



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105181954 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 23

(21) 申请号 201510658433. 0

(22) 申请日 2015. 10. 12

(71) 申请人 天津科技大学

地址 300457 天津市河西区大沽南路 1038
号

申请人 天津出入境检验检疫局工业产品安
全技术中心

(72) 发明人 王硕 生成威 李晶 刘冰 陆旸

(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 李莉华

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 21/31(2006. 01)

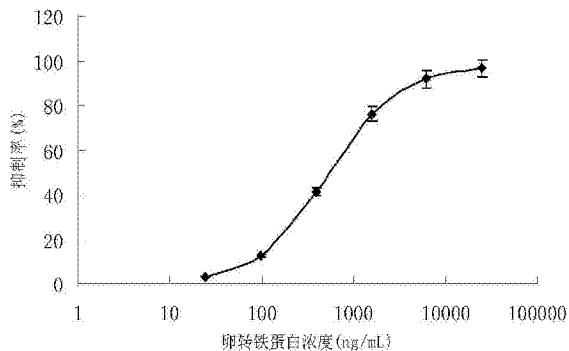
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

一种兔抗卵转铁蛋白过敏原多克隆抗体的制
备方法及其免疫分析方法

(57) 摘要

本发明提供了一种兔抗卵转铁蛋白多克隆抗
体的制备方法及免疫分析方法，所述制备方法主
要过程为卵转铁蛋白兔直接免疫新西兰大耳白
兔，经过五次免疫后股动脉取全血，获得卵转铁蛋
白抗体血清；通过优化抗体包被量，检测抗体的
稀释倍数，封闭液以及样品缓冲溶液的 PH 值建立
卵转铁蛋白间接竞争 ELISA 方法。本发明制备的
抗体效价较高，抑制率较好，建立的方法灵敏度和
精密度较好。



1. 一种兔抗卵转铁蛋白多克隆抗体的制备方法, 其特征在于 : 包括以下步骤 :

1) 抗体制备

免疫动物选用雄性西兰大耳白兔, 月龄约 3 个月, 体重约 1.5 公斤, 免疫原为卵转铁蛋白, 免疫方法采用皮下和肌肉注射法, 初次免疫后进行四次加强免疫, 加强免疫分别于初次免疫后 2 周、4 周和 6 周和 8 周, 五次免疫一周后采用股动脉取全血, 具体做法是 :

(1) 初次免疫 : 免疫原与弗氏完全佐剂以 1 : 1 的体积混合, 经密封性良好的玻璃注射器乳化充分, 直到免疫原与佐剂完全混匀并呈乳白色状态为止, 免疫剂量为 1mg/ 只, 进行动物免疫 ;

(2) 加强免疫 : 免疫原和弗氏不完全佐剂等体积混合乳化, 进行动物免疫, 免疫剂量为 0.5mg/ 只 ;

(3) 免疫完成时将采集到的血液先在 37℃ 下凝固 2h, 然后保存于 4℃ 冰箱中过夜, 使血块收缩, 上清液析出, 取上清, -20℃ 冰箱保存备用 ;

2) 抗体纯化

(1) 将实验中所需的所有试剂超声 20 分钟 ;

(2) 平衡纯化柱 : 首先用冲洗管路 1-2h, 选用的试剂为 pH 7.4 的磷酸缓冲液, 流速 0.5-1.5mL/min, 管路冲洗完毕后取纯化柱, 并将封柱用的一部分乙醇溶液慢慢倒出, 留下柱高度大约三分之一的乙醇溶液 ; 将纯化柱与蛋白纯化仪连接好, 用 pH 7.4 的磷酸缓冲液冲洗平衡柱子, 流速设定为 0.5-1.5mL/min ; 观察程序屏幕中紫外和电导两条基线为平行线时, 即可停止冲柱 ;

(3) 上样 : 取 0.5-1.5mL 待纯化的兔抗卵转铁蛋白多克隆抗体血清与磷酸缓冲液等体积稀释, 流速设置为 0.2-0.8mL/min, 然后将混合液上柱 ;

