



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110683965 B

(45) 授权公告日 2021.04.27

(21) 申请号 201910991617.7

C07K 14/435 (2006.01)

(22) 申请日 2019.10.18

C07K 14/765 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C07K 14/77 (2006.01)

申请公布号 CN 110683965 A

C07K 14/795 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.01.14

G01N 33/531 (2006.01)

(73) 专利权人 中国农业大学

G01N 33/558 (2006.01)

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路2号

G01N 33/577 (2006.01)

(72) 发明人 王战辉 于雪芝 温凯 沈建忠

审查员 高文婷

江海洋 张素霞 朱建宇

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 赵静

(51) Int. Cl.

C07C 249/16 (2006.01)

C07C 251/86 (2006.01)

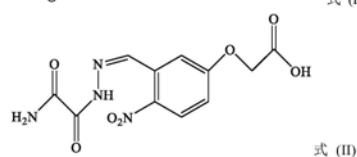
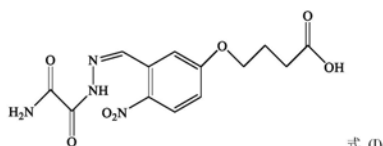
权利要求书3页 说明书7页 附图6页

(54) 发明名称

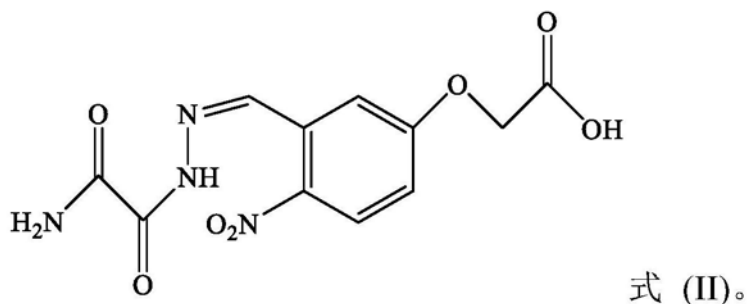
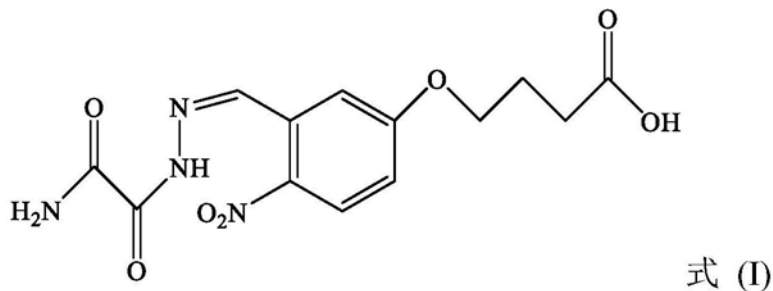
硝呋地腺半抗原和人工抗原及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明涉及硝呋地腺半抗原和人工抗原及其制备方法与应用。所述硝呋地腺半抗原的结构式如式(I)或式(II)所示。所述硝呋地腺人工抗原是由式(I)或式(II)所示半抗原与载体蛋白偶联得到。利用所述硝呋地腺人工抗原免疫动物,可得到效价高,灵敏度高的特异性抗体。本发明提供的硝呋地腺半抗原及其制备的抗体,为建立快速、简便、价廉、灵敏、特异的硝呋地腺检测方法提供了新手段。

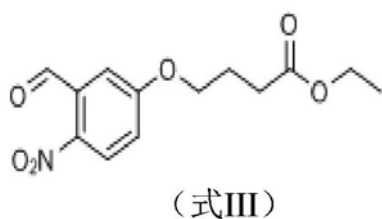


1. 硝呋地腺半抗原, 其结构如式 (I) 或式 (II) 所示:

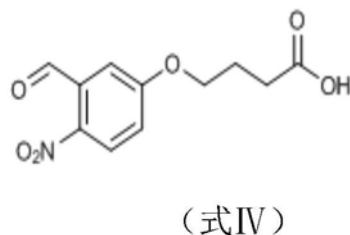


2. 权利要求1中所述式 (I) 所示硝呋地腺半抗原的制备方法, 包括如下步骤:

a1) 在碱性条件且催化剂存在下, 使5-羟基-2硝基苯甲醛与4-溴丁酸乙酯进行反应, 得到式III所示化合物;



a2) 将式III所示化合物加入甲醇中, 然后在碱性条件下进行水解反应, 得到式IV所示化合物;



a3) 将式IV所示化合物与草氨酰肼进行反应, 得到式I所示的化合物;

所述步骤a1) 中, 所述碱性条件由碳酸钾提供, 所述催化剂为KI,

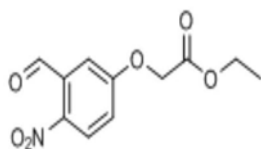
所述反应在溶剂中进行, 所述溶剂为乙腈;

所述步骤a2) 中, 所述碱性条件由1mol/L的氢氧化钠水溶液提供;

所述步骤a3) 中, 所述反应在溶剂中进行, 所述溶剂为无水乙醇。

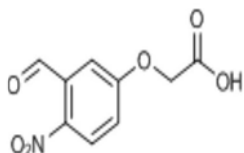
3. 权利要求1中所述式 (II) 所示硝呋地腺半抗原的制备方法, 包括如下步骤:

b1) 在碱性条件下, 使5-羟基-2硝基苯甲醛与4-溴乙酸乙酯进行反应, 得到式V所示化合物;



(式 V)

b2) 将式 V 所示化合物加入甲醇中,然后在碱性条件下进行水解反应,得到式 VI 所示化合物;



(式 VI)

b3) 将式 VI 所示化合物与草氨酰肼进行反应,得到式 II 所示的化合物;

所述步骤 b1) 中,所述碱性条件由碳酸钾提供,所述反应在溶剂中进行,所述溶剂为乙腈;

所述步骤 b2) 中,所述碱性条件由氢氧化钠水溶液提供;其浓度为 1mol/L;

所述步骤 b3) 中,所述反应在溶剂中进行,所述溶剂为乙醇。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的制备方法,其特征在于:

所述步骤 a1) 中,

所述 5-羟基-2 硝基苯甲醛、4-溴丁酸乙酯、碳酸钾的摩尔比依次为 1:1:2;

所述反应的条件为:回流反应过夜;

所述步骤 a1) 反应结束后,还包括对反应体系进行后处理的步骤,具体如下:将反应体系先浓缩除去大部分乙腈,然后倒入水中,加乙酸乙酯提取 3 次,乙酸乙酯合并后,水洗,干燥,旋干;

所述步骤 a2) 中,所述式 III 所示化合物与氢氧化钠的摩尔比为 1:3;所述水解反应的反应条件为:30℃ 度反应 2h;

所述步骤 a2) 反应结束后,还包括对反应体系进行后处理的步骤,具体如下:将反应体系倒入水中,加盐酸调节至酸性,析出固体,抽滤,干燥;

