



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103483444 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 01

(21) 申请号 201210197148. X

G01N 33/577(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 06. 15

(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 王庆国 赵琰 屈会化 王雪茜  
续洁琨 张越 吴婷婷 孙慧  
李翼飞

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/77(2006. 01)

C07K 14/795(2006. 01)

C07K 14/47(2006. 01)

C08B 37/00(2006. 01)

C12N 1/16(2006. 01)

C07K 16/44(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页

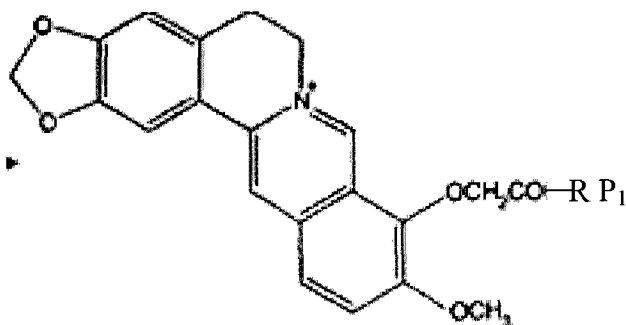
(54) 发明名称

用于检测和测定小檗碱的抗体、方法和试剂盒

(57) 摘要

本发明提供包括小檗碱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,该抗体能与完整的小檗碱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小檗碱的方法和试剂盒,以及前述偶联物和前述抗体在检测或定量小檗碱中的用途。本发明对小檗碱具有特异性,可用于样品中检测小檗碱的存在和测定小檗碱的含量。

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。

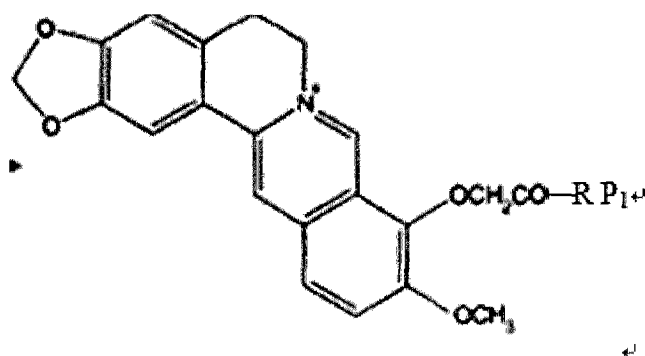
8. 根据权利要求 1 或 5 的免疫原，其中合成或天然多肽或半合成多肽是具有足够数量的可利用氨基的合成聚氨基酸。

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。

## 用于检测和测定小檗碱的抗体、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,特别是涉及小檗碱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小檗碱的方法和试剂盒,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。

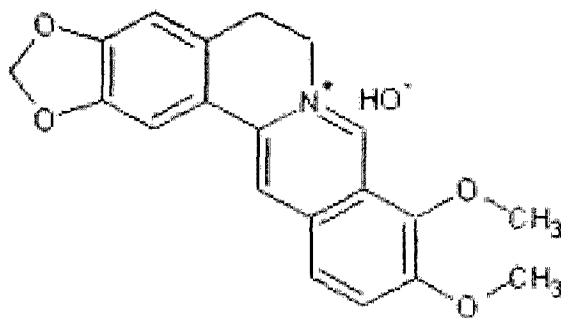
[0005] 小檗碱是一种季铵生物碱,分子式  $[C_{20}H_{18}NO_4]^+Cl^-$ ,分子量 371.8。又称黄连素。存在于黄连以及其它小檗属植物中。黄色针状结晶。熔点  $145^{\circ}C$ 。可溶于热水、乙醇、难溶于乙醚、苯。能与氯仿和丙酮等生成复合物。又称黄连素。常用其盐酸盐。黄色结晶性粉末。无臭,味极苦。微溶于水,不溶于醚、氯仿、醇等。

