



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104849476 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 19

(21) 申请号 201510266768. 8

(22) 申请日 2015. 05. 22

(71) 申请人 天津科技大学

地址 300222 天津市河西区大沽南路 1038 号

(72) 发明人 刘冰 张燕 陆旸 生威 王硕

(74) 专利代理机构 天津滨海科纬知识产权代理有限公司 12211

代理人 刘莹

(51) Int. Cl.

G01N 33/74(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

G01N 33/542(2006. 01)

G01N 1/34(2006. 01)

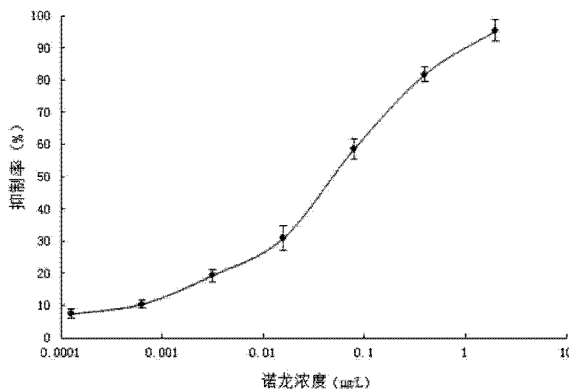
权利要求书3页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

一种用于蛋白同化激素免疫分析的酶标抗原及分析方法

(57) 摘要

本发明提供了一种用于蛋白同化激素免疫分析的酶标抗原及分析方法,属于免疫化学分析技术。所述酶标抗原是由诺龙半抗原与辣根过氧化酶连接制成,所述诺龙半抗原是在诺龙的羟基上引入羧基制成。使用本发明制备的酶标抗原进行诺龙、群勃龙、丙酸诺龙、雄诺龙和美雄诺龙等五种蛋白同化激素多残留化学发光免疫分析,本发明克服了传统酶联免疫分析方法灵敏度低的缺点,提高了免疫检测准确度和检测效率。



1. 一种用于蛋白同化激素免疫分析的酶标抗原,其特征在於:由诺龙半抗原与辣根过氧化酶连接合成,其制备包括如下步骤;

1) 诺龙半抗原的制备,称取 0.5 ~ 2.0g 诺龙溶于 10 ~ 25mL 无水四氢呋喃中,并加入 0.5 ~ 2.0g 丁二酸酐、0.6 ~ 2.0mL 三乙胺和 0.2 ~ 1.5g 4-二甲氨基吡啶,在 62 ~ 70°C 温度下持续反应 8 ~ 17h,随后将溶剂旋干,生成物用体积比为 1:2 ~ 5:6 的石油醚与乙酸乙酯的混合液溶解;以体积比为 1:2 ~ 5:6 的石油醚与乙酸乙酯的混合液为展开剂,进行纯化得到白色晶体,即为诺龙半抗原;

2) 通过活化酯法,以羟基 CO = OH 为桥梁,使诺龙人工半抗原连接到辣根过氧化酶上,即得到酶标抗原。

2. 根据权利要求 1 所述的用于蛋白同化激素免疫分析的酶标抗原,其特征在於:步骤 1) 中,称取 1.316g 诺龙溶于 14.50mL 无水四氢呋喃中,并加入 0.960g 丁二酸酐、1.32mL 三乙胺和 0.584g 4-二甲氨基吡啶,在 60°C 温度下持续反应 12h,随后将溶剂旋干,生成物用体积比为 1:1 的石油醚与乙酸乙酯的混合液溶解;以体积比为 1:1 的石油醚与乙酸乙酯的混合液为展开剂,进行纯化得到白色晶体,即为诺龙半抗原。

3. 根据权利要求 1 所述的用于蛋白同化激素免疫分析的酶标抗原,其特征在於:步骤 2) 中,酶标抗原的制备包括如下步骤,

a) 准确称量 0.03 ~ 0.04mmol 诺龙半抗原溶于 250 ~ 350 μ LN-N 二甲基甲酰胺溶液中,分别加入 3.5 ~ 5.5mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和 2 ~ 3mg N-羟基琥珀酰亚胺避光 5 ~ 6°C 搅拌反应 8 ~ 12h,得甲液;

b) 准确称量 11 ~ 12mg 辣根过氧化酶,加入到 3 ~ 5mL 的碳酸氢钠缓冲液中,缓冲溶液的 pH 为 6 ~ 8,待完全溶解,得乙液,在冰浴条件下将甲液缓慢加入到乙液中,待完全加入后,3 ~ 6°C 避光搅拌 8 ~ 12h,然后将反应液在 3 ~ 6°C、pH 为 6 ~ 8 的磷酸盐缓冲溶液中透析 2 ~ 4 天,即得到酶标抗原溶液。

4. 根据权利要求 3 所述的用于蛋白同化激素免疫分析的酶标抗原,其特征在於:步骤 2) 中,酶标抗原的制备包括如下步骤,

a) 准确称量 0.02mmol 溶于 300 μ LN-N 二甲基甲酰胺溶液中,分别加入 4.78mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和 2.75mg N-羟基琥珀酰亚胺避光 4°C 搅拌反应 10h 左右,得甲液;

b) 准确称量 10.00mg 辣根过氧化酶,加入到 4mL 的碳酸氢钠缓冲液中,缓冲溶液的 pH 为 7.4,待完全溶解,得乙液,在冰浴条件下将甲液缓慢加入到乙液中,待完全加入后,4°C 避光搅拌 12h,然后将反应液在 4°C、pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中透析 3 天,即得到酶标抗原溶液。

5. 一种使用如权利要求 1 ~ 4 所述的用于蛋白同化激素免疫分析的酶标抗原的分析方法,其特征在於:包括如下步骤,

1) 包被,先用磷酸盐缓冲溶液稀释待包被的诺龙抗体,把稀释好的诺龙抗体稀释液加入到酶标板的微孔中,每微孔添加 80 ~ 120 μ L 洗涤液 PBST 缓冲液,加完后把酶标板置于 20 ~ 35°C 条件下反应 10 ~ 15h,弃去孔中液体,向酶标板中加入 200 ~ 300 μ L 洗涤液 PBST 缓冲液,在震荡器上震荡 1 ~ 4min,弃去洗涤液,即为洗板 1 次,重复洗板 2 ~ 5 次;优选的,把稀释好的诺龙抗体稀释液加入到酶标板的微孔中,每微孔添加 100 μ L 洗涤液 PBST 缓冲