(4) 洗脱 : 出现杂蛋白峰后, 继续用磷酸缓冲液冲洗柱子, 至基线达到平衡后停止 ; 用 pH 2.7 的甘氨酸 - 盐酸缓冲液冲洗柱子, 流速 0.5-1.5mL/min, 此时与 Protein A-Sepharose 4B 结合的免疫球蛋白被洗脱下来 ;

(5) 收集 : 加入洗脱液后, 当基线开始发生变化时就开始收集洗脱液, 每个安道管收集管收集 0.5-1.5mL 液体, 直至曲线不发生变化, 停止收集 ; 收集液经分光光度计 280nm 处读数, 弃去吸光度值 < 0.4 的收集液, 将吸光度值 > 0.4 的液体混匀后立即用 Tris-HCl 迅速调节抗体, 使其 pH 至 7.0 ;

(6) 处理纯化柱 : 待抗体纯化结束后, 用 0.05-0.2mol/L 醋酸迅速冲洗柱子 1-3min, 流速 3-8mL/min, 然后再用磷酸盐缓冲液平衡柱子, 流速 1-8mL/min, 同时用 pH 试纸测定流出缓冲液的 pH 值, 直到其显示中性为止 ; 最后用质量浓度为 20% 乙醇溶液冲洗纯化柱 20min, 并使柱子中充满 20% 乙醇溶液, 封存于 4℃ 冰箱中 ;

(7) 抗体保存 : 将纯化后的卵转铁蛋白抗体在 4℃ 环境下用 PBS 透析三天, 透析液为 0.01M 的 PBS 溶液, 透析液每天换三到四次, 透析后的抗体取出后与等体积的丙三醇混匀, 分装后于 -20℃ 冰箱中保存备用。

2. 一种使用如权利要求 1 ~ 3 所述的制备方法制备的兔抗卵转铁蛋白过敏原多克隆抗体的免疫分析方法, 其特征在于 : 包括如下步骤,

1) 包被 : 用包被液稀释卵转铁蛋白标准溶液, 将其包被于 96 孔聚苯乙烯的酶标板中, 100 μL/ 孔, 于 4℃ 冰箱中孵育 12-16h 后弃去孔中液体, PBST 洗液洗板 3 次, 每 2 分钟一次 ;

2) 封闭 :每孔加入 200 μ L 1.0.5% 脱脂乳粉作为封闭液,于 37℃ 烘箱中封闭 1h, 取出弃去封闭液, PBST 洗液洗板 3 次, 每 2 分钟一次 ;

3) 加样 :每孔加入 50 μ L 卵转铁蛋白标准溶液, 再加入 50 μ L 兔抗卵转铁蛋白多克隆抗体, 抗体的稀释倍数为 1 :10000, 于 37℃ 烘箱中竞争反应 1h, 取出用 PBST 洗液洗板 4 次, 每 2 分钟一次 ;

4) 加酶标二抗 :辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗用 PBS 缓冲液稀释 10000 倍, 100 μ L / 孔加入酶标板中, 37℃ 烘箱反应 30min, PBST 洗液洗板 4 次, 每分钟一次 ;

5) 显色 :需提前 15min 将底物 A 放于底物槽中, 总共洗板 5 次, 第四次后加入底物 B, 混匀 ; 每孔中加入 100 μ L, 于 37℃ 烘箱中显色约 15-20min ;

6) 终止 :在每孔中加 50 μ L 终止液终止反应 ;

7) 读数 :用酶标仪读取吸光度值, 采用 450-650nm 双波长方式 ;

8) 绘制标准曲线。

3. 根据权利要求 2 所述的免疫分析方法, 其特征在于 :步骤 1) 中, 卵转铁蛋白的包被量为 0.03 μ g/ 孔。

一种兔抗卵转铁蛋白过敏原多克隆抗体的制备方法及其免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明属于大分子蛋白免疫技术领域；特别涉及用卵转铁蛋白免疫动物、特异性抗体的制备及免疫分析方法的建立。

