



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103159778 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 22

(21) 申请号 201310102015. 4

(22) 申请日 2013. 03. 27

(73) 专利权人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路 2 号

(72) 发明人 王保民 郭素琴 崔永亮 王敏

谭桂玉 曹振 何丽珊 张亮

张瑞 张威

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

C07D 493/20(2006. 01)

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/77(2006. 01)

C07K 16/44(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 30/60(2006. 01)

(56) 对比文件

BR PI0900203-0 A2, 2011. 08. 16, 全文.

CN 102827222 A, 2012. 12. 19, 全文.

CN 102053121 A, 2011. 05. 11, 全文.

Hiroyuki Tanaka, 等. Immunochemical

Analysis of the Antimalarial

Drugs Artemisinin and Artesunate.

《Antibodies》. 2012, 第 1 卷 (第 3 期), 第 273-283 页.

Hiroyuki Tanaka, 等. Preparation of a Novel Monoclonal Antibody against the Antimalarial Drugs, Artemisinin and Artesunate. 《Planta Med》. 2007, 第 73 卷 (第 10 期), 第 1127-1132 页.

Mondher Jaziri, 等. Immunodetection of Artemisinin in Artemisia Annua Cultivated in Hydroponic Conditions. 《Phytochemistry》. 1993, 第 33 卷 (第 4 期), 第 821-826 页.

审查员 吕世华

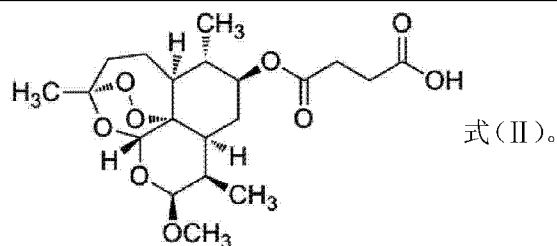
权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 2 页

(54) 发明名称

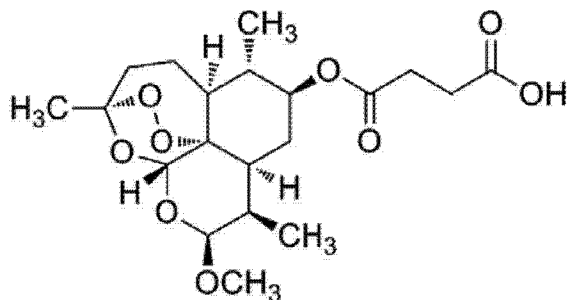
一种半抗原、其抗原、其相应的抗体及其在检测蒿甲醚中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种半抗原、其抗原、其相应的抗体及其在检测蒿甲醚中的应用。本发明提供的半抗原为式(II)所示的化合物。本发明提供的化合物, 可以作为半抗原, 该半抗原与载体蛋白偶联后可以得到抗原, 用抗原免疫动物, 可以得到特异性针对蒿甲醚抗原的抗体。本发明还提供了所述化合物的制备方法, 步骤简洁、成本低廉。用本发明方法制备的抗体的特异性好(与蒿甲醚结构类似物的交叉反应率低)、灵敏度高。本发明可用于蒿甲醚药物的大规模检测与质量控制, 在蒿甲醚的快速免疫检测应用中将有广阔的前景。

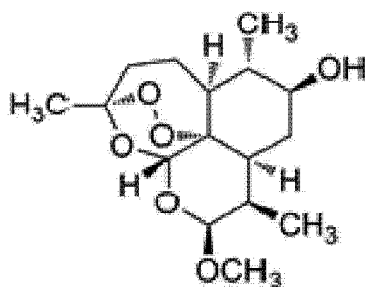


1. 式 (II) 所示的化合物；



式 (II)。

2. 权利要求 1 中式 (II) 所示化合物的制备方法, 包括如下步骤: 将式 (VII) 所示化合物和丁二酸酐反应, 获得所述化合物；



式 (VII)。

3. 权利要求 1 中式 (II) 所示化合物与载体蛋白的偶联物, 所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清白蛋白。

4. 权利要求 3 所述偶联物在制备抗体中的应用。

5. 以权利要求 3 所述偶联物为免疫原制备得到的抗体。

6. 权利要求 3 所述偶联物或权利要求 5 所述抗体在检测蒿甲醚中的应用。

7. 权利要求 3 所述偶联物或权利要求 5 所述抗体在制备用于检测蒿甲醚的试剂盒中的应用。

8. 权利要求 3 所述偶联物或权利要求 5 所述抗体在制备用于检测蒿甲醚的免疫亲和色谱柱中的应用。

一种半抗原、其抗原、其相应的抗体及其在检测蒿甲醚中的应用

技术领域

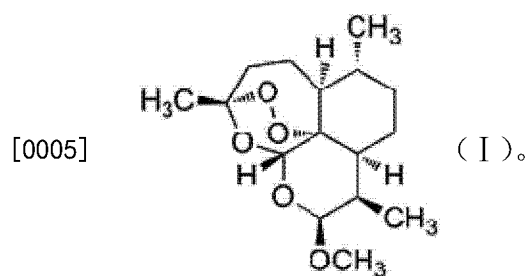
[0001] 本发明涉及一种半抗原、其抗原、其相应的抗体及其在检测蒿甲醚中的应用。

