

[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 200910085645.9

[51] Int. Cl.

C07D 263/26 (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 101643455A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/531 (2006.01)

[22] 申请日 2009.5.27

[21] 申请号 200910085645.9

[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 王战辉 江海洋 吴小平 王亚辉
张 静 阮永磊 黄思扬 徐 飞

[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

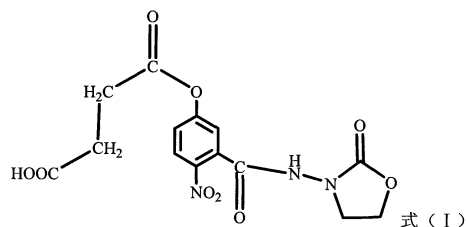
权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 2 页

[54] 发明名称

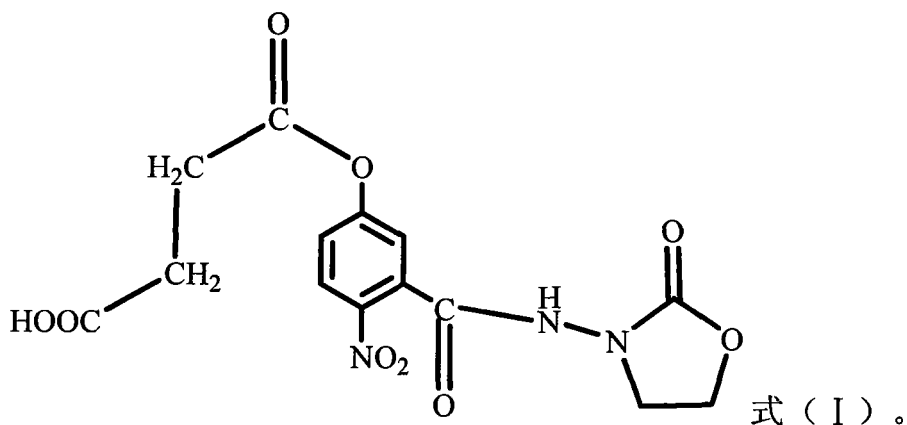
呋喃唑酮代谢物半抗原、抗原及其制备方法和应用

[57] 摘要

本发明公开了一种呋喃唑酮代谢物半抗原、抗原及其制备方法和应用。本发明提供的呋喃唑酮代谢物半抗原是式(I)所示化合物,用式(I)所示化合物与载体蛋白连接可以得到呋喃唑酮代谢物抗原。所述呋喃唑酮代谢物抗原可应用于在制备呋喃唑酮代谢物特异性抗体。本发明提供的制备化合物的方法,操作简单,纯度和产率都很高。将本发明的化合物免疫动物后产生对呋喃唑酮代谢物高亲和力的特异性抗体,用该抗体建立的酶联免疫吸附分析法可用于快速、灵敏、简便地检测动物源性食品呋喃唑酮代谢物的残留量。本发明具有重大经济价值和社会意义。



1、式（I）所示化合物：



2、式（I）所示化合物的制备方法，包括如下步骤：

（1）将 3-氨基-2-恶唑烷基酮和 5-羟基-2-硝基-苯甲醛 20-30℃ 反应 6-8 小时，干燥后得到粉末；

（2）将步骤（1）的产物与琥珀酸酐于有机溶剂中回流，得到式（I）化合物；

所述 3-氨基-2-恶唑烷基酮、所述 5-羟基-2-硝基-苯甲醛和所述琥珀酸酐的物质的量的比值为（1-2）：（3-5）：（6-10）。

3、如权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述 3-氨基-2-恶唑烷基酮、所述 5-羟基-2-硝基-苯甲醛和所述琥珀酸酐的物质的量的比值为 1：3.8：8.3。

4、如权利要求 2 或 3 所述的方法，其特征在于：步骤（1）中，所述反应是在有机溶剂或有机溶剂溶液中进行的；步骤（2）中，所述回流的温度为 60℃-80℃、时间为 8-10 小时。

5、如权利要求 2 至 4 中任一所述的方法，其特征在于：所述方法还包括如下步骤：将步骤（2）中回流后的产物在惰性气体环境中吹干，将得到的粉末洗涤后烘干。

6、一种呋喃唑酮代谢物抗原，是将式（I）所示化合物与载体蛋白偶联得到的偶联物。

7、权利要求 6 所述呋喃唑酮代谢物抗原的制备方法，包括如下步骤：

（1）将权利要求 1 所述化合物、N,N'-二环己基碳化二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺在 N,N-二甲基甲酰胺中 20℃-30℃ 反应 8-10 小时；

