



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109187958 A

(43)申请公布日 2019.01.11

(21)申请号 201811064688.4

(22)申请日 2018.09.12

(71)申请人 福建中医药大学附属人民医院(福建省人民医院)

地址 350004 福建省福州市817中路602号

(72)发明人 周浩

(74)专利代理机构 北京盛凡智荣知识产权代理有限公司 11616

代理人 刘晓晖

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/553(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

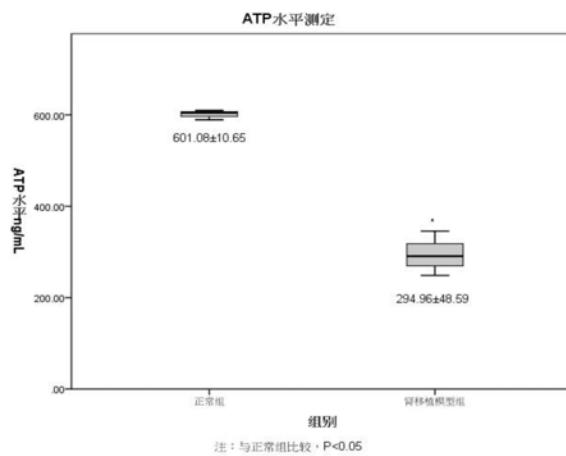
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种大鼠CD4抗体包被磁珠及其制备方法和应用以及含该磁珠的试剂盒

(57)摘要

本发明一种大鼠CD4抗体包被磁珠及其制备方法和应用以及含该磁珠的试剂盒。磁珠的制备方法,将磁珠通过不同试剂多次洗涤并去上清液制成。通过上述制备方法可制得的大鼠CD4抗体包被磁珠。所制得的大鼠CD4抗体包被磁珠可以用于试剂盒内用于检测大鼠肾移植后的免疫排斥反应中的应用。较之现有技术而言,本发明的优点在于:大鼠CD4抗体包被磁珠的制备方法,通过上述方法制成的大鼠CD4抗体包被磁珠结合ImmuKnow™-Cylex®免疫细胞功能测定试剂盒,能够用于检测大鼠肾移植后的免疫排斥反应。



1. 一种大鼠CD4抗体包被磁珠的制备方法,其特征在于:所述方法包括以下步骤:

步骤1:将磁珠通过C1试剂洗涤,之后放在磁铁上吸附后去上清液;

步骤2:将步骤1预处理的磁珠中加入抗体、C1试剂、C2试剂后,在25-37℃条件下离心旋转16-24h;

步骤3:将步骤2处理的磁珠通过磁铁沉淀,后通过HB试剂进行清洗;

步骤4:将步骤3处理的磁珠通过磁铁沉淀后去上清,后通过LB试剂进行清洗;

步骤5:将步骤4处理的磁珠通过磁铁沉淀后去上清,后通过SB试剂进行清洗;

步骤6:将步骤5处理的磁珠再加入SB试剂,离心处理,之后放置于磁铁吸附后去除上清液,完成大鼠CD4抗体包被磁珠的制备;

其中,C1试剂为60-100%丙烯醛缓冲液,C2试剂为PBS缓冲液;所述HB试剂、LB试剂、SB试剂均为0.01%-0.1%Tween20。

2. 根据权利要求1所述的大鼠CD4抗体包被磁珠的制备方法,其特征在于:它还包括步骤7:将步骤6处理的磁珠中加入SB试剂,在2-8℃下储存。

3. 根据权利要求1所述的大鼠CD4抗体包被磁珠的制备方法,其特征在于:步骤2中,磁珠和抗体、C1试剂、C2试剂的重量体积比为1mg:15-20ul:20-30ul:40-60ul。