所述步骤 a3) 中,所述式 IV 所示化合物与草氨酰肼的摩尔比为 1:1;所述反应的反应条件为:回流反应 3h;

所述步骤 b1) 中,所述 5-羟基-2 硝基苯甲醛、4-溴乙酸乙酯、碳酸钾的摩尔比依次为 1:1:2;

所述反应的条件为:回流反应 3h;

所述步骤 b1) 反应结束后,还包括对反应体系进行后处理的步骤,具体如下:将反应体系先浓缩除去大部分乙腈,然后倒入水中,加乙酸乙酯提取 3 次,乙酸乙酯合并后,水洗,干燥,旋干;

所述步骤 b2) 中,所述式 V 所示化合物与氢氧化钠的摩尔比为 1:3;所述水解反应的反应条件为:30℃ 度反应 1h;

所述步骤 b2) 反应结束后,还包括对反应体系进行后处理的步骤,具体如下:将反应体系倒入水中,加盐酸调节至酸性,析出固体,抽滤,干燥;

所述步骤b3)中,所述式VI所示化合物与草氨酰肼的摩尔比为1:1;所述反应的反应条件为:回流反应5h。

5. 硝呋地腺人工抗原,其特征在于:由权利要求1所述硝呋地腺半抗原与载体蛋白偶联后得到;

其中,所述载体蛋白选自下述至少一种:牛血清白蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白。

6. 根据权利要求5所述的硝呋地腺人工抗原,其特征在于:所述载体蛋白选自牛血清白蛋白或钥孔血蓝蛋白。

7. 权利要求5或6所述硝呋地腺人工抗原的制备方法,包括下述步骤:采用活化酯法将载体蛋白偶联于权利要求1所述硝呋地腺半抗原的羧基碳上。

8. 权利要求7所述硝呋地腺人工抗原的制备方法,其特征在于:所述式(II)所示硝呋地腺半抗原与载体蛋白的偶联摩尔比为8.2:1。

9. 由权利要求5所述的硝呋地腺人工抗原制备得到的特异性抗体,所述特异性抗体为多克隆抗体。

10. 一种硝呋地腺代谢物酶联免疫试剂或试剂盒,包括权利要求5或6所述的硝呋地腺人工抗原和权利要求9所述的特异性抗体。

硝呋地腓半抗原和人工抗原及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物化工技术领域,具体地说,涉及硝呋地腓半抗原和人工抗原及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 硝呋地腓(Nifuraldizone),是一种呋喃类化学合成药物,目前在养殖过程中,普遍滥用药物添加剂或高效抗生素等成为影响动物源性食品安全的主要原因。随着人们对食品与环境质量要求的不断提高及对抗生素认识的不断深入,抗生素的添加所引起的问题愈来愈引起人们的关注。硝呋地腓通过增加动物肠粘膜的通透性,从而能有效地提高营养物质在动物消化道中的消化和吸收;还能够有效抑制动物消化道内病原微生物对葡萄糖的利用,使其新陈代谢过程受阻,从而抑制和杀灭多种病原微生物,减少动物感染疾病的机会,提高抗病能力。由于抗生素的耐药性、残留和二重感染的特性,所带来的弊端和危害已成为人类所面临的重大挑战。

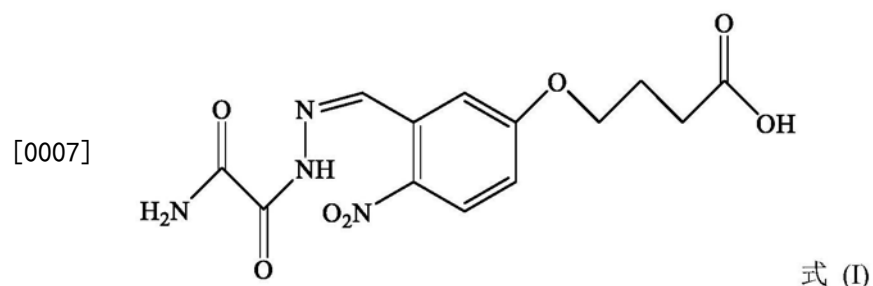
[0003] 由于硝基呋喃类药物的热和化学不稳定性,常以检测其代谢产物作为残留标示物,这些代谢物可以在弱酸性条件下(如胃液的酸性)从蛋白质中释放出来,因此当人类吃了含有硝基呋喃类抗生素残留的食品,这些代谢物就可以在人类胃液的酸性条件下从蛋白质中释放出来被人体吸收而对人类健康造成危害。

[0004] 目前,已发表的检测硝呋地腓代谢物的方法比较少。基于抗原-抗体特异性反应的免疫分析技术,具有检测速度快,成本低的优点,因此设计免疫半抗原分子,开发一种简单、快捷、用于检测硝呋地腓代谢物的抗体显得尤为重要。

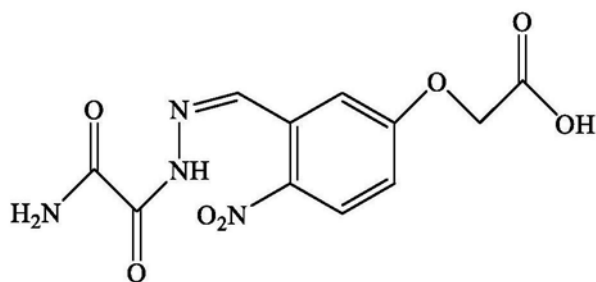
发明内容

[0005] 本发明的目的是提供硝呋地腓半抗原和人工抗原及其制备方法与应用。

[0006] 为了实现本发明目的,第一方面,本发明提供了硝呋地腓半抗原,其结构式如式(I)或式(II)所示:



[0008]



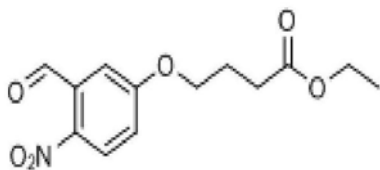
式 (II)

[0009] 第二方面,本发明提供了所述半抗原的制备方法。

[0010] 当所述硝呋地腺半抗原为式(I)所示化合物时,制备方法包括如下步骤:

[0011] a1) 在碱性条件且催化剂存在下,使5-羟基-2硝基苯甲醛与4-溴丁酸乙酯进行反应,得到式III所示化合物;

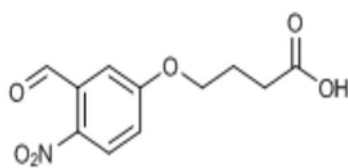
[0012]



(式III)

[0013] a2) 将式III所示化合物加入甲醇中,然后在碱性条件下进行水解反应,得到式IV所示化合物;

[0014]



(式IV)