[0006] 药理作用

[0007] 现代药理研究表明其抗菌谱广,体外对多种革兰阳性及阴性菌均具抑菌作用,其中对溶血性链球菌、金葡菌、霍乱弧菌、脑膜炎球菌、志贺痢疾杆菌、伤寒杆菌、白喉杆菌等有较强的抑制作用,低浓度时抑菌,高浓度时杀菌。对流感病毒、阿米巴原虫、钩端螺旋体、某些皮肤真菌也有一定抑制作用。体外实验证实黄连素能增强白细胞及肝网状内皮系统的吞噬能力。痢疾杆菌、溶血性链球菌、金葡菌等极易对本品产生耐药性。本品与青霉素、链霉素等并无交叉耐药性。小檗碱的盐酸盐(俗称盐酸黄连素)已广泛用于治疗胃肠炎、细菌性痢疾等,对肺结核、猩红热、急性扁桃腺炎和呼吸道感染也有一定疗效。中医常用黄连、黄柏、三颗针及十大功劳等作清热解毒药物,其中主要有效成分即小檗碱。

[0008] 小檗碱化学结构如下:

[0009]



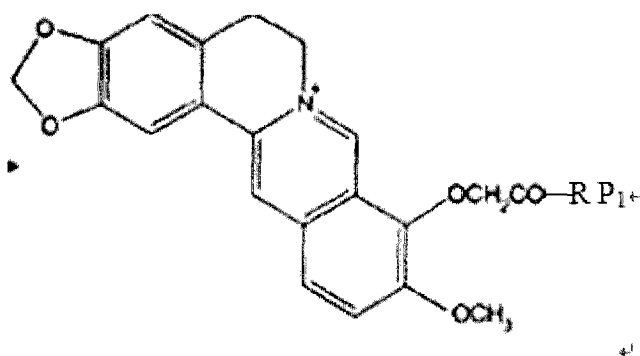
[0010] 目前建立了多种小檗碱的定性与定量检测和测定分析方法,如薄层层析法、HPLC法, HPLC-MS 法等。其中最常用的方法是高效液相色谱法。但含小檗碱的生物样品(包括血浆、尿、唾液等)含有大量的影响含量测定的蛋白质及内源性物质;同时小檗碱可能呈结合状态,必须经过处理,排除内源性杂质和代谢物的干扰,使结合状态的小檗碱游离后才能测定;同时还需要浓缩以满足仪器检测灵敏度的要求,处理程序复杂,费时费力;同时由于

小檗碱进入体内后,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,对于小檗碱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,但由于缺乏小檗碱的抗体,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小檗碱的方法,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

[0011] 本发明的半抗原小檗碱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:

[0012]



[0013] 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 直接与小檗碱羰基碳原子结合,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。

[0014] 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(BSA)。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。

[0015] 半抗原的制备本发明描述了将小檗碱进行结构改造后,得到 9-O-羧甲基-小檗红碱,并用碳二亚胺法将半抗原与赋予抗原性的载体物质发生的偶联作用,产生免疫原。以小檗碱为起始原料,特定温度加热产生的混合物溶解于水,用三倍量的氯仿提取。氯仿被蒸发,残渣经 Sephadex LH20 和 ODS 凝胶柱色谱纯化得到小檗红碱。之后,在室温条件下向小檗红碱的氯仿溶液添加氯乙酸搅拌反应三小时,溶剂被蒸发后,残渣经层析得到 9-O-羧甲基-小檗红碱,产物纯化经核磁共振氢谱和碳谱( $^1\text{H NMR}$  和  $^{13}\text{C NMR}$ ) 确证。

[0016] 免疫原的合成

[0017] 9-O-羧甲基-小檗红碱和 1-乙基-3-(3'-二甲基氨丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)添加到吡啶溶液中。向混合物中滴加 BSA 或 HSA 溶液,然后在室温下搅拌 3 小时。随后,混合物在 4 度用水透析两天,换液五次,分装保存于  $-20^\circ\text{C}$  的冰箱中。

