



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109596821 A

(43)申请公布日 2019.04.09

(21)申请号 201811520028.2

(22)申请日 2018.12.12

(71)申请人 广西医科大学第一附属医院
地址 530021 广西壮族自治区南宁市双拥路6号

(72)发明人 唐安洲 王芝 易翔 周涛
赖永静 杜龙 王梦琳 夏巍
祁承林 李恒 唐杰

(74)专利代理机构 深圳新创友知识产权代理有限公司 44223
代理人 关文龙

(51)Int.Cl.
G01N 33/531(2006.01)

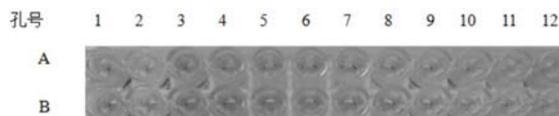
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

ELISA保证型兔抗树鼩多克隆IgG抗体的制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种ELISA保证型兔抗树鼩多克隆IgG抗体的制备方法,先制备树鼩抗原,兔免疫制备兔抗树鼩特异性二抗,再进行间接ELISA检测以验证所得抗体的效价。本发明的抗体的制备方法,提供了较为成熟的兔抗树鼩IgG抗体,可用于不同抗体变化的ELISA检测过程;本发明采用兔子制备抗树鼩抗体,可以解决市面上缺乏高敏感度抗树鼩特异性抗体的问题,解决使用抗人或者抗猴的抗体代替抗树鼩抗体存在的敏感度较低的问题。



1. 一种ELISA保证型兔抗树鼩多克隆IgG抗体的制备方法,其特征在于,先制备树鼩抗原,后免疫兔子制备兔抗树鼩特异性抗体,再进行间接ELISA检测以验证所得抗体的效价,最后通过过碘酸钠氧化法进行HRP标记。

2. 如权利要求1所述的ELISA保证型兔抗树鼩多克隆IgG抗体的制备方法,其特征在于,所述的制备树鼩抗原的步骤包括:通过股静脉抽取树鼩静脉血,得到血清约10ml,纯化得到蛋白总量约为6mg,初免剂量为1mg/只,二免、三免、四免剂量为0.5mg/只;初免抗原为蛋白抗原与等体积弗氏完全佐剂混匀乳化,二免、三免、四免抗原为蛋白抗原与等体积弗氏不完全佐剂混匀乳化。

3. 如权利要求1所述的ELISA保证型兔抗树鼩多克隆IgG抗体的制备方法,其特征在于,所述的兔免疫的方法包括:

- (1) 选用健康雌性新西兰大白兔,4月龄,2.1kg;
- (2) 一免:第1天,免疫用抗原为弗氏完全佐剂+蛋白抗原;
- (3) 二免:第21天,免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+蛋白抗原;
- (4) 三免:第35天,免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+蛋白抗原;
- (5) 三免后采血:第42天,耳静脉采血1ml,ELISA检测抗血清效价;
- (6) 四免:第49天,免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+蛋白抗原;
- (7) 四免后采血:第56天,耳静脉采血1ml,ELISA检测抗血清效价;
- (8) 终放血:第57天,ELISA检测抗血清效价达到要求,颈动脉采全血。

4. 如权利要求1所述的ELISA保证型兔抗树鼩多克隆IgG抗体的制备方法,其特征在于,所述的间接ELISA检测的步骤包括:

- a. 包被抗原:将抗原用0.05mol/l碳酸盐按0.2ug/孔包板,100u1/孔,4℃孵育过夜;
- b. 洗板:取出用0.05%Tween-20洗涤三次;
- c. 封闭:每孔加入5%脱脂奶粉100u1封闭液,37℃封闭60分钟;
- d. 洗板:取出用0.05%Tween-20洗涤三次;
- e. 加一抗:将兔子的血清分别按照1:1000稀释,然后倍比稀释,孵育1小时;
- f. 洗板:取出用0.05%Tween-20洗涤三次;
- g. 加二抗:辣根酶标记山羊抗兔IgG,1:8000稀释,孵育45min。
- h. 洗板:取出用0.05%Tween-20洗涤五次;
- i. 显色:加入底物溶液100u1/孔,反应15min,最后加入100u1终止液终止反应;
- j. 测OD值:用酶标仪在450nm波长下测定OD值。

