



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106802349 A

(43)申请公布日 2017.06.06

(21)申请号 201611257511.7

(22)申请日 2016.12.30

(71)申请人 广东华南联合疫苗开发院有限公司

地址 510663 广东省广州市科学城揽月路3
号国际企业孵化器F栋715

(72)发明人 彭涛 谭远贞 马书智 许煜华
陈丽云 黄杨波 卢全占 丁东

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

代理人 许飞

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书16页 附图3页

(54)发明名称

Sf昆虫细胞宿主细胞蛋白双抗夹心酶联免
疫检测试剂盒及方法

(57)摘要

本发明公开了Sf-公昆虫细胞宿主细胞蛋白
双抗夹心酶联免疫检测试剂盒及方法。试剂盒包
括稀释液、洗液、显色液、终止液、一抗包被的酶
标板、Sf昆虫细胞蛋白标准品和标记的二抗，一
抗为哺乳动物抗Sf昆虫细胞蛋白抗体，二抗为生
物素标记的抗Sf昆虫细胞蛋白抗体。本发明的试
剂盒，操作简便，检测结果准确可靠，检测灵敏度
高，平均检测限低至18.4ng/ml，定量限为50ng/
ml。

1. 一种用于检测Sf昆虫细胞宿主细胞蛋白的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒,包括稀释液、洗液、显色液、终止液、一抗包被的酶标板、Sf昆虫细胞蛋白标准品和标记的二抗,其特征在于:一抗为哺乳动物抗Sf昆虫细胞蛋白抗体,二抗为标记的Sf昆虫细胞蛋白抗体。

2. 根据权利要求1所述的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:哺乳动物抗Sf昆虫细胞蛋白抗体的制备方法为:首次免疫采用抗原多点免疫,注射Sf昆虫细胞蛋白;首次免疫后进行加强免疫,共进行3~5次加强免疫,最后一次加强免疫后取血。

3. 根据权利要求1所述的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:兔抗Sf昆虫细胞蛋白抗体的制备方法为:首次免疫抗原多点免疫,注射Sf昆虫细胞蛋白;首次免疫后进行加强免疫,共进行3~5次加强免疫,最后一次加强免疫后取血。

4. 根据权利要求1或3所述的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:标记二抗的为生物素。

5. 根据权利要求1所述的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:酶标板的处理方法为:将一抗(抗Sf昆虫细胞蛋白抗体用包被液稀释成 $10\sim 50\mu\text{g}/\text{ml}$)后加入酶标板,包被过夜,再用封闭液 $35\sim 37^{\circ}\text{C}$ 封闭2~5小时,封存。

6. 根据权利要求1所述的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:Sf昆虫细胞蛋白的制备方法为:将Sf昆虫细胞悬浮液于离心收集细胞,加入细胞裂解液振荡裂解, $10000\sim 15000\text{ rpm}$ 离心5~10min,取上层溶液,此溶液为Sf昆虫细胞蛋白。

7. 根据权利要求1所述的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:稀释液中,吐温-20使用浓度为 $0.02\%\sim 0.1\%$ 、NBS使用浓度为 $1\%\sim 3\%$,缓冲溶液为磷酸盐缓冲液、TE缓冲液或碳酸盐缓冲液。

8. 一种检测Sf昆虫细胞宿主蛋白含量的方法,包括如下步骤:

1) 取出哺乳动物抗Sf昆虫细胞蛋白抗体包被的酶标板,加入Sf昆虫细胞蛋白抗原标准品,孵育完成后弃去孔内液体,洗液清洗后拍干;

2) 加入生物素标记的抗Sf昆虫细胞蛋白抗体,孵育完成后弃去孔内液体,洗液清洗后拍干;

3) 加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素,孵育完成后弃去孔内液体,洗液清洗后拍干;

4) 加入TMB显色液,室温反应10min;

5) 加入硫酸终止液;

在酶标仪上测450nm下的OD值;

根据标准曲线得到所述待检样品中Sf昆虫细胞宿主蛋白含量。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于:生物素标记的抗Sf昆虫细胞蛋白抗体浓度为 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}\sim 2\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

10. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于:辣根过氧化物酶标记链霉亲和素的浓度为 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}\sim 0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

Sf昆虫细胞宿主细胞蛋白双抗夹心酶联免疫检测试剂盒及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域,尤其是涉及用于检测Sf昆虫细胞(Spodoptera frugiperda)宿主细胞蛋白残留的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒及方法。

背景技术

[0002] 宿主细胞蛋白(Host cell protein,HCP)既包括宿主细胞的结构蛋白,也包括宿主细胞(传代细胞)分泌的促生长因子。它不仅能引起机体的过敏反应,还有可能引起机体对蛋白质药物产生抗体。因此控制疫苗中HCP含量是保证疫苗质量的一项重要内容。1998年,WHO制定了《使用动物细胞生产生物制品规程》,其中对传代细胞的HCP残留量提出了指导性要求,即将传代细胞HCP含量降低至可接受水平。

[0003] 昆虫细胞/杆状病毒表达系统已经广泛应用于重组蛋白的表达和研究中,与大肠埃希菌、酵母、哺乳动物细胞表达系统并称为基因工程四大表达系统。常用的昆虫细胞株有Sf9、Sf21、high5等。用昆虫细胞/杆状病毒表达系统重组的人用疫苗CERVARIX(英国GSK公司)和PROVENGE(美国Dendreon公司)已经批准上市,流感病毒、人细小病毒B19、诺瓦克病毒等人用疫苗制品正在进行临床研究。与其他表达系统的重组制品一样,昆虫细胞/杆状病毒表达系统制备的重组人用生物制品,宿主细胞蛋白是引起副作用的重要成分,需要对其残余量进行控制。

[0004] 目前,《中国药典》对大肠杆菌和Vero细胞等蛋白残留检测方法作了规定,还没有昆虫细胞蛋白残留检测相关专利的报道。

[0005] 抗体的制备过程直接影响着抗体的效价,直接影响着检测结果。由于宿主细胞蛋白为具体组成不明的蛋白混合物,开发出针对这种复杂组成的抗体更具有挑战性。一般条件下制备得到的抗体,往往偏向于某一特定蛋白,对混合蛋白的检测效果较差,稳定性不高,难以满足实际需要。开发出可有效检测混合宿主细胞蛋白的试剂,具有非常实际的意义。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供用于检测Sf昆虫细胞宿主细胞蛋白残留的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒及方法。

[0007] 本发明所采取的技术方案是:

[0008] 一种用于检测Sf昆虫细胞宿主细胞蛋白的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒,包括稀释液、洗液、显色液、终止液、一抗包被的酶标板、Sf昆虫细胞蛋白标准品和标记的二抗,一抗为哺乳动物抗Sf昆虫细胞蛋白抗体,二抗为标记的哺乳动物抗Sf昆虫细胞蛋白抗体。

[0009] 作为上述双抗夹心酶联免疫检测试剂盒的进一步改进,哺乳动物抗Sf昆虫细胞蛋白抗体的制备方法为:首次免疫采用抗原多点免疫,注射Sf昆虫细胞蛋白;首次免疫后进行加强免疫,共进行3~5次加强免疫,最后一次加强免疫后取血。

[0010] 作为上述双抗夹心酶联免疫检测试剂盒的进一步改进,兔抗Sf昆虫细胞蛋白抗体的制备方法为:首次免疫采用抗原多点免疫,注射Sf昆虫细胞蛋白;首次免疫后进行加强免疫,共进行3~5次加强免疫,最后一次加强免疫后取血。

[0011] 作为上述双抗夹心酶联免疫检测试剂盒的进一步改进,标记二抗的为生物素,其标记方法为:

[0012] 1) 将兔抗Sf昆虫细胞蛋白抗体溶于碳酸盐缓冲液中,调节浓度为1~10mg/ml,装入透析袋中对碳酸盐缓冲液透析过夜;

