



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103558386 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 05

(21) 申请号 201310368917. 2

(22) 申请日 2013. 08. 22

(71) 申请人 郑州大学

地址 450001 河南省郑州市高新区科学大道
100 号郑州大学新校区生命科学学院

(72) 发明人 康巧珍 汲振余 刘鑫 李国栋
王婷 陈娇 傅国

(74) 专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务
所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 21/31(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页

(54) 发明名称

ELISA 检测融合蛋白 rMBP-NAP 的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种 ELISA 检测融合蛋白 rMBP-NAP 的方法,包括包被、封闭、加样、加鼠 MBP 单抗、加酶标二抗、加入底物显色。本发明使用兔 NAP 多克隆抗体包被,尤其是经 NAP-GST 亲和层析纯化抗体,通过使用商品化的酶标二抗的夹心间接 ELISA 法,避免了制备酶标抗体的麻烦,增加了灵敏度,在测定时也无需经过特殊处理,简便快捷、灵敏、特异性好。另外,在本发明的工作浓度下,还可很好地对 rMBP-NAP 进行定量分析:批内变异系数小于 10%,批间变异系数均小于 15%;加入结构类似的干扰物 NAP-GST 后,OD 值并没有升高,T 检验证明没有发生显著差异;回收率也在 85-115% 之间。

1. ELISA 检测融合蛋白 rMBP-NAP 的方法,包括以下步骤:

1) 包被:将 100u1 被包被缓冲液稀释至 500ng/mL 的兔抗幽门螺杆菌 NAP 多抗,包被至固体载体,用洗涤缓冲液洗涤

2) 封闭:再加封闭液以封闭,孵育后洗涤

3) 加样:分别加入 100u1 工作浓度的 rMBP-NAP 抗原标准品和待测样品,孵育后洗涤

4) 分别加入稀释至 50ng/mL 的小鼠 MBP 单抗 100u1,孵育后洗涤

5) 分别加入稀释至 1mg/mL 的、辣根过氧化物酶 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体 100u1,孵育后洗涤

6) 加入底物显色,并于 450nm 波长处测定吸光值 OD。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于:

所述兔抗幽门螺杆菌 NAP 多抗的制备方法为:以 rMBP-NAP 免疫兔得到多抗血清,再经以 NAP-GST 融合蛋白为配体的亲和层析纯化制得。

3. 如权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述亲和层析包括:上样前,用磷酸盐浓度 10mM、pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液平衡层析柱,该缓冲液中 NaCl 浓度为 137mM。

4. 如权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述亲和层析包括:在洗脱前,用磷酸盐浓度 10mM、pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液洗涤,该缓冲液中 NaCl 浓度为 500mM。

5. 如权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述亲和层析包括:使用 0.1 mol/L、pH2.5 的甘氨酸-HCl 缓冲液将兔抗幽门螺杆菌 NAP 多抗洗脱。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于:所述封闭液为磷酸盐浓度为 0.15 mol/L、吐温 20 的体积分数为 0.05%、pH 7.4 的 PBST 缓冲液,其中还含有质量体积分数为 2-5% 的牛血清白蛋白。

7. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于:所述包被缓冲液为 0.05mol/L、pH9.6 的碳酸盐缓冲液。

8. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于:所述步骤 1-5 的洗涤条件独立地选自:使用 0.15 mol/L、pH 7.4 PBST 缓冲液进行洗涤。

9. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于:所述步骤 4 或 5 所用稀释液为磷酸盐浓度为 0.15 mol/L、吐温 20 的质量分数为 0.05%、pH 7.4 的 PBST 缓冲液。

10. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于:所述步骤 2、3、4 或 5 中孵育的条件为:37℃孵育 1h。

ELISA 检测融合蛋白 rMBP-NAP 的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种融合蛋白 rMBP-NAP, 尤其涉及一种 ELISA 检测融合蛋白 rMBP-NAP 的方法。

背景技术

[0002] 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 是定植于人胃粘膜的革兰氏阴性螺杆菌, 世界上约有 50% 的人感染幽门螺杆菌。幽门螺杆菌产生一系列独特的毒力因子, 其中包括中性粒细胞激活蛋白 (Hp-NAP)。Hp 菌体培养条件苛刻, 难以进行大规模培养。细菌抗原组分复杂, 且含量较低, 直接从全菌中分离纯化出保护性抗原的难度较大, 方法繁琐。本实验室在中国第一个提交了 HP-NAP 的编码基因序列, Gnebank 登录号 AY366361, 并构建了由大肠杆菌 *E. coli* TB1 表达重组蛋白 rMBP-NAP 的方法, rMBP-NAP 蛋白的分子量约为 59KD, 为大分子蛋白抗原, 该蛋白由 MBP (麦芽糖结合蛋白) 和 NAP (幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白) 两种蛋白融合而成, 具体制备方法见专利 CN201010177875.0。

