

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610007287.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2006年8月2日

[11] 公开号 CN 1811443A

[22] 申请日 2006.2.17

[21] 申请号 200610007287.6

[71] 申请人 中国农业大学

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路2号

[72] 发明人 沈建忠 何方洋 万宇平 张素霞
冯才伟 史为民 吴小平 汪善良
江海洋

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 关 畅

权利要求书2页 说明书15页 附图2页

[54] 发明名称

一种检测 19 - 去甲睾酮的方法及其专用酶联免疫试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种检测 19 - 去甲睾酮的方法及其专用酶联免疫试剂盒。该检测 19 - 去甲睾酮的酶联免疫试剂盒，包括 19 - 去甲睾酮特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为 19 - 去甲睾酮半抗原与载体蛋白的偶联物或抗抗体；所述酶标记物为酶标抗体或酶标 19 - 去甲睾酮半抗原；当所述包被原为 19 - 去甲睾酮半抗原与载体蛋白的偶联物时，所述酶标记物为酶标抗抗体；当所述包被原为抗抗体时，所述酶标记物为酶标 19 - 去甲睾酮半抗原。本发明的方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查的检测动物组织、尿样中 19 - 去甲睾酮药物残留量。

1、一种检测 19-去甲睾酮的酶联免疫试剂盒，包括 19-去甲睾酮特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为 19-去甲睾酮半抗原与载体蛋白的偶联物或抗抗体；所述酶标记物为酶标抗抗体或酶标 19-去甲睾酮半抗原；当所述包被原为 19-去甲睾酮半抗原与载体蛋白的偶联物时，所述酶标记物为酶标抗抗体；当所述包被原为抗抗体时，所述酶标记物为酶标 19-去甲睾酮半抗原；所述 19-去甲睾酮半抗原是将 19-去甲睾酮和琥珀酸酐通过酰化反应得到的。

2、根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括 19-去甲睾酮标准品溶液、显色剂、浓缩洗涤液、终止液、浓缩复溶液；所述载体蛋白为卵清蛋白、兔血清白蛋白或鼠血清白蛋白。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述 19-去甲睾酮特异性抗体为 19-去甲睾酮单克隆抗体或 19-去甲睾酮多克隆抗体；它们均是用 19-去甲睾酮半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的；所述 19-去甲睾酮半抗原是将 19-去甲睾酮和琥珀酸酐通过酰化反应得到的；所述载体蛋白为鼠血清蛋白、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白或血兰蛋白。

4、根据权利要求 1 或 2 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶。

5、根据权利要求 3 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述抗抗体为羊抗鼠或羊抗兔抗抗体；所述 19-去甲睾酮单克隆抗体为 19-去甲睾酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-3 CGMCC No.1613 分泌的单克隆抗体。

6、根据权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述浓缩洗涤液为 0.01M~0.05M、含 0.01%叠氮化钠和 1%吐温 80 的磷酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

7、根据权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：当标记酶为辣根过氧化物酶时显色剂由显色液 A 液和显色液 B 液组成，所述显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲，所述显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺；当标记酶为碱性磷酸酯酶时，显色剂为 4-硝基酚磷酸盐缓冲液。

8、根据权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述浓缩复溶液为含 0.5%牛血清白蛋白和 0.1%吐温 20、0.01~0.05M 的磷酸盐缓冲液，所述百分含量为质量百分含量。

9、根据权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述包被缓冲液为 pH

9.6, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液; 所述封闭液是含有 5% 脱脂奶粉的 0.01~0.05M 磷酸盐缓冲液; 所述终止液为 1~2mol/L 的硫酸、盐酸或氢氧化钠缓冲液; 所述百分含量为质量百分含量。

10、一种检测 19-去甲睾酮的方法, 包括以下步骤:

1) 样品前处理:

当样品为动物组织或饲料时, 称取 2g 动物组织或饲料匀浆物和 0.5g 抗坏血酸加入到 8ml 乙腈和 2ml 1mol/L 氢氧化钠的混合液中, 振荡混匀, 室温 3000g 以上, 15℃, 离心 10-15 分钟, 取上清液 1ml 移置离心管中, 加入 1ml 1mol/L 氢氧化钠和 2ml 乙腈, 混匀, 再加入 3ml 体积比为 8:2 的正己烷和二氯甲烷的混合液振荡混匀, 3000g, 15℃, 离心 10-15 分钟, 去除上层正己烷相, 取中间层有机相在氮气流下完全干燥用 1ml 的权利要求 8 所述的用去离子水稀释 2 倍的浓缩复溶液溶解干燥的残留物取水相, 即可进行分析;

当样品为尿液时, 取 2ml 尿液到离心管中, 3000 g 以上, 15℃, 离心 10-15 分钟直至清亮, 移取 1ml 尿液到离心管中, 加入 2ml 的乙腈, 再加入 3ml 体积比为 8:2 的正己烷和二氯甲烷的混合液混匀, 3000g 以上, 15℃, 离心 10-15 分钟, 去除上层正己烷相, 取中间层有机相在氮气流下完全干燥, 用 1ml 权利要求 8 所述的用去离子水稀释 2 倍的浓缩复溶液溶解干燥的残留物, 取水相进行分析;

2) 利用权利要求 1-9 中任一所述的检测 19-去甲睾酮的酶联免疫试剂盒检测样品。

一种检测 19-去甲睾酮的方法及其专用酶联免疫试剂盒

技术领域

本发明涉及一种检测 19-去甲睾酮的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

背景技术

19-去甲睾酮 (19-nortestosterone, NT) 是一种合成激素, 是具有雄激素作用, 属于合成代谢类固醇。临床主要用于治疗贫血老年性骨质疏松, 还能促进肌肉的生长发育, 增加训练耐力和训练负荷。但其也存在着很严重的副作用, 母体摄入会使女性胎儿男性化, 引起生殖性畸形。女性长期服用会产生男性化特征, 男性长期服用会导致过早秃顶。短期大剂量服用会导致肝功能障碍, 还可能导致癌症、糖尿病、精神错乱等。因此, 加强对该药物的检测是十分必要的。

检测 19-去甲睾酮残留量的化学方法主要有薄层色谱法(TLC)、气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)、气-质联机(GC/MS)、液-质联机(HPLC/MS)、毛细管电泳(CE)等, 由于所需仪器设备复杂和过程繁琐, 不适合现场监控和大量样本筛查。