液；加完后把酶标板置于 25℃ 条件下反应 10 ~ 15h；然后，弃去孔中液体，向酶标板中加入 250 μ L 的洗涤液 PBST 缓冲液，在震荡器上震荡 1 ~ 4min；弃去洗涤液，即为洗板 1 次，重复洗板 2 ~ 5 次，优选的，重复洗板 3 次；

2) 封闭：向酶标板的每个微孔中加入 150 ~ 250 μ L 封闭液，加完后把酶标板置于 20 ~ 35℃ 条件下，0.5 ~ 1.5h 后取出酶标板弃去封闭液，重复洗板 2 ~ 5 次；优选的，向酶标板的每个微孔中加入 200 μ L 封闭液，加完后把酶标板置于 37℃ 条件下，1h 后取出酶标板弃去封闭液，重复洗板 4 次；所述封闭液为含有质量浓度为 0.5% 脱脂奶粉的磷酸盐缓冲溶液；

3) 竞争反应：向酶标板的每个微孔先加入 50 ~ 150 μ L 梯度稀释好的待测物样溶液或样品提取液，然后再向其中加入 50 ~ 150 μ L 稀释的酶标抗原溶液，酶标抗原是用磷酸盐缓冲溶液进行稀释，酶标板被置于 20 ~ 35℃ 条件下孵育 0.5 ~ 1.5h 之后，重复洗板 2 ~ 5 次；优选的，向酶标板的每个微孔先加入 50 μ L 梯度稀释好的待测物样溶液或样品提取液，然后再向其中加入 50 μ L 稀释的酶标抗原溶液；酶标板被置于 37℃ 条件下孵育 1h 之后，重复洗板 5 次；

4) 检测发光值：将上一步洗好的酶标板置于荧光化学发光分析仪中，设定好相应程序，仪器自动向酶标板的每个微孔中加入 50 ~ 150 μ L 化学发光底物，10 ~ 40s 后仪器立即测定每个微孔的发光强度值；优选的，向酶标板的每个微孔中加入 100 μ L 化学发光底物，30s 后仪器立即测定每个微孔的发光强度值。

6. 根据权利要求 5 所述的使用酶标抗原的分析方法，其特征在于：步骤 1) 中，所述诺龙抗体是经过纯化处理的，纯化处理步骤如下所述，

1) 平衡柱子：用 pH6 ~ 9 的磷酸盐缓冲液冲洗管路，流速 5 ~ 8mL/min，1 ~ 3min，装柱后再用 pH6 ~ 9 的磷酸盐缓冲液平衡柱子，流速 0.5 ~ 2mL/min，直至基线水平；优选的，用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液冲洗管路，流速 6.5mL/min，2min，装柱后再用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液平衡柱子，流速 1mL/min，直至基线水平；

2) 上样：待基线水平后，将三聚氰胺抗血清用等体积 pH6 ~ 9 的磷酸盐缓冲液稀释后上样，优选的，pH 7.4；

3) 上柱，流速为 0.2 ~ 0.8mL/min，上样结束后，用 pH6 ~ 9 的磷酸盐缓冲液冲柱子，流速 0.5 ~ 2.0mL/min，诺龙抗体被特异性吸附在填料位点上，其他杂蛋白随缓冲液流出，直至基线水平；优选的，流速为 0.5mL/min，上样结束后，用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液冲柱子，流速 1mL/min，直至基线水平；

4) 洗脱：用 pH 1.5 ~ 3.5 的洗脱缓冲液洗脱柱子上结合的抗体，洗出目的蛋白，流速为 0.2 ~ 1.5mL/min；优选的，用 pH 2.7 的洗脱缓冲液洗脱柱子上结合的抗体，洗出目的蛋白，流速为 0.5mL/min；

5) 测定：在 200 ~ 350nm 紫外下检测洗脱液蛋白浓度；当吸光度大于 0.1 ~ 0.3 时，收集洗脱液，收集完毕后迅速用 0.5 ~ 2.0mol/L Tris 调 pH 至 6.0 ~ 9.0；优选的，在 280nm 紫外下检测洗脱液蛋白浓度，当吸光度大于 0.2 时，收集洗脱液，收集完毕后迅速用 1mol/L Tris 调 pH 至 7.0；所述 Tris 为三羟甲基氨基甲烷；

6) 抗体的透析与保存：用 pH 6 ~ 9 抗体透析液透析所得抗体，2 ~ 6℃ 透析 2 ~ 4 天，每天换 2 ~ 4 次透析，透析后取出，加入 0.05 ~ 0.2% (W/V) 的 NaN_3 ，3 ~ 5℃ 储存备用；优选的，用 pH7.4 抗体透析液透析所得抗体，4℃ 透析 3 天，每天换 3 次透析；透析后取出，加入

0.1% (W/V) 的 NaN_3 ; 4°C 储存备用 ; 所述抗体透析液为磷酸盐缓冲液。

7. 根据权利要求 5 所述的使用酶标抗原的分析方法, 其特征在于: 步骤 4) 中, 所述化学发光底物是将鲁米诺钠、增强剂吩噻嗪-10-基-丙基磺酸钠盐和 4-吗啉吡啶溶于 Tris-HCl, 在进行检测发光强度值之前, 取出一部分和 H_2O_2 对应比例混合, 即可用于实验; 发光底物的储存温度为 3 ~ 5°C, 优选的, 4°C。

一种用于蛋白同化激素免疫分析的酶标抗原及分析方法

技术领域

[0001] 本发明属于小分子化合物免疫化学和多残留分析技术领域,尤其是涉及一种用于蛋白同化激素免疫分析的酶标抗原及分析方法。

背景技术

[0002] 蛋白同化激素 (anabolic steroid) 亦称同化激素,是甾体类激素。其主要包括诺龙 (17 β -19-nortestosterone), 群勃龙 (β -trenbolone)、丙酸诺龙 (19-nortestosterone propionate)、雄诺龙 (stanoalone)、美雄诺龙 (mestanolone) 和替勃龙 (tibolone) 等。

