



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107253989 A

(43)申请公布日 2017.10.17

(21)申请号 201710386414.6

C07K 16/06(2006.01)

(22)申请日 2017.05.26

G01N 33/53(2006.01)

(71)申请人 陕西科技大学

地址 710021 陕西省西安市未央区大学园1号

(72)发明人 钱卫东 刘婵婵 王婷 吴启航
曾桥

(74)专利代理机构 西安通大专利代理有限责任
公司 61200

代理人 范巍

(51)Int.Cl.

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 1/107(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图4页

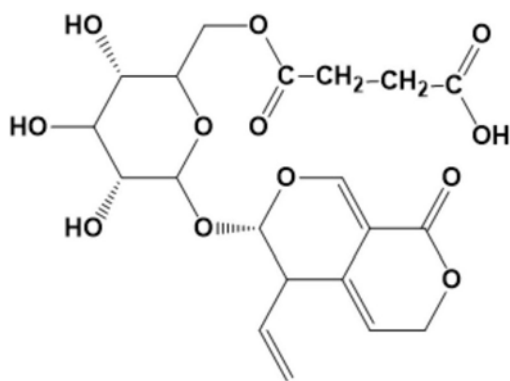
(54)发明名称

龙胆苦苷的人工抗原制备及间接竞争ELISA
检测的建立方法

(57)摘要

本发明提供一种龙胆苦苷的人工抗原制备及间接竞争ELISA检测的建立方法,采用琥珀酸酐法对药用有效成分龙胆苦苷进行结构修饰,获得半抗原羧基化龙胆苦苷;分别利用混合酸酐法,将羧基化的龙胆苦苷与两种载体蛋白BSA和OVA偶联制备得到相应的两种人工抗原;并通过动物免疫制备抗龙胆苦苷抗体,基于此抗体建立了灵敏度较好、特异性较强的龙胆苦苷-ELISA检测方法。为龙胆苦苷的检测开辟了新路径,提供了新思路和新技术,为快速寻找新药源和快速鉴别药材真伪提供了平台。

1. 一种龙胆苦苷人工抗原, 其特征在于: 该人工抗原包括含有羧基的龙胆苦苷半抗原分子以及通过所述羧基与该半抗原分子偶联的载体蛋白, 所述载体蛋白选自牛血清白蛋白BSA或鸡卵清蛋白OVA, 所述半抗原分子的结构如式I所示:



式I。

2. 一种龙胆苦苷人工抗原的制备方法, 其特征在于: 包括以下步骤:

1) 采用琥珀酸酐法对龙胆苦苷进行结构修饰

将55~60mg龙胆苦苷、95~105mg琥珀酸酐及3~5mL吡啶混合后于100~115℃回流7~13h, 得反应液, 将反应液以及3~5mL质量分数36~38%盐酸与18~22mL的≤4℃蒸馏水混合后用氯仿萃取, 除去氯仿层后通过减压蒸馏得棕色粉末, 即为龙胆苦苷半抗原, 记为GTP-SA;

2) 利用混合酸酐法将龙胆苦苷半抗原与载体蛋白偶联, 所述载体蛋白选自牛血清白蛋白BSA或鸡卵清蛋白OVA。

3. 根据权利要求2所述的龙胆苦苷人工抗原的制备方法, 其特征在于: 所述步骤2) 具体包括以下步骤:

2.1) 将15~25mg GTP-SA、0.4~0.6mL二甲基甲酰胺以及70~80μL三正丁胺混合后冷却至0~1℃, 得混合物, 向混合物中加入15~25μL氯甲酸异丁酯后于9~11℃下搅拌25~35min, 得到反应液A;

2.2) 将65~75mg牛血清白蛋白BSA和65~75mg鸡卵清蛋白OVA分别加入至5~7mL二甲基甲酰胺: 水的体积比为1:3~5的混合溶剂中, 得到含有BSA的反应液B₁和含有OVA的反应液B₂;

2.3) 将反应液A平均分成2份, 分别加入至反应液B₁和B₂中于0~1℃搅拌混匀, 得到混合后的反应液A-B₁和A-B₂, 将A-B₁和A-B₂置于3~5℃下搅拌10~12h; 然后, 将A-B₁和A-B₂分别装入截留分子量为8000~14000的透析袋中, 以磷酸盐缓冲液为透析液, 在3~5℃下透析3~4天, 在透析处理期间, 每间隔5~7小时换一次透析液; 然后, 将透析处理后的A-B₁进行冷冻干燥, 得龙胆苦苷人工抗原GTP-BSA, 将透析处理后的A-B₂进行冷冻干燥, 得龙胆苦苷人工抗原GTP-OVA。

4. 一种龙胆苦苷间接竞争ELISA检测的建立方法, 其特征在于: 该建立方法包括以下步骤:

1) 利用琥珀酸酐法对龙胆苦苷进行结构修饰, 得到含有羧基的龙胆苦苷半抗原;

2) 利用混合酸酐法将龙胆苦苷半抗原分别与牛血清白蛋白BSA及鸡卵清蛋白OVA偶联,制备得到相应的两种龙胆苦苷人工抗原GTP-BSA及GTP-OVA;

3) 运用两种龙胆苦苷人工抗原分别对动物进行免疫,结合利用间接ELISA检测,并以相对应的另一种人工抗原为包被抗原测定动物抗血清的效价,从而确定可获得最优抗血清效价的动物免疫方案;

4) 以龙胆苦苷为竞争抗原,通过测定龙胆苦苷对抗原-抗体结合反应的竞争抑制率,从而建立针对龙胆苦苷的竞争抑制曲线以及间接竞争ELISA标准曲线。

5. 根据权利要求4所述一种龙胆苦苷间接竞争ELISA检测的建立方法,其特征在于:所述对动物进行免疫具体包括以下步骤:以GTP-BSA或GTP-OVA为免疫抗原,将免疫抗原用生理盐水稀释至2~4mg/mL,取1~5mL稀释后的免疫抗原与该免疫抗原体积10~15%的佐剂混匀,然后对动物通过多次肌肉多点注射完成免疫。

6. 根据权利要求4所述一种龙胆苦苷间接竞争ELISA检测的建立方法,其特征在于:所述间接ELISA检测中,包被抗原的包被浓度为1:1000~1:8000,包被液为碳酸盐缓冲液,封闭液为山羊血清:PBS的体积比为1:8~12的混合液,酶标二抗的浓度为1:1000~1:10000。

7. 根据权利要求4所述一种龙胆苦苷间接竞争ELISA检测的建立方法,其特征在于:所述间接竞争ELISA检测中,竞争反应时间为10~60min,龙胆苦苷溶剂为体积分数为10~50%的甲醇水溶液。