权利要求 1 所述化合物、N,N'-二环己基碳化二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺和 N,N-二甲基甲酰胺的物质的量的比值为 1：1：1：（3-5）；

（2）将步骤（1）的反应产物的上清液与载体蛋白溶液混合，20℃-30℃ 反应 4-6

小时，得到所述呋喃唑酮代谢物抗原。

8、权利要求 6 所述呋喃唑酮代谢物抗原在制备呋喃唑酮代谢物特异性抗体中的应用。

9、应用权利要求 6 所述呋喃唑酮代谢物抗原制备得到的抗体。

10、权利要求 1 所述化合物、权利要求 6 所述呋喃唑酮代谢物抗原、权利要求 9 所述抗体在检测呋喃唑酮代谢物中的应用。

呋喃唑酮代谢物半抗原、抗原及其制备方法和应用

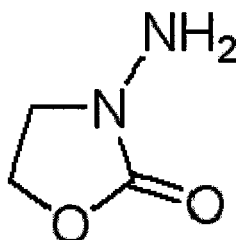
技术领域

本发明涉及一种呋喃唑酮代谢物半抗原、抗原及其制备方法和应用。

背景技术

呋喃唑酮，又名痢特灵，属于硝基呋喃类药物，是一种人工合成的抗菌药，药效稳定，能抑制或杀灭多种革兰氏阳性和阴性细菌，并对某些原虫、真菌有一定作用，临床上常应用于防治畜禽肠道感染。据资料报道，呋喃唑酮具有较强的致畸、致癌、致突变等毒副作用，其在动物性食品中的残留直接威胁到人类身体健康。1995年，欧盟禁止呋喃唑酮用于食品动物，随后美国、日本、澳大利亚、中国等均取消呋喃唑酮在畜禽生产上的使用，但呋喃唑酮残留超标事件时有发生，因此很有必要建立一种快速筛选呋喃唑酮残留的方法。

呋喃唑酮在动物体内很快代谢成3-氨基-2-恶唑烷基酮(AOZ)，与组织结合的AOZ在体内滞留时间长，被视为残留标示物。AOZ的分子式为 $C_3H_6N_2O_2$ ，结构如式(II)所示：



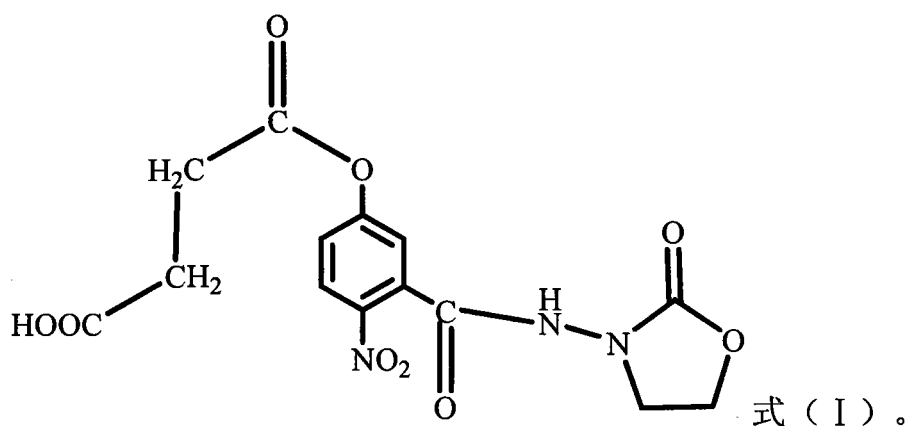
式(II)。

目前检测AOZ残留的方法有LC-UV，LC-MS和LC-MS-MS，该类技术所需设备要求较高，不适合高通量样品筛选，仪器价格昂贵，对操作人员的要求较高，难于推广。免疫分析检测技术是近年来在环境、食品安全监测领域逐渐广泛应用的一种快速、高通量、低成本的检测技术，已逐渐成为世界各国有毒有害残留物快速筛选监测的主要方法之一，这为呋喃唑酮代谢物的检测提供了新的途径。