[0003] Enzyme-linked immunoassay, 简称 ELISA, 是利用抗原抗体之间专一性键结之特性, 对检体进行检测, 主要以夹心法 (sandwich)、间接法 (indirect)、以及竞争法 (Competitive) 三种为主。

[0004] 其中双抗体夹心法基本工作原理是: 利用连接于固相载体上的抗体和酶标抗体分别与样品中被检测抗原分子上两个抗原决定簇结合, 形成固相抗体抗原酶标抗体免疫复合物。由于反应系统中固相抗体和酶标抗体的量相对于待测抗原是过量的, 因此复合物的形成量与待测抗原的含量成正比 (在方法可检测范围内)。测定复合物中的酶作用于加入的底物后生成的有色物质质量 (OD 值), 即可确定待测抗原含量。若固相载体上的抗体和酶标抗体分别与样品中被检测抗原分子上两个不同的抗原决定簇结合, 则属于双位点夹心法。

[0005] 双抗体夹心法中, 传统的双多抗夹心法 (A 法) 所需检测抗体和固相载体包被抗体都是多抗, 制备简单, 在一定范围内检测灵敏度高, 信号显示强, 很难避免钩状效应, 其主要问题在于: 固相载体上的抗体和检测抗体都为针对完整抗原所有抗原结合位点多克隆抗体, 抗原浓度比较低的时候, 固相支持物上的抗体几乎跟抗原上所有位点结合, 结合力强, 空余位点少, 检测抗体与抗原位点少, 结合力弱, 只要固相支持物上的抗体未与抗原结合饱和, 抗原量与最后信号显示部呈线性关系; 随着抗原量的增加, 固相支持物上的抗体与抗原结合饱和, 空余位点越来越多, 检测抗体与抗原的空余位点结合, 信号显示与实际抗原增长呈几何倍数增长, 同样不呈线性关系; 随着抗原量的增加, 固相载体上的抗体与每个抗原的结合位点很少, 结合力很弱, 而过量的检测抗体与其结合位点增多, 结合力增强, 因为抗原抗体结合本来就是一个动态可逆的反应过程, 一旦从固相载体上抗体与抗原解离下来的时候, 位点立即被检测抗体结合, 形成抗原抗体复合物沉淀, 在洗涤过程中被洗掉, 随着抗原量的增加, 而信号反而降低, 就是所谓的钩状效应。此时反应后显色的吸光值 (位于抗原过剩带上) 与标准曲线 (位于抗体过剩带上) 某一抗原浓度的吸光值相同, 如按常法测读, 所得结果将低于实际的含量, 因为标准曲线到达高峰后呈钩状弯落。钩状效应严重时, 反应甚

至可不显色而出现假阴性结果。

[0006] 而用高亲和力的单克隆抗体对(B法)即检测抗体和固相载体包被抗体都用单克隆抗体,生产此类试剂盒可削弱钩状效应,由于固相载体上的抗体和检测抗体结合的不是相同的位点,所以不形成竞争关系,一般情况下不会形成钩状效应,但是单克隆抗体制备周期长,成本高,特别是高亲和力的配对抗体更是不容易得到,同时,由于固相载体上抗体和检测抗体都是单位点与抗原结合,所以结合力弱,信号显示值低,敏感性差,稳定性也不好。

发明内容

[0007] 本发明克服了现有技术的不足,提供了一种ELISA检测融合蛋白rMBP-NAP的方法,制备方法简单、成本低、周期短,且精密度、特异性好。

[0008] 为达到上述目的,本发明采用的技术方案为:

一种ELISA检测融合蛋白rMBP-NAP的方法,包括以下步骤:

1)包被:将100u1被包被缓冲液稀释至500ng/mL的兔抗幽门螺杆菌NAP多抗,包被至固体载体如酶标板,用洗涤缓冲液洗涤;

