



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106645760 B

(45)授权公告日 2018.09.11

(21)申请号 201611231168.9

G01N 33/74(2006.01)

(22)申请日 2016.12.28

G01N 33/558(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 33/532(2006.01)

申请公布号 CN 106645760 A

审查员 贾静

(43)申请公布日 2017.05.10

(73)专利权人 河南科技学院

地址 453000 河南省新乡市红旗区五一路
东段

(72)发明人 姜金庆 刘长忠 杨雪峰 王自良

范国英 张海棠 李广领 赵坤

赵恒章 李任峰

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

代理人 王加贵

(51)Int.Cl.

C07K 14/77(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

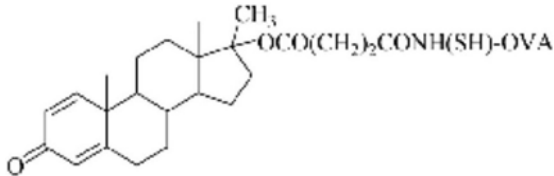
一种去氢甲睾酮抗原及其制备方法和检测
试纸卡

(57)摘要

本发明涉及一种去氢甲睾酮抗原及其制备方法和检测试纸卡,属于免疫化学检测技术领域。本发明提供的去氢甲睾酮包被抗原制备得到的试纸卡,包括塑料盒体,所述塑料盒体一端设置有加样孔,设置在所述塑料盒体中的试纸条,所述试纸条包括支撑层,设置在所述支撑层上的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫,所述硝酸纤维素膜上设置有检测线和质控线,所述检测线处设置有去氢甲睾酮包被抗原,所述质控线处设置有羊抗鼠IgG,所述结合垫上灌注有胶体金标记的抗去氢甲睾酮特异性单克隆抗体。本发明提供的去氢甲睾酮包被抗原制备得到的试纸卡操作简便,灵敏度高,特异性强,易于大范围推广应用。

1. 一种去氢甲睾酮检测试纸卡,包括塑料盒体,所述塑料盒体一端设置有加样孔,设置在所述塑料盒体中的试纸条,所述试纸条包括支撑层,设置在所述支撑层上的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫,所述硝酸纤维素膜上设置有检测线和质控线,其特征在于,所述检测线处设置有去氢甲睾酮包被抗原,所述质控线处设置有羊抗鼠IgG,所述结合垫上灌注有胶体金标记的抗去氢甲睾酮特异性单克隆抗体;

去氢甲睾酮包被抗原,为去氢甲睾酮-鸡卵清白蛋白偶联物,具有式I所示结构:



式 I;

式I中,OVA为鸡卵清白蛋白;

所述包被抗原的制备方法包括以下步骤:

- 1) 将去氢甲睾酮溶于无水吡啶,得到去氢甲睾酮溶液;
 - 2) 将所述去氢甲睾酮溶液与琥珀酸酐混合,在45~60℃避光进行酯化反应30~40h,得到去氢甲睾酮衍生物;所述去氢甲睾酮和琥珀酸酐的质量比为1:(0.6~1.5);
 - 3) 将所述去氢甲睾酮衍生物溶解后进行酸化,得到去氢甲睾酮-琥珀酸酯;所述溶解去氢甲睾酮衍生物用溶剂为质量分数为4~8%的碳酸氢钠溶液;所述酸化后还包括:将酸化产物进行重结晶,所述重结晶用溶剂包括乙醚或四氯化碳;
 - 4) 将所述去氢甲睾酮-琥珀酸酯与N-羟基琥珀酰亚胺和1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐溶于N,N-二甲基甲酰胺中,在35~40℃避光振荡条件下活泼酯法反应20~30h,得到去氢甲睾酮-琥珀酸酯活化中间产物反应液;所述去氢甲睾酮-琥珀酸酯、N-羟基琥珀酰亚胺和1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐的质量比为2:(0.8~1.5):(2.5~3.5);
 - 5) 将所述去氢甲睾酮-琥珀酸酯活化中间产物反应液逐滴加入鸡卵清白蛋白磷酸盐缓冲溶液中,偶联反应3~6h,得到去氢甲睾酮-鸡卵清白蛋白偶联物;
- 所述包被抗原的浓度为0.2~0.3μg/ml;
- 所述抗去氢甲睾酮特异性单克隆抗体的浓度为0.1~0.2mg/ml。

一种去氢甲睾酮抗原及其制备方法和检测试纸卡

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫化学检测技术领域,具体涉及一种去氢甲睾酮抗原及其制备方法和检测试纸卡。

背景技术

[0002] 去氢甲睾酮(1-dehydro-17 α -methyltestosterone,DMT),又名大力补、美雄酮,是一种人工合成的促蛋白同化类固醇激素。DMT能促进蛋白质合成、维持正氮平衡、增进食欲、促进钙磷在骨组织中沉积和新生组织的形成,因而在医学临床上常用于治疗再生障碍性贫血、男性发育迟缓、骨折及烧伤处理、手术后慢性消耗性疾病、老年骨质疏松和肿瘤恶液汁病等。DMT还具有促进动物体内营养物质沉积和改善生产性能的作用,在畜牧业生产中被用作饲料添加剂,以促进动物生长,提高瘦肉率。运动员服用DMT后能增强肌肉力量和体力,提高比赛成绩,因而也被违法应用到运动会和动物竞技比赛中。

[0003] 但DMT是一种蛋白同化激素,长期或大量服用会对人体有很多副作用,导致肝功能障碍、生殖功能紊乱,增加患心血管疾病的风险等。蛋白同化激素用作饲料添加剂时,会在动物体内残留。当人们长期食用含有该药物残留的动物性食品时,同样会造成人类生殖系统障碍、发育异常,提高乳房癌、睾丸癌等发病机率,严重危害人类健康。因此,欧盟自1986年以来就禁止在肉食性动物生产中以促进生长为目的使用人工合成的促蛋白同化激素。我国农业部2002年4月发布的《食品动物禁用的兽药及其它化合物清单》中也明确规定性激素类原料药及其单方、复方制剂产品不准以抗应激、提高饲料报酬、促进动物生长为目的在饲养过程中使用。

