



(43)申请公布日 2017.10.17

权利要求书2页 说明书6页 附图3页

96孔酶标板

60μl 酶标二抗 (1IU/ml) 包被, 并放置 4℃冰箱过夜

PEST清洗3次
60-90秒/次

4种不同封闭试剂中
任意一种进行封闭

a. 0.5%脱脂奶粉 (2.5μl)
b. 2.5%牛血清白 (BSA) (1h)
c. 3%胎牛血清 (FBS) (1h)
d. 2.5%牛血清白蛋白 (BSA) (1h)

PEST清洗3次
60-90秒/次

孵育一抗: 添加预先孵育的 PSH α 抗体与标本或供试样品混合溶液, 并放置 4℃冰箱无震荡孵育 48h

PEST清洗5次
60-90秒/次

孵育酶标二抗: 羊抗鼠-HRP 抗体稀释溶液, 并放置 37℃ 避光孵育 40min

PEST清洗5次
60-90秒/次

TMB显色, 并放置 37℃ 避光孵育 8-12min

2M 硫酸终止反应

检测

标准品或供试样品 吸光度读取

原始数据处理

Excel软件和 Graph Pad Prism 5 软件

导出

标准曲线和 供试样品剂量-反应曲线

酶标二抗: 450nm

1. 一种检测与量化人促卵泡激素体外生物学活性的同源竞争酶联免疫分析法,其特征 在于:包括以下步骤:

(1) 抗原包被:96孔酶标板中包被60ul/well尿源促卵泡激素(丽申宝)溶液(1IU/ml or 1000IU/L),放置4℃冰箱过夜;同时同一酶标板中用磷酸盐缓冲液PBS (PH7.2-7.4) 分别包被5孔作非特异性结合组和4孔作空白对照组;

(2) 封闭:第二天,用PBS包含0.05% Tween-20 (PBST) 清洗酶标板3次,每次60-90秒,随后可以采用以下4种任意一种封闭方式进行封闭:a) 5%的脱脂奶粉(320ul/well) 封闭,37℃避光孵育2.5h;b) PBST包含3%的胎牛血清(FBS) (320ul/well) 封闭,37℃避光孵育1h;c) PBST包含2%的牛血清蛋白(BSA) 封闭(320ul/well),37℃避光孵育1h;d) PBS包含2.5%的正常羊血清(NGS) (320ul/well) 封闭,37℃避光孵育1h;

(3) 孵育一抗:在分配到封闭好的酶标板前,50ul尿源促卵泡激素标品(丽申宝)、50ul 重组促卵泡激素(果纳芬)和50ul其他促卵泡激素供试样品分别预先与50ul的单克隆anti-FSH α 抗体稀释液(最终稀释浓度为1:24000)在1.5ml离心管中,放置4℃冰箱孵育过夜;尿源促卵泡激素(丽申宝)既是作包被抗原也作促卵泡激素标品,标准曲线检测范围设置在0.015-1.98IU/ml。随后分别将100ul anti-FSH α 抗体与尿源促卵泡激素混合液、100ul anti-FSH α 抗体与重组促卵泡激素混合液、100ul anti-FSH α 抗体与其他促卵泡激素样品混合液加入到用PBST清洗3次的封闭好的酶标板中,放置4℃冰箱无震荡孵育48h;最大吸光值(B_0)和非特异性结合(NBS)只接受100ul单克隆anti-FSH α 抗体最终稀释溶液(1:24000),空白对照组直接添加PBS溶液;

(4) 孵育酶标二抗:用PBST清洗酶标板5次,每次60-90秒,清洗完后每孔添加100ul羊抗鼠-HRP抗体稀释液(用PBS稀释,1:3000),37℃避光孵育40min;

(5) 颜色反应:用PBST清洗酶标板5次,每次60-90秒,清洗完后每孔添加100ul TMB显色液,37℃避光孵育8-10min,随后添加2M 50ul/well的硫酸终止反应,使用酶标仪(Thermo Labsystem MK-3)在450nm读取吸光值;

(6) 原始数据处理:将原始数据导入Excel软件初步处理,随后利用GraphPad Prism 5 软件进一步处理,以标品和供试样品的浓度为横坐标,对应的450nm下吸光比值(B_i/B_0)为纵坐标,绘制标准曲线和供试样品的剂量-反应曲线,同时利用Origin pro 8软件进行拟合线性回归分析。

2. 如权利要求1所述的一种检测与量化人促卵泡激素体外生物学活性的同源竞争酶联免疫分析法,其特征 在于:步骤(1)中丽申宝(75IU)最初用无菌蒸馏水(250ul)稀释为300IU/ml储备母液,并-20℃储存备用;用时将储备母液用PBS (PH7.2-7.4) 稀释为1IU/ml。

3. 如权利要求1所述的一种检测与量化人促卵泡激素体外生物学活性的同源竞争酶联免疫分析法,其特征 在于:步骤(3)中先将稀释好的标品或样品用移液枪移入小离心管中,随后再加入稀释好的anti-FSH α 抗体溶液(1:12000),切记不要混匀,放置4℃冰箱孵育过夜即可,此步骤与包被抗原同步进行;添加抗体-标品或样品混合液时,用移液枪混匀后再加入到封闭好的酶标板中;48h孵育过程中切记请勿震荡。