[0003] 蛋白同化激素过多在人体内蓄积会对机体多方面造成不良影响。例如,在人的肝功能异常中,蛋白同化激素作用会使谷草转氨酶、碱性磷酸酶、胆红素、和谷丙转氨酶活性提高,对肝脏产生毒副作用,形成肝充血性囊肿,甚至癌症的。而据可靠相关报道表明,心血管病中的冠心病是由蛋白同化激素中低密度脂蛋白胆固醇过高而引起。此外,蛋白同化激素中的类固醇能够极大影响生殖系统发育。儿童或少年食用过多蛋白同化激素会出现不良发育的现行。常见的表现有身材矮小,肌肉不自主抽搐等。

[0004] 然而,由于蛋白同化激素经常被非法添加到动物食用的饲料当中,用以促进动物增长,造成我国食品中此类药物残留现象大量存在,严重扰乱了食品市场,影响了食品安全。为打击这种行为,我国已经明确规定在食用动物饲养中严禁使用蛋白同化激素。同时,在动物源性食品及功能食品中不得检出。

[0005] 目前,比较常见的高效液相色谱法 (HPLC)、气相色谱法 (GC)、气相色谱-质谱联用法 (GC-MS)、液相色谱-质谱联用法 (LC-MS) 和酶联免疫吸附法 (ELISA) 都有被用来检测蛋白同化激素。传统仪器方法存在前处理复杂,仪器和相应配套费用昂贵,无法大规模进行平行样同时检测等缺点。而酶联免疫的最低检出限往往无法达到我国对于此类物质的检出限要求。因此迫切需要开发更加简便、快速、灵敏的分析技术。

[0006] 化学发光免疫分析方法 (chemiluminescence immunoassay, CLIA) 结合了传统酶联免疫法在大批量样品快速检测方面和化学发光测定技术高灵敏度两方面优势,近年来在小分子有害化合物的免疫分析方法开发方面成为研究热点。

[0007] 但是与大分子不同,小分子化合物免疫分析有自身特点:

[0008] (1) 小分子化合物 ($MW \leq 1000 \text{ dalton}$) 一般不具有免疫原性,不能直接免疫动物产生特异性抗体、必须合成突出分子立体结构特异性部位的半抗原,并与大分子载体连接构成接合物,才能免疫动物产生针对这一目标小分子化合物的特异性抗体。这种半抗原与大分子载体的结合物称为人工抗原。人工抗原的制备不是任意的,包括结合位点、结合方式、载体种类、以及半抗原与目标分析物任何结构上的差异如大小、形状、成份、构型、构象、极性、电子云密度等等在内的诸因素,都可能极大地影响着相应抗体的性质,因此它们是决定产生其特异性抗体和建立免疫分析方法的关键。

[0009] (2) 虽然小分子化合物不具有免疫原性,但具有反应原性,即具有与相应抗体发生

免疫学反应的能力,并可进行体外定量,遵循质量作用定律。

[0010] 免疫分析技术被引入小分子残留分析领域,成为一种最有发展和应用潜力的定量分析技术之一,受到广泛的重视。该技术研究的关键是半抗原的分子设计、合成和人工全抗原及抗体的制备。因此,目标分析物分子免疫学特性,以及如何通过化学或生化技术突出和利用这些特性,是该领域重要的研究内容。这一技术目前已成为微量分析研究的一个崭新领域,可与传统分析方法并列作为一项新的分析途径。

[0011] (3) 化学发光免疫分析法在免疫分析方法的基础上,根据化学发光反应在某一时间点的发光强度(例如峰值强度)或发光总量来确定反应中各组分含量。相比传统的酶联免疫分析方法,其灵敏度能够大大提高。

[0012] 目前文献报道的蛋白同化激素免疫分析方法普遍广谱性差,一般能同时检测一至三种蛋白同化激素药物,而针对三种以上蛋白同化激素药物残留化学发光免疫分析方法尚未见报道。蛋白同化激素药物种类繁多,广泛应用并有一定疗效的也有几十种。如果采用现有的这些分析方法检测实际样品,往往造成一些蛋白同化激素药物无法被检出,检测结果与样品中真实的蛋白同化激素残留量差别较大的情况。因此有必要提供一种能够同时检测出多种蛋白同化激素的分析方法,解决上述问题,提高免疫检测准确度和检测效率。

发明内容

[0013] 有鉴于此,本发明旨在提出一种用于蛋白同化激素免疫分析的酶标抗原及分析方法,以克服传统酶联免疫分析方法灵敏度低的缺点并解决当前蛋白同化激素药物多残留检测方法缺乏的问题,结合化学发光技术能够同时检测诺龙、群勃龙、丙酸诺龙、雄诺龙和美雄诺龙等五种蛋白同化激素的免疫分析方法。

[0014] 为达到上述目的,本发明的技术方案是这样实现的:

[0015] 一种用于蛋白同化激素免疫分析的酶标抗原,由诺龙半抗原与辣根过氧化酶连接合成,其制备包括如下步骤:

[0016] 1) 诺龙半抗原的制备,称取 0.5 ~ 2.0g 诺龙溶于 10 ~ 25mL 无水四氢呋喃中,并加入 0.5 ~ 2.0g 丁二酸酐、0.6 ~ 2.0mL 三乙胺和 0.2 ~ 1.5g 4-二甲氨基吡啶,在 62 ~ 70°C 温度下持续反应 8 ~ 17h,随后将溶剂旋干,生成物用体积比为 1:2 ~ 5:6 的石油醚与乙酸乙酯的混合液溶解;以体积比为 1:2 ~ 5:6 的石油醚与乙酸乙酯的混合液为展开剂,进行纯化得到白色晶体,即为诺龙半抗原;

