



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103641909 A

(43) 申请公布日 2014.03.19

(21) 申请号 201310681540.6

(22) 申请日 2013.12.16

(71) 申请人 福州大学

地址 350108 福建省福州市闽侯县上街镇大学城学园路2号福州大学新区

(72) 发明人 石贤爱 郑友世

(74) 专利代理机构 福州元创专利商标代理有限公司 35100

代理人 蔡学俊

(51) Int. Cl.

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/77 (2006.01)

C07K 1/107 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

呋喃西林偶联抗原的制备方法及其偶联抗原与应用

(57) 摘要

本发明提供一种呋喃西林偶联抗原的制备方法及其偶联抗原与应用,其中抗原制备方法包括以下步骤:将呋喃西林溶解于甲醇中,再加入甲醛溶液,呋喃西林与甲醛的摩尔比为1:1~2.5,制成溶液A;将载体蛋白溶解在pH为6.0~7.5的缓冲溶液中,制成溶液B;将溶液A加入到溶液B中,混合均匀后在4~43℃下反应,反应时间为0.5~3d,收集反应液,分离纯化后,得到呋喃西林偶联抗原,其中,呋喃西林与载体蛋白的摩尔比20~120:1。本发明所制得的呋喃西林偶联抗原的偶联比可达到15以上,以此呋喃西林偶联抗原免疫小鼠,可产生抗呋喃西林的特异性抗体,此抗体可用于快速检测呋喃西林的含量。

1. 一种呋喃西林偶联抗原的制备方法,包括以下步骤:

(1) 将呋喃西林溶解于甲醇中,再加入甲醛溶液,呋喃西林与甲醛的摩尔比为 1:1~2.5,制成溶液 A;

(2) 将载体蛋白溶解在 pH 为 6.0~7.5 的缓冲溶液中,制成溶液 B;

(3) 将步骤(1)的溶液 A 加入到步骤(2)的溶液 B 中,混合均匀后在 4~43℃下反应,反应时间为 0.5~3d,收集反应液,分离纯化后,得到呋喃西林偶联抗原,其中,呋喃西林与载体蛋白的摩尔比 20~120:1。

2. 根据权利要求 1 所述的一种呋喃西林偶联抗原的制备方法,其特征在于:步骤(2)中的载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

3. 根据权利要求 1 所述的一种呋喃西林偶联抗原的制备方法,其特征在于:步骤(2)中呋喃西林与载体蛋白的摩尔比为 20~30:1。

4. 根据权利要求 1 所述的一种呋喃西林偶联抗原的制备方法,其特征在于:步骤(3)中反应温度为 25~38℃。

5. 根据权利要求 1 所述的一种呋喃西林偶联抗原的制备方法,其特征在于:步骤(3)的反应时间为 0.8~1d。

6. 一种如权利要求 1 所述的一种呋喃西林偶联抗原的制备方法制备所得到的呋喃西林偶联抗原。

7. 一种如权利要求 1 所述的一种呋喃西林偶联抗原的制备方法制备所得到的呋喃西林偶联抗原在检测呋喃西林中的应用。

呋喃西林偶联抗原的制备方法及其偶联抗原与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种呋喃西林偶联抗原的制备方法及其偶联抗原与应用,属于生物制药领域。

背景技术

[0002] 呋喃西林(nitrofurazone, NFZ),分子式 $C_6H_6N_4O_4$,化学名为 5-硝基-2-呋喃甲醛缩氨基脲,其化学结构如图 1 所示。

[0003] 呋喃西林为亮黄色结晶性粉末,日光下色渐变深黄色。呋喃西林在水中的溶解度低,易溶于极性较大的有机溶剂。在 5% 的甲醇溶液中,呋喃西林的紫外最大吸收波长为 260 nm 和 376.5 nm。

