



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106543049 B

(45)授权公告日 2018.09.14

(21)申请号 201610941345.6 *C07K 14/47*(2006.01)
(22)申请日 2016.10.25 *C07K 14/765*(2006.01)
(65)同一申请的已公布的文献号 *C07K 14/77*(2006.01)
申请公布号 CN 106543049 A *C07K 14/795*(2006.01)
(43)申请公布日 2017.03.29 *C07K 16/44*(2006.01)
(73)专利权人 中国农业大学 *G01N 33/535*(2006.01)
地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号 审查员 王一婷
(72)发明人 王战辉 沈建忠 史为民 张素霞
温凯 梁晓 曹艳欣
(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
公司 11245
代理人 关畅 任风华
(51)Int.Cl.
C07C 311/44(2006.01)
C07C 303/40(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图3页

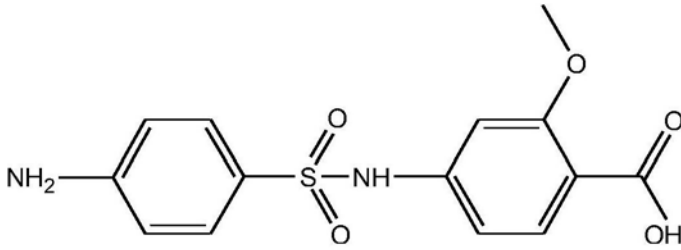
(54)发明名称

磺胺类半抗原及其结合抗原的制备方法与
应用

(57)摘要

本发明公开了磺胺类半抗原及其结合抗原的制备方法与应用。该磺胺类半抗原及其结合抗原的结构式分别如式I和式II所示。该磺胺类结合抗原免疫动物后能够产生高效价、高亲和力和特异性强的抗血清,采用酶联免疫吸附分析方法可以快速、灵敏、简便地检测磺胺类化合物。磺胺类标准品对于采用本发明的结合抗原制备的磺胺类抗血清与磺胺类包被抗原结合反应的半数抑制量(IC₅₀)为3.56ng/mL-50.78ng/mL,磺胺类抗血清对磺胺类标准品的最低检测限(LOD)为0.12ng/mL-1.22ng/mL。本发明的半抗原和结合抗原适用于对磺胺类化合物的检测。

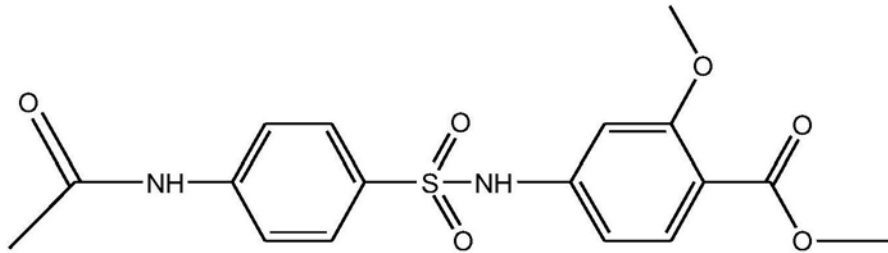
1. 式I所示化合物:



式 I。

2. 权利要求1所述的式I所示化合物的制备方法,包括如下步骤:

1) 将化合物A与N-乙酰氨基苯磺酰氯进行反应得到式III所示的中间产物III;所述化合物A为2-甲氧基-4-氨基苯甲酸甲酯;

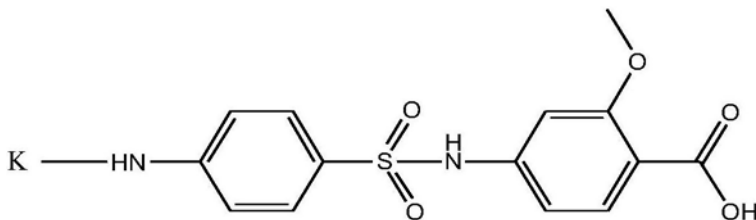


式III;

2) 将所述中间产物III在碱性条件下水解,得到权利要求1所述的式I所示化合物。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于:步骤1)所述反应在三乙胺和4-二甲基吡啶存在的条件下在60℃进行2-3h。

4. 式II所示化合物:



式 II;

式 II 中,K表示载体蛋白。

5. 权利要求4所述的式 II 所示化合物的制备方法,包括:将权利要求1所述的式I所示化合物与载体蛋白偶联得到所述式 II 所示化合物。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于:所述方法还包括对所述式 II 所示化合物进行纯化的步骤。

7. 权利要求1所述的式I所示化合物,或,权利要求2或3所述的制备方法在制备权利要求4的式 II 所示化合物中的应用。

8. 权利要求1所述的式I所示化合物或权利要求4所述的式 II 所示化合物,或,权利要求2或3或5或6所述的制备方法在制备抗磺胺化合物的抗体中的应用。

9. 利用权利要求1所述的式I所示化合物或权利要求4所述的式 II 所示化合物,或,权利要求2或3或5或6所述的制备方法制备的抗磺胺化合物的抗体。

10. 权利要求1所述的式I所示化合物或权利要求4所述的式II所示化合物,或,权利要求2或3或5或6所述的制备方法,或,权利要求9所述的抗体在检测磺胺化合物中的应用。

磺胺类半抗原及其结合抗原的制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物化工领域中磺胺类半抗原及其结合抗原的制备方法与应用。

背景技术

[0002] 磺胺类药物是指具有对氨基苯磺酰胺结构的一类药物的总称，是一类用于预防和治疗细菌感染性疾病的化学治疗药物，其抗菌谱较广，对大多数革兰氏阳性菌以及革兰氏阴性菌有抑制作用。

[0003] 磺胺类药物由于性质稳定、抑菌谱广、毒性小、口服易吸收且价格低廉，被广泛应用于畜牧生产中，在动物疾病防治方面具有显著的疗效。但是由于磺胺类药物的不合理使用、误用甚至滥用，导致了耐药菌的产生，尤其是萘瑟菌属和革兰氏阳性菌的种类日益增多。当病原菌对一种磺胺类药物产生耐药性后，也易于对其它磺胺类药物产生交叉耐药性，因此造成了多次耐药菌的流行性感染。此外，磺胺类药物的不合理使用还在畜牧产品中产生了严重的残留现象，食品中残留的磺胺类药物会危害人们的身体健康，鉴于此，我国和美国规定磺胺类药物的休药期为15天，最高残留限量为100ng/g，欧盟各国也严格限制磺胺类药物的残留限量。