背景技术

[0002] 青蒿素衍生物如青蒿琥酯、双氢青蒿素、蒿甲醚等对治疗脑型疟疾和抗氯喹恶性疟疾具有高效、低毒、速效、复燃率低等显著疗效。蒿甲醚(Artemether)是非洲应用最广的抗疟疾药物。

[0003] 假冒、劣质以及不符合标准的青蒿素药物对疟疾病情的防控造成了重大威胁,而这种伪劣假冒现象在东南亚、非洲等落后地区尤为突出。因此急需建立一种快捷、可靠的针对青蒿素及其衍生物的定性定量分析方法。

[0004] 蒿甲醚的化学名为(3R, 5 α S, 6R, 8 α S, 9R, 10S, 12R, 12 α R)-十氢-10-甲氧基-3, 6, 9-三甲基-3, 12-桥氧-12H-吡喃并[4, 3-j]-1, 2-苯并二塞平, CAS登记号为71963-77-4, 分子式为C₁₆H₂₆O₅, 相对分子量为298.37, 化学结构式见式(I)。

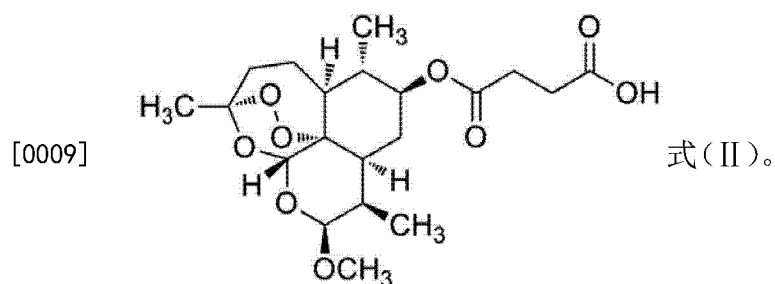


[0006] 目前国内外已发表的文献中,蒿甲醚检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱法(LC-MS)、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)。这些方法都需要昂贵的仪器设备,检测费用高,操作时间长,操作技术要求高且不能用于现场检测。

发明内容

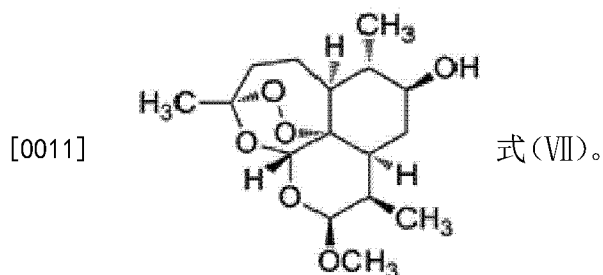
[0007] 本发明的目的是提供一种半抗原、其抗原、其相应的抗体及其在检测蒿甲醚中的应用。

[0008] 本发明提供的半抗原为式(II)所示的化合物：



[0010] 本发明还保护式(II)所示化合物的制备方法,包括如下步骤:将式(VII)所示化合

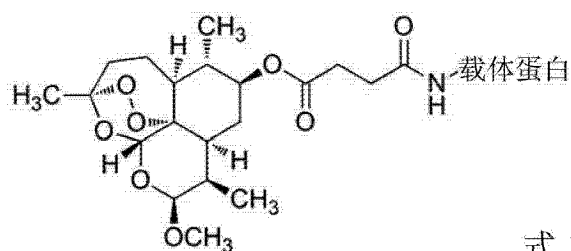
物和丁二酸酐反应,获得式(II)所示化合物。



[0012] 制备式(II)所示化合物时,式(VII)所示化合物与丁二酸酐的摩尔比具体可为 0.9 : 2。制备式(II)所示化合物时,所述反应的条件可为:0-50℃反应 1-48 小时。式(II)所示化合物的制备方法具体如下:将 0.9mmol 式(VII)所示化合物和 25mL 有机溶剂(如二氯甲烷)室温混合后边搅拌边加入 2mmol 丁二酸酐,冰浴冷却后于 0℃-5℃温度条件下加入 0.9mmol 4-二甲氨基吡啶并冰浴反应 30min,然后自然升至室温并反应 1h,加入等体积的水,用盐酸调 pH 至 3,分液后取有机相,用水洗涤后用无水 MgSO₄ 干燥,减压脱溶后得白色粉末,即为式(II)所示化合物。

[0013] 本发明还保护式(II)所示化合物与载体蛋白的偶联物。所述载体蛋白可为牛血清白蛋白或卵清白蛋白。式(II)所示化合物与载体蛋白通过酰胺键连接。所述酰胺键是式(II)所示化合物的羧基通过活泼酯与载体蛋白上的氨基形成的。所述偶联物的结构式见式(III)。

[0014]



