



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102565399 B

(45) 授权公告日 2015.06.03

(21) 申请号 201010588129.0

(22) 申请日 2010.12.07

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 4412 2010.12.03

(73) 专利权人 北京望尔生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观镇国际信
息产业基地高新四街 8 号

(72) 发明人 冯静 胡德专 杨昌松 刘福林

蒲小蓉 冯月君 何丽霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

C12N 5/12(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1766626 A, 2006.05.03,

US 4341758, 1982.07.27,

CN 101358965 A, 2009.02.04,

Norihiro Kobayashi 等.Generation
of a novel monoclonal antibody against
cortisol-[C-4]-bovine serum albumin
conjugate: application to enzyme-linked

immunosorbent assay for urinary and serum
cortisol. 《Analytical Sciences》.2002, 第 18
卷(第 12 期),

Norihiro Kobayashi 等.Generation
of a novel monoclonal antibody against
cortisol-[C-4]-bovine serum albumin
conjugate: application to enzyme-linked
immunosorbent assay for urinary and serum
cortisol. 《Analytical Sciences》.2002, 第 18
卷(第 12 期),

Norihiro Kobayashi 等.Generation
of a novel monoclonal antibody against
cortisol-[C-4]-bovine serum albumin
conjugate: application to enzyme-linked
immunosorbent assay for urinary and serum
cortisol. 《Analytical Sciences》.2002, 第 18
卷(第 12 期),

审查员 苗君叶

权利要求书1页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测氢化可的松的方法及其专用酶联免
疫试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种检测氢化可的松的方法及
其专用酶联免疫试剂盒。本发明的酶联免疫试
剂盒,包括氢化可的松特异性抗体及包被原和酶标
记物;所述特异性抗体为氢化可的松的单克隆抗
体或氢化可的松的多克隆抗体。本发明的酶联免
疫试剂盒,结构简单、使用方便、价格便宜、携带便
利、检测方法高效、准确、简便,能够进行现场监控
且适合大量样本的定性和定量筛查,将在氢化可
的松的检测中发挥重要作用。

CN 102565399 B

1. 一种检测氢化可的松的酶联免疫试剂盒,包括氢化可的松特异性抗体及包被原和酶标记物;所述包被原为氢化可的松半抗原与载体蛋白的偶联物或抗抗体;所述酶标记物为酶标抗抗体或酶标氢化可的松半抗原;当所述包被原为氢化可的松半抗原与载体蛋白的偶联物时,所述酶标记物为酶标抗抗体;当所述包被原为抗抗体时,所述酶标记物为酶标氢化可的松半抗原;所述特异性抗体为氢化可的松的单克隆抗体,所述氢化可的松单克隆抗体为由保藏号为 CGMCC No. 4412 的对氢化可的松单克隆抗体杂交瘤细胞株 D-1-2 分泌的抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括氢化可的松标准溶液、显色液、浓缩洗涤液、终止液、浓缩复溶液;所述浓缩洗涤液为 pH 值为 7.0-7.4,含有 1.5-2.5% (质量百分含量) 吐温 -20 和 0.01-0.03% (质量百分含量) 硫柳汞防腐剂,0.02-0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液为 pH 值为 7.2-7.6,含有 2-4% (质量百分含量) 牛血清白蛋白、0.02-0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液;所述显色液由显色液 A 液和显色液 B 液组成,显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲,显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺;所述终止液为 1 ~ 2mol/L 硫酸或盐酸溶液。

3. 根据权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述浓缩洗涤液为 pH 值为 7.2,含有 1.8% (质量百分含量) 吐温 -20 和 0.02% (质量百分含量) 硫柳汞防腐剂,0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液为 pH 值为 7.4,含有 4% (质量百分含量) 牛血清白蛋白、0.03mol/L 的磷酸盐缓冲液;所述显色液由显色液 A 液和显色液 B 液组成,显色液 A 液为过氧化脲,显色液 B 液为四甲基联苯胺;所述终止液为 2mol/L 盐酸溶液。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述氢化可的松半抗原是按照如下方法得到的:将氢化可的松与琥珀酸酐通过缩合反应得到。

5. 根据权利要求 1、2 或 3 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述氢化可的松特异性抗体是用所述氢化可的松半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的;所述载体蛋白为牛血清蛋白、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、人血清蛋白、血蓝蛋白、纤维蛋白原或卵清蛋白。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述酶标抗抗体是采用过碘酸钠法将标记酶与所述抗抗体进行偶联得到的;所述过碘酸钠方法中,标记酶与所述抗抗体的摩尔浓度比为 2 : 1;标记酶为碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。

7. 一种检测氢化可的松的方法,包括以下步骤:

1) 样品前处理:

