



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1904613 B

(45) 授权公告日 2010. 11. 03

(21) 申请号 200610015210. 3

(22) 申请日 2006. 08. 08

(73) 专利权人 天津科技大学

地址 300457 天津市经济技术开发区第 13
大街天津科技大学食品工程与生物技
术学院

(72) 发明人 王硕 张燕 段振娟 张鸿雁

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1077401 C, 全文.

EP 1557429 A1, 2005. 07. 27, 全文.

李俊锁, 等. 磺胺类药物半抗原的
合成及结构表征. 中国农业大学学报 4

1. 1999, 4(1), 109-111 页.

张伟, 等. 磺胺二甲基嘧啶人工抗原合
成及多克隆抗体制备. 河北农业大学学报 28

6. 2005, 28(6), 76-78 页.

审查员 边昕

权利要求书 1 页 说明书 7 页

(54) 发明名称

用于磺胺类多种残留免疫分析的人工抗原的
制备方法

(57) 摘要

用于磺胺类多种残留免疫分析的人工抗原的
制备方法, 属于小分子化合物 (分子量小于 1000
道尔顿) 免疫化学分析技术, 涉及具有 p- 氨基苯
磺酰胺结构的磺胺类多种药物的人工抗原和抗
体及其制备, 本发明克服了传统半抗原合成方法
繁琐、产率低和抗体广谱性差的缺点。本发明以
4-(4-氨基苯磺酰基) 苯甲酸为半抗原, 与血蓝蛋
白等载体蛋白连接合成人工抗原, 再经动物免疫
制成抗体, 该抗体具有针对多种磺胺药物良好
的特异性, 可用于磺胺类多种药物残留的同时快
速定量检测。该抗体不仅具有针对多种磺胺药
物良好的特异性, 还具有良好的广谱性, 并为
建立快速准确的磺胺多残留定量分析方法奠定
了基础, 具有广阔的应用前景。

1. 用于磺胺类多种残留免疫分析的人工抗原的制备方法,其特征在于用下述步骤制得:

(1) 合成半抗原

采用 4-氨基苯甲酸与 4-乙酰氨基苯磺酰氯反应,一步法合成含羧基的半抗原,具体做法是:

将 2 ~ 4mmol 的 4-乙酰氨基苯磺酰氯溶解在 5mL 干燥吡啶中, N_2 保护下,逐滴加入含 2 ~ 3mmol 4-氨基苯甲酸的干燥吡啶溶液 6mL,磁力搅拌。滴加完毕后,反应混合物在 85 ~ 95°C 下回流 2 ~ 3h,用薄层层析即 TLC 法监测反应进程。接着加入 20 ~ 30mL $2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH,减压除去吡啶。反应体系再回流 2 ~ 3h,用 TLC 监测反应进程,接着冷却到 15-25°C,用浓盐酸调 pH 值到 3.5 ~ 4.,产物用 20 ~ 40mL 乙酸乙酯萃取 3 次,合并有机相并用无水 Na_2SO_4 干燥,减压除去溶剂,残留物过硅胶柱纯化得目标物;

(2) 合成人工抗原

用半抗原 4-(4-氨基苯磺酰基)苯甲酸,以酰胺基 $\text{CO} = \text{NH}$ 为桥梁,通过混合酸酐法,连接到卵清蛋白或血蓝蛋白上,具体做法是:

取 10 ~ 20mg 载体蛋白溶于 2mL 0.1 ~ 0.2mol/L 的碳酸氢钠溶液中,取半抗原 4-(4-氨基苯磺酰基)苯甲酸 0.01 ~ 0.05mmol,碳化二亚胺 0.02 ~ 0.06mmol,溶于 1mL 二甲基甲酰胺中,混合液在冰浴下逐滴加到载体蛋白溶液中,在 20 ~ 25°C 下,搅拌反应 4 ~ 8h,再次加入 0.01 ~ 0.03mmol 碳化二亚胺,后放于 4°C 冰箱内 12 ~ 24h,反应完成后将反应液装入透析袋,4°C 下、pH = 7.4 的 PBS 中透析,分装, -20°C 保存。