4. 如权利要求1所述的一种检测与量化人促卵泡激素体外生物学活性的同源竞争酶联免疫分析法,其特征 在于:步骤(6)中对于超过最大吸光值(B_0)的抑制检测值(B_i)视为无效检测值,不做统计和数据处理。

5. 如权利要求1所述的一种检测与量化人促卵泡激素体外生物学活性的同源竞争酶联免疫分析法,其特征在于:包括如下步骤:

人尿源促卵泡激素(丽申宝,75IU)采用250ul无菌水稀释为0.3IU/ul或300IU/ml储备品于-20℃保存备用;

尿源促卵泡激素包被:96孔酶标板中每孔包被60ul尿源促卵泡激素(丽申宝)溶液(1IU/ml,即300IU/ml的储备品用PBS (PH7.2-7.4) 稀释为1IU/ml的包被抗原工作液),另外用PBS分别包被5孔为非特异性结合组和包被4孔为空白对照组,随后放置4℃冰箱过夜;

尿源促卵泡激素既作包被抗原,也作竞争抗原来绘制标准曲线,首先把10.56ul的尿源促卵泡激素标品-丽申宝(300IU/ml)在小离心管(1.5ml)用790ul PBS溶液稀释为3.96IU/ml,然后依次在小离心管中按倍比稀释成梯度;随后,往每个梯度的标品溶液的小离心管(1.5ml)中添加等体积的anti-FSH α 抗体溶液(一抗初始按1:12000用PBS溶液稀释,混合后最终稀释比例为1:24000,)【anti-FSH α 抗体(一抗) 初始稀释按1:12000用PBS溶液进行稀释,待与尿源促卵泡激素标品等体积混合后,一抗最终稀释比例则为1:24000】,随后放置4℃冰箱过夜(这一步同前一步骤同时进行),整个标准曲线范围为0.0155IU/ml---1.98IU/ml;

封闭试剂进行封闭:第二天,用PBS包含0.05%Tween-20 (PBST) 清洗酶标板3次,每次60-90秒,随后可以采用5%的脱脂奶粉(320ul/well) 封闭,37℃避光孵育2.5h;

孵育单克隆anti-FSH α 抗体和人尿源促卵泡激素混合液:从1.5ml小离心管中取出100ul鼠源anti-FSH α 抗体和尿源促卵泡激素混合液【即将上述在1.5ml离心管中预先4℃孵育过夜的单克隆anti-FSH α 抗体和人尿源促卵泡激素混合液】添加到用PBST清洗3次的已封闭好的酶标板中,每个梯度的一抗-标品混合液重复3孔,随后放置4℃冰箱无震荡孵育48h,最大吸光值(B_0) 和非特异性结合(NBS) 只接受100ul单克隆anti-FSH α 抗体最终稀释溶液(1:24000),空白对照组直接添加100ul PBS;

孵育羊抗鼠-HRP酶标二抗:用PBST清洗酶标板5次,每次60-90秒,清洗完后每孔添加100ul羊抗鼠-HRP抗体(用PBS稀释,1:3000)【羊抗鼠-HRP酶标二抗按1:3000用PBS溶液稀释成工作液】,37℃避光孵育40min;

颜色反应和反应终止:用PBST清洗酶标板5次,每次60-90秒。清洗完后每孔添加100ul TMB显色液(索莱宝公司;商品目录号PR1210),37℃避光孵育8-10min,随后添加2M 50ul/well的硫酸终止反应,使用酶标仪(Thermo Labsystem MK-3) 在450nm读取吸光值;

原始数据处理和绘制标准曲线:把酶标仪读取的原始数据导入Excel软件中,计算每个梯度每一孔与最大吸光值(均值) 的比值(即 B_i/B_0),然后以 B_i/B_0 为纵坐标,尿源促卵泡激素(丽申宝) 标品稀释浓度梯度为横坐标,利用GraphPad Prism 5软件绘制出标准曲线。同时,采用Origin pro 8进行拟合线性回归分析。

一种检测与量化人促卵泡激素体外生物学活性的同源竞争酶联免疫分析法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药工程与技术领域,特别是涉及一种用于检测与量化人促卵泡激素药物体外生物活性的同源竞争酶联免疫分析法。

背景技术

[0002] 促卵泡激素(FSH)是垂体前叶嗜碱性细胞合成和分泌的一种由两个亚基通过非共价键结合形成的异源二聚体糖蛋白类促性腺激素。它与人类某些疾病(如不孕不育、绝经后乳腺癌、卵巢癌等)密切相关,常用于临床辅助治疗用药。以及其具有较高的社会经济价值,广泛的应用在畜牧业(如牛羊)、水产业(如渔业)等领域。

