



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108387723 B

(45)授权公告日 2019.06.25

(21)申请号 201810048828.2

(22)申请日 2018.01.18

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108387723 A

(43)申请公布日 2018.08.10

(73)专利权人 首都医科大学宣武医院

地址 100000 北京市西城区长椿街45号

(72)发明人 陈志国 笪宇威 雷霖

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

代理人 刘奇

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

C12N 15/867(2006.01)

C12N 15/12(2006.01)

(56)对比文件

CN 107299111 A, 2017.10.27, 全文.

CN 103869078 A, 2014.06.18, 全文.

CN 103869064 A, 2014.06.18, 全文.

CN 107190024 A, 2017.09.22, 全文.

US 2013108616 A1, 2013.05.02, 全文.

WO 2004065599 A1, 2004.08.05, 全文.

李先茂 等..粒-巨噬细胞集落刺激因子与绿色荧光蛋白融合基因慢病毒载体构建.《中国病理生理杂志》.2005,第21卷(第7期),第1448-1451页.

Cruz, P. M. Rodriguez, et al..Use of cell-based assays in myasthenia gravis and other antibody-mediated diseases.《EXPERIMENTAL NEUROLOGY》.2015,第270卷第33-71页.

Zisimopoulou P, et al.A comprehensive analysis of the epidemiology and clinical characteristics of anti-LRP4 in myasthenia gravis.《JOURNAL OF AUTOIMMUNITY》.2014,第52卷第139-145页.

审查员 王晓媛

权利要求书1页 说明书7页

序列表3页 附图1页

(54)发明名称

一种LRP4抗体细胞包被微孔板制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种LRP4抗体细胞包被微孔板及制备方法和人LRP4抗体细胞免疫荧光检测试剂盒,属于疫检测技术领域,所述人LRP4抗体细胞免疫荧光检测试剂盒包括LRP4细胞包被微孔板,样品稀释液,阳性对照品、二抗和封闭液。本发明提供的LRP4抗体细胞包被微孔板上直接包被有LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞;避免了短时期内重复进行质粒转染、细胞接种、细胞培养等过程次数,进而降低每次检测的成本,缩短检测时间。

|                  |   |   |   |   |   |   |
|------------------|---|---|---|---|---|---|
| LRP4-GFP-HEK293T | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| EGFP-HEK293T     | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| LRP4-GFP-HEK293T | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| EGFP-HEK293T     | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |

1. 一种LRP4抗体细胞包被微孔板的制备方法,包括以下步骤:

1) 提供LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞:

A) 将携带GFP基因的重组LRP4全长DNA片段和表达EGFP基因的DNA片段分别重组到慢病毒载体pFUGW-H1中,获得pFUGW-LRP4-GFP重组病毒和pFUGW-EGFP重组病毒;所述重组LRP4全长DNA片段的具体序列如Seq ID No.1所示;

B) 将获得pFUGW-LRP4-GFP重组病毒和pFUGW-EGFP重组病毒分别转染到HEK293细胞,分别获得LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞;采用流式细胞学筛选方法分别纯化LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞;

2) 分别将所述LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞以行为单位,交替放于每行微孔中用固定液固定、加入细胞冻存液后置于-80~-200℃保存;

所述重组细胞的接种密度为 $0.8 \sim 1.2 \times 10^5$ /孔;

所述固定液为质量浓度3~5%的多聚甲醛;

所述固定的时间为8~12min;

所述细胞冻存液为DMSO液;所述DMSO液中胎牛血清FBS:DMSO为9:1。

## 一种LRP4抗体细胞包被微孔板制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测技术领域,具体涉及一种LRP4抗体细胞包被微孔板及制备方法和人LRP4抗体细胞免疫荧光检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 重症肌无力(MG)是一种由自身抗体介导引起的神经肌肉接头传递障碍性疾病;其中AChR抗体约占80~90%,其次是MuSK抗体。近年来研究显示,低密度脂蛋白受体相关蛋白4(LRP4)抗体是MG的另一种抗体,可能通过阻断agrin与MuSK结合,抑制突触后膜AChR簇形成,进而参与MG致病过程。临床上明确MG患者血清抗体分型有助于疾病早期诊断及精准治疗。

[0003] 目前用于检测LRP4抗体的方法有酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射免疫沉淀法(RIPA)和细胞免疫荧光染色(CBA)法,其中CBA是一种借助细胞表达靶抗原,基于利用抗原抗体之间的特异性结合来检测目的抗体的技术;相较于其他两种方法,CBA的灵敏度及特异性均较高,且不具有放射性,具有很好的临床应用前景,目前国内及国际上采用方案基本如下:1.将LRP4基因全长重组到携带GFP的CMV6质粒内,获得pCMV6-LRP4-TGFP;2.分别将pCMV6-LRP4-GFP和pEGFP两种质粒转染到HEK293T细胞中,获得两种转染细胞:pCMV6-LRP4-tGFP-HEK293T和pEGFP-HEK293T。3.分别将这两种转染细胞接种到12或24孔板培养24h,用4%多聚甲醛(需加0.2%TritonX-100)或纯甲醇固定10-15分钟。4.加入一抗和二抗进行孵育,并在倒置荧光显微镜下观察。上述方法存在以下问题:(1)成本高,目前获取表达LRP4蛋白的HEK293细胞采用的是直接质粒转染的方法,这种方法会导致重组细胞不稳定表达LRP4蛋白(质粒在传代过程中会逐渐丢失,使得表达LRP4蛋白的HEK293细胞在传代过程中纯度越来越低);获得重组细胞纯度不高;而当纯度低于一定比例时,需要重复质粒转染、细胞接种等系列步骤,从而导致成本增加。此外目前重组细胞系不能长期保存,每次检测时,需要重复进行细胞培养和接种等过程,造成成本增加。(2)耗时长,鉴于目前获得重组细胞系的纯度低且不易保存,需要经常重复进行质粒转染、细胞接种等系列步骤,进而检测周期长。正是由于上述检测方法操作相对复杂,要求的实验条件相对较高,且周期偏长,限制了其应用。