称取 1.0 ± 0.05 g 粉碎的饲料,置于 50ml 离心管中,加入 4ml 12% 氯化钠溶液,4000rpm 离心 5min,取 100 μ l 上清液,加入 900 μ l 复溶工作液,取 50 μ l 用于分析;

取 100 μ l 新鲜牛奶试样,加入 900 μ l 复溶工作液稀释,取 50 μ l 用于分析;

2) 利用权利要求 1-6 中任一所述的酶联免疫试剂盒检测 1) 中所述样品。

8. 保藏号为 CGMCC No. 4412 的对氢化可的松单克隆抗体杂交瘤细胞株 D-1-2。

一种检测氢化可的松的方法及其专用酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测氢化可的松的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 氢化可的松是一种肾上腺糖皮质激素类药物,主要作为人畜抗炎症、抗过敏、抗休克药,在饲料中使用能起到治疗治病、促动物生长作用,对动物的增重效果明显,但其残留可引起类肾上腺皮质亢进综合症、心血管、消化系统并发症及骨质疏松、肌肉萎缩等,严重威胁人们的身体健康。欧盟、美国、日本均规定了牛奶中最大残留限量为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0003] 目前国内外检测氢化可的松类药物的检测方法主要有荧光光度法、反光光度法、高效液相色谱法、气相色谱质谱法等这几种方法,由于仪器设备的复杂和操作过程繁琐,对人员要求较高,不适合现场监控和大量样本筛查。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种检测氢化可的松的酶联免疫试剂盒。

[0005] 本发明所提供的检测氢化可的松的酶联免疫试剂盒,包括氢化可的松特异性抗体及包被原和酶标记物;所述包被原为氢化可的松半抗原与载体蛋白的偶联物或抗抗体;所述酶标记物为酶标抗抗体或酶标氢化可的松半抗原;当所述包被原为氢化可的松半抗原与载体蛋白的偶联物时,所述酶标记物为酶标抗抗体;当所述包被原为抗抗体时,所述酶标记物为酶标氢化可的松半抗原;所述氢化可的松特异性抗体为氢化可的松的单克隆抗体或氢化可的松的多克隆抗体。

[0006] 为了更方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还可包括氢化可的松标准溶液、显色液、浓缩洗涤液、终止液、浓缩复溶液。

[0007] 所述浓缩洗涤液为 pH 值为 7.0-7.4,含有 1.5-2.5% (质量百分含量) 吐温 -20 和 0.01-0.03% (质量百分含量) 硫柳汞防腐剂,0.02-0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液为 pH 值为 7.2-7.6,含有 2-4% (质量百分含量) 牛血清白蛋白、0.02-0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液;所述显色液由显色液 A 液和显色液 B 液组成,显色液 A 液可以为过氧化氢或过氧化脲,显色液 B 液可以为邻苯二胺或四甲基联苯胺;所述终止液可以为 1 ~ 2mol/L 硫酸或盐酸溶液。

[0008] 所述浓缩洗涤液具体可以为 pH 值为 7.2,含有 1.8% (质量百分含量) 吐温 -20 和 0.02% (质量百分含量) 硫柳汞防腐剂,0.04mol/L 磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液具体可以为 pH 值为 7.4,含有 4% (质量百分含量) 牛血清白蛋白、0.03mol/L 的磷酸盐缓冲液;所述显色液由显色液 A 液和显色液 B 液组成,显色液 A 液具体可以为过氧化脲,显色液 B 液具体可以为四甲基联苯胺;所述终止液具体可以为 2mol/L 盐酸溶液。

[0009] 在洗涤液中加入一定量吐温 -20 和叠氮化钠的作用在于:缓冲液中吐温 -20 会减少抗体的非特异性吸附,还能对蛋白起到一定的保护作用,加入叠氮化钠后,则硫柳汞在溶液中抑制细菌的生长,对溶液的稳定性起到一个保护作用。

[0010] 所述包被缓冲液具体可以为 pH 值为 9.0-9.6 的 0.1-0.2mol/L 的碳酸盐冲液；所述封闭液是含有 0.5-1.0%（质量百分含量）卵清蛋白、0.1-0.2%（质量百分含量）吐温-20 和 2-3%奶粉的 pH 值为 7.4-7.8 的 0.02-0.03mol/L 的磷酸盐缓冲液；

[0011] 所述氢化可的松半抗原可以按照如下方法得到：氢化可的松和琥珀酸酐混合后，加入无水吡啶溶解，加热回流 24h，旋蒸，除去吡啶，冷却，加入乙酸乙酯，用稀盐酸调节 PH 值，有机相用稀盐酸萃取，弃去水相，将有机相用无水硫酸镁干燥，过滤，除去干燥剂，旋蒸浓缩至 1ml，用乙酸乙酯：石油醚 = 2：1 做展开剂，过柱分离，得到氢化可的松半抗原。