发明内容

本发明的目的是提供一种检测 19-去甲睾酮的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

本发明所提供的检测 19-去甲睾酮的酶联免疫试剂盒, 包括 19-去甲睾酮特异性抗体及包被原和酶标记物; 所述包被原为 19-去甲睾酮半抗原与载体蛋白的偶联物或抗体; 所述酶标记物为酶标抗体或酶标 19-去甲睾酮半抗原; 当所述包被原为 19-去甲睾酮半抗原与载体蛋白的偶联物时, 所述酶标记物为酶标抗体; 当所述包被原为抗体时, 所述酶标记物为酶标 19-去甲睾酮半抗原。

所述 19-去甲睾酮半抗原与载体蛋白的偶联物可通过将 19-去甲睾酮半抗原和载体蛋白用混合酸酐法或活性酯法或水溶性碳化二亚胺法(EDC)进行偶联得到; 所述 19-去甲睾酮半抗原是将 19-去甲睾酮和琥珀酸酐通过酰化反应得到的; 所述载体蛋白可为卵清蛋白(OVA)、兔血清白蛋白(RSA)或鼠血清白蛋白(MSA)等。

所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶, 其中优选碱性磷酸酯酶; 碱性磷酸酯酶标记抗体可采用现有技术中的多种方法如戊二醛法或过碘酸钠法将酶交联在抗体上; 碱性磷酸酯酶标记的 19-去甲睾酮半抗原可采用混合酸酐法将碱性磷酸酯酶与 19-去甲睾酮半抗原偶联得到。所述 19-去甲睾酮半抗原是将 19-去甲睾酮和琥珀酸酐通过酰化反应得到的。

所述 19-去甲睾酮特异性抗体可为 19-去甲睾酮单克隆抗体或 19-去甲睾酮多克隆抗体；它们均是用 19-去甲睾酮半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的；多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体，所述 19-去甲睾酮单克隆抗体为 19-去甲睾酮鼠单克隆抗体，所述 19-去甲睾酮多克隆抗体优选为 19-去甲睾酮兔多克隆抗体。所述抗抗体为羊抗鼠或羊抗兔抗抗体，优选为羊抗兔抗抗体。

所述 19-去甲睾酮鼠单克隆抗体优选为 19-去甲睾酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-3 CGMCC No. 1613 分泌的抗体。

19-去甲睾酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-3 CGMCC No. 1613 已于 2006 年 2 月 9 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（简称 CGMCC）。

以上抗体均可以用 19-去甲睾酮半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原按常规方法制备。所述载体蛋白可为鼠血清蛋白、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白或血兰蛋白等常用载体蛋白；所述 19-去甲睾酮半抗原与载体蛋白的偶联物可通过将 19-去甲睾酮半抗原和载体蛋白用活性酯法或混合酸酐法进行偶联得到；所述 19-去甲睾酮半抗原是将 19-去甲睾酮和琥珀酸酐通过酰化反应得到的。

为了方便现场监控和大量样本筛查，所述试剂盒还包括 19-去甲睾酮标准品溶液、显色剂、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液。

所述浓缩洗涤液为 0.01M~0.05M、含 0.01%叠氮化钠（ Na_3N ）和 1%吐温 80 的磷酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

本发明试剂盒的浓缩洗涤液中含有的叠氮钠在溶液中抑制细菌的生长，对溶液的稳定性起到一个保护作用。

当标记酶为辣根过氧化物酶时，所述显色剂由显色液 A 液和显色液 B 液组成，所述显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲，所述显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺；当标记酶为碱性磷酸酯酶时，所述显色剂为 4-硝基酚磷酸盐缓冲液。

所述浓缩复溶液可为含 0.5%牛血清白蛋白和 0.1%吐温 20、0.01~0.05M 的磷酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

所述包被缓冲液为 pH9.6，0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液；

所述封闭液是含有 5%脱脂奶粉的 0.01~0.05M 磷酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。；

所述终止液为 1~2mol/L 的硫酸、盐酸或氢氧化钠缓冲液。

本发明所提供的检测 19-去甲睾酮的方法，包括以下步骤：

1) 样品前处理

当样品为动物组织或饲料时，用均质器均质动物组织样品或饲料，称取 2g 样品

和 0.5g 抗坏血酸加入到 8ml 乙腈和 2ml 1mol/L 氢氧化钠的混合液中，振荡混匀，室温 3000g 以上，15℃，离心 10-15 分钟，取上清液 1ml 移置离心管中，加入 1ml 1mol/L 氢氧化钠和 2ml 乙腈，混匀，再加入 3ml 正己烷和二氯甲烷的混合液（正己烷与二氯甲烷的体积比为 8：2）振荡混匀，3000 g 以上，15℃，离心 10-15 分钟，去除上层正己烷相，取中间层有机相在氮气流下完全干燥，用 1ml 的上述的用去离子水稀释 2 倍的浓缩复溶液溶解干燥的残留物取水相，即可进行分析；

当样品为尿液时，取 2ml 尿液到离心管中，3000 g 以上，15℃，离心 10-15 分钟直至清亮，移取 1ml 尿液到离心管中，加入 2ml 的乙腈，再加入 3ml 正己烷和二氯甲烷的混合液（正己烷与二氯甲烷的体积比为 8：2）混匀，3000g 以上，15℃，离心 10-15 分钟，去除上层正己烷相，取中间层有机相在氮气流下完全干燥，用 1ml 上述的用去离子水稀释 2 倍的浓缩复溶液溶解干燥的残留物，取水相进行分析。

2) 利用上述检测 19-去甲睾酮的酶联免疫试剂盒检测样品。

其中可作为固定 19-去甲睾酮半抗原与载体蛋白的偶联物或 19-去甲睾酮抗抗体的载体物质很多，如聚苯乙烯、纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙烯、聚丙烯、交联葡聚糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等。该载体的形式可以是试管、微量反应板凹孔、小珠、小圆片等。其中优选为聚苯乙烯制成的微量反应板凹孔，其优点为：聚苯乙烯具有较强的吸附蛋白质的性能，抗原吸附其上后还是保留原来的免疫活性，空白值低，孔底透明度高，各板之间、同一板各孔之间性能相近。

