



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105884884 A

(43)申请公布日 2016.08.24

(21)申请号 201410521697.7

C09K 11/06(2006.01)

(22)申请日 2014.09.30

G01N 33/577(2006.01)

(71)申请人 北京中医药大学

G01N 33/53(2006.01)

地址 100029 北京市朝阳区北三环东路11号

(72)发明人 赵琰 屈会化 王庆国 成金俊
单文超 赵灵灵 冯盛岚

(51)Int.Cl.

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 14/47(2006.01)

C07K 16/16(2006.01)

C07K 16/06(2006.01)

C07H 17/07(2006.01)

C07H 1/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页

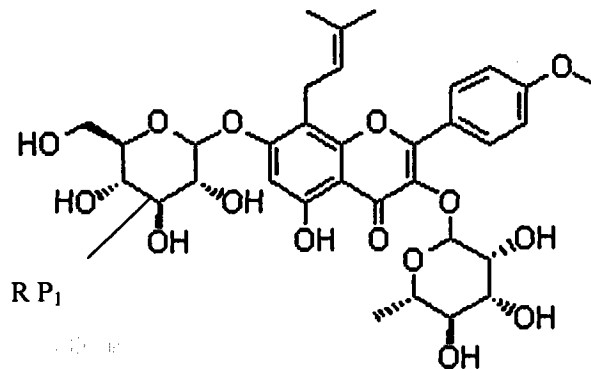
(54)发明名称

用于检测和测定淫羊藿苷的抗体、方法和试剂盒

(57)摘要

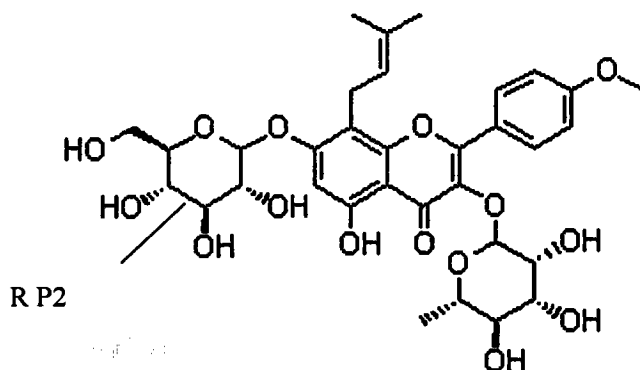
本发明提供包括淫羊藿苷或其衍生物的半抗原,与赋予抗原性的载体物质结合的前述半抗原的免疫原,与标记试剂结合的前述半抗原的偶联物(包被原),以及抗前述免疫原的抗体,该抗体能与完整的淫羊藿苷中的至少一种结构性抗原决定部位结合。本发明还提供用于检测或定量样品中淫羊藿苷的方法和试剂盒,以及前述偶联物和前述抗体在检测或定量淫羊藿苷中的用途。本发明对淫羊藿苷具有特异性,可用于样品中检测淫羊藿苷的存在和测定淫羊藿苷的含量。

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_1 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_1 直接与淫羊藿苷氧化后的醛基结合。
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淫羊藿苷中的至少一种结构性抗原决定部位结合。
11. 如权利要求 10 的抗体，其中当抗原固定和支持底物上，特别是聚苯乙烯固体支持物时，抗体可以与其特异性结合。
12. 制备如权利要求 10 或 11 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。
13. 如权利要求 12 的方法，其中该方法还包括将所述血清抗体固定和支持底物上。包括如权利要求 1 至 3 中任一项的半抗原与可检测到的标记物共价结合的偶联物。
14. 一种如下结构的偶合物：



其中 R 是 0 至 6 个碳的烷基, P2 是可检测的标记试剂。

15. 根据权利要求 14 的偶合物, 标记试剂选自酶、发光物质、放射性物质或它们的混合物。

16. 根据权利要求 14 或 16 的偶合物, 标记试剂是过氧化物酶。

17. 根据权利要求 16 的偶合物, 标记试剂是辣根过氧化物酶 (HRP)。

18. 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。

19. 用于检测和定量样品中淫羊藿苷的方法, 该方法包括将供试样品和如权利要求 14 至 18 中任一项的偶联物或其混合物, 与如权利要求 10 或 11 的抗体或其混合物接触; 检测或定量结合的偶联物; 以及从校准曲线中推出样品中淫羊藿苷的存在或含量。

