



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109358194 A

(43)申请公布日 2019.02.19

(21)申请号 201811152746.9

(22)申请日 2018.09.29

(71)申请人 中国海洋大学

地址 266100 山东省青岛市崂山区松岭路
238号

(72)发明人 潘鲁青 许丽君 韦存

(74)专利代理机构 青岛海昊知识产权事务所有
限公司 37201

代理人 张中南 邱岳

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

G01N 33/74(2006.01)

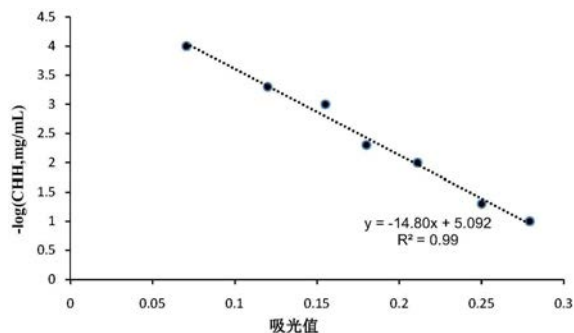
权利要求书3页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

凡纳滨对虾高血糖激素间接竞争酶联免疫
检测方法

(57)摘要

凡纳滨对虾高血糖激素间接竞争酶联免疫检测方法,首先以原核表达方式于大肠杆菌中获得凡纳滨对虾重组高血糖激素,然后以rLvCHH为免疫抗原,利用现有的多克隆抗体的制备与纯化技术获得抗rLvCHH多克隆抗体,该抗体可与CHH特异性结合,建立了一种凡纳滨对虾高血糖激素的间接竞争酶联免疫检测方法,为检测凡纳滨对虾机体组织中的CHH含量提供了一种快速高效的检测手段。甲壳动物高血糖素是甲壳动物特有的神经内分泌激素,具有血糖调节、渗透调节等功能。要深入解析CHH,其定量测定十分重要。酶联免疫检测方法具有特异性强等特点,通过抗原-抗体能够较为准确的定量目的蛋白,从而利于深入解析CHH的功能。



1. 一种凡纳滨对虾高血糖激素间接竞争酶联免疫检测方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 用凡纳滨对虾重组高血糖激素合成人工抗原:

构建重组质粒并转化到大肠杆菌中:

根据本实验室之前克隆的LvCHH基因cDNA序列(GenBank登录号:HM748790.2)的开放阅读框以及表达载体pET-32a (+)的多克隆位点的序列来设计特异性引物,选择xhoI I和BamH I两个限制性内切酶,设计了一对特异性原核表达引物LvCHHxhoI I和LvCHHBamH I,进而构建并鉴定重组质粒 p32a-LvCHH;

通过T4 DNA 连接酶来连接上述特异性原核表达引物和线性载体 pET-32a,连接后的载体转化到大肠杆菌 DH5 α 中,得到重组菌以待进一步转化;

LvCHH 基因的诱导表达:

将重组质粒 p32a-LvCHH 转化到大肠杆菌 BL21;

重组菌扩大培养和诱导表达:当上述待转化的重组菌的单菌落长到菌落直径约为1-2mm时,从培养皿中挑取单菌落于LB 液体培养基中,培养基含有 50 μ g/ml 的 Amp,在振荡器中,37 $^{\circ}$ C,200 rpm/min 震荡过夜培养,之后扩培至 OD600 为 0.6 ,扩培比例为 1:100,然后加入诱导剂IPTG,使诱导剂浓度为 1mmol/L,阴性对照为不加诱导剂 IPTG 的菌株;

重组蛋白的提取与分离:室温条件下,4000 g离心 10 min 收集步骤(1)得到的菌体,重悬在 3 ml 裂解液 1(Na₂HP0₄0.358g,NaH₂PO₄0.156g, NaCl 2.922g,2M 咪唑 1ml 定容至 100ml,调 pH 值到 7.4,0.45 μ m 滤膜过滤)中;超声波破碎细胞,每管至少破碎 10min,每隔 10s 停顿一次,以免发热对蛋白的活性造成影响;4 $^{\circ}$ C温度下 10000 g 离心 20 min,此时可溶性蛋白存在于上清液中,沉淀中包含有以包涵体形式存在的蛋白;将上清液倒入新的离心管中并做好标记,不溶性的包涵体蛋白重悬在裂解2(Tris 0.2425g,尿素 48.05g,NaCl 2.922g,2mol/L 咪唑 1ml,用超纯水溶解,调 pH 值到 8.0,0.45 μ m 滤膜过滤,加 β -巯基乙醇,定容到 100ml),37 $^{\circ}$ C震荡孵育 45min,4 $^{\circ}$ C温度下 10000 g 离心 20 min,取上清液,则包涵体形式的蛋白存在于上清液中;经检测,rLvCHH更多的存在于上清液中的可溶性蛋白中:

