



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103387611 A

(43) 申请公布日 2013. 11. 13

(21) 申请号 201210140423. 4

(22) 申请日 2012. 05. 09

(71) 申请人 北京中医药大学

地址 100029 北京市朝阳区北三环东路 11  
号

(72) 发明人 屈会化 赵琰 王庆国 王雪茜  
续洁琨 李翼飞 薛瑾 吴婷婷  
孙晔 刘洋

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/77(2006. 01)

C07K 14/795(2006. 01)

C07K 14/47(2006. 01)

C07K 16/44(2006. 01)

G01N 33/545(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页

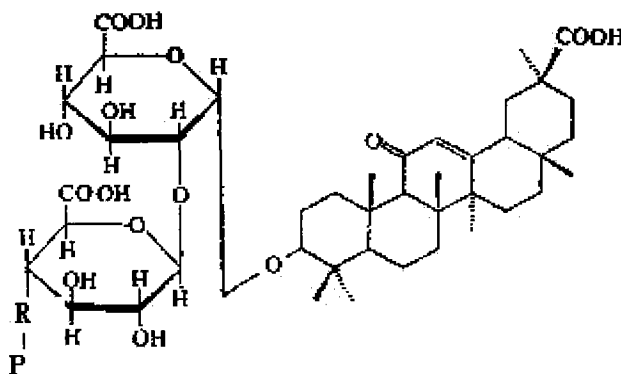
### (54) 发明名称

用于检测和测定甘草酸的抗体、方法和试剂盒

### (57) 摘要

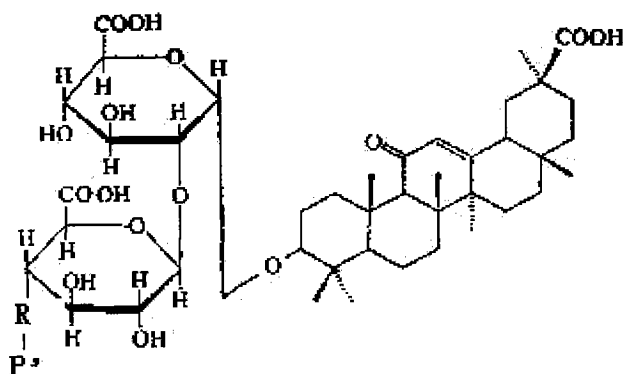
本发明提供包括甘草酸或其衍生物的半抗原,与赋予抗原性的载体物质结合的前述半抗原的免疫原,与标记试剂结合的前述半抗原的偶联物(包被原),以及抗前述免疫原的抗体,该抗体能与完整的甘草酸中的至少一种结构性抗原决定部位结合。本发明还提供用于检测或定量样品中甘草酸的方法和试剂盒,以及前述偶联物和前述抗体在检测或定量甘草酸中的用途。本发明对甘草酸具有特异性,可用于样品中检测甘草酸的存在和测定甘草酸的含量。

1. 一种如下通式的免疫原：



其中 R 是 0 至 6 个碳的烷基桥（连接半抗原与载体物质的桥），P 是赋予抗原性的载体物质。

2. 根据权利要求 1 的免疫原，R = 0，即 P<sub>1</sub> 直接与甘草酸羰基碳原子结合。
3. 根据权利要求 1 的免疫原，R 是 C1-C6 取代或未取代的、直链或支链的、饱和或不饱和的亚烷基。
4. 根据权利要求 1 或 3 的免疫原，R 是 C1-C4 未取代的、直链的、饱和的亚烷基。
5. 根据权利要求 1 的免疫原，其中载体物质为蛋白质、蛋白质片段、合成或天然多肽或半合成多肽、合成或天然聚合物。
6. 根据权利要求 1 或 5 的免疫原，其中蛋白质、蛋白质片段选自白蛋白、血清蛋白、球蛋白、和脂蛋白。
7. 根据权利要求 1 或 5 的免疫原，其中蛋白质、蛋白质片段选自牛血清白蛋白、卵清蛋白、牛丙种球蛋白、甲状腺素结合球蛋白、锁眼形血蓝蛋白 (keyhole limpet haemocyanin, KLH) 等。
8. 根据权利要求 1 或 5 的免疫原，其中合成或天然多肽或半合成多肽是具有足够数量的可利用氨基的合成聚氨基酸。
9. 根据权利要求 1 或 5 的免疫原，其中合成或天然聚合物选自碳水化合物、酵母或多糖。
10. 抗如权利要求 1 至 9 的免疫原的抗体，其中抗体能与完整的甘草酸中的至少一种结构性抗原决定部位结合。
11. 制备如权利要求 10 中的抗体的方法，该方法包括将如权利要求 1 至 9 的免疫原重复给予动物而使动物免疫，以及从免疫动物中收集所得到的血清抗体；以及利用免疫学上可接受的细胞系与产生抗体的免疫动物单克隆细胞系融合后产生的细胞系，所制备的单克隆抗体。
12. 一种如下结构的偶合物：