背景技术

[0002] 卵转铁蛋白 (Ovotransferrin, OVT or Gal d 3) 是鸡蛋过敏原的主要过敏原之一，其含量约占蛋清总蛋白的 12%，它是一种有铁离子相结合的糖蛋白，卵转铁蛋白在自由的形态下通常具有抗菌活性，卵转铁蛋白由两个结构域组成，分别为 N 域和 C 域，它是一条单一肽链，由 686 个氨基酸组成，它能够与铁离子相结合，是一种糖蛋白，每个蛋白分子中含有 15 个二硫键，具有抗氧化特性，目前对卵转铁蛋白的过敏性研究相对较少，卵转铁蛋白对温度的变化较为敏感，高温可使其过敏性受到严重的影响。若与铁离子，锌离子等金属结合形成复合体后就可以提高其热稳定性。

[0003] 卵转铁蛋白是一种重要的转铁蛋白，背负着调节机体铁离子平衡的重要作用，可以维持机体铁的运输和代谢，具有抗菌、抗病毒、抗氧化、免疫调节等生物活性。是生物体需要的重要蛋白。

[0004] 卵转铁蛋白运输铁是将铁离子在体内进行全面的运输，将铁离子送到需要的部位后，便于铁离子分离，血红蛋白的合成所需的铁离子便是其提供的，有研究表明卵转铁蛋白可以改善缺铁性贫血症状。

[0005] 其次卵转铁蛋白还有抗菌的作用，它通过螯合细菌生长所需的铁离子来抑制细菌的繁殖；卵转铁蛋白存在抗菌多肽。对于能够引起病变的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌等都能够阻碍其活性的作用，还能够对病毒起到抑制作用，如抗马立克氏病病毒、疱疹病毒等病毒，而且具有比血清转铁蛋白和乳转铁蛋白更好的效果。

[0006] 还有抗氧化的作用，能够抑制自由基的产生，氧化损伤在 SOD 试验中，卵转铁蛋白抑制 O_2^- 的净化活性比抗坏血酸盐、血清蛋白和所知的抗氧化剂更高，卵转铁蛋白与金属离子结合后的比未结合金属离子的卵转的铁蛋白抗氧化活性更高，且清除氧自由基的能力最强是结合 Cu^{2+} 的卵转铁蛋白。

[0007] 免疫调节作用，卵转铁蛋白能够促进双歧杆菌的繁殖，以双歧杆菌促生长因子的作用存在，可以促进机体对营养物质的吸收，成为肌肉细胞营养的一种重要因素，可以促进细胞的生长和分化，从而增强机体的免疫力，卵转铁蛋白在体外能够调节鸡巨噬细胞和异嗜细胞、小鼠巨噬细胞和脾淋巴细胞。

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种兔抗卵转铁蛋白过敏原多克隆抗体的制备方法，和使用制得的抗体的免疫分析方法。本发明提供的技术方案是：

[0009] 一种卵转铁蛋白兔多克隆抗体的制备方法，包括以下步骤：

[0010] 1) 抗体制备

[0011] 免疫动物选用雄性西兰大耳白兔,月龄约3个月,体重约1.5公斤,免疫原为卵转铁蛋白,免疫方法采用皮下和肌肉注射法,初次免疫后进行四次加强免疫,加强免疫分别于初次免疫后2周、4周和6周和8周,五次免疫一周后采用股动脉取全血,具体做法是:

[0012] (1) 初次免疫:免疫原与弗氏完全佐剂以1:1的体积混合,经密封性良好的玻璃注射器乳化充分,直到免疫原与佐剂完全混匀并呈乳白色状态为止,免疫剂量为1mg/只,进行动物免疫;

[0013] (2) 加强免疫:免疫原和弗氏不完全佐剂等体积混合乳化,进行动物免疫,免疫剂量为0.5mg/只;

[0014] (3) 免疫完成时将采集到的血液先在37℃下凝固2h,然后保存于4℃冰箱中过夜,使血块收缩,上清液析出,取上清,-20℃冰箱保存备用;

[0015] 2) 抗体纯化

[0016] (1) 将实验中所需的所有试剂超声20分钟;

[0017] (2) 平衡纯化柱:首先用冲洗管路1-2h,选用的试剂为pH 7.4的磷酸缓冲液,流速0.5-1.5mL/min,管路冲洗完毕后取纯化柱,并将封柱用的一部分乙醇溶液慢慢倒出,留下柱高度大约三分之一的乙醇溶液;将纯化柱与蛋白纯化仪连接好,用pH 7.4的磷酸缓冲液冲洗平衡柱子,流速设定为0.5-1.5mL/min;观察程序屏幕中紫外和电导两条基线为平行线时,即可停止冲柱;