[0015] 所述偶联物的制备方法包括如下步骤:在 NHS 和 EDC 的作用下促使式(II)所示化合物与载体蛋白偶联。制备所述偶联物时,式(II)所示化合物、NHS 和 EDC 的摩尔比可为 1 : (1-5):(1-5)。制备所述偶联物时,所述反应的条件可为:0-50℃反应 4-36 小时。制备所述偶联物时,式(II)所示化合物与所述载体蛋白的摩尔比可为(5-30):1;具体可为(15-17):1,更具体可为 15:1。所述偶联物的制备方法具体如下:将 0.036mmol 式(II)所示化合物、0.047mmol NHS 和 0.040mmol EDC,用有机溶剂(如 DMSO)溶解,25℃搅拌反应 6 小时,然后滴加入含 0.0024mmol 载体蛋白的载体蛋白溶液(载体蛋白溶液具体是将 0.0024mmol OVA 溶于 5mL pH7.5、0.1M 的 PBS 缓冲液得到的),4℃搅拌 12 小时。

[0016] 所述偶联物的制备方法包括如下步骤:在 NHS 和 DCC 的作用下促使式(II)所示化合物与载体蛋白偶联。制备所述偶联物时,式(II)所示化合物、NHS 和 DCC 的摩尔比可为 1 : (1-5):(1-5)。制备所述偶联物时,所述反应的条件可为:0-50℃反应 4-36 小时。制备所述偶联物时,式(II)所示化合物与所述载体蛋白的摩尔比可为(5-30):1;具体可为(15-17):1,更具体可为 15:1。所述偶联物的制备方法具体如下:将 0.04mmol 式(II)所示化合物、0.052mmol NHS 和 0.044mmol DCC,用有机溶剂(如 DMF)溶解,25℃搅拌反应 6 小时,离心(离

心参数具体可为:8000rpm 离心 5 分钟)收集上清液,然后滴加入含 0.0024mmol 载体蛋白的载体蛋白溶液(载体蛋白溶液具体是将 0.0024mmol OVA 溶于 5mL pH7.5、0.1M 的 PBS 缓冲液得到的),4℃搅拌 12 小时。

[0017] 本发明还保护所述偶联物在制备抗体中的应用。

[0018] 本发明还保护以所述偶联物为免疫原制备得到的抗体。

[0019] 本发明还保护所述偶联物和 / 或所述抗体在检测蒿甲醚中的应用。

[0020] 本发明还保护所述偶联物和 / 或所述抗体在制备用于检测蒿甲醚的试剂盒中的应用。所述试剂盒具体可为酶联免疫试剂盒。待检样本可为水体、药品、食品或土壤。

[0021] 本发明还保护所述偶联物和 / 或所述抗体在制备用于检测蒿甲醚的免疫亲和色谱柱中的应用。待检样本可为水体、药品、食品或土壤。

[0022] 本发明提供了一种化合物,可以作为半抗原,该半抗原与载体蛋白偶联后可以得到抗原,用抗原免疫动物,可以得到特异性针对蒿甲醚抗原的抗体。本发明还提供了所述化合物的制备方法,步骤简洁、成本低廉。用本发明方法制备的抗体的特异性好(与蒿甲醚结构类似物的交叉反应率低)、灵敏度高。本发明可用于蒿甲醚药物的大规模检测与质量控制,在蒿甲醚的快速免疫检测应用中将有广阔的前景。

附图说明

[0023] 图 1 为制备式(II)所示化合物的流程示意图。

[0024] 图 2 为制备偶联物的流程示意图。

[0025] 图 3 为蒿甲醚间接 ELISA 法标准曲线。

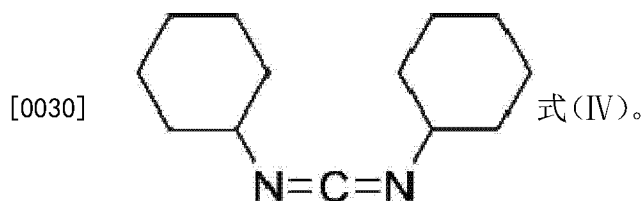
具体实施方式

[0026] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

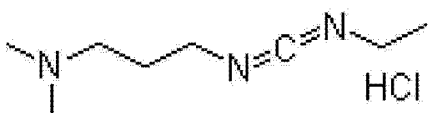
[0027] 丁二酸酐、N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、牛血清白蛋白(BSA,分子量 68kDa)和卵清白蛋白(OVA,分子量为 44kDa)均购自 Sigma 公司。羊抗小鼠 IgG-HRP 购自 Jackson 公司。邻苯二胺(OPD)、氨基乙酸、氨基丙酸等其余常规试剂均购自北京化学试剂公司。

[0028] 蒿甲醚:购自阿拉丁试剂(上海)有限公司,货号为 71963-77-4。

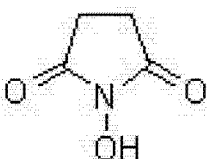
[0029] N,N'-二环己基碳二亚胺的化学结构式见式(IV)。



[0031] 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐的化学结构式见式(V)。

[0032]  式(V)。

[0033] N-羟基琥珀酰亚胺的化学结构式见式(VI)。

[0034]  (VI)。

[0035] pH7.5、0.1M 的 PBS 缓冲液的制备方法：称量 4.0g NaCl、0.1g KH_2PO_4 、1.48g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，用蒸馏水定容至 500mL。

