



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105801512 A

(43)申请公布日 2016.07.27

(21)申请号 201610207332.6

(22)申请日 2016.04.01

(66)本国优先权数据

201610012538.3 2016.01.07 CN

(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 肖治理 王锋 王弘 沈玉栋

杨金易 孙远明 王宇 戴尽波

刘凤银

(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 任重

(51)Int.Cl.

C07D 263/26(2006.01)

C07C 323/31(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/78(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

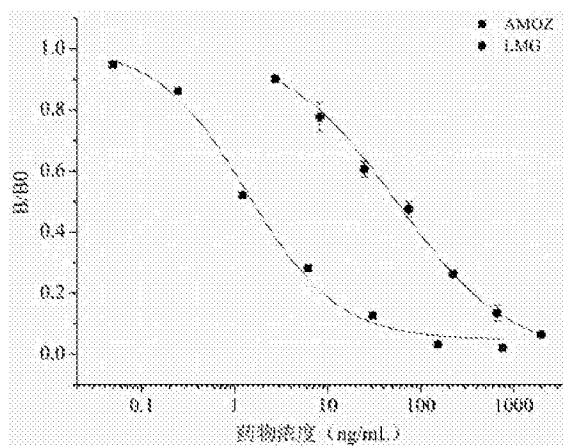
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

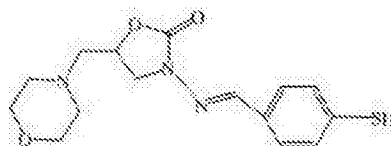
同时检测呋喃它酮代谢物、孔雀石绿及隐孔雀石绿的免疫检测方法

(57)摘要

本发明提供了一种同时检测呋喃它酮代谢物(AMOZ)、孔雀石绿(MG)及隐孔雀石绿(LMG)的免疫检测方法。本发明科学合成AMOZ半抗原和LMG半抗原,将其分别与载体蛋白偶联制备人工抗原。利用AMOZ人工抗原和LMG人工抗原,分别制备针对两种对象的杂交瘤细胞株,采用杂交-杂交瘤技术制备分泌同时抗AMOZ和LMG的双特异性抗体,并成功建立多残留免疫检测方法,实现对AMOZ、MG及LMG的同时检测,对AMOZ的检测限为0.1 ng/mL,半抑制浓度为1.3 ng/mL,对LMG的检测限为4.8 ng/mL,半抑制浓度为45.3 ng/mL。本发明方法特异性强,灵敏度较高,操作方法简便,在食品中AMOZ、MG及LMG的多残留检测方面具有广泛的应用前景。



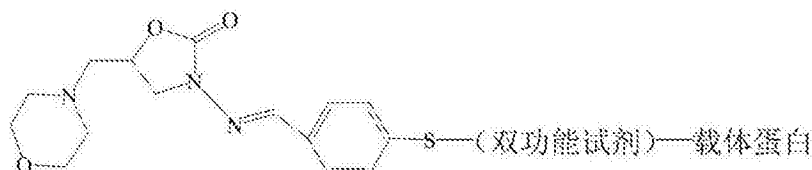
1. 一种AMOZ半抗原,其特征在于,其具有如式(I)所示的结构:



(I)。

2. 权利要求1所述AMOZ半抗原的制备方法,其特征在于,是将4-巯基苯甲醛和AMOZ分别溶于无水甲醇中,搅拌过程中将AMOZ的甲醇溶液缓慢滴加入4-巯基苯甲醛的甲醇溶液中,室温搅拌过夜,反应结束后过滤,分别用蒸馏水和无水甲醇洗涤,干燥即得。

3. 一种AMOZ人工抗原,其特征在于,其具有如式(II)所示的结构:



(II)。

4. 权利要求3所述AMOZ人工抗原的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S11. 将载体蛋白溶于PBS溶液中,记为A液;

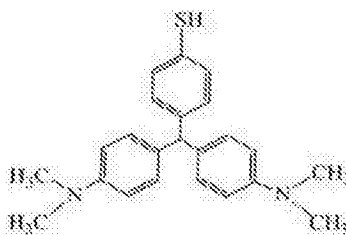
S12. 将双功能试剂溶于N,N-二甲基甲酰胺中,记为B液;

S13. 在一定温度下磁力搅拌,将B液逐滴加入A液中,反应一段时间后,用透析液透析,得溶液C;

S14. 将权利要求1所述半抗原溶于N,N-二甲基甲酰胺中,将此溶液逐滴加入C液中,反应一段时间后,用透析液透析,得到人工抗原;

所述载体蛋白为钥孔血蓝蛋白、牛血清白蛋白质或卵清蛋白;所述透析液为生理盐水或pH 7.4的0.01mol/L的PBS溶液。

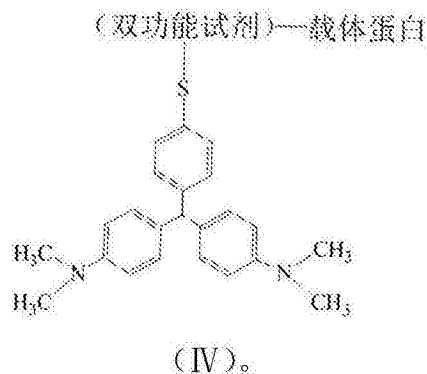
5. 一种LMG半抗原,其特征在于,其具有如式(III)所示的结构:



