



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102707069 B

(45) 授权公告日 2015.04.08

(21) 申请号 201210181365.X

(22) 申请日 2012.06.04

(73) 专利权人 南京巴傲得生物科技有限公司

地址 210036 江苏省南京市栖霞区迈皋桥街

道和燕路 251 号 1 幢 1202 房屋 18 室

专利权人 殷志敏

(72) 发明人 殷志敏 冯展波 周军 刘冬

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所

(普通合伙) 32204

代理人 肖明芳

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101424691 A, 2009.05.06, 全文.

CN 1504484 A, 2004.06.16, 全文.

US 5232830 A, 1993.08.03, 全文.

Yue Wang, et al..Carbon felt-based
bioelectrocatalytic ﬂ

ow-through detectors: Highly sensitive
amperometric determination of H₂O₂ based
on a direct electrochemistry of covalently
modiﬁ

ed horseradish peroxidase using
cyanuric chloride as a linking agent.
《Sensors and Actuators B: Chemical》.2011,
第 115 卷 (第 2 期), 722-729.

姜侃. 应用酶联免疫法快速检测乳品
中 β -内酰胺类抗生素残留.《中国乳品工
业》.2010, 第 38 卷 (第 1 期), 51-54.

Karina L. Heredia, et al..Synthesis of
protein-polymer conjugates.《Organic &
Biomolecular Chemistry》.2006, 第 5 卷 (第 1
期), 45-53.

Ramadan A. Abuknesha, et al..Efficient
labelling of antibodies with horseradish
peroxidase using cyanuric chloride.《Journal
of Immunological Methods》.2005, 第 306 卷 (第
1-2 期), 211-217.

Ramadan A Abuknesha, et al..Labeling
of biotin antibodies with horseradish
peroxidase using cyanuric chloride.《NATURE
PROTOCOLS》.2009, 第 4 卷 (第 4 期), 452-460.

审查员 赵晓明

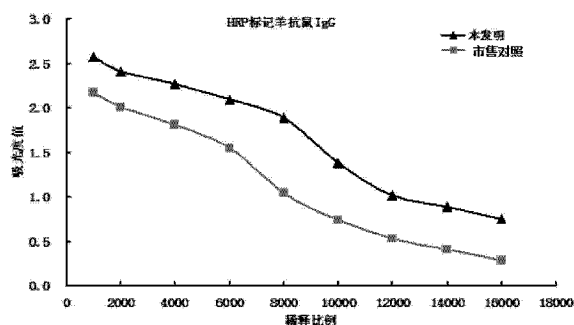
权利要求书1页 说明书12页 附图6页

(54) 发明名称

一种免疫组化二抗试剂盒的制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种免疫组化二抗试剂盒,包
括三聚氯氰活化的辣根过氧化物酶标记免疫球蛋
白溶液,即 CC-HRP-Ig。所述 CC-HRP-Ig 由以下方
法制得:步骤一活化,三聚氯氰与辣根过氧化物
酶或免疫球蛋白反应,得活化的辣根过氧化物酶
或活化的免疫球蛋白;步骤二偶联:所述活化的
辣根过氧化物酶与免疫球蛋白偶联反应,或所述
活化的免疫球蛋白与辣根过氧化物酶偶联反应得
CC-HRP-Ig。该免疫组化二抗试剂盒抗体效价高,
灵敏度高,成本低。



一种免疫组化二抗试剂盒的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫组化二抗试剂盒,特别涉及一种包括三聚氯氰活化辣根过氧化物酶标记免疫球蛋白的免疫组化二抗试剂盒。

背景技术

[0002] 19 世纪 40 年代, Coons 首先建立了免疫组织化学法,随后被广泛应用到生物学的多个领域,包括细胞功能研究、肿瘤形成过程的研究,以及感染性疾病的检测等。近几年来,随着杂交技术及单克隆抗体技术的发展,使制备的诊断抗体具有更高的特异性和敏感性。免疫组化技术借助这些新技术的发展,在临床病理学、免疫学、微生物学诊断中发挥了巨大的实用价值。

[0003] 酶标抗体技术是通过共价键经适当方法将酶连接在抗体上,制成酶标抗体,再借酶对底物的特异催化作用,生成有色的不溶性产物或具有一定电子密度的颗粒,于光镜或电镜下进行细胞表面及细胞内各种抗原成分的定位。酶标记抗体的质量主要取决于纯度高、活性强及亲和力高的酶亲和抗体,其次要有良好的制备方法。辣根过氧化物酶是最常用的一种酶。

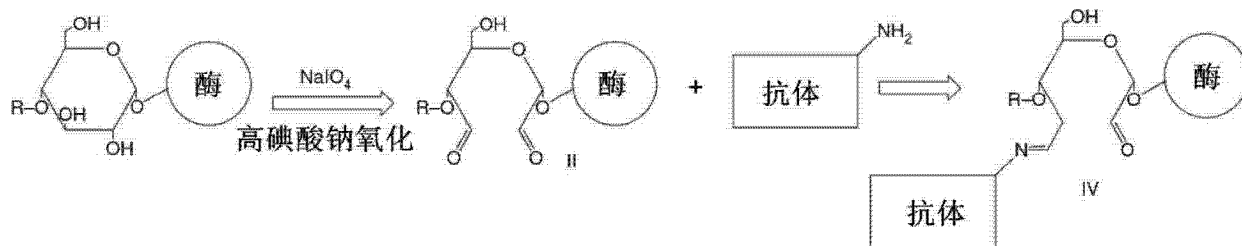
[0004] 抗体与酶连接的方法很多,目前较为常用的主要是戊二醛法和改良的过碘酸钠法。

[0005] 戊二醛是一种同型双功能偶联剂,其两个醛基可以与碱性氨基酸的氨基形成希夫碱或迈克尔加成复合物,也可以与胱氨酸的巯基、酪氨酸和组氨酸的苯环和咪唑环发生交联。抗体和辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶都是富含上述基团的生物分子,所以可以通戊二醛将两者连接起来。

[0006] 根据偶联反应中酶与抗体的反应的顺序,戊二醛法可以分为一步法和两步法。戊二醛一步法将偶联剂戊二醛、抗体和酶进行反应,该方法简单、省时、有效和重复性好等;缺点是交联反应速率不同,抗体蛋白的氨基酸数远较 HRP 为多,与戊二醛反应快,不易控制,易形成较大的聚合体,而与酶蛋白分子间的交联相应减少,影响酶的标记;结合效率非常低,约为 1%~5%,很难获得理想的酶标抗体。戊二醛二步法首先将偶联剂戊二醛与抗体或酶进行反应,待除去多余的偶联剂后,再与另一种物质反应;该比较简单,重复性好,能够减少自身聚合物的产生,缺点仍然是酶的利用率低,一般只有 2~4% 的酶与蛋白质结合。综上所述,戊二醛法 HRP 的活性效率和与 IgG 结合的效率都非常低,反应可控性差。

[0007] 简易过碘酸钠法是以 NaIO_4 先将 HRP 表面的糖分子氧化成醛基,经氧化形成的醛化酶可与抗体分子的氨基相连形成希夫碱,后者可进一步用 NaBH_4 (或乙醇胺) 还原生成稳定的酶标记抗体。该方法所获酶标记抗体的产率高,将近 70% 的 HRP 和 Ig 结合,90% 的 IgG 与酶结合,是目前最常用的方法。本法标记步骤比较简单,重复性好。缺点是过碘酸钠将 HRP 发挥主要功能的糖环打开,HRP 活性降低;反应中需要 NaBH_4 (有毒) 的参与,危险性增加,杂质不易去除。反应式如下:

[0008]



[0009] SABC法二抗试剂盒是基于生物素-链霉亲和素蛋白系统标记抗体开发的二抗试剂盒。生物素也称辅酶R或维生素H,是有机体内许多羧化酶的辅酶。生物素与抗体蛋白的链接主要通过侧链上的羧基与抗体分子上的氨基形成酰胺键来进行。亲和素又称抗生物素抗体,是一种糖蛋白。链霉亲和素来源于链霉菌菌培养滤液,相对分子质量60000,其结构不同于亲和素,但具备与亲和素相似的生物特性,可以和生物素结合。用生物素标记抗体是,需要将生物素的羧基先进行化学修饰,制成活化的生物素。目前一般都有商品化的生物素标记抗体。SABC法二抗试剂盒的缺点在于:

[0010] 1) 有内源性生物素的干扰,容易形成非特异性染色背景;容易受内源性生物的干扰,形成难以去除的背景(或需要增加额外的封闭);

[0011] 2) 需要两步操作,即先加生物素标记的抗体,再加HRP标记的链霉亲和素,操作时间长;生物素依赖的试剂盒,需要链霉亲和素参与,增加了反应过程和反应时间。