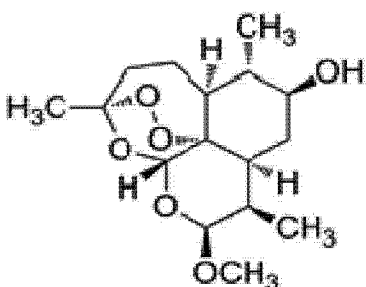
[0036] 实施例 1、半抗原的制备

[0037] 一、化合物的制备

[0038] 1、式(VII)所示化合物的制备

[0039] 式(VII)所示化合物的制备见文献：Ehab A. Abourashed and Charles D. Hufford, Microbial Transformation of Artemether, J. Nat. Prod. 1996, 59, 251-253.。

[0040] 产物的表征数据如下：白色针晶，MS m/z 336.83 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ； $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz)： δ 5.42 (1H, s), 4.68 (1H, d), 3.41 (3H, s), 3.10 (1H, m), 2.60 (1H, m), 2.36 (1H, m), 1.9-2.1 (1H, m), 1.59 (1H, m), 1.5-1.9 (2H, m), 1.44 (3H, s), 1.2-1.4 (1H, m), 1.05 (3H, d), 0.90 (3H, d)。

[0041]  式(VII)。

[0042] 2、式(II)所示化合物的制备

[0043] 合成路线图如图 1 所示。

[0044] 在三口烧瓶中加入 0.9mmol 式(VII)所示化合物和 25mL 干燥的二氯甲烷，于室温下边搅拌边加入 2mmol 丁二酸酐，冰浴冷却后于 0°C - 5°C 温度条件下加入 0.9mmol 4-二甲氨基吡啶 (DMAP)，冰浴反应 30min；自然升至室温后反应 1h，取样进行 TLC 薄层层析(展开剂为乙酸乙酯和石油醚的等体积混合物；式(VII)所示化合物的 R_f 值为 0.57，目标产物的 R_f 值为 0.78；结果表明，式(VII)所示化合物都生成了目标产物)；加入等体积的水，用 10% 盐酸调 pH 至 3，分液后取有机相，用水洗涤(每次加入 25mL 水，洗涤三次)后用无水 MgSO_4 干燥，减压脱溶后得白色粉末，即为产物。

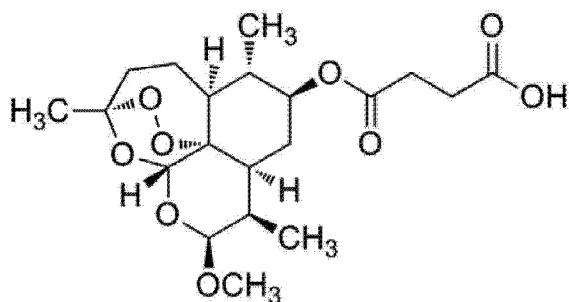
[0045] 二、化合物的表征

[0046] 步骤一得到的产物的 $^1\text{H-NMR}$ 数据如下：

[0047] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO , 300MHz)： δ 12.11 (1H, s), 5.42 (1H, s), 4.60 (1H, d), 4.34 (1H, m), 3.27 (3H, s), 2.38-2.40 (5H, m), 2.18 (1H, m), 2.05 (1H, m), 1.77-1.84 (2H, m), 1.57-1.63 (2H, m), 1.37-1.42 (2H, m), 1.30 (3H, s), 0.80-0.85 (6H, m)。

[0048] 结果表明，步骤一得到的产物的化学结构式如式(II)所示。

[0049]



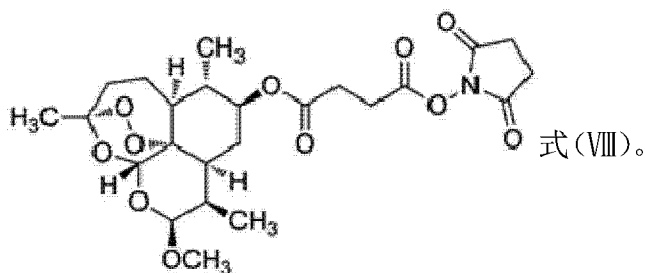
式(II)。

[0050] 实施例 2、抗原的制备

[0051] 一、蒿甲醚-卵清白蛋白的偶联物的制备

[0052] 1、取 0.036mmol 式(II)所示化合物、0.047mmol NHS 和 0.040mmol EDC, 用 1mL DMSO 溶解, 25℃ 搅拌反应 6 小时, 得到式(VIII)所示化合物。

[0053]



式(VIII)。

[0054] 2、取完成步骤 1 的整个反应液(按照所有式(II)所示化合物都生成了式(VIII)所示化合物计, 反应液中含有 0.036mmol 式(VIII)所示化合物), 缓慢滴加入载体蛋白溶液中(载体蛋白溶液是将 0.0024mmol OVA 溶于 5mL pH7.5、0.1M 的 PBS 缓冲液得到的), 4℃ 搅拌 12 小时。

