

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810026199.X

[51] Int. Cl.

C07C 229/40 (2006.01)

C07C 211/50 (2006.01)

C07C 217/80 (2006.01)

C07C 233/43 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008年8月20日

[11] 公开号 CN 101245032A

[22] 申请日 2008.1.31

[21] 申请号 200810026199.X

[71] 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山

[72] 发明人 沈玉栋 王宇 孙远明 雷红涛

王弘 肖治理 徐小艳

[74] 专利代理机构 广州粤高专利代理有限公司

代理人 林丽明 任重

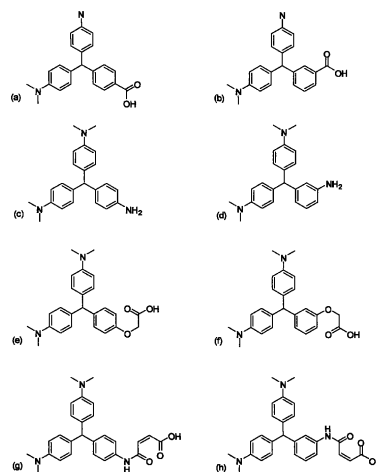
权利要求书 4 页 说明书 16 页 附图 5 页

[54] 发明名称

隐孔雀石绿半抗原及制备得到的抗体和抗体的应用

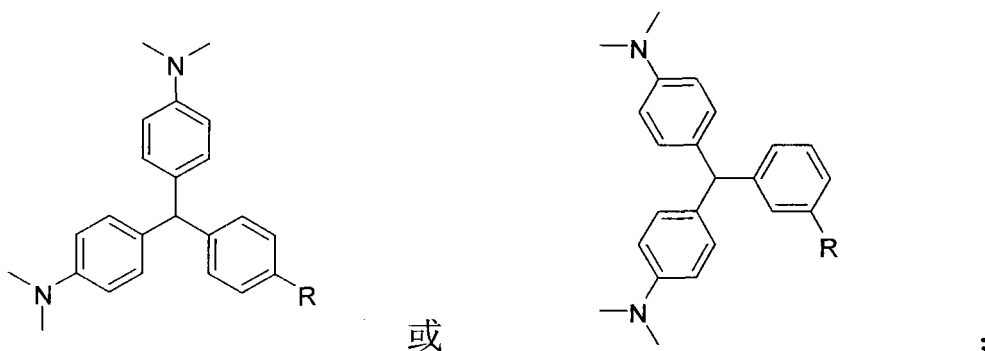
[57] 摘要

本发明公开了一种隐孔雀石绿半抗原，保留隐孔雀石绿的特征结构，在隐孔雀石绿结构的不同化学位点上衍生出具有不同电子结构性质、不同碳链长度以及适合与大分子载体偶联的活性手臂，所述活性手臂为 R 基团、芳香胺、末端羧基直链烷基醚或带有直链末端羧基结构的酰胺键；由隐孔雀石绿半抗原制备得到隐孔雀石绿人工抗体，应用于检测隐孔雀石绿和孔雀石绿的残留量时具有很高的特异性和灵敏度，准确度高，回收率可达 80~110%，同时操作方法简单快速，不需要复杂的前处理过程，一次可同时检测大批样品，成本低廉，对操作人员要求低，便于进行现场监控，并可以与常规方法互为补充，成功建立了灵敏、快速、高效、经济的隐孔雀石绿免疫检测方法。



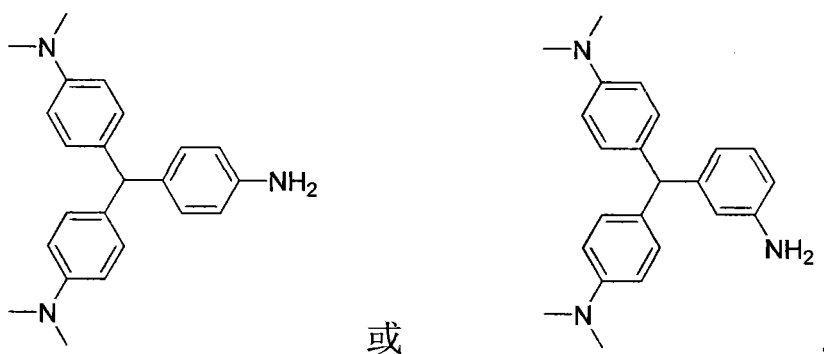
1、一种隐孔雀石绿半抗原，其特征在于保留隐孔雀石绿的特征结构，在隐孔雀石绿结构的不同化学位点上衍生出具有不同电子结构性质、不同碳链长度以及适合与大分子载体偶联的活性手臂，所述活性手臂为 R 基团、芳香胺、末端羧基直链烷基醚或带有直链末端羧基结构的酰胺键。