[0012] 所述氢化可的松特异性抗体是用所述氢化可的松半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的；所述载体蛋白为甲状腺蛋白、牛血清蛋白、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、人血清蛋白、血蓝蛋白、纤维蛋白原或卵清蛋白。

[0013] 氢化可的松是小分子物质，只有免疫反应性，没有免疫原性，不能诱发机体产生免疫应答，必须与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性。本发明采用混合酸酐法将氢化可的松与载体蛋白偶联，突出了氢化可的松的特征结构，同时也增加了氢化可的松半抗原的免疫源性和特异性。其中，氢化可的松半抗原与载体蛋白的结合比例过低或过高都对免疫不利，半抗原与载体蛋白（如卵清蛋白）的结合摩尔比为 (12-16)：1。

[0014] 所述氢化可的松多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体。

[0015] 所述氢化可的松单克隆抗体为由保藏号为 CGMCC No. 4412 的对氢化可的松单克隆抗体杂交瘤细胞株 D-1-2 分泌的抗体。

[0016] 所述酶标抗抗体是采用过碘酸钠法将所述标记酶与所述抗抗体进行偶联得到的；所述过碘酸钠方法中，所述标记酶与所述抗抗体的摩尔浓度比为 2：1；所述标记酶为碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶，优选为辣根过氧化物酶。该改良的过碘酸钠法省略了封闭酶上氨基的步骤，节省了时间，又降低了辣根过氧化物酶（HRP）与抗抗体的浓度比率，节省了原材料。

[0017] 本发明的另一个目的是提供一种检测氢化可的松的方法。

[0018] 本发明所提供的检测氢化可的松的方法，包括以下步骤：

[0019] 1) 样品前处理：

[0020] 每 2.0g 动物组织匀浆物中，加入 6-10ml 乙腈，混匀，3000g 以上室温离心 10min，收集上清液；将每 2ml 所述上清液吹干，加入权利要求 7 所述试剂盒中的浓缩复溶液 1-4ml，混匀，取样进行分析；所述乙腈的体积优选为 8ml；所述浓缩复溶液的体积优选为 2ml。样品的前处理主要是为了从样品中获得氢化可的松溶液，从而用于后续的检测。

[0021] 2) 用上述任一种酶联免疫试剂盒检测 1) 中所述样品。

[0022] 3) 分析检测结果。

[0023] 由保藏号为 CGMCC No. 4412 的对氢化可的松单克隆抗体杂交瘤细胞株 D-1-2 分泌的氢化可的松单克隆抗体也属于本发明的保护范围。

[0024] 保藏号为 CGMCC No. 4412 的对氢化可的松单克隆抗体杂交瘤细胞株 D-1-2 也属于本发明的保护范围。

[0025] 本发明检测氢化可的松的酶联免疫试剂盒主要采用间接竞争 ELISA 方法定性或定量检测样品中氢化可的松的残留量；本试剂盒对样品的前处理要求低，样品前处理过程简单，能同时快速检测大批量样品；本试剂盒采用高特异性的氢化可的松单克隆抗体，主要

试剂以工作液的形式提供,检验方法方便易行,具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高特点。本发明的酶联免疫试剂盒,结构简单、使用方便、价格便宜、携带便利、检测方法高效、准确、简便,能够进行现场监控且适合大量样本的定性和定量筛查,将在氢化可的松的检测中发挥重要作用。本发明简化了传统检测方法的步骤,缩短了检测的时间,具有可观的社会效益和经济效益。

附图说明

[0026] 图 1 为以氢化可的松半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原的试剂盒的标准曲线图。

具体实施方式

[0027] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明均为常规方法。

[0028] 实施例 1、以氢化可的松半抗原与载体蛋白偶联物为包被原的试剂盒及其检测方法

[0029] 一、以氢化可的松半抗原与载体蛋白偶联物为包被原的试剂盒的检测原理如下:

[0030] 当在酶标板微孔条上预包被氢化可的松偶联抗原时,加入样本溶液或标准品溶液后,加入氢化可的松特异性抗体溶液,样本中的氢化可的松药物与酶标板上包被的氢化可的松偶联抗原竞争氢化可的松特异性抗体,加入酶标记物抗抗体进行放大作,用显色液显色,样本吸光度值与氢化可的松药物的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样本中氢化可的松的含量,同时根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的氢化可的松标准品溶液颜色比较可粗略判断样品中氢化可的松含量的浓度范围。

[0031] 二、以氢化可的松半抗原与载体蛋白偶联物为包被原的酶联免疫试剂盒一般可以包括如下组成:

[0032] 1、包被有包被原(包被原为氢化可的松半抗原与载体蛋白偶联物)的酶标板:包被原的浓度可以为 0.10-0.20 $\mu\text{g/ml}$;