用于磺胺类多种残留免疫分析的人工抗原的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于小分子化合物（分子量小于 1000 道尔顿）免疫化学和残留分析技术领域；涉及有机合成，免疫化学，生物化学及物化测试技术等；特别涉及具有 p-氨基苯磺酰胺分子结构的磺胺类小分子化合物人工半抗原、人工抗原的设计合成，和免疫动物特异性抗体的制备。

背景技术

[0002] 磺胺类抗菌药是一类抑制核酸合成的小分子化合物，在食源性动物的饲养中，作为兽药被广泛用于对细菌感染性疾病的防治，是目前使用最广泛和用量最大的兽药之一，也用作动物饲料添加剂。研究表明，磺胺类药物能抑制骨髓功能，破坏造血系统，引起再生性贫血、粒细胞缺乏症、血小板减少症、血尿等，易产生抗药性，易引起过敏反应。残留超标的食品，能使人恶心、呕吐、眩晕等，重者甚至出现死亡。由于广泛地使用，近年来磺胺类药物的残留污染成为国内外众多学者研究的热点问题，各国对磺胺残留的限制也因此越来越严格，并且对分析测定对象、种类、数量、范围、指标等诸方面，都提出新的要求和更高的标准。日本要求的最高限量分别为：磺胺甲基嘧啶 (0.02ppm)，磺胺二甲嘧啶 (0.01ppm)，磺胺-6-甲氧嘧啶 (0.03ppm)，磺胺二甲氧嘧啶 (0.04ppm)，磺胺间甲氧嘧啶 (0.03ppb)，恶喹酸 (0.05ppm)，乙胺嘧啶 (0.05ppm)，日本还禁止在家禽中使用磺胺喹恶啉、磺胺二甲基嘧啶以及含有磺胺喹恶啉成分的药物。早在 2002 年，美国食物与药品管理局 (FDA) 就规定磺胺类药禁止在进口动物源性食品中使用。目前我国对于磺胺在畜产品中的残留量为以总量计不得超过 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0003] 分子量小于 1000 道尔顿的小分子有毒化学品，如农药、兽药及其代谢产物，其传统的残留分析主要是依靠气相色谱、液相色谱或色谱-质谱联用等分析手段。这些理化分析方法，繁琐复杂、成本较高、分析速度慢，难以满足实际分析的需要，因此迫切需要开发简便、快速、灵敏的分析技术。

[0004] 基于抗原抗体免疫反应原理而建立的酶联免疫分析 (ELISA) 方法在大批量样品快速检测方面显示出巨大的优越性，操作简单，又具有相当的灵敏度，近年来在小分子有害化合物的免疫分析方法开发方面成为研究热点。

[0005] 但是与大分子不同，小分子化合物免疫分析有自身特点：

[0006] (1) 小分子化合物 ($MW \leq 1000\text{dalton}$) 一般不具有免疫原性，不能直接免疫动物产生特异性抗体、必须合成突出分子立体结构特异性部位的半抗原，并与大分子载体连接构成接合物，才能免疫动物产生针对这一目标小分子化合物的特异性抗体。这种半抗原与大分子载体的结合物称为人工抗原。人工抗原的制备不是任意的，包括结合位点、结合方式、载体种类、以及半抗原与目标分析物任何结构上的差异如大小、形状、成份、构型、构象、极性、电子云密度等等在内的诸因素，都可能极大地影响着相应抗体的性质，因此它们是决定产生其特异性抗体和建立免疫分析方法的关键。

[0007] (2) 虽然小分子化合物不具有免疫原性，但具有反应原性，即具有与相应抗体发生

免疫学反应的能力,并可进行体外定量,遵循质量作用定律。

[0008] 免疫分析技术被引入兽药残留分析领域,成为一种最有发展和应用潜力的定量分析技术之一,受到广泛的重视。该技术研究的关键是半抗原的分子设计、合成和人工全抗原及抗体的制备。因此,目标分析物分子免疫学特性,以及如何通过化学或生化技术突出和利用这些特性,是该领域重要的研究内容。这一技术目前已成为微量分析研究的一个崭新领域,可与传统分析方法并列作为一项新的分析途径。

