

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103360271 A

(43) 申请公布日 2013. 10. 23

(21) 申请号 201310245255. X

C07C 213/06 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 06. 19

C07K 14/765 (2006. 01)

C07K 14/77 (2006. 01)

(71) 申请人 广州万孚生物技术股份有限公司

C07K 14/795 (2006. 01)

地址 510663 广东省广州市萝岗区科学城荔
枝山路 8 号

C07K 16/44 (2006. 01)

G01N 33/558 (2006. 01)

(72) 发明人 邓发亮 唐时幸 王继华

G01N 33/531 (2006. 01)

(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理
有限公司 44224

代理人 万志香 郭元杰

(51) Int. Cl.

C07C 219/22 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书13页 附图4页

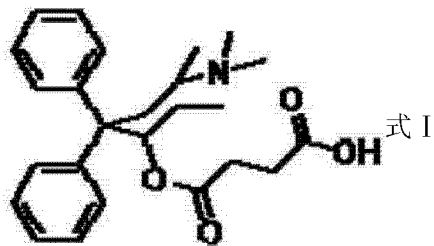
(54) 发明名称

美沙酮半抗原及其制备方法、美沙酮抗原和美沙酮单克隆抗体及其应用

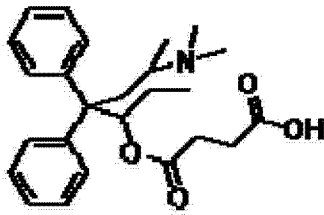
(57) 摘要

本发明公开了一种美沙酮半抗原及其制备方法、抗原和单克隆抗体及其应用,所述美沙酮半抗原具有式 I 结构,所述制备方法是将美沙酮还原为羟基美沙酮,与丁二酸酐进行酯化反应制得的;所述美沙酮完全抗原是将美沙酮半抗原与蛋白质载体连接制得的;所述美沙酮单克隆抗体是先将美沙酮完全抗原施用于动物进行免疫,再用杂交瘤技术或重组 DNA 方法制得的;所得的美沙酮单克隆抗体在制备检测样品中美沙酮的试剂、试剂条或试剂盒中的应用。本发明的完全抗原具有高免疫原性,且保留了美沙酮的免疫反应性;美沙酮单克隆抗体的特异性优越且效价高;胶体金标记美沙酮单抗免疫试纸条灵敏度高、特异性强、简便快捷,可进行现场检测等优点。

CN 103360271 A



1. 一种美沙酮半抗原,其特征在于,所述美沙酮半抗原具有下述式 I 结构:



式 I。

2. 一种如权利要求 1 所述的美沙酮半抗原的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 将美沙酮还原为羟基美沙酮;

(2) 将步骤(1)所得的羟基美沙酮与丁二酸酐进行酯化反应,即得。

3. 根据权利要求 2 所述的美沙酮半抗原的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所述将美沙酮还原为羟基美沙酮的方法为:先将美沙酮溶解于无水甲醇中,冰浴下加入硼氢化钠进行反应,再加冰水溶解,后乙酸乙酯萃取,再用饱和氯化钠水溶液洗涤萃取液,收集有机相,无水硫酸钠干燥,蒸干溶剂,即可;所述反应的温度为 0-40℃,时间为 2-24h。

4. 根据权利要求 2 所述的美沙酮半抗原的制备方法,其特征在于,步骤(2)所述酯化反应为:先将羟基美沙酮溶于甲苯,再加入丁二酸酐进行反应;所述酯化反应的温度为 50-150℃,时间为 6-24h。

5. 根据权利要求 3 所述的美沙酮半抗原的制备方法,其特征在于,所述反应的温度为 3-7℃,时间为 4-10h。

6. 根据权利要求 4 所述的美沙酮半抗原的制备方法,其特征在于,所述酯化反应的温度为 100-120℃,时间为 8-16h。

7. 一种美沙酮完全抗原,其特征在于,所述美沙酮完全抗原是将权利要求 1 所述的美沙酮半抗原与蛋白质载体连接制得的;所述蛋白质载体为牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白或血蓝蛋白。

8. 一种美沙酮单克隆抗体,其特征在于,所述美沙酮单克隆抗体是先将权利要求 7 所述的美沙酮完全抗原施用于动物进行免疫,再用杂交瘤技术或重组 DNA 方法制得的。

9. 一种如权利要求 8 所述的美沙酮单克隆抗体在制备检测美沙酮的试剂、试剂条或试剂盒中的应用。

10. 根据权利要求 9 所述的美沙酮单克隆抗体的应用,其特征在于,所述试剂条为用胶体金标记美沙酮单克隆抗体的免疫试纸条。

美沙酮半抗原及其制备方法、美沙酮抗原和美沙酮单克隆抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别是涉及美沙酮半抗原、抗原和单克隆抗体及其应用。

背景技术

[0002] 盐酸美沙酮(Methadone, MTD),是人工合成的阿片类药物,药效与吗啡类似,具有镇痛作用,并伴有呼吸抑制、缩瞳、镇静等副作用。因其镇疼作用强、成瘾性小,美沙酮常用于阿片类物质滥用的替代治疗,已成为世界上多个国家的主要戒毒药物。美沙酮自身具有生理和心理的依赖性和耐受性,滥用可能导致阿片类毒品一样的后果,是吸毒者追逐的对象之一,因此必须严格管理。目前已被国家和国际禁毒公约列入麻醉药品的规范中进行严格管制。

[0003] 目前,美沙酮的检测主要有薄层色谱法和基于色谱分析方法,如气相色谱分析法(GC)、高效液相色谱分析法(HPLC)、质谱(MS)等。这些色谱分析方法具有较高的灵敏度和特异性,但操作繁琐,需要精密仪器和受过专业培训的操作人员,且耗时长。因此,急需一种简单快捷、高灵敏度、高特异性、易于操作的美沙酮检测方法。

[0004] 而特定的结合反应,例如抗原-抗体反应,已经广泛用于检测生物样品中存在的各种物质的免疫测试中。其中,胶体金免疫层析技术发展迅速,已被人们所熟知,与仪器色谱分析法比较,胶体金层析技术具有高灵敏度、高特异性、简单快捷、易于操作和无需任何仪器设备等优点。

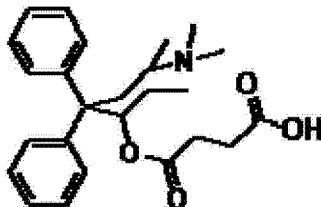
发明内容

[0005] 基于此,本发明提供一种美沙酮半抗原及其制备方法、美沙酮抗原和美沙酮单克隆抗体及其应用。

[0006] 解决上述技术问题的具体技术方案如下:

[0007] 一种美沙酮半抗原,所述美沙酮半抗原具有式 I 结构:

[0008]



[0009] 式 I

[0010] 上述美沙酮半抗原的制备方法,包括如下步骤:

[0011] (1) 将美沙酮还原为羟基美沙酮;

[0012] (2) 将步骤(1)所得的羟基美沙酮与丁二酸酐进行酯化反应,得具有式 I 结构的含

羧基的美沙酮半抗原。

[0013] 在其中一些实施例中,步骤(1)所述将美沙酮还原为羟基美沙酮的方法为:先将美沙酮溶解于无水甲醇中,冰浴下加入硼氢化钠,再加冰水溶解,后用乙酸乙酯萃取,饱和氯化钠水溶液洗涤萃取液,收集有机相,无水硫酸钠干燥,蒸干溶剂,即可;所述反应的温度为 0 ~ 40℃,时间为 2 ~ 24h;优选温度为 5℃,时间为 4 ~ 10h;更优选 6h。

[0014] 在其中一些实施例中,步骤(2)所述酯化反应的具体步骤为:先将羟基美沙酮溶于甲苯,再加入丁二酸酐进行反应,所述反应的温度为 50-150℃,时间为 6-24h;优选温度为 110℃,时间为 8-16h;更优选 6h。

[0015] 一种美沙酮完全抗原的制备方法,所述美沙酮完全抗原是将美沙酮半抗原与蛋白质载体连接制得的。

[0016] 在其中一些实施例中,所述美沙酮半抗原和蛋白质载体的连接方法采用碳二亚胺法(EDC),但不限于碳二亚胺法(EDC);半抗原和蛋白质载体的连接条件如下:反应温度为 0 ~ 40℃,优选 4 ~ 25℃;反应 pH 为 6.0 ~ 9.0,优选 7.0;反应时间为 4 ~ 48 小时,优选 12 ~ 24 小时,更优选 24 小时。

[0017] 在其中一些实施例中,所述蛋白质载体为牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白或血蓝蛋白;优选鸡卵清白蛋白和牛血清白蛋白。

[0018] 一种美沙酮单克隆抗体,所述美沙酮单克隆抗体是先将美沙酮完全抗原施用于动物进行免疫,再用杂交瘤技术或重组 DNA 方法制得的,具体方法如下:

[0019] (a) 将美沙酮完全抗原对 Balb/c 小鼠进行三次间隔免疫,在第三次免疫后再进行一次加强免疫,激活体内的淋巴细胞,产生美沙酮特异性抗体。

[0020] (b) 将产生美沙酮特异性抗体的 Balb/c 小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞 SP210 按 9:1 比例进行融合,采用间接竞争 ELISA 法测定细胞上清液,筛选阳性孔。将阳性细胞采用有限稀释法进行亚克隆,得到稳定的能够分泌美沙酮单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0021] (c) 用液体石蜡致敏 Balb/c 小鼠,将收集得到的杂交瘤细胞株注射于小鼠的腹腔。采集得到的腹水,用辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化,纯化后的腹水放入 -20℃ 环境保存。

[0022] 一种美沙酮单克隆抗体在制备检测美沙酮的试剂、试剂条或试剂盒中的应用。

[0023] 在其中一些实施例中,所述试剂条为用胶体金标记的美沙酮单克隆抗体的免疫试纸条。

[0024] 一种美沙酮的检测方法,包括如下步骤:

[0025] (1) 将样品与美沙酮单克隆抗体接触;

[0026] (2) 检测抗原-抗体复合物。

[0027] 本发明所述美沙酮半抗原及其制备方法、美沙酮抗原和单克隆抗体及其应用具有以下优点及有益效果:

[0028] (1) 本发明所述美沙酮半抗原的结构属于首次设计合成;

[0029] (2) 本发明所述美沙酮半抗原的制备方法简单,易操作,原料易得,易合成,适合大规模的生产;

[0030] (3) 本发明所制得的完全抗原具有高免疫原性,且保留了美沙酮的免疫反应性;

[0031] (4) 本发明所制得的抗美沙酮单克隆抗体 MTD-5 的特异性优异且效价高;

[0032] (5) 本发明所制得的胶体金标记美沙酮单克隆抗体免疫试纸条具有灵敏度高、特

异性强、简便快捷,可进行现场检测等优点,为打击毒品犯罪提供了有力的武器

附图说明

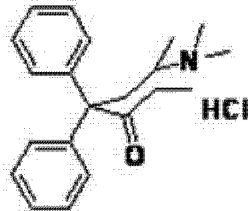
- [0033] 图 1 为实施例 1 中美沙酮半抗原衍生化合物(三甲基硅烷化)的 GC-MS 图谱;
 [0034] 图 2 为实施例 2 中美沙酮免疫原(美沙酮-OVA)紫外扫描图谱;
 [0035] 图 3 为实施例 3 中美沙酮检测抗原(美沙酮-BSA)紫外扫描图谱
 [0036] 图 4 为实施例 4 中美沙酮单克隆抗体纯化后凝胶电泳图图谱;
 [0037] 图 5 为实施例 4 中美沙酮单克隆抗体 MTD-5 类型测定图;
 [0038] 图 6 为实施例 4 中美沙酮单克隆抗体 MTD-5 效价测定图;
 [0039] 图 7-a 为实施例 5 阴性样本试剂条显色结果示意图;
 [0040] 图 7-b 为实施例 5 中 150ng/ml 美沙酮样本试剂条显色结果示意图;
 [0041] 图 7-c 为实施例 5 中 300ng/ml 美沙酮样本试剂条显色结果示意图;
 [0042] 图 7-d 为实施例 5 中 450ng/ml 美沙酮样本试剂条显色结果示意图。

具体实施方式

[0043] 本发明经过深入的研究合成了美沙酮的半抗原(结构式 I),并将其与适当的蛋白质载体连接制备了美沙酮完全抗原,以此为免疫原免疫 Balb/小鼠,将其脾细胞与小鼠骨髓瘤 SP210 细胞融合,获得特异性分泌抗美沙酮的单克隆细胞株,并制备和纯化得到了美沙酮单克隆抗体,其后进一步用所述完全抗原和美沙酮抗体制备了具有高灵敏度和特异性的美沙酮的免疫试纸条、试剂盒或试剂。

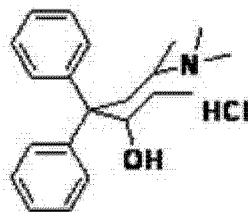
[0044] 本发明所述的盐酸美沙酮的结构如下:

[0045]