其中 R 是 0 至 6 个碳的烷基, P' 是不同于 P 的载体物质。

13. 如权利要求 12 偶合物,其偶合物固定在固相支持物上。
14. 根据权利要求 13 的固相支持物可为聚苯乙烯或聚氯乙烯等具有一定吸附作用的材料。
15. 根据权利要求 13 或 14 的固相支持物,优选化学处理高吸附表面的聚苯乙烯酶标板。
16. 用于检测和测定样品中甘草酸的方法,该方法包括将供试样品和如权利要求 10 和 11 中的抗体一同与如权利要求 12 至 15 中的固定在固相支持物的偶联物接触,再与标记二抗接触,检测或测定标记信号,从校准曲线中推出样品中甘草酸的存在或含量。
17. 根据权利要求 16 的标记二抗,其标记试剂选自酶、发光物质、放射性物质或它们的混合物。
18. 根据权利要求 16 的二抗,标记试剂是过氧化物酶。
19. 根据权利要求 16 的二抗,标记试剂是辣根过氧化物酶 (HRP)。
20. 根据权利要求 14 或 15 的偶合物,发光物质是生物发光物质、化学发光物质或荧光物质。
21. 用于检测和测定甘草酸的试剂盒,该试剂盒包括如权利要求 12 至 15 中任一项的偶联物或其混合物,以及如权利要求 10 或 11 的抗体或其混合物。

## 用于检测和测定甘草酸的抗体、方法和试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及小分子半抗原的抗体及其制备方法与应用,特别是涉及甘草酸及其衍生物的抗体及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 本发明涉及用于检测和定量甘草酸的方法和试剂盒,以及其中使用的半抗原、免疫原、包被原和抗体。

[0003] 其中“检测”是指定性分析物质是否存在。

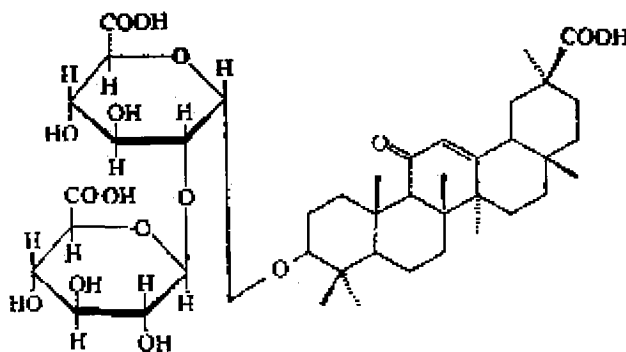
[0004] 其中“测定”是指对物质进行定量分析。

[0005] 甘草酸(GA)是一种萜类物质,分子式 $C_{42}H_{62}O_{16}$ 。又称甘草甜素。为甘草次酸的二葡萄糖醛苷(见苷),是甘草的甜味成分,存在于甘草属植物中,在乙酸中结成片状或棱柱状晶体。在 $220^{\circ}\text{C}$ 分解。溶于水。

[0006] 现代药理研究表明其具有抗炎、抗病毒,和保肝解毒及增强免疫功能等作用。由于甘草酸有糖皮质激素样药理作用而无严重不良反应,临床被广泛用于治疗各种急慢性肝炎、支气管炎和艾滋病,还具有抗癌防癌、干扰素诱生剂及细胞免疫调节剂等功能。

[0007] 另外,甘草酸具有降血脂与抗动脉粥样硬化作用,阻止动脉粥样硬化的形成。甘草酸化学结构如下:

[0008]