[0015] a3) 将式IV所示化合物与草酰肼进行反应,得到式I所示的化合物。

[0016] 上述方法步骤a1)中,所述碱性条件可由碳酸钾提供,所述催化剂可为KI,所述5-羟基-2硝基苯甲醛、4-溴丁酸乙酯的摩尔比为1:1;

[0017] 所述5-羟基-2硝基苯甲醛、4-溴丁酸乙酯、碳酸钾的摩尔比依次为1:1:2;

[0018] 所述反应在溶剂中进行,所述溶剂为乙腈。

[0019] 所述反应的条件为:回流反应过夜。

[0020] 所述步骤a1)反应结束后,还包括对反应体系进行后处理的步骤,具体如下:将反应体系先浓缩除去大部分乙腈,然后倒入水中,加乙酸乙酯提取3次,乙酸乙酯合并后,水洗,干燥,旋干。

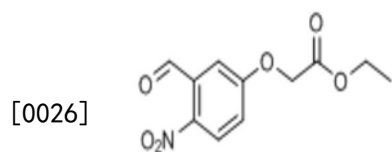
[0021] 上述方法步骤a2)中,所述碱性条件由1mol/L的氢氧化钠水溶液提供;所述式III所示化合物与氢氧化钠的摩尔比为1:3;所述水解反应的反应条件为:30℃度反应2h;

[0022] 所述步骤a2)反应结束后,还包括对反应体系进行后处理的步骤,具体如下:将反应体系倒入水中,加盐酸调节至酸性(如pH值为6),析出固体,抽滤,干燥。

[0023] 上述方法步骤a3)中,所述反应在溶剂中进行,所述溶剂为无水乙醇;所述式IV所示化合物与草酰肼的摩尔比为1:1;所述反应的反应条件为:回流反应3h。

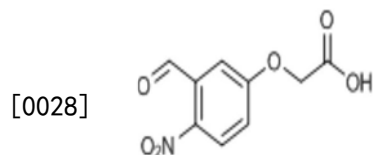
[0024] 当所述硝呋地腺半抗原为式(II)所示化合物时,制备方法如下:

[0025] b1) 在碱性条件下,使5-羟基-2硝基苯甲醛与4-溴乙酸乙酯进行反应,得到式V所示化合物;



(式V)

[0027] b2) 将式V所示化合物加入甲醇中,然后在碱性条件下进行水解反应,得到式VI所示化合物;



(式VI)

[0029] b3) 将式IV所示化合物与草氨酰肼进行反应,得到式II所示的化合物。

[0030] 上述方法步骤b1)中,所述5-羟基-2硝基苯甲醛、4-溴乙酸乙酯的摩尔比可为1:1;所述碱性条件可由碳酸钾提供,所述5-羟基-2硝基苯甲醛、4-溴丁酸乙酯、碳酸钾的摩尔比偶从为1:1:2;

[0031] 所述反应在溶剂中进行,所述溶剂为乙腈。

[0032] 所述反应的条件为:回流反应3h。

[0033] 所述步骤b1)反应结束后,还包括对反应体系进行后处理的步骤,具体如下:将反应体系先浓缩除去大部分乙腈,然后倒入水中,加乙酸乙酯提取3次,乙酸乙酯合并后,水洗,干燥,旋干。

[0034] 上述方法步骤b2)中,所述碱性条件由氢氧化钠水溶液提供,其浓度可为1mol/L;所述式V所示化合物与氢氧化钠的摩尔比为1:3;所述水解反应的反应条件为:30℃度反应1h;

[0035] 所述步骤b2)反应结束后,还包括对反应体系进行后处理的步骤,具体如下:将反应体系倒入水中,加盐酸调节至酸性(如pH值为6),析出固体,抽滤,干燥。

[0036] 上述方法步骤b3)中,所述反应在溶剂中进行,所述溶剂为乙醇;所述式IV所示化合物与草氨酰肼的摩尔比为1:1;所述反应的反应条件为:回流反应5h。

[0037] 第三方面,本发明提供了硝呋地腺人工抗原。

[0038] 所述硝呋地腺人工抗原是由所述硝呋地腺半抗原与载体蛋白偶联后得到。所述硝呋地腺人工抗原可以作为免疫原也可以作为包被原。

[0039] 其中,所述载体蛋白选自下述至少一种:牛血清白蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白;优选牛血清白蛋白、钥孔血蓝蛋白。

[0040] 更具体的如:式I所示的硝呋地腺半抗原-钥孔血蓝蛋白(KLH)形成的免疫原;

[0041] 式II所示的硝呋地腺半抗原-牛血清白蛋白(BSA)形成的包被原。

[0042] 第四方面,本发明提供了所述人工抗原的制备方法。

[0043] 本发明所提供的人工抗原的制备方法,是采用活化酯法将载体蛋白偶联于所述硝呋地腺半抗原的羧基碳上。

- [0044] 优选地,式(II)所示化合物与载体蛋白的偶联摩尔比为8.2:1。
- [0045] 第五方面,本发明还提供了由所述硝呋地腺人工抗原制备的特异性抗体。
- [0046] 所述特异性抗体,包括多克隆抗体和单克隆抗体,优选多克隆抗体。所述多克隆抗体可通过硝呋地腺人工抗原免疫实验动物(如新西兰大白兔),收集血清纯化获得。
- [0047] 第六方面,本发明还提供了所述硝呋地腺半抗原或所述硝呋地腺人工抗原的应用。
- [0048] 所述应用选自下述至少一方面:
- [0049] 1) 在制备抗硝呋地腺代谢物特异性抗体中的应用;
- [0050] 2) 在检测抗硝呋地腺代谢物特异性抗体中的应用。
- [0051] 第七方面,本发明还提供了一种硝呋地腺代谢物酶联免疫试剂或试剂盒。
- [0052] 该硝呋地腺代谢物酶联免疫试剂或试剂盒,包括所述的硝呋地腺人工抗原和所述的特异性抗体。
- [0053] 进一步的,所述硝呋地腺人工抗原为硝呋地腺包被原(如式II所示的硝呋地腺半抗原-牛血清白蛋白(BSA)形成的包被原)。
- [0054] 第八方面,本发明还提供了所述特异性抗体的应用。
- [0055] 所述应用选自下述至少一方面:
- [0056] (1) 在检测硝呋地腺代谢物中的应用;
- [0057] (2) 在制备硝呋地腺代谢物的免疫层析试纸条中的应用;
- [0058] (3) 在制备硝呋地腺代谢物的胶体金检测试纸条中的应用。
- [0059] 借由上述技术方案,本发明至少具有下列优点及有益效果:
- [0060] 本发明首次公开了两种新的硝呋地腺半抗原、人工抗原及其制备方法,用所述硝呋地腺人工抗原免疫动物,可得到效价高、灵敏度高的特异性抗体。本发明提供的硝呋地腺半抗原及其制备的抗体,为建立快速、简便、价廉、灵敏、特异的硝呋地腺检测方法提供了新手段。
- [0061] 利用本发明提供的半抗原与载体蛋白的偶联物制备硝呋地腺抗体(多抗),制备过程简单、经济,抗体的检测灵敏度可达1.47ng/mL、实用价值高。本发明在兽药残留检测中具有良好的应用前景。