8. 根据权利要求4所述一种龙胆苦苷间接竞争ELISA检测的建立方法,其特征在于:所述建立方法还包括以下步骤:根据龙胆苦苷浓度为横坐标的间接竞争ELISA竞争抑制曲线获得检测灵敏度;根据龙胆苦苷浓度对数为横坐标的间接竞争ELISA标准曲线,获得其线性回归方程;根据龙胆苦苷的检测灵敏度与其结构相似物的检测灵敏度比值得到交叉反应率。

9. 根据权利要求8所述一种龙胆苦苷间接竞争ELISA检测的建立方法,其特征在于:所述结构相似物选自獐牙菜苦苷、獐牙菜苷、梔子苷、马钱苷和橄榄苦苷。

10. 一种龙胆苦苷多克隆抗体的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 利用琥珀酸酐法对龙胆苦苷进行结构修饰,得到含有羧基的龙胆苦苷半抗原;

2) 利用混合酸酐法将龙胆苦苷半抗原分别与牛血清白蛋白BSA及鸡卵清蛋白OVA偶联,制备得到相应的两种龙胆苦苷人工抗原GTP-BSA及GTP-OVA;

3) 运用两种龙胆苦苷人工抗原分别对动物进行免疫,得到对应的免疫血清。

龙胆苦苷的人工抗原制备及间接竞争ELISA检测的建立方法

技术领域

[0001] 本发明属于多克隆抗体领域,具体涉及龙胆苦苷半抗原、人工抗原、多克隆抗体制备及其ELISA检测方法的建立。

背景技术

[0002] 龙胆苦苷(Gentiopicroside,GTP)为裂环环烯萜苷类化合物,属于半萜类物质,分子式为 $C_{16}H_{20}O_9$,分子量为356.32,白色针状晶体,易溶于甲醇。是药用植物秦艽中最主要有效成分,存在于龙胆科龙胆属植物中,具有特殊的药理活性,主要包括镇痛、抗菌、抗炎、抗病毒、保肝利胆、健胃、降压等功效。

[0003] 龙胆苦苷目前在临床中应用极为广泛,随着对龙胆苦苷药理作用的不断开发利用,使得其野生资源保有量急剧下降,中药秦艽已被列为国家三级保护药材,市场上难免会有假冒伪劣的秦艽药材出现,所以,建立简单高效的中药有效成分检测技术为成为当务之急。

[0004] 酶联免疫吸附测定法(Enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)对于小分子化合物的检测与分析是一种新兴技术,目前,在中药有效成分的检测分析中得以广泛应用。建立ELISA方法的基本路线是通过中药有效成分人工抗原的合成制备多克隆抗体或单克隆抗体,并建立ELISA法检测技术。相比于传统的检测分析方法,ELISA法具有很大的优势,该方法具有高灵敏性和高特异性,操作简单,样品的前处理过程得以极大程度的简化,无需使用昂贵的仪器设备,对操作人员的技能要求不高,适合推广应用于基层。

[0005] 现有技术中尚不存在龙胆苦苷人工抗原的制备及其ELISA检测方法的报道。而小分子化合物人工抗原的制备是建立其ELISA检测方法的难点,不同的分子结构偶联载体蛋白的位置、种类互不相同,为了实现检测方法的灵敏度高、特异性强的特点还需要对免疫抗原、包被抗原条件进行优化。

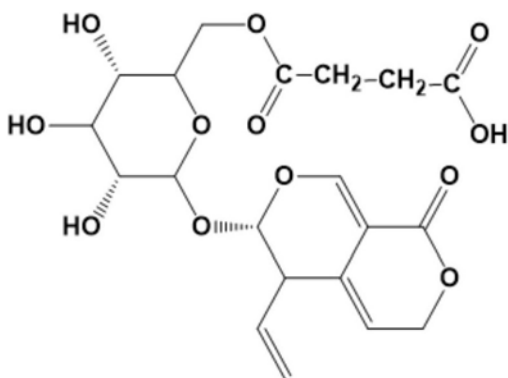
发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服上述现有技术的不足,提供一种龙胆苦苷的人工抗原制备及间接竞争ELISA检测的建立方法。

[0007] 为达到上述目的,本发明采用了以下技术方案:

[0008] 一种龙胆苦苷人工抗原,该人工抗原包括含有羧基的龙胆苦苷半抗原分子以及通过所述羧基与该半抗原分子偶联的载体蛋白,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白BSA或鸡卵清蛋白OVA,所述半抗原分子的结构如式I所示:

[0009]



式I。

[0010] 上述龙胆苦苷人工抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0011] 1) 采用琥珀酸酐法对龙胆苦苷进行结构修饰

[0012] 将55~60mg龙胆苦苷、95~105mg琥珀酸酐及3~5mL吡啶混合后于100~115℃回流7~13h,得反应液,将反应液以及3~5mL质量分数36~38%盐酸与18~22mL的≤4℃蒸馏水混合后用氯仿萃取,除去氯仿层后通过减压蒸馏(≤160℃)得棕色粉末,即为龙胆苦苷半抗原(式I),记为GTP-SA;

[0013] 2) 利用混合酸酐法将龙胆苦苷半抗原与载体蛋白偶联

[0014] 2.1) 将15~25mg GTP-SA、0.4~0.6mL二甲基甲酰胺以及70~80μL三正丁胺混合后冷却至0~1℃,得混合物,向混合物中加入15~25μL氯甲酸异丁酯后于9~11℃下搅拌25~35min,得到反应液A;

[0015] 2.2) 将65~75mg牛血清白蛋白BSA和65~75mg鸡卵清蛋白OVA分别加入至5~7mL二甲基甲酰胺:水的体积比为1:3~5的混合溶剂中,得到含有BSA的反应液B₁和含有OVA的反应液B₂;

[0016] 2.3) 将反应液A平均分成2份,分别加入至反应液B₁和B₂中于0~1℃搅拌混匀,得到混合后的反应液A-B₁和A-B₂,将A-B₁和A-B₂置于3~5℃下搅拌10~12h;

[0017] 3) 龙胆苦苷人工抗原GTP-BSA和GTP-OVA的纯化

[0018] 经过步骤2)后,将A-B₁和A-B₂分别装入截留分子量为8000~14000的透析袋中,以磷酸盐缓冲液为透析液,在3~5℃下透析3~4天,在透析处理期间,每间隔5~7小时换一次透析液;然后,将透析处理后的A-B₁进行冷冻干燥,得龙胆苦苷人工抗原GTP-BSA,将透析处理后的A-B₂进行冷冻干燥,得龙胆苦苷人工抗原GTP-OVA。