[0055] 3、取完成步骤 2 的整个反应液(按照所有载体蛋白均与式(VIII)所示化合物偶联计), 用 pH7.5、0.1M 的 PBS 缓冲液透析三天(透析的作用在于去除未反应的蒿甲醚半抗原或其它小分子), 然后用 pH7.5、0.1M 的 PBS 缓冲液稀释得到蒿甲醚-卵清白蛋白溶液(以 OVA 计, 浓度为 1mg/mL), -40℃ 冻存待用。蒿甲醚-卵清白蛋白又称蒿甲醚-OVA。

[0056] 二、蒿甲醚-牛血清白蛋白的偶联物的制备

[0057] 1、取 0.04mmol 式(II)所示化合物、0.052mmol NHS 和 0.044mmol DCC, 用 1mL 无水 DMF 溶解, 25℃ 搅拌反应 6 小时, 然后 8000rpm 离心 5 分钟, 取上清液。上清液中含有式(VIII)所示化合物。

[0058] 2、将步骤 1 得到的上清液代替步骤一的 2 中的反应液, 其它同步骤一的 2。

[0059] 3、同步骤一的 3。

[0060] 三、蒿甲醚-牛血清白蛋白的偶联物的制备

[0061] 1、同步骤一的 1。

[0062] 2、取完成步骤 1 的整个反应液(按照所有式(II)所示化合物都生成了式(VIII)所示化合物计, 反应液中含有 0.036mmol 式(VIII)所示化合物), 缓慢滴加入载体蛋白溶液中(载体蛋白溶液是将 0.0024mmol BSA 溶于 10mL pH7.5、0.1M 的 PBS 缓冲液得到的), 4℃ 搅拌 12 小时。

[0063] 3、取完成步骤 2 的整个反应液(按照所有载体蛋白均与式(VIII)所示化合物偶联计), 用 pH7.5、0.1M 的 PBS 缓冲液透析三天(透析的作用在于去除未反应的蒿甲醚半抗原或

其它小分子),然后用 pH7.5、0.1M 的 PBS 缓冲液稀释得到蒿甲醚-牛血清白蛋白溶液(以 BSA 计,浓度为 1mg/mL), -40°C 冻存待用。蒿甲醚-牛血清白蛋白又称蒿甲醚-BSA。

[0064] 四、蒿甲醚-牛血清白蛋白的偶联物的制备

[0065] 1、同步骤二的 1。

[0066] 2、将步骤 1 得到的上清液代替步骤三的 2 中的反应液,其它同步骤三的 2。

[0067] 3、同步骤三的 3。

[0068] 实施例 3、抗体的制备及其在检测蒿甲醚中的应用

[0069] 一、利用蒿甲醚-BSA 作为抗原制备抗体

[0070] 实验动物为 8-10 周龄的 Balb/c 小鼠(军事医学科学院实验动物中心),体重 23-25g。

[0071] 1、基础免疫

[0072] 将实施例 2 的步骤三制备的蒿甲醚-BSA 溶液(以 BSA 计,浓度为 1mg/mL)用无菌过滤器过滤后与等体积弗氏完全佐剂混合,用磁力搅拌器充分搅拌乳化,直到滴入水中不扩散,得到乳化好的完全抗原。

[0073] 取乳化好的完全抗原,腹腔及背部皮下多点注射 Balb/c 小鼠,每只小鼠的注射剂量为 0.1mg (以 BSA 计)。

[0074] 2、加强免疫

[0075] 将实施例 2 的步骤三制备的蒿甲醚-BSA 溶液(以 BSA 计,浓度为 1mg/mL)用无菌过滤器过滤后与等体积弗氏不完全佐剂混合,用磁力搅拌器充分搅拌乳化,直到滴入水中不扩散,得到乳化好的不完全抗原。

[0076] 基础免疫 2 周后,取乳化好的不完全抗原,腹腔及背部皮下多点注射 Balb/c 小鼠,每只小鼠的注射剂量为 0.1mg (以 BSA 计),之后每隔 15 天按相同的方法加强免疫一次。从第三次加强免疫开始,每次免疫后第 3-5 天,从小鼠眼眶采血,测定抗体效价。

[0077] 测定抗体效价时,采用实施例 2 中制备的 1mg/mL 蒿甲醚-OVA 溶液(以 OVA 计,浓度为 1mg/mL)的 500 倍稀释液(用 pH7.5、0.1M 的 PBS 缓冲液进行稀释)作为包被原。

[0078] 待效价大于 1:8000 后(效价定义为零孔显色值为 1 时,血清的稀释倍数;第三次加强免疫后已经达到了该效价),眼球摘除采血,血液室温静置 1 小时,再 4°C 静置 2 小时,然后于离心机中 8000r/min 离心 5 分钟,分离血清,即为蒿甲醚-BSA 抗体。

[0079] 二、制备抗体效果检测时所用的各种缓冲液

[0080] 包被缓冲液:pH9.6、0.05M 的碳酸盐缓冲液。

[0081] 样品稀释液:由 0.5mL 吐温 20、0.5g 明胶和 500mL pH9.6、0.1M 的 PBS 缓冲液混合得到。

[0082] 柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液(pH5.5):由柠檬酸三钠、 Na_2HPO_4 和水组成,柠檬酸三钠的浓度为 0.01M, Na_2HPO_4 的浓度为 0.03M。