(III)。

6. 权利要求5所述LMG半抗原的制备方法,其特征在于,是将4-巯基苯甲醛溶于无水甲醇中,向其中加入N,N-二甲基苯胺和催化剂BOP,在氮气保护情况下加热回流,反应过夜,反应结束后,过滤干燥即得。

7. 一种LMG人工抗原,其特征在于,其具有如式(IV)所示的结构:



8. 权利要求7所述LMG人工抗原的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S21. 将载体蛋白溶于PBS溶液中,记为A液;

S22. 将双功能试剂溶于N,N-二甲基甲酰胺中,记为B液;

S23. 在一定温度下磁力搅拌,将B液逐滴加入A液中,反应一段时间后,用透析液透析,得溶液C;

S24. 将权利要求5所述LMG半抗原溶于N,N-二甲基甲酰胺中,将此溶液逐滴加入C液中,反应一段时间后,用透析液透析,得到人工抗原;

所述载体蛋白为钥孔血蓝蛋白、牛血清白蛋白质或卵清蛋白;所述透析液为生理盐水或pH 7.4的0.01mol/L的PBS溶液。

9. 一种同时检测AMOZ、MG及LMG的免疫检测方法,包括以下步骤:

S41. 分别将AMOZ包被抗原、LMG包被抗原包被在同一酶标板的不同微孔内,孵育、洗板、封闭;

S42. 分别将AMOZ的标准液、LMG标准液或待测样品液加入酶标板相应微孔内;所述样品液经还原剂处理;

S43. 将抗AMOZ和LMG的双特异性抗体溶液加入酶标板所有微孔内,孵育、洗板;

S44. 将酶标二抗溶液加入酶标板所有微孔内,孵育、洗板;

S45. 将显色液加入酶标板所有微孔内,孵育;

S46. 将终止液加入酶标板所有微孔内,并将酶标板用酶标仪读数;

S47. 分别绘制AMOZ和LMG的标准曲线,定量检测AMOZ和LMG;

其中,步骤S42所述还原剂为硼氢化钠、硼氢化钾或硫代硫酸钠溶液;步骤S45所述显色液为步骤S44所述酶标二抗中酶所对应的底物溶液;S46所述终止液为浓硫酸或氢氧化钠溶液;

步骤S43所述抗AMOZ和LMG的双特异性抗体的制备方法包括以下步骤:

S31. 设计合成权利要求1所述AMOZ半抗原和权利要求5所述LMG半抗原,并分别将其与载体蛋白偶联,制备权利要求3所述AMOZ人工抗原和权利要求7所述LMG人工抗原;

S32. 分别利用权利要求3所述AMOZ人工抗原和权利要求7所述LMG人工抗原制备能分泌抗AMOZ单克隆抗体的杂交瘤细胞株和抗LMG单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

S33. 采用杂交-杂交瘤技术筛选制备得到抗AMOZ和LMG的双特异性抗体。

同时检测呋喃它酮代谢物、孔雀石绿及隐孔雀石绿的免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全检测技术领域,更具体地,涉及一种同时检测呋喃它酮代谢物AMOZ、孔雀石绿及隐孔雀石绿的免疫检测方法。

背景技术

[0002] 呋喃它酮和孔雀石绿是水产品中经常检出的禁用药物。呋喃它酮代谢物AMOZ(CAS号:43056-63-9)是呋喃它酮在动物体内的代谢产物,能以蛋白结合物的形式长期稳定存在于动物组织内,可以通过检测代谢产物的手段来分析呋喃它酮残留。隐孔雀石绿(LMG,CAS号:129-73-7)是孔雀石绿(MG,CAS号:2437-29-8)在水生动物体内的主要代谢产物,能在动物组织中蓄积,长期稳定存在。

[0003] AMOZ、MG及LMG所造成的危害主要表现在它们所存在的毒性作用,以及可能对生物体引起的过敏反应和变态反应,潜在的致畸、致癌、致突变作用等。目前,国内外有很多与AMOZ、MG及LMG免疫检测相关的研究报道,但这些研究主要集中于单一对象检测。由于环境及食品中组分复杂,单一对象的免疫分析方法已难以满足实际检测的需要。AMOZ和MG、LMG都是水产品经常检测的指标。目前国内外暂无AMOZ、MG及LMG的多残留免疫检测方法,因此,同时针对三者提供一种简便、快速的免疫检测方法是非常有必要并亟需的。

发明内容

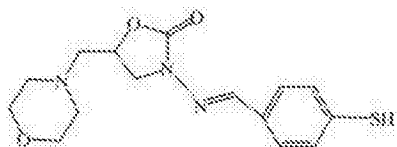
[0004] 本发明要解决的技术问题是克服现有AMOZ、MG及LMG单残留免疫检测技术的不足,提供一种可应用于同时检测AMOZ、MG及LMG的AMOZ半抗原及人工抗原、LMG半抗原及人工抗原和能同时识别AMOZ和LMG的双特异性抗体。

[0005] 本发明要解决的另一技术问题是提供一种同时检测AMOZ、MG及LMG的免疫检测方法。

[0006] 本发明的目的通过以下技术方案予以实现:

[0007] 提供一种AMOZ半抗原,具有如式(I)所示的结构,记为AMOZMB:

[0008]