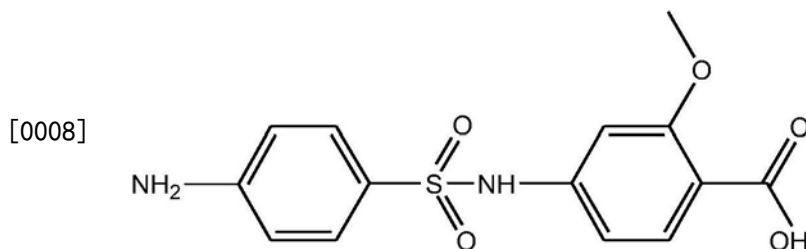
[0004] 目前检测磺胺类药物残留的技术方法主要是仪器确证分析和快速筛选分析。仪器分析检测技术具有灵敏度高、特异性强等特点，但是需要较长的样本处理时间和专业的操作人员，不适用于大量样本的快速筛选。基于抗原-抗体特异性反应的免疫分析技术，主要包括酶联吸附免疫分析和侧流层析免疫分析技术，因其速度快、成本低等优点，被广泛应用于食品样本中磺胺类药物的快速筛选分析。但是检测磺胺类药物的免疫分析方法大多是特异性地针对某一种磺胺类药物，随着畜牧业中磺胺类药物使用种类的增加，建立一种快速、灵敏、准确、简便地检测多种磺胺类药物残留量的方法是当前亟待解决的问题。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是如何快速、准确检测磺胺化合物的残留量。

[0006] 为解决上述技术问题，本发明首先提供了一种磺胺类半抗原。

[0007] 本发明所提供的磺胺类半抗原，其结构如式I所示：



[0009]

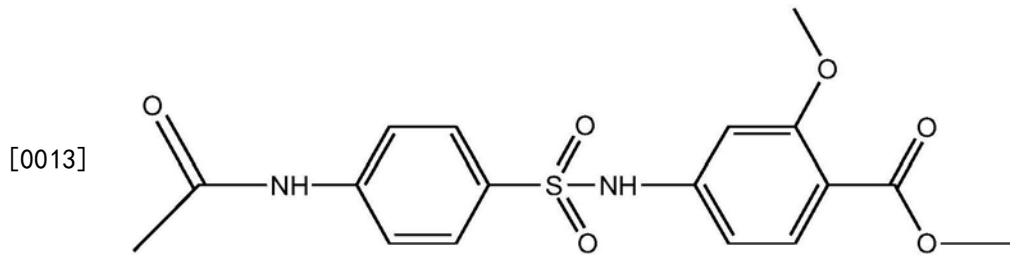
式 I。

[0010] 为解决上述技术问题，本发明还提供了所述式I所示化合物的制备方法。

[0011] 本发明所提供的所述式I所示化合物的制备方法，包括如下步骤：

[0012] 1) 将化合物A与N-乙酰氨基苯磺酰氯进行反应得到中间产物III；所述化合物A为2-

甲氧基-4-氨基苯甲酸甲酯或4-(4-氨基苯基)丁酸;



式III。

[0014] 2) 将所述中间产物III在碱性条件下水解,得到所述式I所示化合物。

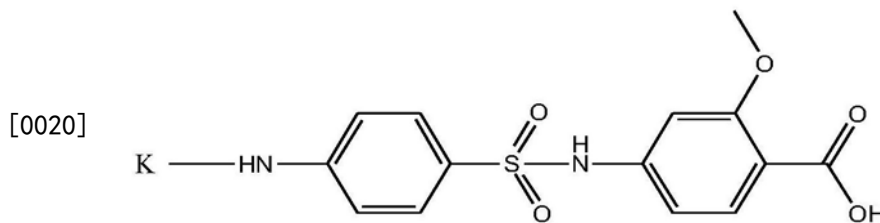
[0015] 上述制备方法还包括将步骤2) 水解反应后的溶液进行pH值调节,具体可为采用浓度为2mol/L的盐酸将pH值调节至4。

[0016] 上述式I所示化合物的制备方法中,步骤1) 所述反应在三乙胺和4-二甲氨基吡啶(DMAP)存在的条件下在60℃进行2-3h,具体可为在水浴60℃反应2h;所述化合物A、N-乙酰氨基苯磺酰氯、三乙胺和4-二甲氨基吡啶(DMAP)的摩尔比可为2:2:2:1。

[0017] 上述式I所示化合物的制备方法中,步骤2) 所述水解为在浓度为24.03mg/mL-40.05mg/mL的NaOH溶液中95℃反应2-3h。

[0018] 为解决上述技术问题,本发明还提供了一种磺胺类结合抗原。

[0019] 本发明所提供的磺胺类结合抗原,其结构如式II所示:



式II;

[0021] 式II中,K表示载体蛋白;所述载体蛋白具体可为:牛血清白蛋白、人血清白蛋白、血蓝蛋白、卵清蛋白、鼠血清白蛋白、甲状腺球蛋白或兔血清白蛋白等。

[0022] 为解决上述技术问题,本发明还提供了所述式II所示化合物的制备方法。

[0023] 本发明所提供的所述式II所示化合物的制备方法,包括将所述的式I所示化合物与载体蛋白偶联得到所述式II所示化合物。

[0024] 上述式II所示化合物的制备方法还包括对所述式II所示化合物进行纯化的步骤,可为将所述的式II所示化合物进行透析的步骤。所述透析在蒸馏水中进行;所述透析在室温(20-30℃)进行72h。

[0025] 其中,所述式I所示化合物与载体蛋白是在1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)和N-羟基琥珀酰亚胺(NSH)存在的条件下进行的偶联反应;所述式I所示化合物、所述载体蛋白、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)和N-羟基琥珀酰亚胺(NSH)的摩尔比具体可为40:1:80:120。

[0026] 上述式II所示化合物的制备方法中,所述载体蛋白的浓度可为10.05-16.67mg/mL,所述载体蛋白具体可为牛血清白蛋白,所述牛血清白蛋白的浓度具体可为10.05mg/mL。

