



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102353767 B

(45) 授权公告日 2014.03.12

(21) 申请号 201110189412.0

(22) 申请日 2011.07.07

(73) 专利权人 贺福元

地址 410208 湖南省长沙市岳麓区象嘴路含浦科教园区

(72) 发明人 贺福元 贺琪珺 邓凯文

(74) 专利代理机构 长沙市融智专利事务所 43114

代理人 黄美成

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101694493 A, 2010.04.14, 全文.

CN 102043045 A, 2011.05.04, 全文.

WO 02/073180 A1, 2002.09.19, 全文.

CN 101334408 A, 2008.12.31, 全文.

Ruo-Pan Huang. Detection of multiple proteins in an antibody-based protein microarray system.《Journal of Immunological Methods》.2001, 第 255 卷 1-13.

Sunil Bhand et al. Immuno-arrays for multianalyte analysis of chlorotriazines.《Talanta》.2005, 第 65 卷 (第 2 期), 第 331-336 页.

Sunil Bhand et al. Immuno-arrays for multianalyte analysis of chlorotriazines.《Talanta》.2005, 第 65 卷 (第 2 期), 第 331-336 页.

Zhanhui Wang et al. Development of a Monoclonal Antibody-Based Broad-Specificity ELISA for Fluoroquinolone Antibiotics in Foods and Molecular Modeling Studies of Cross-Reactive Compounds.《Anal. Chem.》.2007, 第 79 卷 (第 2 期), 4471-4483.

付志锋. 多组分免疫传感及其应用.《化学传感器》.2006, 第 26 卷 (第 4 期), 第 1-8 页.

王茹. 中药虎杖抗原、抗体制备及其特异性检测.《医药卫生科技辑》.2009, (第 10 期), E057-52.

审查员 陈伟潘

权利要求书2页 说明书24页

(54) 发明名称

一种全成分群同时测算方法

(57) 摘要

本发明公开了一种全成分群同时测算方法: (1) 根据成分的免疫原性与结构特点制备抗原; (2) 上述抗原分别或混合注射到动物体内产生抗体, 并分离出抗体; (3) 对上述抗原或抗体进行标记; (4) 将未标记的抗体或抗原有规律地包被成芯片板; (5) 获取抗体与成分间的交叉反应信息, 根据实验精度要求构建斜率矩阵 B、同一抗体截距和的列向量 A、浓度对数或浓度列向量 C 和总叠加抑制率列向量 I; (6) 对于不考虑交叉反应成分, 直接依线性方程读出含量; 需考虑交叉反应成分, 根据 BC = I-A 求解获得成分含量; 从而获得全成分群含量。本测算方法操作方便, 能满足含各种成分群大批量样本的同时测定需求, 特别适合复杂组分群的分析 and 测定。

CN 102353767 B

1. 一种全成分群同时测算方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 根据成分的免疫原性与结构特点,对于具有免疫原性的大分子化合物直接作为抗原;将没有免疫原性的小分子采用直接或化学合成的方法与大分子载体制备成抗原;

(2) 上述抗原分别或混合注射到动物体内产生抗体,并分离出抗体;

(3) 对上述抗原或抗体进行标记;

(4) 将未标记的抗体或抗原按实验目的有规律地包被成芯片板;

(5) 获取交叉反应矩阵 R、斜率矩阵 B、同一抗体截距和的列向量 A、浓度对数或浓度列向量 C 和总叠加抑制率列向量 I:

取与待测成分相应的免疫芯片板,采用固相吸附标记免疫竞争法测定芯片板点阵对各成分标准品液的特异与非特异性线性关系;

依交叉反应公式计算成分间的交叉反应率,获得抗体与成分特异与非特异反应两两交叉反应率矩阵 R,根据实验精度确定交叉反应率阈值,根据阈值确定需考虑与不考虑交叉反应成分类别,考虑交叉反应成分,需建立各抗体与成分间相互交叉作用的斜率矩阵 B、同一抗体截距和的列向量 A 及浓度对数或浓度列向量 C;

取与待测成分相应的免疫芯片板,采用固相吸附标记免疫竞争法测定芯片点阵对待测样品液的总抑制率,再转换成总叠加抑制率列向量 I;

(6) 对于不考虑交叉反应的成分,直接依线性方程读出该成分的含量;需考虑交叉反应的成分,根据标准曲线与样品液的总叠加抑制率建立成分对数浓度或浓度的多元线性方程: $BC=I-A$, 求解获得成分的含量;从而获得所有成分的含量;

免疫抗原的合成方法为:

对于具免疫原性的大分子可直接作抗原,各种类型小分子成分能与蛋白质反应的可直接合成全抗原;不能与蛋白质直接反应的通过下列化学反应合成全抗原:

(1) 对于含氨基基团的半抗原成分,采用重氮化法或戊二醛法或多元酸酐法或二异氰酸酯法或偶氮苯甲酸法或亚胺酸酯法合成全抗原;

(2) 对于含糖基的半抗原成分,采用过碘酸盐氧化为醛基,然后与蛋白分子中的氨基形成 Schiff 氏碱法合成全抗原;

(3) 对于含羧基基团的半抗原成分,采用混合酸酐法或碳二亚胺法或活泼酯法合成全抗原;

(4) 含酮基基团半抗原成分,可采用 O—羧甲基羟胺法或者对胼基苯甲酸法或者 Mannich 反应法合成全抗原;

(5) 含羧酸甲酯衍生物的半抗原成分,采用叠氮化法,羧酸甲酯衍生物经胼解、亚硝化,转变为叠氮化物,再与载体蛋白上的氨基反应合成全抗原;

(6) 对于含羟基基团半抗原成分,采用氯乙酸钠法或三氯三嗪试剂法合成全抗原;

(7) 含氨基、羟基、巯基的半抗原,可采用卤代硝基苯法或苯醌法合成全抗原;

合成所使用的载体蛋白有:丙种球蛋白、人血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、兔血清白蛋白(RSA)、牛甲状腺球蛋白(TG)、血蓝蛋白(Hemocyanin)以及人、牛和鸡 γ -球蛋白、卵黄蛋白,或者是人工合成的多聚赖氨酸、多聚谷氨酸、多聚混合氨基酸;或者采用聚乙烯吡咯酮、羧甲基纤维素、聚甲基丙酸酯微粒、乳胶和炭末。

2. 根据权利要求 1 所述的全成分群同时测算方法,其特征在于,所述的载体为蛋白质

或其它具免疫原性的非蛋白质高分子化合物；

所述的抗原所产生的抗体为 IgA、IgD、IgG、IgE 和 IgM 中的一种或多种；

所述的抗原或抗体的标记方法为荧光标记法、酶标记或放射性核素标记、胶体金及化学发光标记法；

所述的有规律包被为按化学类型、中文编码、英文编码、药材所含成分分类群、功效、功能团、生物物种、同类化合物或同一组分代谢产物针对不同检测目标要求而编排成各种芯片点阵，包被未标记的抗原或抗体；

斜率矩阵为 $B(b_{i,j})$ ， i 为包被的抗体或抗原， j 为竞争的成分， i 与 j 的交叉作用超过了实验精度界限， $b_{i,j}$ 为 B 矩阵中的任一元素，亦任一抗体对任一成分作用线性方程的斜率；

同一抗体截距和的向量为 $A(\sum_{j=1}^n a_{i,j})$ ， n 为需考虑交叉反应成分的数目， $a_{i,j}$ 表示截距矩阵的任一元素，即任一抗体对任一成分作用线性方程的斜率。

3. 根据权利要求 1 所述的全成分群同时测算方法，其特征在于，获得斜率矩阵 B 、同一抗体截距和的列向量 A 以及浓度对数列向量 C 的具体过程为：

取与待测成分数目 5 ~ 6 倍的芯片板，在包被有多种抗原或抗体的芯片板每个微孔内分别两两交叉加入 1 ~ 4 数量级梯度的标准品溶液，每一块板只加呈梯度浓度标准品液中的一个浓度标准品液，5 ~ 6 块板完成一个成分对特异性抗原抗体交叉影响反应的线性考察实验；标准品液加完后在每个微孔内分别对应加入标记多克隆抗体或标记抗原反应，洗涤后，加入底物显色测定或直接测定荧光、放射性强度、发光强度；先计算抑制率，再建立各成分标准品液对抗原抗体反应抑制率的线性方程；计算出 IC_{50} ，再按特异性反应的 IC_{50} 除以非特异性的 IC_{50} 计算交叉率，获得交叉信息，根据实验的精密度确定交叉反应率的界值，取大于交叉反应率界值的成分组成交叉率矩阵 $R(r_{i,j})$ ，根所交叉率矩阵 R 组成对应的斜率矩阵 $B(b_{i,j})$ 与同一抗体截距和向量 $A(\sum_{j=1}^n a_{i,j})$ ，根据需考虑交叉成分数目的多少建立浓度对数或浓度列向量 C 。

4. 根据权利要求 1 所述的全成分群同时测算方法，其特征在于，获得总叠加抑制率列向量 I 的具体过程为：

取包被有多种抗体或抗原的芯片板，每个微孔内加入待测样品溶液，在每个微孔内加入标记的抗原或标记抗体，反应，洗涤后，加入底物显色测定或直接测定荧光、放射性强度、发光强度，读出样品液对抗原抗体竞争反应吸收值，采用 D/D_0 计算抑制率时，则应乘上 100，再加上 $(n-1) \times 100$ 构成总叠加抑制率列向量 I ；采用 $(D_0-D)/D_0$ 计算抑制率时，则乘上 100 即可； D 为样品或标准品的吸收值， D_0 为不加样品或标准品液的吸收值。

一种全成分群同时测算方法

技术领域

[0001] 本发明属于多成分分析和免疫技术结合领域,属于化学、生物医药、中医药学的交叉学科,涉及一种全成分群同时测算方法。

背景技术

[0002] 现已报道的检测方法主要是用于单成分检测,很少有同时检测多成分的方法和产品出现,而对于同时检测全成分群的产品则更少。随着中医药现代化和系统生物学的代谢组学研究的兴起,解决中药多成分群与系统生物学的代谢成分群等全成分群的同步测定问题已迫在眉睫。近几年来,一些研究人员试图采用指纹图谱技术解决这一问题,但缘于色谱柱的分离能力、色谱峰的重现性及通用检测器的原因,很难实现中药及代谢组全成分群检测。纵观成分的检测方法可分化学方法与仪器方法,化学方法多用于无机化合物的分析,而有机化合物多采用仪器分析。目前常用的检测方法有气相色谱法、高效液相色谱法、色谱/质联用分析法、毛细管电泳法、薄层色谱法、荧光分析法、标记免疫分析法(酶联免疫方法、放射免疫技术测定法和化学发光酶免疫测定法)等。气相色谱法适用于有挥发性的物质的分析;高效液相色谱法多用于有紫外吸收的成分分析,对于没有紫外吸收的化合物可采用折光示差、蒸发光散射等检测分析,但灵敏度低,对于能产生荧光的物质可采用荧光检测分析,但产生荧光的物质较少,因此高效液相到目前为止还没有适用所有成分的通用检测器;色谱/质联仪采用离子峰进行分析,灵敏度高、特异性强,但对于同分异构型化合物也不适用,对于有机大分子化合物的含量测定也存在困难。总之,这些仪器分析方法的局限是集分离与测定于一身,只有当样品成分被分离后才能检测,同时所有的检测器只能检测特定的化学成分群,而不能进行全成分群分析,当遇到象中药、中药复方及代谢组这样复杂的有机成分群体系(分子量从几十到上万,成分群结构从简单的氨基酸到复杂的三萜皂苷类)检测时,因色谱柱或检测器的限制,不能将全成分完全分离或检测到是必然的。因此建立起一种“法于自然”的仿生全成分群检测技术是实现中药现代化、解决代谢组学与中药质量控制时全成分群测定国际性难题的客观需要。

[0003] 众所周知,机体对中药成分群或代谢组成分群的快速“辨识”却不按化学分析原理,而是将其当作“外源性”物质经免疫应答识别,蛋白质与多糖等大分子具有免疫原性,而中药或代谢组的成分多为小分子,一般不具备免疫原性,但可将小分子成分群作为半抗原,通过与载体偶合成抗原,以抗原决定簇递呈而被辨识。分子量小的可以作为半抗原识别,分子量大的可以作为全抗原识别,因此免疫识别可囊括自然界与人工合成所有的有机物分子类群,自然是中药与代谢组成分群绝好的检测方法。

[0004] 免疫标记技术是指用荧光素、酶、放射性同位素、化学发光物、胶体金或电子致密物质等标记的抗体或抗原进行抗原抗体反应测定的技术,其中酶联免疫技术应用最广。目前免疫标记技术及产品多针对具有免疫原性的蛋白质、多糖设计,主要用于病理或生理状态的细胞因子测定,少用于象中药或代谢组研究中所遇的成分群的测定,尽管已有专利申请与文献报道中药成分群的质量控制可采用特异性的抗体抗原反应,但目前仅有芍药苷等

