



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110616193 B

(45) 授权公告日 2021.06.08

(21) 申请号 201910961094.1

(22) 申请日 2019.10.11

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110616193 A

(43) 申请公布日 2019.12.27

(83) 生物保藏信息

CGMCC No.17396 2019.03.07

(73) 专利权人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号江南大学食品学院生物界面与生物检测研究所

(72) 发明人 胥传来 陈雨汐 匡华 徐丽广

刘丽强 吴晓玲 宋珊珊 胡拥明

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
(普通合伙) 32104

代理人 时旭丹 张仕婷

(51) Int.Cl.

C12N 5/20 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

C07K 14/795 (2006.01)

C07K 1/107 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

审查员 冷千里

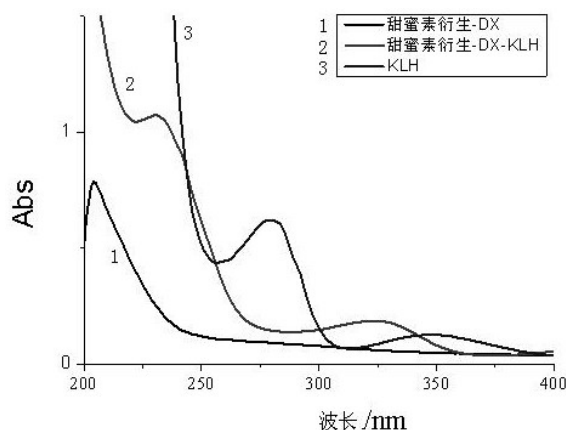
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

一株分泌抗甜蜜素单克隆抗体的杂交瘤细胞株BCB及其应用

(57) 摘要

一株分泌抗甜蜜素单克隆抗体的杂交瘤细胞株BCB及其应用,属于食品安全免疫检测领域。本发明制备的分泌抗甜蜜素单克隆抗体的杂交瘤细胞株BCB,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.17396。本发明将甜蜜素的完全抗原与等量弗氏佐剂混合乳化,通过多点注射免疫BALB/c小鼠,再经过间接竞争酶联免疫法筛选细胞并三次亚克隆,最终得到一株单克隆抗体杂交瘤细胞株BCB。细胞株BCB分泌的单克隆抗体,对甜蜜素具有较好的特异性和检测灵敏度(IC_{50} 值为283 ng/mL),可实现对保健食品中甜蜜素残留量的检测,为食品中甜蜜素残留的免疫检测提供了原料,具有实际应用价值。



1. 一株分泌抗甜蜜素单克隆抗体的杂交瘤细胞株BCB,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,分类命名为单克隆细胞株,保藏日期2019年3月7日,保藏编号CGMCC No.17396。

2. 抗甜蜜素单克隆抗体,其特征在于:它由权利要求1所述保藏编号为CGMCC No.17396的杂交瘤细胞株BCB分泌产生。

3. 权利要求2所述抗甜蜜素单克隆抗体的应用,其特征在于:用于食品安全检测中甜蜜素残留的分析检测。

一株分泌抗甜蜜素单克隆抗体的杂交瘤细胞株BCB及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一株分泌抗甜蜜素单克隆抗体的杂交瘤细胞株BCB及其应用,属于食品安全免疫检测领域。

背景技术

[0002] 甜蜜素(环己基氨基磺酸钠),在食品生产中常作为一种甜味剂添加于产品中。它是一种非营养型的合成甜味剂,为白色结晶粉末、味甜、无臭、易溶于水,几乎不溶于乙醇、氯仿等有机溶剂,甜度为白砂糖的30倍,为蔗糖的50倍,加热后略有苦味。其价格仅为蔗糖的三分之一,而且它不像糖精那样用量稍多时有苦味,因而作为国际通用的食品添加剂中可用于清凉饮料、果汁、冰激凌、糕点食品及蜜饯等中。

[0003] 但长期食用过量的甜蜜素会加重肝脏负担,并对肾脏有一定的毒副作用。有报道称,甜蜜素因在胃肠道内转化为环己胺,可能具有潜在的致癌性,能诱发膀胱癌。从发现甜蜜素至今,对人体健康是否存在伤害一直饱受争议,1969年美国国家科学院研究委员会收到有关甜蜜素:糖精的 10:1 混合物可致膀胱癌的动物实验证据,不久后美国食品与药物管理局即发出了全面禁止使用甜蜜素的命令。英、日、加拿大等国随后也禁用。我国也制定了国家标准来限制使用甜蜜素,但是甜蜜素用量超标现象还是时有发生。因此,为了我国食品出口贸易的正常进行,更为了人们的身体健康得到保障,研究更便捷、准确的甜蜜素检测方法,提高甜蜜素检测的灵敏度是至关重要的。