20. 用于检测和定量淫羊藿苷的试剂盒, 该试剂盒包括如权利要求 14 至 18 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。

用于检测和测定淫羊藿苷的抗体、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,特别是涉及淫羊藿苷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淫羊藿苷的方法和试剂盒,以及其中使用的半抗原、免疫原、偶联物 (conjugate) 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] 淫羊藿苷,是为箭叶淫羊藿、柔毛淫羊藿、巫山淫羊藿巫,朝鲜淫羊藿等干燥茎叶提取物。

[0006] 分子式 :C₃₃H₄₀O₁₅ 分子量 :676.6617

[0007] 淫羊藿苷属于黄酮类化合物,熔点 223-225℃,溶于水,乙醇、乙酸乙酯,不溶于醚、苯、氯仿。

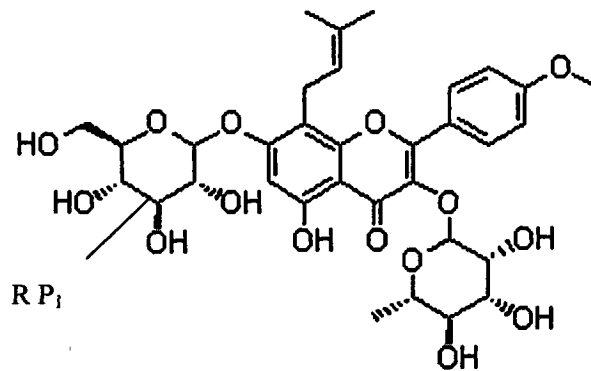
[0008] 研究表明,淫羊藿苷显示多种生物学活性和药理作用。淫羊藿苷能增加心脑血管血流量、促进造血功能、免疫功能及骨代谢,还具有补肾壮阳、抗衰老等功效。还具有强心、降血压、抗心律失常、增加脑血流量、抑菌、抗病毒、抗炎、降血脂、抗肿瘤等多种作用,具有较高的药用和保健价值。

[0009] 目前建立了多种淫羊藿苷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。但含淫羊藿苷的生物样品 (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;同时淫羊藿苷可能呈结合状态,必须经过处理,排除内源性杂质和代谢物的干扰,使结合状态的淫羊藿苷游离后才能测定;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;另外由于淫羊藿苷进入体内后,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。最后,对于淫羊藿苷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 western-blot 等方法,但由于缺乏淫羊藿苷的抗体,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淫羊藿苷的方法,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] 本发明的半抗原淫羊藿苷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 直接与淫羊藿苷氧化后的醛基结合，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] P1 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。

[0014] 半抗原的制备 本发明描述了半抗原淫羊藿苷的糖苷结构中的两个邻羟基经过过碘酸钠氧化为醛基从而与载体物质发生的偶联作用，产生免疫原。偶联物成功制备并纯化后分别经质谱（MS）和核磁共振氢谱和碳谱（¹HNMR 和 ¹³CNMR）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。例如过碘酸盐氧化法等。采用过碘酸氧化法制备免疫原时，是将 10 毫克的半抗原淫羊藿苷溶解在 10ml 热水中，加入含有 12 毫克的过碘酸钠溶液 0.5 毫升，室温下反应一个小时，离心，取上清液加入到 10-20mg/ml 的牛血清蛋白碳酸盐缓冲溶液中，搅拌反应 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。

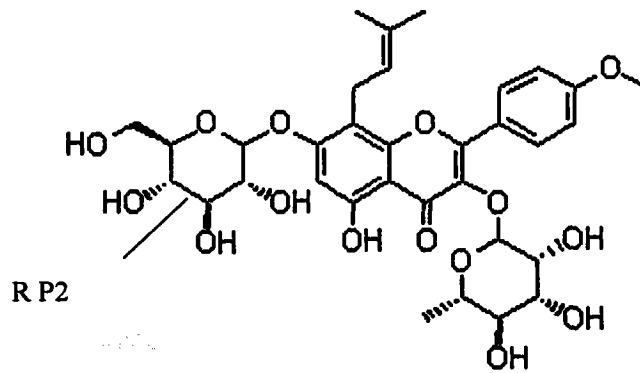
[0016] 合成免疫原的分析方法 为了确认载体物质上结合有适当的半抗原，在免疫前，使用紫外分光光度法或矩阵辅助紫外激光解析 / 电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）对每个免疫原进行评估。淫羊藿苷免疫原反应物和产物的吸收峰相比（200nm-400nm），可判断是否偶合，并根据反应物和产物的摩尔吸光系数计算偶联物与半抗原的比例。