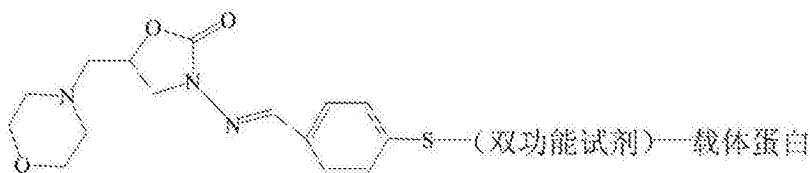


(I)。

[0009] 本发明提供了所述AMOZ半抗原AMOZMB的制备方法,包括以下步骤:将4-巯基苯甲醛和AMOZ分别溶于无水甲醇中,搅拌过程中将AMOZ的甲醇溶液缓慢滴加到入4-巯基苯甲醛的甲醇溶液中,室温搅拌过夜。反应结束后过滤,分别用蒸馏水和无水甲醇洗涤,干燥,得产物AMOZMB。

[0010] 本发明提供了一种AMOZ人工抗原,具有如式(II)所示的结构:

[0011]



(II)。

[0012] 本发明提供了上述AM0Z人工抗原的制备方法:AM0ZMB作为半抗原与载体蛋白通过双功能试剂交联法制备得到。所述载体蛋白为钥孔血蓝蛋白、牛血清白蛋白质或卵清蛋白;所述透析液为生理盐水或0.01mol/L PBS溶液(pH7.4)。

[0013] 具体地,所述双功能试剂交联法包括如下步骤:

[0014] S11.将载体蛋白溶于PBS溶液中,记为A液;

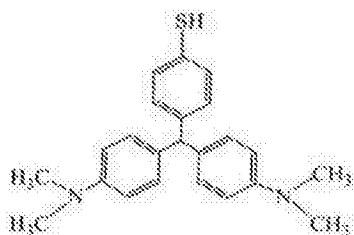
[0015] S12.将双功能试剂溶于N,N-二甲基甲酰胺中,记为B液;

[0016] S13.在一定温度下磁力搅拌,将B液逐滴加入A液中,反应一段时间后,用透析液透析,得溶液C;

[0017] S14.将AM0ZMB半抗原溶于N,N-二甲基甲酰胺中,将此溶液逐滴加入C液中,反应一段时间后,用透析液透析,得到人工抗原。

[0018] 本发明同时提供一种LMG半抗原,具有如式(III)所示的结构,记为LMGMB:

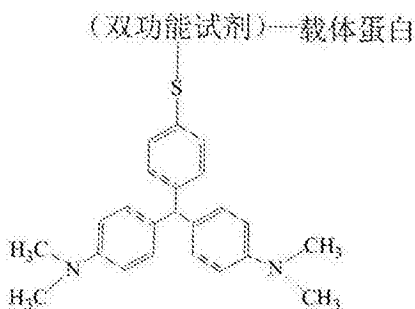
[0019]



(III)。

[0020] 本发明提供了所述LMG半抗原LMGMB的制备方法,包括以下步骤:将4-巯基苯甲醛溶于无水甲醇中,向其中加入N,N-二甲基苯胺和催化剂BOP(化学名:六氟磷酸苯并三唑-1-氧基三(二甲氨基)磷),在氮气保护情况下加热回流,反应过夜。反应结束后,过滤干燥得产物LMGMB。本发明提供了一种LMG人工抗原,具有如式(IV)所示的结构:

[0021]



(IV)。

[0022] 本发明提供了LMG人工抗原的制备方法:LMGMB作为半抗原分别与载体蛋白通过双功能试剂交联法制备得到。所述载体蛋白为钥孔血蓝蛋白、牛血清白蛋白质或卵清蛋白;所述透析液为生理盐水或0.01mol/L PBS溶液(pH7.4)。

[0023] 具体地,所述双功能试剂交联法包括如下步骤:

- [0024] S21.将载体蛋白溶于PBS溶液中,记为A液;
- [0025] S22.将双功能试剂溶于N,N-二甲基甲酰胺中,记为B液;
- [0026] S23.在一定温度下磁力搅拌,将B液逐滴加入A液中,反应一段时间后,用透析液透析,得溶液C;
- [0027] S24.将LMGMB半抗原溶于N,N-二甲基甲酰胺中,将此溶液逐滴加入C液中,反应一段时间后,用透析液透析,得到人工抗原。
- [0028] 本发明还提供了能同时识别AMOZ和LMG的双特异性抗体。
- [0029] 所述同时识别呋喃它酮代谢物(AMOZ)和隐孔雀石绿(LMG)的双特异性抗体通过以下步骤制备得到:
- [0030] S31.设计合成AMOZ半抗原和LMG半抗原,并分别将其与载体蛋白偶联,制备AMOZ人工抗原和LMG人工抗原;
- [0031] S32.分别利用AMOZ人工抗原和LMG人工抗原免疫动物,制备能分泌抗AMOZ单克隆抗体的杂交瘤细胞株和抗LMG单克隆抗体的杂交瘤细胞株;
- [0032] S33.采用杂交-杂交瘤技术筛选制备抗AMOZ和LMG的双特异性抗体。
- [0033] 其中,S33所述的筛选制备方法,采用杂交-杂交瘤技术,其特征在于首先对S32所述两种杂交瘤细胞株进行酶缺陷型诱导和筛选,用8-氮鸟嘌呤诱导次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)缺陷型细胞株,用5-溴尿苷或6-氯嘌呤诱导胸苷激酶(TK)缺陷型细胞株。然后将经诱导的酶缺陷型细胞株、经S14或S24所述人工抗原免疫的动物脾细胞按以下组合方式之一进行融合:抗AMOZ的HGPRT酶缺陷型细胞株+经S24人工抗原免疫的动物脾细胞、抗AMOZ的TK酶缺陷型细胞株+经S24人工抗原免疫的动物脾细胞、抗LMG的HGPRT酶缺陷型细胞株+经S14人工抗原免疫的动物脾细胞、抗LMG的TK酶缺陷型细胞株+经S14人工抗原免疫的动物脾细胞、抗AMOZ的HGPRT酶缺陷型细胞株+抗LMG的TK酶缺陷型细胞株、抗AMOZ的TK酶缺陷型细胞株+抗LMG的HGPRT酶缺陷型细胞株,筛选制备抗AMOZ和LMG的双特异性杂交瘤细胞株,然后将双特异性杂交瘤经体内诱导或体外培养制备双特异性抗体。
- [0034] 基于上述AMOZ半抗原及人工抗原、LMG半抗原及人工抗原,本发明同时还提供了一种同时检测AMOZ、MG及LMG的免疫检测方法,包括以下步骤:
- [0035] S41.分别将AMOZ包被抗原、LMG包被抗原包被在同一酶标板的不同微孔内,孵育、洗板、封闭;
- [0036] S42.分别将AMOZ的标准液、LMG标准液或待测样品液加入酶标板相应微孔内;所述样品液需经还原剂处理,将MG还原为LMG;
- [0037] S43.将抗AMOZ和LMG的双特异性抗体溶液加入酶标板所有微孔内,孵育、洗板;
- [0038] S44.将酶标二抗溶液加入酶标板所有微孔内,孵育、洗板;
- [0039] S45.将显色液加入酶标板所有微孔内,孵育;
- [0040] S46.将终止液加入酶标板所有微孔内,并将酶标板用酶标仪读数;
- [0041] S47.分别绘制AMOZ和LMG的标准曲线,定量检测AMOZ和LMG。
- [0042] 所述还原剂是一定浓度的硼氢化钠、硼氢化钾或硫代硫酸钠溶液,其浓度为0.1~1mol/L。优选0.2mol/L。
- [0043] 抑制率按下式计算:

$$[0044] \quad \text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{B}{B_0}\right) \times 100\%$$

[0045] 其中各标准液浓度孔的吸光值为B,零标准孔的吸光值为B₀。

[0046] 以各标准品浓度孔吸光值与零标准孔吸光值比值为纵坐标,以药物标准液浓度的Log₁₀值为横坐标,分别绘制标准曲线图。根据建立的标准曲线计算出检测限LOD(10%抑制率的药物浓度,IC₁₀)和半数抑制量(50%抑制率的药物浓度,IC₅₀)。

[0047] 步骤S45所述显色液为步骤S44所述酶标二抗中酶所对应的的底物溶液;

[0048] 步骤S46所述终止液是一定浓度的浓硫酸或氢氧化钠溶液。所述浓硫酸或氢氧化钠溶液为1~4mol/L。优选2mol/L。

[0049] 本发明的有益效果:

[0050] 本发明的最大创新点是提供了新的AMOZ半抗原及人工抗原、LMG半抗原及人工抗原,以及能同时识别AMOZ和LMG的双特异性抗体。利用AMOZ半抗原及人工抗原、LMG半抗原及人工抗原,以及能同时识别AMOZ和LMG的双特异性抗体,建立了一种同时检测AMOZ、MG及LMG的免疫检测方法,而现有的传统的免疫检测方法只是利用多克隆抗体、单克隆抗体或基因工程抗体实现对AMOZ、MG或LMG单一对象的检测。

[0051] 本发明的有益效果具体体现在:

[0052] (1)合成AMOZ半抗原和LMG半抗原,通过将半抗原偶联到载体蛋白上,成功制备得到两种对象的人工抗原;(2)分别利用AMOZ人工抗原和LMG人工抗原免疫动物,制备能分泌抗两种对象抗体的杂交瘤细胞;(3)利用药物诱导和杂交-杂交瘤技术,制备得到能分泌抗AMOZ和LMG的双特异性抗体;(4)基于一种双特异性抗体,实现对AMOZ、MG及LMG的同时检测;(5)本发明建立的多残留检测方法具有简便快速、特异性强、灵敏度较高的特点,该方法对AMOZ检测限为0.1ng/mL,半数抑制浓度为1.3ng/mL,对LMG的检测限为4.8ng/mL,半抑制浓度为45.3ng/mL。

附图说明

[0053] 图1为基于双特异性抗体的AMOZ、LMG标准曲线。

[0054] 图2为半抗原AMOZMB及其人工抗原、载体蛋白紫外扫描图。

[0055] 图3为半抗原LMGMB及其人工抗原、载体蛋白紫外扫描图。

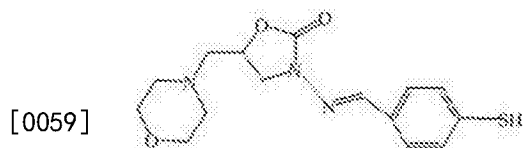
具体实施方式

[0056] 以下结合附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定,本领域技术人员基于本发明所描述的思路和原理所做试剂的简单替换和用量的改变应属于本发明范围。除非特别说明,本发明实施例所采用的试剂、方法和设备均为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0057] 实施例1呋喃它酮代谢物半抗原和隐孔雀石绿半抗原的合成