发明内容

[0012] 发明目的:本发明的目的是提供一种抗体效价高、灵敏度高的免疫组化二抗试剂盒及其制备方法。

[0013] 技术方案:本发明提供的一种免疫组化二抗试剂盒,包括三聚氯氰(CC)活化的辣根过氧化物酶(HRP)标记免疫球蛋白(IgG),即CC-HRP-Ig;

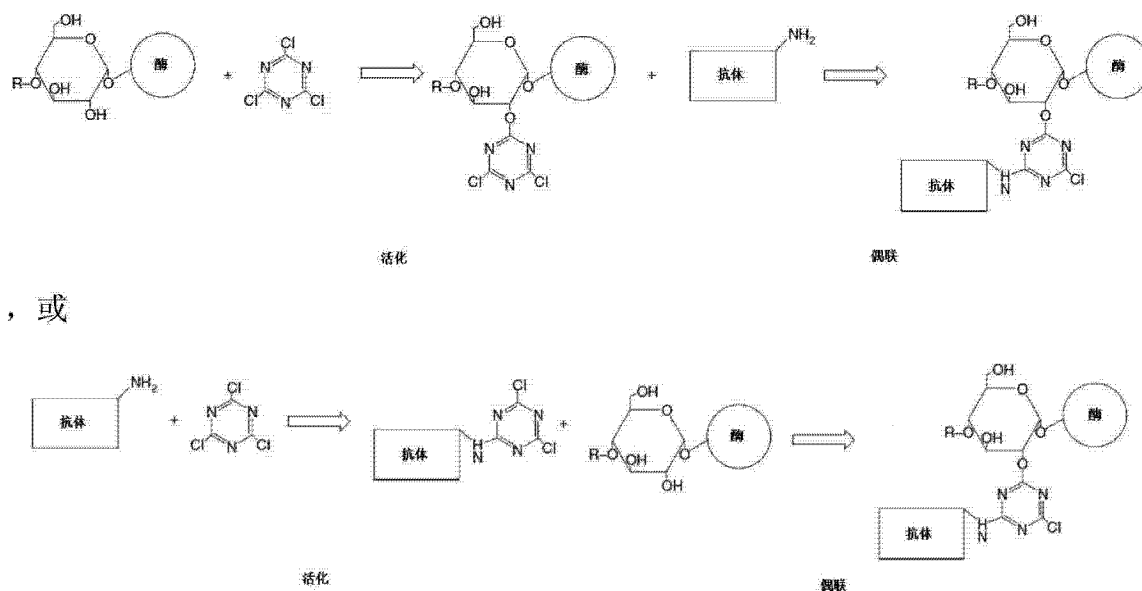
[0014] 所述CC-HRP-Ig由以下方法制得:

[0015] (1)活化:三聚氯氰与辣根过氧化物酶或免疫球蛋白反应,得活化的辣根过氧化物酶或活化的免疫球蛋白;

[0016] (2)偶联:所述活化的辣根过氧化物酶与免疫球蛋白偶联反应得CC-HRP-Ig,或所述活化的免疫球蛋白与辣根过氧化物酶偶联反应得CC-HRP-Ig;

[0017] 反应式如下:

[0018]



[0019] 其中,所述免疫球蛋白为免疫球蛋白 G (IgG)、单价免疫球蛋白片段 Fab、双价免疫球蛋白片段 F(ab)₂ 或免疫球蛋白 M (IgM),所述三聚氯氰、辣根过氧化物酶与免疫球蛋白的质量比为 1:(0.1-10):(0.1-10)。

[0020] 步骤(1)中,所述反应温度为 0°C - 8°C ,反应时间为2h-8h。

[0021] 步骤(2)中,所述反应温度为 25℃—40℃,反应时间 12h—24h。

[0022] 所述 CC-HRP-Ig 存在于溶液中,所述溶液包括如下组分:6-18mg/L CC-HRP-Ig, 5-20g/L 牛血清白蛋白,0.05-0.1g/L 硫柳汞和 pH 7.0-7.4 的 0.01-0.1mol/L 磷酸盐缓冲液。

[0023] 为了在较低温度下更好的保存,CC-HRP-Ig 溶液中还可以加入体积分数为 3-5% 的甘油。

[0024] 试剂盒还包括山羊血清溶液,所述山羊血清溶液包括:体积百分浓度为1-10%的山羊血清,0.05-0.1g/L 硫柳汞和 pH 7.0-7.4 的 0.01-0.1mol/L 磷酸盐缓冲液。

[0025] 试剂盒还包括体积百分浓度为 3-10% 的双氧水水溶液。

[0026] 试剂盒还包括二氨基联苯胺固体或二氨基联苯胺浓缩液,所述二氨基联苯胺浓缩液的浓度为 30-100g/L。

[0027] 试剂盒还包括二氨基联苯胺反应底物,所述二氨基联苯胺反应底物为体积浓度分数 1-10% 双氧水水溶液。

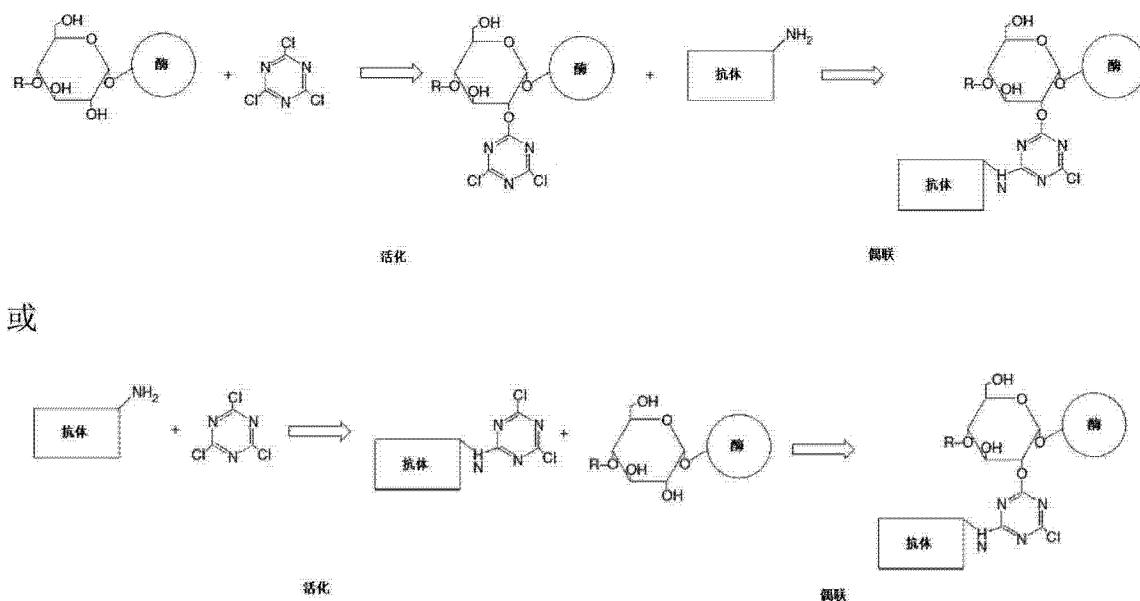
[0028] 本发明还提供了一种免疫组化二抗试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0029] (1)活化:三聚氯氰与辣根过氧化物酶或免疫球蛋白反应,得活化的辣根过氧化物酶或活化的免疫球蛋白;

[0030] (2) 偶联: 所述活化的辣根过氧化物酶与免疫球蛋白偶联反应得 CC-HRP-Ig, 或所述活化的免疫球蛋白与辣根过氧化物酶偶联反应得 CC-HRP-Ig;

[0031] (3)免疫组化二抗试剂盒的制备:利用所述 CC-HRP-Ig 制备免疫组化二抗试剂盒;反应式如下:

[0032]



[0033] 有益效果：本发明提供的免疫组化二抗试剂盒抗体效价高，灵敏度高，成本低。

[0034] 本发明提供的试剂盒不含生物素和链霉亲和素，既可以有效避免生物素的干扰和链霉素大分子空间位阻的干扰，同时也大大降低了成本；该试剂盒包括采用三聚氯氰活化的辣根过氧化物酶标记免疫球蛋白，催化效率高，反应性好。本发明提供的试剂盒用于酶联免疫吸附实验(ELISA)和蛋白免疫印迹实验(Western Blot)时，稀释比例可以达到1:5,000~1:10,000，高出同类产品50%-100%。

[0035] 本发明提供的免疫组化二抗试剂盒的制备方法，利用三聚氯氰官能团能与不同亲核基团反应且在不同温度下活性不同的特性制备酶标抗体，能够有效控制反应时间和反应强度，产率高、副反应少。

