



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103954749 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 30

(21) 申请号 201410154389. 5

C07K 16/44 (2006. 01)

(22) 申请日 2014. 04. 17

(71) 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路  
483 号

(72) 发明人 孙远明 刘凤银 徐振林 沈玉栋  
雷红涛 王弘 杨金易 肖治理

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限  
公司 44102

代理人 林丽明

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

C07K 14/795 (2006. 01)

C07K 14/77 (2006. 01)

C07K 14/765 (2006. 01)

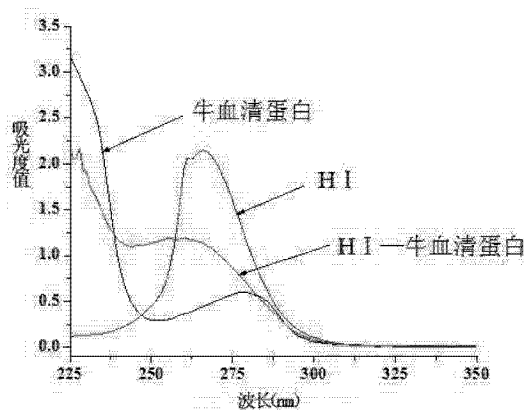
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种用于直接检测呋喃它酮代谢物 AMOZ 的  
快速免疫检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种用于直接检测呋喃它酮代谢物 AMOZ 的快速免疫检测方法,包括 AMOZ 半抗原、人工抗原、抗体等的制备及其应用。所述 AMOZ 半抗原具有式(I)或式(II)所示分子结构,所述 AMOZ 人工抗原具有式(III)或式(IV)所示分子结构。采用本发明抗原得到的抗体可以特异性识别 AMOZ,抗体的效价为 1:64000,最低检测限为 0.852ng/mL,半抑制浓度为 15.26ng/mL,可以直接用于 AMOZ 的检测,克服传统酶联免疫方法需要对 AMOZ 进行衍生化的特点,更简便、快速及低成本。本发明的抗原及抗体在食品中 AMOZ 的残留检测上具有广泛的应用前景。





## 一种用于直接检测呋喃它酮代谢物 AMOZ 的快速免疫检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于食品安全免疫检测技术领域,更具体地,涉及一种用于直接检测呋喃它酮代谢物 AMOZ 的快速免疫检测方法。

### 背景技术

[0002] AMOZ 是硝基呋喃类抗生素呋喃它酮的代谢物,是非法使用硝基呋喃类抗生素的指示物,是一类具有潜在致畸、致癌和致突变的物质。欧盟已于 1995 年禁止在食用动物中使用硝基呋喃类抗生素,又在 1997 年将所有的硝基呋喃类抗生素全部列为违禁药物,我国亦于 2002 年颁布了禁止使用硝基呋喃类抗生素的禁令。之后欧盟又于 2003 年通过了 2003/181/EC 委员会决议,建立了用于禽肉产品和水产品中硝基呋喃类药物代谢物的各种检测方法的最小要求性能限值为 1 $\mu$ g/kg。现在,为保证食品安全,国内外的监管机构将注意力集中在了 AMOZ 的检测上,建立快速、简单、廉价、有效的 AMOZ 检测方法已刻不容缓。

[0003] 目前国内外检测 AMOZ 的方法主要有色谱方法及其联用技术、分光光度法、免疫分析法等。前两种属于仪器分析检测技术,存在着周期长、专业性强、费用高等不足,很难适应许多场合快速检测的需要,在应用上不能广泛推广。而现在报道的基于抗原-抗体特异性结合检测 AMOZ 的免疫分析方法在检测之前均需对检测对象进行衍生化处理,存在着前处理操作复杂繁琐、成本高及回收率偏低等不足,限制了其应用。

[0004] 基于抗原-抗体识别的免疫分析技术在小分子化学性污染物检测领域占有重要地位,已经成功应用于农药、兽药、生物毒素等的快速检测,为保障食品安全发挥了重要作用。但是,大量实践证明:当化合物(半抗原)的分子量 <300 Da 时,其高特异性高亲和力的抗体制备难度增大。由于 AMOZ 分子量很小(201.22 Da),即使将其与载体蛋白偶联,其高特异性高亲和力抗体的制备难度也相对很大,因此,目前关于 AMOZ 免疫分析检测技术的报道大都是需对其进行衍生化的间接检测,而关于直接检测 AMOZ 的免疫分析检测技术则鲜有报道。