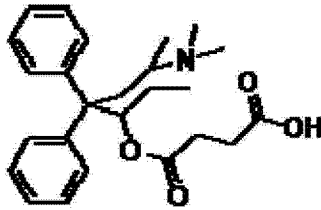
[0046] 所述的羟基美沙酮的结构如下:

[0047]



[0048] 所述美沙酮半抗原具有下述式 I 结构:

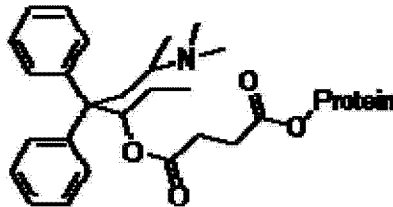
[0049]



[0050] 式 I

[0051] 所述美沙酮抗原具有下述式 II 结构：

[0052]

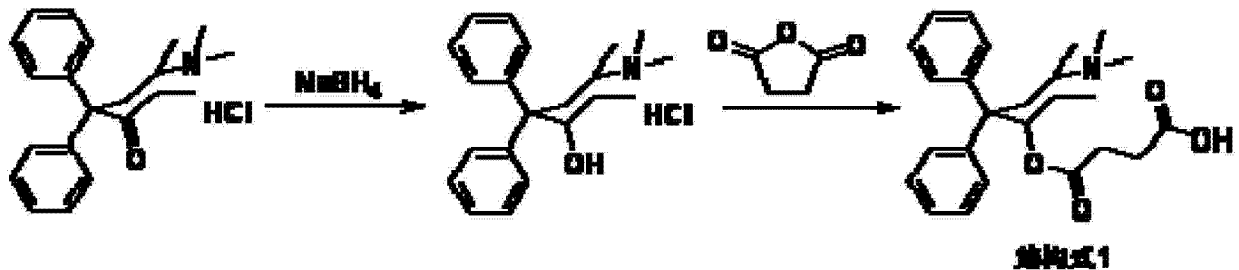


[0053] 式 II

[0054] 美沙酮半抗原制备

[0055] 美沙酮分子量小于 1000, 是半抗原物质, 只具备免疫反应性, 没有免疫原性, 不能直接用于免疫动物而获得抗体。因此, 为了制备本发明的完全抗原, 对美沙酮进行结构修饰制得了本发明的含活性基团—羧基的美沙酮半抗原。美沙酮半抗原根据以下路线合成：

[0056]



[0057] 在 0 ~ 40℃ 条件下, 用还原剂硼氢化钠将盐酸美沙酮的羰基还原羟基, 在无水的溶剂中与丁二酸酐发生酯化反应产生含活性基团的美沙酮半抗原 (结构式 I)。

[0058] 其中所述的还原和酯化反应可以本领域技术人员已知的任何方法、任何适宜的条件进行。本领域普通技术人员可根据具体操作或对产物的要求对这些条件进行适当调整。

[0059] 美沙酮完全抗原制备

[0060] 本发明提供了半抗原的确切结构, 但需要与蛋白质载体偶联形成完全抗原, 并施与宿主动物, 才能引发免疫原性应答产生抗体。

[0061] 本发明的“完全抗原”是指本发明的半抗原与适当的蛋白质载体结合后的产物。

[0062] 适当的蛋白质载体通常是指任何在免疫学上可接受的用于形成完全抗原的蛋白质, 例如, 血蓝蛋白 (KLH)、牛血清白蛋白 (BSA)、鸡卵清白蛋白 (OVA) 等。

[0063] 在本发明的一个优选的方案中, 蛋白质载体为鸡卵清白蛋白, 完全抗原为美沙酮-OVA, 作为免疫用抗原, 用于制备分泌抗美沙酮单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0064] 在本发明的另一个优选的方案中, 蛋白质载体为牛血清白蛋白, 完全抗原为美沙酮-BSA, 作为检测用抗原, 用于制备检测美沙酮的单克隆抗体免疫试纸条。

[0065] 美沙酮单克隆抗体的制备

[0066] 本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如,本发明完全抗原,可被施用于动物以诱导单克隆抗体的产生。对于单克隆抗体,可利用杂交瘤技术来制备或可用重组 DNA 法制备。

[0067] 本发明提供了一种抗美沙酮的单克隆抗体 MTD-5,经鉴定为 IgG1 型。本发明的一个优选的方案中,单克隆抗体 MTD-5 采用培养杂交瘤细胞方法制备。取杂交瘤细胞培养的上清液,经饱和硫酸铵沉淀法粗提出 IgG,再将粗提的抗体经亲和层析柱纯化。

[0068] 本发明的一个优选的方案中,单克隆抗体 MTD-5 采用 Balb/c 小鼠腹水生产单克隆抗体的方法制备。将约 $10^6 \sim 10^7$ 个杂交瘤细胞接种到致敏的小鼠腹腔内,2-4 周内可见腹部明显胀大。抽取腹水,经饱和硫酸铵沉淀法粗提出 IgG,再将粗提的抗体经亲和层析柱纯化。

[0069] 本发明在采用美沙酮-OVA 免疫的小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤 SP210 细胞按常规方法制备杂交瘤时,筛选到一株特异性分泌抗美沙酮的单克隆细胞株。

[0070] 标记本发明的美沙酮的单克隆抗体

[0071] 在本发明的一个优选例中,所述免疫球蛋白带有可检测标记物。更佳地,所述的标记物选自下组:胶体金标记物、有色标记物或荧光标记物。

[0072] 胶体金标记可采用本领域技术人员已知的方法进行。在本发明的一个优选的方案中,抗美沙酮的单克隆抗体 MTD-5 用胶体金标记,得到胶体金标记的 MTD-5 单克隆抗体。

[0073] 本发明的抗美沙酮单克隆抗体 MTD-5 有很好的特异性,与 143 种常见药物、毒品、没有交叉反应;MTD-5 与美沙酮-BSA 的载体 BSA 没有交叉反应。

[0074] 本发明的单克隆抗体 MTD-5 有很高的效价,在美沙酮-BSA 包被的酶标板检测中,效价达到 $1:10^6$ 。

[0075] 美沙酮检测用胶体金标记—免疫试纸条

[0076] 检测原理

[0077] 美沙酮的检测采用竞争抑制法。本发明将美沙酮-BSA 固定于硝酸纤维素膜上的检测区域,待检样品溶液中的美沙酮与美沙酮-BSA 竞争结合胶体金标记的抗美沙酮单克隆抗体。待检样品中的美沙酮抑制抗美沙酮单克隆抗体与美沙酮-BSA 的结合,从而抑制在硝酸纤维素膜上的检测区域形成色带。检测后如果检测区域形成色带,则结果为阴性,表明待测样品中不含美沙酮;反之,不形成色带,则结果为阳性,检测样品中含有美沙酮。