[0036] 本发明提供的试剂盒的制备方法条件温和，无需过酸或过碱；采用三聚氯氰与辣根过氧化物酶(HRP)上的羟基偶联，无需打开糖环，不影响辣根过氧化物酶(HRP)的活性；或采用三聚氯氰对免疫球蛋白活化，反应不受氨基的局限，可以充分利用免疫球蛋白的羟基、巯基等亲核基团，对免疫球蛋白效价没有任何影响，同时克服了戊二醛活化和过碘酸钠活化的缺点；该制备方法无需其他物质参与，特别是没有生物素的参与，避免了其他物质和组织内源性生物素的干扰；该制备方法操作简便，时间较短，适用于工业化生产。

附图说明

[0037] 图1为一抗为MMP-9、二抗为实施例9的羊抗鼠二抗试剂盒的检测图。

[0038] 图2为一抗为MMP-9、二抗为Thermo公司的羊抗兔/鼠试剂盒的检测图。

[0039] 图3为一抗为Histone H2B、二抗为实施例13的羊抗兔二抗试剂盒的检测图。

[0040] 图4为一抗为Histone H2B、二抗为Thermo公司的羊抗兔/鼠试剂盒的检测图。

[0041] 图5为一抗为YAP、二抗为实施例13的羊抗兔二抗试剂盒的检测图。

[0042] 图6为一抗为YAP、二抗为Thermo公司的羊抗兔/鼠试剂盒的检测图。

[0043] 图7为无一抗、二抗为实施例13的羊抗兔二抗试剂盒阴性对照的检测图。

[0044] 图8为无一抗、二抗为Thermo公司的羊抗兔/鼠阴性对照的检测图。

[0045] 图9为一抗为鼠IgG，二抗为实施例9的HRP标记羊抗鼠IgG或Millipore公司

HRP 标记羊抗鼠 IgG 的酶联免疫吸附实验(ELISA)检测图。

[0046] 图 10 为一抗为兔 IgG,二抗为实施例 13 的 HRP 标记羊抗兔 IgG 或 Millipore 公司 HRP 标记羊抗兔 IgG 的酶联免疫吸附实验(ELISA)检测图。

[0047] 图 11 为一抗为 GAPGH,二抗为实施例 9 的 HRP 标记羊抗鼠 IgG 或 Millipore 公司 HRP 标记羊抗鼠 IgG 的蛋白免疫印迹实验(Western Blot)检测图。

[0048] 图 12 为一抗为 GAPGH,二抗为实施例 13 的 HRP 标记羊抗兔 IgG 或 Millipore 公司 HRP 标记羊抗兔 IgG 的蛋白免疫印迹实验(Western Blot)检测图。

具体实施方式

[0049] 根据下述实施例,可以更好地理解本发明。然而,本领域的技术人员容易理解,实施例所描述的内容仅用于说明本发明,而不应当也不会限制权利要求书中所详细描述的本发明。

[0050] 所用试剂:

- [0051] 1. 碳酸钠(国药)
- [0052] 2. 三聚氯氰(sigma 公司)
- [0053] 3. 辣根过氧化物酶(国药)
- [0054] 4. 羊抗兔免疫球蛋白(自制,亲和层析)
- [0055] 5. 羊抗鼠免疫球蛋白(自制,亲和层析)
- [0056] 6. 超滤管(Millipore)
- [0057] 7. 甘油(国药)
- [0058] 8. 氯化钠(国药)
- [0059] 9. 磷酸二氢钠(国药)
- [0060] 10. 磷酸氢二钠(国药)
- [0061] 11. 葡聚糖(GE 公司)
- [0062] 12. 山羊血清(自制)
- [0063] 13. 硫柳汞(国药)
- [0064] 14. 二氨基联苯胺(sigma 公司)
- [0065] 15. SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳(本公司自制)
- [0066] 16. 脱脂牛奶(光明公司)
- [0067] 17. PVDF 膜(Millipore 公司)
- [0068] 18. 兔免疫球蛋白 G (自制,亲和层析)
- [0069] 19. 鼠免疫球蛋白 G (自制,亲和层析)
- [0070] 20. 酶联板(Thermo 公司)
- [0071] 21. Millipore 公司 HRP 标记羊抗兔抗体(Millipore 公司)
- [0072] 22. Millipore 公司 HRP 标记羊抗鼠抗体(Millipore 公司)
- [0073] 23. 变性海拉细胞蛋白(自制)
- [0074] 24. GAPDH 一抗(Bioworld 公司)
- [0075] 25. 结合缓冲液(自制, pH9.4 的 0.1mol/L 碳酸钠水溶液)
- [0076] 26. 平衡缓冲液(自制, pH9.6 的 0.01mol/L 碳酸钠水溶液)

[0077] 实施例 1 :CC-HRP-IgG 的制备。

[0078] A:HRP 的活化

[0079] 1) 使用 1mL 冷却结合缓冲液溶解 6mg 的辣根过氧化物酶(HRP),所述冷却结合缓冲液为 0.1mol/L 碳酸钠水溶液。

[0080] 2) 将溶解的 HRP 溶液加入到含有 6mg 三聚氯氰(CC)的试管中,小心震荡使得三聚氯氰(CC)完全悬浮于液体环境中。

[0081] 3) 放于水平摇床上,0℃—4℃震荡反应不少于 4 小时。

[0082] 4) 过滤去除液体中残留的固态的三聚氯氰(CC),得反应液。

[0083] 5) 利用制备好的 PD-10 重力柱,每次加 1mL 反应液,每一毫升换一次收集管,测试每管的吸光度值,当流出液为棕色,吸光度达到或超过 2 时,收集该液体,即为活化的辣根过氧化物酶溶液;此外,可以使用冷却的结合缓冲液 1 升,4℃透析 16 小时,中间换液一次,此时的溶液即为活化的辣根过氧化物酶溶液;然而利用 PD-10 重力柱,除盐更快更彻底。

[0084] B: 特异性 IgG 的准备

[0085] 6) 使用 1 升冷结合缓冲液透析亲和纯化后的 IgG 16 小时,中间换液一次,并用聚乙二醇浓缩使得终浓度达到 6mg/mL。

[0086] C: 活化的辣根过氧化物酶与特异性 IgG 的结合

[0087] 7) 取步骤 6 的 IgG 溶液 1mL(6mg) 与 1mL 的活化的辣根过氧化物酶溶液加入到超滤管(Millipore)中,同时加入 1mL 的冷却结合缓冲液。

[0088] 8) 0℃ -4℃,5000rpm 离心,使得体积浓缩到大约 500 μ L。

[0089] 9) 重复步骤 8,使得体积浓缩到约 300 μ L,即浓缩液,使结合物更纯,浓度更高。

[0090] 10) 取出浓缩液于 EP 管中,放入 25℃ -40℃ 培养箱中静置 16h。

[0091] 11) 将液体再次加入到超滤管中,加入 1mL 的结合平衡缓冲液,0℃—4℃ 5000rpm 离心至终体积为 500 μ L。

[0092] 12) 重复 11 步骤,使结合物更纯,浓度更高,即为 CC-HRP-IgG 溶液,加入 500 μ L 甘油混匀后于 -20℃分装保存。

[0093] 实施例 2 :CC-HRP-IgG 的制备。

[0094] A:IgG 的活化

[0095] 1) 使用 1mL 冷却结合缓冲液溶解 6mg 亲和纯化的 IgG 或使用 1 升冷结合缓冲液透析亲和纯化后的 IgG 16 小时,中间换液一次,并用聚乙二醇浓缩使得终浓度达到 6mg/mL。

[0096] 2) 将上述 IgG 放入含有 6mg 三聚氯氰(CC)的管子,小心震荡使得三聚氯氰(CC)完全悬浮于液体环境中。

[0097] 3) 放于水平摇床上,0℃—4℃震荡反应不少于 4 小时。

[0098] 4) 使用过滤的方法去除液体中残留的固态的三聚氯氰(CC)。

[0099] 5) 利用制备好的 PD-10 重力柱,每次加 1mL 活化的 IgG 溶液,每一毫升换一次收集管,测试每管的吸光度值,当流出液为棕色,吸光度达到或超过 2 时,收集该液体,即为活化的免疫球蛋白 G;或使用冷结合缓冲液 1 升,0℃—4℃透析 16 小时,中间换液一次,即为活化的免疫球蛋白 G。