2、根据权利要求 1 所述隐孔雀石绿半抗原，其特征在于所述隐孔雀石绿半抗原结构式为：

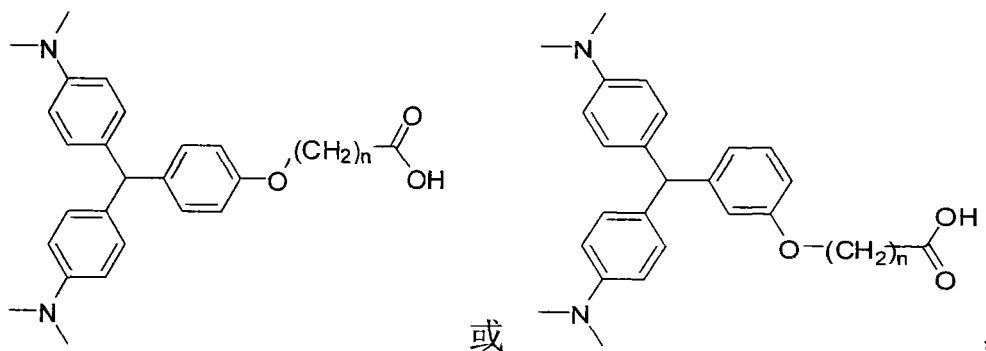


其中 R 为 $(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ ，n 为 0~4 的整数。

3、根据权利要求 1 所述隐孔雀石绿半抗原，其特征在于所述隐孔雀石绿半抗原结构式为：

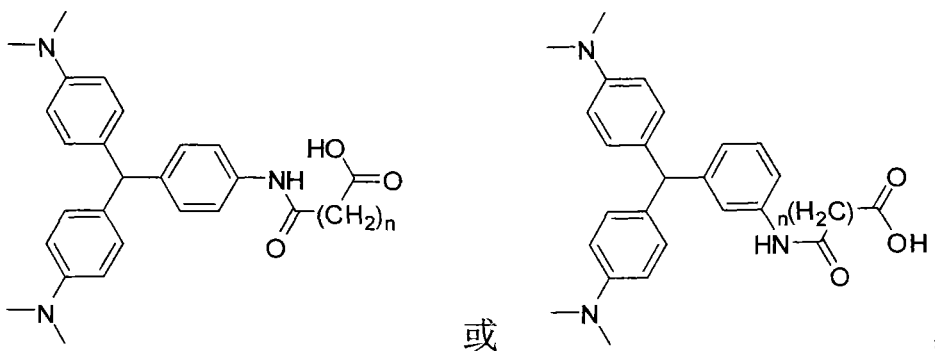


4、根据权利要求 1 所述隐孔雀石绿半抗原，其特征在于所述隐孔雀石绿半抗原结构式为：



其中 n 为 1~4 的整数。

5、根据权利要求 1 所述隐孔雀石绿半抗原，其特征在于所述隐孔雀石绿半抗原结构式为：



其中 n 为 1~4 的整数。

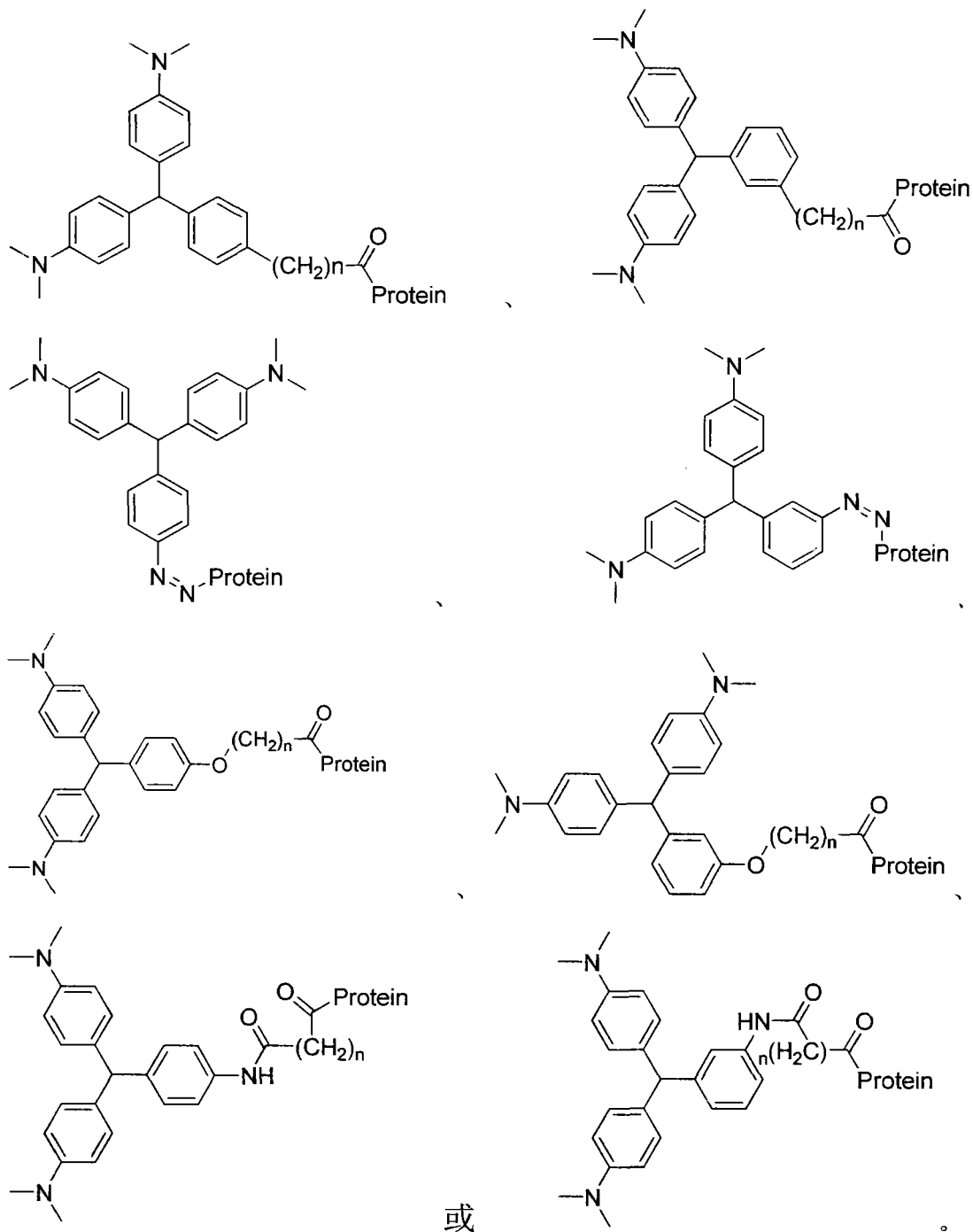
6、一种权利要求 1、2、3、4 或 5 所述隐孔雀石绿半抗原的制备方法，其特征在于采用 N, N-二甲基苯胺与芳香醛类物质在甲苯反应体系、Amberlyst 15 Resin 作为反应催化剂条件下合成。

7、根据权利要求 6 所述隐孔雀石绿半抗原的制备方法，其特征在于所用原料的摩尔比为 N, N-二甲基苯胺：芳香醛：催化剂=2:1:0.1；反应温度为 80~100℃，反应时间为 8~10h。

8、一种利用权利要求 1 所述隐孔雀石绿半抗原制备得到的隐孔雀石绿人工抗体，其特征在于通过采用隐孔雀石绿半抗原与载体蛋白质偶联得到隐孔雀石绿人工抗原；隐孔雀石绿人工抗原经免疫动物制备

得到所述隐孔雀石绿人工抗体。

9、根据权利要求 8 所述利用隐孔雀石绿半抗原制备得到的隐孔雀石绿人工抗体，其特征在于所述隐孔雀石绿人工抗原的结构式为：



10、根据权利要求 8 或 9 所述隐孔雀石绿人工抗体的应用，其特征在于应用于检测食品、农产品或环境样品中的隐孔雀石绿和孔雀石

绿的残留量。

隐孔雀石绿半抗原及制备得到的抗体和抗体的应用

技术领域

本发明属于免疫化学技术领域，具体涉及一种隐孔雀石绿半抗原及其制备方法，以及利用所述半抗原制备得到的抗体和抗体的应用。

背景技术

水产品中违禁药物的残留是近年来食品安全问题中较为突出的问题之一，是困扰世界范围的难题。农业部从1997年开始，虽先后多次发文禁止硝基呋喃、孔雀石绿等近40种兽（渔）药在动物性食品生产中使用，但由于部分生产者和商贩缺乏法律意识和有关科学知识，特别是受经济利益的驱使，在养殖生产过程中经常非法使用禁药，其现象至今仍较普遍，严重威胁人民的身体健康，同时严重影响我国水产品在国际上竞争力，并造成重大经济损失，已引起社会各界的广泛关注。

孔雀石绿 (malachite green, MG)，孔雀石绿(分子式 $C_{23}H_{25}ClIN_2$ ，又名碱性绿、盐基块绿、孔雀绿)是一种带有金属光泽的绿色结晶体，属三苯甲烷类染料，结构见附图1。从1933年起其作为驱虫剂、杀菌剂、防腐剂广泛用于预防与治疗各类水产动物的水霉病、鳃霉病和小瓜虫病等，特别在治疗水霉病上具有非常有效的作用。孔雀石绿是三个芳香胺的聚合物，存在潜在的致癌性，这在各种毒理学实验也得到了证实。隐孔雀石绿 (leucomalachite green, LMG) 是孔雀石绿的还原产物，结构见附图1，是已知的孔雀石绿在鱼体及其他生物体内的

主要代谢产物和存在形式，其危害比孔雀石绿更大，在体内残留时间更长。由于孔雀石绿和无色孔雀石绿在鱼体内和环境中残留时间长，并有致畸、致癌和致突变的危险性，我国于2002年5月将孔雀石绿列入《食品动物禁用的兽药及其化合物清单》(农业部公告193号)。欧盟及美国都不允许孔雀石绿用于养殖鱼类，日本在其本国内也是限制使用。但由于孔雀石绿低廉的价格及在水霉病防治方面较好的效果，因此仍有不法商贩在使用，孔雀石绿事件时有发生。孔雀石绿的非法使用给我们国家经济和人民健康造成了极其严重的后果，其残留检测问题一直备受关注。目前对孔雀石绿及隐孔雀石绿残留检测主要是用气相色谱法和高效液相色谱法，但设备昂贵且操作繁琐，不适用于现场快速检测。免疫分析检测技术是近年来在环境、食品安全监测领域逐渐广泛应用的一种快速、高通量、低成本的检测技术，已逐渐成为世界各国有毒有害残留物快速筛选检测的主要方法之一。这为隐孔雀石绿及孔雀石绿的检测提供了新的途径。