[0019] 一种龙胆苦苷间接竞争ELISA检测的建立方法,包括以下步骤:

[0020] 1) 利用琥珀酸酐法对龙胆苦苷进行结构修饰,得到含有羧基的龙胆苦苷半抗原(式I);

[0021] 2) 利用混合酸酐法将龙胆苦苷半抗原分别与牛血清白蛋白BSA及鸡卵清蛋白OVA偶联,制备得到相应的两种龙胆苦苷人工抗原GTP-BSA及GTP-OVA;

[0022] 3) 运用两种龙胆苦苷人工抗原分别对动物进行免疫,结合利用间接ELISA检测,并以相对应的另一种人工抗原为包被抗原测定动物抗血清的效价,从而确定可获得最优抗血清效价的动物免疫方案;

[0023] 4) 以龙胆苦苷为竞争抗原,通过测定龙胆苦苷对抗原-抗体结合反应的竞争抑制

率,从而建立针对龙胆苦苷的竞争抑制曲线以及间接竞争ELISA标准曲线。

[0024] 所述对动物进行免疫具体包括以下步骤:以GTP-BSA或GTP-OVA为免疫抗原,将免疫抗原用生理盐水稀释至2~4mg/mL,取1~5mL稀释后的免疫抗原与该免疫抗原体积10~15%的佐剂混匀,然后对以基础饲料或谷胱甘肽抗应激饲料饲喂的动物通过多次肌肉多点注射完成免疫。

[0025] 所述间接ELISA检测中,包被抗原的包被浓度为1:1000~1:8000,包被液为碳酸盐缓冲液,封闭液为山羊血清:PBS的体积比为1:8~12的混合液,酶标二抗的浓度为1:1000~1:10000。

[0026] 所述间接竞争ELISA检测中,竞争反应时间为10~60min,龙胆苦苷溶剂为体积分数为10~50%的甲醇水溶液。

[0027] 所述建立方法还包括以下步骤:

[0028] 根据龙胆苦苷浓度为横坐标的间接竞争ELISA竞争抑制曲线获得检测灵敏度;根据龙胆苦苷浓度对数为横坐标的间接竞争ELISA标准曲线,获得其线性回归方程;根据龙胆苦苷的检测灵敏度与其结构相似物的检测灵敏度比值得到交叉反应率。

[0029] 所述结构相似物选自獐牙菜苦苷、獐牙菜苷、栀子苷、马钱苷和橄榄苦苷。

[0030] 本发明的有益效果体现在:

[0031] 本发明首先利用琥珀酸酐法对秦艽中有效成分龙胆苦苷结构进行修饰,在分子结构中引入可直接与载体蛋白相结合的羧基,从而形成半抗原,然后将该半抗原与载体蛋白偶联,制备得到人工抗原。所制备的人工抗原可以用于龙胆苦苷高灵敏度和特异性ELISA检测方法的建立。本发明通过龙胆苦苷多克隆抗体的制备及龙胆苦苷ELISA检测方法的建立,为有效成分龙胆苦苷的检测开辟了一条新路径,提供了一种新思路和一项新技术。为快速寻找新药源和快速鉴别药材真伪提供了可能,有利于相关天然药物的开发利用,并可以成为仪器分析技术的补充方法,加速了中医药现代化进程。

附图说明

[0032] 图1为GTP-SA的合成路线图;

[0033] 图2为GTP标准品(a)和半抗原GTP-SA(b)的质谱图;

[0034] 图3为GTP-BSA和GTP-OVA的薄层色谱图;图中:1、GTP;2、BSA;3、OVA;4、GTP-BSA;5、GTP-OVA;

[0035] 图4为GTP-SA、BSA、OVA、GTP-BSA、GTP-OVA的紫外图谱;其中:(a)为GTP-SA、BSA和GTP-BSA的全波长扫描结果;(b)为GTP-SA、OVA和GTP-OVA的全波长扫描结果;

[0036] 图5为龙胆苦苷人工抗原和载体蛋白的IR图谱;

[0037] 图6为载体蛋白和人工抗原的SDS-PAGE图;图中:1、GTP-OVA;2、OVA;3、GTP-BSA;4、BSA;

[0038] 图7为抗体产生的动态曲线图;

[0039] 图8为冲击免疫后4组大白兔抗血清的p/N值。

具体实施方式

[0040] 下面结合附图和实施例对本发明作详细说明。

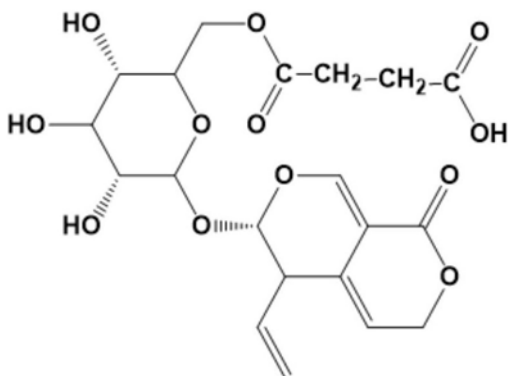
[0041] 本发明选用琥珀酸酐法对龙胆苦苷进行结构修饰,通过薄层色谱法(Thin layer

chromatography, TLC)、红外光谱法(Infrared Spectroscopy, IR)、紫外-可见分光光度计法(Ultraviolet and visible spectrophotometry, UV)、质谱法(MS)等进行鉴定分析,经过修饰获得含有羧基的半抗原分子(即龙胆苦苷半抗原, GTP-SA)。再利用混合酸酐法将GTP-SA分别与两种载体蛋白,即牛血清白蛋白(BSA)和鸡卵清蛋白(OVA)进行偶联,获得两种人工抗原(GTP-BSA和GTP-OVA),并且经过TLC、UV、三硝基苯磺酸法(TNBS)、IR和SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE)进行鉴定分析。用两种人工抗原GTP-BSA和GTP-OVA对新西兰大白兔进行免疫,并对兔子的血清效价、灵敏度和特异性等方面进行分析,确定免疫抗原和包被抗原等必要参数,从而建立基于间接竞争ELISA的龙胆苦苷检测方法。