10 余种小分子成分建立了酶联免疫测定（也有其它的标记免疫测定），多按单成分测定模式成分分析，没有适合全成分群的同步芯片标记测定技术及相关芯片产品的面世。主要原因有五，一是传统成分测定多注重单成分的精确测定，少关注多成分的同步测定，测定方法多受单成分测定模式的影响，另者也没有学科研究的需要。近年来，随着中医药现代化与代谢组学研究的需要，全成分群的快速同步测定已是学科发展亟需解决的关键问题，引起了国内外广泛的关注与重视，已成为中药、生物医药、分析化学领域的国际难题；二是有大量高、精、尖测定的现代仪器，对单成分的测定研究细致深入，但对多成分的测定问题研究却不够深入，其缺点还没有引起足够的认识和重视，多认为凭借现代化的仪器可以解决小分子多成分群的测定难题，因此，近年来推动了指纹图谱测定多成分技术的兴起，但缘于指纹图谱测定技术具有与现代仪器分析一样的弱点：亦在大多数情况下，要先分离才能分析，故极大地制约了对多成分群体系的同步快速分析；三是目前还没有能满足全成分群检测所需的通用检测器；四是对于大分子化合物目前有采用标记免疫芯片技术的报道，但所针对的物质数目不大，相互间一般不考虑交叉反应的干扰，而大多数小分子有机化合物本身没有免疫原性，要与载体结合才能有免疫原性，尽管目前有单个小分子酶联免疫测定方法的报道，也有利用特异性的抗体抗原反应来进行中药成分群的质量控制的专利申请，但要建立适合中药与代谢组全成分群成千上万大样测定方法，不得不解决成分间的交叉反应；五是抗原与抗体的结合专属性决定抗原表位的决定簇，而中药及代谢物成分往往又同母核群生，难免存在相似的抗原决定簇，因此当芯片中的特异抗体与成千上万成分反应时非常有可能发生交叉反应，如莱克多巴胺抗体对多巴酚丁胺有 8.3% 交叉反应，链霉素抗体对双氢链霉素的交叉反应率达 90.6%，青霉素过敏病人与头孢菌素有 17.38% 交叉过敏反应。因此，怎样处理交叉反应是实现全成分群测定的最为关键的技术。

发明内容

[0005] 有鉴于此，本发明的目的在于提供一种全成分群同时测算方法。全成分群同时测算方法操作方便，重要的是能满足含各种多分子群的大批样本的同时测定需求，特别适合具有复杂组分的混合物的分析和测定，如：中草药、药物代谢产物、生物代谢物组、作物、食品、农药、化工产品等等。

[0006] 针对大样本抗体与成分间的交叉反应有二种解决思路，第一种思路为传统的观点，亦追求抗原表位的决定簇的特异性，尽量地消除交叉反应。对于具有免疫原性的大分子物质，因不易出现表位决定簇完全相同，可直接注入到动物体内产生特异性抗体，其抗体抗原反应特异性强，在做成芯片时可以不考虑抗体与成分间的交叉反应，目前很多生物试剂盒就是据此原理设计制而成；但对于中药及代谢组学中的小分子有机物，没有免疫原性，只能作为半抗原，与载体（蛋白质或高分子物）结合成抗原，注射到动物体内，才能产生所需特异性抗体，因此，抗体与小分子之间半抗原间的作用程度处决于各小分子之间的相似程度以及与载体蛋白质的合成方法，随着半抗原成分间相似程度的增加，其交叉反应表现得越强，大量文献也报道了各成分标记免疫竞争法检测时所产生的交叉反应，因此要完全消灭成分间的交叉反应既不符合自然规律，也不现实与可能，故只按传统的消除交叉反应的思路来进行大样本特异性抗原抗体测定会变得棘手，为此，我们只能另辟蹊径，采用第二思路，亦在尽可能消除交叉反应的情况下，不畏惧、不特异回避交叉反应，而是掌握并充

分利用交叉反应信息来全面分析所纳入成分,先获得各抗体与半抗原成分之间的交叉反应率,根据实验的精确度需要,先确定交叉反应率界值,对于大于界值的交叉成分可组成特异性与非特异性交叉成分浓度对数或浓度线性方程组来测算获得其浓度,从而实现全成分群抗体与抗原特异性与非特异性标记免疫反应分析的结合,建立起以芯片的形式进行快速、高通量的定性定量分析,解决目前中药及代谢组学全成分群同步测定的国际性难题。

[0007] 本发明先将各成分群分离、鉴定,确定该成分的归属;然后对有免疫原性的大分子直接注入动物体内产生抗体,没有免疫原性的小分子与大分子载体直接反应或化学合成为全抗原,在合成时尽可能地增强抗体与各成分半抗原间的特异性反应,消除成分间的交叉反应。直接或以合成抗原注入动物体内,产生抗体,分离抗体;再标记抗体或抗原;包被未标的抗体或抗原,制成多成分群的免疫芯片。通过抗体和抗原的竞争性的免疫标记反应获得全成分群的线性回归方程与交叉反应信息,再根据实验精确度的需要,将成分群分成需考虑交叉反应与不需考虑交叉反应两类,前者可直接依据芯片包埋抗原或抗体点阵的信号有、无、强、弱直接由线性回归方程读出含量,后者需建立对数浓度、浓度多元线性方程组,求解计算获得各成分群的含量,从而实现中药、代谢组学乃至化学合成与半合成全成分群的定性定量分析,达到多把钥匙同时开多把锁的钥匙,相互关联匹配分析的检测分析目的。

[0008] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0009] 一种全成分群同时测算方法,包括以下步骤:

[0010] (1) 根据成分的免疫原性与结构特点,对于具有免疫原性的大分子化合物直接作为抗原;将没有免疫原性的小分子采用直接或化学合成的方法与大分子载体制备成抗原;

[0011] (2) 上述抗原分别或混合注射到动物体内产生抗体,并分离出抗体;

[0012] (3) 对上述抗原或抗体进行标记;

[0013] (4) 将未标记的抗体或抗原按实验目的有规律地包被成芯片板;

[0014] (5) 获取交叉反应矩阵 R、斜率矩阵 B、同一抗体截距和的列向量 A、浓度对数或浓度列向量 C 和总叠加抑制率列向量 I:

[0015] 取与待测成分相应的免疫芯片板,采用固相吸附标记免疫竞争法测定芯片板点阵对各成分标准品液的特异与非特异性线性关系;

[0016] 依交叉反应公式计算成分间的交叉反应率,获得抗体与成分特异与非特异反应两两交叉反应率矩阵 R,根据实验精度确定交叉反应率界值,根据界值确定需考虑与不考虑交叉反应成分类别,考虑交叉反应成分,需建立各抗体与成分间相互交叉作用的斜率矩阵 B、同一抗体截距和的列向量 A 及浓度对数或浓度列向量 C;

[0017] 取与待测成分相应的免疫芯片板,采用固相吸附标记免疫竞争法测定芯片点阵对待测样品液的总抑制率,再转换成总叠加抑制率列向量 I;

[0018] (6) 对于不考虑交叉反应的成分,直接依线性方程读出该成分的含量;需考虑交叉反应的成分,根据标准曲线与样品液的总叠加抑制率建立成分对数浓度的多元线性方程: $BC = I - A$, 求解获得成分的含量;从而获得所有成分的含量。

[0019] 所述的载体为蛋白质或其它具免疫原性的非蛋白质高分子化合物;

[0020] 所述的抗原所产生的抗体为 IgA、IgD、IgG、IgE 和 IgM 中的一种或多种;

[0021] 所述的抗原或抗体的标记方法为荧光标记法、酶标记或放射性核素标记、胶体金及化学发光标记法;

[0022] 所述的有规律包被为按化学类型、中文编码、英文编码、药材所含成分分类群、功效、功能团、生物物种、同类化合物或同一组分代谢产物针对不同检测目标要求而编排成各种芯片点阵,包被未标记的抗原或抗体。

[0023] 斜率矩阵为 $B(b_{i,j})$, i 为包被的抗体或抗原, j 为竞争的成分, i 与 j 的交叉作用超过了实验精度界限, $b_{i,j}$ 为 B 矩阵中的任一元素,亦任一抗体对任一成分作用线性方程的斜率;

[0024] 同一抗体截距和的向量为 $A(\sum_{j=1}^n a_{i,j})$, n 为需考虑交叉反应成分的数目, $a_{i,j}$ 表示截距矩阵的任一元素,即任一抗体对任一成分作用线性方程的斜率。

[0025] 获得斜率矩阵 B 、同一抗体截距和的列向量 A 以及浓度对数列向量 C 的具体过程为:

[0026] 取与待测成分数目 5 ~ 6 倍的芯片板,在包被有多种抗原或抗体的芯片板每个微孔内分别两两交叉加入 1 ~ 4 数量级梯度的标准品溶液,每一块板只加呈梯度浓度标准品液中的一个浓度标准品液,5 ~ 6 块板完成一个成分对特异性抗原抗体交叉影响反应的线性考察实验;标准品液加完后在每个微孔内分别对应加入标记多克隆抗体或标记抗原反应,洗涤后,加入底物显色测定或直接测定荧光、放射性强度、发光强度;先计算抑制率,再建立各成分标准品液对抗原抗体反应抑制率的线性方程;计算出 IC_{50} ,再按特异性反应的 IC_{50} 除以非特异性的 IC_{50} 计算交叉率,获得交叉信息,根据实验的精密度确定交叉反应率的界值,取大于交叉反应率界值的成分组成交叉率矩阵 $R(r_{i,j})$,根所交叉率矩阵 R 组成对应的斜率矩阵 $B(b_{i,j})$ 与同一抗体截距和向量 $A(\sum_{j=1}^n a_{i,j})$,根据需考虑交叉成分数目的多少建立浓度对数或浓度列向量 C 。

[0027] 获得总叠加抑制率列向量 I 的具体过程为:

[0028] 取包被有多种抗体或抗原的芯片板,每个微孔内加入待测样品溶液,在每个微孔内加入标记的抗原或标记抗体,反应,洗涤后,加入底物显色测定或直接测定荧光、放射性强度、发光强度,读出样品液对抗原抗体竞争反应吸收值,采用 D/D_0 计算抑制率时,则应乘上 100,再加上 $(n-1) \times 100$ 构成总叠加抑制率列向量 I ;采用 $(D_0-D)/D_0$ 计算抑制率时,则乘上 100 即可; D 为样品或标准品的吸收值, D_0 为不加样品或标准品液的吸收值。

[0029] 免疫抗原的合成方法为:

[0030] 对于具免疫原性的大分子可直接作抗原,各种类型小分子成分能与蛋白质反应的可直接合成全抗原;不能与蛋白质直接反应的通过下列化学反应合成全抗原:

[0031] (1) 对于含氨基基团的半抗原成分,采用重氮化法或戊二醛法或多元酸酐法或二异氰酸酯法或偶氮苯甲酸法或亚胺酸酯法合成全抗原;

[0032] (2) 对于含糖基的半抗原成分,采用过碘酸盐氧化为醛基,然后与蛋白分子中的氨基形成 Schiff 氏碱法合成全抗原;

[0033] (3) 对于含羧基基团的半抗原成分,采用混合酸酐法或碳二亚胺法或活泼酯法合成全抗原;

[0034] (4) 含酮基基团半抗原成分,可采用 O -羧甲基羟胺法或者对肼基苯甲酸法或者 Mannich 反应法合成全抗原;

[0035] (5) 含羧酸甲酯衍生物的半抗原成分,采用叠氮化法,羧酸甲酯衍生物经肼解、亚硝化,转变为叠氯化物,再与载体蛋白上的氨基反应合成全抗原;

[0036] (6) 对于含羟基基团半抗原成分,采用氯乙酸钠法或三氯三嗪试剂法合成全抗原;

[0037] (7) 含氨基、羟基、巯基的半抗原,可采用卤代硝基苯法或苯醌法合成全抗原;

[0038] 合成所使用的载体蛋白有:丙种球蛋白、人血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、兔血清白蛋白(RSA)、牛甲状腺球蛋白(TG)、血蓝蛋白(Hemocyanin)以及人、牛和鸡 γ -球蛋白、卵黄蛋白,或者是人工合成的多聚赖氨酸、多聚谷氨酸、多聚混合氨基酸;或者采用聚乙烯吡咯酮、羧甲基纤维素、聚甲基丙烯酸酯微粒、乳胶和炭末。

[0039] 本发明中的免疫原性是指抗原能诱导机体产生体液免疫或细胞免疫应答的性能。

[0040] 大分子指分子量大于 10000 的分子,小分子指分子量小于 10000 的分子。

[0041] 步骤(3)中,每个成分都要标记,与每一个成分对应的抗原或抗体只要标记其中任意一种。标记的用来进行反应,没有标记的进行包被。标记为免疫测定的一种技术,在抗原或抗体上标上可测定的荧光、光、放射性或胶体金等物质,以便能进行定性定量分析,如果抗原抗体没有标记,两者的反应程度难以测算。

[0042] 步骤(4)中,包被时,每个成分都需要包被,按实验目的依名称、用途、方法、性质等进行分类编排。

[0043] 步骤(5)中,交叉反应率阈值,根据实验的要求不同而不同,一般 $< 1\%$ 或 $< 5\%$ 。

[0044] R 为交叉反应率,是用来判断两两成分相互干扰的大小, R 越大,干扰越大,当大于实验测定精度限度时,则视为某一成分对另一成分测定的干扰不得不考虑。当将大于精度限度的成分纳入考虑时,由所有纳入考虑的成分的浓度构成列向量 C , R 不参加计算,但决定 C 的向量数目。

[0045] 其它具免疫原性的非蛋白质高分子化合物,如多聚氨基酸类、聚乙烯吡咯酮等。

[0046] 斜率矩阵为 $B(b_{i,j})$ 中,竞争的成分为待测成分,由于为免疫竞争法测定,故为竞争成分,为免疫学通用名称, $b_{i,j}$ 为 B 矩阵中的任一元素,亦任一抗体对任一成分作用线性方程的斜率,为数学上通用写法。

