



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105181948 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 23

(21) 申请号 201510563175. 8

(22) 申请日 2015. 09. 07

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 10581 2015. 04. 15

(71) 申请人 中国中医科学院中药研究所

地址 100700 北京市东城区东直门内南小街
16 号

(72) 发明人 黄璐琦 张波 南铁贵 袁媛

詹志来 康利平

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限

公司 11245

代理人 关畅 白艳

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

权利要求书1页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测木犀草苷的方法及其专用酶联免疫
试剂盒

(57) 摘要

本发明提供了一种检测木犀草苷的方法及其
专用酶联免疫试剂盒。本发明所提供的酶联免疫
试剂盒包括抗木犀草苷的单克隆抗体,该单克隆
抗体是通过间接竞争 ELISA 方法筛选出的杂交
瘤细胞株 CGMCC No. 10581 分泌的。通过实验证
明:本发明所提供抗木犀草苷的单克隆抗体特异
性强,对芹菜素的交叉反应率为 1.27%;对木犀
草素的交叉反应率为 1.02%;对葛根素、柚皮苷、
金丝桃苷、异荭草苷、芦丁、槲皮素的交叉反应率
都小于 0.001%。利用该单克隆抗体制备得到的
间接竞争酶联免疫试剂盒可用于定性或定量检测
待测样品中的木犀草苷,线性检测范围在 9.07 ~
258.07ng/mL,具有快速、灵敏的优点。

1. 抗木犀草苷的单克隆抗体,由保藏号为 CGMCC No. 10581 的杂交瘤细胞株分泌的。
2. 一株分泌抗木犀草苷的单克隆抗体的杂交瘤细胞株 Lg 3A4,其保藏号为 CGMCC No. 10581。
3. 权利要求 1 所述的单克隆抗体或权利要求 2 所述的杂交瘤细胞株 Lg 3A4 在检测或辅助检测待测样品中木犀草苷含量中的应用。
4. 权利要求 1 所述的单克隆抗体或权利要求 2 所述的杂交瘤细胞株 Lg 3A4 在制备检测或辅助检测待测样品中木犀草苷含量的试剂或试剂盒中的应用。
5. 权利要求 1 所述的单克隆抗体或权利要求 2 所述的杂交瘤细胞株 Lg 3A4 在制备检测或辅助检测待测样品中木犀草苷含量的胶体金试纸条中的应用。
6. 权利要求 1 所述的单克隆抗体或权利要求 2 所述的杂交瘤细胞株 Lg 3A4 在比较或辅助比较待测样品中木犀草苷含量高低中的应用。
7. 一种检测或辅助检测待测样品中木犀草苷含量的酶联免疫试剂盒,包括独立包装的权利要求 1 所述的单克隆抗体。
8. 根据权利要求 7 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述样品为金银花。
9. 权利要求 7 或 8 所述的酶联免疫试剂盒在检测或辅助检测待测样品中木犀草苷含量中的应用。
10. 根据权利要求 9 所述的应用,其特征在于:所述样品为金银花。

一种检测木犀草苷的方法及其专用酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测木犀草苷的方法及其专用酶联免疫试剂盒,属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 木犀草苷 (Luteoloside) 是常用中药金银花 (Lonicerae Japonicae FLOS) 的主要活性成分之一,具有抗氧化、抗炎、抑菌杀菌、抗肿瘤、抗诱变、平喘、治疗糖尿病等药理作用。2010 版《中国药典》规定木犀草苷是金银花、菊花 (Chrysanthemum FLOS)、锦灯笼 (Physalis CALYX SEU FRUCTUS) 等中药质量控制的指标性成分之一。

[0003] 目前,木犀草苷检测方法有薄层色谱法、高效液相色谱法、液质联用检测法、毛细管电泳检测法等,但上述方法均无法同时满足简单快速、高通量、现场检测的需求。酶联免疫吸附检测法具有操作简便、灵敏度高、通量高、检测快速、成本低廉等特点,在中药材的品质鉴定方面应用广泛,但木犀草苷的免疫检测方法还未见报道。市场上所售金银花由于种质、生境、采收加工、储藏条件等诸多差异,导致金银花药材质量参差不齐,严重影响金银花药用疗效及其他商业产品开发应用,所以建立一种简便、快速、高通量的木犀草苷免疫检测方法具有非常重要的意义。

发明内容

[0004] 本发明的第一个目的是提供抗木犀草苷的单克隆抗体。

[0005] 本发明提供的抗木犀草苷的单克隆抗体由保藏号为 CGMCC No. 10581 的杂交瘤细胞株分泌的。

[0006] 本发明的第二个目的是提供一株分泌抗木犀草苷的单克隆抗体的杂交瘤细胞株 Lg 3A4。

[0007] 本发明提供的分泌抗木犀草苷的单克隆抗体的杂交瘤细胞株 Lg 3A4 的保藏号为 CGMCC No. 10581。

[0008] 本发明保护保藏号为 CGMCC No. 10581 的杂交瘤细胞株 Lg 3A4,该杂交瘤细胞株的分类命名为小鼠杂交瘤细胞系,该杂交瘤细胞株已于 2015 年 4 月 15 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,地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所,邮编 100101)。