[0004] 现在国内外对食品中甜蜜素的检测方法主要有气相色谱法、比色法、高效液相色谱、离子色谱法等。但这些方法的样品前处理过程复杂,实验周期长,不适合大量样本的快速检测。基于酶联免疫分析方法(ELISA)简单、灵敏、快捷和高通量的优点,建立一种高效的甜蜜素免疫学检测方法很有必要,而建立此方法的一个重要前提即需筛选出针对甜蜜素的高特异性单克隆单体。

发明内容

[0005] 本发明的目的是克服上述不足之处,提供一株分泌抗甜蜜素单克隆抗体的杂交瘤细胞株BCB及其应用,由该细胞株制备的抗体对甜蜜素具有较好特异性和检测灵敏度,可以用来建立甜蜜素的免疫学检测方法。

[0006] 本发明的技术方案,一株分泌抗甜蜜素单克隆抗体的杂交瘤细胞株BCB,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,分类命名为单克隆细胞株,保藏日期2019年3月7日,保藏编号CGMCC No.17396。

[0007] 甜蜜素单克隆抗体,它由所述保藏编号为CGMCC No.17396的甜蜜素单克隆抗体杂交瘤细胞株BCB分泌产生。

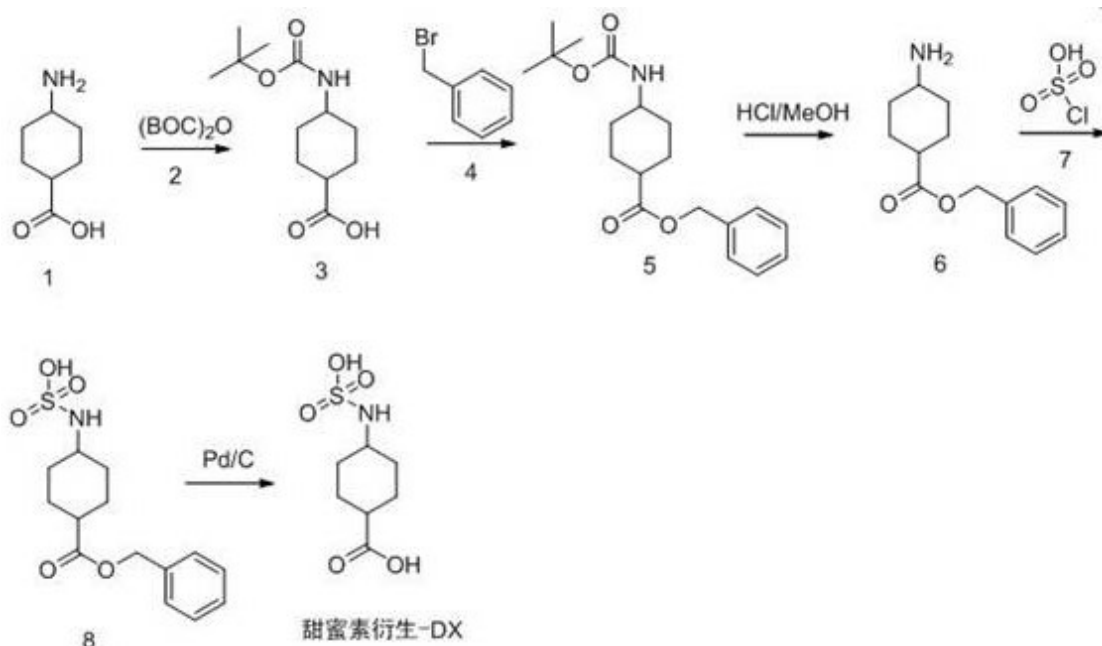
[0008] 一种甜蜜素人工抗原的合成方法,采用由甜蜜素,即环己基氨基磺酸钠衍生得到的产物作为半抗原,简称为甜蜜素衍生-DX;再用碳二亚胺法将半抗原甜蜜素衍生-DX与载

体蛋白偶联,即得到甜蜜素(环己基氨基磺酸钠)的人工抗原。

[0009] 本发明提供的甜蜜素单克隆抗体杂交瘤细胞株BCB的制备基本步骤为:

[0010] 1、半抗原 甜蜜素衍生-DX的制备:

[0011] 合成路线如下:



[0012]

[0013] 将化合物1(4-氨基环己羧酸)(1.5g, 10.5mmol), Et_3N (2.1 g, 21.0 mmol)加入到DCM(15 mL)中,氮气保护下滴加化合物2(3.4 g, 15.7 mmol)后升温至室温,反应过夜。向反应液中加水(50 mL),DCM(50 mL $\times$ 3)萃取,饱和食盐水洗一次,无水硫酸钠干燥,浓缩得化合物3;

[0014] 将化合物3(2.0 g, 8.2 mmol), Et_3N (1.7 g, 16.4 mmol)加入DCM(20 mL)中,氮气保护下降温至0℃,滴加化合物4(溴化苄)(2.1 g, 12.3 mmol)后升温至室温,反应过夜。向反应液中加水(100 mL),DCM(100 mL $\times$ 3)萃取,饱和食盐水洗一次,无水硫酸钠干燥浓缩过柱,浓缩得化合物5;