[0047] 建立各成分标准品液对抗原抗体反应抑制率的线性方程的具体方法为采用最小二乘法线性回归,统计学或科研方法上通用。

[0048] 特异性反应的 IC_{50} 、非特异性的 IC_{50} 为抑制率为 50% 时所需成分的浓度。

[0049] 直接合成是指无需加其它物质可与蛋白质直接反应。

[0050] 所述的全成分群为已知结构的天然、人工合成与半合成产物。有免疫原性的可直接作抗原,没有免疫原性的需经与大分子载体结合成抗原,如能直接反应者可直接与大分子载体结合成抗原,如不能直接反应者可采用化学合成合成的方法合成抗原。载体可以是蛋白质或其它具免疫原性的高分子化合物;

[0051] 所述的全成分抗原或合成抗原所产生的抗体包括 IgA、IgD、IgG、IgE、IgM 等;

[0052] 所述的抗原、抗体的标记方法可采用荧光标记法、酶标记、放射性同位素、胶体金及化学发光标记等。

[0053] 所述的包被全成分群免疫芯片是将至少一种已知天然的或者人工合成、半合成化合物的未标记的直接抗原,或间接合成抗原,或抗体分别有规律地包被于芯片板的每个微

孔内,即得;

[0054] 所述有规律的包埋的抗原或抗体是指按化学类型、中文编码、英文编码、药材所含成分分类群、功效、功能团、生物物种、同类化合物、同一组分代谢产物等针对不同检测目标要求而编排成各种芯片点阵;

[0055] 所述的标准品液的线性方程为采用固相吸附的标记免疫竞争法,用与欲待测成分相应的免疫芯片板测得的芯片点阵对梯度浓度标准品液的特异性与非特异性抑制率与浓度对数或浓度的线性回归方程。

[0056] 所述的交叉反应率矩阵信息是按特异性 IC_{50} 除以非特异性 IC_{50} 求得各抗体与成分群间的交叉反应率。根据实验精度需要,先确定交叉反应率的界值,确定需与不需考虑交叉成分类别,由大于界值的成分构成芯片包被抗原或抗体与成分间的特异性与非特异性竞争反应的两两交叉率,记为 $R(r_{i,j})$,亦 $i \times j$ 个交叉率,一般 $i = j = n$,共 n^2 个数据。

[0057] 所述的斜率矩阵 $B(b_{i,j})$ 、同一抗体截距和列向量 $A(\sum_{j=1}^n a_{i,j})$ 及浓度对数或浓度列向量 C 是对应于 n^2 个交叉反应矩阵 R 组建而成。

[0058] 所述的待测样品液的总叠加抑制率列向量为采用固相吸附的标记免疫竞争法,用与欲待测成分相应的免疫芯片板测得的芯片点阵对样品液的总抑制率,如为 D (样品或标准品液的吸收值) / D_0 (为不加样品或标准品液的吸收值) 的形式,乘上 100,再加上 $(n-1) \times 100$ 构成,记为 I_j , j 为所对应的成分抗体。如为 $(D_0 - D) / D_0$ 形式,则乘上 100 亦可。

[0059] 所述根据交叉反应率矩阵成分所建立的多元线性方程矩阵式是: $BC = I - A$ 。其中 B 为各交叉成分的特异性与非特异性反应斜率矩阵, C 为各交叉成分的对数浓度或浓度列向量, I 为各交叉成分的反应总叠加抑制率列向量, A 为同一抗体特异性与非特异性成分的截距和的列向量。

[0060] 所述的待测样品中成分的含量可直接由回归方程读出(不考虑交叉反应的成分)或求解上述多元线性方程组(需考虑交叉反应的成分)获得的各成分的含量。

[0061] 所述全成分群测定芯片包括:

[0062] (1) 包被有多种抗原的芯片板和标记的抗体,或者包被有多种抗体的芯片板和标记的抗原;

[0063] (3) 浓磷酸盐缓冲液、浓底物缓冲液、底物储存液、终止液、标准品液等;

[0064] (3) 诸成分群与抗体间交叉反应信息。

[0065] 所述的包被有多种抗原的芯片板是将至少一种已知天然的或者人工合成的化合物直接或间接与蛋白质反应产物作为包被抗原;然后有规律地在每个芯片板微孔内包被一种抗原,即得;

[0066] 所述的标记的抗体是将至少一种已知天然的或者人工合成的化合物直接或间接与蛋白质反应产物作为免疫抗原,再将免疫抗原分别或者混合后多次注射到新西兰大白兔、豚鼠、猪、牛或羊等动物体内,产生抗体,经过分离纯化,获得各种抗原的多克隆抗体或者它们的混合物,所述的多克隆抗体是 IgG 、 IgM 、 IgA 、 IgD 、 IgE 中的一种或几种;然后,将各种抗原的多克隆抗体或者它们的混合物用标记物标记即得;

[0067] 所述的包被有多种抗原的芯片板制备时采用的化合物即标记多种抗体制备时采用的化合物;

[0068] 所述的包被有多种抗体的芯片板是将至少一种已知天然的或者人工合成的化合物直接或间接与蛋白质反应的产物作为免疫抗原；将各种免疫抗原分别或者混合后多次注射到新西兰大白兔、豚鼠、猪、牛或羊体内，产生抗体，经过分离纯化，获得各种抗原的多克隆抗体或者它们的混合物，所述的多克隆抗体是 IgG、IgM、IgA、IgD、IgE 中的一种或几种；然后有规律地在每个芯片板微孔内包被一种抗原的多克隆抗体或者每个芯片板微孔内均包被多克隆抗体的混合物，即得；

[0069] 所述的标记的抗原是将至少一种已知的天然的或者人工合成的化合物直接或间接与蛋白质反应的产物作为免疫抗原；然后用标记物标记各种免疫抗原，即得；

[0070] 所述的包被有多种抗体的芯片板制备时采用的化合物即标记的抗原制备时采用的化合物。

[0071] 所述的浓磷酸盐缓冲液、浓底物缓冲液、底物储存液、终止液、标准品液等的组合形式依所采用的标记方法不同而不同。酶标记法由浓磷酸盐缓冲液、浓底物缓冲液、底物储存液、终止液、标准品液等组成；荧光素、放射性同位素标记、化学发光及免疫金标记法直接测定荧光、放射性、发光及胶体金吸光强度，故不需要浓底物缓冲液、底物贮存液；化学发光标记也可与酶标记一样，提供氧化剂贮存液；采用生物素与亲和素标记法时还需提供生物素化的抗原或抗体、亲和素、标记生物素溶液等。

[0072] 所述的诸成分群与抗体交叉反应信息是按权利要求 1 所述，通过各成分群与抗体抗原竞争标记免疫反应测得的成分群与抗体间特异与非特异的两两交叉反应率。

[0073] 所述的芯片的应用方法，包括以下步骤：

[0074] (1) 取与欲测定成分数目 5~6 倍的芯片板，在包被有多种抗原的芯片板每个微孔内分别两两交叉对应加入 1~4 个数量级梯度的标准品溶液，每一块板只加一个浓度标准品液，5~6 块板完成一个成分对特异性抗原抗体反应交叉影响反应的线性考察实验。标准品液加完后再在每个微孔内加入标记的多克隆抗体反应，洗涤后，加入底物显色测定或直接测定荧光、放射性强度、发光强度，计算抑制率。

[0075] (2) 再按特异性反应的 IC_{50} 除以非特异性的 IC_{50} 计算交叉率，根据实验的精密度确定交叉反应率的界值，确定需考虑与不考虑交叉反应成分类别，取大于交叉反应率界值的成分组成交叉率矩阵 $R(r_{i,j})$ 。

[0076] (3) 根据交叉率矩阵 R 组建对应的斜率矩阵为 $B(b_{i,j})$ ，同一抗体截距和列向量为 $A(\sum_{j=1}^n a_{i,j})$ 及对数浓度向量 C 。

[0077] (4) 取包被有多种抗原的芯片板每个微孔内加入待测样品溶液，再在每个微孔内加入标记的多克隆抗体分别加入包被有该种抗原的微孔内反应，洗涤后，加入底物显色测定或直接测定荧光、放射性强度、发光强度，读出样品液对抗原抗体反应抑制率，采用 D (样品或标准品液吸收值) / D_0 (不加样品或标准品液的吸收值) 的形式，需乘上 100，加上 $(n-1) \times 100$ 获得总叠加抑制率列向量 I ；采用 $(D_0 - D) / D_0$ 形式，乘上 100 获得总叠加抑制率列向量 I 。

[0078] (5) 不考虑交叉反应者可直接由线性方程读出浓度，需考虑交叉反应者，按 $BC = I - A$ 建立交叉成分对数浓度的多元线性方程，求解算得结果。

[0079] (6) 如芯片产品已告知各成分与抗体的交叉反应率，则在 (1) 项试验时，不考虑交

又反应成分的只做特异性反应线性方程考察实验,而需考虑交叉反应成分都要做特异性与非特异性的线性方程考察实验;不考虑交叉反应成分还可采用混合标记抗体或抗原进行测定。

[0080] 或者是包括以下步骤:

[0081] (1) 取与欲测定成分数目 5~6 倍的芯片板,在包被有多克隆抗体的芯片板的每个微孔内分别两两交叉加入 1~4 个数量级标准溶液,每一块板只加一个标准品液,5~6 块板完成一个成分对特异性抗原抗体反应交叉影响反应的线性考察实验。标准品加完后再将每种标记的抗原对应加入到包被有该抗体的微孔内反应,洗涤后,加入底物显色测定或直接测定荧光、放射性强度、发光强度,计算抑制率。

[0082] (2) 再按特异性反应的 IC_{50} 除以非特异性的 IC_{50} 计算交叉率,根据实验的精密度确定交叉反应率的界值,确定需考虑与不考虑交叉反应成分类别,取大于交叉反应率界值的成分组成交叉率矩阵 $R(r_{i,j})$ 。

[0083] (3) 根据交叉率矩阵 R 组建对应的斜率矩阵为 $B(b_{i,j})$,同一抗体截距和向量为 $A(\sum_{j=1}^n a_{i,j})$ 及对数浓度列向量 C 。

[0084] (4) 取包被有多种抗体的芯片板,每个微孔内加入待测样品溶液,在每个微孔内加入标记的抗原,反应,洗涤后,加入底物显色测定或直接测定荧光、放射性强度、发光强度,读出样品液对抗原抗体反应抑制率,如采用 D/D_0 形式,需乘上 100,加上 $(n-1) \times 100$ 获得总叠加抑制率列向量 I ;如采用 $(D_0-D)/D_0$ 形式,乘上 100 获得总叠加抑制率列向量 I 。

[0085] (5) 不考虑交叉反应者可直接由线性方程读出浓度,需考察交叉反应者,按 $BC = I - A$ 建立交叉成分对数浓度的多元线性方程,求解算得结果。

[0086] (6) 如芯片产品已告知各成分与抗体的交叉反应率,则在 (1) 项试验时,不考虑交叉反应成分的只做特异性反应线性方程考察实验,而需考虑交叉反应成分特异性与非特异性的线性方程考察实验均做;不考虑交叉反应成分可采用混合标记抗体或抗原进行测定。

[0087] 所述的已知的天然的或者人工合成的包括:

[0088] 中药及天然药物的成分类型:(1) 糖类,主要有葡萄糖、其衍生物以及所构成的双糖、低聚糖和多糖等,如人参多糖、茯苓多糖、猪苓多糖等;(2) 苷类,由糖与配基组成的化合物,主要包括葡萄糖等糖构成的单糖链及多糖链苷类,包括 C、O、S、N 等苷类,如人参皂苷 Ra 、 Rb_1 、 Rb_2 、 Rb_3 、 Rc 、 Rd 等;(3) 醌类化合物,主要为蒽醌及菲醌类,如紫草素、丹参醌 I、茜草素、大黄素等;(3) 苯丙素类化合物,主要为香豆素类,如七叶内酯、七叶苷、川白芷内酯、当归白芷内酯、白花前胡甲素、乙素等;(4) 木脂素类化合物,主要为二至三个苯丙素的聚合物,如连翘酯苷、五味子素、五味子醇等;(5) 黄酮类化合物,如黄芩苷、红花苷、芦丁、银杏素等;(6) 萜类,包括单萜、倍半萜、二萜、二倍半萜、三萜类、四萜及多萜类,如柠檬烯、薄荷酮、樟脑、梓苷、莪术醇、青蒿素、穿心莲内酯、大戟醇、齐墩果酸等;(7) 强心苷类,如洋地黄毒苷、海葱苷 A;(8) 皂苷类,包括甾体皂苷类、三萜皂苷类,如柴胡皂苷 a、 b_1 、 b_2 、c、远志酸、桔根皂苷 A、C、D 等;(9) 挥发油,如桉油精、薄荷醇、桂皮醛、花椒油素、甲基正壬酮;(10) 胆汁酸类,如胆烷酸、胆酸、牛磺胆酸等;(11) 大环类化合物,如麝香酮、美登木碱;(12) 激素类,如 5β -雄甾烷-3,17-二酮等;(13) 有机酸类,如绿原酸、阿魏酸等;(14) 甾醇类与昆虫变态激素类,如 β -谷甾醇、豆甾醇、牛膝甾醇等;(15) 有机含硫、磷化合物,如大蒜辣素、核

苷酸等；(16) 生物碱,如麻黄碱、黄连碱、苦参碱、乌头碱、延胡索乙素等；(17) 鞣质类,如没食子酸鞣质、大黄鞣质等；(18) 氨基酸、蛋白质类及代谢产物,如南瓜子氨酸、使君子氨酸、天花粉蛋白等；(19) 核苷酸及代谢产物,如腺苷酸等；(20) 脂类及代谢产物,如蓖麻油等。