[0083] 底物缓冲液:将 20.0mg 邻苯二胺(OPD)溶解于 10.0mL 柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液中,然后加入 4 μL 体积百分含量为 30% 的 H_2O_2 水溶液。

[0084] 终止液:2.0M 硫酸水溶液。

[0085] 洗涤液:由 NaCl、 KH_2PO_4 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、Tween-20 和水组成,NaCl 的浓度为 8.0g/L, KH_2PO_4 的浓度为 0.2g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 的浓度为 2.96g/L, Tween-20 的体积百分含量为

1:1000。

[0086] 三、蒿甲醚-BSA 抗体对蒿甲醚的检测效果

[0087] 1、蒿甲醚-OVA 稀释液的配制

[0088] 将实施例 2 的步骤一制备蒿甲醚-OVA 溶液(以 OVA 计,浓度为 1mg/mL)完全解冻后,用包被缓冲液分别按 1:500、1:1000、1:2000 和 1:4000 进行梯度稀释,得到不同浓度的蒿甲醚-OVA 稀释液。

[0089] 2、蒿甲醚标准品溶液的配制

[0090] (1)称取 5mg 蒿甲醚标准品,充分溶解于 5mL 乙腈中,得到 1mg/mL 蒿甲醚标准品溶液。

[0091] (2)用样品稀释液将 1mg/mL 蒿甲醚标准品溶液配成 1000ng/mL 的蒿甲醚标准品溶液。

[0092] 3、蒿甲醚-BSA 抗血清稀释液的配制

[0093] 将步骤一制备的蒿甲醚-BSA 抗体用样品稀释液分别按 1:500、1:1000、1:2000 和 1:4000 进行梯度稀释,得到不同浓度的蒿甲醚-BSA 抗体稀释液。

[0094] 4、抗原、抗体的棋盘格实验

[0095] 包被:在 96 孔酶标板中每孔加入 100 μ L 蒿甲醚-OVA 稀释液,37℃包被 3 小时,用洗涤液洗涤 4 次,甩干。

[0096] 竞争:零孔每孔加 50 μ L 样品稀释液,抑制孔每孔加 50 μ L 步骤 2 的(2)制备的蒿甲醚标准品溶液;加入蒿甲醚-BSA 抗体稀释液(50 μ L/孔);置湿盒中 37℃放置 30min,用洗涤液洗涤 4 次,甩干。

[0097] 加酶标二抗:将羊抗鼠酶标二抗(IgG-HRP, Jackson 公司,产品目录号为 79556)(0.1mg/mL)用样品稀释液稀释 1000 倍,每孔加 100 μ L,置湿盒中 37℃条件下 30min,用洗涤液洗涤 4 次,甩干。

[0098] 显色:将底物缓冲液加入酶标板中,每孔 100 μ L,避光显色 10min。

[0099] 终止:每孔加入 50 μ L 终止液,用酶标仪 492nm 处测定各孔的 OD 值。

[0100] 结果如表 1 所示。

[0101] 表 1 抗原、抗体的棋盘格实验结果(OD492nm 值)

[0102]

	血清 1:500 稀释		血清 1:1000 稀释		血清 1:2000 稀释		血清 1:4000 稀释	
	C	I	C	I	C	I	C	I
抗原 1:500 稀释	1.616	1.225	1.389	0.832	1.010	0.774	0.797	0.486
抗原 1:1000 稀释	1.417	0.733	1.273	0.771	0.965	0.641	0.765	0.387
抗原 1:2000 稀释	1.384	0.571	1.191	0.615	0.992	0.442	0.667	0.251
抗原 1:4000 稀释	1.000	0.206	1.078	0.413	0.816	0.285	0.516	0.173

[0103] 注:I 表示抑制孔,C 表示零孔。

[0104] 结果表明,实施例 2 制备的蒿甲醚-BSA 可以作为免疫原制备出检测蒿甲醚的抗体。

[0105] 四、蒿甲醚标准曲线的建立

[0106] 1、称取 5mg 蒿甲醚标准品,充分溶解于 5mL 乙腈中,得到 1mg/mL 蒿甲醚标准品溶液。将蒿甲醚标准品溶液用样品稀释液分别稀释成如下不同的浓度:50ng/mL、25ng/mL、

12.5ng/mL、6.25ng/mL、3.12ng/mL、1.56ng/mL、0.78ng/mL、0.39ng/mL 和 0.20ng/mL。

[0107] 2、将实施例 2 的步骤一制备的蒿甲醚-OVA 溶液(以 OVA 计,浓度为 1mg/mL)用包被缓冲液 1:16000 稀释后加入到 96 孔酶标板中,每孔 100 μ L,37℃包被 3 小时;用洗涤液洗涤 4 次,甩干。

[0108] 3、在步骤 2 的酶标板中加入不同浓度的蒿甲醚标准品稀释液(实验孔),每孔 50 μ L,用 50 μ L 样品稀释液代替蒿甲醚标准品稀释液作为对照孔。

[0109] 4、将步骤一制备的蒿甲醚-BSA 抗体用样品稀释液 1:8000 稀释后加入步骤 3 的酶标板中,每孔 50 μ L;37℃温育 30 分钟;用洗涤液洗涤 4 次,甩干。