本发明的检测 19-去甲睾酮的酶联免疫试剂盒主要采用间接竞争 ELISA 方法定性或定量检测动物组织、饲料及尿液等样品中 19-去甲睾酮的残留量；对样品的前处理要求低，样品前处理过程简单，能同时快速检测大批样品。

将 19-去甲睾酮和琥珀酸酐通过酰化反应合成半抗原，其优点在于给 19-去甲睾酮接出一个含 4 个碳链的间隔臂，突出了 19-去甲睾酮分子结构中的特征基团——睾酮，使制备的 19-去甲睾酮抗体对 19-去甲睾酮免疫原或包被原均有很高的识别能力。再将 19-去甲睾酮半抗原采用混合酸酐法与载体蛋白偶联得到免疫原。半抗原与载体蛋白的结合比例过低或过高都对免疫不利，半抗原与 KLH、RSA 和 HSA 的结合摩尔比分别为 12:1、17:1 和 17:1。

本发明的试剂盒可定性、定量检测动物组织、尿样等样品中 19-去甲睾酮的残留量。本发明的检测原理是当微孔条上预包被 19-去甲睾酮半抗原与载体蛋白的偶联物时，加入系列标准品或样品溶液和 19-去甲睾酮抗体工作液后，样本中残留的 19-去甲睾酮和微孔条上预包被的偶联抗原竞争抗 19-去甲睾酮的抗体，加入酶标记物进行酶活性放大作用，显色后终止；当微孔条上包被抗抗体时，加入 19-去甲睾酮抗体工

作液后,再加入系列标准品或样品溶液和酶标半抗原,样品残留的 19-去甲睾酮和酶标半抗原竞争抗 19-去甲睾酮抗体,显色;显色终止后用酶标仪测定每孔吸光度值(OD 值),样本吸光度值与其残留物 19-去甲睾酮的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出相应残留物 19-去甲睾酮的含量。也可根据酶标板上的样品溶液颜色的深浅,与系列浓度的 19-去甲睾酮标准液颜色比较判断样品中 19-去甲睾酮的浓度范围。

本发明的检测 19-去甲睾酮的酶联免疫试剂盒主要采用间接竞争 ELISA 方法定性或定量检测动物组织及尿液等样品中 19-去甲睾酮的残留量;对样品的前处理要求低,样品前处理过程简单,能同时快速检测大批样品;采用高特异性的 19-去甲睾酮单克隆抗体,主要试剂以工作液的形式提供,检验方法方便易行,具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点。本发明的酶联免疫试剂盒,结构简单、使用方便、价格便宜、携带便利,检测方法高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量。

附图说明

图 1 为以 19-去甲睾酮抗原与载体蛋白的偶联物为包被原的酶联免疫试剂盒 19-去甲睾酮标准曲线图

图 2 为以抗抗体为包被原的酶联免疫试剂盒 19-去甲睾酮标准曲线图

具体实施方式

下述实施例的方法如无特别说明,均为常规方法。

下述实施例中的百分含量,如无特别说明,均为质量百分含量。

实施例 1、以 19-去甲睾酮半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原的酶联免疫试剂盒的制备及其检测方法

以 19-去甲睾酮半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原的酶联免疫试剂盒包括:

(1) 包被有 19-去甲睾酮与载体蛋白偶联物的酶标板;

(2) 碱性磷酸酯酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液:用稀释液将碱性磷酸酯酶标记的羊抗鼠抗抗体稀释成蛋白浓度为 0.1~1 $\mu\text{g/L}$ 的酶标记抗抗体工作液, 12ml/瓶, 1 瓶。稀释液为含有 0.1%甘油(可防止放入-20 $^{\circ}\text{C}$ 环境的酶标记物冻结,亦可长时间保持酶标记物的生物活性)、1%小牛血清,1%的硫柳汞防腐剂(便于保存)的溶液。

(3) 19-去甲睾酮标准溶液: 19-去甲睾酮系列标准溶液 6 瓶, 0 $\mu\text{g/L}$ 、0.1 $\mu\text{g/L}$ 、0.3 $\mu\text{g/L}$ 、0.9 $\mu\text{g/L}$ 、2.7 $\mu\text{g/L}$ 、8.1 $\mu\text{g/L}$, 3ml/瓶。把 19-去甲睾酮稀释为标准溶液的稀释液为: pH 8.3, 0.03 mol/L 的磷酸盐缓冲液

(4) 显色液: 显色液为 4-硝基酚磷酸盐缓冲液, 7ml/瓶。

(5) 19-去甲睾酮鼠单克隆抗体工作液：用含有 1%BSA 的 pH 7.9, 0.5mol/L 磷酸盐缓冲液将 19-去甲睾酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-3 CGMCC No. 1613 分泌的抗体稀释成蛋白浓度为 2.0 μ g/L 使用, 12ml/瓶, 1 瓶。

(6) 浓缩洗涤液：0.01M~0.05M、含 0.1% (质量浓度) 叠氮化钠 (Na_3N) 和 1% (质量浓度) 吐温 80 的磷酸盐缓冲液。40ml/瓶, 1 瓶。为正常使用浓度的 20 倍。

(7) 终止液：2mol/L 氢氧化钠, 8ml/瓶, 1 瓶。

(8) 浓缩复溶液：含 0.5%牛血清白蛋白和 1%吐温 20、0.01~0.05M 的磷酸盐缓冲液, 分为 50ml/瓶, 1 瓶。为正常使用浓度的 3 倍。

(9) 包被缓冲液：pH9.6, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液。

(10) 封闭液：含有 5%脱脂奶粉的 0.01 磷酸盐缓冲液。

其中, 19-去甲睾酮半抗原与载体蛋白偶联物、19-去甲睾酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-3 CGMCC No. 1613 分泌的抗体、碱性磷酸酯酶标记的羊抗鼠抗抗体的制备方法如下：

一、酶标板的制备

1、19-去甲睾酮半抗原的合成方法：

半抗原的合成：将 19-去甲睾酮和琥珀酸酐通过酰化反应合成半抗原。其优点在于给 19-去甲睾酮接出一个含 4 个碳链的间隔臂, 突出了 19-去甲睾酮分子结构中的特征基团——睾酮, 使制备的 19-去甲睾酮抗体对 19-去甲睾酮免疫原或包被原均有很高的识别能力。