[0009] 本发明的第三个目的是提供上述单克隆抗体或上述杂交瘤细胞株 Lg 3A4 的新用途。

[0010] 本发明提供了上述单克隆抗体或上述杂交瘤细胞株 Lg 3A4 在检测或辅助检测待测样品中木犀草苷含量中的应用。

[0011] 本发明还提供了上述单克隆抗体或上述杂交瘤细胞株 Lg 3A4 在比较或辅助比较待测样品中木犀草苷含量高低中的应用。

[0012] 本发明还提供了上述单克隆抗体或上述杂交瘤细胞株 Lg 3A4 在制备检测或辅助

检测待测样品中木犀草苷含量的试剂或试剂盒中的应用。

[0013] 本发明还提供了上述单克隆抗体或上述杂交瘤细胞株 Lg 3A4 在制备检测或辅助检测待测样品中木犀草苷含量的胶体金试纸条中的应用。

[0014] 本发明的第四个目的是提供一种检测或辅助检测待测样品中木犀草苷含量的酶联免疫试剂盒。

[0015] 本发明提供的检测或辅助检测待测样品中木犀草苷含量的酶联免疫试剂盒包括独立包装的上述单克隆抗体。

[0016] 本发明提供的检测或辅助检测待测样品中木犀草苷含量的酶联免疫试剂盒还可含有分别为独立包装的木犀草苷标准品和 / 或用于标记所述单克隆抗体的标记酶 ;

[0017] 所述木犀草苷标准品可为木犀草苷或由所述木犀草苷配制成的一系列不同浓度的木犀草苷溶液 ; 所述一系列不同浓度的木犀草苷溶液的浓度具体可为 : 400ng/mL、200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL 和 6.25ng/mL ; 所述木犀草苷溶液的溶剂具体可为 PBS 缓冲液 ; 所述 PBS 缓冲液的溶剂为水, 溶质为 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 和 NaCl , 溶质 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 和 NaCl 在所述 PBS 缓冲液中的浓度分别为 0.02M、0.0015M 和 0.14M, 所述 PBS 缓冲液的 pH 值为 7.5 ;

[0018] 所述标记酶具体可为辣根过氧化物酶。

[0019] 本发明提供的检测或辅助检测待测样品中木犀草苷含量的酶联免疫试剂盒还可含有分别为独立包装的包被缓冲液和 / 或洗涤液和 / 或底物缓冲液和 / 或终止缓冲液和 / 或封闭液 ;

[0020] 所述包被缓冲液的溶剂为水, 溶质为 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 ; 溶质 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 在所述包被缓冲液中的浓度分别为 0.01M 和 0.04M ; 所述包被缓冲液的 pH 值为 9.6 ;

[0021] 所述洗涤液的溶剂为水, 溶质为 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 NaCl 和吐温 -20 ; 溶质 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 NaCl 和吐温 -20 在所述洗涤液中的浓度分别为 0.02M、0.0015M、0.14M 和 0.1% (体积百分含量) ; 所述洗涤液的 pH 值为 7.5 ;

[0022] 所述底物缓冲液的溶剂为水, 溶质为柠檬酸三钠和 Na_2HPO_4 ; 溶质柠檬酸三钠和 Na_2HPO_4 在所述底物缓冲液中的浓度分别为 0.01M 和 0.03M ; 所述底物缓冲液的 pH 值为 5.5 ;

[0023] 所述终止缓冲液为 2M 的硫酸水溶液 ;

[0024] 所述封闭液的溶剂为水, 溶质为 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 NaCl 和脱脂牛奶 ; 溶质 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 NaCl 和脱脂牛奶在所述封闭液中的浓度分别为 0.02M、0.0015M、0.14M 和 3% (质量百分含量) ; 所述封闭液的 pH 值为 7.5。

[0025] 上述酶联免疫试剂盒中, 所述样品为金银花 ; 所述金银花具体为亚特红蕾、亚特立本、巨花一号和 / 或久丰一号。

[0026] 上述酶联免疫试剂盒在检测或辅助检测待测样品中木犀草苷含量中的应用也属于本发明的保护范围。

[0027] 上述应用中, 所述样品为金银花 ; 所述金银花具体为亚特红蕾、亚特立本、巨花一号和 / 或久丰一号。

[0028] 本发明提供了一种检测木犀草苷的方法及其专用酶联免疫试剂盒。本发明所提供的酶联免疫试剂盒包括抗木犀草苷的单克隆抗体, 该单克隆抗体是通过间接竞争 ELISA

