



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103116021 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 22

(21) 申请号 201310047430. 4

(22) 申请日 2013. 02. 06

(71) 申请人 北京工业大学

地址 100124 北京市朝阳区平乐园 100 号

申请人 中南民族大学

(72) 发明人 陈素 吴水才 刘向明 雷丽云

沈洲 龙蓉

(74) 专利代理机构 武汉楚天专利事务所 42113

代理人 孔敏

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 21/31 (2006. 01)

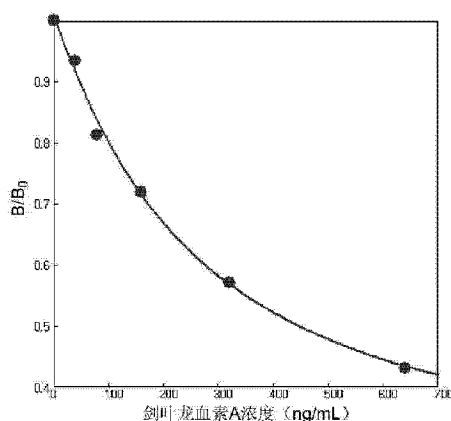
权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒

(57) 摘要

本发明提供一种检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒, 包括包被有剑叶龙血素 A 人工抗原的固相载体、剑叶龙血素 A 多克隆抗体溶液、 $1.0 \mu\text{g/mL}$ 剑叶龙血素 A 标准品溶液、 $0.2 \sim 0.5 \mu\text{g/mL}$ 辣根过氧化物酶标记的二抗溶液、 $0.2 \sim 10\text{mg/mL}$ 四甲基联苯胺溶液、 $0.4 \sim 0.7\text{mg/mL}$ 过氧化脲溶液、样品稀释液、10 倍浓缩洗涤液和 $1 \sim 2\text{mol/L}$ 的硫酸终止液。本发明具有高灵敏度、高特异性、高精确度的特点, 可用于测定样品中剑叶龙血素 A 含量。



1. 一种检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒,其特征在于:包括包被有剑叶龙血素 A 人工抗原的固相载体、剑叶龙血素 A 多克隆抗体溶液、 $1.0\mu\text{g/mL}$ 剑叶龙血素 A 标准品溶液、 $0.2\sim 0.5\mu\text{g/mL}$ 辣根过氧化物酶标记的二抗溶液、 $0.2\sim 10\text{mg/mL}$ 四甲基联苯胺溶液、 $0.4\sim 0.7\text{mg/mL}$ 过氧化脲溶液、样品稀释液、10 倍浓缩洗涤液和 $1\sim 2\text{mol/L}$ 的硫酸终止液。

2. 如权利要求 1 所述的检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒,其特征在于所述剑叶龙血素 A 人工抗原的制备方法为:

按质量体积比 $8\sim 40\text{mg}:1\text{mL}$ 将剑叶龙血素 A 溶于二甲亚砜,并加入相比剑叶龙血素 A 质量 $10\sim 20$ 倍的氢氧化钾,再加入与剑叶龙血素 A 相同质量的溴乙酸,在室温反应 $3\sim 5$ 小时,加入盐酸酸化至出现沉淀,用 G5 砂芯漏斗抽滤,弃滤液,用乙醇洗下沉淀物,真空干燥得到剑叶龙血素 A 半抗原粉末;

按剑叶龙血素 A 半抗原与 N,N-二甲基甲酰胺质量体积比 $1\text{mg}:0.04\text{mL}$ 将剑叶龙血素 A 半抗原溶于 N,N-二甲基甲酰胺,在搅拌条件下按半抗原与 N,N-二环己基碳二亚胺质量比 $1.67\text{mg}:1\text{mg}$ 加入 N,N-二环己基碳二亚胺,再按剑叶龙血素 A 半抗原与 N-羟基琥珀酰亚胺质量比 $3\text{mg}:1\text{mg}$ 加入 N-羟基琥珀酰亚胺,于室温下密闭搅拌 4 小时,置 4°C 冰箱过夜,次日 4000r/min 离心 10min 取上清活性酯液待用;

按蛋白质与半抗原质量比 $4\sim 10\text{mg}:1\text{mg}$ 取蛋白质溶于 $0.05\text{M pH}8.0$ 的磷酸盐缓冲液配成质量体积比为 5% 的蛋白质溶液,取活性酯液,将活性酯液冰浴下逐滴滴加到蛋白质溶液中,室温反应 2 小时, 4°C 条件下缓慢搅拌反应过夜;

