

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
G01N 33/53
G01N 33/535



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02147877.5

[43] 公开日 2003 年 6 月 4 日

[11] 公开号 CN 1421701A

[22] 申请日 2002.12.19 [21] 申请号 02147877.5

[71] 申请人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌珞珈山

[72] 发明人 李家儒 何 骥 胡江丽

[74] 专利代理机构 武汉科宏专利事务所

代理人 黄瑞棠

权利要求书 1 页 说明书 6 页

[54] 发明名称 薯蓣皂素含量的 ELISA 检测方法

[57] 摘要

本发明公开了薯蓣皂素含量的 ELISA 检测方法；涉及一种检测植物体或相关样品内薯蓣皂素含量的方法。本发明是用蛋白偶联的薯蓣皂素作为抗原，获得抗薯蓣皂素及相关皂甙的抗体，将其用作固相抗原竞争酶联免疫法检测植物体或相关样品中薯蓣皂素的含量。本发明所需仪器设备简单便宜，投入少，检测成本低、时间短、过程简化，样品量少，灵敏度高，可以满足有关研究单位、贸易、加工企业、质检部门批量检测相关植物体内薯蓣皂素含量的需要。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、薯蓣皂素含量的 ELISA 检测方法，其特征在于：用蛋白偶联的薯蓣皂素作为抗原获得抗薯蓣皂素及相关皂甙的抗体，将其用作固相抗原竞争酶联免疫法检测植物体或相关样品中薯蓣皂素的含量，其主要步骤如下：

- ① 薯蓣皂素和琥珀酸酐在吡啶中反应使其羧基化；
- ② 用 DCC 法将羧基化的薯蓣皂素与蛋白 A 偶联为抗原；
- ③ 用 EDC 法将羧基化的薯蓣皂素与蛋白 B 偶联为包被物；
- ④ 用抗原免疫动物，获得抗薯蓣皂素及相关皂甙的抗血清；
- ⑤ 盐析纯化抗体，检测抗体效价；
- ⑥ 用酶联免疫法检测植物体或相关样品内的薯蓣皂素含量。

2、按权利要求 1 所述的薯蓣皂素含量的 ELISA 检测方法，其特征在于：蛋白 A 为牛血清白蛋白。

3、按权利要求 1 所述的薯蓣皂素含量的 ELISA 检测方法，其特征在于：蛋白 B 为卵清蛋白。

4、按权利要求 1 所述的薯蓣皂素含量的 ELISA 检测方法，其特征在于：免疫动物为雄性新西兰大白兔。

5、按权利要求 1 所述的薯蓣皂素含量的 ELISA 检测方法，其特征在于：酶联免疫检测方法为固相抗原竞争酶联免疫检测法。

薯蓣皂素含量的 ELISA 检测方法

技术领域

本发明涉及一种检测植物体内薯蓣皂素含量的方法，具体地说，涉及一种用 ELISA(酶联免疫吸附测定法)定量检测植物体内薯蓣皂素含量的方法。

背景技术

薯蓣皂素是合成甾体激素类药物的最重要原料。由于常规方法检测植物体内薯蓣皂素含量步骤繁琐耗时，因而改进植物体内薯蓣皂素含量的测定方法成为迫切需要解决的问题。

就目前所知，检测植物（通常是薯蓣属植物）体内薯蓣皂素含量的常规方法有：

①重量法：称取切碎晒干(或在 80℃烘干,另测水分)的待测样品两份,每份 30g,分别加入 2N 盐酸 300ml,水浴加热水解 3.5 小时，吸滤，水洗至中性，残渣在 80℃烘干，然后装入纸筒，在脂肪抽提器中用石油醚（60-90℃）抽提完全（将最后的提取液 6-8 滴，在表面皿上挥干无结晶时，表示已提完），提取液蒸浓放冷，滤集结晶，用石油醚洗两次，结晶在 80℃烘干后称重，洗液与滤液合并后蒸浓又得少许结晶，同上烘干称重，换算成含量百分率。

②比色法：精密称取切碎烘干的待测样品两份，每份 0.1 – 0.3g 放于小纸包内，分别装入脂肪抽提器内，用苯脱脂，挥去苯后，将样品移入锥形瓶，加 2N 硫酸 20ml，在 120℃左右加热水解 3.5 小时，放冷，加水稀释，过滤，先用 1% 碳酸钠液热洗至微碱性，再用蒸馏水洗至中性，在 80℃烘干后，装入脂肪抽提器用石油醚（60 – 90℃）抽提完全，将提取液转入容量瓶（50ml）中，在 30℃定容后，分别吸取 0.5ml 提取液蒸干，加 6ml 高氯酸（G.R.）显色，一刻钟后进行比色（分光光度计 480nm 进行比色）。根据标准曲线，换算成含量百分率。