[0005] 2009 年,Pimpitak 等人报道了一种检测强化虾样品中 AMOZ 残留量的方法。他们将 AMOZ 与 3-羧酸苯甲醛衍生化制备免疫半抗原 CPAMOZ,通过抗原制备、动物免疫以及单克隆抗体制备获得单克隆抗体,该抗体虽然能够识别 AMOZ,但是识别灵敏度低,比其对半抗原 CPAMOZ 的灵敏度低 23 倍。基于该抗体他们建立了间接检测 AMOZ 的免疫分析方法,即在检测前对其进行衍生化(将 AMOZ 与 2-硝基苯甲醛衍生化为 NPAMOZ),衍生化的时间需要十多个小时,十分费时。

[0006] 抗体是免疫分析的核心试剂,本课题组以一种新型的 AMOZ 半抗原,将其与载体蛋白偶联制备人工抗原,并进行抗体制备,获得了特异性识别 AMOZ 的抗体。同时为了提高对 AMOZ 分析的灵敏度,设计了一个与免疫半抗原不同结构的包被半抗原,基于此建立了一种异源免疫分析方法,该方法可以实现对 AMOZ 的直接检测,无需衍生化,同时只对 AMOZ 的原型呋喃它酮有交叉(CR=188.2%),与其它硝基呋喃类抗生素的原型及其衍生物无交叉现象,

考虑到样品前处理采用水提的方式,呋喃它酮本身不能溶于水,对实际样品的检测影响不大,不会造成假阳性,可以用于实际样品的检测。

### 发明内容

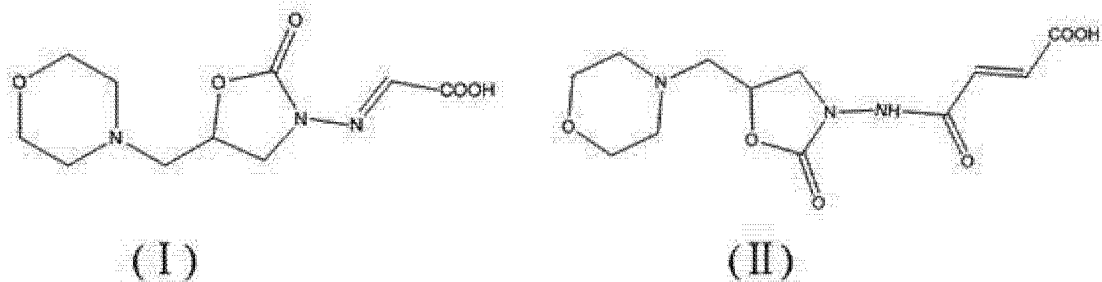
[0007] 本发明要解决的技术问题是克服传统的 AMOZ 免疫分析技术中均需对其进行衍生化处理的缺陷,提供一种 AMOZ 半抗原、人工抗原和高特异性抗体。

[0008] 本发明的第二个目的是提供所述 AMOZ 半抗原、人工抗原和特异性抗体的制备方法。

[0009] 本发明的第三个目的是提供一种可以对 AMOZ 进行直接快速检测的免疫分析方法。

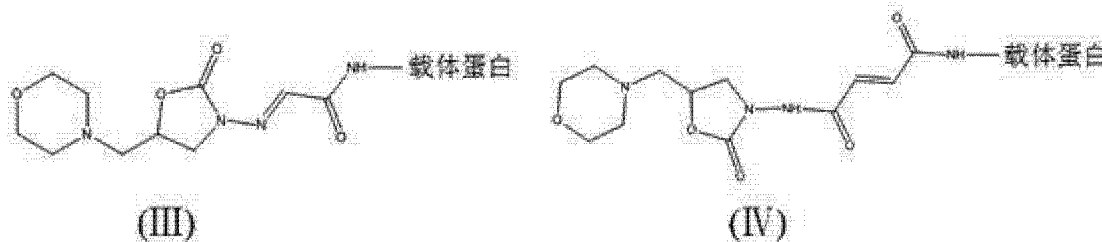
[0010] 本发明的目的通过以下技术方案予以实现:

一种 AMOZ 半抗原,所述 AMOZ 半抗原具有式(I)或式(II)所示分子结构:



所述 AMOZ 半抗原的制备方法为:将 AMOZ 和乙醛酸或顺丁烯二酸酐分别溶于无水乙醇中,搅拌过程中将乙醛酸或顺丁烯二酸酐的乙醇溶液滴加到 AMOZ 的乙醇溶液中,AMOZ 和乙醛酸或顺丁烯二酸酐的摩尔比为 1:1.2;室温搅拌过夜,反应结束,真空抽滤,依次用乙醇和乙醚洗涤 2 次,取沉淀、干燥获得式(I)或式(II)所示 AMOZ 半抗原。

[0011] 一种 AMOZ 人工抗原,所述 AMOZ 人工抗原具有式(III)或式(IV)所示分子结构:



优选地,本发明所述人工抗原的制备方法为:采用活泼酯偶联法将如上具有式(I)或式(II)所示分子结构的 AMOZ 半抗原与载体蛋白偶联制备得到具有式(III)或式(IV)所示分子结构的 AMOZ 人工抗原。

[0012] 更优选地,本发明所述人工抗原的制备方法为:将具有式(I)或(II)所示分子结构的 AMOZ 半抗原溶于二甲基甲酰胺(DMF)中,搅拌加入 1,3-二环己基碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺,4℃下磁力搅拌反应过夜,离心后取上清;搅拌条件下,将上清液逐滴滴加到载体蛋白的 PBS (0.01M, pH 7.4) 缓冲溶液中,4℃下磁力搅拌反应 12h;离心后取上清。4℃下用生理盐水透析 3 天得目标产物。所述 AMOZ 半抗原与载体蛋白的摩尔比为 100:1。

[0013] 优选地,所述载体蛋白为匙孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清蛋白(BSA)或卵清蛋白(OVA)。

[0014] 本发明同时提供所述 AMOZ 特异性单克隆抗体或多克隆抗体,以及所述 AMOZ 人工抗原和特异性抗体在 AMOZ 免疫检测方面的应用。

[0015] 一种直接检测呋喃它酮代谢物 AMOZ 的快速免疫分析方法,包括如下步骤:

S1. 将权利要求 3 具有式(III)所示分子结构的 AMOZ 人工抗原免疫动物制备 AMOZ 的多克隆抗体;

S2 权利要求 3 具有式(IV)所示分子结构的 AMOZ 人工抗原作为包被原包被在微孔板上,将步骤 S1 制备得到的 AMOZ 的多克隆抗体加入微孔板中;

S3. 采用竞争 ELISA 测定待测样品中 AMOZ 的含量。

[0016] 本发明建立了一种异源包被的酶联免疫检测方法,可直接用于 AMOZ 的检测,无需衍生化处理。

[0017] 本发明的有益效果是:

本发明最大的创新点就是把两个半抗原进行了组合,建立异源包被(免疫半抗原用式(I)所示半抗原,包被半抗原用式(II)所示半抗原,传统的方法是免疫半抗原和包被半抗原都采用式(I)所示半抗原或都采用式(II)所示半抗原。而本发明发现只有将式(I)所示半抗原作为免疫半抗原、式(II)所示半抗原作为包被半抗原这种组合才能用于直接检测 AMOZ,其他组合均不行。

[0018] 现有的 AMOZ 检测方法以仪器法居多,而仪器法周期长、专业性强、费用高操作繁复,前处理复杂,成本高。现有的免疫分析检测方法均需在检测前对 AMOZ 进行衍生化处理,存在前处理操作复杂繁琐、成本高及回收率偏低等不足。本发明提供了一种对 AMOZ 进行直接检测的快速免疫分析方法,阐述了 AMOZ 半抗原、人工抗原、特异性抗体的制备方法与应用。其思路是将 AMOZ 衍生化,获得具有双键刚性支撑手臂的衍生物。以该衍生物为半抗原,进而制备人工抗原,免疫动物获得特异性抗体。该抗体可以特异性识别 AMOZ 本身,进而对 AMOZ 进行直接检测,无需衍生化。该思路的有益效果体现在:(1)引入具有刚性支撑作用的双键手臂,使得 AMOZ 的结构特征明显增强,有利于刺激动物免疫应答产生特异性更强、灵敏度更高的抗体;(2)所使用的衍生剂可以与 AMOZ 的胍胺键发生快速、高效的酰胺化缩合,衍生条件简单、快速、重复性好;(3)本发明提供的 AMOZ 的快速检测方法最低检测限可达到 0.852ng/mL。