用His 标签纯化上述存在于上清液中的可溶性蛋白:

剪掉纯化柱底部的尖,去掉顶部的盖,倒掉多余的液体,将纯化柱放在架子上;

用 10 ml 裂解液 1 平衡柱子,紧接着进行填料防止柱子流干;

加样 3 ml,用 10 ml 裂解液 1 洗涤柱子;

加入 3 ml 洗脱缓冲液(Na₂HP0₄0.358g,NaH₂PO₄0.156g, NaCl 2.922g,2M咪唑 25ml 定容至 100ml,调 pH 值到 7.4,0.45 μ m 滤膜过滤)洗脱,收集洗脱液,洗脱蛋白于 4 $^{\circ}$ C保存;

最后再通过冷冻干燥蛋白的方法,升华水分,得到浓缩蛋白晶体,即凡纳滨对虾重组高血糖激素(rLvCHH)人工抗原;

2) rLvCHH多克隆抗体的制备步骤:

以浓度为100 μ g/mL的rLvCHH作为抗原,利用现有的多克隆抗体的制备与纯化技术获得抗rLvCHH多克隆抗体,该抗体可与高血糖激素特异性结合;

3) 间接竞争ELISA检测步骤:

以pH6.4的磷酸盐缓冲液溶解步骤1)最终得到的浓缩蛋白晶体并包被该人工抗原至100 $\mu\text{g/mL}$,将包被抗原加入酶标板中,每孔100 μL ,置于4℃冰箱内孵育过夜;

将孵育过夜后的酶标板甩干液体,然后加入200 μL /孔洗涤液洗涤3次后,加入封闭液,37℃封闭2h;

再将步骤1)得到的浓缩蛋白晶体溶解,并逐级稀释成7个梯度,将逐级稀释成7个梯度的溶液、以及作为待测样品的凡纳滨对虾身体组织,分别加入到各自的酶标孔中,每孔加100 μL ;

同时分别以抗体稀释液1:400的比例稀释步骤2)得到的多克隆抗体,并加入以上各个酶标孔中,每孔100 μL ;37℃孵育30-60 min后以PBST洗涤3次;

以抗体稀释液1:2500的比例稀释辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠IgG,然后加入以上各个酶标孔中,每孔100 μL ,37℃孵育30-60 min后以PBST洗涤3次;

将四甲基联苯胺显色液A液和B液1:1混合后加入以上各个酶标孔中,每孔100 μL ,37℃显色20 min;将2mol/L硫酸溶液加入以上各个酶标孔中终止反应,每孔50 μL ;

用酶标仪在450 nm波长下测吸光值OD₄₅₀,得到rLvCHH纯化蛋白溶液的标准曲线,以及待测样品的吸光值,将所得的待测样品的吸光值与所做标准曲线对比即比算出待测样品中CHH含量。

2.如权利要求1所述的凡纳滨对虾高血糖激素的间接竞争酶联免疫检测方法,其特征在于上述步骤2)的rLvCHH多克隆抗体的具体制备方法如下:

选取4周龄的雌性昆明大白鼠或成熟的新西兰大白兔作为实验动物,实验前暂养一周;将步骤1)得到的人工抗原用生理盐水稀释至不小于100 $\mu\text{g/mL}$,然后与等量的弗氏佐剂混合用搅拌法使其乳化——乳化的标准是将一滴乳化过的溶液滴入水中呈现球型不分散,静置后不出现油水分层;初次免疫时将乳化好的抗原溶液于实验动物背部皮下多点注射,每只注射1 mL;两周后进行第一次加强免疫,免疫抗原用不完全弗氏佐剂乳化,注射部位和剂量与初次免疫相同;两周后进行第二次加强免疫,生理盐水稀释抗原溶液至不小于100 $\mu\text{g/mL}$,免疫部位为尾静脉;一周后进行最后一次加强免疫,操作与第二次加强免疫相同;一周后再从耳缘静脉采血,采用直接ELISA法测定抗体效价,确定抗体效价可用后取血获得抗血清,收集于灭菌离心管中;将此抗血清高速离心并过滤纯化后于-20℃保存。

3.如权利要求1所述的凡纳滨对虾高血糖激素的间接竞争酶联免疫检测方法,其特征在于所述的逐级稀释成7个梯度中,7个梯度分别为: 10^{-4} , $5*10^{-4}$, 10^{-3} , $5*10^{-3}$, 10^{-2} , $5*10^{-2}$, 10^{-1} $\mu\text{g/mL}$ 。