[0110] 5、将羊抗小鼠 IgG-HRP 用样品稀释液 1:1000 稀释后加入步骤 4 的酶标板中,每孔 100 μ L,37℃温育 30 分钟;用洗涤液洗涤 4 次,甩干。

[0111] 6、每孔加入 100 μ L 底物缓冲液,避光显色 10min。

[0112] 7、每孔加入 50 μ L 终止液,用酶标仪 492nm 处测定各孔的 OD 值。

[0113] 以蒿甲醚标准品稀释液的浓度(ng/mL)作为 X 轴,以吸光度值的比值($B/B_0 \times 100\%$,其中, B 为试验孔的平均吸光度值, B_0 为对照孔的平均吸光度值)作为 Y 轴,绘制标准曲线图。

[0114] 标准曲线图见图 3 (实验设 3 次重复,取三次平均值)。检测蒿甲醚的 IC_{50} (即 B/B_0 为 50%时对应的蒿甲醚浓度)为 3.70ng/mL,检测范围是 0.70ng/mL-18.75ng/mL。结果表明,用实施例 1 制备的蒿甲醚-BSA 作为抗原免疫小鼠得到的抗体具有很好的效果。

[0115] 五、抗体特异性检测

[0116] 1、蒿甲醚类似物标准品溶液的配制

[0117] 分别用青蒿琥酯(中国食品药品检定研究院,货号为 100200)、青蒿素(中国食品药品检定研究院,货号为 100202)和双氢青蒿素(中国食品药品检定研究院,货号为 100184)三种结构类似物代替蒿甲醚进行步骤四的 1,其它步骤均同步骤四中的相应步骤。

[0118] 交叉反应率(%) = (蒿甲醚的 IC_{50}) / (蒿甲醚的类似物的 IC_{50}) $\times 100\%$ 。

[0119] 实验设 3 次重复,取三次实验结果的平均值,结果如表 2 所示。

[0120] 表 2 由蒿甲醚-BSA 制备的抗体的特异性检测

[0121]

分析物	IC_{50} (ng/mL)	交叉反应率(%)
蒿甲醚	3.70	100
青蒿琥酯	>20,000	<0.02
青蒿素	158.92	2.29
双氢青蒿素	282.63	1.31

