



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103175951 A

(43) 申请公布日 2013.06.26

(21) 申请号 201110441180.3

(22) 申请日 2011.12.24

(71) 申请人 复旦大学

地址 200433 上海市杨浦区邯郸路 220 号

(72) 发明人 力弘 章蕴毅 吴牧鹭 陈道峰

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事

务所(普通合伙) 31268

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

一种补体系统激活水平的 ELISA 检测方法

(57) 摘要

本发明属于免疫学检测方法领域。公开了一种补体系统激活水平的 ELISA 检测方法,本发明针对补体系统的经典、替代和甘露糖三条激活途径,分别用三种不同的激活物包被 96 孔高吸附性酶标板,实现在体外激活补体系统,并利用多克隆抗补体抗体为中间物,捕获激活补体,以抗 IgG-HRP 为酶标检测抗体,以此反映补体系统的激活情况。本发明中采用二步法作为放大系统替代传统的三步法。本方法耗时少,操作过程简便,能节省地高辛标记抗体的步骤,使实验更加便捷。本方法弥补了现有溶血实验不能测定补体甘露糖途径激活情况的缺陷,尤其适用于检测药物对补体系统的抑制作用,建立了全新的快速高效的补体抑制剂离体筛选方法。

1. 一种补体系统激活水平的 ELISA 检测方法,其特征在于,其针对经典途径、替代途径和甘露糖途径三条激活途径,分别用免疫球蛋白 IgM、脂多糖 LPS 和甘露糖三种激活物包被 96 孔高吸附性酶标板;封板后加入含补体的豚鼠血清与待研的药物,与酶标板上固化的激活物作用,使豚鼠血清中的补体系统被激活;以抗补体抗体为一抗,捕捉被激活裂解的补体片段;以抗 IgG-HRP 为酶标检测抗体,建立检测补体激活水平的 ELISA 方法。

2. 按权利要求 1 的方法,其特征在于,所述的抗补体抗体为兔抗人 C3c 多克隆抗体。

3. 按权利要求 1 的方法,其特征在于,所述的被激活裂解的补体片段是被激活裂解的 C3c 片段。

4. 权利要求 1 的方法在制备补体激活水平检测试剂盒中的用途。

5. 权利要求 1 的方法在制备在筛选补体抑制剂中的用途。

6. 权利要求 1 的方法在补体抑制药物质量控制中的应用。

一种补体系统激活水平的 ELISA 检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学检测方法领域,具体涉及一种药物影响补体系统三条激活途径激活水平的 ELISA 检测方法。

背景技术

[0002] 现有技术公开了补体系统包括 30 余种组分,广泛分布于人和脊椎动物的血清、组织液和细胞膜表面,是具有精密调控机制的蛋白质反应系统。补体不仅是机体固有免疫防御的重要组成部分,也是抗体发挥免疫效应的主要机制之一。研究显示,补体系统的正常活化可介导防御微生物感染和炎症应答,但是其非正常活化会导致机体的严重损伤。临床上观察补体的动态变化,对一些疾病的诊断、病因研究等有重要的意义。多种疾病如系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、免疫复合物引起的肾炎、急性肺损伤,缺血再灌注引发的组织损伤及同种异体器官移植排异反应等均涉及补体系统过度激活。建立快速和高效补体抑制剂筛选平台,对急、慢性炎症性疾病的治疗有着重要的意义。

[0003] 研究显示,多种微生物成分、抗原-抗体复合物以及其他外源性或内源性物质可循三条既独立又交叉的途径,即经典激活途径、替代激活途径和甘露糖激活,通过启动一系列丝氨酸蛋白酶的级联酶解反应而激活补体,所形成的活化产物具有调理吞噬、溶解细胞、介导炎症、调节免疫应答和清除免疫复合物等生物学功能。其中,补体成分 C3 是三条激活途径的共同节点,C3 被激活后裂解成 C3a 和 C3b 两个片段,随后大片段 C3b 可以进一步裂解成 C3c 和 C3d,其中较大片段 C3c 为较稳定的裂解产物,并且可以与激活物相连接。

[0004] 现有补体系统检测手段主要是溶血试验和补体缺失血清试验,以及酶联免疫吸附测定实验。其中,溶血试验应用最为广泛。

[0005] 溶血试验是目前最常用的检测方法。三条补体激活途径所介导的终产物均为膜攻击复合物,具有溶解能力,可以反映补体的功能,因此常采用补体溶血试验测定经典途径或替代途径的总补体活性。补体溶血反应是基于抗红细胞血清与红细胞结合后,遇到补体即可使红细胞发生溶血这一特点所建立的。具体方法是将抗红细胞抗体与红细胞结合,制成致敏红细胞,然后用致敏红细胞去检测补体活性。羊红细胞可以测定经典激活途径,兔红细胞可以测定替代激活途径。对补体系统中任何一级的抑制均可导致部分或全部激活级联反应受阻,但溶血试验只能反映血清或体液中总的补体活性大小,无法准确定位药物作用靶点。此外,膜攻击复合物在进攻红细胞使其裂解时并非一一对应,即一个红细胞的裂解可能是由一个膜攻击复合物引起的,也可能是由多个膜攻击复合物引起的,因此,红细胞的裂解量并不能准确地反映补体系统的激活水平。目前,溶血试验无法对甘露糖途径的激活水平进行测定。