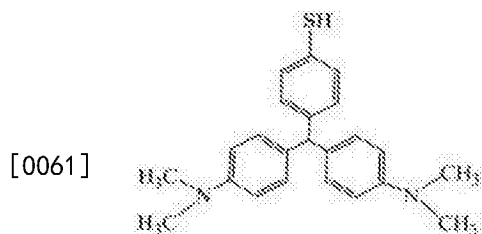
[0058] 呋喃它酮代谢物半抗原AMOZMB采用如下所述方法合成:将140mg 4-巯基苯甲醛和225mg AMOZ分别溶于20mL无水甲醇和5mL无水甲醇中,搅拌过程中将AMOZ的甲醇溶液缓慢滴加到入4-巯基苯甲醛甲醇溶液中,室温搅拌过夜。反应结束后过滤,分别用蒸馏水和无水甲醇洗涤2次,干燥,得产物AMOZMB,结构式如下。ESI-MS(negative)m/z:320(M-H)⁻,¹H-NMR

(500MHz, d-Chloroform) δ 7.90(s, 1H), 7.50-7.40(m, 2H), 7.37-7.27(m, 2H), 5.41(p, J=13.9Hz, 1H), 4.80(dd, J=24.8, 13.6Hz, 1H), 4.56(dd, J=24.7, 13.7Hz, 1H), 3.56(t, J=9.4Hz, 4H), 3.21(s, 1H), 2.93(dd, J=24.8, 14.0Hz, 1H), 2.81-2.63(m, 5H)。



(I);

[0060] 隐孔雀石绿半抗原LMGMB采用如下所述方法合成:将150mg 4-巯基苯甲醛溶于40mL无水甲醇溶液,向其中加入270mg N,N-二甲基苯胺和催化剂120mg BOP(化学名:六氟磷酸苯并三唑-1-氧基三(二甲氨基)磷),在氮气保护情况下加热回流,80℃反应过夜。反应结束后,过滤干燥得产物LMGMB,结构式如下。ESI-MS(positive)m/z:363(M+H)⁺, ¹H-NMR(500MHz, d-Chloroform) δ 7.40-7.30(m, 2H), 7.13-7.01(m, 6H), 6.72-6.62(m, 4H), 5.41(s, 1H), 3.17(s, 1H), 3.02(s, 12H)。



(III)。

[0062] 实施例2呋喃它酮代谢物人工抗原和隐孔雀石绿人工抗原的制备

[0063] AMOZ人工抗原和LMG人工抗原均采用双功能试剂交联法制备,所述双功能试剂交联法包括如下步骤:

[0064] (1)将1/80mmol的BSA或1/60mmol的OVA溶于2mL的0.01mol/L PBS溶液中,记为A液;

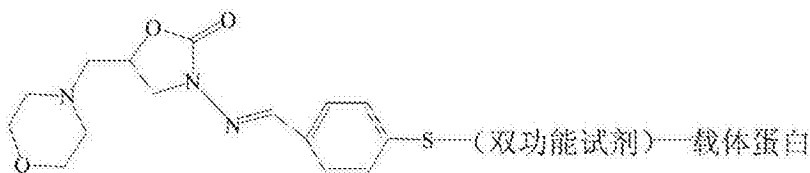
[0065] (2)将1/40mmol双功能试剂SMCC(琥珀酰亚胺基4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧化物)溶于0.2mL N,N-二甲基甲酰胺中,记为B液;

[0066] (3)在磁力搅拌下,将B液逐滴加入A液中,4℃反应过夜,用0.01mol/L PBS溶液(pH 7.4)透析2天,每天更换两次透析液,得溶液C。

[0067] (4)将1mmol半抗原AMOZMB(或半抗原LMGMB)溶于0.2mL N,N-二甲基甲酰胺中,将此溶液逐滴加入C液中。4℃反应过夜,用0.01mol/L PBS溶液(pH 7.4)透析3天,每天更换2次透析液,得到人工抗原AMOZMB-BSA和AMOZMB-OVA(LMGMB-BSA和LMGMB-OVA)。将所得各人工抗原分装成小管,-20℃保存。

[0068] AMOZ人工抗原结构式如(II)所示:

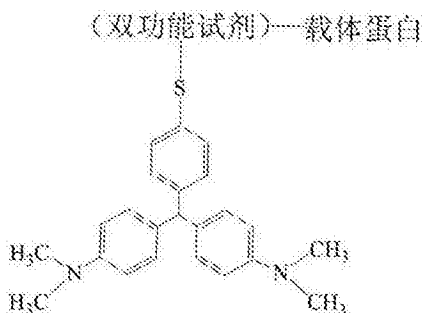
[0069]



(II);

[0070] LMG人工抗原结构式如(IV)所示:

[0071]



(IV)。

[0072] 实施例3呋喃它酮代谢物单克隆抗体、隐孔雀石绿单克隆抗体的制备

[0073] 分别用实施例2制备得到的人工抗原AMOZMB-BSA和LMGMB-BSA免疫雌性BaIb/c小鼠。首次免疫时,取0.5μg的AMOZMB-BSA人工抗原或LMGMB-BSA人工抗原与等体积弗氏完全佐剂乳化,采用皮下多点免疫。

