

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710022047.8

[43] 公开日 2007年11月7日

[11] 公开号 CN 101066998A

[22] 申请日 2007.4.27

[21] 申请号 200710022047.8

[71] 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道1800号

[72] 发明人 金征宇 彭池方 胥传来 谢正军

[74] 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
代理人 时旭丹 刘品超

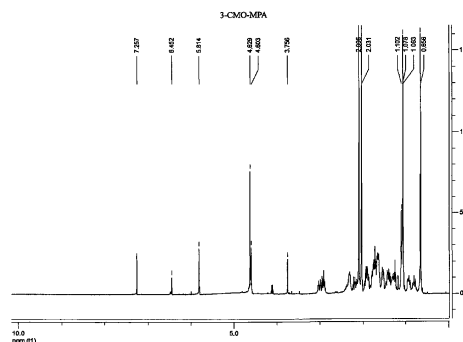
权利要求书2页 说明书9页 附图3页

[54] 发明名称

甲羟孕酮醋酸酯特异性抗体的制备及该抗体用于同源或异源酶联免疫分析的方法

[57] 摘要

甲羟孕酮醋酸酯特异性抗体的制备及该抗体用于同源或异源酶联免疫分析的方法，属于酶联免疫分析技术领域。本发明制备了半抗原3-羧甲基肼基-6-甲基-17 α -羟基-孕甾-20-酮醋酸酯(3-CMO-MPA)、3-羧甲基肼基-6-氯-17 α -羟基-孕甾-6-烯-20-酮醋酸酯(3-CMO-CMA)或3-羧甲基肼基-6-甲基-17 α -羟基-孕甾-6-烯-20-酮醋酸酯(3-CMO-MEGA)。将半抗原3-CMO-MPA与蛋白质偶联，制备免疫抗原；将半抗原3-CMO-MPA、3-CMO-CMA或3-CMO-MEGA与蛋白质偶联，制备三种包被抗原。将免疫抗原免疫动物，产生的抗体能与甲羟孕酮醋酸酯发生特异性的反应，用该抗体建立的同源或异源酶联免疫分析方法可快速、灵敏的检测样本中的甲羟孕酮醋酸酯含量。



1、一种甲羟孕酮醋酸酯特异性抗体的制备方法，其特征在于：

1) 人工半抗原的合成：以甲羟孕酮醋酸酯、氯地孕酮醋酸酯或甲地孕酮醋酸酯为原料，其与羧甲基氧胺盐酸盐的投料摩尔比为1:1.2~1:1.5，在甲醇中溶解甲羟孕酮醋酸酯、氯地孕酮醋酸酯或甲地孕酮醋酸酯，然后将羧甲基氧胺盐酸盐和适量的乙酸钠溶于其中，使pH为5~7，室温下搅拌24小时，减压蒸馏去除甲醇后，用乙酸乙酯萃取残余物，经Na₂SO₄干燥，过滤，蒸馏去除乙酸乙酯，干燥得到白色固体为3-羧甲基肟基-6-甲基-17 α -羟基-孕甾-20-酮醋酸酯(3-CMO-MPA)、3-羧甲基肟基-6-氯-17 α -羟基-孕甾-6-烯-20-酮醋酸酯(3-CMO-CMA)或3-羧甲基肟基-6-甲基-17 α -羟基-孕甾-6-烯-20-酮醋酸酯(3-CMO-MEGA)；

2) 人工抗原的合成：

a 免疫原的合成与纯化

免疫原采用碳二亚胺法合成，将50 μ mol半抗原3-CMO-MPA加入到1mL的N,N-二甲基甲酰胺中溶解，加入50 μ mol的二环己基碳二亚胺和50 μ mol的N-羟基琥珀酰亚胺，室温反应过夜，离心，取上清溶液100~800 μ l缓慢加入到4mL 10mg/mL的牛血清白蛋白硼酸缓冲溶液中，搅拌反应1小时，然后透析袋中对0.01 mol/L磷酸缓冲液透析，分装保存于-20 $^{\circ}$ C；

b 包被抗原的合成与纯化

包被抗原采用混合酸酐法合成，将50 μ mol半抗原3-CMO-MPA、3-CMO-CMA或3-CMO-MEGA加入到1mL的N,N-二甲基甲酰胺中溶解，加入50 μ mol的三丁胺和50 μ mol氯甲酸异丁酯，4 $^{\circ}$ C下反应1小时，将反应液加入到10~20mg/mL的卵清蛋白碳酸缓冲溶液中，搅拌反应2小时，然后透析袋中对0.01 mol/L磷酸缓冲液和纯水透析，分装保存于-40 $^{\circ}$ C；

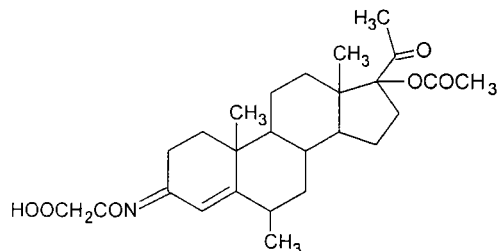
3) 抗体的制备：

a 免疫动物血清的制备：选用三月龄、体重2kg雌性新西兰白兔，将3-CMO-MPA免疫原免疫三只，免疫剂量为0.5~1.5mg免疫原/次·只，初次免疫，免疫原中加入等体积的弗氏完全佐剂，充分乳化，直至滴入水中不分散，兔背部皮下多点注射免疫原，3~4周后，进行加强免疫，以后2~3周进行加强免疫，加强免疫时采用弗氏不完全佐剂，待血清质量合格后，采用心脏取血法采血，收集在试管中的血液凝固后，然后放置在37 $^{\circ}$ C温箱中半小时，再放到4 $^{\circ}$ C冰箱中过夜，待血块收缩后，5000rpm离心15min，分离出血清；

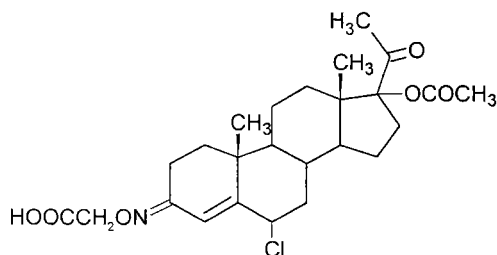
b 血清的纯化：采用DEAE阴离子交换树脂纯化法纯化血清，在pH7.2的0.01M PBS缓冲液中平衡树脂，用0.01M PBS缓冲液将血清稀释一倍，按1mL