[0100] B:HRP 的准备

[0101] 6) 使用 1mL 冷却结合缓冲液溶解 6mg 的 HRP,浓度 6mg/mL。

[0102] C: 活化的免疫球蛋白 G 与 HRP 的结合

[0103] 7) 取 5 步骤的活化的免疫球蛋白 G 溶液 1mL 与 1mL 的 HRP 溶液 (6mg) 加入到超滤管中, 同时加入 1mL 的冷却结合缓冲液 (HRP 溶液与活化的免疫球蛋白 G 溶液的质量比为 1:1)。

[0104] 8) 0℃ -4℃, 5000rpm 离心, 使得体积缩小到大约 500 μ L, 大概需要 20 分钟的时间 (离心速度可以按实际情况而定, 速度越大, 离心时间越短)。

[0105] 9) 重复步骤 8 一次, 并使得最终反应的体积大约是 300 μ L。

[0106] 10) 取出液体于 EP 管中, 放入 25℃—40℃ 培养箱中静置 16h。

[0107] 11) 将液体再次加入到浓缩管中, 加入 1mL 的结合平衡缓冲液, 0℃ -4℃, 5000rpm 离心至终体积为 500 μ L。

[0108] 12) 重复步骤 11 一次, 同时加入 500 μ L 甘油, 混匀后于 -20℃ 分装保存, 即得 CC-HRP-IgG。

[0109] 13) 上述两种操作可以同时扩大反应体系。

[0110] 实施例 3 CC-HRP-IgM 的制备

[0111] 本实施例的制备过程和相应参数与实施例 2 基本相同, 所不同的是: 使用免疫球蛋白 M 作为反应物制备 CC-HRP-IgM; 所述三聚氯氰、辣根过氧化物酶与 IgM 的质量比为 1:0.1:0.1; 步骤 3) 中, 反应温度为 8℃, 反应时间为 2h; 步骤 10) 中, 反应温度为 40℃, 反应时间为 12h。

[0112] 实施例 4 CC-HRP-IgM 的制备

[0113] 本实施例的制备过程和相应参数与实施例 1 基本相同, 所不同的是: 使用免疫球蛋白 M 作为反应物制备 CC-HRP-IgM; 所述三聚氯氰、辣根过氧化物酶与 IgM 的质量比为 1:10:1; 步骤 3) 中, 反应温度为 0℃, 反应时间为 8h; 步骤 10) 中, 反应温度为 25℃, 反应时间为 24h。

[0114] 实施例 5 CC-HRP-Fab 的制备

[0115] 本实施例的制备过程和相应参数与实施例 1 基本相同, 所不同的是: 使用单价免疫球蛋白片段 Fab 作为反应物制备 CC-HRP-Fab; 所述三聚氯氰、辣根过氧化物酶与 Fab 的质量比为 1:5:10; 步骤 3) 中, 反应温度为 8℃, 反应时间为 2h; 步骤 10) 中, 反应温度为 40℃, 反应时间为 12h。

[0116] 实施例 6 CC-HRP-Fab 的制备

[0117] 本实施例的制备过程和相应参数与实施例 2 基本相同, 所不同的是: 使用单价免疫球蛋白片段 Fab 作为反应物制备 CC-HRP-Fab; 所述三聚氯氰、辣根过氧化物酶与 Fab 的质量比为 1:5:1; 步骤 3) 中, 反应温度为 0℃, 反应时间为 8h; 步骤 10) 中, 反应温度为 25℃, 反应时间为 24h。

[0118] 实施例 7 CC-HRP-F(ab)₂ 的制备

[0119] 本实施例的制备过程和相应参数与实施例 2 基本相同, 所不同的是: 使用双价免疫球蛋白片段 F(ab)₂ 作为反应物制备 CC-HRP-F(ab)₂; 所述三聚氯氰、辣根过氧化物酶与 F(ab)₂ 的质量比为 1:1:5; 步骤 3) 中, 反应温度为 8℃, 反应时间为 2h; 步骤 10) 中, 反应温度为 40℃, 反应时间为 12h。

[0120] 实施例 8 CC-HRP-F(ab)₂ 的制备

[0121] 本实施例的制备过程和相应参数与实施例 1 基本相同,所不同的是:使用双价免疫球蛋白片段 $F(ab)_2$ 作为反应物制备 CC-HRP- $F(ab)_2$;所述三聚氯氰、辣根过氧化物酶与 $F(ab)_2$ 的质量比为 1:10:10;步骤 3) 中,反应温度为 0℃,反应时间为 8h;步骤 10) 中,反应温度为 25℃,反应时间为 24h。

[0122] 实施例 9 即用型免疫组化二抗试剂盒 I。

[0123] 成分 1:HRP 标记羊抗 IgG (CC-HRP-IgG),10mL。取本发明的标记方法制备的羊抗鼠 CC-HRP-IgG,用 10mL 无菌 0.05mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS) 配制成 6mg/L 的溶液,加 0.1g 牛血清白蛋白 (BSA),加 75 μ l 1% 硫柳汞,混匀,4-8℃ 保存。

[0124] 成分 2:二氨基联苯胺 (DAB) 浓缩液,1mL。取 DAB 固体溶于高压灭菌的超纯水,制成 50g/L 浓缩液,4-8℃ 避光保存。

[0125] 成分 3:山羊血清溶液,10mL。去离心过滤后正常山羊血清,用 10mL 无菌 0.05mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS) 配成 10% 工作液,加 75 μ l 1% 硫柳汞,4-8℃ 保存。

[0126] 成分 4:3% 双氧水 10mL,用高压后的超纯水与 30% 双氧水配制。

[0127] 成分 5:二氨基联苯胺反应底物,即 1% 双氧水 10mL.,用高压后的超纯水配制的 PBS 与 30% 双氧水配制。

[0128] 实施例 10 即用型免疫组化二抗试剂盒 II。

[0129] 成分 1:HRP 标记羊抗 IgM (CC-HRP-IgM),10mL。取本发明的标记方法制备的羊抗鼠 CC-HRP-IgM,用 10mL 无菌 0.1mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 配制成 18mg/L 的溶液,加 0.05g 牛血清白蛋白 (BSA),加 50 μ l 1% 硫柳汞,混匀,4-8℃ 保存。

[0130] 成分 2:二氨基联苯胺 (DAB) 浓缩液,1mL。取 DAB 固体溶于高压灭菌的超纯水,制成 30g/L 浓缩液,4-8℃ 避光保存。

[0131] 成分 3:山羊血清溶液,10mL。去离心过滤后正常山羊血清,用 10mL 无菌 0.1mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 配成 10% 工作液,加 50 μ l 1% 硫柳汞,4-8℃ 保存。

[0132] 成分 4:10% 双氧水 10mL,用高压后的超纯水与 30% 双氧水配制。

[0133] 成分 5:二氨基联苯胺反应底物,1% 双氧水 10mL.,用高压后的超纯水配制的 PBS 与 30% 双氧水配制。

[0134] 实施例 11 即用型免疫组化二抗试剂盒 III。

[0135] 成分 1:HRP 标记羊抗 Fab (CC-HRP-Fab),10mL。取本发明的标记方法制备的羊抗鼠 CC-HRP-Fab,用 10mL 无菌 0.01mol/L pH7.0 磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释配制成 12mg/L 的溶液,加 0.2g 牛血清白蛋白 (BSA),加 100 μ l 1% 硫柳汞,混匀,4-8℃ 保存。

[0136] 成分 2:二氨基联苯胺 (DAB) 浓缩液,1mL。取 DAB 固体溶于高压灭菌的超纯水,制成 100g/L 浓缩液,4-8℃ 避光保存。

[0137] 成分 3:山羊血清溶液,10mL。去离心过滤后正常山羊血清,用 10mL 无菌 0.01mol/L pH7.0 磷酸盐缓冲液 (PBS) 配成 5% 工作液,加 100 μ l 1% 硫柳汞,4-8℃ 保存。

[0138] 成分 4:7% 双氧水 10mL,用高压后的超纯水与 30% 双氧水配制。

[0139] 成分 5:二氨基联苯胺反应底物,8% 双氧水 10mL.,用高压后的超纯水配制的 PBS 与 30% 双氧水配制。

[0140] 实施例 12 即用型免疫组化二抗试剂盒 IV。

[0141] 成分 1:HRP 标记羊抗 $F(ab)_2$ (CC-HRP- $F(ab)_2$),10mL。取本发明的标记方法制备

的羊抗鼠 CC-HRP-IgM 配制成 15mg/L 的溶液,用 10mL 无菌 0.08mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释,加 0.1g 牛血清白蛋白 (BSA),加 75 μ l 1% 硫柳汞,混匀,4-8℃ 保存。