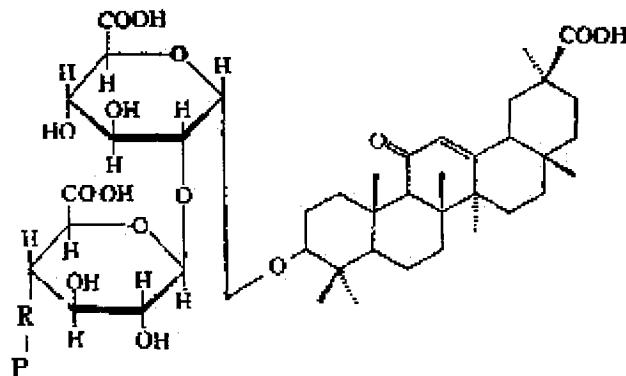


[0009] 目前建立了多种甘草酸的定性与定量检测和测定分析方法,如薄层层析法、HPLC法, HPLC-MS法等。其中最常用的方法是高效液相色谱法。但含甘草酸的生物样品(包括血浆、尿、唾液等)含有大量的影响含量测定的蛋白质及内源性物质;同时甘草酸可能呈结合状态,必须经过处理,排除内源性杂质和代谢物的干扰,使结合状态的甘草酸游离后才能测定;同时还需要浓缩以满足仪器检测灵敏度的要求,处理程序复杂,费时费力;同时由于甘草酸进入体内后,组织中的分布是极其微量的,即使经过富集,进行含量测定仍是极其困难的。另外,对于甘草酸在靶器官和组织中分布,以及细胞和亚细胞定位的研究,需要通过免疫组织化学和westblot等方法,但由于缺乏甘草酸的抗体,阻碍了此方面的研究。因此,有必要开发出一种用于检测和测定生物样品中甘草酸的方法,对阐明相关药材或复方的作用机理,以及其体内分布和代谢研究,将具有特别的价值。

## 发明内容

[0010] 本发明的半抗原甘草酸可提供确定的结构性抗原决定部位,但是它本身并不具备免疫原性,因此必须要偶联到适宜的赋予抗原性的载体物质上,这样所形成的免疫原才会在注射到宿主动物体内后诱发免疫应答。因此,本发明提供一种如下结构的免疫原:

[0011]



[0012] 其中 R 是 0 至 6 个碳的烷基桥 (连接半抗原与载体物质的桥),优选  $R = 0$ , 即 P1 直接与绿原羰基碳原子结合,或 R 是 C1-C6 取代或未取代的、直链或支链的、饱和或不饱和的亚烷基,更优选 R 是 C1-C4 未取代的、直链的、饱和的亚烷基。

[0013] P 是赋予抗原性的载体物质。载体物质选自蛋白质、蛋白质片合成的多肽或半合成的多肽。其中蛋白质、蛋白质片段选自白蛋白、血清蛋白、球蛋白、目镜蛋白和脂蛋白,优选为牛血清白蛋白、卵清蛋白、牛丙种球蛋白、甲状腺素结合球蛋白、锁眼形血蓝蛋白 (keyhole limpet haemocyanin, KLH),更优选自锁眼形血蓝蛋白或牛血清蛋白 (BAS)。合成多肽或半合成多肽是具有足够数量的可利用氨基的合成聚氨基酸,优选多聚赖氨酸。合成或天然聚合物是带有反应官能基的聚合物材料,特别是能够结合到半抗原产生免疫原的碳水化合物、酵母或多糖。

[0014] 半抗原的制备 本发明描述了用改进后的过碘酸氧化法将半抗原甘草酸与赋予抗原性的载体物质发生的偶联作用,产生免疫原。以甘草酸为起始原料,用过碘酸将甘草酸上糖基的邻二羟基氧化为醛基。产物纯化经质谱 (MS) 和核磁共振氢谱和碳谱 ( $^1\text{H}$ NMR 和  $^{13}\text{C}$ NMR) 确证。

[0015] 免疫原的合成 本发明的半抗原和蛋白质载体的连接可使用本领域已知的任何连接方式。例如但不限于过碘酸氧化法、碳二亚胺法 (EDC)、戊二醛法等。采用过碘酸氧化法制备免疫原时,将与过碘酸反应后的溶液 PH 调节到 9.0 至 9.5 之间,在室温下逐滴加入 10-20mg/mL 的牛血清蛋白碳酸盐缓冲溶液中,搅拌反应 1-6 小时,装入透析袋,分别用蒸馏水和 0.01mol/L 的 PBS 缓冲溶液透析 3-5d,分装保存于  $-20^\circ\text{C}$  的冰箱中。