[0006] 在补体缺失血清试验中,首先将一定浓度的药物与一定浓度补体混合使其恰好完全抑制补体溶血,再补充不同成分补体缺失血清,若药物作用部位恰好为这一缺失成分,则体系依然不溶血;反之,体系溶血。这一方法可用于确定药物在补体激活体系中的作用位点,但是补体缺失血清大多需自行制备,步骤繁琐复杂,且工作量大,研究速度缓慢。如果直

接购买补体缺失血清,试剂昂贵。同时,这种方法无法研究药物对补体系统的非特异性作用或半溶血作用,存在一定缺陷。

[0007] ELISA 是酶联免疫吸附测定试验的简称,它是以免疫学反应为基础,将抗原、抗体的特异性反应与酶底物的高效催化作用相结合起来的一种敏感性很高的实验技术。结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性,酶标记的相应抗体或抗原既保留其免疫学活性,又保留酶的活性。在测定时,受检标本与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开。再加入酶标记的抗原或抗体,使其通过反应结合在固相载体上。此时,固相上的酶量与标本中受检物质的量呈一定的比例。加入酶反应的底物后,底物被酶催化成为有色产物,产物的量与标本中受检物质的量直接相关,故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。

[0008] 国外有文献报道,将 ELISA 方法应用于血清中补体水平的检测,该方法是针对经典途径、替代途径和甘露糖途径三条激活途径,分别用 IgM、LPS 和甘露糖三种激活物包被高吸附性酶标板,封板后加入含补体的血清,以地高辛连接的抗 C3 抗体为一抗,捕捉血清中的 C3 片段,以 HRP 连接的羊抗地高辛抗体为酶标检测抗体,建立检测补体水平的 ELISA 方法,并主要应用于患者体内补体水平的测定。

发明内容

[0009] 本发明目的在于,基于 ELISA 原理,提供一种新的测定补体系统三条激活途径激活水平的方法,并用于补体抑制剂的高通量筛选。

[0010] 为了实现本发明的上述目的,本发明提供了如下的技术方案:

[0011] 针对经典途径、替代途径和甘露糖途径三条激活途径,分别用 IgM、LPS 和甘露糖三种激活物包被 96 孔高吸附性酶标板,封板后加入含补体的豚鼠血清与待研究的药物,与酶标板上固化的激活物作用,使豚鼠血清中的补体系统被激活;以兔抗人 C3c 多克隆抗体为一抗,捕捉补体中被激活裂解的 C3c 片段,以羊抗兔 IgG-HRP 为酶标检测抗体,建立检测补体激活水平的 ELISA 方法。

[0012] 具体而言,本发明的检测补体激活水平的 ELISA 方法,其特征在于,其包括步骤:将 IgM、LPS 和甘露糖三种激活物包被于 ELISA 板上,50 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C 过夜;将豚鼠血清或豚鼠血清和待测药物混合液加入与酶标板上,与酶标板上的激活物作用,使豚鼠血清中的补体系统被激活,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h;加入兔抗人 C3c 多克隆抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,使之结合到被固相化捕捉的 C3c 片段上;加入羊抗兔 IgG-HRP 酶标抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,使之与兔抗人 C3c 多克隆抗体结合,用以检测补体系统的激活水平。

[0013] 本方法中,酶标板为购自 Nunc 公司的 96 孔高吸附性可拆卸式酶标板,包被缓冲液为 pH9.6 的 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液,经典途径和甘露糖途径的豚鼠血清和待测药物稀释液为 pH7.5 的 BVB⁺⁺ 缓冲液,替代途径豚鼠血清和待测药物稀释液为 pH7.5 的 GVB/Mg⁺⁺-EGTA 缓冲液,洗涤液为 pH7.4 的 0.05% 的 PBS-T 缓冲液。商品化的兔抗人 C3c 多克隆抗体和羊抗兔 IgG-HRP 酶标抗体购自上海长岛生物技术有限公司,商品化甘露糖和 LPS 购自 Sigma 公司,人 IgM 购自北京博奥森生物技术有限公司。

[0014] 更具体的,本发明方法包括步骤:

[0015] (1) 建立经典途径补体激活水平标准曲线:

[0016] 5 μ g/ml 人 IgM 包被液包被酶标板, 50 μ l/孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜; PBS-T 洗涤 3 次, 250 μ l/孔, 轻轻震荡后在吸水纸上拍干; PBS-1% BSA 封闭, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h; PBS-T 洗涤 3 次, 250 μ l/孔, 轻轻震荡后在吸水纸上拍干; 加不同稀释度的豚鼠血清, 将豚鼠血清稀释为 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 同时设灭活的小牛血清 (1:500 稀释) 为空白对照, 均用 pH7.5 的 BVB⁺⁺ 缓冲液稀释, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h; PBS-T 洗涤 3 次, 250 μ l/孔, 轻轻震荡后在吸水纸上拍干; 加 1/1000 稀释的兔抗人 C3c 多克隆抗体, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h; PBS-T 洗涤 5 次, 250 μ l/孔, 轻轻震荡后在吸水纸上拍干; 加 1/1000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP 酶标抗体, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h; PBS-T 洗涤 5 次, 250 μ l/孔, 轻轻震荡后在吸水纸上拍干; 加入 OPD 底物溶液, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 20min; 加入 2M H₂SO₄ 终止反应, 50 μ l/孔, 用酶标仪测定 OD₄₉₂; 以不同稀释度的豚鼠血清对数值为横坐标, 以相应的 OD 值为纵坐标绘制标准曲线, 建立回归方程。

[0017] (2) 建立甘露糖途径补体激活水平标准曲线:

[0018] 100 μ g/ml 甘露糖包被液包被酶标板, 50 μ l/孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜; PBS-T 洗涤 3 次, 250 μ l/孔, 轻轻震荡后在吸水纸上拍干; PBS-1% BSA 封闭, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h; PBS-T 洗涤 3 次, 250 μ l/孔, 轻轻震荡后在吸水纸上拍干; 加不同稀释度的豚鼠血清, 将豚鼠血清稀释为 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 同时设灭活的小牛血清 (1:500 稀释) 为空白对照, 均用 pH7.5 的 BVB⁺⁺ 缓冲液稀释, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h; PBS-T 洗涤 3 次, 250 μ l/孔, 轻轻震荡后在吸水纸上拍干; 加 1/1000 稀释的兔抗人 C3c 多克隆抗体, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h; PBS-T 洗涤 5 次, 250 μ l/孔, 轻轻震荡后在吸水纸上拍干; 加 1/1000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP 酶标抗体, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h; PBS-T 洗涤 5 次, 250 μ l/孔, 轻轻震荡后在吸水纸上拍干; 加入 OPD 底物溶液, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 20min; 加入 2M H₂SO₄ 终止反应, 50 μ l/孔, 用酶标仪测定 OD₄₉₂; 以不同稀释度的豚鼠血清对数值为横坐标, 以相应的 OD 值为纵坐标绘制标准曲线, 建立回归方程。

[0019] (3) 建立替代途径补体激活水平标准曲线:

[0020] 10 μ g/ml LPS 包被液包被酶标板, 50 μ l/孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜; PBS-T 洗涤 3 次, 250 μ l/孔, 轻轻震荡后在吸水纸上拍干; PBS-1% BSA 封闭, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h; PBS-T 洗涤 3 次, 250 μ l/孔, 轻轻震荡后在吸水纸上拍干; 加不同稀释度的豚鼠血清, 将豚鼠血清稀释为 1:2.5, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 同时设灭活的小牛血清 1:500 稀释为空白对照, 均用 pH7.5 的 GVB/Mg-EGTA 缓冲液稀释, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h; PBS-T 洗涤 3 次, 250 μ l/孔, 轻轻震荡后在吸水纸上拍干; 加 1/1000 稀释的兔抗人 C3c 多克隆抗体, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h; PBS-T 洗涤 5 次, 250 μ l/孔, 轻轻震荡后在吸水纸上拍干; 加 1/1000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP 酶标抗体, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h; PBS-T 洗涤 5 次, 250 μ l/孔, 轻轻震荡后在吸水纸上拍干; 加入 OPD 底物溶液, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 20min; 加入 2M H₂SO₄ 终止反应, 50 μ l/孔, 用酶标仪测定 OD₄₉₂; 以不同稀释度的豚鼠血清对数值为横坐标, 以相应的 OD 值为纵坐标绘制标准曲线, 建立回归方程。

[0021] (4) 经典途径补体抑制剂的筛选:

[0022] 5 μ g/ml 人 IgM 包被液包被酶标板, 50 μ l/孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜; PBS-T 洗涤 3 次, 250 μ l/孔, 轻轻震荡后在吸水纸上拍干; PBS-1% BSA 封闭, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h; PBS-T 洗涤 3 次, 250 μ l/孔, 轻轻震荡后在吸水纸上拍干; 将等体积的豚鼠血清 (1:5 稀释) 与一定

浓度梯度的待测补体抑制剂温和均匀混合（均用 pH7.5 的 BVB⁺⁺ 缓冲液稀释），4℃ 预孵育 45min 后加板，200 μl/孔，37℃ 孵育 1h；PBS-T 洗涤 3 次，250 μl/孔，轻轻震荡后在吸水纸上拍干；加 1/1000 稀释的兔抗人 C3c 多克隆抗体，100 μl/孔，37℃ 孵育 1h；PBS-T 洗涤 5 次，250 μl/孔，轻轻震荡后在吸水纸上拍干；加 1/1000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP 酶标抗体，100 μl/孔，37℃ 孵育 1h；PBS-T 洗涤 5 次，250 μl/孔，轻轻震荡后在吸水纸上拍干；加入 OPD 底物溶液，100 μl/孔，37℃ 避光孵育 20min；加入 2M H₂SO₄ 终止反应，50 μl/孔，用酶标仪测定 OD₄₉₂；将测得的 OD₄₉₂ 与相同条件下标准曲线中豚鼠血清（1：10 稀释）OD₄₉₂ 相比较，得到百分抑制率；以不同稀释度的待测补体抑制剂对数值为横坐标，以相应的百分抑制率为纵坐标绘制标准曲线，建立回归方程，计算 CH₅₀。