[0027] 所述式I所示化合物或所述式I所示化合物的制备方法在制备式II所示化合物中的应用也属于本发明保护的范围。

[0028] 所述式I所示化合物或所述式II所示化合物,或,所述式I所示化合物的制备方法或所述式II所示化合物的制备方法在制备抗磺胺化合物抗体中的应用也属于本发明保护的

范围。
[0029] 利用所述式I所示化合物或所述式II所示化合物,或,所述式I所示化合物的制备方法或所述式II所示化合物的制备方法制备的抗磺胺化合物的抗体也属于本发明的保护范围,所述抗磺胺化合物的抗体可为单克隆抗体,也可为多克隆抗体。

[0030] 所述式I所示化合物或所述式II所示化合物,或,所述式I所示化合物的制备方法或所述式II所示化合物的制备方法,或,所述抗磺胺化合物的抗体在检测磺胺化合物中的应用也属于本发明保护的

范围。
[0031] 上文中,所述磺胺化合物可为磺胺间甲氧吡嗪、磺胺甲氧嘧啶、磺胺甲二唑、磺胺甲噻唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺二甲基异嘧啶、磺胺氯吡嗪、磺胺甲基异噻唑、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺喹噁啉、磺胺苯吡唑、柳氮磺胺吡啶、磺胺吡啶、磺胺二甲噻唑、磺胺噻唑、磺胺嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、酞磺胺噻唑、磺胺硝苯、磺胺胍、磺胺异噻唑、氨苯磺胺、磺胺苯酰、磺胺多辛、磺胺醋酰和磺酰胺基脲嘧啶。

[0032] 实验证明,以本发明所提供的方法制备的磺胺类结合抗原免疫动物后能够产生高效价、高亲和力和特异性强的抗血清,利用该抗血清采用酶联免疫吸附分析方法可以快速、灵敏、简便地检测磺胺类化合物。磺胺类标准品对于采用本发明的磺胺类结合抗原制备的磺胺类抗血清与磺胺类包被抗原结合反应的半数抑制量(IC₅₀)为3.56ng/mL-50.78ng/mL,采用本发明的磺胺类结合抗原制备的磺胺类抗血清对磺胺类标准品的最低检测限(LOD)为0.12ng/mL-1.22ng/mL。采用本发明的磺胺类结合抗原制备的磺胺类抗血清能够特异性地识别磺胺类标准品,对磺胺类标准品具有较高的亲和力。本发明的半抗原和结合抗原适用于对磺胺类化合物的检测。

附图说明

[0033] 图1为磺胺类半抗原及磺胺类结合抗原制备的流程图。

[0034] 图2为磺胺类半抗原的质谱图。

[0035] 图3为磺胺类半抗原的核磁共振氢谱图。

[0036] 图4为磺胺类结合抗原的MALDI-TOF-MS图。

具体实施方式

[0037] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。

[0038] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0039] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0040] 下述实施例中:2-甲氧基-4-氨基苯甲酸甲酯(Sigma-Aldrich,647616)、2-甲氧基-4-氨基苯甲酸甲酯(Sigma-Aldrich,335339)、N-乙酰氨基苯磺酰氯(阿拉丁试剂,A114795)、三乙胺(阿拉丁试剂,T103285)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(阿拉丁试剂,D109207)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)(Sigma-Aldrich,E6383)、N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)(阿拉丁试剂,H109330)、牛血清白蛋白(BSA)(阿拉丁试剂,A116563)、

HRP-羊抗兔IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 313-005-003)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB) (Sigma-Aldrich, 860336)。

[0041] 下述实施例中的磺胺标准品:磺胺二甲基嘧啶(SM₂) (Sigma-Aldrich, S6256)、磺胺甲二唑(SMZ) (Sigma-Aldrich, S5632)、磺胺二甲氧嘧啶(SDM) (Sigma-Aldrich, S7385)、磺胺喹噁啉(SQX) (Sigma-Aldrich, N13251)、磺胺氯哒嗪(SCP) (Sigma-Aldrich, S9882)。

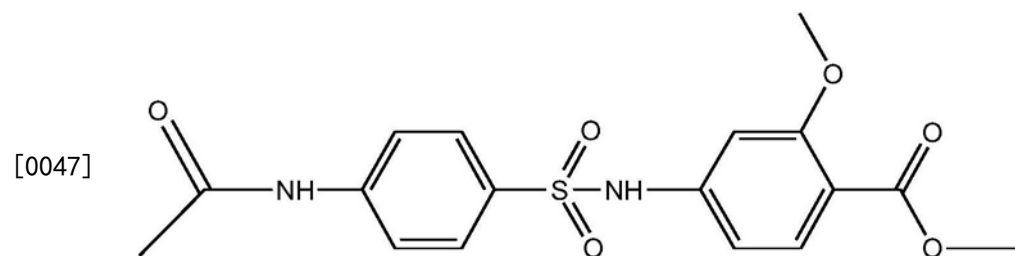
[0042] 下述实施例中:磺胺间甲氧哒嗪(Sigma-Aldrich, S7257)、磺胺甲氧嘧啶(Sigma-Aldrich, S7385)、磺胺甲噻唑(Sigma-Aldrich, 46901)、磺胺间甲氧嘧啶(Sigma-Aldrich, 32996)、磺胺二甲基异嘧啶(Sigma-Aldrich, 46908)、磺胺甲基嘧啶(Sigma-Aldrich, S6256)、磺胺二甲氧嘧啶(Sigma-Aldrich, S7385)、磺胺苯吡唑(Sigma-Aldrich, SS075802)、柳氮磺胺吡啶(Sigma-Aldrich, S0883)、磺胺甲基异噁唑(Sigma-Aldrich, S7507)、磺胺吡啶(Sigma-Aldrich, S6252)、磺胺二甲噁唑(Sigma-Aldrich, S5632)、磺胺噻唑(Sigma-Aldrich, 46902)、磺胺嘧啶(Sigma-Aldrich, S8626)、酞磺胺噻唑(Sigma-Aldrich, 46901)、磺胺硝苯(Sigma-Aldrich, 46882)、磺胺胍(阿拉丁试剂, S107128)、磺胺异噁唑(Sigma-Aldrich, S6377)、氨苯磺胺(Sigma-Aldrich, S9251)、磺胺苯酰(Sigma-Aldrich, 46762)、磺胺多辛(Sigma-Aldrich, 31736)、磺胺醋酰(阿拉丁试剂, S114284)和磺酰胺基脲嘧啶(CHEMSTEP, 17017-91-3)。