将反应液装入透析袋,于 4°C 下, $\text{pH}7.4$, 0.01mol/L 的 PBS 中透析 3 天,紫外扫描透析外液中无半抗原紫外吸收为止;

取出透析袋内溶液,冻干得到所述剑叶龙血素 A 人工抗原。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述包被有剑叶龙血素 A 人工抗原的固相载体,其中包被所用剑叶龙血素 A 人工抗原浓度为 $1\sim 8\mu\text{g/mL}$,固定所述剑叶龙血素 A 人工抗原的固相载体为聚苯乙烯、聚乙烯、纤维素或乳胶材料制备的酶标板、微孔板或小珠。

4. 如权利要求 3 所述的检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒,其特征在于:包被剑叶龙血素 A 的固相载体的制备方法为:使用 $0.05\text{M pH}9.6$ 碳酸盐缓冲液将剑叶龙血素 A 人工抗原稀释到 $1\sim 8\mu\text{g/mL}$,每孔加入 $100\mu\text{L}$, $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冷藏过夜,用洗涤液清洗 3 次,每孔加入封闭液 $120\mu\text{L}$, 37°C 孵育 2 小时,洗涤后于 30°C 干燥 $3\sim 4$ 小时,铝箔袋真空包装。

5. 如权利要求 2 所述的检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述蛋白质为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、鸡卵清蛋白或血蓝蛋白。

6. 如权利要求 1 所述的检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述剑叶龙血素 A 多克隆抗体优选为剑叶龙血素 A 小鼠多克隆抗体。

7. 如权利要求 1 或 6 所述的检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述剑叶龙血素 A 多克隆抗体的制备方法是:用剑叶龙血素 A 人工抗原免疫动物,然后从免疫动物血清中分离得到所述剑叶龙血素 A 多克隆抗体。

8. 如权利要求 1 所述的检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述剑叶龙血素 A 多克隆抗体溶液,其配制方法为使用含 0.15M NaCl 和 0.005% 吐温-20 的 0.1M 磷酸盐缓冲液溶解稀释剑叶龙血素 A 多克隆抗体至 $0.3\sim 3\mu\text{g/mL}$ 。

9. 如权利要求 1 所述的检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述样品稀释液为含有 0.15M NaCl 和 0.005%吐温 -20 的 0.1M 的磷酸盐缓冲液, $\text{pH} = 7.4$ 。

10. 如权利要求 1 所述的检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述 10 倍浓缩洗涤液为含 0.5%吐温 -20 的 0.2M 的磷酸盐缓冲液, $\text{pH} = 7.4$ 。

一种检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测技术领域,具体是一种检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 剑叶龙血素 A(4'-羟基-2,6-二甲氧基二氢查耳酮)是传统药物龙血竭的有效成分之一。龙血竭被誉为“活血圣药”,它是由百合科植物剑叶龙血树 (*Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen) 的含脂木材经提取得到的树脂,在临床上主要有活血散瘀,定痛止血,敛疮生肌等功效。剑叶龙血素 A 经研究有镇痛作用、血小板聚集抑制作用、抗真菌等活性。

[0003] 目前对剑叶龙血素 A 的检测主要采用高效液相色谱法进行定量分析,但其实施需要经过繁琐的样品前处理过程,且仪器设备昂贵,很难普及应用。

发明内容

[0004] 针对现有技术的上述不足,本发明所要解决的技术问题在于提供一种检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒,其具有高灵敏度、高特异性、高精度的特点,可用于测定样品中剑叶龙血素 A 含量。

[0005] 本发明提供一种检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒,包括包被有剑叶龙血素 A 人工抗原的固相载体、剑叶龙血素 A 多克隆抗体溶液、 $1.0 \mu\text{g/mL}$ 剑叶龙血素 A 标准品溶液、 $0.2 \sim 0.5 \mu\text{g/mL}$ 辣根过氧化物酶标记的二抗溶液、 $0.2 \sim 10\text{mg/mL}$ 四甲基联苯胺溶液、 $0.4 \sim 0.7\text{mg/mL}$ 过氧化脲溶液、样品稀释液、10 倍浓缩洗涤液和 $1 \sim 2\text{mol/L}$ 的硫酸终止液。