[0003] 当前,有两类商业化的促卵泡生长激素药物产品均可在市场上获得:一类是尿源促卵泡激素(uFSH),主要是从绝经妇女尿液中提取纯化获得,如瑞士Serono公司的TERTINEX/METRODIN(1986),Ferring公司的BRAVELLE(2002),以及我国丽珠集团的丽申宝(2010)。另一类是重组促卵泡激素(rFSH),主要是利用基因工程技术和细胞培养工艺来制备重组促卵泡激素生物制品,如瑞士Serono公司的GONAL-F(1995)、GONAL-F RFF(2004)和GONAL-F RFF PEN(2004),以及荷兰Organon公司的PUREGON(1996)、FOLLISTIM AQ(2004)和ELONVA(2010)。

[0004] 近几年来,随着市场需求的增加,迫切需要长效、安全的尿源或重组促卵泡激素药物新品来供应。然而,该种激素产品在上市之前,需要进行严格的临床试验,尤其是体内外生物活性的鉴定与评估。目前,体外有效、快速的检测与量化促卵泡生长激素免疫技术仅有少数被报道。

[0005] 酶联免疫吸附试验(ELISA)是一种用于检测与量化抗体或抗原的方法和广泛应用在生物医学领域里的一种重要的诊断和分析工具。根据其检测的方式不同,可以分为双抗夹心ELISA,间接ELISA和竞争ELISA等。同源竞争酶联免疫分析法(同源竞争ELISA)起源于1997年发明的条纹鲈黄体生成素ELISA,随后应用到欧洲黑鲈促卵泡激素的检测与量化。这种检测和量化的方式具有较高的灵敏性、精准性和特异性,以及可再现性。

[0006] 基于上述鱼类激素同源竞争酶联免疫的特点和指南,我们进一步建立了一种新型的检测与量化人促卵泡激素的同源竞争酶联免疫分析方法。这种分析方法与临床上电化学发光免疫分析法检测人促卵泡激素的效果相比,易于操作,生产成本较低,能同时检测多个样品,并在一定范围内可直接根据酶标仪检测的吸光值反映出人促卵泡激素药物或相关促卵泡激素样品的体外生物学活性。

发明内容

[0007] 本发明提供了一种人促卵泡激素同源竞争酶联免疫分析方法来检测与量化促卵泡激素药物或相关促卵泡激素样品的体外生物学活性。

[0008] 为了实现本发明的技术目的,本发明采用以下技术方案:一种利用抗原-抗体免

疫亲和性来检测、量化和反映人促卵泡激素体外生物学活性的分析方法。其中抗原来源于商业化的重组人促卵泡激素(果纳芬, 5.5ug (75IU), Merck Serono公司; 国药准字S20130055)和尿源促卵泡激素(丽申宝, 75IU, 中国丽珠集团; 国药准字H20052130); 抗体来源于商业化的单克隆anti-FSH α 抗体(Abcam公司; 商品目录号ab9500)和羊抗鼠-HRP抗体(康为世纪公司; 商品目录号CW0102S); 封闭试剂来源于商业化的脱脂奶粉(美国BD公司; 商品目录号232100)、胎牛血清(WISENT公司; 商品目录号086150)、牛血清白蛋白(Sigma公司; 商品目录号V900933)和正常羊血清(JACKSON公司; 商品目录号005000121)。

[0009] 人促卵泡激素同源竞争酶联免疫分析法含有以下步骤。

[0010] (1) 抗原包被: 96孔酶标板(Corning公司; 商品型号2592)中包被60ul/well尿源促卵泡激素(丽申宝)溶液(1IU/ml or 1000IU/L), 放置4℃冰箱过夜。同时在同一酶标板中用磷酸盐缓冲液PBS (PH7.2-7.4) 分别包被5孔作非特异性结合组【接受anti-FSH α 抗体稀释液和羊抗鼠-HRP抗体稀释液】和4孔作空白对照组【仅接受羊抗鼠-HRP抗体稀释液】【这两组的作用是检测封闭试剂的封闭效果和酶标板是否每次清洗干净】

[0011] (2) 封闭: 第二天, 用PBS包含0.05% Tween-20 (PBST) 清洗酶标板3次, 每次60-90秒。随后可以采用以下4种任意一种封闭方式进行封闭: a) 5%的脱脂奶粉【用电子天平称量1g脱脂奶粉溶于20ml去离子水中, 并用玻璃棒充分搅拌均匀】(320ul/well) 封闭, 37℃避光孵育2.5h; b) PBST包含3%的胎牛血清(FBS)【用移液枪取0.6ml胎牛血清溶于19.4ml PBST中并充分搅拌均匀】(320ul/well) 封闭, 37℃避光孵育1h; c) PBST包含2%的牛血清蛋白(BSA)【用电子天平称量0.4g牛血清白蛋白溶于20ml PBST溶液中, 并用玻璃棒充分搅拌均匀】封闭(320ul/well), 37℃避光孵育1h; d) PBS包含2.5%的正常羊血清【根据说明书先将冻干粉末态的正常羊血清溶于10ml无菌去离子水配成储备母液, 再将储备母液用PBST溶液稀释成2.5%工作液】(NGS) (320ul/well) 封闭, 37℃避光孵育1h。