2)封闭:再加封闭液以封闭,孵育后洗涤

3)加样:分别加入100u1工作浓度(15.625-1000ng/mL、2倍倍比稀释的梯度)的rMBP-NAP抗原标准品和待测样品,孵育后洗涤

4)分别加入稀释至50ng/mL的小鼠MBP单抗100u1,孵育后洗涤

5)分别加入100u1辣根过氧化物酶HRP标记的羊抗小鼠IgG抗体,孵育后洗涤

6)加入底物显色,并于450nm波长处测定吸光值OD

7)以步骤3中一系列不同稀释度的rMBP-NAP标准品,制标准曲线,计算样品中rMBP-NAP的含量。

[0009] 使用本法ELISA检测时,通常另设空白对照/阴性对照。显色步骤可用商业化的TMB(四甲基联苯胺)底物,显色液可由A液和B液(TMB)按1:1比例配制,先加A液,再加B液,避光显色5-10 min,用浓硫酸终止反应。

[0010] 所述兔抗幽门螺杆菌NAP多抗可由含NAP特异片段的抗原免疫兔制得,如用rMBP-NAP免疫,然后再用亲和层析纯化,亲和配体可使用加标签的NAP抗原,如NAP-GST融合蛋白,该蛋白是在NAP上加了GST标签,一种构建方法可参见论文:Long M, Luo J, Li Y, et al. Detection and evaluation of antibodies against neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* in patients with gastric cancer[J]. World journal of gastroenterology: WJG, 2009, 15(19): 2381.。以NAP-GST融合蛋白为配体的亲和层析,层析介质的基质可为常用的Sephacrose 4B,层析上样前,可使用磷酸盐PBS缓冲液(缓冲对为 H_2PO_4^- - HPO_4^{2-})平衡层析柱,PBS浓度可为10 mM,该缓冲液中NaCl浓度可为137mM,pH可为7.4;上完样,在洗脱前,优选使用PBS缓冲液(缓冲对为 H_2PO_4^- - HPO_4^{2-})平衡层析柱,PBS浓度可为10 mM,该缓冲液中NaCl浓度较高,可为500mM,pH可为7.4;优选使用甘氨酸-HCl缓冲液将兔抗幽门螺杆菌NAP多抗洗脱,该缓冲液的pH可为2.5,浓度可为0.1 mol/L。

[0011] 所述步骤1-5的洗涤,优选使用常用的含吐温20的PBST缓冲液,其磷酸盐(缓冲对为 H_2PO_4^- - HPO_4^{2-})浓度可为0.15 mol/L,吐温20的质量分数可为0.05%,pH可调至7.4;

所述步骤 4 或 5 的稀释液亦可用如前所述的 PBST 缓冲液。所述封闭液优选在所述 PBST 缓冲液中另加入牛血清白蛋白 BSA, BSA 质量体积分数可为 2-5%。

[0012] 所述步骤 2、3、4 或 5 中孵育的条件优选为 37 °C, 优选孵育 1h。

[0013] 所述包被缓冲液可为碳酸盐缓冲液(缓冲对为 HCO_3^- - CO_3^{2-}), 碳酸盐浓度可为 0.05mol/L, pH 可为 9.6; 包被过程可采用在 4 °C 放置 24h 或过夜。

[0014] 所述样品或标准品可预先用 PBS 或 PBST 缓冲液稀释。

[0015] 本发明的积极效果为:

本发明的鼠 MBP 单克隆抗体可与 rMBP-NAP 蛋白中 MBP 上的表位(epitope) 结合, 兔 NAP 多克隆抗体可以与 rMBP-NAP 蛋白中 NAP 上的表位(epitope) 结合, 尤其是经 NAP-GST 亲和层析纯化抗体, 纯度超过 90%、效价达到 1:12800, 可高特异地结合 rMBP-NAP 抗原, 这样, 通过 1 个单抗、1 个多抗即可实现“夹心”; 比传统双多抗夹心法(A 法) 线性好, 无标准曲线的钩状效应; 与双单抗的夹心法(B 法) 相比制备方法简单、成本低、周期短。

[0016] 通过使用商品化的酶标二抗的夹心间接 ELISA 法, 避免了制备酶标抗体的麻烦, 增加了灵敏度, 在测定时也无需经过特殊处理, 简便快捷、灵敏、特异性好。

[0017] 另外, 在本发明的工作浓度下, 还可很好地对 rMBP-NAP 进行定量分析: 批内变异系数小于 10%, 批间变异系数均小于 15%; 加入结构类似的干扰物 NAP-GST 后, OD 值并没有升高, T 检验证明没有发生显著差异; 回收率也在 85-115% 之间。