方法筛选出的杂交瘤细胞株 CGMCC No. 10581 分泌的。通过实验证明：本发明所提供抗木犀草苷的单克隆抗体特异性强，对芹菜素的交叉反应率为 1.27%；对木犀草素的交叉反应率为 1.02%；对葛根素、柚皮苷、金丝桃苷、异荭草苷、芦丁、槲皮素的交叉反应率都小于 0.001%。利用该单克隆抗体制备得到的间接竞争酶联免疫试剂盒可用于定性或定量检测待测样品中的木犀草苷，线性检测范围在 9.07 ~ 258.07ng/mL，具有快速、灵敏的优点。

附图说明

[0029] 图 1 为木犀草苷和木犀草素 -7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷的化学结构式。

[0030] 图 2 为酶联免疫试剂盒检测木犀草苷浓度的标准曲线。

具体实施方式

[0031] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。

[0032] 下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

[0033] 弗氏完全佐剂：Sigma 公司，产品目录编号为 F5881。

[0034] 弗氏不完全佐剂：Sigma 公司，产品目录编号为 F5506。

[0035] 绿原酸标准品溶液：将绿原酸溶于 PBS 缓冲液后得到的溶液。

[0036] PBS 缓冲液：溶剂为水，溶质为 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 和 NaCl ，溶质 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 和 NaCl 在 PBS 缓冲液中的浓度分别为 0.02M、0.0015M 和 0.14M；pH 值为 7.5。

[0037] 包被缓冲液：溶剂为水，溶质为 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 ；溶质 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 在包被缓冲液中的浓度分别为 0.01M 和 0.04M；pH 值为 9.6。

[0038] 洗涤液：溶剂为水，溶质为 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 NaCl 和吐温 -20；溶质 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 NaCl 和吐温 -20 在洗涤液中的浓度分别为 0.02M、0.0015M、0.14M 和 0.1%（体积百分含量）；pH 值为 7.5。

[0039] 样品稀释液：溶剂为水，溶质为 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 和 NaCl 、吐温 -20 和明胶；溶质 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 和 NaCl 在样品稀释液中的浓度分别为 0.02M、0.0015M 和 0.14M；吐温 -20 在样品稀释液中的体积百分含量为 0.1%；明胶在样品稀释液中的质量百分含量为 0.5%。

[0040] 底物缓冲液：溶剂为水，溶质为柠檬酸三钠和 Na_2HPO_4 ；溶质柠檬酸三钠和 Na_2HPO_4 在底物缓冲液中的浓度分别为 0.01M 和 0.03M；pH 值为 5.5。

[0041] 终止缓冲液：浓度为 2M 的硫酸水溶液。

[0042] 封闭液：溶剂为水，溶质为 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 NaCl 和脱脂牛奶；溶质 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 NaCl 和脱脂牛奶在封闭液中的浓度分别为 0.02M、0.0015M、0.14M 和 3%（质量百分含量）；pH 值为 7.5。

[0043] Bal b/C 小白鼠购自军事医学科学院实验动物中心。

[0044] SP2/0 骨髓瘤细胞购自中国兽医药品监察所。

[0045] 实施例 1、杂交瘤细胞株的获得及抗木犀草苷的单克隆抗体的制备

[0046] 一、木犀草苷-BSA 免疫原和木犀草苷-OVA 包被原的合成

[0047] 1、称取木犀草素 -7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷标准品（购自中国食品药品检定研究院，产品目录编号为 111968，化学结构式如图 1 所示）4.40mg，溶解于 1mL 无水 N,N-二甲基甲酰胺（购自 Sigma 公司，产品目录编号为 D4551）中，常温下磁力搅拌，得到木犀草

素-7-0-β-D-葡萄糖醛酸苷标准品溶液。

[0048] 2、向步骤 1 中的木犀草素-7-0-β-D-葡萄糖醛酸苷标准品溶液中加入 2.13mg N-羟基琥珀酰亚胺(购自 Sigma 公司,产品目录编号为 56480),避光搅拌反应 30min 后,加入 3.73mg 二环己基碳二亚胺(购自 Sigma 公司,产品目录编号为 D3128),4℃搅拌反应 4h,离心(3000g,5min),取上清。

[0049] 3、将 20mg BSA(牛血清白蛋白,购自 Sigma 公司,产品目录编号为 A4737)和 20mg OVA(鸡卵清白蛋白,购自 Sigma 公司,产品目录编号为 A5503)分别溶解于 2mL PBS 溶液中,分别得到 BSA 溶液和 OVA 溶液。

[0050] 4、将步骤 2 中的上清液逐滴加入到步骤 3 中的 BSA 溶液和 OVA 溶液中,4℃搅拌反应 12h 后,装入透析袋,PBS 透析 2 天,每 6h 换一次透析液。透析后分别得到木犀草苷-BSA 免疫原溶液(4mg/mL)及木犀草苷-OVA 包被原溶液(4mg/mL),分装,-40℃冷冻,备用。