[0142] 成分 2:二氨基联苯胺 (DAB) 浓缩液,1mL。取 DAB 固体溶于高压灭菌的超纯水,制成 45g/L 浓缩液,4-8℃ 避光保存。

[0143] 成分 3:山羊血清溶液,10mL。去离心过滤后正常山羊血清,用 10mL 无菌 0.08mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS) 配成 1% 工作液,加 75 μ l 1% 硫柳汞,4-8℃ 保存。

[0144] 成分 4:7% 双氧水 10mL,用高压后的超纯水与 30% 双氧水配制。

[0145] 成分 5:二氨基联苯胺反应底物,10% 双氧水 10mL,,用高压后的超纯水配制的 PBS 与 30% 双氧水配制。

[0146] 实施例 13 浓缩型免疫组化二抗试剂盒。

[0147] 成分 1:HRP 标记羊抗兔 IgG (CC-HRP-IgG)。取本发明的标记方法制备的羊抗兔 IgG-HRP 配制成 12mg/L 的溶液,用 10mL 无菌 0.01M pH7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释,加 0.1g 牛血清白蛋白 (BSA),加 100 μ l 1% 硫柳汞,混匀,4-8℃ 保存。

[0148] 成分 2:二氨基联苯胺 (DAB) 浓缩液,1mL。取 DAB 固体溶于高压灭菌的超纯水,制成 30-100g/L 浓缩液,4-8℃ 避光保存。

[0149] 成分 3:10% 山羊工作血清,10mL。去离心过滤后正常山羊血清,用磷酸盐缓冲液 (PBS) 配成 10% 工作液,加 50-100 μ l 1% 硫柳汞,4-8℃ 保存。

[0150] 成分 4:3% 双氧水 10mL,用高压后的超纯水配制的 PBS 与 30% 双氧水配制。

[0151] 成分 5:二氨基联苯胺反应底物,3% 双氧水 10mL,,用高压后的超纯水配制的 PBS 与 30% 双氧水配制。

[0152] 实施例 14 利用免疫组化二抗试剂盒进行检测。

[0153] 检测方法:

[0154] 1) 取组织石蜡标本,用石蜡切片机切成 4-8 μ m 切片,转移到载玻片;

[0155] 2) 经二甲苯脱蜡,再经 100% 酒精、95% 酒精、75% 酒精和磷酸盐缓冲液 (PBS) 水化;

[0156] 3) 用 0.01M pH6.0 柠檬酸钠高压 3 分钟或微波炉加热 5 分钟修复抗原;

[0157] 4) 用双氧水溶液封闭 10 分钟,磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗;

[0158] 5) 加适当比例稀释的一抗,37℃ 孵育 1 小时或 4℃ 孵育 12-18 小时,磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗;

[0159] 6) 加山羊工作血清,封闭 10-20 分钟,磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗(此环节根据需要,如果一抗用抗体稀释液,则不需要在封闭);

[0160] 7) 加 HRP 标记羊抗鼠或羊抗兔 IgG,室温孵育 30 分钟或 37℃ 15 分钟,磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗;如使用实施例 13 所述浓缩型试剂盒需 1:50—1:100 稀释后使用。

[0161] 8) 取 DAB 浓缩液,用磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释 20 倍—50 倍后,加两滴 DAB 底物,混合后加到载玻片样本上,室温显色,显微镜下观察显色程度,用磷酸盐缓冲液 (PBS) 终止显色。

[0162] 检测结果:

[0163] 利用 MMP-9 (Millipore 公司) 鼠来源单抗和 YAP (Bioworld 公司)、Histone H2B (Bioworld 公司) 兔来源多抗进行检测。标本为人来源石蜡切片。阳性对照二抗试剂盒为羊抗兔 / 鼠试剂盒 (Thermo 公司)。

[0164] 检测结果见附图 1 至 9, 其中 :

[0165] 图 1 为一抗为 MMP-9 (1:400, PBS 稀释), 二抗为实施例 9 的羊抗鼠二抗试剂盒的检测图 ;

[0166] 图 2 为一抗为 MMP-9 (1:400, PBS 稀释), 二抗为 Thermo 公司的羊抗兔 / 鼠试剂盒的检测图 ;

[0167] 图 3 为一抗为 Histone H2B (1:50, PBS 稀释), 二抗为实施例 13 的羊抗兔二抗试剂盒的检测图 ;

[0168] 图 4 为一抗为 Histone H2B (1:50, PBS 稀释), 二抗为 Thermo 公司的羊抗兔 / 鼠试剂盒 的检测图 ;

[0169] 图 5 为一抗为 YAP (1 : 50, PBS 稀释), 二抗为实施例 13 的羊抗兔二抗试剂盒的检测图 ;

[0170] 图 6 为一抗为 YAP (1 : 50, PBS 稀释), 二抗为 Thermo 公司的羊抗兔 / 鼠试剂盒的检测图 ;

[0171] 图 7 为无一抗, 二抗为实施例 13 的羊抗兔二抗试剂盒阴性对照的检测图 ;

[0172] 图 8 为无一抗, 二抗为 Thermo 公司的羊抗兔 / 鼠阴性对照的检测图。

[0173] 结果显示 : 本发明在阳性检测和阴性检测过程中与阳性羊抗兔 / 鼠 (Thermo 公司) 二抗试剂盒无显著差异 ; 而非特异性背景较对照更低, 特异性更强。

[0174] 实施例 15 酶联免疫法 (ELISA) 实验

[0175] 1. 抗原包被 : 用包被缓冲液将完全抗原 (鼠 IgG) 进行稀释, 以 100 μ l / 孔加入酶标板, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 一般稀释浓度为 2 μ g / mL ; 所述包被缓冲液为 pH 9.6 的 0.1 mol / L 碳酸钠水溶液。

[0176] 2. 封闭 : 取出酶标板, 不用弃去孔内液体, 配制 75% 的脱脂奶粉, 每孔 200 μ l, 37 $^{\circ}$ C 温育 1.5 h ;

[0177] 3. 洗涤 : 弃去孔内液体, 用自来水洗 12 遍, 然后排干 ;

[0178] 4. 加样 :

[0179] (一) 本发明三聚氯氰活化 HRP 标记羊抗鼠抗体检测按设计加入用 PBS 系列倍比稀释 (1 : 1000, 1 : 2000, 1 : 4000, 1 : 8000, 1 : 10000, 1 : 50000, 1 : 100000) 待检 HRP 标记羊抗鼠 IgG, 阴性对照, 同时做空白对照, 100 μ l / 孔, 37 $^{\circ}$ C 1 h ;

[0180] (二) 市售 HRP 标记羊抗鼠抗体检测 按设计加入用 PBS 系列倍比稀释 (1 : 1000, 1 : 2000, 1 : 4000, 1 : 8000, 1 : 10000, 1 : 50000, 1 : 100000) 待检市售 HRP 标记羊抗鼠 IgG, 阴性对照, 同时做空白对照, 100 μ l / 孔, 37 $^{\circ}$ C 1 h ;

[0181] 5. 洗板 : 弃去孔内液体, 用自来水洗 12 遍, 拍干 ;

[0182] 6. 显色反应 : 加入底物液 (即市售 TMB 使用液), 100 μ l / 孔, 37 $^{\circ}$ C 避光反应 15-20 min ;

[0183] 7. 终止 : 每孔加终止液 50 μ l 振荡混匀, 所述终止液为 2 mol / L H₂SO₄ 水溶液 ;

[0184] 8. 测定 : 静置 3-5 min 后于酶标仪上读取 450 nm 处的 OD 值 ;

[0185] 检测结果见图 9, 由图 9 可知, 相同稀释倍数吸光度较大 ; 稀释比例可以达到 1 : 5,000 ~ 1 : 10,000, 高出同类产品 50% -100%。

[0186] 实施例 15 酶联免疫法实验 (ELISA)

[0187] 1. 抗原包被 :用包被缓冲液将完全抗原(兔 IgG)进行稀释 , 以 100 μ l/ 孔加入酶标板,4℃过夜,一般稀释浓度为 2 μ g/mL ;

[0188] 2. 封闭 :取出酶标板,不用弃去孔内液体,配制 75%的脱脂奶粉,每孔 200 μ l,37℃温育 1.5h ;

[0189] 3. 洗涤 :弃去孔内液体,用自来水洗 12 遍,然后排干 ;

[0190] 4. 加样 :

[0191] (一)本发明三聚氯氰活化的 HRP 标记羊抗兔抗体检测按设计加入用 PBS 系列倍比稀释(1:1000,1:2000,1:4000,1:8000,1:10000,1:50000,1:100000)待检 HRP 标记羊抗兔 IgG,阴性对照,同时做空白对照,100 μ l/ 孔,37℃ 1h ;