③高效液相色谱法：精密称取切碎烘干的待测样品两份，每份 0.1 – 0.3g 放于小纸包内，分别装入脂肪抽提器内，用苯脱脂，挥去苯后，将样品移入锥形瓶，加 2N 硫酸 20ml，在 120℃左右加热水解 3.5 小时，放冷，加水稀释，过滤，先用 1% 碳酸钠液热洗至微碱性，再用蒸馏水洗至中性，在 80℃烘干后，装入脂肪抽提器用石油醚（60 – 90℃）抽提完全，将提取液转入容量瓶（50ml）中，在 30℃定容。取适量用 0.45 μm 有机膜滤过，供进样。进样量 20 μl。C₈ 柱（5 μm, 4.6mmX250mm）乙腈 – 水（80: 20）为流动相流速 1ml/min, 检测波长 205nm，样品中薯蓣皂素与其他成分达到分离。计算峰面积积分值，根据标准曲线换算成含量百分率。

其中重量法和比色法所需设备简单，缺点是费时，难以进行大量样品的同时检测，且误差较大；高效液相色谱法测定结果精确，但同样耗时，且所需设备昂贵（市售液相色谱仪需几十万至数百万元），

操作复杂，需专门培训的操作人员，不是一般企业或个人所能及的。

发明内容

本发明的目的是：克服上述常规方法所存在着的缺点和不足，提供一种薯蓣皂素含量的 ELISA 检测方法。具体地说是要解决以下技术问题：

① 加工企业原料收购及加工过程中样品的薯蓣皂素含量快速检测问题；

② 相关研究过程中批量样品，特别是微量样品的快速检测问题；

③ 现有方法的样品制备程序烦琐、对设备要求高的问题。

本发明的目的是这样实现的：用蛋白偶联的薯蓣皂素作为抗原获得抗薯蓣皂素及相关皂甙的抗体，将其用作固相抗原竞争酶联免疫法检测植物体中薯蓣皂素的含量。

有关术语和缩略语：

BSA - 牛血清白蛋白；

OVA - 卵清蛋白；

DCC - N,N-二环己基碳二亚胺；

NHS - N-羟基丁二酰亚胺；

DMF - 二甲基甲酰胺；

OD 值 - 吸光值；

酶标板 - 市售 40 孔或 96 孔酶标板；

磷酸盐缓冲液 - 0.01mol/L PH7.8 磷酸缓冲液，含 0.9% 氯化钠；

底物 - Na_2HPO_4 1.84g, 柠檬酸 0.51g 在蒸馏水 100ml 中溶解后加邻苯二胺 40mg, 避光保存, 使用前加入 30% H_2O_2 0.15ml。

薯蓣皂素酶联免疫检测方法建立过程及检测过程如下:

①薯蓣皂素和琥珀酸酐在吡啶中反应使其羧基化

薯蓣皂素和琥珀酸酐溶解于吡啶, 密闭室温反应 3 天以上, 减压蒸干, 所得物质溶于氯仿, 水洗 3 次以上, 挥干氯仿。

②用 DCC 法将羧基化的薯蓣皂素与蛋白 A 偶联为抗原

将①所得的琥珀酸酐化的薯蓣皂素、DCC(N,N-二环己基碳二亚胺)、NHS(N-羟基丁二酰亚胺)按 1:1:3 的摩尔比溶于 DMF(二甲基甲酰胺)中室温反应 1 天, 过滤, 所得溶液逐滴加入 BSA(牛血清白蛋白)溶液(4 mg/ML)中, 室温磁力搅拌 5 小时, 所得液体透析(0.1% 无水乙酸钠)3 天, 用作免疫原。

③用 EDC 法将羧基化的薯蓣皂素与蛋白 B 偶联为包被物

称取 20mg EDC(水溶性碳二亚胺)溶解于 4ml 水中, 取 3ml 逐滴加入 7ml 2mg/ml 的 OVA(卵清蛋白)溶液, 磁力搅拌, 然后逐滴加入琥珀酸酐化皂素/DMF 溶液 0.4ml, 磁力搅拌, 10min 后加入剩下 1 ml EDC 溶液到正在搅拌的溶液中, 室温搅拌过夜。透析(0.1% 无水乙酸钠)3 天。