[0004] 呋喃西林是一种人工合成的抗菌药,作为兽药得到广泛的应用。呋喃西林具有较高的电子亲和力,对细胞染色体损伤作用较强,5-硝基促进了呋喃环的稳定性,并促进了呋喃西林与 DNA 结合,导致 DNA 发生变异,并且,5-硝基作为亲电子基团,易结合谷胱甘肽(GSH),发生毒性反应。呋喃西林不仅自身具有毒性作用、致癌致畸作用,而且其代谢产物与体内蛋白紧密结合,形成稳定残留物,无法快速有效的降解,对人类的健康也构成了极大的危害。因此,世界上各个国家和地区对呋喃西林的使用严加监管,美国 1993 年禁止呋喃西林作为兽药使用。欧盟在 1995 年禁止使用呋喃西林。2002 年 4 月,我国农业部第 193 号公告(食品动物禁用的兽药及其它化合物清单)将硝基呋喃类药物列为禁止使用的药物。2003 年开始,我国将硝基呋喃纳入残留监控计划中。但是,由于呋喃西林具有杀菌能力强、抗菌谱广、不易产生耐药性、价格低廉、疗效好等性质,仍有一些国家和地区使用此类药物。因此,对呋喃西林的检测显的尤为重要。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种呋喃西林偶联抗原的制备方法及其偶联抗原与应用,采用甲醛加成法制备呋喃西林偶联抗原可得到较高的偶联率,并且,在采用甲醛加成法制备呋喃西林偶联抗原的过程中,pH 值的选择非常关键,所制得的呋喃西林偶联抗原的偶联比达到 15 以上,且可得到具有良好特异性的抗体。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

一种呋喃西林偶联抗原的制备方法,包括以下步骤:

(1) 将呋喃西林溶解于甲醇中,再加入甲醛溶液,呋喃西林与甲醛的摩尔比为 1:1~2.5,制成溶液 A;

(2) 将载体蛋白溶解在 pH 为 6.0~7.5 的缓冲溶液中,制成溶液 B;

(3) 将步骤(1)的溶液 A 加入到步骤(2)的溶液 B 中,混合均匀后在 4~43℃ 下反应,反应时间为 0.5~3d,收集反应液,分离纯化后,得到呋喃西林偶联抗原,其中,呋喃西林与载体蛋白的摩尔比 20-120:1。

[0007] 步骤(2)中的载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA)或卵清蛋白(OVA)等,最优选为 BSA。

[0008] 步骤(2)中呋喃西林与载体蛋白的摩尔比优选为 20~30:1,可在保证制得的呋喃西林偶联抗原具有较高偶联比(偶联比> 15)的前提下,大大提高呋喃西林的利用率,避免呋喃西林的浪费,节约成本。

[0009] 步骤(3)中反应温度为 25~38℃。

[0010] 步骤(3)的反应时间为 0.8~1d,节约时间。

[0011] 所述的一种呋喃西林偶联抗原的制备方法制备所得到的呋喃西林偶联抗原。

[0012] 所述的一种呋喃西林偶联抗原的制备方法制备所得到的呋喃西林偶联抗原在检测呋喃西林中的应用。

[0013] 本发明所制得的呋喃西林偶联抗原的偶联比可达到 15.53~33.42,即呋喃西林偶联抗原中每个载体蛋白分子上连接 15~34 个呋喃西林分子,以此呋喃西林偶联抗原免疫小鼠,可产生抗呋喃西林的特异性抗体。

[0014] 根据上述呋喃西林偶联抗原的制备方法所制得的呋喃西林偶联抗原属于本发明的保护范围。

[0015] 本发明的优点在于:目前为止,国内外尚未见到关于呋喃西林偶联抗原偶联制备方法的相关报道。呋喃西林偶联抗原的结构式中带有氨基,对于本领域一般技术人员来说,对于带有氨基的半抗原来说,常用的抗原偶联方法为重氮化法和戊二醛法。但是,本申请人在研究呋喃西林偶联抗原的制备方法时,发现采用此两种常用的偶联方法来制备呋喃西林偶联抗原,得到的呋喃西林偶联抗原中呋喃西林与载体蛋白的偶联比极低(为 5 以下),即每个载体蛋白分子上连接的呋喃西林的数量不超过 5 个,偶联比低直接影响偶联抗原的免疫原性。本申请人在经过无数次尝试和试验后,发现采用甲醛加成法制备呋喃西林偶联抗原可得到较高的偶联率,并且,在采用甲醛加成法制备呋喃西林偶联抗原的过程中,pH 值的选择非常关键,在已报道的采用甲醛加成法合成其他药物抗原的报道中,大多数采用的 pH 值为 4.2,但是,本申请人突破常规思维,在呋喃西林偶联抗原制备过程中采用 pH 值为 6.0~7.5,得到了未预料到的技术效果,所制得的呋喃西林偶联抗原的偶联比达到 15 以上,且可得到具有良好特异性的抗体。