[0017] 2) 通过活化酯法,以羟基 CO = OH 为桥梁,使诺龙人工半抗原连接到辣根过氧化酶上,即得到酶标抗原。

[0018] 优选的,步骤 1) 中,称取 1.316g 诺龙溶于 14.50mL 无水四氢呋喃中,并加入 0.960g 丁二酸酐、1.32mL 三乙胺和 0.584g 4-二甲氨基吡啶,在 60°C 温度下持续反应 12h,随后将溶剂旋干,生成物用体积比为 1:1 的石油醚与乙酸乙酯的混合液溶解;以体积比为 1:1 的石油醚与乙酸乙酯的混合液为展开剂,进行纯化得到白色晶体,即为诺龙半抗原。

[0019] 优选的,步骤 2) 中,酶标抗原的制备包括如下步骤,

[0020] a) 准确称量 0.03 ~ 0.04mmol 诺龙半抗原溶于 250 ~ 350 μ L N-N 二甲基甲酰胺溶液中,分别加入 3.5 ~ 5.5mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和 2 ~ 3mg N-羟基琥珀酰亚胺避光 5 ~ 6°C 搅拌反应 8 ~ 12h,得甲液;

[0021] b) 准确称量 11 ~ 12mg 辣根过氧化酶, 加入到 3 ~ 5mL 的碳酸氢钠缓冲液中, 缓冲溶液的 pH 为 6 ~ 8, 待完全溶解, 得乙液, 在冰浴条件下将甲液缓慢加入到乙液中, 待完全加入后, 3 ~ 6℃ 避光搅拌 8 ~ 12h, 然后将反应液在 3 ~ 6℃、pH 为 6 ~ 8 的磷酸盐缓冲溶液中透析 2 ~ 4 天, 即得到酶标抗原溶液。

[0022] 优选的, 步骤 2) 中, 酶标抗原的制备包括如下步骤,

[0023] a) 准确称量 0.02mmol 溶于 300 μ LN-N 二甲基甲酰胺溶液中, 分别加入 4.78mg1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和 2.75mgN-羟基琥珀酰亚胺避光 4℃ 搅拌反应 10h 左右, 得甲液;

[0024] b) 准确称量 10.00mg 辣根过氧化酶, 加入到 4mL 的碳酸氢钠缓冲液中, 缓冲溶液的 pH 为 7.4, 待完全溶解, 得乙液, 在冰浴条件下将甲液缓慢地加入到乙液中, 待完全加入后, 4℃ 避光搅拌 12h, 然后将反应液在 4℃、pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中透析 3 天, 即得到酶标抗原溶液。

[0025] 本发明中合成了小分子目标分析物的半抗原, 并与载体蛋白质偶联, 制备有效的酶标抗原。该技术研究的关键是半抗原的分子设计、合成和酶标抗原的制备。其中半抗原的设计、合成是影响蛋白同化激素免疫分析成败的关键。

[0026] 诺龙结构中不具有合适的基团, 因此要对诺龙的结构进行改造, 在诺龙的羟基上引入羧基, 形成可以与载体蛋白连接的臂。因此, 本发明在设计合成诺龙人工半抗原时, 采用诺龙与丁二酸酐反应, 来引入活性侧链, 合成诺龙半抗原, 这样既保持了诺龙半抗原与诺龙、群勃龙、丙酸诺龙、雄诺龙和美雄诺龙等五种蛋白同化激素在结构上的相似性, 又使半抗原分子具有了与载体蛋白连接的合适结构。

[0027] 利用上述的诺龙人工半抗原与载体蛋白结合, 制得人工抗原, 免疫动物制备的抗体。使用 protein A-sepharose4B 亲和层析柱对含有抗蛋白同化激素类药物抗血清进行纯化。

[0028] 所纯化的诺龙抗体与诺龙、群勃龙、丙酸诺龙、雄诺龙和美雄诺龙的特异性结合率以抑制抗体最大结合率的 50% 所需诺龙的浓度即 IC_{50} 值来表示, 几种蛋白同化激素类药物对本发明的抗体的 IC_{50} 值分别为, 诺龙 0.050ng/mL、群勃龙 0.094ng/mL、丙酸诺龙 0.66ng/mL、雄诺龙 1.40ng/mL 和美雄诺龙 2.40ng/mL。将上述的 IC_{50} 值与国内外规定的蛋白同化激素类药物最大残留限量值比较, 不难看出, 上述五种磺胺药物的 IC_{50} 值均远低于规定的最大残留限量值, 说明本发明抗体用于化学发光免疫分析时, 能够特异性地同时检测到五种蛋白同化激素药物的残留含量。

[0029] 本发明还提供了一种使用如上所述的用于蛋白同化激素免疫分析的酶标抗原的分析方法, 包括如下步骤,

[0030] 1) 包被, 先用磷酸盐缓冲溶液稀释待包被的诺龙抗体, 把稀释好的诺龙抗体稀释液加入酶标板的微孔中, 每微孔添加 80 ~ 120 μ L 洗涤液 PBST 缓冲液, 加完后把酶标板置于 20 ~ 35℃ 条件下反应 10 ~ 15h, 弃去孔中液体, 向酶标板中加入 200 ~ 300 μ L 洗涤液 PBST 缓冲液, 在震荡器上震荡 1 ~ 4min, 弃去洗涤液, 即为洗板 1 次, 重复洗板 2 ~ 5 次; 优选的, 把稀释好的诺龙抗体稀释液加入酶标板的微孔中, 每微孔添加 100 μ L 洗涤液 PBST 缓冲液; 加完后把酶标板置于 25℃ 条件下反应 10 ~ 15h, 弃去孔中液体, 向酶标板中加入 250 μ L 的洗涤液 PBST 缓冲液, 在震荡器上震荡 1 ~ 4min; 弃去洗涤液, 即为洗板 1 次, 重复

洗板 2 ~ 5 次, 优选的, 重复洗板 3 次;