[0042] (一) 龙胆苦苷多克隆抗体的制备

[0043] (1) 龙胆苦苷半抗原GTP-SA的合成、纯化与鉴定

[0044] 参见图1,取50mg龙胆苦苷、100mg琥珀酸酐置于反应瓶中,并加入3mL无水吡啶,混合后加热(100~115℃)回流反应10h。在反应期间,利用TLC法进行监测,待龙胆苦苷基本反应完后停止反应。将反应液移至20mL的冰蒸馏水(4℃左右)中,并加入3mL盐酸(36%~38%),用适量氯仿萃取3次,除去下层的氯仿层,将剩余的反应液通过减压蒸馏(100~120℃)制得棕色粉末,以获得龙胆苦苷半抗原(结构如式I所示),利用TLC、IR、MS、UV等进行鉴定。



[0045]

式I

[0046] 从式I可以看出, GTP-SA属于琥珀酸单酯衍生物;

[0047] TLC的具体步骤为:将龙胆苦苷标准品和GTP-SA配制成1mg/L的甲醇溶液,在同一硅胶G₂₅₄薄层板上点样,在以乙酸乙酯、甲醇与水的混合液(V_{乙酸乙酯}:V_{甲醇}:V_水=10:2:1)为展开剂的展开体系中进行展开,取出晾干,置于紫外灯(254nm)下检视。对GTP和GTP-SA的比移值(R_f值)进行测算,公式如下:

[0048]
$$R_f \text{值(比移值)} = \frac{\text{原点到溶剂前沿的距离}}{\text{原点到斑点中心的距离}}$$

[0049] 结果表明,成功合成了新物质。结合IR和MS(图2)以及UV(图4)等进一步确定合成的新物质为目标化合物(式I)。

[0050] (2) 龙胆苦苷人工抗原GTP-BSA和GTP-OVA的合成、纯化与鉴定

[0051] 取20mg GTP-SA溶于0.5mL二甲基甲酰胺(N,N-Dimethylformamide, DMF)中,加入75μL三正丁胺,冷却至0℃,再加入20μL氯甲酸异丁酯,10℃搅拌30min,得到反应液A;取70mg BSA和70mg OVA分别溶于5mL V_{DMF}:V_水=1:4的混合液中,得到反应液B₁和B₂。

[0052] 将反应液A平均分成2份,分别逐滴缓慢加入反应液B₁和B₂中,并不断搅拌(此操作在0℃进行),将混合后的反应液A-B₁和A-B₂置于4℃下搅拌过夜,初步获得龙胆苦苷人工抗原GTP-BSA和GTP-OVA。

[0053] 最后,将混合液A-B₁和A-B₂分别装入透析袋(截留分子量8000~14000)中,以PBS(pH 7.4)为透析液,在4℃下透析3d,在透析处理期间,每间隔6小时换一次透析液。然后,将透析处理后的混合液A-B₁和A-B₂进行冷冻干燥(-50℃下冷冻干燥2~4h),保存于-20℃冰箱内,备用,获得纯化后的龙胆苦苷人工抗原GTP-BSA和GTP-OVA。

[0054] 利用TLC、UV、IR、SDS-PAGE法对两种龙胆苦苷人工抗原进行分析鉴定,同时利用TNBS法计算出两种龙胆苦苷人工抗原的结合比。

[0055] 其中TLC法通过在紫外灯(254nm)下观察GTP、BSA、OVA、GTP-BSA和GTP-OVA的展开和显色(图3),表明GTP可展开并显色,BSA和OVA无法展开同时也不显色,GTP-BSA和GTP-OVA无法展开但可显色,说明龙胆苦苷半抗原与两种载体蛋白(BSA和OVA)偶联成功。

[0056] TNBS法是一种定量测定氨基酸的方法,通过测定载体蛋白和人工抗原中游离氨基酸的含量,计算出载体蛋白与GTP-SA的结合比,结合比的公式如下:

$$[0057] \quad \text{结合比} = \frac{OD_1 - OD_2}{OD_1} \times A$$

[0058] OD₁——载体蛋白单位质量浓度光密度

[0059] OD₂——人工抗原单位质量浓度光密度

[0060] A——每分子载体蛋白游离氨基酸个数

[0061] 结果显示,龙胆苦苷半抗原与两种载体蛋白偶联成功;计算得出,GTP-BSA的结合比为9:1,GTP-OVA的结合比为6:1。

[0062] 通过不同分析方法,用不同的指标,进一步验证龙胆苦苷半抗原与两种载体蛋白偶联成功(图4、图5、图6)。

[0063] (3) 实验动物免疫

[0064] 以上述GTP-BSA、GTP-OVA分别作为免疫抗原,以基础饲料、谷胱甘肽抗应激饲料(配方见表1)将12只纯种雄性新西兰大白兔预饲养3d,观察大白兔的外观状态和精神状态。待观察无异样后,将12只大白兔编号,并对每只大白兔进行耳静脉采血1~2mL,37℃静置1~2h后,于4℃静置过夜,将其于2500r/min离心5min,吸取血清,作为阴性对照血清,保存于-20℃冰箱内,备用。

[0065] 表1. 饲料配方

	基础饲料	谷胱甘肽抗应激饲料
[0066]	玉米 15%	玉米 15%
	豆饼 11%	豆饼 11%
[0067]	麦麸 20%	麦麸 20%
	草粉 50%	草粉 50%
	骨粉 2%	骨粉 2%
	食盐 1.5%	食盐 1.5%
	维生素添加剂 0.5%	维生素添加剂 0.5%
	—	谷胱甘肽 2.5g/kg

[0068] 根据饲料和免疫抗原种类的不同,将上述经预饲养后的12只大白兔分为4组(每组3只),结果如表2:

[0069] 表2.大白兔分组

	免疫抗原	包被抗原	饲料
[0070]	实验组 1	GTP-BSA	GTP-OVA
	实验组 2	GTP-OVA	GTP-BSA
	实验组 3	GTP-BSA	GTP-OVA
	实验组 4	GTP-OVA	GTP-BSA

[0071] 用生理盐水将免疫抗原稀释至2mg/mL,取2mL免疫抗原与10%的Antigenwrap佐剂混合,摇匀,其中Antigenwrap佐剂为新型水溶性佐剂,说明书要求与抗原按体积比1:10混合,震荡2~3min即可混匀。再通过腿部肌肉多点注射免疫对应组大白兔,具体免疫方案参见表3。

[0072] 表3.免疫方案

	免疫次数	时间(天)	免疫原及剂量(mL)	免疫途径
[0073]	首次免疫	0	免疫原 2+佐剂 0.2	左腿肌肉多点注射
	第 1 次加强免疫	8	免疫原 2+佐剂 0.2	右腿肌肉多点注射
	第 2 次加强免疫	16	免疫原 2+佐剂 0.2	左腿肌肉多点注射
	第 3 次加强免疫	24	免疫原 2+佐剂 0.2	右腿肌肉多点注射
	第 4 次加强免疫	32	免疫原 2+佐剂 0.2	左腿肌肉多点注射
	冲击免疫	39	免疫原 2	右腿肌肉多点注射