附图说明

[0016] 图 1 为本发明的呋喃西林的分子结构图。

[0017] 图 2 为本发明的呋喃西林偶联抗原的紫外光谱图;其中 a 为 1mg/ml BSA 溶液的紫外扫描图,b 为 1mg/ml 呋喃西林溶液的紫外扫描图,c 为实施例 1 的呋喃西林偶联蛋白(NFZ-BSA)的紫外扫描图。

[0018] 图 3 为本发明的呋喃西林偶联抗原的液相色谱图;其中 A 为 1mg/ml 实施例 1 的呋喃西林偶联蛋白(NFZ-BSA)在 376.5 nm 光谱下的液相色谱图,B 为 1mg/ml 实施例 1 的呋喃西林偶联蛋白(NFZ-BSA)在 278nm 光谱下的液相色谱图。

具体实施方式

[0019] 实施例 1

(一)呋喃西林偶联抗原的制备方法的具体步骤为:

(1)将 4.8mg 呋喃西林溶解于甲醇中,再加入 12ml 质量分数为 37% 的甲醛,即呋喃西

林与甲醛的摩尔比为 1:1.8, 制成溶液 A;

(2) 将 13.5mg BSA 溶解在 pH 为 6.0 的乙酸钠溶液中, 制成溶液 B;

(3) 将步骤(1)的溶液 A 加入到步骤(2)的溶液 B 中, 混合均匀后在 35℃下反应 1d, 收集反应液。其中, 呋喃西林与 BSA 的摩尔比为 120:1。

[0020] 呋喃西林偶联抗原(即 NFZ-BSA)的分离纯化: 将上述反应液经过 Sephadex G-25 葡聚糖凝胶柱层析上样吸附, 冲洗层析柱, 洗脱去除过量的反应溶剂和反应物, 洗脱液为 0.01 mol/L PBS(pH= 7.4)缓冲液, 流速为 1.0 mL/min; 最后, 采用分部收集器收集, 进行紫外检测。当然, 呋喃西林偶联抗原的分离纯化也可采用透析法进行, 透析法的具体步骤为: 使用 PBS 对反应液进行透析, 采用的透析袋孔径为 2.5nm, 每 2h 换液一次, 换液 2~3d 后得到袋中溶液即为呋喃西林偶联抗原溶液, 进行紫外检测。但是, 采用 Sephadex G-25 葡聚糖凝胶柱层析进行分离纯化得到的呋喃西林偶联抗原溶液中呋喃西林偶联抗原的纯度更高, 计算所得的偶联比也更可靠。

[0021] (二) NF 偶联抗原的鉴定

(1) 紫外检测: 采用 UV-1800 紫外分光光度仪, 分别对呋喃西林和 BSA 标准品溶液进行全波长扫描(190nm ~ 800nm), 确定其特征吸收波长, 其中, 呋喃西林的特征吸收峰波长为 260 nm 和 376.5 nm; BSA 的特征吸收峰波长为 278nm。对经 G-25 凝胶层析柱分离纯化后的偶联产物(即 NFZ-BSA 偶联产物)进行检测, 检测偶联物在该波长附近范围的特征吸收峰情况(NFZ-BSA 偶联产物的紫外全波长扫描图见图 2)。

[0022] 偶联比的计算方式为: 根据所测定的 NFZ-BSA 在波长 278 nm 和 376.5 nm 的吸光度, 以及 NFZ 和 BSA 在这两种波长下的摩尔吸光系数, 偶联物的偶联比可按下列公式计算。