[0015] 将化合物5(2.2 g, 6.6 mmol), HCl/MeOH (3 mL),加入MeOH (20 mL)中,在室温下反应1h。减压浓缩得化合物6;

[0016] 将化合物6(1.3 g, 5.6 mmol), Et_3N (1.4 g, 14.0 mmol)加入DCM(20 mL)中,在氮气保护下降温至0℃,滴加化合物7(1.3 g, 11.2 mmol)后升温至室温,反应过夜。加水(50 mL),DCM萃取(50 mL $\times$ 3),饱和食盐水洗一次,无水硫酸钠干燥浓缩过柱,浓缩得化合物8;

[0017] 将化合物8(0.9 g, 2.9 mmol), Pd/C (0.1 g) 加入EA (10 mL)中,在室温下反应4h。过滤,滤饼用水(10 mL $\times$ 3)淋洗,EA和水减压浓缩得白色固体即为半抗原甜蜜素衍生-DX。

[0018] 2、甜蜜素(环己基氨基磺酸钠)人工抗原的合成,完全抗原甜蜜素衍生-DX-KLH的制备:

[0019] a、称取步骤(1)制备所得1.45mg 甜蜜素衍生-DX(甜蜜素衍生-DX与钥孔血蓝蛋白(KLH)摩尔比为6000:1),2.5mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),溶解于300 μL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,室温搅拌反应10min;再称取4.2mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐

(EDC),用100 μ L DMF充分溶解后,加入到甜蜜素衍生-DX溶液中,室温搅拌反应6-8 h(称为A液)。取10mg KLH,用2mL 0.01M硼酸盐缓冲溶液(BB,pH=8.6)溶解(称为B液),再逐滴将A液缓慢加入到B液中,室温反应过夜,得到偶联物甜蜜素衍生-DX-KLH混合液;

[0020] b、透析:取10cm的透析袋,于沸水中煮沸5min,再用60℃的去离子水冲洗3min,保存在4℃去离子水中备用;将偶联物甜蜜素衍生-DX-KLH混合液放入透析袋,并用pH=7.2、0.01M磷酸盐缓冲溶液PBS透析3天,每天换三次透析液,除去未反应的小分子半抗原,得到完全抗原甜蜜素衍生-DX-KLH,并通过紫外吸收扫描方法进行鉴定。

[0021] 3、甜蜜素(环己基氨基磺酸钠)人工抗原的鉴定:

[0022] (1)采用核磁共振和液质联用方法鉴定半抗原。

[0023] (2)采用紫外法鉴定人工抗原的偶联效果,利用偶联物中小分子与蛋白的浓度,计算其偶联比。

[0024] 偶联比测定:估算偶联物中被偶联的两种分子的比率(偶联比率)的方法,虽然测定方法种类很多,但都是依据检测偶联物中被偶联的两种分子含量(或相对含量)的原理建立起来的。紫外法是依据合成的人工抗原中的分子的摩尔浓度与蛋白的摩尔浓度的比确定偶联比的。

[0025] 偶联比=偶联物中小分子的摩尔浓度/偶联物中蛋白的摩尔浓度。

[0026] 4、分泌抗甜蜜素单克隆抗体的杂交瘤细胞株的制备:

[0027] (1)小鼠的免疫:将甜蜜素衍生-DX-KLH完全抗原与等量弗氏佐剂混合乳化后,对BALB/c小鼠进行颈背部皮下多点注射免疫(冲刺免疫除外)。首次免疫用完全弗氏佐剂,剂量为100 μ g/只;多次加强免疫用不完全弗氏佐剂且剂量减半即为50 μ g/只;冲刺免疫不用佐剂,直接用生理盐水稀释后腹腔注射,剂量再减半即为25 μ g/只。首次免疫与第二次加强免疫之间间隔一个月,多次加强免疫之间间隔21天,冲刺免疫与最后一次加强免疫之间间隔18-21天。通过间接竞争酶联免疫法(ic-ELISA)观测小鼠免疫效果即检测小鼠血清的效价和抑制;

[0028] (2)细胞融合与细胞株建立:通过聚乙二醇(PEG 4000)法将小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞进行融合,采用选择性培养基(HAT培养基)筛选出杂交瘤细胞,并用HT培养基进行细胞培养。融合一周后利用ic-ELISA法检测阳性细胞孔,并进一步利用ic-ELISA法测定阳性细胞孔的抑制效果,通过有限稀释法对抑制较好的阳性细胞孔进行亚克隆,一周后再次检测、挑孔、亚克隆。按上述方法进行三次亚克隆后获得甜蜜素的高分泌特异抗体的单克隆杂交瘤细胞株BCB;

[0029] (3)杂交瘤细胞株性质的鉴定:通过ic-ELISA测定灵敏度和特异性。

[0030] 所述甜蜜素单克隆抗体的应用,用于食品安全检测中甜蜜素残留的分析检测。

[0031] 本发明的有益效果:本发明成功合成了甜蜜素(环己基氨基磺酸钠)的人工抗原,合成步骤简单、安全、有效,完全可用于免疫分析中,为以后的研究提供了必需的人工抗原。