### 发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种操作简便、现成的人LRP4抗体细胞免疫荧光检测试剂盒,降低检测成本,缩短检测时间。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:一种LRP4抗体细胞包被微孔板,所述LRP4抗体细胞包被微孔板包括若干行微孔,以行为单位,每行微孔上交替包被有LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞。

[0006] 本发明还提供了所述的LRP4抗体细胞包被微孔板的制备方法,包括以下步骤:1)提供LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞;2)分别将所述LRP4-GFP-

HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞以行为单位,交替放于每行微孔中用固定液固定、加入细胞冻存液后置于-80~-200℃保存。

[0007] 优选的,所述固定液为质量浓度3~5%的多聚甲醛。

[0008] 优选的,所述固定的时间为8~12min。

[0009] 优选的,步骤1)中所述的LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和 EGFP-HEK293T重组细胞的制备方法包括以下步骤:A)将携带GFP基因的重组LRP4全长DNA片段和表达EGFP基因的DNA片段分别重组到慢病毒载体 pFUGW-H1中,获得pFUGW-LRP4-GFP重组病毒和pFUGW-EGFP重组病毒;B)将获得pFUGW-LRP4-GFP重组病毒和pFUGW-EGFP重组病毒分别转染到 HEK293细胞,分别获得LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞。

[0010] 优选的,所述步骤B)中转染后还包括采用流式细胞学筛选方法分别纯化 LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞。

[0011] 本发明还提供了一种人LRP4抗体细胞免疫荧光检测试剂盒,包括上述 LRP4细胞包被微孔板、样品稀释液、阳性对照品、二抗和封闭液。

[0012] 优选的,所述样品稀释液为以PBS为溶剂的体积浓度1.5~2.5%的羊血清溶液。

[0013] 优选的,封闭液为以PBS为溶剂,体积浓度4.5~5.5%的羊血清溶液。

[0014] 优选的,所述阳性对照品为LRP4抗体。

[0015] 本发明的有益效果:本发明提供的LRP4抗体细胞包被微孔板上直接包被有 LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞;避免了短时期内重复进行质粒转染、细胞接种、细胞培养等过程次数,进而降低每次检测的成本,缩短检测时间。

[0016] 进一步的,本发明借助慢病毒载体,构建长期稳定表达重组LRP4蛋白的重组细胞,并经流式细胞筛选,获取高纯度重组细胞,能够大批量培养,并将所述高纯度的重组细胞固定于微孔板上,可于-80℃冰箱长期保存。本发明通过提高重组细胞系的纯度,改进保存方法,制备现成CBA检测半成品试剂盒,降低检测成本,缩短抗体检测时间。

## 附图说明

[0017] 图1为本发明提供的LRP4抗体细胞包被微孔板示意图。

## 具体实施方式

[0018] 本发明提供了一种LRP4抗体细胞包被微孔板,所述LRP4抗体细胞包被微孔板包括若干行微孔,以行为单位,每行微孔上交替包被有 LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞。

[0019] 在本发明中,所述微孔板为本领域常规的微孔板,优选的可采用Coverslip 的24孔或无Coverslip384孔板。在本发明中,所述微孔板包括若干行微孔,优选的为2~50行,更优选的为4~40行;本发明中所述微孔板作为载体固定LRP4 抗体细胞。本发明中所述LRP4抗体细胞包被微孔板以行为单位,交替包被有 LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞。在本发明中所述 LRP4抗体细胞包被微孔板每一微孔中LRP4-GFP-HEK293T重组细胞或 EGFP-HEK293T重组细胞的包被浓度为 $5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$  (24孔板)、 $3 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$  (384孔板),每一微孔中LRP4-GFP-HEK293T重组细胞或EGFP-HEK293T重组细胞的包被体积为500 $\mu$ l~1ml (24孔板)、25 $\mu$ l~50ml (384孔板)。

[0020] 本发明还提供了所述的LRP4抗体细胞包被微孔板的制备方法,包括以下步骤:1) 提供LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞;2) 分别将所述LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞放于微孔中用固定液固定、加入细胞冻存液后置于-80~-200℃保存。

[0021] 在本发明中所述LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞的制备方法包括以下步骤:A) 将携带GFP基因的重组LRP4全长DNA片段和表达EGFP基因的DNA片段分别重组到慢病毒载体pFUGW-H1中,获得 pFUGW-LRP4-GFP重组病毒和pFUGW-EGFP重组病毒; B) 将获得 pFUGW-LRP4-GFP重组病毒和pFUGW-EGFP重组病毒分别转染到HEK293细胞,分别获得LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞。