2、包被原：将 19-去甲睾酮半抗原和兔血清白蛋白 (RSA) 采用水溶性碳化二亚胺法 (EDC) 进行偶联得到包被原。

包被原的具体制备方法如下：

(1) 取 19-去甲睾酮半抗原 2g 溶于 20ml, 0.5M 的氢氧化钠溶液中；

(2) 再取 1.5g 碳化二亚胺溶于 5ml 纯水并加到步骤 (1) 的溶液中室温搅拌反应 2 小时；

(3) 取兔血清白蛋白 20g 溶于 75ml pH9.6 的碳酸盐缓冲液并滴加到步骤 (2) 的溶液中 4℃ 搅拌过夜, 0.1M 的磷酸盐缓冲液透析 7 天, 每天换液 3~4 次, 最后将抗原浓缩或冻干保存。

3、酶标板的制备：

用包被缓冲液将 19-去甲睾酮与兔血清白蛋白偶联物稀释成 1 μ g/ml, 每孔加入 100 μ l, 37℃ 温育 2h 或 4℃ 过夜, 倾去包被液, 用洗涤液 (浓缩洗涤液用去离子

水稀释 19 倍) 洗涤 3 次, 每次 30 秒, 拍干, 然后在每孔中加入 200 μ l 封闭液, 37 $^{\circ}$ C 温育 1-2h, 倾去孔内液体, 干燥后用铝膜真空密封保存。

二、19-去甲睾酮鼠单克隆抗体的制备

1、免疫原: 将 19-去甲睾酮半抗原和血蓝蛋白 (KLH) 采用混合酸酐法进行偶联得到免疫原。

免疫原的制备方法: 1) 取 19-去甲睾酮半抗原 2 g 溶于 30ml, 50% 的 N,N-二甲基甲酰胺溶液中; 2) 再取 0.5ml 氯甲酸异丁酯溶于 5ml 无水二噁烷并加到步骤 1) 溶液中室温搅拌反应 4 小时; 3) 取血蓝蛋白 32g 溶于 70ml pH9.6 的碳酸盐缓冲液中并加到步骤 2) 溶液中 4 $^{\circ}$ C 搅拌过夜, 然后在 0.2M 的磷酸盐缓冲液透析 7 天, 每天换液 3~4 次, 最后将酶标记半抗原抗原浓缩或冻干保存。

2、19-去甲睾酮鼠单克隆抗体制备

动物免疫程序 采用 Balb/c 小鼠为免疫动物, 19-去甲睾酮半抗原与血蓝蛋白偶联物为免疫原, 免疫剂量为 80-100 μ g/只, 首免时将免疫源与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂, 颈背部皮下多点注射, 间隔 2-3 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化, 加强免疫一次, 四免后腹腔加强免疫一次, 3 天后取脾细胞。

细胞融合与克隆化 取免疫 Balb/c 小鼠的脾细胞, 按 10: 1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 采用间接竞争 ELISA 测定细胞上清液, 筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化, 直至得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株—19-去甲睾酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-3 CGMCC No. 1613 分泌的单克隆抗体。

细胞冻存和复苏 取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个/mL 的细胞悬液, 分装于冻存管, 在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管, 立即放入 37 $^{\circ}$ C 水浴中速融, 离心去除冻存液后, 移入培养瓶内培养。

单克隆抗体的制备与纯化 采用体内诱生法, 将 Balb/c 小鼠 (8 周龄) 腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/只, 14 天后腹腔注射 19-去甲睾酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-3 CGMCC No. 1613 5×10^6 个/只, 10 天后采集腹水。经辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化, 小瓶分装, -20 $^{\circ}$ C 保存。

三、酶标抗抗体的制备

以鼠源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫, 得到羊抗鼠抗抗体。

羊抗鼠抗抗体和碱性磷酸酯酶采用戊二醛法进行偶联, 得到碱性磷酸酯酶标记的抗抗体。

将羊抗鼠抗抗体与碱性磷酸酯酶进行偶联, 采用的方法优选戊二醛法, 用碱性磷酸酯酶以 2: 1 的比例与羊抗兔抗抗体偶联, 有 60%~70% 的酶与 8% 的抗抗体偶

联，酶标记物的产量比使用辣根过氧化物酶高。

酶标羊抗鼠抗抗体具体步骤如下：

1) 称取碱性磷酸酯酶 25mg 溶于 1.25% 戊二醛溶液中，于室温静置过夜。

2) 反应后的酶溶液经 Sephadex G-25 层析柱，用生理盐水洗脱。流速控制在 1ml / 1min，收集棕色流出液。如体积大于 5ml，则以聚乙二醇浓缩至 5ml。放置 25ml 小烧杯中，缓慢搅拌。

3) 取羊抗鼠抗抗体 12.5mg 用生理盐水稀释至 5ml，搅拌下逐滴加入酶溶液中。

4) 用 1M pH9.5 碳酸缓冲液 0.25ml，继续搅拌 3h。

5) 加 0.2M 赖氨酸 0.25ml，混匀后，置室温 2h。

6) 在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵，置 4℃ 1h。

7) 3000rpm 离心半小时，弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次，最后沉淀物溶于少量 0.15M pH7.4 的磷酸盐缓冲液中。

8) 将上述溶液装入透析袋中，用 0.15M pH7.4 的磷酸盐缓冲液透析，去除铵离子后(用萘氏试剂检测)，10,000rpm 离心 30min 去除沉淀，上清液即为酶结合物，分装后，冰冻保存。