[0032] 本发明提供的细胞株BCB分泌的单克隆抗体,对甜蜜素具有较好的特异性和检测灵敏度(IC₅₀值为283ng/mL),可实现对保健食品中甜蜜素残留量的检测,为食品中甜蜜素残留的免疫检测提供了原料,具有实际应用价值。

[0033] 生物材料样品保藏:一株分泌抗甜蜜素单克隆抗体的杂交瘤细胞株BCB,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中

国科学院微生物研究所,保藏编号为CGMCC No.17396,分类命名为单克隆细胞株,保藏日期为2019年3月7日。

附图说明

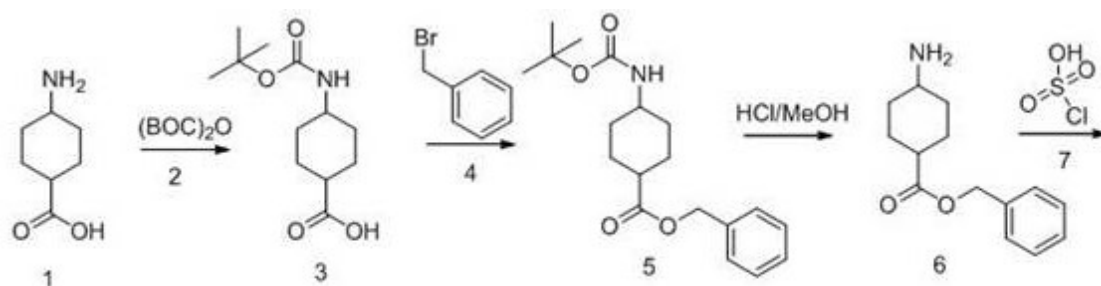
- [0034] 图1半抗原 甜蜜素衍生-DX的NMR鉴定图。
 [0035] 图2-a甜蜜素衍生-DX的LC鉴定图。
 [0036] 图2-b甜蜜素衍生-DX的MS鉴定图。
 [0037] 图3 甜蜜素衍生-DX-KLH人工抗原的免疫原紫外鉴定图。
 [0038] 图4 单克隆抗体BCB对甜蜜素的标准抑制曲线。

具体实施方式

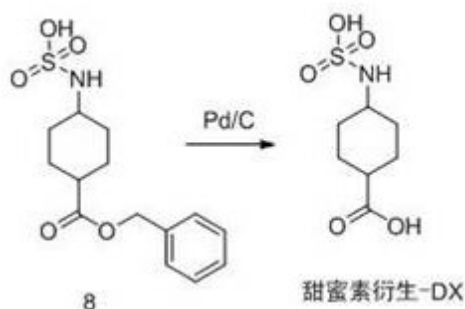
[0039] 本发明下面的实施例仅作为本发明内容的进一步说明,不能作为本发明的限定内容或范围。下面通过实施例对本发明作进一步说明。

[0040] 本发明通过合成甜蜜素人工抗原,合成的甜蜜素完全抗原免疫小鼠,通过细胞融合,HAT选择性培养基培养,通过ic-ELISA筛选细胞上清,最终得到了针对甜蜜素具有高分泌特异性抗体的杂交瘤细胞株BCB。

[0041] 实施例1 半抗原甜蜜素衍生-DX的合成



[0042]



[0043] 将1.5g (10.5mmol) 4-氨基环己羧酸(化合物1), Et_3N (2.1 g, 21.0 mmol) 加入到DCM (15 mL) 中, 氮气保护下滴加化合物2 (3.4 g, 15.7 mmol) 后升温至室温反应过夜。向反应液中加水 (50 mL), DCM (50 mL $\times$ 3) 萃取, 饱和食盐水洗一次, 无水硫酸钠干燥, 浓缩得化合物3;

[0044] 将化合物3 (2.0 g, 8.2 mmol), Et_3N (1.7 g, 16.4 mmol) 加入DCM (20 mL) 中, 氮气保护下降温至0℃滴加化合物4 (溴化苄) (2.1 g, 12.3 mmol) 后升温至室温反应过夜。向反应液中加水 (100 mL), DCM (100 mL $\times$ 3) 萃取, 饱和食盐水洗一次, 无水硫酸钠干燥浓缩过柱, 浓缩得化合物5;

[0045] 将化合物5 (2.2 g, 6.6 mmol), HCl/MeOH (3 mL), 加入MeOH (20 mL) 中, 在室温下反应1h。减压浓缩得化合物6;

[0046] 将化合物6 (1.3 g, 5.6 mmol), Et₃N (1.4 g, 14.0 mmol) 加入DCM (20 mL) 中, 在氮气保护下降温至0℃滴加化合物7 (1.3 g, 11.2 mmol) 后升温至室温反应过夜。加水 (50 mL), DCM萃取 (50 mL×3), 饱和食盐水洗一次, 无水硫酸钠干燥浓缩过柱, 浓缩得化合物8;