[0089] 可以用于检测人工合成化学药物中含有的化合物,如：(1) 中枢神经系统药物,如巴比妥、异戊巴比妥、安定、盐酸氯丙嗪、盐酸吗啡、咖啡因等；(2) 外周神经系统药物,包括拟胆碱药、抗胆碱药、肾上腺素受体激动剂、组胺 H₁ 受体拮抗剂、局部麻醉药,如毛果芸香碱、阿托品、苯丙氨类及普鲁卡因类；(3) 循环系统药物,包括 β 受体阻滞剂、钙通道阻滞剂、钠钾通道阻滞剂、血管紧张素转化酶抑制剂及血管紧张素 II 受体拮抗剂、NO 供体药物、调血脂药、抗血栓药等,如普萘洛尔、硝苯地平、奎尼丁、卡托普利、硝酸甘油、地高辛、洛伐他汀、华法林钠等；(4) 消化系统药物,如盐酸雷尼替丁、奥美拉唑、昂丹司琼、西沙必利、联苯双酯等；(5) 解热镇痛药和非甾体抗炎药,如阿司匹林、布洛芬等；(6) 抗肿瘤药,如环磷酰胺、氟尿嘧啶、放线菌素 D、紫杉醇等；(7) 抗生素,如青霉素类、四环素、氨基糖苷、红霉素、氯霉素等；(8) 化学治疗药,如吡哌酸、异烟肼、利福平、磺胺类、两性霉素 B、阿昔洛韦等；(9) 利尿及合成降血糖药,如甲苯磺丁脲、呋塞米等；(10) 激素,如米索前列醇、胰岛素、雌二醇、氢化可的松等；(11) 脂溶性与水溶性维生素类,如维生素 A 醋酸酯、维生素 B、C、D、E 类等。

[0090] 还可以检测附加剂中含有的化合物,包括：(1) 增溶剂,如司盘、吐温等；(2) 助溶剂,如苯甲酸钠、乌拉坦、尿素等；(3) 乳化剂,如卖泽类、苜泽类、(4) 矫味剂与矫臭剂,如山梨醇、甜叶菊苷、香兰素、香豆素等；(5) 着色剂,如日落黄、苋菜红、叶绿素等；(6) 防腐剂,如尼泊金甲、乙酯、苯甲酸、苯扎氯铵等；(7) 透皮促进剂,如二甲基亚砜、二甲基硅油、1-甲基-2-吡咯烷酮；(8) 抗氧化剂,如 EDTA、BHT、α-生育酚、维生素 C、没食子酸等。

[0091] 还可以检测农药中含有的化合物,农药包括有机磷、有机氮、拟除虫菊酯等类型,如甲基对硫磷、久效磷、2-甲基-4-氯苯氧基乙酸等。

[0092] 本发明免疫抗原的合成：对于具免疫原性的大分子可直接作抗原,各种类型小分子成分能与蛋白质反应的可直接合成全抗原；不能与蛋白质直接反应的可根据成分的具体结构,通过下列化学反应合成全抗原：

[0093] (1) 对于含氨基基团的半抗原成分,可采用重氮化法或戊二醛法或多元酸酐法或二异氰酸酯法或偶氮苯甲酸法或亚胺酸酯法合成全抗原。

[0094] (2) 对于含糖基的半抗原成分,可采用过碘酸盐氧化为醛基,然后与蛋白分子中的氨基形成 Schiff 氏碱法合成全抗原。

[0095] (3) 对于含羧基基团的半抗原成分,可采用混合酸酐法或碳二亚胺法或活泼酯法合成全抗原。

[0096] (4) 含酮基基团半抗原成分,可采用 O-羧甲基羟胺法或者对胍基苯甲酸法或者 Mannich 反应法合成全抗原。

[0097] (5) 含羧酸甲酯衍生物的半抗原成分,可采用叠氮化法,羧酸甲酯衍生物经胍解、亚硝化,转变为叠氮化物,再与载体蛋白上的氨基反应合成全抗原。

[0098] (6) 对于含羟基基团半抗原成分,可采用氯乙酸钠法或三氯三嗪试剂法合成全抗原。

[0099] (7) 含氨基、羟基、巯基的半抗原,可采用卤代硝基苯法或苯醌法合成全抗原。

[0100] 合成所使用的载体蛋白有：丙种球蛋白、人血清白蛋白 (HSA)、牛血清白蛋白 (BSA)、兔血清白蛋白 (RSA)、牛甲状腺球蛋白 (TG)、血蓝蛋白 (Hemocyanin) 其分子量范围分别为 23.5kDa ~ 50kDa、66.5kDa ~ 67kDa、66kDa ~ 68kDa、66kDa ~ 67kDa、45.8kDa、46kDa ~ 64kDa；以及人、牛和鸡 γ -球蛋白、卵黄蛋白等；也可以是人工合成的多聚赖氨酸、多聚谷氨酸、多聚混合氨基酸；还可采用聚乙烯吡咯酮、羧甲基纤维素、聚甲基丙烯酸酯微粒、乳胶和炭末等高分子化合物。

[0101] 本发明包被抗原的合成：制备方法与条件同免疫抗原，只是将免疫抗原制备时所用蛋白质换成另外的蛋白质，一般情况是将牛血清白蛋白 (BSA) 换成卵清白蛋白 (OVA)。

[0102] 本发明抗体的制备：将上述方法所得的免疫抗原多次注射到新西兰大白兔、豚鼠、猪、牛、羊等动物体内，一段时间后，动物产生抗体，通过酶联免疫间接 Elisa 法测定达到要求后，取血，冷冻一晚上，次日离心分离出抗血清，然后从血清中分离出抗体并且进行纯化，抗体包括 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。

[0103] 抗体的分离与纯化

[0104] IgG 的分离与纯化：取血清采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和溶液盐析出粗免疫蛋白，再用半透膜除去小分子，过 DEAE-52 纤维素层析柱，用 pH7.4 的 PBS 洗脱得到纯化的 IgG。

[0105] IgM 的分离与纯化：继续过聚丙烯酰胺葡聚糖凝胶 S-200Superfine 层析柱，以 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH7.4 PBS 洗脱，用 A_{280} 值确定 IgM 浓度，用 SDS 还原聚丙烯酰胺凝胶鉴定 IgM 纯度。

[0106] IgA 的分离与纯化：再用 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH6.4 PBS 液洗脱，收集蛋白峰，即为 IgA。再过 SephadexG200 柱，洗液为 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH7.4 PBS ($0.14\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl)，收集洗脱液测 OD_{280} 值，取第一峰即为纯化 IgA。

[0107] IgD 的分离与纯化：采用 GS-I 凝集素交联琼脂糖凝胶层析柱，以 PBS-CA 缓冲液洗柱，监测洗脱液 A_{280} 值，再用预冷的 PBS-CA-GAL 缓冲液洗脱 IgD，于 4℃ 进行透析精制得 IgD。

[0108] IgE 抗体的分离与纯化：采用先过 DE₅₂ 柱，再过 G150 柱，以 PBS 液洗脱得 IgE 抗体。

[0109] 芯片板的制备：

[0110] 抗原或抗体顺序的编排：

[0111] 将需要包埋的抗原或抗体可以按化学类型、中文编码、英文编码、药材所含成分分类群

[0112] (如生物碱类、甙类、醌类、香豆素和木脂类、黄酮类、强心苷类、皂甙类、萜类等成分群)、功效、功能团、生物物种、同类化合物、同一组分代谢产物等不同检测目标要求编排成各种芯片点阵孔。

[0113] 抗原、抗体的包被：

[0114] 用包被液 (碳酸盐缓冲水溶液) 适当稀释抗原、抗体为 $10\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 500\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的包被浓度，混匀，在活化处理过的芯片板微孔内每孔加入 $100 \sim 500 \mu\text{L}$ ；芯片板封膜后 4℃ 下反应过夜；倒掉包被的抗体溶液，洗板，每孔加入 $250 \mu\text{L}$ 13% OVA 封闭液 (0.1% ~ 0.9% 的 OVA 的 PBST 缓冲溶液)，4℃ 下封闭过夜；倒空封闭液，用洗涤液洗板 4 次，拍干；将芯片板真空干燥后，密封入带干燥剂的金属箔袋内，在 4℃ 贮存。

[0115] 标记物制备：可采用荧光素、酶、化学发光物、放射性同位素、胶体金或电子致密物

质进行标记。

[0116] 酶标记物可采用 HRP、AP、葡萄糖氧化酶、 β -D-半乳糖苷酶、脲酶进行标记,方法有改良过碘酸钠法、戊二醛二步法和戊二醛-过碘酸钠法。酶联免疫反应时标记物的工作浓度按 1 : 200 ~ 1 : 3000 稀释。底物:酶标记物采用 HRP 时,底物为邻苯二胺、四甲基联苯胺、氨基水杨酸、邻联苯甲胺、2,2'-连胺基-2(3-乙基-并噻唑啉磺酸-6)铵盐;标记酶为碱性磷酸酯酶时,底物为 4-硝基酚磷酸盐(PNP)、萘酚-AS-Mx 磷酸盐+重氮盐;标记酶为葡萄糖氧化酶,底物为 ABTS+HRP+葡萄糖、葡萄糖+甲硫酚嗪+噻唑兰;标记酶为 β -D-半乳糖苷酶,底物为甲基伞酮基半乳糖苷(4MuG)、硝基酚半乳糖苷(ONPG)。酶联免疫反应,工作时用底物缓冲液稀释浓度为 10 ~ 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0117] 荧光素标记:标记物主要有异硫氰基荧光黄(FITC)、四乙基罗丹明(RB200)和藻红蛋白(PE),最常用的为异硫氰基荧光黄。标记的方法有搅拌法(Marshall 法)和半透析法(Clark 法)。

[0118] 放射性同位素标记:标记物主要有放射性核素,主要有 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C 等。以 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ 、 $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 、 $^3\text{H}_2\text{O}$ 为基本原料经细胞培养或化学反应标记抗原或抗体。

[0119] 化学发光标记:标记物常有鲁米诺、异鲁米诺及其衍生物、吖啶酯类化合物(AE)与电化学发光(ECL)的三联吡啶钌 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ 和三丙胺(TPA)体系,鲁米诺、异鲁米诺及其衍生物常采用 N-羟基琥珀酰胺作为偶联试剂标记;吖啶酯与吖啶-9-(N-磺酰基)碳酸胺可直接与抗体抗原反应标记;三联吡啶钌 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ 通过活化“手臂”(吡啶环)与抗体抗原反应标记。

[0120] 还可采用胶体金、生物素与亲和素标记抗体抗原。

[0121] 所述酶联免疫吸附检测法(ELISA)的建立:

[0122] (1) 所需系列溶液的配制:

[0123] 浓缩磷酸盐缓冲液(PBS):是每升含 NaCl 10 ~ 200g、 KH_2PO_4 0.5 ~ 3g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5 ~ 50g、 KCl 0.1 ~ 5g 的水溶液($0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),使用前稀释 1 ~ 10 倍;

[0124] 浓底物缓冲液为每升含有 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 100 ~ 200g、 $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_6$ 、 H_2O (柠檬酸)10 ~ 100g。使用前稀释 1 ~ 10 倍,每升稀释液加 5 ~ 30%的 H_2O_2 36 ~ 150 μl 制得底物缓冲液;

[0125] 底物储存液:溶解并储存 1 ~ 20mg $\cdot \text{mL}^{-1}$ 底物的溶液;

[0126] 稀释液配制:使用前将前述浓 PBS 稀释 1 ~ 10 倍,再加 0.01%的 Tween-20 与 0.1 ~ 1%明胶制得的 $0.01 \sim 0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲溶液;

[0127] 洗涤液(PBST)配制:使用前将前述浓 PBS 稀释 1 ~ 10 倍,再加 0.01 ~ 0.1%的 Tween-20 制得 $0.001 \sim 0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲溶液;

[0128] 浓底物缓冲工作液的配制:使用前将前述浓底物缓冲液液稀释 1 ~ 10 倍,每 10ml 稀释液加 5 ~ 30%的 H_2O_2 36 ~ 150 μl 、1ml 的底物储存液;

[0129] 终止液:2M【M为摩尔浓度,国际通用浓度单位】的 H_2SO_4 溶液。

[0130] 标准品溶液:各成分的 0.001 ~ 10mg $\cdot \text{mL}^{-1}$ 溶解溶液。使用前每种化合物成分再配成 6 个标准浓度从 0.1 ~ 10000ng $\cdot \text{mL}^{-1}$,标准对照液。

[0131] (2) 抗体与包被抗原浓度的优选:将包被抗原分别用稀释液稀释成 10ng $\cdot \text{mL}^{-1}$ ~ 500ng $\cdot \text{mL}^{-1}$ 包被浓度,分别加入 50 ~ 500 μL 不等量包被成芯片,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。次日取出芯片板回至室温,每孔用 PBS 溶液洗涤,充分洗涤后,用封闭液封闭芯片板,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过

夜。次日取出洗涤后,于 37℃温育箱内烘干待用;将动物阳性血清梯度稀释对应加入到芯片板的每行,室温孵育 30min 后洗涤、拍干;每孔加入 HRP 标记的 IgG,室温孵育 30min 后洗涤、拍干;每孔加入显色液,暗处反应 15min,取出后每孔加入终止液,用酶标仪测定吸光度值 A_{450} 。用已确定的抗原包被浓度稀释抗原包被芯片板,同样方法封闭洗涤。37℃温育箱内烘干后进行空白对照、阴性血清、阳性血清等方法学研究,测定 A_{450} 值。当阳性血清的 $A_{450} \geq$ 阴性对照孔的 2.1 倍并且 A_{450} 大于 0.1,此时血清的稀释倍数即为血清的效价。

