



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103499695 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 08

(21) 申请号 201310484346. 9

(22) 申请日 2013. 10. 16

(71) 申请人 武汉优尔生科技股份有限公司

地址 430056 湖北省武汉市武汉经济技术开发区出口加工区 8MC 地 F 栋(武汉优尔生科技股份有限公司)

(72) 发明人 孙颖 何峰容 李华渊 章秀波  
汪景 高强 刘晓乐 彭夫望  
杨娟

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书2页 说明书6页

(54) 发明名称

小鼠粘蛋白 5B 大鼠单抗和酶联免疫吸附测定试剂盒的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种小鼠粘蛋白 5B 大鼠单抗和酶联免疫吸附测定试剂盒的制备方法,其特征在于所述的小鼠粘蛋白 5B 试剂盒包括 5B 以及连接于固相载体上的大鼠源单克隆抗体结合,生物素化的 5B 多克隆抗体, HRP 标记的亲和素,底物 TMB 和终止液。本发明通过分子克隆技术得到稳定性好的小鼠 5B 重组蛋白,并通过大鼠单克隆抗体制备技术得到特异性高及亲和力强的单克隆抗体,用来制备小鼠粘蛋白 5B 酶联免疫吸附测定试剂盒。

1. 一种小鼠粘蛋白 5B 酶联免疫吸附测定试剂盒的制备方法,其特征在于所述的试剂盒包括小鼠粘蛋白 5B 以及连接于固相载体上的抗体结合,生物素化的小鼠粘蛋白 5B 多克隆抗体,HRP 标记的亲素,底物 TMB 和终止液,所述的制备方法包括如下步骤:

小鼠粘蛋白 5B 与连接于固相载体上的抗小鼠粘蛋白 5B 大鼠单克隆抗体结合,洗板之后加入生物素化的 5B 多克隆抗体,将未结合的生物素化抗体洗净后,加入 HRP 标记的亲素,再通过亲素化辣根过氧化物酶(HRP)放大信号,以 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺(TMB)及硫酸分别作为底物及终止液。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法,所述的试剂盒以聚苯乙烯试剂板(PS)作为固相载体,先将其置于紫外光下辐照 2 小时,使 PS 板活化。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的制备方法,所述的生物素化的小鼠粘蛋白 5B 抗原的制备方法包括如下步骤:

小鼠粘蛋白抗原的制备:采用分子克隆技术,设计引物、酶切、转化、表达以及 SDS-PAGE 电泳鉴定获得小鼠粘蛋白 5B 重组蛋白。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的制备方法,所述的生物素化的小鼠粘蛋白 5B 多克隆抗体的制备方法包括如下步骤:

抗小鼠粘蛋白 5B 兔多克隆抗体的制备:将重组的小鼠粘蛋白 5B 蛋白调整至 0.5-3mg/ml,取 0.2-4ml 蛋白,加入等体积的弗氏完全佐剂充分乳化混匀,兔后足垫、背部皮下多点免疫,每只 100-1000 $\mu$ l,14d 后,以小鼠粘蛋白 5B 重组蛋白溶液加等体积的弗氏不完全佐剂进行加强免疫,剂量与基础免疫剂量相同,每两周免疫一次,共免疫四次,第四次免疫后 14 天,从颈动脉取全血,测定抗体效价。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的制备方法,所述的生物素化的小鼠粘蛋白 5B 大鼠单克隆抗体的制备方法包括如下步骤:

抗小鼠粘蛋白 5B 大鼠单克隆抗体的制备:

1) 细胞培养

小鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞细胞培养于 5-25% 新生牛血清的 RPMI1640 培养液 中,培养条件为 :1-20%CO<sub>2</sub>, 25-45 $^{\circ}$ C。

2) 免疫动物

选用 3 月雌性裸大鼠,从浓度为 0.5-3mg/ml 的小鼠粘蛋白 5B 重组蛋白溶液中取 0.3-1ml 与等体积的完全 Freund' s 佐剂混合,在 0、15 和 28d 大鼠后足足底免疫,10d 后用琼脂糖双向扩散法检测,等到抗体浓度达到 1mg/mL 时,即完成免疫。在最后一次免疫后 3 天后取腹股沟淋巴结 B 细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合;

3) 试剂

HAT 选择性培养液, Hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) (50X),

HyPoxanthine-thymidine (HT) (50X);