[0009] 文献报道有磺胺药物的免疫分析方法,但广谱性差,一般能同时检测一至三种磺胺药物,而磺胺类药物有数千种,广泛应用并有一定疗效的也有几十种,对人畜均有危害。如果采用现有的广谱性差的分析方法检测实际样品,一些磺胺药物将不能检出,往往造成检测结果与样品中真实的磺胺残留量差别较大。采用针对磺胺类多种药物均有特异性结合反应的抗体来建立分析方法,解决上述问题,是当务之急。目前具有磺胺类多种药物特征结构的人工抗原和针对磺胺类多种药物有特异性的抗体尚未见报道。

发明内容

[0010] 需要解决的问题:

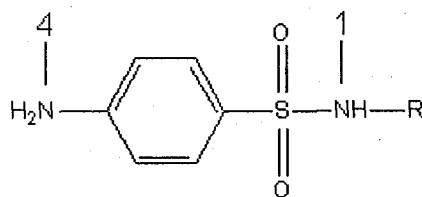
[0011] 针对上述情况,当前急需一种简易快速有效地同时检测多种磺胺药物残留的方法。本发明的目的是通过设计合成具有 p-氨基苯磺酰胺分子结构的磺胺类药物的半抗原和人工抗原,制备针对磺胺类药物的特异性抗体;独特之处在于突出了磺胺类药物分子特异性抗原决定簇,又克服了化学合成的困难,免疫动物诱导产生亲合性很高的特异性抗体。

[0012] 技术方案:

[0013] 本发明设计、合成了小分子目标分析物的半抗原,并与载体蛋白质偶联,制备有效的人工抗原,免疫动物制备针对小分子分析物的特异性抗体。其选择性决定于免疫学反应的特异性,可为建立快速准确的磺胺类多种药物残留的定量分析方法奠定基础。该技术研究的关键是半抗原的分子设计、合成和人工全抗原及抗体的制备。其中半抗原的设计、合成是本方法成败的关键。

[0014] 磺胺的共同结构如下图所示:

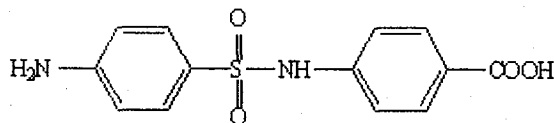
[0015]



[0016] 磺胺的分子结构可以分为两个结构单元:一部分是 p-氨基苯磺酰胺,另一部分是不同的取代基。从免疫学的角度分析,p-氨基苯磺酰胺的空间结构复杂,分子量较大,可以作为抗原决定簇,而取代基可以作为与载体蛋白连接的臂,通过改变 N1 位 R 基的磺胺衍生物能制备族特异性抗体。因此在合成半抗原时,必须保留 p-氨基苯磺酰胺结构,而可以对取代基进行适当的修饰,形成可以与载体蛋白连接的臂。因此,本发明在设计合成磺胺半抗原时,采用具有氨基苯磺酰胺等活性基团的 4-乙酰氨基苯磺酰氯与 4-氨基苯甲酸反应,来引入活性侧链,合成磺胺半抗原,这样既保持了磺胺半抗原与磺胺在结构上的相似性,又使半抗原分子具有了与载体蛋白连接的合适结构。

[0017] 为突出该类兽药分子特异性抗原决定簇,本发明用于磺胺类多种药物残留免疫分析的人工抗原选择 4-(4-氨基苯磺酰基)苯甲酸

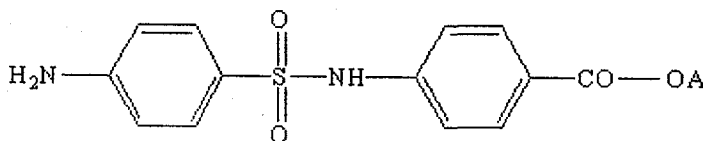
[0018]