利用该试剂盒检测样品中残留的 19-去甲睾酮的方法如下：

一、样品前处理

a、动物组织和饲料：

用均质器均质动物组织样品或饲料，称取 2g 样品和 0.5g 抗坏血酸加入到 8ml 乙腈和 2ml 氢氧化钠 (1mol/L) 的混合液中，振荡 10min，3000 g 以上，15℃，离心 10min 取上清液 1ml 移置离心管中，加入 1ml 氢氧化钠 (1mol/L) 和 2ml 乙腈，振荡 1min 加入 3ml 正己烷和二氯甲烷的混合液 (正己烷与二氯甲烷的体积比为 8: 2) 振荡 10min，3000 g 以上，15℃，离心 10min 去除上层正己烷相，取中间层有机相在氮气流下完全干燥用 1ml 去离子水稀释 2 倍的浓缩复溶液溶解干燥的残留物取水相，取 50μl 进行分析；

b、尿液：

取 2ml 尿液到离心管中，3000 g 以上，15℃，离心 10min，直至清亮，移取 1ml 尿液到离心管中，加入 2ml 乙腈，振荡 1min，加入 3ml 正己烷和二氯甲烷的混合液 (正己烷与二氯甲烷的体积比为 8: 2) 振荡 10min，3000 g 以上，15℃，离心 10min 去除上层正己烷相，取中间层有机相在氮气流下完全干燥，用 1ml 去离子水稀释 2 倍的浓缩复溶液溶解干燥的残留物，取 50μl 水相进行分析。

二、检测方法

a、向 19-去甲睾酮与兔血清白蛋白偶联物包被的酶标板微孔中加系列标准品溶液或样品溶液（各 2 孔）50 μ l，然后加入 19-去甲睾酮鼠单克隆抗体工作液 50 μ l，用盖板膜封板，37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min。

b、倒出孔中液体，每孔加入 250 μ l 洗涤液，30 秒后倒出孔中液体，如此重复操作共洗板 5 次，用吸水纸拍干。加入碱性磷酸酯酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液 100 μ l，用盖板膜封板，37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min。

c、取出酶标板，如前述洗板 5 次。每孔加入底物显色液 100 μ l，轻轻振荡混匀，37 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 15-30min。

d、每孔加入终止液 50 μ l，轻轻振荡混匀，用酶标仪将波长范围测定在 400nm 波长处，测定每孔吸光度值（OD 值）。

三、结果分析

所获得的每个浓度标准溶液或样本吸光度值的平均值（B）除以第一个标准（0 标准）的吸光度值（B₀）再乘以 100%，即百分吸光度值。

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

公式中 B 为标准品溶液或样本溶液的平均吸光度值，B₀ 为 0 μ g/L 标准溶液的平均吸光度值。以 19-去甲睾酮浓度的自然对数值为 X 轴，百分吸光度值为 Y 轴，绘制标准曲线图，如图 1 所示。相对应每一个样品中 19-去甲睾酮的浓度可以从标准曲线上读出。也可以用回归方程法，计算出样本溶液中 19-去甲睾酮的浓度。利用计算机专业软件，更便于大量样品的快速分析。整个检测过程只需 1.5 小时就可以完成，最低检测限为 0.1 μ g/L。

实施例 2、以羊抗兔抗抗体作为包被原的酶联免疫试剂盒及其制备方法

以羊抗兔抗抗体作为包被原的酶联免疫试剂盒包括：

(1) 包被有羊抗兔抗抗体的酶标板；

(2) 碱性磷酸酯酶标记的 19-去甲睾酮半抗原工作液：将碱性磷酸酯酶标记的 19-去甲睾酮半抗原稀释为 0.1~1 μ g/L 的工作液，12ml/瓶，1 瓶。所用的稀释液为含有 0.1% 甘油（可防止放入 -20 $^{\circ}$ C 环境的酶标记物冻结，亦可长时间保持酶标记物的生物活性）、1% 的硫柳汞防腐剂（便于保存）的溶液。

(3) 19-去甲睾酮标准溶液：19-去甲睾酮系列标准品溶液 6 瓶，0 μ g/L、0.1 μ g/L、0.3 μ g/L、0.9 μ g/L、2.7 μ g/L、8.1 μ g/L，3ml/瓶。把 19-去甲睾酮稀释为标准溶液的稀释液为：pH 值为 8.3，0.03 mol/L 的磷酸盐缓冲液。

(4) 显色液：显色液为 4-硝基酚磷酸盐缓冲液，7ml/瓶。

(5) 19-去甲睾酮兔多克隆抗体工作液：用含有 1%BSA 的 pH 7.9, 0.5mol/L 磷酸盐缓冲液将抗体稀释成蛋白浓度为 2.0 μ g/L 使用，12ml/瓶，1 瓶。

(6) 浓缩洗涤液：0.01M~0.05M、含 0.1%（质量浓度）叠氮化钠（ Na_3N ）和 1%（质量浓度）吐温 80 的磷酸盐缓冲液。40ml/瓶，1 瓶。为正常使用浓度的 20 倍。

(7) 终止液：2mol/L 氢氧化钠，8ml/瓶，1 瓶。

(8) 浓缩复溶液：含 0.5%牛血清白蛋白和 1%吐温 20、0.01~0.05M 的磷酸盐缓冲液，分为 50ml/瓶，1 瓶。为正常使用浓度的 3 倍。

(9) 包被缓冲液：pH9.6, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液。

(10) 封闭液：磷酸盐缓冲液和 5%脱脂奶粉的以 1:5 比例混合的混合物。

其中，羊抗兔抗抗体包被原、19-去甲睾酮兔多克隆抗体、碱性磷酸酯酶标记的 19-去甲睾酮半抗原的制备方法如下：

一、酶标板的制备

1、包被原的制备：以兔源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫，得到羊抗兔抗抗体。

2、包被有羊抗兔抗抗体的酶标板制备方法：用包被缓冲液将羊抗兔抗抗体稀释成 1 μ g/ml，每孔加入 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 温育 2h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜，倾去包被液，用洗涤液（浓缩洗涤液用去离子水稀释 19 倍）洗涤 3 次，每次 30 秒，拍干，然后在每孔中加入 200 μ l 封闭液，37 $^{\circ}$ C 温育 1-2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

二、19-去甲睾酮兔多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以免疫原（19-去甲睾酮半抗原与和血蓝蛋白的偶联物）免疫剂量为 1mg/kg，首免时将免疫原与等量的福氏完全佐剂混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射，间隔 3~4 周取相同剂量免疫原加等量福氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫一次，共免疫 5 次，最后一次不加佐剂。最后一次免疫 7~10d 后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