[0043] 下述实施例中的新西兰大白兔为北京维通利华实验动物技术有限公司产品, 产品目录号为S09045。

[0044] 实施例1、磺胺类半抗原的制备与鉴定

[0045] 一、磺胺类半抗原的制备

[0046] 将1mmol 2-甲氧基-4-氨基苯甲酸甲酯(或1mmol 4-(4-氨基苯基)丁酸)溶解于4mL 四氢呋喃中, 得到2-甲氧基-4-氨基苯甲酸甲酯的四氢呋喃溶液。向2-甲氧基-4-氨基苯甲酸甲酯的四氢呋喃溶液中加入150 μ L 三乙胺、0.5mmol 的4-二甲基吡啶和1mmol 的N-乙酰氨基苯磺酰氯, 充分搅拌均匀在水浴60 $^{\circ}$ C条件下反应2h。采用薄层色谱法确定反应的进展程度, 当比移值R_f为0.5左右时反应完全, 反应完全时加适量水淬灭反应, 得到淬灭反应的溶液。向淬灭反应的溶液中加入二氯甲烷进行萃取, 共进行萃取操作3次, 得到有机相; 向有机相中加入Na₂SO₄进行干燥, 得到干燥后的有机相; 将干燥后的有机相在35 $^{\circ}$ C进行真空浓缩, 得到式III所示的中间产物III:



式III。

[0048] 将式III所示的中间产物III加入到50mL浓度为24.03mg/mL的NaOH溶液中, 在95 $^{\circ}$ C条件下进行水解反应3h, 获得水解反应结束后的溶液。采用浓度为2mol/L的盐酸将水解反应结束后的溶液的pH值调节到4, 然后加入乙酸乙酯进行萃取, 重复萃取3次, 收集有机相溶液。向有机相中加入Na₂SO₄进行干燥, 得到干燥后的有机相; 将干燥后的有机相在50 $^{\circ}$ C进行

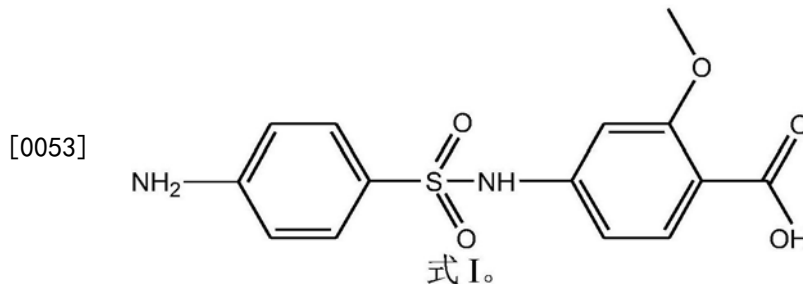
真空浓缩,得到浓缩后的样品。将浓缩后的样品溶于甲醇溶液中,通过硅胶色谱柱(Protein G亲和纯化柱,介质颗粒为50-160 μ m)进行分离纯化,硅胶色谱柱分离纯化中所用的淋洗液为Gly-HCl缓冲液(具体配方为3.75gGly和4.383gNaCl溶于500mL蒸馏水中,用HCl调节pH至2.8),得到分离纯化后的样品。将分离纯化后的样品溶解于乙酸乙酯和甲醇的混合液(v:v=1:1)中,磁力搅拌1h,最后进行抽滤并在60 $^{\circ}$ C条件下进行旋蒸,得到淡黄色晶体状的磺胺类半抗原80mg,产率为24.8%。

[0049] 二、磺胺类半抗原的鉴定

[0050] 步骤一的磺胺类半抗原(分子式为 $C_{14}H_{14}N_2O_5S$)的质谱(Synapt,Waters)鉴定结果:MS m/z $[M+H]^+$ 理论值:322;实测值:320.9(为去掉一个质子的分子量),与目标产物的分子量相吻合,质谱如图3。

[0051] 步骤一的磺胺类半抗原的核磁鉴定结果:(Bruker,300MHZ Advance核磁共振仪,特征峰值为 1H NMR(300MHz,DMSO- d_6), δ (ppm)11.43(br,s,1H,COOH),7.52(d,2H,J=8.61Hz,CHar),6.20(d,2H,J=8.5Hz,CHar),6.15(d,2H,J=8.5Hz,CHar),5.88(s,2H,NH $_2$),3.73(m,2H,O-CH $_2$),氢谱如图3。

[0052] 上述鉴定结果表明磺胺类半抗原的结构式为式I:



[0054] 实施例2、磺胺类结合抗原的制备与鉴定

[0055] 一、磺胺类结合抗原的制备

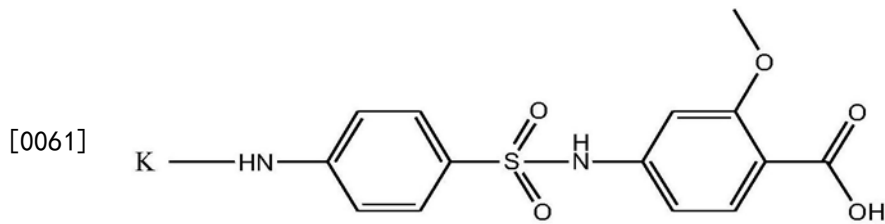
[0056] 将0.04mmol实施例1制备得到的磺胺类半抗原溶解于1.8mL二甲基甲酰胺(DMF)中,得到磺胺类半抗原的二甲基甲酰胺溶液。向磺胺类半抗原的二甲基甲酰胺溶液中加入0.12mmol的N-羟基琥珀酰亚胺(NSH)和0.08mmol的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl),在室温(20-30 $^{\circ}$ C)条件下置于磁力搅拌器上搅拌3h,反应得到溶液A;将60.3mg的牛血清白蛋白溶解于6mL浓度为0.05M的 Na_2CO_3 缓冲溶液(pH9.6)中,得到溶液B。在磁力搅拌下,将溶液A逐滴加入到溶液B中,室温(20-30 $^{\circ}$ C)搅拌4h,得到反应后的溶液。