4.如权利要求2所述的凡纳滨对虾高血糖激素的间接竞争酶联免疫检测方法,其特征在于所述的采用直接ELISA法测定抗体效价的步骤如下:

1)将步骤1)得到的人工抗原用0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液溶解,得到包被抗原,100 μL /孔加入酶标孔中,置于4℃冰箱内过夜;次日取出酶标板,200 μL /孔加入PBST洗涤液洗涤3次,以下洗涤方法相同;每次摇床震荡3min,甩去水分,在吸水纸上拍干;

2)加封闭缓冲液200 μL /孔封闭酶标板,37℃孵育2h;

3)将封闭缓冲液甩干,洗涤酶标板三次;

4)将免疫过的实验动物的阳性血清稀释成系列浓度加入上述酶标孔,100 μL /孔,在该酶标板的另一行加入等量的未经过免疫的实验动物的阴性血清,37℃孵育45min后洗涤,甩

干；

5) 抗体稀释液以1:2500的比例稀释辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠IgG,然后100 μL 每孔加入以上各个酶标孔中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育45 min 后洗涤,甩干；

6) 在以上各个酶标孔中加入100 μL TMB显色液——A液:B液的混合比例为1:1,暗处静置显色反应20 min后每个酶标孔加入100 μL 2mol/L 浓硫酸终止反应,用酶标仪测定450nm的吸光值 OD_{450} ;若测得的结果达到所要求效价水平,则可按计划进行收集血清工作;;以能够达到 $\text{P/N}>2.1$ 的最大稀释倍数作为抗血清的效价;所要求效价水平是:以 P/N 值大于2.1 对应的样品为阳性; P/N 值小于 2.1 对应的样品为阴性,其中 P/N 值为 $(\text{阳性血清 } \text{OD}_{450}\text{值}-\text{空白对照 } \text{OD}_{450})/(\text{阴性血清 } \text{OD}_{450}\text{值}-\text{空白对照 } \text{OD}_{450})$ 。

凡纳滨对虾高血糖激素间接竞争酶联免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及凡纳滨对虾高血糖激素含量的检测方法,更具体的说是对甲壳动物高血糖激素一种间接竞争酶联免疫检测方法,属于免疫检测技术领域。

背景技术

[0002] 甲壳动物神经内分泌器官主要包括x-器官-窦腺复合体(XO-SG),后联结器(PCO)和围心器(PO)等,其中眼柄中XO-SG与脊椎动物的下丘脑-垂体系统具有相似的功能,是神经内分泌的主要调控中心,神经肽激素大多是由其合成和分泌,主要包括甲壳动物高血糖激素(CHH)、性腺抑制激素(GIH)、蜕皮抑制激素(MIH)和大颚器官抑制激素(MOIH)等。CHH是甲壳动物特有的神经内分泌激素,具有血糖调节、渗透调节、蜕皮调控、免疫调节等重要生理功能。CHH在围心腺、胸神经节和肠道、血细胞中均能合成,目前许多甲壳动物的CHH序列已完成序列克隆,甲壳动物高血糖激素生理学功能研究已成为国际上的热点研究领域。

[0003] 随着生物技术的快速发展,关于CHH功能研究的实验技术不断进步,目前研究CHH功能的方法主要有眼柄切除法、活体注射法、原核表达技术、免疫组化法及RNAi干扰法。要深入解析研究CHH的生理学功能,CHH定量测定技术具有十分重要的意义。酶联免疫检测方法(ELISA)具有特异性强、灵敏度高、价格低廉、快速简便,通过抗原-抗体能够较为准确的定量目的蛋白,而目前针对凡纳滨对虾机体内CHH的ELISA检测方法尚未见报道。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种凡纳滨对虾高血糖激素(LvCHH)的间接竞争酶联免疫检测方法,是一种具有高灵敏性和特异性的快速检测方法。

[0005] 本说明所涉及的CHH,为本研究室首次在凡纳滨对虾上克隆得到全长序列,属于CHH家族I型神经肽激素,经过不同CHH亚型多重序列对比以及进化树分析等,表明该CHH属于CHHA亚型中的一种,C末端具有典型的Gly-Lys位点,该位点被证实与血糖调控功能相关。经验证,本说明涉及到的重组高血糖激素具有血糖调节活性,且具有免疫调控功能。

[0006] 本发明的技术方案如下:

一种凡纳滨对虾高血糖激素(LvCHH)的间接竞争酶联免疫检测方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 用凡纳滨对虾重组高血糖激素(rLvCHH)合成人工抗原:

构建重组质粒并转化到大肠杆菌中:

根据本实验室之前克隆的LvCHH基因cDNA序列(GenBank登录号:HM748790.2)的开放阅读框以及表达载体pET-32a (+)的多克隆位点的序列来设计特异性引物,选择xhoI I和BamH I两个限制性内切酶,设计了一对特异性原核表达引物LvCHHxhoI I和LvCHHBamH I,进而构建并鉴定重组质粒 p32a-LvCHH;

通过T4 DNA 连接酶来连接上述特异性原核表达引物和线性载体 pET-32a,连接后的载体转化到大肠杆菌 DH5α中,得到重组菌以待进一步转化;

LvCHH 基因的诱导表达:

(1) 将重组质粒 p32a-LvCHH 转化到大肠杆菌 BL21;

(2) 重组菌扩大培养和诱导表达: 当上述待转化的重组菌的单菌落长到菌落直径约为 1-2mm 时, 从培养皿中挑取单菌落于 LB 液体培养基中, 培养基含有 50 μ g/ml 的 Amp, 在振荡器中, 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm/min 震荡过夜培养, 之后扩培至 OD₆₀₀ 为 0.6, 扩培比例为 1:100, 然后加入诱导剂 IPTG, 使诱导剂浓度为 1mmol/L, 阴性对照为不加诱导剂 IPTG 的菌株;

(3) 重组蛋白的提取与分离: 室温条件下, 4000 g 离心 10 min 收集步骤 (1) 得到的菌体, 重悬在 3 ml 裂解液 1 (Na₂HPO₄ 0.358g, NaH₂PO₄ 0.156g, NaCl 2.922g, 2M 咪唑 1ml 定容至 100ml, 调 pH 值到 7.4, 0.45 μ m 滤膜过滤) 中; 超声波破碎细胞, 每管至少破碎 10min, 每隔 10s 停顿一次, 以免发热对蛋白的活性造成影响; 4 $^{\circ}$ C 温度下 10000 g 离心 20 min, 此时可溶性蛋白存在于上清液中, 沉淀中包含有以包涵体形式存在的蛋白; 将上清液倒入新的离心管中并做好标记, 不溶性的包涵体蛋白重悬在裂解液 2 (Tris 0.2425g, 尿素 48.05g, NaCl 2.922g, 2mol/L 咪唑 1ml, 用超纯水溶解, 调 pH 值到 8.0, 0.45 μ m 滤膜过滤, 加 β -巯基乙醇, 定容到 100ml), 37 $^{\circ}$ C 震荡孵育 45min, 4 $^{\circ}$ C 温度下 10000 g 离心 20 min, 取上清液, 则包涵体形式的蛋白存在于上清液中; 经检测, rLvCHH 更多的存在于上清液中的可溶性蛋白中:

用 His 标签纯化上述存在于上清液中的可溶性蛋白:

(1) 剪掉纯化柱底部的尖, 去掉顶部的盖, 倒掉多余的液体, 将纯化柱放在架子上;

(2) 用 10 ml 裂解液 1 平衡柱子, 紧接着进行填料防止柱子流干;

(3) 加样 3 ml, 用 10 ml 裂解液 1 洗涤柱子;

(4) 加入 3 ml 洗脱缓冲液 (Na₂HPO₄ 0.358g, NaH₂PO₄ 0.156g, NaCl 2.922g, 2M 咪唑 25ml 定容至 100ml, 调 pH 值到 7.4, 0.45 μ m 滤膜过滤) 洗脱, 收集洗脱液, 洗脱蛋白于 4 $^{\circ}$ C 保存;

最后再通过冷冻干燥蛋白的方法, 升华水分, 得到浓缩蛋白晶体, 即凡纳滨对虾重组高血糖激素 (rLvCHH) 人工抗原;

2) rLvCHH 多克隆抗体的制备步骤:

以浓度为 100 μ g/mL 的 rLvCHH 作为抗原, 利用现有的多克隆抗体的制备与纯化技术获得抗 rLvCHH 多克隆抗体, 该抗体可与高血糖激素 (CHH) 特异性结合;

3) 间接竞争 ELISA 检测步骤:

以 pH 6.4 的磷酸盐缓冲液溶解步骤 1) 最终得到的浓缩蛋白晶体并包被该人工抗原至 100 μ g/mL, 将包被抗原加入酶标板中, 每孔 100 μ L, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内孵育过夜;

将孵育过夜后的酶标板甩干液体, 然后加入 200 μ L/孔洗涤液洗涤 3 次后, 加入封闭液, 37 $^{\circ}$ C 封闭 2h;