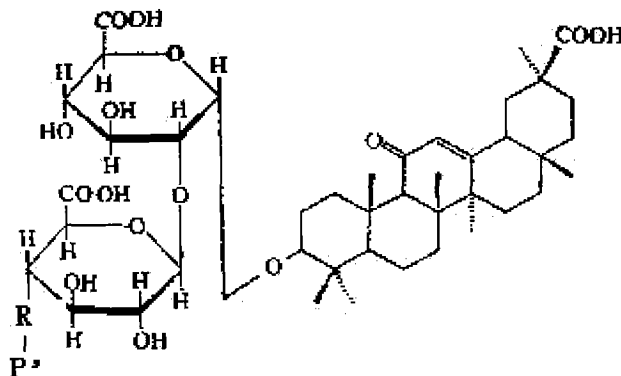
[0016] 合成免疫原的分析方法为了确认载体物质上结合有适当的半抗原,在免疫前,使用紫外分光光度法或矩阵辅助紫外激光解析 / 电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 对每个免疫原进行评估。甘草酸免疫原反应物和产物的吸收峰相比 (200nm-400nm),可判断是否偶合,并根据反应物和产物的摩尔吸光系数计算偶联物与半抗原的比例。

[0017] 使用 voyager STR 生物分光光度测量方法研究站激光解析质谱与延迟萃取结合进行 MALDI-TOF 质谱。将每个要分析的等分试样在 0.1% 的三氟乙酸水溶液中稀释制成 1mg/ml 的试样溶液。使用芥子酸基质和牛血清白蛋白作为外标分析等分试样 (1 $\mu\text{L}$ )。

[0018] 对于优选的载体物质,牛血清白蛋白或 KLH 而言,优选半抗原与蛋白质的结合比为 6-15 : 1。

[0019] 第二方面,免疫检测时需要有吸附在固相载体上的含有半抗原结构的包被原,因此,本发明提供一种如下结构的偶合物;

[0020]



[0021] 其中 R 是 0 至 6 个碳的烷基, P' 是不同于免疫原载体的一种载体物质。

[0022] 偶合物的合成利用过碘酸法,但不限于此法,可以采用已知的其他偶合方法。在 1ml 1mg/ml 甘草酸溶液中逐滴加入 1ml 1M 的过碘酸钠反应 1 小时后,调节 PH 至 9.0 至 9.5,逐滴加入 10-20mg/mL 的卵清蛋白碳酸盐缓冲溶液,搅拌反应 1-6 小时,装入透析袋,分别用蒸馏水和 0.01mol/L 的 PBS 缓冲溶液透析 3-5d,分装保存于 -20℃ 的冰箱中。

[0023] 免疫检测时要将该复合物固定在支撑底物上。优选地,该方法进一步包括将所述复合物固定到支撑底物上,优选固体支持物,最优选聚苯乙烯固体支持物。

[0024] 另一方面,本发明涉及对于本发明第一方面的免疫原产生的抗体,这些抗体能够至少与一个甘草酸结构上的表位结合,优选与完整的甘草酸结构表位相结合,该抗体是多克隆的,或是单克隆的,优选为单克隆抗体,且具有对甘草酸的特异性。

[0025] 本发明进一步提供一种制备抗体的方法,该方法包含通过重复给予根据本发明的甘草酸的免疫原免疫动物,优选脊椎动物,最优选哺乳动物,并收集从免疫动物得到的血清的步骤。

[0026] 另一方面,本发明包括在试样中检测或测定甘草酸的方法,该方法包括将供试样品和本发明的抗体一同与固定在固相支持物的偶联物接触,再与标记二抗接触,检测或测定标记信号,从校准曲线中推出样品中甘草酸的存在或含量。