[0132] (3) 抗体灵敏度的测定:用包被液将上述包被抗原配成优选出浓度的溶液,加入到芯片微孔中,4.0℃过夜。次日,弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗,拍干。用封闭液封闭上述已包被的芯片板,室温孵育 2.5 小时,洗涤。加稀释标记抗体与不同浓度的样品于上述已封闭的反应孔中,室温孵育 24 小时,洗涤。于各反应孔中加入临时配制的底液的,立即用光度免疫分析仪检测 A_{450} 值。按抑制率% = $(D/D_0) \times 100\%$ 计算抑制率,式中 D 是加入竞争者的吸光度, D_0 是没有竞争者的吸光度。其中 50% 抑制率时药物的浓度即为该抗体的灵敏度,亦 IC_{50} 。

[0133] (4) 工作曲线的建立:1) 包被、2) 封闭操作同 (3) 项下,3) 竞争反应:取待测成分数 5~6 倍的芯片板,按芯片成分的顺序依次两两交叉加样,每块全成分群芯片只加一个标准品液,浓度呈梯度稀释,共需 5~6 块完成一个成分对特异性抗原抗体反应交叉影响反应抑制率测定,从首至末测完待测的交叉成分测定;上述加样完后芯片再加稀释酶标抗体或抗原于上述的芯片板孔中,室温孵育 2~4 小时,洗涤。4) 显色过程:于各反应孔中加入临时配制的底物液,立即用酶标仪检测。5) 计算过程:以多成分的浓度的对数为横坐标,抑制率为纵坐标,作图得到工作曲线。

[0134] 本发明已完成中药、化药及其它成分特异性反应线性范围、 IC_{50} 及最低检测限见表 1。

[0135] (5) 交叉反应实验:1) 包被、2) 封闭操作同 (3) 项下,3) 竞争反应、显色测定同 (4) 项下;4) 计算过程:用特异性成分的 IC_{50} 除以非特异性成分的 IC_{50} 即得交叉反应率。由交叉反应测得特异性成分与非特异性成分的两两交叉率,记为 $R(r_{i,j})$, i 为特异性抗体, j 为与该抗体的竞争特异与非特异性成分,共有 $i \times j$ 个交叉反应率, $i = j$ 时,为抗体与竞争成分的特异性反应,交叉率为 100%,当 $r_{i,j}$ 为零时,说明两成分没有交叉反应,一般 $i = j = n$,共为 n^2 个。抗体与成分交叉反应率的矩阵为:

[0136] 表 1 各中药、化学药物及其它成分特异性反应线性范围、 IC_{50} 、最低检测限及回收率

[0137]

小分子名称	线性范围 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	检测限 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率 (%)
甘草酸	0.01~10	<0.5	<0.5	75.7~140.9
川楝素	0.01~100	<2	<0.3	85.3~135.9
芍药苷	0.01~20	<2	<0.08	75.7~133.3
人参皂苷 Rb1	0.001~30	<0.1	<0.03	81.2~142.3
人参皂苷 Rg3	0.001~30	<0.1	<0.03	79.7~132.1
绿原酸	5~250	<15	<5	90.6~123.4
银杏内酯 B	0.01~100	<1	<0.2	87.4~147.3
雷公藤	0~8	<5	<0.5	78.1~154.7
大黄酸	0.001~0.7	<0.1	<0.1	87.9~141.4
大黄素	0.001~0.7	<0.1	<0.05	83.4~132.9
大黄素甲醚	0.001~0.7	<0.1	<0.07	80.6~135.8
[0138]				
大黄酚	0.001~0.7	<0.2	<0.06	91.4~132.7
芦荟大黄素	0.001~0.7	<0.5	<0.03	75.9~137.3
黄芩苷	0.001~0.8	<0.3	<0.05	78.8~142.1
己烯雌酚	0.0001~0.025	<0.002	<0.0008	79.3~145.2
恩诺沙星	0.5~50	<10	<2	76.9~145.9
醋酸甲羟孕酮	2.5~50	<10	<5	89.8~131.7
莱克多巴胺	0.0001~0.025	<0.01	<0.001	92.3~144.6
氧氟沙星	0.001~0.35	<0.1	<0.08	87.4~133.5
盐酸克伦特罗	0.0001~0.250	<0.01	<0.001	91.9~142.9
特布他林	0.0001~0.055	<0.1	<0.01	96.5~140.2
四环素	0.007~15.5	<0.2	<0.1	84.3~133.7
孕酮	0.032~50.5	<1	<0.1	88.6~135.2
青霉素类	0.32~500.5	<15	<0.1	86.9~143.7
氯霉素	0.0032~3.5	<0.1	<0.02	95.3~145.8
罗丹明 123	0.0032~25.8	<0.5	<0.01	91.2~140.8
链霉素	0~0.5	<0.1	<0.1	78.5~134.7
乙草胺	0.04~5	<1	<0.1	89.3~135.2
紫杉醇	0.04~50	<10	<0.3	88.5~143.5
环丙沙星	0.04~60	<1	<0.8	87.7~133.2
双酚 A	0~0.1	<0.5	<0.1	91.3~134.5
氟虫腈	0.10~100	<5	<2	86.9~134.4
乐果	0.01~50	<0.5	<0.1	91.3~145.2
2 甲 4 氯	0.01~10	<2	<0.1	85.9~143.1
久效磷	0.2~100	<1	<1	93.9~134.7
除草剂 2, 4-D	0.05~10	<1	<0.3	83.2~145.8

$$[0139] \quad R = (r_{i,j}) = \begin{pmatrix} r_{11} & r_{12} & r_{13} & \cdots & r_{1,j} & \cdots & r_{1n} \\ r_{21} & r_{22} & r_{23} & & r_{2,j} & & r_{2n} \\ r_{31} & r_{32} & r_{33} & & r_{3,j} & & r_{3n} \\ \vdots & \vdots & \vdots & & \vdots & & \vdots \\ r_{i1} & r_{i2} & r_{i3} & & r_{i,j} & & r_{in} \\ \vdots & \vdots & \vdots & & \vdots & & \vdots \\ r_{n1} & r_{n2} & r_{n3} & & r_{n,j} & & r_{nn} \end{pmatrix}$$

[0140] 本发明芯片已完成中药、化药及其它成分的交叉反应率见表 2。根据实验的精确定可以确定需考虑的交叉成分特异性与非特异性成分的斜率矩阵 B：

$$[0141] \quad B = (b_{i,j}) = \begin{pmatrix} b_{11} & b_{12} & b_{13} & \cdots & b_{1,j} & \cdots & b_{1n} \\ b_{21} & b_{22} & b_{23} & & b_{2,j} & & b_{2n} \\ b_{31} & b_{32} & b_{33} & & b_{3,j} & & b_{3n} \\ \vdots & \vdots & \vdots & & \vdots & & \vdots \\ b_{i1} & b_{i2} & b_{i3} & & b_{i,j} & & b_{in} \\ \vdots & \vdots & \vdots & & \vdots & & \vdots \\ b_{n1} & b_{n2} & b_{n3} & & b_{n,j} & & b_{nn} \end{pmatrix}$$

[0142] 式中 n 为具交叉作用的待测成分数目。特异性与非特异性成分的同一种抗体截距和列向量 A :

$$[0143] \quad A = \left(\sum_j^n a_{i,j} \right) = \left(\sum_{j=1}^n a_{1j} \quad \sum_{j=1}^n a_{2j} \quad \sum_{j=1}^n a_{3j} \quad \cdots \quad \sum_{j=1}^n a_{ij} \quad \cdots \quad \sum_{j=1}^n a_{nj} \right)^T$$

[0144] 由于标记免疫反应的特异性较强,只有化学结构较相似的成分才产生交叉反应,而结构相似的成分往往药理作用又相似,故一般定交叉反应率大于 1% 者才作为影响较显著纳入交叉成分进行精确计算。

[0145] 芯片产品的组装及应用 :

[0146] (1) 芯片产品的组成 :a. 按一定排列规律制成包被抗原 (或抗体) 的固相载体芯片板 ;b. 酶标记过的上述药物所产生 IgG 等抗体 (或酶标记药物抗原) ;c. 浓磷酸盐缓冲液 (每升含 NaCl 10 ~ 200g、KH₂PO₄ 0.5 ~ 3g、Na₂HPO₄ · 12H₂O 5 ~ 50g、KCl 0.1 ~ 5g 的水溶液 (0.1mol · L⁻¹),使用前稀释 1 ~ 10 倍) ;d. 浓底物缓冲液 (每升含有 Na₂HPO₄ · 12H₂O 100 ~ 200g、C₄H₂O₇ · H₂O (柠檬酸) 10 ~ 100g。使用前稀释 1 ~ 10 倍,每升稀释液加 5 ~ 30% 的 H₂O₂ 36 ~ 150 μl 制得底物缓冲液) ;e. 底物储存液 (溶解并储存底物的溶液) ;f. 终止液 (2M 的 H₂SO₄ 溶液) ;g. 样品的标准溶液 (各成分的 1.0mg · ml⁻¹ 溶解溶液。使用前按需要每种化合物成分再配成 6 个标准浓度从 0.1 ~ 10000ng · ml⁻¹ 标准品液) ;f. 提供芯片可测成分的交叉反应信息。对于荧光、放射性、化学发光、胶体金及生物素与亲和素标记法,根据具体情况其浓底物缓冲液、底物储存液及终止液可以变动。

[0147] (2) 应用程序

[0148] 1) 试剂的准备 :按要求对稀释液、洗涤液、底物缓冲工作液进行配制与稀释。

[0149] 稀释液配制 :使用前将浓 PBS 稀释 1 ~ 10 倍,再加 0.01% 的 Tween-20 与 0.1 ~ 1% 明胶制得的 0.01 ~ 0.1mol · L⁻¹ 磷酸缓冲溶液 ;

[0150] 洗涤液 (PBST) 配制 :使用前将浓 PBS 稀释 1 ~ 10 倍,再加 0.01 ~ 0.1% 的 Tween-20 制得 0.001 ~ 0.1mol · L⁻¹ 的磷酸缓冲溶液 ;

[0151] 底物缓冲工作液的配制 :使用前将浓底物缓冲液稀释 1 ~ 10 倍,每 10ml 稀释液加 5 ~ 30% 的 H₂O₂ 36 ~ 150 μl、1ml 的底物储存液。

[0152] 标记抗体工作液的配制 :用稀释液对标记抗体稀释制得工作浓度为 1 : 200 ~ 1 : 3000 稀释液。

[0153] 标记抗原工作液的配制 :用稀释液对标记抗原稀释制得工作浓度为 10ng · mL⁻¹ ~ 500ng · mL⁻¹。

[0154] 标准品溶液配制 :各成分的 1.0mg · ml⁻¹ 溶解溶液。使用前每种化合物成分再配成 6 个标准浓度从 0.1 ~ 10000ng · ml⁻¹,标准对照液。

[0155] 2) 样品前处理 :将待测药材样品加 8 倍量水提取,以 3000rpm · min⁻¹ 离心 15 分

钟,经过 0.45 μm 的滤膜抽滤,用根据文献或药材的浸膏得率稀释液稀释,得到 0.1 ~ 10000ng • ml⁻¹ 待测样品液。

[0156] 表 2 部分相似中药、化学药物及其它成分的交叉反应信息 (%)

[0157]

成分 抗体	甘草 酸	芍药 苷	人参 皂苷 Rg3	大黄 酸	大黄 素	大黄 素甲 醚	大黄 酚	芦荟 大黄 素	黄芩 苷	氧氟 沙星	四环 素	青霉 素类	氯霉 素	链霉 素	乐果	久效 磷
甘草酸	100	<1	0.15 ~2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
芍药苷	<1	100	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
人参皂苷 Rg3	0.15 ~2	<0.2	100	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
大黄酸	<1	<1	<1	100	<2	<10	<5	<10	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
大黄素	<1	<1	<1	<2	100	<15	<5	<2	<2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
大黄素甲醚	<1	<1	<1	<5	<12	100	<5	<2	<3	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
大黄酚	<1	<1	<1	<6	<5	<2	100	<15	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
芦荟大黄素	<1	<1	<1	<10	<1	<5	<10	100	<2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
黄芩苷	<1	<2	<3	<1	<1	<2	<1	<2	100	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
氧氟沙星	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	100	<1	<1	<1	<1	<1	<1
四环素	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	100	<1	<1	<1	<1	<1
青霉素类	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	100	<1	<1	<1	<1
氯霉素	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	100	<1	<1	<1
链霉素	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	100	<1	<1
乐果	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	100	<1
久效磷	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	100

[0158] 3) 检测步骤:①加样:向芯片板中加入多成分系列标准浓度溶液或样品溶液,然后每孔加入酶标抗体(或酶标抗原)工作液,室温恒温孵育 1.5h;②洗涤:倾出孔中液体,向芯片板中加入洗涤液,静置 5min 后拍干,重复三次;③加底物缓冲液;④终止:每孔加终止液终止反应;⑤检测:用酶标仪测定每孔的吸光度。

[0159] 4) 结果分析:以所测得的标准品吸光度 D,除以第一个标准(0 标准,不加标准品)的吸光度 D₀,再乘以 100,得到抑制率(D/D₀),以抑制率为纵坐标,多成分浓度的对数为横坐标作标准曲线,再按特异性反应的 IC₅₀ 除以非特异性的 IC₅₀ 计算交叉率,根据实验的精密密度确定交叉反应率的界值,取大于交叉反应率界值的成分组成交叉率矩阵 R(r_{i,j}),根据交叉率矩阵 R 建立交叉成分的斜率矩阵 B = (b_{i,j})、浓度对数列向量 C = (logc₁, logc₂, logc₃, ..., logc_n)^T、或浓度列向量 C = (c₁, c₂, c₃, ..., c_n)^T、同一抗体截距和向量。