再将步骤 1) 得到的浓缩蛋白晶体溶解, 并逐级稀释成 7 个梯度, 将逐级稀释成 7 个梯度的溶液、以及作为待测样品的凡纳滨对虾身体组织 (如血细胞、眼柄等), 分别加入到各自的酶标孔中, 每孔加 100 μ L;

同时分别以抗体稀释液 1:400 的比例稀释步骤 2) 得到的多克隆抗体, 并加入以上各个酶标孔中, 每孔 100 μ L; 37 $^{\circ}$ C 孵育 30-60 min 后以 PBST 洗涤 3 次;

以抗体稀释液 1:2500 的比例稀释辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠 IgG, 然后加入以上各

个酶标孔中,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育30–60 min后以PBST洗涤3次;

将四甲基联苯胺显色液A液和B液1:1混合后加入以上各个酶标孔中,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C显色20 min;将2mol/L硫酸溶液加入以上各个酶标孔中终止反应,每孔50 μ L;

用酶标仪在450 nm波长下测吸光值OD₄₅₀,得到rLvCHH纯化蛋白溶液的标准曲线,以及待测样品的吸光值,将所得的待测样品的吸光值与所做标准曲线对比即比算出待测样品中CHH含量。

[0007] 所述的凡纳滨对虾高血糖激素(LvCHH)的间接竞争酶联免疫检测方法,其特征在于上述步骤2)的rLvCHH多克隆抗体的具体制备方法如下:

选取4周龄的雌性昆明大白鼠或成熟的新西兰大白兔作为实验动物,实验前暂养一周;将步骤1)得到的人工抗原用生理盐水稀释至不小于100 μ g/mL,然后与等量的弗氏佐剂混合用搅拌法使其乳化——乳化完全的标准是将一滴乳化过的溶液滴入水中呈现球型不分散,静置后不出现油水分层;初次免疫时将乳化好的抗原溶液于实验动物背部皮下多点注射,每只注射1 mL;两周后进行第一次加强免疫,免疫抗原用不完全弗氏佐剂乳化,注射部位和剂量与初次免疫相同;两周后进行第二次加强免疫,生理盐水稀释抗原溶液至不小于100 μ g/mL,免疫部位为尾静脉;一周后进行最后一次加强免疫,操作与第二次加强免疫相同;一周后再从耳缘静脉采血,采用直接ELISA法测定抗体效价,确定抗体效价可用后取血获得抗血清,收集于灭菌离心管中;将此抗血清高速离心并过滤纯化后于-20 $^{\circ}$ C保存。

[0008] 所述的凡纳滨对虾高血糖激素(LvCHH)的间接竞争酶联免疫检测方法,其特征在于所述的逐级稀释成7个梯度中,7个梯度分别为:10⁻⁴, 5*10⁻⁴, 10⁻³, 5*10⁻³, 10⁻², 5*10⁻², 10⁻¹ μ g/mL。

[0009] 所述的凡纳滨对虾高血糖激素(LvCHH)的间接竞争酶联免疫检测方法,其特征在于所述的采用直接ELISA法测定抗体效价的步骤如下:

1)将步骤1)得到的人工抗原用0.05mol/L 碳酸盐缓冲液溶解,得到包被抗原,100 μ L/孔加入酶标孔中,置于4 $^{\circ}$ C冰箱内过夜;次日取出酶标板,200 μ L/孔加入PBST洗涤液洗涤3次,以下洗涤方法相同;每次摇床震荡3min,甩去水分,在吸水纸上拍干;

2)加封闭缓冲液200 μ L/孔封闭酶标板,37 $^{\circ}$ C孵育2h;

3)将封闭缓冲液甩干,洗涤酶标板三次;

4)将免疫过的实验动物的阳性血清稀释成系列浓度加入上述酶标孔,100 μ L/孔,在该酶标板的另一行加入等量的未经过免疫的实验动物的阴性血清,37 $^{\circ}$ C孵育45min后洗涤,甩干;

5)抗体稀释液以1:2500的比例稀释辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠IgG,然后100 μ L每孔加入以上各个酶标孔中,37 $^{\circ}$ C 孵育45 min 后洗涤,甩干;

6)在以上各个酶标孔中加入100 μ L TMB显色液——A液:B液的混合比例为1:1,暗处静置显色反应20 min后每个酶标孔加入100 μ L 2mol/L 浓硫酸终止反应,用酶标仪测定450nm的吸光值OD₄₅₀;若测得的结果达到所要求效价水平,则可按计划进行收集血清工作;以能够达到P/N>2.1的最大稀释倍数作为抗血清的效价。