[0027] 另一方面,本发明还描述了如何将针对这种免疫原产生的抗体用于开发可用来检测和测定甘草酸的存在通用分析方法和相应的试剂盒。本试剂盒包括用本发明的固定包被原或其混合物和本发明的抗体或其混合物。该试剂盒可以任意地包括应用所述缀合物和所述抗体在试样中检测或测定甘草酸的指导。优选地,试样是溶液,如生物流体。更优选地,试样是血清或尿。在本发明的方法和试剂盒中,首选各自不同的交联剂(免疫原的和包被原的)。

[0028] 另一方面,本发明包括使用本发明的固定包被原或其混合物和本发明的抗体或其混合物在试验试样如生物流体中检测或测定甘草酸。

[0029] 为了产生多克隆抗血清,将免疫原与 Freund 佐剂完全乳化,并且将混合物注射入宿主动物体内,如兔、羊、鼠、天竺鼠或马。进一步注射(加强)并取血清试样评价抗体效价。

达到最佳效价时,随后将宿主动物放血得到适当体积的特异性的抗血清。要求的抗体纯化水平视计划的应用而定。对于许多目的,根本不需要纯化,但是,在其它情况下,例如抗体固定在固体载体上,纯化步骤能够除去不想要的物质和除去非特异性的结合。本发明特异性抗体作为试剂在免疫试验中用于测定或检测生物流体中的甘草酸的试剂是有用的。

[0030] 单克隆抗体的制备本发明所述单克隆抗体是指获自基本上同源的抗体群的抗体,即组成该群体的抗体个体都相同,除了可能存在少量可能的自发突变。

[0031] 本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如,本发明完全抗原,可被施用于动物以诱导单克隆抗体的产生。对于单克隆抗体,可利用杂交瘤技术来制备或可用重组 DNA 法制备。骨髓瘤细胞可选鼠类的骨髓瘤细胞系,包括衍生自 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的骨髓瘤细胞系以及 SP-2/0、NZ0 或 X63-Ag8-653 细胞,以及人骨髓瘤和小鼠-人杂合骨髓瘤细胞系。

[0032] 对杂交瘤细胞生长于其中的培养基进行分析以检测具有所需特异性的单克隆抗体的产生,如通过体外结合分析,例如酶联免疫吸附分析 (ELISA) 或放射免疫分析 (RIA)。表达抗体的细胞的位置可用 FACS 进行检测。然后,可将杂交瘤克隆通过有限稀释步骤形成亚克隆,并通过标准方法生长。为了达到这一目的而使用的适合的培养基包括,例如,DMEM 或 RPMI-1640 培养基。此外,杂交瘤细胞可在动物体内作为腹水瘤生长。

[0033] 由亚克隆分泌的单克隆抗体从培养基、腹水或血清中,通过常规的免疫球蛋白纯化工艺适当地得到分离,这些纯化工艺为例如,蛋白 A-琼脂糖法 (protein A-Sepharose)、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析。

[0034] 本发明的一个优选的方案中,抗甘草酸单克隆抗体采用 Balb/C 小鼠腹水生产单克隆抗体的方法制备。将约  $1-2 \times 10^6$  杂交瘤细胞接种到致敏的小鼠腹腔内,2 周内可见腹部明显胀大。抽取腹水,经饱和硫酸铵沉淀法粗提出 IgG,再将粗提的抗体经亲和层析柱 (Protein G-Sepharose) 纯化。

## 具体实施方式

[0035] 实施例 1

[0036] 免疫原和包被原的制备

[0037] 免疫原和包被原采用同样的方法制备合成。

[0038] 用这 0.1M 的  $\text{NaIO}_4$  溶液 1ml 氧化 1ml 10.0mg/ml 甘草酸溶液,室温下避光氧化 30min,1ml 乙二醇终止反应 30min,然后用 0.05mol/l 碳酸盐缓冲液调 pH 至 9.0 以上,再逐滴加入 1ml 10.0mg/ml BSA 溶液或多聚赖氨酸溶液 (溶剂为 0.05mol/l 碳酸盐缓冲液, pH 9.6,以维持溶液的 pH 值在 9.0 以上),室温下继续搅拌反应 100min。待上述反应完成后,将反应液转移至采用 PBS 浸泡过的透析袋中,在 PBS (pH 7.4) 中透析 27 小时,中间多次换液。将透析后的产物分装,于  $-20^\circ\text{C}$  保存备用,其中,与 BSA 偶联的复合物作为免疫原,与多聚赖氨酸 (PLL) 偶联的复合物作为包被原。