[0160] $A = \left(\sum_{j=1}^n a_{1j} \quad \sum_{j=1}^n a_{2j} \quad \sum_{j=1}^n a_{3j} \quad \dots \quad \sum_{j=1}^n a_{ij} \quad \dots \quad \sum_{j=1}^n a_{nj} \right)^T$ 、总叠加抑制率 B/B₀ 列向量 I = (I₁ = (B₁/B₀+n-1) × 100, I₂ = (B₂/B₀+n-1) × 100, I₃ = (B₃/B₀+n-1) × 100, ..., I_j = (B_j/B₀+n-1) × 100, ..., I_n = (B_n/B₀+n-1) × 100)^T, 或 (B₀-B)/B₀ 列向量 I = (I₁ = ((B₀-B₁)/B₀) × 100, I₂ = ((B₀-B₂)/B₀) × 100, I₃ = ((B₀-B₃)/B₀) × 100, ..., I_j = ((B₀-B_j)/B₀) × 100, ..., I_n = (B₀-B_n)/B₀) × 100)^T 及其构成的线性方程组:BC = I-A。

[0161] 式中 r_{i,j}、b_{i,j}、logc_{i,j}、a_{i,j}、I_j 分别为具交叉反应第 i 成分抗体对第 j 成分标准品液标记免疫竞争反应的交叉反应率、线性回归斜率、对数浓度(或浓度)、截距及样品液总叠加抑制率。对于不考虑交叉反应成分可直接从标准曲线上读出其浓度,需考虑交叉反应

成分建立成分浓度矩阵方程 $BC = I - A$, 求解获得其浓度。

[0162] 所述的荧光素、放射性同位素、化学发光物及胶体金标记等方法的建立与酶联免疫法总体思路上相似, 芯片板上的抗体或抗原点阵排列与包埋; 稀释液、洗涤液、标准品溶液及固相洗涤反应过程与酶联免疫相同或相似, 只是抗体或抗原的标记方法分别采用荧光素、放射性核素、化学发光物进行标记(如将化学发光物作底物则与酶联免疫反应一样), 然而对于抗原抗体标记物或加底物后的反应产物却分别通过测定荧光、放射性、发光强度与金颗粒的聚集程度来计算抑制率, 故其浓底物缓冲液、贮存液、终止液与测定方法因标记方法不同而不同。对于采用生物素与亲和素标记法, 在芯片吸附反应时, 需加入生物素化的抗原或抗体, 再加亲和素、标记生物素, 以放大反应信号。

[0163] 因此, 本发明的基本思路在传统经典抗原抗体特异性反应基础上, 充分利用多成分间抗体与非特异性成分的交叉反应信息, 根据实验要求确定需考虑交叉反应成分, 建立斜率矩阵、浓度、总抑制率与截距和列向量多元线性方程组。对于不考虑交叉反应干扰的成分直接由线性方程读出浓度, 对于需考虑交叉反应成分者可解所建立的线性方程获得成分的浓度。

[0164] 有益效果:

[0165] 本发明是申请人经过十余载的艰巨实践摸索, 在系统分析目前仪器方法“需先分离后分析、没有适合全成分群的通用检测器”致命缺陷后; 参考中药成分特异性抗体在中药质量检测中的应用, 在解决了成分间非特异性交叉反应干扰后, 提出的“法于自然”的全成分群仿生检测思路, 才创立了中药、中药复方和代谢组学研究亟需的多成分群高通量快速同步检测技术, 并研制出相应产品, 解决了全成分群难实现同步检测的国际性难题。与继往的检测方法比较, 有以下明显的优点:

[0166] 1) 制备的抗体与对应的抗原成分特异性强、专属性高, 绝大多数能实现多把钥匙同时开各自锁的目标, 能定性定量分析多个成分群, 可以是高分子成分, 也可以是小分子成分。

[0167] 2) 在考虑抗原与抗体特异性反应前提下, 不回避和有意消除交叉反应, 而是充分利用交叉反应信息, 根据实验精确度要求, 建立交叉反应成分的对数浓度或浓度多元线性方程组, 求解获得其浓度。本发明已对抗原抗体表面决定簇的特异性与非特异性统一考虑, 其所检测原理能客观真实地反应自然界各成分族辨识的基团摩尔单位的定量关系, 其测算结果更准确可信。

[0168] 3) 诸成分群中的大分子物质直接作抗原或小分子物质作半抗原与载体蛋白质或其它高分子材料合成抗原, 注射动物体内产生多克隆抗体。对其抗原或抗体进行标记, 按英文、中文、按同中药成分群、按中成药成分群、按同母核群、按同功效群等不同形式组成芯片点阵包埋, 制成点阵芯片, 采用竞争免疫标记技术分析各点阵的信号强弱, 实现高通量、快速、高效、高专属性、高综合性的多成分群分析的目标。

[0169] 4) 样品的前处理简单, 无需先分离后分析, 将样品直接稀释成样品便可分析, 操作十分便捷。

[0170] 5) 整个检测在 1 ~ 3 小时完成, 效率极高。

[0171] 6) 样品最低检测限可达 $0.1 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以下, 线性检测范围在 $0.0001 \sim 500 \mu \text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 板内变异系数在 $0.3\% \sim 15\%$ 以内, 样品中回收率在 $70\% - 150\%$ 之间。

[0172] 7) 中药及代谢成分群经水溶解后均能达到上述浓度, 本法非常适合于中药原成分群及体内代谢产物的分析; 还可用于生物体内代谢组成成分群、化学药物的体内代谢成分、农药残留、食品与药品中的添加剂、及众多小分子化工产品的分析; 本技术还可应用于大分子蛋白质组、基因组与多糖成分的研究, 故为全成分群的普适方法。

[0173] 8) 可采用计算机阅读与计算, 实现测算信息共享, 并机建立巨大的已知成分测定数据库。

[0174] 因此本发明技术与产品可最终可解决中药及代谢组学多成分群同步分析国际性难题, 将对化学成分分析学科将产生变革性的巨大影响。

[0175] 由于本技术发明统一考虑了抗体与成分间的特异性与非特异性反应, 其反应的强弱基于抗原表位决定簇, 因此线性叠加好, 测算得结果准确, 故本方法为“法于自然”的全成分群分析的普适方法, 具有专属性强、综合性强、灵敏度高、适用性广、不需分离、检测批量大、仪器设备要求不高、测定成本低、速度快、操作简单方便、试剂保存时间长等特点, 如与计算机连接还可进行信息化自动读存处理, 具有其它方法无可比拟的巨大优势, 是解决目前有机化合物, 特别是结构复杂的天然化合物同步分析的国际性难题的最宜方法, 因此本技术发明不仅对中药及代谢成分分析、对生物成分检测、化学分析具有划时代的意义, 而且对化学药物、制剂附加剂、生物体内代谢产物、农业食品、农作物成分群、农药残留物以及系统生物学中蛋白质组、基因组的分析测定有重大促进作用。将对于中医药现代化、国际化; 将对系统生物学代谢组的发展具有里程碑作用, 同时也对分析化学、计量化学产生不可估量的影响, 同时潜在的巨大的市场经济效益。

具体实施方式:

[0176] 本发明公开了一种全成分群同时测算方法。本领域技术人员可以借鉴本文内容, 适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是, 所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的, 它们都被视为包括在本发明。本发明的方法和芯片已经通过较佳实施例进行了描述, 相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用程序进行改动或适当变更与组合, 来实现和应用本发明技术。

[0177] 以下以大黄单一药材蒽醌类成分群 10 种成分芯片为例, 就本发明提供的一种全成分群同时测算方法及芯片, 进行详细阐述。

[0178] 实施例 1: 大黄单一药材蒽醌类成分群芯片的制备与应用

[0179] 大黄蒽醌类成分群为其主要有效成分, 主含大黄酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄酚、芦荟大黄素等成分, 其免疫芯片的制备与应用如下:

[0180] 1. 大黄酸等 5 个成分免疫抗原的制备: 取 100mg 琥珀酸酐溶于 50ml 二氧六环后, 分成五份, 分别各加入大黄酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄酚、芦荟大黄素 28.4mg (0.1mmol)、27.0mg (0.1mmol)、28.4mg (0.1mmol)、25.4mg (0.1mmol)、27.0mg (0.1mmol), 搅拌溶解。再每份分别加入 0.1ml 三乙胺, 于 30℃ 搅拌 1h, 待溶液冷却至室温, 滴入 100mg BSA (100mg BSA 溶于 5ml, pH7.4, 0.01mol · L⁻¹ 的 PBS 溶液中) 溶液, 随后加入 19mg EDC · HCl 避光磁力搅拌器搅拌 20h。将反应物置透析袋中在 4℃ 冰箱中, 用 pH7.4, 0.01mol · L⁻¹ 的 PBS 溶液透析, 连续透析两天, 期间多次换液, 最后得到 10ml 产物液, 将透析后的溶液冷冻干燥, 分别得到大黄酸等五成分的免疫抗原, -20℃ 保存。

[0181] 2. 大黄酸等五成分包被抗原的制备:分别称取大黄酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄酚、芦荟大黄素反应物各 0.1mol,分别按下述操作制备包被抗原。

[0182] 取 100mg 琥珀酸酐溶于 50ml 二氧六环后,分成五份,分别加入大黄酸等五成分反应物 0.1mol,搅拌溶解,再每份分别加入 0.1ml 三乙胺,于 30℃ 搅拌 1h,待溶液冷却至室温,滴入 100mg OVA (100mg OVA 溶于 5ml, pH7.4, 0.01mol·L⁻¹ 的 PBS 溶液中) 溶液,随后加入 19mg EDC·HCl 避光磁力搅拌器搅拌 20h。将反应物置透析袋中置 4℃ 冰箱中,用 pH7.4, 0.01mol·L⁻¹ 的 PBS 溶液透析,连续透析两天,期间多次换液,最后得到 10ml 产物液,将透析后的溶液冷冻干燥,分别得到大黄酸等五成分的包被抗原,-20℃ 保存。

[0183] 3. 多克隆抗体的制备:上述合成的免疫原分别用来免疫 10 只新西兰大白兔。首次免疫,用注射器对抽法将弗氏完全佐剂与免疫原按 1:1 混合成油包水的乳浊液,每只兔注射 1mg·ml⁻¹ 免疫原,每个免疫原分别只注射 2 只兔子,进行背部皮下多点注射(5 点以上)。首次免疫两周后,第一次加强免疫用弗氏不完全佐剂与同样量的抗原混合,进行第二次免疫,剂量、方法同首次免疫。以后每隔两周加强免疫一次,剂量减半。第五次不加佐剂只用生理盐水稀释抗原进行末次免疫,注射七天后进行心脏采血。血液在 4℃ 静置过夜,次日 3000rpm 离心 15min,分离出抗血清,得到多克隆抗体。

[0184] 4. 酶标记抗原/抗体的制备:称取 HRP 溶解于 1ml 蒸馏水中,然后加入 0.2ml 新配的 0.1mol·L⁻¹ NaIO₄ 溶液,室温下避光搅拌 20min;将上述溶液装入透析袋中,用 1mol·L⁻¹ pH4.4 的醋酸钠缓冲液透析,4℃ 过夜;加 20μl 0.21mol·L⁻¹ pH 9.5 碳酸盐缓冲液,使已醛化的 HRP 溶液的 pH 升高到 9.0~9.5,然后立即加入 1~100mg 抗原/抗体与 1ml 0.01mol·L⁻¹ 碳酸盐缓冲液,室温避光轻轻搅拌 2 小时;加 0.1ml 新配的 4mg·ml⁻¹ NaBH₄ 液,混匀,4℃ 下再静置 2 小时;将上述溶液装入透析袋中,用 0.01mol·L⁻¹ pH 7.4 PBS 透析,4℃ 过夜。如有沉淀离心弃去。另取层析柱,装入 2ml ProteinA-Sepharose 4B Fast Flow,用 5ml pH 3.0 柠檬酸钠缓冲液清洗柱,接着用 10ml pH 8.0 的磷酸缓冲液清洗。用 Tris 调节上述制备的酶-抗原/抗体标记物溶液的 pH 值至 8.0,以约 5ml·h⁻¹ 的速度将标记制备好的 HRP-抗原/抗体溶液上柱,用 pH8.0 的磷酸缓冲液清洗色谱柱,清洗流出液含非免疫球蛋白等杂蛋白质。用 10ml 0.1mol·L⁻¹ 的柠檬酸钠缓冲液洗 HRP-抗原/抗体。酶标记抗原/抗体洗脱后柱用 10ml 磷酸缓冲液清洗;在 280nm 处监控洗脱液的吸光度,收集大于基线的馏份,并迅速用 2mol·L⁻¹ Tris 溶液中和,过 PD10(SephadexG25) 柱并用 PBS 交换洗脱馏份的介质溶液,灭菌后,加入载体蛋白冷冻干燥,收集的酶标记抗原/抗体,贮存在 4℃ 以下的暗处。

[0185] 5. 酶联免疫吸附检测法(ELISA)的建立

[0186] (1) 所需系列溶液的配制:

[0187] 包被浓缩碳酸盐缓冲液:每升含 NaCO₃15.9g、NaHCO₃29.5g 的水溶液,pH 为 9.6,使用前稀释 10 倍。

[0188] 浓磷酸盐缓冲液(PBS):是每升含 NaCl185g、KH₂PO₄2.5g、Na₂HPO₄·12H₂O 29g、KCl 2g 的水溶液(0.1mol·L⁻¹),使用前稀释 10 倍。