附图说明

- [0062] 图1为本发明实施例1中式(I)所示硝呋地腺半抗原制备的流程图。
- [0063] 图2为本发明实施例1中式(II)所示硝呋地腺半抗原制备的流程图。
- [0064] 图3为本发明实施例1中式(I)所示硝呋地腺半抗原的质谱图。
- [0065] 图4为本发明实施例1中式(II)所示硝呋地腺半抗原的质谱图。
- [0066] 图5为本发明实施例1中式(I)所示硝呋地腺半抗原的¹H NMR核磁谱图。
- [0067] 图6为本发明实施例1中式(II)所示硝呋地腺半抗原的¹H NMR核磁谱图。
- [0068] 图7为本发明实施例2中OXZ②-BSA的MALDI-TOF-MS图。
- [0069] 图8为本发明实施例4中利用多克隆抗体检测硝呋地腺代谢物OXZ的标准曲线图。

具体实施方式

[0070] 下面通过具体实施例对本发明进行说明,但本发明并不局限于此,凡在本发明的精神和原则之内所做的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

[0071] 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。

[0072] 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。

[0073] 下述实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。实施例中所用的PBS缓冲液均为pH7.4、0.01M的PBS缓冲液。实施例中所用的碳酸盐缓冲液均为pH9.6、0.05mol/L的碳酸钠缓冲液。

[0074] NHS为N-羟基琥珀酰亚胺的缩写。EDC为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的缩写。DMF为N,N-二甲基甲酰胺的缩写。NHS、EDC、牛血清白蛋白(Albumin from bovine serum,BSA)、钥孔血蓝蛋白(Keyhole Limpet Hemocyanin,KLH)以及弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂均购自Sigma公司。柱层析所用固定相均为200-300目的硅胶。

[0075] 实施例1硝呋地腺半抗原的制备和表征

[0076] 一、硝呋地腺半抗原的制备

[0077] 1、式(I)所示硝呋地腺半抗原的制备

[0078] 第一步:乙腈作溶剂,依次加入1eq5-羟基-2硝基苯甲醛、1eq4-溴丁酸乙酯和2eq碳酸钾,加入少量KI做催化剂,回流反应过夜,后处理先浓缩除去大部分乙腈,然后倒入水中,加乙酸乙酯提取3次,乙酸乙酯合并后,水洗,干燥,旋干,收率约60%,无须纯化,直接下投。第二步:1eq底物加入甲醇中,然后加入3eq1mol/L的氢氧化钠水溶液,30℃反应2h,,后处理倒入水中,加盐酸调节至酸性,析出固体,抽滤,干燥,收率约80%。第三步:无水乙醇作溶剂,加入1eq上步产物和1eq草氨酰肼,回流反应3h,冷却,抽滤,滤饼真空干燥,得产物浅黄色粉末固体,收率90%。

[0079] 2、式(II)所示硝呋地腺半抗原的制备

[0080] 第一步:乙腈作溶剂,1eq5-羟基-2硝基苯甲醛,1eq2-溴乙酸乙酯和2eq碳酸钾依次加入,回流反应3h,后处理先浓缩除去大部分乙腈,然后倒入水中,乙酸乙酯提取三次,乙酸乙酯合并,水洗,干燥,旋干,收率80%。第二步:将上步产物加入甲醇中,再加入3eq氢氧化钠水溶液,30℃反应1h,后处理倒入水中。加盐酸调节至强酸性,析出固体,抽滤,真空干燥,得黄色粉末固体,收率60%。第三步:乙醇中溶剂,加入1eq上步产物和1eq草氨酰肼,回流反应5h,冷却至室温,抽滤,滤饼真空干燥,得浅黄色粉末,收率90%。

[0081] 二、硝呋地腺半抗原的表征

[0082] 1、质谱鉴定

[0083] 步骤一的式(I)所示硝呋地腺半抗原的质谱鉴定结果:MS m/z $[M+H]^+$ 理论值:338.3;实测值:339.0,与目标产物的分子量相吻合,质谱见图3。

[0084] 步骤一的式(II)所示硝呋地腺半抗原的质谱鉴定结果:MS m/z $[M+H]^+$ 理论值:310.2;实测值:311.1,与目标产物的分子量相吻合,质谱见图4。

[0085] 2、核磁共振鉴定

[0086] 步骤一的式(I)所示硝呋地腺半抗原的核磁鉴定结果: 1H NMR (400MHz, dmsO) δ 12.49 (s, 1H, NH), 9.03 (s, 1H, CHO), 8.28 (s, 1H, NH2), 8.11 (d, J=9.1Hz, 1H, ArH), 7.96 (s, 1H, NH2), 7.36 (d, J=2.5Hz, 1H, ArH), 7.19 (dd, J=9.1, 2.5Hz, 1H, ArH), 4.14 (t, J=6.3Hz,

2H,CH₂) , 2.38 (t, J=7.2Hz, 2H,CH₂) , 2.03-1.87 (m, 2H,CH₂) .核磁数据表明上述方法合成的化合物即为目标产物,磁共振鉴定结果见图5。

[0087] 步骤一的式(II)所示硝呋地腺半抗原的核磁鉴定结果:¹H NMR (400MHz, dmsO) δ 12.49 (s, 1H, NH) , 9.02 (s, 1H, CHO) , 8.29 (s, 1H, NH₂) , 8.10 (d, J=9.1Hz, 1H, ArH) , 7.96 (s, 1H, NH₂) , 7.37 (d, J=2.6Hz, 1H, ArH) , 7.18 (dd, J=9.1, 2.6Hz, 1H, ArH) , 4.88 (s, 2H, CH₂) .核磁数据表明上述方法合成的化合物即为目标产物,磁共振鉴定结果见图6。

[0088] 实施例2硝呋地腺人工抗原的制备和表征

[0089] 所述免疫原与包被原的制备方法中,其区别在于载体蛋白的使用类型,所述免疫原载体蛋白主要采用KLH,所述包被原载体蛋白主要采用BSA,所用偶联方法为活泼酯法。

[0090] 一、硝呋地腺包被原的合成和鉴定

[0091] 1、硝呋地腺包被原的制备

[0092] (1) 将20mg实施例1制备得到的式(II)所示化合物溶于2mL DMF中,加入10mg NHS和10mg DCC,室温下搅拌过夜,得到溶液I。

[0093] (2) 将7mg BSA加入7mL PBS缓冲液中,充分溶解,即为溶液II。

[0094] (3) 将溶液I缓慢滴加至溶液II中,缓慢4℃搅拌24h后装入透析袋,在生理盐水中4℃透析72h(中间换水6次),得到硝呋地腺包被原溶液,-20℃保存。式(II)所示化合物合成的硝呋地腺包被原简称OXZ②-BSA。