发明内容

本发明的第一个目的是针对本领域的迫切需要，提供一种隐孔雀石绿半抗原。

本发明的第二个目的是提供所述隐孔雀石绿半抗原的制备方法。

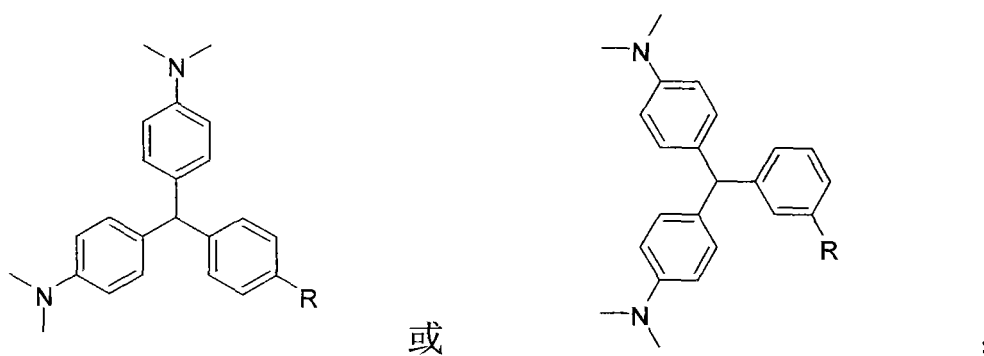
本发明的第三个目的是提供由所述隐孔雀石绿半抗原制备得到的抗体，以及抗体的应用。

本发明的目的通过以下技术方案来予以实现：

提供一种隐孔雀石绿半抗原，保留隐孔雀石绿的特征结构，在隐

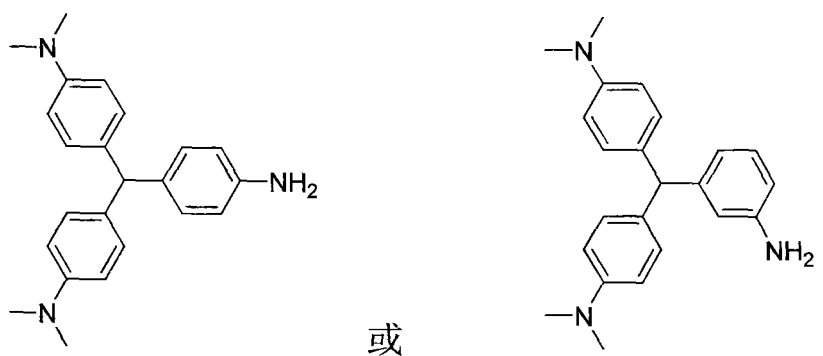
孔雀石绿结构的不同化学位点上衍生出具有不同电子结构性质、不同碳链长度以及适合与大分子载体偶联的活性手臂，所述活性手臂为 R 基团、芳香胺、末端羧基直链烷基醚或带有直链末端羧基结构的酰胺键。

所述隐孔雀石绿半抗原结构式可以为：

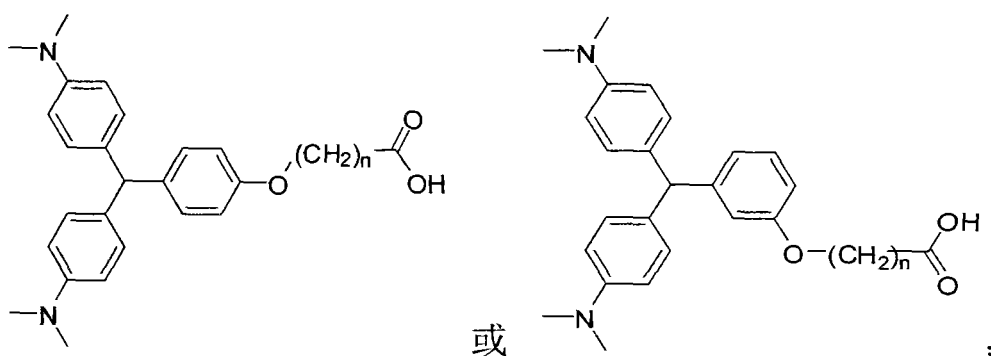


其中 R 为 $(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ ，n 为 0~4 的整数。

或者，所述隐孔雀石绿半抗原结构式为：

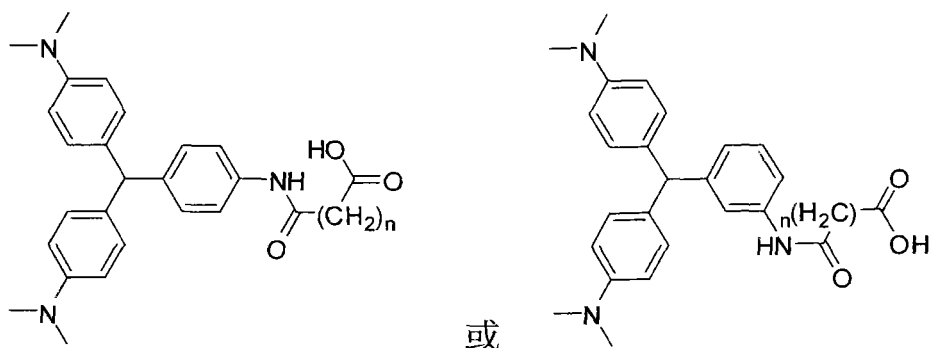


或者，所述隐孔雀石绿半抗原结构式为：



其中 n 为 1~4 的整数。

或者，所述隐孔雀石绿半抗原结构式为：



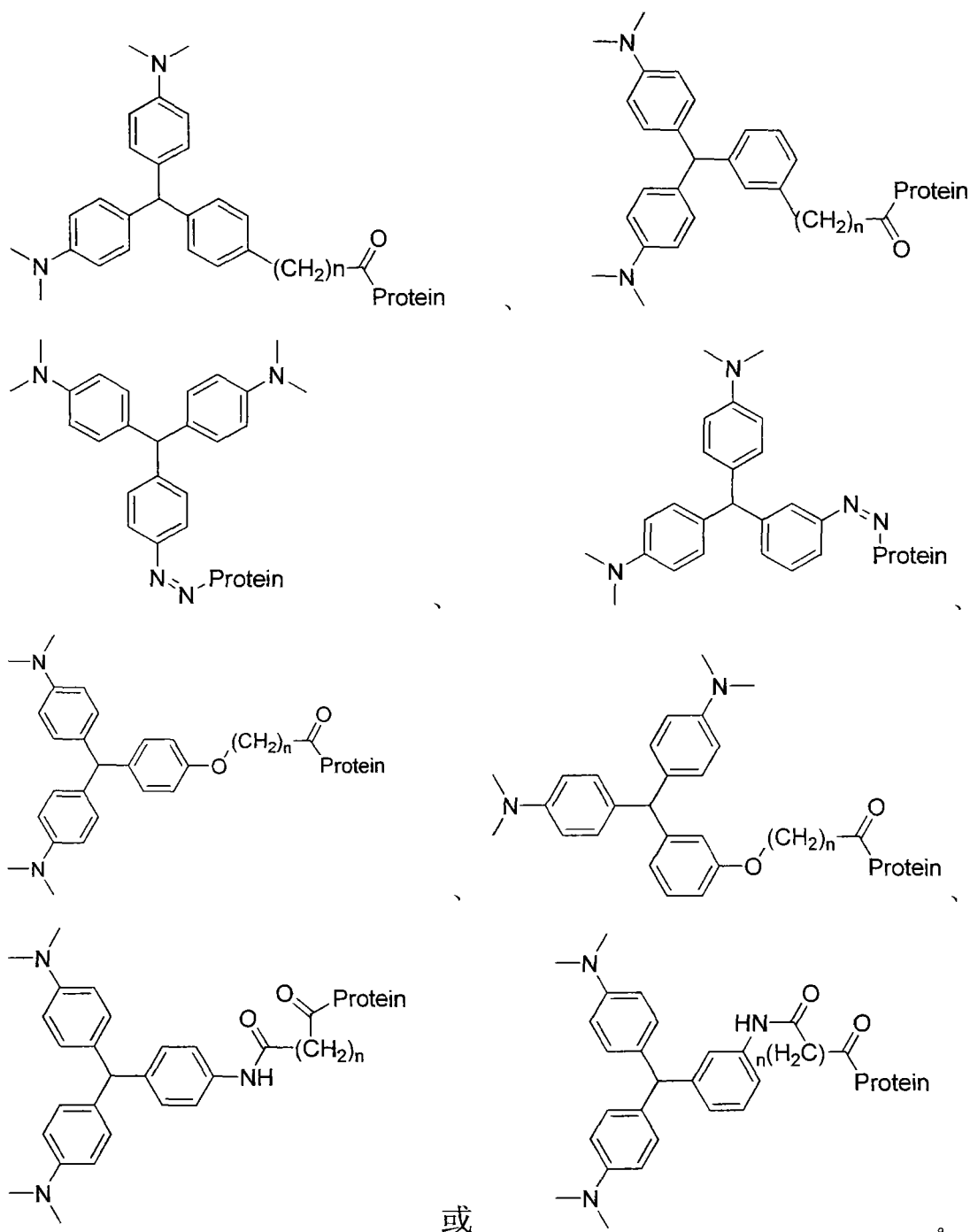
其中 n 为 1~4 的整数。

本发明同时提供了所述隐孔雀石绿半抗原的制备方法，采用 N,N -二甲基苯胺与芳香醛类物质在甲苯反应体系、Amberlyst 15 Resin 作为反应催化剂条件下合成。所用原料的摩尔比为 N,N -二甲基苯胺：芳香醛：催化剂=2:1:0.1；反应温度为 80~100℃，反应时间为 8~10h。