[0189] 封闭液:0.1%~1%的 OVA 的 PBS 缓冲溶液。

[0190] 洗涤液(PBST):体积分数 0.05%的 Tween-20 的 pH 为 7.4,0.01mol·L⁻¹ 的磷酸缓冲溶液。使用前将浓 PBS 稀释 10 倍,再加 0.05%的 Tween-20 制得。

[0191] 浓底物缓冲液:每升含有 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 188.1g、 $\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (柠檬酸)51.03g。使用前稀释 10 倍,每升稀释液加 30%的 H_2O_2 36 ~ 150 μl 制得底物缓冲液。

[0192] 抗体稀释液:0.1%明胶,0.01%的 Tween-20 的 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH7.4 ~ 7.6 磷酸缓冲溶液。使用前将浓 PBS 稀释 10 倍,再加 0.01%的 Tween-20 与 0.1%明胶制得。

[0193] 底物储存液:每升含 2.5g 四甲替联苯胺 (TMB) 的乙醇溶液。

[0194] 终止液:2M 的 H_2SO_4 溶液。

[0195] 标准品溶液:各成分的 $1.0\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 溶液,每种化合物成分再配成 6 个标准浓度从 $0.1 \sim 1000\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

[0196] (2) 抗体与包被抗原浓度的优选:将大黄酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄酚、芦荟大黄素包被抗原溶液分别作系列稀释,即 1 : 100、1 : 200、1 : 400、1 : 800、1 : 1000、1 : 2000 稀释后分别包被 100 孔芯片板,100 μL /孔,于 4℃ 冰箱过夜。次日取出芯片板回至室温,每孔注入 200 μL PBS 溶液,摇床上振荡 3min,用力甩掉洗涤液,在吸水纸上拍干,继续洗涤 2 次。以下洗涤方法相同;充分洗涤后,用封闭液封闭芯片板,200 μL /孔,于 4℃ 冰箱过夜。次日取出洗涤后,于 37℃ 温育箱内烘干待用;将动物阳性血清梯度稀释成 1 : 500、1 : 1000、1 : 2000、1 : 4000、1 : 5000、1 : 8000、1 : 10000 和 1 : 20000 对应加入到芯片板的每行,100 μL /孔,室温孵育 30min 后洗涤、拍干;每孔加入 100 μL 一定浓度 HRP 标记的羊抗兔 IgG,室温孵育 30min 后洗涤、拍干;每孔加入 100 μL 显色液 (TMB 与底物液比例为 1 : 10),暗处反应 15min,取出后每孔加入 100 μL 终止液,用酶标仪测定吸光度值 A_{450} 。用已确定的抗原包被浓度稀释抗原包被芯片板,同样方法封闭洗涤。37℃ 温育箱内烘干后取 4 条芯片板条,第 1 行加抗体稀释液作为空白对照,第 2 行加 1 : 1000 稀释的阴性血清,以下 7 行分别为 1 : 3200、1 : 6400、1 : 12500、1 : 25600、1 : 51200、1 : 102400、1 : 204800 的阳性血清,每孔 100 μL ,室温孵育 30min,然后同法依次加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 和 TMB 显色液,均为每孔 100 μL ,最后加入 100 μL 2M H_2SO_4 终止反应,测定 A_{450} 值。当阳性血清的 $A_{450} \geq$ 阴性对照孔的 2.1 倍并且 A_{450} 大于 0.1,此时血清的稀释倍数即为血清的效价。经上述方法优选,选择包被抗原浓度为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,稀释抗体 (1 : 4000),进行抗体的灵敏度的测定。

[0197] (3) 抗体灵敏度的测定:

[0198] 1) 包被:用 0.05M, pH9.6 的碳酸盐缓冲液,将上述 5 种化合物的包被抗原配成 $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的溶液,每个聚苯乙烯板的反应孔中加 100 μL 化合物抗原,4.0℃ 过夜。次日,弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗 3 次,每孔 250 μL ,每次 5 分钟,拍干。(此步简称洗涤,下同)。2) 封闭:用每孔 200 μL 的封闭液封闭上述已包被的芯片板,室温孵育 2.5 小时,洗涤。3) 竞争:加稀释标记抗体 (1 : 2000) 每孔 50 μL 与不同浓度的药物每孔 50 μL 于上述已封闭的反应孔中,室温孵育 24 小时,洗涤。4) 显色过程:于各反应孔中加入 100 μL 临时配制的底物液,反应显色,再加终止液,立即用光度免疫分析仪检测。5) 计算过程,检测结果以抑制率计算:抑制率% = $(D/D_0) \times 100\%$ 。D 是加入竞争者的吸光度, D_0 是没有竞争者的吸光度。计算出 50% 抑制率时药物的浓度即为该抗体的灵敏度。大黄酸等五成分的灵敏度在 $50 \sim 300\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

[0199] (4) 工作曲线的建立:1) 包被、2) 封闭操作同 (3) 项下。3) 竞争反应:取 5 倍于等测成分数目 (5 个) 的芯片板,共 25 块,先按芯片成分的顺序依次加样,每块全成分群芯片

分别加一个浓度的标准品,浓度分别为 $0.1\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $1.0\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $50.0\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $100\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 和 $200\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, 共需 5 块完成一个成分对特异性抗原抗体反应的交叉影响反应的线性实验, 再取 5 块同法完成第二个成分对特异性抗原抗体反应的交叉影响反应的线性实验, 依次类推至完, 25 块板完成五个成分对各特异性抗原抗体反应的交叉影响线性反应。对上述加完样的芯片再加稀释酶标抗体于上述的芯片板孔中, 室温孵育 2 ~ 4 小时, 洗涤。4) 显色过程: 于各反应孔中加入 $100\mu\text{L}$ 临时配制的底物液进行显色, 再加终止液, 立即用酶标仪检测。5) 计算过程: 以多成分的浓度的对数为横坐标, 抑制率为纵坐标, 作图得到工作曲线。大黄酸等五成分的特异性与非特异性反应 D/D_0 对浓度对数线性回归的斜率矩阵 B、同一抗体截距列向量 A 分别为:

$$[0200] \quad B = \begin{pmatrix} -47.33 & -33.74 & -19.91 & -35.67 & -44.23 \\ -37.29 & -33.19 & -28.78 & -42.30 & -28.36 \\ -51.24 & -48.64 & -34.22 & -38.07 & -29.99 \\ -31.51 & -28.15 & -28.81 & -43.06 & -49.79 \\ -50.60 & -15.69 & -22.09 & -37.81 & -37.32 \end{pmatrix} \quad A = \begin{pmatrix} 66.79+67.93+69.09+17.21+48.05 \\ 76.81+14.71+44.19+60.13+72.94 \\ 63.92+45.51+13.71+65.43+69.81 \\ 15.45+74.02+48.87+60.15+50.31 \\ 61.01+85.69+62.32+60.11+20.78 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 269.1 \\ 268.8 \\ 258.4 \\ 248.8 \\ 289.9 \end{pmatrix}$$

[0201] 线性范围在 $1 \sim 700\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

[0202] (5) 交叉反应率: 1) 包被、2) 封闭操作同 (3) 项下。3) 竞争反应、显色测定同 (4) 项下, 4) 计算过程: 用本标准品 IC_{50} 除以其它标准品 IC_{50} 得交叉反应率, 各成分的交叉反应率见表 3。

[0203] 表 3 大黄蒽醌类成分交叉反应信息 (%)

成分 抗体	大黄酸	大黄素	大黄素甲醚	大黄酚	芦荟大黄素
[0204] 大黄酸	100	<2	<10	<5	<10
大黄素	<2	100	<15	<5	<2
大黄素甲醚	<5	<12	100	<5	<2
大黄酚	<6	<5	<2	100	<15
芦荟大黄素	<10	<1	<5	<10	100

[0205] 6. 本发明的检测 5 种化合物的产品的组装及应用

[0206] (1) 检测 5 种化合物的芯片产品的组成: a. 包被有 5 种包被抗原的固相载体芯片, 5 种成分按中文拼音排列, 顺序分别是大黄酚、大黄素、大黄素甲醚、大黄酸、芦荟大黄素; b. 辣根过氧化物酶标记过的上述药物所产生 IgG 抗体工作液各 5ml; c. 浓磷酸盐缓冲液 (PBS) 20ml; d. 浓底物缓冲液 5ml; e. 底物储存液 2ml: 含 $10\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 四甲替联苯胺 (TMB) 的乙醇液; f. 终止液 2ml: $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸。g. 5 种化合物的标准溶液各 1 瓶, 浓度为 $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, 每瓶 2ml, 按浓度需要分别配制成 $0.1\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1} \sim 10000\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 系列标准品液; f. 提供如表 3 的交叉反应信息。

[0207] (2) 应用程序

[0208] 1) 试剂的准备: ①样品稀释液: 将浓 PBS 稀释 10 倍, 再加 0.01% 的 Tween-20 与 0.1% 明胶制得; ②洗涤液: 使用前将浓 PBS 稀释 10 倍, 再加 0.05% 的 Tween-20 制得; ③底物缓冲工作液: 将浓底物缓冲液稀释 10 倍, 每 10ml 稀释液加 30% 的 H_2O_2 36 ~ 150 μl 、1ml 的四甲替联苯胺 (TMB) 储存液制得; ④标准品溶液配制: 各成分标准品液使用前配成 $0.1 \sim 10000\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 梯度浓度。

[0209] 2) 样品前处理:将待测药材样品加 8 倍量水提取,在 10000 转/分钟离心 15 分钟,经过 0.45 μm 滤膜抽滤,用稀释液稀释成 0.1 ~ 10000 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 待测样品液。

[0210] 3) 检测步骤:①加样:向芯片板中每孔加入 50 μL 的多成分系列标准浓度溶液或样品溶液,然后每孔加入酶标抗体工作液 100 μL ,室温恒温孵育 1.5h;②洗涤:倾出孔中液体,向芯片板中每孔加入 250 μL 的洗涤液,静置 5min 后拍干,重复三次;③洗涤:倾出孔中液体,向芯片板中每孔加入 250 μL 的洗涤液,静置 5min 后拍干,重复三次;④加底物量:每孔加 100 μL 四甲替联苯胺;⑤终止:每孔加 2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸 50 μL 终止反应;⑥检测:用酶标仪测定每孔的吸光度。

[0211] 3) 结果分析:以所测得的标准品吸收值,除以第一个标准(0 标准,不加标准品)的吸光度再乘以 100,得到抑制率 (D/D_0),以抑制率为纵坐标,多成分浓度的对数为横坐标作标准曲线。用特异性成分标准品 IC_{50} 除以其它非特异成分标准品 IC_{50} 得交叉反应率构成交叉反应率矩阵 R,见表 3,由此可知成分间的交叉反应除芦荟大黄素-大黄素外,其余均大于 1%,都不能直接用线性方程读出,需按线性关系建立五元线性方程组。

[0212] 根据交叉矩阵 R,构建对应的五成分斜率矩阵 B、同一抗体截距和列向量 A、浓度对数列向量 C 及总叠加抑制率列向量 I,亦:

$$[0213] \quad B = \begin{pmatrix} -47.33 & -33.74 & -19.91 & -35.67 & -44.23 \\ -37.29 & -33.19 & -28.78 & -42.30 & -28.36 \\ -51.24 & -48.64 & -34.22 & -38.07 & -29.99 \\ -31.51 & -28.15 & -28.81 & -43.06 & -49.79 \\ -50.60 & -15.69 & -22.09 & -37.81 & -37.32 \end{pmatrix} \quad A = \begin{pmatrix} 66.79+67.93+69.09+17.21+48.05 \\ 76.81+14.71+44.19+60.13+72.94 \\ 63.92+45.51+13.71+65.43+69.81 \\ 15.45+74.02+48.87+60.15+50.31 \\ 61.01+85.69+62.32+60.11+20.78 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 269.1 \\ 268.8 \\ 258.4 \\ 248.8 \\ 289.9 \end{pmatrix}$$

$$[0214] \quad C = \begin{pmatrix} \lg c_1 \\ \lg c_2 \\ \lg c_3 \\ \lg c_4 \\ \lg c_5 \end{pmatrix}; I = \begin{pmatrix} 28.42 + (5-1) \times 100 \\ 25.64 + (5-1) \times 100 \\ 43.51 + (5-1) \times 100 \\ 18.61 + (5-1) \times 100 \\ 34.12 + (5-1) \times 100 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 428.4 \\ 425.6 \\ 443.5 \\ 418.6 \\ 434.1 \end{pmatrix};$$

[0215] 【A、B 为抗原抗体特异性与非特异性线性拟合得到, I 中的 28.42、25.64、43.51、18.61、34.12 由芯片板测得】

[0216] 故可得五元线性方程组:

$$[0217] \quad \begin{pmatrix} -47.33 & -33.74 & -19.91 & -35.67 & -44.23 \\ -37.29 & -33.19 & -28.78 & -42.30 & -28.36 \\ -51.24 & -48.64 & -34.22 & -38.07 & -29.99 \\ -31.51 & -28.15 & -28.81 & -43.06 & -49.79 \\ -50.60 & -15.69 & -22.09 & -37.81 & -37.32 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \lg c_1 \\ \lg c_2 \\ \lg c_3 \\ \lg c_4 \\ \lg c_5 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 159.3 \\ 156.8 \\ 185.1 \\ 169.8 \\ 144.2 \end{pmatrix}$$