5. 如权利要求4所述的ELISA保证型兔抗树鼩多克隆IgG抗体的制备方法,其特征在于:所述包被抗原所采用的盐酸盐的PH=9.6。

6. 如权利要求4所述的ELISA保证型兔抗树鼩多克隆IgG抗体的制备方法,其特征在于:所述的洗板频率为3分钟/次。

7. 如权利要求4所述的ELISA保证型兔抗树鼩多克隆IgG抗体的制备方法,其特征在于:所述的加一抗和加二抗的孵育温度为36.5-37.5℃。

8. 如权利要求4所述的ELISA保证型兔抗树鼩多克隆IgG抗体的制备方法,其特征在于:所述的终止液为2mol/L硫酸。

ELISA保证型兔抗树鼩多克隆IgG抗体的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及检验试剂制备领域,特别是涉及一种ELISA保证型兔抗树鼩多克隆IgG抗体的制备方法。

背景技术

[0002] 树鼩是一种生长于热带及亚热带地区的小型动物,属树鼩科,易饲养,寿命约8年。在我国,树鼩主要分布在云南、广西等地,近年来树鼩正越来越多的被科学家和生物医药领域采用。近期,中国科学院昆明动物研究所通过对树鼩全基因组、转录组及蛋白组的解析,证实了树鼩与灵长类的遗传特征接近,其在生理解剖、神经发育、及心理应激模式等方面与灵长类甚至人类之间存在高度的相似性。目前已有多项国内外研究表明,树鼩的许多病毒感染特性与人类相似,树鼩能被甲肝、乙肝、丙肝、轮状、腺、及疱疹等病毒感染。此外,研究表明,树鼩作为耐药细菌感染和败血症、心理应激和抑郁症、近视及代谢性疾病等动物模型已成功建立。由此我们可以看出,树鼩作为一种新型的与灵长类更为接近的动物正得到密切的关注。

[0003] 但是由于目前市面上缺乏树鼩特异性二抗,在某些实验研究中,需要检测树鼩在感染某种病毒如乙肝、EBV后产生的相关抗体或者蛋白水平的变化时,研究者只能通过使用适用于抗人类或者抗猴的二抗试剂代替,其敏感度欠佳。

[0004] 以上背景技术内容的公开仅用于辅助理解本发明的发明构思及技术方案,其并不必然属于本专利申请的现有技术,在没有明确的证据表明上述内容在本专利申请的申请日已经公开的情况下,上述背景技术不应当用于评价本申请的新颖性和创造性。

发明内容

[0005] 本发明目的在于提出一种ELISA保证型兔抗树鼩多克隆IgG抗体的制备方法,用以填补抗树鼩特异性抗体的技术空白。

[0006] 为此,本发明提出一种ELISA保证型兔抗树鼩多克隆IgG抗体的制备方法,具体的技术方案如下:

[0007] 一种ELISA保证型兔抗树鼩多克隆IgG抗体的制备方法,先制备树鼩抗原,后免疫兔子制备兔抗树鼩特异性抗体,再进行间接ELISA检测以验证所得抗体的效价,最后通过过碘酸钠氧化法进行HRP标记。

[0008] 优选地,所述的制备树鼩抗原的步骤包括:通过股静脉抽取树鼩静脉血,得到血清约10ml,纯化得到蛋白总量约为6mg,初免剂量为1mg/只,二免、三免、四免剂量为0.5mg/只;初免抗原为蛋白抗原与等体积弗氏完全佐剂混匀乳化,二免、三免、四免抗原为蛋白抗原与等体积弗氏不完全佐剂混匀乳化。

[0009] 优选地,所述的兔免疫的方法包括:

[0010] (1) 选用健康雌性新西兰大白兔,4月龄,2.1kg;

[0011] (2) 一免:第1天,免疫用抗原为弗氏完全佐剂+蛋白抗原;