[0022] 在本发明中所述重组LRP4全长DNA片段是依据Genbank中hLPR4基因编码区(CDS)设计相应引物扩增后经双酶切获得,所述重组LRP4全长 DNA片段的具体序列如Seq ID No.1所示,所述引物优选的还根据载体质粒 pFUGW-H1的要求在引物中加入BamH1和EcoR1酶切位点,所述引物的具体序列优选的为ForwardprimerwithBamH1 (序列如Seq ID No.2所示):5' CGCGGATCCGCGATGAGGCGGCAGTGGGG 3',Reverse primerwith EcoR1 (序列如Seq ID No.3所示)5' CCGGAATCCGGGACCTGGCTCTCTGAGG 3'。在本发明中,所述扩增的 PCR程序优选的为:预变性94℃、3min,变性94℃、30s,退火55℃、30s,延伸72℃、1min,30个循环,72℃延伸5min。所述扩增体系优选的包括:rTaq 酶0.2μl,上下游引物各0.5μl,dNTP 0.8μl, rTaq酶buffer2μl,模板3μl,水 13μl。

[0023] 本发明在扩增完成后,优选的用1%琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物,根据电泳产物的大小初步鉴定,初步确定大小一致后,将获得电泳产物回收测序鉴定,若序列一致即为目标序列。

[0024] 本发明将扩增获得扩增产物pCMV6-LRP4经SgfI和MluI双酶切消化获得hLPR4。在本发明中所述双酶切的时间为3小时,温度为37℃。

[0025] 本发明在获得重组LRP4全长DNA片段后,在所述重组LRP4全长DNA 片段上连接GFP基因序列获得携带GFP基因;然后将所述携带GFP基因的重组LRP4全长DNA片段和表达EGFP基因的DNA片段分别用DNA连接酶与慢病毒载体pFUGW-H1连接,获得pFUGW-LRP4-GFP重组病毒和

[0026] pFUGW-EGFP重组病毒;本发明在所述连接前,优选的用BamH1和EcoR1 分别切割携带GFP基因的重组LRP4全长DNA片段、表达EGFP基因的DNA 片段与慢病毒载体pFUGW-H1。本发明中所述用DNA连接酶连接的温度为室温,时间为1小时。

[0027] 本发明在获得pFUGW-LRP4-GFP重组病毒和pFUGW-EGFP重组病毒后,优选的将所述pFUGW-LRP4-GFP重组病毒和pFUGW-EGFP重组病毒转化到感受态细胞DH5α中,扩增培养后用BamH1和EcoR1双酶切并测序,根据测序结果鉴定插入DNA片段的正确性。

[0028] 本发明在获得pFUGW-LRP4-GFP重组病毒和pFUGW-EGFP重组病毒后,将所述pFUGW-LRP4重组病毒和pFUGW-H1重组病毒分别转染到 HEK293细胞,获得LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞。本发明对所述转染的方法没有特殊限定,采用本领域常规方法即可,在本发明具体实施过程中,所述转染包括以下步骤:24孔板接种HEK293细胞  $2 \times 10^5$ /孔,24h后入分别加入预先混好的MOI=5的pFUGW-LRP4-GFP重组病毒和pFUGW-EGFP重组病毒2ml,37℃,5%CO<sub>2</sub>孵育箱中孵育12h后换正常培养基(所述正常培养基包括:88%

DMEM+10%FBS+1%L-glutamine+1% Streptomycin-Penicilline)继续培养,72h后在荧光显微镜下观察细胞转染情况,在应激光为蓝色(420~490nm)时,细胞表面呈现绿色荧光,即为转染成功。

[0029] 在本发明中,获得pFUGW-LRP4-GFP重组病毒和pFUGW-EGFP重组病毒后,优选的对其进行滴度测定。所述滴度测定前优选的首先分别将所述 pFUGW-LRP4-GFP重组病毒和pFUGW-EGFP重组病毒与慢病毒包装质粒复合体(pCMV-VSV-G和Delta8.9)及Lipofectamine 2000混合后转染HEK293 细胞。本发明在所述转染48h后进行固液分离,收集液相组分病毒颗粒。本发明中所述固液分离优选的为离心;所述离心的温度优选的为2~6℃,更优选的为4℃,所述离心的转速优选的为400~600r/min,更优选的为500r/min;所述离心的时间优选的为8~12min,更优选的为10min。

[0030] 本发明在所述离心获得液相组分后,优选的用0.45um滤器过滤收集病毒颗粒,将所述病毒颗粒浓缩后分装10μl/EP管,-70℃保存。

[0031] 本发明在获得所述病毒颗粒后,对其进行滴度测定,所述滴度测定具体包括以下步骤:24孔板接种HEK293细胞 $2 \times 10^5$ /孔,37℃,5%CO<sub>2</sub>孵育中培养至细胞50%。两种慢病毒颗粒分别以0.5、1、2、10、30μl感染HEK293细胞,72h后荧光显微镜下计数GFP阳性细胞数以计算病毒滴度。为避免误差,只选择GFP阳性细胞率为1%~30%孔进行计算,取各组平均值计算滴度。当所述滴度为 $5 \times 10^7 \sim 10^8$ TU/ml时用于转染HEK293T细胞获得重组细胞。

[0032] 本发明在获得LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞后,优选的采用流式细胞学筛选方法分别纯化LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞,本发明中所述流式细胞学筛选方法优选的使用流式细胞仪,所述流式细胞仪的参数设置FSC电压为15,SSC电压为351,FITC电压为424。本发明采用所述流式细胞学筛选方法的目的是纯化细胞,获得高纯度细胞,以利于后期包被到微孔板上的长期保存。

[0033] 本发明在获得LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞后,分别将所述LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞放于微孔中固定、加入细胞冻存液后置于-80~-200℃保存。在本发明中所述微孔板以行为单位,交替包被LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞。