为了保证所合成隐孔雀石绿系列半抗原的结构准确性，采用过滤、萃取及减压柱层析手段对所合成系列隐孔雀石绿半抗原进行分离纯化，并通过质谱 (MS) 和核磁氢谱 ($^1\text{H-NMR}$) 进行鉴定，确证了所有目标半抗原物质合成成功。主要代表性半抗原的结构见附图 3。

本发明提供了由所述隐孔雀石绿半抗原制备得到的隐孔雀石绿人工抗体，通过采用隐孔雀石绿半抗原与载体蛋白质偶联得到隐孔雀石绿人工抗原；隐孔雀石绿人工抗原经免疫动物、细胞融合等生化过程制备得到所述隐孔雀石绿人工抗体。

所述隐孔雀石绿人工抗原的结构式为：



所述隐孔雀石绿人工抗体可应用于检测食品、农产品或环境样品中的隐孔雀石绿和孔雀石绿的残留量。

本发明的有益效果是：

(1) 本发明通过设计合成隐孔雀石绿半抗原和人工抗原，经免疫动物产生特异性抗体，通过细胞融合技术筛选到了高亲和力、高特

异性隐孔雀石绿单克隆抗体。

(2) 本发明建立了隐孔雀石绿的快速免疫检测方法和实验室标准检测方法, 并对 pH 值、离子强度等影响测定的因素进行分析, 确定最佳工作条件, 建立标准曲线: 即目标分析物浓度对抗体的抑制率的相关曲线。在检测分析食品、和环境土壤与水等样品中隐孔雀石绿残留时具有很高的特异性和灵敏度, 准确度高, 回收率可达 80~110%, 同时操作方法简单快速, 不需要复杂的前处理过程, 一次可同时检测大批样品, 成本低廉, 对操作人员要求低, 便于进行现场监控, 可以与常规方法互为补充。

(3) 本发明的隐孔雀石绿半抗原化合物的化学合成方法, 其技术关键是采用了高效的催化剂, 巧妙地利用化学合成手段从源头出发, 以芳香胺, 芳香醛为反应原料, 连续法或一锅法合成隐孔雀石绿半抗原。其优点是: 1) 反应条件温和, 操作方便, 收率高。2) 反应副产物少, 而且反应后处理简便, 减少了对于环境的污染。是一种高效的合成方法, 本发明在免疫分析检测领域具有深远的应用价值。

总之, 本发明成功合成出具有不同活性基团、不同化学位点、不同手臂长度的隐孔雀石绿半抗原, 通过偶联大分子载体成功制备出人工抗原。在免疫动物基础上制备出了针对隐孔雀石绿的高亲和力、高特异性免疫球蛋白, 建立了灵敏、快速、高效、经济的隐孔雀石绿免疫检测方法。同时, 通过抗原的构效关系分析为免疫学机理定量分析奠定了基础, 提供了新的研究思路。

附图说明

- 图1 孔雀石绿和隐孔雀石绿结构图
- 图2 隐孔雀石绿半抗原结构式
- 图3 几种典型的隐孔雀石绿半抗原结构式
- 图4 隐孔雀石绿人工抗原结构式
- 图5 隐孔雀石绿半抗原的合成路线1
- 图6 隐孔雀石绿半抗原的合成路线2
- 图7 隐孔雀石绿半抗原的合成路线3
- 图8 隐孔雀石绿半抗原的合成路线4

具体实施方式

下面结合附图和具体实施例来进一步说明本发明。

实施例1 半抗原的合成路线见附图5。

取 N,N-二甲基苯胺 2.50g(20.0mmol)于 50ml 两口烧瓶中,缓慢加入 5%的 Amberlyst 15 Resin, 磁力搅拌几分钟,磁力与搅拌时间按照常规的技术具体选择,时间一般在 5~10min。在搅拌状态下,加入 1.50g 4-羧基苯甲醛或 3-羧基苯甲醛,于 80~100℃搅拌过夜。待反应结束后过滤催化剂并向反应体系中加入饱和碳酸氢钠溶液调酸碱度至 pH=9.0,用二氯甲烷萃取。取水相用稀盐酸调节 pH=2,用乙酸乙酯萃取,将有机层减压旋转蒸发得粗产物。粗产物用减压硅胶柱层析法进行纯化到白色固体物质,其结构式见附图3(a)和(b)。

附图5中,合成(a)时, R₁为 COOH, R₂为 H; 其波谱数据为:
+ESI-MS *m/z*: 375[(M+H)⁺]; ¹H-NMR(400MHz, *d*₆-Acetone, TMS): δ
2.90(s, 12H), 5.44(s, 1H), 6.69(d, *J*=8.7Hz, 4H), 6.96(d, *J*=8.7Hz, 4H),

7.26(d, $J=8.2\text{Hz}$, 2H), 7.95(d, $J=8.2\text{Hz}$, 2H); 合成 (b) 时, R_2 为 COOH, R_1 为 H。其波谱数据为: +ESI-MS m/z : 375[(M+H)⁺]; ¹H-NMR(400MHz, d_6 -Acetone, TMS): δ 2.88(s, 12H), 5.45(s, 1H), 6.68(d, $J=8.8\text{Hz}$, 4H), 6.96(d, $J=8.8\text{Hz}$, 4H), 7.38-7.41(m, 2H), 7.85-7.86(m, 2H);

实施例 2 半抗原的合成路线见附图 6。

取 N,N-二甲基苯胺 2.50g(20.0mmol)于 50ml 两口烧瓶中, 缓慢加入 5%的 Amberlyst 15 Resin, 磁力搅拌几分钟。在搅拌状态下, 加入 1.53g 3-硝基苯甲醛或 4-硝基苯甲醛。通氮气条件下, 于 80~100℃ 搅拌过夜。待反应结束后过滤催化剂, 减压旋转蒸发得到黄色固体。

在圆底烧瓶中加入上述粗产物 3.75g (约 10mmol), 加入 95%的乙醇 10ml, 搅拌使之溶解后加入铁粉 4g (约 70mmol), 蒸馏水 20ml, 最后滴加 1ml 浓盐酸, 80℃回流 2h 停止反应。抽滤得水相, 用乙酸乙酯萃取得有机相, 减压选转蒸发得浅黄色粗产物。得到的粗产物用减压硅胶柱层析法进行纯化得到浅黄色固体目标物质, 其结构式见附图 3 (c) 和 (d)。

附图 6 中, 合成 (c) 时, R_1 为 NO₂, R_2 为 H, R_3 为 NH₂, R_4 为 H; 其中 (c) 的波谱数据为: +APCI-MS m/z : 346[(M+H)⁺]; ¹H-NMR(400MHz, d_6 -Acetone, TMS): δ 2.88(s, 12H), 4.45(s, br, 2H), 5.19(s, 1H), 6.57(d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 6.66(d, $J=8.8\text{Hz}$, 4H), 6.8(d, $J=8.3\text{Hz}$, 2H), 6.90(d, $J=8.6\text{Hz}$, 4H); 合成 (d) 时, R_2 为 NO₂, R_1 为 H, R_4 为 NH₂, R_3 为 H; 其中(d)的波谱数据为: +ESI-MS m/z : 346[(M+H)⁺]; ¹H-NMR(400MHz, d_6 -Acetone, TMS): δ 2.88(s, 12H), 4.49(s, br, 2H),

5.19(s, 1H), 6.35(d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 6.43(s, 1H), 6.47(d, $J=7.90\text{Hz}$, 1H), 6.66(d, $J=8.7\text{Hz}$, 4H), 6.91-6.96(m, 5H)。

实施例 3 半抗原的合成路线见附图 7。

取 12.2g 3-羟基苯甲醛或 4-羟基苯甲醛于 150ml 园底烧瓶, 用 20ml 蒸馏水溶解, 加入 4g NaOH 搅拌反应。然后在搅拌状态下逐滴加入 11.6g 氯乙酸钠的溶液, 于 80~100℃回流搅拌反应 2~3h。反应结束后, 加适量浓盐酸酸化后再加入饱和碳酸氢钠溶液调节至碱性, 用乙酸乙酯萃取后将水相用稀盐酸酸化水相至沉淀析出, 减压干燥沉淀得中间产物。

将中间产物与 N,N-二甲基苯胺按照摩尔比 1:2 加入 50ml 两口烧瓶中, 同时加入 5%的 Amberlyst 15 Resin, 通氮气下, 于 80~100℃搅拌过夜。待反应结束后过滤催化剂, 减压旋转蒸发得到黄绿色固体粗产物, 经减压硅胶柱层析分离得到纯目标物质, 其结构式见附图 3 (e) 和 (f)。