[0047] 将化合物8 (0.9 g, 2.9 mmol), Pd/C (0.1 g) 加入EA (10 mL) 中, 在室温下反应4h。过滤, 滤饼用水 (10 mL×3) 淋洗, EA和水减压浓缩得白色固体即为半抗原甜蜜素衍生-DX。

[0048] 实施例2 甜蜜素完全抗原的合成

[0049] 所述完全抗原甜蜜素衍生-DX-KLH的制备方法如下:

[0050] a、称取步骤(1)取1.45mg 甜蜜素衍生-DX (甜蜜素衍生-DX与钥孔血蓝蛋白 (KLH) 摩尔比为6000:1), 2.5mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 溶解于300μL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 室温搅拌反应10min; 再称取4.2mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC), 用100μL DMF充分溶解后, 加入到甜蜜素衍生-DX溶液中, 室温搅拌反应6-8 h (称为A液)。取10mg KLH, 用2mL 0.01M硼酸盐缓冲溶液 (BB, pH=8.6) 溶解 (称为B液), 再逐滴将A液缓慢加入到B液中, 室温反应过夜, 得到偶联物甜蜜素衍生-DX-KLH混合液;

[0051] b、透析: 取10cm的透析袋, 于沸水中煮沸5min, 再用60℃的去离子水冲洗3min, 保存在4℃去离子水中备用; 将偶联物甜蜜素衍生-DX-KLH混合液放入透析袋, 并用pH=7.2、0.01M磷酸盐缓冲溶液PBS透析3天, 每天换三次透析液, 除去未反应的小分子半抗原, 得到完全抗原甜蜜素衍生-DX-KLH, 并通过紫外吸收扫描方法进行鉴定。

[0052] 实施例3 甜蜜素人工抗原的鉴定

[0053] (1) 采用核磁共振和液质联用技术鉴定半抗原。

[0054] (2) 人工抗原采用紫外法鉴定其偶联结果, 利用偶联物中小分子与蛋白的浓度, 计算其偶联比。

[0055] 偶联比测定: 估算偶联物中被偶联的两种分子的比率 (偶联比率) 的方法, 虽然测定方法种类很多, 但都是依据检测偶联物中被偶联的两种分子含量 (或相对含量) 的原理建立起来的。紫外法是依据合成的人工抗原中的小分子浓度与蛋白浓度的比确定偶联比的。

[0056] 实施例2中免疫原甜蜜素衍生-DX-KLH的紫外鉴定图如图3所示;

[0057] 计算其偶联比为9.8。

[0058] 实施例4 杂交瘤细胞株BCB的制备

[0059] (1) 完全抗原的合成: 称取1.45mg 甜蜜素衍生-DX (甜蜜素衍生-DX与牛血清白蛋白 (BSA) 摩尔比为6000:1), 2.5mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 溶解于300μL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 室温搅拌反应10min; 再称取4.2mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC), 用100μL DMF充分溶解后, 加入到甜蜜素衍生-DX溶液中, 室温搅拌反应6-8 h (称为A液)。取10mg KLH, 用2mL 0.01M硼酸盐缓冲溶液 (BB, pH=8.6) 溶解 (称为B液), 再逐滴将A液缓慢加入到B液中, 室温反应过夜; 然后用0.01M PBS溶液透析, 除去未反应的小分子半抗原, 得到完全抗原甜蜜素衍生-DX-KLH, 并通过紫外吸收扫描方法进行鉴定;

[0060] (2) 动物免疫: 将甜蜜素衍生-DX-KLH完全抗原与等量弗氏佐剂混合乳化后, 对BALB/c小鼠进行颈背部皮下多点注射免疫 (冲刺免疫除外)。首次免疫用完全弗氏佐剂, 剂

量为100 μ g/只;多次加强免疫用不完全弗氏佐剂且剂量减半即为50 μ g/只;冲刺免疫不用佐剂,直接用生理盐水稀释后腹腔注射,剂量再减半即为25 μ g/只。首次免疫与第二次加强免疫之间间隔一个月,多次加强免疫之间间隔21天,冲刺免疫与最后一次加强免疫之间间隔18-21天。通过间接竞争酶联免疫法(ic-ELISA)观测小鼠免疫效果即检测小鼠血清的效价和抑制;

[0061] (3)细胞融合:在冲刺免疫三天后,按照常规PEG(聚乙二醇,分子量为4000)方法进行细胞融合,具体步骤如下:

[0062] a、小鼠摘眼球取血,颈椎脱臼法处死小鼠后,立即放入 75% 酒精中消毒,浸泡 5 min左右,无菌操作取出小鼠的脾脏,用注射器胶头适度研磨并通过200目细胞筛网得到脾细胞悬液,收集,离心(1200rpm,8 min),用RPMI-1640培养基洗涤脾细胞三次,最后一次离心后,将脾细胞稀释到一定体积,计数,备用;