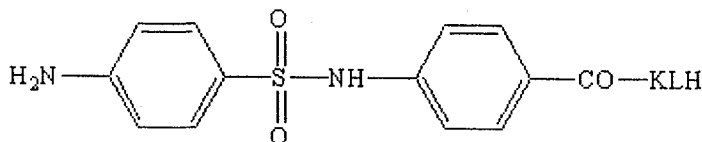
[0019] 为半抗原的结构,其分子量 MW 为 292 ;

[0020] 再以 4-(4-氨基苯磺酰基)苯甲酸为半抗原,与载体蛋白卵清蛋白 (ovalbumin, OA) 或血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 相连接,合成分子式为

[0021]



或



[0022] 的化合物为人工抗原 ;

[0023] 用于磺胺类多种药物残留免疫分析的人工抗体采用 4-(4-氨基苯磺酰基)苯甲酸与载体蛋白卵清蛋白 (ovalbumin, OA) 或血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 相连接所合成的人工抗原,经动物免疫,取血,分离抗血清,纯化制得。

[0024] 用于磺胺类多种药物残留免疫分析的人工抗原和抗体的制备方法如下 :

[0025] (1) 合成半抗原

[0026] 采用 4-氨基苯甲酸与 4-乙酰氨基苯磺酰氯反应,一步法合成含羧基的半抗原,具体做法是 :

[0027] 将 2 ~ 4mmol 的 4-乙酰氨基苯磺酰氯溶解在 5mL 干燥吡啶中, N₂ 保护下,逐滴加入含 2 ~ 3mmol 4-氨基苯甲酸的干燥吡啶溶液 6mL,磁力搅拌。滴加完毕后,反应混合物在 85 ~ 95°C 下回流 2 ~ 3h,用薄层层析即 TLC 法监测反应进程。接着加入 20 ~ 30mL 2mol · L⁻¹ NaOH,减压除去吡啶。反应体系再回流 2 ~ 3h,用 TLC 监测反应进程,接着冷却到 15-25°C,用浓盐酸调 pH 值到 3.5 ~ 4.5。产物用 20 ~ 40mL 乙酸乙酯萃取 3 次,合并有机相并用无水 Na₂SO₄ 干燥,减压除去溶剂。残留物过硅胶柱纯化得目标物 ;

[0028] (2) 合成人工抗原

[0029] 用半抗原 4-(4-氨基苯磺酰基)苯甲酸,以酰胺基 CO = NH 为桥梁,通过混合酸酐法,连接到卵清蛋白 (ovalbumin, OA) 或血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 上,具体做法是 :

[0030] 取 10 ~ 20mg 载体蛋白溶于 2mL 0.1 ~ 0.2mol/L 的碳酸氢钠溶液中,取半抗原 4-(4-氨基苯磺酰基)苯甲酸 0.01 ~ 0.05mmol,碳化二亚胺 0.02 ~ 0.06mmol,溶于 1mL 二甲基甲酰胺中,混合液在冰浴下逐滴加到载体蛋白溶液中,在 20 ~ 25°C 下,搅拌反应 4 ~

8h,再次加入 0.01 ~ 0.03mmol 碳化二亚胺,后放于 4℃冰箱内 12 ~ 24h,反应完成后将反应液装入透析袋,4℃下、pH = 7.4 的 PBS 中透析,分装,-20℃保存;

[0031] (3) 制备抗体

[0032] 免疫动物选用大耳白兔,采用皮内多点和肌肉注射法免疫,初免后进行四次加强免疫,分别于初次免疫后 2 周、4 周和 6 周后免疫三次,此后间隔一个月加强免疫一次。

[0033] 初次免疫时取 1 ~ 2mg 本发明的人工抗原溶于 0.5 ~ 1mL 0.9% (m/v) 的 NaCl 溶液和等体积的弗氏完全佐剂乳化,进行动物免疫;

[0034] 加强免疫时用 0.5 ~ 1mg 本发明的人工抗原溶于 0.5 ~ 1mL 0.9% (m/v) 的 NaCl 溶液和等体积的弗氏不完全佐剂乳化,进行动物免疫;