[0004] 这就要求对食源性动物进行严格的激素滥用监控,以保护消费者的合法权益。DMT残留常用的检测方法有高效液相色谱法(HPLC),气相色谱-质谱法(GC-MS)和液相色谱-质谱法(LC-MS)等。这些方法灵敏度高,定性准确,可以确定化合物的分子量、分子式,甚至官能团,适合定量检测DMT含量。但这些方法成本高,需要专业的技术人员,昂贵的实验仪器及长时间的前期准备工作。而免疫学检测方法建立在抗体对抗原的分子识别上,其主要优点是抗原抗体的亲合力高、检测快速、经济实用,能够实现对生物液体的小体积、大通量检测,是最灵敏的方法之一。

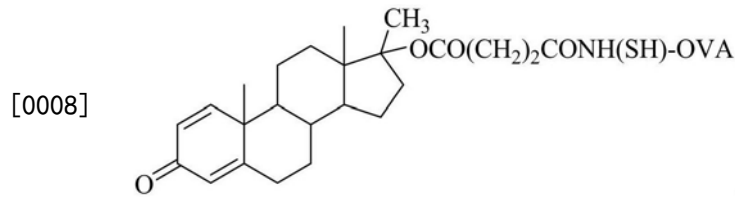
[0005] 胶体金标记免疫分析法简便快速、成本低、无污染、无需培训,但现有去氢甲睾酮胶体金标记免疫检测方法灵敏度仍较低,一种能够实现去氢甲睾酮高灵敏度检测的抗原的研制对于保障动物性食品安全具有十分重要的意义。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种去氢甲睾酮抗原及其制备方法和检测试纸卡。本发明提供的去氢甲睾酮抗原及其检测试纸卡操作简单、快速准确、灵敏度高、特异性强、成本低、稳定性好,可进行批量检测。

[0007] 本发明提供了一种去氢甲睾酮包被抗原,为去氢甲睾酮-鸡卵清白蛋白偶联物,具

有式I所示结构：



[0009] 式I中，OVA为鸡卵清白蛋白。

[0010] 本发明还提供了上述技术方案所述包被抗原的制备方法，包括以下步骤：

[0011] 1) 将去氢甲睾酮溶于无水吡啶，得到去氢甲睾酮溶液；

[0012] 2) 将所述去氢甲睾酮溶液与琥珀酸酐混合，在45~60℃避光进行酯化反应30~40h，得到去氢甲睾酮衍生物；

[0013] 3) 将所述去氢甲睾酮衍生物溶解后进行酸化，得到去氢甲睾酮-琥珀酸酯；

[0014] 4) 将所述去氢甲睾酮-琥珀酸酯与N-羟基琥珀酰亚胺和1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐溶于N,N-二甲基甲酰胺中，在35~40℃避光振荡条件下活泼酯法反应20~30h，得到去氢甲睾酮-琥珀酸酯活化中间产物反应液；

[0015] 5) 将所述去氢甲睾酮-琥珀酸酯活化中间产物反应液逐滴加入鸡卵清白蛋白磷酸盐缓冲溶液中，偶联反应3~6h，得到去氢甲睾酮-鸡卵清白蛋白偶联物。

[0016] 优选的是，所述溶解淡黄色油脂状物用溶剂为质量分数为4~8%的碳酸氢钠溶液。

[0017] 优选的是，所述步骤3)中酸化后还包括：将酸化产物进行重结晶，所述重结晶用溶剂包括乙醚或四氯化碳。

[0018] 优选的是，所述步骤2)中去氢甲睾酮和琥珀酸酐的质量比为1：(0.6~1.5)。

[0019] 优选的是，所述步骤4)中去氢甲睾酮-琥珀酸酯、N-羟基琥珀酰亚胺和1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐的质量比为2：(0.8~1.5)：(2.5~3.5)。

[0020] 本发明还提供了上述技术方案所述去氢甲睾酮包被抗原制备得到的试纸卡，包括塑料盒体，所述塑料盒体一端设置有加样孔，设置在所述塑料盒体中的试纸条，所述试纸条包括支撑层，设置在所述支撑层上的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫，所述硝酸纤维素膜上设置有检测线和质控线，其特征在于，所述检测线处设置有上述技术方案所述的去氢甲睾酮包被抗原或上述技术方案所述制备方法得到的去氢甲睾酮包被抗原，所述质控线处设置有羊抗鼠IgG，所述结合垫上灌注有胶体金标记的抗去氢甲睾酮特异性单克隆抗体。

[0021] 优选的是，所述包被抗原的浓度为0.2~0.3μg/ml。

[0022] 优选的是，所述抗去氢甲睾酮特异性单克隆抗体的浓度为0.1~0.2mg/ml。

[0023] 本发明提供了一种去氢甲睾酮包被抗原，为去氢甲睾酮-鸡卵清白蛋白偶联物。利用本发明所述去氢甲睾酮包被抗原得到的检测试纸卡因异源性检测方法而灵敏度高、特异性强，检测限可达0.5ng/ml；操作简单、方便快捷、成本低、易于大范围推广应用。