[0074] 首次免疫后,进行多次的加强免疫,步骤如下:取0.5μg的上述人工抗原与等量的弗氏不完全佐剂乳化,间隔周期为2周。每次加强免疫1周后,尾部取血测定抗血清效价。待效价稳定不变时,选取免疫效果最好的小鼠加强一次免疫,3天后取脾细胞进行细胞融合,制备单克隆抗体。

[0075] 分别采用以下方法制备能分泌抗AMOZ单克隆抗体的杂交瘤细胞株和分泌抗LMG单克隆抗体的杂交瘤细胞株:将购买于中国科学院上海细胞库的SP2/0骨髓瘤细胞与脾细胞以1:5~1:10的比例混合,在聚乙二醇(PEG 2000)的作用下融合,将融合的细胞悬浮后铺于含饲养层细胞的HAT培养基(终浓度为80% RPMI 1640基础培养基(Hyclone)、20%胎牛血清(Hyclone)、1% HAT(Sigma))的96孔板中,置于37℃、5% CO₂的培养箱中培养。融合后,待细胞集落长满孔底的1/4时,取上清液采用间接竞争ELISA法筛选分泌抗AMOZ或LMG抗体的细胞孔,选取阳性值最高,而且竞争抑制较为明显的单克隆细胞孔的细胞,用有限稀释的方法进行克隆化、扩大培养,得到稳定分泌抗AMOZ或LMG抗体的杂交瘤细胞株。

[0076] 实施例4呋喃它酮代谢物和隐孔雀石绿双特异性抗体的制备

[0077] 使用8-氮鸟嘌呤(8-AG)对实施例2中制备的分泌抗AMOZ抗体的杂交瘤细胞株进行酶缺陷型诱导,将该细胞株置于含不同浓度(25、50、100μg/mL)的8-AG的完全培养基(终浓度为80% RPMI 1640基础培养基(Hyclone)、20%胎牛血清(Hyclone)),每个浓度培养2周,得到胸苷激酶(TK)缺陷型的细胞株。

[0078] 使用5-溴尿苷(5-BrdU)对实施例2中制备的分泌抗LMG抗体的杂交瘤细胞株进行酶缺陷型诱导,将该细胞株置于含不同浓度(5、10、20、40μg/mL)的8-AG的完全培养基(终浓度为80% RPMI 1640基础培养基(Hyclone)、20%胎牛血清(Hyclone)),每个浓度培养2周,得到次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)缺陷型的细胞株。

[0079] 将TK缺陷型的AM0Z细胞株与HGPRT缺陷型的LMG细胞株以1:1的比例混合,在聚乙二醇(PEG 2000)的作用下融合,将融合的细胞悬浮后铺于含饲养层细胞的HAT培养基(终浓度为80% RPMI 1640基础培养基(Hyclone)、20%胎牛血清(Hyclone)、1% HAT(Sigma))的96孔板中,置于37℃、5% CO₂的培养箱中培养。融合后,待细胞集落长满孔底的1/4时,取上清液采分别使用人工抗原LMGMB-OVA和AM0ZMB-OVA用间接竞争ELISA法筛选分泌抗AM0Z或LMG抗体的细胞孔,选取阳性值最高,而且竞争抑制较为明显的单克隆细胞孔的细胞,用有限稀释的方法进行克隆化、扩大培养,得到稳定分泌抗AM0Z和LMG的双特异性抗体的杂交-杂交瘤细胞株。

[0080] 将0.5mL液状石蜡注射到BaIb/C小鼠腹腔,1~2周后向腹腔注射1~2×10⁶个四体杂交瘤细胞,每只小鼠0.5mL,接种大约10天左右可见小鼠腹部肿胀,在小鼠死亡之前处死小鼠,采集腹水,12000r/min离心15min,去除上层脂肪和下层纤维蛋白及细胞,将中层微黄色液体分装,保存于-20℃备用。双特异性抗体采用常规辛酸-硫酸铵法纯化。

[0081] 实施例5 ELISA法同时检测咪喃它酮代谢物、孔雀石绿及隐孔雀石绿

[0082] (1)分别将500ng/mL AM0ZMB-OVA、250ng/mL LMGMB-OVA包被在同一ELISA酶标板的不同微孔内,经37℃包被过夜后,每孔加入120μL 5%脱脂奶粉溶液于37℃封闭3h。甩干孔内液体后,37℃烘1h,备用;

[0083] (2)向样品处理液加入1mL 0.2mol/L的硼氢化钾溶液,混匀后阴暗处静置10min,得到经还原的样品液;

[0084] (3)将50μL一系列浓度(0、0.049、0.245、1.225、6.125、30.625、153.127、765.634ng/mL)AM0Z标准液或经还原的样品液加入AM0ZMB-OVA包被的微孔内;将50μL一系列一定浓度(0、2.74、8.23、24.69、74.07、222.22、666.67、2000ng/mL)LMG标准液或经还原的样品液加入LMGMB-OVA包被的微孔内;

[0085] (4)各孔加入50μL 1:10000稀释的抗AM0Z和LMG的双特异性抗体,37℃孵育30min,倒出孔内液体,用洗涤液洗涤5次,在吸水纸上拍干;