4. 根据权利要求1所述的大鼠CD4抗体包被磁珠的制备方法,其特征在于:步骤3中,磁珠和HB试剂的重量体积比为1mg:30-40ul。

5. 根据权利要求1所述的大鼠CD4抗体包被磁珠的制备方法,其特征在于:步骤4中,磁珠和LB试剂的重量体积比为1mg:30-40ul。

6. 根据权利要求1所述的大鼠CD4抗体包被磁珠的制备方法,其特征在于:步骤5中,磁珠和SB试剂的重量体积比为1mg:30-40ul。

7. 根据权利要求1所述的大鼠CD4抗体包被磁珠的制备方法,其特征在于:所述抗体为兔抗鼠的抗体。

8. 根据权利要求1-7中任意一项所述制备方法制得的大鼠CD4抗体包被磁珠。

9. 一种试剂盒,其特征在于:所述试剂盒包括权利要求8所述的大鼠CD4抗体包被磁珠。

10. 根据权利要求8所述大鼠CD4抗体包被磁珠在检测大鼠肾移植后的免疫排斥反应中的应用。

# 一种大鼠CD4抗体包被磁珠及其制备方法和应用以及含该磁珠的试剂盒

## 技术领域

[0001] 本发明涉及一种大鼠CD4抗体包被磁珠及其制备方法和应用以及含该磁珠的试剂盒。

## 背景技术

[0002] 现有市面上,还没有一种试剂盒,能够用来检测大鼠肾移植后的免疫排斥反应。

## 发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种大鼠CD4抗体包被磁珠及其制备方法和应用以及含该磁珠的试剂盒。

[0004] 本发明的目的通过如下技术方案实现:

[0005] 一种大鼠CD4抗体包被磁珠的制备方法,步骤1:将磁珠通过C1试剂洗涤,之后放在磁铁上吸附后去上清液;

[0006] 步骤2:将步骤1预处理的磁珠中加入抗体、C1试剂、C2试剂后,在室温条件下离心旋转16-24h;

[0007] 步骤3:将步骤2处理的磁珠通过磁铁沉淀,后通过HB试剂进行清洗;

[0008] 步骤4:将步骤3处理的磁珠通过磁铁沉淀后去上清,后通过LB试剂进行清洗;

[0009] 步骤5:将步骤4处理的磁珠通过磁铁沉淀后去上清,后通过SB试剂进行清洗;该过程可根据抗体渗漏情况重复多次;

[0010] 步骤6:将步骤5处理的磁珠再加入SB试剂,离心处理,之后放置于磁铁吸附后去除上清液,完成大鼠CD4抗体包被磁珠的制备;

[0011] 其中,C1试剂为60-100%丙烯醛缓冲液,C2试剂为PBS缓冲液。

[0012] 它还包括步骤7:将步骤6处理的磁珠中加入SB试剂,在2-8°C下储存。

[0013] 步骤7中还包括防腐剂叠氮化钠。

[0014] 进一步的,步骤2中,磁珠和抗体、C1试剂、C2试剂的重量体积比为1mg:20ul:30ul:50ul。

[0015] 进一步的,步骤3中,磁珠和HB试剂的重量体积比为1mg:40ul。

[0016] 进一步的,步骤4中,磁珠和LB试剂的重量体积比为1mg:40ul。

[0017] 进一步的,步骤5中,磁珠和SB试剂的重量体积比为1mg:40ul。

[0018] 所述HB试剂、LB试剂、SB试剂均为0.01%-0.1%Tween 20。

[0019] 所述磁珠为环氧树脂磁珠。

[0020] 所述抗体为兔抗鼠的抗体。

[0021] 一种通过上述制备方法制得的大鼠CD4抗体包被磁珠。

[0022] 一种试剂盒,所述试剂盒包括大鼠CD4抗体包被磁珠的制备方法所制得的大鼠CD4抗体包被磁珠。

[0023] 大鼠CD4抗体包被磁珠在检测大鼠肾移植后的免疫排斥反应中的应用。

[0024] 较之现有技术而言,本发明的优点在于:大鼠CD4抗体包被磁珠的制备方法,通过上述方法制成的大鼠CD4抗体包被磁珠结合ImmunoKnowTM-Cytolex®免疫细胞功能测定试剂盒,能够用于检测大鼠肾移植后的免疫排斥反应。

## 附图说明

[0025] 图1正常大鼠和肾移植大鼠ATP水平测定对比图。

## 具体实施方式

[0026] 下面结合说明书附图和实施例对本发明内容进行详细说明:

[0027] 实施例1:

[0028] 一种大鼠CD4抗体包被磁珠的制备方法,所述方法包括以下步骤:

[0029] 步骤1:用适量75%丙烯醛缓冲液试剂洗环氧树脂磁珠,涡旋。洗完后放在磁铁上吸附1min,然后去上清。该过程中,只要保证丙烯醛缓冲液的量能够清洗环氧树脂磁珠即可,即便过量也无妨。

[0030] 步骤2:将步骤1预处理的环氧树脂磁珠中加入丙烯醛缓冲液、PBS缓冲液后,在37℃室温条件下离心旋转16h;其中各组分的占比如下:5mg环氧树脂磁珠、100ul兔抗鼠抗体、150ul丙烯醛缓冲液、250ul PBS缓冲液。

[0031] 步骤3:将步骤2处理的环氧树脂磁珠通过磁铁沉淀1min,后通过HB试剂进行清洗;5mg的环氧树脂磁珠用200ul 0.05%Tween 20试剂进行清洗。

[0032] 步骤4:将步骤3处理的环氧树脂磁珠通过磁铁沉淀1min后去上清,后通过LB试剂进行清洗;5mg的环氧树脂磁珠用200ul 0.05%Tween 20进行清洗。

[0033] 步骤5:将步骤4处理的环氧树脂磁珠通过磁铁沉淀1min后去上清,后通过SB试剂进行清洗;5mg的环氧树脂磁珠用200ul 0.05%Tween 20试剂进行清洗。

[0034] 步骤6:将步骤5处理的环氧树脂磁珠再加入0.05%Tween 20试剂,离心处理,之后放置于磁铁吸附后去除上清液,完成大鼠CD4抗体包被磁珠的制备。

[0035] 步骤7:将步骤6处理的磁珠中加入0.05%Tween 20试剂,在2-8℃下储存。其中,按100ul SB试剂/mg磁珠的配比关系,添加0.05%Tween 20试剂。

[0036] 实施例2

[0037] 一种试剂盒,所述试剂盒包括实施例1中大鼠CD4抗体包被磁珠的制备方法所制得的大鼠CD4抗体包被磁珠。

[0038] 实施例3

[0039] 对发明制得的大鼠CD4抗体包被磁珠进行ATP检测,具体实验过程如下:

[0040] 1. 试验第一部分:细胞刺激。

[0041] 预先从冰箱取出试剂盒中相关组分并平衡至室温。

[0042] 1.1小心地颠倒混匀质控对照和大鼠CD4全血样本,重复多次以确保血细胞分布均匀。:

[0043] 1.2用样本稀释液按1:3稀释质控和全血样本(例如:250ul全血+750ul样本稀释液)。

- [0044] 1.3稀释后,每个样本使用一条8孔培养板板条,按照工作表组装培养板。
- [0045] 1.4将25ul样本稀释液加入每个板条的前4个孔中,作为非刺激孔。
- [0046] 1.5将25ul样本稀释液加入每个板条的其余4个孔中,作为刺激孔。
- [0047] 1.6将100ul已稀释的质控样本加入板条1的各孔中。
- [0048] 1.7根据工作表,将100ul已稀释的待测样本加入相应板条的各孔中。
- [0049] 1.8盖上培养板盖,在平板振荡器上震荡30秒。
- [0050] 1.9将带盖的培养板在37℃/5%CO<sub>2</sub>/加湿处理的培养箱中孵育16-18小时。
- [0051] 2.实验第2部分:CD4细胞选择和ATP释放。
- [0052] 预先从冰箱取出试剂盒中相关组分并平衡至室温。
- [0053] 2.1从培养相中拿出培养板,置于平板振荡器上震荡3分钟。
- [0054] 2.2小心颠倒CD4磁珠溶液试剂瓶若干次以充分悬浮磁珠;用单通道移液器或连续加样移液器向各孔分别加入50ul磁珠。磁珠在吸取前应充分悬浮以确保各孔加入量一致。
- [0055] 注意:因为磁珠不易在储液槽中充分悬浮,请不要用多通道微量移液器操作这一步骤。
- [0056] 2.3盖上培养板盖,在平板振荡器上震荡30秒,室温下静置(18-28℃)孵育15分钟。震荡培养板30秒,室温(18-28℃)再次静置孵育15分钟。最后,再次震荡培养板30秒以重新悬浮磁珠。
- [0057] 2.4从培养板上取出板条,放在组装好的磁座上,等待1-2分钟使磁珠聚集在孔的一侧;按以下步骤从全血中分离CD4细胞。
- [0058] 2.5用连接到负压抽吸真空泵系统的8通道吸头伸入微孔吸除磁珠以外的含红细胞培养液。注意轻柔操作,避免吸走磁珠。
- [0059] 2.6洗涤板条三次,以清除残余的未结合的游离细胞和孔中的其他干扰物质。
- [0060] 注意:加入洗涤液时,需垂直提持多通道微量移液器,避免移液器吸头触碰微孔内壁上的磁珠。
- [0061] 洗涤#1:向各孔加入200ul洗涤液,等待一分钟,然后吸走洗涤液。
- [0062] 洗涤#2:向各孔加入200ul洗涤液,检查微孔内壁,若有凝血斑,则用微量移液器吸头将其移除。等待1分钟,然后吸走洗涤液。
- [0063] 洗涤#3:向各孔加入200ul洗涤液,从磁座上移去板条架,将板条放在平板振荡器上振荡1分钟,然后将板条架放在磁座上。等待1分钟,待磁珠聚集在孔的一侧,然后吸走洗涤液。
- [0064] 2.7向各孔加入200ul裂解试剂。
- [0065] 2.8将板条架从磁座上移开,在平板振荡器上振荡5分钟。
- [0066] 2.9将板条架放在磁座上,等待1-2分钟。
- [0067] 2.10继续进行试验第3部分。
- [0068] 注意:如果不能立即(4小时内)进行试验第3部分,应将板条冷冻保存:将板条从磁座板条架上取下来,放在培养板框架上;密封板条,盖上培养板盖,-20℃冷冻保存。冷冻的板条至少在1个月内保持稳定。若要继续进行后续检测试验,从冰箱中取出培养板,将其平衡至室温(18-28℃),把板条放入磁座板条架上,然后重复上述2.8和2.9步骤。
- [0069] 3.试验第3部分:ATP测量。

[0070] 3.1参照试验工作表组装测量板:测量板包括质控测量条,大鼠CD4样本测量条,校准品测量条。

[0071] 3.2依据工作表,用多道微量移液器从培养板各孔取出50ul裂解产物,加入测量板条相应孔中;将裂解产物加入每一板条之前,需更换新的移液器吸头。

[0072] 3.3依照工作表,从各浓度水平ATP校准品中各取出50ul分别加入测量板的相应孔(通常做2个复孔)

[0073] 3.4发光试剂:使用前,轻轻颠倒使其充分混匀。用多道微量移液器取150ul 发光试剂加至测量板的各孔中;将测量板置于平板振荡器上振荡30秒,以确保充分混合。在加入发光试剂后3-10分钟内读取相对发光强度(RLU)。最终结果参见图1,正常大鼠检测发现ATP结果为 $601.08 \pm 10.65$ ng/mL,而肾移植之后的大鼠ATP结果为 $294.96 \pm 48.59$ ng/mL,与正常对照组相比 $P < 0.05$ ,差异具有统计学意义。本发明制备的大鼠CD4抗体包被磁珠能够用于检测大鼠肾移植后的免疫排斥反应。