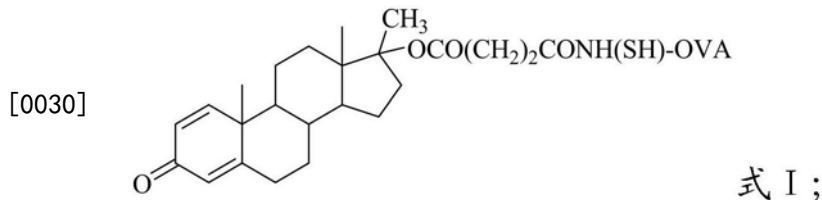
附图说明

[0024] 图1为本发明实施例3提供的去氢甲睾酮包被抗原合成路线图；

- [0025] 图2为本发明实施例5提供的试纸卡的结构示意图；
 [0026] 图3为本发明实施例5提供的试纸卡的侧视图；
 [0027] 图4为本发明实施例5提供的试纸卡的俯视图；
 [0028] 图5为本发明实施例1提供的去氢甲睾酮免疫原合成路线图。

具体实施方式

[0029] 本发明提供了一种去氢甲睾酮包被抗原,为去氢甲睾酮-鸡卵清白蛋白偶联物,具有式I所示结构:



[0031] 式I中,OVA为鸡卵清白蛋白。

[0032] 式I中,OVA与去氢甲睾酮通过脱水缩合反应形成酰胺键。

[0033] 本发明还提供了上述技术方案所述包被抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0034] 1) 将去氢甲睾酮溶于无水吡啶,得到去氢甲睾酮溶液;

[0035] 2) 将所述去氢甲睾酮溶液与琥珀酸酐混合,在45~60℃避光进行酯化反应30~40h,得到去氢甲睾酮衍生物;

[0036] 3) 将所述去氢甲睾酮衍生物溶解后进行酸化,得到去氢甲睾酮-琥珀酸酯;

[0037] 4) 将所述去氢甲睾酮-琥珀酸酯与N-羟基琥珀酰亚胺和1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐溶于N,N-二甲基甲酰胺中,在35~40℃避光振荡条件下活泼酯法反应20~30h,得到去氢甲睾酮-琥珀酸酯活化中间产物反应液;

[0038] 5) 将所述去氢甲睾酮-琥珀酸酯活化中间产物反应液逐滴加入鸡卵清白蛋白磷酸盐缓冲溶液中,脱水缩合反应3~6h,得到去氢甲睾酮-鸡卵清白蛋白偶联物。

[0039] 本发明将去氢甲睾酮溶于无水吡啶,得到去氢甲睾酮溶液。在本发明中,所述去氢甲睾酮的质量和无水吡啶的体积比优选为(5~30)mg:3mL,更优选为20mg:3mL。本发明对所述去氢甲睾酮和无水吡啶的来源没有特殊的限定,采用本领域技术人员熟知的去氢甲睾酮和无水吡啶的市售产品即可。

[0040] 得到去氢甲睾酮溶液后,本发明将所述去氢甲睾酮溶液与琥珀酸酐混合,在45~60℃避光进行酯化反应30~40h。在本发明中,所述去氢甲睾酮和琥珀酸酐的质量比为1:(0.6~1.5),更优选为1:0.9。在本发明中,所述酯化反应的温度为45~60℃,更优选为50℃;所述酯化反应的时间为30~40h,优选为36h。在本发明中,所述酯化反应优选进行搅拌的条件下进行,所述搅拌的转速优选为50~200rpm。

[0041] 在本发明中,所述酯化反应后,优选对酯化反应产物进行干燥,得到去氢甲睾酮衍生物。在本发明中,所述去氢甲睾酮衍生物为淡黄色油脂状物。在本发明中,所述干燥的方法优选采用氮吹法,具体为:使用本领域技术人员熟知的氮吹仪将无水吡啶吹干,得到去氢甲睾酮衍生物。

[0042] 得到淡黄色油脂状物后,本发明对所述淡黄色油脂状物溶解后进行酸化,除去多余溶质。在本发明中,溶解所述淡黄色油脂状物用溶剂优选为碳酸氢钠溶液,所述碳酸氢钠

溶液的质量分数优选为4~8%，更优选为5%；

[0043] 所述溶解后，本发明优选使用乙醚将溶解后的淡黄色油脂状物进行洗涤，除去未反应的杂质，取水相挥干。

[0044] 在本发明中，所述酸化用酸化剂优选为硫酸，酸化pH值为4.0~6.0。

[0045] 本发明在所述酸化反应后，优选将得到的酸化产物进行离心，对所述离心得到的沉淀进行干燥和重结晶，得到去氢甲睾酮-琥珀酸酯。在本发明中，所述干燥方法优选为干燥剂干燥，所述干燥剂优选为无水硫酸钠。在本发明中，所述重结晶用溶剂优选包括乙醚或四氯化碳。

[0046] 得到去氢甲睾酮-琥珀酸酯后，本发明将所述去氢甲睾酮-琥珀酸酯与N-羟基琥珀酰亚胺和1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐溶于N,N-二甲基甲酰胺中(3~5ml)，在35~40℃避光振荡反应20~30h，得到去氢甲睾酮-琥珀酸酯活化中间产物反应液。在本发明中，所述去氢甲睾酮-琥珀酸酯、N-羟基琥珀酰亚胺和1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐的质量比为2:(0.8~1.5):(2.5~3.5)；更优选为5:2.4:6.8。

[0047] 在本发明中，所述避光反应优选在37℃下反应24h。

[0048] 得到去氢甲睾酮-琥珀酸酯活化中间产物反应液后，本发明将所述中间产物反应液逐滴加入鸡卵清白蛋白磷酸盐缓冲溶液中，反应3~6h，得到去氢甲睾酮-鸡卵清白蛋白偶联物。本发明对所述磷酸盐缓冲液的浓度和pH没有特殊的限定，采用本领域技术人员熟知的用于溶解鸡卵清白蛋白的磷酸盐缓冲液即可。在本发明中，所述偶联反应的时间优选为4h。