[0078] 通常,在检测中设置内质控。在硝酸纤维素膜上临近检测区域设置质控区域,将羊抗鼠 IgG 多抗固定在质控区域。检测过程中,无论待检样品中是否含有美沙酮,层析载体玻璃纤维上预包被的胶体金标记的美沙酮单克隆抗体总能与质控区域羊抗鼠 IgG 多抗结合形成一条有色质控带,该条带是判定层析过程是否正常和检测试纸是否变质的标准。

[0079] 若以 OVA 用来做免疫原,免疫动物产生抗体,抗体会包括美沙酮抗体/OVA 抗体,BSA 包被在 T 线,可以防止交叉反应,降低假阳率,试纸条采用的是竞争法,如果都用同一种的话,就会有载体交叉。

[0080] 试纸条及其材料

[0081] 本发明的试纸条可采用本领域常用的试纸条材料,采用常规的试纸条制备方法制成。

[0082] 本发明检测美沙酮的免疫试纸条,包括测试条和支撑测试条的支撑板,如可采用PVC板等;所述的测试条由滤样纸、层析材料、硝酸纤维素膜和吸水纸依次搭接组成,搭接部位可以采用常规的方法,如胶带等固定连接;其中:层析材料预包被胶体金标记或有色标记的美沙酮单克隆抗体或多克隆抗体,优选地包被胶体金标记的美沙酮单克隆抗体(MTD-5),硝酸纤维素膜上吸附检测线(T)和质控线(C);

[0083] 所述的检测线为完全抗原美沙酮-BSA,检测线所在的区域为检测区;

[0084] 所述的质控线为羊抗鼠多克隆抗体,质控线所在的区域为质控区;

[0085] 因此,测试条上的检测物依次为:预包被胶体金标记的美沙酮单克隆抗体(MTD-5)、检测线和质控线;

[0086] 在一个优选的方案中,层析材料上预包被胶体金标记的美沙酮单克隆抗体(MTD-5)是采用浓度为0.1~2.0mg/ml胶体金标记的美沙酮单克隆抗体(MTD-5)溶液进行预包被的,包被量为 $50\mu\text{l}/\text{cm}^2$;优选的浓度为0.5或1.5mg/ml, $50\mu\text{l}/\text{cm}^2$;

[0087] 硝酸纤维素膜上吸附的完全抗原美沙酮-BSA是采用浓度为0.1~2.0mg/ml的完全抗原美沙酮-BSA溶液进行吸附的,吸附量为 $10\mu\text{l}/\text{cm}^2$;优选的浓度为0.5或1mg/ml, $10\mu\text{l}/\text{cm}^2$;

[0088] 硝酸纤维素膜上吸附的羊抗鼠IgG多抗是采用浓度为0.1~2.0mg/ml羊抗鼠1gG多抗溶液进行吸附的,吸附量为 $10\mu\text{l}/\text{cm}^2$;优选的浓度为0.8或1.2mg/ml, $10\mu\text{l}/\text{cm}^2$;

[0089] 试纸条的灵敏度在50ng/ml~1000ng/ml之间。

[0090] 检测方法与结果判定

[0091] 平放试纸条,将试样滴在滤样纸上,3~5min内观察层析结果。根据出现的条纹位置来判断结果:

[0092] 阴性:质控区、检测区均出现明显的色带,示为阴性;

[0093] 阳性:只在质控区出现明显色带,而在检测区无色带,示为阳性;

[0094] 无效:质控区、检测区无任何色带或在质控区未出现色带而在检测区出现色带,表明检测方法错误或检测板变质或失效,应重新换取检测板检测。

[0095] 如果检测线较浅于质控线说明被测者吸食过此毒品但已代谢到末尾或用量较小,所以质控线也是试纸条判别吸毒状况的标准。

[0096] 吸毒阈值设定

[0097] 使用胶体金标记本发明的美沙酮单克隆抗体和完全抗原制备的试纸条,美沙酮的最低检测量可达到50ng/ml。考虑到某些正常使用的药物中也含有美沙酮成分,实际工作中为避免假阳性的出现,参照国际通行的浓度值,设定试纸条的阈值以300ng/ml为好。

[0098] 调节试剂条上预包被的胶体金标记的MTD-5单抗溶液、美沙酮-BSA完全抗原的浓度,使得试纸条对美沙酮的最低检测量为300ng/ml。当尿液中的美沙酮浓度 $<300\text{ng}/\text{ml}$,胶体金标记抗美沙酮单抗通过层析作用,向上移动,与固相于硝酸纤维素膜上的完全抗原相结合,形成色带,测试结果呈阴性;当尿液中的美沙酮浓度 $>300\text{ng}/\text{ml}$,胶体金标记的抗美沙酮单抗完全与尿液中的美沙酮相结合,不能与固相于硝酸纤维素膜上检测区的完全抗原相结合,检测区不能形成色带,测试结果呈阳性。

[0099] 试剂盒

[0100] 本发明的试剂盒是指含有本发明的美沙酮单克隆抗体或本发明的试纸条的试剂

盒。所述的试剂盒可根据需要包括容器、使用说明书、缓冲剂、免疫助剂等。

[0101] 以下将结合具体实施例对本发明做进一步说明。

[0102] 实施例 1 美沙酮半抗原的制备

[0103] 一种美沙酮半抗原,所述美沙酮半抗原是由下述方法制备而成的,具体步骤如下:

[0104] (1)将美沙酮还原为羟基美沙酮,具体步骤为:将盐酸美沙酮(2.4mmol)置于 50ml 圆底烧瓶中,加入无水甲醇 10ml 搅拌溶解,在冰浴下加入硼氢化钠(4.8mmol),控温 5℃ 反应。反应完毕,加入冰水 30ml 搅拌溶解,用乙酸乙酯 15ml 萃取 3 次,合并有机相,饱和氯化钠水溶液洗涤两次,收集有机相,无水硫酸钠干燥 1 小时。过滤收集母液,蒸干溶剂,即可。

[0105] (2)将步骤(1)所得的羟基美沙酮溶于 5ml 甲苯中,加入丁二酸酐,在 110℃ 反应 20 小时。冰浴冷却后过滤得白色固体即为美沙酮半抗原,反应产物的经气相-质谱联用仪(GC-MS)确证为结构式 1 所示的结构,参见图 1。

[0106] 实施例 2 美沙酮-OVA 完全抗原的制备

[0107] 一种美沙酮-OVA 完全抗原,所述美沙酮-OVA 完全抗原是用碳二亚胺法(EDC)方法将美沙酮半抗原与蛋白质载体连接制得的,具体步骤如下:

[0108] 取美沙酮半抗原 9.0mg (0.029mmol)溶于 500 μ l N,N-二甲基甲酰胺中,震荡混匀,加入 EDC0.04mmol、NHS0.04mmol 于 4℃ 搅拌反应 4 小时;

[0109] 将载体蛋白 OVA0.003mmol 溶于 2.0ml PBS (0.05M, pH7.0)中,缓慢加入到上述溶液中,加毕,室温搅拌反应 24 小时,之后于蒸馏水中透析 2 天,换液 3 次,高速冷冻离心机离心,收集上清液,得到美沙酮-OVA 免疫原。

[0110] 经紫外扫描可知(参见图 2),260-310nm 范围内三者最大吸收峰有明显的区别,即偶联成功。

[0111] 实施例 3 美沙酮-BSA 完全抗原的制备

[0112] 一种美沙酮-BSA 完全抗原,其制备方法同实施例 2 基本相同,不同在于:将蛋白质载体 OVA 换成牛血清白蛋白(BSA),即可制得美沙酮-BSA 完全抗原。

[0113] 经紫外扫描可知(参见图 3),260-310nm 范围内三者最大吸收峰有明显的区别,即偶联成功。

[0114] 实施例 4 美沙酮单克隆抗体的制备

[0115] 一种美沙酮单克隆抗体,其是由下述方法制备而成的,具体如下:

[0116] (1) Balb/C 小鼠免疫操作

[0117] 先将免疫原与弗氏佐剂(Freund's adjuvant)乳化,用 PBS 将实施例 2 制得的免疫原美沙酮-OVA 配制成 1mg/ml 的溶液,然后将免疫原溶液与弗氏佐剂等体积混合,用高速震荡器震荡形成均匀乳浊液,将此乳浊液用于动物的免疫。

[0118] 选择 8 周龄的小鼠进行注射免疫。取 8 周龄的健康 Balb/C 小鼠 12 只,在第 0 天,每只腹腔注射完全弗氏佐剂乳化抗原 100 μ l;第 14 天,再对每只小鼠腹腔注射不完全弗氏佐剂乳化抗原 100 μ l;第 21 天,以摘小鼠眼球法采血,用 ELISA 方法检测血清中抗体效价(滴度);第 28 天,再次腹腔注射不完全弗氏佐剂乳化抗原 100 μ l。在细胞融合反应前一周,用 100 μ g/100 μ l 抗原生理盐水再次加强免疫。采血后经测定,所得抗血清效价为 1:6400。

[0119] (2) 细胞融合及克隆化

[0120] 参考通用方法进行细胞融合和克隆化操作。

[0121] 细胞融合操作 3 天后检查细胞融合情况,当克隆直径长到约 1mm 时,用美沙酮-BSA 包被的酶联板来筛选出抗美沙酮的杂交瘤细胞。筛选到的阳性克隆用有限稀释法进行克隆化,以美沙酮-BSA 包被的 ELISA 法酶标板来筛选抗美沙酮的特异性杂交瘤细胞。经五次克隆后,得到一株能分泌专一性抗体的抗美沙酮单克隆细胞株。

[0122] (3) MTD-5 单抗的大规模制备

[0123] A、腹水制备

[0124] 培养步骤(2)所得的单克隆细胞株,取 $10^6 \sim 10^7$ 个杂交瘤细胞接种到致敏的小鼠腹腔内,3 周内可见腹部明显胀大,抽取腹水离心,加入 0.02wt% 的叠氮钠,于 4℃ 冰箱内保存。

[0125] B、抗体的纯化

[0126] 取 10ml 腹水,先用饱和硫酸铵沉淀,再对 pH=8 的磷酸缓冲液透析,并用紫外吸收法测定 280nm 下的蛋白浓度,制得抗体 20mg,命名为 MTD-5。

[0127] (4) MTD-5 抗体的鉴定

[0128] A、纯度测定

[0129] 对实施例 5 制备的抗体进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,测得 MTD-5 抗体的纯度 $\geq 90\%$,参见图 4。

[0130] B、型别测定

[0131] MTD-5 抗体经 PIERCE 公司生产的特异性抗体分型试剂盒(monoclonal antibody isotyping kit, PIERCE) 鉴定,操作方案试剂盒说明书进行,鉴定结果为 MTD-5 抗体为 IgG1 型,参见图 5。

[0132] C、MTD-5 抗体的效价测定

[0133] 采用间接 ELISA 法测定。包被 MTD-BSA ($1 \mu\text{g/ml}$),将美沙酮单克隆抗体稀释到 1mg/ml 后,从 1:1000 浓度开始做 10 倍稀释进行检测,设阴性(N)、阳性(P)对照。在 450nm 光波长下测定吸收值(OD),与阴性对照的 OD 均值比较,以 $P/N > 2.1$ 的最低稀释度作为单抗的效价。经比色测定,所得美沙酮单克隆抗体的效价为 $1:10^6$,参见图 6。

[0134] D、MTD-5 抗体的与 BSA 的交叉反应性鉴定

[0135] 用完全抗原美沙酮-BSA 和 BSA 包被酶标板,以 1:2000 稀释的美沙酮单克隆抗体 MTD-5 与之结合,进行酶联反应检测,结果显示美沙酮单克隆抗体 MTD-5 可以检测到 50ng 的美沙酮-BSA,而且与 BSA 没有任何交叉反应。

[0136] 实施例 5 一种美沙酮单克隆抗体在制备检测样品中美沙酮的试剂条中的应用

[0137] 一种 MTD-5 抗体在制备检测样品中美沙酮的试剂条中的应用,具体如下:

[0138] (1) 胶体金标记的 MTD-5 抗体

[0139] 取粒径合适的胶体金(Gold Colloidal)颗粒(广州万孚生物技术股份有限公司制备) 100ml,缓慢滴加入 10ml 的 pH 为 9.0 的硼酸缓冲液,滴加完毕后在磁力快速搅拌下迅速加入 1.5mg 抗美沙酮抗体,继续搅拌 15min;加入 2ml 的 10wt% 的牛血清白蛋白,再搅拌 15min 后,以 12000rpm/min,在 4℃ 下离心 30min,吸去上清液,用 10ml 含 0.1% 叠氮钠的硼酸缓冲液悬浮沉淀,即得胶体金标记的 MTD-5 抗体,汲取并保存。