发明内容

本发明的目的是提供一种呋喃唑酮代谢物半抗原、抗原及其制备方法和应用。

本发明提供的呋喃唑酮代谢物半抗原，是式(I)所示化合物：



本发明还保护式 (I) 所示化合物的制备方法, 包括如下步骤:

(1) 将 3-氨基-2-恶唑烷基酮 (AOZ) 和 5-羟基-2-硝基-苯甲醛 20-30℃ 反应 6-8 小时, 干燥后得到粉末;

(2) 将步骤 (1) 的产物与琥珀酸酐于有机溶剂中回流, 得到式 (I) 化合物; 所述 3-氨基-2-恶唑烷基酮 (AOZ)、所述 5-羟基-2-硝基-苯甲醛和所述琥珀酸酐的物质的量的比值可为 (1-2): (3-5): (6-10)。

所述 3-氨基-2-恶唑烷基酮、所述 5-羟基-2-硝基-苯甲醛和所述琥珀酸酐的物质的量的比值具体可为 1: 3.8: 8.3。

步骤 (1) 中, 所述反应可在有机溶剂或有机溶剂溶液中进行, 常规有机溶剂均可采用, 如乙醇。实际操作中, 可先将 3-氨基-2-恶唑烷基酮和 5-羟基-2-硝基-苯甲醛分别溶解, 再把两个溶液混合, 从而避免产物中含有大量未反应完全的原料。

步骤 (2) 中, 常规有机溶剂均可采用, 既可为单一成分的有机溶剂, 也可为几种有机溶剂的混合物, 如可为丙酮和吡啶的混合物。

步骤 (2) 中, 所述回流的温度可为 60℃-80℃、时间可为 8-10 小时; 所述回流的温度优选为 70℃、时间优选为 8 小时。

所述方法还可包括如下步骤: 将步骤 (2) 中回流后的产物在惰性气体环境中吹干, 然后将得到的粉末洗涤后烘干, 以去除未反应完全的物质, 采用惰性气体环境是为了避免产物表面发生氧化。

本发明提供的呋喃唑酮代谢物抗原, 是将式 (I) 所示化合物与载体蛋白偶联得到的偶联物。

所述呋喃唑酮代谢物抗原的结构示意图见图 3。

本发明还保护所述呋喃唑酮代谢物抗原的制备方法, 包括如下步骤:

(1) 将式 (I) 所示化合物、N, N'-二环己基碳化二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚

胺在N,N-二甲基甲酰胺中20℃-30℃反应8-10小时；

式(I)所示化合物、N,N'-二环己基碳化二亚胺(DCC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和N,N-二甲基甲酰胺(DMF)的物质的量的比值为1:1:1:(3-5)；

(2)将步骤(1)的反应产物的上清液与载体蛋白溶液混合,20℃-30℃反应4-6小时,得到所述呋喃唑酮代谢物抗原。

常用载体蛋白均可采用,如牛血清白蛋白(BSA),卵清蛋白(OVA)等。

步骤(2)中,所述载体蛋白溶液可为含有载体蛋白的磷酸盐缓冲液。

所述呋喃唑酮代谢物抗原可以作为免疫原制备呋喃唑酮代谢物特异性抗体。利用所述呋喃唑酮代谢物抗原作为免疫原免疫动物可获得高特异性的抗体,其抗血清效价可达到1:51200。

应用所述呋喃唑酮代谢物抗原制备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。

式(I)所示化合物、所述呋喃唑酮代谢物抗原、所述抗体均可应用于检测呋喃唑酮代谢物。

将所得抗体用于ELISA方法检测呋喃唑酮代谢物,检测灵敏度高,最低检测限可达0.2ng/mL。所得抗体的特异性极好,呋喃唑酮代谢物人工抗原与硝基呋喃类其它药物及常用抗菌药,如呋喃它酮、呋喃妥因、呋喃西林、四环素、磺胺二甲嘧啶、阿莫西林、恩诺沙星、土霉素无交叉反应,交叉反应率都小于0.01%。

本发明提供的制备化合物的方法,操作简单,纯度和产率都很高。将本发明的化合物免疫动物后产生对呋喃唑酮代谢物高亲和力的特异性抗体,用该抗体建立的酶联免疫吸附分析法可用于快速、灵敏、简便地检测动物源性食品呋喃唑酮代谢物的残留量。本发明具有重大经济价值和社会意义。