[0049] 所述偶联反应后，本发明优选将得到反应液进行透析处理，得到去氢甲睾酮-鸡卵清白蛋白偶联物。在本发明中，所述透析优选先采用蒸馏水透析2~3d，再采用磷酸盐缓冲液透析3~4天。本发明对所述磷酸盐缓冲液的浓度和pH没有特殊的限定，采用本领域技术人员熟知的用于溶解鸡卵清白蛋白的磷酸盐缓冲液即可，如浓度为0.01mol/L，pH值为7.4的PBS溶液。透析膜的透析孔径为8000~14000Kd。

[0050] 参见图1，图1为本发明实施例中包被抗原的制备方法的原理图，首先将去氢甲睾酮与琥珀酸酐进行酯化反应，自去氢甲睾酮的羟基处衍生出羧基，然后采用活泼酯法，将去氢甲睾酮-琥珀酸酯活化中间产物上的羧基与鸡卵清白蛋白上的氨基进行脱水缩合反应，合成本实施例的包被抗原。

[0051] 本发明还提供了上述技术方案所述去氢甲睾酮包被抗原制备得到的试纸卡，包括塑料盒体，所述塑料盒体一端设置有加样孔，设置在所述塑料盒体中的试纸条，所述试纸条包括支撑层，设置在所述支撑层上的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫，所述硝酸纤维素膜上设置有检测线和质控线，所述检测线处设置有上述技术方案所述的去氢甲睾酮包被抗原或上述技术方案所述制备方法得到的去氢甲睾酮包被抗原，所述质控线处设置有羊抗鼠IgG，所述结合垫上灌注有胶体金标记的抗去氢甲睾酮特异性单克隆抗体。

[0052] 所述试纸卡的结构如图2、图3和图4所示。其中：1为塑料盒体，2为试纸条，3为支撑层，4为样品垫，5为金标抗体结合垫，6为硝酸纤维素膜，7为吸收垫，8为加样孔，9为观察窗，10为质控线(C线)，11为检测线(T线)，12为胶膜，13为标记线。

[0053] 在本发明中，所述包被抗原的浓度为0.2~0.3μg/ml。

[0054] 在本发明中，所述抗去氢甲睾酮特异性单克隆抗体的浓度为0.1~0.2mg/ml。

[0055] 在本发明中,所述抗去氢甲睾酮特异性单克隆抗体是由去氢甲睾酮-牛血清白蛋白偶联物免疫Ba1b/C小鼠制备而来的。

[0056] 在本发明中,所述的去氢甲睾酮-牛血清白蛋白偶联物的制备方法优选包括以下步骤:

[0057] A) 将去氢甲睾酮与羧甲基羟胺半盐酸盐进行脎化反应,得到去氢甲睾酮脎化物;

[0058] B) 将所述去氢甲睾酮脎化物溶解于1,4二氧六环中,得到去氢甲睾酮脎化物溶液;将所述去氢甲睾酮脎化物溶液滴加入氨基戊酸-氢氧化钠溶液中,C链衍生化反应1.5~3h;将所述反应产物用乙酸乙酯萃取,将所述萃取得到的中间产物酸洗去除水相,将所述酸洗后的半抗原用碳酸氢钠溶液反萃取,得到去氢甲睾酮半抗原;

[0059] C) 将所述去氢甲睾酮半抗原溶于N,N-二甲基甲酰胺,得到去氢甲睾酮半抗原溶液;将所述去氢甲睾酮半抗原溶液与N-羟基琥珀酰亚胺和1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐在35~40℃避光反应22~26h,得到A液;

[0060] 将牛血清白蛋白和葡萄糖溶于pH值为9.2~9.8的缓冲液中,在38~42℃反应1.5~3h,得到糖基化修饰的牛血清白蛋白;将所述糖基化修饰的牛血清白蛋白溶于含质量分数为18~25%N,N-二甲基甲酰胺的磷酸盐缓冲液中,得到B液;

[0061] 将所述A液滴加入B液中,振荡反应3~5h,透析得到去氢甲睾酮-牛血清白蛋白偶联物。

[0062] 在本发明中,所述脎化反应的温度优选为35~42℃,反应时间优选为1.5~3h;所述去氢甲睾酮的质量与羧甲基羟胺半盐酸盐的体积比为优选为(10~20)mg:1mL,更优选为50mg:3mL。

[0063] 所述脎化反应滴加的速度为30~100滴/min,所述反应优选在搅拌情况下进行,搅拌转速优选为50~200rpm。

[0064] 在本发明中,所述去氢甲睾酮的质量与氨基戊酸的物质的量的比为(45~55)g:1mol,更优选为50g:1mol。

[0065] 所述萃取剂与反应产物的体积比优选为1:(1~2)。所述酸化用酸化剂优选为稀盐酸,酸化pH值为4.0~6.0。碳酸氢钠溶液反萃取的质量浓度为2.1~4.2mg/ml。

[0066] 在本发明中,所述去氢甲睾酮半抗原与N-羟基琥珀酰亚胺和1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐的比例优选为2:(0.8~1.5):(2.5~3.5)。

[0067] 在本发明中,所述牛血清白蛋白和葡萄糖的质量比为(30~35):1,更优选为33:1。所述缓冲液优选为磷酸盐缓冲液。在本发明中,所述糖基化修饰的牛血清白蛋白在含质量分数为18~25%N,N-二甲基甲酰胺的磷酸盐缓冲液中的浓度优选为12~24mg/ml,所述磷酸盐缓冲液浓度为0.01mol/L,pH值为7.4。

[0068] 在本发明中,将A液滴加到B液中,优选并用振荡器匀速反应,振荡的转速为50~200r/min,反应的温度为30~37℃。

[0069] 在本发明中,所述透析优选将反应液加入透析袋,蒸馏水透析2~3d,磷酸盐缓冲液透析3~5d。所述磷酸盐缓冲液浓度优选为0.01mol/L,pH值优选为7.4。