[0051] 二、动物免疫

[0052] 1、以 8-10 周龄的 Balb/c 小白鼠作为实验动物。

[0053] 2、基础免疫:将 1mg/mL 的木犀草苷-BSA 经无菌过滤器过滤后加入等体积弗氏完全佐剂,用磁力搅拌器充分搅拌乳化,直到滴入水中不扩散,得到乳化后的免疫原。将乳化后的免疫原采用腹腔及背部皮下多点注射 Balb/c 小白鼠,注射剂量为每只小鼠注射 0.1mg 抗原。

[0054] 3、加强免疫:基础免疫 2 周后,取 1mL 1mg/mL 的木犀草苷-BSA,加入 1mL 弗氏不完全佐剂,用磁力搅拌器充分搅拌乳化,直到滴入水中不扩散。将乳化后的免疫原采用腹腔及背部皮下多点注射 Balb/c 小鼠,注射剂量为每只小鼠注射 0.1mg 抗原。

[0055] 三、细胞融合和克隆化

[0056] 加强免疫每隔 10 天一次,从第三次加强免疫开始,每次免疫后第 7 天,从小鼠眼眶采血,测定抗体效价,效价的定义为 OD 值为 1 时的血清稀释倍数。待效价大于 1:8000 后,选择血清效价最佳的小鼠(效价为 1:80000),取脾细胞,按 9:1(数量配比)比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合;采用有限稀释法筛选分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株;并采用间接竞争 ELISA 方法筛选,结果如表 1 所示。其中筛选出了一株稳定分泌抗木犀草苷抗体的单克隆抗体效价最高的单克隆杂交瘤细胞株,命名为 Lg-3A4,该杂交瘤细胞株的分类命名为小鼠杂交瘤细胞系,该杂交瘤细胞株已于 2015 年 4 月 15 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,地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所,邮编 100101),保藏号为 CGMCC No. 10581。

[0057] 上述间接竞争 ELISA 方法的步骤具体如下:

[0058] 1) 包被:在 96 孔酶标板中加入 100 μL 1000ng/mL 的木犀草苷-OVA 溶液,37℃包被 3 小时,用洗涤液洗涤 4 次。

[0059] 2) 封闭:封闭液 150 μL/孔,在 37℃湿盒中封闭 1h,弃封闭液,洗涤 3 次。

[0060] 3) 加样品:抑制孔加入预先配置好的木犀草苷标准品溶液(500ng/mL)50 μL,空白孔加入 50 μL 样品稀释液。

[0061] 4) 加抗体:将不同稀释倍数的杂交瘤细胞培养液加至酶标板中,置湿盒中 37℃条件下 30min,洗板 4 次。

[0062] 5) 加酶标二抗:将羊抗鼠酶标二抗 IgG-HRP(购自 Jackson 公司,商品目录号为

79556) (0.1mg/mL) 稀释 1000 倍,每孔加 100 μ L,置湿盒中 37 $^{\circ}$ C 条件下 30min,洗板 4 次。

[0063] 6) 显色:取 20mg 邻苯二胺 (OPD) 溶于 10mL 底物稀释液中,加 4 μ L 30% H_2O_2 ,将底物溶液加入酶标板中,每孔 100 μ L。避光显色 10min。用酶标仪 492nm 处测定各孔的 OD 值,部分结果见表 1。表 1 中 1G4、2B9 和 4B7 分别代表筛选过程中加入的细胞培养板不同孔中的杂交瘤细胞,抑制率 (%) = [(空白孔 OD 值 - 抑制孔 OD 值) / 空白孔 OD 值] \times 100%。

[0064] 表 1、间接竞争 ELISA 法筛选杂交瘤细胞的结果

[0065]

位置编号 \ 项目	空白孔的 OD 值	抑制孔 (500 ng/mL) 的 OD 值	识别率 (%)
1G4	2.240	0.842	62.411
2B9	0.241	0.134	44.398
4B7	0.681	0.295	56.681

[0066] 吸光值越大,说明抗体对抗原的亲和力越高;识别率越高,说明抗体的特异性越好。从表 1 的数据可以看出,1G4 的识别率最高,达 62.411%,同时与两种包被原的亲和力都比较高,选取 1G4 的杂交瘤细胞继续进行筛选,最后得到分泌抗体特异性好、亲和力高的杂交瘤细胞株,将 1G4 细胞株命名为杂交瘤细胞株 Lg 3A4。

[0067] 四、细胞冻存和复苏

[0068] 用冻存液将杂交瘤细胞株 Lg 3A4CGMCC No. 10581 制成 1×10^6 个/mL 的细胞悬液,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。

[0069] 五、单克隆抗体的制备与纯化

[0070] 1、增量培养法

[0071] 细胞培养基的制备方法:向 DMEM 培养基中添加小牛血清(购自 GIBCOBRL,产品目录号为 26170-043)和碳酸氢钠,小牛血清的终浓度为 20% (质量百分含量),碳酸氢钠的终浓度为 0.2% (质量百分含量),pH 为 7.4。