[0035] 从第一次加强免疫后开始,每次免疫后 7 ~ 9 天时由兔子的耳缘静脉取血,进行效价检测。定时监测动物抗体效价,当抗体效价达到 10 万以上时,采集血液,将采集的全血 20℃静置 2h 后在 4℃下静置 8h,然后 3500 转 /min 离心 10min,收集上清液获得抗血清,使用 protein A-Sepharose4B 亲和层析柱对抗血清进行纯化,即制得抗体,于 -20℃保存。

[0036] 所制备的磺胺抗体与磺胺类药物的特异性结合率以抑制抗体最大结合率的 50% 所需磺胺的浓度即 IC_{50} 值来表示,几种磺胺类药物对本发明的抗体的 IC_{50} 值见表 1

[0037] 表 1 磺胺抗体与磺胺药物的特异性结合率

[0038]	IC_{50}
[0039]	磺胺类药物名称
[0040]	(ng mL ⁻¹)
[0041]	sulfasozole 1.3
[0042]	磺胺噻唑 sulfathiazole 2
[0043]	磺胺对甲氧嘧啶 sulfameter 3.2
[0044]	磺胺甲氧嗪
[0045]	8.4
[0046]	sulfamethoxypridazine
[0047]	磺胺吡啶 sulfapyridine 10
[0048]	磺胺甲二唑 sulfamethizole 12.8
[0049]	磺胺氯达嗪 sulfachlorpyridazine 14

[0050] 将表 1 的 IC_{50} 值与国内外规定的磺胺类药物最大残留限量值比较,不难看出,上述七种磺胺药物的 IC_{50} 值均远低于规定的最大残留限量值,说明本发明抗体用于免疫分析时,能够特异性地同时检测到七种磺胺药物的残留含量。

[0051] 有益效果:

[0052] 本发明构思巧妙,与其他同类方法相比,其设计、合成的半抗原与目标待测物相似程度高,对待测物的特征结构保留完整,人工抗原具有磺胺类多种药物特征结构,为制备特异性好的抗体奠定了基础。本发明所制备抗体稳定,可识别 ng/mL 级的多种磺胺类物质,不仅具有针对多种磺胺药物良好的特异性,同时具有良好的广谱性,抗体的稀释度可高达 1×10^6 ,可为建立快速准确的磺胺类多种药物残留定量分析方法奠定基础。本发明的半抗原合成方法不仅简便,且所用主要原料如 4-乙酰氨基苯磺酰氯、4-氨基苯甲酸价格较为低廉、容易获得,在一般化学试剂公司都可购买。由于半抗原只需一步反应即可合成,反应产

率达到了 72%，合成效率高，提高了反应的可控性。因此，本发明合成半抗原的方法与其他方法相比较，更加易于推广普及，可用于磺胺类药物多种残留的快速免疫检测，具有良好的应用前景，既有经济效益又有社会效益。

具体实施方式

[0053] 实施例 1：

[0054] 1. 半抗原的合成

[0055] 将 2mmol 4-乙酰氨基苯磺酰氯溶解在 5mL 干燥吡啶中， N_2 保护下，逐滴加入含 2mmol 4-氨基苯甲酸的干燥吡啶溶液 6mL，磁力搅拌。滴加完毕后，反应混合物在 90℃ 下回流 3h，用 TLC 监测反应进程，接着加入 20mL $2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{NaOH}$ ，减压除去吡啶。反应体系再回流 2h，用 TLC 监测反应进程，接着冷却到 15℃，用浓盐酸调 pH 值到 3.5。产物用乙酸乙酯萃取 3 次，每次 20mL，合并有机相并用无水 Na_2SO_4 干燥，减压除去溶剂。残留物过 200-300 目硅胶柱纯化得半抗原 4-(4-氨基苯磺酰基)苯甲酸目标物；

[0056] 2. 人工抗原的合成

[0057] 取 10mg 血兰蛋白 KLH 溶于 2mL 0.15mol/L 的碳酸氢钠溶液中，取半抗原 4-(4-氨基苯磺酰基)苯甲酸 0.025mmol，碳化二亚胺 0.05mmol，溶于 1mL 二甲基甲酰胺中，混合液在冰浴下逐滴加到载体蛋白溶液中，在 20℃ 下，搅拌反应 4h，再次加入 0.015mmol 碳化二亚胺，混匀后放于 4℃ 冰箱内 12h，反应完成后将反应液装入透析袋，4℃ 下、pH = 7.4 的 PBS 中透析，分装，-20℃ 保存；