[0057] 将反应后的溶液进行透析,所用透析膜的截留分子量为10000-14000,室温(20-30 $^{\circ}$ C)用蒸馏水透析72h,每12h换水一次,收集透析袋中的溶液得到磺胺类结合抗原,分装于安培瓶中,-20 $^{\circ}$ C保存。

[0058] 二、磺胺类结合抗原的鉴定

[0059] 步骤一的磺胺类结合抗原的质谱(Synapt,Waters)鉴定结果:MALDI-TOF-MS m/z $[M+H]^+$ 实测值:69186.79,质谱结果如图4,牛血清白蛋白的分子量为65867.88,证明结合抗原合成的成功,实施例1制备得到的磺胺类半抗原的分子量为322,其偶联率计算公式为:偶联率=(磺胺类结合抗原的分子量-牛血清白蛋白分子量)/磺胺类半抗原的分子量。计算得到磺胺类结合抗原的偶联率为10.3,即1个牛血清白蛋白与10.3个磺胺类半抗原偶联。

[0060] 上述鉴定结果表明磺胺类结合抗原的结构式如式II所示,K为牛血清白蛋白:



式 II。

[0062] 实施例3、磺胺类药物抗体血清制备及效价、灵敏性与特异性的测定

[0063] 相关溶液的配方如下：

[0064] 浓度为0.1M, pH值为7.2的PBS缓冲液的配制：溶液A：35.8g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1L去离子水, 得到浓度为0.1M的 Na_2HPO_4 溶液；溶液B：15.6g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1L去离子水, 得到浓度为0.1M的 NaH_2PO_4 溶液；将72mL溶液A和28mL溶液B混合后加入8.5g NaCl 混合均匀。

[0065] 浓度为0.01M, pH值为7.4的PBS缓冲液的配制：8g NaCl 、0.2g KCl 、3.53g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.24g KH_2PO_4 , 1L去离子水。

[0066] 浓度为0.02M, pH值为7.2的PBS缓冲液的配制：取浓度为0.1M, pH值为7.2的PBS缓冲液200mL, 加入去离子水800mL, 混匀。

[0067] 包被缓冲液：0.05mol/L、pH值为9.6的碳酸钠的水溶液： Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g, 加去离子水定容至1升。

[0068] 洗涤液：每1升洗涤液按照如下方法配制：将0.5mL吐温20、5g叠氮化钠和990mL浓度为0.01M, pH值为7.4的磷酸盐缓冲液混合, 得到所述洗涤液。

[0069] 封闭液：每1升封闭液按照如下方法配制：将50mgBSA、1g叠氮化钠、30g酪蛋白混合, 用浓度为0.02M, pH值为7.2的磷酸盐缓冲液溶解并定容至1000mL, 得到封闭液。

[0070] 一、磺胺类抗血清的制备

[0071] 新西兰大白兔6只, 随机分成实验组和对照组 (每组3只)；实验组以实施例2制备的磺胺类结合抗原溶液 (采用包被缓冲液稀释) 进行免疫, 对照组以牛血清白蛋白 (BSA) 溶液 (将BSA溶于包被缓冲液中) 进行免疫, 每只兔子每次免疫1mg/mL, 其中, 实施例2制备的磺胺类结合抗原的浓度以与其偶联的BSA浓度计, 每两周免疫一次, 共免疫6次。在第六次免疫之后7天, 每组兔子耳缘静脉采血, 制备血清, 得到磺胺类抗血清 (来自实验组) 和BSA抗血清 (来自对照组)。

[0072] 二、磺胺类抗血清的效价测定

[0073] 分别将步骤一制备的磺胺类抗血清和BSA抗血清进行间接竞争ELISA分析 (每孔均设三个重复孔), 具体步骤如下：

[0074] 1、包被：

[0075] 1.1磺胺类包被抗原的制备

[0076] 磺胺类包被抗原的结构式为实施例2的式 II, 其中K为血蓝蛋白 (KLH), 其制备过程与实施例2中磺胺类结合抗原制备过程相同, 将实施例2的BSA替换为血蓝蛋白 (KLH)。

[0077] 1.2包被

[0078] 用包被缓冲液溶解步骤1.1的磺胺类包被抗原, 得到如下浓度的磺胺类包被抗原溶液：100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.5625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每一浓度包被一行, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

[0079] 2、洗涤与封闭:倾去包被孔中的孔内液体,用洗涤液洗涤3次,每次3min;每孔加入150 μ L封闭液,37 $^{\circ}$ C恒温封闭1h,倾去孔内液体,然后用洗涤液洗涤3次,每次3min。

[0080] 3、加样:将50 μ L采用包被缓冲液按照如下比例1:204800、1:2048000、1:20480000、1:204800000、1:2048000000和1:20480000000进行倍比稀释的兔抗血清(磺胺类抗血清或BSA抗血清)加到酶标板上反应:,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C反应1h,倾去孔内液体,然后用洗涤液洗涤3次,每次3min;然后向每孔中加入100 μ L HRP-羊抗兔IgG,37 $^{\circ}$ C反应1h,倾去孔内液体,然后用洗涤液洗涤3次,每次3min。

[0081] 4、显色测定:每孔加入TMB溶液100 μ L,37 $^{\circ}$ C显色20min,然后每孔加入50 μ L浓度为2M的H₂SO₄以终止反应,最后用酶标仪测定各孔的OD_{450nm}值。

[0082] ELISA分析中:用高纯水代替兔血清作为空白对照。

[0083] 实验组:步骤一的磺胺类抗血清对浓度为12.5 μ g/mL的磺胺类包被抗原溶液的效价为1:20480000。

[0084] 对照组:步骤一的BSA抗血清,测定中均无显色反应,说明对照组未产生特异性针对磺胺类包被抗原的抗血清。

[0085] 结果表明,用实施例2的磺胺类结合抗原免疫兔子,可以获得高效价的磺胺类抗血清。

[0086] 三、最低检测限 (LOD) 和半数抑制量 (IC₅₀) 测定

[0087] 用包被缓冲液溶解磺胺标准品:磺胺二甲基嘧啶 (SM₂)、磺胺甲二唑 (SMZ)、磺胺二甲氧嘧啶 (SDM)、磺胺喹噁啉 (SQX) 和磺胺氯哒嗪 (SCP),分别配置成如下浓度梯度的溶液:10000ng/mL、1000ng/mL、100ng/mL、10ng/mL、1ng/mL和0.1ng/mL,作为实验溶液。采用6组平行试验 (n=6)。