三、酶标半抗原的制备

碱性磷酸酯酶标记半抗原的制备：19-去甲睾酮半抗原的制备同实施例 1 中的 19-去甲睾酮半抗原制备方法。

酶标半抗原制备：采用混合酸酐法将碱性磷酸酯酶与 19-去甲睾酮半抗原偶联得到酶标记 19-去甲睾酮半抗原。

具体方法如下：1) 取 19-去甲睾酮半抗原 2 g 溶于 30ml 50% (质量百分含量) 的 N,N-二甲基甲酰胺溶液中；2) 再取 0.5ml 氯甲酸异丁酯溶于 5ml 无水二噁烷中，然后加到步骤 1) 得到的溶液中，室温搅拌反应 4 小时；3) 取碱性磷酸酯酶 32g 溶于 70ml pH9.6 的碳酸盐缓冲液中，然后加到步骤 2) 得到的溶液中 4℃ 搅拌过夜，然后在 0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液透析 7 天，每天换液 3~4 次得到酶标记 19-去甲睾酮半抗原，最后将酶标记半抗原浓缩或冻干保存。

利用该试剂盒检测样品中残留的 19-去甲睾酮的方法如下：

样品前处理的具体步骤同实施例 1 中的样品前处理步骤

检测方法：

a、向羊抗兔抗抗体包被的酶标板微孔中加入 19-去甲睾酮兔多克隆抗体工作液 100 μ l，37℃ 反应 30min。

b、倒出孔中液体，每孔加入稀释后的洗涤液，30 秒后倒出孔中液体，如此重复操作共洗板 5 次，用吸水纸拍干。每孔加入系列标准品溶液或样品溶液 50 μ l 及碱性磷酸酯酶标记的 19-去甲睾酮半抗原工作液 50 μ l，37℃ 反应 30min。

c、倒出孔中液体，重复洗板步骤，加入底物显色液 100 μ l，轻轻振荡混匀，37℃ 恒温箱避光显色 15~30min。

d、每孔加入终止液 50 μ l，轻轻振荡混匀，用酶标仪将波长范围设定在 400nm 波长处，测定每孔吸光度值 (OD 值)。

结果分析的方法同实施例 1 中的结果分析方法，该试剂盒的标准曲线图，如图 2 所示。结果分析表明，制备的试剂盒整个检测过程只需 1.5 小时就可以完成，最低检测限为 0.1 μ g/L。

实施例 3、试剂盒精密度、准确度和保存期试验

1、试剂盒精密度试验

(1) 标准品精密度试验

将实施例 1 和实施例 2 中制备的试剂盒分别取三批进行精密度实验，每批试剂盒抽取 10 个试剂盒，再从每个试剂盒的酶联板中各抽出 20 个微孔，测定 0.9 μ g/L 标准品溶液的吸光度值 (OD 值)，计算变异系数。实施例 1 中的三批试剂盒的测定结果如表 1 所示，结果表明变异系数范围在 5.4%~10.9%之间。符合精密度小于 15% 的要求。

表 1 标准可重复性试验

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	01 批	8.9	10.3	7.8	9.9	6.7	5.9	9.9	10.3	7.2	6.5
	03 批	9.2	6.7	5.4	7.1	8.5	8.4	9.1	9.9	7.6	7.9
	06 批	8.8	9.4	9.5	6.4	7.5	9.6	8.2	8.3	10.9	7.7

实施例 2 中的三批试剂盒的测定结果如表 2 所示, 结果表明变异系数范围在 5.9%~10.6%之间。符合精密度小于 15%的要求。

表 2 标准可重复性试验

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	01 批	7.6	8.9	10.6	8.1	7.5	8.4	8.2	8.3	5.9	8.4
	03 批	8.6	9.1	7.3	8.4	8.5	6.9	8.6	8.2	7.4	9.4
	06 批	9.6	6.8	8.2	8.6	9.5	7.8	7.9	7.4	9.8	10.3

(2) 样本可重复性试验

每个鸡肉样品、饲料样品、尿样样品按 25 μ g/kg 浓度添加 19-去甲睾酮标准品, 分别取实施例 1 和实施例 2 中制备的三个不同批次的试剂盒各三个, 每个浓度重复 5 次, 分别计算变异系数。实施例 1 中的三批试剂盒的测定结果如表 3-表 5 所示, 结果表明鸡肉样本变异系数均低于 22%, 饲料样本的变异系数均低于 20%, 尿样本的变异系数均低于 18%。符合变异系数小于 25%的要求。

表 3 鸡肉样品可重复性试验

批号	实测值 (μ g/kg)					变异系数 CV%
0507012	12.7	19.4	20.3	18.9	19.6	17.9
	24.6	20.3	21.3	13.6	24.3	21.3
	15.4	13.6	18.6	15.4	18.3	13.1
0507004	19.9	17.6	15.4	12.9	12.9	19.3
	20.9	23.6	24.5	16.4	15.5	20.2
	17.4	16.3	14.3	19.4	16.5	11.0
0509010	16.3	15.4	18.6	23.6	21.9	18.4
	21.3	24.2	15.6	14.4	18.7	21.3
	15.4	16.5	18.7	21.3	22.3	15.7

表4 饲料样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
0507012	12.6	18.9	17.6	21.3	19.6	18.3
	24.7	23.6	17.8	15.6	18.9	19.3
	15.5	18.9	17.6	21.3	24.6	17.9
0507004	20.3	17.8	16.9	14.2	13.6	16.5
	21.3	22.6	23.4	18.9	16.4	13.9
	17.4	16.4	15.6	19.5	16.4	8.8
0509010	16.5	15.3	19.8	23.4	21.9	17.8
	14.5	16.9	20.3	23.6	24.6	19.7
	12.7	18.9	16.4	21.3	18.8	18.4

表5 尿样样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
0507012	3.2	3.9	4.5	3.9	3.6	12.4
	4.8	4.7	3.4	4.8	4.3	13.5
	3.5	3.9	4.2	3.5	4.6	11.9
0507004	3.6	3.4	4.6	4.5	3.5	14.8
	4.6	4.2	4.6	3.3	3.6	14.5
	3.4	4.8	4.5	4.6	3.3	17.2
0509010	3.6	4.5	4.7	3.6	4.1	12.3
	3.8	4.8	4.5	3.2	4.2	15.2
	3.8	3.6	3.3	4.6	3.6	13.0