[0063] b、收集SP2/0细胞:融合前 7-10 天,将 SP2/0 瘤细胞用含10% FBS(胎牛血清)RPMI-1640培养基在5% CO₂培养箱中培养。融合前要求SP2/0瘤细胞数量达到 (1-4)*10⁷,保证融合前SP2/0瘤细胞处于对数生长期。融合时,收集瘤细胞,悬浮于RPMI-1640基础培养液中,进行细胞计数;

[0064] c、融合过程7min: 第1min,将1mL的PEG 4000 由慢到快滴加到细胞中;第2min,静置。第3min 和第4min,在1min内滴加1mL RPMI-1640培养基;第5min 和第6min,在1min内滴加2mL RPMI-1640培养基;第7min,每10s 滴加1mL 的 RPMI-1640培养基。然后37℃温浴5 min。离心(800 rpm,10 min),弃上清,细胞轻轻敲散,并向其内加入含20%胎牛血清,2% 50 $\times$ HAT的RPMI-1640选择性培养基(HAT培养基),按照200 μ L/ 孔加到 96 孔细胞板,置于37℃,5% CO₂培养箱中培养。

[0065] (4)细胞筛选与细胞株建立:在细胞融合后的第3天用HAT培养基对融合细胞进行半换液;第5天用含20% 胎牛血清,1%的100 $\times$ HT的RPMI-1640过渡培养液(HT培养基)进行全换液;第7天取细胞上清进行筛选。筛选分两步:第一步先用ic-ELISA法筛选出阳性细胞孔,第二步选用甜蜜素为标准品,用ic-ELISA法对阳性细胞进行抑制效果测定。选择对甜蜜素标准品有较好抑制的细胞孔,采用有限稀释法进行亚克隆,七天后用同样的方法进行检测。按上述方法进行三次亚克隆,最终获得甜蜜素单克隆抗体细胞株BCB。

[0066] (5)单克隆抗体的制备与鉴定:取8-10周龄BALB/c小鼠,每只小鼠腹腔注射无菌石蜡油1mL;7天后每只小鼠腹腔注射1 $\times$ 10⁶ 甜蜜素杂交瘤细胞,从第七天开始收集腹水,将腹水通过辛酸-饱和硫酸铵法进行抗体纯化。在偏酸条件下,正辛酸可以沉淀腹水中除IgG免疫球蛋白外的其他杂蛋白,然后离心,弃沉淀;再用等量饱和度的硫酸铵溶液沉淀 IgG型的单克隆抗体,离心,弃上清,用0.01 M PBS溶液(pH7.4)溶解后,透析脱盐,最终得到纯化后的单克隆抗体置于-20℃保存;

[0067] 5.1包被:将包被原甜蜜素衍生-DX-BSA用0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液从1 μ g/mL开始3倍比稀释,100 μ L/孔,37℃反应2h;

[0068] 5.2洗涤:将板内溶液倾去,并用洗涤液洗涤3次,每次3min;

[0069] 5.3封闭:拍干后,加入200 μ L/孔封闭液,37℃反应2h。洗涤后烘干备用;

[0070] 5.4加样:将抗血清从1:1000开始倍比稀释,并加入到各稀释度的包被孔中,100 μ L/孔,37℃反应30min;充分洗涤后,加入1:3000稀释的HRP-羊抗鼠IgG,100 μ L/孔,37℃反应

30min;

[0071] 5.5显色:将酶标板取出,充分洗涤后,每孔加入100 μ L的TMB显色液,37 $^{\circ}$ C避光反应15min;

[0072] 5.6终止和测定:每孔加入50 μ L终止液以终止反应,然后用酶标仪测定各孔的OD450值。

[0073] 用ic-ELISA测定单克隆抗体甜蜜素的IC₅₀为:283ng/mL,说明对甜蜜素有很好的灵敏度,可用于甜蜜素免疫分析检测。

[0074] 溶液的配制:

[0075] 碳酸盐缓冲液(CBS):称取Na₂CO₃ 1.59 g,NaHCO₃ 2.93 g,分别溶于少量双蒸水后混合,加双蒸水至约800mL混匀,调pH值至9.6,加双蒸水定容至1000mL,4 $^{\circ}$ C贮存备用;

[0076] 磷酸盐缓冲液(PBS):8.00g NaCl,0.2g KCl,0.2g KH₂PO₄,2.9g Na₂HPO₄·12 H₂O,溶于800mL纯水中,用NaOH或HCl调pH到7.2~7.4,定容至1000mL;

[0077] PBST:含0.05 % 吐温20的PBS;

[0078] TMB显色液:A液:Na₂HPO₄·12H₂O 18.43g,柠檬酸 9.33g,纯水定容至1000mL;B液:60mg TMB 溶于100mL乙二醇中。A、B液按体积比5:1混合即为TMB显色液,现用现混。