[0033] 2、酶标抗抗体工作液:用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体;酶标二抗的稀释液为 pH 值为 7.2-7.8,含有 0.8-1.2% (质量百分含量) 酪蛋白、0.01-0.02mol/L 磷酸盐缓冲液,酶标抗抗体工作液稀释度为 1 : 300。

[0034] 3、氢化可的松特异性抗体工作液:可以为氢化可的松多克隆抗体或氢化可的松单克隆抗体工作液;稀释液为 pH 值为 7.2-7.6,含有 2-4% (质量百分含量) 牛血清白蛋白、0.02-0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0035] 4、氢化可的松标准品(购于 sigma, CAS 50-23-7) 溶液:6 瓶,浓度分别为 0 $\mu\text{g/L}$ 、0.05 $\mu\text{g/L}$ 、0.1 $\mu\text{g/L}$ 、0.3 $\mu\text{g/L}$ 、0.6 $\mu\text{g/L}$ 、1.8 $\mu\text{g/L}$;稀释溶液为 pH 值为 7.2-7.6,含有 1.0-2.0% (质量百分含量) 卵清蛋白、0.01-0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0036] 5、底物显色液:由 A 液和 B 液组成,底物显色液 A 液为过氧化脲或过氧化氢,7ml/瓶,1 瓶;底物显色液 B 液为四甲基联苯胺或邻苯二胺,7ml/瓶,1 瓶。

[0037] 6、终止液:1-2mol/L 盐酸或硫酸。

[0038] 7、浓缩洗涤液:pH 值为 7.0-7.4,含有 1.5-2.5% (质量百分含量) 吐温-20 和 0.01-0.03% (质量百分含量) 硫柳汞防腐剂,0.02-0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液;40ml/瓶,

1 瓶。

[0039] 8、浓缩复溶液 :pH 值为 7.2-7.6, 含有 2-4% (质量百分含量) 牛血清白蛋白、0.02-0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液 ;50ml/ 瓶, 1 瓶。

[0040] 三、本实验中以氢化可的松半抗原与载体蛋白偶联物为包被原的酶联免疫试剂盒具体包括 :

[0041] 1、包被有包被原 (包被原为氢化可的松半抗原与载体蛋白偶联物) 的酶标板。

[0042] 2、酶标抗抗体工作液 :用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体。酶标二抗的稀释液为 pH 值为 7.6, 含有 1.0% (质量百分含量) 酪蛋白、0.02mol/L 磷酸盐缓冲液, 酶标抗抗体工作液稀释度为 1 : 300。

[0043] 3、氢化可的松单克隆抗体工作液是按照以下方法制备的 :用稀释液将氢化可的松单克隆抗体稀释 5000 倍, 得到单抗工作液, 所述稀释液为 pH 值为 7.4, 含有 4% (质量百分含量) 牛血清白蛋白、0.03mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0044] 4、氢化可的松标准品 (购于 sigma, CAS 50-23-7) 溶液 :6 瓶, 浓度分别为 0 μ g/L, 0.05 μ g/L, 0.1 μ g/L, 0.3 μ g/L, 0.6 μ g/L, 1.8 μ g/L, 稀释溶液为 pH 值为 7.4, 含有 1.0% (质量百分含量) 卵清蛋白、0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0045] 5、底物显色液 :由 A 液和 B 液组成, 底物显色液 A 液为过氧化脲 ;底物显色液 B 液为四甲基联苯胺。

[0046] 6、终止液 :2mol/L 盐酸

[0047] 7、浓缩洗涤液 :pH 值为 7.2, 含有 1.8% (质量百分含量) 吐温 -20 和 0.02% (质量百分含量) 硫柳汞防腐剂, 0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0048] 8、浓缩复溶液 :pH 值为 7.4, 含有 4% (质量百分含量) 牛血清白蛋白、0.03mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0049] 其中, 包被有氢化可的松半抗原与牛血清白蛋白偶联物的酶标板、氢化可的松单克隆抗体工作液、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液的制备方法如下 :

[0050] 所用的包被缓冲液和封闭液可为 :

[0051] 包被缓冲液 :pH 值为 9.0-9.6 的 0.1-0.2mol/L 的碳酸盐冲液。

[0052] 封闭液 :含有 0.5-1.0% (质量百分含量) 卵清蛋白、0.1-0.2% (质量百分含量) 吐温 -20 和 2-3% 奶粉的 pH 值为 7.4-7.8 的 0.02-0.03mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0053] 1、包被有氢化可的松半抗原与牛血清白蛋白偶联物的酶标板的制备