[0034] 在本发明中所述包被优选的为将LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和 EGFP-HEK293T重组细胞按照说明书附图1所示接种于微孔板上,所述接种密度为 $0.8 \sim 1.2 \times 10^5$ /孔,所述接种48h小时后每孔细胞可铺满整个孔面积的 60~80%。

[0035] 在本发明中所述固定用固定液为质量浓度为3~5%的多聚甲醛,更优选的为4%的多聚甲醛;所述固定时间优选的为8~12min,更优选的为10min。

[0036] 本发明在所述固定完成后,向所述微孔中添加细胞冻存液后置于 -80~-200℃保存,本发明中所述细胞冻存液优选的为DMSO液(胎牛血清FBS: DMSO=9:1) 500μl (24孔板) 25μl (384孔板)。本发明所述的LRP4抗体细胞包被微孔板可以于-80~-200℃长期保存,在使用时置于37℃水浴快速解冻即可。

[0037] 本发明还提供了一种人LRP4抗体细胞免疫荧光检测试剂盒,包括上述 LRP4细胞包被微孔板,样品稀释液,阳性对照品、二抗和封闭液;所述LRP4 细胞包被微孔板为包被有LRP4-GFP-HEK293T重组细胞的微孔板。

[0038] 在本发明中所述样品稀释液优选的为以PBS为溶剂的体积浓度1.5~2.5%的羊血

清溶液,更优选的为以PBS为溶剂的体积浓度2%的羊血清溶液。在本发明中所述所述阳性对照品为羊抗兔LRP4抗体(Santa cruz)。本发明中所述二抗优选的为Alexa Fluor@568羊抗兔IgG(H+L)二抗和Alexa Fluor@568羊抗人IgG(H+L)二抗(Invitrogen)。本发明中所述二抗为市售商品。在本发明中,所述封闭液优选的为以PBS为溶剂体积浓度4.5~5.5%的羊血清溶液,更优选的为以PBS为溶剂的体积浓度5%的羊血清溶液。

[0039] 本发明中所述人LRP4抗体细胞免疫荧光检测试剂盒优选的在-80℃条件下保存;所述人LRP4抗体细胞免疫荧光检测试剂盒用于人LRP4抗体检测,检测所述LRP4抗体有助于重症肌无力疾病早期诊断及精准治疗。

[0040] 在本发明中所述人LRP4抗体细胞免疫荧光检测试剂盒的使用方法包括以下步骤:①从-80℃冰箱取出试剂盒,放置37℃水浴锅内快速解冻,加入0.2%TritonX-100破膜处理后,清洗2遍,5min/每遍。②加入封闭液,每孔400μl,室温封闭1小时。③一抗孵育:将一定滴度的待检标本和阳性对照(1:200)各400μl分别加入LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞,4℃过夜,12-16小时。④清洗一抗:弃一抗稀释液,加入0.01mM PBS洗5遍,每遍5min,于摇床上轻摇。⑤二抗孵育:避光条件下,加入400μl二抗稀释液(二抗:抗体稀释液=1:2000),室温2小时,于摇床上轻摇。⑥清洗二抗:避光下,弃二抗稀释液,加入0.01mM PBS洗5遍,每遍5min,于摇床上轻摇。⑦用PVA封片,室温放置48小时后,在荧光显微镜下观察(激发光波长分别为420-490nm和绿光568nm)。⑧根据红色荧光与绿色荧光是否重叠及荧光强度,判定结果。

[0041] 在本发明中,所述判定结果参考下述标准:(-)无荧光;(±)极弱的可疑荧光;(+)荧光较弱,但清晰可见;(++)荧光明亮;(+++~+++++)荧光闪亮)。阳性对照表现为红色荧光与绿色荧光相互重叠,且荧光强度为“+”及以上。若待检标本出现红色荧光与绿色荧光相互重叠,且荧光强度为“+”及以上,为阳性,若待检标本出现红色荧光与绿色荧光无重叠,且荧光强度为“+”以下为阴性。

[0042] 本发明在具体检测过程中,待检标本的初筛滴度优选的为1:40和1:100,若初筛阳性,则对该样品进行抗体滴度检测,即对抗体分别按照1:200、1:400、1:800、1:1000、1:1600、1:2000等进行滴度稀释,并根据荧光反应强度粗步判断,以能观察到明显特异性荧光反应(“+”)最高血清稀释度的倒数表示该血清的LRP4抗体滴度。

[0043] 下面结合实施例对本发明提供的一种LRP4抗体细胞包被微孔板及制备方法和人LRP4抗体细胞免疫荧光检测试剂盒进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0044] 实施例1

[0045] 一种LRP4抗体细胞包被微孔板,所述LRP4抗体细胞包被微孔板为Coverslip的24孔培养板,如附图1所示,以行为单位,交替包被有LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞,所述LRP4抗体细胞包被微孔板可于-80℃长期保存。

[0046] 制备方法:

[0047] (1).hLPR4基因克隆依据Genbank中hLPR4基因编码区(CDS)设计相应引物,根据载体质粒pFUGW-H1的要求在引物中加入BamH1和EcoR1。将pCMV6-LRP4经SgfI和MluI双酶切消化获得hLPR4。PCR扩增,反应条件:预变性94℃、3min,变性94℃、30s,退火55℃、30s,延伸72℃、1min,30个循环,72℃延伸5min。用1%琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物。

[0048] (2).慢病毒载体pFUGW-LRP4构建:慢病毒载体pFUGW-H1和目的片段分别经BamH1和EcoR1双酶切,用DNA连接酶连接,形成含GFP基因的克隆重组体。将连接产物转化为感受态细胞DH5 $\alpha$ ,扩增培养后用BamH1和EcoR1 双酶切鉴定,并测序鉴定插入DNA片段的正确性。