[0140] (2) 试纸条的制备

[0141] A、胶体金-单抗结合物玻璃纤维条的制备

[0142] 将步骤(1)所得的胶体金标记的 MTD-5 抗体与 pH 为 7.4 的 10mM 磷酸盐缓冲溶液混合,配制成 0.5mg/ml 浓度的溶液,均匀地涂布在玻璃纤维素纸上,涂布量为 $50 \mu\text{l}/\text{cm}^2$,真空干燥,即可。

[0143] B、检测线 T 质控线 C

[0144] 检测线(T):将美沙酮-BSA 完全抗原与 pH 为 7.4 的 10mM 磷酸盐缓冲溶液混合配制成浓度为 0.5mg/ml 的混合溶液,喷在硝酸纤维膜上,涂布量为 $10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$;

[0145] 质控线(C):将羊抗兔 IgG 多抗与 pH 为 7.4 的 10mM 磷酸盐缓冲溶液混合配制成浓度为 0.8mg/ml 混合溶液,喷在硝酸纤维膜上,涂布量为 $10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$;然后在 15-35℃ 干燥。

[0146] C、测试条组装

[0147] 将滤样纸、包被有胶体金标记的 MTD-5 抗体的玻璃纤维纸、包被有美沙酮-BSA(检测线)和羊抗兔 IgG 多抗(质控线)的硝酸纤维素膜、吸水纸依次搭接组成测试条;将测试条置于 PVC 支撑板上,用胶带固定;用设有加样孔和观察窗的盖板覆盖测试条及支撑板,加样孔位于滤样纸处,观察窗位于带有检测线和质控线的硝酸纤维素膜处,即可。

[0148] (3) 胶体金标记氯胺酮单抗免疫试纸条的灵敏度测试

[0149] A、样本配制

[0150] 根据测试要求,在空白尿样中添加美沙酮,分别配制成含美沙酮浓度为 1ng/ml、3ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、80ng/ml、100ng/ml、150ng/ml、200ng/ml、250ng/ml、300ng/ml 和 450ng/ml 的系列试样,参见图 7a-图 7d。

[0151] B、检测与结果

[0152] 将上述系列浓度定量梯度测试,灵敏度实验结果如表 1。

[0153] 表 1 胶体金免疫试纸条的灵敏度实验结果

[0154]

浓度 (ng/ml)	1	3	5	10	20	40	50	60	80	100	150	200	250	300
试纸条实验结果	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

[0155] 注:“+”表示阳性;“-”表示阴性。

[0156] 实验结果表明,本实施例制得的胶体金免疫层析分析试纸最低检测量 50ng/ml。

[0157] 另外,通过改变胶体金标记 MTD-5 单克隆抗体的浓度或美沙酮-BSA 完全抗原的包被浓度可以获得不同最低检测量($\geq 50\text{ng/ml}$)的胶体金试纸条。

[0158] C、美沙酮胶体金试纸条的药物交叉实验

[0159] 144 种毒品和常用药物,分别用阴性尿液配成浓度 100ug/ml 的样本。显色情况按广州万孚生物技术股份有限公司比色卡判读,测试线显色达 C5 以上,试剂条显两条明显条带,判为阴性结果,用“-”表示。T 线显色达 C5 以下,T 线较浅,只显一条明显条带,判为阳性结果,用“+”表示。

[0160] 用本实施例制得的美沙酮单抗胶体金标记试纸条进行检测,结果表明用此抗体制成的美沙酮单抗胶体金标记试纸条仅与美沙酮发生免疫结合反应,而与上述其他药物没有交叉反应。结果表明制备的胶体金标记美沙酮单抗免疫试纸条性能良好,专一性强。测试结果见表 2。

[0161] 表 2 试纸条的特异性反应测试结果

[0162]

常用毒品、药物	结果	常用毒品、药物	结果	常用毒品、药物	结果
01 盐酸麻黄碱	-	02 盐酸文拉法辛	-	03 拉莫三嗪	-
04 盐酸哌替啶	-	05 赖诺普利	-	06 多西拉敏	-
07 福尔可定	-	08 孟鲁司特	-	09 阿托西汀	-
100 ³ -单乙酰吗啡	-	11 氢氯噻嗪	-	12 酚麻美敏	-
13 磷酸可待因	-	14 辛伐他汀	-	15 喹硫平(富马酸)	-
16 枸橼酸芬太尼	-	17 螺内酯	-	18 阿立派唑	-
19 美沙酮	+	20 阿托伐他汀	-	21 左甲状腺素钠	-
22 蒂巴因	-	23 非诺贝特	-	24 加巴喷丁	-
25 乙酰可待因	-	26 卡马西平	-	27 普伐他汀钠	-
28 罂粟碱	-	29 盐酸利多卡因	-	30 维生素 B1	-
31 阿普唑仑	-	32 尼莫地平	-	33 盐酸普萘洛尔	-
34 盐酸纳洛酮	-	35 多潘立酮	-	36 维生素 B2	-
37 盐酸纳曲酮	-	38 枸橼酸莫沙必利	-	39 氢溴酸右美沙芬	-
40 盐酸普鲁卡因	-	41 盐酸碘酮片	-	42 奥氮平	-
43 奥美拉唑	-	44 克拉霉素	-	45 枸橼酸西地那非	-
46 萘磺酸右丙氧芬	-	47 环丙沙星	-	48 双氯芬酸钠	-
49 司可巴比妥	-	50 对乙酰氨基酚	-	51 氨苯蝶啶	-
52 硝西洋	-	53 地红霉素	-	54 可的松	-
55 奥沙西洋	-	56 硝苯地平	-	57 醋酸波尼松	-
58 安非他命	-	59 头孢克洛	-	60 碳酸锂	-
61 苯巴比妥	-	62 氟氮平	-	63 盐酸多巴胺	-

[0163]