[0010] 所要求效价水平是:以P/N 值(阳性血清 OD₄₅₀ 值-空白对照 OD₄₅₀/阴性血清 OD₄₅₀-空白对照 OD₄₅₀)大于 2.1 对应的样品为阳性;P/N 值小于 2.1 对应的样品为阴性。

[0011] 本发明的有益效果:首先,以原核表达方式于大肠杆菌中获得凡纳滨对虾重组高血糖激素(rLvCHH),以rLvCHH为免疫抗原,建立了rLvCHH的间接竞争ELISA方法,为检测凡纳滨对虾机体组织中的甲壳动物高血糖激素含量提供了一种快速高效的检测手段。甲壳动物高血糖激素(CHH)主要是由神经内分泌器官和神经内分泌细胞释放的重要神经肽激素,已经被证实参与甲壳动物免疫生理调节。CHH主要通过血细胞膜上受体介导甲壳动物非特异性免疫反应,如血细胞免疫行为(吞噬、胞吐作用),并释放到血淋巴中多种活性因子如酚氧化酶原激活系统、凝集素、溶菌酶、抗菌肽等,可迅速启动和扩大对外界因素的免疫应答。近期研究表明,甲壳动物血细胞也能够通过自分泌产生CHH,表明CHH在神经内分泌-免疫调控网络中的重要地位。因此,通过酶联免疫检测方法定量凡纳滨对虾神经内分泌器官或免疫细胞中CHH的含量,对于研究甲壳动物神经内分泌-免疫调控应答具有重要意义。此外,由于该方法采用的是多克隆抗体,成本较低且准确性和稳定性较好。

附图说明

[0012] 图1凡纳滨对虾高血糖激素(LvCHH)的酶联免疫检测标准曲线。

[0013] 图2体内注射rLvCHH后,凡纳滨对虾血淋巴中CHH含量变化柱形图。

具体实施方式

[0014] 以下通过实施例进一步说明本发明。

[0015] 一、主要仪器:

R015型纯水机,上海力申科学仪器有限公司

Neofuge 15R型台式离心机,上海力申科学仪器有限公司

TS-1型摇床,江苏海门市麒麟医用仪器厂

SPECTRA MAX 190型酶标仪,Molecular Devices 公司

可调式移液器,Effendorf 公司

二、试剂

主要的溶液配制

1) 配制0.01M磷酸盐(PBS)缓冲液(pH = 6.4)

Na₂HPO₄·12H₂O 3.62g

KH₂PO₄ 0.2g

NaCl 0.2g

KCl 8.0g

加超纯水定容至1000 mL;

2) 配制PBST洗涤液:购自北京翰谱医药生物研究所,按要求稀释;

3) 配制封闭液:购自北京翰谱医药生物研究所,按要求稀释;

4) 配制抗体稀释液:购自北京翰谱医药生物研究所,按要求稀释;

5) 四甲基联苯胺显色液购自北京翰谱医药生物研究所;

A液为过氧化脲,B液为四甲基联苯胺(TMB),使用前将A液和B液等体积混合;

6) 包被缓冲液、抗体稀释液以及封闭液,北京翰谱医药生物研究所

7) 辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠IgG,北京翰谱医药生物研究所

8) 终止液: 2mol/L的 H_2SO_4 。

[0016] 三、步骤:

1、人工抗原的制备: 通过原核表达制备凡纳滨对虾重组高血糖激素(rLvCHH)作为抗原, 离心收集菌株经破碎重悬于裂解液, 后过镍柱纯化得到目的重组蛋白, 再通过冷冻干燥蛋白的方法, 升华水分, 得到浓缩蛋白晶体, 进而配置成目的抗原浓度;

2、rLvCHH多克隆抗体的制备

选取4周龄的新西兰大白兔为实验动物, 实验前暂养一周。将免疫抗原用磷酸盐缓冲液以及包被缓冲液稀释至100 $\mu\text{g/mL}$, 然后用注射器吸取等量的弗氏佐剂反复推拉混合使其乳化, 乳化完全的标准是将一滴乳化过的溶液滴入水中呈现球型不分散, 静置后不出现油水分层。初次免疫将乳化好的抗原溶液于兔子背部皮下多点注射, 每只注射1 mL。两周后进行第一次加强免疫, 用不完全弗氏佐剂乳化, 注射部位和剂量与初次免疫相同。两周后进行第二次加强免疫。一周后进行最后一次加强免疫, 操作与第二次加强免疫相同。从耳缘静脉采血, 采用直接ELISA法测定抗体效价, 确定抗体效价可用后全部通过耳缘静脉取血获得抗血清, 收集于灭菌离心管中。将此抗血清高速离心并过滤纯化后于 -20°C 保存。