- [0012] (3) 二免:第21天,免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+蛋白抗原;
- [0013] (4) 三免:第35天,免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+蛋白抗原;
- [0014] (5) 三免后采血:第42天,耳静脉采血1ml,ELISA检测抗血清效价;
- [0015] (6) 四免:第49天,免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+蛋白抗原;
- [0016] (7) 四免后采血:第56天,耳静脉采血1ml,ELISA检测抗血清效价;
- [0017] (8) 终放血:第57天,ELISA检测抗血清效价达到要求,颈动脉采全血。
- [0018] 优选地,所述的间接ELISA检测的步骤包括:
- [0019] a. 包被抗原:将抗原用0.05mol/l碳酸盐按0.2ug/孔包板,100ul/孔,4℃孵育过夜;
- [0020] b. 洗板:取出用0.05%Tween-20洗涤三次;
- [0021] c. 封闭:每孔加入5%脱脂奶粉100ul封闭液,37℃封闭60分钟;
- [0022] d. 洗板:取出用0.05%Tween-20洗涤三次;
- [0023] e. 加一抗:将兔子的血清分别按照1:1000稀释,然后倍比稀释,孵育1小时;
- [0024] f. 洗板:取出用0.05%Tween-20洗涤三次;
- [0025] g. 加二抗:辣根酶标记山羊抗兔IgG,1:8000稀释,孵育45min。
- [0026] h. 洗板:取出用0.05%Tween-20洗涤五次;
- [0027] i. 显色:加入底物溶液100ul/孔,反应15min,最后加入100ul终止液终止反应;
- [0028] j. 测OD值:用酶标仪在450nm波长下测定OD值。
- [0029] 优选地,所述包被抗原所采用的盐酸盐的PH=9.6。
- [0030] 优选地,所述洗板的时间为3分钟/次。
- [0031] 优选地,所述的加一抗和加二抗的孵育温度为36.5-37.5℃。
- [0032] 优选地,所述的终止液为2mol/L硫酸。
- [0033] 发明人经深入研究作出了的重大创新,与现有技术相比,主要体现在以下几方面:
- [0034] 1. 本发明的抗体的制备方法,提供了较为成熟的兔抗树鼩IgG抗体,可用于不同抗体变化的ELISA检测过程。
- [0035] 2. 本发明采用兔抗制备抗树鼩抗体,可以解决市面上缺乏高敏感度抗树鼩特异性抗体的问题,解决使用抗人或者抗猴的抗体代替抗树鼩抗体存在的敏感度较低的问题。

附图说明

- [0036] 图1:三免后抗血清ELISA检测结果;
- [0037] 图2:终放后抗血清ELISA检测结果;
- [0038] 图3:纯化抗体ELISA检测结果。

具体实施方式

[0039] 一、具体实施例

[0040] 实施例1

[0041] 一种ELISA保证型兔抗树鼩多克隆IgG抗体的制备方法,先制备树鼩抗原,后免疫兔子制备兔抗树鼩特异性抗体,再进行间接ELISA检测以验证所得抗体的效价,最后通过过碘酸钠氧化法进行HRP标记。。

[0042] 所述的制备树鼩抗原的步骤包括:通过股静脉抽取树鼩静脉血,得到血清约10ml,纯化得到蛋白总量约为6mg,初免剂量为1mg/只,二免、三免、四免剂量为0.5mg/只;初免抗原为蛋白抗原与等体积弗氏完全佐剂混匀乳化,二免、三免、四免抗原为蛋白抗原与等体积弗氏不完全佐剂混匀乳化。

[0043] 所述的兔免疫的方法包括:

[0044] (1) 选用健康雌性新西兰大白兔,4月龄,2.1kg;

[0045] (2) 一免:第1天,免疫用抗原为弗氏完全佐剂+蛋白抗原;

[0046] (3) 二免:第21天,免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+蛋白抗原;

[0047] (4) 三免:第35天,免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+蛋白抗原;

[0048] (5) 三免后采血:第42天,耳静脉采血1ml,ELISA检测抗血清效价;

[0049] (6) 四免:第49天,免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+蛋白抗原;

[0050] (7) 四免后采血:第56天,耳静脉采血1ml,ELISA检测抗血清效价;

[0051] (8) 终放血:第57天,ELISA检测抗血清效价达到要求,颈动脉采全血。

[0052] 所述的间接ELISA检测的步骤包括:

[0053] a. 包被抗原:将抗原用0.05mol/l碳酸盐(PH=9.6)按0.2ug/孔包板,100ul/孔,4℃孵育过夜;

[0054] b. 洗板:取出用0.05%Tween-20(PBST)洗涤三次,3分钟/次;

[0055] c. 封闭:每孔加入5%脱脂奶粉100ul封闭液,36.5℃封闭60分钟;

[0056] d. 洗板:取出用0.05%Tween-20(PBST)洗涤三次,3分钟/次;