[0192] (二)市售 HRP 标记羊抗兔抗体检测按设计加入用 PBS 系列倍比稀释(1:1000,1:2000,1:4000,1:8000,1:10000,1:50000,1:100000)待检市售 HRP 标记羊抗鼠 IgG (在此特意避讳),阴性对照,同时做空白对照,100 μ l/ 孔,37℃ 1h ;

[0193] 5. 洗板 :弃去孔内液体,用自来水洗 12 遍,拍干 ;

[0194] 6. 显色反应 :加入底物液(即市售 TMB 使用液),100 μ l/ 孔,37℃ 避光反应 15-20min ;

[0195] 7. 终止 :每孔加终止液 50 μ l,(2M H_2SO_4) 振荡混匀 ;

[0196] 8. 测定 :静置 3-5min 后于酶标仪上读取 450nm 处的 OD 值 ;

[0197] 检测结果见图 10,由图 10 可知,相同稀释倍数吸光度较大 ;稀释比例可以达到 1:5,000~1:10,000,高出同类产品 50%-100%。

[0198] 实施例 16 蛋白免疫印迹(Western Blot) 实验

[0199] 1. 取 10-20ug 变性海拉细胞蛋白,加到预先制备好的 SDS- 聚丙烯凝胶上样孔进行电泳实验,电压 80 伏,持续 15 分钟后,换 110 伏,持续 35 分钟 ;

[0200] 2. 将跑好的蛋白凝胶转移到转膜槽,与 PVDF 膜一起进行转膜实验,将凝胶中的蛋白转移到 PVDF 膜上 ;电流 0.35 安培,持续 2 小时 ;

[0201] 3. 转膜完成后,用质量分数 5% 的脱脂奶粉封闭 1 小时 ;

[0202] 4. 加用 5% 的脱脂奶粉稀释的 GAPDH 抗体到 PVDF 膜上,4-8℃孵育 12-16 小时 ;

[0203] 5. 用 PBS 洗剂三次,每次 3 分钟 ;

[0204] 6. 加本发明的三聚氯氰活化的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (用 PBS 稀释,稀释浓度 1:1000,1:2000,1:4000,1:8000,1:10000,1:20000),同时用某公司品牌 HRP 标记羊抗鼠 IgG (用 PBS 稀释,稀释浓度 1:1000,1:2000,1:4000,1:8000,1:10000,1:20000) ; 室温孵育 1 小时 ;

[0205] 7. 用 PBS 洗三次,每次 3 分钟后,于蛋白核酸成像仪观察拍照。

[0206] 检测结果见图 11,由图 11 可知,同样的稀释比例,本发明成像更明显。

[0207] 实施例 17 蛋白免疫印迹(Western Blot)

[0208] 1. 取 10-20ug 变性海拉细胞蛋白,加到预先制备好的 SDS- 聚丙烯凝胶上样孔进行电泳实验,电压 80 伏,持续 15 分钟后,换 110 伏,持续 35 分钟 ;

[0209] 2. 将跑好的蛋白凝胶转移到转膜槽,与 PVDF 膜一起进行转膜实验,将凝胶中的蛋白转移到 PVDF 膜上 ;电流 0.35 安培,持续 2 小时 ;

[0210] 3. 转膜完成后,用质量分数 5% 的脱脂奶粉封闭 1 小时 ;

- [0211] 4. 加用 5% 的脱脂奶粉稀释的 GAPDH 抗体到 PVDF 膜上, 4—8℃ 孵育 12-16 小时 ;
- [0212] 5. 用 PBS 洗剂三次, 每次 3 分钟 ;
- [0213] 6. 加本发明的三聚氯氰活化的 HRP 标记的羊抗兔 IgG (用 PBS 稀释, 稀释浓度 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:10000, 1:20000), 同时用某公司品牌 HRP 标记羊抗兔 IgG (用 PBS 稀释, 稀释浓度 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:10000, 1:20000); 室温孵育 1 小时 ;
- [0214] 7. 用 PBS 洗三次, 每次 3 分钟后, 于蛋白核酸成像仪观察拍照。
- [0215] 检测结果见图 12, 由图 12 可知, 同样的稀释比例, 本发明成像更明显。