[0018] 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

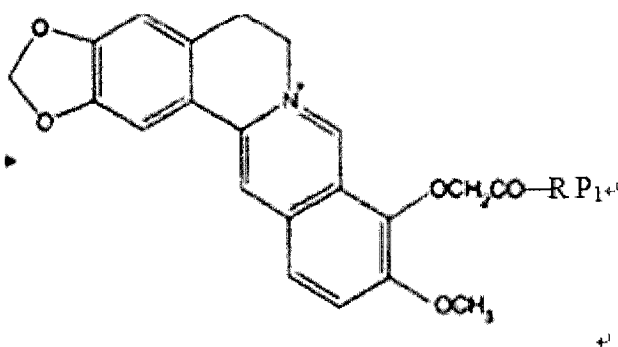
用紫外分光光度法或矩阵辅助紫外激光解析 / 电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 对每个免疫原进行评估。小檗碱免疫原反应物和产物的吸收峰相比 (200nm-400nm), 可判断是否偶合, 并根据反应物和产物的摩尔吸光系数计算偶联物与半抗原的比例。

[0019] 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 $\mu$ L)。

[0020] 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。

[0021] 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;

[0022]



[0023] 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。

[0024] 偶合物的合成

[0025] 1. 半抗原的制备 本发明描述了将小檗碱进行结构改造后, 得到 9-O-羧甲基-小檗红碱, 并用碳二亚胺法将半抗原与赋予抗原性的载体物质发生的偶联作用, 产生免疫原。以小檗碱为起始原料, 特定温度加热产生的混合物溶解于水, 用三倍量的氯仿提取。氯仿被蒸发, 残渣经 Sephadex LH20 和 ODS 凝胶柱色谱纯化得到小檗红碱。之后, 在室温条件下向小檗红碱的氯仿溶液添加氯乙酸搅拌反应三小时, 溶剂被蒸发后, 残渣经层析得到 9-O-羧甲基-小檗红碱, 产物纯化经核磁共振氢谱和碳谱 ( $^1\text{H}$ NMR 和  $^{13}\text{C}$ NMR) 确证。

[0026] 2. 免疫原的合成

[0027] 9-O-羧甲基-小檗红碱和 1-乙基-3-(3'-二甲基氨丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 添加到吡啶溶液中。向混合物中滴加 BSA 或 HSA 溶液, 然后在室温下搅拌 3 小时。随后, 混合物在 4 度用水透析两天, 换液五次, 分装保存于  $-20^\circ\text{C}$  的冰箱中。

[0028] 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。

[0029] 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小檗碱结构上的表位结合, 优选与完整的小檗碱结构表位相结合, 该抗体是多克隆的, 或是单克隆的, 优选为单克隆抗体, 且具有对小檗碱的特异性。

[0030] 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小檗碱的免疫原免疫动物, 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。

[0031] 另一方面, 本发明包括在试样中检测或测定小檗碱的方法, 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小檠碱的存在或含量。

[0032] 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于检测或测定小檠碱的存在的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小檠碱的指导。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)。

[0033] 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小檠碱。

[0034] 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小檠碱的试剂是有用的。

[0035] 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。

[0036] 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、NZO 或 X63-Ag8-653 细胞,以及人骨髓瘤和小鼠-人杂合骨髓瘤细胞系。

[0037] 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。

[0038] 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。

[0039] 本发明的一个优选的方案中,抗小檠碱单克隆抗体采用 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

[0040] 实施例 1

[0041] 免疫原和包被原的制备

[0042] 免疫原和包被原采用同样的方法制备合成。小檗碱(3克),在190度加热15分钟。由此产生的混合物溶解于水,用三倍量的氯仿提取。氯仿被蒸发,残渣经 Sephadex LH20 和 ODS 凝胶柱色谱纯化得到小檗红碱 2g。之后,在室温条件下向小檗红碱的氯仿溶液(100mg, 0.31mol) 添加氯乙酸 300mg(3.17mol) 搅拌反应三小时,溶剂被蒸发后,残渣经层析得到 9-O- 羧甲基 - 小檗红碱,将其与标准品进行核磁共振比对。

[0043] 8 毫克 9-O- 羧甲基 - 小檗红碱(0.021 毫摩尔)和 8 毫克 1- 乙基 -3-(3'-二甲氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐(EDC,0.042 毫摩尔) 添加到 1 毫升吡啶溶液中。向混合物中滴加 1 毫升 BSA 或 HSA 溶液(8 毫克),然后在室温下搅拌 3 小时。随后,混合物在 4 度用水透析两天,换液五次,冻干。