附图说明

图1为呋喃唑酮代谢物半抗原负离子质谱图。

图2为呋喃唑酮代谢物人工抗原的紫外光谱图。

图3为所述呋喃唑酮代谢物抗原的结构示意图。

具体实施方式

以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

产率=实际得到的产物的质量/理论上得到产物的质量×100%。

实施例 1、呋喃唑酮代谢物半抗原的制备和鉴定

一、呋喃唑酮代谢物半抗原的制备

3-氨基-2-恶唑烷基酮：5-羟基-2-硝基-苯甲醛：琥珀酸酐=1：3.8：8.3（摩尔比）。

1、溶液 A 和溶液 B 的制备

溶液 A：25mg 3-氨基-2-恶唑烷基酮溶解于 1mL 蒸馏水中，备用。

溶液 B：155mg 5-羟基-2-硝基-苯甲醛，溶解于 4mL 乙醇中，备用。

2、在室温（20-30℃）条件下，以不断搅拌的方式，把溶液 A 逐渐加到溶液 B 中，反应 7 小时，得到溶液 C。

3、溶液 C 5000rpm 离心 10min，取出沉淀，用少量无水乙醇洗涤两次，置干燥箱中 60℃烘干，得到黄色粉末。

4、将步骤 3 的产物转移至 20mL 圆底烧瓶内，加入 200mg 琥珀酸酐，溶解于 5mL 丙酮和 1mL 吡啶混合溶液中，70℃回流 8 小时。

5、将反应产物 40℃氮气吹干，得到固体粉末，用 10mL 蒸馏水洗涤两次，5000rpm 离心 5min，沉淀置干燥箱中 60℃烘干。得到反应产物（呋喃唑酮代谢物半抗原）41mg，产率为 48.9%。

二、呋喃唑酮代谢物半抗原的鉴定

将步骤一制备得到的呋喃唑酮代谢物半抗原进行质谱鉴定和元素分析。

质谱图见图 1。呋喃唑酮代谢物半抗原具有分子离子峰 366（M-1）。

半抗原化合物的元素分析结果（%）：C，45.78； H， 3.57； N， 11.44； O， 39.21。

分析结果表明：呋喃唑酮代谢物半抗原的结构如式（I）所示，分子量为 367。

实施例 2、呋喃唑酮代谢物人工抗原的制备和鉴定

一、呋喃唑酮代谢物人工抗原的制备

1、将实施例 1 制备的呋喃唑酮代谢物半抗原（式（I）所示化合物）溶解于 N,N-二甲基甲酰胺（DMF）中，然后加入 N,N'-二环己基碳化二亚胺（DCC）和 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS），室温（20-30℃）搅拌 9 小时，4℃过夜，离心分出上清液；呋喃唑酮代谢物半抗原：DCC：NHS：DMF =1：1：1：4（摩尔比）。

2、将上清液加入到溶有载体蛋白（BSA）的磷酸盐缓冲液中（0.01 mol/L, pH 7.4），继续搅拌 5 小时，得到呋喃唑酮代谢物人工抗原。

3、将步骤 2 的溶液装入透析袋，在 4℃用磷酸盐缓冲液（0.01 mol/L, pH 7.4）透析 72 小时，换水 10 次。

4、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。

二、呋喃唑酮代谢物人工抗原的鉴定

将步骤一制备的呋喃唑酮代谢物人工抗原溶液用 PBS 溶液稀释，然后进行紫外（200-400 nm）光谱扫描，以 300 μg/mL 的 BSA 作为对照。产物的紫外图谱与 BSA 相比发生了明显变化，说明呋喃唑酮代谢物半抗原与载体蛋白 BSA 成功偶联。呋喃唑酮代谢物半抗原分子与载体蛋白分子的结合比为 14: 1。

实施例 3、抗血清的制备和特异性鉴定

一、免疫动物制备抗血清

采用 5 只新西兰大白兔为免疫动物，以呋喃唑酮代谢物人工抗原（实施例 2 制备的）为免疫原，每次免疫的免疫剂量为 1mg/kg。免疫方法如下：首免时将免疫原与等体积弗氏完全佐剂充分乳化，颈背部皮下多点注射，间隔 3-4 周取将免疫原与弗氏不完全佐剂混合制成乳化剂，加强免疫一次，共免疫 7 次，最后一次不加佐剂。