[0074] 首次免疫之后的每次免疫,3~4天后,通过耳静脉采血1~2mL,利用间接ELISA方法监测其血清效价。待血清效价变化进入平台期时,进行最后一次冲击免疫,4~6天后,通过心脏采血法采集血液,防止长时间后抗体效价出现回落趋势。将采集得到的血液于37℃静置1~2h,待血液凝固后,于4℃静置过夜,2500r/min离心15min,收集上层血清,再加入具有防腐作用的0.02%NaN₃。最后,用西林瓶进行分装,标记,并保存于-20℃冰箱内,备用。

[0075] 由于免疫血清中含有的杂质蛋白相对较多,所以需要进行分离纯化处理。目前,常用的蛋白分离纯化方法是盐析法,此法操作简单、技术成熟、且使用的分离试剂对抗体的影响较小。本研究采用辛酸-硫酸铵盐析法进行抗体纯化。

[0076] 经过数次免疫后,再分别以GTP-OVA、GTP-BSA作为包被抗原,建立间接ELISA检测法对抗体效价进行测定,对两种免疫抗原的免疫效果进行比较,以获得高效价的龙胆苦苷多克隆抗体。

[0077] (4)间接ELISA方法测定抗龙胆苦苷多克隆抗体的效价

[0078] 间接ELISA法的优化条件:包被抗原的包被浓度为1:2000(采用棋盘滴定法,选择OD_{450nm}值大约为1.0时所对应的抗原稀释倍数作为包被抗原的最适工作浓度),包被液为碳酸盐缓冲液(CBS,pH9.6),封闭液为山羊血清(10mL山羊血清溶于100mL的PBS中),抗血清的稀释液为PBS+0.5%BSA,酶标二抗的浓度为1:3000。

[0079] 多抗效价测定的具体步骤为:以加强免疫后采集的兔血清作为阳性血清,以未经免疫时采集的兔血清为阴性对照,以PBS为空白对照。

[0080] a. 抗原包被:用最适包被液CBS将包被抗原(当免疫抗原为GTP-BSA时,以GTP-OVA作为包被抗原;当免疫抗原为GTP-OVA时,以GTP-BSA作为包被抗原)稀释至其最适包被浓度(1:2000),以100 μ L/孔加至酶标板中,于4 $^{\circ}$ C下孵育过夜,倾去板内包被液,每孔加入200 μ L洗涤液PBST(含0.05%吐温-20的PBS缓冲液),洗板3~4次,每次轻晃2~3min,吸水纸上拍干。

[0081] b. 封闭:每孔加入150 μ L最适封闭液,于37 $^{\circ}$ C下孵育1.5h,倾去板内封闭液,每孔加入200 μ L洗涤液PBST,洗板3~4次,每次轻晃2~3min,吸水纸上拍干。

[0082] c. 加样:将收集的血清经梯度稀释成系列浓度,并以未免疫时新西兰大白兔血清作为阴性对照,以PBS作为空白对照。分别以每孔100 μ L加入酶标板中,于37 $^{\circ}$ C下孵育1h,倾去板内血清和PBS,每孔加入200 μ L洗涤液PBST,洗板3~4次,每次轻晃2~3min,吸水纸上拍干。

[0083] d. 加二抗:将羊抗兔酶标二抗稀释(稀释液为PBS)至其最适工作浓度(1:3000),以每孔100 μ L加入酶标板中,于37 $^{\circ}$ C下孵育1h,倾去板内酶标二抗,每孔加入200 μ L洗涤液PBST,洗板3~4次,每次轻晃2~3min,吸水纸上拍干。

[0084] e. 加显色液:每孔加入100 μ L的四甲基联苯胺(TMB)底物液(现配现用),避光条件下,37 $^{\circ}$ C显色20min。

[0085] f. 加终止液:每孔快速加入50 μ L的反应终止液。

[0086] g. 酶标仪测定:在450nm处读出吸光度。

[0087] 通过观察谷胱甘肽对实验动物的外观指标及精神状态的变化,测定实验动物的进食量和体重的变化,结果表明,谷胱甘肽对新西兰大白兔的免疫应激反应具有明显的缓解作用。通过对龙胆苦苷免疫血清效价的动态监测,以免疫次数为横坐标,OD_{450nm}值为纵坐标,得到了抗体产生的动态曲线(图7)。

[0088] 结果显示,4个实验组的新西兰大白兔均能产生免疫应答,且应答趋势基本一致。这表明已成功合成了龙胆苦苷人工抗原(指GTP-BSA和GTP-OVA),且能有效刺激机体产生针对龙胆苦苷人工抗原的抗体。

[0089] 依据抗血清效价的判断标准(当阳性血清OD_{450nm}值与阴性血清OD_{450nm}值之比大于2.1,即P/N>2.1时,将此时最大稀释倍数定义为血清效价),本研究中4个实验组抗血清的效价判定结果(图8)显示,4个实验组的效价均达到1:12800以上,且免疫抗原GTP-BSA所产生的抗血清效价明显高于免疫抗原GTP-OVA所产生的抗血清效价,这表明GTP-BSA为理想的免疫抗原;在基础饲料中添加谷胱甘肽的实验组所产生的抗血清效价高于基础饲料组所产生的抗血清效价,这表明在基础饲料中添加谷胱甘肽,不仅可作为抗应激反应因子对大白兔产生的应激反应有所缓解,而且对提升免疫效果也有所帮助。综上可知,实验组3的免疫效果最佳。

[0090] (二)间接竞争龙胆苦苷-ELISA方法的建立及优化

[0091] 针对龙胆苦苷多克隆抗体的灵敏度和特异性,建立的龙胆苦苷检测方法为间接竞争ELISA法,并对其工作条件(竞争反应时间、有机溶剂及其浓度、洗涤液pH值)进行优化,以期获得最适的间接竞争ELISA检测体系。通过在加样过程中混入不同浓度的龙胆苦苷标准品,以期检测出4个实验组的灵敏度(IC₅₀)、竞争抑制曲线、竞争抑制标准曲线及其回归方程。选择獐牙菜苦苷、獐牙菜苷、栀子苷、马钱苷和橄榄苦苷作为龙胆苦苷的结构相似物,测