[0054] (1) 氢化可的松半抗原的制备

[0055] 称取 362mg 氢化可的松 (购于 sigma, CAS 50-23-7) 和 0.15g 琥珀酸酐同时加入 100ml 的圆底烧瓶中, 加入 30ml 无水吡啶做溶剂, 搅拌溶解, 加热回流反应 24h。旋蒸, 除去吡啶, 冷却, 加入乙酸乙酯 25ml, 滴加 0.1mol/L 的稀盐酸, 除去酸水层, 有机相再用 0.1mol/L 的盐酸萃取, 弃去水相, 将有机相用无水硫酸镁干燥, 过滤, 除去干燥剂, 旋蒸浓缩至 1ml, 用乙酸乙酯 : 石油醚 = 2 : 1 做展开剂, 过柱分离, 得氢化可的松半抗原。

[0056] (2) 包被原的制备

[0057] 将氢化可的松半抗原和牛血清白蛋白采用混合酸酐法进行偶联得到包被抗原, 具体步骤如下 :

[0058] 取氢化可的松半抗原 30mg, 充分溶解于 1ml DMF 中, 得到 I 液 ;称取 BSA50mg, 充

分溶解在 2ml, pH7.2 的 PBS 缓冲液中, 得到 II 液; 将 I 液逐滴缓慢滴加到 II 液中, 得到 III 液; 称取 12.5mgEDC 用 1ml 去离子水溶解后缓慢于室温下加入 III 液中, 搅拌反应 24h; 用 0.01mol/LPBS 透析 3 天, 每天换 2 次透析液; 12000rpm 离心 30min, 收集上清, 分装, 于 -20℃ 保存备用。

[0059] (3) 包被有包被原的酶标板的制备

[0060] 用包被缓冲液将氢化可的松半抗原与牛血清白蛋白的偶联物稀释成 0.10-0.20 $\mu\text{g/ml}$, 每孔加入 100 μl , 37℃ 温育 2h 或 4℃ 过夜, 倾去包被液, 用洗涤液洗涤 2 次, 每次 30 秒, 拍干, 然后在每孔中加入 150-200 μl 封闭液, 37℃ 温育 2h, 倾去孔内液体, 干燥后用铝膜真空密封保存。

[0061] 2、氢化可的松单克隆抗体的制备

[0062] (1) 免疫原的制备

[0063] 氢化可的松是小分子物质, 只有免疫反应性, 没有免疫原性, 不能诱发机体产生免疫应答, 必须与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性, 这样突出了氢化可的松分子结构中的特征基团, 使制备的氢化可的松抗体对氢化可的松的特异性很高。

[0064] 将氢化可的松半抗原和卵清蛋白, 采用混合酸酐法进行偶联得到免疫原, 具体步骤如下:

[0065] 称取 20mg 氢化可的松半抗原用 1.0mlDMF 溶解, 冷却至 10℃, 加入氯甲酸异丁酯 15 μl , 10℃ 搅拌反应 30min, 得到 I 液; 称取 OVA36mg, 使之充分溶解在 2.6ml, 50mmol/L 碳酸钠溶液中, 得到 II 液; 将 I 液缓慢滴加到 II 液中, 10℃ 反应 4h, 4℃ 过夜; 用 0.01mol/L PBS 透析 3 天, 每天换 2 次透析液; 12000rpm 离心 30min, 收集上清, 得到免疫原, 分装, 于 -20℃ 保存备用。

[0066] (2) 制备单抗

[0067] a. 动物免疫

[0068] 将免疫原注入到 Balb/c 小鼠体内, 免疫剂量为 100 $\mu\text{g/}$ 只, 使其产生多克隆抗体。

[0069] b. 细胞融合和克隆化

[0070] 取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞, 按 9 : 1 (数量配比) 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 筛选得到稳定分泌氢化可的松单克隆抗体的对氢化可的松药物的单克隆杂交瘤细胞株, 将此细胞株命名为 D-1-2, 该细胞株已于 2010 年 12 月 03 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (简称 CGMCC, 地址: 北京市朝阳区大屯路, 中国科学院微生物研究所, 邮编 100101), 保藏号为 CGMCC No. 4412。

[0071] c. 细胞冻存和复苏

[0072] 将杂交瘤细胞用冻存液制成 1×10^9 个 /ml 的细胞悬液, 在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管, 立即放入 37℃ 水浴中速融, 离心去除冻存液后, 移入培养瓶内培养。

[0073] d. 单克隆抗体的制备与纯化

[0074] 将 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.9ml/ 只, 7 天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^9 个 / 只, 7 天后采集腹水。用辛酸 - 饱和硫酸铵法进行纯化, 纯化后的腹水放入 -20℃ 环境保存。

[0075] 3、氢化可的松多克隆抗体的制备

[0076] 采用新西兰大白兔作为免疫动物, 以氢化可的松与卵清蛋白偶联物为免疫原, 免

疫剂量为 1.5mg/kg 体重,首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐混合制成乳化剂,颈背部皮下多点注射,间隔 3~4 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化,加强免疫一次,共免疫 5 次,最后一次不加佐剂。最后一次免疫 10 天后采血,测定血清抗体效价,心脏采血,用硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