实施例2中的三批试剂盒的测定结果如表6-表8所示,结果表明鸡肉样本变异系数均低于20%,饲料样本的变异系数均低于20%,尿样本的变异系数均低于20%。

表6 鸡肉样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
0507012	15.6	21.5	18.5	16.4	19.9	13.2

	18.6	19.5	17.6	21.5	15.3	12.4
	19.3	18.6	15.3	16.9	21.6	13.1
0507004	18.2	17.9	19.8	15.2	21.9	13.3
	17.6	15.3	21.6	18.4	18.8	13.4
	21.3	15.2	22.3	17.9	17.3	15.6
0509010	24.3	17.6	24.9	18.9	16.6	18.9
	21.2	21.5	17.6	15.4	17.2	14.3
	21.5	18.9	15.3	17.2	15.9	14.1

表7 饲料样品可重复性试验

批号	实测值 (µg/kg)					变异系数 CV%
0507012	16.6	17.7	18.9	18.9	15.2	9.1
	21.6	14.9	15.3	20.4	18.9	16.5
	19.7	16.5	19.8	15.8	18.5	10.2
0507004	15.9	17.9	14.9	19.1	15.6	10.5
	18.8	18.2	17.8	17.3	21.3	8.4
	17.6	17.6	21.6	19.8	21.0	9.6
0509010	15.3	18.9	20.9	17.6	18.6	11.2
	16.9	23.5	18.9	18.9	17.9	13.2
	18.7	21.6	17.6	15.2	16.3	13.8

表8 尿样样品可重复性试验

批号	实测值 (µg/kg)					变异系数 CV%
0507012	4.3	4.6	5.2	4.4	3.4	14.8
	3.9	5.1	4.6	5.2	3.6	15.9
	4.5	4.3	3.8	3.9	5.1	12.1
0507004	5.4	3.7	5.2	5.4	4.4	15.6
	5.3	5.1	4.9	3.6	4.5	14.3
	4.5	3.9	3.5	5.4	4.3	16.6

0509010	4.6	5.1	4.6	4.8	4.6	4.6
	3.8	3.9	5.1	3.9	4.8	14.1
	5.1	4.8	3.8	5.2	4.2	13.0

2、试剂盒的准确度测定

每个鸡肉样品、饲料样品、尿样样品分别按 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度、按 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度添加 19-去甲睾酮标准品，分别利用实施例 1 或实施例 2 的试剂盒按照实施例 1 或实施例 2 的方法检测常山酮，每个浓度做 4 个平行，分别计算准确度。实施例 1 的试剂盒测定结果如表 9 所示，结果表明鸡肉添加的准确度在 71.9%-103.2%之间，饲料添加准确度在 82.4%-112.4%之间，尿液添加准确度在 67.5%-108.7%之间。

表9 实施例1的试剂盒的准确度测定试验 $\mu\text{g}/\text{kg}(\text{L})$

样本		鸡肉		饲料		尿液	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		25	50	25	50	25	50
准确度%	1	83.4	103.2	94.8	83.4	108.7	83.4
	2	71.9	86.4	81.6	82.5	82.4	67.5
	3	98.4	72.9	76.5	96.5	82.9	94.8
	4	68.2	84.3	74.9	112.4	97.8	106.4
平均值CV%		80.4	86.7	81.9	93.7	92.9	88.0

实施例 2 的试剂盒测定结果如表 10 所示，结果表明鸡肉添加的准确度在 68.5-96.4 之间，饲料添加准确度在 65.2-102.3 之间，尿液添加准确度在 73.5-101.3 之间。

表10 实施例2的试剂盒的准确度测定试验 $\mu\text{g}/\text{kg}(\text{L})$

样本		鸡肉		饲料		尿液	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		25	50	25	50	25	50
准确度%	1	75.3	87.6	65.2	78.5	78.4	94.2
	2	85.6	81.2	74.6	84.6	84.3	84.6
	3	94.2	88.3	88.1	93.2	101.3	73.5
	4	96.4	68.5	102.3	84.4	98.4	78.3
平均值CV%		87.9	81.4	82.6	85.2	90.6	82.7

3、试剂盒保存期试验

将实施例 1 和实施例 2 制备的试剂盒分别保存在 2-8℃，6 个月后，测定试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度、19-去甲睾酮添加实际测定值，结果表明实施例 1 的试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度，实施例 2 的试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中，会有非正常保存条件出现，将上述试剂盒在 37℃ 保存的条件下放置 6 天，进行加速老化实验，结果表明实施例 1 和实施例 2 制备的试剂盒各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生，将试剂盒放入-20℃冰箱冷冻 5 天，测定结果也表明实施例 1 和实施例 2 制备的试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出实施例 1 和实施例 2 制备的试剂盒可以在 2-8℃ 至少可以保存 6 个月以上。