[0039] 实施例 2

[0040] 免疫原和包被原的鉴定

[0041] 精确配制适宜浓度的甘草酸与 BSA、PLL 标准溶液,将待检样品稀释到适当浓度后,用紫外分光光度计测出甘草酸、BSA、PLL、甘草酸-BSA、甘草酸-PLL 的全波长图谱及最

大吸收波长处的吸光值。将 GA(A) 和 BSA(B) 分别用 PBS 配置成 0.05mg/ml 和 1mg/ml, 用 PBS 将 GA-BSA(C) 按 1 : 4 稀释, 在 200-400nm 紫外光谱范围内每 1nm 扫描一个点。测得这三种溶液在 A 物质和 B 物质最大吸收波长 ( $\lambda_m$ 、 $\lambda_{bm}$ ) 处的吸收值, 即  $AA_m$ 、 $AA_{bm}$ 、 $AB_m$ 、 $AB_{bm}$ 、 $AC_m$ 、 $AC_{bm}$ 。根据公式  $A = \epsilon c l$  ( $c$  为摩尔浓度 mol/l,  $l$  为比色杯厚度 (cm))。计算 A 物质在 A、B 物质吸收峰波长处的摩尔分子消光值, 即  $\epsilon A_m$ 、 $\epsilon A_{bm}$ ; 以及 B 物质在 A、B 物质吸收峰波长处的摩尔分子消光值, 即  $\epsilon B_m$ 、 $\epsilon B_{bm}$ 。

[0042] 按以下公式计算 A 物质和 B 物质的偶联比 :

[0043]  $GA/BSA = (A_{cam} \times \epsilon B_{bm} - A_{cbm} \times \epsilon B_m) / (A_{cbm} \times \epsilon A_m - A_{cam} \times \epsilon A_{bm})$ 。

[0044] 实施例 3

[0045] 包被原固定

[0046] 用碳酸盐缓冲溶液将包被原稀释到适当浓度, 加到 96 孔酶标板中, 每孔 100  $\mu$  l, 4℃过夜, 0.05% PBS-T 清洗三次, 每次五分钟, 再每孔加入 100  $\mu$  l 10% 血清, 4℃过夜封闭未结合包被原的位点, 0.05% PBS-T 清洗三次后 -20℃保存备用。

[0047] 实施例 4

[0048] 用制备的免疫原免疫小鼠

[0049] 饲养 7 周龄雄性 BALB/c 小鼠 8 只, 用免疫原免疫其中 7 只, 另外一只不免疫, 以作阴性对照。免疫程序: 第一次基础免疫, 免疫剂量为 50  $\mu$  g/ 只, 用生理盐水稀释到适当体积, 再加等体积弗式完全佐剂 (FCA), 采用注射器推拉法乳化成油包水 (W/O) 状态, 可将一小滴混合液滴在清水的液面上, 若混合液凝聚不散, 则可认为混合液已乳化完全。将乳化好的抗原进行背部皮下多点注射 (0.3ml/ 只); 2 周后以相同剂量的免疫原与弗式不完全佐剂 (FIA) 混合乳化, 进行加强免疫, 腹腔注射 (0.3ml/ 只); 此后每隔 2-3 周加强 1 次, 方法同第二次。从每四次免疫开始, 每次免疫后 1 周, 断尾法采少量血, 分离血清, 间接 ELISA 法测效价。

[0050] 采用棋盘滴定法测定血清的效价。将采得的血清从 1 : 100 开始倍比稀释成 8 个梯度, 以 100  $\mu$  l/ 孔加入酶标板, 37℃孵育 1h 后洗板。阴性对照用未免疫过的小鼠血清, 空白对为 PBS。加二抗: 100  $\mu$  l/ 孔, 37℃孵育 1h, 洗板。加显色液 TMB: 100  $\mu$  l/ 孔, 于 37℃孵育 15min, 在波长 450nm 处用酶标仪读出各孔的 A 值。以血清样品 (P) 与阴性血清 (N) OD450 比值大于 2.1 时定义为阳性, 抗血清为阳性的最大稀释倍数的倒数定义为抗血清的效价。当效价大于 64000 时即可用于融合。