[0023]

$$\frac{C_{NFZ}}{C_{BSA}} = \frac{A_{278} / K_{BSA, 376.5} - A_{376.5} / K_{BSA, 278}}{A_{376.5} / K_{NFZ, 278} - A_{278} / K_{NFZ, 376.5}}$$

其中, C_{NFZ}/C_{BSA} 为 NFZ-BSA 分子中 NFZ 与 BSA 的偶联比, A_{278} 、 $A_{376.5}$ 为其在波长 278 nm 和 376.5 nm 的吸光度, $K_{BSA, 376.5}$ 、 $K_{BSA, 278}$ 、 $K_{NFZ, 278}$ 和 $K_{NFZ, 376.5}$ 为 NFZ 和 BSA 在这二种波长下的摩尔吸光系数。计算得实施例所制得的呋喃西林偶联抗原(NFZ-BSA)中 NFZ 与 BSA 的偶联比为 33.52。

[0024] (2) 对偶联产物进行液相色谱 HPLC 检测: 呋喃西林 NFZ 的紫外特征吸收峰(376.5 nm)与蛋白质的紫外特征吸收峰(280 nm)同时出峰(见图 3), 说明呋喃西林与蛋白偶联成功。

实施例 2

(一) 呋喃西林偶联抗原的制备方法的具体步骤为:

(1) 将 1.8mg 呋喃西林溶解于甲醇中, 再加入 0.25ml 质量分数为 37% 的甲醛, 制成溶液 A, 其中, 呋喃西林与甲醛的摩尔比为 1 : 1;

(2) 将 20.3mg BSA 溶解在 pH 为 7.5 的乙酸钠溶液中, 制成溶液 B;

(3) 将步骤(1)的溶液 A 加入到步骤(2)的溶液 B 中, 混合均匀后在 4℃下反应 1d, 收集反应液。其中, NFZ 与 BSA 的摩尔比为 30:1。

[0025] 呋喃西林偶联抗原的分离纯化步骤与实施例 1 相同。

[0026] (二) 呋喃西林偶联抗原的鉴定

(1) 经过紫外检测, 计算得呋喃西林偶联抗原(NFZ-BSA 偶联产物) 中 NFZ 与 BSA 的偶联比为 15.53。

[0027] (2) 经过液相色谱检测, 呋喃西林的紫外特征吸收峰(376.5 nm) 与蛋白质的紫外特征吸收峰(280 nm) 同时出峰, NFZ 与 BSA 偶联成功。

[0028] 实施例 3

(一) 呋喃西林偶联抗原的制备方法的具体步骤为:

(1) 将 2mg 呋喃西林溶解于甲醇中, 再加入 0.695ml 质量分数为 37% 的甲醛, 制成溶液 A, 其中, 呋喃西林与甲醛的摩尔比为 1 : 2.5 ;

(2) 将 33.8mg BSA 溶解在 pH 为 7.2 的乙酸钠溶液中, 制成溶液 B ;

(3) 将步骤(1)的溶液 A 加入到步骤(2)的溶液 B 中, 混合均匀后在 43℃ 下反应 3d, 收集反应液。其中, NFZ 与 BSA 的摩尔比为 20:1。

[0029] 呋喃西林偶联抗原的分离纯化步骤与实施例 1 相同。

[0030] (二) 呋喃西林偶联抗原的鉴定

(1) 经过紫外检测, 计算得呋喃西林偶联抗原(NFZ-BSA 偶联产物) 中 NFZ 与 BSA 的偶联比为 30.71。

[0031] (2) 经过液相色谱检测, 呋喃西林的紫外特征吸收峰(376.5 nm) 与 BSA 的紫外特征吸收峰(280 nm) 同时出峰, NFZ 与 BSA 偶联成功。

[0032] 实施例 4

(一) 呋喃西林偶联抗原的制备方法的具体步骤为:

(1) 将 2mg 呋喃西林溶解于甲醇中, 再加入 0.5ml 质量分数为 37% 的甲醛, 制成溶液 A, 其中, 呋喃西林与甲醛的摩尔比为 1 : 1.8 ;

(2) 将 27mg BSA 溶解在 pH 为 7.5 的乙酸钠溶液中, 制成溶液 B ;

(3) 将步骤(1)的溶液 A 加入到步骤(2)的溶液 B 中, 混合均匀后在 38℃ 下反应 0.8d, 收集反应液。其中, NFZ 与 BSA 的摩尔比为 25:1。

[0033] 呋喃西林偶联抗原的分离纯化步骤与实施例 1 相同。

[0034] (二) 呋喃西林偶联抗原的鉴定

(1) 经过紫外检测, 计算得呋喃西林偶联抗原(NFZ-BSA 偶联产物) 中 NFZ 与 BSA 的偶联比为 31.94。

[0035] (2) 经过液相色谱检测, 呋喃西林的紫外特征吸收峰(376.5 nm) 与 BSA 的紫外特征吸收峰(280 nm) 同时出峰, NFZ 与 BSA 偶联成功。

[0036] 实施例 5

(一) 呋喃西林偶联抗原的制备方法的具体步骤为:

(1) 将 2mg 呋喃西林溶解于甲醇中, 再加入 0.5ml 质量分数为 37% 的甲醛, 制成溶液 A, 其中, 呋喃西林与甲醛的摩尔比为 1 : 1.8 ;

(2) 将 4.5mg OVA 溶解在 pH 为 7.0 的乙酸钠溶液中, 制成溶液 B ;

(3) 将步骤(1)的溶液 A 加入到步骤(2)的溶液 B 中, 混合均匀后在 25℃ 下反应 0.9d, 收集反应液。其中, NFZ 与 BSA 的摩尔比为 100:1。

[0037] 呋喃西林偶联抗原的分离纯化步骤与实施例 1 相同。

[0038] (二) 呋喃西林偶联抗原的鉴定

(1) 经过紫外检测, 计算得呋喃西林偶联抗原(NFZ-OVA 偶联产物)中 NFZ 与 OVA 的偶联比为 21.87。NFZ-OVA 分子中 NFZ 与 OVA 的偶联比的计算方式与 NFZ-BSA 中 NFZ 与 BSA 的偶联比计算方式相同。

[0039] (2) 经过液相色谱检测, 呋喃西林的紫外特征吸收峰(376.5 nm)与 OVA 的紫外特征吸收峰(278nm)同时出峰, 呋喃西林与 OVA 偶联成功。

[0040] 目前为止, 国内、外尚未见到关于呋喃西林偶联抗原偶联制备方法的相关报道。呋喃西林偶联抗原的结构式中带有氨基, 对于本领域一般技术人员来说, 对于带有氨基的半抗原来讲, 常用的抗原偶联方法为重氮化法和戊二醛法。但是, 本申请人在研究呋喃西林偶联抗原的制备方法时, 发现采用此两种常用的偶联方法来制备呋喃西林偶联抗原, 得到的呋喃西林偶联抗原中呋喃西林与载体蛋白的偶联比极低(为 5 以下), 即每个载体蛋白分子上连接的呋喃西林的数量不超过 5 个, 偶联比低直接影响偶联抗原的免疫原性。本申请人在经过无数次尝试和试验后, 发现采用甲醛加成法制备呋喃西林偶联抗原可得到较高的偶联率, 并且, 在采用甲醛加成法制备呋喃西林偶联抗原的过程中, pH 值的选择非常关键, 在已报道的采用甲醛加成法合成其他药物抗原的报道中, 大多数采用的 pH 值为 4.2, 但是, 本申请人突破常规思维, 在呋喃西林偶联抗原制备过程中采用 pH 值为 6.0~7.5, 得到了未预料到的技术效果, 所制得的呋喃西林偶联抗原的偶联比达到 15 以上, 且, 可得到具有良好特异性的抗体。