[0013] 2) 将Biotin-NHS溶解于DMF,浓度为1~50mg/ml。按Biotin-NHS与抗体的质量比为1:10室温搅拌下混合反应;

[0014] 3) 在反应混合液中加入1M的NH₄Cl终止反应,孵育后将反应混合物装入透析袋,在PBS中透析过夜。

[0015] 作为上述双抗夹心酶联免疫检测试剂盒的进一步改进,酶标板的处理方法为:将哺乳动物抗Sf昆虫细胞蛋白抗体用包被液稀释成10~50μg/ml后加入酶标板,每孔50~100μl,包被过夜,再用封闭液35~37℃封闭2~5小时,封存。

[0016] 作为上述双抗夹心酶联免疫检测试剂盒的进一步改进,Sf昆虫细胞蛋白的制备方法为:将Sf昆虫细胞悬浮液于离心收集细胞,加入细胞裂解液振荡裂解,10000~15000rpm离心5~10min,取上层溶液,此溶液为Sf昆虫细胞蛋白。

[0017] 作为上述双抗夹心酶联免疫检测试剂盒的进一步改进,稀释液中,吐温-20使用浓度为0.02%~0.1%、NBS使用浓度为1%~3%,缓冲溶液为磷酸盐缓冲液、TE缓冲液或碳酸盐缓冲液。

[0018] 作为上述双抗夹心酶联免疫检测试剂盒的进一步改进,一种检测Sf昆虫细胞宿主蛋白含量的方法,包括如下步骤:

[0019] 1) 取出豚鼠抗Sf昆虫细胞蛋白抗体包被的酶标板,加入Sf昆虫细胞蛋白抗原标准品100μl,37℃孵育1小时,弃去孔内液体,用洗液洗3遍,拍干;

[0020] 2) 加入生物素标记的兔抗Sf昆虫细胞蛋白抗体100μl,37℃孵育1小时,弃去孔内液体,用洗液洗6遍,拍干;

[0021] 3) 加入辣根过氧化物酶标记链霉亲和素100μl,37℃孵育1小时,弃去孔内液体,用洗液洗6遍,拍干;

[0022] 4) 加入100μl TMB显色液,室温反应10min;

[0023] 5) 加入50μl 2M硫酸终止液;

[0024] 6) 在酶标仪上测450nm下的OD值;

[0025] 7) 根据标准曲线得到所述待检样品中Sf昆虫细胞宿主蛋白含量。

[0026] 作为上述方法的进一步改进,Sf昆虫细胞蛋白抗原标准品浓度为0ng/ml~2000ng/ml。

[0027] 作为上述方法的进一步改进,生物素标记的兔抗Sf昆虫细胞蛋白抗体浓度为0.5μg/ml~2μg/ml。

[0028] 作为上述方法的进一步改进,辣根过氧化物酶标记链霉亲和素的浓度为0.1μg/ml~0.5μg/ml。

[0029] 作为上述方法的进一步改进,辣根过氧化物酶标记链霉亲和素0.1μg/ml~0.5μg/

ml。

[0030] 本发明的有益效果是：

[0031] 本发明的试剂盒，操作简便，检测结果准确可靠，检测灵敏度高，平均检测限低至18.4ng/ml，定量限为50ng/ml。

附图说明

[0032] 图1是蛋白含量测定标准曲线；

[0033] 图2是Sf昆虫细胞蛋白抗体纯度；

[0034] 图3是Sf昆虫细胞蛋白SDS-PAGE (A) 及其抗体Western blot (B) 分析；

[0035] 图4是Sf昆虫细胞蛋白双抗夹心ELISA法标准曲线；

[0036] 图5是Sf昆虫细胞蛋白双抗夹心ELISA法标准曲线。

具体实施方式

[0037] 一种用于检测Sf昆虫细胞宿主细胞蛋白的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒，包括稀释液、洗液、显色液、终止液、一抗包被的酶标板、Sf昆虫细胞蛋白标准品和标记的二抗，一抗为豚鼠抗Sf昆虫细胞蛋白抗体，二抗为兔抗Sf昆虫细胞蛋白抗体。

[0038] 作为上述双抗夹心酶联免疫检测试剂盒的进一步改进，豚鼠抗Sf昆虫细胞蛋白抗体的制备方法为：首次免疫采用弗氏完全佐剂与抗原按1:1体积比例乳化，豚鼠背部皮下多点免疫，注射Sf昆虫细胞蛋白0.5mg/只；首次免疫14天后进行加强免疫，采用弗氏不完全佐剂，其它步骤与首次免疫相同，每次加强免疫间隔时间为10天，共进行3~5次加强免疫，最后一次加强免疫的第5~7天进行心脏取血。

[0039] 作为上述双抗夹心酶联免疫检测试剂盒的进一步改进，兔抗Sf昆虫细胞蛋白抗体的制备方法为：首次免疫采用弗氏完全佐剂与抗原按1:1体积比例乳化，家兔背部皮下多点免疫，注射Sf昆虫细胞蛋白1mg/只；首次免疫14天后进行加强免疫，采用弗氏不完全佐剂，其它步骤与首次免疫相同，每次加强免疫间隔时间为10天，共进行3~5次加强免疫，最后一次加强免疫的第5~7天进行心脏取血。

[0040] 作为上述双抗夹心酶联免疫检测试剂盒的进一步改进，标记二抗的为生物素，其标记方法为：

[0041] 1) 将兔抗Sf昆虫细胞蛋白抗体溶于碳酸盐缓冲液中，调节浓度为6mg/ml，装入透析袋中对碳酸盐缓冲液透析，4℃过夜；

[0042] 2) 将Biotin-NHS溶解于DMF，浓度为38mg/ml。按Biotin-NHS与抗体的质量比为1:10室温搅拌下混合，反应4h；

[0043] 3) 在反应混合液中加入48μl 1M的NH₄Cl终止反应，孵育10min后将反应混合物装入透析袋，在PBS中透析，4℃过液。

[0044] 当，本领域技术人员也可以使用其他的标记物进行标记。

[0045] 作为上述双抗夹心酶联免疫检测试剂盒的进一步改进，酶标板的处理方法为：将豚鼠抗Sf昆虫细胞蛋白抗体用包被液稀释成30μg/ml后加入酶标板，每孔100μl，4℃包被过夜，再用封闭液37℃封闭2小时，封存。

[0046] 作为上述双抗夹心酶联免疫检测试剂盒的进一步改进，Sf昆虫细胞蛋白的制备方

法为：将Sf昆虫细胞悬浮液于1000rpm离心5min收集细胞，用PBS洗3次，收集细胞于离心管，加入细胞裂解液振荡10min，10000~15000rpm离心5min，取上层溶液，此溶液为Sf昆虫细胞蛋白。

[0047] 作为上述双抗夹心酶联免疫检测试剂盒的进一步改进，稀释液中，吐温-20使用浓度为0.02%~0.1%、NBS使用浓度为1%~3%，缓冲溶液为磷酸盐缓冲液、TE缓冲液或碳酸盐缓冲液。

[0048] 作为上述双抗夹心酶联免疫检测试剂盒的进一步改进，一种检测Sf昆虫细胞宿主蛋白含量的方法，包括如下步骤：

[0049] 1) 取出豚鼠抗Sf昆虫细胞蛋白抗体包被的酶标板，加入Sf昆虫细胞蛋白抗原标准品100 μ l，37℃孵育1小时，弃去孔内液体，用洗液洗3遍，拍干；