具体实施方式

[0018] 部分下文所用试剂(其他试剂或仪器均为市售或本领域常用):

(1)、PBS 缓冲液:

在 800 mL 双蒸水中溶解 NaCl 8 g, KCl 0.2 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.63 g 和 KH_2PO_4 0.24 g, 搅拌均匀后, 调节 pH 值至 7.4, 再加水定容至 1000 mL, 高压蒸气灭菌, 4°C 保存。

[0019] 除非另有指明, 以下文中 PBS 缓冲液均指此磷酸盐浓度 10mM、NaCl 浓度 137mM 的溶液。

[0020] (2)、包被缓冲液: 称取 Na_2CO_3 1.59 克, NaHCO_3 2.94 克, 加入蒸馏水, 调整 pH 值到 9.6, 充分溶解后, 定容至 1L。然后用 0.22 μm 微孔滤器除菌, 4°C 保存。

[0021] (3)、洗涤缓冲液: 称取 KH_2PO_4 0.2 克, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 克, NaCl 8.0 克, KCl 0.2 克, Tween-20 0.5mL, 加入蒸馏水, 调整 pH 值到 7.4, 充分溶解后, 定容至 1L, 室温保存。

[0022] (4)、PBST 缓冲液: 将吐温 20 加入到 (1) 所制 PBS 缓冲液中, 吐温 20 的体积分数为 0.05%

(5) 封闭液(含 5%BSA 的 PBST 缓冲液): 称取 0.25g BSA, 溶解在 5 mL (4) 所制 PBST 缓冲液中。存放于 4°C, 放至室温后使用, 现用现配。

[0023] (6) 显色液: 显色液由 A 液和 B 液按 1:1 比例配制, 4°C 保存, 现用现配。

[0024] A 液配方: 称取柠檬酸钠(含 1 分子水, 分子量 210.14) 约 3.15 g 溶于 150 mL 双蒸水中, 即 0.1 mol 柠檬酸; 再称取称醋酸钠(含 3 个结晶水) 11.56 g 或者无水醋酸钠 6.9725 g 加双蒸水至 850 mL 即 0.1 mol 醋酸钠; 混合以上两种溶液 pH = 5.0; 称取非那汀 0.08 g 加少许(约 30 mL) 双蒸水加热至完全溶解, 加入前两种溶液的混合液中; 再加入 0.5 g 过氧化脲, 混匀即可。

[0025] B液配方:称取 TMB (四甲基联苯胺)1.27 g 加入到 500 mL 甲醇中,加热溶解,再加入 500 mL 丙三醇即可。

[0026] (7) 终止液:蒸馏水 178.3 mL,逐滴加入浓硫酸 (98%) 21.7 mL,室温保存

(8) 洗脱液:0.1 mol/L 甘氨酸-HCl, pH 2.5

(9) 弗式完全佐剂 (CFA)、弗式不完全佐剂 (IFA) 购自 Sigma 公司

(10) 融合蛋白 NAP-GST 本实验室制备

兔抗 NAP 多克隆抗体的制备及验证:

一、主要动物和免疫原

动物:成年健康雄性新西兰大白兔,购于河南省实验动物中心

免疫原:融合蛋白 rMBP-NAP

二、免疫、兔抗 NAP 多克隆抗血清的制备

免疫方式为后颈部皮下注射,每次免疫原用量为 0.5 mg/只,0.5 mg 免疫原 (rMBP-NAP) 溶解在 500 μ l PBS (10mM、pH 7.4、含 137mM NaCl;具体配制方法及配方见前面描述) 缓冲液中。首次免疫时与 0.5 mL 弗氏完全佐剂 CFA 混合 (1 : 1, v/v); 免疫后第 2 周和第 6 周用不完全弗氏佐剂 (IFA) 进行加强免疫,免疫剂量相同。最后一次免疫 2 周后收集血,然后收集血清。

[0027] 三、纯化

1、制备 NAP-GST-Sepharose 4B 亲和介质

将 NAP-GST 蛋白与 CNBr 激活的 Sepharose 4B 的交联,经检测偶联效果良好,基本上 90% 以上的蛋白交联到了载体柱上。

[0028] 2、NAP-GST-Sepharose 4B 亲和层析

1) 将前述收集到的抗血清 37 $^{\circ}$ C 放置 1 个小时,再经过 4 $^{\circ}$ C 过夜处理,然后按 40mL 血清加 5M 的 NaCl 4 mL,8000 rpm 离心 10min,取上清准备过柱