[0095] 2、硝呋地腺包被原的鉴定

[0096] 用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS)法测定OXZ②-BSA溶液中BSA与半抗原的结合比。结果见图7。

[0097] 结合比 = {M(偶联物) - M(蛋白质)} / M(半抗原)

[0098] BSA的分子量为65700.3,式(II)半抗原的分子量为338.3,由质谱最高峰值分析偶联物的分子量为68237.2,经计算得出BSA与半抗原的结合比为8.2,即OXZ②-BSA中一个BSA分子上平均偶联8.2个半抗原。

[0099] 二、硝呋地腺免疫原的合成

[0100] 1、硝呋地腺免疫原的制备

[0101] 用KLH代替BSA,式(I)所示化合物代替式(II)所示化合物,其它同步骤一的1。

[0102] 式(I)所示化合物合成硝呋地腺免疫原简称OXZ①-KLH。

[0103] 实施例3硝呋地腺抗血清的制备

[0104] 将实施例2制备的OXZ①-KLH溶液免疫2组3-4月龄,体重1.5-2.0kg的雌性新西兰大白兔,每组2只。将各免疫原用生理盐水稀释至1mg/mL,与等量弗氏佐剂乳化。首免采用弗氏完全佐剂,颈背部皮内多点注射,免疫剂量为1mg/只。4周后进行加强免疫,每隔4周加免1次,共加免3次,佐剂改为弗氏不完全佐剂,免疫剂量不变,改为颈背部皮下多点注射。第4次免疫1周后,用心脏采血的方法大量采血。取血后,将血液37℃静置2h,然后4℃静置过夜,然后3000rpm离心20min,收集上清液,即为抗血清,-20℃分装保存。

[0105] 实施例4硝呋地腺抗血清的测定

[0106] 一、采用间接ELISA方法检测抗血清效价,具体操作步骤如下:

[0107] 1) 包被:将实施例2中的抗原(OXZ②-BSA)用0.05M、pH9.6碳酸盐缓冲液从10μg/mL

开始进行倍比稀释,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C反应2h。

[0108] 2) 洗涤:将板内溶液倾去,甩干,并用洗涤液洗涤3次,每次3min。

[0109] 3) 封闭:拍干后,加入200 μ L/孔封闭液,37 $^{\circ}$ C反应2h。洗涤后烘干备用。

[0110] 4) 加样:将抗血清从1:1000开始进行倍比稀释,并加入到各种稀释度的包被孔中,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C反应1h;充分洗涤后,加入1:3000稀释的HRP-羊抗兔IgG,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C反应1h。

[0111] 5) 显色:将酶标板取出,充分洗涤后,每孔加入100 μ L的TMB显色液,37 $^{\circ}$ C避光反应15min。

[0112] 6) 终止和测定:每孔加入100 μ L终止液以终止反应,然后用酶标仪测定各孔的OD₄₅₀值。

[0113] 7) 结果判读:以OD₄₅₀值 $\geq$ 阴性对照孔的2.1倍(即P/N $\geq$ 2.1)所对应的血清最高稀释倍数即为血清的ELISA效价。

[0114] 二、最低检测限、半数抑制以及特异性的检测

[0115] 具体操作步骤如下:

[0116] 1) 用上述的间接ELISA方法确定以OXZ②-BSA作为包被原,以OXZ①-KLH免疫兔子获得的血清作为抗体,以OD₄₅₀值在1.5左右时所对应的抗原和抗体浓度为最适工作浓度。

[0117] 2) 包被:将包被原用包被缓冲液稀释20000倍,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C反应2h。

[0118] 3) 洗涤和封闭:方法操作同上述间接ELISA法。

[0119] 4) 配硝呋地腺代谢物OXZ(草胺酰肼)标准溶液:将OXZ标准品用0.01mol/L, pH7.4的PBS溶液配制成5mg/mL的母液,然后,在加样前,再用0.01mol/L, pH7.4的PBS溶液倍比稀释成需要浓度(OXZ的浓度分别为0.1ng/mL、0.3ng/mL、1ng/mL、3ng/mL、10ng/mL、30ng/mL、100ng/mL)。

[0120] 5) 加样:每孔加入50 μ L倍比稀释的OXZ各浓度标准品,然后再加入50 μ L/孔最适稀释倍数的抗血清,37 $^{\circ}$ C反应1h。充分洗涤后,加入1:3000稀释的HRP-羊抗兔IgG,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C反应1h。

[0121] 6) 显色反应:将酶标板取出,充分洗涤后,每孔加入100 μ L的TMB显色液,37 $^{\circ}$ C避光反应15min。

[0122] 7) 终止和测定:每孔加入100 μ L终止液以终止反应,然后用酶标仪测定各孔的OD₄₅₀值。

[0123] 8) 数据处理:以OXZ各浓度的对数为横坐标,以OXZ各浓度对应的OD值为纵坐标,使用Origin 8.5软件,按照四参数对数拟合绘制标准曲线,如图8所示,通过计算IC₅₀值(半数抑制浓度)判定抗血清对OXZ是否具有特异性。

[0124] 结果显示,四免后,兔子抗血清效价可达81000,检测限为0.28ng/mL,IC₅₀值为1.47ng/mL,线性检测范围为0.61-3.53ng/mL。

[0125] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之做一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

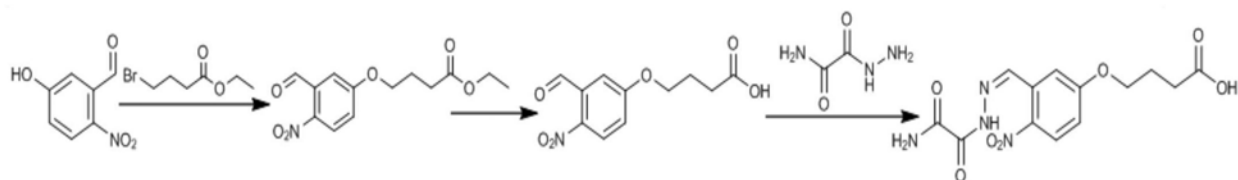


图1

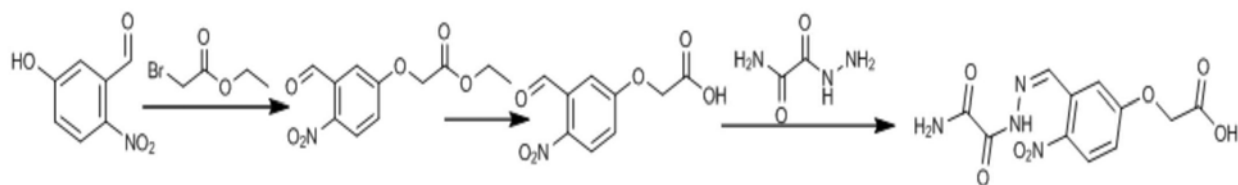


图2

13#51-74RT0.23-0.32V24 NL4.35E6
T:FTMS + p ESI Full ms [100.0000-800.0000]