[0012] (3) 孵育一抗: 在分配到封闭好的酶标板前, 50ul尿源促卵泡激素标品(丽申宝)、50ul重组促卵泡激素(果纳芬)和50ul其他促卵泡激素供试样品分别预先与50ul的单克隆anti-FSH α 抗体稀释液【用移液枪取1ul的anti-FSH α 抗体加入到装有12ml PBS的离心管(15ml)中充分混匀, 即一抗初始稀释按1:12000进行稀释。待与标品或供试样品等体积添加到同一小离心管(1.5ml)中后, 即标品或供试样品浓度再次稀释了2倍, 一抗最终稀释比例为1:24000】(最终稀释浓度为1:24000)在1.5ml离心管中, 放置4℃冰箱孵育过夜。尿源促卵泡激素(丽申宝)既是作包被抗原也作促卵泡激素标品, 标准曲线检测范围设置在0.015-1.98IU/ml。随后分别将100ul anti-FSH α 抗体与尿源促卵泡激素混合液、100ul anti-FSH α 抗体与重组促卵泡激素混合液、100ul anti-FSH α 抗体与其他促卵泡激素样品混合液加入到用PBST清洗3次的封闭好的酶标板中, 放置4℃冰箱无震荡孵育48h。最大吸光值(B_0)和非特异性结合(NBS)只接受100ul单克隆anti-FSH α 抗体最终稀释溶液(1:24000)【一抗初始稀释液(1:1200)与PBS溶液在小离心管(1.5ml)等体积混合】, 空白对照组直接添加PBS溶液。

[0013] (4) 孵育酶标二抗: 用PBST清洗酶标板5次, 每次60-90秒。清洗完后每孔添加100ul羊抗鼠-HRP抗体稀释液(用PBS稀释, 1:3000)【羊抗鼠-HRP酶标二抗按1:3000用PBS溶液稀释成工作液】, 37℃避光孵育40min。

[0014] (5) 颜色反应: 用PBST清洗酶标板5次, 每次60-90秒。清洗完后每孔添加100ul TMB显色液(索莱宝公司; 商品目录号PR1210), 37℃避光孵育8-10min, 随后添加2M 50ul/well

的硫酸终止反应。使用酶标仪 (Thermo Labsystem MK-3) 在450nm读取吸光值。

[0015] (6) 原始数据处理: 将原始数据导入Excel软件初步处理, 随后利用GraphPad Prism 5软件进一步处理, 以标品和供试样品的浓度为横坐标, 对应的450nm下吸光比值 (Bi/Bo) 为纵坐标, 绘制标准曲线和供试样品的剂量-反应曲线。同时利用Origin pro 8软件进行拟合线性回归分析。

[0016] 步骤(1) 中丽申宝 (75IU) 最初用无菌蒸馏水 (250ul) 稀释为300IU/ml储备母液, 并-20℃储存备用; 用时将储备母液用PBS (PH7.2-7.4) 稀释为1IU/ml。

[0017] 步骤(2) 中每种封闭试剂所产生的背景值不同。

[0018] 步骤(3) 中先将稀释好的标品或样品用移液枪移入小离心管中, 随后再加入稀释好的anti-FSH α 抗体溶液 (1:12000), 直接用移液枪添加即可切记不要混匀, 放置4℃冰箱孵育过夜即可, 此步骤与包被抗原同步进行; 添加抗体-标品或样品混合液时, 用移液枪混匀后再加入到封闭好的酶标板中; 48h孵育过程中切记请勿震荡。

[0019] 步骤(6) 中对于超过最大吸光值 (Bo) 的抑制检测值 (Bi) 视为无效检测值, 不做统计和数据处理。

[0020] 所述其他人促卵泡激素样品可为任意未知的促卵泡激素样品。

[0021] 本发明有益效果在于:

[0022] (1) 本发明所述的促卵泡激素来源于尿源促卵激素、重组人促卵泡激素和其他人促卵泡激素相关样品的任意一种。

[0023] (2) 本发明与临床上化学发光免疫分析法检测人促卵泡激素的效果相比, 其易于操作, 生产成本较低, 能同时检测多个样品浓度, 并在一定范围内根据酶标仪检测的吸光值可直接反映出测试的人促卵泡激素的体外生物学活性。

[0024] (3) 本发明所检测的曲线范围宽广, 且标品或样品稀释梯度符合线性规律 (直接采用倍比稀释)。此外检测灵敏度虽然以IU/ml为单位, 实质性达到了以mIU/ml为单位计算促卵泡激素体外生物学活性。

[0025] (4) 本发明中四种封闭体系中任意一种方式均可达到相应封闭效果, 尤其是采用5%的脱脂奶粉封闭所产生的背景值较低。

附图说明

[0026] 图1为同源竞争酶联免疫分析法整个工作流程。

[0027] 图2为4种不同封闭试剂产生封闭背景值。

[0028] 图3为采4种不同封闭试剂封闭形成的尿源促卵泡激素 (丽申宝) 标准曲线。

[0029] 图4为采用5%脱脂奶粉封闭形成的重组促卵泡激素 (果纳芬) 剂量反应曲线。

[0030] 图5为采用5%脱脂奶粉封闭形成的昆虫杆状病毒表达系统重组促卵泡激素上清剂量反应曲线。

具体实施方式

[0031] 以下通过实施案例形式的具体实施方式对本发明的内容作进一步的详细说明。但不应将其理解为本发明的范围仅限于以下实施案例。凡基于本发明的内容所实现的技术方案均属于本发明的范围。此外, 根据此发明的内容, 按照本领域的普通技术知识和惯用手