[0051] 实施例 4

[0052] 单克隆抗体的制备

[0053] 1、小鼠骨髓瘤细胞的准备

[0054] 融合前 7 天复苏骨髓瘤细胞 SP2/0, 使细胞密度在  $2 \times 10^5$  个 / 毫升, 融合前一天换液, 使细胞处于对数生长期。融合前用吸管将细胞轻轻从培养瓶中吹打下来, 转移至 50ml 离心管, 用 RPMI-1640 培养液洗 1 次 (1000rpm, 5min)。用 RPMI-1640 培养液重悬细胞, 计数。

[0055] 2、免疫脾细胞的制备

[0056] 取待融合的 Balb/C 小鼠, 融合前 4 天冲击免疫, 50  $\mu$  g/ 只, 不加佐剂, 直接用生理盐水稀释到 0.3ml, 腹腔注射。融合当天断颈处死小鼠, 浸泡于 75% 乙醇溶液 5min, 随后放



入超净台里解剖。用无菌手术打开腹腔取出脾脏,放入合适大小的玻璃平皿中,按以下方法制成单个脾细胞悬液:用 10ml 注射器往脾内注入约 0.2-0.5ml 无血清 1640 培养液使其胀大,再用弯曲的针头多点刺破脾膜,然后用注射器吸取无血清 1640 培养液从脾的一端向另一端吹打,直至脾脏完全变白,用无血清 1640 培养液将平皿加满,静置 1min,使非单细胞组织块沉淀,将单细胞悬液移入 50ml 塑料离心管中,1200rpm 离心 5min,弃上清,用 20ml 无血清 1640 培养液重悬细胞,计数。

### [0057] 3、细胞融合及培养

[0058] 融合前先将 1mL 的 PEG-1450 和 20mL 的 RPMI-1640 基础培养基于 37℃ 预温。将骨髓瘤细胞与脾细胞混合于 50mL 离心管内(脾细胞:  $1 \times 10^8$ ,骨髓瘤细胞:  $2.5 \times 10^7$ ),离心(1200rpm×5min),弃上清。在 37℃ 水浴中沿管壁加入 PEG 1ml,60 秒内加完,边加边转动离心管,不宜吹打,加完后在 37℃ 水浴中静止反应 1min,再加入 RPMI-1640 基础培养基以终止 PEG 的作用,在 1min 内加完 1ml,再在 1min 内加完 2ml,然后逐渐加快速度,在五分钟内加完 15ml。融合细胞终止后于 900rpm×8min 离心弃上清,加入预温的 HAT 培养基至所需的细胞浓度,并轻轻将细胞混匀,按 100ul/孔加到 96 孔细胞培养板中。待融合细胞在 HAT 中培养 7 天左右后,以 HAT 培养基半量换液一次,第 9-10 天间接 ELISA 检测。

### [0059] 4、杂交瘤细胞的克隆化培养

[0060] 采用的细胞克隆化培养方法是有限稀释法。将要克隆的细胞轻轻吹起,计数,然后稀释成 80 个/ml,种两排,100  $\mu$ l/孔。再稀释一倍,种两排,以此类推,最后得到四个浓度,使各孔的细胞分别为 8 个、4 个、2 个、1 个。10 天左右后观察胞,将只有一个杂交瘤集落的孔挑出来检测,若为阳性,再用同样的有限稀释法重复克隆 2 次,100% 阳性后即得到稳定分泌单克隆株细胞株。得到的单克隆抗体细胞株在液氮中冻存。

### [0061] 实施例 5

#### [0062] 单克隆抗体的大量制备

[0063] 采用腹水法大量制备单克隆抗体。

[0064] 给 6-8 周龄的雌性 Balb/C 小鼠腹腔注射 0.2mL/只福氏不完全佐剂致敏,3 天后,接种杂交瘤细胞。将对数生长期的杂交瘤细胞以 1000rpm 离心 5min,弃上清液,用生理盐水悬浮细胞沉淀,并将细胞数调至  $(1-2) \times 10^6$  个/ml,每只小鼠腹腔注射 0.5mL 细胞悬液。接种 7-10 天后,注意观察小鼠状态,可见小鼠腹部明显膨大,断颈处死小鼠,用镊子提起小鼠腹部皮肤,剪一小口,然后从两边向小鼠背部方向剪开,充分暴露腹部,然后用 5ml 注射器吸出腹腔内全部腹水。将取得的腹水于 3000rpm 离心 20min。离心后收集上清,分装,于 -20℃ 冻存。