[0050] 2) 加入生物素标记的兔抗Sf昆虫细胞蛋白抗体100 μ l，37℃孵育1小时，弃去孔内液体，用洗液洗6遍，拍干；

[0051] 3) 加入辣根过氧化物酶标记链霉亲和素100 μ l，37℃孵育1小时，弃去孔内液体，用洗液洗6遍，拍干；

[0052] 4) 加入100 μ l TMB显色液，室温反应10min；

[0053] 5) 加入50 μ l 2M硫酸终止液；

[0054] 6) 在酶标仪上测450nm下的OD值；

[0055] 7) 根据标准曲线得到所述待检样品中Sf昆虫细胞宿主蛋白含量。

[0056] 作为上述方法的进一步改进，Sf昆虫细胞蛋白抗原标准品浓度为0ng/ml~2000ng/ml。

[0057] 作为上述方法的进一步改进，生物素标记的兔抗Sf昆虫细胞蛋白抗体浓度为0.5 μ g/ml~2 μ g/ml。

[0058] 作为上述方法的进一步改进，辣根过氧化物酶标记链霉亲和素的浓度为0.1 μ g/ml~0.5 μ g/ml。

[0059] 作为上述方法的进一步改进，辣根过氧化物酶标记链霉亲和素0.1 μ g/ml~0.5 μ g/ml。

[0060] 为了使本发明实现的技术手段、创作特征、达成目的与功效易于明白了解，下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。

[0061] Sf昆虫细胞蛋白的制备

[0062] 1材料

[0063] 氯化钠、氯化钾、十二水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、全蛋白提取试剂盒、酶标板、Folin-酚蛋白定量试剂盒、BSA标准品。

[0064] 2 Sf昆虫细胞蛋白的提取

[0065] 2.1磷酸盐缓冲液配制(PBS)：称取氯化钠8g，氯化钾0.2g，十二水磷酸氢二钠1.42g，磷酸二氢钾0.27g，加超纯水1000ml溶解。

[0066] 2.2取1支Sf细胞复苏于125ml摇瓶中，28℃培养，传代当天摇床转速80rpm，次日调为120rpm，约3-4天取样计数，根据培养细胞的密度传代，维持 $1.0\sim 2.0\times 10^6$ 个/ml。进行3次传代后，收集细胞于无菌离心管，1000rpm离心5min，弃去上清。

[0067] 2.3加入预冷的PBS，1000rpm离心5min，洗涤两次，弃去上清。

[0068] 2.4在无菌离心管加入预冷的裂解缓冲液、磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂和PMSF混匀,冰上保存数分钟待用。

[0069] 2.5将以上混合液加入到细胞中,振荡混匀,置于摇床平台上,中速振荡10min。

[0070] 2.6 12,000rpm离心5min,取上清液,即为Sf细胞总蛋白溶液。

[0071] 3 Sf昆虫细胞蛋白含量测定

[0072] 3.1 Folin-酚试剂甲配制:将Folin-酚蛋白定量试剂盒的溶液I (5×) 稀释5倍后与溶液II按50:1的比例混合,现配现用。

[0073] 3.2 Folin-酚试剂乙配制:原浓度为2mol/L,使用前稀释一倍,使其最后浓度为1mol/L。

[0074] 3.3标准曲线的制定:取14支试管分成两组,按表1顺序加入试剂,混匀,于室温放置10分钟。再加入0.05ml试剂乙,立即摇匀,在室温放置30分钟,然后于655nm处比色,测定光密度值。取两组测定的平均值,以蛋白质浓度为横座标,光密度值为纵座标,绘制标准曲线为定量的依据。

[0075] 表1标准曲线制定

[0076]

试剂/管号	0	1	2	3	4	5	6
BSA (200μg/ml)	0	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
纯水	0.1	0.09	0.08	0.06	0.04	0.02	0
试剂甲/ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
试剂乙/mL	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

[0077] 3.4取Sf昆虫细胞蛋白溶液,按一定比例进行稀释,分别取0.1ml,加入0.5ml试剂甲混匀,于室温放置10分钟。

[0078] 3.5加入0.5ml试剂乙,立即摇匀,于室温保温30分钟,然后于655nm处比色,测定光密度值,将测定值从标准曲线中计算出Sf昆虫细胞蛋白含量。

[0079] 3.6结果

[0080] 表2蛋白测定标准曲线

[0081]

浓度(μg/ml)	平均OD值
0	0.033
20	0.0535
40	0.071
60	0.0855
80	0.1015
100	0.1185
200	0.1875
Sf昆虫细胞蛋白溶液(稀释100倍)	0.137

[0082] 其标准曲线如图1所示。由图1可知,标准曲线具有良好的线性关系,经计算提取的Sf昆虫细胞蛋白溶液浓度为12312μg/ml。

[0083] 豚鼠抗Sf昆虫细胞蛋白抗体血清和兔抗Sf昆虫细胞蛋白抗体血清的制备

[0084] 1材料

[0085] 离心机、微型搅拌器、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、豚鼠、家兔、注射器、离心管、酒精棉、乌来糖麻醉剂。

[0086] 2方法

[0087] 2.1抗原乳化:佐剂与抗原按1:1体积比例加入离心管,在冰浴中用微型搅拌器快速搅拌进行乳化,当乳液滴入水中不扩散即可。

[0088] 2.2首次免疫:采用弗氏完全佐剂进行抗原乳化,豚鼠或家兔背部皮下多点免疫,前者注射Sf昆虫细胞蛋白0.5mg/只,后者注射Sf昆虫细胞蛋白1mg/只。

[0089] 2.3皮下注射操作:将豚鼠或家兔固定在手术台上,用酒精棉球消毒给药部位,左手充分提起给药部位皮肤,右手持注射器以45度角将注射针刺入皮下,确定针在皮下后缓缓注入药液。注射完毕后,用手指压住并轻柔刺入部位少许时间。

[0090] 2.4加强免疫:首次免疫14天后进行加强免疫,采用弗氏不完全佐剂进行抗原乳化,其它步骤与首次免疫相同,每次加强免疫间隔时间为10天,共进行3次加强免疫。

[0091] 2.5第三次加强免疫后的第5天进行心脏取血,固定好豚鼠或家兔,每只腹腔注射20%乌来糖麻醉剂进行麻醉。完全麻醉后,用剪刀剪开胸腔,暴露心脏位置,用一次性注射器从心尖处进针,针尖进入心室,缓慢回抽注射器,抽完血,拔掉针头,注射器贴着离心管壁缓慢推动,将注射器的血液沿着管壁流入离心管。

[0092] 2.6采集的血液于4℃过夜,第二天于3000rpm,离心10min,取上层血清于-70℃保存。

[0093] 间接ELISA法测定兔抗Sf昆虫细胞蛋白抗体血清效价

[0094] 1材料

[0095] 酶标仪、酶标板、涡漩混合器、吐温-20、氯化钠、氯化钾、十二水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、NBS、TMB、浓硫酸。

[0096] 2溶液配制

[0097] 2.1包被液(碳酸盐缓冲液,pH9.5、0.05M):称 Na_2CO_3 1.59g、 NaHCO_3 2.93g加超纯水800ml溶解,调pH9.5后加水至1000ml。

[0098] 2.2磷酸盐缓冲液(PBS):称氯化钠8g,氯化钾0.2g,十二水磷酸氢二钠1.42g,磷酸二氢钾0.27g,加超纯水1000ml溶解。

[0099] 2.3洗液:量取0.5ml吐温-20,加,加PBS 1000ml混匀。

[0100] 2.4封闭液:量取NBS 20ml,加洗液100ml溶解。

[0101] 2.5稀释液:量取NBS 2ml,加洗液100ml溶解。

[0102] 2.6终止液:量取超纯水178.3ml,逐滴加入浓硫酸21.7ml。

[0103] 3方法

[0104] 3.1用Sf昆虫细胞蛋白以20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 包被于96孔板,每孔加入100 μl ,置于4℃过夜,用洗液洗3遍,拍干。

[0105] 3.2每孔加入200 μl 封闭液,于37℃孵育2小时,,用洗液洗3遍,拍干。

[0106] 3.3将兔抗Sf昆虫细胞蛋白抗体血清按1:4000、1:20000、1:100000、1:500000和1:2500000比例稀释(阴性对照血清按相同倍比稀释),每孔加入100 μl ,37℃孵育1小时,用洗液洗3遍,拍干。

