



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103728448 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 16

(21) 申请号 201310747526. 1

(22) 申请日 2013. 12. 31

(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 梁楠 柯江波 胡利静
刘腾飞

(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

(51) Int. Cl.

G01N 33/535 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书2页

(54) 发明名称

一种辣根过氧化物酶标记无色孔雀石绿免疫原的制备方法

(57) 摘要

一种辣根过氧化物酶标记无色孔雀石绿免疫原的制备方法。其特征是本发明利用过碘酸钠法，对合成的无色孔雀石绿免疫原，用辣根过氧化物酶对其进行标记。该标记方法是由无色孔雀石绿免疫原和辣根过氧化物酶在室温条件下，在低 pH 条件下，用过碘酸钠氧化辣根过氧化物酶的糖链，形成的醛化酶可与无色孔雀石绿免疫原的氨基相连，然后进一步用硼氢化钠还原成稳定的酶标记免疫原，获得的酶标记免疫原经过 50% 饱和硫酸铵沉淀，用磷酸盐缓冲液溶解，经透析后，即可获得辣根过氧化物酶标记无色孔雀石绿免疫原。本发明成功地合成了可用于检测无色孔雀石绿残留的酶标记免疫原，并且，为开发孔雀石绿药物残留酶联免疫检测方法奠定了基础，还有利于普及推广应用。

1. 一种辣根过氧化物酶标记无色孔雀石绿免疫原的制备方法,其特征在于通过下列方法制得:在室温条件下

(1) 称取 5mg 辣根过氧化物酶放入 10mL 离心管中,加入 1mL 双蒸水溶解,接着缓慢振荡中缓缓加入 0.2mL 新鲜配置的 0.1mol/L 过碘酸钠溶液,室温下避光反应 20min,将反应后的液体装入透析袋中,再放入 1mmol/L pH4.4 醋酸钠缓冲液中,4℃暗处透析 24h,期间换液 4 次,然后收集透析袋内的液体,得透析好的辣根过氧化物酶溶液;

(2) 先在 1mL 无色孔雀石绿免疫原溶液中加入 0.2mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液,将 pH 调整到 9.1,再将步骤(1)透析好的辣根过氧化物酶溶液用 0.2mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液调节 pH 到 9.1,并加入上述调整 pH 后的无色孔雀石绿免疫原溶液中,室温下避光反应 2h,在反应结束后的溶液中加入 100 μ L 新鲜配置的 4mg/mL 硼氢化钠溶液,4℃放置 2h,得结合物;

(3) 取步骤(2)所得结合物并加入等体积饱和硫酸铵,混匀,4℃放置 30min,3000rpm 离心 30min,弃上清,沉淀以 3mL 0.02mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液溶解,装入透析袋,在 200mL 以上的 0.02mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液中 4℃暗处透析 24h,期间换液 4 次,得透析物;

(4) 取步骤(3)所得透析物,3000rpm 离心 30min,除去不溶物,即得辣根过氧化物酶标记无色孔雀石绿免疫原。

2. 根据权利要求 1 所述的辣根过氧化物酶标记无色孔雀石绿免疫原的制备方法,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。

一种辣根过氧化物酶标记无色孔雀石绿免疫原的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种辣根过氧化物酶标记免疫原的制备方法,特别是涉及一种辣根过氧化物酶标记无色孔雀石绿免疫原的制备方法。

背景技术

[0002] 目前在无色孔雀石绿检测中,常见的标记方法都是对抗体进行标记,但抗体的标记存在着标记后抗体的效价下降较大的不足,不利于无色孔雀石绿残留检测。

发明内容

[0003] 本发明的目的是要提供一种改进的辣根过氧化物酶标记无色孔雀石绿免疫原的制备方法,它不但能有效地制得用于无色孔雀石绿残留检测的酶标记无色孔雀石绿免疫原,而且操作简单,标记效果理想。

[0004] 本发明的目的是这样实现的:本发明的一种辣根过氧化物酶标记无色孔雀石绿免疫原的制备方法操作如下,在室温条件下:

(1)称取 5mg 辣根过氧化物酶放入 10mL 离心管中,加入 1mL 双蒸水溶解,接着缓慢振荡中缓缓加入 0.2mL 新鲜配置的 0.1mol/L 过碘酸钠溶液,室温下避光反应 20min,将反应后的液体装入透析袋中,再放入 1mmol/L pH4.4 醋酸钠缓冲液中,4℃暗处透析 24h,期间换液 4 次,然后收集透析袋内的液体,得透析好的辣根过氧化物酶溶液;

(2)先在 1mL 无色孔雀石绿免疫原溶液中加入 0.2mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液,将 pH 调整到 9.1,再将步骤(1)透析好的辣根过氧化物酶溶液用 0.2mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液调节 pH 到 9.1,并加入上述调整 pH 后的无色孔雀石绿免疫原溶液中,室温下避光反应 2h,在反应结束后的溶液中加入 100 μL 新配置的 4mg/mL 硼氢化钠溶液,4℃放置 2h,得结合物;