PEG 融合剂 :5g 的 PEG-4000 溶解于 7ml 的 EMEM 培养液中,56 $^{\circ}$ C 10min,120 $^{\circ}$ C 15min 除菌,加入 1ml DMSO,经 0.22  $\mu$  M 的 Millipore 过滤除菌,分装成每管 2ml,于 37 $^{\circ}$ C 保存;

滋养细胞 :融合前 2d 取大鼠腹腔巨噬细胞,浓度为 2.0 $\times 10^5$  cell/ml,每孔 0.1ml 接种于 96 孔板内;

4) 细胞融合

取对数生长期的 SP2/0 细胞和免疫的大鼠 B 细胞,用融合液 EMEM 洗两次,计数细胞,以 1 个 SP2/0 细胞和 5 个 B 细胞的比例混合细胞,离心 1000rpm,5min,移去上清,轻轻打松细胞团块,在 37°C、90 秒内加入 1ml 的 PEG,经过 30 秒摇动,在 90 秒内逐滴加入 1ml 的融合液,最后加入 20mlEMEM 培养液稀释 PEG,800rpm 离心 5min,重悬细胞于选择性 HAT 培养液中,调节细胞密度为  $10^6$  脾细胞 /ml,每孔 0.1ml 接种于铺有滋养细胞的 96 孔板中;

5) 筛选及抗体的制备:

融合后 14d,可见克隆形成,待克隆长大至相当 1/3 孔时,用 ELISA 检测有杂交瘤细胞的培养上清,阳性孔进行两次的有限稀释法进行克隆,获得稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株,并将杂交瘤细胞接种于裸大鼠的腋窝皮下,3 星期后长成一个  $2 \times 2\text{cm}^3$  以上的实体瘤,研磨制成杂交瘤细胞悬液,接种于裸大鼠腹腔内,产生含有单克隆抗体的腹水;

6) 免疫亲和柱的制备:

用硫酸铵沉淀法粗提单抗,用亲和层析法纯化分离得到特异性高的抗小鼠粘蛋白 5B 的抗体;采用亲和层析法纯化大鼠腹水中的特异性抗体。将上述重组蛋白偶联到亲和层析柱上,制备成能分离小鼠粘蛋白 5B 抗体的亲和层析柱;

小鼠粘蛋白 5B 抗体的纯化具体步骤如下:将 200-300ml 大鼠腹水样本直接从小鼠粘蛋白 5B 抗原偶联的层析柱进样口上样,流速为 1ml/min。用 0.1mol/LpH8.0 磷酸缓冲液 (30-40ml) 洗脱杂蛋白后,再用 0.01mol/LpH8.0 磷酸缓冲液 (20-30ml) 洗脱,流速为 2ml/min。最后用 0.1mol/LGly-HCl 洗脱缓冲液洗脱,流速为 1.5ml/min,收集样本洗脱液,透析浓缩后备用。采用间接 ELISA 法进行鉴定,抗体效价为 1:1000000-1:2500000。

## 小鼠粘蛋白 5B 大鼠单抗和酶联免疫吸附测定试剂盒的制备方法

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体而言,涉及一种小鼠粘蛋白 5B 大鼠单抗和酶联免疫吸附测定试剂盒的制备方法的制备方法。

### 背景技术

[0002] 粘蛋白 5B, Mucin5SubtypeB (MUC5B), 是高度糖基化修饰的高分子量蛋白家族成员之一。由核心蛋白和 O-糖链组成,分子量约为 40 万以上,在泪腺中表达并分泌,是唾液和泪液中的主要黏蛋白成分之一。

[0003] 粘蛋白 5B 为凝胶成型粘蛋白,其单体可以缠结聚合形成线性多聚物,从而形成凝胶锚定在眼表,它使得黏液层具有流变性质,在眼睑和眼球快速相对运动时保护上皮免受剪切力的破坏。同时,它可与各种微粒、化学物质、微生物等产生非特异性的相互作用。可在异物、坏死细胞等周围形成小的凝胶,经过鼻泪管把眼表的垃圾运走。粘蛋白 5B 是泪膜必不可少的成分,在维持泪膜稳定方面有重要作用,检测眼表粘蛋白的含量可作为评价泪膜功能的一种方法。同时,它还在全唾液、正常肺粘液和宫颈粘液中起到润滑性和粘弹性的作用。而且,该蛋白已被发现是在一些人类疾病,包括鼻窦粘膜慢性鼻窦炎(CRS)与鼻息肉 CRS,慢性阻塞性肺疾病(COPD)和幽门螺杆菌相关胃病上调中起到重要作用。因此粘蛋白的检测对于干眼症、鼻窦炎、肺癌、胃溃疡等疾病的诊断、药物疗效的评估等均有一定的价值。