[0057] e. 加一抗:将兔子的血清分别按照1:1000稀释,然后倍比稀释,37℃孵育1小时;

[0058] f. 洗板:取出用0.05%Tween-20(PBST)洗涤三次,3分钟/次;

[0059] g. 加二抗:辣根酶标记山羊抗兔IgG(H+L),1:8000稀释,36.5℃孵育45min。

[0060] h. 洗板:取出用0.05%Tween-20(PBST)洗涤五次,3分钟/次;

[0061] i. 显色:加入底物溶液(TMB)100ul/孔,反应15min,最后加入100ul2mol/L硫酸终止反应;

[0062] j. 测OD值:用酶标仪(科华ST-360)在450nm波长下测定OD值。

[0063] 实施例2

[0064] 一种ELISA保证型兔抗树鼩多克隆IgG抗体的制备方法,先制备树鼩抗原,后免疫兔子制备兔抗树鼩特异性抗体,再进行间接ELISA检测以验证所得抗体的效价,最后通过过碘酸钠氧化法进行HRP标记。。

[0065] 所述的制备树鼩抗原的步骤包括:通过股静脉抽取树鼩静脉血,得到血清约10ml,纯化得到蛋白总量约为6mg,初免剂量为1mg/只,二免、三免、四免剂量为0.5mg/只;初免抗原为蛋白抗原与等体积弗氏完全佐剂混匀乳化,二免、三免、四免抗原为蛋白抗原与等体积弗氏不完全佐剂混匀乳化。

[0066] 所述的兔免疫的方法包括:

[0067] (1) 选用健康雌性新西兰大白兔,4月龄,2.1kg;

[0068] (2) 一免:第1天,免疫用抗原为弗氏完全佐剂+蛋白抗原;

[0069] (3) 二免:第21天,免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+蛋白抗原;

[0070] (4) 三免:第35天,免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+蛋白抗原;

- [0071] (5) 三免后采血:第42天,耳静脉采血1ml,ELISA检测抗血清效价;
- [0072] (6) 四免:第49天,免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+蛋白抗原;
- [0073] (7) 四免后采血:第56天,耳静脉采血1ml,ELISA检测抗血清效价;
- [0074] (8) 终放血:第57天,ELISA检测抗血清效价达到要求,颈动脉采全血。
- [0075] 所述的间接ELISA检测的步骤包括:
- [0076] a. 包被抗原:将抗原用0.05mol/l碳酸盐(PH=9.6)按0.2ug/孔包板,100ul/孔,4℃孵育过夜;
- [0077] b. 洗板:取出用0.05%Tween-20(PBST)洗涤三次,3分钟/次;
- [0078] c. 封闭:每孔加入5%脱脂奶粉100ul封闭液,37℃封闭60分钟;
- [0079] d. 洗板:取出用0.05%Tween-20(PBST)洗涤三次,3分钟/次;
- [0080] e. 加一抗:将兔子的血清分别按照1:1000稀释,然后倍比稀释,37℃孵育1小时;
- [0081] f. 洗板:取出用0.05%Tween-20(PBST)洗涤三次,3分钟/次;
- [0082] g. 加二抗:辣根酶标记山羊抗兔IgG(H+L),1:8000稀释,37℃孵育45min。
- [0083] h. 洗板:取出用0.05%Tween-20(PBST)洗涤五次,3分钟/次;
- [0084] i. 显色:加入底物溶液(TMB)100ul/孔,反应15min,最后加入100ul2mol/L硫酸终止反应;
- [0085] j. 测OD值:用酶标仪(科华ST-360)在450nm波长下测定OD值。
- [0086] 实施例3
- [0087] 一种ELISA保证型兔抗树鼩多克隆IgG抗体的制备方法,先制备树鼩抗原,后免疫兔子制备兔抗树鼩特异性抗体,再进行间接ELISA检测以验证所得抗体的效价,最后通过过碘酸钠氧化法进行HRP标记。。
- [0088] 所述的制备树鼩抗原的步骤包括:通过股静脉抽取树鼩静脉血,得到血清约10ml,纯化得到蛋白总量约为6mg,初免剂量为1mg/只,二免、三免、四免剂量为0.5mg/只;初免抗原为蛋白抗原与等体积弗氏完全佐剂混匀乳化,二免、三免、四免抗原为蛋白抗原与等体积弗氏不完全佐剂混匀乳化。
- [0089] 所述的兔免疫的方法包括:
- [0090] (1) 选用健康雌性新西兰大白兔,4月龄,2.1kg;
- [0091] (2) 一免:第1天,免疫用抗原为弗氏完全佐剂+蛋白抗原;
- [0092] (3) 二免:第21天,免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+蛋白抗原;
- [0093] (4) 三免:第35天,免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+蛋白抗原;
- [0094] (5) 三免后采血:第42天,耳静脉采血1ml,ELISA检测抗血清效价;
- [0095] (6) 四免:第49天,免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+蛋白抗原;
- [0096] (7) 四免后采血:第56天,耳静脉采血1ml,ELISA检测抗血清效价;
- [0097] (8) 终放血:第57天,ELISA检测抗血清效价达到要求,颈动脉采全血。
- [0098] 所述的间接ELISA检测的步骤包括:
- [0099] a. 包被抗原:将抗原用0.05mol/l碳酸盐(PH=9.6)按0.2ug/孔包板,100ul/孔,4℃孵育过夜;
- [0100] b. 洗板:取出用0.05%Tween-20(PBST)洗涤三次,3分钟/次;
- [0101] c. 封闭:每孔加入5%脱脂奶粉100ul封闭液,37.5℃封闭60分钟;