[0049] (3).重组慢病毒的包装和滴度测定:

[0050] ①包装慢病毒pFUGW-LRP4和pFUGW-H1:分别将重组慢病毒表达载体 pFUGW-LRP4和对照慢病毒载体pFUGW-H1与慢病毒包装质粒复合体 (pCMV-VSV-G和Delta8.9) 及Lipofectamine 2000混合后转染HEK293细胞。48h后收集病毒上清,4℃下500r/min离心10min弃去细胞碎片,上清液用 0.45 $\mu$ m滤器过滤收集病毒颗粒,浓缩后分装10 $\mu$ l/EP管,-70℃保存。②滴度测定:24孔板接种HEK293细胞 $2 \times 10^5$ /孔,37℃,5%CO<sub>2</sub>孵育中培养至细胞50%。两种慢病毒液分别以0.5、1、2、10、30 $\mu$ l感染HEK293细胞,72h后荧光显微镜下计数GFP阳性细胞数以计算病毒滴度。为避免误差,只选择GFP 阳性细胞率为1%-30%孔进行计算,取各组平均值计算滴度。

[0051] (4).感染HEK293细胞及其表达情况

[0052] 24孔板接种HEK293细胞 $2 \times 10^5$ /孔,24h后入分别加入预先混好的MOI=5的两种重组慢病毒完全培养液2ml (pFUGW-LRP4和pFUGW-H1),37℃,5%CO<sub>2</sub>孵育箱中孵育12h后换正常培养基继续培养,72h后在荧光显微镜下观察细胞转染情况。

[0053] (5)筛选

[0054] 将感染病毒72h后的两种HEK293T细胞 (pFUGW-LRP4和pFUGW-H1) 进行筛选。根据这pFUGW-LRP4/pFUGW-H1均携带GFP基因这一特点,分选出 GFP阳性细胞;而后大量培养该细胞并与液氮罐中保存。

[0055] 实施例2

[0056] 人LRP4抗体细胞免疫荧光检测试剂盒

[0057] 完整试剂盒包括以下部分:

[0058] ①LRP4细胞包被微孔板:将两种转染细胞按照如图样式接种到装有 Coverslip的24孔或无Coverslip384孔板培养,用4%多聚甲醛固定10分钟后,加入细胞冻存液,而后放置于-80℃冰箱长期保存。

[0059] ②样品稀释液:2%羊血清(正常羊血清+PBS液),用于制备不同滴度的待检样本。

[0060] ③阳性对照:羊抗兔LRP4抗体(Santa cruz)

[0061] ④二抗:AlexaFluor@568羊抗兔IgG (H+L) 二抗和AlexaFluor@568羊抗人IgG (H+L) 二抗

[0062] ⑤封闭液:5%羊血清(正常羊血清+PBS液)

[0063] 所述试剂盒的使用方法:

[0064] ①从-80℃冰箱取出试剂盒,放置37℃水浴锅内快速解冻,加入0.2%Triton X-100破膜处理后,清洗2遍,5min/每遍。

[0065] ②加入封闭液,每孔400 $\mu$ l,室温封闭1小时。

[0066] ③一抗孵育:将一定滴度的待检标本和阳性对照(1:200) 分别加入携带 pFUGW-LRP4和pFUGW-H1的HEK293细胞中,4℃过夜,12-16小时。

[0067] ③清洗一抗:弃一抗稀释液,加入0.01mM PBS洗5遍,每遍5min,于摇床上轻摇。

[0068] ④二抗孵育:避光条件下,加入400 $\mu$ l二抗稀释液(二抗:抗体稀释液=1:2000),室

温2小时,于摇床上轻摇。

[0069] ⑤清洗二抗:避光下,弃二抗稀释液,加入0.01mM PBS洗5遍,每遍5min,于摇床上轻摇。

[0070] ⑥用PVA封片,室温放置48小时后,在荧光显微镜下观察(激发光波长分别为420-490nm和绿光568nm)。

[0071] ⑦根据红色荧光与绿色荧光是否重叠及荧光强度,判定结果。

[0072] 阳性对照表现为红色荧光与绿色荧光相互重叠,且荧光强度为“+”及以上。

[0073] 若待检标本出现红色荧光与绿色荧光相互重叠,且荧光强度为“+”及以上,为阳性,反之为阴性。

[0074] 待检标本的初筛滴度为1:40和1:100,若初筛阳性,则对该样品进行抗体滴度检测,即对抗体分别按照1:200、1:400、1:800、1:1000、1:1600、1:2000 等进行滴度稀释,并根据荧光反应强度粗步判断为+++++,并以能观察到明显特异性荧光反应(“+”)最高血清稀释度的倒数表示该血清的LRP4抗体滴度。注:(-)无荧光;(±)极弱的可疑荧光;(+)荧光较弱,但清楚可见; (++)荧光明亮; (+++~+++++) 荧光闪亮)。

[0075] 由上述实施例可知,本发明通过构建长期稳定表达重组LRP4蛋白的重组细胞,并经流式细胞筛选,获取高纯度重组细胞,能够大批量培养,并将所述高纯度的重组细胞固定于微孔板上,可于-80℃冰箱长期保存。本发明通过提高重组细胞系的纯度,改进保存方法,制备现成CBA检测半成品试剂盒,降低检测成本,缩短抗体检测时间。