[0041] 当然, 本发明的载体蛋白也可采用常见的血蓝蛋白或人血清白蛋白等。

[0042] 采用实施例 1 所制得的呋喃西林偶联抗原(即 NFZ-BSA 偶联产物)进行免疫试验, 制备抗呋喃西林多克隆抗体:

选取 8 周龄的 Balb/c 小鼠, 每只小鼠每次免疫剂量为 3.0 μ g 的呋喃西林, 首次免疫将实施例 1 制得的 NFZ-BSA 偶联产物(即 NFZ-BSA 偶联产物作为免疫抗原)与等体积的弗氏完全佐剂混合, 形成油包水的结构, 进行腹腔注射。此后每隔 14 天加强免疫一次, 免疫抗原与弗氏不完全佐剂等体积混合, 腹腔注射。共进行 4 次免疫。第 4 次免疫后, 小鼠尾静脉采血, 血清样本经 4 $^{\circ}$ C 静置, 过夜处理, 经 3000 rpm 离心 5 min, 收集上清液, 即为多抗血清。采用上述实施例 5 所制得的 NFZ-OVA 偶联产物作为免疫检测抗原, 间接非竞争 ELISA 检测方法检测抗血清的效价为 1:66500。

[0043] 所述的间接非竞争 ELISA 检测方法的具体步骤为:(1)包被:用碳酸盐缓冲液(0.05 mol/L, pH 9.5)稀释实施例 5 的 NFZ-OVA 偶联产物至蛋白浓度为 20 μ g/mL, 包被于酶标条孔中, 100 μ L/孔, 4 $^{\circ}$ C 静置过夜;(2)洗涤:倒去包被液, 用 300 μ L/孔的 PBST 洗涤 3 次, 4 min/次, 扣干;(3)封闭:加入 200 μ L/孔 5% 脱脂奶, 37 $^{\circ}$ C 封闭静置过夜;倾去封闭液, 用(2)方法洗涤;(4)加一抗:加入 100 μ L/孔 PBS 倍比稀释的抗血清, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h; 倒去抗血清, 用(2)方法洗涤;(5)加二抗:HRP-羊抗小鼠 IgG 稀释 2000 倍, 加入 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h; 倒去酶标二抗, 用(2)方法洗涤;(6)显色:加入底物 TMB 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 避光反应 15 min; 加入 2mol/L H₂SO₄ 100 μ L/孔, 以终止反应。用酶标仪测定 450 nm 的吸光度值(A₄₅₀);(7)结果判定:测定过程中, 设置阴性对照和空白对照。测定结果, 当 2.1 \times (阴性对照 - 空白对照) \leq (阳性血清 - 空白对照), 且阴性对照的 A₄₅₀ 大于 0.1, 此时的抗体稀释倍数即是该抗体的效价。

[0044] 采用间接竞争 ELISA 方法检测抗呋喃西林多抗血清的抗体特异性。计算得呋喃西林的浓度的 IC_{50} 值为 90.40ng/ml, 最低检测限为 12.63 ng/ml。可见, 甲醛加成法制备人工抗原免疫小鼠, 能够获得具有较好的亲和力和良好特异性的多抗血清。

[0045] 所述的间接竞争 ELISA 方法的具体操作为: 将呋喃西林标准品 1 mg 溶于 1 ml 甲醇溶液中, 将呋喃西林标准品倍比稀释成浓度分别为: 10000 ng/ml、1000 ng/ml、200 ng/ml、120 ng/ml、60 ng/ml、30 ng/ml、10 ng/ml、1 ng/ml 的标准液。将呋喃西林标准液与适当溶度的抗血清等体积混合, 加入 100 μ L/孔混合液, 同时设置阳性对照组、阴性对照组和空白对照组, 37°C 孵育 2 h。结果判定: 以结合率为纵坐标, 以呋喃西林的浓度的对数值为横坐标, 绘制竞争曲线, 以 A_{450} 的值判断抗呋喃西林抗体与呋喃西林的竞争反应情况, 判断抗体的特异性。以抗呋喃西林特异性抗体对呋喃西林的竞争抑制率为纵坐标, 以呋喃西林浓度的对数值为横坐标, 绘制标准竞争曲线。在标准竞争曲线上计算出抑制率为 50% 时混合液中呋喃西林的标准浓度作为竞争抑制率 IC_{50} 。