- [0102] d.洗板:取出用0.05%Tween-20 (PBST) 洗涤三次,3分钟/次;
 [0103] e.加一抗:将兔子的血清分别按照1:1000稀释,然后倍比稀释,37.5℃孵育1小时;
 [0104] f.洗板:取出用0.05%Tween-20 (PBST) 洗涤三次,3分钟/次;
 [0105] g.加二抗:辣根酶标记山羊抗兔IgG (H+L),1:8000稀释,37℃孵育45min。
 [0106] h.洗板:取出用0.05%Tween-20 (PBST) 洗涤五次,3分钟/次;
 [0107] i.显色:加入底物溶液 (TMB) 100ul/孔,反应15min,最后加入100ul2mol/L硫酸终止反应;
 [0108] j.测OD值:用酶标仪 (科华ST-360) 在450nm波长下测定OD值。

[0109] 二、效价检测

[0110] (一) 三免后抗血清效价检测

[0111] 采用A、B两只兔子进行效价检测,结果如下:

[0112] 三免后抗血清ELISA检测结果见表1。

[0113]

阴性	空白	1K	2K	4K	8K	16K	32K	64K	128K	256K	512K
0.090	0.115	1.017	1.06	0.877	0.826	0.675	0.54	0.377	0.279	0.217	0.120
0.099	0.111	0.952	0.88	0.784	0.775	0.634	0.48	0.37	0.281	0.212	0.110

[0114] 表1

[0115] 备注:图1为三免后抗血清效价检测的图片;表1为酶标仪测出的数据。

[0116] 血清效价值 $\geq 2.5 \times$ 阴性值。

[0117] 三免后抗血清效价:A $\geq 128K$,B $\geq 128K$ 。

[0118] (二) 终放后抗血清效价检测

[0119] 终放后抗血清ELISA检测结果见表2。

[0120]

阴性	空白	1K	2K	4K	8K	16K	32K	64K	128K	256K	512K
0.100	0.008	0.74	0.684	0.68	0.631	0.526	0.493	0.367	0.261	0.166	0.115
0.109	0.024	0.731	0.689	0.667	0.639	0.609	0.539	0.441	0.336	0.274	0.166

[0121] 表2

[0122] 备注:图2为终放后抗血清效价检测的图片;表2为酶标仪测出的数据。

[0123] 血清效价值 $\geq 2.5 \times$ 阴性值。

[0124] 终放后抗血清效价:A ≥ 128 ,B $\geq 256K$ 。

[0125] (三) 抗血清纯化抗体效价检测

[0126] 纯化抗体ELISA检测结果见表3:

[0127]

阴性	空白	1K	2K	4K	8K	16K	32K	64K	128K	256K	512K
0.106	0.084	0.867	0.843	0.803	0.787	0.740	0.731	0.684	0.626	0.549	0.475
0.100	0.085	0.897	0.87	0.865	0.852	0.802	0.771	0.757	0.734	0.709	0.659