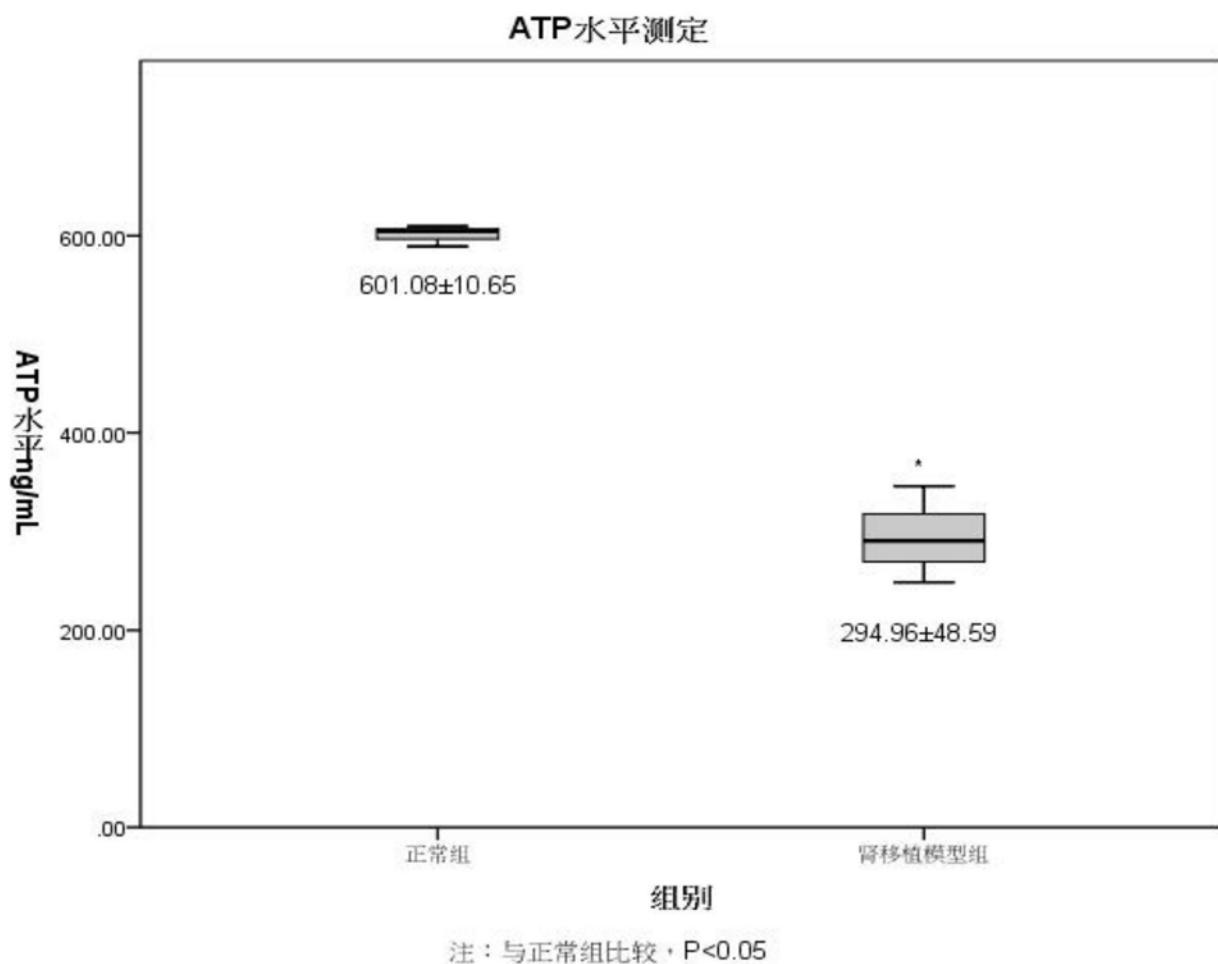


图1

专利名称(译)	一种大鼠CD4抗体包被磁珠及其制备方法和应用以及含该磁珠的试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN109187958A</a>	公开(公告)日	2019-01-11
申请号	CN201811064688.4	申请日	2018-09-12
[标]申请(专利权)人(译)	福建中医药大学附属人民医院(福建省人民医院)		
申请(专利权)人(译)	福建中医药大学附属人民医院(福建省人民医院)		
当前申请(专利权)人(译)	福建中医药大学附属人民医院(福建省人民医院)		
[标]发明人	周浩		
发明人	周浩		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/553 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N33/531 G01N33/553		
代理人(译)	刘晓晖		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>	<a href="#">Sipo</a>	

#### 摘要(译)

本发明一种大鼠CD4抗体包被磁珠及其制备方法和应用以及含该磁珠的试剂盒。磁珠的制备方法，将磁珠通过不同试剂多次洗涤并去上清液制成。通过上述制备方法可制得的大鼠CD4抗体包被磁珠。所制得的大鼠CD4抗体包被磁珠可以用于试剂盒内用于检测大鼠肾移植后的免疫排斥反应中的应用。较之现有技术而言，本发明的优点在于：大鼠CD4抗体包被磁珠的制备方法，通过上述方法制成的大鼠CD4抗体包被磁珠结合免疫细胞功能测定试剂盒，能够用于检测大鼠肾移植后的免疫排斥反应。