附图 7 中, 合成 (e) 时, R_1 为 OH, R_2 为 H, R_3 为 CH_2COOH , R_4 为 H; 其中 (e) 的波谱数据为: +APCI-MS m/z : 405[(M+H)⁺]; ¹H-NMR(400MHz, d_6 -Acetone, TMS): δ 2.88(s, 12H), 4.66(s, 2H), 5.29(s, 1H), 6.67(d, $J=8.8\text{Hz}$, 4H), 6.85(d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 6.94(d, $J=8.8\text{Hz}$, 4H), 7.03(d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H); 合成(f)时, R_2 为 OH, R_1 为 H, R_4 为 CH_2COOH , R_3 为 H; 其中 (f) 的波谱数据为: +APCI-MS m/z : 405[(M+H)⁺]; ¹H-NMR(400MHz, d_6 -Acetone, TMS): δ 2.89(s, 12H), 4.62(s, 2H), 5.32(s, 1H), 6.68(d, $J=8.8\text{Hz}$, 4H), 8.74-8.79(m, 3H), 6.96(d, $J=8.8\text{Hz}$, 4H),

7.19(t, $J=8.0\text{Hz}$, 1H)。

实施例 4 半抗原的合成路线见附图 8。

于 100ml 烧瓶中取半抗原 c (或 d) 3.45g (约 0.01mol) 溶于四氢呋喃溶液, 加入 10%DMAP 作为催化剂。在磁力搅拌状态下, 逐滴缓慢加入 0.015mol 的顺丁烯二酸酐四氢呋喃溶液。于 80~100℃加热回流搅拌反应 4h。于反应溶液中加入饱和碳酸氢钠溶液调节至 pH=9 左右, 用二氯甲烷萃取溶液。用稀盐酸调节水相至 pH=2 左右, 乙酸乙酯萃取, 有机相经减压旋转蒸发的淡黄色固体物质即为目标粗产物, 减压硅胶柱层析得目标物质, 其结构式见附图 3 (g) 和 (h)。

附图 8 中, 合成 (g) 时, R_1 为 NH_2 , R_2 为 H; 其中 (g) 的波谱数据为: +ESI-MS m/z : 444[(M+H)⁺]; ¹H-NMR(400MHz, d_6 -DMSO, TMS): δ 2.84(s, 12H), 5.25(s, 1H), 5.78(d, $J=13.6\text{Hz}$, 1H), 6.16(d, $J=13.6\text{Hz}$, 1H), 6.64(d, $J=8.8\text{Hz}$, 4H), 6.89(d, $J=8.8\text{Hz}$, 4H), 6.99(d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 7.49(d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 14.43(s, br, 1H); 合成 (f) 时, R_2 为 OH, R_1 为 H, R_4 为 CH_2COOH , R_3 为 H。合成 (h) 时, R_2 为 NH_2 , R_1 为 H; 其中 (f) 的波谱数据为: +ESI-MS m/z : 444[(M+H)⁺]; ¹H-NMR(400MHz, d_6 -DMSO, TMS): δ 2.89(s, 12H), 5.27(s, 1H), 6.26(d, $J=12.0\text{Hz}$, 1H), 6.26(d, $J=12.0\text{Hz}$, 1H), 6.37(d, $J=12.0\text{Hz}$, 1H), 6.64(d, $J=8.8\text{Hz}$, 4H), 6.79(d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 6.89(d, $J=8.8\text{Hz}$, 4H), 7.21(t, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.29(s, 1H), 7.55(d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 10.47(s, br, 1H)。

实施例 5 人工抗原的合成、纯化及鉴定

5.1 人工抗原的合成与纯化

人工抗原的合成采用活泼酯法和重氮法。人工抗原的合成依据带羧基的用活泼酯法合成，含有氨基的半抗原采用重氮法合成。

活泼酯法合成人工抗原步骤：称取 1mmol 的半抗原和 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）1mmol 溶于 1.0ml N,N-二甲基甲酰胺（DMF）中。将 1mmol N,N-二环己基碳二亚胺（DCC）溶于 1.0ml DMF 中，磁力搅拌下逐滴加入，室温搅拌 3.5h 得 A 液。然后在搅拌状态下将 A 液逐滴加入到 BSA 溶液中，4℃ 冰箱搅拌反应过夜。4℃ 下用 9‰ 的生理盐水透析 3 天，每 4h 换一次透析液。紫外扫描透析液无小分子吸收峰时可将透析得到产物分装于离心管中，-20℃ 保存。

合成包被人工抗原步骤同上，将 BSA 换成卵清蛋白（OVA）即可制得包被抗原。

重氮法合成人工抗原步骤：称取 1mmol 半抗原于 10ml 称量皿中，加入 1ml 1.0mol/L 的盐酸溶液，随后称取 1mmol NaNO_2 加入称量皿中，冰浴搅拌 30min。得到淡黄色液体 A。搅拌状态下将 A 液逐滴加入到 BSA 溶液中，4℃ 反应过夜。4℃ 下用 9‰ 的生理盐水透析 3 天，每 4h 换一次透析液。紫外扫描透析液无小分子吸收峰时可将透析得到的产物分装于离心管中，-20℃ 保存。

合成人工包被抗原步骤同上，将 BSA 换成卵清蛋白（OVA）即可制得包被抗原。

按照上述方法分别由半抗原（a）～（h）制备得到 8 种免疫原，8 种免疫原的结构式见附图 4。

5.2 人工抗原的鉴定

按照合成隐孔雀石绿免疫原和包被原时反应物和产物的比例，分别取反应物和产物进行 200~400nm 紫外扫描分析。偶联物与半抗原及载体的吸收峰相比，发生了明显的变化，表明这几种人工抗原的合成是成功的。

经计算半抗原与载体（BSA 或 OVA）的结合比如下：

免疫抗原	b-BSA	a-BSA	d-BSA	c-MGN-BSA
结合比	27:1	39:1	17:1	15:1
免疫抗原	f-BSA	e-BSA	h-BSA	g-BSA
结合比	31:1	28:1	21:1	34:1
包被抗原	b-OVA	a-OVA	d-OVA	c-OVA
结合比	13:1	14:1	10:1	9:1
包被抗原	f-OVA	e-OVA	h-OVA	g-OVA
结合比	8:1	7:1	9:1	11:1

实施例 6 抗体的制备

6.1 免疫动物制备抗血清

免疫动物选用 Balb/c 小鼠，小鼠由中山医学院动物实验中心提供，按照常规免疫手段各免疫三只小鼠。

具体方法是：将半抗原与蛋白质偶联制备得到的 8 种免疫原用 0.9% 的 NaCl 溶液配制成 1mg/ml 的抗原，加入等体积弗氏佐剂充分乳化，直至滴入水中乳滴不分散，然后进行动物免疫。免疫方法采用皮下注射法，初次免疫 3~4 周后进行加强免疫，以后每隔 2 周再次加强免疫。从加强免疫开始，在每次免疫小鼠 7 天后对小鼠进行尾部取血，血清经适当稀释后用间接 ELISA 测定血清效价。待免疫血清效价合格后，就进行采血。

实验采血采用尾部取血法。每只小鼠采血 80 μ l 左右，取完血清后在 4 $^{\circ}$ C 冰箱 5~6 小时，然后以 5000rpm 离心 10 分钟，分离血清。

6.2 抗血清效价测定

几种免疫原复合物按常规方法各免疫三只小鼠，从加强免疫第二次开始，在每次免疫后第 7 天尾部取血，血清经适当稀释后用间接 ELISA 测定效价。待第 5 次免疫时，小鼠获得了高效价的抗体。

其抗血清的效价如下：

免疫抗原	b-BSA	a-BSA	d-BSA	c-BSA
	1:6400	1:12800	1:6400	1:12800
效 价	1:12800	1:12800	1:12800	1:6400
	1:12800	1:25600	1:6400	1:6400
免疫抗原	f-BSA	e-BSA	h-BSA	g-BSA
	1:25600	1:51200	1:12800	1:25600
效 价	1:51200	1:102400	1:25600	1:12800
	1:25600	1:51200	1:12800	1:25600