[0072] 将杂交瘤细胞株 Lg 3A4CGMCC No. 10581 置于上述细胞培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 2 天,用于制备抗木犀草苷的单克隆抗体溶液。

[0073] 2、腹水制备

[0074] Ba1 b/C 小鼠腹腔注射灭菌石蜡油 (0.2mL/只)。7 天后腹腔注射杂交瘤细胞株 Lg3A4CGMCC No. 10581 (10^6 个/只)。7 天后采集腹水,用饱和硫酸铵法进行纯化,得到抗木犀草苷的单克隆抗体溶液,-20 $^{\circ}$ C 保存。

[0075] 上述饱和硫酸铵纯化腹水方法具体步骤如下:

[0076] (1) 室温下将腹水与等体积的 PBS 缓冲液混合。搅拌状态下逐滴加入等体积饱和硫酸铵(即使硫酸铵浓度达到 50%),4 $^{\circ}$ C 静置 2h 后,4 $^{\circ}$ C 3000g 离心 15min,弃上清,取沉淀。

[0077] (2) 向步骤 (1) 中的沉淀中加入原腹水量 2 倍体积的 PBS 缓冲液,充分溶解,逐滴加入一半 PBS 体积的饱和硫酸铵(即饱和硫酸铵浓度达到 33%),4 $^{\circ}$ C 静置 2h 后,4 $^{\circ}$ C 3000g

离心 15min, 弃上清, 取沉淀。

[0078] (3) 将步骤 (2) 中的沉淀用原腹水一半体积的 PBS 缓冲液溶解, 4℃ 透析 2 天, 每 6h 更换一次透析液。透析完成后, 冷冻干燥, -40℃ 保存。上述透析液为 PBS 缓冲液。

[0079] 六、单克隆抗体的鉴定

[0080] 采用单克隆抗体类型检测试剂盒 (购自 Sigma, 产品编号为 IS02-1KT) 对步骤五中的 2 得到的抗木犀草苷的单克隆抗体溶液中的单克隆抗体的亚型进行检测。

[0081] 结果表明: 步骤五中的 2 得到的抗木犀草苷的单克隆抗体溶液中的单克隆抗体的亚型为 IgG1 型。

[0082] 实施例 2、利用间接竞争性 ELISA 法测定单克隆抗体的交叉反应

[0083] 金银花药材中的黄酮类成分已分离得到的约 30 多种, 其中以木犀草苷、木犀草素、芦丁和槲皮素含量较高; 此外结构类似的黄酮类成分还有芹菜素、葛根素、柚皮苷、金丝桃苷和异荭草苷等, 因此本实施例中测定了实施例 1 的步骤五中的 2 得到的抗木犀草苷的单克隆抗体与木犀草素、芦丁、槲皮素、芹菜素、葛根素、柚皮苷、金丝桃苷和异荭草苷的交叉反应。具体步骤如下:

[0084] 1、包被: 取 96 孔酶标板, 采用木犀草苷-OVA 溶液进行包被, 100 μ L/孔; 木犀草苷-OVA 溶液的浓度为 1000ng/mL; 37℃ 包被 3 小时, 用洗涤液洗涤 4 次。

[0085] 2、加样品: 分别在每孔加入 50 μ L 下述化合物溶液: 木犀草苷溶液、木犀草素溶液、芹菜素溶液、芦丁溶液、槲皮素溶液、葛根素溶液、柚皮苷溶液、金丝桃苷溶液和异荭草苷溶液, 上述化合物溶液的溶剂均为样品稀释液。其中, 木犀草苷溶液的浓度为: 400ng/mL、200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL 和 6.25ng/mL; 木犀草素溶液的浓度为: 50000ng/mL、2500ng/mL、1250ng/mL、625ng/mL、312.5ng/mL、156.25ng/mL 和 78.125ng/mL; 芹菜素溶液的浓度为: 20000ng/mL、10000ng/mL、5000ng/mL、2500ng/mL、1250ng/mL、625ng/mL 和 312.5ng/mL; 芦丁溶液的浓度为: 50000ng/mL、2500ng/mL、1250ng/mL、625ng/mL、312.5ng/mL、156.25ng/mL 和 78.125ng/mL; 槲皮素溶液的浓度为: 50000ng/mL、2500ng/mL、1250ng/mL、625ng/mL、312.5ng/mL、156.25ng/mL 和 78.125ng/mL; 葛根素溶液的浓度为: 50000ng/mL、2500ng/mL、1250ng/mL、625ng/mL、312.5ng/mL、156.25ng/mL 和 78.125ng/mL; 柚皮苷溶液的浓度为: 50000ng/mL、2500ng/mL、1250ng/mL、625ng/mL、312.5ng/mL、156.25ng/mL 和 78.125ng/mL; 金丝桃苷溶液的浓度为: 50000ng/mL、2500ng/mL、1250ng/mL、625ng/mL、312.5ng/mL、156.25ng/mL 和 78.125ng/mL; 异荭草苷溶液的浓度为 50000ng/mL、2500ng/mL、1250ng/mL、625ng/mL、312.5ng/mL、156.25ng/mL 和 78.125ng/mL; 对照孔为 50 μ L 的样品稀释液。