[0070] 本发明在去氢甲睾酮-牛血清白蛋白偶联物的制备过程中,将去氢甲睾酮与羧甲基羟胺半盐酸盐进行脎化反应,得到去氢甲睾酮脎化物。本发明所述脎化反应优选在38~42℃下反应2~3h;随后优选进行水洗、干燥、重结晶。

[0071] 本发明上述技术方案所述去氢甲睾酮-牛血清白蛋白偶联物的制备方法反应原理图如图5所示。首先将去氢甲睾酮与羧甲基羟胺半盐酸盐进行脗化反应,自去氢甲睾酮的羰基处衍生出羧基,然后用氨基戊酸将碳链衍伸化,生成具备6个碳原子的去氢甲睾酮半抗原,再采用碳二亚胺法,将去氢甲睾酮半抗原上的羧基与糖基化修饰后牛血清白蛋白上的氨基进行脱水缩合反应,合成本实施例的免疫原。

[0072] 本发明对所述样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫的制备没有特殊的限定,采用本领域技术人员熟知的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫的制备方法即可。

[0073] 在本发明中,所述试纸卡检测原理如下:根据抗原抗体竞争性免疫层析原理设计。滴加样品液后,在吸收垫和硝酸纤维素膜的毛细作用下,样品溶液向上迁移,到达结合垫时,金标抗体将被溶解。当样品中含有去氢甲睾酮时,它们将和金标抗体结合,并一起向上迁移,到达固定有包被抗原的检测线位置时,包被抗原将和去氢甲睾酮蛋白同化激素竞争结合金标抗体上有限的抗原结合位点。样品中去氢甲睾酮含量越高,包被抗原和金标抗体结合数量就越少,T线显色就越弱;当样品中去氢甲睾酮含量高于一定数值时,检测抗原就无法和金标抗体结合,T线不显色。无论样品中是否有去氢甲睾酮存在,过量的金标抗体或检测抗原与金标抗体的结合物都将和二抗GaMIgG结合,在C线形成红色。试纸卡以红色印迹线“|”或“||”作为检测线的阳性和阴性标记,即在硝酸纤维素膜上质控线(C线)显示一条红色“|”印迹时,表示被检测样品溶液呈阳性;若硝酸纤维素膜上质控线(C线)和检测线(T线)同时出现两条红色“||”印迹时,表示样品溶液呈阴性。

[0074] 本发明提供的试纸卡可用于去氢甲睾酮残留的检测,对待测样品的种类没有特殊的限制,可以为血样、尿样或组织样品,具体的在所述检测前,待测样品进行前处理,所述前处理的过程优选包括:

[0075] (1) 动物尿样:新鲜尿样放于4℃冰箱中待检,直接用于试纸卡检测;若尿液中有污染和混浊,5000r/min离心10min或过滤后检测。

[0076] (2) 动物血液:用加有肝素钠(20~30单位/ml血样)的离心管采集血液样本,5000r/min离心10min;取出血浆2ml加入干净的玻璃离心管中,再加入2ml乙腈-0.1M氢氧化钠溶液(体积比为40/60),用振荡器混匀5min后上样检测。

[0077] (3) 动物组织:准确称取 10 ± 0.1 g已绞碎的动物组织样品于50ml具拧盖的塑料离心管中。加入2ml乙腈-0.1M氢氧化钠溶液(体积比为40/60),均质5min。再加入100 μ l β -盐酸葡萄糖醛基转移酶溶液,震荡、超声15min。置50℃恒温箱内孵育4h,3500r/min离心5min,上清液待检。

[0078] 下面结合具体实施例对本发明所述的去氢甲睾酮抗原及其制备方法和检测试纸卡做进一步详细的介绍,本发明的技术方案包括但不限于以下实施例。实施例1

[0079] 去氢甲睾酮免疫原的合成,合成流程图如图5所示。

[0080] (1) 称取100mg去氢甲睾酮溶于6ml无水吡啶,加入65mg羧甲基羟胺半盐酸盐,置于烘箱40℃搅拌反应2h;真空旋转蒸发去除吡啶,残余物用50ml乙酸乙酯溶解,加适量水洗3次;取上层油状物,加适量无水硫酸钠干燥;减压蒸馏去乙酸乙酯,残余物用乙醚重结晶,捣碎,得到去氢甲睾酮脗化物。

[0081] (2) 称取2mmol氨基戊酸加入三角烧瓶中,然后用2ml氢氧化钠溶液调节pH值至4.0

~6.0,冰浴搅拌;用1,4-二氧六环溶液溶解去氢甲睾酮酮肟化物,缓慢加入氨基戊酸-氢氧化钠溶液中,磁力搅拌反应2h;用乙酸乙酯萃取,将所述萃取得到的中间产物酸洗离心去除水相,将所述酸洗后的半抗原用碳酸氢钠溶液反萃取,得到溶解于水相中的去氢甲睾酮半抗原。

[0082] (3)取上述去氢甲睾酮半抗原10mg,用2ml N,N-二甲基甲酰胺(DMF)搅拌溶解后,加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)4.8mg和1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)13.6mg,溶解后37℃条件下避光,摇床振荡反应24h,称A液。称取33mg活化牛血清白蛋白(cBSA)和1mg葡萄糖溶于PBS缓冲液中,用NaHCO₃调节pH值至9.5,40℃摇床反应2h。将活化的cBSA溶解于含20%DMF的磷酸盐缓冲溶液中(PBS,0.01mol/L,pH7.4),称B液。将A液逐滴缓慢加入到B液中,并不断震荡,加完后继续反应4h。反应结束后将反应液装入透析袋,先用蒸馏水透析2d,再用PBS透析3d。