稀释后血清比 1mL 树脂的比例与树脂混合，4℃吸附 1 小时，然后装柱，pH7.2 的 0.01M PBS 缓冲液洗脱两倍柱体积后，收集洗脱液，加入洗脱液的等体积甘油，-40℃保存，即为抗体产品。

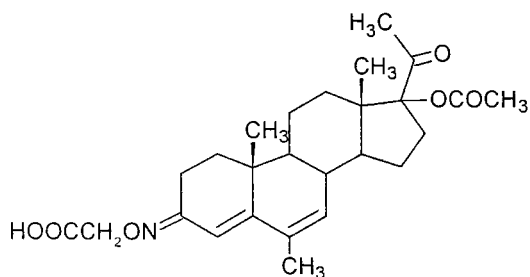
2、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征是人工合成的半抗原为 3-羧甲基肼基-6-甲基-17 α -羟基-孕甾-20-酮醋酸酯（3-CMO-MPA），分子结构为：



3-羧甲基肼基-6-氯-17 α -羟基-孕甾-6-烯-20-酮醋酸酯（3-CMO-CMA），分子结构为：



或 3-羧甲基肼基-6-甲基-17 α -羟基-孕甾-6-烯-20-酮醋酸酯(3-CMO-MEGA)，分子结构为：



3、用权利要求1方法制备的抗体用于同源或异源酶联免疫分析的方法，其特征是：采用抗原包被的间接竞争ELISA 方法，包被抗原与免疫原的制备采用同样的半抗原，称为同源的ELISA 方法；包被抗原与免疫原的制备采用不同的半抗原，则称为异源的ELISA 方法；用半抗原3-CMO-MPA与蛋白质偶联，制备免疫抗原；用半抗原3-CMO-MPA、3-CMO-CMA或3-CMO-MEGA与蛋白质偶联，制备三种包被抗原；3-CMO-MPA免疫原将包被抗原吸附于酶标板上，然后加入待测样品，与抗体竞争反应，再加入酶标记的二抗，与结合的抗体反应，最后结合的酶催化底物溶液显色来定量待测样品中甲羟孕酮醋酸酯的含量。

甲羟孕酮醋酸酯特异性抗体的制备及该抗体用于同源或异源酶联免疫分析的方法

技术领域

甲羟孕酮醋酸酯特异性抗体的制备及该抗体用于同源或异源酶联免疫分析的方法，本发明涉及一种特异性好、灵敏度高的甲羟孕酮醋酸酯的 ELISA 分析方法，属于酶联免疫分析技术领域。

背景技术

甲羟孕酮醋酸酯（Medroxyprogesterone acetate, MPA）是一种合成的甾体类孕激素。在人体的药物应用中，被用作激素替代治疗中的避孕药和激素依赖性肿瘤的治疗。在兽药应用中，可用于动物治疗和饲养促生长。由于不当使用和非法使用，使得动物食品中残留过量的 MPA，可对人体生殖产生抑制作用，尤其是对儿童的健康产生潜在威胁，可能会产生各种慢性和积蓄性毒性，如“三致作用”（致癌、致畸、致突变）。

由于甲羟孕酮醋酸酯具有显著的同化作用，可显著促进动物生长，在美国、澳大利亚、新西兰已批准用于动物饲料添加剂，但有严格的停药期。我国和欧盟禁止其用作饲料添加剂，但仍有非法使用。为了保障我国动物食品消费者的健康和安全，加强对甲羟孕酮醋酸酯的分析监测非常必要的。

测定食品和环境中的甲羟孕酮醋酸酯残留的方法主要有高效液相色谱法、色谱-质谱联用以及免疫分析法。其中酶联免疫分析法（ELISA）特异性好、成本低、样品通量高，在食品安全监测中具有非常重要的作用。但寻求操作简便、灵敏度高、特异性高的酶联免疫分析法（ELISA）一直是科研工作者的研究方向。

目前，国内外对甲羟孕酮醋酸酯残留的 ELISA 方法研究较少，新型抗体和 ELISA 方法的建立为甲羟孕酮醋酸酯残留分析提供了一个有力的手段。

发明内容

本发明的目的是提供一种甲羟孕酮醋酸酯特异性抗体的制备方法，同时提供其同源或异源酶联免疫分析方法。

本发明技术方案：

一种甲羟孕酮醋酸酯特异性抗体的制备方法，其步骤为：

1)人工半抗原的合成：以甲羟孕酮醋酸酯、氯地孕酮醋酸酯或甲地孕酮醋酸酯为原料，其与羧甲基氧胺盐酸盐的投料摩尔比为1:1.2~1:1.5，在甲醇中溶解甲羟孕酮醋酸酯、氯地孕酮醋酸酯或甲地孕酮醋酸酯，将羧甲基氧胺盐酸盐和适量的乙酸钠溶于其中，使pH为5~7，室温下搅拌24小时。减压蒸馏去除甲醇后，

用乙酸乙酯(3×20 ml)萃取残余物,经Na₂SO₄干燥,过滤,蒸馏去除乙酸乙酯,干燥得到白色固体为3-羧甲基脲基-6-甲基-17 α -羟基-孕甾-20-酮醋酸酯(3-CMO-MPA)、3-羧甲基脲基-6-氯-17 α -羟基-孕甾-6-烯-20-酮醋酸酯(3-CMO-CMA)或3-羧甲基脲基-6-甲基-17 α -羟基-孕甾-6-烯-20-酮醋酸酯(3-CMO-MEGA);