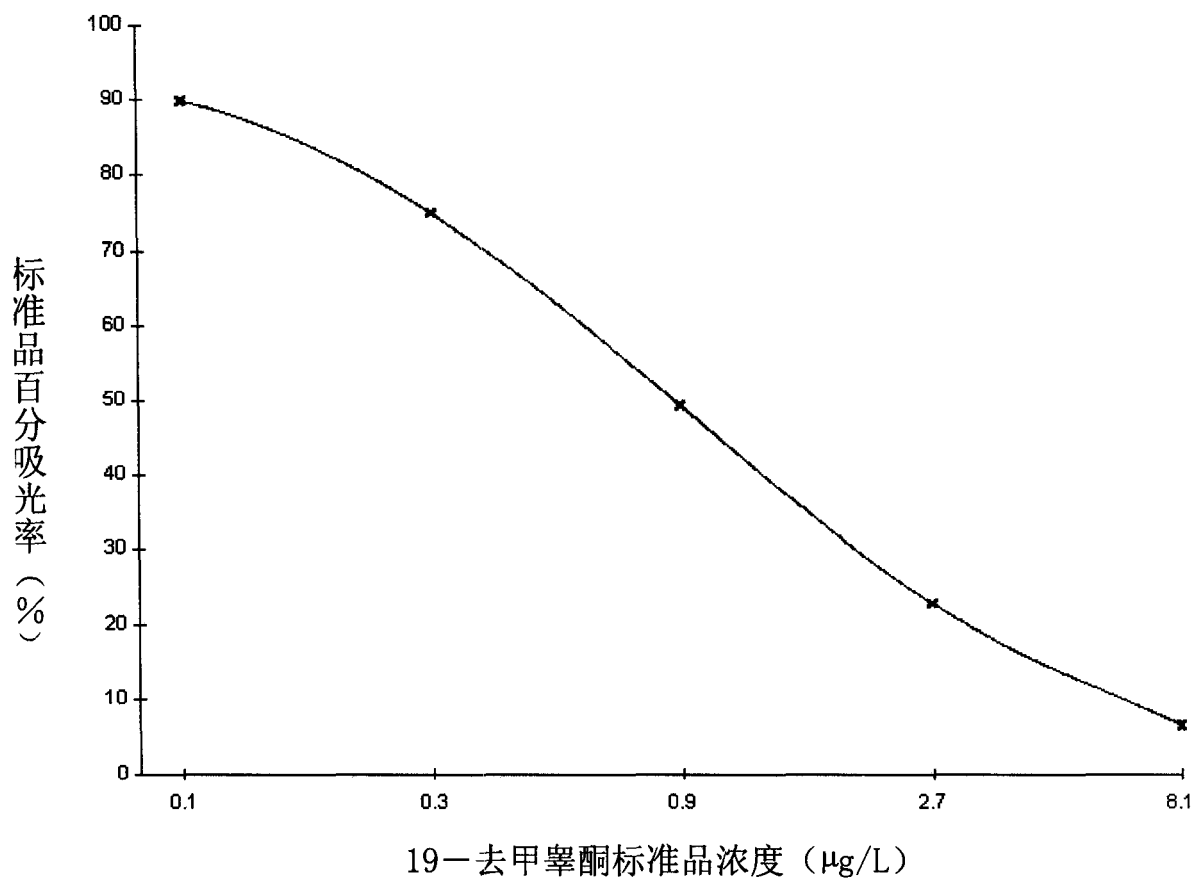


图 1

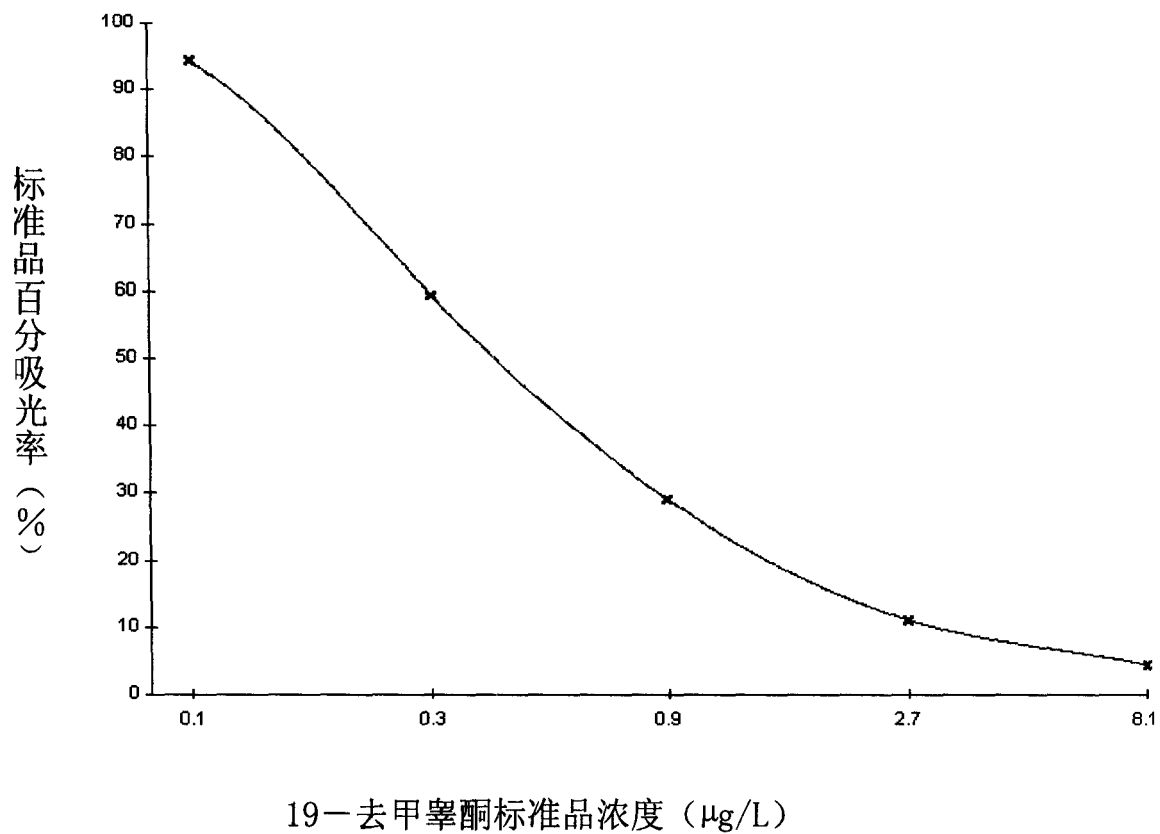


图 2

专利名称(译)	一种检测19 - 去甲睾酮的方法及其专用酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN1811443A	公开(公告)日	2006-08-02
申请号	CN200610007287.6	申请日	2006-02-17
[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	沈建忠 何方洋 万宇平 张素霞 冯才伟 史为民 吴小平 汪善良 江海洋		
发明人	沈建忠 何方洋 万宇平 张素霞 冯才伟 史为民 吴小平 汪善良 江海洋		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/535		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN100445746C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测19 - 去甲睾酮的方法及其专用酶联免疫试剂盒。该检测19 - 去甲睾酮的酶联免疫试剂盒，包括19 - 去甲睾酮特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为19 - 去甲睾酮半抗原与载体蛋白的偶联物或抗体；所述酶标记物为酶标抗体或酶标19 - 去甲睾酮半抗原；当所述包被原为19 - 去甲睾酮半抗原与载体蛋白的偶联物时，所述酶标记物为酶标抗体；当所述包被原为抗体时，所述酶标记物为酶标19 - 去甲睾酮半抗原。本发明的方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查的检测动物组织、尿样中19 - 去甲睾酮药物残留量。

$$\text{百分吸光度值 (\%) = } \frac{B}{B_0} \times 100\%$$