



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105911271 A

(43)申请公布日 2016.08.31

(21)申请号 201610339333.6

(22)申请日 2016.05.20

(71)申请人 福建安欣睿捷生物科技有限公司

地址 350003 福建省福州市仓山区盖山镇
浦下村后门里122号080室

(72)发明人 王保民 张威 陈俊玉 王冕
杨涛 谢紫君 宁香雪 郭素琴
谭桂玉 丹阳

(74)专利代理机构 福州市景弘专利代理事务所
(普通合伙) 35219

代理人 林祥翔 吕元辉

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

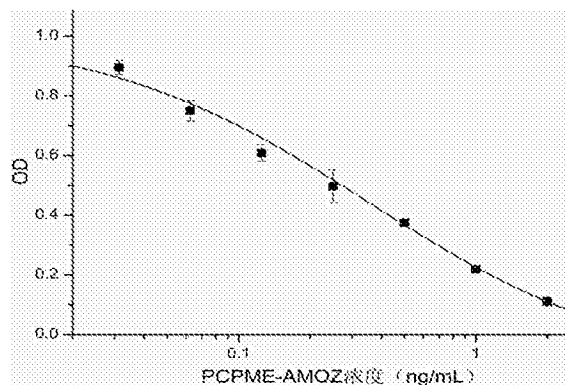
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮免疫
检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮免疫检测方法,呋喃它酮在动物体内迅速代谢为5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮(AMOZ),检测呋喃它酮的残留实际上是检测AMOZ的残留。本发明的检测方法是将待检物中的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮(AMOZ)提取后改用3-醛基苯甲酸甲酯进行衍生化,得到3-醛基苯甲酸甲酯-5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮(PCPME-AMOZ),然后再测定该衍生物的含量。以NP-AMOZ和PCPME-AMOZ为标准品进行间接竞争酶联免疫吸附测定(icELISA),结果证明用本发明的检测方法能够显著提高呋喃它酮残留即5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮(AMOZ)免疫检测的灵敏度。



1. 一种5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮免疫检测方法,其特征在于,将待测样品中的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮通过肟反应衍生得到3-醛基苯甲酸甲酯-5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮后进行酶联免疫吸附检测,以测定待测样品中的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮含量。

2. 如权利要求1所述的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮免疫检测方法,其特征在于,用3-醛基苯甲酸甲酯与待测样品中的3-氨基-2-恶唑烷基酮发生肟反应。

3. 如权利要求1所述的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮免疫检测方法,其特征在于,所述的酶联免疫吸附检测为间接竞争酶联免疫吸附测定。

4. 如权利要求2所述的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮免疫检测方法,其特征在于:待测样品的获取方法为将待检物与甲醇-水混合溶液混合研匀,离心后的沉淀物为待测样品。

5. 如权利要求4所述的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮免疫检测方法,其特征在于,所述的待测样品肟反应的操作方法步骤包括:

1)将沉淀物与盐酸溶液混合研匀;

2)再与3-醛基苯甲酸甲酯混匀后旋干;

3)再加入1,4-二氧六环加热回流;

4)向步骤(3)的混合物中加入水和 CH_2Cl_2 萃取,水洗有机层,再用无水 Na_2SO_4 干燥有机层,而后浓缩至干燥,获得含有衍生物3-醛基苯甲酸甲酯-5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮的物质。

6. 如权利要求1至5所述的任一5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮免疫检测方法,其特征在于,酶联免疫吸附检测中用完全抗原AMOZ-3-醛基苯甲酸-BSA免疫动物体获得抗血清。

7. 如权利要求6所述的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮免疫检测方法,其特征在于,酶联免疫吸附检测为基于抗血清的3-醛基苯甲酸甲酯-5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮间接竞争酶联免疫吸附反应。

8. 如权利要求7所述的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮免疫检测方法,其特征在于,酶联免疫吸附检测中以完全抗原AMOZ-3-醛基苯甲酸-OVA作为固相抗原。