[0004] 目前传统的粘蛋白定量测定方法主要有高效液相色谱法、Western-blotting、RT-PCR、免疫组织化学和酶联免疫吸附测定法。

[0005] 其中免疫印迹法(Western-blotting)是目前应用于粘蛋白 5B 定量检测的比较普遍的方法,这种方法可以初步测定粘蛋白 5B 的含量,但它测得的是  $\mu\text{g/mL}$  以上的含量,操作简单,但需要做 SDS-PAGE 电泳和用考马斯亮蓝染色和脱色,中间过程繁多,影响因素也很多,稳定性较差,而且最后只能通过目标条带灰度值估测定量,结果不是很准确,并且一次性只能检测少数样本,临床上使用较少;而使用免疫组织染色检测粘蛋白 5B 虽然也可以测得  $\mu\text{g/mL}$  以上的含量,但由于现今免疫组织染色中还存在着一些问题,比如说组织固定问题,抗原修复问题以及阳性对照问题等,这些问题也严重制约了免疫组织染色方法的发展和普及;RT-PCR 主要通过检测 mRNA 来预测粘蛋白 5B 的量,需要使用荧光定量 PCR 仪,一次性投资大,价格昂贵,不适合一般实验室使用。

[0006] 高效液相色谱法(HPLC)具有灵敏度高、准确性和重复性好等优势,但需要昂贵的仪器设备,而且检测过程繁琐、样本前处理的技术要求很高,难于操作。检测人员需要具备专业的检测技能和丰富的实验经验。

[0007] 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测技术是在 RIA 基本理论的基础上发展起来的一种非放射性标记免疫分析技术。利用抗原-抗体之间特异性的免疫反应识别生物液体中的靶分子,并利用酶-底物的显色反应定量的反应待测样本中靶分子的含量。由于其特异性强、灵敏度、操作简便及不需大型仪器等优点,现广泛用于生物样本的定量检测实验中。酶联免疫吸附测定检测试剂盒中的关键因素是获得高特异性、高亲和力的单克隆抗体。目前

小鼠是科研实验室最常用的实验动物,但由于粘蛋白 5B 来源于小鼠,所以常规的小鼠单克隆抗体的制备方法在这里是行不通的。而大鼠单抗的制备则可以解决这个问题,同时大鼠抗体具有一些小鼠抗体不具备的特点,大鼠抗体分子的轻链 95% 为  $\kappa$  型。因此可以利用小鼠抗大鼠抗体 Ig  $\kappa$ -1a 抗体,高度特异性地结合杂交瘤产生的 Ig  $\kappa$ -1a 的单克隆抗体,然后达到去除宿主大鼠产生的非特异性 Ig  $\kappa$ -1b 抗体的目的,从而分离纯化得到高纯度的抗体。因此,本申请是利用大鼠杂交瘤技术制备小鼠及其他物种的蛋白的单克隆抗体,然后用于 ELISA 试剂盒研发。

## 发明内容

[0008] 本发明的目的在于克服现有技术的缺陷,提供一种小鼠粘蛋白 5B 大鼠单抗和酶联免疫吸附测定试剂盒及其制备方法。为了实现本发明的目的,拟采用如下技术方案:

[0009] 本发明一方面涉及一种小鼠粘蛋白 5B 大鼠单抗和酶联免疫吸附测定试剂盒的制备方法,其特征在于所述的试剂盒包括粘蛋白 5B 以及连接于固相载体上的抗体结合,生物素化的粘蛋白 5B 多克隆抗体,HRP 标记的亲合素,底物 TMB 和终止液,所述的制备方法包括如下步骤:

[0010] 粘蛋白 5B 与连接于固相载体上的抗体结合,洗板之后加入生物素化的粘蛋白 5B 多克隆抗体,将未结合的生物素化抗体洗净后,加入辣根过氧化物酶 HRP 标记的亲合素,再通过亲合素化辣根过氧化物酶(HRP)放大信号,以 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)及硫酸分别作为底物及终止液。