[0088] 分别将步骤一采得的血样制备磺胺类抗血清,进行如下实验:

[0089] 1、包被:用包被缓冲液溶解步骤二制备的磺胺类包被抗原,得到磺胺类包被抗原浓度为12.5 μ g/mL的磺胺类包被抗原溶液,用该磺胺类包被抗原溶液包被实验孔,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C过夜。

[0090] 2、洗涤与封闭:倾去孔内液体,用洗涤液洗涤3次,每次3min;每孔加入150 μ L封闭液,37 $^{\circ}$ C恒温封闭1h,倾去孔内液体,然后用洗涤液洗涤3次,每次3min,得到酶标板。

[0091] 3、加样:

[0092] 3.1、标准品孔

[0093] 用包被缓冲液将步骤一的磺胺类抗血清稀释20480000倍得到磺胺类抗血清稀释液,将50 μ L磺胺类抗血清稀释液与50 μ L上述任一种浓度的磺胺类标准品溶液加到酶标板上,37 $^{\circ}$ C反应1h,倾去孔内液体,然后用洗涤液洗涤3次,每次3min;然后向每孔中加入100 μ L HRP-羊抗兔IgG,37 $^{\circ}$ C反应1h,倾去孔内液体,然后用洗涤液洗涤3次,每次3min。

[0094] 3.2、阴性对照孔

[0095] 与3.1的区别仅在于将磺胺类标准品溶液替换为等体积的高纯水,其它步骤不变。

[0096] 3.3、空白对照孔

[0097] 与3.1的区别仅在于将空白孔为将添加的磺胺类抗血清稀释液替换为高纯水,其它步骤不变。

[0098] 4、显色测定:每孔加入TMB溶液100 μ L,37 $^{\circ}$ C反应20min,然后每孔加入50 μ L浓度为

2M的H₂SO₄以终止反应,最后用酶标仪测定各孔的OD_{450nm}值。

[0099] 以OD_{450nm}值为纵坐标,以磺胺类标准品溶液浓度的log₁₀值为横坐标,绘制半对数标准曲线图。标准曲线具有完整的反S形状,并具有上平台和下平台,标准曲线的平行测定次数6次,实验重复性良好,相对标准偏差(变异系数)均在20%以内。

[0100] 根据标准曲线得出10%抑制量和半数抑制量(IC₅₀),比较检测灵敏度。

[0101] 抑制率用以下式计算:

$$[0102] \quad \text{抑制率(\%)} = \frac{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min}) - (\text{OD}_x - \text{OD}_{\min})}{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min})} \times 100\%$$

[0103] 式中:OD_{max}为不加标准品时的吸光值(即阴性对照),OD_x为标准品浓度为x时的吸光值,OD_{min}为空白对照孔的吸光值。

[0104] 结果如表1所示,磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲二唑、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺喹噁啉和磺胺氯哒嗪对磺胺类抗血清与磺胺类包被抗原结合反应的半数抑制量(IC₅₀)分别为50.78ng/mL、3.56ng/mL、10.34ng/mL、12.18ng/mL和9.75ng/mL;磺胺类抗血清对磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲二唑、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺喹噁啉和磺胺氯哒嗪最低检测限(LOD)分别为1.22ng/mL、0.12ng/mL、0.97ng/mL、3.98ng/mL和0.15ng/mL。与阴性对照(未加磺胺类标准品溶液)相比,加入磺胺类标准品溶液后,吸光值呈明显的梯度递减趋势,说明获得的磺胺类抗血清能够特异性地识别磺胺类标准品,对磺胺类标准品具有较高的亲和力。

[0105] 表1、磺胺类标准品的最低检测限(LOD)和半数抑制量(IC₅₀)测定结果

[0106]

磺胺类化合物	最低检测限(LOD)/(ng/mL)	半数抑制量(IC ₅₀)/(ng/mL)
磺胺二甲基嘧啶	1.22	50.78
磺胺甲二唑	0.12	3.56
磺胺二甲氧嘧啶	0.97	10.34
磺胺喹噁啉	3.98	12.18
磺胺氯哒嗪	0.15	9.75

[0107] 四、磺胺类抗血清特异性测定

[0108] 根据实施例3中的步骤三,测定磺胺类抗血清对如下磺胺类化合物对磺胺类抗血清与磺胺类包被抗原结合反应的半数抑制量(IC₅₀):磺胺二甲基嘧啶、磺胺间甲氧哒嗪、磺胺甲氧嘧啶、磺胺甲噻唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺二甲基异嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺苯吡唑、柳氮磺胺吡啶、磺胺甲基异噁唑、磺胺吡啶、磺胺二甲噁唑、磺胺噻唑、磺胺嘧啶、酞磺胺噻唑、磺胺硝苯、磺胺胍、磺胺异噁唑、氨苯磺胺、磺胺苯酰、磺胺多辛、磺胺醋酰和磺酰胺基脲嘧啶,浓度梯度如下:10000ng/mL、1000ng/mL、100ng/mL、10ng/mL、1ng/mL和0.1ng/mL。按照下式计算各竞争物的IC₅₀。

[0109] 交叉反应率 = IC₅₀(磺胺二甲基嘧啶) / IC₅₀(竞争物) × 100%

[0110] 结果显示,磺胺类抗血清对参与检测的27种磺胺类药物中的22种药物,包括磺胺间甲氧哒嗪、磺胺甲氧嘧啶、磺胺甲二唑、磺胺甲噻唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺二甲基异嘧啶、磺胺氯哒嗪、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺苯吡唑、柳氮磺胺吡啶、磺胺喹噁啉、磺胺甲基异噁唑、磺胺吡啶、磺胺二甲噁唑、磺胺噻唑、磺胺嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、酞磺胺噻唑、磺胺硝苯、磺胺胍、磺胺异噁唑均有较好的交叉反应(交叉反应率在30.86%~5519%)