[0023] (5) 筛选甘露糖途径补体抑制剂：

[0024] 100 μg/ml 甘露糖包被液包被酶标板，50 μl/孔，4℃ 过夜；PBS-T 洗涤 3 次，250 μl/孔，轻轻震荡后在吸水纸上拍干；PBS-1% BSA 封闭，100 μl/孔，37℃ 孵育 1h；PBS-T 洗涤 3 次，250 μl/孔，轻轻震荡后在吸水纸上拍干；将等体积的豚鼠血清（1：10 稀释）与一定浓度梯度的待测补体抑制剂温和均匀混合（均用 pH7.5 的 BVB⁺⁺ 缓冲液稀释），4℃ 预孵育 45min 后加板，200 μl/孔，37℃ 孵育 1h；PBS-T 洗涤 3 次，250 μl/孔，轻轻震荡后在吸水纸上拍干；加 1/1000 稀释的兔抗人 C3c 多克隆抗体，100 μl/孔，37℃ 孵育 1h；PBS-T 洗涤 5 次，250 μl/孔，轻轻震荡后在吸水纸上拍干；加 1/1000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP 酶标抗体，100 μl/孔，37℃ 孵育 1h；PBS-T 洗涤 5 次，250 μl/孔，轻轻震荡后在吸水纸上拍干；加入 OPD 底物溶液，100 μl/孔，37℃ 避光孵育 20min；加入 2M H₂SO₄ 终止反应，50 μl/孔，用酶标仪测定 OD₄₉₂；将测得的 OD₄₉₂ 与相同条件下标准曲线中豚鼠血清（1：20 稀释）OD₄₉₂ 相比较，得到百分抑制率；以不同稀释度的待测补体抑制剂对数值为横坐标，以相应的百分抑制率为纵坐标绘制标准曲线，建立回归方程，计算 CH₅₀。

[0025] (6) 筛选替代途径补体抑制剂：

[0026] 10 μg/ml LPS 包被液包被酶标板，50 μl/孔，4℃ 过夜；PBS-T 洗涤 3 次，250 μl/孔，轻轻震荡后在吸水纸上拍干；PBS-1% BSA 封闭，100 μl/孔，37℃ 孵育 1h；PBS-T 洗涤 3 次，250 μl/孔，轻轻震荡后在吸水纸上拍干；将等体积的豚鼠血清（1：1.25 稀释）与一定浓度梯度的待测补体抑制剂温和均匀混合（均用 pH7.5 的 GVB/Mg-EGTA 缓冲液稀释），4℃ 预孵育 45min 后加板，200 μl/孔，37℃ 孵育 1h；PBS-T 洗涤 3 次，250 μl/孔，轻轻震荡后在吸水纸上拍干；加 1/1000 稀释的兔抗人 C3c 多克隆抗体，100 μl/孔，37℃ 孵育 1h；PBS-T 洗涤 5 次，250 μl/孔，轻轻震荡后在吸水纸上拍干；加 1/1000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP 酶标抗体，100 μl/孔，37℃ 孵育 1h；PBS-T 洗涤 5 次，250 μl/孔，轻轻震荡后在吸水纸上拍干；加入 OPD 底物溶液，100 μl/孔，37℃ 避光孵育 20min；加入 2M H₂SO₄ 终止反应，50 μl/孔，用酶标仪测定 OD₄₉₂；将测得的 OD₄₉₂ 与相同条件下标准曲线中豚鼠血清（1：5 稀释）OD₄₉₂ 相比较，得到百分抑制率；以不同稀释度的待测补体抑制剂对数值为横坐标，以相应的百分抑制率为纵坐标绘制标准曲线，建立回归方程，计算 CH₅₀。

[0027] 本发明中采用二步法作为放大系统替代现有技术中采用的传统的三步法。本发明方法中的第二抗体将特异抗体和辣根过氧化物酶（HRP）结合在一种葡聚糖的聚合物上制成，使第二抗体有较多的结合位点（超过 20 个），充分地 and 第一抗体结合；同时在显色时，第二抗体有充足的酶与显色剂起反应，从而将待测的抗原水平显示出来。本方法敏感性高于一

般的三步法。而且克服了三步法中所采用的地高辛不仅价格昂贵,而且很难标记在特异性抗体上的缺陷。因此,本方法耗时少,操作过程简便,省去了地高辛标记一抗的步骤,使实验更加便捷。