[0006] 如上所述的检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒,所述剑叶龙血素 A 人工抗原的制备方法为:按质量体积比 $8 \sim 40\text{mg} : 1\text{mL}$ 将剑叶龙血素 A 溶于二甲亚砜,并加入相比剑叶龙血素 A 质量 $10 \sim 20$ 倍的氢氧化钾,再加入与剑叶龙血素 A 相同质量的溴乙酸,在室温反应 $3 \sim 5$ 小时,加入盐酸酸化至出现沉淀,用 G5 砂芯漏斗抽滤,弃滤液,用乙醇洗下沉淀物,真空干燥得到剑叶龙血素 A 半抗原粉末;按半抗原与 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 质量体积比 $1\text{mg} : 0.04\text{mL}$ 将半抗原溶于 DMF,在搅拌条件下按半抗原与 N,N-二环己基碳二亚胺质量比 $1.67\text{mg} : 1\text{mg}$ 加入 N,N-二环己基碳二亚胺,再按半抗原与 N-羟基琥珀酰亚胺质量比 $3\text{mg} : 1\text{mg}$ 加入 N-羟基琥珀酰亚胺,于室温下密闭搅拌 4 小时,置 4°C 冰箱过夜,次日 4000r/min 离心 10min 取上清活性酯液待用;按蛋白质与半抗原质量比 $4 \sim 10\text{mg} : 1\text{mg}$ 取蛋白质溶于 0.05M pH8.0 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 配成质量体积比为 5% 的蛋白质溶液,取活性酯液,将活性酯液冰浴下逐滴滴加到蛋白质溶液中,室温反应 2 小时, 4°C 条件下缓慢搅拌反应过夜;将反应液装入透析袋,于 4°C 下, pH7.4, 0.01mol/L 的 PBS 中透析 3 天,紫外扫描透析外液中无半抗原紫外吸收为止;取出透析袋内溶液,冻干得到所述剑叶龙血素 A 人工抗原。

[0007] 如上所述的检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒,所述包被有剑叶龙血素 A 人工

抗原的固相载体,其中包被所用剑叶龙血素 A 人工抗原浓度为 $1 \sim 8 \mu\text{g/mL}$,固定所述剑叶龙血素 A 人工抗原的固相载体为聚苯乙烯、聚乙烯、纤维素或乳胶材料制备的酶标板、微孔板或小球。

[0008] 如上所述的检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒,包被剑叶龙血素 A 的固相载体的制备方法为:使用 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液将剑叶龙血素 A 人工抗原稀释到 $1 \sim 8 \mu\text{g/mL}$,每孔加入 $100 \mu\text{L}$, $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 冷藏过夜,用洗涤液清洗 3 次,每孔加入封闭液 $120 \mu\text{L}$, 37°C 孵育 2 小时,洗涤后于 30°C 干燥 $3 \sim 4$ 小时,铝箔袋真空包装。

[0009] 如上所述的检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒,所述蛋白质为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、鸡卵清蛋白或血蓝蛋白。

[0010] 如上所述的检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒,所述剑叶龙血素 A 多克隆抗体优选为剑叶龙血素 A 小鼠多克隆抗体。

[0011] 如上所述的检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒,所述剑叶龙血素 A 多克隆抗体的制备方法是:用剑叶龙血素 A 人工抗原免疫动物,然后从免疫动物血清中分离得到所述剑叶龙血素 A 多克隆抗体。

[0012] 如上所述的检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒,所述剑叶龙血素 A 多克隆抗体溶液,其配制方法为使用含 0.15M NaCl 和 0.005% 吐温-20 的 0.1M 磷酸盐缓冲液溶解稀释剑叶龙血素 A 多克隆抗体至 $0.3 \sim 3 \mu\text{g/mL}$ 。

[0013] 如上所述的检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒,所述样品稀释液为含有 0.15M NaCl 和 0.005% 吐温-20 的 0.1M 的磷酸盐缓冲液, $\text{pH} = 7.4$ 。

[0014] 如上所述的检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒,所述 10 倍浓缩洗涤液为含 0.5% 吐温-20 的 0.2M 的磷酸盐缓冲液, $\text{pH} = 7.4$ 。