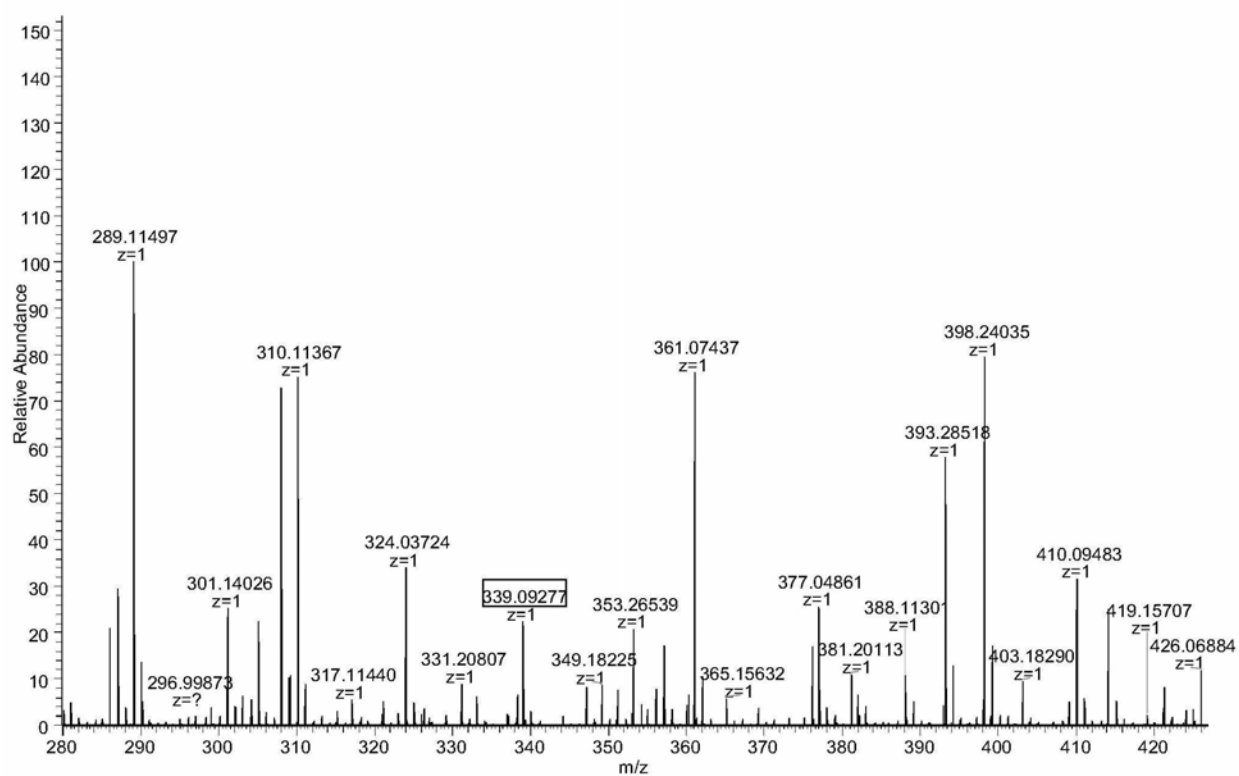


图3

14 #45-94 RT: 0.20-0.42 AV: 50 NL: 5.09E5
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-800.0000]