之间),对氨苯磺胺和磺胺苯酰的交叉反应率一般(在1%-10%之间),但对磺胺多辛、磺胺醋酰和磺酰胺基脲嘧啶的交叉反应率则较低(<1%)。

[0111] 表2、磺胺类抗血清对磺胺类化合物的半数抑制量(IC₅₀)测定结果

[0112]

中文名称	IC ₅₀ (ng/mL)	交叉反应率(%)
磺胺间甲氧哒嗪	0.92	5519.57
磺胺甲氧嘧啶	1.47	3454.42

[0113]

磺胺甲二唑	3.56	1426.40
磺胺甲噻唑	3.71	1368.73
磺胺间甲氧嘧啶	5.12	991.80
磺胺二甲基异嘧啶	6.49	782.43
磺胺氯哒嗪	9.75	520.82
磺胺甲基异噁唑	10.31	492.53
磺胺二甲氧嘧啶	10.34	491.10
磺胺甲基嘧啶	11.50	441.57
磺胺喹噁啉	12.18	416.91
磺胺苯吡唑	15.01	338.31
柳氮磺胺吡啶	15.16	334.96
磺胺吡啶	23.68	214.44
磺胺二甲噁唑	25.51	199.06
磺胺噻唑	37.70	134.69
磺胺嘧啶	37.88	134.05
磺胺二甲基嘧啶	50.78	100.00
酞磺胺噻唑	85.69	59.26
磺胺硝苯	119.90	42.35
磺胺胍	127.74	39.75
磺胺异噁唑	164.53	30.86
氨苯磺胺	2122.37	2.39
磺胺苯酰	2349.00	2.16
磺胺多辛	8786.15	0.58
磺胺醋酰	>10000	<0.1
磺酰胺基脲嘧啶	>10000	<0.1