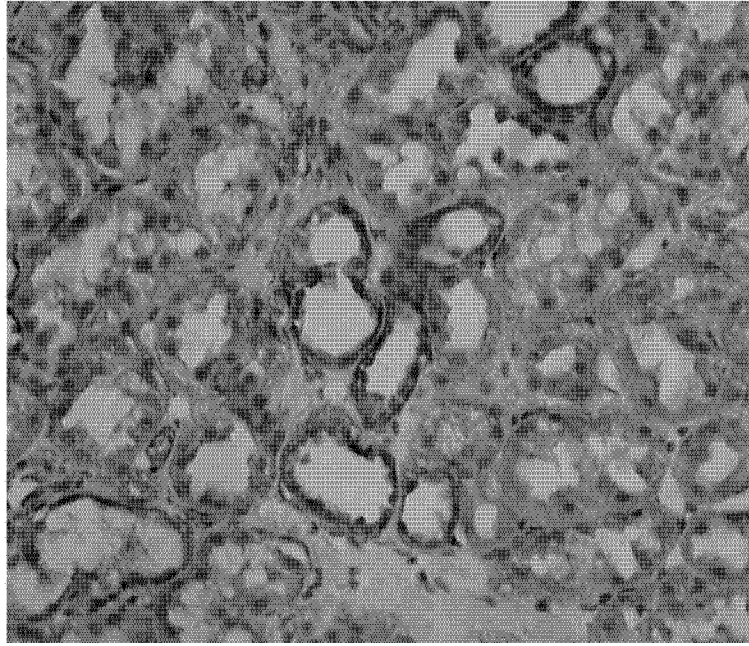


图 1

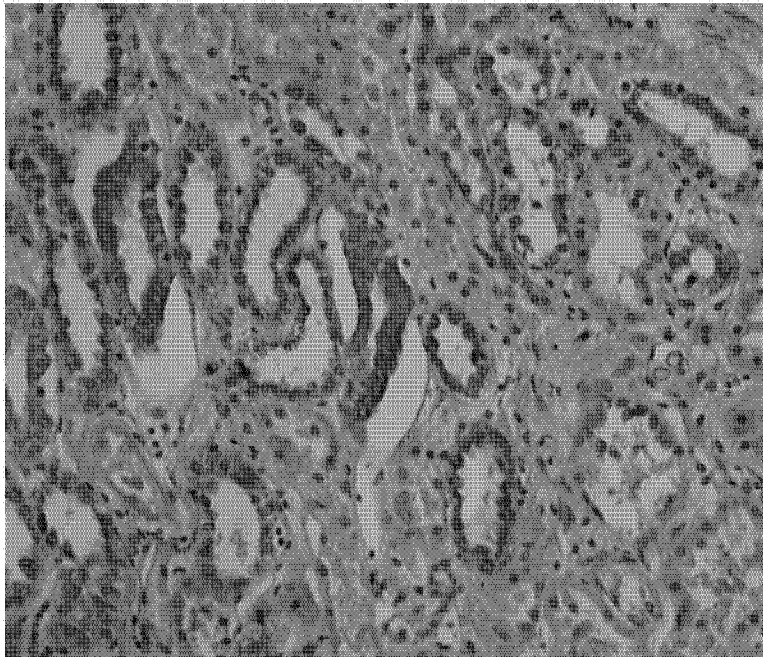


图 2

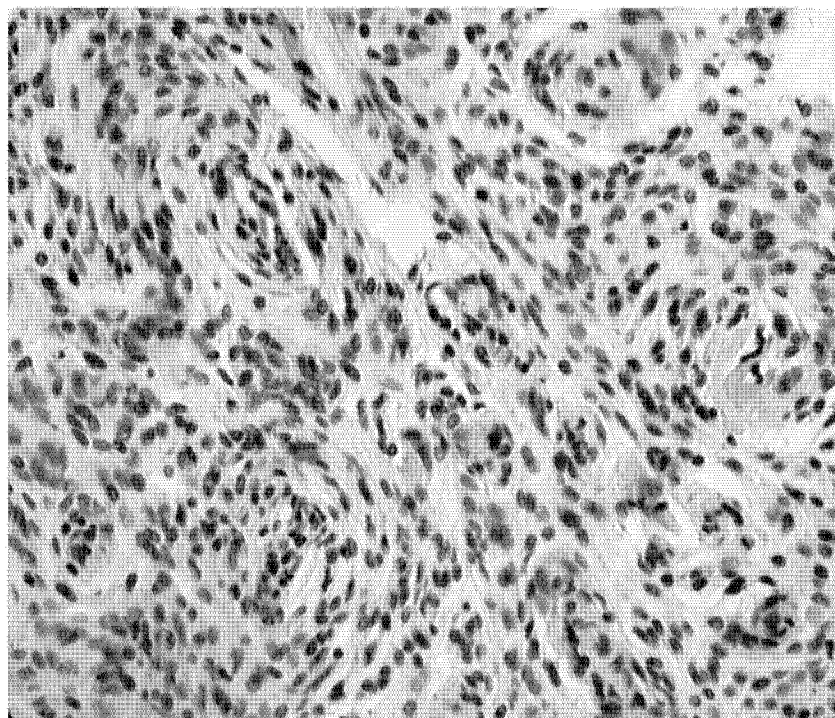


图 3

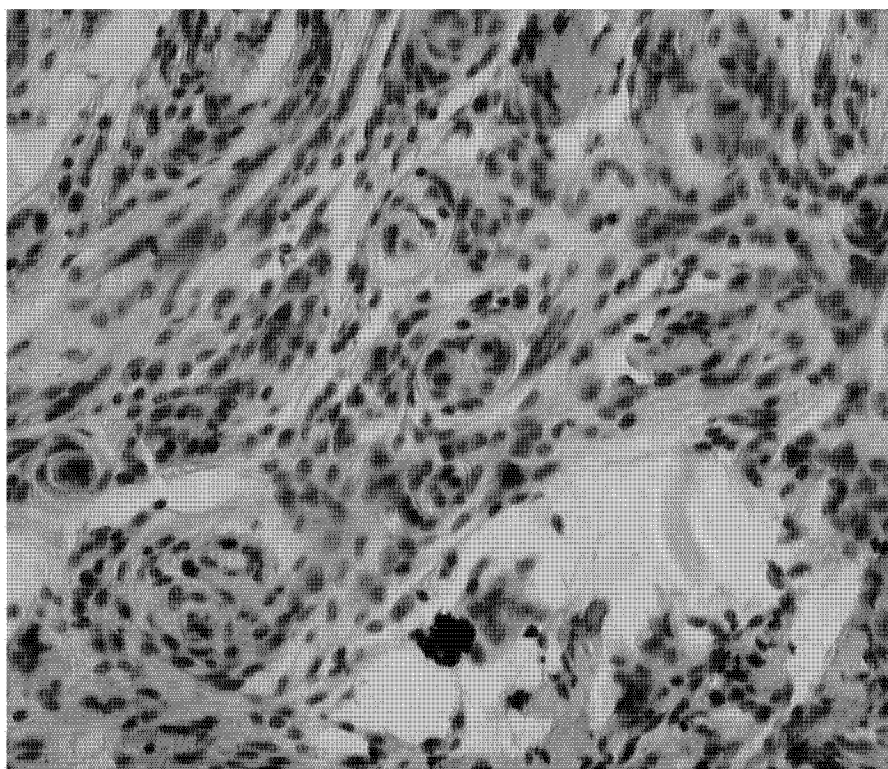


图 4

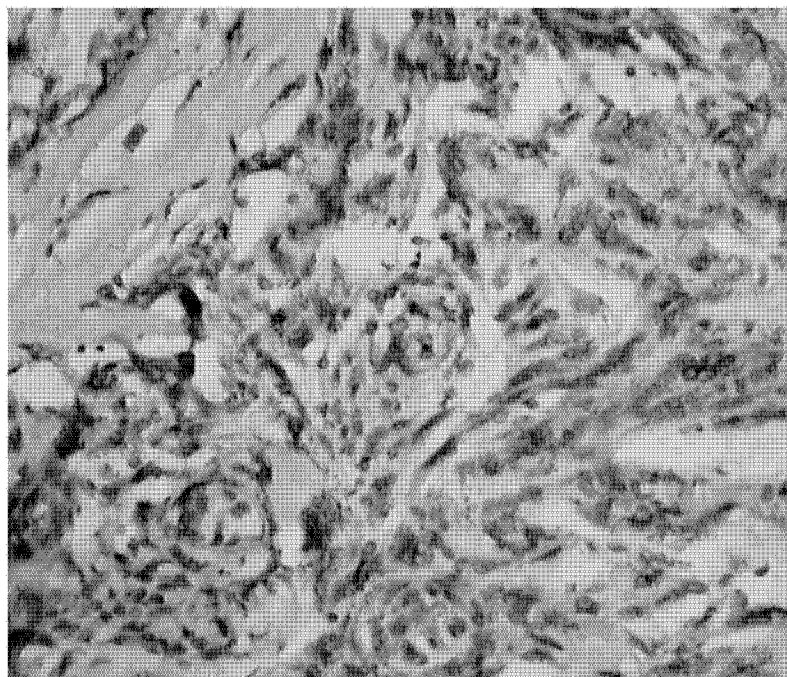


图 5

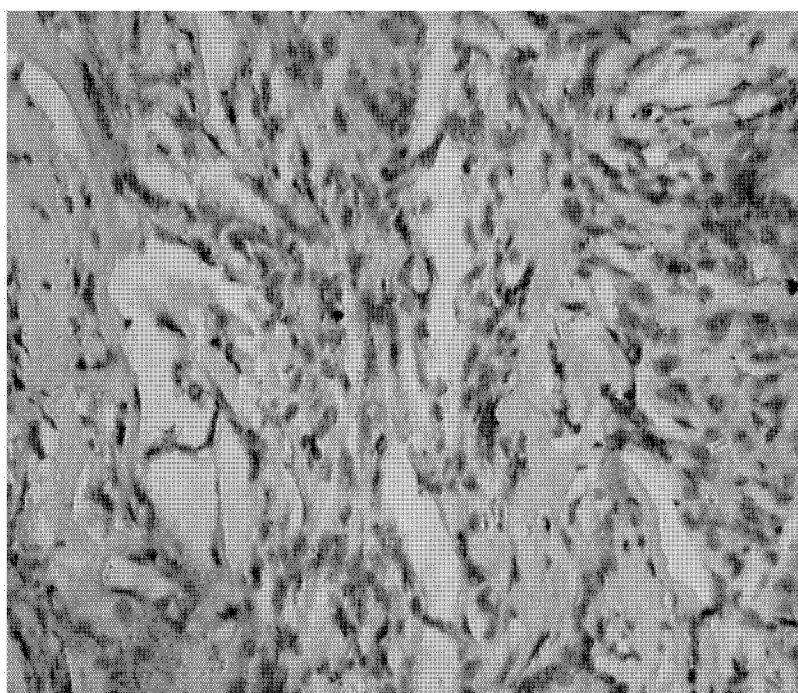


图 6

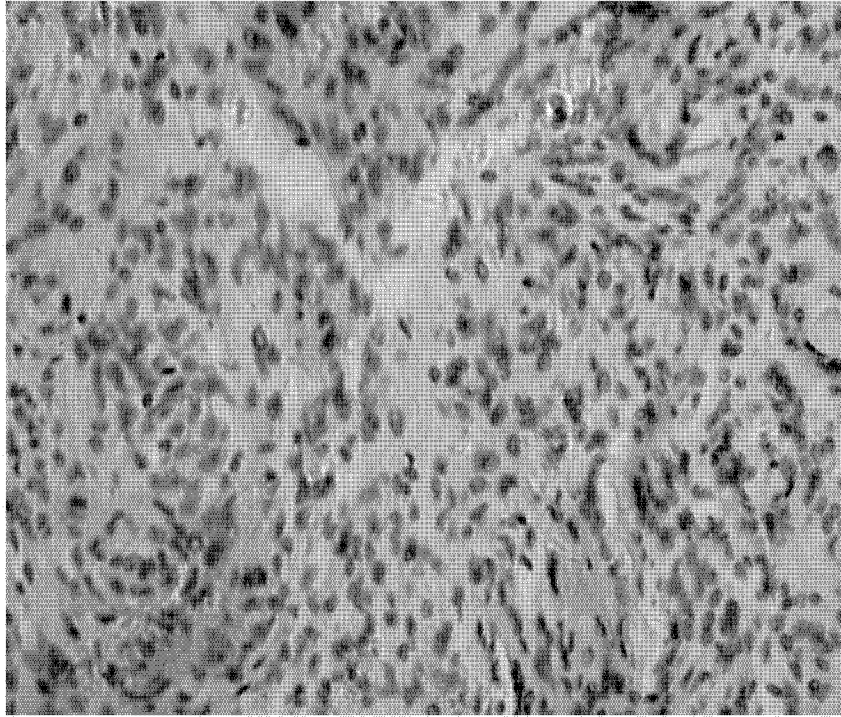


图 7

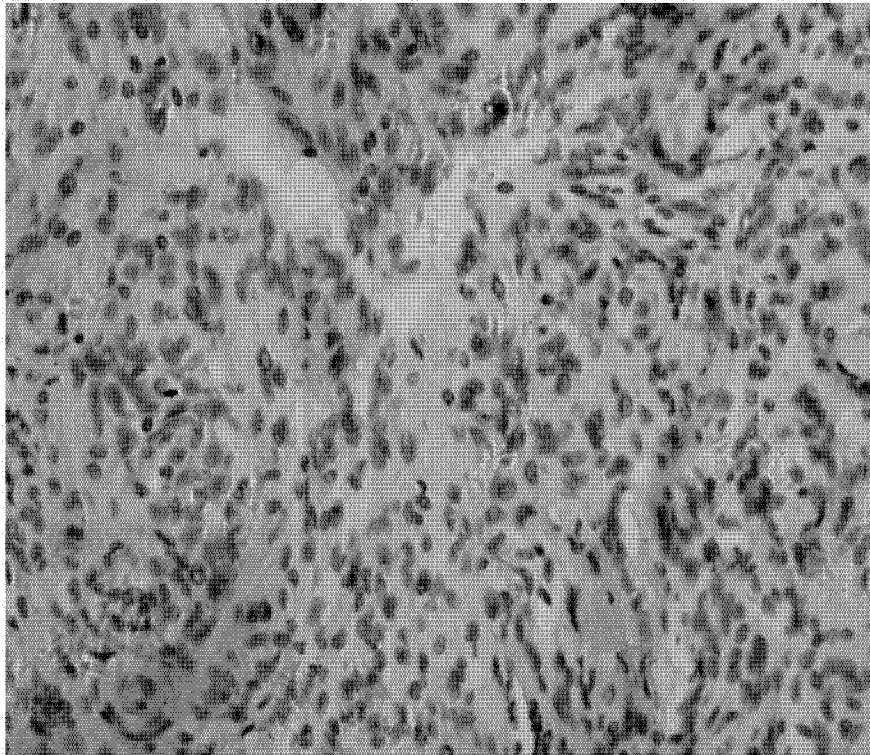


图 8

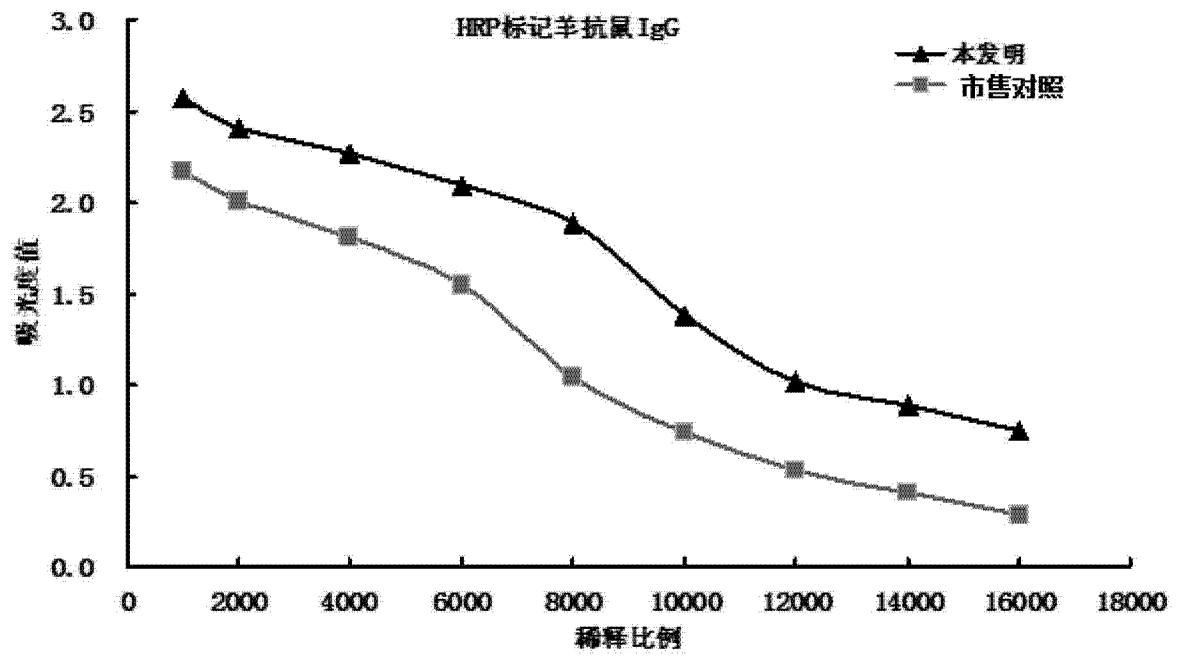


图 9

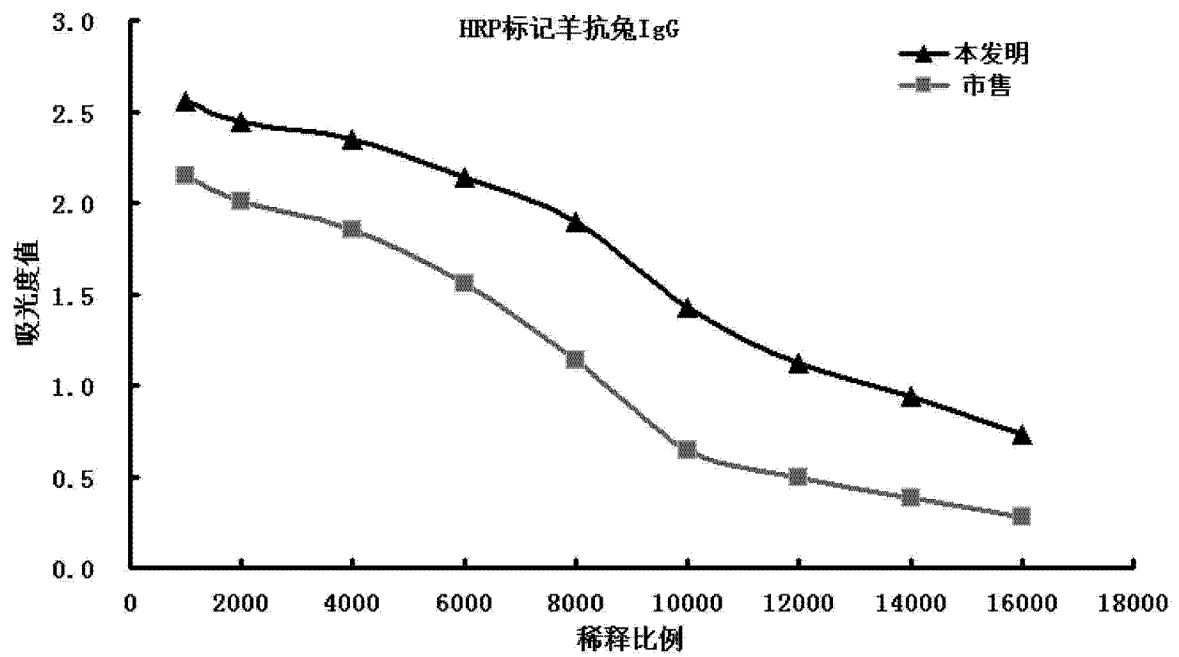


图 10



图 11

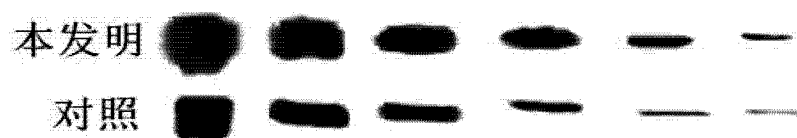


图 12

专利名称(译)	一种免疫组化二抗试剂盒的制备方法		
公开(公告)号	CN102707069B	公开(公告)日	2015-04-08
申请号	CN201210181365.X	申请日	2012-06-04
[标]申请(专利权)人(译)	南京巴傲得生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京巴傲得生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京巴傲得生物科技有限公司 殷志敏		
[标]发明人	殷志敏 冯展波 周军 刘冬		
发明人	殷志敏 冯展波 周军 刘冬		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
审查员(译)	赵晓明		
其他公开文献	CN102707069A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种免疫组化二抗试剂盒，包括三聚氯氰活化的辣根过氧化物酶标记免疫球蛋白溶液，即CC-HRP-Ig。所述CC-HRP-Ig由以下方法制得：步骤一活化，三聚氯氰与辣根过氧化物酶或免疫球蛋白反应，得活化的辣根过氧化物酶或活化的免疫球蛋白；步骤二偶联：所述活化的辣根过氧化物酶与免疫球蛋白偶联反应，或所述活化的免疫球蛋白与辣根过氧化物酶偶联反应得CC-HRP-Ig。该免疫组化二抗试剂盒抗体效价高，灵敏度高，成本低。