[0083] 紫外扫描透析液无小分子吸收峰时分装于安瓿瓶中,-20℃保存。

[0084] 实施例2

[0085] 抗去氢甲睾酮单克隆抗体的制备

[0086] 抗去氢甲睾酮特异性单克隆抗体由去氢甲睾酮-牛血清白蛋白偶联物免疫Balb/C小鼠制备而来,包括以下步骤:

[0087] 1)小鼠免疫:用去氢甲睾酮-BSA免疫8~10周龄雌性Balb/C小鼠5只,剂量为60μg/只,体积为0.2ml。首免用PBS稀释的免疫原与等体积FCA完全乳化,以后每隔3w加强免疫一次,换用FIA乳化。免疫5次后断尾采血分离血清,用间接ELISA和间接竞争ELISA(cELISA)筛选效价高,抑制效果好的小鼠作为融合备用鼠。融合前3d超免小鼠,尾静脉和腹腔各注射60μg免疫原。

[0088] 2)细胞融合:融合前4~5d用含有8-氮鸟嘌呤的完全培养基(含15%FBS的RPMI-1640)传代培养NS0细胞;前1d用HAT培养滋养细胞;融合时眶下窦采血,脱颈致死小鼠。无菌取脾脏制备脾细胞,在PEG-1500作用下与NS0细胞融合(细胞数量比约为10:1),将融合后的细胞悬液加入到已铺有滋养细胞的96孔细胞板中,HAT培养。

[0089] 3)单克隆细胞株的筛选:融合后10~14d用间接ELISA和cELISA筛选强阳性、抑制率高、生长状态好的杂交瘤细胞株,用有限稀释法进行3次亚克隆。然后用蛋白同化激素标准品溶液筛选灵敏度高、特异性强的单克隆源细胞株,共取得7株。其中,D2F5细胞株灵敏度最高,特异性最强,其抗体特异性结果见表1。

[0090] 表1D2F5细胞株抗体特异性

	蛋白同化激素	灵敏度 IC ₅₀ (ng/ml)	交叉反应率 CR (%)
	去氢甲睾酮	0.17	100
	丙酸睾酮酯	16.5	1.0
	群勃龙	18.2	0.9
[0091]	雌二醇	> 170	< 0.1
	雌酮	> 170	< 0.1
	氯睾酮	> 170	< 0.1
	甲羟孕酮	> 170	< 0.1
	19-去甲睾酮	> 170	< 0.1
	己烯雌酚	> 170	< 0.1

[0092] (6) 单克隆抗体的制备:将D2F5细胞株转移到24孔细胞板及50ml细胞瓶中扩大培养。筛选的杂交瘤细胞浓度达到约 10^7 /ml时,向10d前经液体石蜡处理过的经产母鼠腹腔内注射单克隆细胞 10^8 /只。10~12d后抽取腹水,饱和硫酸胺法纯化抗去氢甲睾酮特异性单克隆抗体,采用常规方法进行胶体金标记。

[0093] 实施例3

[0094] 去氢甲睾酮包被抗原的合成,合成流程图如图1所示。

[0095] 所述的去氢甲睾酮-鸡卵清白蛋白偶联物由以下方式实现:称取20mg去氢甲睾酮溶于3ml无水吡啶,然后加入18mg的琥珀酸酐,50℃避光搅拌反应36h。氮吹仪吹干吡啶,获得淡黄色油脂状去氢甲睾酮衍生物,5%NaHCO₃溶解后,用乙醚洗涤两次,然后用H₂SO₄进行酸化。离心后弃上清液,残余物用无水硫酸钠干燥,并用乙醚重结晶捣碎,挥干溶剂得到去氢甲睾酮琥珀酸酯。取去氢甲睾酮琥珀酸酯10mg、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 4.8mg和1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl) 13.6mg溶于2mlN,N-二甲基甲酰胺(DMF),37℃条件下避光振荡反应24h。将反应液逐滴加入含20mg鸡卵清白蛋白(OVA)的磷酸盐缓冲溶液中(PBS,0.01mol/L,pH 7.4),继续反应4h。反应液装入透析袋,先用蒸馏水透析2d,再用PBS透析3d,即为去氢甲睾酮-鸡卵清白蛋白偶联物。

[0096] 实施例4

[0097] 胶体金标记去氢甲睾酮特异性单克隆抗体的制备

[0098] 1) 胶体金溶液的制备:取超纯水溶解的0.01%氯金酸溶液100ml,置电炉加热至沸腾,3min后边搅拌,边迅速加入1%的柠檬酸三钠溶液2ml。继续加热,溶液颜色由无色转为浅黄色,最后变为橙红色时停止加热。冷却后用超纯水恢复至原体积,进行透射电镜扫描,鉴定胶体金质量及颗粒大小。胶体金悬液中加入最终质量浓度为0.05%的叠氮钠(NaN₃),4℃冰箱中保存备用。

[0099] 2) 抗体预处理:高浓度的抗体长时间冷冻保存会发生不同程度的聚集,这些聚集物会影响标记的稳定性。因此标记前,将抗去氢甲睾酮特异性单克隆抗体10000r/min,4℃条件下离心30min,弃沉淀,上清液用0.01mol/L PBS稀释成1mg/ml。

[0100] 3) 待标mAb实际用量的确定:酶标板用每孔50 μ l双蒸水铺底,纵排加入倍比稀释的去氢甲睾酮mAb,每孔50 μ l,设空白对照(BC)。用0.1mol/LK₂CO₃调节胶体金溶液至pH 9.0,加入到酶标板中,每孔50 μ l混匀。室温孵育15min后,加入10%NaCl溶液100 μ l,混匀,静置。对照孔与mAb量不足以稳定金溶胶的各孔呈现由红变蓝的聚沉现象,而mAb量达到或超过最低稳定量的各孔仍保持红色不变。选择不聚沉时mAb的最低量,在此基础上增加20%,即为待标去氢甲睾酮mAb的实际用量。