[0076] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

|        |                                                                         |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|
| [0001] | 序列表                                                                     |
| [0002] | <110> 首都医科大学宣武医院                                                        |
| [0003] | <120> 一种LRP4抗体细胞包被微孔板及制备方法和人LRP4抗体细胞免疫荧光检测试剂盒                           |
| [0004] | <160> 3                                                                 |
| [0005] | <170> SIPOSequenceListing 1.0                                           |
| [0006] | <210> 1                                                                 |
| [0007] | <211> 5715                                                              |
| [0008] | <212> DNA                                                               |
| [0009] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                         |
| [0010] | <400> 1                                                                 |
| [0011] | atgaggcggc agtggggcgc gctgctgctt ggcgccctgc tctgcgcaca cggcctggcc 60    |
| [0012] | agcagccccg agtgtgcttg tggtcggagc cacttcacat gtgcagttag tgctcttgga 120   |
| [0013] | gagtgtacct gcatccctgc ccagtggcag tgtgatggag acaatgactg cggggaccac 180   |
| [0014] | agcgatgagg atggatgtat actacctacc tgttccccctc ttgactttca ctgtgacaat 240  |
| [0015] | ggcaagtgca tccgccgctc ctgggtgtgt gacggggaca acgactgtga ggatgactcg 300   |
| [0016] | gatgagcagg actgtcccc cgggagtggt gaggaggacg agtttccctg ccagaatggc 360    |
| [0017] | tactgcatcc ggagtctgtg gactgcgat ggtgacaatg actgtggcga caacagcgat 420    |
| [0018] | gagcagtgtg acatgcgcaa gtgctccgac aaggagtcc gctgtagtga cggaagctgc 480    |
| [0019] | attgctgagc attggtactg cgacggtgac accgactgca aagatggctc cgatgaggag 540   |
| [0020] | aactgtccct cagcagtgc agcgcccccc tgcaacctgg aggagttcca gtgtgcctat 600    |
| [0021] | ggacgtgca tctcgcacat ctaccactgc gatggcgacg atgactgtgg agactggtca 660    |
| [0022] | gacgagtctg actgctcctc ccaccagccc tgccgctctg gggagtccat gtgtgacagt 720   |
| [0023] | ggcctgtgca tcaatgcagg ctggcgctgc gatggtgacg cggactgtga tgaccagtct 780   |
| [0024] | gatgagcgca actgcaccac ctccatgtgt acggcagaa agttccgctg tcaactcaggc 840   |
| [0025] | cgctgtgtcc gctgtcctg gcgctgtgat ggggaggacg actgtgcaga caacagcgat 900    |
| [0026] | gaagagaact gtgagaatac aggaagcccc caatgtgcct tggaccagtt cctgtgttgg 960   |
| [0027] | aatgggcgct gcattgggca gaggaagctg tgcaacgggg tcaacgactg tggtgacaac 1020  |
| [0028] | agcgacgaaa gcccacagca gaattgccgg ccccgacgg gtgaggagaa ctgcaatgtt 1080   |
| [0029] | aacaacggtg gctgtgcccc gaagtgcag atggtgcggg gggcagtgca gtgtacctgc 1140   |
| [0030] | cacacaggct accggtcac agaggatggg cacacgtgcc aagatgtgaa tgaatgtgcc 1200   |
| [0031] | gaggaggggt attgcagcca gggctgcacc aacagcgaag gggctttcca atgctggtgt 1260  |
| [0032] | gaaacaggct atgaactacg gcccagccgg cgcagctgca aggctctggg gccagagcct 1320  |
| [0033] | gtgctgctgt tcgccaatcg catcgacatc cggcaggtgc tgccacaccg ctctgagtac 1380  |
| [0034] | acactgctgc ttaacaacct ggagaatgcc attgccctg atttccacca ccgccgcgag 1440   |
| [0035] | cttgtcttct ggtcagatgt caccctggac cggatcctcc gtgccaacct caacggcagc 1500  |
| [0036] | aacgtggagg aggttgtgtc tactgggctg gagagcccag ggggcctggc tgttgattgg 1560  |
| [0037] | gtccatgaca aactctactg gaccgactca ggcacctga ggattgaggt ggccaatctg 1620   |
| [0038] | gacggggccc accggaaggt gttgctgtgg cagaacctgg agaagcccc ggccattgcc 1680   |
| [0039] | ttgcatccca tggagggtac catttactgg acagactggg gcaacacccc ccgtatttag 1740  |
| [0040] | gcctccagca tggatggctc tggacgccgc atcattgccg ataccatct cttctggccc 1800   |
| [0041] | aatggcctca ccatcgacta tgccgggcgc cgtatgtact gggatggatgc taagcaccat 1860 |

