



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101948531 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 19

(21) 申请号 201010260392. 7

(22) 申请日 2010. 08. 23

(71) 申请人 上海海洋大学

地址 201306 上海市浦东新区临港新城沪城  
环路 999 号

(72) 发明人 杨先乐 陈力 胡鲲 黄宣运  
姜有声 符贵红 付乔芳

(74) 专利代理机构 上海智力专利商标事务所  
31105

代理人 瞿承达 罗芳英

(51) Int. Cl.

*C07K 14/765* (2006. 01)

*G01N 33/53* (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 2 页

### (54) 发明名称

一种用于孔雀石绿检测的完全抗原及其制备方法

### (57) 摘要

本发明公开了一种用于孔雀石绿检测的完全抗原及其制备方法。本发明首次利用孔雀石绿的结构类似物副品红,进行了用于孔雀石绿检测的完全抗原的合成。免疫原是由副品红和牛血清蛋白在室温条件下,通过碳二亚胺法进行偶联反应,用磷酸缓冲液(pH为7.4,浓度为0.01mol/L)透析后,经过冷冻干燥获得的。研究表明,该方法不仅成功地合成了可用于制备检测孔雀石绿特异抗体的免疫原,同时采用了新的偶联方法、缩短了制备时间,提高了偶联比率。本发明为开发孔雀石绿药物残留酶联免疫检测方法奠定了基础。

1. 一种用于孔雀石绿检测的完全抗原,其特征在于,所述的完全抗原是用副品红制备的。

2. 一种用于孔雀石绿检测的完全抗原的制备方法,其特征在于,通过下列方法制得:先将牛血清白蛋白、副品红、1-乙基-(3-甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐以摩尔比 1 : 129 : 5216 的比例一一加入到磷酸盐缓冲液中,在室温下反应 2 个小时;接着将反应后的液体装入透析袋中,再放入自来水中透析 48 小时;每 12 小时换液一次,最后收集透析袋内的液体;在  $-20^{\circ}\text{C}$  中预冷冻 2 个小时,然后在  $-50^{\circ}\text{C}$  下冷冻干燥,制成完全抗原粉红色固体粉末。

3. 根据权利要求 2 所述的一种用于孔雀石绿检测的完全抗原的制备方法,其特征在于所述的磷酸盐缓冲液是 PH 为 7.4,含量为 0.01mol/L 的磷酸缓冲液。

4. 根据权利要求 2 所述的一种用于孔雀石绿检测的完全抗原的制备方法,其特征在于所述的透析袋是半周长为 22mm,截留分子量为 14000 的透析袋。

## 一种用于孔雀石绿检测的完全抗原及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于孔雀石绿检测的完全抗原,特别是涉及一种用于孔雀石绿检测的完全抗原的制备方法。

### 背景技术

[0002] 由于孔雀石绿独特的苯环结构,其自身不含氨基和羧基,不能为偶联提供位点,给半抗原的偶联改造增加了一定的难度,添加氨基时会产生邻位、对位、间位不同产物,从而导致改造后的产物不均一。难以用于孔雀石绿残留检测。

### 发明内容

[0003] 本发明首次找到了孔雀石绿的结构类似物,从而合成完全抗原。它不但能有效的制得用于孔雀石绿残留检测的免疫原。而且操作简单,生产效率高。

[0004] 为了达到上述目的本发明是这样实现的:

[0005] 本发明提供一种用于孔雀石绿检测的完全抗原,所述的完全抗原是用副品红制备的。

[0006] 本发明还提供一种用于孔雀石绿检测的完全抗原的制备方法,操作如下:

[0007] 先将先将牛血清白蛋白、副品红、1-乙基-(3-甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐以摩尔比 1 : 129 : 5216 的比例一一加入到磷酸盐缓冲液中,在室温下反应 2 个小时,接着将反应后的液体装入透析袋中,再放入自来水中透析 48 小时,每 12 小时换液一次,最后收集透析袋内的液体,在 -20℃ 中预冷冻 2 个小时,然后在 -50℃ 下冷冻干燥,制成完全抗原粉红色固体粉末。