9. 如权利要求8所述的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮免疫检测方法,其特征在于,酶联免疫吸附检测中以3-醛基苯甲酸甲酯-5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮为竞争性抑制物,以抗血清为一抗,以IgG-HRP为酶标二抗。

10. 如权利要求1所述的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮免疫检测方法的应用,其特征在于将待测样品中的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮通过肟反应衍生得到3-醛基苯甲酸甲酯-5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮后进行酶联免疫吸附检测在5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮快速检测试剂盒方面的应用。

一种5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及含有呋喃它酮代谢物5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮的检测方法及其应用。

背景技术

[0002] 呋喃它酮药物抗菌谱较广,对大多数革兰氏阳性菌、阴性菌均有抗菌作用。本品内服后在肠道不易吸收,故主要用于肠道感染,也可用于球虫病、火鸡黑头病的治疗。硝基呋喃类广谱抗生素(呋喃它酮、呋喃唑酮、呋喃妥因、呋喃西林)主要出现在动物源性食品。经过科学实验证明,硝基呋喃类药物及其代谢产物具有致癌和致突变的特性。

[0003] 1995年,欧盟禁止在食用动物中使用硝基呋喃类抗生素,并于1997年将所有的硝基呋喃类抗生素列为违禁药物。欧盟于2003年通过了2003/181/EC委员会决议,建立了用于检测禽肉产品和水产品中硝基呋喃类药物的代谢的各种方法的最小要求性能限值为1.0ug/kg。目前,欧盟、美国及其他国家都对进口动物性食品中硝基呋喃类抗生素残留做了非常严格的限制。我国于2002年颁布了禁止使用硝基呋喃类抗生素的禁令。

[0004] 本发明创新地运用了一种呋喃它酮代谢物5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮的检测方法,使得相应的ELISA检测灵敏度大幅度提高。因此,本发明建立的酶联免疫吸附检测方法可以大大提高检测准确性,为各层监督单位提供快速、高效、准确的检测方法,具有不可估量的市场价值。

发明内容

[0005] 为了使得用于检测如动物源性食品及其加工产品等样品中AMOZ残留的icELISA具有更高的灵敏度,本发明创新了一种5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮的处理方法,使得icELISA更加高效更适宜于实际样品的检测。

[0006] 本发明所述的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮免疫检测方法如下,将待测样品中的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮通过肟反应衍生得到3-醛基苯甲酸甲酯-5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮后进行酶联免疫吸附检测,以测定待测样品中的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮含量。

[0007] 本发明中用3-醛基苯甲酸甲酯与待测样品中的3-氨基-2-恶唑烷基酮发生肟反应。

[0008] 本发明的酶联免疫吸附检测为间接竞争酶联免疫吸附测定。

[0009] 本发明待测样品的获取方法为将待检物与甲醇-水混合溶液混合研匀,离心后的沉淀物为待测样品。

[0010] 本发明的待测样品肟反应的操作方法步骤包括:1)将沉淀物与盐酸溶液混合研匀;2)再与3-醛基苯甲酸甲酯混匀后旋干;3)再加入1,4-二氧六环加热回流;4)向步骤(3)的混合物中加入水和CH₂Cl₂萃取,水洗有机层,再用无水Na₂SO₄干燥有机层,而后浓缩至干燥,获得含有衍生物3-醛基苯甲酸甲酯-5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮的物质。

[0011] 本发明所述的酶联免疫吸附检测中用完全抗原AMOZ-3-醛基苯甲酸-BSA免疫动物体获得抗血清。所述的酶联免疫吸附检测为基于抗血清的3-醛基苯甲酸甲酯-5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮间接竞争酶联免疫吸附反应。

[0012] 本发明所述的酶联免疫吸附检测中以完全抗原AMOZ-3-醛基苯甲酸-OVA作为固相抗原。

[0013] 本发明所述的酶联免疫吸附检测中以3-醛基苯甲酸甲酯-5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮为竞争性抑制物,以抗血清为一抗,以1gG-HRP为酶标二抗。