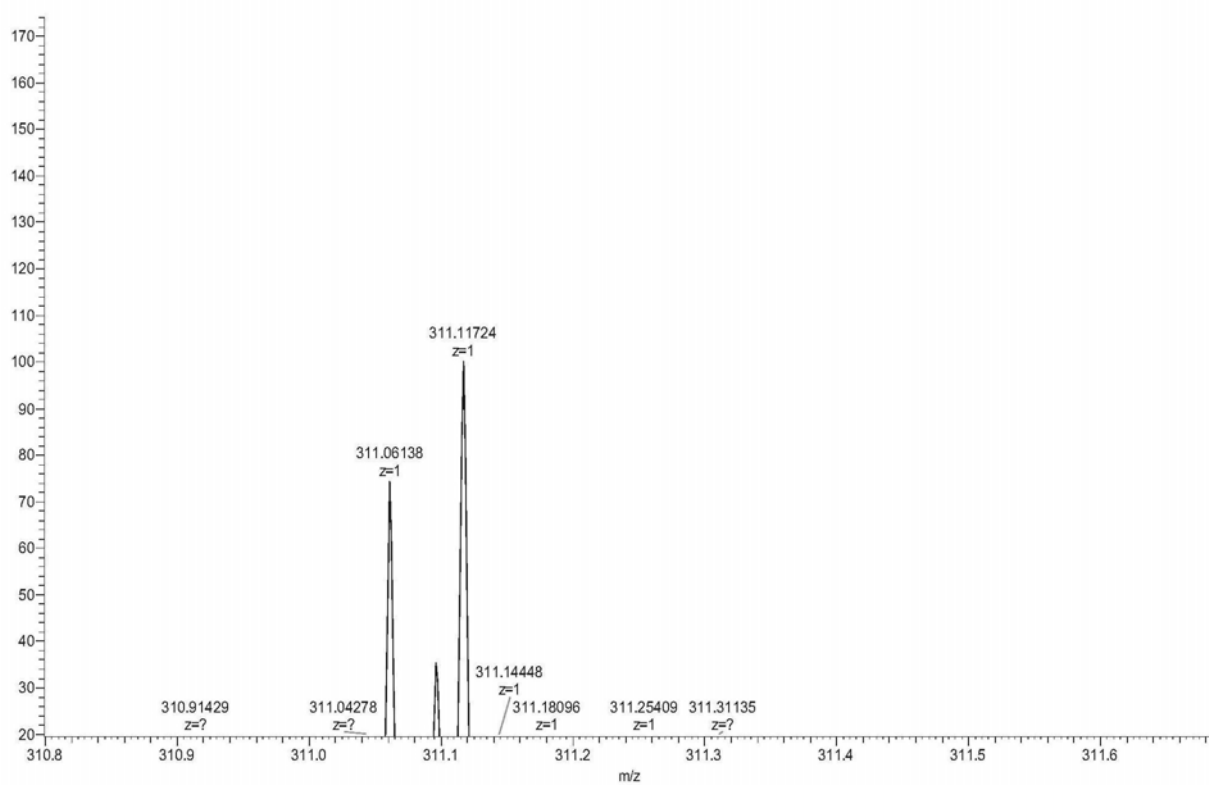


图4

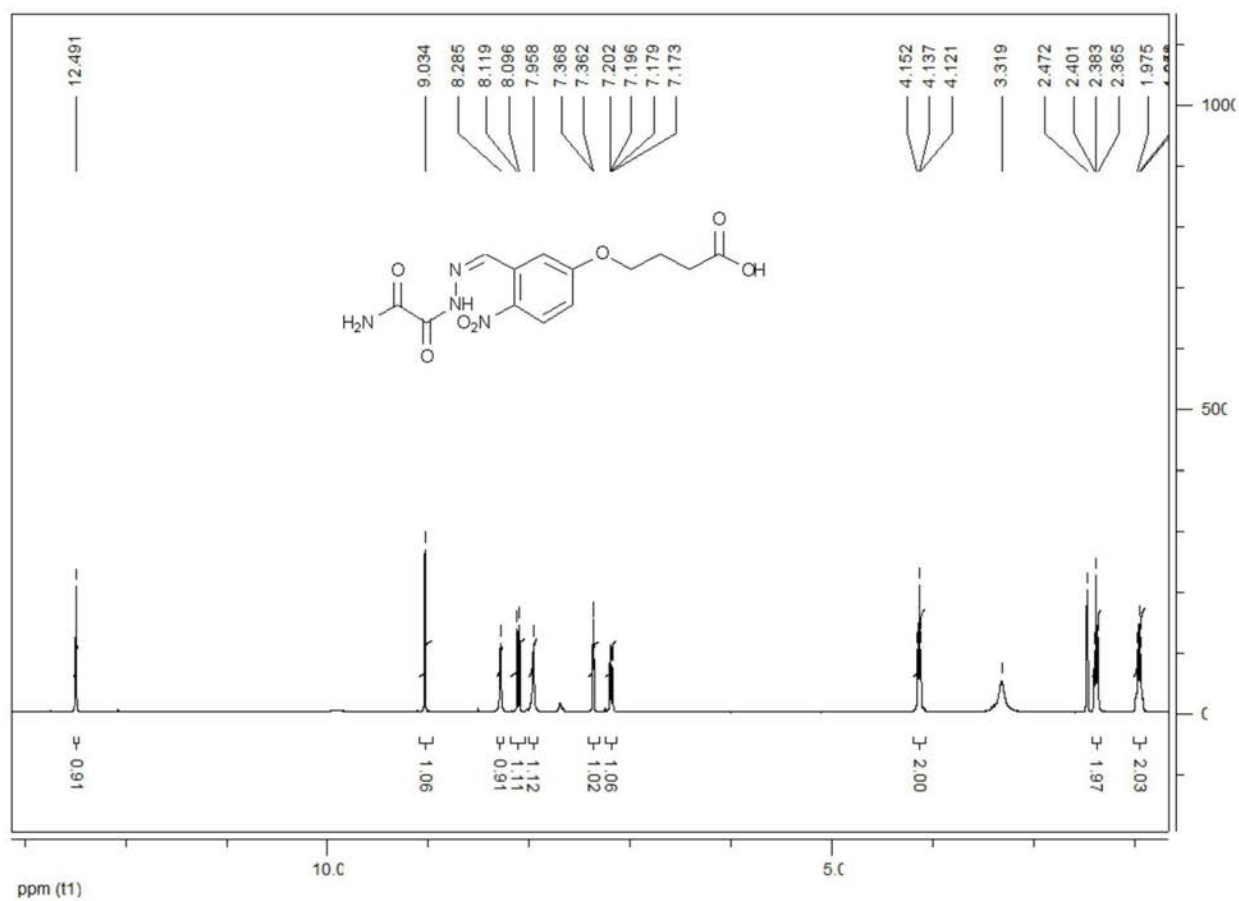


图5

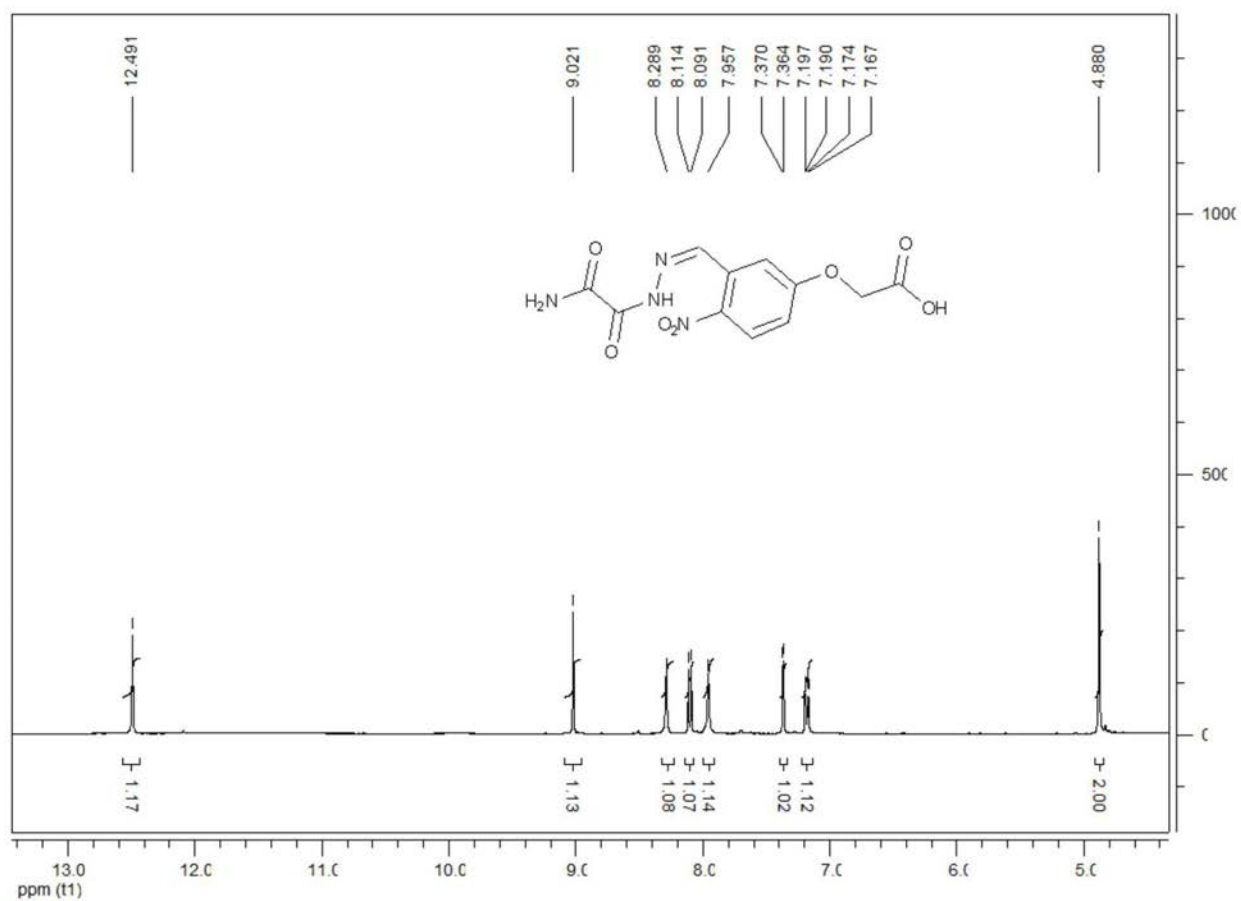