[0058] 3. 免疫与特异性抗体制备

[0059] 1) 免疫

[0060] 选择雄性大耳白兔，月龄 3 个月，体重 1.5 公斤，饲养于标准实验动物房中，连续观察 3 天，确定身体状况正常后进行免疫。

[0061] 初次免疫时精确称取 1mg 本发明的人工抗原溶于 0.5mL 0.9% (m/v) 的 NaCl 溶液中，和 0.5mL 弗氏完全佐剂充分乳化后免疫。

[0062] 加强免疫时精确称取 0.5mg 本发明的人工抗原溶于 0.5mL 0.9% (m/v) 的 NaCl 溶液中，和 0.5mL 弗氏不完全佐剂充分乳化后免疫。加强免疫分别于初次免疫后 2 周、4 周和 6 周后进行。加强免疫三次后间隔时间为一个月。每次加强免疫后 7 天时由兔子的耳缘静脉取血，进行效价检测。

[0063] 2) 抗体纯化

[0064] 定时监测动物抗体效价，当终点效价达到 20 万以上时，由颈动脉采全血。将采集的全血 20℃ 静置 2h 后在 4℃ 下静置 8h，然后 3500 转 /min 离心 10min，收集上清液于 -20℃ 保存。离心后获得的血清采用 proteinA-Sepharose-4B 免疫亲和层析柱进一步纯化，制备 IgG 抗体。

[0065] 实施例 2：

[0066] 1. 半抗原合成具体方法为：

[0067] 2. 12mmol 的 4-氨基苯甲酸溶于 6mL 干燥吡啶溶液中，2.28mmol 的 4-乙酰氨基苯磺酰氯溶解在 5mL 干燥吡啶中， N_2 保护下，逐滴加入到 4-氨基苯甲酸溶液中，磁力搅拌。滴加完毕后，反应混合物在 95℃ 下回流 2h，接着加入 $2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{NaOH}$ 25mL，减压除去

吡啶。反应体系再回流 2.5h,冷却到 20℃,用浓盐酸调 pH 值到 4.0。产物用乙酸乙酯萃取 (3×30mL),合并有机相并用无水 Na₂SO₄ 干燥,减压除去溶剂。残留物过硅胶柱 (200-300 目) 纯化得目标物;

[0068] 2. 人工抗原合成具体方法为:

[0069] 取 15mg 载体蛋白 KLH 溶于 2mL 0.2mol/L 的碳酸氢钠溶液中,取半抗原 4-(4-氨基苯磺酰基)苯甲酸 0.01mmol,碳化二亚胺 0.02mmol,溶于 1mL 二甲基甲酰胺中,混合液在冰浴下逐滴加到载体蛋白溶液中,在 25℃下,搅拌反应 5h,再次加入 0.01mmol 碳化二亚胺,后放于 4℃冰箱内 18h,反应完成后将反应液装入透析袋,4℃下、pH = 7.4 的 PBS 中透析,分装,-20℃保存;

[0070] 3. 抗体制备方法

[0071] 选择雄性大耳白兔,月龄 3 个月,体重 1.5 公斤,饲养于标准实验动物房中,连续观察 3 天,确定身体状况正常后进行免疫。采用皮内多点和肌肉注射法,初免后进行四次加强免疫。

[0072] 初次免疫时精确称取 1.0mg 本发明的人工抗原溶于 1.0mL 0.9% (m/v) 的 NaCl 溶液中,和 1.0mL 弗氏完全佐剂充分乳化后免疫。

[0073] 加强免疫时精确称取 0.5mg 本发明的人工抗原溶于 1.0mL 0.9% (m/v) 的 NaCl 溶液中,和 1.0mL 弗氏不完全佐剂充分乳化后免疫。加强免疫分别于初次免疫后 2 周、4 周和 6 周后进行。加强免疫三次后间隔一个月免疫一次。每次加强免疫后 8 天时由兔子的耳缘静脉取血,进行效价检测。当终点效价达到 15 万以上时,由颈动脉采全血。