[0077] 4、辣根过氧化物酶标记的抗抗体的制备:

[0078] (1) 抗抗体的制备:

[0079] 羊抗鼠抗抗体的制备:以羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫,得到羊抗鼠抗抗体。

[0080] 羊抗兔抗抗体的制备:以羊作为免疫动物,以兔源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫,得到羊抗兔抗抗体。

[0081] (2) 辣根过氧化物酶标记的抗抗体的制备

[0082] 将抗抗体与辣根过氧化物酶 (HRP) 采用改良后的过碘酸钠法进行偶联。

[0083] 传统的过碘酸钠法要求反映体系中酶与抗抗体的摩尔浓度比为 4:1;由于辣根过氧化物酶在强氧化的作用下产生许多与抗抗体结合的位点,这样活化的辣根过氧化物酶分子充当了连接各分子的桥梁,降低了酶标记物的酶活性,使制备的偶联物中混有许多聚集体。

[0084] 本发明采用改良的过碘酸钠法进行抗抗体的标记,其操作省去了氨基的封闭过程,因为能产生自身氨基连接的氨基实际很少。降低了辣根过氧化物酶:抗抗体的摩尔浓度比率至 2:1,改良后的方法比传统的方法简便,对酶的活性的损失减少。

[0085] 四、用步骤三所述试剂盒检测样品中氢化可的松

[0086] 1、样品前处理

[0087] 饲料样品

[0088] 称取 $1.0 \pm 0.05\text{g}$ 粉碎的饲料,置于 50ml 离心管中,加入 4ml 2% 氯化钠溶液,4000rpm 离心 5min,取 $100 \mu\text{l}$ 上清液,加入 $900 \mu\text{l}$ 复溶工作液,取 $50 \mu\text{l}$ 用于分析。

[0089] 牛奶样品

[0090] 取 $100 \mu\text{l}$ 新鲜牛奶试样,加入 $900 \mu\text{l}$ 复溶工作液稀释,取 $50 \mu\text{l}$ 用于分析。

[0091] 2、检测

[0092] 向包被有氢化可的松半抗原与牛血清白蛋白偶联物的酶标板微孔中加入系列标准品溶液或样品溶液 $50 \mu\text{l}$,再加入单克隆抗体工作液 $50 \mu\text{l}$,轻轻振荡混匀,用盖板膜封板,25℃ 避光环境中反应 30min。倒出孔中液体,每孔加入稀释后的洗涤液,10s 后倒出孔中液体,如此重复操作共洗板 5 次,用吸水纸拍干。再加入酶标二抗工作液 $100 \mu\text{l}$,轻轻振荡混匀,用盖板膜封板,25℃ 避光环境中反应 30min。倒出孔中液体,每孔加入稀释后的洗涤液,10s 后倒出孔中液体,如此重复操作共洗板 5 次,用吸水纸拍干。每孔加入底物显色液 A 液过氧化脲 $50 \mu\text{l}$,底物显色液 B 液四甲基联苯胺 (TMB) $50 \mu\text{l}$,轻轻振荡混匀,用盖板膜封板,25℃ 避光环境中反应 15min。每孔加入终止液 $50 \mu\text{l}$,轻轻振荡混匀,用酶标仪波长设定在 450nm 处,测定每孔吸光度值 (OD 值)。

[0093] 3、检测结果分析

[0094] 用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值 (B) 除以第一个标准品溶液 (0 标准) 的吸光度值 (B_0) 再乘以 100%,得到百分吸光度值。

[0095]

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

[0096] 公式中 B 为标准品溶液或样本溶液的平均吸光度值, B_0 为 $0 \mu\text{g/L}$ 标准品溶液的平均吸光度值。

[0097] 以氢化可的松标准品浓度 ($\mu\text{g/L}$) 值为 X 轴, 百分吸光度值为 Y 轴, 绘制标准曲线图 (图 1)。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值, 相对应每一个样品的浓度, 则可从标准曲线上读出样本中氢化可的松的含量。本发明中检测结果的分析也可以采用回归方程法, 计算出样品溶液浓度。本发明中检测结果的分析还可以利用计算机专业软件, 此法更便于大量样品的快速分析, 整个检测过程只需 1.5 小时可以完成。

[0098] 实施例 2、试剂盒精确度、准确度和保存期试验

[0099] 一、标准品精密度试验:

[0100] 从实施例 1 中步骤三中三个不同的时间段制备的三个不同批次的试剂盒中各抽取 10 个试剂盒, 从每个试剂盒的酶联板中各抽出 20 个微孔, 测定 $0.3 \mu\text{g/L}$ 氢化可的松标准溶液的吸光度值, 计算变异系数。结果如表 1 所示。