[0015] 本发明试剂盒采用间接竞争法检测样品中龙血素 A 的浓度。检测时,向固相载体加入样品和剑叶龙血素 A 多克隆抗体,样品溶液中的剑叶龙血素 A 和固相载体上的剑叶龙血素 A 竞争结合剑叶龙血素 A 多克隆抗体,洗涤后,加入酶标记二抗溶液,反应后再次洗涤,加入四甲基联苯胺溶液显色,用硫酸终止液终止反应后用酶标仪测定吸光度。待测样品中的剑叶龙血素 A 浓度与吸光度值呈负相关,用剑叶龙血素 A 标准品标准化吸光度拟合标准曲线,样品吸光度与标准曲线比较得出样品中剑叶龙血素 A 的浓度。

[0016] 本发明通过合成剑叶龙血素 A 人工抗原,利用人工抗原免疫动物得到抗体,进一步建立检测剑叶龙血素 A 的酶联免疫试剂盒,本发明的试剂盒用于检测剑叶龙血素 A 方便快捷,无需复杂的样品处理,全部检测能在 2 小时内完成。

附图说明

[0017] 图 1 是不同浓度剑叶龙血素 A 标准品吸光度拟合标准曲线。

具体实施方式

[0018] 下面结合具体实施例对本发明的技术方案进行清楚、完整的说明。

[0019] 实施例 1:制备剑叶龙血素 A 人工抗原

[0020] 取剑叶龙血素 A 30.0mg ,溶于 1mL 二甲亚砜,并加入 $0.3 \sim 0.6\text{g}$ 氢氧化钾,再加入 30.0mg 溴乙酸,在室温反应 $3 \sim 5\text{h}$,加入盐酸酸化至出现沉淀,用 G5 砂芯漏斗抽滤,弃

滤液,用乙醇洗下沉淀物,真空干燥得到剑叶龙血素 A 半抗原粉末。取 3.0mg 半抗原粉末溶于 0.12mL 的 N, N- 二甲基甲酰胺 (DMF),在搅拌条件下加入 1.8mg 的 N, N- 二环己基碳二亚胺 (DCC),再加入 1.0mg 的 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS),于室温下密闭搅拌 4h,置 4℃ 冰箱过夜。次日 4000r/min 离心 10min 取上清活性酯液待用。称取鸡卵清蛋白 OVA15mg,用 0.05M pH8.0 磷酸盐缓冲液配成质量体积比为 5% 的蛋白质溶液,取活性酯液,冰浴下逐滴滴加到 OVA 溶液中,室温反应 2h,于 4℃ 缓慢搅拌反应过夜。将反应液装入透析袋,于 4℃ 下, pH7.4, 0.01mol/L 的 PBS 中透析 3 天,紫外扫描透析外液中无半抗原紫外吸收为止。取出透析袋内溶液,分装, -20℃ 保存,冻干得人工抗原剑叶龙血素 A-OVA 偶联物。

[0021] 实施例 2 :制备剑叶龙血素 A 多克隆抗体

[0022] 使用实施例 1 中的方法把鸡卵清蛋白 OVA 替换为牛血清白蛋白 BSA 合成剑叶龙血素 A-BSA 偶联物作为免疫原,取 6-7 周龄的 Balb/C 小白鼠进行免疫。基础免疫使用等量弗氏完全佐剂与龙血素 A-BSA 偶联物乳化,每只背部皮下注射龙血素 A-BSA 偶联物 0.025mg,加强免疫采用弗氏不完全佐剂乳化免疫原,每隔 2 周进行加强免疫,三免后第 10 天小鼠眼眶采血,分离出抗血清。抗血清采用硫酸铵沉淀法纯化,透析后冷冻干燥成粉末,使用时用含 0.15M NaCl 和 0.005% 吐温 -20 的 0.1M 磷酸盐缓冲液配制成 0.3 ~ 3 μg/mL 剑叶龙血素 A 多克隆抗体溶液。

[0023] 实施例 3 :剑叶龙血素 A 酶联免疫检测试剂盒组建

[0024] 包被剑叶龙血素 A 的固相载体采用聚苯乙烯、聚乙烯、纤维素或乳胶材料制备的酶标板,使用 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液将实施例 1 中制备的剑叶龙血素 A 人工抗原稀释到 1 ~ 8 μg/mL,加入酶标板孔中,100 μL/ 孔,2 ~ 8℃ 冷藏过夜,用洗涤液清洗 3 次。每孔加入封闭液 (例如含 1% 脱脂奶粉的磷酸盐缓冲液) 120 μL,37℃ 孵育 2 小时,洗涤后于 30℃ 干燥 3 ~ 4 小时,铝箔袋真空包装。