[0008] 所述的磷酸盐缓冲液是 PH 为 7.4,含量为 0.01mol/L 的磷酸缓冲液。

[0009] 所述的透析袋是半周长为 22mm,截留分子量为 14000 的透析袋。

[0010] 由于孔雀石绿独特的苯环结构,其自身不含氨基和羧基,不能为偶联提供位点,给半抗原的偶联改造增加了一定的难度,添加氨基时会产生邻位、对位、间位不同产物,从而导致改造后的产物不均一。本发明首次找到了孔雀石绿的结构类似物副品红,可以生产均一的产物用于孔雀石绿检测。另外,由于本发明采用了改进的碳二亚胺法,本发明的完全抗原的合成过程只需要 50 个小时左右,这样使制备过程得到了简化,大大节约了制备完全抗原的时间,提高了生产效率,其效率可提高 49% 左右。与此同时采用了自来水作为透析液,该方法也降低了生产成本。另外,本发明制备的完全抗原的比例在 20-37 之间,由此,为对提高孔雀石绿药物残留酶联免疫检测方法的准确度和灵敏度有了可靠的保证;并且,还有利于普及推广应用。

### 具体实施方式:

[0011] 应当理解,下面实施例中未说明的常规条件和方法,通常按照所属领域实验人员常规采用方法;如萨姆布鲁克和拉塞尔主编的《分子克隆实验指南》第三版,或按照制造厂

商所建议的步骤和条件。常用试剂为市售分析纯试剂。

[0012] 实施例一：

[0013] 以下将对本发明的一种用于孔雀石绿检测的完全抗原的制备方法作进一步的详细描述。

[0014] 具体步骤如下：

[0015] 1、称取 9.6g 的氯化钠、3.58g 十二水磷酸氢二钠、0.4g 氯化钾、0.7g 磷酸二氢钾加入 950ml 的蒸馏水，调节 PH 至 7.4，再加入 50ml 的蒸馏水，配置成 1000ml，浓度为 0.01mol/L 的磷酸缓冲液。

[0016] 2、在 15ml 的离心管中依次加入牛血清白蛋白 32mg (0.48u mol)、副品红 20mg (61.8u mol)、1-乙基-(3-甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 480mg (2503.8u mol)，再加入 8ml 的磷酸缓冲液 (PH 为 7.4，含量为 0.01mol/L)，在室温下反应 2 小时。

[0017] 3、将反应好的液体装入透析袋 (半周长 22mm，截留分子量 14000) 内，再放入装有自来水的烧杯中，透析 48 小时，每 12 小时换自来水一次。

[0018] 4、将透析好的液体，在 -20℃ 中预冷冻 2 个小时，然后在 -50℃ 下冷冻干燥，制成完全抗原粉红色固体粉末。

[0019] 实施例二：

[0020] 用于孔雀石绿检测的完全抗原的使用及效果

[0021] (1) 采用此合成的完全抗原用于免疫小鼠，免疫剂量为 0.25mg/次，免疫四次后进行眼眶取血，利用间接 ELISA 法，测得的小鼠血清效价可达  $6.25 \times 10^5$ ，远远高于其他抗原免疫小鼠获得血清效价，为后续的单克隆抗体的制备奠定了基础。

[0022] (2) 孔雀石绿进入鱼体后，24h 之内 98% 代谢为无色孔雀石绿，利用合成的完全抗原，通过竞争性 ELISA 检查，可直接检测无色孔雀石绿，避免了其他检测方法需将无色孔雀石绿重新转化为孔雀石绿，节省了成本和时间。

[0023] (3) 采用此合成的完全抗原免疫小鼠，获得的抗体能有效的检测水产品中孔雀石绿及无色孔雀石绿的残留，检出限 200ng/kg，远低于国家标准《水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定高效液相色谱荧光检测法》中 0.5ug/kg 的检出限。

专利名称(译)	一种用于孔雀石绿检测的完全抗原及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101948531A</a>	公开(公告)日	2011-01-19
申请号	CN201010260392.7	申请日	2010-08-23
[标]申请(专利权)人(译)	上海海洋大学		
申请(专利权)人(译)	上海海洋大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海海洋大学		
[标]发明人	杨先乐 陈力 胡鲲 黄宣运 姜有声 符贵红 付乔芳		
发明人	杨先乐 陈力 胡鲲 黄宣运 姜有声 符贵红 付乔芳		
IPC分类号	C07K14/765 G01N33/53		
代理人(译)	罗芳英		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种用于孔雀石绿检测的完全抗原及其制备方法。本发明首次利用孔雀石绿的结构类似物副品红，进行了用于孔雀石绿检测的完全抗原的合成。免疫原是由副品红和牛血清蛋白在室温条件下，通过破二亚胺法进行偶联反应，用磷酸缓冲液(pH为7.4，浓度为0.01mol/L)透析后，经过冷冻干燥获得的。研究表明，该方法不仅成功地合成了可用于制备检测孔雀石绿特异抗体的免疫原，同时采用了新的偶联方法、缩短了制备时间，提高了偶联比率。本发明为开发孔雀石绿药物残留酶联免疫检测方法奠定了基础。