[0044] 实施例 2

[0045] 免疫原和包被原的鉴定

[0046] 精确配制适宜浓度的小檗碱与 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小檗碱、BSA、PLL、小檗碱 -BSA、小檗碱 -PLL 的全波长图谱及最大吸收波长处的吸光值。将(A)和 BSA(B) 分别用 PBS 配置成 0.05mg/ml 和 1mg/ml,用 PBS 将小檗碱 -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(am、bm) 处的吸收值,即 AAam、AAbm、ABam、ABbm、ACam、ACbm。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  $\epsilon Aam$ 、 $\epsilon Abm$ ; 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  $\epsilon Bam$ 、 $\epsilon Bbm$ 。

[0047] 按以下公式计算 A 物质和 B 物质的偶联比:

[0048]  $GA/BSA = (Acam \times \epsilon Bbm - Achm \times \epsilon Bam) / (Achm \times \epsilon Aam - Acam \times \epsilon Abm)$ 。

[0049] 实施例 3

[0050] 包被原固定

[0051] 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。

[0052] 实施例 4

[0053] 用制备的免疫原免疫小鼠

[0054] 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。

[0055] 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。

[0056] 实施例 5

[0057] 单克隆抗体的制备

[0058] 1、小鼠骨髓瘤细胞的准备

[0059] 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。

[0060] 2、免疫脾细胞的制备

[0061] 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。

[0062] 3、细胞融合及培养

[0063] 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 $\times$ 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℃ 水浴中静置反应 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 $\times$ 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 100 $\mu$ l/ 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。

[0064] 4、杂交瘤细胞的克隆化培养

[0065] 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。

[0066] 实施例 6

[0067] 单克隆抗体的大量制备

[0068] 采用腹水法大量制备单克隆抗体。

[0069] 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  $-20^{\circ}\text{C}$  冻存。

[0070] 实施例 6

[0071] 抗体的纯化

[0072] 采用硫酸铵沉淀法对抗体进行纯化。

[0073] 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  $4^{\circ}\text{C}$  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。即可得到纯化的抗小檗碱抗体。

[0074] 实施例 7

[0075] 建立间接 ELISA 法,测定及检测含小檗碱试样。

[0076] 1、建立标准曲线

[0077] 用 PBS(pH 7.4)配制系列浓度(16、8、4、2、1、0.5、0.25、0  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )的小檗碱标准溶液。用间接竞争 ELISA 方法测定小檗碱对包被抗原-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,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育一小时,洗板,加二抗 100  $\mu\text{l}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育一小时,洗板后显色,检测 OD450 值。以小檗碱浓度为 0 对应的孔 A450 值为 A0,以其他各种浓度小檗碱对应的孔 A450 值为 A,以抑制率  $(1-A/A0) \times 100\%$  为纵坐标,以小檗碱浓度对数 ( $\text{Log}_2C$ ) 为横坐标,进行线性拟合,绘制标准曲线,建立直线回归方程。

[0078] 2、小檗碱的检测

[0079] 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,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育一小时,洗板,加二抗 100  $\mu\text{l}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育一小时,洗板后显色,检测 OD450 值。将 OD450 带到标准曲线中,计算试样中的小檗碱浓度。

专利名称(译)	用于检测和测定小檗碱的抗体、方法和试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN103483444A</a>	公开(公告)日	2014-01-01
申请号	CN201210197148.X	申请日	2012-06-15
[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	王庆国 赵琰 屈会化 王雪茜 续洁琨 张越 吴婷婷 孙慧 李翼飞		
发明人	王庆国 赵琰 屈会化 王雪茜 续洁琨 张越 吴婷婷 孙慧 李翼飞		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K14/47 C08B37/00 C12N1/16 C07K16/44 G01N33/531 G01N33/577		
CPC分类号	C07K14/765 C07K14/47 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/577 G01N33/94		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供包括小檗碱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，该抗体能与完整的小檗碱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小檗碱的方法和试剂盒，以及前述偶联物和前述抗体在检测或定量小檗碱中的用途。本发明对小檗碱具有特异性，可用于样品中检测小檗碱的存在和测定小檗碱的含量。