[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 μL）。

[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，免疫检测时需要将淫羊藿苷与标记试剂进行偶合。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,P2是可检测的标记试剂,标记试剂选自酶、发光物质、放射性物质或它们的混合物,更优选地标记试剂是过氧化物酶。最优选地标记试剂是辣根过氧化物酶(HRP)。发光物质选自生物发光物质、化学发光物质或荧光物质。

[0022] 耦合物的合成 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。例如过碘酸盐氧化法等。采用过碘酸盐氧化法制备免疫原时,是将10毫克的半抗原淫羊藿苷溶解在10ml热水中,加入含有12毫克的过碘酸钠溶液0.5毫升,室温下反应一个小时,离心,取上清液加入到10-20mg/mL的牛血清蛋白碳酸盐缓冲溶液中,搅拌反应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] 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淫羊藿苷结构上的表位结合,优选与完整的淫羊藿苷结构表位相结合,该抗体是多克隆的,或是单克隆的,优选为单克隆抗体,且具有对淫羊藿苷的特异性的抗体。

[0024] 免疫检测时要将该抗体固定在支撑底物上。优选地,该方法进一步包括将所述血清抗体固定到支撑底物上,优选固体支持物,最优选聚苯乙烯固体支持物。

[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淫羊藿苷的免疫原免疫动物,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淫羊藿苷的方法,该方法包括用本发明的偶合物或其混合物和本发明的抗体或其混合物接触试样;检测或测定结合的缀合物的数量;并且从标准曲线推断试样中淫羊藿苷的存在或数量。

[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淫羊藿苷的存在的通用分析方法和相应的试剂盒。该试剂盒包括用本发明的偶合物或其混合物和本发明的抗体或其混合物,同时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淫羊藿苷的指导。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(免疫原的和耦合物的)。

[0028] 另一方面,本发明包括使用本发明的偶合物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淫羊藿苷。

[0029] 为了产生多克隆抗血清,将免疫原与 Freund 佐剂混合,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滴度。达到最佳滴度时,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淫羊藿苷的含量是需要纯化的。

[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、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、透析或亲和层析等等。

[0034] 本发明的一个优选的方案中,淫羊藿苷单克隆抗体采用 Balb/C 小鼠腹水生产单克隆抗体的方法制备。将约 10^6 - 10^7 杂交瘤细胞接种到致敏的小鼠腹腔内,2-4 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] 10 毫克的半抗原淫羊藿苷溶解在 10ml 热水中,加入含有 12 毫克的过碘酸钠溶液 0.5 毫升,室温下反应一个小时,离心,取上清液加入到 10-20mg/mL 的牛血清蛋白碳酸盐缓冲溶液中,搅拌反应 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°C 的冰箱中。

[0037] 实施例 2

[0038] 10 毫克的半抗原淫羊藿苷溶解在 10ml 热水中,加入含有 12 毫克的过碘酸钠溶液 0.5 毫升,室温下反应一个小时,离心,取上清液加入到 10-20mg/mL 的卵清蛋白碳酸盐缓冲溶液中,搅拌反应 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°C 的冰箱中。

[0039] 实施例 3

[0040] 制备方法同实施例 1,只是将牛血清白蛋白 (BSA) 换成 KLH,制得淫羊藿苷-KLH 完全抗原 120mg。

[0041] 实施例 4

[0042] 免疫原 (1CA-BSA、1CA-KLH) 按常规方法各免疫了三只兔子。从加强免疫第二次开

始,在每次免疫后第 8 天于兔子耳缘静脉采血,血清经适当稀释后用间接 ELISA 测定效价。待第 4 次免疫时,兔子获得了高效价的抗体,经纯化制成冻干粉后的效价分别为 20000 : 1。