定龙胆苦苷多克隆抗体与其结构相似物的交叉反应率,以检验间接竞争ELISA反应体系的特异性是否良好。

[0092] (1) 间接竞争龙胆苦苷-ELISA方法的建立

[0093] 由于间接竞争ELISA方法与间接ELISA方法的操作过程相似,本实验以间接ELISA方法中优化后的工作条件为基础,在包被抗原、抗体的最适工作浓度下,在加样步骤中,将系列浓度的龙胆苦苷标准溶液加入抗血清中。

[0094] 具体操作步骤:

[0095] a. 包被:分别将包被抗原用CBS稀释至最适包被浓度(1:2000),以100 μ L/孔加至酶标板中,4 $^{\circ}$ C下孵育过夜,倾去板内包被液,以200 μ L/孔的洗涤液PBST洗板3~4次,每次轻晃2~3min,吸水纸上拍干。

[0096] b. 封闭:用山羊血清作为封闭液,以150 μ L/孔加至酶标板中,37 $^{\circ}$ C下孵育1.5h后,倾去板内封闭液,以200 μ L/孔的洗涤液PBST洗板3~4次,每次轻晃2~3min,吸水纸拍干。

[0097] c. 加样:每孔加入抗血清和系列浓度的龙胆苦苷甲醇溶液各50 μ L,37 $^{\circ}$ C下孵育1h后(竞争反应),倾去板内血清和龙胆苦苷甲醇溶液的混合液,以200 μ L/孔的洗涤液PBST洗板3~4次,每次轻晃2~3min,吸水纸上拍干。

[0098] d. 加二抗:将羊抗兔酶标二抗稀释至其最适工作浓度(1:3000),以100 μ L/孔加入酶标板中,37 $^{\circ}$ C下孵育1h后,以200 μ L/孔的洗涤液PBST洗板3~4次,每次轻晃2~3min,吸水纸上拍干。

[0099] e. 加显色液:100 μ L/孔(现配现用),37 $^{\circ}$ C避光条件下,显色20min。

[0100] f. 加终止液:快速加入反应终止液,50 μ L/孔。

[0101] g. 用酶标仪于450nm处读出吸光度。

[0102] (2) 间接竞争ELISA方法的条件优化

[0103] 利用前期制备且纯化的龙胆苦苷多克隆抗体,初步建立间接竞争ELISA分析方法,并对主要影响条件(竞争反应时间、有机溶剂及其浓度、洗涤液的pH值)进行优化,以期建立出更加适合的龙胆苦苷间接竞争ELISA方法。

[0104] 间接竞争ELISA方法的优化条件为:最佳竞争反应时间为40min,最佳的有机溶剂为10%的甲醇溶液,洗涤液PBST的最佳pH值为7.5。

[0105] (3) 间接竞争ELISA的灵敏度和交叉反应性

[0106] a. 灵敏度

[0107] 基于间接竞争ELISA法优化的条件,检测龙胆苦苷对抗体和包被抗原结合反应的竞争抑制作用。在加样过程中,选用最佳有机溶剂配制浓度为0、0.1、1、10、100、1000、10000ng/mL的龙胆苦苷标准溶液,通过间接竞争ELISA法,测定其抗体-包被抗原的结合率和龙胆苦苷对抗体-包被抗原结合反应的竞争抑制率,公式如下:

[0108] 竞争抑制率 (I) = $\left(1 - \frac{B}{B_0}\right) \times 100\%$

[0109] B: 加样孔的OD_{450nm}值,即含竞争抗原(即龙胆苦苷)孔的OD_{450nm}值。

[0110] B₀: 阳性对照孔的OD_{450nm}值,即龙胆苦苷标准品浓度为0时的OD_{450nm}值。

[0111] 当竞争抑制率为50%时所对应的竞争抗原龙胆苦苷的浓度为其灵敏度(即IC₅₀)。

[0112] 以龙胆苦苷浓度为横坐标,以竞争抑制率为纵坐标,绘制间接竞争ELISA的竞争抑

制曲线,分别获得4个实验组的灵敏度(IC_{50});以龙胆苦苷浓度的对数为横坐标,以竞争抑制率为纵坐标,得到间接竞争ELISA标准曲线,并分别得到4个实验组的线性回归方程(表4)。

[0113] 表4.间接竞争ELISA抑制曲线的相关参数

	实验组别	灵敏度 (ng/mL)	线性方程
[0114]	实验组 1	95.2	$y=18.666x-22.452$, $R_2=0.9722$
	实验组 2	38.9	$y=19.07x-18.335$, $R_2=0.9658$
	实验组 3	41.5	$y=16.872x-12.188$, $R_2=0.9714$
	实验组 4	10.9	$y=15.523-1.4934$, $R_2=0.9688$

[0115] b.交叉反应性

[0116] 本研究分别选用龙胆苦苷的5种结构相似物(獐牙菜苦苷、獐牙菜苷、栀子苷、马钱苷和橄榄苦苷)作为竞争物,进行间接竞争ELISA检测。利用间接竞争ELISA检测方法分别对龙胆苦苷及其5种结构相似物的灵敏度(即 IC_{50})进行检测,计算测出其交叉反应率,并判定间接竞争ELISA特异性是否良好。

[0117] 交叉反应率是指龙胆苦苷标准品的灵敏度与其结构相似物灵敏度的比值,公式如下:

$$[0118] \quad \text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{GTP灵敏度}}{\text{相似物灵敏度}} \times 100\%$$

[0119] 结果显示(表5),4个实验组与龙胆苦苷的交叉反应率均为100%,与獐牙菜苷和獐牙菜苦苷的交叉反应率均 $<0.5\%$,与栀子苷、马钱苷及橄榄苦苷的交叉反应率均 $<0.1\%$,这表明4个实验组的特异性均良好,尤其是对栀子苷、马钱苷和橄榄苦苷基本没有交叉反应。

[0120] 表5.龙胆苦苷抗血清与其结构相似物的交叉反应率

	相似物	实验组 1 交叉反应率 (%)	实验组 2 交叉反应率 (%)	实验组 3 交叉反应率 (%)	实验组 4 交叉反应率 (%)
[0121]	龙胆苦苷	100	100	100	100
	獐牙菜苦苷	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
	獐牙菜苷	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
	栀子苷	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
	马钱苷	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
	橄榄苦苷	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1

[0122] 本发明首次成功制备出龙胆苦苷半抗原、人工抗原以及多克隆抗体,并建立了具有良好的灵敏度和特异性的间接竞争ELISA检测方法,为中药秦艽有效成分龙胆苦苷的检测开辟了一条新路径,提供了一种新思路和一项新技术。为快速寻找新药源和快速鉴别药材真伪提供了可能,为中药有效成分的检测分析和质量控制评估打下基础,有利于天然药物的开发利用,甚至可以成为仪器分析技术的补充方法,加速了中医药现代化进程。