[0017] 3、抗体效价的测定步骤:

1) 将包被抗原rLvCHH用磷酸盐缓冲液稀释, 100 μL /孔加入酶标孔中, 置于 4°C 冰箱内过夜。次日取出酶标板, 将孵育后的酶标板中的液体扣掉, 每孔加入PBST洗涤液200 μL , 每次摇床震荡3 min, 甩去洗涤液, 在吸水纸上拍干, 重复此洗涤过程3次; 以下洗涤方法相同;

2) 加封闭缓冲液200 μL /孔封闭酶标板, 37°C 孵育2h;

3) 将封闭缓冲液扣掉, 洗涤3次;

4) 将阳性血清稀释成系列浓度加入酶标孔, 100 μL /孔, 另一行加入等量的阴性血清, 37°C 孵育45min后洗涤3次;

5) 每孔加入100 μL 1:2500稀释的酶标二抗RAM-HRP, 37°C 孵育45 min 后洗涤3次;

6) 加入100 μL TMB显色液(A液:B液的混合比例为1:1), 暗处静置显色反应20 min后每孔加入50 μL 2M浓硫酸终止反应, 用酶标仪测定450nm的吸光值(OD_{450}); 以阳性血清 OD 值: 阴性血清 OD 值大于2对应的最大的抗血清稀释度为抗血清效价, 本发明制备的抗血清的效价在10000以上。

[0018] 4、竞争ELISA反应过程

1) 利用棋盘滴定法对包被抗原和抗体工作浓度进行筛选, 选择包被抗原浓度为100 $\mu\text{g/mL}$, 多克隆抗体稀释度为1:400, 酶标二抗稀释度为1:2500。

[0019] 2) 包被: 将包被抗原即rLvCHH用磷酸盐缓冲液稀释至100 $\mu\text{g/mL}$, 100 μL /孔加入酶标孔中, 置于 4°C 冰箱内孵育过夜;

3) 洗板: 将酶标板中的液体甩干, 每孔加入PBST洗涤液200 μL , 每次摇床震荡3 min, 甩去洗涤液, 在吸水纸上拍干; 重复此洗涤过程3次; 以下洗涤方法相同;

4) 封闭: 加入封闭缓冲液, 200 μL /孔, 37°C 封闭2h;

5) 洗板: 即将孵育后的酶标板中的液体甩干, 每孔加入PBST洗涤液200 μL , 每次摇床震荡3 min, 甩去洗涤液, 在吸水纸上拍干; 重复此洗涤过程3次;

6) 竞争: 加入rLvCHH纯化蛋白溶液(PBST稀释成系列浓度) 或样品提取液至酶标板, 50 μL /孔; 另加入50 μL PBST稀释液至酶标板, 此酶标孔作为阳性对照; 然后加入50 μL 用抗体稀

释液以1:400比例稀释的多克隆抗体至酶标板,充分混匀后37℃孵育45 min;

7) 洗板:将孵育后的酶标板中的液体甩干,每孔加入PBST洗涤液200 μ L,每次摇床震荡3 min,甩去洗涤液,在吸水纸上拍干;重复此洗涤过程3次;

8) 加二抗:加入HRP标记的二抗100 μ L/孔,37℃孵育45 min;

9) 洗板:将孵育后的酶标板中的液体甩干,每孔加入PBST洗涤液200 μ L,每次摇床震荡3 min,甩去洗涤液,在吸水纸上拍干;重复此洗涤过程3次;

10) 显色:加入TMB显色液100 μ L/孔,避光静置显色反应20 min,然后加入2M的浓硫酸50 μ L/孔终止反应;

11) 测定:酶标仪测定450 nm 的吸光值(OD₄₅₀)。

[0020] 12) 将所得的待测样品的吸光值与所做标准曲线对比即比算出待测样品中CHH含量。图1是以本发明的方法构建的标准曲线之一,将该吸光值代入图1中标准曲线,可得待测样品中CHH含量。图2是体内注射CHH含量后,通过本发明构建的酶联免疫检测方法于凡纳滨对虾血淋巴中检测到的随时间变化的CHH含量。