[0046] 结合率(%) = $(A - A_{\text{空白}}) / (A_0 - A_{\text{空白}})$

抑制率(%) = 100% - 结合率(%)

其中, A 为加入不同溶度的底物呋喃西林的 A_{450} 值;

A_0 为不加底物呋喃西林的 A_{450} 值;

$A_{\text{空白}}$ 为不加底物呋喃西林, 不加抗血清的 A_{450} 值。

[0047] 本发明所用到的呋喃西林(>99%) 购自东京化成工业株式会社; 37% 的甲醛购自 Sigma 公司; 牛血清白蛋白(BSA)、卵清白蛋白(OVA) 购自 Worthington 公司; G-25 凝胶(Sephadex G-25 medium) 购自 Pharmacia 公司; BCA 蛋白测定试剂盒购自 Pierce 公司(USA); Balb/c 小鼠购自于福建省医科大学; HRP 标记羊抗小鼠 IgG (H+L) 购自于中杉金桥公司; 四甲基联苯胺(TMB) 购自于中国 Tiangen 公司; 弗氏完全佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA) 和弗氏不完全佐剂(incomplete Freund's adjuvant, IFA) 购自于 Sigma 公司; Tween-20 购自于 Amresco 公司。

[0048] 以上所述仅为本发明的较佳实施例, 凡依本发明申请专利范围所做的均等变化与修饰, 皆应属本发明的涵盖范围。

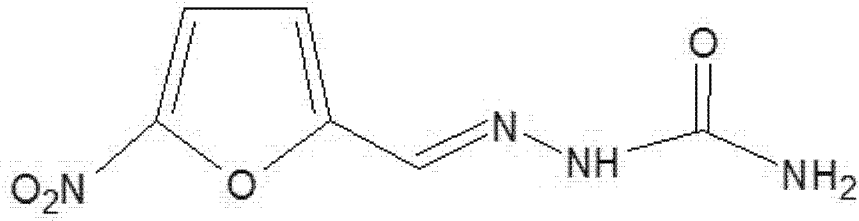


图 1

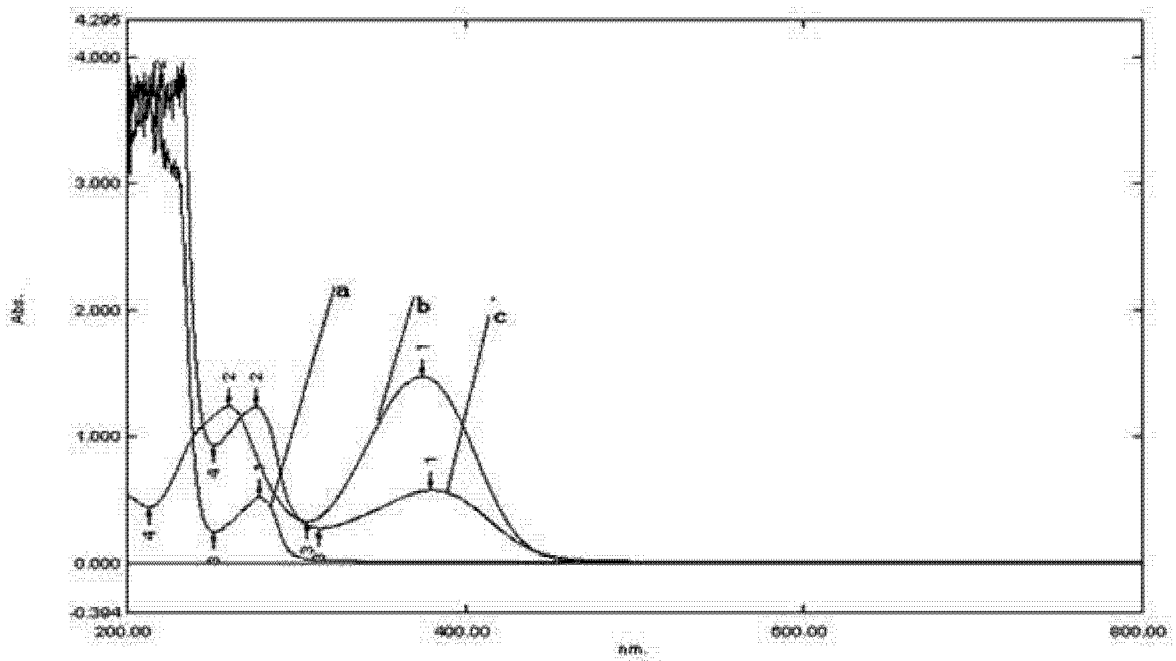


图 2