[0014] 本发明所述的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮免疫检测方法的应用,尤其在于将待测样品中的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮通过肟反应衍生得到3-醛基苯甲酸甲酯-5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮后进行酶联免疫吸附检测在5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮快速检测试剂盒方面的应用。

[0015] 以上检测方法及其应用具有快速、简单、准确、高通量、无需专业操作等优点,使得它成为一种理想的市场监管检测方法。

附图说明

[0016] 图1为5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮(AMOZ)的化学式;

[0017] 图2为3-醛基苯甲酸甲酯-5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮(PCPME-AMOZ)的化学式;

[0018] 图3为邻硝基苯甲醛-5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮(NP-AMOZ)的化学式;

[0019] 图4为以PCPME-AMOZ为标准抑制物的抗血清icELISA标准曲线;

[0020] 图5为以NP-AMOZ为标准抑制物的抗血清icELISA标准曲线

具体实施方式

[0021] 本发明中出现的术语及相关试剂配方如下:

[0022] AMOZ:5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮(3-amino-5-morpholino-methyl-2-oxazolidinone,AMOZ);

[0023] BSA:牛血清蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA),分子量约为66.43kDa;

[0024] OVA:卵白蛋白(Albumin,from chicken egg white),分子量约为44kDa;

[0025] Tween-20:吐温20;

[0026] Gelatin:明胶;

[0027] PBS:磷酸盐缓冲液(NaCl 137mM,KH₂PO₄ 1.5mM,Na₂HPO₄ • 12H₂O 8.3mM,pH 7.5);

[0028] PBST:PBS溶液中加入0.1%的Tween-20;

[0029] PBSTG:PBST溶液中加入0.1%的明胶;

[0030] 包被缓冲液:1.5g Na₂CO₃、2.93g NaHCO₃溶于1000mL水,pH 9.6;

[0031] 底物缓冲液:5.1g一水合柠檬酸、18.43g Na₂HPO₄ • 12H₂O、1.0mL Tween-20溶于1000mL水,pH 5.0;

[0032] 文中出现的所有试剂及仪器设备均可配制或市购获得,本发明具体实施例中所使用的试剂均购买于Sigma公司。

[0033] 试验例1:

[0034] 待检物中5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮的获取及其衍生物3-醛基苯甲酸甲酯-5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮(PCPME-AMOZ)的获取。

[0035] 可参考国家标准(GB/T 20752-2006)的文献报告,用文献中的方法把5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮提取出来,方法可以是(1)收集市场中或实验室制备的待检物,置于棕色离心管中,加入甲醇-水混合溶液(甲醇与水的混合体积比为2:1),研均,再用甲醇-水混合溶液洗涤均质器刀头,二者合并后离心,吸取上清液弃掉。

[0036] (2)向上述离心管中加入盐酸溶液,研均,用盐酸溶液洗涤均质刀头,二者合并。

[0037] (3)把步骤(2)中的混合液中加入3-醛基苯甲酸甲酯,混匀后旋干。加入1,4-二氧六环加热回流;

[0038] (4)向步骤(3)的混合物中加入水和CH₂Cl₂萃取,水洗有机层,其中水和CH₂Cl₂的量分别为20至30mL;再用无水Na₂SO₄干燥有机层,而后浓缩至干燥,获得含有衍生物3-醛基苯甲酸甲酯-5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮的物质。

[0039] 经过上述处理方案,若待检物提取的待测样品中含有5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮(AMOZ),其将与3-醛基苯甲酸甲酯发生成脎反应,衍生得到3-醛基苯甲酸甲酯-5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮(PCPME-AMOZ)。

[0040] 具体的:

[0041] (1)待测样品的获取。收集市场中或实验室制备的实际样品,称取2.0g(±0.01g),分别置于50mL棕色离心管中,加入10mL甲醇-水混合溶液(甲醇与水的混合体积比为2:1),均质2min,再用5mL甲醇-水混合溶液洗涤均质器刀头,二者合并5000r/min离心10min,吸取上清液弃掉。向阴性样品中加入适量AMOZ,使最终测定浓度为10.0ng/mL。

[0042] (2)向上述每个离心管中加入10mL 0.2mol/L盐酸溶液,研均2min,用10mL 0.2mol/L的盐酸溶液洗涤均质刀头,二者合并。

[0043] (3)向步骤(2)的混合液中加入0.3mL3-醛基苯甲酸甲酯,混匀后悬干。加入干燥的1,4-二氧六环(1,4-dioxane)到25mL单口反应瓶中,加热回流反应8小时。

[0044] (4)向步骤(3)加入水和CH₂Cl₂萃取,有机层水洗三次,其中水和CH₂Cl₂的量分别为20至30mL;无水Na₂SO₄干燥后浓缩至完全干燥。从而使得AMOZ与3-醛基苯甲酸甲酯发生成脎反应,衍生得到AMOZ-3-醛基苯甲酸甲酯(PCPME-AMOZ)。

[0045] 以上化学反应使得待测样品中可能含有的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮(AMOZ)与3-醛基苯甲酸甲酯发生成脎反应,衍生得到3-醛基苯甲酸甲酯-5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮(PCPME-AMOZ)。

[0046] 试验例2:

[0047] 合成AMOZ的半抗原和完全抗原,并用完全抗原免疫实验小鼠获得抗血清:

[0048] 参考Yu-Dong Shen等的文献报道(Yu-Dong Shen,Zhen-Lin Xu,Shi-Wei Zhang,Hong Wang,Jin-Yi Yang,Hong-Tao Lei,Zhi-Li Xiao&Yuan-Ming Sun.Development of a monoclonal antibody-based competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for furaltidone metabolite AMOZ in fish and shrimp samples.Journal of Agricultural and Food Chemistry,2012,60,10991-10997.),合成AMOZ的半抗原和完全抗原。用完全抗原AMOZ-3-醛基苯甲酸-BSA(按蛋白的量计量,1.0mg/mL)与弗氏佐剂按1:1

(v/v)混合乳化,乳化完全后注射到小鼠体内。免疫Balb/c雌性小鼠,每只小鼠每次分别在背部和腹腔各注射。四次免疫之后,取小鼠血液,离心之后得到抗血清。

[0049] 具体的,制备了AM0Z半抗原的方法步骤如下:

[0050] (1)依次取适量AM0Z盐酸盐固体粉末70.0mg(1.0equiv.),3-醛基苯甲酸41.0mg(1.0equiv.),干燥的1,4-二氧六环(1,4-dioxane)加入到25mL单口反应瓶中,加热反应2小时。

[0051] (2)用减压旋转蒸发仪脱溶剂得到白色固体粉末。

[0052] (3)向步骤(2)的固体粉末中加入乙醇,在超声波水浴槽中溶解1min。

[0053] (4)直接抽滤除掉3-醛基苯甲酸得到白色固体。

[0054] (5)干燥步骤(4)中的白色固体得到半抗原AM0Z-3-醛基苯甲酸。

[0055] 具体的,制备了AM0Z完全抗原的方法步骤如下:

[0056] (1)称取适量AM0Z-3-醛基苯甲酸3.29mg(1.0equiv.)加到10.0mL反应瓶中,再加入0.5mL N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)搅拌5min使粉末完全溶解。加入N-羟基丁二酰亚胺(NHS)1.57mg(1.5equiv.),搅拌30min后加入N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)2.82mg(1.5equiv.)搅拌反应过夜。