6.3 抗体的纯化与鉴定

抗体纯化采用辛酸-硫酸铵盐析，也可采用蛋白 A 柱层析。辛酸在偏酸性的条件下能将血清中除 IgG 以外的蛋白都沉淀下来，上清中只有 IgG。辛酸加入因抗体的来源不同而不同，人血清为 70 μ l/ml，兔血清为 75 μ l/ml，小鼠血清为 40 μ l/ml，小鼠腹水为 33 μ l/ml。

实施例 7 隐孔雀石绿 ELISA 测定方法的原理

采用间接竞争酶联免疫分析方法，将药物分子与大分子载体（如蛋白质）偶联制得的复合物作为包被抗原吸附于固相载体（96 孔酶标板）上，制备成固相抗原，然后加入待测药物和相应抗体，固相抗原中的药物，待测药物，与抗体进行竞争结合反应，待测药物含量多，被结合在固相抗原上的抗体就少，反之结合在固相抗原的抗体多，反应后加入酶标二抗（只能与结合在固相抗原上的抗体相结合），最后用底物进行显色加以测定，当抗体量一定时，加入的待测药物量就多，

与固相抗原结合的抗体就少，显色反应就减弱，抑制率增高，反之，则显色反应增强，抑制率减低，因而可根据已知量药物的标准线和待检样品的抑制率，推算出待测药物的浓度。上述内容见申请号为200810025908.2的专利申请资料。

7.2 最佳抗体工作浓度和包被抗原复合物浓度的确定

采用方阵滴定法确定包被抗原浓度、抗体、二抗浓度，在同一包被浓度下，随着抗体的稀释，所得 OD 值呈下降趋势，同样在同一抗体稀释度下，随着包被浓度的下降，所得 OD 值也呈下降趋势。选择抗体 6400 倍稀释最为最适工作浓度，包被抗原浓度 0.5 μ g/ml 最佳包被浓度。

7.3 标准曲线和检测灵敏度

7.3.1 标准曲线的制备，其基本操作步骤如下：

7.3.1.1 包被：将制备好的抗原溶于 50mmol/L、pH=9.6 的碳酸缓冲液中，配制成合适浓度的包被液，按照每孔 100 μ l 加入到 96 孔板 4 $^{\circ}$ C 放置过夜。

7.3.1.2 封闭：取出包被好的 96 孔板，甩掉包被液，用 PBST 洗涤后，每孔加入 5.0%脱脂奶粉 200 μ l，于 37 $^{\circ}$ C 温育 3h。

7.3.1.3 加样：取隐孔雀石绿用甲醇配制一系列浓度的隐孔雀石绿标准溶液，将制备好的抗体用 PBST 稀释成工作浓度。取出封闭好的 96 孔板，每孔加入系列浓度的隐孔雀石绿 50 μ l，再加入抗体工作液 50 μ l，对照孔加入抗体工作液 50 μ l 和 PBST50 μ l。放入 37 $^{\circ}$ C 温箱温育 1h，弃去孔内液体，用 PBST 溶液洗涤 4 次。

7.3.1.4 加酶标二抗：每孔加入经 1: 10000 稀释的羊抗小鼠辣根过氧化物酶溶液 100 μ l，放入 37 $^{\circ}$ C 温箱反应 1 小时，用 PBST 溶液洗涤 4 次，甩干。

7.3.1.5 显色：每孔加入底物 TMB-过氧化氢溶液 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 温育 15min，用 50 μ l，2mol/LH₂SO₄ 终止反应。在酶标仪上测定 450nm 波长下的吸光值，根据抑制率与药物浓度之间的半对数关系作图即得到标准曲线。

ELISA 方法的标准曲线以抑制率与药物浓度的半对数曲线表示，目标分析物浓度对抗体的抑制率用下式计算：

$$\text{抑制率}(\%) = (\text{Amax} - \text{Amin}) - (\text{Ai} - \text{Amin}) / (\text{Amax} - \text{Amin}) * 100$$

式中：Amax 为不加分析物孔平均吸光值；Amin 为免疫前小鼠血清对照孔平均吸光值；Ai 为加样孔平均吸光值。

以抑制率为纵坐标，分析物浓度为横坐标由上述公式计算得隐孔雀石绿各浓度的抑制率，作图。通过实验优选，获得最佳抗体，当抑制率为 50% 时隐孔雀石绿的浓度为 1ng/ml，最低检测限（以抑制率为 10% 时的浓度表示）为 0.005ng/ml。隐孔雀石绿在 0.005ng/ml~10 ng/ml 范围内，抑制率与药物浓度的对数值呈显著的线性关系，相关系数为 $r=0.9867$ 。

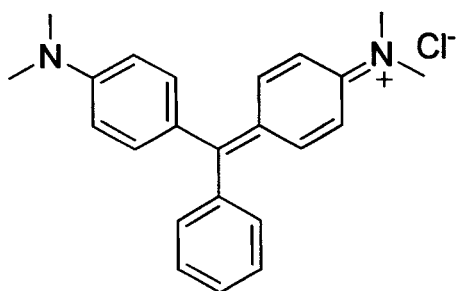
7.4 抗体特异性：抗体与结构类似化合物的交叉反应程度，通常以抑制抗体最大结合率的 50% 所需目标分析物的浓度 IC_{50i} 与所需各种结构类似化合物的浓度 IC_{50m} 之比的百分数表示，即交叉反应率 C.R (%)。

$$C.R (\%) = I_{50i}/I_{50m} * 100$$

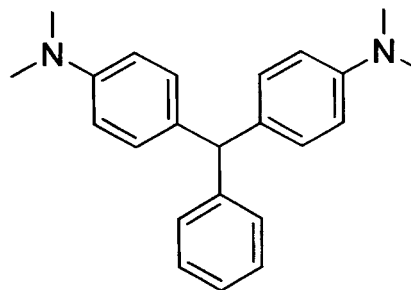
交叉反应越小，抗体特异性越高。

将隐孔雀石绿及其类似物做系列稀释，分别与同一种抗体竞争反应，按照同样的方法制作标准曲线，通过曲线上抑制率为 50%的分析物浓度和类似物抑制率为 50%时的浓度计算各类似物的交叉反应率。

通过实验得出：抗体对隐孔雀石绿的特异性强，与类似物不存在交叉反应。

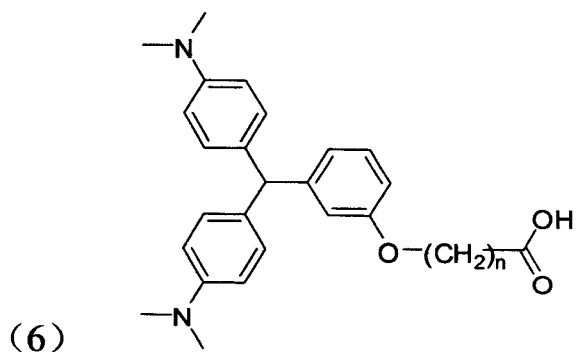
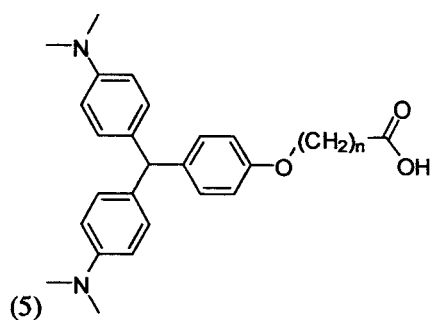
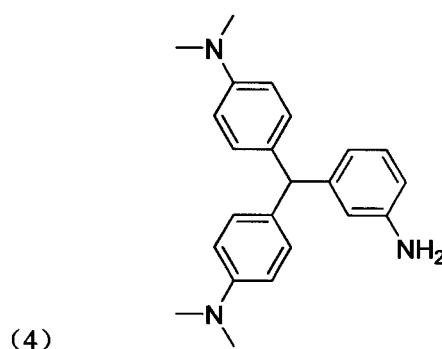
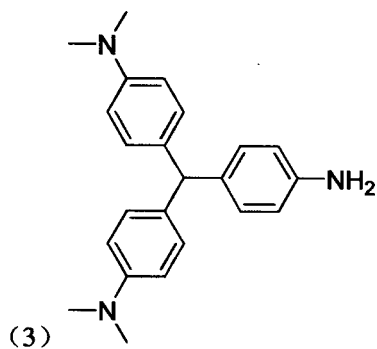
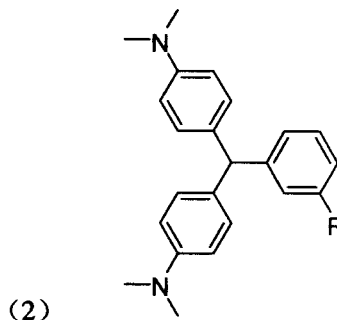
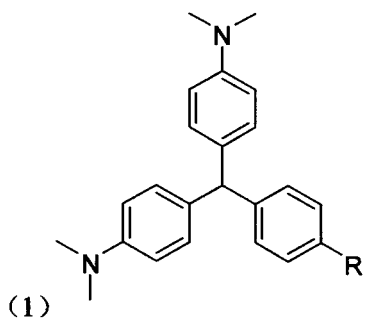