## 附图说明

[0019] 图 1. AMOZ 半抗原 H I 及其免疫抗原、载体蛋白紫外扫描图。

[0020] 图 2. AMOZ 半抗原 H II 及其包被抗原、载体蛋白紫外扫描图。

[0021] 图 3. 以人工抗原 III 为免疫原制备的抗体、人工抗原 IV 为包被原建立的对 AMOZ 的抑制曲线。

## 具体实施方式

[0022] 下面结合附图和具体实施例进一步详细说明本发明,除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和仪器为本技术领域常规的试剂、方法和仪器。

[0023] 实施例 1 半抗原 H I 的制备:

取 604mg(3mmol)AMOZ、266.5mg(3.6mmol)乙醛酸分别溶于 2mL 无水乙醇中,搅拌过程

中将乙醛酸的乙醇溶液滴加到 AMOZ 的乙醇溶液中,室温搅拌反应过夜。反应结束,真空抽滤,依次用 2mL 乙醇和乙醚洗涤滤饼 2 次,取沉淀,得到白色固体目标物 H I 540.2mg,产率为 70%。ESI-MS analysis (positive)m/z 258.7 [M+H]<sup>+</sup>;<sup>1</sup>H NMR (600MHz, d<sub>5</sub>-Pyridine, TMS): δ 7.56 (s, 1H), 4.99-4.97 (m, 1H), 4.16 (t, J=8.8Hz, 1H), 3.79 (dd, J<sub>1</sub>=6.7, J<sub>2</sub>=8.8, 1H), 3.68-3.64 (m, 4H), 2.66 (dd, J<sub>1</sub>=6.1, J<sub>2</sub>=13.5, 1H), 2.62 (dd, J<sub>1</sub>=5.5, J<sub>2</sub>=13.4, 1H), 2.51-2.46 (m, 4H)。

#### [0024] 实施例 2 半抗原 H II 的制备方法

取 604mg (3mmol) AMOZ、353mg (3.6mmol) 顺丁烯二酸酐分别溶于 2mL 无水乙醇中,搅拌过程中将顺丁烯二酸酐的乙醇溶液滴加到 AMOZ 的乙醇溶液中,室温搅拌反应过夜。反应结束,真空抽滤,依次用 2mL 乙醇和乙醚洗涤滤饼 2 次,取沉淀,得到白色固体目标物 H II 566mg,产率为 63%。ESI-MS analysis (negative)m/z 298.6 [M-H]<sup>-</sup>;<sup>1</sup>H NMR (500MHz, d<sub>6</sub>-DMSO, TMS): δ 6.32 (d, J=2.9Hz, 2H), 4.86-4.78 (m, 1H), 3.74 (t, J =8.1Hz, 2H), 3.58 (s, J= 4.6 Hz, 4H), 3.43 (t, J = 7.7 Hz, 1H)。

#### [0025] 实施例 3 免疫原 / 包被原的制备

免疫原与包被原的制备不同之处在于半抗原的结构和载体蛋白种类,所述免疫原采用半抗原 H I,载体蛋白采用牛血清蛋白(BSA);所述包被原采用半抗原 H II,载体蛋白采用卵清蛋白(OVA)。

[0026] 免疫原的制备方法。活泼酯法:取半抗原 H I 10mg (0.04mmol),溶于 500 μ L 二甲基甲酰胺(DMF)中,搅拌加入 20.6mg (0.1mmol) 1,3-二环己基碳二亚胺(DCC)和 11.5mg (0.1mmol) N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),4℃下磁力搅拌反应过夜,离心后取上清为 A 液。称取 20mg 载体蛋白 BSA 溶于 2mL PBS 溶液(0.1mol/L, pH 7.4)中,搅拌溶解制备 B 液。磁力搅拌下,吸取 A 液 384 μ L 逐滴滴加到 B 液中,4℃下搅拌反应 12h。离心后,取上清液,4℃下 PBS 透析 3d,每天早晚 2 次更换透析液。得到免疫原 H I—BSA。用 PBS 调整浓度为 1mg/mL,每管 500 μ L 分装于 0.5mL 离心管中。冻存于-20℃冰箱中,备用。