2) 人工抗原的合成:

a 免疫原的合成与纯化

免疫原采用碳二亚胺法合成,将50 μ mol半抗原3-CMO-MPA加入到1mL的N,N-二甲基甲酰胺中溶解,加入50 μ mol的二环己基碳二亚胺和50 μ mol的N-羟基琥珀酰亚胺,室温反应过夜,离心,取上清溶液100~800 μ l缓慢加入到4mL 10mg/mL的牛血清白蛋白(BSA)硼酸缓冲溶液中,搅拌反应1小时,然后透析袋中对0.01 mol/L磷酸缓冲液透析,分装保存于-20 $^{\circ}$ C;

b 包被抗原的合成与纯化

包被抗原采用混合酸酐法合成,将50 μ mol半抗原3-CMO-MPA、3-CMO-CMA或3-CMO-MEGA加入到1mL的N,N-二甲基甲酰胺中溶解,加入50 μ mol的三丁胺和50 μ mol氯甲酸异丁酯,4 $^{\circ}$ C下反应1小时,将反应液加入到10~20mg/mL的卵清蛋白(OVA)碳酸缓冲溶液中,搅拌反应2小时。转入透析袋,然后透析袋中对0.01 mol/L磷酸缓冲液和纯水透析,分装保存于-40 $^{\circ}$ C;

3) 抗体的制备:

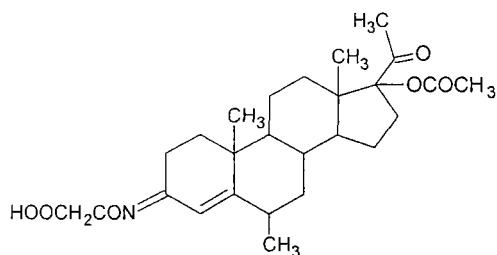
a 免疫动物血清的制备

选用三月龄、体重2kg雌性新西兰白兔,将3-CMO-MPA免疫原免疫三只,免疫剂量为0.5~1.5mg免疫原/次·只,初次免疫,免疫原中加入等体积的弗氏完全佐剂,充分乳化,直至滴入水中不分散,兔背部皮下多点注射免疫原,3~4周后,进行加强免疫,以后2~3周进行加强免疫,加强免疫时采用弗氏不完全佐剂,待血清质量合格后,采用心脏取血法采血,收集在试管中的血液凝固后,然后放置在37 $^{\circ}$ C温箱中半小时,再放到4 $^{\circ}$ C冰箱中过夜,待血块收缩后,5000rpm离心15min,分离出血清;

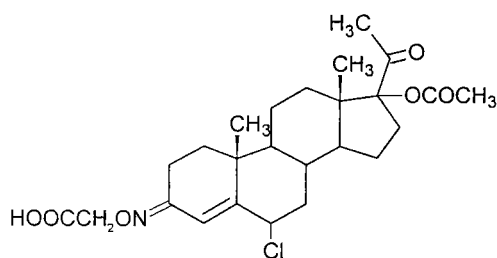
b 血清的纯化

采用DEAE阴离子交换树脂纯化法纯化血清,在0.01M PBS缓冲液(pH7.2)中平衡树脂,用0.01M PBS缓冲液将血清稀释一倍,按1mL稀释后血清比1mL树脂的比例与树脂混合,4 $^{\circ}$ C吸附1小时,然后装柱,0.01M PBS缓冲液(pH7.2)洗脱两倍柱体积后,收集洗脱液,加入洗脱液等体积甘油,-40 $^{\circ}$ C保存,即为抗体产品。

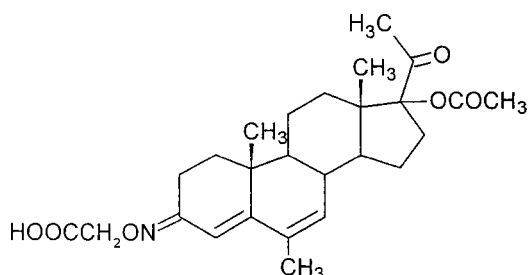
所述的制备方法人工合成的半抗原为3-羧甲基脲基-6-甲基-17 α -羟基-孕甾-20-酮醋酸酯(3-CMO-MPA),分子结构为:



3-羧甲基肼基-6-氯-17 α -羟基-孕甾-6-烯-20-酮醋酸酯 (3-CMO-CMA), 分子结构为:



或3-羧甲基肼基-6-甲基-17 α -羟基-孕甾-6-烯-20-酮醋酸酯(3-CMO-MEGA), 分子结构为:



所制备的抗体用于同源或异源酶联免疫分析的方法: 采用抗原包被的间接竞争ELISA 方法, 包被抗原与免疫原的制备采用同样的半抗原, 称为同源的ELISA 方法; 包被抗原与免疫原的制备采用不同的半抗原, 则称为异源的ELISA 方法; 用半抗原3-CMO-MPA与蛋白质偶联, 制备免疫抗原; 用半抗原3-CMO-MPA、3-CMO-CMA或3-CMO-MEGA与蛋白质偶联, 制备三种包被抗原; 3-CMO-MPA免疫原将包被抗原吸附于酶标板上, 然后加入待测样品, 与抗体竞争反应, 再加入酶标记的二抗, 与结合的抗体反应, 最后结合的酶催化底物溶液显色来定量待测样品中甲羟孕酮醋酸酯的含量。

本发明的有益效果: 本发明通过合成半抗原、人工抗原、经动物免疫产生特异性抗体, 以抗原抗体特异性反应为基础, 建立对甲羟孕酮醋酸酯的同源或异源酶联免疫分析方法。这种方法对甲羟孕酮醋酸酯灵敏度高、特异性强, 适合食品中甲羟孕酮醋酸酯残留的分析。

附图说明

图 1 3-CMO-MPA 核磁共振氢谱。

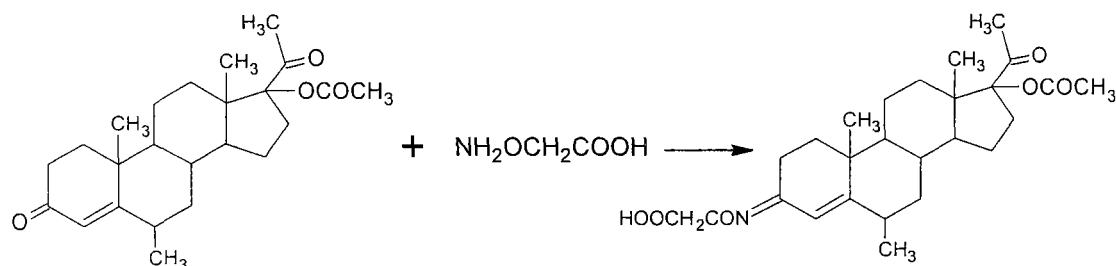
图 2 3-CMO-CMA 核磁共振氢谱。

图 3 3-CMO-MEGA 核磁共振氢谱。

具体实施方式

实施例 1: 人工半抗原 3-羧甲基肟基-6-甲基-17 α -羟基-孕甾-20-酮醋酸酯 (3-CMO-MPA) 的合成

反应式:

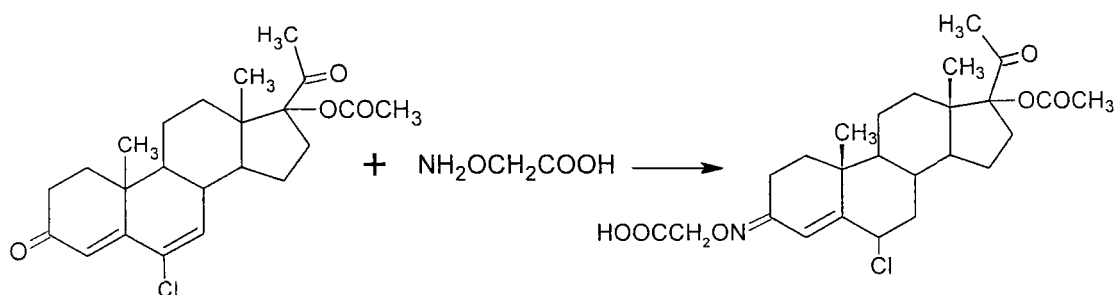


按投料比甲羟孕酮醋酸酯 (MPA): 羧甲基氧胺盐酸盐=1:1.2mol 比, 称取 1 mmol MPA 溶解于甲醇中, 然后将 1.2mmol 羧甲基氧胺盐酸盐和适量的乙酸钠溶于其中, 使 pH 为 6, 室温下搅拌 24 小时。减压蒸馏去掉甲醇后, 乙酸乙酯 (3 \times 20 ml) 萃取残余物, 然后称取 10g Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 蒸馏去除乙酸乙酯, 干燥得到白色固体为 3-CMO-MPA。

取上述产物分别经 ESI 和 ¹H-NMR 测定其结构。该物质的 ESI 分子离子峰为 459 (M⁻¹), ¹H-NMR (CDCl₃) 为: δ 0.66 (s, 3H, 18-CH₃); 1.06 and 1.10 (2s, 3H, E and Z 19-CH₃); 2.03 (s, 3H, CH₃CO); 2.10 (s, 3H, CH₃COO); 4.60 and 4.63 (2s, 2H, CH₂, Z 30% and E 70% CMO); 6.50 and 7.26 (2s, 1H, E and Z 4-H)。

实施例 2: 人工半抗原 3-羧甲基肟基-6-氯-17 α -羟基-孕甾-6-烯-20-酮醋酸酯 (3-CMO-CMA) 的合成

反应式:



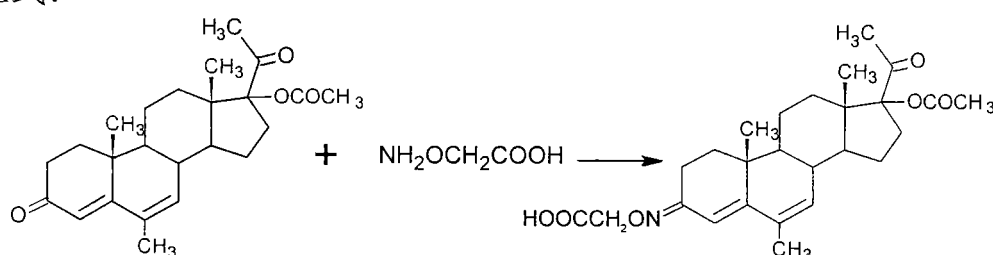
按投料比氯地孕酮醋酸酯:羧甲基氧胺盐酸盐=1:1.5mol 比, 称取 1 mmol CMA 溶解于甲醇中, 然后将 1.5 mmol 羧甲基氧胺盐酸盐和适量的乙酸钠溶于其中, 使 pH 为 6, 室温下搅拌 24 小时。减压蒸馏去掉甲醇后, 乙酸乙酯 (3 \times 20 ml) 萃取残余物, 然后称取用 10g Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 蒸馏去除乙酸乙酯, 干燥得

到白色固体为 3-CMO-CMA。

取上述产物分别经 ESI 和 $^1\text{H-NMR}$ 测定其结构。该物质的 ESI 分子离子峰 477 ($M-1$), $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 为: δ 0.70 (s, 3H, 18- CH_3); 1.00 and 1.05 (2s, 3H, E and Z 19- CH_3); 2.05 (s, 3H, CH_3CO); 2.09 (s, 3H, CH_3COO); 4.66 and 4.70 (2s, 2H, CH_2 , Z 33% and E 67% CMO); 6.05, 6.15, (2d, 1H, E and Z 7-H); 6.50 and 7.11 (2s, 1H, E and Z 4-H)。

实施例 3: 人工半抗原 3-羧甲基胍基-6-甲基-17 α -羟基-孕甾-6-烯-20-酮醋酸酯 (3-CMO-MEGA) 的合成

反应式:



按投料比甲地孕酮醋酸酯:羧甲基氧胺盐酸盐=1:1.5mol 比, 称取 1 mmol MEGA 溶解于甲醇中, 然后将 1.5 mmol 羧甲基氧胺盐酸盐和适量的乙酸钠溶于其中, 使 pH 为 6, 室温下搅拌 24 小时。减压蒸馏去掉甲醇后, 乙酸乙酯 (3 \times 20 ml) 萃取残余物, 然后称取用 10g Na_2SO_4 干燥, 过滤, 蒸馏去除乙酸乙酯, 干燥得到白色固体为 3-CMO-MEGA。