[0018] (3) 上样:取0.5-1.5mL待纯化的兔抗卵转铁蛋白多克隆抗体血清与磷酸缓冲液等体积稀释,流速设置为0.2-0.8mL/min,然后将混合液上柱;

[0019] (4) 洗脱:出现杂蛋白峰后,继续用磷酸缓冲液冲洗柱子,至基线达到平衡后停止;用pH 2.7的甘氨酸-盐酸缓冲液冲洗柱子,流速0.5-1.5mL/min,此时与Protein A-Sepharose 4B结合的免疫球蛋白被洗脱下来;

[0020] (5) 收集:加入洗脱液后,当基线开始发生变化时就开始收集洗脱液,每个安道管收集管收集0.5-1.5mL液体,直至曲线不发生变化,停止收集;收集液经分光光度计280nm处读数,弃去吸光度值<0.4的收集液,将吸光度值>0.4的液体混匀后立即用Tris-HCl迅速调节抗体,使其pH至7.0;

[0021] (6) 处理纯化柱:待抗体纯化结束后,用0.05-0.2mol/L醋酸迅速冲洗柱子1-3min,流速3-8mL/min,然后再用磷酸盐缓冲液平衡柱子,流速1-8mL/min,同时用pH试纸测定流出缓冲液的pH值,直到其显示中性为止;最后用质量浓度为20%乙醇溶液冲洗纯化柱20min,并使柱子中充满20%乙醇溶液,封存于4℃冰箱中;

[0022] (7) 抗体保存:将纯化后的卵转铁蛋白抗体在4℃环境下用PBS透析三天,透析液为0.01M的PBS溶液,透析液每天换三到四次,透析后的抗体取出后与等体积的丙三醇混匀,分装后于-20℃冰箱中保存备用。

[0023] 制备的兔抗卵转铁蛋白多克隆抗体的免疫分析方法,包括如下步骤,

[0024] 1) 包被:用包被液稀释卵转铁蛋白标准溶液,将其包被于96孔聚苯乙烯的酶标板中,100μL/孔,于4℃冰箱中孵育12-16h后弃去孔中液体,PBST洗液洗板3次,每2分钟一次;

[0025] 2) 封闭:每孔加入200μl、0.5%脱脂乳粉作为封闭液,于37℃烘箱中封闭1h,取

出弃去封闭液, PBST 洗液洗板 3 次, 每 2 分钟一次;

[0026] 3) 加样: 每孔加入 50 μ L 卵转铁蛋白标准溶液, 再加入 50 μ L 兔抗卵转铁蛋白多克隆抗体, 抗体的稀释倍数为 1:10000, 于 37℃ 烘箱中竞争反应 1h, 取出用 PBST 洗液洗板 4 次, 每 2 分钟一次;

[0027] 4) 加酶标二抗: 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗用 PBS 缓冲液稀释 10000 倍, 100 μ L/孔加入酶标板中, 37℃ 烘箱反应 30min, PBST 洗液洗板 4 次, 每分钟一次;

[0028] 5) 显色: 需提前 15min 将底物 A 放于底物槽中, 总共洗板 5 次, 第四次后加入底物 B, 混匀; 每孔中加入 100 μ L, 于 37℃ 烘箱中显色约 15~20min;

[0029] 6) 终止: 在每孔中加 50 μ L 终止液终止反应;

[0030] 7) 读数: 用酶标仪读取吸光度值, 采用 450~650nm 双波长方式;

[0031] 8) 绘制标准曲线。

[0032] 使用的溶液配方如下:

[0033] 包被液: 0.05mol/L 碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液, pH 为 9.6: 分别准确称取 Na₂CO₃ 1.60g, NaHCO₃ 2.91g, 然后加双蒸水定容至 1000mL, 最后调 pH 至 9.6。

[0034] 底物体系溶液 (TMB- 过氧化氢脲溶液)