[0027] 包被原的制备方法。活泼酯法:半抗原 H II 15mg (0.05mmol),溶于 1.5mL 二甲基甲酰胺(DMF)中,搅拌加入 24.8 mg (0.12mmol) 1,3-二环己基碳二亚胺(DCC)和 13.8mg (0.12mmol) N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),4℃下磁力搅拌反应过夜,离心后取上清为 A 液。称取 20mg 载体蛋白 OVA 溶于 5mL PBS 溶液(0.1mol/L, pH 7.4)中,搅拌溶解制备 B 液。磁力搅拌下,吸取 A 液 1.329mL 逐滴滴加到 B 液中,4℃下搅拌反应 12h。离心后,取上清液,4℃下 PBS 透析 3d,每天早晚 2 次更换透析液。得到免疫原 H II—OVA。用 PBS 调整浓度为 1mg/mL,每管 500 μ L 分装于 0.5mL 离心管中。冻存于-20℃冰箱中,备用。

[0028] 对载体蛋白、半抗原 H I、半抗原 H II 及其相应的免疫原和包被原进行紫外扫描鉴定(220nm ~ 350nm),发现免疫原和包被原同时具备半抗原和载体蛋白的特征吸收峰(见图 1 和图 2),说明免疫原和包被原偶联成功。

#### [0029] 实施例 4 抗体的制备及鉴定

将免疫原与等剂量的免疫佐剂(第 1 次用完全弗氏佐剂,之后均用不完全弗氏佐剂)混合乳化,采用背部皮下、各部位皮下、腿部肌肉和耳缘静脉多种注射方式免疫 6 只体重为 2.5~3kg 的健康新西兰大白兔。第一次免疫间隔一个月后每三周加强免疫一次。第三次加强免疫后 1 周耳缘静脉取血,并利用 ic-ELISA 测定血清效价。当效价不再上升时,采用耳

缘静脉加强免疫。两天后心脏采血,室温静置 0.5~1h,于 4℃、12000r/min 下离心 10min,取上清分装于离心管中,于 -20℃ 下保存备用。

[0030] 间接竞争 ELISA 测定抗体阳性滴度以 2.1 倍于阴性血清的测定值为准,结果表明半抗原 H I 对应的抗血清(Ab-H I)效价为 1:64000。

[0031] 实施例 5 抗体的特异性及灵敏度

依据如上效果,使用抗血清(Ab-H I)建立 ELISA 标准曲线;使用磷酸盐吐温缓冲溶液 PBST (0.01 mol/L, Tween-20 0.0125%, pH 5.4) 作为所有样品的稀释液;使用 H II—OVA 作为包被原;将 50 μL 系列浓度的药物标准品和 50 μL 适当稀释倍数的 AMOZ 特异性多克隆抗体加入到 96 孔酶标板中,竞争反应后通过酶标分析仪测定吸光度(OD)。以 OD 值为纵坐标,相应标准品浓度对数值为横坐标,应用 originPro 7.5 软件四参数对数函数进行曲线拟合:

$$y = (A-D) / [1 + (x/C)^B] + D \quad (1)$$

其中,A 和 D 分别代表药物浓度最小和最大时的吸光值;C 为 midpoint 标准品浓度,当标准品浓度等于 C 时的 OD 值为 (A+D)/2,正处于曲线的拐点处,半数抑制量浓度为 IC<sub>50</sub>;B 表示曲线的陡峭程度,称斜率因子;以 IC<sub>10</sub> 为检测限,以 IC<sub>20</sub>~IC<sub>80</sub> 为检测范围。以标准品 AMOZ 建立 ELISA 的标准曲线,结果如图 3,相关标准曲线参数见表 1。结合附图及附表可知,以 AMOZ 标准品建立的标准曲线具备典型的 S 型曲线,检测灵敏度较好,因此该方法可以用于直接检测食品中 AMOZ 的含量。

[0032] 表 1 抗血清(Ab-H I)对 AMOZ 的检测参数

免疫原	IC <sub>50</sub> (ng/mL)	线性范围 (ng/mL)	最低检测限 (ng/mL)	相关系数 R <sup>2</sup>
H I—BSA	15.26	2.47~94.21	0.852	0.997