[0086] (5)各孔加入100μL 1:5000稀释的酶标二抗溶液,37℃温育30min,用洗涤液洗涤5次,拍干;

[0087] (6)各孔加入100μL TMB底物显色溶液,37℃温育10min,加入50μL的2mol/L硫酸溶液终止,用酶标仪在波长450nm处测定吸光值,以各标准品浓度孔吸光值与零标准孔吸光值比值为纵坐标,以药物标准液浓度的log₁₀值为横坐标,绘制标准曲线图。

[0088] 抑制率按下式计算:

$$[0089] \quad \text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{B}{B_0}\right) \times 100\%$$

[0090] 其中各标准液浓度孔的吸光值为B,零标准孔的吸光值为B₀。

[0091] 根据建立的标准曲线计算出检测限LOD(10%抑制率的药物浓度,IC₁₀)和半数抑制量(50%抑制率的药物浓度,IC₅₀)。

[0092] (7)将AM0Z的几种类似物进行梯度稀释,然后与双特异性抗体进行反应,制作标准曲线。通过曲线分别计算出各类似物的IC₅₀,计算建立的多残留检测方法对AM0Z类似物的交叉反应率:

$$[0093] \quad \text{交叉反应率} = \frac{\text{IC}_{50}(\text{AMOZ})}{\text{IC}_{50}(\text{类似物})} \times 100\%$$

[0094] 将LMG的几种类似物进行梯度稀释,然后与上述双特异性抗体进行反应,制作标准曲线。通过曲线分别计算出各类似物的 IC_{50} ,计算建立的多残留检测方法对LMG类似物的交叉反应率:

$$[0095] \quad \text{交叉反应率} = \frac{\text{IC}_{50}(\text{LMG})}{\text{IC}_{50}(\text{类似物})} \times 100\%$$

[0096] 结果表明,本发明建立的多残留检测方法对AMOZ为1.3ng/mL,检测限为0.1ng/mL,在0.3~6.4ng/mL的范围内,抑制率与AMOZ浓度的对数值成显著的S型曲线关系,相关系数为0.9940。对LMG的半数抑制量(IC_{50})为45.3ng/mL,检测限为4.8ng/mL,在7.0~291.7ng/mL的范围内,抑制率与LMG浓度的对数值成显著的S型曲线关系,相关系数为0.9998。采用本发明方法对MG的检测可通过将MG还原为LMG,然后根据LMG的标准曲线进行检测。所以MG的检测标准曲线参照LMG标准曲线。

[0097] 本发明建立的多残留检测方法对AMOZ和LMG检测的特异性强,见表1、表2所示,可以很好地用来作为食品中AMOZ、MG及LMG的同时多残留免疫分析方法。

[0098] 表1本发明建立的检测方法对AMOZ类似物的交叉反应率

[0099]	竞争药物	IC_{50} (ng/mL)	交叉反应率
	呋喃它酮代谢物 (AMOZ)	1.3	100%
	呋喃它酮	5.2	25%
	呋喃西林	>1000	< 0.1%
	呋喃妥因	>1000	< 0.1%
	呋喃唑酮	>1000	< 0.1%
	呋喃西林代谢物	>1000	< 0.1%
	呋喃妥因代谢物	>1000	< 0.1%
	呋喃唑酮代谢物	>1000	< 0.1%

[0100] 表2本发明建立的检测方法对LMG类似物的交叉反应率

[0101]

药物	IC ₅₀ (ng/mL)	交叉反应率
隐孔雀石绿 (LMG)	45.3	100%
孔雀石绿 (MG)	1372.7	3.3%
灿烂绿	>1000	< 0.1%
隐灿烂绿	>1000	< 0.1%
结晶紫	>1000	< 0.1%
无色结晶紫	943.8	4.8%
副品红	>1000	< 0.1%
亚甲基蓝	>1000	< 0.1%