[0107] 3.4加入HRP标记的羊抗兔1:5000,每孔加100 μ l,37℃孵育1小时,用洗液洗6遍,拍干。

[0108] 3.5每孔加入100 μ l TMB显色液,室温显色反应10min。

[0109] 3.6每孔加入50 μ l终止液终止反应。

[0110] 3.7在酶标仪上测450nm下的OD值。当样品吸光值/阴性吸光值>2.1时,即认为是阳性,同时计算效价。

[0111] 4结果

[0112] 表3兔抗Sf昆虫细胞蛋白抗体血清效价

[0113]	稀释比例	兔抗 Sf 昆虫细胞蛋白抗体 血清 (平均 OD 值)	生理盐水组对照血 清 (平均 OD 值)	效价比
	1:4000	3.178	0.141	22.5
	1:20000	1.528	0.123	12.4
	1:100000	0.366	0.063	5.8
	1:500000	0.170	0.048	3.5
	1:2500000	0.122	0.052	2.3

[0114] 由结果可知,兔抗Sf昆虫细胞蛋白抗体血清稀释比例为1:2500000,效价比仍大于2.1,具有较高的效价。

[0115] 抗体纯化

[0116] 1材料

[0117] 豚鼠抗Sf昆虫细胞蛋白抗体血清,兔抗Sf昆虫细胞蛋白抗体血清,Protein A sepharose,纯化仪,十二水磷酸氢二钠,,二水磷酸二氢钠,氯化钠,柠檬酸,Tris,氯化钾,磷酸二氢钾,0.45 μ m滤膜,透析袋。

[0118] 2溶液配制

[0119] 2.1 250mM Na₂HPO₄:称取Na₂HPO₄·12H₂O 26.86g,加超纯水250ml,搅拌溶解,再加超纯水定容至300ml。

[0120] 2.2 250mM NaH₂PO₄:称取NaH₂PO₄·2H₂O 2.75g,加超纯水70ml,搅拌溶解,再加超纯水定容至80ml。

[0121] 2.3 250mM PB (pH7.4):取250mM Na₂HPO₄溶液300ml,加入250mM NaH₂PO₄71ml。

[0122] 2.4 Buffer A (25mM PB,0.3M NaCl,pH7.4):取250mM PB缓冲液100ml,称取NaCl 17.53g,加超纯水800ml搅拌溶解,再加超纯水定容至1000ml。

[0123] 2.5 Buffer B (0.1M柠檬酸,pH3.0):称取柠檬酸10.50g,加超纯水400ml搅拌溶解,用1M NaOH溶解,调pH至3.0,再加超纯水定容至500ml。

[0124] 2.6 Buffer C (1M Tris-Base):称取Tris-Base 12.11g,加超纯水80ml搅拌溶解,调pH8.0,再加超纯水定容至100ml。

[0125] 2.7磷酸盐缓冲液 (PBS):称取氯化钠8g,氯化钾0.2g,十二水磷酸氢二钠1.42g,磷酸二氢钾0.27g,加超纯水1000ml溶解,调pH7.4,再加超纯水定溶至1000ml。

[0126] 3方法

[0127] 3.1将血清样品稀释3倍,补加NaCl浓度至2M,12000×g离心15min,取上清液,再过0.45μm滤膜。

[0128] 3.2 Protein A层析柱用Buffer A平衡,流速3ml/min。

[0129] 3.3将处理过的样品以2.5ml/min的流速经过层析柱。

[0130] 3.4用Buffer A缓冲液以3ml/min的流速冲洗层析柱。

[0131] 3.5用Buffer B缓冲液以3ml/min的流速经过层析柱,观察280nm波长吸收值的变化,当280nm呈直线上升时,立即收集洗脱样品,至吸收值回归至基线水平停止收集,按每1ml洗脱液加入40μl Buffer C进行中和pH值至7.0~7.4范围。

[0132] 3.6将洗脱样品,装进透析袋,在PBS pH7.4缓冲液中透析,4℃,过夜。

[0133] 实施例5抗体验证

[0134] 1材料

[0135] 电泳仪,电泳槽,电磁炉,台式高速离心机,离心管,海绵,滤纸,PVDF膜,镊子,剪子,计时器,X-光片,X-光片暗夹,托盘,暗室灯,小塑料盒,显影液,定影液,ECL化学发光试剂。

[0136] 2溶液配制

[0137] 2.1电泳缓冲液:Tris Base 3.0g;甘氨酸18.8g;SDS 1g;加超纯水至1000ml。

[0138] 2.2转膜缓冲液:甘氨酸2.9g;Tris 5.8g;SDS 0.37g;甲醇200ml;加超纯水定容至1000ml。

[0139] 2.3 PBS (0.01M,pH7.4):NaCl 8.0g;KCl 0.2g;Na₂HPO₄ 1.44g;KH₂PO₄ 0.24g;加超纯水至1000ml。

[0140] 2.4 PBST:吐温-20 0.5ml,加入PBS 1000ml。

[0141] 2.5膜染色液:考马斯亮兰0.25g;甲醇45ml;乙酸10ml;加超纯水至100ml。

[0142] 2.6封闭液 (5%脱脂奶粉,现配):脱脂奶粉5g溶于1000ml PBST。

[0143] 3方法

[0144] 3.1 SDS-PAGE电泳

[0145] 3.1.1制胶:按比例配制8%分离胶及5%浓缩胶,完全聚合后使用。

[0146] 3.1.2预电泳:拔去梳子,加入电泳缓冲液后低电压10V进行预电泳20min。

[0147] 3.1.3样品准备:按样品:上样buffer为4:1体积比加入上样buffer混匀,沸水煮10min,冰上5min。

[0148] 3.1.4加样:预电泳后加入标准品和待分析样品。每个泳道上样10μl。

[0149] 3.1.5电泳:加样完毕,选择90V恒压进行电泳,电泳直至溴酚蓝染料前沿到达两胶交界处,更换至130V恒压电泳,电泳直至溴酚蓝染料前沿下至凝胶末端处,即停止电泳。

[0150] 3.2染色

[0151] 3.2.1切胶:将电泳完毕的胶割取左半部分去掉浓缩胶部分并放在盛有电转液的玻璃皿中,另外部分放在盛有考马斯亮蓝染色液的玻璃皿中。

[0152] 3.2.2置于水平摇床或侧摆摇床上缓慢摇动,室温染色1h或更长时间。

[0153] 3.2.3倒出染色液,加入适量考马斯亮蓝染色脱色液,确保脱色液可以充分覆盖凝胶。置于水平摇床或侧摆摇床上缓慢摇动,室温脱色1h。期间更换脱色液2-4次,直至蓝色背

景基本上全部被脱去,并且蛋白条带染色效果达到预期。通常蛋白条带在脱色30min后即可出现。

[0154] 3.2.4完成脱色后,用超纯水浸泡,并扫描最终结果。

[0155] 3.3转膜

[0156] 3.3.1切胶:将电泳完毕的胶去掉浓缩胶部分,其余完整的放在盛有电转液的玻璃皿中。

[0157] 3.3.2剪膜和滤纸:按胶的尺寸剪膜和滤纸(滤纸长宽较凝胶小0.5~1mm,PVDF膜长宽较凝胶大0.5~1mm),膜放入甲醇中10秒钟,然后将两者都放入盛有电转液的玻璃皿中5min。

[0158] 3.3.3向电转槽中倒入部分电转液,将海绵浸入。按如下顺序制作“三明治”,从正极到负极按如下顺序排列:正极-海绵-双层滤纸-PVDF膜-凝胶-双层滤纸-海绵-负极。(其中不能留有气泡)卡紧转膜板,电转槽中倒满电转液,将转膜板浸入电转槽中,注意正负极要正确。插上电源,设定恒流200mA转膜,冰浴电转60min。