表 2 抗血清(Ab-H I)对 AMOZ 及其结构类似物的交叉反应率

竞争物	交叉反应率(%)
AMOZ	100
AOZ	<0.1
AHD	<0.1
SEM	<0.1
盐酸呋喃它酮(原药)	188.2
呋喃唑酮	<0.1
呋喃妥因	<0.1
呋喃西林	<0.1

### 实施例 6

S1. 免疫原与包被原的制备:所述免疫原采用半抗原 H II,载体蛋白采用牛血清蛋白(BSA);所述包被原采用半抗原 H I,载体蛋白采用卵清蛋白(OVA)。免疫原与包被原的制备方法参照实施例 3 的步骤。

[0033] S2. 抗体制备:以 H II—BSA 作为免疫原免疫新西兰大白兔,制备 AMOZ 特异性多克隆抗体,抗体制备参照实施例 4 的步骤;

S3. 以 H I—OVA 作为包被原包被酶标板,将 50 μL 系列浓度的药物标准品和 50 μL 适当稀释倍数的 AMOZ 特异性多克隆抗体加入到 96 孔酶标板中,采用竞争 ELISA 测定待测样品中 AMOZ 的含量。具体步骤参照实施例 5。

本实施例发现:以 H II—BSA 作为免疫原,H I—OVA 作为包被原的组合不能用于直接检测 AMOZ,检测效果不灵敏。

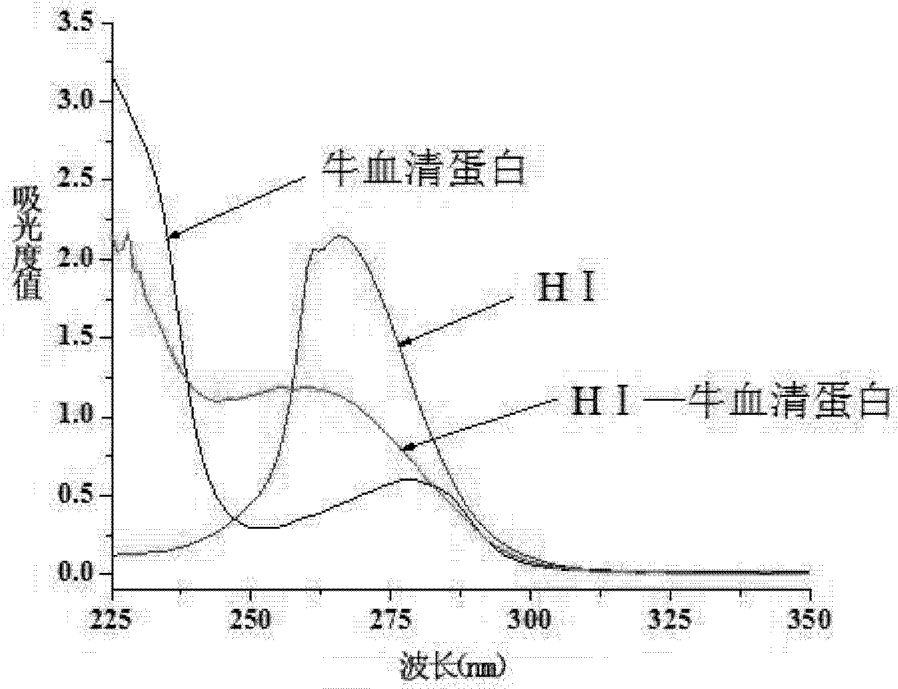


图 1

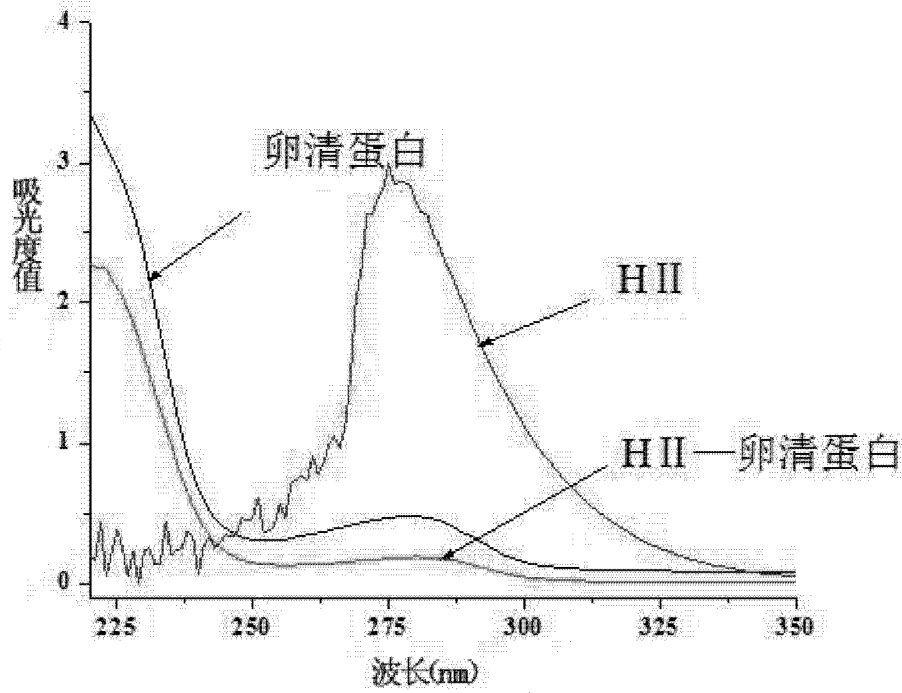


图 2

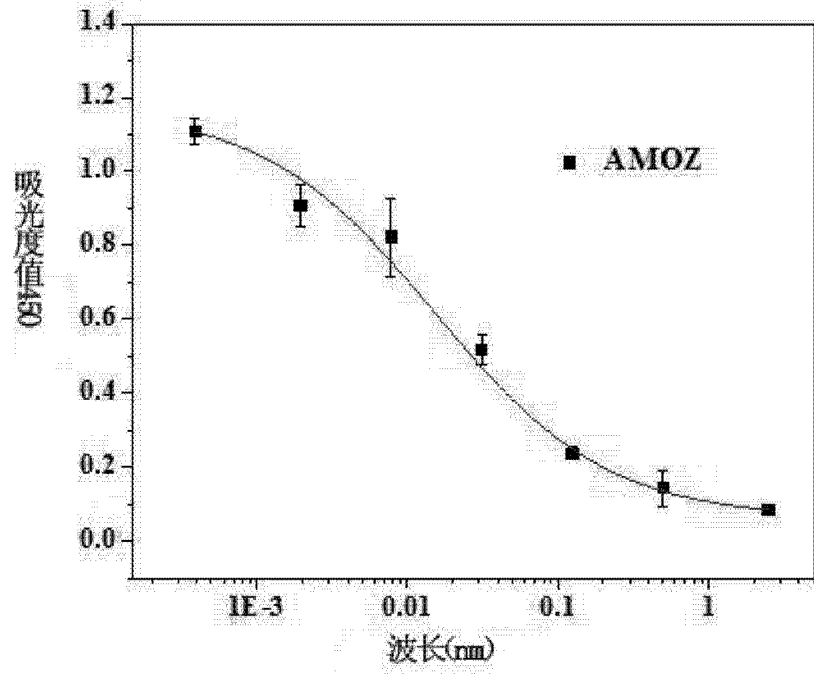


图 3

专利名称(译)	一种用于直接检测呋喃它酮代谢物AMOZ的快速免疫检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103954749A</a>	公开(公告)日	2014-07-30
申请号	CN201410154389.5	申请日	2014-04-17
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	孙远明 刘凤银 徐振林 沈玉栋 雷红涛 王弘 杨金易 肖治理		
发明人	孙远明 刘凤银 徐振林 沈玉栋 雷红涛 王弘 杨金易 肖治理		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/795 C07K14/77 C07K14/765 C07K16/44		
CPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/566		
代理人(译)	林丽明		
其他公开文献	CN103954749B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种用于直接检测呋喃它酮代谢物AMOZ的快速免疫检测方法，包括AMOZ半抗原、人工抗原、抗体等的制备及其应用。所述AMOZ半抗原具有式(I)或式(II)所示分子结构，所述AMOZ人工抗原具有式(III)或式(IV)所示分子结构。采用本发明抗原得到的抗体可以特异性识别AMOZ，抗体的效价为1:64000，最低检测限为0.852ng/mL，半抑制浓度为15.26ng/mL，可以直接用于AMOZ的检测，克服传统酶联免疫方法需要对AMOZ进行衍生化的特点，更简便、快速及低成本。本发明的抗原及抗体在食品中AMOZ的残留检测上具有广泛的应用前景。