[0028] 本发明中采用抗 C3c 多克隆抗体为一抗,能特异性的捕捉补体系统中的激活成分 C3c,有效反映补体系统的激活情况,克服了现有技术中采用抗 C3 的抗体无法通过其含量的测定反映补体系统的激活情况的缺陷。且本方法中所采用的 Nunc 96 孔酶标板具有高吸附性,抗体的结合量高,提高了反应的灵敏度;96 孔板为快速筛选多种浓度的多种药物提供了可能,从而实现高通量新药筛选。

[0029] 本发明测定补体系统激活水平的方法与现有方法相比,具有如下突出的优点:

[0030] 提供了对甘露糖途径激活水平的新的检测方法;利用抗原抗体一一结合的特点,避免了溶血试验中由于膜攻击复合物与红细胞非一一对应作用所引起的检测误差;酶标抗体检测时采用两步法,简化实验条件和步骤,进行优化;通过检测抗体对 C3c 片段的特异性捕捉,可以反映补体系统的激活水平,用于制备补体激活水平检测试剂盒;可应用于补体抑制剂的的研究,实现对补体抑制剂的进行高通量的筛选;同时,通过对已知作用的补体抑制药物的检测,可以用于补体抑制药物质量控制。

附图说明

[0031] 图 1 是本发明操作流程的示意图

[0032] 图 2 是经典途径补体激活水平标准曲线,横坐标为不同稀释浓度的豚鼠血清负对数值,纵坐标为相应的 OD₄₉₂ 值。

[0033] 图 3 是甘露糖途径补体激活水平标准曲线,横坐标为不同稀释浓度的豚鼠血清负对数值,纵坐标为相应的 OD₄₉₂ 值。

[0034] 图 4 是替代途径补体激活水平标准曲线,横坐标为不同稀释浓度的豚鼠血清负对数值,纵坐标为相应的 OD₄₉₂ 值。

[0035] 图 5 是具体实施方法中补体抑制剂苏拉明经典途径检测结果,横坐标为不同稀释浓度的苏拉明负对数值,纵坐标为相应的百分抑制率。

[0036] 图 6 是具体实施方法中补体抑制剂苏拉明甘露糖途径检测结果,横坐标为不同稀释浓度的苏拉明负对数值,纵坐标为相应的百分抑制率。

具体实施方式

[0037] 下面以已知补体抑制药物苏拉明的研究过程及结果为例对本发明进行详细说明。

[0038] 实施例 1 测定苏拉明对经典途径和甘露糖途径补体激活水平的作用

[0039] 本实施例中的酶标板为购自 Nunc 公司的 96 孔单孔可拆卸式酶标板,包被缓冲液为 pH9.6 的 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液,经典途径和甘露糖途径的豚鼠血清和待测药物缓冲液为 pH7.5 的 BVB⁺⁺ 缓冲液,替代途径豚鼠血清和待测药物缓冲液为 pH7.5 的 GVB/Mg⁺⁺-EGTA 缓冲液,洗涤液为 pH7.4 的 0.05% 的 PBS-T 缓冲液。商品化的兔抗人 C3c 多克隆抗体和羊抗兔 IgG-HRP 酶标抗体购自上海长岛生物技术有限公司。苏拉明 (Sigma 公司)

[0040] 1、方法:

[0041] 分别用 5 μg/ml 人 IgM 和 100 μg/ml 甘露糖包被液包被酶标板,50 μl/孔,4℃过

夜;PBS-T 洗涤 3 次,250 μ l/孔,轻轻震荡后在吸水纸上拍干;PBS-1% BSA 封闭,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h;PBS-T 洗涤 3 次,250 μ l/孔,轻轻震荡后在吸水纸上拍干;将 5mg 的苏拉明溶解于 1ml 的补体缓冲液中,取 500 μ l 依次稀释为 2.5mg/ml,1.25mg/ml,0.3125mg/ml,0.07813mg/ml,0.01953mg/ml,0.00488mg/ml,0.00122mg/ml,将等体积的豚鼠血清稀释液与上述浓度梯度的苏拉明温和均匀混合(两条途径均用 pH7.5 的 BVB⁺⁺ 缓冲液稀释;经典途径中豚鼠血清 1 : 5 稀释,甘露糖途径中豚鼠血清 1 : 10 稀释),分别得到豚鼠血清稀释倍数为 1 : 10、苏拉明浓度依次为 2.5mg/ml,1.25mg/ml、0.3125mg/ml、0.07813mg/ml、0.01953mg/ml、0.00488mg/ml、0.00122mg/ml、0.00030mg/ml 的经典途径加板液和豚鼠血清稀释倍数为 1 : 20、苏拉明浓度依次为 2.5mg/ml,1.25mg/ml、0.3125mg/ml、0.07813mg/ml、0.01953mg/ml、0.00488mg/ml、0.00122mg/ml、0.00030mg/ml 的甘露糖途径加板液,4 $^{\circ}$ C 预孵育 45min 后加板,200 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h;PBS-T 洗涤 3 次,250 μ l/孔,轻轻震荡后在吸水纸上拍干;加兔抗人 C3c 多克隆抗体稀释液(1 : 1000),100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h;PBS-T 洗涤 5 次,250 μ l/孔,轻轻震荡后在吸水纸上拍干;加 1/1000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP 酶标抗体,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h;PBS-T 洗涤 5 次,250 μ l/孔,轻轻震荡后在吸水纸上拍干;加入 OPD 底物溶液,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 20min;加入 2M H₂SO₄ 终止反应,50 μ l/孔,用酶标仪测定 OD₄₉₂;将测得的 OD₄₉₂ 与相同条件下标准曲线中相同稀释倍数豚鼠血清 OD₄₉₂ 相比较(经典途径与 1 : 10 豚鼠血清 OD 值比较,甘露糖途径与 1 : 20 豚鼠血清 OD 值比较),得到百分抑制率,以不同稀释度的待测补体抑制剂对数值为横坐标,以相应的百分抑制率为纵坐标绘制标准曲线,建立回归方程,计算 CH₅₀。