段,在不脱离本发明的基本技术思路的前提下,还可以做出其它多种形式的修改、替换和变更等。

[0032] 实施例一:人尿源促卵泡激素标品体外生物学活性的检测与量化

[0033] 人尿源促卵泡激素(丽申宝,75IU)采用250ul无菌水稀释为0.3IU/ul或300IU/ml储备品于-20℃保存备用。

[0034] 尿源促卵泡激素包被:96孔酶标板中每孔包被60ul尿源促卵泡激素(丽申宝)溶液(1IU/ml,即300IU/ml的储备品用PBS(PH7.2-7.4)稀释为1IU/ml的包被抗原工作液),另外用PBS分别包被5孔为非特异性结合组和包被4孔为空白对照组。随后放置4℃冰箱过夜。

[0035] 尿源促卵泡激素既作包被抗原,也作竞争抗原来绘制标准曲线。首先把10.56ul的尿源促卵泡激素标品-丽申宝(300IU/ml)在小离心管(1.5ml)用790ul PBS溶液稀释为3.96IU/ml,然后依次在小离心管中按倍比稀释成梯度;随后,往每个梯度的标品溶液的小离心管(1.5ml)中添加等体积的anti-FSH α 抗体溶液(一抗初始按1:12000用PBS溶液稀释,混合后最终稀释比例为1:24000,)【anti-FSH α 抗体(一抗)初始稀释按1:12000用PBS溶液进行稀释,待与尿源促卵泡激素标品等体积混合后,一抗最终稀释比例则为1:24000】。随后放置4℃冰箱过夜(这一步同前一步骤同时进行),整个标准曲线范围为0.0155IU/ml---1.98IU/ml。

[0036] 封闭试剂进行封闭:第二天,用PBS包含0.05%Tween-20(PBST)清洗酶标板3次,每次60-90秒。随后可以采用5%的脱脂奶粉(320ul/well)封闭,37℃避光孵育2.5h。

[0037] 孵育单克隆anti-FSH α 抗体和人尿源促卵泡激素混合液:从1.5ml小离心管中取出100ul鼠源anti-FSH α 抗体和尿源促卵泡激素混合液【即将上述在1.5ml离心管中预先4℃孵育过夜的单克隆anti-FSH α 抗体和人尿源促卵泡激素混合液】添加到用PBST清洗3次的已封闭好的酶标板中,每个梯度的一抗-标品混合液重复3孔,随后放置4℃冰箱无震荡孵育48h。最大吸光值(B_0)和非特异性结合(NBS)只接受100ul单克隆anti-FSH α 抗体最终稀释溶液(1:24000),空白对照组直接添加100ul PBS。

[0038] 孵育羊抗鼠-HRP酶标二抗:用PBST清洗酶标板5次,每次60-90秒。清洗完后每孔添加100ul羊抗鼠-HRP抗体(用PBS稀释,1:3000)【羊抗鼠-HRP酶标二抗按1:3000用PBS溶液稀释成工作液】,37℃避光孵育40min。

[0039] 颜色反应和反应终止:用PBST清洗酶标板5次,每次60-90秒。清洗完后每孔添加100ul TMB显色液(索莱宝公司;商品目录号PR1210),37℃避光孵育8-10min,随后添加2M 50ul/well的硫酸终止反应。使用酶标仪(Thermo Labsystem MK-3)在450nm读取吸光值。

[0040] 原始数据处理和绘制标准曲线:把酶标仪读取的原始数据导入Excel软件中,计算每个梯度每一孔与最大吸光值(均值)的比值(即 B_i/B_0)。然后以 B_i/B_0 为纵坐标,尿源促卵泡激素(丽申宝)标品稀释浓度梯度为横坐标,利用GraphPad Prism 5软件绘制出标准曲线。同时,采用Origin pro 8进行拟合线性回归分析。

[0041] 实施例二:人重组促卵泡激素(果纳芬)样品体外生物学活性的检测与量化

[0042] 人尿源促卵泡激素(丽申宝,75IU)和人重组促卵泡激素(果纳芬,75IU)分别采用250ul无菌水稀释为0.3IU/ul或300IU/ml储备品于-20℃保存备用。

[0043] 取尿源促卵泡激素包被:96孔酶标板中每孔包被60ul尿源促卵泡激素(丽申宝)溶液(1IU/ml,即300IU/ml的储备品用PBS(PH7.2-7.4)稀释为1IU/ml的包被抗原工作液),另