[0031] 2) 封闭: 向酶标板的每个微孔中加入 150 ~ 250 μL 封闭液, 加完后把酶标板置于 20 ~ 35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 0.5 ~ 1.5h 后取出酶标板弃去封闭液, 重复洗板 2 ~ 5 次; 优选的, 向酶标板的每个微孔中加入 200 μL 封闭液, 加完后把酶标板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 1h 后取出酶标板弃去封闭液, 重复洗板 4 次; 所述封闭液为含有质量浓度为 0.5% 脱脂奶粉的磷酸盐缓冲溶液;

[0032] 3) 竞争反应: 向酶标板的每个微孔先加入 50 ~ 150 μL 梯度稀释好的待测物样溶液或样品提取液, 然后再向其中加入 50 ~ 150 μL 稀释的酶标抗原溶液, 酶标抗原是用磷酸盐缓冲溶液进行稀释, 酶标板被置于 20 ~ 35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 0.5 ~ 1.5h 之后, 重复洗板 2 ~ 5 次; 优选的, 向酶标板的每个微孔先加入 50 μL 梯度稀释好的待测物样溶液或样品提取液, 然后再向其中加入 50 μL 稀释的酶标抗原溶液; 酶标板被置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 1h 之后, 重复洗板 5 次;

[0033] 4) 检测发光值: 将上一步洗好的酶标板置于荧光化学发光分析仪中, 设定好相应程序, 仪器自动向酶标板的每个微孔中加入 50 ~ 150 μL 化学发光底物, 10 ~ 40s 后仪器立即测定每个微孔的发光强度值; 优选的, 向酶标板的每个微孔中加入 100 μL 化学发光底物, 30s 后仪器立即测定每个微孔的发光强度值。

[0034] 优选的, 步骤 1) 中, 所述诺龙抗体是经过纯化处理的, 纯化处理步骤如下所述,

[0035] 1) 平衡柱子: 用 pH6 ~ 9 的磷酸盐缓冲液冲洗管路, 流速 5 ~ 8mL/min, 1 ~ 3min, 装柱后再用 pH6 ~ 9 的磷酸盐缓冲液平衡柱子, 流速 0.5 ~ 2mL/min, 直至基线水平; 优选的, 用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液冲洗管路, 流速 6.5mL/min, 2min, 装柱后再用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液平衡柱子, 流速 1mL/min, 直至基线水平;

[0036] 2) 上样: 待基线水平后, 将三聚氰胺抗血清用等体积 pH6 ~ 9 的磷酸盐缓冲液稀释后上样, 优选的, pH 7.4;

[0037] 3) 上柱, 流速为 0.2 ~ 0.8mL/min, 上样结束后, 用 pH6 ~ 9 的磷酸盐缓冲液冲柱子, 流速 0.5 ~ 2.0mL/min, 诺龙抗体被特异性吸附在填料位点上, 其他杂蛋白随缓冲液流出, 直至基线水平; 优选的, 流速为 0.5mL/min, 上样结束后, 用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液冲柱子, 流速 1mL/min, 直至基线水平;

[0038] 4) 洗脱: 用 pH 1.5 ~ 3.5 的洗脱缓冲液洗脱柱子上结合的抗体, 洗出目的蛋白, 流速为 0.2 ~ 1.5mL/min; 优选的, 用 pH2.7 的洗脱缓冲液洗脱柱子上结合的抗体, 洗出目的蛋白, 流速为 0.5mL/min;

[0039] 5) 测定: 在 200 ~ 350nm 紫外下检测洗脱液蛋白浓度; 当吸光度大于 0.1 ~ 0.3 时, 收集洗脱液, 收集完毕后迅速用 0.5 ~ 2.0mol/L Tris 调 pH 至 6.0 ~ 9.0; 优选的, 在 280nm 紫外下检测洗脱液蛋白浓度, 当吸光度大于 0.2 时, 收集洗脱液, 收集完毕后迅速用 1mol/L Tris 调 pH 至 7.0; 所述 Tris 为三羟甲基氨基甲烷;

[0040] 6) 抗体的透析与保存: 用 pH 6 ~ 9 抗体透析液透析所得抗体, 2 ~ 6 $^{\circ}\text{C}$ 透析 2 ~ 4 天, 每天换 2 ~ 4 次透析, 透析后取出, 加入 0.05 ~ 0.2% (W/V) 的 NaN_3 , 3 ~ 5 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用; 优选的, 用 pH7.4 抗体透析液透析所得抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析 3 天, 每天换 3 次透析; 透析后取出, 加入 0.1% (W/V) 的 NaN_3 ; 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用; 所述抗体透析液为磷酸盐缓冲液。

[0041] 优选的, 步骤 4) 中, 所述化学发光底物是将鲁米诺钠、增强剂吩噻嗪-10-基-丙

基磺酸钠盐和 4- 吗啉吡啶溶于 Tris-HCl, 在进行检测发光强度值之前, 取出一部分和 H_2O_2 对应比例混合, 即可用于实验; 发光底物的储存温度为 $4^{\circ}C$ 。

[0042] 如上所述的分析方法, 其灵敏度 (IC_{50}) 和检测限 (IC_{15}) 分别为: 诺龙 $IC_{50}=0.050 \mu g/L$, $IC_{15}=0.00378 \mu g/L$ 、群勃龙 $IC_{50}=0.094 \mu g/L$, $IC_{15}=0.00330 \mu g/L$ 、丙酸诺龙 $IC_{50}=0.66 \mu g/L$, $IC_{15}=0.259 \mu g/L$ 、雄诺龙 $IC_{50}=1.40 \mu g/L$, $IC_{15}=0.0398 \mu g/L$ 、美雄诺龙 $IC_{50}=2.40 \mu g/L$, $IC_{15}=0.078 \mu g/L$ 。

[0043] 本发明对化学发光免疫方法测定进行了技术改进, 其测定包括: 诺龙抗体纯化; 标准抗体包被量; 进行化学发光免疫反应; 用荧光化学发光分析仪对一定波长的光的吸收参数; 作出蛋白同化激素标准品与荧光化学发光分析仪检查参数图; 将样品的荧光化学发光分析仪检测参数与标准品的荧光化学发光分析仪检测参数图比较而获得样品中诺龙、群勃龙、丙酸诺龙、雄诺龙、美雄诺龙的总量。