[0086] 3、加抗体: 每孔加入 50 μ L 实施例 1 的步骤五中的 2 得到的抗木犀草苷单克隆抗体溶液的稀释液 (用样品稀释液稀释成 500ng/mL); 每种稀释液设置三个复孔; 置湿盒中 37℃ 条件下 30min, 洗板 4 次。

[0087] 4、加酶标二抗: 将羊抗鼠酶标二抗 IgG-HRP (0.1mg/mL, 购自 Jackson 公司, 商品目录号为 79556) 稀释 1000 倍, 每孔加 100 μ L, 置湿盒中 37℃ 条件下 30min, 洗板 4 次。

[0088] 5、显色: 取 20mg 邻苯二胺 (OPD) 溶于 10mL 底物稀释液中, 加 4 μ L 30% H_2O_2 , 将底物溶液加入酶标板中, 每孔 100 μ L。避光显色 15min。

[0089] 6、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。

[0090] 以化合物溶液浓度为横坐标, OD/OD₀ (OD 值表示含有化合物时的吸光值, OD₀ 表示不含有化合物时的吸光值) 为纵坐标, 运用 OriginPro 8 软件分别计算木犀草苷、木犀草素、芦丁和槲皮素的 IC₅₀ 值, 按下列公式计算交叉反应率: 交叉反应率 (%) = (IC₅₀ (木犀草苷) / IC₅₀ (木犀草苷类似物)) × 100%。

[0091] 结果如表 2 所示: 本发明的抗木犀草苷的单克隆抗体对芹菜素的交叉反应率为 1.27%; 对木犀草素的交叉反应率为 1.02%; 对葛根素、柚皮苷、金丝桃苷、异荭草苷、芦丁、槲皮素的交叉反应率都小于 0.001%。说明本发明的抗木犀草苷的单克隆抗体特异性强, 所建立的间接竞争 ELISA 检测方法可以用于样品中木犀草苷含量的测定。

[0092] 表 2、单克隆抗体与木犀草苷及其结构类似物的交叉反应

[0093]

化合物	交叉反应率 (%)
木犀草苷	100
芹菜素	1.27
木犀草素	1.02
葛根素	<0.001
柚皮苷	<0.001
金丝桃苷	<0.001
异荭草素	<0.001
芦丁	<0.001
槲皮素	<0.001

[0094] 实施例 3、单克隆抗体的灵敏度检测

[0095] 通过间接竞争 ELISA 实验建立标准曲线, 并确定检测灵敏度为 42.26ng/mL, 线性检测范围在 9.07 ~ 258.07ng/mL。具体方法如下:

[0096] 1、包被: 取 96 孔酶标板, 采用木犀草苷-OVA 溶液进行包被, 100 μL/孔; 木犀草苷-OVA 溶液的浓度为 1000ng/mL; 37°C 包被 3h, 用洗涤液洗涤 4 次。

[0097] 2、加标准品溶液和样品溶液: 每孔加入 50 μL 木犀草苷标准品溶液和待测样品溶液, 木犀草苷标准品溶液浓度依次为: 400ng/mL、200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL 和 6.25ng/mL; 对照孔为 50 μL 的样品稀释液。

[0098] 3、加抗体: 每孔加入 50 μL 实施例 1 的步骤五中的 2 得到的抗木犀草苷的单克隆抗体溶液的稀释液 (用样品稀释液稀释成 1000ng/mL); 置湿盒中 37°C 条件下 30min, 洗板 4 次。

[0099] 4、加酶标二抗: 将羊抗鼠酶标二抗 IgG-HRP (0.1mg/mL, 购自 Jackson 公司, 商品目录号为 79556) 稀释 1000 倍, 每孔加 100 μL, 置湿盒中 37°C 条件下 30min, 洗板 4 次。

[0100] 5、显色: 取 20mg 邻苯二胺 (OPD) 溶于 10mL 底物稀释液中, 加 4 μL 30% H₂O₂, 将底物溶液加入酶标板中, 每孔 100 μL。避光显色 15min。

[0101] 6、终止: 每孔加入 50 μL 终止液, 用酶标仪 492nm 处测定各孔的 OD 值。

[0102] 7、绘制标准曲线: 以不同浓度的木犀草苷标准品溶液为横坐标, B/B₀ (B 表示含有大黄酸时的 OD 值, B₀ 表示对照孔时的 OD 值) 为纵坐标, 运用 OriginPro 8 软件绘制标准曲线。实验设 3 次重复, 取三次实验结果的平均值, 得到的标准曲线如图 2 所示。标准曲线方