[0011] 在一个优选的实施方式中,所述的试剂盒以聚苯乙烯试剂板(PS)作为固相载体,先将其置于紫外光下辐照 2 小时,使 PS 板活化。

[0012] 在本发明的另一个优选实施方式中,所述的生物素化的粘蛋白 5B 抗原的制备方法包括如下步骤:

[0013] (1) 粘蛋白 5B 抗原的制备:采用分子克隆技术,设计引物、酶切、转化、表达以及 SDS-PAGE 电泳鉴定获得小鼠粘蛋白 5B 重组蛋白;

[0014] 在本发明的另一个优选实施方式中,所述的生物素化的粘蛋白 5B 多克隆抗体的制备方法包括如下步骤:

[0015] (2) 抗小鼠粘蛋白粘蛋白 5B 兔多克隆抗体的制备:将重组的小鼠 5B 蛋白调整至 0.5-3mg/ml,取 0.2-4ml 蛋白,加入等体积的弗氏完全佐剂充分乳化混匀,兔后足垫、背部皮下多点免疫,每只 100-1000 $\mu$ l,14d 后,以小鼠粘蛋白 5B 重组蛋白溶液加等体积的弗氏不完全佐剂进行加强免疫,剂量与基础免疫剂量相同,每两周免疫一次,共免疫四次,第四次免疫后 14 天,从颈动脉取全血,测定抗体效价;

[0016] 在本发明的另一个优选实施方式中,所述的生物素化的粘蛋白 5B 大鼠单克隆抗体的制备方法包括如下步骤:

[0017] (3) 抗小鼠粘蛋白 5B 大鼠单克隆抗体的制备:

[0018] 1) 细胞培养

[0019] 小鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞细胞培养于 5-25% 新生牛血清的 RPMI1640 培养液中,培养条件为:1-20%CO<sub>2</sub>,25-45℃。

[0020] 2) 免疫动物

[0021] 选用 3 月雌性裸大鼠,从浓度为 0.5-3mg/ml 的小鼠粘蛋白 5B 重组蛋白溶液中取 0.3-1ml 与等体积的完全 Freund's 佐剂混合,在 0、15 和 28d 大鼠后足足底免疫,10d 后用琼脂糖双向扩散法检测,等到抗体浓度达到 0.5-3mg/mL 时,即完成免疫。在最后一次免疫后 3 天后取腹股沟淋巴结 B 细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合。

[0022] 3) 试剂

[0023] HAT 选择性培养液, Hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) (50X),

[0024] HyPoxanthine-thymidine (HT) (50X)。

[0025] PEG 融合剂:5g 的 PEG-4000 溶解于 7ml 的 EMEM 培养液中,56°C 10min,120°C 15min 除菌,加入 1ml DMSO,经 0.22 μm 的 Millipore 过滤除菌,分装成每管 2ml,于 37°C 保存。

[0026] 滋养细胞:融合前 2d 取大鼠腹腔巨噬细胞,浓度为  $2.0 \times 10^5$  cell/ml,每孔 0.1ml 接种于 96 孔板内。

[0027] 4) 细胞融合

[0028] 取对数生长期的 SP2/0 细胞和免疫的大鼠 B 细胞,用融合液 EMEM 洗两次,计数细胞,以 SP2/0 细胞和 B 细胞 1:1-1:20 的比例混合细胞,离心 1000rpm,5-20min,移去上清,轻轻打松细胞团块,在 37°C、90 秒内加入 0.5-3ml 的 PEG,经过 30 秒摇动,在 90 秒内逐滴加入 1ml 的融合液,最后加入 20ml EMEM 培养液稀释 PEG,800rpm 离心 5min,重悬细胞于选择性 HAT 培养液中,调节细胞密度为  $10^6$  脾细胞/ml,每孔 0.1ml 接种于铺有滋养细胞的 96 孔板中。

[0029] 5) 筛选及抗体的制备:

[0030] 融合后 14d,可见克隆形成,待克隆长大至相当 1/3 孔时,用 ELISA 检测有杂交瘤细胞的培养上清,阳性孔进行两次的有限稀释法进行克隆,获得稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株,并将杂交瘤细胞接种于裸大鼠的腋窝皮下,3 星期后长成一个  $2 \times 2 \text{cm}^3$  以上的实体瘤,研磨制成杂交瘤细胞悬液,接种于裸大鼠腹腔内,产生含有单克隆抗体的腹水。