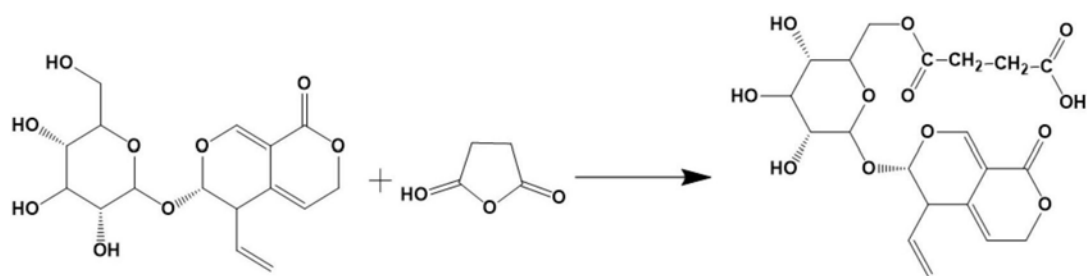
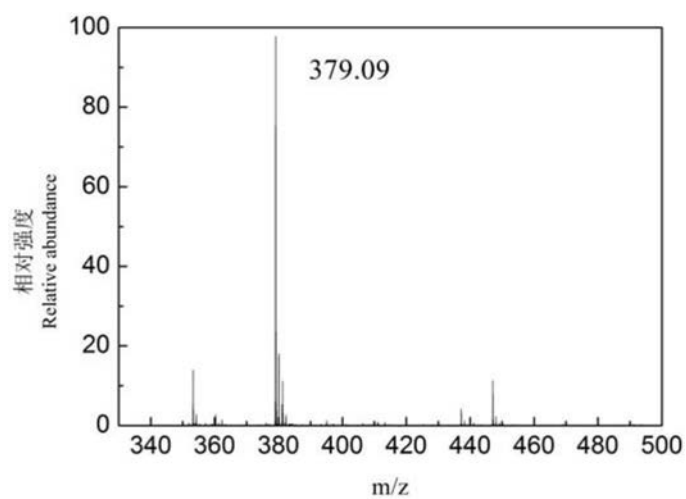
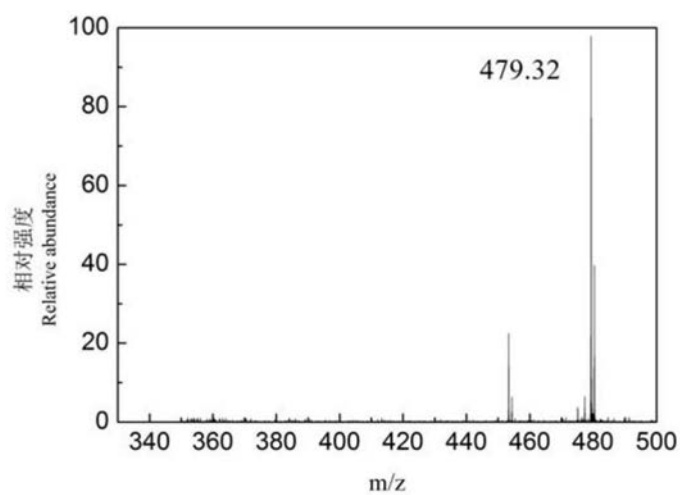


图1



(a)



(b)

图2

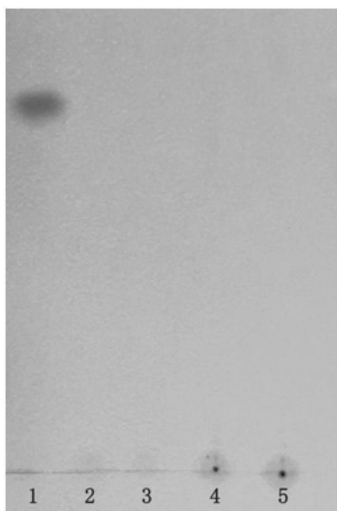
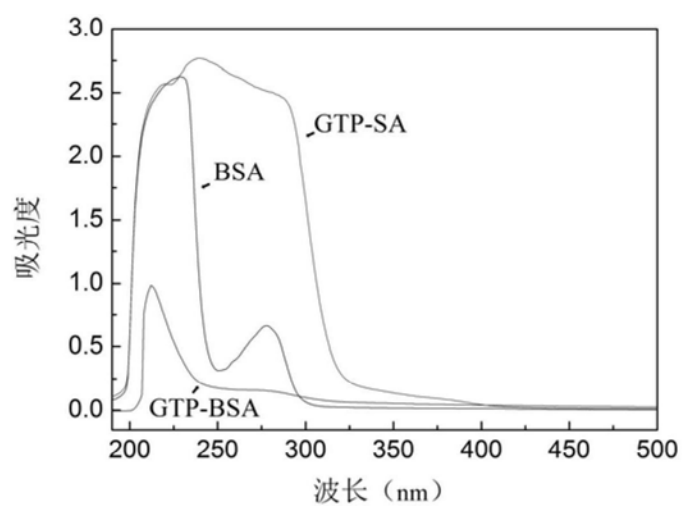
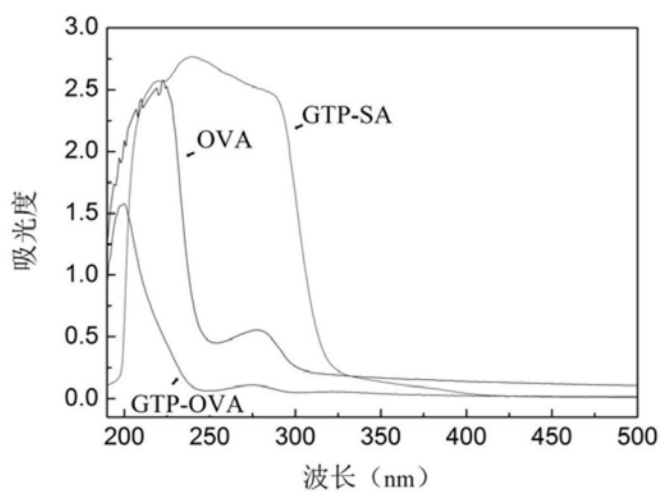


图3



(a)



(b)