[0025] 样品稀释液为含有 0.15M NaCl 和 0.005% 吐温 -20 的 0.1M 的磷酸盐缓冲液, pH = 7.4。终止液为 1 ~ 2mol/L 的硫酸溶液。10 倍浓缩洗涤液为含 0.5% 吐温 -20 的 0.2M 的磷酸盐缓冲液, pH = 7.4,操作时用纯化水稀释 10 倍使用。辣根过氧化物酶标记二抗溶液使用 HRP 标记羊抗小鼠 IgG,用含 0.1% OVA 的 0.1M 的磷酸盐缓冲液 (pH = 7.4) 稀释至 0.2 ~ 0.5 μg/mL。

[0026] 取包被有剑叶龙血素 A 人工抗原的固相载体、剑叶龙血素 A 多克隆抗体溶液、1.0 μg/mL 剑叶龙血素 A 标准品溶液、0.2 ~ 0.5 μg/mL 辣根过氧化物酶标记的二抗溶液、0.2 ~ 10mg/mL 四甲基联苯胺溶液、0.4 ~ 0.7mg/mL 过氧化脲溶液、样品稀释液、10 倍浓缩洗涤液和 1 ~ 2mol/L 的硫酸终止液。成套装入包装盒内,即组成一个龙血素 A 酶联免疫检测试剂盒。

[0027] 实施例 4 :标准曲线的建立

[0028] 用样品稀释液将剑叶龙血素 A 标准品溶液稀释成 640ng/mL、320ng/mL、160ng/mL、80ng/mL、40ng/mL、0ng/mL 的系列标准品,向试剂盒中的酶标板孔中加入系列标准品 50 μL/ 孔和龙血素 A 多克隆抗体溶液 50 μL/ 孔,35-40℃ 反应 30min 后洗涤,加入酶标记的二抗溶液 100 μL/ 孔,反应后再次洗涤,加入过氧化脲溶液和四甲基联苯胺溶液各 50 μL/ 孔避光显色 10min,加硫酸终止液 100 μL/ 孔终止反应后用酶标仪测定吸光度 (双波长测定用 OD_{450nm} 减去 OD_{630nm} 作为吸光度)。计算标准化吸光度 = B/B₀ (B 为标准品或样品的吸光度

值, B_0 为 0ng/mL 标准品吸光度值)。用系列标准品的标准化吸光度和标准品浓度用四参数 Logistic 方程拟合得到标准曲线(如图 1 所示)。

[0029] 实施例 5:试剂盒最低检测限、特异性、准确度测定

[0030] 同时检测 10 孔 0ng/mL 标准品, 根据标准曲线计算它们的浓度值, 以这些计算得到的浓度平均值加 2 倍的标准差作为最低检测限, 本试剂盒的最低检测限为 55ng/mL。

[0031] 选择与剑叶龙血素 A 结构类似的化合物, 分别测定后计算交叉反应率=测得浓度/化合物浓度。结果如表 1 所示, 说明本试剂盒有很好的特异性。

[0032] 表 1 交叉反应情况

	化合物	化合物浓度	测得浓度	交叉反应率
[0033]	龙血素 B	8 μ g/mL	0.296 μ g/mL	3.70%
	剑叶龙血素 B	100 μ g/mL	0.108 μ g/mL	0.11%
	血竭素	200 μ g/mL	0.113 μ g/mL	0.06%
	辣椒平	200 μ g/mL	<55ng/mL	N/A*

[0034] * 检测得到浓度值低于最低检测限时无法计算交叉反应率。

[0035] 用本试剂盒检测 120ng/mL 剑叶龙血素 A 各 10 孔, 回收率在 70% -130% 之间, 变异系数 CV < 40%。

[0036] 以上所述, 仅为本发明的具体实施方式, 但本发明的保护范围并不局限于此, 任何属于本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内, 可轻易想到的变化或替换, 都应涵盖在本发明的保护范围之内。