[0057] (2)称取牛血清蛋白(BSA)20.0mg加入到10.0mL反应瓶中,加2.0mL PBS使之搅拌溶解。

[0058] (3)把步骤(1)中的混合物缓慢逐滴加入到步骤(2)的蛋白溶液中,此过程边搅拌边滴加。4℃搅拌反应过夜。

[0059] (4)取步骤(3)的混合物在4.0L PBS中透析3天,每天换透析液2次。最后按蛋白质的量用PBS配成1.0mg/mL,分装到1.0mL/管,-40℃长期冻存。此过程就完成了半抗原与蛋白质的偶联(即得到完全抗原)。

[0060] 半抗原与卵清白蛋白(OVA)的偶联方法同上。

[0061] 具体的,用完全抗原AM0Z-3-醛基苯甲酸-BSA免疫Balb/c雌性小鼠获得抗血清的方法步骤如下:取实施例3中制备好的完全抗原一管(1.0mL)与弗氏佐剂按1:1(v/v)混合乳化,乳化完全后注射到小鼠体内。

[0062] 免疫Balb/c雌性小鼠的免疫方案见表1。

[0063] 表1完全抗原免疫小鼠的免疫方案

	免疫次数	免疫剂量	佐剂类型	免疫部位
	一免	100 ug	完全佐剂	背部两点,腹腔
[0064]	二免(间隔两周)	100 ug	不完全佐剂	背部两点,腹腔
	三免(间隔两周)	100 ug	不完全佐剂	背部两点,腹腔
	四免(间隔两周)	100 ug	不完全佐剂	背部两点,腹腔

[0065] 将第四次免疫(四免)之后的小鼠进行眼眶取血,离心取血清,从而制备得到抗血清。

[0066] 试验例3:

[0067] 以抗血清和PCPME-AM0Z、NP-AM0Z分别建立了间接竞争酶联免疫吸附反应

(icELISA)进行对照及建立标准曲线的方法如下:

[0068] (1)取完全抗原AMOZ-3-醛基苯甲酸-OVA(1.0mg/mL)用包被缓冲液稀释1:240000倍,加到酶标板中200uL/孔。放入37℃培养箱中温育3h。

[0069] (2)用PBST洗板4次,甩干。

[0070] (3)将标准品PCPME-AMOZ用PBSTG稀释成系列梯度(2;1;0.5;0.25;0.125;0.0625;0.03125;0ng/mL)。或将标准品NP-AMOZ用PBSTG稀释成系列梯度(200;100;50;25;12.5;6.25;3.125;0ng/mL)。用PBSTG把抗血清稀释150000倍。在酶标板孔中依次加入100uL浓度为标准品和100uL抗血清稀释液。37℃温育30min。

[0071] (4)用PBST洗板4次,甩干。

[0072] (5)每孔加入200uL用PBSTG稀释的IgG-HRP。

[0073] (6)用PBST洗板4次,甩干。

[0074] (7)每孔加入200uL底物缓冲液,显色到一定程度再加入50uL硫酸(2M)终止反应。

[0075] (8)在492nm波长测吸光值。

[0076] 测得相应数据后,用分析软件OriginPro 8.0建立标准曲线,见图4(PCPME-AMOZ为标准品),图5(NP-AMOZ为标准品)。

[0077] 利用本发明的检测方法,可以成功地使待检物中可能残留的AMOZ经过一系列的衍生化反应,最终得到了PCPME-AMOZ。并利用制备得到的抗血清,以PCPME-AMOZ作为标准抑制物建立了icELISA,其标准曲线见图4。同时,利用以已报道的衍生方法得到的NP-AMOZ作为标准抑制物建立了icELISA,其标准曲线见图5。以NP-AMOZ为标准品进行间接竞争酶联免疫吸附测定(icELISA),得到的IC50和检测范围分别为22.35ng/mL,5.71~96.14ng/mL。而以PCPME-AMOZ为标准品进行间接竞争酶联免疫吸附测定(icELISA),得到的IC50和检测范围分别为0.27ng/mL,0.052~1.35ng/mL。结果证明以PCPME-AMOZ为标准抑制物时,其icELISA的灵敏度更高。实验证明以本发明的AMOZ检测方法能大幅度提升icELISA灵敏度。