④用抗原免疫动物, 获得抗薯蓣皂素及相关皂甙的抗血清

将②所得的偶联物作为免疫原, 免疫雄性新西兰大白兔, 一个月后加强免疫一次, 两周后放血, 得抗血清。

⑤盐析纯化抗体, 检测抗体效价

将③所得的包被物包被酶标板；④所得抗血清用饱和硫酸铵盐析纯化抗体，所得抗体蛋白用磷酸盐缓冲液稀释成梯度浓度，滴加到包被物包被的酶标板上，再依次加入酶标羊抗兔及其底物显色。测 OD 值选择合适的稀释浓度作为抗血清效价。

⑥用酶联免疫法检测植物体或相关样品内的薯蓣皂素含量

样品制备：待测样品用甲醇浸提，活性炭去色；

标准曲线的制作：包被物包被 → 加入梯度浓度薯蓣皂素标准品 → ⑤所得的抗体 → 酶标羊抗兔 → 底物显色 → 测 OD 值并绘制标准曲线；

样品检测：包被物包被 → 加入待测样品 → ⑤所得的抗体 → 酶标羊抗兔 → 底物显色 → 测 OD 值，由标准曲线换算出待测样品的皂素含量。

本发明具有以下优点和积极效果：

①所需仪器设备简单便宜，只需要酶联免疫检测仪（市价几千元）便可实现对大批量样品的连续快速检测，因此投入少，检测成本低。

②检测时间短，特别是对于多个样品大批量同时检测时，单个样品平均所需时间短，方便科研与生产的实际使用。

③检测过程简化，所需的样品量少，检测的灵敏度高。

可以满足有关研究单位、加工企业、质检部门大量检测相关植物体内薯蓣皂素含量的需要。

具体实施方式

样品制备：

称取适量粉碎待测样品（0.01g - 1g,视样品情况而定），加入甲醇超声浸提（如无超声波设备，静置过夜即可）3次，每次3 - 5ml,合并浸提液，定容，活性炭脱色。

含量检测：

包被物包被酶标板（37℃过夜），磷酸盐缓冲液洗涤 → 加入梯度浓度薯蓣皂素标准品 → 加兔抗薯蓣皂素及相关皂甙抗体（37℃孵育1h），磷酸盐缓冲液洗涤 → 加酶标羊抗兔（37℃孵育1h），磷酸盐缓冲液洗涤 → 加底物在黑暗室温显色约15min → 在酶标仪上测OD值，并绘制标准曲线。

取待测样品，适当稀释，用上述方法检测OD值，根据样品稀释倍数，以及OD值由标准曲线换算出待测样品的皂素含量。

每份样品检测三次取平均值（占3个孔），实际操作中标准品和待测样品在同一块酶标板上完成。每块96孔板可绘制标准曲线并同时检测20份以上的样品。

测定所需的包被好的酶标板、各种抗体、标准品、底物、缓冲液试剂等，可由专利申请者以试剂盒的方式成套提供，使用者按照上述步骤操作，每块96孔酶标板约4小时即可检测至少二十个样品的薯蓣皂素含量。如果待测样品数更多，可以使用多块酶标板，交叉检测，这样单个样品检测所需的时间更短。

专利名称(译)	薯蓣皂素含量的ELISA检测方法		
公开(公告)号	CN1421701A	公开(公告)日	2003-06-04
申请号	CN02147877.5	申请日	2002-12-19
[标]申请(专利权)人(译)	武汉大学		
申请(专利权)人(译)	武汉大学		
当前申请(专利权)人(译)	武汉大学		
[标]发明人	李家儒 何骥 胡江丽		
发明人	李家儒 何骥 胡江丽		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/543		
其他公开文献	CN1180261C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了薯蓣皂素含量的ELISA检测方法；涉及一种检测植物体或相关样品内薯蓣皂素含量的方法。本发明是用蛋白偶联的薯蓣皂素作为抗原，获得抗薯蓣皂素及相关皂甙的抗体，将其用作固相抗原竞争酶联免疫法检测植物体或相关样品中薯蓣皂素的含量。本发明所需仪器设备简单便宜，投入少，检测成本低、时间短、过程简化，样品量少，灵敏度高，可以满足有关研究单位、贸易、加工企业、质检部门批量检测相关植物体内薯蓣皂素含量的需要。