[0035] 底物液 A: 准确称取无水醋酸钠 8.20g, β -糊精 2.50g, 溶解于 1000mL 的双蒸水中, 然后准确称柠檬酸 3.23g 调节 pH 至 5.0, 待所有药品完全溶解后, 准确称取过氧化氢脲 428.6mg, 并将其加入已配制好的溶液中。于 4℃ 冰箱中保存, 使用时需提前 15min 取出, 待恢复至室温方可使用。

[0036] 底物液 B: 准确称取 100mg TMB 溶解于 10mL DMSO 中, 在常温保存, 并存放于棕色瓶暗处。

[0037] 底物液 A 和底物液 B 在使用前需混合均匀: 分别取 14.60mL 底物 A 溶液和 0.45mL 底物 B 溶液。

[0038] 终止液: 1.25mol/L 的 H₂SO₄ 溶液。

[0039] 本发明优点是: 本发明制备的抗体效价较高, 抑制率较好, 建立的方法灵敏度和精密度较好。

附图说明

[0040] 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:

[0041] 图 1 为本发明实施例一所述的免疫分析方法中绘制的标准曲线。

具体实施方式

[0042] 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。

[0043] 下面将结合实施例来详细说明本发明。

[0044] 实施例 1

[0045] 免疫动物选用雄性西兰大耳白兔, 月龄约 3 个月, 体重约 1.5 公斤, 免疫原为卵转铁蛋白,

[0046] 免疫方法采用皮下和肌肉注射法,初次免疫后进行四次加强免疫,加强免疫分别于初次免疫后2周、4周和6周和8周,五次免疫一周后采用股动脉取全血,具体做法是:

[0047] (1) 初次免疫:免疫原与弗氏完全佐剂以1:1的体积混合,经密封性良好的玻璃注射器乳化充分,直到免疫原与佐剂完全混匀并呈乳白色状态为止,免疫剂量为1mg/只,进行动物免疫;

[0048] (2) 加强免疫:免疫原和弗氏不完全佐剂等体积混合乳化,进行动物免疫;免疫量为0.5mg/只;

[0049] (3) 免疫完成时将采集到的血液先在37℃下凝固2h,然后保存于4℃冰箱中过夜,使血块收缩,上清液析出,取上清,-20℃冰箱保存备用。

[0050] 抗体纯化

[0051] (1) 将实验中所需的所有试剂超声20分钟;

[0052] (2) 平衡纯化柱:首先用冲洗管路1-2h,选用的试剂为pH 7.4的磷酸缓冲液,流速0.5-1.5mL/min,管路冲洗完毕后取纯化柱,并将封柱用的一部分乙醇溶液慢慢倒出,留下柱高度大约三分之一的乙醇溶液;将纯化柱与蛋白纯化仪连接好,用pH 7.4的磷酸缓冲液冲洗平衡柱子,流速设定为0.5-1.5mL/min;观察程序屏幕中紫外和电导两条基线为平行线时,即可停止冲柱;

[0053] (3) 上样:取0.5-1.5mL待纯化的兔抗卵转铁蛋白多克隆抗体血清与磷酸缓冲液等体积稀释,流速设置为0.2-0.8mL/min,然后将混合液上柱;

[0054] (4) 洗脱:出现杂蛋白峰后,继续用磷酸缓冲液冲洗柱子,至基线达到平衡后停止;用pH 2.7的甘氨酸-盐酸缓冲液冲洗柱子,流速0.5-1.5mL/min,此时与Protein A-Sepharose 4B结合的免疫球蛋白被洗脱下来;

[0055] (5) 收集:加入洗脱液后,当基线开始发生变化时就开始收集洗脱液,每个安道管收集管收集0.5-1.5mL液体,直至曲线不发生变化,停止收集;收集液经分光光度计280nm处读数,弃去吸光度值<0.4的收集液,将吸光度值>0.4的液体混匀后立即用Tris-HCl迅速调节抗体,使其pH至7.0;

[0056] (6) 处理纯化柱:待抗体纯化结束后,用0.05-0.2mol/L醋酸迅速冲洗柱子1-3min,流速3-8mL/min,然后再用磷酸盐缓冲液平衡柱子,流速1-8mL/min,同时用pH试纸测定流出缓冲液的pH值,直到其显示中性为止;最后用质量浓度为20%乙醇溶液冲洗纯化柱20min,并使柱子中充满20%乙醇溶液,封存于4℃冰箱中;