[0031] 6) 免疫亲和柱的制备:

[0032] 用硫酸铵沉淀法粗提单抗,用亲和层析法纯化分离得到特异性高的抗小鼠粘蛋白 5B 的抗体。采用亲和层析法纯化大鼠腹水中的特异性抗体。将上述重组蛋白偶联到亲和层析柱上,制备成能分离小鼠粘蛋白 5B 抗体的亲和层析柱。

[0033] 小鼠粘蛋白 5B 抗体的纯化具体步骤如下:将 200-300ml 大鼠腹水样本直接从小鼠粘蛋白 5B 抗原偶联的层析柱进样口上样,流速为 1ml/min。用 0.1mol/L pH8.0 磷酸缓冲液 (30-40ml) 洗脱杂蛋白后,再用 0.01mol/L pH8.0 磷酸缓冲液 (20-30ml) 洗脱,流速为 2ml/min。最后用 0.1mol/L Gly-HCl 洗脱缓冲液洗脱,流速为 1.5ml/min,收集样本洗脱液,透析浓缩后备用。采用间接 ELISA 法进行鉴定,抗体效价为 1:1000000-1:2500000。

[0034] 本发明通过分子克隆技术得到稳定性好的小鼠 5B 重组蛋白,并通过大鼠单克隆抗体制备技术得到特异性高及亲和力强的单克隆抗体,用来制备小鼠粘蛋白 5B 酶联免疫吸附测定试剂盒。通过与 HPLC 法的比较,其精密度、回收率、准确性和批量检测样本等方面均优于 HPLC 法。ELISA 法比 HPLC 法样品前处理简单得多,特异性好,无需纯化浓缩。另外,ELISA 法比 HPLC 法操作时间短,一次可处理大量样品,节约了大量的人力、物力,提高了工作效率。而且,ELISA 法比 HPLC 法投资小,仪器的使用不需要专业培训技术人员,更适合基层单位使用。

## 具体实施方式

[0035] 实施例 1：

[0036] 主要的技术路线如下：

[0037] 1. 小鼠粘蛋白 5B 酶联免疫试剂盒原料的制备方法,其具体步骤为

[0038] a、小鼠粘蛋白 5B 抗原的制备：

[0039] 采用分子克隆技术,设计引物、酶切、转化、表达以及 SDS-PAGE 电泳鉴定获得小鼠粘蛋白 5B 重组蛋白。

[0040] b、抗小鼠粘蛋白 5B 兔多克隆抗体的制备：

[0041] 健康雄性新西兰大白兔 1 只,用小鼠粘蛋白 5B 重组蛋白免疫。将重组的小鼠粘蛋白 5B 蛋白调整至 1mg/ml,取 1ml 蛋白,加入等体积的弗氏完全佐剂充分乳化混匀。兔后足垫、背部皮下多点免疫,每只 500 $\mu$ l。14d 后,以小鼠粘蛋白 5B 重组蛋白溶液加等体积的弗氏不完全佐剂进行加强免疫,剂量与基础免疫剂量相同。每两周免疫一次,共免疫四次,第四次免疫后 14 天,从颈动脉取全血,测定抗体效价。

[0042] c、抗小鼠粘蛋白 5B 大鼠单克隆抗体的制备：

[0043] 1) 细胞培养

[0044] 小鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞细胞培养于 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养液中,培养条件为 :5%CO<sub>2</sub>, 37°C。

[0045] 2) 免疫动物

[0046] 选用 3 月雌性裸大鼠,从浓度为 1mg/ml 的 5B 重组蛋白溶液中取 0.4ml 与等体积的完全 Freund's 佐剂混合,在 0、15 和 28d 大鼠后足足底免疫,10d 后用琼脂糖双向扩散法检测,等到抗体浓度达到 1mg/mL 时,即完成免疫。在最后一次免疫后 3 天后取腹股沟淋巴结 B 细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合。

[0047] 3) 试剂

[0048] HAT 选择性培养液, Hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) (50X),

[0049] HyPoxanthine-thymidine (HT) (50X)。

[0050] PEG 融合剂 :5g 的 PEG-4000 溶解于 7ml 的 EMEM 培养液中,56°C 10min,120°C 15min 除菌,加入 1ml DMSO,经 0.22  $\mu$  M 的 Millipore 过滤除菌,分装成每管 2ml,于 37°C 保存。