[0101] 4) 金标抗体的制备:将事先确定的最佳标记蛋白量与胶体金偶联,常温搅拌30min,5000r/min离心20min,弃上清后,加入10%BSA硼酸钠溶液,使BSA终浓度为1%作为稳定剂。金标抗体溶液10000r/min离心30min,弃上清,用20mmol/L的硼酸盐稀释液(含1%BSA和0.1%叠氮钠)将金标抗体恢复至原体积的1/10,放置在4 $^{\circ}$ C冰箱备用。

[0102] 实施例5

[0103] 试纸卡制备,试纸卡结构示意图如图2、图3和图4所示。其中:1为塑料盒体,2为试纸条,3为支撑层,4为样品垫,5为金标抗体结合垫,6为硝酸纤维素膜,7为吸收垫,8为加样孔,9为观察窗,10为质控线(C线),11为检测线(T线),12为胶膜,13为标记线。

[0104] 硝酸纤维素膜(NC膜)的制备方法:将硝酸纤维素膜置于X-only单向喷点仪平台上,检测抗原放于A池,RaMIgG放于B池,展平压紧,开机后将抗原和二抗分别点射于硝酸纤维素膜上,形成检测线(T线)和质控线(C线)。室温自然干燥后,将其浸入封闭液(质量浓度为1%的BSA的PBS缓冲液,pH 7.4)中30min,37 $^{\circ}$ C烘干后,加入干燥剂,4 $^{\circ}$ C密封保存。

[0105] 结合垫的制备方法:将玻璃纤维棉裁成4mm宽的细条,放入含质量浓度为5%的BSA,质量浓度为2%的蔗糖,质量浓度为0.8%的NaCl和质量浓度为0.05%的NaN₃的PBS处理液中20min,37 $^{\circ}$ C恒温烘干,然后将金标抗体灌注已处理好的玻璃纤维棉上,真空冻干4h,即为结合垫。

[0106] 样品垫的制备方法:玻璃纤维棉要用含质量浓度为2%的BSA,质量浓度为1%的蔗糖,质量浓度为0.5%的硼酸钠和质量浓度为0.1%的NaN₃的PBS处理后,干燥备用,即为样品垫。

[0107] 试纸卡的组装:在支持板(PVC板)上,将NC膜、结合垫、样品垫、吸收垫和胶膜等按一定工艺组装在一起,用CM4000切割机制成4mm宽的试纸条。然后,按一定工艺将试纸条封装于带有加样孔和观察窗的特制的塑料盒体中,即为本发明去氢甲睾酮残留快速检测试纸卡。

[0108] 实施例5

[0109] 试纸卡灵敏度检测对比实验

[0110] 利用杂交瘤细胞株D2F5分泌的单克隆抗体,进行胶体金标记,同时采用本发明碳二亚胺法合成的包被抗原DMT-OVA,以及本实验室混合酸酐合成的包被抗原DMT-KLH进行对比实验,在PBS缓冲液(0.01mol/L,pH 7.4)中进行试纸卡添加检测实验,两种包被原的试纸卡制备方法和检测条件完全相同。结果表明:本发明碳二亚胺法合成的包被抗原DMT-OVA制备的试纸卡,检测灵敏度为0.5ng/ml,而混合酸酐合成的包被抗原DMT-KLH制备的试纸卡,检测灵敏度为3ng/ml。