64 盐酸氟西汀	-	65 卡托普利	-	66 地高辛	-
67 盐酸可卡因	-	68 头孢拉定	-	69 强的松	-
70 盐酸地芬诺酯	-	70 青霉素 V 钾	-	72 盐酸曲唑酮	-
73 氟硝西泮	-	74 甲磺酸氯氯地平	-	75 苯妥英钠	-
76 盐酸伪麻黄碱	-	77 马来酸依那普利	-	78 异丙肾上腺素	-
79 盐酸雷尼替丁	-	80 酒石酸美托洛尔	-	81 洛哌丁胺	-
82 盐酸摇头丸	-	83 利福平	-	84 雌激素	-
85 盐酸曲马多	-	86 盐酸吡格列酮	-	87 地西洋	-
88 吗啡	-	89 氯雷他定	-	90 氨苄西林	-
91 盐酸甲基安非他明	-	92 尼可刹米	-	93 盐酸氯丙嗪	-
94 苯甲酰爱康宁	-	95 咪噻米	-	96 格列吡嗪	-
97 阿司匹林	-	98 硫酸氢氯吡格雷	-	99 头孢氨苄	-
100 巴比妥	-	101 硝酸甘油	-	102 盐酸洛非西定	-
103 甲基苯丙胺	-	104 阿托品	-	105 氟伏沙明	-
106 埃索美拉唑镁	-	107 左炔诺孕酮	-	108 氟哌啶醇	-
109 咖啡因	-	110 米氮平	-	111 镁	-
112 奋乃静	-	113 葡萄糖	-	114 丙戊酸钠	-
115 泮托拉唑	-	116 酚妥拉明	-	117 盐酸舍曲林	-
118 丙硫氧嘧啶	-	119 硝酸异山梨酯	-	120 吡拉西坦	-
121 米非可酮	-	122 格列本脲	-	123 帕罗西汀	-
124 四环素	-	125 兰索拉唑	-	126 多赛平	-
127 格列齐特	-	128 托吡脂	-	129 氯米帕明	-
130 阿昔洛韦	-	131 氯丙嗪	-	132 阿米替林	-
133 左氧氟沙星	-	134 利培酮	-	135 西酞普兰	-
136 酮康唑	-	137 氨茶碱	-	138 度洛西汀	-
139 氨卡西林	-	140 利福来	-	141 帕利哌酮	-

[0164]

142 维生素 C	-	143 氨酚羟考酮	-	144 五氟利多	-
-----------	---	-----------	---	----------	---

