲噻唑人工抗原的鉴定

磺胺甲噻唑人工抗原用 PBS 配成溶液进行紫外 (200-400 nm) 光谱扫描，以 1 mg/mL 的 BSA 作为对照。

紫外 (200-400 nm) 光谱扫描结果见图 2，磺胺甲噻唑人工抗原的紫外图谱与 BSA 相比发生了明显变化，说明磺胺甲噻唑半抗原与载体蛋白 BSA 成功偶联，经计算实施例 1 的磺胺甲噻唑半抗原与载体蛋白的结合比为 11: 1。

3) 磺胺甲噻唑人工抗原免疫动物及 ELISA 竞争抑制实验

新西兰大白兔 10 只，随机分成两组，实验组和对照组，实验组以 2) 制备的磺胺甲噻唑人工抗原进行免疫，对照组以牛血清蛋白（BSA）进行免疫。每只兔子每次免疫 1 mg/mL（以 BSA 量计），每两周免疫一次，共免疫 7 次，第三次免疫之后 7 天，耳缘静脉采血，进行间接竞争 ELISA 分析，具体步骤如下：

1. 包被：用包被缓冲液将磺胺甲噻唑包被抗原稀释为系列浓度，每一浓度包被一行，100 μ L/孔，4℃过夜；
2. 洗涤与封闭：倾去孔内液体，用洗涤液洗涤 3 次，每次 3 分钟；每孔加入 150 μ L 封闭液，37℃恒温封闭 1h，然后洗涤 3 次，每次 3 分钟；
3. 加样：将 50 μ L 抗血清与等体积倍比稀释的磺胺甲噻唑标准液加到酶标板上反应，每孔 100 μ L，37℃反应 1 小时，洗涤同步骤 2；然后每孔加入 100 μ L HRP-羊抗兔 IgG，37℃反应 1 小时，洗涤同步骤 2；
4. 显色测定：每孔加入 TMB 溶液 100 μ L，37℃显色 20 min，然后每孔加入 50 μ L 2 mol L^{-1} H_2SO_4 以终止反应，最后用酶标仪测定各孔的 OD_{450nm} 值。

间接竞争 ELISA 结果表明，第 6 次免疫之后获得了特异性抗体，效价高达 1:102400。

建立间接 ELISA 方法，在倍比稀释的实验组（磺胺甲噻唑人工抗原免疫）兔血清中加入 100 ng/mL 的磺胺甲噻唑标准品进行抑制检测，将其获得的 OD 值与未加磺胺甲噻唑的 OD 值相比较。

分析结果表明，与阴性对照（未加磺胺甲噻唑标准品）相比，吸光值明显下降，随着血清稀释倍数的增加，吸光值呈明显的递减梯度。说明获得的兔血清能够特异性地识别磺胺甲噻唑。