[0218] 如采用 $(D_0-D)/D_0$ 的形式,则斜率矩阵由负变正,参数值不变;截距列向量均变负后再加 500,亦为 $A = (500-269.1, 500-268.8, 500-258.4, 500-248.8, 500-289.9)^T = (230.9, 231.2, 241.6, 251.2, 210.1)^T$, 而列向量 $I = (71.58, 74.36, 56.49, 81.39, 65.88)^T$, 最终获得一样的对数浓度线性方程组。对上述线性方程组求解算得待检样品中大黄酚 (c_1)、大黄素 (c_2)、大黄素甲醚 (c_3)、大黄酸 (c_4)、芦荟大黄素 (c_5) 的含量分别为 0.2480 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、0.1348 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、0.02969 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、0.1506 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、0.1148 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 再折算成药材含量分别 0.7521%、0.6732%、0.1483%、1.239%、0.5732%, 其 RSD 分别为

2.967%、6.471%、5.257%、4.878%、3.551%，与采用 HPLC 测定结果相符。

[0219] 4) 产品使用的注意事项

[0220] ①使用之前将所有试剂温度升至室温，使用后立刻将所有试剂放回冰箱，4℃下保存。

[0221] ②在使用过程中务必不能让微孔干燥。

[0222] ③按照推荐的洗板顺序操作。

[0223] ④使用中避免光线直射，在孵育过程中用锡箔纸遮光。

[0224] ⑤样品放置过长，抗体与成分间的线性关系与交叉反应率可能变化，使用前需进行线性关系考察并测定交叉反应率。

[0225] 实施例 2：大黄酸等 10 种成分芯片的制备与应用

[0226] 本芯片包括大黄酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄酚、芦荟大黄素五个蒽醌类及黄芩苷、甘草酸、芍药苷、人参皂苷 Rg₃、人参皂苷 Rb₁ 等 10 成分。

[0227] 1. 免疫抗原的制备：大黄酸等 5 个成分免疫抗原的制备同实施例 1。黄芩苷、甘草酸、芍药苷、人参皂苷 Rg₃、人参皂苷 Rb₁ 等 5 成分均含有糖基结构，采用高碘酸钠氧化法制备成抗原，其制备方法：取黄芩苷、甘草酸、芍药苷、人参皂苷 Rg₃、人参皂苷 Rb₁ 等单体 0.05mmol，用 2ml 吡啶溶解。称取 NaIO₄ 10.7mg(0.1mmol)，加 1ml 蒸馏水溶解，将配制好的 NaIO₄ 溶液加入各苷类成分溶液中，室温搅拌反应 20min，加入 1ml 分析纯的乙二醇，室温搅拌反应 5min，称取 16.25mgBSA(牛血清蛋白)，加入 PH = 7.4 的 PBS(磷酸)缓冲溶液 2ml 溶解，将配制好的 BSA 溶液加入到以上反应液中，4℃，静置过夜，加入 1ml 新配制的 0.05M NaHB₄ 水溶液，室温反应 3h，反应液加入 0.01M 的 pH = 7.4PBS 透析，每 6h 换液一次，透析 2 天。透析后，离心分离，弃去沉淀，溶液冷冻干燥后得到固体粉末。

[0228] 2. 包被抗原的制备：大黄酸等 5 个成分包被抗原的制备同实施例 1。黄芩苷、甘草酸、芍药苷、人参皂苷 Rg₃、人参皂苷 Rb₁ 的免疫包被抗原的制备：取黄芩苷、甘草酸、芍药苷、人参皂苷 Rg₃、人参皂苷 Rb₁ 单体 0.05mmol，用 2ml 吡啶溶解，称取 NaIO₄ 10.7mg(0.1mmol)，加 1ml 蒸馏水溶解。将配制好的 NaIO₄ 溶液加入到苷类成分溶液，室温搅拌反应 20min，加入 1ml 分析纯的乙二醇，室温搅拌反应 5min，称取 16.25mg 卵清白蛋白(OVA)，加入 PH = 7.4 的 PBS(磷酸)缓冲溶液 2ml 溶解，将配制好的 BSA 溶液加入到以上反应液中，4℃，静置过夜，加入 1ml 新配制的 0.05M NaHB₄ 水溶液，室温反应 3h，反应液加入 0.01M 的 PH = 7.4PBS 透析，每 6h 换液一次，透析 2 天。透析后，离心分离，弃去沉淀，溶液冷冻干燥后得到固体粉末。

[0229] 3. 多克隆抗体的制备：将大黄酸等 10 个成分免疫原混合注射新西兰大白兔体内产生多克隆抗体，具体操作同实施例 1。

[0230] 4. 酶标记抗原 / 抗体的制备：同实施例 1。

[0231] 5. 酶联免疫吸附检测法 (ELISA) 的建立

[0232] (1) 所需系列溶液的配制：同实施例 1。

[0233] (2) 抗体与包被抗原浓度的优选：分别对大黄酸等 10 个成分的免疫抗原与抗体的反应浓度进行优选，具体步骤同实施例 1。经上述方法优选得包被抗原浓度为 5 μg · ml⁻¹，稀释抗体 (1 : 2000 ~ 1 : 50000)，进行抗体的灵敏度的测定。

[0234] (3) 抗体灵敏度的测定：分别对大黄酸等 10 个成分的免疫抗原与抗体的反应灵敏

度进行测定,具体步骤同实施例 1。大黄酸等 10 成分的抗体的灵敏度在 $5 \sim 1500\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

[0235] (4) 工作曲线的建立:分别对大黄酸等 10 个成分的免疫抗原与抗体的特异性与非特异性反应工作曲线进行研究,具体步骤同实施例 1。大黄酸等 10 成分的特异性线性关系列于表 1,线性范围在 $1 \sim 8000\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

[0236] (5) 交叉反应率:1) 包被、2) 封闭操作同 (3) 项下。3) 非特异性竞争与显色测定过程同 (4) 项下,4) 计算过程:用对应标准品 IC_{50} 除以其它标准品 IC_{50} 得交叉反应率,各成分的交叉反应率信息见表 4。

[0237] 6. 本发明的检测 10 种化合物的产品的组装及应用

[0238] (1) 检测 10 种化合物的芯片产品的组成:a. 包被有 10 种包被抗原的固相载体芯片,10 种成分按中文拼音排列,顺序分别是大黄酚、大黄素、大黄素甲醚、大黄酸、甘草酸、黄芩苷、芦荟大黄素、人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Rg_3 、芍药苷;b. 辣根过氧化物酶标记过的上述药物所产生 IgG 抗体工作液各 5ml;c. 浓缩磷酸盐缓冲液 (PBS) 20ml;d. 浓底物缓冲液 5ml;e. 底物储存液 2ml;含 $10\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 四甲替联苯胺 (TMB) 的乙醇液;f. 终止液 2ml;g. 10 种化合物的标准溶液各 1 瓶,浓度为 $1\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$,每瓶 1ml,按浓度需要分别配制成 $0.1\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1} \sim 10000\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 标准品液;g. 提供如表 4 的交叉反应信息。

[0239] 表 4 大黄酸等 10 个成分的交叉反应信息 (%)

[0240]

成分 抗体	大黄酚	大黄素	大黄素 甲醚	大黄酸	甘草酸	黄芩苷	芦荟大 黄素	人参皂 苷 Rb_1	人参皂 苷 Rg_3	芍药苷
大黄酚	100	<5	<2	<6	<1	<1	<15	<1	<1	<1
大黄素	<5	100	<15	<2	<1	<2	<2	<1	<1	<1
大黄素甲醚	<5	<12	100	<5	<1	<3	<2	<1	<1	<1
大黄酸	<5	<2	<10	100	<1	<1	<10	<1	<1	<1
甘草酸	<1	<1	<1	<1	100	<1	<1	<2	<2	<1
黄芩苷	<1	<1	<2	<1	<1	100	<2	<3	<3	<2
芦荟大黄素	<10	<1	<5	<10	<1	<2	100	<1	<1	<1
人参皂苷 Rb_1	<1	<1	<1	<1	<3	<2	<1	100	<6	<1
人参皂苷 Rg_3	<1	<1	<1	<1	<2	<2	<1	<5	100	<1
芍药苷	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	100

[0241] (2) 应用程序:

[0242] 1) 试剂的准备:同实施例 1。

[0243] 2) 样品前处理:将大黄、黄芩药材进行提取处理,具体方法同实施例 1。

[0244] 3) 检测步骤:①加样:向芯片板中加入 $50 \mu\text{L}$ /孔的多成分系列标准浓度溶液或样品溶液,然后加入酶标混合抗体工作液 100 μL ,室温恒温孵育 1.5h;②洗涤:倾出孔中液体,向芯片板中加入 250 μL 孔的洗涤液,静置 5min 后拍干,重复三次;③洗涤:倾出孔中液体,向芯片板中加入 250 μL /孔的洗涤液,静置 5min 后拍干,重复三次;④加底物量:每孔加 100 μL 四甲替联苯胺;⑤终止:每孔加 2mol/L 硫酸 50 μL 终止反应;⑥检测:用酶标仪测定每孔的吸光度。

[0245] 3) 结果分析:同实施例 1。本例芍药苷抗体与其它成分的交叉反应率小于 1%,

可不考虑交叉反应,可直接从标准曲线上读出赤芍中芍药苷含量;其它成分抗体的交叉反应率均大于1%,需建立浓度对数多元线性方程计算。然而黄芩与甘草中成分群与本例中的其它成分不共存,可以不考虑交叉反应,直接用从标准曲线上读出黄芩中黄芩苷的含量,甘草中甘草酸的含量;但大黄中的成分群共存并存在明显的交叉反应,同例1建立起五元对数浓度线性方程组,求解测得大黄中大黄酚、大黄素、大黄素甲醚、大黄酸、芦荟大黄素的含量;同法建立人参皂苷Rb₁、Rg₃二元对数浓度线性方程组: $-22.51c_1-19.76c_2=47.44$ 与 $-140.2c_1-19.19c_2=65.50$,先算得Rb₁、Rg₃在待测液中的含量分别为 $0.6719\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $0.006254\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$,再折算成人参药材中的含量,相关结果列于表5。由此可知,除甘草中甘草酸、黄芩中的黄芩苷的含量略高于HPLC测定值外,其它均与HPLC结果一致,因此,对中药成分群进行标记免疫测定时,同母核成分群间可能存在一定的交叉反应,需要将特异性与非特异性免疫方法结合,建立对数浓度多元线性方程才可精确求得各成分群的含量,在中药同母核成分群共同存在时应引起注意。

[0246] 表5 大黄酸等10个成分的测定结果

[0247]

成分	大黄酚	大黄素	大黄素 甲醚	大黄酸	甘草酸	黄芩苷	芦荟大 黄素	人参皂 苷Rb ₁	人参皂 苷Rg ₃	芍药苷
药材含量(%)	0.7145	0.6521	0.1227	1.407	3.329	7.547	0.3473	0.3356	0.003124	3.512
RSD(%)	3.154	5.132	5.257	4.878	4.327	6.215	3.551	3.231	4.327	5.418

[0248] 4) 产品使用的注意事项:

[0249] ①使用之前将所有试剂温度升至室温,使用后立刻将所有试剂放回冰箱,4℃下保存。

[0250] ②在使用过程中务必不能让微孔干燥。

[0251] ③按照推荐的洗板顺序操作。

[0252] ④使用中避免光线直射,在孵育过程中用锡箔纸遮光。

[0253] ⑤样品放置过长,抗体与成分间的线性关系与交叉反应率可能变化,使用前需进行测定。

[0254] 值得指出的是:以上所述仅是本发明的具体实施方式,其交叉信息矩阵、斜率矩阵、同一抗体截距和矩阵及总叠加抑制率列向量因受实验方法、动物与环境的影响,在重复实验时可能出现与文中不一致的信息,这是实验所允许的。对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

专利名称(译)	一种全成分群同时测算方法		
公开(公告)号	CN102353767B	公开(公告)日	2014-03-12
申请号	CN201110189412.0	申请日	2011-07-07
[标]申请(专利权)人(译)	贺福元		
申请(专利权)人(译)	贺福元		
当前申请(专利权)人(译)	贺福元		
[标]发明人	贺福元 贺琪璐 邓凯文		
发明人	贺福元 贺琪璐 邓凯文		
IPC分类号	G01N33/53		
代理人(译)	黄美成		
其他公开文献	CN102353767A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种全成分群同时测算方法：(1)根据成分的免疫原性与结构特点制备抗原；(2)上述抗原分别或混合注射到动物体内产生抗体，并分离出抗体；(3)对上述抗原或抗体进行标记；(4)将未标记的抗体或抗原有规律地包被成芯片板；(5)获取抗体与成分间的交叉反应信息，根据实验精度要求构建斜率矩阵B、同一抗体截距和的列向量A、浓度对数或浓度列向量C和总叠加抑制率列向量I；(6)对于不考虑交叉反应成分，直接依线性方程读出含量；需考虑交叉反应成分，根据 $BC = I - A$ 求解获得成分含量；从而获得全成分群含量。本测算方法操作方便，能满足含各种成分群大批量样本的同时测定需求，特别适合复杂组分群的分析测定。

成分名称	浓度	抑制率	斜率	截距
成分1	100	0.1	0.01	0.01
成分2	100	0.2	0.02	0.02
成分3	100	0.3	0.03	0.03
成分4	100	0.4	0.04	0.04
成分5	100	0.5	0.05	0.05
成分6	100	0.6	0.06	0.06
成分7	100	0.7	0.07	0.07
成分8	100	0.8	0.08	0.08
成分9	100	0.9	0.09	0.09
成分10	100	1.0	0.10	0.10