[0042] 2、结果:

[0043] 检测结果如附图 5、6 所示。结果显示,苏拉明对经典途径的 CH₅₀ = 0.089mg/ml,对甘露糖途径的 CH₅₀ = 0.318mg/ml,说明苏拉明对经典途径和甘露糖途径均有明显的抑制作用,而且对经典途径作用效果更强。实验结果对补体抑制剂的研究有指导性作用,可用于补体抑制剂的高通量筛选。

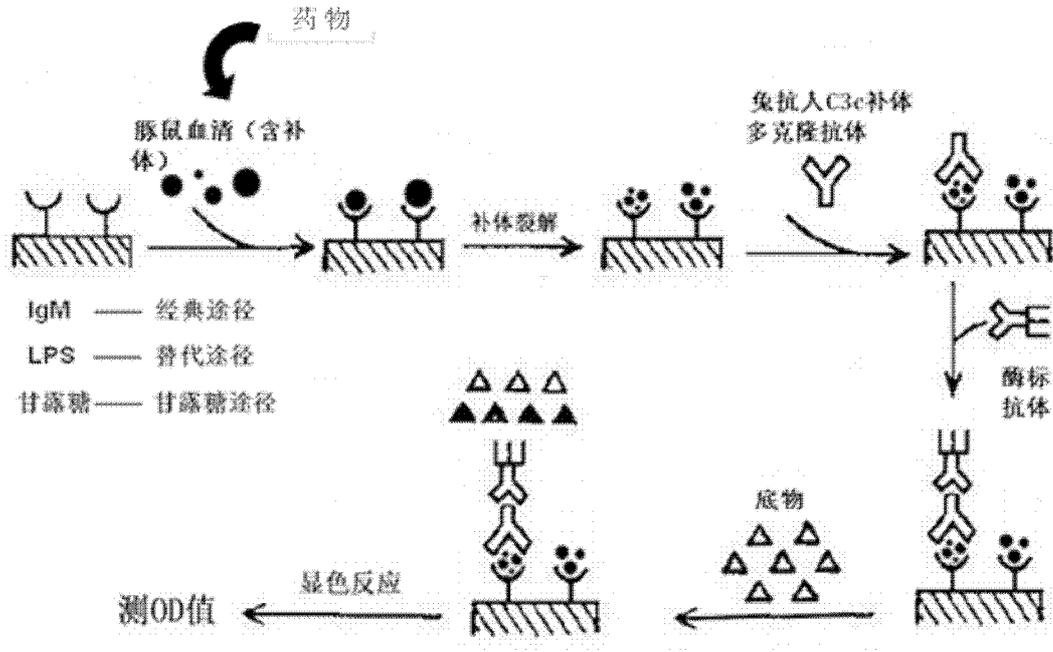


图 1

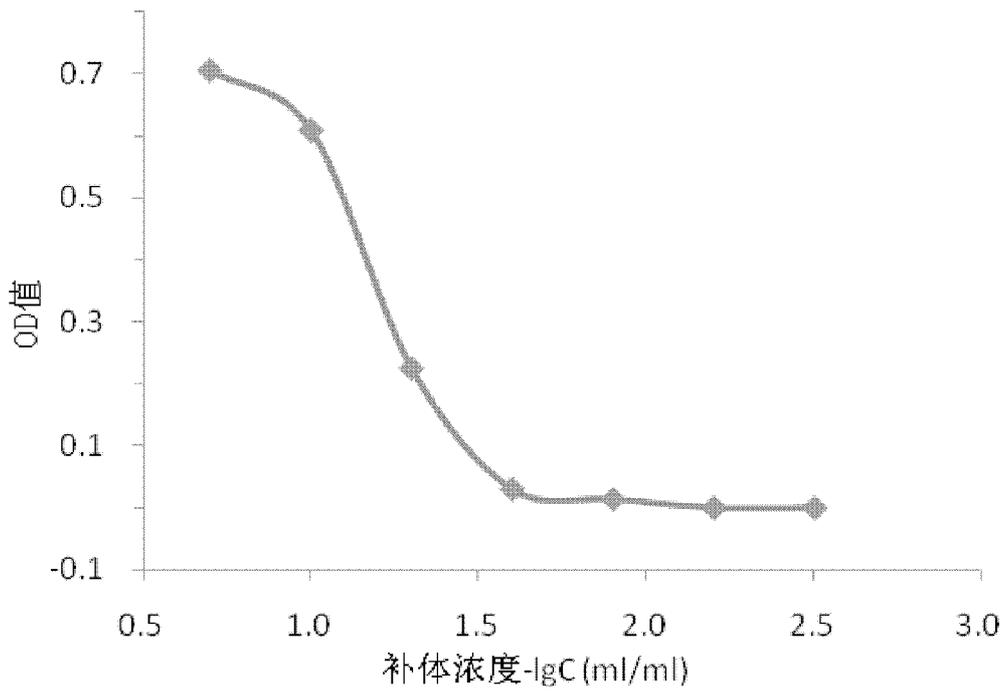


图 2

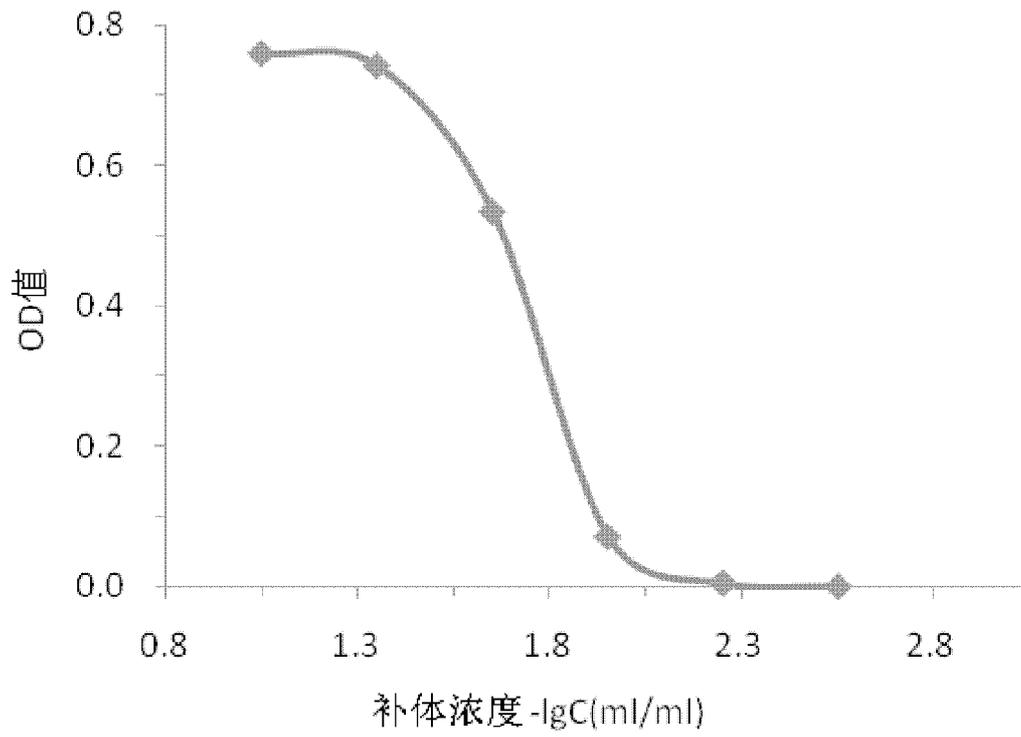


图 3

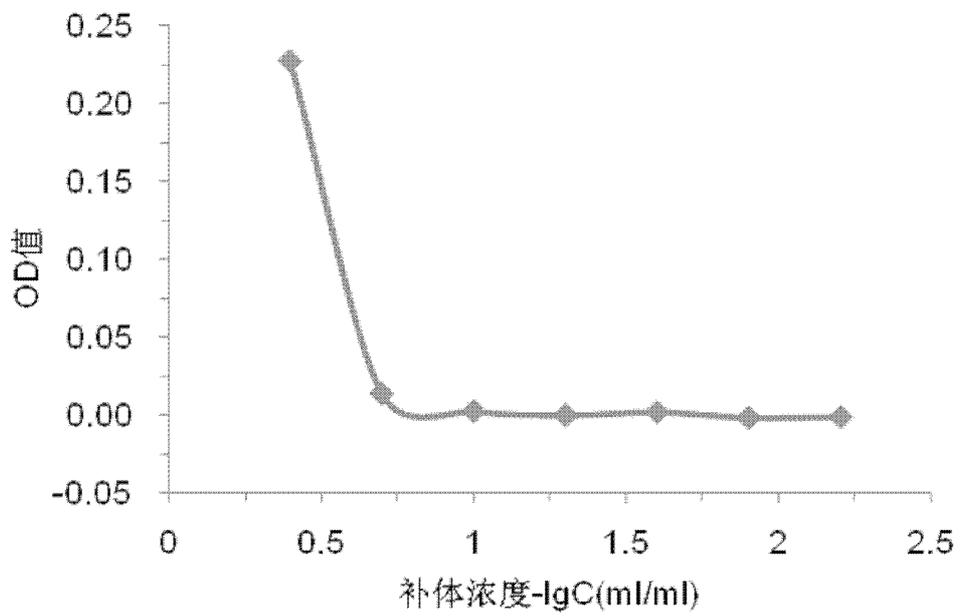


图 4