[0165] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

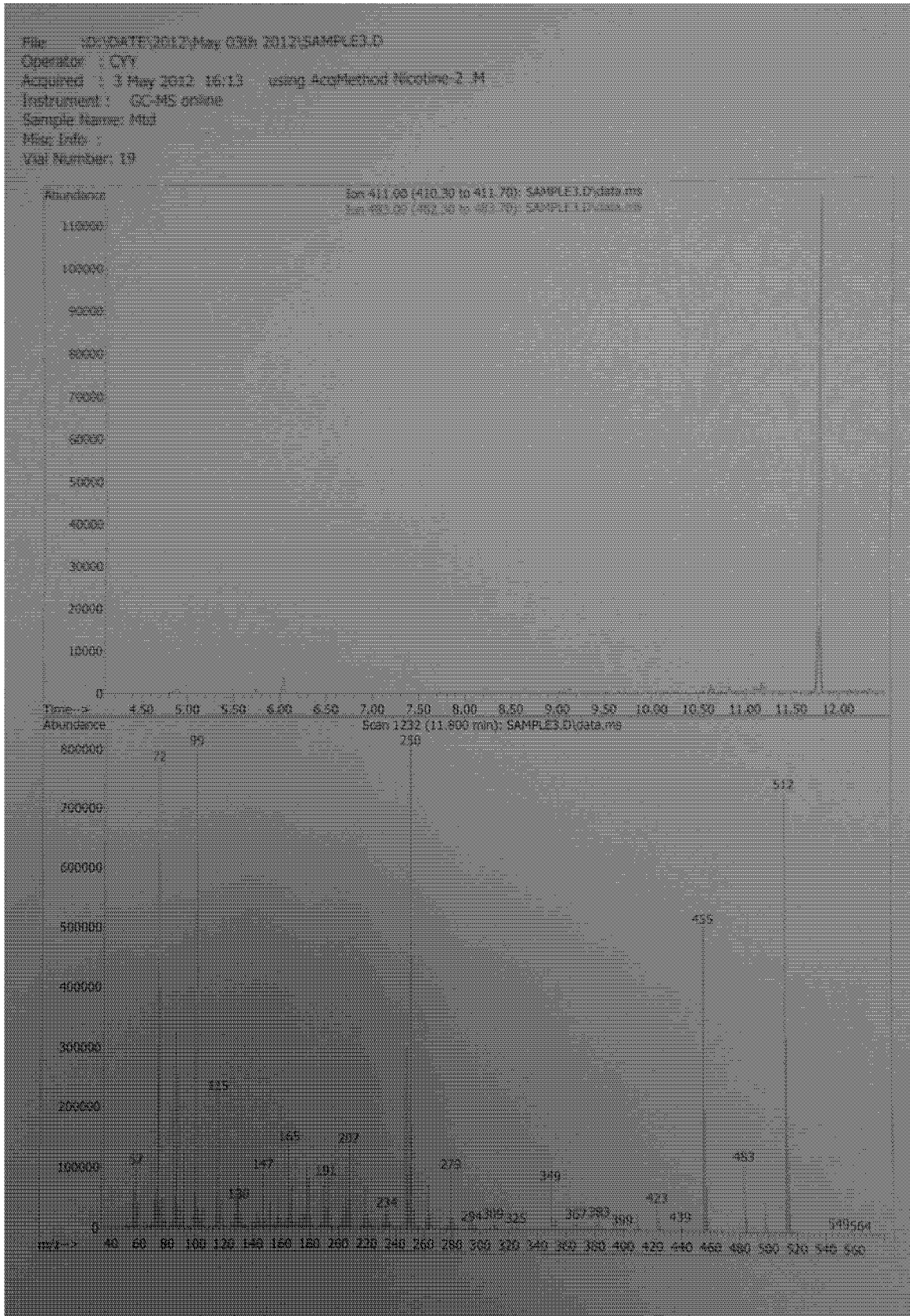


图 1

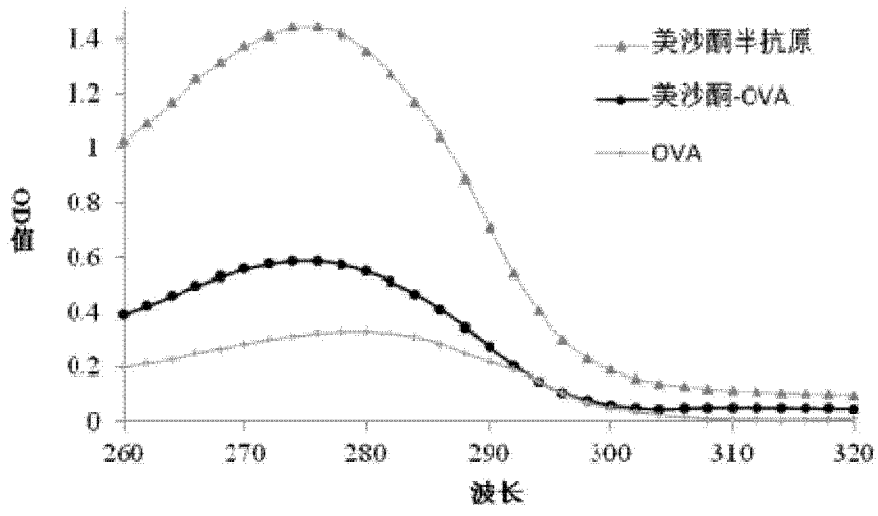


图 2

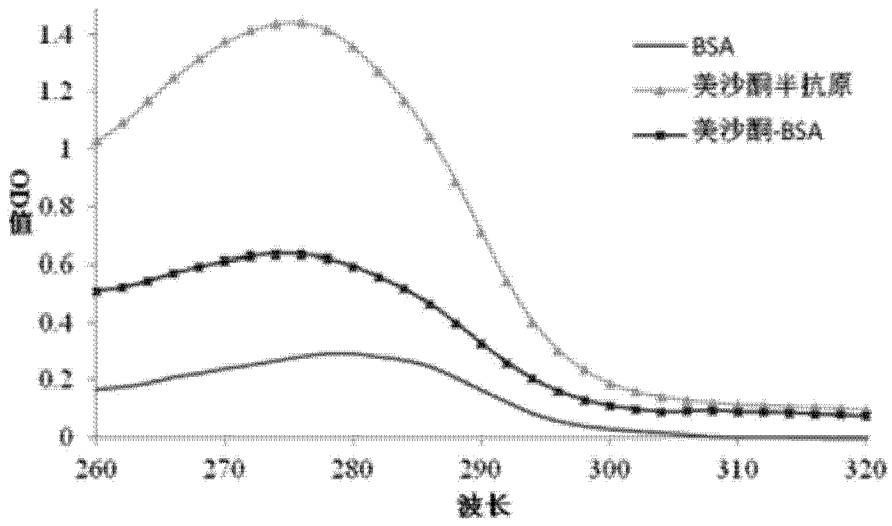


图 3

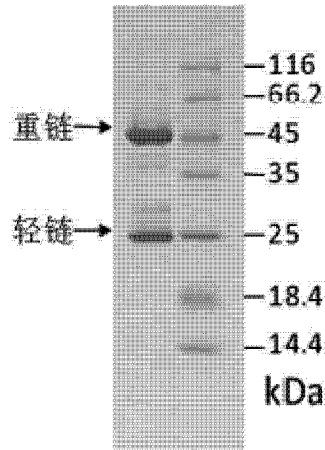


图 4

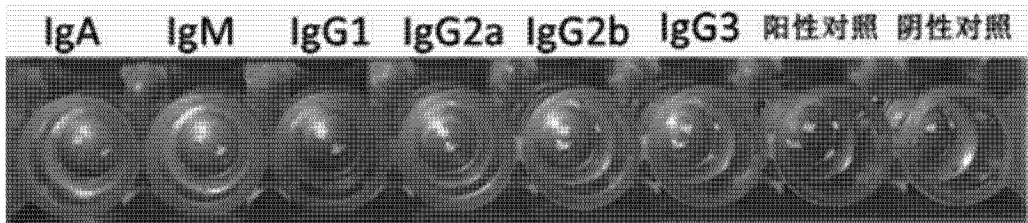


图 5

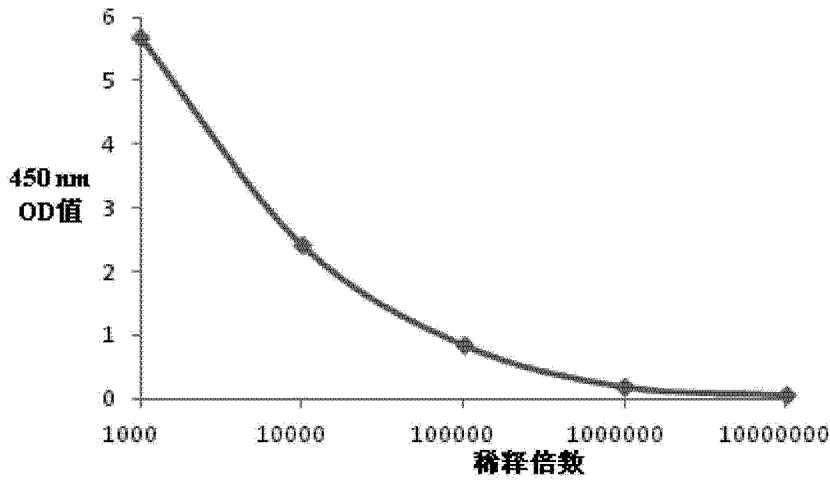


图 6

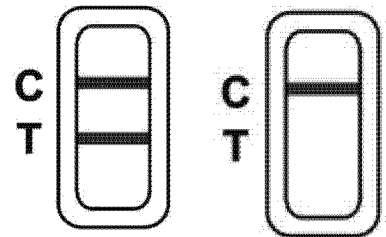


图 7-a

图 7-b

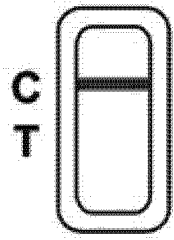


图 7-c

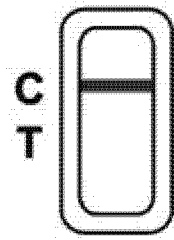


图 7-d

专利名称(译)	美沙酮半抗原及其制备方法、美沙酮抗原和美沙酮单克隆抗体及其应用		
公开(公告)号	CN103360271A	公开(公告)日	2013-10-23
申请号	CN201310245255.X	申请日	2013-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术股份有限公司		
[标]发明人	邓发亮 唐时幸 王继华		
发明人	邓发亮 唐时幸 王继华		
IPC分类号	C07C219/22 C07C213/06 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/558 G01N33/531		
代理人(译)	郭元杰		
其他公开文献	CN103360271B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种美沙酮半抗原及其制备方法、抗原和单克隆抗体及其应用，所述美沙酮半抗原具有式I结构，所述制备方法是美沙酮还原为羟基美沙酮，与丁二酸酐进行酯化反应制得的；所述美沙酮完全抗原是将美沙酮半抗原与蛋白质载体连接制得的；所述美沙酮单克隆抗体是先将美沙酮完全抗原施用于动物进行免疫，再用杂交瘤技术或重组DNA方法制得的；所得的美沙酮单克隆抗体在制备检测样品中美沙酮的试剂、试剂条或试剂盒中的应用。本发明的完全抗原具有高免疫原性，且保留了美沙酮的免疫反应性；美沙酮单克隆抗体的特异性优越且效价高；胶体金标记美沙酮单克隆免疫试纸条灵敏度高、特异性强、简便快捷，可进行现场检测等优点。式I