[0057] (7) 抗体保存:将纯化后的卵转铁蛋白抗体在4℃环境下用PBS透析三天,透析液为0.01M的PBS溶液,透析液每天换三到四次,透析后的抗体取出后与等体积的丙三醇混匀,分装后于-20℃冰箱中保存备用。

[0058] 上述制备的卵转铁蛋白兔多克隆抗体用于间接竞争方法的建立。

[0059] 卵转铁蛋白间接竞争ELISA方法测定条件的优选:

[0060] 抗原包被量和抗体稀释倍数的优化:

[0061] 选择卵转铁蛋白包被量为0.1μg/孔、0.05μg/孔和0.03μg/孔,兔抗的稀释比例为1:10000、1:15000、1:20000,应用棋盘法进行间接竞争ELISA,测定最大吸光度值,计算相应的抑制率,绘制抑制率曲线,计算IC₅₀,其结果如表1所示。根据实验要求,选取最大吸光度值在0.8-1.2左右,其对应的IC₅₀最小的组合为最佳包被量和抗体稀释倍数。因

此,根据表中数据结果可知最佳包被量为 0.03 μg/孔,抗体稀释比例是 1:10000。

[0062] 表 1 包被量和抗体稀释倍数对卵转铁蛋白间接竞争酶联免疫检测的影响

[0063] Table1 Effect of quantity of capture antibody and detect antibody on indirect competition ELISA

[0064]

抗体稀释	0.1 μg/孔	0.05 μg/孔	0.03 μg/孔			
倍数	A _{control} 值 (OD)	IC ₅₀ 值 (ng/mL)	A _{control} 值 (OD)	IC ₅₀ 值 (ng/mL)	A _{control} 值 (OD)	IC ₅₀ 值 (ng/mL)
1:10000	1.746	1026.5	1.463	879.9	1.134	758.4
1:15000	1.489	1219.4	1.154	967.3	0.978	827.9
1:2	1.2	13	0.96	10	0.89	893.
0000	91	89.6	9	86.4	3	7

[0065] 封闭液的优化：

[0066] 实验选择了 0.5% 的脱脂乳粉、1% 的脱脂乳粉、5% 的脱脂乳粉、1% BSA 溶液, 0.5% 鱼皮胶, 1% 明胶, 0.5% 酪蛋白分别作为封闭液。如表 3-5 所示。如表 2 所示, 采用 0.5% 的乳粉封闭时空白值最低, 并且 Control 值在 1.2 左右, IC₅₀ 最低, 因此选择了封闭效果较好的 0.5% 的乳粉作为封闭液。

[0067] 表 2 不同封闭液下空白的平均吸光度值

[0068] Table2 Absorption values at the different blocking buffer

[0069]

封闭液	空白值 A ₄₅₀₋₆₅₀	Control 值	IC ₅₀ (μg/mL)
0.5% 乳粉	0.057	1.192	623.47
1% 乳粉	0.063	1.249	645.24
5% 乳粉	0.060	1.358	663.76
1% BSA	0.197	1.694	678.29
1% 明胶	0.436	2.179	892.35
0.5% 酪蛋白	0.477	3.746	901.13

[0070]

0.5% 鱼皮胶	0.583	3.974	989.
----------	-------	-------	------

36

[0071] (3) 样品缓冲液 pH 的优化

[0072] 有表 3 可知, 当磷酸缓冲液 pH 为 7.4 时, 并且 Control 值在 1.2 左右, IC₅₀ 值最低, 因此实验选择 pH7.4 的磷酸盐缓冲液为样品稀释液。

[0073] 表 3 pH 值对间接竞争酶联免疫检测的影响

[0074] Table3 Effect of pH on indirect competition ELISA

[0075]

卵转铁蛋白 ELISA 检测法

磷酸缓冲液优化

	Control 值	IC ₅₀ (μg/mL)
pH 值	8.5 7.4 5.7	1.499 1.217 1.658
		621.24 615.18 642.47

[0076] 按照上述优化得到的结果,以卵转铁蛋白浓度的对数为横坐标,以卵转铁蛋白浓度值为 X 轴,相应的抑制率为 Y 轴,经半对数作图得到卵转铁蛋白间接竞争 ELISA 标准曲线,见图 1。