[0078] 将待检物中可能残留的AMOZ经过一系列的衍生化反应,最终得到了PCPME-AMOZ,以PCPME-AMOZ作为标准抑制物建立了icELISA,得到的吸光值与标准曲线比对,从而知悉AMOZ的含量,其能提高icELISA灵敏度,可以快速推广市场应用,在市场监管过程中具有更深远的意义。

[0079] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并非用以限定本发明的实质技术内容范围,本发明的实质技术内容是广义地定义于申请的权利要求范围中,任何他人完成的技术实体或方法,若是与申请的权利要求范围所定义的完全相同,也或是一种等效的变更,均将被视为涵盖于该权利要求范围之内。

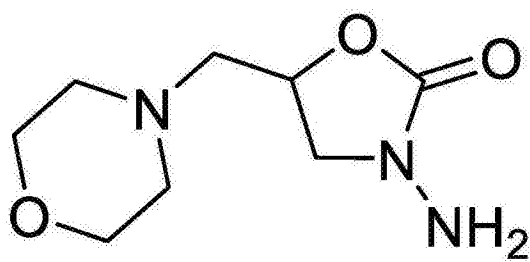


图1

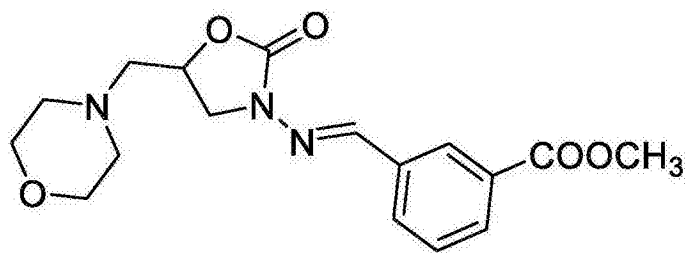


图2

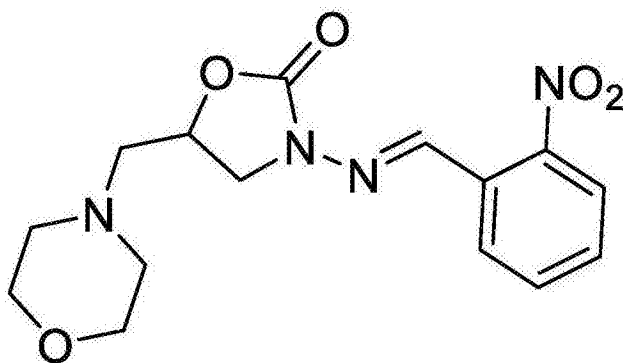


图3

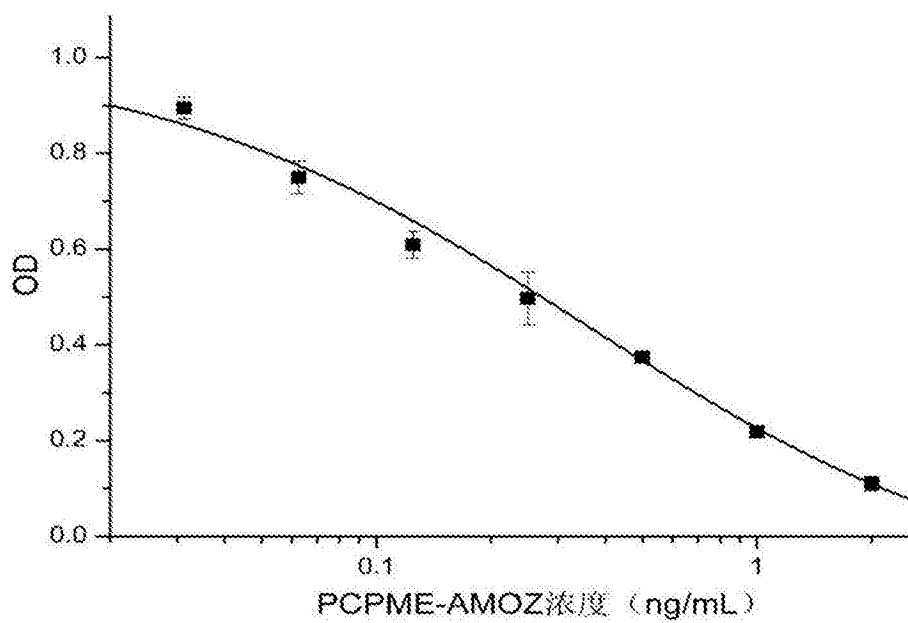


图4

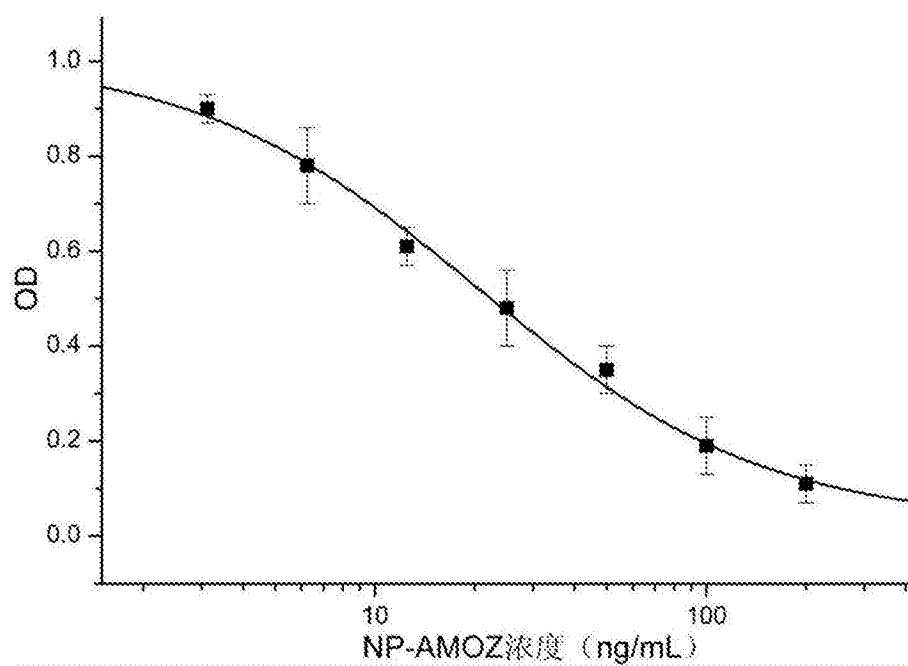


图5

专利名称(译)	一种5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮免疫检测方法		
公开(公告)号	CN105911271A	公开(公告)日	2016-08-31
申请号	CN201610339333.6	申请日	2016-05-20
[标]申请(专利权)人(译)	福建安欣睿捷生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	福建安欣睿捷生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	福建安欣睿捷生物科技有限公司		
[标]发明人	王保民 张威 陈俊玉 王冕 杨涛 谢紫君 宁香雪 郭素琴 谭桂玉 丹阳		
发明人	王保民 张威 陈俊玉 王冕 杨涛 谢紫君 宁香雪 郭素琴 谭桂玉 丹阳		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/543 G01N33/9446		
其他公开文献	CN105911271B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮免疫检测方法，呋喃它酮在动物体内迅速代谢为5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮(AMOZ)，检测呋喃它酮的残留实际上是检测AMOZ的残留。本发明的检测方法是将待检物中的5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮(AMOZ)提取后改用3-醛基苯甲酸甲酯进行衍生化，得到3-醛基苯甲酸甲酯-5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮(PCPME-AMOZ)，然后再测定该衍生物的含量。以NP-AMOZ和PCPME-AMOZ为标准品进行间接竞争酶联免疫吸附测定(icELISA)，结果证明用本发明的检测方法能够显著提高呋喃它酮残留即5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮(AMOZ)免疫检测的灵敏度。