[0044] 相对于现有技术, 本发明所述的一种用于蛋白同化激素免疫分析的酶标抗原及分析方法, 具有以下优势:

[0045] (1) 本发明所述的分析方法针对多种蛋白同化激素药物具有良好的特异性和广谱性, 与传统酶联免疫吸附分析方法相比, 灵敏度提高了 5 ~ 8 倍。

[0046] (2) 本发明所述的人工半抗原合成方法不仅简便, 且所用主要原料丁二酸酐价格较为低廉、容易获得, 在一般化学试剂公司都可购买。由于合成效率高、反应步骤少, 半抗原只需一步反应即可合成, 从而提高了反应的可控性。

附图说明

[0047] 构成本发明的一部分的附图用来提供对本发明的进一步理解, 本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明, 并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0048] 图 1 为本发明实施例一所述的诺龙的化学发光免疫分析方法标准曲线;

[0049] 图 2 为本发明实施例一所述的群勃龙的化学发光免疫分析方法标准曲线;

[0050] 图 3 为本发明实施例一所述的丙酸诺龙的化学发光免疫分析方法标准曲线;

[0051] 图 4 为本发明实施例一所述的雄诺龙的化学发光免疫分析方法标准曲线;

[0052] 图 5 为本发明实施例一所述的美雄诺龙的化学发光免疫分析方法标准曲线。

具体实施方式

[0053] 需要说明的是, 在不冲突的情况下, 本发明中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。

[0054] 下面将参考附图并结合实施例来详细说明本发明创造。

[0055] 实施例一

[0056] 诺龙半抗原的合成

[0057] 称取 1.316g 诺龙溶于 14.50mL 无水四氢呋喃中, 并加入 0.960g 丁二酸酐、1.32mL 三乙胺和 0.584g 4-二甲氨基吡啶 (DMAP), 在 $60^{\circ}C$ 温度下持续反应 12h, 随后将溶剂旋干, 生成物用有机溶剂石油醚 / 乙酸乙酯 (1/1, v/v) 溶解。以石油醚 / 乙酸乙酯 (1/1, v/v) 为展开剂, 进行纯化得到白色晶体, 即为诺龙半抗原。

[0058] 酶标抗原的合成

[0059] 活化酯法：准确称量 0.02mmol (7.47mg) 溶于 300 μ L N-N 二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液中，分别加入 4.78mg (0.02mmol) 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (EDC) 和 2.75mg (0.02mmol) N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 避光 4 $^{\circ}$ C 搅拌反应 10h 左右，得甲液。

[0060] 准确称量 10.00mg 辣根过氧化物酶 (HRP)，加入到 4mL 的碳酸氢钠缓冲液中 (pH7.4)，待完全溶解，得乙液，在冰浴条件下将甲液缓慢加入到乙液中，待完全加入后，4 $^{\circ}$ C 避光搅拌 12h，然后将反应液在 4 $^{\circ}$ C、pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中透析 3 天，然后精确量取酶标抗原溶液的体积，测定浓度加入硫柳汞，4 $^{\circ}$ C 保存。

[0061] 抗血清纯化制备诺龙抗体

[0062] 具体步骤如下：

[0063] 1) 定时监测动物抗体效价，当终点效价达到 20 万以上时，由颈动脉采全血。将采集的全血 20 $^{\circ}$ C 静置 2h 后在 4 $^{\circ}$ C 下静置 8h，然后 3500 转/min 离心 10min，收集上清液于 -20 $^{\circ}$ C 保存。离心后获得的血清采用 proteinA-Sepharose-4B 免疫亲和层析柱进一步纯化，制备 IgG 抗体。平衡柱子：用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液 (Binding buffer) 冲洗管路，流速 6.5mL/min，2min。装柱后再用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液 (Binding buffer) 平衡柱子，流速 1mL/min，直至基线水平。

[0064] 2) 上样：待基线水平后，将三聚氰胺抗血清用等体积 pH7.4 的磷酸盐缓冲液 (Binding buffer) 稀释 (1:1, V/V) 后。

[0065] 3) 上柱，流速为 0.5mL/min。上样结束后，用 pH7.4 Binding buffer 冲柱子，流速 1mL/min。抗体被特异性吸附在填料位点上，其他杂蛋白随缓冲液流出，直至基线水平。

[0066] 4) 洗脱：用 pH 2.7 的洗脱缓冲液 (Elution buffer) 洗脱柱子上结合的抗体，洗出目的蛋白，流速为 0.5mL/min。

[0067] 5) 测定：在 280nm 紫外下检测洗脱液蛋白浓度，当吸光度 $A_{280} > 0.2$ 时，收集洗脱液，收集完毕后迅速用 1mol/L Tris 调 pH 至 7.0。

[0068] 6) 抗体的透析与保存：用 pH 7.4 抗体透析液 (磷酸盐缓冲液, PB) 透析所得抗体，4 $^{\circ}$ C 透析三天，每天换三次透析，透析后取出，加入 0.1% (W/V) 的 NaN_3 ，4 $^{\circ}$ C 储存备用。

[0069] 诺龙、群勃龙、丙酸诺龙、雄诺龙和美雄诺龙等五种蛋白同化激素多残留化学发光免疫分析方法检测步骤：

[0070] (1) 包被抗体

[0071] 在包被抗体时，需要先用磷酸盐缓冲溶液稀释待包被的诺龙抗体，把稀释好的抗体稀释液加入到酶标板中的 96 微孔中 (100 μ L/well)，加完后把酶标板置于 4 $^{\circ}$ C 条件下，过夜，次日，弃去孔中液体，向酶标板中加入 250 μ L 的洗涤液 PBST 缓冲液，在震荡器上震荡 2min，弃去洗涤液，即为洗板一次，重复洗板 3 次。

[0072] (2) 封闭

[0073] 紧接上一步，封闭酶标板，向酶标板的每个微孔中加入 200 μ L 封闭液，加完后把酶标板置于 37 $^{\circ}$ C 条件下，1h 后取出酶标板弃去封闭液，重复洗板 4 次。