[0077] 上述制备的抗体可用于卵转铁蛋白的免疫检测,其方法如下:

[0078] (1) 包被:用包被液稀释卵转铁蛋白标准溶液,将其包被于 96 孔聚苯乙烯酶标板中,100 μL/孔,于 4℃冰箱中孵育 12–16h 后弃去孔中液体, PBST 洗液洗板 3 次,每 2 分钟一次。

[0079] (2) 封闭:每孔加入 200 μL、0.5% 脱脂乳粉作为封闭液,于 37℃烘箱中封闭 1h,取出弃去封闭液, PBST 洗液洗板 3 次,每 2 分钟一次。

[0080] (3) 加样:每孔加入 50 μL 卵转铁蛋白标准溶液,再加入 50 μL 兔抗卵转铁蛋白抗体,于 37℃烘箱中竞争反应 1h,取出用 PBST 洗液洗板 4 次,每 2 分钟一次。

[0081] (4) 加酶标二抗:HRP 标记的羊抗兔二抗用 PBS 稀释 10000 倍,100 μL/孔加入酶标板中,37℃烘箱反应 30min, PBST 洗液洗板 4 次,每分钟一次。

[0082] (5) 显色:需提前 15min 将底物 A 放于底物槽中,总共洗板 5 次,第四次后加入底物 B,混匀。每孔中加入 100 μL,于 37℃烘箱中显色约 15–20min。

[0083] (6) 终止:在每孔中加 50 μL 终止液终止反应。

[0084] (7) 读数:用酶标仪读取吸光度值 (OD 值),采用双波长方式 (450–650nm)。

[0085] (8) 绘制标准曲线:抑制率曲线图的 X 轴为卵转铁蛋白浓度值, Y 轴为相应的抑制率,标准曲线是典型的 S 型曲线, IC₅₀ 定义为抑制率为 50% 时对应的卵转铁蛋白浓度。

[0086] 灵敏度:在确定的最优条件下,建立了如附图 1 所示的卵转铁蛋白间接竞争 ELISA 方法的标准曲线,从图中可以得出该方法的灵敏度,其半抑制浓度 IC₅₀ 值为 619.26 ± 65.6ng/mL。

[0087] 特异性:本实验使用卵转铁蛋白抗体对 10 种日常的易致敏食品的蛋白进行了交叉反应检测,目的是检查抗体的特异性,交叉反应率越小,表明抗体的特异性越好。如表 4 所示,卵转铁蛋白与白蛋白有交叉,而它与其他几种常见的过敏原蛋白没有交叉反应。

[0088] 表 4 卵转铁蛋白抗体与其他交叉反应

[0089] Table 4 Cross-reactivity of antibody of OVT with selected common foods

[0090]

过敏原	IC ₅₀ (μg/mL)	交叉反应率 (%)
卵类黏蛋白	>30000	<0.01
白蛋白	19.14	35.42%
β-乳球蛋白	>30000	<0.01
α-乳白蛋白	>30000	<0.01
花生蛋白	>30000	<0.01
溶菌酶	>30000	<0.01
牛奶总蛋白	>30000	<0.01
杏仁	>30000	<0.01
大豆蛋白	>30000	<0.01

[0091]

绿豆蛋白	>30000	<0.01
------	--------	-------

[0092] 精密度：

[0093] 精密度是指在规定的测试条件下,同一个均匀样品,经多次取样测定所得结果之间的接近程度。在 ELISA 检测中,精密度用变异系数来衡量。变异系数用 (CV%) 来表示,表示测量结果中随机误差大小的程度。

[0094] 本发明选择 6 个不同浓度的卵转铁蛋白溶液进行分析,分别考查板内变异和板间变异,对建立的卵转铁蛋白间接竞争酶联免疫检测方法进行精密度测试。

[0095] 板内变异:选择 6 个不同浓度的卵转铁蛋白进行间接竞争酶联免疫检测方法分析,每个浓度在同一块酶标板内做 5 个重复,按照建立的酶联免疫检测方法对每个浓度进行分析,测定其的吸光度值,并计算抑制率,变异系数。结果如下表 5。