|        |                                                                    |      |
|--------|--------------------------------------------------------------------|------|
| [0042] | gtcatcgaga gggccaatct ggatgggagt caccgtaagg ctgtcattag ccagggcctc  | 1920 |
| [0043] | ccgcatccct tcgccatcac agtgtttgaa gacagcctgt actggacaga ctggcacacc  | 1980 |
| [0044] | aagagcatca atagcgctaa caaatttacg gggaagaacc aggaaatcat tcgcaacaaa  | 2040 |
| [0045] | ctccacttcc ctatggacat ccacaccttg cccccccagc gccaacctgc agggaaaaaac | 2100 |
| [0046] | cgctgtgggg acaacaacgg aggctgcacg cacctgtgtc tgcccagtgg ccagaactac  | 2160 |
| [0047] | acctgtgcct gcccacttg cttccgcaag atcagcagcc acgcctgtgc ccagagtctt   | 2220 |
| [0048] | gacaagttcc tgctttttgc ccgaaggatg gacatccgtc gaatcagctt tgacacagag  | 2280 |
| [0049] | gacctgtctg atgatgtcat cccactggct gacgtgcgca gtgctgtggc ccttgactgg  | 2340 |
| [0050] | gactcccggg atgaccacgt gtactggaca gatgtcagca ctgataccat cagcagggcc  | 2400 |
| [0051] | aagtgggatg gaacaggaca ggaggtggtg gtggatacca gtttgagag cccagctggc   | 2460 |
| [0052] | ctggccattg attgggtcac caacaaactg tactggacag atgcaggtag agaccggatt  | 2520 |
| [0053] | gaagtagcca acacagatgg cagcatgaga acagtactca tctgggagaa ccttgatcgt  | 2580 |
| [0054] | cctcgggaca tcgtggtgga acccatgggc gggtacatgt attggactga ctgggggtgcg | 2640 |
| [0055] | agccccaaga ttgaacgagc tggcatggat gcctcaggcc gccaaatcat tatctcttct  | 2700 |
| [0056] | aatctgacct ggcctaattg gttagctatt gattatgggt cccagcgtct atactgggt   | 2760 |
| [0057] | gacgccgga tgaagacaat tgaatttctt ggactggatg gcagtaagag gaaggtgctg   | 2820 |
| [0058] | attggaagcc agctcccca cccatttggg ctgacctct atggagagcg catctatttg    | 2880 |
| [0059] | actgactggc agaccaagag catacagagc gctgaccggc tgacagggtt ggaccgggag  | 2940 |
| [0060] | actctgcagg agaacctgga aaacctaatg gacatccatg tcttcaccg ccgccggccc   | 3000 |
| [0061] | ccagtgtcta caccatgtgc tatggagaat ggcggtgta gccacctgtg tcttaggtcc   | 3060 |
| [0062] | ccaaatccaa gcggttcag ctgtacctgc cccacaggca tcaacctgct gtctgatggc   | 3120 |
| [0063] | aagacctgct caccaggcat gaacagtctt ctcatcttcg ccaggaggat agacattcgc  | 3180 |
| [0064] | atggtctccc tggacatccc ttattttgct gatgtggtgg taccaatcaa cattaccatg  | 3240 |
| [0065] | aagaacacca ttgccgttgg agtagacccc caggaaggaa aggtgtactg gtctgacagc  | 3300 |
| [0066] | acactgcaca ggatcagtcg tgccaatctg gatggctcac agcatgagga catcatcacc  | 3360 |
| [0067] | acagggttac agaccacaga tgggctcgcg gttgatgcca ttggccggaa agtatactgg  | 3420 |
| [0068] | acagacacgg gaacaaaccg gattgaagtg ggcaacctgg acgggtccat gcggaaagt   | 3480 |
| [0069] | ttggtgtggc agaaccttga cagtccccg gccatcgtac tgtaccatga gatggggtt    | 3540 |
| [0070] | atgtactgga cagactgggg ggagaatgcc aagttagagc ggtccggaat ggatggctca  | 3600 |
| [0071] | gaccgcggcg tgctcatcaa caacaacctg ggatggccca atggactgac tgtggacaag  | 3660 |
| [0072] | gccagctccc aactgctatg ggccgatgcc cacaccgagc gaattgaggc tgctgacctg  | 3720 |
| [0073] | aatggtgcca atcggcatac attggtgtca ccggtgcagc acccatatgg cctcaccctg  | 3780 |
| [0074] | ctcgactcct atatctactg gactgactgg cagactcgga gcatccaccg tgctgacaag  | 3840 |
| [0075] | ggtactggca gcaatgtcat cctcgtgagg tccaacctgc caggcctcat ggacatgcag  | 3900 |
| [0076] | gctgtggacc gggcacagcc actaggtttt aacaagtgcg gctcgagaaa tggcggctgc  | 3960 |
| [0077] | tcccacctct gcttgccctg gccttctggc ttctcctgtg cctgccccac tggcatccag  | 4020 |
| [0078] | ctgaaggagg atgggaagac ctgtgatccc tctcctgaga cctacctgt cttctccagc   | 4080 |
| [0079] | cgtggctcca tccggcgtat ctactggac accagtgacc acaccgatgt gcatgtccct   | 4140 |
| [0080] | gttcctgagc tcaacaatgt catctccctg gactatgaca gcgtggatgg aaaggtctat  | 4200 |
| [0081] | tacacagatg tgttcctgga tgttatcagg cgagcagacc tgaacggcag caacatggag  | 4260 |
| [0082] | acagtgatcg ggcgagggt gaagaccact gacgggctgg cagtggactg ggtggccagg   | 4320 |
| [0083] | aacctgtact ggacagacac aggtcgaaat accattgagg cgtccaggct ggatggttcc  | 4380 |