[0051] 滋养细胞 :融合前 2d 取大鼠腹腔巨噬细胞,浓度为  $2.0 \times 10^5$  cell/ml,每孔 0.1ml 接种于 96 孔板内。

[0052] 4) 细胞融合

[0053] 取对数生长期的 SP2/0 细胞和免疫的大鼠 B 细胞,用融合液 EMEM 洗两次,计数细胞,以 1 个 SP2/0 细胞和 5 个 B 细胞的比例混合细胞,离心 1000rpm,5min,移去上清,轻轻打松细胞团块,在 37°C、90 秒内加入 1ml 的 PEG,经过 30 秒摇动,在 90 秒内逐滴加入 1ml 的融合液,最后加入 20ml EMEM 培养液稀释 PEG,800rpm 离心 5min,重悬细胞于选择性 HAT 培养液中,调节细胞密度为  $10^6$  脾细胞 /ml,每孔 0.1ml 接种于铺有滋养细胞的 96 孔板中。

[0054] 5) 筛选及抗体的制备：

[0055] 融合后 14d,可见克隆形成,待克隆长大至相当 1/3 孔时,用 ELISA 检测有杂交瘤细胞的培养上清,阳性孔进行两次的有限稀释法进行克隆,获得稳定分泌抗体的杂交瘤细胞

株,并将杂交瘤细胞接种于裸大鼠的腋窝皮下,3星期后长成一个 $2 \times 2 \text{cm}^3$ 以上的实体瘤,研磨制成杂交瘤细胞悬液,接种于裸大鼠腹腔内,产生含有单克隆抗体的腹水。

[0056] 6) 免疫亲和柱的制备:

[0057] 用硫酸铵沉淀法粗提单抗,用亲和层析法纯化分离得到特异性高的抗小鼠粘蛋白5B的抗体。采用亲和层析法纯化大鼠腹水中的特异性抗体。将上述重组蛋白偶联到亲和层析柱上,制备成能分离小鼠粘蛋白5B抗体的亲和层析柱。

[0058] 小鼠粘蛋白5B抗体的纯化具体步骤如下:将200-300ml大鼠腹水样本从小鼠粘蛋白5B抗原偶联的层析柱进样口上样,流速为1ml/min。用0.1mol/LpH8.0磷酸缓冲液(30-40ml)洗脱杂蛋白后,再用0.01mol/LpH8.0磷酸缓冲液(20-30ml)洗脱,流速为2ml/min。最后用0.1mol/LGly-HCl洗脱缓冲液洗脱,流速为1.5ml/min,收集样本洗脱液,透析浓缩后备用。采用间接ELISA法进行鉴定,抗体效价为1:1000000-1:2500000。

[0059] 1、ELISA试剂盒的研制:

[0060] 本试剂盒应用双抗体夹心酶联免疫分析法测定小鼠血清或血浆样本中粘蛋白5B的水平。制备过程如下:使用96孔聚苯乙烯试剂板(PS)作为固相载体,先将其置于紫外光下辐照2h,使PS板活化。在试剂板微孔条上预先包被一定浓度的抗小鼠粘蛋白5B大鼠单克隆抗体,4℃过夜,经洗板及牛血清白蛋白封闭处理后制成包被好的酶标板。检测时,向微孔中依次加入标准品和标本,其中的小鼠粘蛋白5B与连接于固相载体上的抗体结合,洗板之后加入生物素化的小鼠粘蛋白5B多克隆抗体,将未结合的生物素化抗体洗净后,加入辣根过氧化物酶HRP标记的亲素,再通过亲素化辣根过氧化物酶(HRP)放大信号,以3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)及硫酸分别作为底物及终止液,完成小鼠粘蛋白5B的酶联吸附测定试剂盒的制备。

[0061] 2、经过对试剂盒一系列的质量指标检测,包括灵敏度、重复性、特异性、回收率及线性测定,表明该检测体系成熟,本试剂盒各项指标检测结果:

[0062] a. 标准曲线

[0063]

浓度 (pg/ml)	标准品 OD 值		OD 值平均值	校正值
1000	2.389	2.487	2.438	2.356
500	1.588	1.6	1.594	1.512
250	1.123	1.249	1.186	1.104
125	0.798	0.812	0.805	0.723
62.5	0.502	0.484	0.493	0.411
31.2	0.348	0.366	0.357	0.275
15.6	0.207	0.191	0.199	0.117
0	0.085	0.079	0.082	—