[0096] 表 5 卵转铁蛋白间接竞争 ELISA 板内变异 (n = 5)

[0097] Table5 Variance in-plate of icELISA for OVT(n = 5)

[0098]

浓度 (μg/mL)	抑制率(%)±SD	CV (%)
25.0	98.12±0.29	0.29
6.25	91.39±0.51	0.56
1.56	70.49±0.71	1.01
0.391	35.96±0.27	3.78
0.0977	12.12±2.32	10.89
0.0244	4.65±0.78	16.77

[0099] 板间变异:取 6 个不同浓度的卵转铁蛋白标准溶液,进行间接竞争酶联免疫检测方法分析。每个浓度每天进行一次间接竞争 ELISA 分析,综合 5 天共 5 次测得的抑制率并计算出变异系数,结果见表 6。

[0100] 表 6 卵转铁蛋白间接竞争 ELISA 板间变异 (n = 5)

[0101] Table6 Variance inter-plate of icELISA for OVT(n = 5)

[0102]

浓度 (μg/mL)	抑制率(%)±SD	CV (%)
25.0	98.90±0.41	0.41
6.25	89.75±0.69	0.76
[0103]		
1.56	71.46±1.05	1.47
0.391	37.80±2.70	7.14
0.0977	14.67±1.28	8.73
0.0244	4.58±0.47	10.26

[0104] 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。

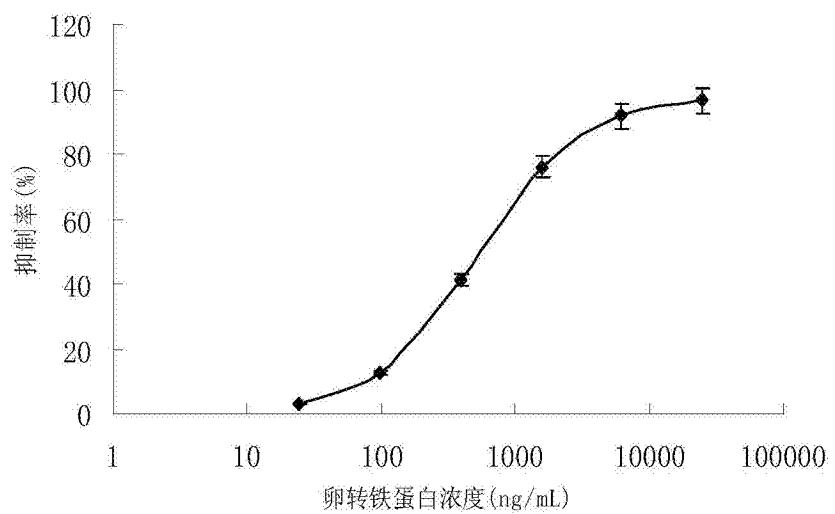


图 1

专利名称(译)	一种免抗卵转铁蛋白过敏原多克隆抗体的制备方法及其免疫分析方法		
公开(公告)号	CN105181954A	公开(公告)日	2015-12-23
申请号	CN201510658433.0	申请日	2015-10-12
[标]申请(专利权)人(译)	天津科技大学 天津出入境检验检疫局工业产品安全技术中心		
申请(专利权)人(译)	天津科技大学 天津出入境检验检疫局工业产品安全技术中心		
当前申请(专利权)人(译)	天津科技大学 天津出入境检验检疫局工业产品安全技术中心		
[标]发明人	王硕 生威 李晶 刘冰 陆旸		
发明人	王硕 生威 李晶 刘冰 陆旸		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/68 G01N21/31		
CPC分类号	G01N33/531 G01N21/31 G01N33/6803		
代理人(译)	李莉华		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明提供了一种免抗卵转铁蛋白多克隆抗体的制备方法及免疫分析方法，所述制备方法主要过程为卵转铁蛋白兔直接免疫新西兰大耳白兔，经过五次免疫后股动脉取全血，获得卵转铁蛋白抗体血清；通过优化抗体包被量，检测抗体的稀释倍数，封闭液以及样品缓冲溶液的PH值建立卵转铁蛋白间接竞争ELISA方法。本发明制备的抗体效价较高，抑制率较好，建立的方法灵敏度和精密度较好。