[0079] 综上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并非用来限定本发明的实施范围。即凡依本发明申请范围的内容所作的等效变化与修饰,都应为本发明的技术范畴。

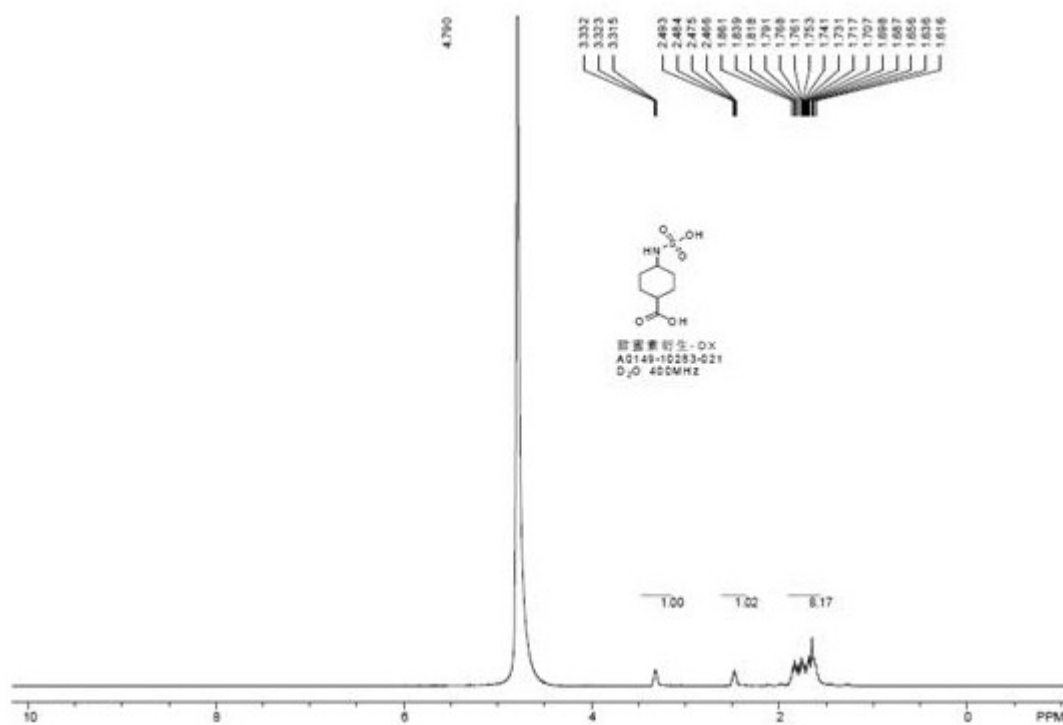


图1