2) 预先用 10 mM 的 PBS 缓冲液 (pH 7.4、含 137mM NaCl;具体配制方法及配方见前面描述) 平衡 NAP-GST-Sepharose 4B 柱子

3) 血清过柱,流速 1 mL/min

4) 用 10 mM 的 PBS 缓冲液 (pH 7.4、含 500mM NaCl) 洗涤柱子,流速 1mL/min,洗 20 个柱体积

5) 洗脱,用 0.1 mol/L、pH 2.5 的甘氨酸-HCl 洗脱靶抗体,控制流出速度为 1 mL/min。每管收集洗脱液 1 mL,用 100 μ L 1M Tris 碱中和。

[0029] 3、纯化产物进行 SDS-PAGE 电泳,检测抗体的纯度

SDS-PAGE 电泳结果表明,经过纯化的抗体只在 50KD 附近有一个条带,没有其他杂带,抗体的纯度超过 90%。

[0030] 四、效价验证

采用间接 ELISA 方法检测多克隆抗体效价,具体操作如下

a 用包被缓冲液 (pH9.6、0.05M 碳酸盐缓冲液) 稀释 rMBP-NAP 至浓度为 10ng/mL,另设空白对照,阴性血清对照,包被酶标板,每孔 100 μ l。4 $^{\circ}$ C 过夜,弃去液体,甩干,每孔加满 PBST 洗涤液,震荡 3min,甩去洗涤液,用吸水纸拍干。如此重复 3 次,拍干;

b 用另加有 5%BSA 的 PBST 溶液封闭酶标板,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,洗涤 3 次;

c 在包被孔中依次分别加入 1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600、1:51200、1:102400 稀释的多克隆抗体样品,每孔 100 μ l,37℃孵育 1h,洗涤 3 次;

d 在每一包被孔中加入 HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体 (PBST 缓冲液稀释至 1mg/mL),37℃孵育 1h,洗涤 3 次;

e 每孔先加 A 号显色剂 50 μ L,再加入 B 号显色剂 50 μ L,轻轻震荡混匀,37℃显色 5min,用 2mol/L H_2SO_4 终止反应(此时蓝色立转黄色),酶标仪 450nm 读取吸光度(OD)值;测定应在加完终止液 15 分钟内进行。

[0031] 结果显示稀释度在 1:12800 时,P/N (阳性血清 / 阴性血清)比值最接近 2.1,可知在抗原 10ng/mL 时,抗体效价达到 1:12800。

[0032] ELISA 检测融合蛋白 rMBP-NAP 的方法

实施例 1:

1) 包被:用包被缓冲液 (pH9.6、0.05M 碳酸盐缓冲液) 将兔抗幽门螺杆菌 NAP 多抗稀释至 500ng/mL,以 100 μ l 每孔加入到酶标板,另设空白对照,4℃过夜,弃去液体,甩干,每孔加满 PBST 洗涤液,震荡 5 分钟,甩去洗涤液,如此重复 3 次,用吸水纸拍干。另设空白对照、阴性血清对照。

[0033] 2) 封闭:用封闭液封闭酶标板,37℃孵育 1h,洗涤 3 次,拍干

3) 加样:分别加入 100 μ l 工作浓度 (15.625–1000ng/mL、2 倍倍比稀释的梯度) 的 rMBP-NAP 抗原标准品和待测样品,每个样品做复孔,37℃孵育 1h,洗涤 3 次,拍干

4) 用 0.15 mol/L、pH 7.4 PBST 缓冲液将小鼠 MBP 单抗稀释至 50ng/mL,每孔分别加入 100 μ l,

5) 在每一包被孔中加入 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体 100 μ L,

6) 每孔先加 A 号显色液 50 μ L,再加入 B 号显色剂 50 μ L,震荡混匀后,37℃避光显色 5–10 min,用 2 mol/L H_2SO_4 终止反应(终止后蓝色立转黄色),酶标仪 450 nm 读取吸光度(OD)值;测定应在加完终止液 15 分钟内进行。

[0034] 7) 制标准曲线,计算样品中 rMBP-NAP 的含量。

[0035] 实施例 2:

操作步骤如上,封闭液改用含 2%BSA 的 PBST 缓冲液,其他操作、条件如上。

[0036] ELISA 检测融合蛋白 rMBP-NAP 的方法的考核(以实施例 1 的方法为例)