[0101] 表 1、标准可重复性试验 (CV%)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[0102]	CV%	6.3	5.2	7.8	4.5	6.9	8.4	6.4	6.0	5.8	7.5
	01 批	7.2	6.8	6.0	7.3	9.5	5.8	4.7	3.8	6.4	5.7
	02 批	6.0	8.2	4.9	5.7	6.8	7.7	7.3	8.4	6.7	8.2

[0103] 实验表明, 每批试剂盒各测定 10 次标准品变异系数均在 3.8% -9.5% 之间, 符合精密度小于或等于 20% 的规定。

[0104] 二、样本精密度和准确度试验

[0105] (一) 样品精密度试验:

[0106] 向不含氢化可的松的饲料、牛奶中添加终浓度为 $5 \mu\text{g/L}$ 的氢化可的松, 然后按照实施例 1 的方法进行样品前处理。从实施例 1 中步骤三中所述的不同时间段制备的三个批次的试剂盒 (01 批、02、03 批) 中各抽取 3 个试剂盒, 进行实验, 每个实验重复 5 次, 分别计算变异系数, 结果如表 2-3 所示 (各表中的数值为 5 次重复的平均值)。结果表明, 饲料、牛奶样本中的变异系数在 4.8% -12.1% 之间, 均低于 20%, 符合规定。

[0107] 表 2、饲料样品可重复性试验

[0108]

批号	实测值 ($\mu\text{g/L}$)					变异系数 CV%
01	3.8	4.5	4.6	4.9	5.0	10.4
	4.6	3.9	4.1	4.7	4.2	7.9
	5.0	4.8	4.3	4.7	4.4	6.2
02	4.7	4.0	4.6	5.6	4.8	12.1
	4.3	4.5	4.8	5.0	4.2	7.4
	4.8	3.7	4.5	4.4	3.9	10.6
03	3.8	4.1	4.4	4.6	4.9	9.8
	4.3	4.7	4.9	4.5	4.2	6.3
	4.0	4.7	3.6	4.3	4.0	9.9

[0109] 表 3、牛奶样品可重复性试验

[0110]

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数 CV%
01	4.4	3.7	4.0	3.8	4.7	10.2
	3.9	4.8	5.2	4.2	4.3	11.5
	4.0	4.3	4.5	3.9	4.0	6.1
02	4.5	4.9	5.2	4.3	4.5	7.8
	5.0	5.1	4.1	4.7	4.0	11.1
	4.2	4.0	4.3	3.7	3.9	5.9
03	4.8	4.6	5.0	4.8	4.4	4.8
	4.3	4.5	3.9	4.8	4.6	7.7
	4.9	4.4	4.7	5.1	4.2	7.8

[0111] (二) 样本准确度试验

[0112] 向不含氢化可的松的饲料、牛奶中分别添加氢化可的松标准品,使氢化可的松的终浓度分别为 $4 \mu\text{g/kg(L)}$ 和 $8 \mu\text{g/kg(L)}$,然后按照实施例 1 中所述的样品前处理方法进行处理;再用实施例 1 中步骤三中所述的试剂盒检测组织中的氢化可的松,每个浓度做 4 个平行,分别计算准确度(准确度=实测值/添加值)。结果如表 4 所示。结果表明氢化可的松样品添加准确度均在 74.9% -104.2% 之间。

[0113] 表 4、试剂盒的准确度

样本		饲料		牛奶	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		4	8	4	8
[0114] 准确度%	1	80.5	92.5	86.8	101.2
	2	91.4	86.5	74.9	87.0
	3	79.6	97.8	92.4	80.5
	4	104.2	95.0	98.7	91.7
平均值%		88.9	93.0	88.2	90.1

[0115] 三、交叉反应率试验：

[0116] 选择与氢化可的松有类似结构和类似功能的 5 种药物测定交叉反应率。通各种药物的标准曲线分别得到其 50% 抑制浓度。用下式计算步骤三中试剂盒对其它药物的交叉反应率。重复测定 3 次, 结果取平均值。

[0117] 交叉反应率 (%) = (引起 50% 抑制氢化可的松的浓度 / 引起 50% 抑制的氢化可的松类似物浓度) \times 100%

[0118] 表 5、试剂盒的特异性

[0119]

药物名称	交叉反应率 (%)
氢化可的松	100
泼尼松龙	120
甲基泼尼松龙	5
雌二醇	< 1
雌三醇	< 1

[0120] 实验表明, 本发明试剂盒可以检测氢化可的松药物。

[0121] 四、试剂盒保存期试验

[0122] 试剂盒保存条件为 2-8 $^{\circ}\text{C}$, 经过 6 个月的测定, 试剂盒的最大吸光度值 (零标准)、50% 抑制浓度, 氢化可的松添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中, 会有非正常保存条件出现, 将试剂盒在 37 $^{\circ}\text{C}$ 保存的条件下放置 6 天, 进行加速老化实验, 结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生, 将试剂盒放入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻 5 天, 测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 至少可以保存 6 个月以上。