外用PBS溶液分别包被5孔为非特异性结合组和包被4孔为空白对照组。随后放置4℃冰箱过夜。

[0044] 人重组促卵泡激素作竞争抗原来绘制剂量反应曲线。首先把10.56u1的人重组促卵泡激素样品-果纳芬(300IU/ml)在小离心管(1.5ml)用790u1 PBS溶液稀释为3.96IU/ml,然后依次在小离心管中按倍比稀释成梯度;随后,往每个梯度的标品溶液的小离心管(1.5ml)中添加等体积的anti-FSH α 抗体溶液(一抗初始按1:12000用PBS溶液稀释,与重组促卵泡激素供试样混合后最终稀释比例为1:24000)。随后放置4℃冰箱过夜(这一步同前一步骤同时进行),整个剂量反应曲线范围也为0.0155IU/ml---1.98IU/ml。

[0045] 封闭试剂进行封闭:第二天,用PBS包含0.05%Tween-20(PBST)清洗酶标板3次,每次60-90秒。随后可以采用5%的脱脂奶粉(320u1/well)封闭,37℃避光孵育2.5h。

[0046] 孵育单克隆anti-FSH α 抗体和人重组促卵泡激素混合液:从上述在1.5ml离心管中预先4℃孵育过夜的单克隆anti-FSH α 抗体和人尿源促卵泡激素混合液中取出100u1添加到用PBST清洗3次的已封闭好的酶标板中【用移液枪充分混匀后添加到封闭好的酶标板】,每个梯度混合液重复3次,随后放置4℃冰箱无震荡孵育48h。最大吸光值(B_0)和非特异性结合(NBS)只接受100u1单克隆anti-FSH α 抗体最终稀释溶液(1:24000),空白对照组直接添加100u1 PBS。

[0047] 孵育羊抗鼠-HRP酶标二抗:用PBST清洗酶标板5次,每次60-90秒。清洗完后每孔添加100u1羊抗鼠-HRP抗体(用PBS稀释,1:3000)【羊抗鼠-HRP酶标二抗按1:3000用PBS溶液稀释成工作液】,37℃避光孵育40min。

[0048] 颜色反应和反应终止:用PBST清洗酶标板5次,每次60-90秒。清洗完后每孔添加100u1 TMB显色液(索莱宝公司;商品目录号PR1210),37℃避光孵育8-10min,随后添加2M 50u1/well的硫酸终止反应。使用酶标仪(Thermo Labsystem MK-3)在450nm读取吸光值。

[0049] 原始数据处理和绘制标准曲线:把酶标仪读取的原始数据导入Excel软件中,计算每个梯度每一孔与最大吸光值(均值)的比值(即 B_i/B_0)。然后以 B_i/B_0 为纵坐标,人重组促卵泡激素(果纳芬)样品稀释浓度梯度为横坐标,利用GraphPad Prism 5软件绘制出剂量反应曲线。同时,采用Origin pro 8进行拟合线性回归分析。

[0050] 实施案例三:人尿源促卵泡激素标品体外生物学活性的检测与量化

[0051] 操作和实施案例一相同,但封闭试剂采用2%牛血清白蛋白(BSA)替代5%的脱脂奶粉进行封闭。

[0052] 实施案例四:人尿源促卵泡激素标品体外生物学活性的检测与量化

[0053] 操作和实施案例一相同,但封闭试剂采用3%胎牛血清(FBS)替代5%的脱脂奶粉进行封闭。

[0054] 实施案例五:人尿源促卵泡激素标品体外生物学活性的检测与量化

[0055] 操作和实施案例一相同,但封闭试剂采用2.5%正常羊血清(NGS)替代5%的脱脂奶粉进行封闭。

[0056] 验证案例:

[0057] (1) 曲线与范围

[0058]

组别	样品或标品浓度范围	拟合线性 R^2	曲线范围 $[B_i/B_0(\%)]$
----	-----------	------------	----------------------

实施案例一	0.0155IU/ml---1.98IU/ml	0.82863	10%—80%
实施案例二	0.0155IU/ml---1.98IU/ml	0.61751	10%—90%
实施案例三	0.0155IU/ml---1.98IU/ml	0.97226	20%—90%
实施案例四	0.0155IU/ml---1.98IU/ml	0.97780	30%—100%
实施案例五	0.0155IU/ml---1.98IU/ml	0.89733	20%—100%

[0059] (2) 有效性【1和2两种对系统有效性的评估】

[0060] 【1】同源竞争ELISA有效性评估,采用本实验与湖南农业大学联合开发出昆虫杆状病毒系统表达的重组促卵泡激素上清做供试样品,并按10倍,20倍,40倍,80倍等系列稀释后做体外活性量化检测与评估。其中上清样品稀释在20-320倍之间均能有效检测出其体外生物学活性(图5)。

[0061] 【2】同源竞争ELISA有效性评估,我们采用重组促卵泡激素(果纳芬)做供试品,并按尿源促卵泡激素(丽申宝)标品稀释梯度进行稀释,操作如上述案例二。其中供试品稀释在0.0155IU/ml—1.98IU/ml范围内均能有效检测和量化出其体外生物学活性(图4)。