从加强免疫第二次开始，在每次免疫后第 8 天于兔子耳缘静脉采血，采血后 4℃冰箱放置 5-6 小时，然后以 5000 rpm 离心 10min，分离血清，血清经适当稀释后用间接 ELISA 测定效价。第 7 次免疫时，兔子获得了高效价的抗体，抗血清的滴度为 1: 51200。

二、抗血清最低检测限（LOD 值）和半数抑制量（IC₅₀）的检测

3-氨基-2-恶唑烷酮标准品购自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).; CAS 编号: 80-65-9。

用方阵滴定法确定呋喃唑酮代谢物包被抗原（AOZ-OVA，把载体蛋白换成卵清蛋白，制备方法同呋喃唑酮代谢物人工抗原）和步骤一制备的抗血清的工作浓度，呋喃唑酮代谢物包被抗原的工作浓度为 500ng/mL，抗血清的工作浓度为 $1/8 \times 10^4$ 。

用不同浓度的 3-氨基-2-恶唑烷酮标准品溶液做实验溶液，其浓度如下（单位：ng/mL）：0、0.5、1、2、4、8、16、32、64、128、256。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1h，倒出孔内液体，用洗涤液（10×PBST）洗涤3-5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1h，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3-氨基-2-恶唑烷酮实验溶液浓度的log10值为横坐标，绘制半对数标准曲线图。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10%抑制量和半数抑制量（IC₅₀），比较检测灵敏度。

抑制率用以下式计算：

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

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ELISA方法的标准曲线可见，半数抑制量（IC₅₀）为1.0 ng/mL，最低检测限（LOD）为0.2 ng/mL，在0.2-4.1ng/mL范围内，抑制率与药物浓度的对数值呈显著的线性关系，相关系数为r=0.9982。

三、抗血清特异性测定

抗血清的特异性就是指它同特异性抗原结合的能力与同该抗原类似物结合能力的比较。常用交叉反应率作为评价的重要标准。交叉反应越小，抗血清的特异性越好。

检测呋喃唑酮代谢物人工抗原与如下几种物质的交叉反应率：

呋喃唑酮、AOZ、3-(2-硝基苯亚甲基)-氨基-2-恶唑烷酮（NP-AOZ）、呋喃唑酮代谢物半抗原、呋喃它酮、呋喃妥因、呋喃西林、四环素、磺胺二甲嘧啶、阿莫西林、恩诺沙星、土霉素。

用样品稀释液将以上几种物质分别稀释成如下浓度：0ng/ml、0.5ng/ml、1ng/ml、2ng/ml、4ng/ml、8ng/ml、16ng/ml、32ng/ml、128ng/ml。（请指明）

按照步骤二中所述方法，各自建立标准曲线，测定抑制中浓度IC₅₀。

交叉反应率（%）=（引起50%抑制的呋喃唑酮代谢物人工抗原的浓度/引起50%

抑制的其它物质的浓度) $\times 100\%$ 。

实验设3次重复, 结果取平均数。所得特异性抗体与呋喃唑酮、NP-AOZ (呋喃唑酮残留标识物)、呋喃唑酮代谢物(AOZ)、呋喃唑酮代谢物半抗原的交叉反应率分别为5.24%、100.0%、3.72%、113.65%; 呋喃唑酮代谢物人工抗原与呋喃它酮、呋喃妥因、呋喃西林、四环素、磺胺二甲嘧啶、阿莫西林、恩诺沙星、土霉素交叉反应率都小于0.01%。结果表明: 说明抗血清的特异性非常好。

实施例 4、呋喃唑酮代谢物半抗原的制备和鉴定

一、呋喃唑酮代谢物半抗原的制备

3-氨基-2-恶唑烷基酮: 5-羟基-2-硝基-苯甲醛: 琥珀酸酐=1: 3: 6 (摩尔比)。

1、溶液 A 和溶液 B 的制备

溶液 A: 3-氨基-2-恶唑烷基酮溶解于 1mL 蒸馏水中, 备用。

溶液 B: 5-羟基-2-硝基-苯甲醛, 溶解于 4mL 乙醇中, 备用。

2、在室温 (20-30℃) 条件下, 以不断搅拌的方式, 把溶液 A 逐渐加到溶液 B 中, 反应 6 小时, 得到溶液 C。

3、溶液 C 5000rpm 离心 10min, 取出沉淀, 用少量无水乙醇洗涤两次, 置干燥箱中 60℃烘干, 得到黄色粉末。

4、将步骤 3 的产物转移至 20mL 圆底烧瓶内, 加入琥珀酸酐, 溶解于 5mL 丙酮和 1mL 吡啶混合溶液中, 60℃回流 10 小时。

5、将反应产物 40℃氮气吹干, 得到固体粉末, 用 10mL 蒸馏水洗涤两次, 5000rpm 离心 5min, 沉淀置干燥箱中 60℃烘干。得到反应产物 (呋喃唑酮代谢物半抗原), 产率为 50.8%。