程为 $y = 0.07208 + 0.9371 / (1 + (x/35.00208)^{0.92333})$ ($R^2 = 0.9985$)。

[0103] 8、由所建立的标准曲线,定义 B/B_0 数值为 0.5 时对应的木犀草苷标准品浓度为检测灵敏度(即 42.26ng/mL),定义 B/B_0 数值分别为 0.2 和 0.8 时所对应的木犀草苷标准品浓度范围为该检测方法的线性检测范围(即 9.07 ~ 258.07ng/mL)。

[0104] 实施例 4、检测木犀草苷的酶联免疫试剂盒

[0105] 一、试剂盒的制备

[0106] 本发明的检测木犀草苷的酶联免疫试剂盒由木犀草苷-OVA 溶液(包被原)、抗木犀草苷的单克隆抗体、羊抗鼠酶标二抗 IgG-HRP、包被缓冲液、洗涤液、标准品溶液、底物缓冲液和终止缓冲液和封闭液组成。其中,木犀草苷-OVA 溶液为实施例 1 中的步骤一制备得到的;抗木犀草苷的单克隆抗体为实施例 1 的步骤五中的 2 得到的。

[0107] 二、抗木犀草苷的单克隆抗体在检测样品中木犀草苷含量中的应用

[0108] 使用步骤一所述的试剂盒分别对不同产地(山东临沂、河南新密、云南保山、北京房山、河北巨鹿、湖南攸县)的金银花品种中的木犀草苷含量进行检测,具体步骤如下:

[0109] 1、将待测样品粉碎,经 70% 乙醇超声提取,得到提取液,将提取液直接检测或加适量样品稀释液稀释成样品溶液。

[0110] 2、包被:取 96 孔酶标板,采用木犀草苷-OVA 溶液进行包被,100 μ L/孔;木犀草苷-OVA 溶液的浓度为 1000ng/mL;37 $^{\circ}$ C 包被 3 小时,用洗涤液洗涤 4 次。

[0111] 3、加标准品溶液和样品溶液:每孔加入 50 μ L 木犀草苷标准品溶液和待测样品溶液;木犀草苷溶液浓度为:400ng/mL、200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL 和 6.25ng/mL;对照孔为 50 μ L 的样品稀释液。

[0112] 4、加抗体:每孔加入 50 μ L 抗木犀草苷的单克隆抗体溶液的稀释液(用样品稀释液稀释成 1000ng/mL);置湿盒中 37 $^{\circ}$ C 条件下 30min,洗板 4 次。

[0113] 5、加酶标二抗:将羊抗鼠酶标二抗 IgG-HRP(0.1mg/mL,购自 Jackson 公司,商品目录号为 79556)稀释 1000 倍,每孔加 100 μ L,置湿盒中 37 $^{\circ}$ C 条件下 30min,洗板 4 次。

[0114] 6、显色:取 20mg 邻苯二胺(OPD)溶于 10mL 底物稀释液中,加 4 μ L 30% H_2O_2 ,将底物溶液加入酶标板中,每孔 100 μ L。避光显色 15min。

[0115] 7、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。

[0116] 8、绘制标准曲线:以不同浓度的木犀草苷溶液为横坐标, B/B_0 (B 表示含有木犀草苷时的 OD 值, B_0 表示对照孔的 OD 值)为纵坐标,运用 OriginPro 8 软件绘制标准曲线。实验设 3 次重复,取三次实验结果的平均值,得到的标准曲线如图 2 所示。标准曲线方程为 $y = 0.07208 + 0.9371 / (1 + (x/35.00208)^{0.92333})$ ($R^2 = 0.9985$)。

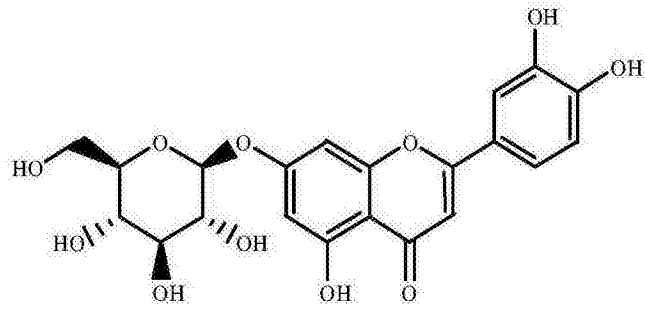
[0117] 9、将待测样品的 B/B_0 代入标准曲线中,根据标准曲线方程计算得到待测样品中木犀草苷的含量。

[0118] 检测结果如表 3 所示:山东临沂亚特红蕾中木犀草苷含量为 0.86 ± 0.06 mg/g;河南新密亚特红蕾中木犀草苷含量为 0.52 ± 0.04 mg/g;云南保山亚特红蕾中木犀草苷含量为 0.58 ± 0.02 mg/g;北京房山亚特立本中木犀草苷含量为 0.50 ± 0.01 mg/g;河北巨鹿巨花一号中木犀草苷含量为 0.61 ± 0.01 mg/g;湖南攸县久丰一号中木犀草苷含量为 0.27 ± 0.01 mg/g。