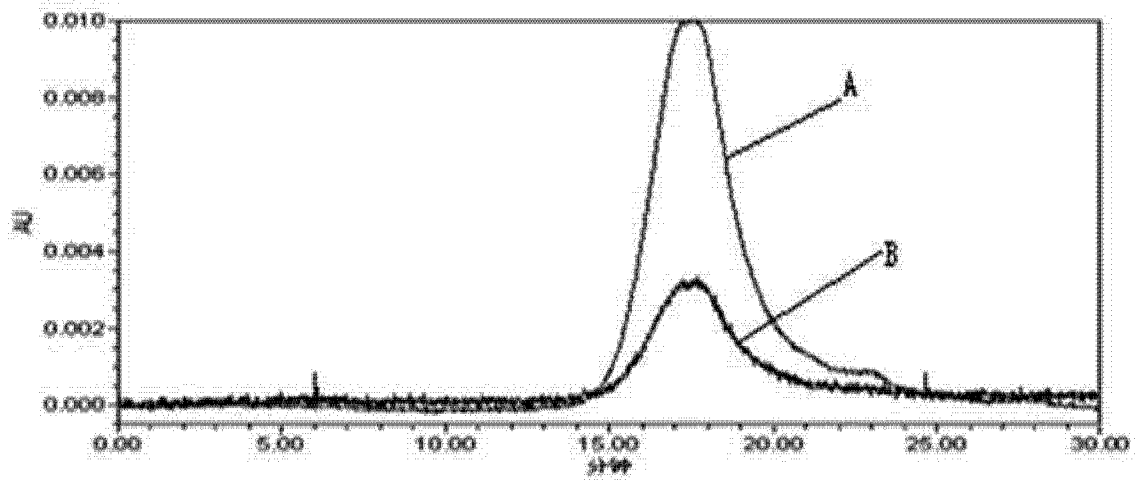


图 3

专利名称(译)	呋喃西林偶联抗原的制备方法及其偶联抗原与应用		
公开(公告)号	CN103641909A	公开(公告)日	2014-03-19
申请号	CN201310681540.6	申请日	2013-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	福州大学		
申请(专利权)人(译)	福州大学		
当前申请(专利权)人(译)	福州大学		
[标]发明人	石贤爱 郑友世		
发明人	石贤爱 郑友世		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K1/107 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K19/00		
代理人(译)	蔡学俊		
其他公开文献	CN103641909B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种呋喃西林偶联抗原的制备方法及其偶联抗原与应用，其中抗原制备方法包括以下步骤：将呋喃西林溶解于甲醇中，再加入甲醛溶液，呋喃西林与甲醛的摩尔比为1：1~2.5，制成溶液A；将载体蛋白溶解在pH为6.0~7.5的缓冲溶液中，制成溶液B；将溶液A加入到溶液B中，混合均匀后在4~43°C下反应，反应时间为0.5~3d，收集反应液，分离纯化后，得到呋喃西林偶联抗原，其中，呋喃西林与载体蛋白的摩尔比20-120:1。本发明所制得的呋喃西林偶联抗原的偶联比可达到15以上，以此呋喃西林偶联抗原免疫小鼠，可产生抗呋喃西林的特异性抗体，此抗体可用于快速检测呋喃西林的含量。