二、呋喃唑酮代谢物半抗原的鉴定

将步骤一制备得到的呋喃唑酮代谢物半抗原进行质谱鉴定和元素分析。

结果表明, 同样得到了式 (I) 所示化合物。

实施例 5、呋喃唑酮代谢物人工抗原的制备和鉴定

一、呋喃唑酮代谢物人工抗原的制备

1、将实施例 4 制备的呋喃唑酮代谢物半抗原 (式 (I) 所示化合物) 溶解于 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 然后加入 N,N'-二环己基碳化二亚胺 (DCC) 和 N-

羟基琥珀酰亚胺 (NHS)，室温 (20–30℃) 搅拌 8 小时，4℃ 过夜，离心分出上清液；呋喃唑酮代谢物半抗原：DCC：NHS：DMF = 1：1：1：3 (摩尔比)。

2、将上清液加入到溶有载体蛋白 (BSA) 的磷酸盐缓冲液中 (0.01 mol/L, pH 7.4)，继续搅拌 4 小时，得到呋喃唑酮代谢物人工抗原。

3、将步骤 2 的溶液装入透析袋，在 4℃ 用磷酸盐缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.4) 透析 72 小时，换水 10 次。

4、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。

二、呋喃唑酮代谢物人工抗原的鉴定

将步骤一制备的呋喃唑酮代谢物人工抗原溶液用 PBS 溶液稀释，然后进行紫外 (200–400 nm) 光谱扫描，以 300 μg/mL 的 BSA 作为对照。结果表明，得到了呋喃唑酮代谢物人工抗原。

实施例 6、呋喃唑酮代谢物半抗原的制备和鉴定

一、呋喃唑酮代谢物半抗原的制备

3-氨基-2-恶唑烷基酮：5-羟基-2-硝基-苯甲醛：琥珀酸酐=2：5：10 (摩尔比)。

1、溶液 A 和溶液 B 的制备

溶液 A：3-氨基-2-恶唑烷基酮溶解于 1mL 蒸馏水中，备用。

溶液 B：5-羟基-2-硝基-苯甲醛，溶解于 4mL 乙醇中，备用。

2、在室温 (20–30℃) 条件下，以不断搅拌的方式，把溶液 A 逐渐加到溶液 B 中，反应 8 小时，得到溶液 C。

3、溶液 C 5000rpm 离心 10min，取出沉淀，用少量无水乙醇洗涤两次，置干燥箱中 60℃ 烘干，得到黄色粉末。

4、将步骤 3 的产物转移至 20mL 圆底烧瓶内，加入琥珀酸酐，溶解于 5mL 丙酮和 1mL 吡啶混合溶液中，80℃ 回流 8 小时。

5、将反应产物 40℃ 氮气吹干，得到固体粉末，用 10mL 蒸馏水洗涤两次，5000rpm 离心 5min，沉淀置干燥箱中 60℃ 烘干。得到反应产物 (呋喃唑酮代谢物半抗原)，产率为 49.2%。

二、呋喃唑酮代谢物半抗原的鉴定

将步骤一制备得到的呋喃唑酮代谢物半抗原进行质谱鉴定和元素分析。

结果表明，同样得到了式 (I) 所示化合物。

实施例 7、呋喃唑酮代谢物人工抗原的制备和鉴定

一、呋喃唑酮代谢物人工抗原的制备

1、将实施例 1 制备的呋喃唑酮代谢物半抗原（式（I）所示化合物）溶解于 N,N-二甲基甲酰胺（DMF）中，然后加入 N,N'-二环己基碳化二亚胺（DCC）和 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS），室温（20-30℃）搅拌 10 小时，4℃过夜，离心分出上清液；呋喃唑酮代谢物半抗原：DCC：NHS：DMF =1：1：1：5（摩尔比）。