[0123] 五、试剂盒的最低检测限

[0124] 取空白饲料、牛奶样本用本发明所制试剂盒分别进行 20 次检测, 测定结果的平均

值加上 3 倍标准差作为试剂盒的最低检测限。

[0125] 表 6、空白饲料样本测定结果统计表 $\mu\text{g}/\text{kg}$

[0126]

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	0.0	0.5	0.9	1.0	0.2	0.0	0.8	0.4
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	1.1	0.8	0.0	0.6	0.0	0.3	1.2	0.9
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	0.5	0.0	0.9	0.0	0.5	0.4	1.8	

[0127] 由表 6 可知,试剂盒的最低检测限为 $1.8 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0128] 表 7、空白牛奶样本测定结果统计表 $\mu\text{g}/\text{L}$

[0129]

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	0.00	0.10	0.24	0.20	0.06	0.00	0.10	0.00
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	0.06	0.21	0.00	0.00	0.00	0.12	0.00	0.30
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	0.08	0.19	0.21	0.09	0.10	0.10	0.39	

[0130] 由表 7 可知,试剂盒的最低检测限为 $0.39 \mu\text{g}/\text{L}$ 。

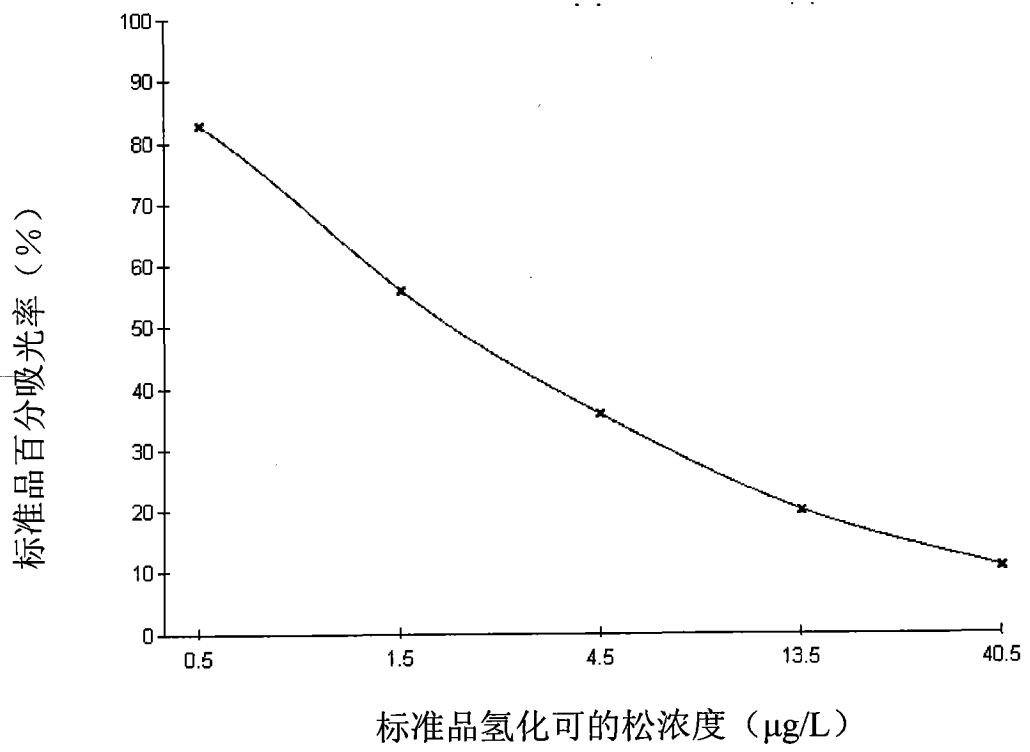


图 1

专利名称(译)	一种检测氢化可的松的方法及其专用酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN102565399B	公开(公告)日	2015-06-03
申请号	CN201010588129.0	申请日	2010-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
[标]发明人	冯静 胡德专 杨昌松 刘福林 蒲小蓉 冯月君 何丽霞		
发明人	冯静 胡德专 杨昌松 刘福林 蒲小蓉 冯月君 何丽霞		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/535 C12N5/12		
其他公开文献	CN102565399A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测氢化可的松的方法及其专用酶联免疫试剂盒。本发明的酶联免疫试剂盒，包括氢化可的松特异性抗体及包被原和酶标记物；所述特异性抗体为氢化可的松的单克隆抗体或氢化可的松的多克隆抗体。本发明的酶联免疫试剂盒，结构简单、使用方便、价格便宜、携带便利、检测方法高效、准确、简便，能够进行现场监控且适合大量样本的定性和定量筛查，将在氢化可的松的检测中发挥重要作用。

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$