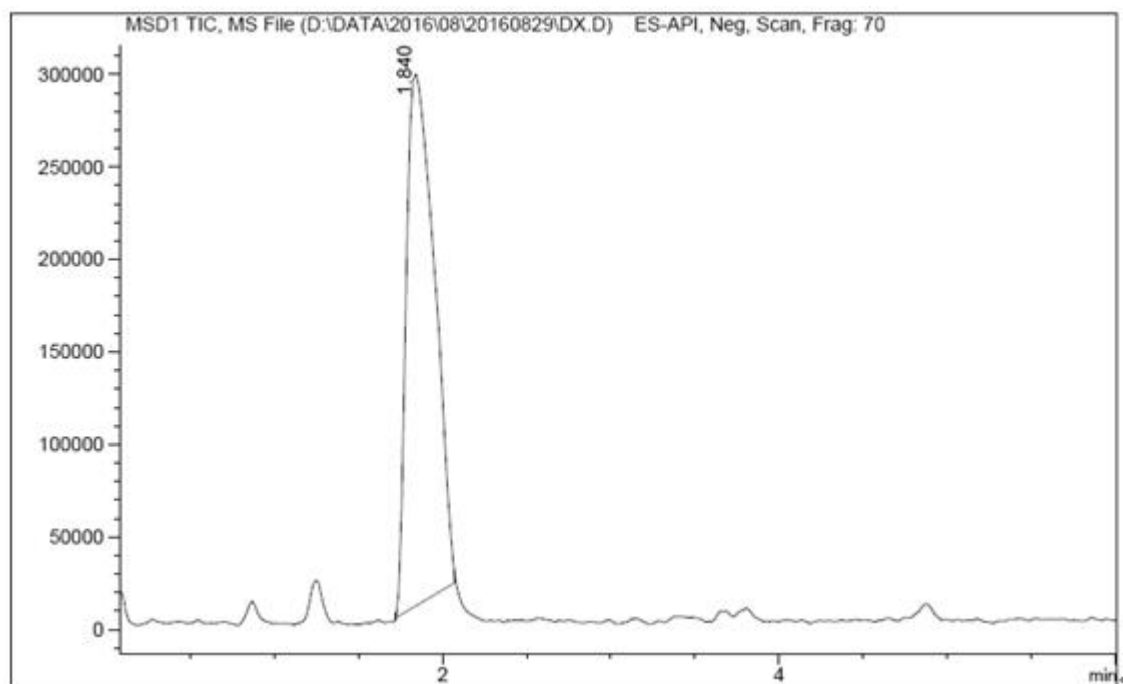


图2-a

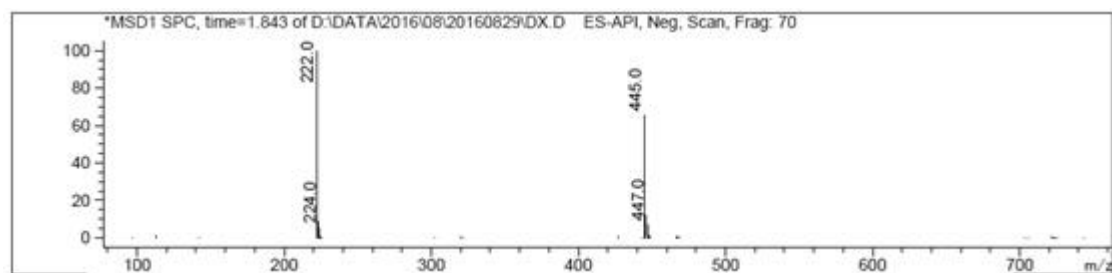


图2-b

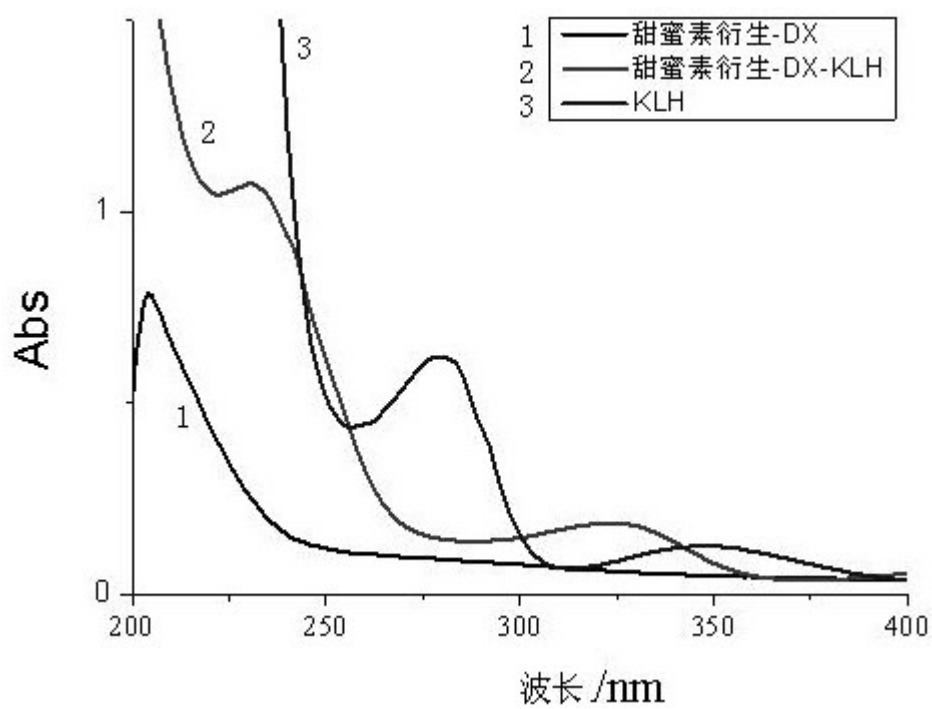


图3

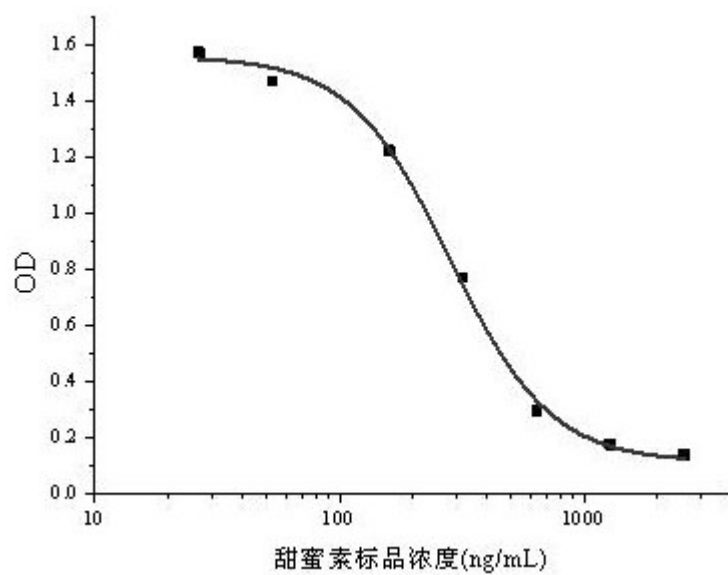


图4