### [0065] 实施例 6

#### [0066] 抗体的纯化

[0067] 采用硫酸铵沉淀法对抗体进行纯化。

[0068] 取 20ml 腹水,加生理盐水 20ml,再逐滴加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  饱和溶液 10ml,使成 20%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶液,边加边搅拌,充分混合后,静置 30min。3000r/min 离心 20min,弃去沉淀。在上清液中再加  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  饱和溶液 30ml,使成 50%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶液,充分混合,静置 30min。3000r/min 离心 20min,弃上清。于沉淀中加 20ml 生理盐水,使之溶解,再加  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  饱和溶液 10ml,使成 33%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶液,充分混合后,静置 30min。3000r/min 离心 20min,弃上

清,以除去白蛋白。重复步骤 5,2 ~ 3 次。用 10ml 生理盐水溶解沉淀,装入透析袋。在常水中透析过夜,再在生理盐水中于 4℃透析 24h,中间换液数次。离心去沉淀(去除杂蛋白),上清液即为粗提 IgG。最后过 SephadexG150 层析柱。以 0.01Mol/L pH7.4PBS(0.03Mol/LNaCl)洗脱,收集洗脱液。即可得到纯化的抗甘草酸抗体。

[0069] 实施例 7

[0070] 建立间接 ELISA 法,测定及检测含甘草酸试样。

[0071] 1、建立标准曲线

[0072] 用 PBS(pH 7.4) 配制系列浓度 (16、8、4、2、1、0.5、0.25、0  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) 的甘草酸标准溶液。用间接竞争 ELISA 方法测定甘草酸对包被抗原-抗体结合反应的抑制率。取 50  $\mu\text{l}$  标准溶液与 50  $\mu\text{l}$  按一定比例稀释的抗体混匀,加到连接有包被原的 96 孔酶标板中,37℃ 孵育一小时,洗板,加二抗 100  $\mu\text{l}$ ,37℃ 孵育一小时,洗板后显色,检测 OD450 值。以甘草酸浓度为 0 对应的孔 A450 值为 A0,以其他各种浓度甘草酸对应的孔 A450 值为 A,以抑制率  $(1-A/A0) \times 100\%$  为纵坐标,以甘草酸浓度对数 ( $\text{Log}_2 C$ ) 为横坐标,进行线性拟合,绘制标准曲线,建立直线回归方程。

[0073] 2、甘草酸的检测

[0074] 取 50  $\mu\text{l}$  试样与 50  $\mu\text{l}$  按一定比例稀释的抗体混匀,加到连接有包被原的 96 孔酶标板中,37℃ 孵育一小时,洗板,加二抗 100  $\mu\text{l}$ ,37℃ 孵育一小时,洗板后显色,检测 OD450 值。将 OD450 带到标准曲线中,计算试样中的甘草酸浓度。

专利名称(译)	用于检测和测定甘草酸的抗体、方法和试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN103387611A</a>	公开(公告)日	2013-11-13
申请号	CN201210140423.4	申请日	2012-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	北京中医药大学		
申请(专利权)人(译)	北京中医药大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京中医药大学		
[标]发明人	屈会化 赵琰 王庆国 王雪茜 续洁琨 李翼飞 薛瑾 吴婷婷 孙晔 刘洋		
发明人	屈会化 赵琰 王庆国 王雪茜 续洁琨 李翼飞 薛瑾 吴婷婷 孙晔 刘洋		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K14/47 C07K16/44 G01N33/545 G01N33/53		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供包括甘草酸或其衍生物的半抗原，与赋予抗原性的载体物质结合的前述半抗原的免疫原，与标记试剂结合的前述半抗原的偶联物(包被原)，以及抗前述免疫原的抗体，该抗体能与完整的甘草酸中的至少一种结构性抗原决定部位结合。本发明还提供用于检测或定量样品中甘草酸的方法和试剂盒，以及前述偶联物和前述抗体在检测或定量甘草酸中的用途。本发明对甘草酸具有特异性，可用于样品中检测甘草酸的存在和测定甘草酸的含量。