(3)取步骤(2)所得结合物并加入等体积饱和硫酸铵,混匀,4℃放置 30min,3000rpm 离心 30min,弃上清,沉淀以 3mL 0.02mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液溶解,装入透析袋,在 200mL 以上的 0.02mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液中 4℃暗处透析 24h,期间换液 4 次,得透析物;

(4)取步骤(3)所得透析物,3000rpm 离心 30min,除去不溶物,即得辣根过氧化物酶标记无色孔雀石绿免疫原。

[0005] 所述的透析袋是半周长为 22mm,截留分子量为 14000 的透析袋。

[0006] 本发明利用过碘酸钠法,对合成的无色孔雀石绿免疫原,用辣根过氧化物酶对其进行标记,该标记方法是由无色孔雀石绿免疫原和辣根过氧化物酶在室温条件下,在低 pH 条件下,用过碘酸钠氧化辣根过氧化物酶的糖链,形成的醛化酶可与无色孔雀石绿免疫原的氨基相连,然后进一步用硼氢化钠还原成稳定的酶标记免疫原,获得的酶标记免疫原经过 50% 饱和硫酸铵沉淀,用磷酸盐缓冲液溶解,经透析后,即可获得辣根过氧化物酶标记无色孔雀石绿免疫原。在所得辣根过氧化物酶标记无色孔雀石绿免疫原中加入灭菌甘油至 40% ~ 50% 浓度,-20℃冻存且可保存备用。

[0007] 所使用无色孔雀石绿免疫原且购自上海佩吉生物科技有限公司。

[0008] 本发明采用了过碘酸钠法,本发明的辣根过氧化物酶标记无色孔雀石绿免疫原的制备方法,且制备过程得到了简化,标记效果理想,用此方法制备得到的酶标无色孔雀石绿免疫原,可用于检测无色孔雀石绿残留的酶标记免疫原,在无色孔雀石绿残留的检测中,大大降低了方法的检测限,对提高无色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,该方法成功地合成了可用于检测无色孔雀石绿残留的酶标记免疫原,并且,为开发孔雀石绿药物残留酶联免疫检测方法奠定了基础,还有利于普及推广应用。

具体实施方式

[0009] 以下将对本发明的辣根过氧化物酶标记无色孔雀石绿免疫原的制备方法作进一步的详细描述。

[0010] 具体步骤如下:

(1) 称取 5mg 辣根过氧化物酶放入 10mL 离心管中,加入 1mL 双蒸水溶解,接着缓慢振荡中缓缓加入 0.2mL 新鲜配置的 0.1mol/L 过碘酸钠溶液,室温下避光反应 20min,将反应后的液体装入透析袋中,再放入 1mmol/L pH4.4 醋酸钠缓冲液中,4℃暗处透析 24h,期间换液 4 次,然后收集透析袋内的液体,得透析好的辣根过氧化物酶溶液;

(2) 先在 1mL 无色孔雀石绿免疫原溶液中加入 0.2mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液,将 pH 调整到 9.1,再将步骤(1)透析好的辣根过氧化物酶溶液用 0.2mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液调节 pH 到 9.1,并加入上述调整 pH 后的无色孔雀石绿免疫原溶液中,室温下避光反应 2h,在反应结束后的溶液中加入 100 μL 新配置的 4mg/mL 硼氢化钠溶液,4℃放置 2h,得结合物;

(3) 取步骤(2)所得结合物并加入等体积饱和硫酸铵,混匀,4℃放置 30min,3000rpm 离心 30min,弃上清,沉淀以 3mL 0.02mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液溶解,装入透析袋,在 200mL 以上的 0.02mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液中 4℃暗处透析 24h,期间换液 4 次,得透析物;

(4) 取步骤(3)所得透析物,3000rpm 离心 30min,除去不溶物,即得辣根过氧化物酶标记无色孔雀石绿免疫原。

[0011] 上述各步骤均在室温下进行,所用透析袋均是半周长为 22mm,截留分子量为 14000 的透析袋。

专利名称(译)	一种辣根过氧化物酶标记无色孔雀石绿免疫原的制备方法		
公开(公告)号	CN103728448A	公开(公告)日	2014-04-16
申请号	CN201310747526.1	申请日	2013-12-31
[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 梁楠 柯江波 胡利静 刘腾飞		
发明人	杨先乐 梁楠 柯江波 胡利静 刘腾飞		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种辣根过氧化物酶标记无色孔雀石绿免疫原的制备方法。其特征是本发明利用过碘酸钠法,对合成的无色孔雀石绿免疫原,用辣根过氧化物酶对其进行标记。该标记方法是由无色孔雀石绿免疫原和辣根过氧化物酶在室温条件下,在低pH条件下,用过碘酸钠氧化辣根过氧化物酶的糖链,形成的醛化酶可与无色孔雀石绿免疫原的氨基相连,然后进一步用硼氢化钠还原成稳定的酶标记免疫原,获得的酶标记免疫原经过50%饱和硫酸铵沉淀,用磷酸盐缓冲液溶解,经透析后,即可获得辣根过氧化物酶标记无色孔雀石绿免疫原。本发明成功地合成了可用于检测无色孔雀石绿残留的酶标记免疫原,并且,为开发孔雀石绿药物残留酶联免疫检测方法奠定了基础,还有利于普及推广应用。