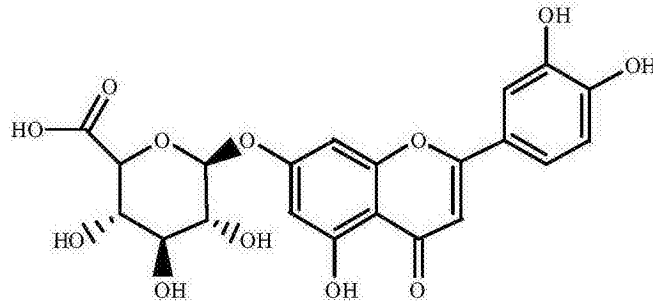
[0119] 表 3、不同产地金银花样品中木犀草苷含量的检测结果

[0120]

编号	产地	金银花品种	含量 (mg/g)
1	山东临沂	亚特红蕾	0.86±0.06
2	河南新密	亚特红蕾	0.52±0.04
3	云南保山	亚特红蕾	0.58±0.02
4	北京房山	亚特立本	0.50±0.01
5	河北巨鹿	巨花一号	0.61±0.01
6	湖南攸县	久丰一号	0.27±0.01



木犀草苷



木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷

图 1

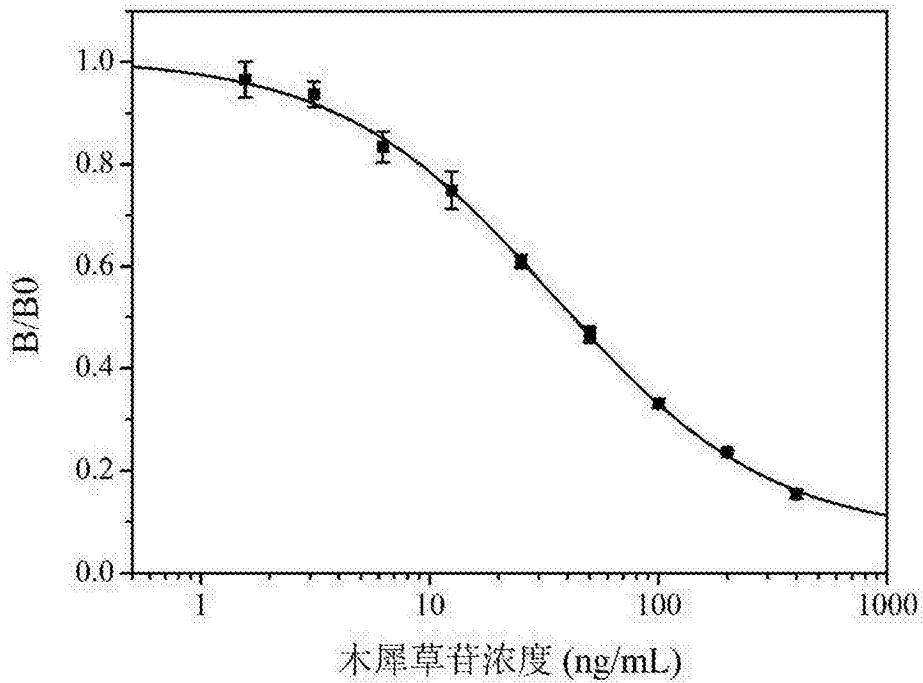


图 2

专利名称(译)	一种检测木犀草苷的方法及其专用酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN105181948A	公开(公告)日	2015-12-23
申请号	CN201510563175.8	申请日	2015-09-07
[标]申请(专利权)人(译)	中国中医科学院中药研究所		
申请(专利权)人(译)	中国中医科学院中药研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国中医科学院中药研究所		
[标]发明人	黄璐琦 张波 南铁贵 袁媛 詹志来 康利平		
发明人	黄璐琦 张波 南铁贵 袁媛 詹志来 康利平		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53		
代理人(译)	关畅 白艳		
其他公开文献	CN105181948B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测木犀草苷的方法及其专用酶联免疫试剂盒。本发明所提供的酶联免疫试剂盒包括抗木犀草苷的单克隆抗体，该单克隆抗体是通过间接竞争ELISA方法筛选出的杂交瘤细胞株CGMCC? No. 10581分泌的。通过实验证明：本发明所提供抗木犀草苷的单克隆抗体特异性强，对芹菜素的交叉反应率为1.27%；对木犀草素的交叉反应率为1.02%；对葛根素、柚皮苷、金丝桃苷、异荭草苷、芦丁、槲皮素的交叉反应率都小于0.001%。利用该单克隆抗体制备得到的间接竞争酶联免疫试剂盒可用于定性或定量检测待测样品中的木犀草苷，线性检测范围在9.07~258.07ng/mL，具有快速、灵敏的优点。

项目	空白孔的OD值	抑制孔 (500 ng/mL) 的OD值	识别率 (%)
位置编号			
1G4	2.240	0.842	62.411
2B9	0.241	0.134	44.398
4B7	0.681	0.295	56.681