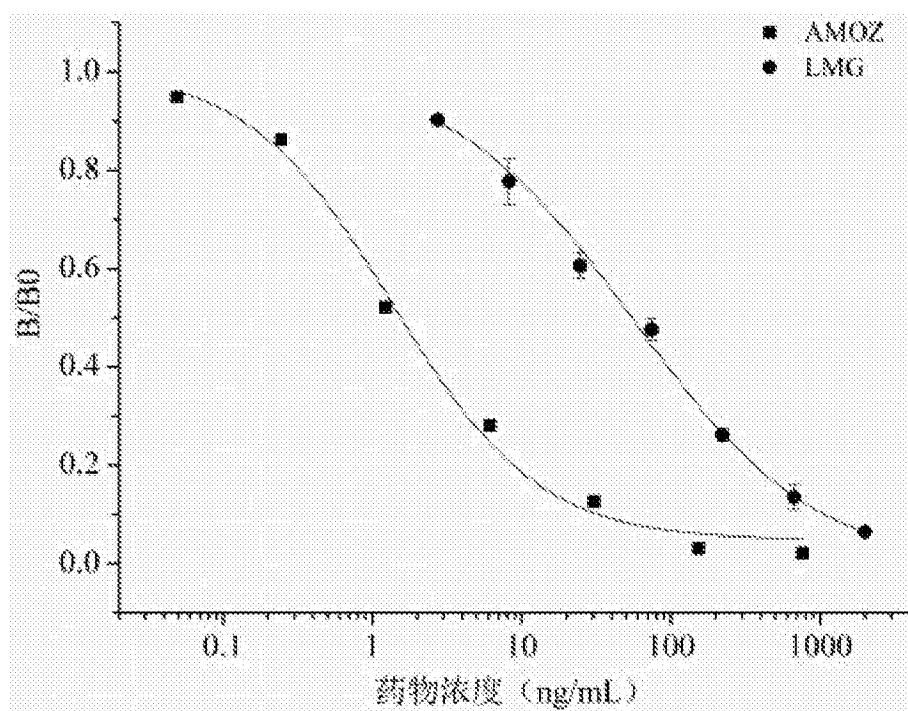


图1

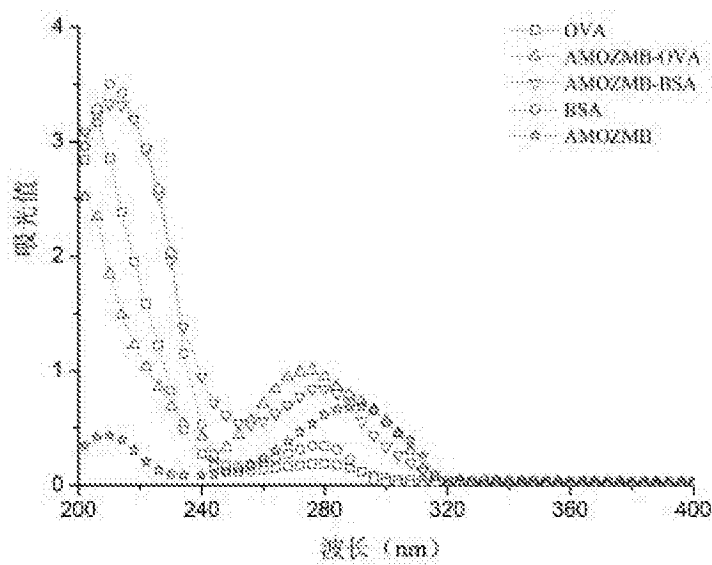


图2

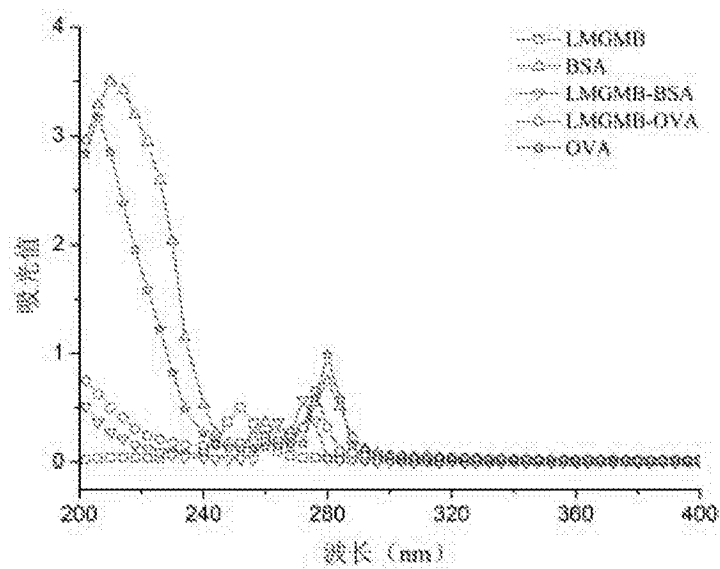


图3

专利名称(译)	同时检测呋喃它酮代谢物、孔雀石绿及隐孔雀石绿的免疫检测方法		
公开(公告)号	CN105801512A	公开(公告)日	2016-07-27
申请号	CN201610207332.6	申请日	2016-04-01
[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	肖治理 王锋 王弘 沈玉栋 杨金易 孙远明 王宇 戴尽波 刘凤银		
发明人	肖治理 王锋 王弘 沈玉栋 杨金易 孙远明 王宇 戴尽波 刘凤银		
IPC分类号	C07D263/26 C07C323/31 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 G01N33/577 G01N33/531 G01N21/78 G01N21/31		
CPC分类号	C07C323/31 C07D263/26 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K19/00 G01N21/31 G01N21/78 G01N33/531 G01N33/577		
代理人(译)	任重		
优先权	201610012538.3 2016-01-07 CN		
其他公开文献	CN105801512B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种同时检测呋喃它酮代谢物 (AMOZ)、孔雀石绿 (MG) 及隐孔雀石绿 (LMG) 的免疫检测方法。本发明科学合成AMOZ半抗原和LMG半抗原,将其分别与载体蛋白偶联制备人工抗原。利用AMOZ人工抗原和LMG人工抗原,分别制备针对两种对象的杂交瘤细胞株,采用杂交-杂交瘤技术制备分泌同时抗AMOZ和LMG的双特异性抗体,并成功建立多残留免疫检测方法,实现对AMOZ、MG及LMG的同时检测,对AMOZ的检测限为0.1 ng/mL,半抑制浓度为1.3 ng/mL,对LMG的检测限为4.8 ng/mL,半抑制浓度为45.3 ng/mL。本发明方法特异性强,灵敏度较高,操作方法简便,在食品中AMOZ、MG及LMG的多残留检测方面具有广泛的应用前景。