[0159] 3.4膜的封闭:用PBST液洗涤印迹膜10s,加入5%脱脂奶粉封闭液,室温轻柔摇动封闭1.5h。

[0160] 3.5一抗孵育:按相应抗体的效价加入PBST稀释一抗,加入一抗约10ml,室温轻柔摇动孵育2h,用PBST洗涤膜4次,每次5min。

[0161] 3.6二抗孵育:按相应抗体的效价加入PBST稀释的二抗,加入二抗约10ml,室温轻柔摇动孵育1h,用PBST洗涤膜4次,每次5min。

[0162] 3.7 ECL显色:在避光的容器中按A液:B液=1:1的比例配制1ml,将ECL工作液覆盖到膜表面,放置1min后在凝胶成像系统中观察拍照或者暗房内显影曝光。

[0163] 4结果:分别如图2和图3所示。图2为Sf昆虫细胞蛋白抗体纯度,图3是Sf昆虫细胞蛋白SDS-PAGE(A)及其抗体Western blot(B)分析。

[0164] 由结果可知,纯化的兔抗Sf昆虫细胞蛋白抗体和豚鼠抗Sf昆虫细胞蛋白抗体大小在50kd左右,具有较高纯度;纯化的兔抗Sf昆虫细胞蛋白抗体能够与Sf昆虫细胞蛋白特异性结合,具有较高的特异性。

[0165] 生物素标记兔抗Sf昆虫细胞蛋白抗体

[0166] 1材料

[0167] 生物素酰-N-羟基丁二酰亚胺酯(Biotin-NHS),二甲基甲酰胺(DMF),无水碳酸钠,碳酸氢钠,氯化铵,氯化钠,氯化钾,十二水磷酸氢二钠,磷酸二氢钾,透析袋。

[0168] 2溶液配制

[0169] 2.1碳酸盐缓冲液(pH9.5、0.05M):称 Na_2CO_3 1.59g、 NaHCO_3 2.93g加超纯水800ml溶解,调pH9.5后加水至1000ml。

[0170] 2.2磷酸盐缓冲液(PBS):称氯化钠8g,氯化钾0.2g,十二水磷酸氢二钠1.42g,磷酸二氢钾0.27g,加超纯水1000ml溶解。

[0171] 3方法

[0172] 3.1兔抗Sf昆虫细胞蛋白抗体溶于碳酸盐缓冲液中,调节浓度为6mg/ml,装入透析袋中对碳酸盐缓冲液透析,4℃过夜。

[0173] 3.2将Biotin-NHS溶解于DMF,浓度为38mg/ml。按Biotin-NHS与抗体的质量比为1:

10室温搅拌下混合,反应4h。

[0174] 3.3在反应混合液中加入48μl 1M的NH₄Cl终止反应,孵育10min后将反应混合物装入透析袋,在PBS中透析,4℃过液。

[0175] 棋盘法确定包被抗体和检测抗体的浓度

[0176] 1材料

[0177] 酶标仪,漩涡混合仪,酶标板,吐温-20,无水碳酸钠,碳酸氢钠,氯化钠,氯化钾,十二水磷酸氢二钠,磷酸二氢钾,NBS,HRP-Streptavidin,TMB,浓硫酸。

[0178] 2溶液配制

[0179] 2.1包被液(碳酸盐缓冲液,pH9.5、0.05M):称Na₂CO₃ 1.59g、NaHCO₃ 2.93g加超纯水800ml溶解,调pH9.5后加水至1000ml。

[0180] 2.2磷酸盐缓冲液(PBS):称氯化钠8g,氯化钾0.2g,十二水磷酸氢二钠1.42g,磷酸二氢钾0.27g,加超纯水1000ml溶解。

[0181] 2.3洗液:量取0.5ml吐温-20,加,加PBS 1000ml混匀。

[0182] 2.4封闭液:量取NBS 20ml,加洗液100ml溶解。

[0183] 2.5稀释液:量取NBS 2ml,加洗液100ml溶解。

[0184] 2.6终止液:量取超纯水178.3ml,逐滴加入浓硫酸21.7ml。

[0185] 3方法

[0186] 3.1包被:用包被液将豚鼠抗Sf昆虫细胞蛋白抗体稀释成30μg/ml、15μg/ml和7.5μg/ml,包被于96孔板,每孔加100μl,放入4℃冰箱过夜。

[0187] 3.2封闭:弃去孔内液体,用洗液洗3遍,拍干。每孔加入200μl封闭液,37℃封闭2h后,弃去孔内液体,用洗液洗涤3次,拍干。

[0188] 3.3加样:用稀释液将Sf昆虫细胞蛋白稀释至2000ng/ml、50ng/ml和0ng/ml,每份样品加入100μl,做2个复孔,37℃孵育1h,弃去孔内液体,用洗液洗涤3次,拍干。

[0189] 3.4加生物素标记的兔抗Sf昆虫细胞抗体:用稀释液将生物素标记的兔抗Sf昆虫细胞抗体按1:300、1:600和1:900稀释,每孔加100μl,37℃孵育1h,弃去孔内液体,用洗液洗涤6次,拍干。

[0190] 3.5加HRP-Streptavidin:用稀释液将HRP-Streptavidin按1:5000稀释,每孔加100μl,37℃孵育1h,弃去孔内液体,用洗液洗涤6次,拍干。

[0191] 3.6加显色液:每孔加入100μl TMB显色液,室温下避光反应10min。

[0192] 3.7加终止液:每孔加入50μl终止液。

[0193] 3.8检测:15min内在酶标仪上测450nm下的OD值。

[0194] 4结果

[0195] 表4棋盘法优化结果

[0196]

检测抗体	2000ng/ml (平均 OD 值)	50ng/ml (平均 OD 值)	0ng/ml (平均 OD 值)
包被抗体 30 μ g/ml			
1:300	1.8635	0.4995	0.3205
1:600	1.0335	0.247	0.174
1:900	0.6915	0.105	0.1295
包被抗体 15 μ g/ml			
1:300	1.446	0.3505	0.3875
1:600	0.808	0.1665	0.1785
1:900	0.48	0.1265	0.1185
包被抗体 7.5 μ g/ml			
1:300	1.1505	0.3085	0.3095
1:600	0.6635	0.176	0.1705
1:900	0.411	0.111	0.1215

[0197] 由结果可知,包被抗体浓度为30 μ g/ml、检测抗体浓度为1:600时,结果较理想。

[0198] 检测限和定量限

[0199] 1材料

[0200] 酶标仪,漩涡混合仪,酶标板,吐温-20,无水碳酸钠,碳酸氢钠,氯化钠,氯化钾,十二水磷酸氢二钠,磷酸二氢钾,NBS,HRP-Streptavidin,TMB,浓硫酸。

[0201] 2溶液配制

[0202] 2.1包被液(碳酸盐缓冲液,pH9.5、0.05M):称Na₂CO₃ 1.59g、NaHCO₃ 2.93g加超纯水800ml溶解,调pH9.5后加水至1000ml。

[0203] 2.2磷酸盐缓冲液(PBS):称氯化钠8g,氯化钾0.2g,十二水磷酸氢二钠1.42g,磷酸二氢钾0.27g,加超纯水1000ml溶解。

[0204] 2.3洗液:量取0.5ml吐温-20,加,加PBS 1000ml混匀。

[0205] 2.4封闭液:量取NBS 20ml,加洗液100ml溶解。

[0206] 2.5稀释液:量取NBS 2ml,加洗液100ml溶解。

[0207] 2.6终止液:量取超纯水178.3ml,逐滴加入浓硫酸21.7ml。

[0208] 3方法

[0209] 检测限(灵敏度)是对20份阴性对照样品进行测定,取平均值后加2倍标准差,即X+2S,代入标准方程中,计算出来的浓度即为本试剂盒的灵敏度,重复3次实验。定量限是将Sf昆虫细胞蛋白稀释至最低浓度,最低浓度的准确度应在80%-120%,变异系数应小于20%,重复5次实验。