(1) 精密度

精密度通常用批内和批间的变异系数(CV%)来表示,rMBP-NAP 的含量在标准曲线范围内选择了 250ng/mL、62.5ng/mL 和 15.625ng/mL 三个浓度,来验证建立的 ELISA 方法的批内和批间精密度,结果如表 1-4 和表 1-5 显示:批内变异系数均在 5.9%–7.73% 范围内,均小于 10%,批间变异系数在 6.2%–7.85% 范围内,均小于 15%,说明建立的方法重现性良好。

[0037] 表 1-4 批内精密度测定结果

理论值 (ng/mL)	平均值 (ng/mL)	标准差SD	变异系数 CV (%)	平均变异系 数 CV (%)
250	260.73	15.39	5.90	6.95
62.5	64.15	4.96	7.73	
15.63	17.28	1.25	7.23	

表 1-5 批间精密度测定结果

理论值 (ng/mL)	平均值 (ng/mL)	标准差SD	变异系数 CV (%)	平均变异系 数 CV (%)
250	257.22	17.33	6.73	6.93
62.5	64.80	4.02	6.20	
15.63	16.39	1.29	7.85	

(2) 特异性

其中 6 个样本孔,加入 100 μ L rMBP-NAP (终浓度为 61.25 ng/mL),另设 6 个对照孔,加入 1000 μ L 稀释的 rMBP-NAP (终浓度为 61.25 ng/mL)和等摩尔的 NAP-GST (终浓度为也 61.25 ng/mL),结果如下表 1-6,表明加入结构类似干扰物 NAP-GST 后,OD 值没有发生显著性差异,说明建立的 ELISA 方法特异性强,能够专一测定 rMBP-NAP。

[0038] 表 1-6 特异性测定结果

	样本1	样本2	样本3	样本4	样本5	样本6	平 均	P值
	OD值	OD值	OD值	OD值	OD值	OD值	OD值	
rMBP-NAP								
61.25	0.607	0.548	0.535	0.456	0.538	0.536	0.537	
ng/mL								0.84
加入等摩 尔								
NAP-GST	0.54	0.529	0.48	0.51	0.49	0.46	0.50	

(3) 回收率

样品 1,2,3 中 rMBP-NAP 的含量分别为 250ng/mL、62.5ng/mL、15.625ng/mL, 每个样品设 6 个孔, 根据标准曲线测出平均值, 算出回收率如下表 1-7 所示, 分别为 104%、103%、111%。

[0039] 表 1-7 方法回收率的测定结果

样品序号	理论值 (ng/mL)	平均值 (ng/mL)	回收率 (%)
1	250	260.73	104
2	62.5	64.15	103
3	15.63	17.28	111

专利名称(译)	ELISA检测融合蛋白rMBP-NAP的方法		
公开(公告)号	CN103558386A	公开(公告)日	2014-02-05
申请号	CN201310368917.2	申请日	2013-08-22
[标]申请(专利权)人(译)	郑州大学		
申请(专利权)人(译)	郑州大学		
当前申请(专利权)人(译)	郑州大学		
[标]发明人	康巧珍 汲振余 刘鑫 李国栋 王婷 陈娇 傅国		
发明人	康巧珍 汲振余 刘鑫 李国栋 王婷 陈娇 傅国		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N21/31		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/558 G01N33/56911 G01N33/6803 G01N2333/20		
其他公开文献	CN103558386B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种ELISA检测融合蛋白rMBP-NAP的方法，包括包被、封闭、加样、加鼠MBP单抗、加酶标二抗、加入底物显色。本发明使用兔NAP多克隆抗体包被，尤其是经NAP-GST亲和层析纯化抗体，通过使用商品化的酶标二抗的夹心间接ELISA法，避免了制备酶标抗体的麻烦，增加了灵敏度，在测定时无需经过特殊处理，简便快捷、灵敏、特异性好。另外，在本发明的工作浓度下，还可很好地对rMBP-NAP进行定量分析：批内变异系数小于10%，批间变异系数均小于15%；加入结构类似的干扰物NAP-GST后，OD值并没有升高，T检验证明没有发生显著差异；回收率也在85-115%之间。

理论值 (ng/mL)	平均值 (ng/mL)	标准差SD	变异系数 CV (%)	平均变异系数 CV (%)
250	260.73	15.39	5.90	6.95
62.5	64.15	4.96	7.73	
15.63	17.28	1.25	7.23	