取上述产物分别经 ESI 和 $^1\text{H-NMR}$ 测定其结构。该物质的 ESI 分子离子峰 477 ($M-1$), $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 为: δ 0.70 (s, 3H, 18- CH_3); 0.95 and 1.00 (2s, 3H, E and Z 19- CH_3); 2.05 (s, 3H, CH_3CO); 2.09 (s, 3H, CH_3COO); 4.63 and 4.67 (2s, 2H, CH_2 , Z 30% and E 70% CMO); 5.71, 6.00 (2d, 1H, E and Z 7-H); 6.61 and 7.26 (2s, 1H, E and Z 4-H)。

实施例 4: 3-CMO-MPA 的免疫原和包被抗原合成

免疫原的合成与纯化

免疫原采用碳二亚胺法合成。将 50 mmol 半抗原 3-CMO-MPA 加入到 1mL N, N-二甲基甲酰胺中溶解, 加入 50mmol 的二环己基碳二亚胺和 50 mmol N-羟基琥珀酰亚胺, 室温反应过夜, 离心, 取上清溶液 100~800 μl 缓慢加入到 4mL 10mg/mL 的牛血清白蛋白 (BSA) 硼酸缓冲溶液中, 磁力搅拌反应 1 小时, 然后透析袋中对 0.01 mol/L 磷酸缓冲 5 \times 5 L 透析, 分装保存于 -20 $^\circ\text{C}$ 中。

包被抗原的合成与纯化

包被抗原采用混合酸酐法合成。将 50 mmol 半抗原 3-CMO-MPA 加入到 1mL N, N-二甲基甲酰胺中溶解, 加入 50mmol 的三丁胺和 50 mmol 氯甲酸异丁酯, 4 $^\circ\text{C}$ 下反应 1 小时。反应液加入 10~20mg/mL 的卵清蛋白 (OVA) 碳酸缓冲溶液

中，搅拌反应 2 小时。然后转入透析袋，分别用 0.01mol/mL 的磷酸盐缓冲液和纯水透析，分装-40℃冷冻干燥保存。

人工抗原的鉴定

分别紫外扫描 3-CMO-MPA、载体蛋白及偶联物（200~500 nm），确定各物质的摩尔吸光系数，计算半抗原和载体蛋白的结合比如下：

3-CMO-MPA-BSA 5~20:1 3-CMO-MPA-OVA 2~15:1

实施例 5：3-CMO-CMA 的包被抗原合成

采用混合酸酐法合成。将 50mmol 半抗原 3-CMO-CMA 加入到 1mL N, N-二甲基甲酰胺中溶解，加入 50mmol 的三丁胺和 50mmol 氯甲酸异丁酯，4℃下反应 1 小时。反应液加入到 10~20mg/mL 的卵清蛋白（OVA）碳酸缓冲溶液中，搅拌反应 2 小时。然后转入透析袋，分别用 0.01mol/mL 的磷酸盐缓冲液和纯水透析，分装-40℃冷冻干燥保存。

人工抗原的鉴定

分别紫外扫描 3-CMO-CMA、载体蛋白及偶联物（200~500 nm），确定各物质的摩尔吸光系数，计算半抗原和载体蛋白的结合比如下：

3-CMO-CMA-OVA 2~12:1

实施例 6：3-CMO-MEGA 的包被抗原合成

包被抗原采用混合酸酐法合成。将 50mmol 半抗原 3-CMO-MEGA 加入到 1mL N, N-二甲基甲酰胺中溶解，加入 50mmol 的三丁胺和 50mmol 氯甲酸异丁酯，4℃下反应 1 小时。反应液加入到 10~20mg/mL 的卵清蛋白（OVA）碳酸缓冲溶液中，搅拌反应 2 小时。然后转入透析袋，分别用 0.01mol/mL 的磷酸盐缓冲液和纯水透析，分装-40℃冷冻干燥保存。

人工抗原的鉴定

分别紫外扫描 3-CMO-MEGA、载体蛋白及偶联物（200~500 nm），确定各物质的摩尔吸光系数，计算半抗原和载体蛋白的结合比如下：

3-CMO-MEGA-OVA 5~15:1

实施例 7：MPA 抗体的制备

免疫动物血清的制备

选用三月龄、体重 2kg 左右雌性新西兰白兔，免疫三只。免疫剂量为 0.5~1.5mg 免疫原/次·只。初次免疫，免疫原中加入等体积的弗氏完全佐剂，充分乳化，直至滴入水中不分散，兔背部皮下多点注射的免疫原。3~4 周后，进行加强免疫，以后 2~3 周进行加强免疫，加强免疫时采用弗氏不完全佐剂。从第三次免疫开始，在免疫后一周于白兔耳缘静脉采血，血清经适当稀释后采用间接 ELISA 测定其效价和特异性。免疫血清达到要求后，进行采血，分离血清。

本试验采用心脏取血法。每只兔子可得血 80mL 左右。采血后，待收集在试

管中的血液凝固后，然后放置在 37℃温箱中半小时，再放到 4℃冰箱中过夜，待血块收缩后，将血清吸出，5000rpm 离心 15min，分离出血清。

抗体的纯化

采用 DEAE 阴离子交换树脂纯化法纯化抗体。在 0.01M PBS 缓冲液(pH7.2) 中平衡树脂，将稀释一倍的血清，按 1mL 血清/1mL 树脂的比例与树脂混合，4℃ 吸附 1 小时，然后装柱，0.01M PBS 缓冲液 (pH7.2) 洗脱两倍柱体积后，收集洗脱液，加入等量甘油，分装-40℃保存。

实施例 8：甲羟孕酮醋酸酯的 ELISA 方法

甲羟孕酮醋酸酯 ELISA 方法的原理

采用抗原包被的间接竞争 ELISA 方法。免疫原采用 3-CMO-MPA-BSA，包被抗原分别采用 3-CMO-MPA-OVA、3-CMO-CMA-OVA 或 3-CMO-MEGA-OVA。包被抗原与免疫原的制备采用同样的半抗原，称为同源的 ELISA 方法，如果采用不同的半抗原，则称为异源的 ELISA 方法。将包被抗原吸附于 96 孔酶标板上，然后加入待测药物，与抗体竞争反应，待测药物含量越高，与固相上的包被抗原结合的抗体就越少。然后再加入酶标记的二抗，与结合的抗体反应，最后结合的酶催化底物溶液显色来定量待测药物的量。