图6

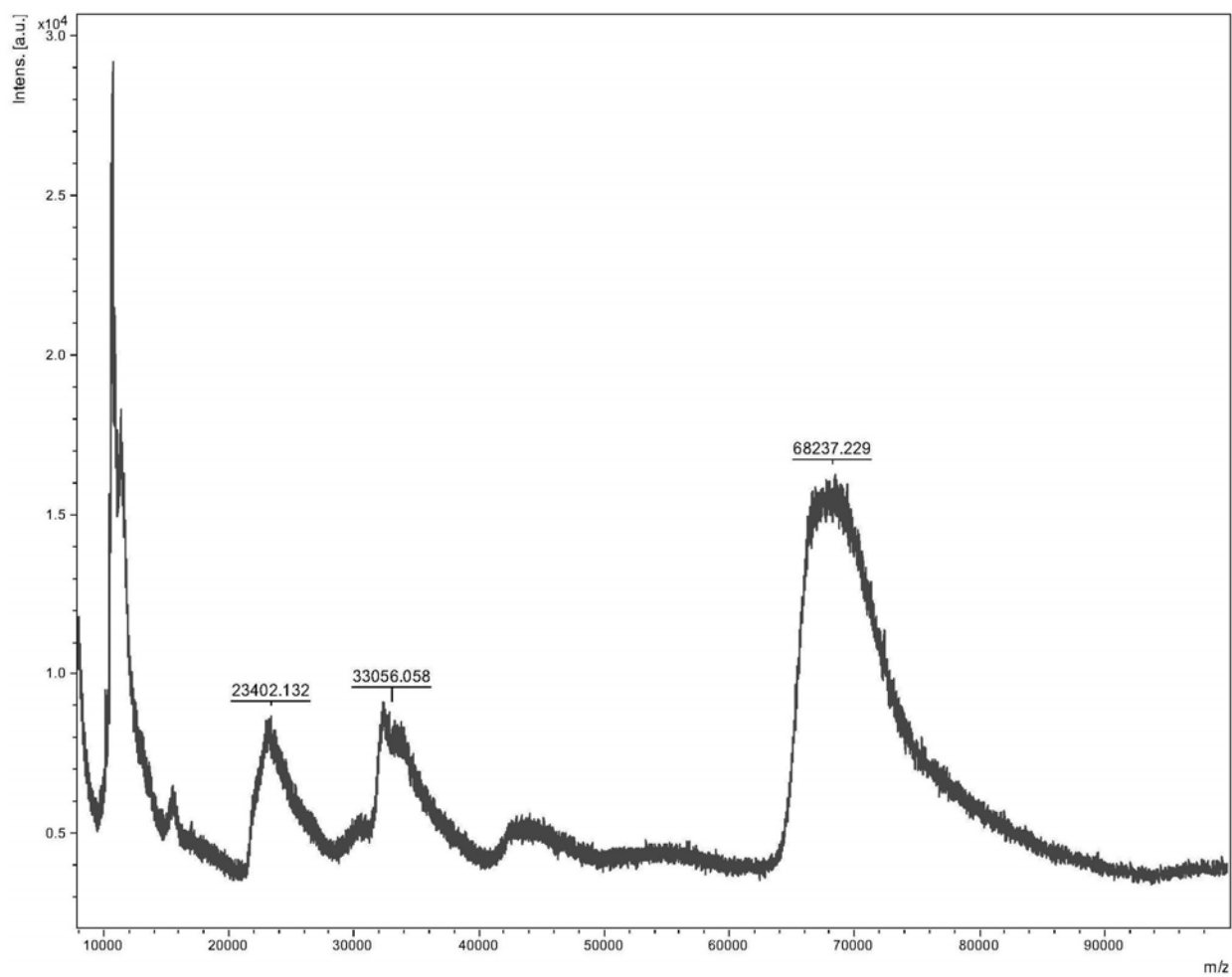


图7

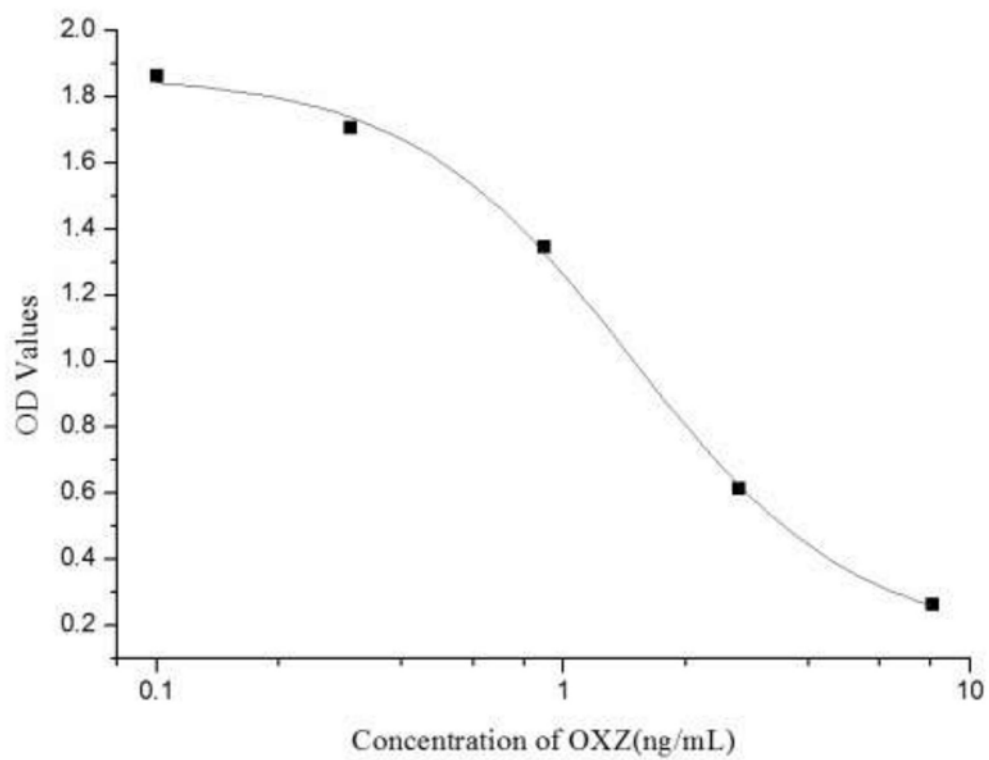


图8