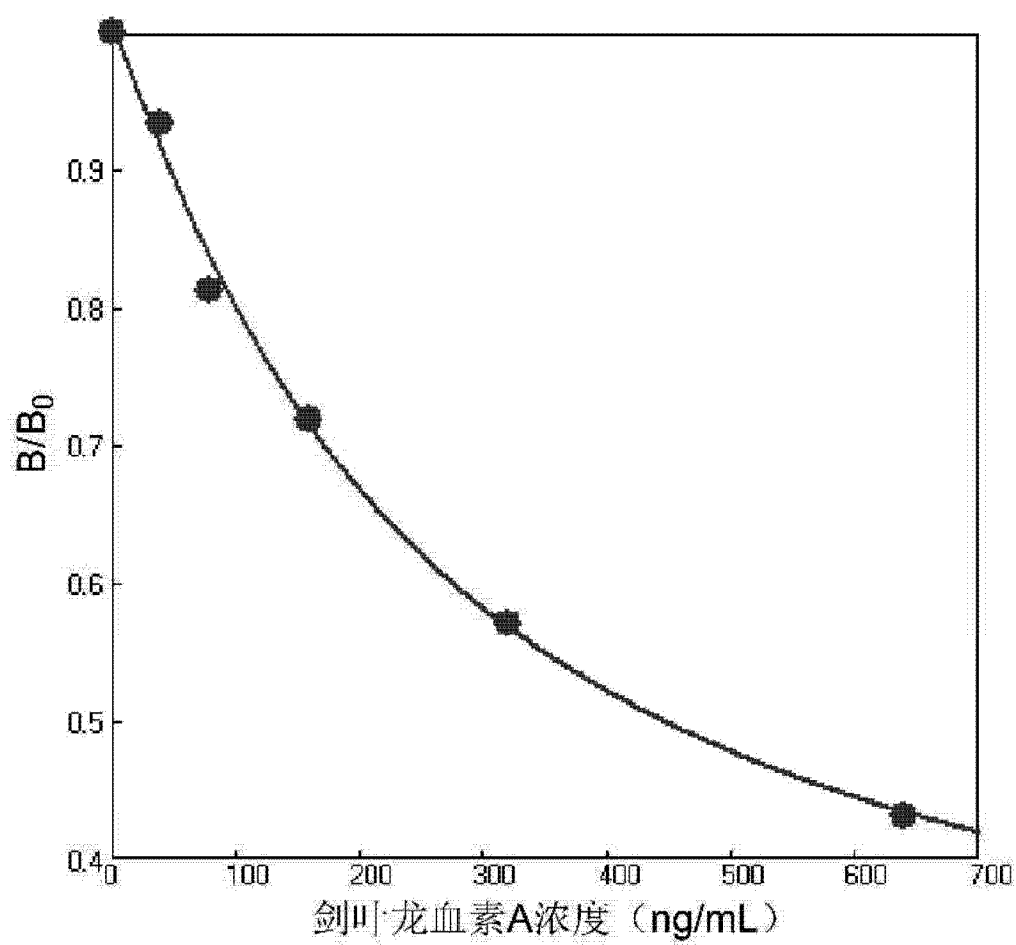


图 1

专利名称(译)	一种检测剑叶龙血素A的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN103116021A	公开(公告)日	2013-05-22
申请号	CN201310047430.4	申请日	2013-02-06
[标]申请(专利权)人(译)	北京工业大学 中南民族大学		
申请(专利权)人(译)	北京工业大学 中南民族大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京工业大学 中南民族大学		
[标]发明人	陈素 吴水才 刘向明 雷丽云 沈洲 龙蓉		
发明人	陈素 吴水才 刘向明 雷丽云 沈洲 龙蓉		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531 G01N21/31		
代理人(译)	孔敏		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种检测剑叶龙血素A的酶联免疫试剂盒，包括包被有剑叶龙血素A人工抗原的固相载体、剑叶龙血素A多克隆抗体溶液、1.0μg/mL剑叶龙血素A标准品溶液、0.2~0.5μg/mL辣根过氧化物酶标记的二抗溶液、0.2~10mg/mL四甲基联苯胺溶液、0.4~0.7mg/mL过氧化脲溶液、样品稀释液、10倍浓缩洗涤液和1~2mol/L的硫酸终止液。本发明具有高灵敏度、高特异性、高精度的特点，可用于测定样品中剑叶龙血素A含量。