ELISA 方法的建立

1)采用不同的包被抗原建立 ELISA 方法。得到一种同源,两种异源的 ELISA 方法。

2) 方阵滴定法确定包被抗原、抗体和 HRP 酶标记羊抗兔 IgG 的最适工作浓度。

将抗原、抗体及酶标记物系列稀释，采用非竞争 ELISA 法分析不同浓度下的吸光值，选择吸光值在 1.0 左右的工作浓度。具体操作如下：

将包被抗原用包被缓冲液作系列稀释，1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000 稀释后按列包被 6 列 96 孔酶标板，100 μL/孔，于 4℃冰箱过夜。次日取出酶标板回至室温，每孔注入 200 μL PBST 溶液，摇床上振荡 3min，用力甩掉洗涤液，在吸水纸上拍干，继续洗涤 2 次（以下洗涤方法相同）。用封闭液封闭酶标板，200 μL/孔，于 37℃温育箱内温育 2h 后，取出洗涤，烘干。

将抗体系列稀释成 1:600、1:1800、1:3600、1:7200、1:14400、1:28800、1:57600 和 1:115200，安排对应加入到酶标板的 1~6 列，100 μL/孔，35℃孵育 30min 后洗涤、拍干。

每孔加入 100 μL,1:3000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG，25℃孵育 30min 后洗涤、拍干。

每孔加入 100 μL 显色液（0.1 g/L 四甲基联苯胺与 0.05 g/L 过氧化氢的柠檬

酸缓冲溶液), 暗处 35℃ 反应 30min, 取出后每孔加入 100μL 终止液(2mol/L 的硫酸), 用酶标仪测定光密度值 A_{450nm} 。

3) 竞争 ELISA 方法

采用方阵法确定的各免疫反应物合适工作浓度。在抗原包被的板中加入系列抗原标准液 50μL 和抗体溶液 50 μL, 35℃ 孵育 30min, 洗涤。再加入酶标溶液 100μL 35℃ 孵育 30min, 洗涤。经显色反应并终止后, 测试 450nm 下吸光值。

4) 竞争 ELISA 方法的灵敏度

根据抑制率与 MPA 浓度的半对数作图得到标准曲线。抑制率按下列公式计算:

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{(A_{\max} - A_{\min}) - (A_x - A_{\min})}{(A_{\max} - A_{\min})} \times 100\%$$

公式中: A_{\max} 为不加标准液时的吸光值, A_{\min} 为空白对照孔的吸光值, A_x 为加入兽药标准液时的吸光值。

由上述公式计算得到各 MPA 浓度的抑制率。同源 ELISA 方法测定 MPA 时, 抑制率为 50% 时的浓度 (IC_{50}) 为 10 ng/mL, 灵敏度 (以抑制率为 10% 时的浓度表示, IC_{10}) 为 0.2 ng/mL。采用 3-CMO-CMA-OVA 为包被抗原, 异源 ELISA 方法测定 MPA 时, IC_{50} 为 2.0 ng/mL, 灵敏度为 0.05 ng/mL。采用 3-CMO-MEGA-OVA 为包被抗原, 异源 ELISA 方法测定 MPA 时, IC_{50} 为 3.9 ng/mL, 灵敏度为 0.05 ng/mL。抑制率与 MPA 浓度呈显著线性关系, 同源 ELISA 法的相关系数为 $r=0.9912$, 采用 3-CMO-CMA-OVA 为包被抗原的异源 ELISA 方法的相关系数 $r=0.9931$, 采用 3-CMO-MEGA-OVA 为包被抗原的异源 ELISA 方法的相关系数 $r=0.9859$ 。

5) ELISA 方法特异性

抗血清的特异性指它特异性抗原的结合能力同该抗原类似物结合能力的比较。常用交叉反应率作为评价指标。交叉反应越小, ELISA 的特异性越好。交叉反应率按如下公式计算:

$$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{标准物的 } IC_{50}}{\text{交叉反应物的 } IC_{50}} \times 100\%$$

式中: 标准物的 IC_{50} 指采用特异性抗原的标液测试 IC_{50} , 交叉反应物的 IC_{50} 为采用类似物测试 IC_{50} 。

同源 ELISA 方法对几种合成孕激素有交叉反应, 对氯地孕酮的交叉反应率为 15.8%, 对甲地孕酮的交叉反应率为 28.5%, 对其他孕激素类似物的交叉反应率小于 0.5%。

采用 3-CMO-CMA-OVA 为包被抗原的异源 ELISA 方法的交叉反应：对氯地孕酮的交叉反应率为 35.2%，对甲地孕酮的交叉反应率为 23.8%，对其他孕激素类似物的交叉反应率小于 0.5%。

采用 3-CMO-MEGA-OVA 为包被抗原的异源 ELISA 方法的交叉反应：对氯地孕酮的交叉反应率为 29.7%，对甲地孕酮的交叉反应率为 45.8%，对其他孕激素类似物的交叉反应率小于 0.5%。