[0210] 3.1包被:用包被液将豚鼠抗Sf昆虫细胞蛋白抗体稀释成30 μ g/ml包被于96孔板,

每孔加100 μ l,放入4℃冰箱过夜。

[0211] 3.2封闭:弃去孔内液体,用洗液洗3遍,拍干。每孔加入200 μ l封闭液,37℃封闭2h后,弃去孔内液体,用洗液洗涤3次,拍干。

[0212] 3.3加样:用稀释液将Sf昆虫细胞蛋白稀释成2000ng/ml、1000ng/ml、500ng/ml、200ng/ml、100ng/ml、50ng/ml、20ng/ml、10ng/ml、5ng/ml、0ng/ml,每孔100 μ l,37℃孵育1h,弃去孔内液体,用洗液洗涤3次,拍干。

[0213] 3.4加生物素标记的兔抗Sf昆虫细胞抗体:用稀释液将生物素标记的兔抗Sf昆虫细胞抗体按1:600稀释,每孔加100 μ l,37℃孵育1h,弃去孔内液体,用洗液洗涤6次,拍干。

[0214] 3.5加HRP-Streptavidin:用稀释液将HRP-Streptavidin按1:5000稀释,每孔加100 μ l,37℃孵育1h,弃去孔内液体,用洗液洗涤6次,拍干。

[0215] 3.6加显色液:每孔加入100 μ l TMB显色液,室温下避光反应10min。

[0216] 3.7加终止液:每孔加入50 μ l终止液。

[0217] 3.8检测:15min内在酶标仪上测450nm下的OD值。

[0218] 3结果

[0219] 表5检测限

实验编号	平均值 (X)	标准差 (S)	检测限 (ng/ml)
1	0.1506	0.00491	20.5
2	0.1929	0.00822	15.4
3	0.1826	0.00552	19.4
平均检测限 (ng/ml)			18.4

[0221] 表6定量限

[0222]

实验编号	理论值 (ng/ml)	平均测量值 (ng/ml)	准确度 (%)	CV (%)
1	50	50.8	101.7	3.2
2	50	51.1	102.3	2.6
3	50	54.5	109.1	2.1
4	50	59.7	119.3	2.1
5	50	41.5	83.0	2.2

[0223] 由结果可知,Sf昆虫细胞宿主细胞蛋白双抗夹心酶联免疫法的检测限为18.4ng/ml,定量限为50ng/ml。

[0224] 标准曲线的确定

[0225] 1材料

[0226] 酶标仪、酶标板、涡漩混合器、吐温-20、氯化钠、氯化钾、十二水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、NBS、TMB、浓硫酸。

[0227] 2方法

[0228] 2.1包被:用包被液将豚鼠抗Sf昆虫细胞蛋白抗体稀释成30 μ g/ml包被于96孔板,每孔加100 μ l,放入4℃冰箱过夜。

[0229] 2.2封闭:弃去孔内液体,用洗液洗3遍,拍干。每孔加入200 μ l封闭液,37℃封闭2h后,弃去孔内液体,用洗液洗涤3次,拍干。

[0230] 2.3加样:用稀释液将Sf昆虫细胞蛋白稀释至2000ng/ml、1000ng/ml、500ng/ml、200ng/ml、100ng/ml、50ng/ml和0ng/ml,每份样品加入100 μ l,做8个复孔,37℃孵育1h,弃去孔内液体,用洗液洗涤3次,拍干。

[0231] 2.4加生物素标记的兔抗Sf昆虫细胞抗体:用稀释液将生物素标记的兔抗Sf昆虫细胞抗体按1:600稀释,每孔加100 μ l,37℃孵育1h,弃去孔内液体,用洗液洗涤6次,拍干。

[0232] 2.5加HRP-Streptavidin:用稀释液将HRP-Streptavidin按1:5000稀释,每孔加100 μ l,37℃孵育1h,弃去孔内液体,用洗液洗涤6次,拍干。

[0233] 2.6加显色液:每孔加入100 μ l TMB显色液,室温下避光反应10min。

[0234] 2.7加终止液:每孔加入50 μ l终止液。

[0235] 2.8检测:15min内在酶标仪上测450nm下的OD值。

[0236] 3结果

[0237] 表7标准曲线

[0238]

浓度 (ng/ml)	平均OD值	CV (%)
2000	1.4279	2.5
1000	0.9506	1.2
500	0.6076	1.2
200	0.3609	2.4
100	0.2674	4.6
50	0.2250	3.2
0	0.1806	4.5

[0239] Sf昆虫细胞蛋白双抗夹心ELISA法标准曲线如图4所示。

[0240] 由结果可知,Sf昆虫细胞蛋白双抗夹心ELISA法标准曲线线性为 $R^2=1$,线性关系较好,线性范围在50ng/ml-2000ng/ml,线性范围较理想。

[0241] 准确度和精密度

[0242] 1材料

[0243] 酶标仪、酶标板、涡漩混合器、吐温-20、氯化钠、氯化钾、十二水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、NBS、TMB、浓硫酸。

[0244] 2方法

[0245] 日内准确度和精密度是一天内分别对高、中、低浓度(1200ng/ml、400ng/ml、80ng/ml)进行测定,每个浓度重复20次。日间准确度和精密度是每天分别对高、中、低浓度(1200ng/ml、400ng/ml、80ng/ml)进行测定,每个浓度重复4次,测定5天。

[0246] 2.1包被:用包被液将豚鼠抗Sf昆虫细胞蛋白抗体稀释成30 μ g/ml包被于96孔板,每孔加100 μ l,放入4℃冰箱过夜。

[0247] 2.2封闭:弃去孔内液体,用洗液洗3遍,拍干。每孔加入200 μ l封闭液,37℃封闭2h后,弃去孔内液体,用洗液洗涤3次,拍干。

[0248] 2.3加样:加入2000ng/ml、1000ng/ml、500ng/ml、200ng/ml、100ng/ml、50ng/ml、

0ng/ml标准品溶液和1200ng/ml、400ng/ml、80ng/ml质控品溶液,每孔100 μ l,37℃孵育1h,弃去孔内液体,用洗液洗涤3次,拍干。

[0249] 2.4加生物素标记的兔抗Sf昆虫细胞抗体:加入1:600稀释的生物素标记的兔抗Sf昆虫细胞抗体,每孔加100 μ l,37℃孵育1h,弃去孔内液体,用洗液洗涤6次,拍干。

[0250] 2.5加HRP-Streptavidin:加入1:5000稀释的HRP-Streptavidin,每孔加100 μ l,37℃孵育1h,弃去孔内液体,用洗液洗涤6次,拍干。

[0251] 2.6加显色液:每孔加入100 μ l TMB显色液,室温下避光反应10min。

[0252] 2.7加终止液:每孔加入50 μ l终止液。

[0253] 2.8检测:15min内在酶标仪上测450nm下的OD值。

[0254] 3结果

[0255] 3.1日内准确度和精密度

[0256] 表8标准曲线

[0257]

浓度 (ng/ml)	平均OD值	CV (%)
2000	1.4323	1.6
1000	0.9377	3.1
500	0.6390	6.9
200	0.3600	6.4
100	0.2640	6.7
50	0.2253	2.6
0	0.1910	2.3

[0258] Sf昆虫细胞蛋白双抗夹心ELISA法标准曲线如图5所示。

[0259] 表9日内准确度和精密度

[0260]

理论值 (ng/ml)	实际测定平均值 (ng/ml)	准确度 (%)	CV (%)
高浓度 (1200)	1294.6	107.9	3.5
中浓度 (400)	424.0	105.5	5.0
低浓度 (80)	82.6	103.2	15.6