[0122] 结果表明,上述由蒿甲醚-BSA 制备得到的抗体与其类似物青蒿素的交叉反应率很小,说明用蒿甲醚-BSA 制备的抗体对蒿甲醚具有很好的特异性。

[0123] 实施例 4、抗体的制备及其在检测蒿甲醚中的应用

[0124] 用步骤二制备的蒿甲醚-OVA 溶液代替步骤一制备蒿甲醚-OVA 溶液,并且用步骤

四制备的蒿甲醚-BSA 溶液代替步骤三制备的蒿甲醚-BSA 溶液,其它同实施例 3。

[0125] 结果与实施例 3 的结果一致。

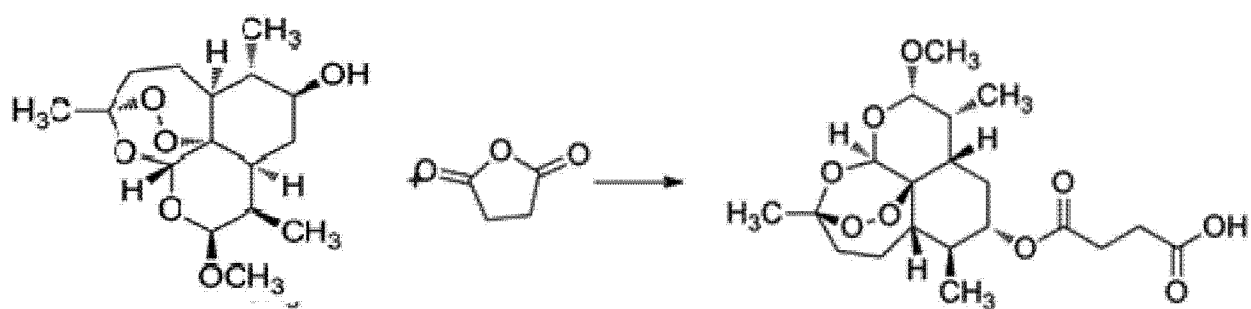


图 1

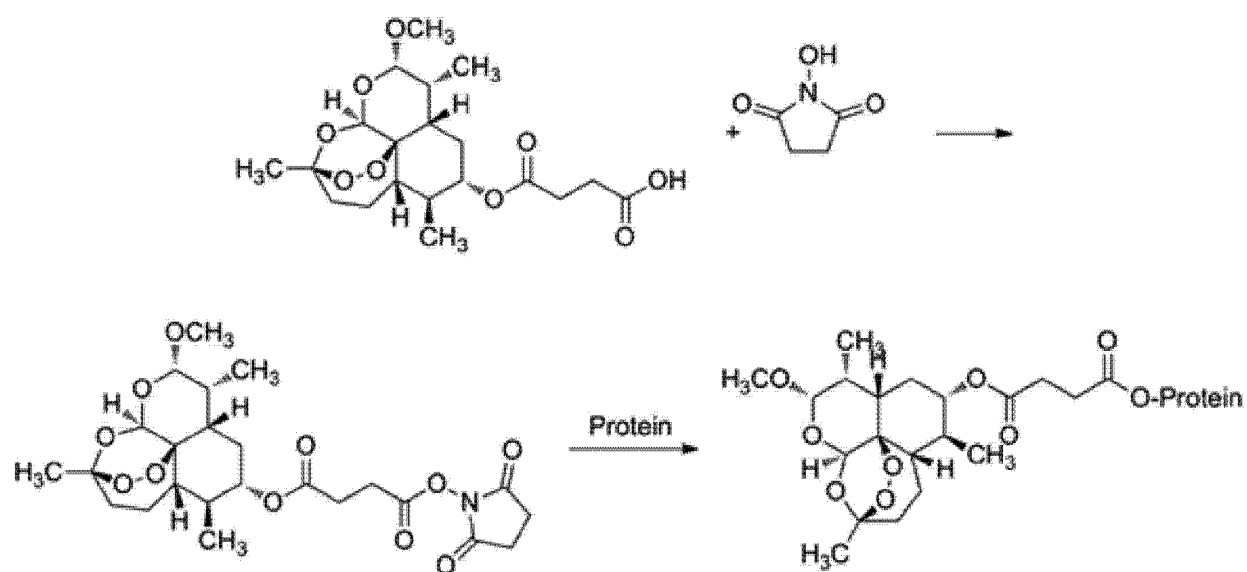


图 2

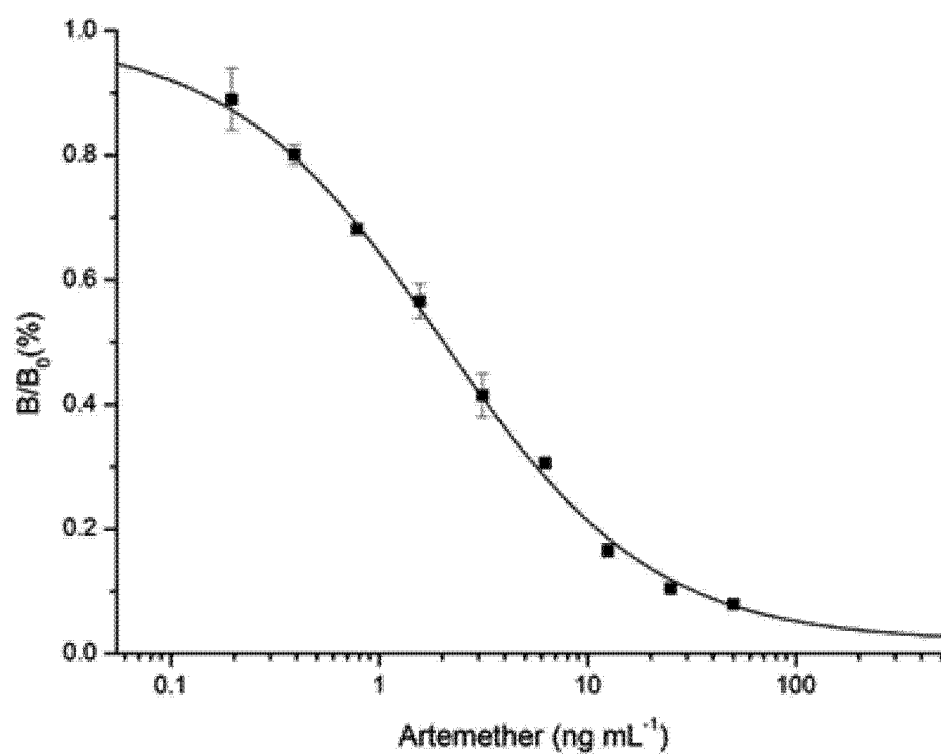


图 3

专利名称(译)	一种半抗原、其抗原、其相应的抗体及其在检测蒿甲醚中的应用		
公开(公告)号	CN103159778B	公开(公告)日	2015-07-22
申请号	CN201310102015.4	申请日	2013-03-27
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	王保民 郭素琴 崔永亮 王敏 谭桂玉 曹振 何丽珊 张亮 张瑞 张威		
发明人	王保民 郭素琴 崔永亮 王敏 谭桂玉 曹振 何丽珊 张亮 张瑞 张威		
IPC分类号	C07D493/20 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 G01N33/53 G01N33/531 G01N30/60		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	吕世华		
其他公开文献	CN103159778A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种半抗原、其抗原、其相应的抗体及其在检测蒿甲醚中的应用。本发明提供的半抗原为式(II)所示的化合物。本发明提供的化合物，可以作为半抗原，该半抗原与载体蛋白偶联后可以得到抗原，用抗原免疫动物，可以得到特异性针对蒿甲醚抗原的抗体。本发明还提供了所述化合物的制备方法，步骤简洁、成本低廉。用本发明方法制备的抗体的特异性好(与蒿甲醚结构类似物的交叉反应率低)、灵敏度高。本发明可用于蒿甲醚药物的大规模检测与质量控制，在蒿甲醚的快速免疫检测应用中将有广阔的前景。式(II)。