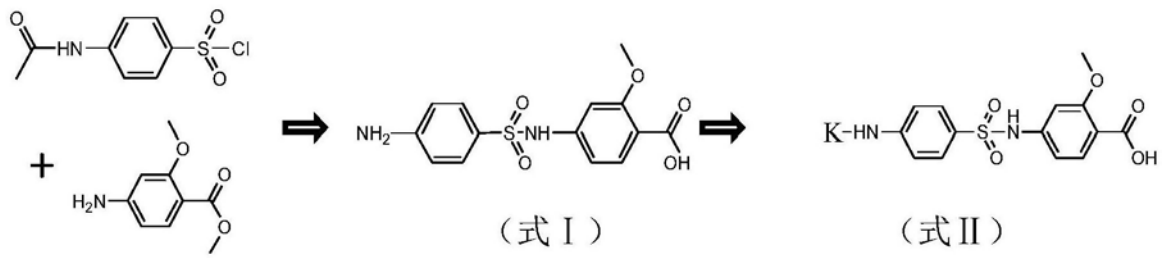


图1

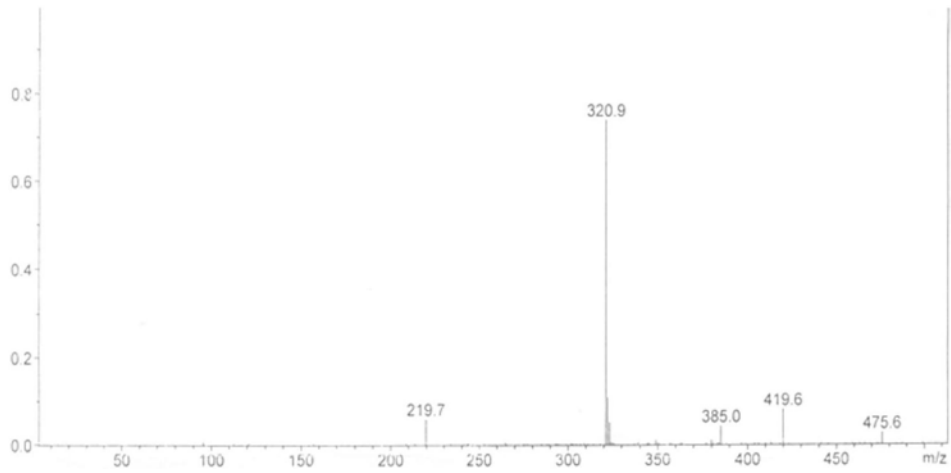


图2

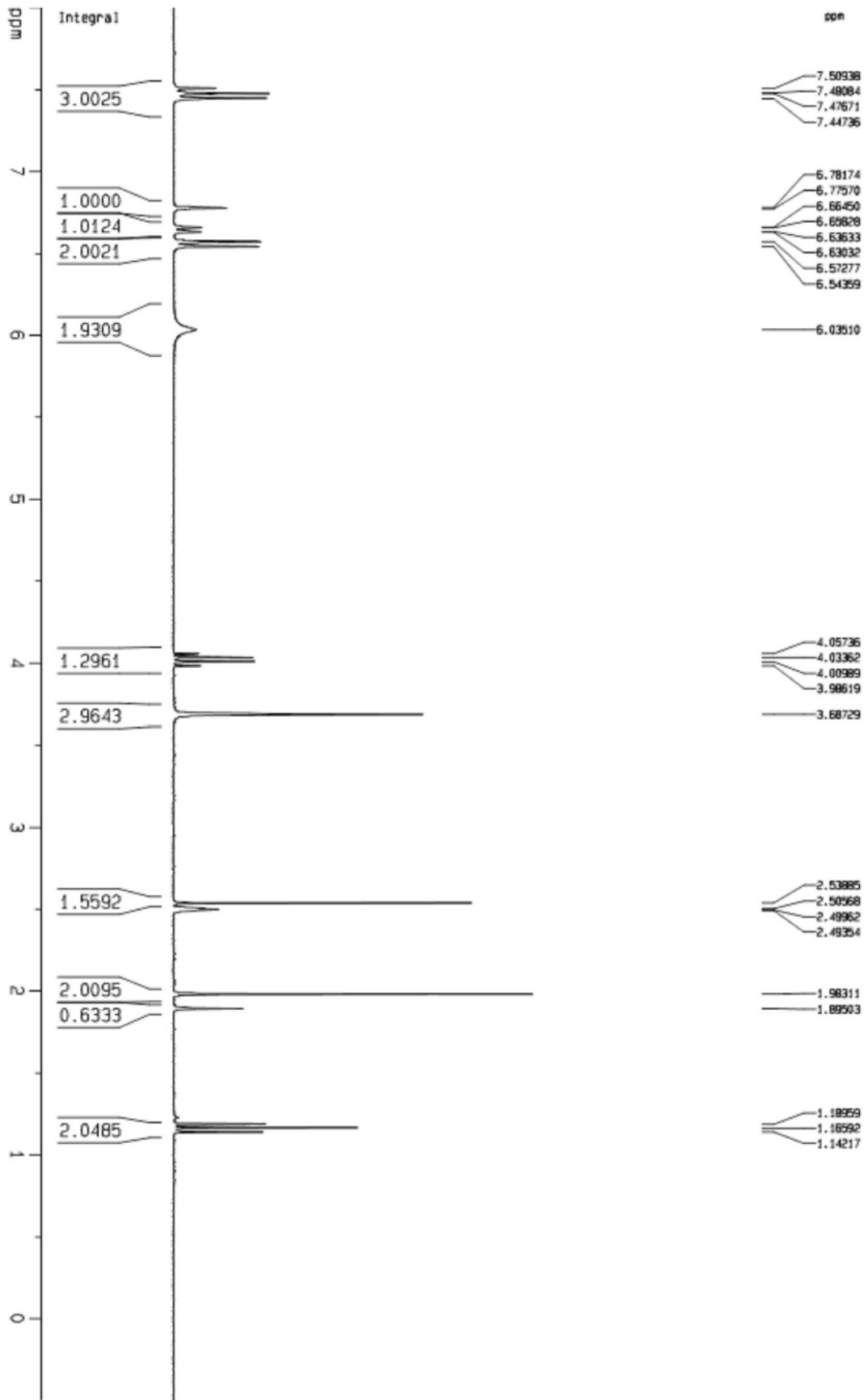


图3

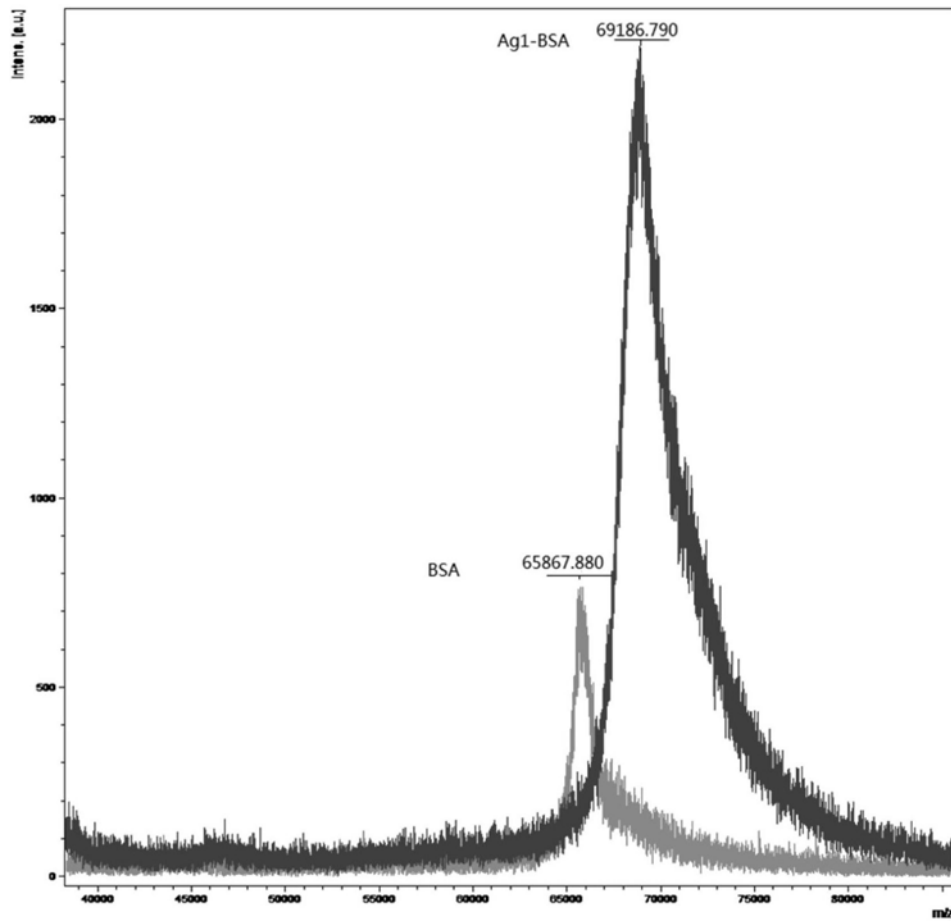


图4

专利名称(译)	磺胺类半抗原及其结合抗原的制备方法与应用		
公开(公告)号	CN106543049B	公开(公告)日	2018-09-14
申请号	CN201610941345.6	申请日	2016-10-25
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	王战辉 沈建忠 史为民 张素霞 温凯 梁晓 曹艳欣		
发明人	王战辉 沈建忠 史为民 张素霞 温凯 梁晓 曹艳欣		
IPC分类号	C07C311/44 C07C303/40 C07K14/47 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/535		
CPC分类号	C07C303/38 C07C303/40 C07C311/44 C07K14/47 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/535 C07C311/46		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	王一婷		
其他公开文献	CN106543049A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了磺胺类半抗原及其结合抗原的制备方法与应用。该磺胺类半抗原及其结合抗原的结构式分别如式I和式II所示。该磺胺类结合抗原免疫动物后能够产生高效价、高亲和力和特异性强的抗血清，采用酶联免疫吸附分析方法可以快速、灵敏、简便地检测磺胺类化合物。磺胺类标准品对于采用本发明的结合抗原制备的磺胺类抗血清与磺胺类包被抗原结合反应的半数抑制量(IC₅₀)为3.56ng/mL-50.78ng/mL，磺胺类抗血清对磺胺类标准品的最低检测限(LOD)为0.12ng/mL-1.22ng/mL。本发明的半抗原和结合抗原适用于对磺胺类化合物的检测。