[0074] (3) 加酶标抗原

[0075] 在步骤 (2) 之后，向酶标板上的每个微孔先加入 50 μ L 梯度稀释好的待测物样溶液或样品提取液，然后再向其中加入 50 μ L 酶标抗原溶液，酶标抗原是用磷酸盐缓冲溶液进行稀释，酶标板被置于 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 1h 之后，重复洗板 5 次；

[0076] (4) 读发光值

[0077] 将上一步洗好的酶标板置于荧光化学发光分析仪中, 设定好相应程序, 仪器自动向酶标板的每个微孔中加入 100 μ L 发光底物, 30s 后仪器立即测定每个微孔的发光强度值。

[0078] 根据发光强度值分别建立诺龙、群勃龙、丙酸诺龙、雄诺龙和美雄诺龙的化学发光免疫分析方法标准曲线, 如图 1 ~ 图 5 所示。

[0079] 使用实施例一中对应的分析方法, 诺龙的灵敏度为 0.050 μ g/L, 最低检出限为 0.00378 μ g/L、群勃龙的灵敏度为 0.094 μ g/L, 最低检出限为 0.00330 μ g/L、丙酸诺龙的灵敏度为 0.66 μ g/L, 最低检出限为 0.259 μ g/L、雄诺龙的灵敏度为 1.40 μ g/L, 最低检出限为 0.0398 μ g/L、美雄诺龙的灵敏度为 2.40 μ g/L, 最低检出限为 0.078 μ g/L。

[0080] 效果验证试验一, 准确称取猪肉样品 1g (精确到 0.01g) 加 2mL 甲醇溶液匀浆振荡提取 6min, 4 $^{\circ}$ C、9000rpm、离心 12min, 取全部上清液到试管中, 氮吹干后, 用 1mL 甲醇复溶, 用 PBS 稀释 60 倍后配制标准系列绘制基质标准曲线, 得出的诺龙的平均回收率为 80 ~ 100%。

[0081] 效果验证试验二, 准确称取鸡肉和牛肉样品 1g (精确到 0.01g) 加 2mL 甲醇溶液匀浆振荡提取 6min, 4 $^{\circ}$ C、9000rpm、离心 12min, 取全部上清液到试管中, 氮吹干后, 用 1mL 甲醇复溶, 用 PBS 稀释 60 倍后配制标准系列绘制基质标准曲线, 得出的诺龙的平均回收率为 80 ~ 100%。

[0082] 以上所述仅为本发明创造的较佳实施例而已, 并不用以限制本发明创造, 凡在本发明创造的精神和原则之内, 所作的任何修改、等同替换、改进等, 均应包含在本发明创造的保护范围之内。