2、将上清液加入到溶有载体蛋白（BSA）的磷酸盐缓冲液中（0.01 mol/L，pH 7.4），继续搅拌 6 小时，得到呋喃唑酮代谢物人工抗原。

3、将步骤 2 的溶液装入透析袋，在 4℃用磷酸盐缓冲液（0.01 mol/L，pH 7.4）透析 72 小时，换水 10 次。

4、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。

二、呋喃唑酮代谢物人工抗原的鉴定

将步骤一制备的呋喃唑酮代谢物人工抗原溶液用 PBS 溶液稀释，然后进行紫外（200-400 nm）光谱扫描，以 300 μg/mL 的 BSA 作为对照。结果表明，得到了呋喃唑酮代谢物人工抗原。

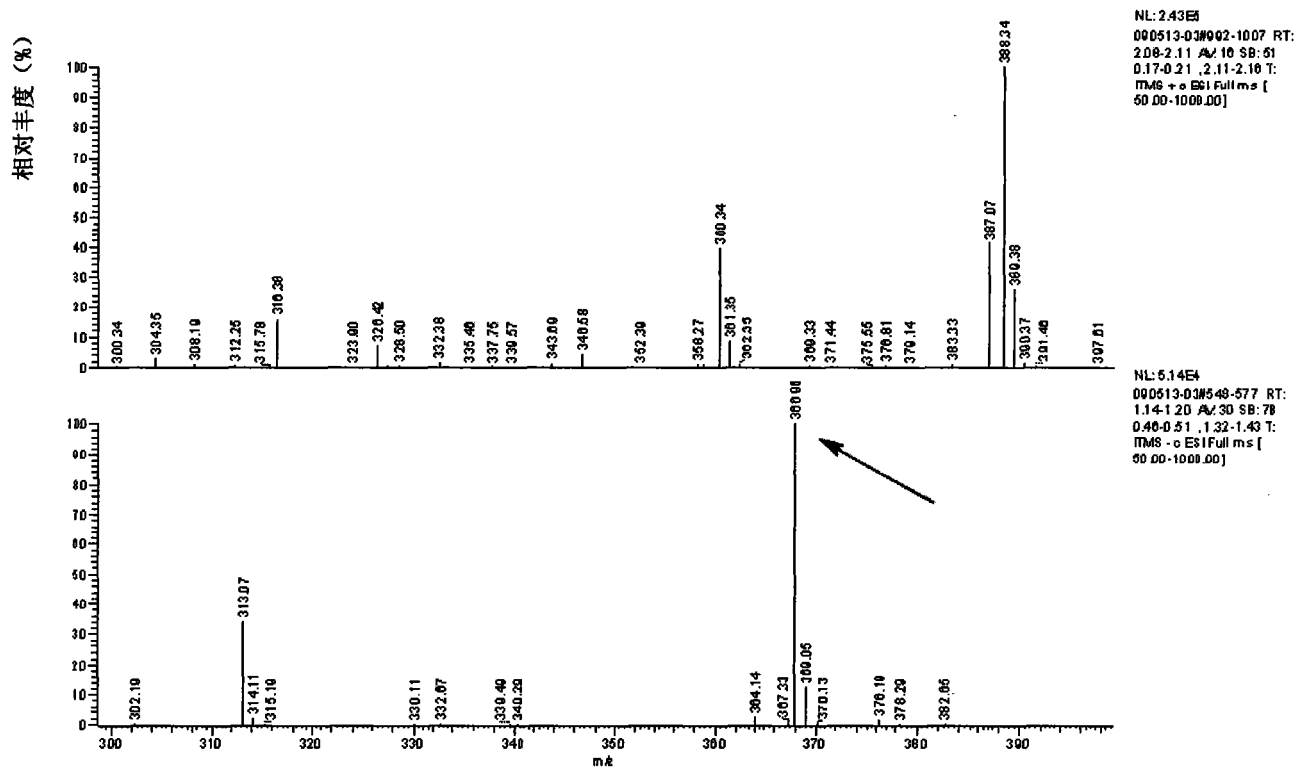


图 1

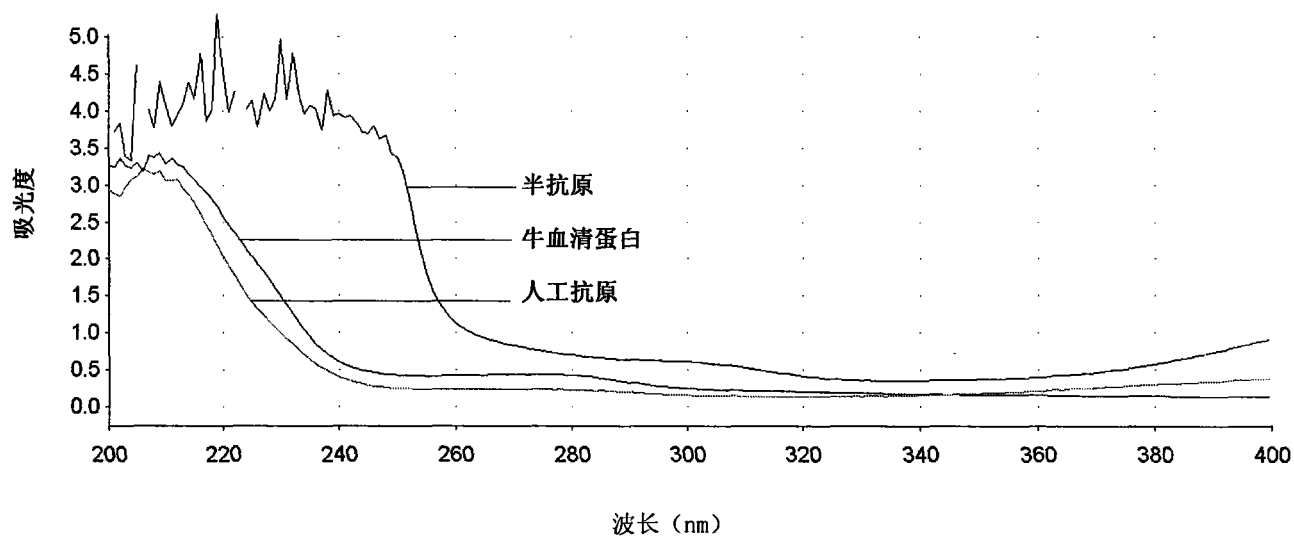


图 2

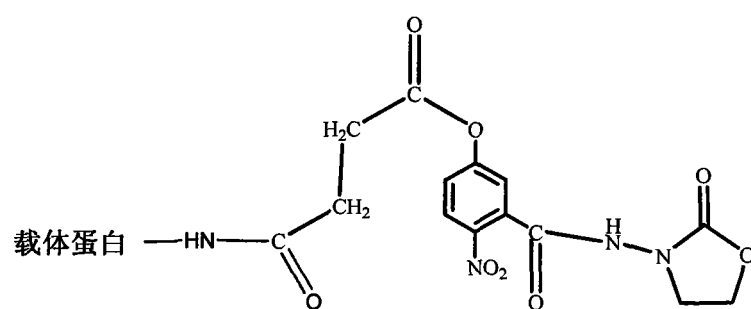


图 3

专利名称(译)	呋喃唑酮代谢物半抗原、抗原及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN101643455A	公开(公告)日	2010-02-10
申请号	CN200910085645.9	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	王战辉 江海洋 吴小平 王亚辉 张静 阮永磊 黄思扬 徐飞		
发明人	王战辉 江海洋 吴小平 王亚辉 张静 阮永磊 黄思扬 徐飞		
IPC分类号	C07D263/26 C07K14/765 C07K14/77 C07K1/113 C07K16/44 G01N33/566 G01N33/531		
代理人(译)	关畅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种呋喃唑酮代谢物半抗原、抗原及其制备方法和应用。本发明提供的呋喃唑酮代谢物半抗原是式(I)所示化合物，用式(I)所示化合物与载体蛋白连接可以得到呋喃唑酮代谢物抗原。所述呋喃唑酮代谢物抗原可应用于在制备呋喃唑酮代谢物特异性抗体。本发明提供的制备化合物的方法，操作简单，纯度和产率都很高。将本发明的化合物免疫动物后产生对呋喃唑酮代谢物高亲和力的特异性抗体，用该抗体建立的酶联免疫吸附分析法可用于快速、灵敏、简便地检测动物源性食品呋喃唑酮代谢物的残留量。本发明具有重大经济价值和社会意义。