[0043] 实施例 5

[0044] 先将淫羊藿苷抗原与弗氏佐剂乳化,用 PBS 将完全抗原淫羊藿苷-KLH 配制成 1mg/ml 的溶液,然后将完全抗原溶液与弗氏佐剂等体积混合,用高速震荡器震荡形成均匀乳浊液,将此乳浊液用于动物的免疫。选择 8 周龄的小鼠进行注射免疫。取 8 周龄的健康 Balb/C 小鼠 12 只,在第 0 天,每只腹腔注射完全弗氏佐剂乳化抗原 100 μ L。第 14 天,再对每只小鼠腹腔注射不完全弗氏佐剂乳化抗原 100 μ L。第 21 天,以摘小鼠眼球法采血,用 ELISA 方法检测血清中抗体效价(滴度)。第 28 天,再次腹腔注射不完全弗氏佐剂乳化抗原 100 μ L。在细胞融合反应前一周,用 100ug/100ul 抗原生理盐水再次加强免疫。采血后经测定,所得抗血清效价为 1 : 20000。细胞融合操作 3 天后检查细胞融合情况,8 天后加 HT' 完全培养基,每孔加入 1ml。在 12 天内,就可以观察到杂交细胞的克隆。当克隆直径长到约 1mm 时,用人淫羊藿苷-BSA 包被的酶联板来筛选出抗淫羊藿苷的杂交瘤细胞。筛选到的阳性克隆用有限稀释法进行克隆化,以 1CA-BSA 包被的 ELISA 法酶标板来筛选抗淫羊藿苷的特异性杂交瘤细胞。经五次克隆后,得到一株能分泌专一性抗体的抗淫羊藿苷单克隆细胞。

[0045] 实施例 6

[0046] 取实施例 4 中经过 4 次免疫的小鼠,用淫羊藿苷-BSA 包被的酶联板测定抗血清的滴度。将包被抗原以 10ug/ml 稀释于 pH 9.6 的 0.05M 碳酸盐缓冲液中,100 μ L/孔加入到 96 孔酶标板于 4 $^{\circ}$ C 过夜。弃去包被液后用 1%明胶/PBS 在 37 $^{\circ}$ C 下封闭 2 小时,然后用 PBS-Tween-20 洗液洗板 3 遍,再加入稀释后的淫羊藿苷抗血清,置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。用 PBS-Tween-20 洗液洗板 3 遍,加入 1 : 2000 的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 多抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时后用 PBS-Tween-20 洗液洗板 3 遍,加 TMB/H2O2 底物进行显色 10min,并用终止液(0.1M 硫酸)终止显色。

[0047] 在 450nm 光波长下测定吸收值(OD),与空白对照孔的 OD 均值比较,采用计量资料的 t 检验,取 P < 0.05 的最低稀释度作为此抗体的效价。经比色测定,所得淫羊藿苷抗血清的效价为 1 : 20000。

[0048] 实施例 7

[0049] 融合效率分析用 CFSE 绿色荧光预标记的淋巴细胞显绿色,用 PE 标记的抗小鼠 B220 单克隆抗体预标记的 SP2/0 细胞显红色,两种细胞融合形成的杂交瘤细胞带有双色荧光。经流式细胞仪测定分析双荧光细胞比例,用于反映融合效率。实验中,PE 标记抗小鼠 B220 单克隆抗体预标记的 SP2/0(骨髓瘤)细胞,CFSE 绿色荧光预标记淋巴细胞,带有双色荧光即为杂交瘤细胞。本实验体系中脾细胞和 SP2/0 的最初融合效率约为 45%,ELISA 法测定阳性率为 15%。

专利名称(译)	用于检测和测定淫羊藿苷的抗体、方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN105884884A	公开(公告)日	2016-08-24
申请号	CN201410521697.7	申请日	2014-09-30
[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	赵琰 屈会化 王庆国 成金俊 单文超 赵灵儿 冯盛岚		
发明人	赵琰 屈会化 王庆国 成金俊 单文超 赵灵儿 冯盛岚		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K14/47 C07K16/16 C07K16/06 C07H17/07 C07H1/00 C09K11/06 G01N33/577 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供包括淫羊藿苷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，该抗体能与完整的淫羊藿苷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淫羊藿苷的方法和试剂盒，以及前述偶联物和前述抗体在检测或定量淫羊藿苷中的用途。本发明对淫羊藿苷具有特异性，可用于样品中检测淫羊藿苷的存在和测定淫羊藿苷的含量。