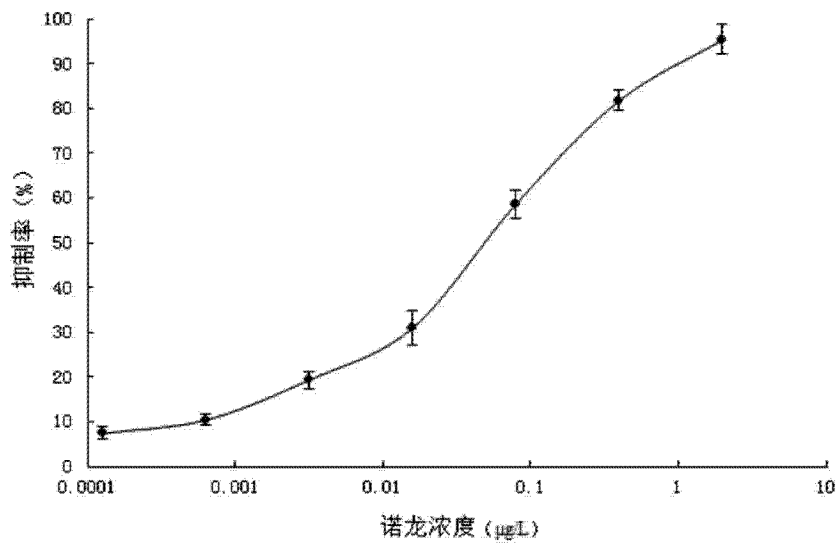


图 1

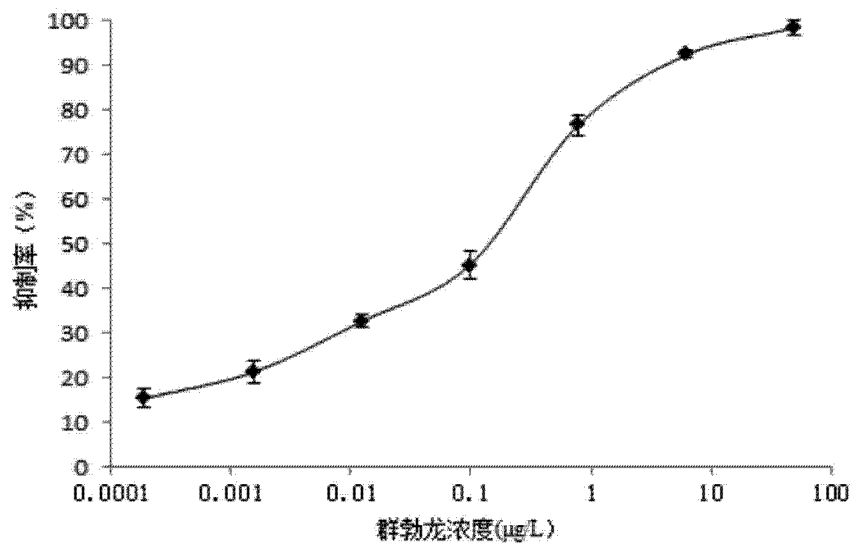


图 2

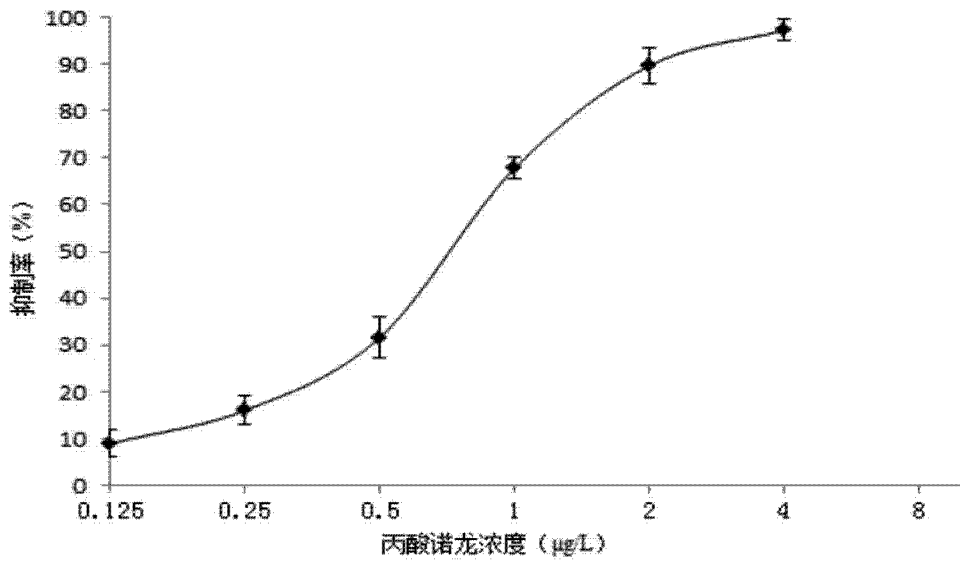


图 3

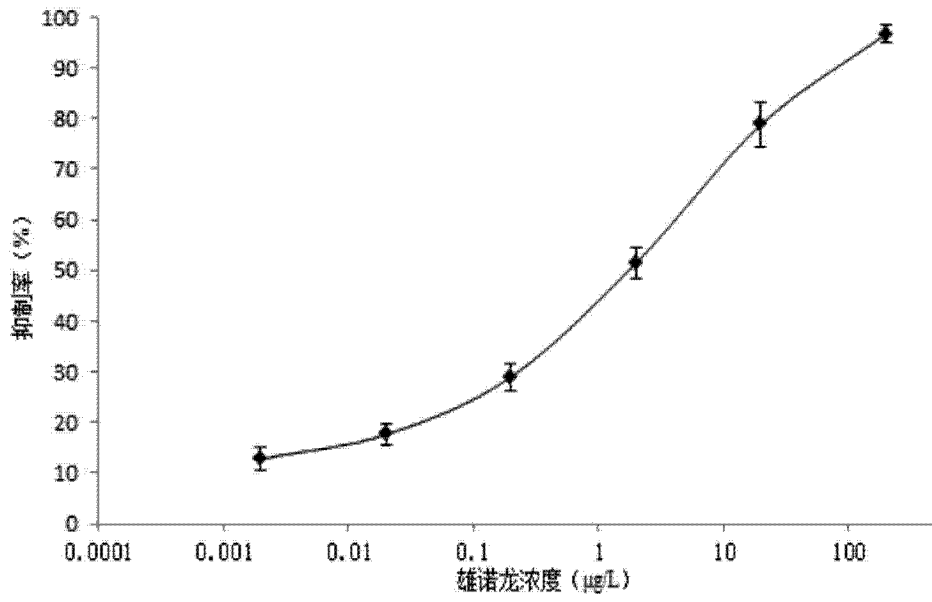


图 4

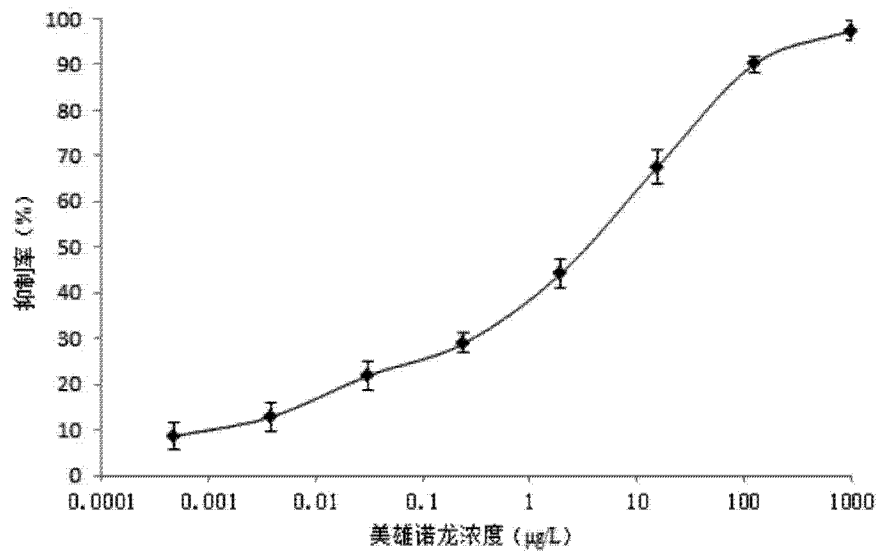


图 5

专利名称(译)	一种用于蛋白同化激素免疫分析的酶标抗原及分析方法		
公开(公告)号	CN104849476A	公开(公告)日	2015-08-19
申请号	CN201510266768.8	申请日	2015-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
[标]发明人	刘冰 张燕 陆旸 生威 王硕		
发明人	刘冰 张燕 陆旸 生威 王硕		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/535 G01N33/542 G01N1/34		
CPC分类号	G01N33/74 G01N1/34 G01N33/535 G01N33/542		
代理人(译)	刘莹		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种用于蛋白同化激素免疫分析的酶标抗原及分析方法，属于免疫化学分析技术。所述酶标抗原是由诺龙半抗原与辣根过氧化酶连接制成，所述诺龙半抗原是在诺龙的羟基上引入羧基制成。使用本发明制备的酶标抗原进行诺龙、群勃龙、丙酸诺龙、雄诺龙和美雄诺龙等五种蛋白同化激素多残留化学发光免疫分析，本发明克服了传统酶联免疫分析方法灵敏度低的缺点，提高了免疫检测准确度和检测效率。