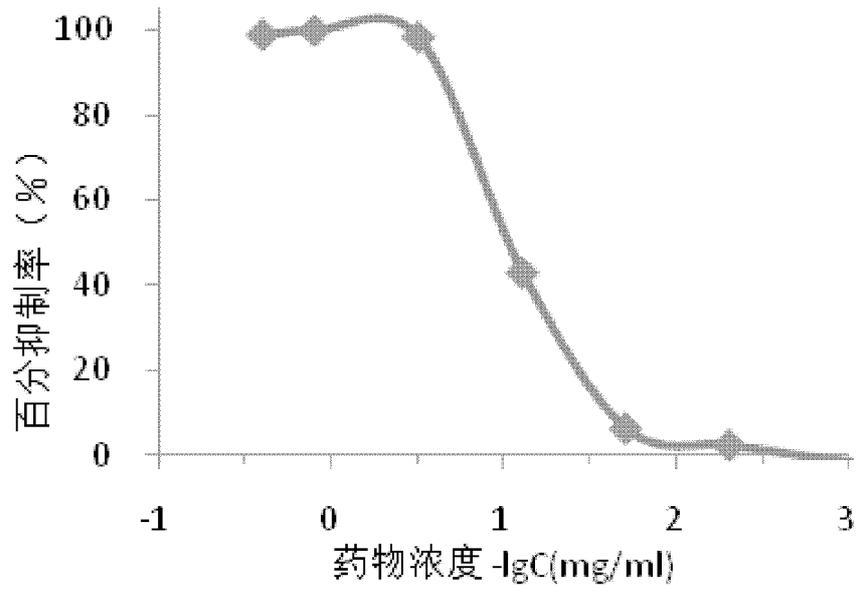


图 5

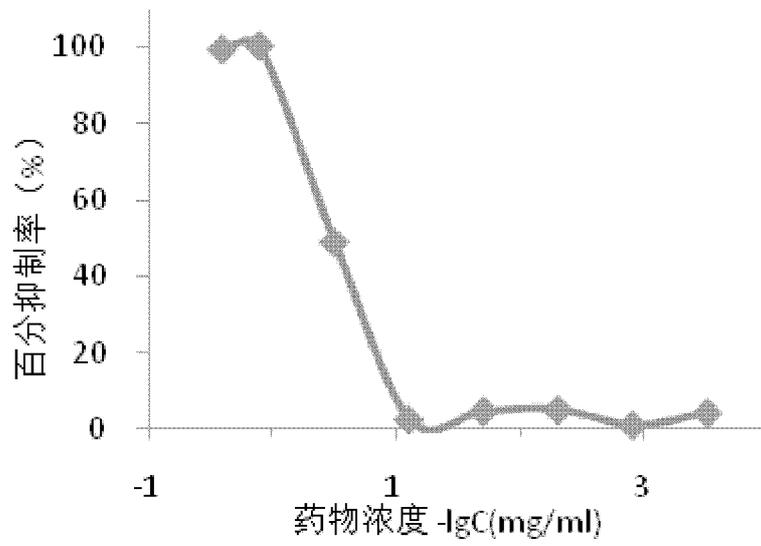


图 6

专利名称(译)	一种补体系统激活水平的ELISA检测方法		
公开(公告)号	CN103175951A	公开(公告)日	2013-06-26
申请号	CN201110441180.3	申请日	2011-12-24
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学		
申请(专利权)人(译)	复旦大学		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学		
[标]发明人	力弘 章蕴毅 吴牧鹭 陈道峰		
发明人	力弘 章蕴毅 吴牧鹭 陈道峰		
IPC分类号	G01N33/53		
代理人(译)	吴桂琴		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫学检测方法领域。公开了一种补体系统激活水平的ELISA检测方法，本发明针对补体系统的经典、替代和甘露糖三条激活途径，分别用三种不同的激活物包被96孔高吸附性酶标板，实现在体外激活补体系统，并利用多克隆抗补体抗体为中间物，捕获激活补体，以抗IgG-HRP为酶标检测抗体，以此反映补体系统的激活情况。本发明中采用二步法作为放大系统替代传统的三步法。本方法耗时少，操作过程简便，能节省地高辛标记抗体的步骤，使实验更加便捷。本方法弥补了现有溶血实验不能测定补体甘露糖途径激活情况的缺陷，尤其适用于检测药物对补体系统的抑制作用，建立了全新的快速高效的补体抑制剂离体筛选方法。