|        |                                                                         |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|
| [0084] | tgccgcaaag tactgatcaa caatagcctg gatgagcccc gggccattgc tgttttcccc 4440  |
| [0085] | aggaaggggt acctcttctg gacagactgg ggccacattg ccaagatcga acgggcaaac 4500  |
| [0086] | ttggatggtt ctgagcggaa ggtcctcatc aacacagacc tgggttggcc caatggcctt 4560  |
| [0087] | accctggact atgatacccg caggatctac tgggtggatg cgcactctgga ccggatcgag 4620 |
| [0088] | agtgtgacc tcaatgggaa actgcggcag gtcttggtcg gccatgtgtc ccaccccttt 4680   |
| [0089] | gccctcacac agcaagacag gtggatctac tggacagact ggcagaccaa gtcaatccag 4740  |
| [0090] | cgtgttgaca aatactcagg ccggaacaag gagacagtgc tggcaaatgt ggaaggactc 4800  |
| [0091] | atggatatca tcgtggtttc ccctcagcgg cagacaggga ccaatgcctg tgggtgtgaac 4860 |
| [0092] | aatggtggct gcacccacct ctgctttgcc agagcctcgg acttcgtatg tgcctgtcct 4920  |
| [0093] | gacgaacctg atagccagcc ctgctccctt gtgcctggcc tggtagacc agctcctagg 4980   |
| [0094] | gctactggca tgagtgtgaaa gagcccagtg ctaccaaca caccacctac caccttgtat 5040  |
| [0095] | tcttcaacca cccggaccgg cagctctctg gaggaggtgg aaggaagatg ctctgaaagg 5100  |
| [0096] | gatgccaggc tgggcctctg tgcacgttcc aatgacgtg ttctgtctgc tccaggggaa 5160   |
| [0097] | ggacttcata tcagctacgc cattggtgga ctctcagta ttctgtgat tttggtggtg 5220    |
| [0098] | attgcagctt tgatgtgtga cagacacaaa aaatccaagt tcaatgatcc tggaatgggg 5280  |
| [0099] | aacctcacct acagcaaccc ctctaccga acatccacac aggaagtga gattgaagca 5340    |
| [0100] | atccccaac cagccatgta caaccagctg tgctataaga aagaggagg gcctgaccat 5400    |
| [0101] | aactacacca aggagaagat caagatcgta gagggaatct gcctcctgtc tggggatgat 5460  |
| [0102] | gctgagtggg atgacctcaa gcaactgcga agctcacggg ggggcctcct ccgggatcat 5520  |
| [0103] | gtatgcatga agacagacac ggtgtccatc caggccagct ctggctccct ggatgacaca 5580  |
| [0104] | gagacggagc agctgttaca ggaagagcag tctgagtgtg gcagcgtcca tactgcagcc 5640  |
| [0105] | actccagaaa gacgagctc tctgccagac acgggctgga aacatgaac caagctctcc 5700    |
| [0106] | tcagagagcc aggtc 5715                                                   |
| [0107] | <210> 2                                                                 |
| [0108] | <211> 29                                                                |
| [0109] | <212> DNA                                                               |
| [0110] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                         |
| [0111] | <400> 2                                                                 |
| [0112] | cgcggatccg cgatgaggcg gcagtgggg 29                                      |
| [0113] | <210> 3                                                                 |
| [0114] | <211> 29                                                                |
| [0115] | <212> DNA                                                               |
| [0116] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                         |
| [0117] | <400> 3                                                                 |
| [0118] | ccggaattcc gggacctggc tctctgagg 29                                      |

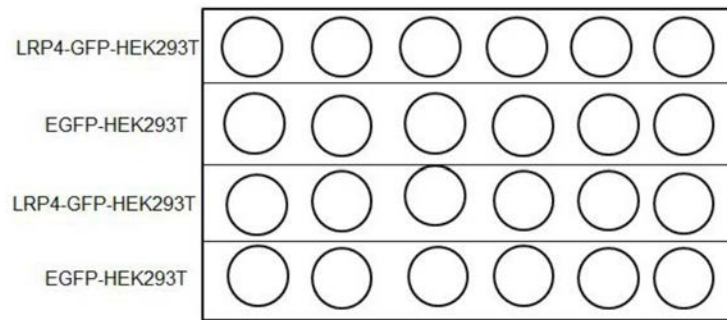


图1

|                |                                                                                    |         |            |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种LRP4抗体细胞包被微孔板制备方法                                                                |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN108387723B</a>                                                       | 公开(公告)日 | 2019-06-25 |
| 申请号            | CN201810048828.2                                                                   | 申请日     | 2018-01-18 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 首都医科大学宣武医院                                                                         |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 首都医科大学宣武医院                                                                         |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 首都医科大学宣武医院                                                                         |         |            |
| [标]发明人         | 陈志国<br>笪宇威<br>雷霖                                                                   |         |            |
| 发明人            | 陈志国<br>笪宇威<br>雷霖                                                                   |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/533 C12N5/10 C12N15/867 C12N15/12                                           |         |            |
| CPC分类号         | C07K14/705 C12N5/0686 C12N15/86 C12N2510/00 C12N2740/15043 C12N2800/107 G01N33/533 |         |            |
| 代理人(译)         | 刘奇                                                                                 |         |            |
| 审查员(译)         | 王晓媛                                                                                |         |            |
| 其他公开文献         | CN108387723A                                                                       |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                                     |         |            |

#### 摘要(译)

本发明提供了一种LRP4抗体细胞包被微孔板及制备方法和人LRP4抗体细胞免疫荧光检测试剂盒，属于疫检测技术领域，所述人LRP4抗体细胞免疫荧光检测试剂盒包括LRP4细胞包被微孔板，样品稀释液，阳性对照品、二抗和封闭液。本发明提供的LRP4抗体细胞包被微孔板上直接包被有LRP4-GFP-HEK293T重组细胞和EGFP-HEK293T重组细胞；避免了短时期内重复进行质粒转染、细胞接种、细胞培养等过程次数，进而降低每次检测的成本，缩短检测时间。