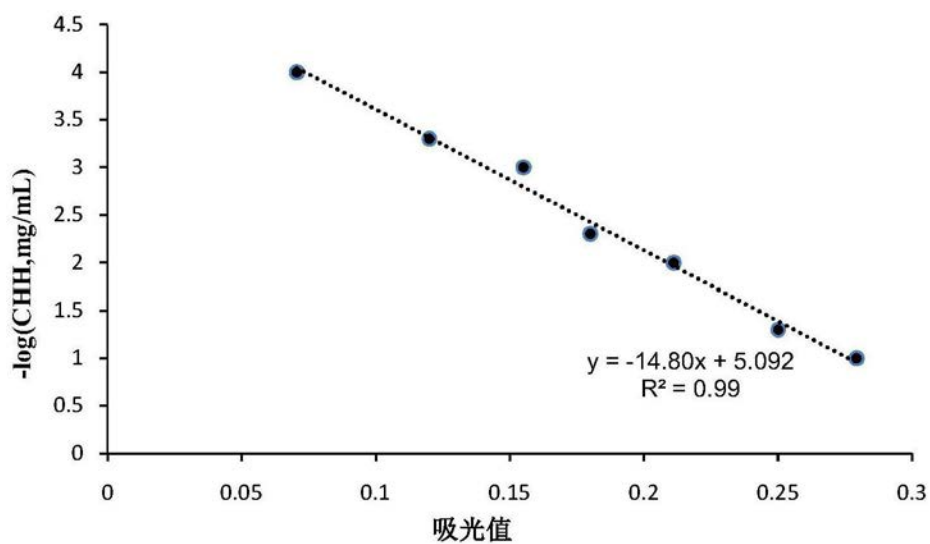


图1

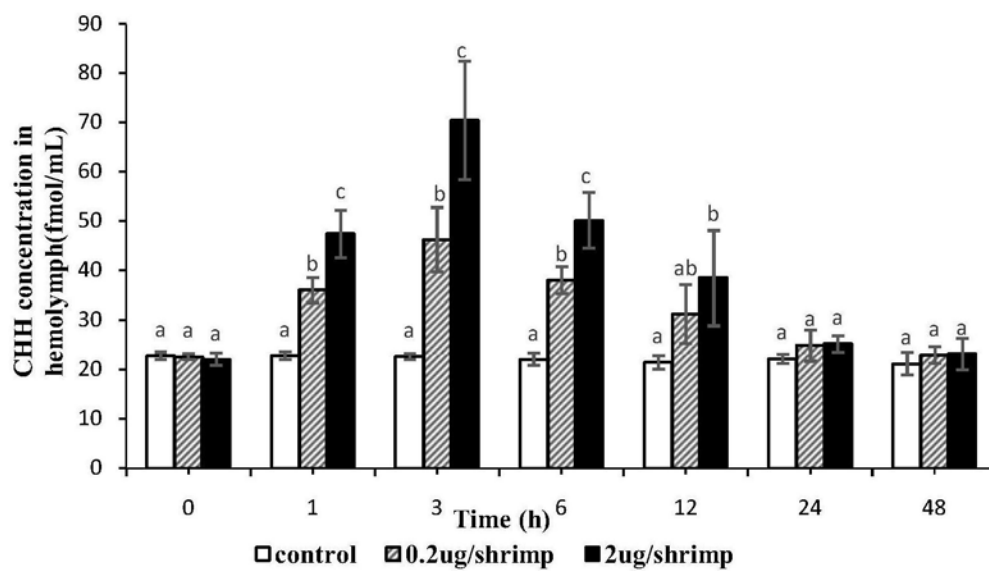


图2

专利名称(译)	凡纳滨对虾高血糖激素间接竞争酶联免疫检测方法		
公开(公告)号	CN109358194A	公开(公告)日	2019-02-19
申请号	CN201811152746.9	申请日	2018-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
[标]发明人	潘鲁青 许丽君 韦存		
发明人	潘鲁青 许丽君 韦存		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/536 G01N33/74		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/536 G01N33/74		
代理人(译)	张中南 邱岳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

凡纳滨对虾高血糖激素间接竞争酶联免疫检测方法，首先以原核表达方式于大肠杆菌中获得凡纳滨对虾重组高血糖激素，然后以rLvCHH为免疫抗原，利用现有的多克隆抗体的制备与纯化技术获得抗rLvCHH多克隆抗体，该抗体可与CHH特异性结合，建立了一种凡纳滨对虾高血糖激素的间接竞争酶联免疫检测方法，为检测凡纳滨对虾机体组织中的CHH含量提供了一种快速高效的检测手段。甲壳动物高血糖素是甲壳动物特有的神经内分泌激素，具有血糖调节、渗透调节等功能。要深入解析CHH，其定量测定十分重要。酶联免疫检测方法具有特异性强等特点，通过抗原-抗体能够较为准确的定量目的蛋白，从而利于深入解析CHH的功能。