图4

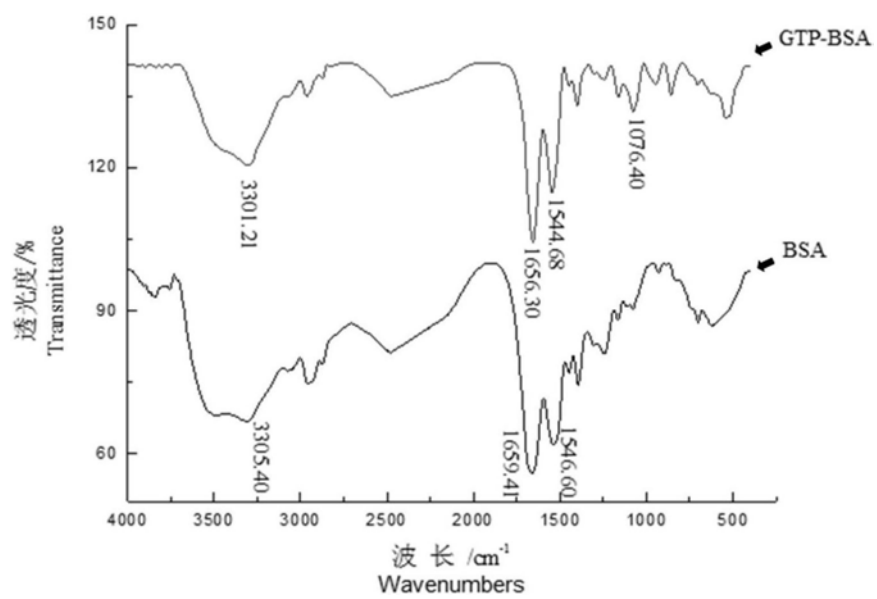


图5

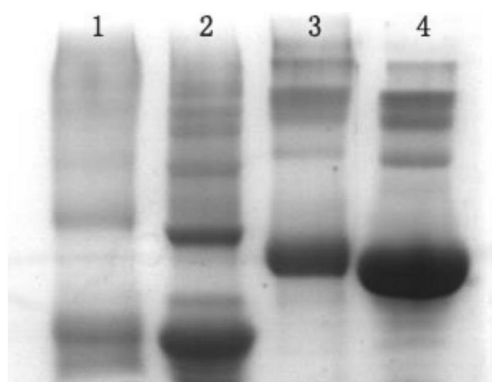


图6

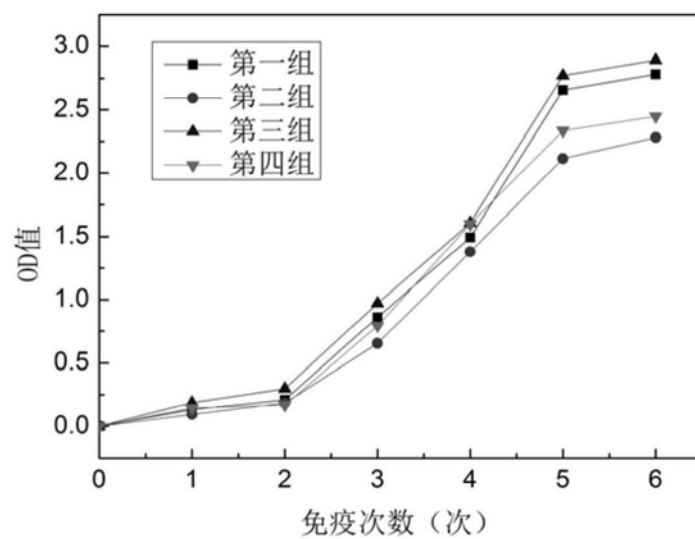


图7

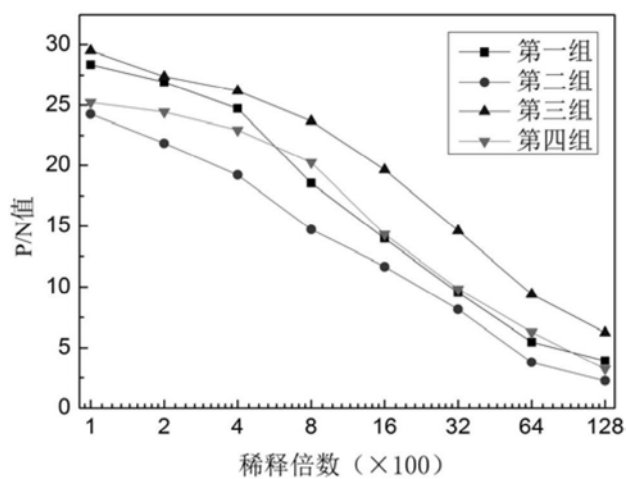
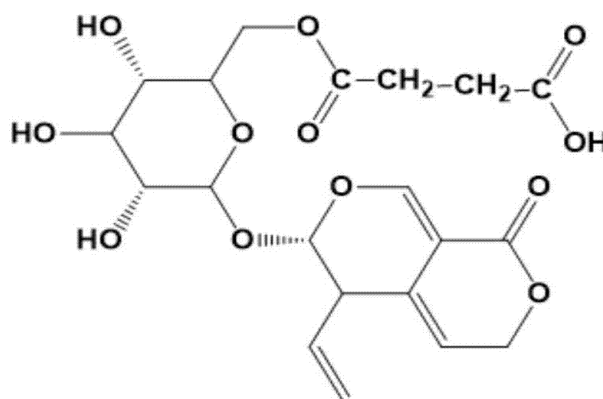


图8

专利名称(译)	龙胆苦苷的人工抗原制备及间接竞争ELISA检测的建立方法		
公开(公告)号	CN107253989A	公开(公告)日	2017-10-17
申请号	CN2017110386414.6	申请日	2017-05-26
[标]申请(专利权)人(译)	陕西科技大学		
申请(专利权)人(译)	陕西科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	陕西科技大学		
[标]发明人	钱卫东 刘婵婵 王婷 吴启航 曾桥		
发明人	钱卫东 刘婵婵 王婷 吴启航 曾桥		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K1/107 C07K16/44 C07K16/06 G01N33/53		
代理人(译)	范巍		
其他公开文献	CN107253989B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种龙胆苦苷的人工抗原制备及间接竞争ELISA检测的建立方法，采用琥珀酸酐法对药用有效成分龙胆苦苷进行结构修饰，获得半抗原羧基化龙胆苦苷；分别利用混合酸酐法，将羧基化的龙胆苦苷与两种载体蛋白BSA和OVA偶联制备得到相应的两种人工抗原；并通过动物免疫制备抗龙胆苦苷抗体，基于此抗体建立了灵敏度较好、特异性较强的龙胆苦苷-ELISA检测方法。为龙胆苦苷的检测开辟了新路径，提供了新思路和新技术，为快速寻找新药源和快速鉴别药材真伪提供了平台。



式I。