[0261] 3.2日间准确度和精密度

[0262] 表10标准曲线方程

[0263]

时间	标准曲线方程	相关系数 (R^2)
1d	$Y = -0.0000001x^2 + 0.0008x + 0.2044$	0.9988
2d	$Y = -0.0000001x^2 + 0.0009x + 0.1851$	0.9988
3d	$Y = -0.0000001x^2 + 0.0007x + 0.1505$	0.9984
4d	$Y = -0.0000002x^2 + 0.0009x + 0.1939$	0.9998
5d	$Y = -0.0000002x^2 + 0.0009x + 0.1883$	0.9993

[0264] 表11日间准确度和精密度

[0265]

理论值 (ng/ml)	实际测定平均值 (ng/ml)	准确度 (%)	CV (%)
高浓度 (1200)	1182.8	98.6	6.8
中浓度 (400)	366.6	91.6	8.5
低浓度 (80)	75.9	94.9	11.2

[0266] 由结果可知,日内、日间准确度在91.6%–107.9%之间,精密度在3.5%–15.6%之间,表明试剂盒具有较好的准确度和精密度。

[0267] 批间差异

[0268] 1材料

[0269] 酶标仪、酶标板、涡旋混合器、吐温-20、氯化钠、氯化钾、十二水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、NBS、TMB、浓硫酸。

[0270] 2方法

[0271] 制备3批试剂盒,对高、中、低浓度(1200ng/ml、400ng/ml、80ng/ml)进行测定,每个浓度重复4次,分析批间的差异。

[0272] 2.1包被:用包被液将豚鼠抗Sf昆虫细胞蛋白抗体稀释成30μg/ml包被于96孔板,每孔加100μl,放入4℃冰箱过夜。

[0273] 2.2封闭:弃去孔内液体,用洗液洗3遍,拍干。每孔加入200μl封闭液,37℃封闭2h后,弃去孔内液体,用洗液洗涤3次,拍干。

[0274] 2.3加样:加入2000ng/ml、1000ng/ml、500ng/ml、200ng/ml、100ng/ml、50ng/ml、0ng/ml标准品溶液和1200ng/ml、400ng/ml、80ng/ml质控品溶液,每孔100μl,37℃孵育1h,弃去孔内液体,用洗液洗涤3次,拍干。

[0275] 2.4加生物素标记的兔抗Sf昆虫细胞抗体:加入1:600稀释的生物素标记的兔抗Sf昆虫细胞抗体,每孔加100μl,37℃孵育1h,弃去孔内液体,用洗液洗涤6次,拍干。

[0276] 2.5加HRP-Streptavidin:加入1:5000稀释的HRP-Streptavidin,每孔加100μl,37℃孵育1h,弃去孔内液体,用洗液洗涤6次,拍干。

[0277] 2.6加显色液:每孔加入100μl TMB显色液,室温下避光反应10min。

[0278] 2.7加终止液:每孔加入50μl终止液。

[0279] 2.8检测:15min内在酶标仪上测450nm下的OD值。

[0280] 3结果

[0281] 表12批间差异分析

[0282]

理论值 (ng/ml)	实际测定平均值 (ng/ml)	准确度 (%)	CV (%)
高浓度 (1200)	1213.0	101.1	4.7
中浓度 (400)	378.1	94.5	9.7
低浓度 (80)	72.9	91.1	11.6

[0283] 由结果可知,不同批试剂盒对高、中、低浓度质控品进行测定,测定值的准确度在91.1%–101.1%之间,精密度在4.7%–11.6%之间,差异较小。

[0284] 重组蛋白生物制品中Sf昆虫细胞宿主细胞蛋白含量测定

[0285] 1材料

[0286] 本实施例中的样品为本公司3个重组蛋白疫苗样品,对纯化后的重组蛋白疫苗进行Sf昆虫细胞宿主细胞蛋白含量的测定,目的在于检测其中Sf昆虫细胞宿主细胞蛋白的残留量。

[0287] 2方法

[0288] 2.1包被:用包被液将豚鼠抗Sf昆虫细胞蛋白抗体稀释成30 μ g/ml包被于96孔板,每孔加100 μ l,放入4℃冰箱过夜。

[0289] 2.2封闭:弃去孔内液体,用洗液洗3遍,拍干。每孔加入200 μ l封闭液,37℃封闭2h后,弃去孔内液体,用洗液洗涤3次,拍干。

[0290] 2.3加入标准品和待检测样品:加入2000ng/ml、1000ng/ml、500ng/ml、200ng/ml、100ng/ml、50ng/ml和0ng/ml标准品溶液和3份待检测样品,每份样品分别按1:5和1:10稀释,每孔加入100 μ l,做3个复孔,37℃孵育1h,弃去孔内液体,用洗液洗涤3次,拍干。

[0291] 2.4加生物素标记的兔抗Sf昆虫细胞抗体:加入1:600稀释的生物素标记的兔抗Sf昆虫细胞抗体,每孔加100 μ l,37℃孵育1h,弃去孔内液体,用洗液洗涤6次,拍干。

[0292] 2.5加HRP-Streptavidin:加入1:5000稀释的HRP-Streptavidin,每孔加100 μ l,37℃孵育1h,弃去孔内液体,用洗液洗涤6次,拍干。

[0293] 2.6加显色液:每孔加入100 μ l TMB显色液,室温下避光反应10min。

[0294] 2.7加终止液:每孔加入50 μ l终止液。

[0295] 2.8检测:15min内在酶标仪上测450nm下的OD值。

[0296] 3结果

[0297] 表13重组蛋白疫苗中Sf昆虫细胞宿主细胞蛋白残留测定

[0298]

样品名称	残留量(μ g/ml)	CV(%)
重组疫苗A	32.2	5.9
重组疫苗B	19.2	2.2
重组疫苗C	48.2	5.6

[0299] 由结果可知,本公司3个重组蛋白疫苗样品检测出的Sf昆虫细胞宿主细胞蛋白残留量较多,需要进一步优化纯化工艺。本试剂盒能对纯化后Sf昆虫细胞宿主细胞蛋白进行残留量控制,为纯化工艺提供重要的参考信息,同时有利于制定最终产品的质量标准。