[0074] 其余同实施例 1

[0075] 实施例 3:

[0076] 1. 半抗原的合成

[0077] 将 3.5mmol 4-乙酰氨基苯磺酰氯溶解在 5mL 干燥吡啶中,N₂ 保护下,逐滴加入含 3mmol 4-氨基苯甲酸的干燥吡啶溶液 6mL,磁力搅拌。滴加完毕后,反应混合物在 85℃下回流 3h,用 TLC 监测反应进程,接着加入 30mL 2mol·L⁻¹NaOH,减压除去吡啶。反应体系再回流 3h,用 TLC 监测反应进程,接着冷却到 25℃,用浓盐酸调 pH 值到 4.5。产物用乙酸乙酯萃取 3 次,每次 40mL,合并有机相并用无水 Na₂SO₄ 干燥,减压除去溶剂。残留物过 200-300 目硅胶柱纯化得半抗原 4-(4-氨基苯磺酰基)苯甲酸目标物;

[0078] 2. 人工抗原的合成

[0079] 取 20mg 血兰蛋白 KLH 溶于 2mL 0.2mol/L 的碳酸氢钠溶液中,取半抗原 4-(4-氨基苯磺酰基)苯甲酸 0.05mmol,碳化二亚胺 0.06mmol,溶于 1mL 二甲基甲酰胺中,混合液在冰浴下逐滴加到载体蛋白溶液中,在 20℃下,搅拌反应 8h,再次加入 0.03mmol 碳化二亚胺,后放于 4℃冰箱内 24h,反应完成后将反应液装入透析袋,4℃下、pH = 7.4 的 PBS 中透析,分装,-20℃保存;

[0080] 3. 抗体制备

[0081] 选择雌性大耳白兔,月龄 3 个月,体重 1.5 公斤,饲养于标准实验动物房中,连续观察 3 天,确定身体状况正常后进行免疫。采用皮内多点和肌肉注射法免疫。

[0082] 初次免疫时精确称取 2.0mg 本发明的人工抗原溶于 0.5mL 0.9% (m/v) 的 NaCl 溶液中,和 0.5mL 弗氏完全佐剂充分乳化后免疫。

[0083] 分别于初次免疫后 2 周、4 周和 6 周后进行加强免疫,加强免疫三次后间隔为一个月。加强免疫时精确称取 1.0mg 本发明的人工抗原溶于 0.5mL 0.9% (m/v) 的 NaCl 溶液中,和 0.5mL 弗氏不完全佐剂充分乳化后免疫。

[0084] 每次加强免疫后 9 天时由兔子的耳缘静脉取血,进行效价检测。

[0085] 其他同实施例 1

[0086] 实施例 4 :

[0087] 除载体蛋白为卵清蛋白(OA)外,其他同实施例 1

专利名称(译)	用于磺胺类多种残留免疫分析的人工抗原的制备方法		
公开(公告)号	CN1904613B	公开(公告)日	2010-11-03
申请号	CN200610015210.3	申请日	2006-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
[标]发明人	王硕 张燕 段振娟 张鸿雁		
发明人	王硕 张燕 段振娟 张鸿雁		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
其他公开文献	CN1904613A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

用于磺胺类多种残留免疫分析的人工抗原的制备方法，属于小分子化合物(分子量小于1000道尔顿)免疫化学分析技术，涉及具有p-氨基苯磺酰胺结构的磺胺类多种药物的人工抗原和抗体及其制备，本发明克服了传统半抗原合成方法繁琐、产率低和抗体广谱性差的缺点。本发明以4-(4-氨基苯磺酰基)苯甲酸为半抗原，与血蓝蛋白等载体蛋白连接合成人工抗原，再经动物免疫制成抗体，该抗体具有针对多种磺胺药物良好的特异性，可用于磺胺类多种药物残留的同时快速定量检测。该抗体不仅具有针对多种磺胺药物良好的特异性，还具有良好的广谱性，并为建立快速准确的磺胺多残留定量分析方法奠定了基础，具有广阔的应用前景。