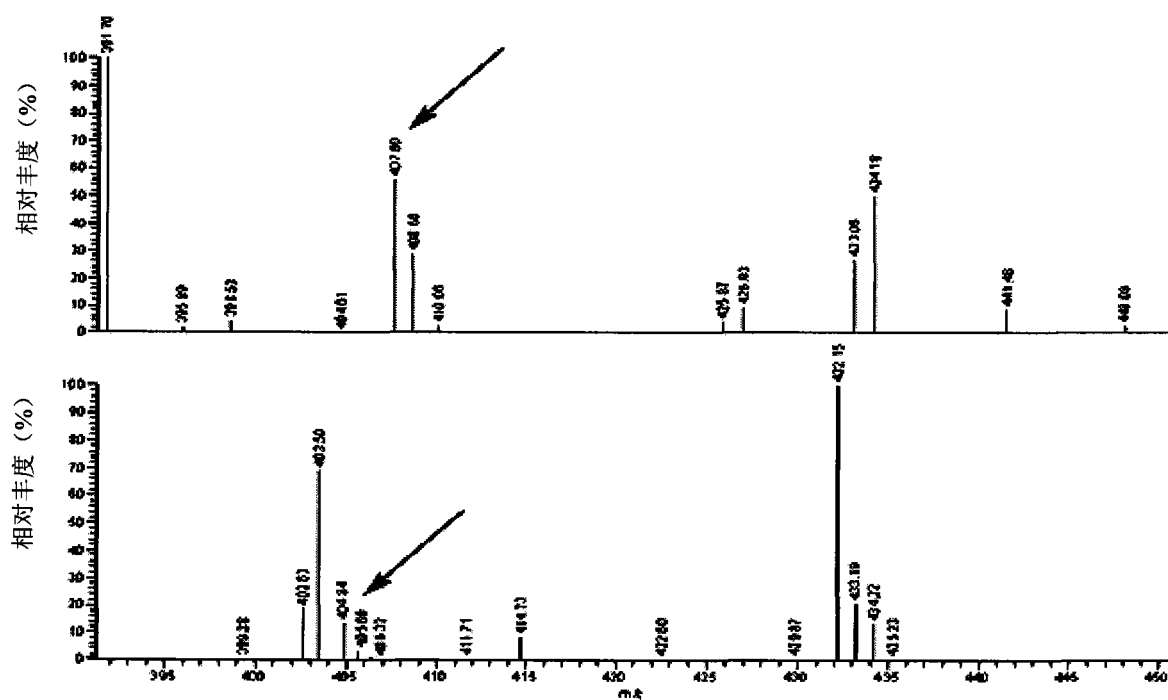


图 1

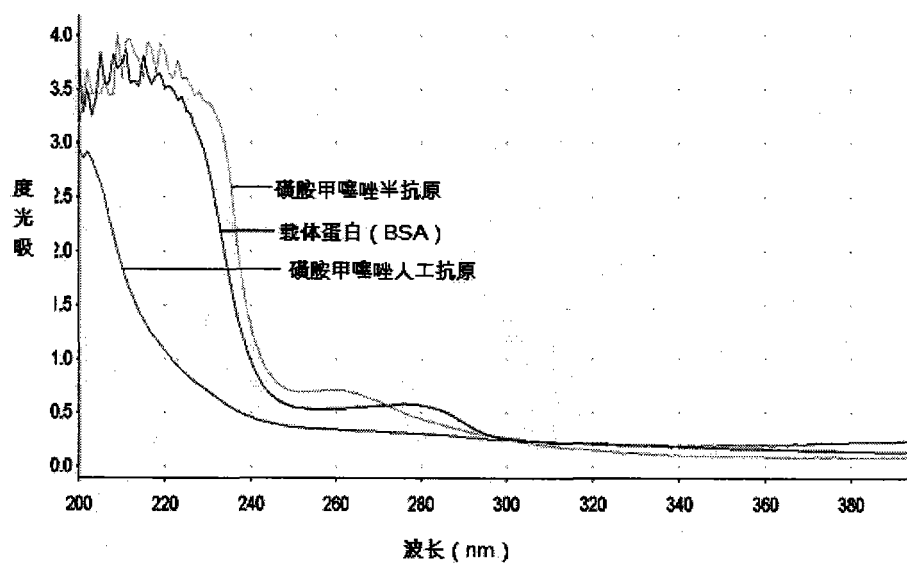


图 2

专利名称(译)	磺胺甲噻唑人工抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN101643457A	公开(公告)日	2010-02-10
申请号	CN200910085646.3	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	吴小平 江海洋 王战辉 李娜 米铁军 王亚辉 张静		
发明人	吴小平 江海洋 王战辉 李娜 米铁军 王亚辉 张静		
IPC分类号	C07D277/18 C07K14/765 C07K14/77 G01N33/566 G01N33/531 C07K1/113		
代理人(译)	关畅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种磺胺甲噻唑人工抗原及其制备方法与应用。该磺胺甲噻唑人工抗原，是将磺胺甲噻唑半抗原与载体蛋白偶联获得的抗原。磺胺甲噻唑半抗原是一种化合物，其结构为式I所示。磺胺甲噻唑的人工抗原在磺胺甲噻唑半抗原与载体蛋白间含有一个对醛基苯甲酸间隔臂，包被原与免疫原结构上的差异可以进一步提高检测的灵敏度和特异性。用该磺胺甲噻唑人工抗原免疫动物，可获得特性高的特异性抗体。该磺胺甲噻唑人工抗原与其他已经报道的磺胺甲噻唑人工抗原联合应用于免疫分析，可提高检测方法的灵敏度和特异性。本发明的磺胺甲噻唑的人工抗原可用于磺胺药物的残留检测。