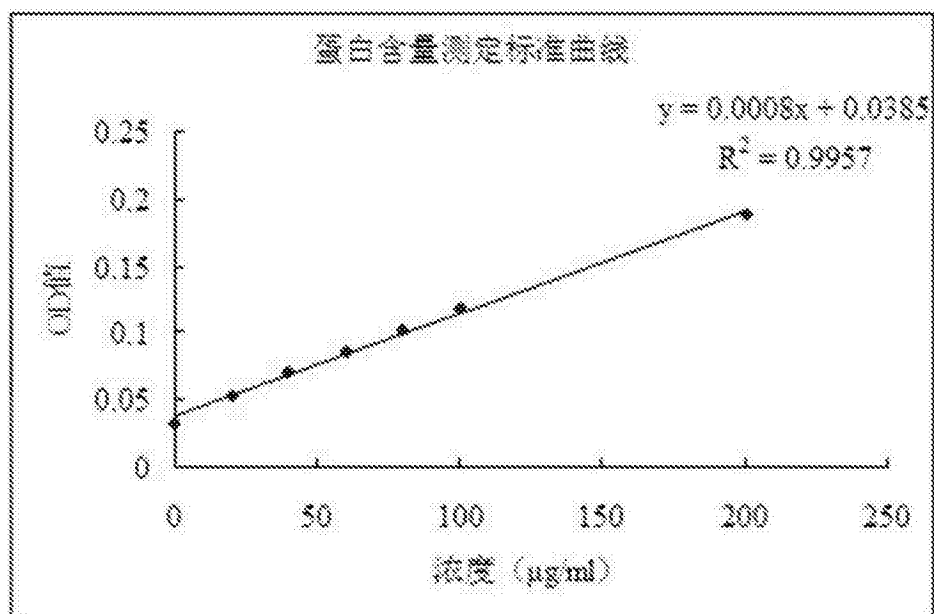
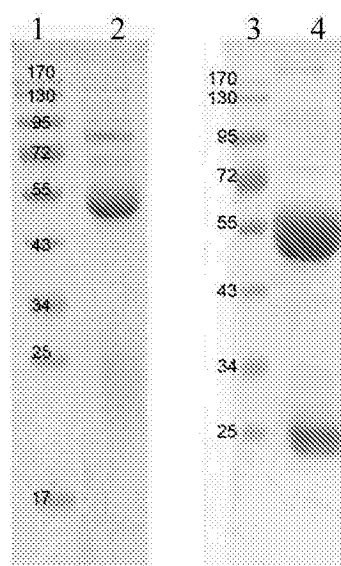
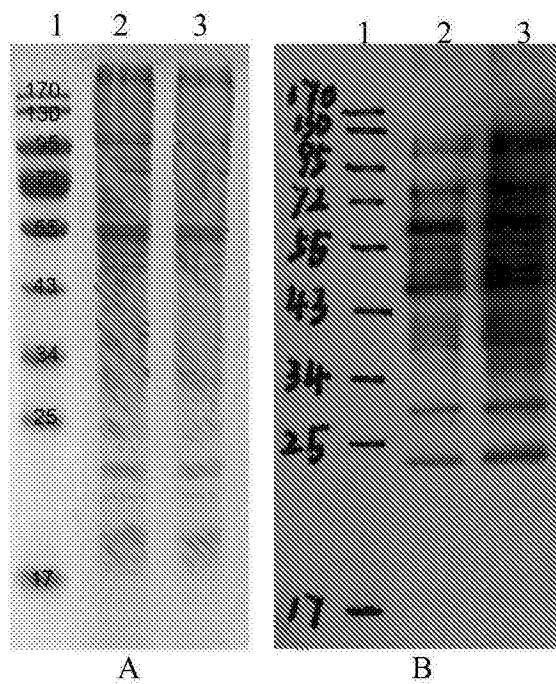


图1



1、3: Marker; 2: 兔抗 Sf 昆虫细胞蛋白抗体; 4: 豚鼠
抗 Sf 昆虫细胞蛋白抗体

图2



1: Marker; 2~3: Sf 昆虫细胞蛋白

图3

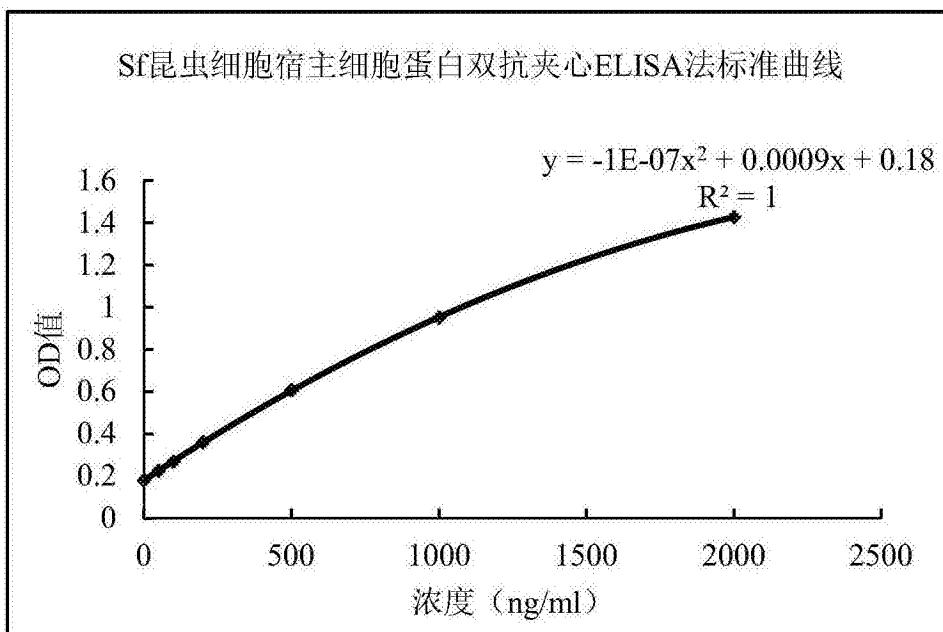


图4

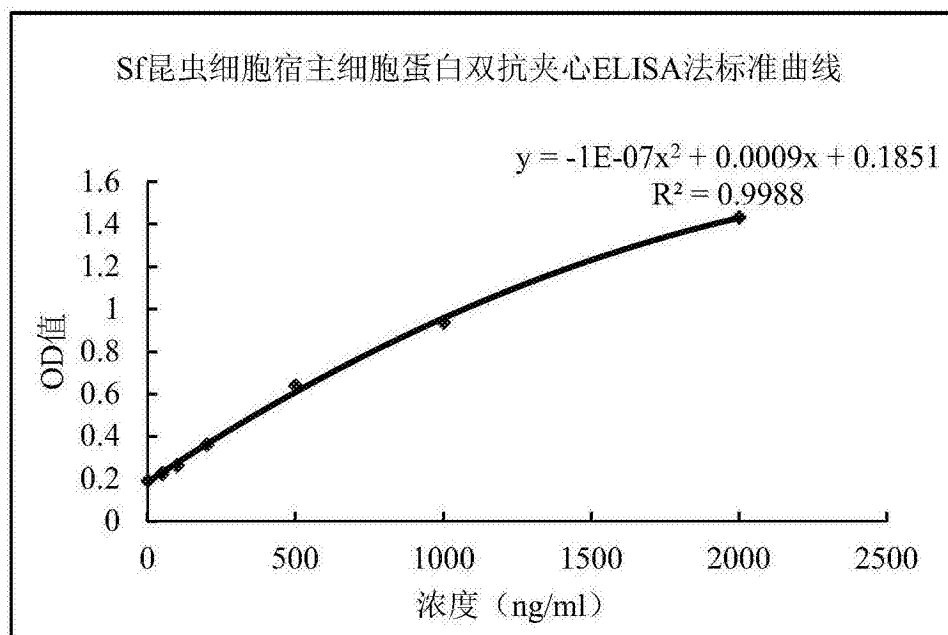


图5

专利名称(译)	Sf昆虫细胞宿主细胞蛋白双抗夹心酶联免疫检测试剂盒及方法		
公开(公告)号	CN106802349A	公开(公告)日	2017-06-06
申请号	CN201611257511.7	申请日	2016-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	广东华南联合疫苗开发院有限公司		
申请(专利权)人(译)	广东华南联合疫苗开发院有限公司		
[标]发明人	彭涛 谭远贞 马书智 许煜华 陈丽云 黄杨波 卢全占 丁东		
发明人	彭涛 谭远贞 马书智 许煜华 陈丽云 黄杨波 卢全占 丁东		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/6872 G01N33/531		
代理人(译)	许飞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了Sf-公昆虫细胞宿主细胞蛋白双抗夹心酶联免疫检测试剂盒及方法。试剂盒包括稀释液、洗液、显色液、终止液、一抗包被的酶标板、Sf昆虫细胞蛋白标准品和标记的二抗，一抗为哺乳动物抗Sf昆虫细胞蛋白抗体，二抗为生物素标记的抗Sf昆虫细胞蛋白抗体。本发明的试剂盒，操作简便，检测结果准确可靠，检测灵敏度高，平均检测限低至18.4ng/ml，定量限为50ng/ml。

稀释比例	兔抗 Sf 昆虫细胞蛋白抗体血清 (平均 OD 值)	生理盐水组对照血清 (平均 OD 值)	效价比
1:4000	3.178	0.141	22.5
1:20000	1.528	0.123	12.4
1:100000	0.366	0.063	5.8
1:500000	0.170	0.048	3.5
1:2500000	0.122	0.052	2.3