[0064] b. 灵敏度:ELISA法检测小鼠血清标本时最低检测限为6.7pg/ml;

[0065] c. 回收率:用同一血清样本分别添加不同量的定值标准品,作回收试验(n=5)。平均回收率95.5%(表2)。

[0066] 表2ELISA法测定催产素的回收试验

[0067]

定值标准品 (pg/ml)	回收率 (%)
600	95.83
250	96.42
30	94.25
平均回收率	95.5

[0068] 技术效果

[0069] 对比了 ELISA 法(本发明所制备的测定试剂盒)和 HPLC 法定量检测,可见 ELISA 法有操作简单、快捷、试验成本低的特点。

[0070]

	ELISA 法	HPLC 法
检测过程	简单	繁琐
操作时间	短(4.5 小时)	长
操作人员	普通实验员	专业培训技术人员
样本测定数量 / 次	多	单
设备(试剂)价格	低廉	昂贵
灵敏度	6.7pg/ml	4.57ng/ml

[0071] 表 3ELISA 法和 HPLC 法比较

[0072] 1. 精密度实验:

[0073] 用两法对高、中、低值质控品分别进行精密度实验,实验方法为分别用这两个试剂盒测定三个定值样本 600pg/ml、250pg/ml、30pg/ml,每个样本重复测定 20 次,表 4 中结果可见 ELISA 方法精密度较好。

[0074]

	批内差 CV(%)		批间差 CV(%)	
	ELISA 法	HPLC 法	ELISA 法	HPLC 法
高值	5.8	6.1	7.4	8.5
中值	6.2	6.4	6.9	7.8
低值	6.5	7.5	7.6	9.1

[0075] 表 4ELISA 法和 HPLC 法精密度测试

[0076] 2. 回收实验:

[0077] 取不同浓度的标准品溶液(粘蛋白 5B 浓度为 600pg/ml、250pg/ml、30pg/ml),分别加入定值血清(125pg/ml),用 HPLC 法和 ELISA 法检测,并比较测定值和预期值得到回收率(见表 5)。

[0078]

	ELISA 法 (%)	HPLC 法 (%)
600pg/ml	95.83	82.34
250pg/ml	96.42	87.68
30pg/ml	94.25	78.45

[0079] 表 5ELISA 法和 HPLC 法回收率测试

[0080] 以上所述,仅为本发明的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何不经过创造性劳动想到的变化或替换,都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此,本发明的保护范围应该以权利要求书所限定的保护范围为准。

专利名称(译)	小鼠粘蛋白5B大鼠单抗和酶联免疫吸附测定试剂盒的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103499695A</a>	公开(公告)日	2014-01-08
申请号	CN201310484346.9	申请日	2013-10-16
[标]申请(专利权)人(译)	武汉优尔生科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉优尔生科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉优尔生科技股份有限公司		
[标]发明人	孙颖 何峰容 李华渊 章秀波 汪景 高强 刘晓乐 彭夫望 杨娟		
发明人	孙颖 何峰容 李华渊 章秀波 汪景 高强 刘晓乐 彭夫望 杨娟		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	C07K16/18 G01N33/535 G01N33/68		
其他公开文献	CN103499695B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种小鼠粘蛋白5B大鼠单抗和酶联免疫吸附测定试剂盒的制备方法，其特征在于所述的小鼠粘蛋白5B试剂盒包括5B以及连接于固相载体上的大鼠源单克隆抗体结合，生物素化的5B多克隆抗体，HRP标记的亲素，底物TMB和终止液。本发明通过分子克隆技术得到稳定性好的小鼠5B重组蛋白，并通过大鼠单克隆抗体制备技术得到特异性高及亲和力强的单克隆抗体，用来制备小鼠粘蛋白5B酶联免疫吸附测定试剂盒。

浓度 (pg/ml)	标准品 OD 值		OD 值平均值	校正值
1000	2.389	2.487	2.438	2.356
500	1.588	1.6	1.594	1.512
250	1.123	1.249	1.186	1.104
125	0.798	0.812	0.805	0.723
62.5	0.502	0.484	0.493	0.411
31.2	0.348	0.366	0.357	0.275
15.6	0.207	0.191	0.199	0.117
0	0.085	0.079	0.082	—