[0111] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应

视为本发明的保护范围。

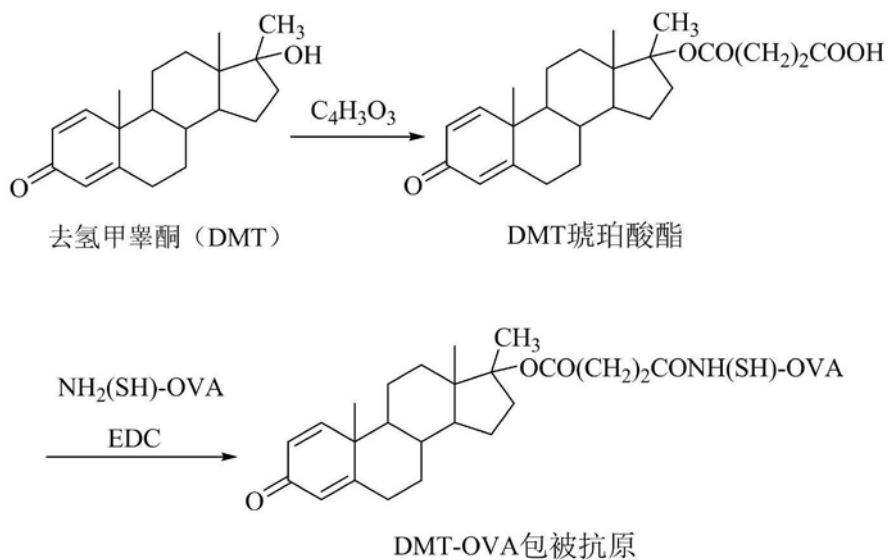


图1

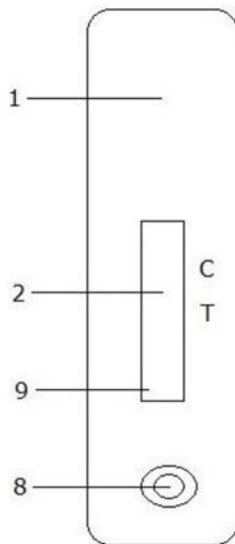


图2

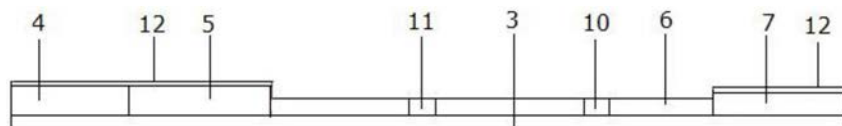


图3

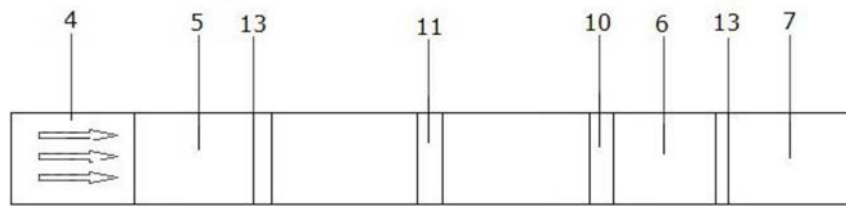


图4

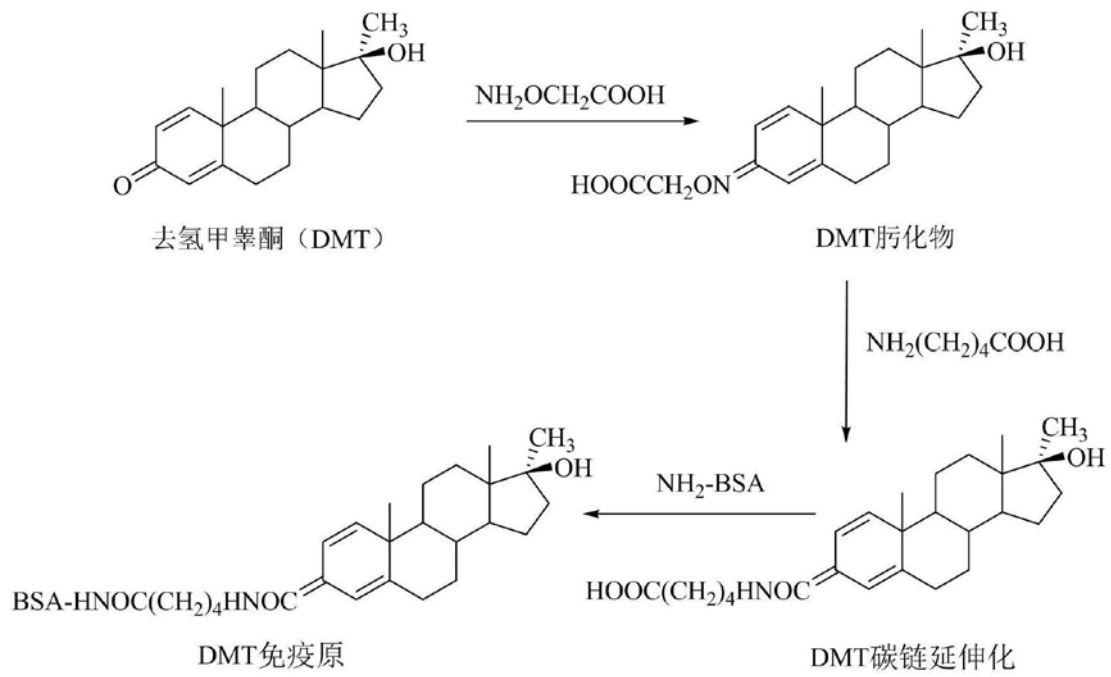
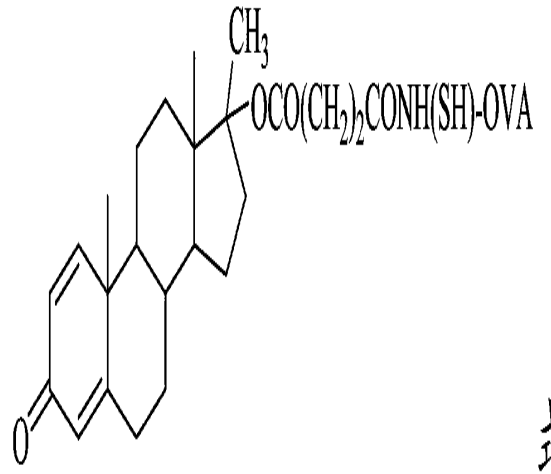


图5

专利名称(译)	一种去氢甲睾酮抗原及其制备方法和检测试纸卡		
公开(公告)号	CN106645760B	公开(公告)日	2018-09-11
申请号	CN201611231168.9	申请日	2016-12-28
[标]申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
当前申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
[标]发明人	姜金庆 刘长忠 杨雪峰 王自良 范国英 张海棠 李广领 赵坤 赵恒章 李任峰		
发明人	姜金庆 刘长忠 杨雪峰 王自良 范国英 张海棠 李广领 赵坤 赵恒章 李任峰		
IPC分类号	C07K14/77 G01N33/74 G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/743		
审查员(译)	贾静		
其他公开文献	CN106645760A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种去氢甲睾酮抗原及其制备方法和检测试纸卡，属于免疫化学检测技术领域。本发明提供的去氢甲睾酮包被抗原制备得到的试纸卡，包括塑料盒体，所述塑料盒体一端设置有加样孔，设置在所述塑料盒体中的试纸条，所述试纸条包括支撑层，设置在所述支撑层上的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫，所述硝酸纤维素膜上设置有检测线和质控线，所述检测线处设置有去氢甲睾酮包被抗原，所述质控线处设置有羊抗鼠IgG，所述结合垫上灌注有胶体金标记的抗去氢甲睾酮特异性单克隆抗体。本发明提供的去氢甲睾酮包被抗原制备得到的试纸卡操作简便，灵敏度高，特异性强，易于大范围推广应用。



式 I;