孔雀石绿



隐孔雀石绿

图 1



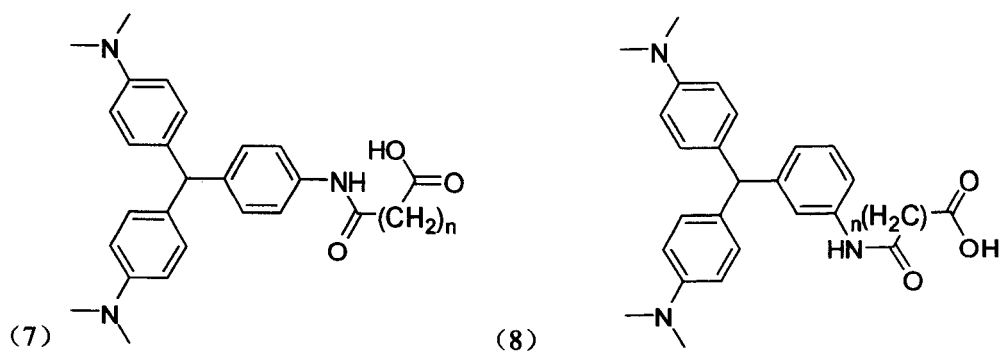


图 2

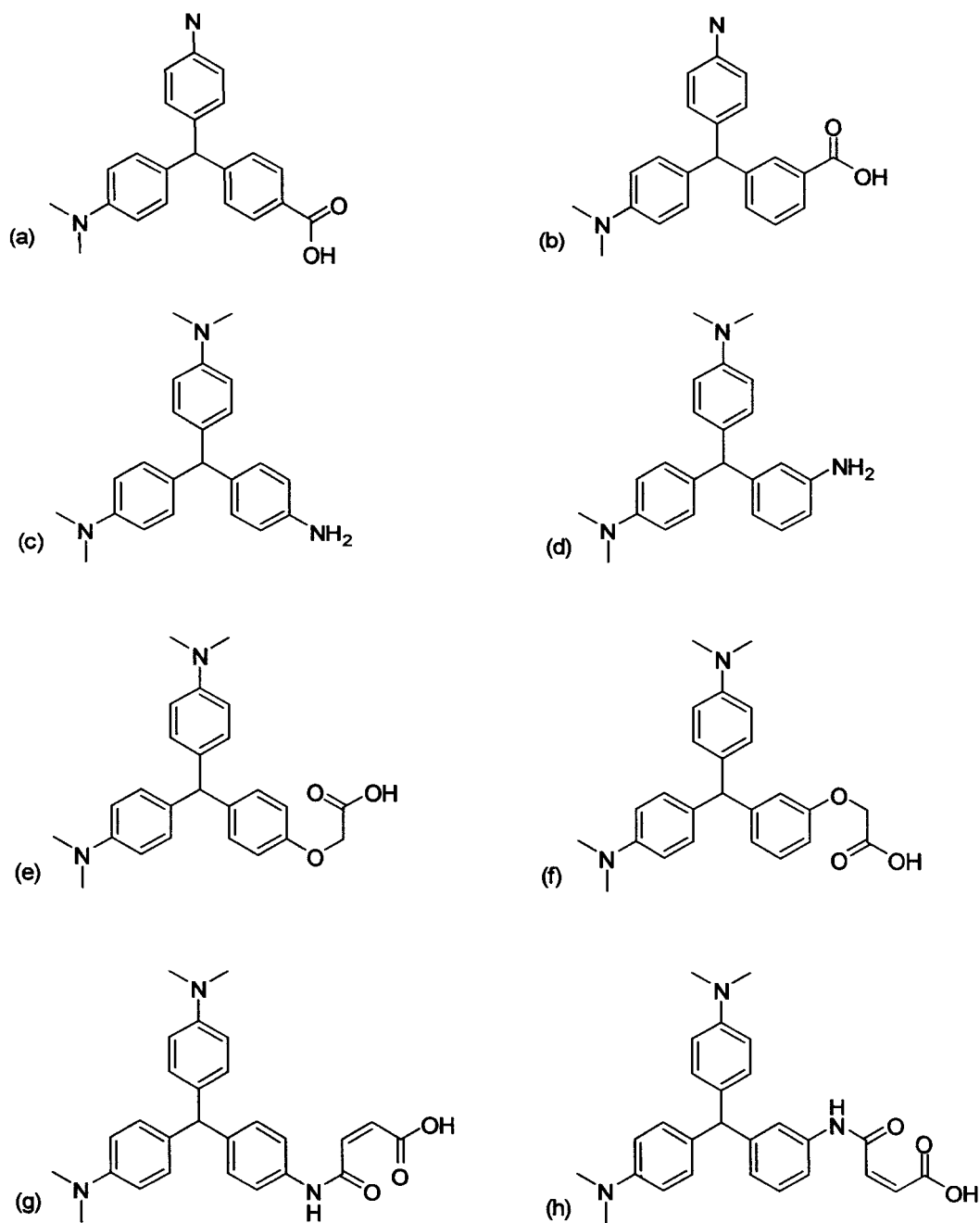


图 3

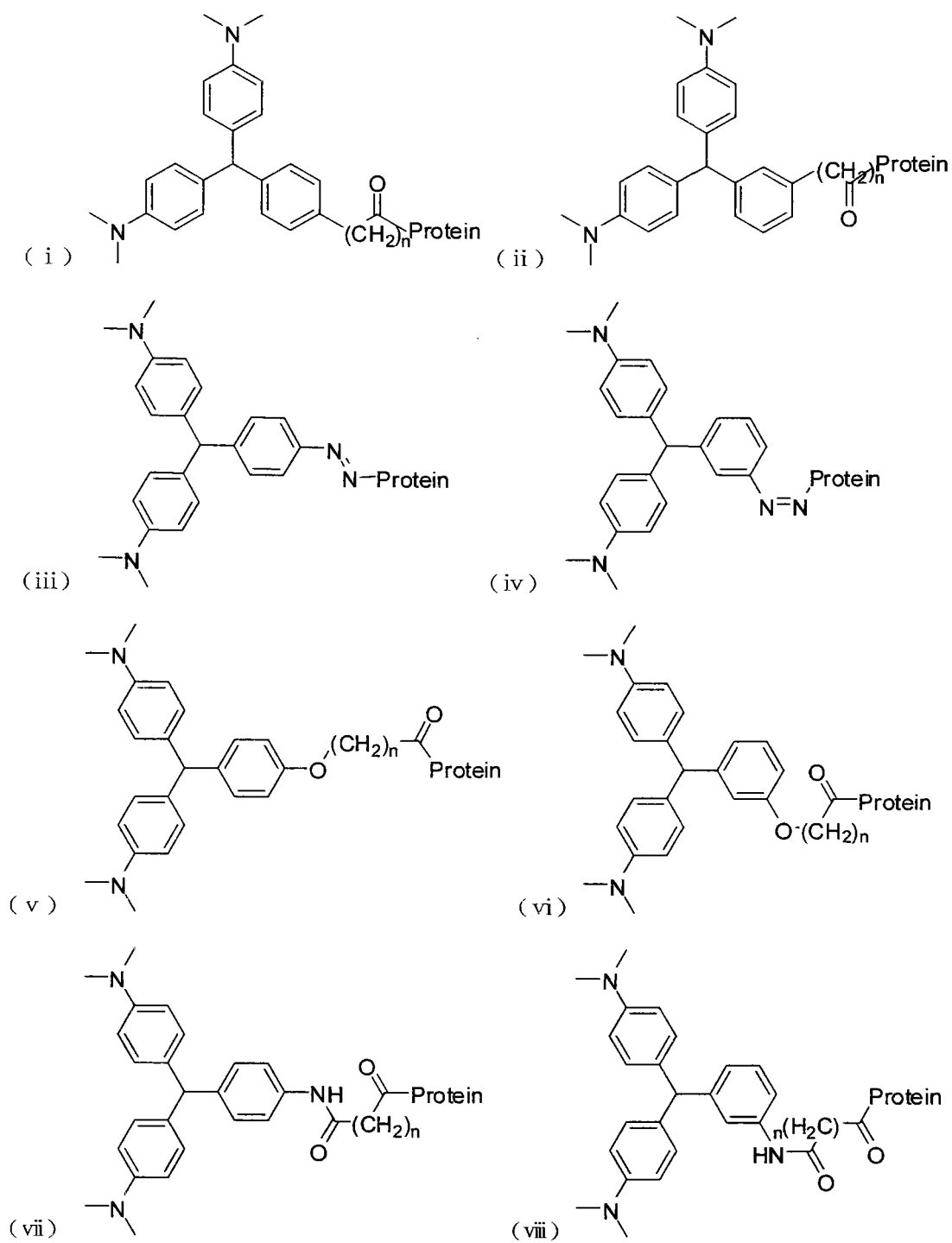


图 4

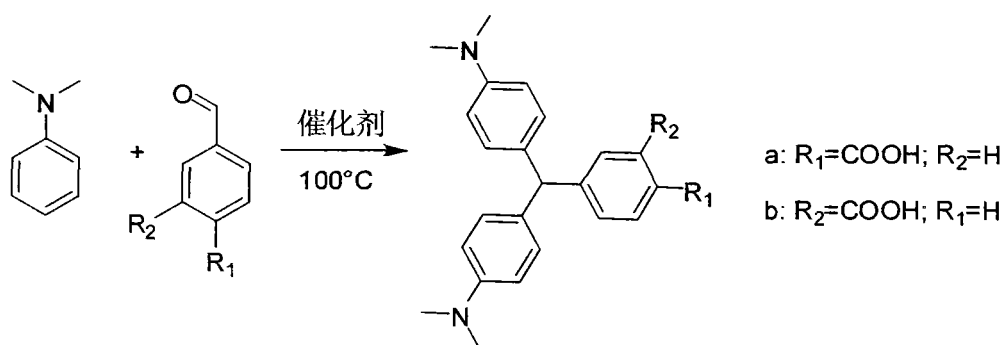


图 5

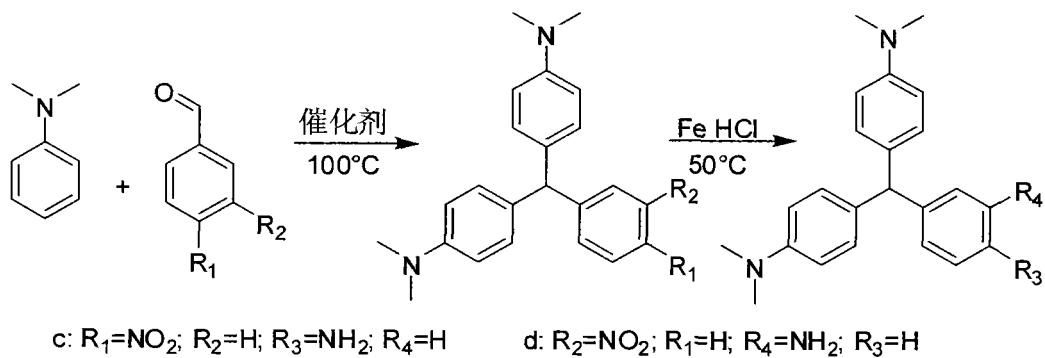


图 6

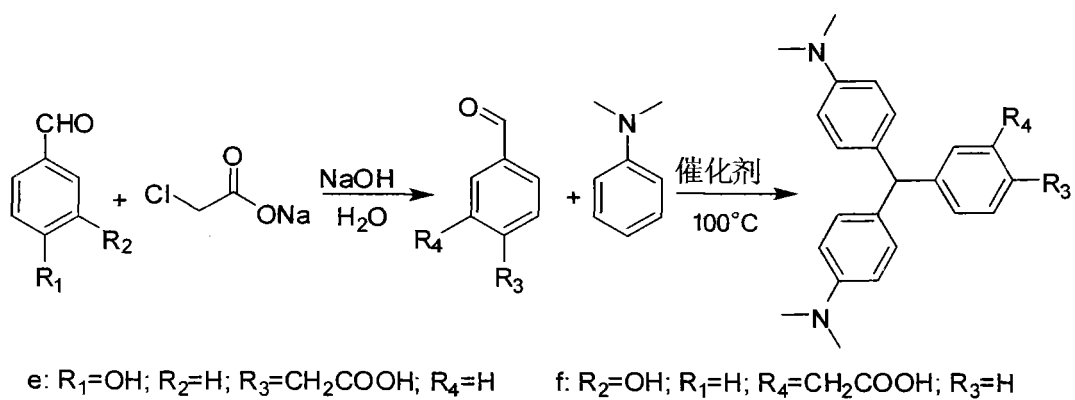


图 7

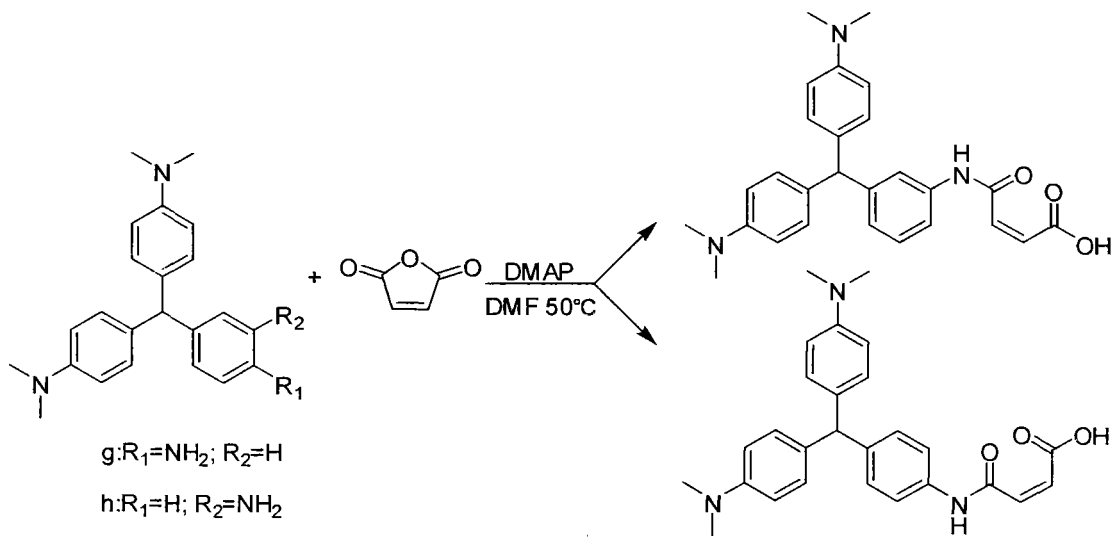


图 8

专利名称(译)	隐孔雀石绿半抗原及制备得到的抗体和抗体的应用		
公开(公告)号	CN101245032A	公开(公告)日	2008-08-20
申请号	CN200810026199.X	申请日	2008-01-31
[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	沈玉栋 王宇 孙远明 雷红涛 王弘 肖治理 徐小艳		
发明人	沈玉栋 王宇 孙远明 雷红涛 王弘 肖治理 徐小艳		
IPC分类号	C07C229/40 C07C211/50 C07C217/80 C07C233/43 C07K16/18 G01N33/53		
代理人(译)	林丽明 任重		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种隐孔雀石绿半抗原，保留隐孔雀石绿的特征结构，在隐孔雀石绿结构的不同化学位点上衍生出具有不同电子结构性质、不同碳链长度以及适合与大分子载体偶联的活性手臂，所述活性手臂为R基团、芳香胺、末端羧基直链烷基醚或带有直链末端羧基结构的酰胺键；由隐孔雀石绿半抗原制备得到隐孔雀石绿人工抗体，应用于检测隐孔雀石绿和孔雀石绿的残留量时具有很高的特异性和灵敏度，准确度高，回收率可达80~110%，同时操作方法简单快速，不需要复杂的前处理过程，一次可同时检测大批样品，成本低廉，对操作人员要求低，便于进行现场监控，并可以与常规方法互为补充，成功建立了灵敏、快速、高效、经济的隐孔雀石绿免疫检测方法。