从而得知，所建立的三种 ELISA 方法的灵敏度较高，特异性均较强。

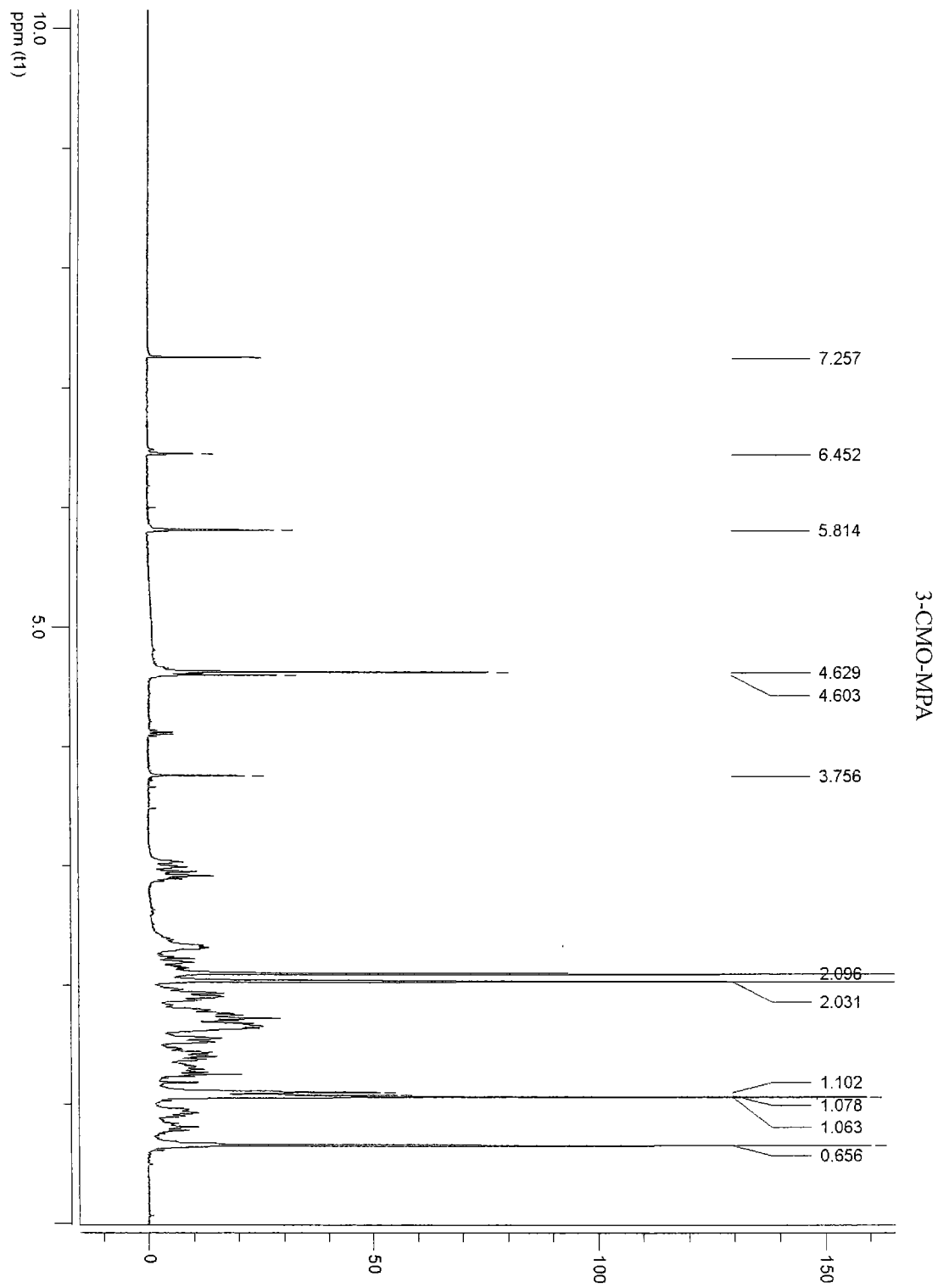


图 1

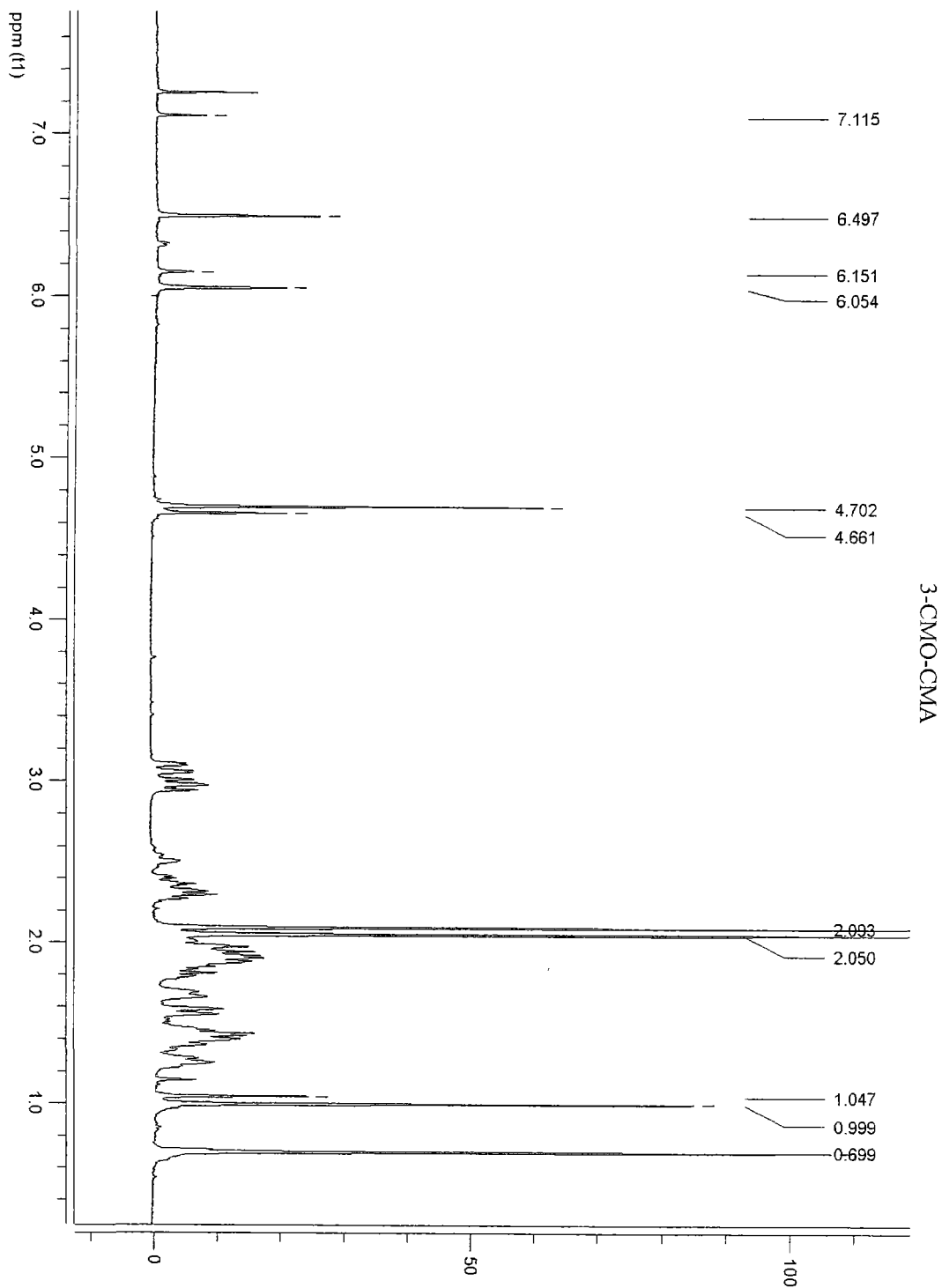


图 2

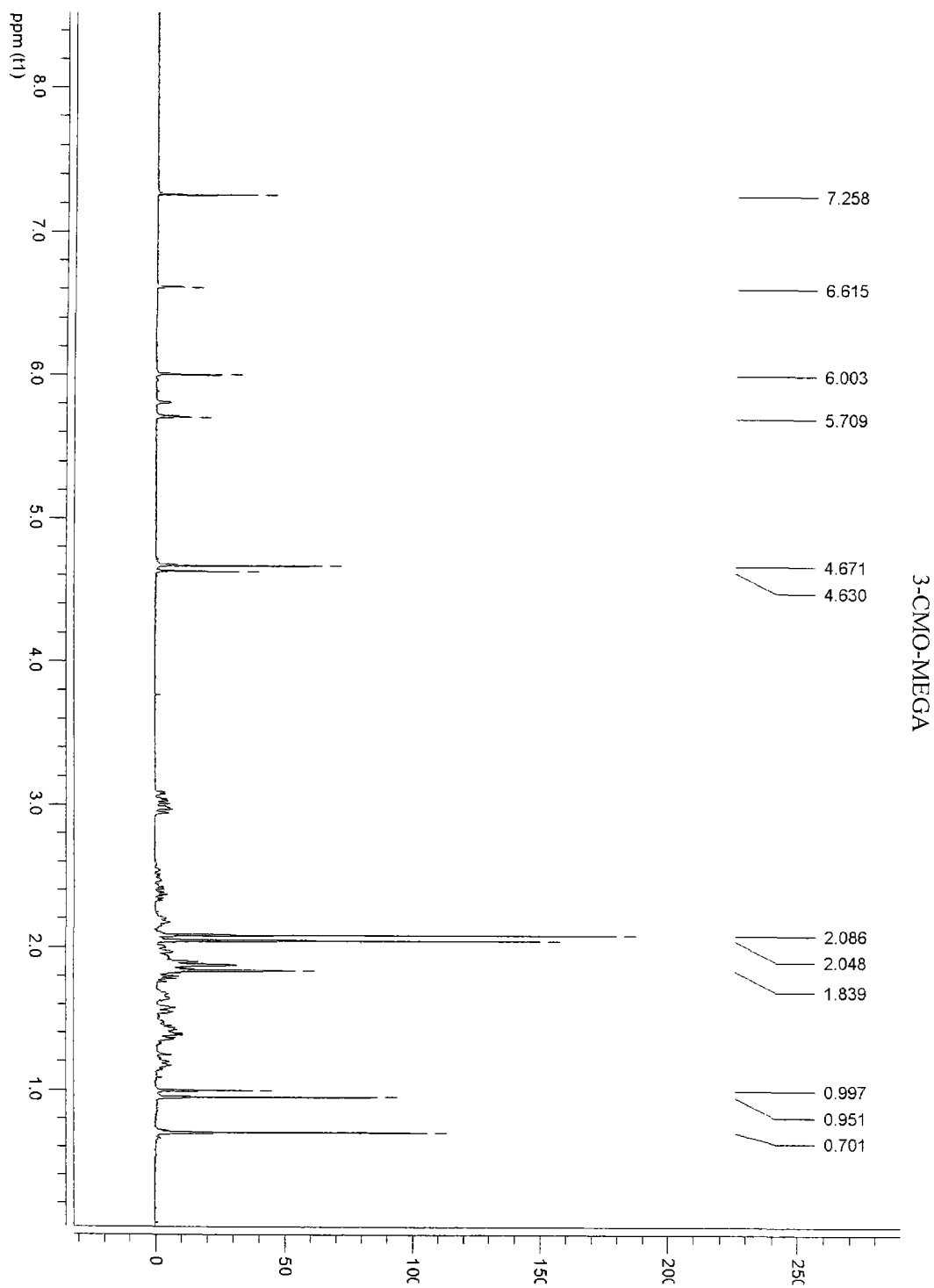


图 3

专利名称(译)	甲羟孕酮醋酸酯特异性抗体的制备及该抗体用于同源或异源酶联免疫分析的方法		
公开(公告)号	CN101066998A	公开(公告)日	2007-11-07
申请号	CN200710022047.8	申请日	2007-04-27
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	金征宇 彭池方 胥传来 谢正军		
发明人	金征宇 彭池方 胥传来 谢正军		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/535		
其他公开文献	CN101066998B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

甲羟孕酮醋酸酯特异性抗体的制备及该抗体用于同源或异源酶联免疫分析的方法，属于酶联免疫分析技术领域。本发明制备了半抗原3-羧甲基肟基-6-甲基-17 α -羟基-孕甾-20-酮醋酸酯(3-CMO-MPA)、3-羧甲基肟基-6-氯-17 α -羟基-孕甾-6-烯-20-酮醋酸酯(3-CMO-CMA)或3-羧甲基肟基-6-甲基-17 α -羟基-孕甾-6-烯-20-酮醋酸酯(3-CMO-MEGA)。将半抗原3-CMO-MPA与蛋白质偶联，制备免疫抗原；将半抗原3-CMO-MPA、3-CMO-CMA或3-CMO-MEGA与蛋白质偶联，制备三种包被抗原。将免疫抗原免疫动物，产生的抗体能与甲羟孕酮醋酸酯发生特异性的反应，用该抗体建立的同源或异源酶联免疫分析方法可快速、灵敏的检测样本中的甲羟孕酮醋酸酯含量。