[0128] 表3

[0129] 备注:表3是图3用酶标仪测出的数据。图3为终放后抗血清纯化抗体效价检测的图片。

[0130] 血清效价值 $\geq 2.5 \times$ 阴性值。

[0131] 抗血清纯化抗体效价: $A \geq 512K, B \geq 512K$

[0132] 结果表明, 终放并纯化后抗血清抗体效价 $\geq 1:50000$, 即在此稀释浓度及以下均能检测到所制备的抗体与抗原的结合。但须注意的是, 在实际应用过程中, 由于所检测的抗原不同, 还需要摸索最佳抗体稀释浓度, 太高的抗体浓度容易产生非特异性结合, 太低的抗体浓度则无法检测出目标抗原, 掌握好合适的抗体稀释比例尤为重要, 以达到较好的效果。

[0133] 下面结合具体实施方式对本发明作进一步详细说明。应该强调的是, 下述说明仅仅是示例性的, 而不是为了限制本发明的范围及其应用。以上内容是结合具体的/优选的实施方式对本发明所作的进一步详细说明, 不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明构思的前提下, 其还可以对这些已描述的实施例做出若干替代或变型, 而这些替代或变型方式都应当视为属于本发明的保护范围。

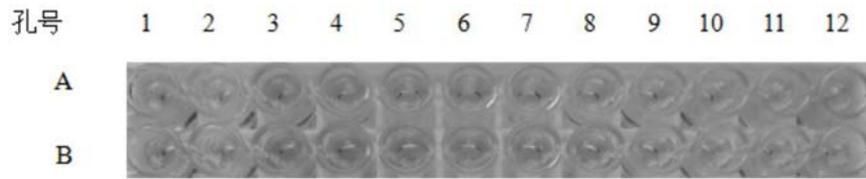


图1

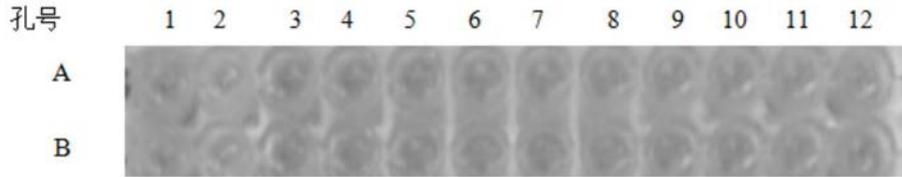


图2

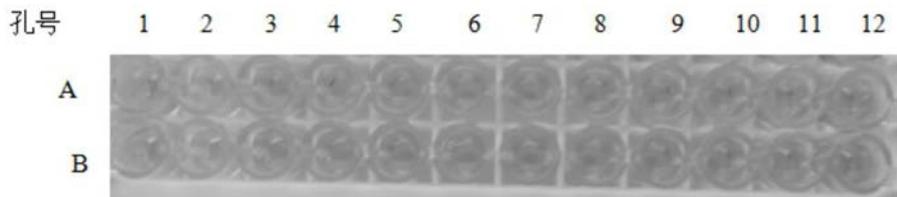


图3

专利名称(译)	ELISA保证型兔抗树鼩多克隆IgG抗体的制备方法		
公开(公告)号	CN109596821A	公开(公告)日	2019-04-09
申请号	CN201811520028.2	申请日	2018-12-12
[标]申请(专利权)人(译)	广西医科大学第一附属医院		
申请(专利权)人(译)	广西医科大学第一附属医院		
当前申请(专利权)人(译)	广西医科大学第一附属医院		
[标]发明人	唐安洲 王芝 易翔 周涛 赖永静 杜龙 王梦琳 夏巍 祁承林 李恒 唐杰		
发明人	唐安洲 王芝 易翔 周涛 赖永静 杜龙 王梦琳 夏巍 祁承林 李恒 唐杰		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	关文龙		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种ELISA保证型兔抗树鼩多克隆IgG抗体的制备方法，先制备树鼩抗原，兔免疫制备兔抗树鼩特异性二抗，再进行间接ELISA检测以验证所得抗体的效价。本发明的抗体的制备方法，提供了较为成熟的兔抗树鼩IgG抗体，可用于不同抗体变化的ELISA检测过程；本发明采用兔子制备抗树鼩抗体，可以解决市面上缺乏高敏感度抗树鼩特异性抗体的问题，解决使用抗人或者抗猴的抗体代替抗树鼩抗体存在的敏感度较低的问题。

孔号 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

A

B