[0062] (3) 准确性

[0063] 同源竞争ELISA准确性评估,取重复5次测量的最大吸光值(Bo)做数理统计(序号为1,2,3,4,5),每次在酶标板中设置6孔,并计算每次Bo平均值,标准偏差和变异系数[CV(%)],其结果如表1所示。【注意每次测量的OD₄₅₀(Bo)值在0.7-0.9之间,如不在此区间则视为无效检测结果】

[0064] 表1同源竞争ELISA准确性评估

[0065]

序号	重复孔数	Bo平均值	标准偏差值	变异系数[CV(%)]
1	6	0.84383	0.01861	2.01
2	6	0.82250	0.05378	6.54
3	6	0.73917	0.03286	4.45
4	6	0.71675	0.01559	2.18
5	6	0.75317	0.04549	6.04

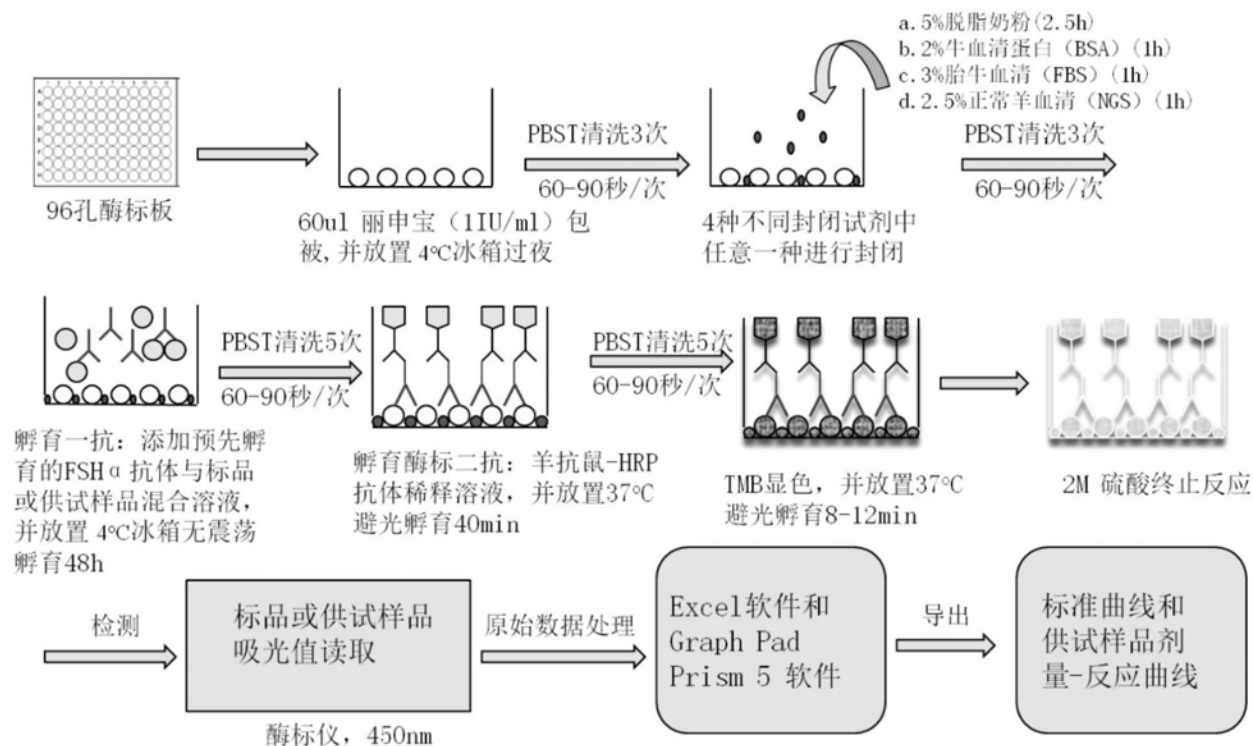


图1

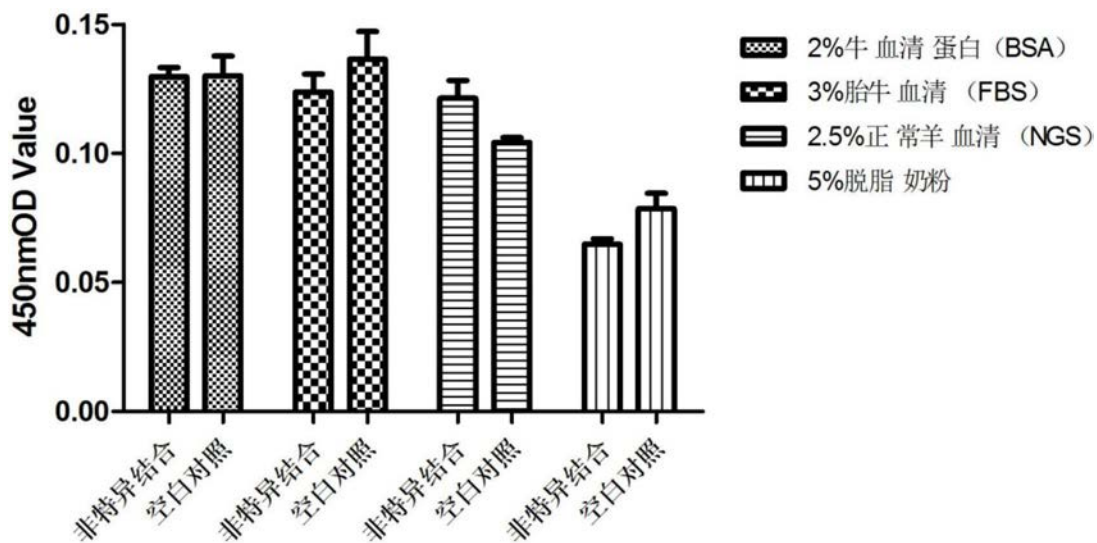


图2

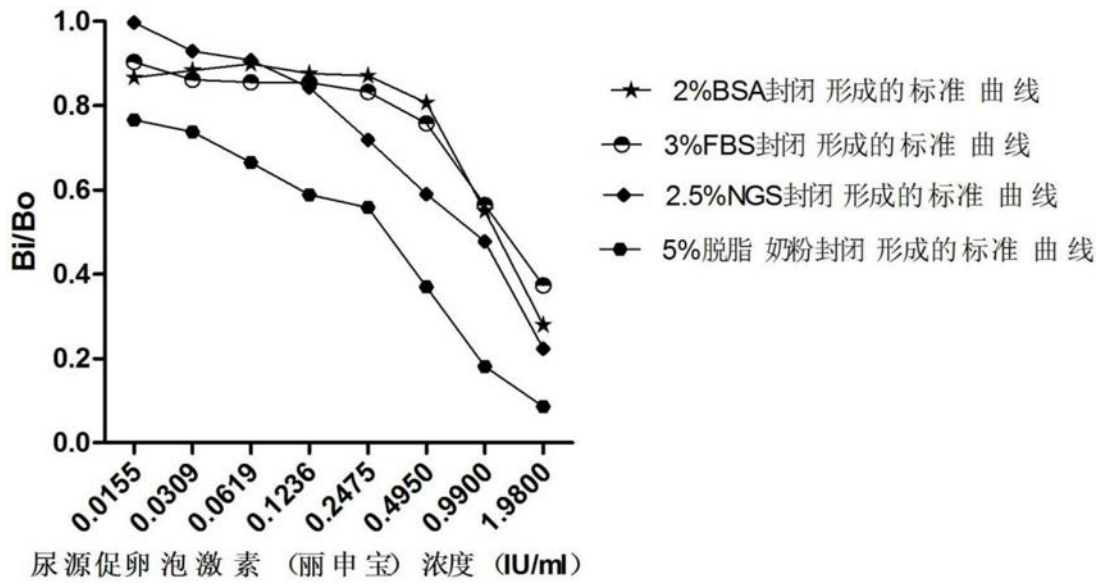


图3

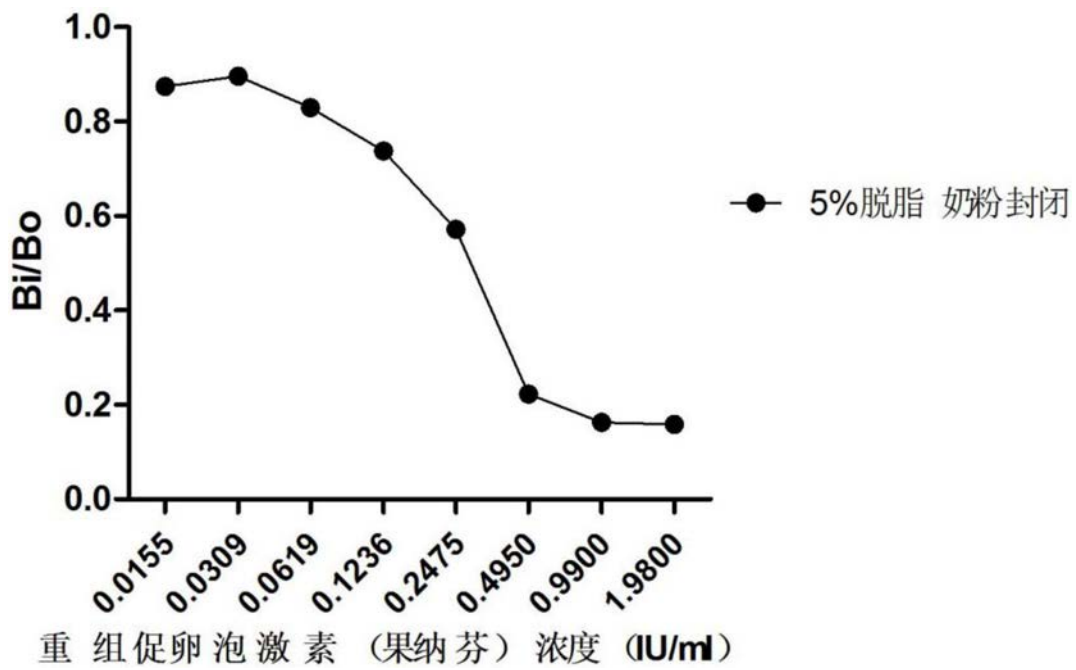


图4

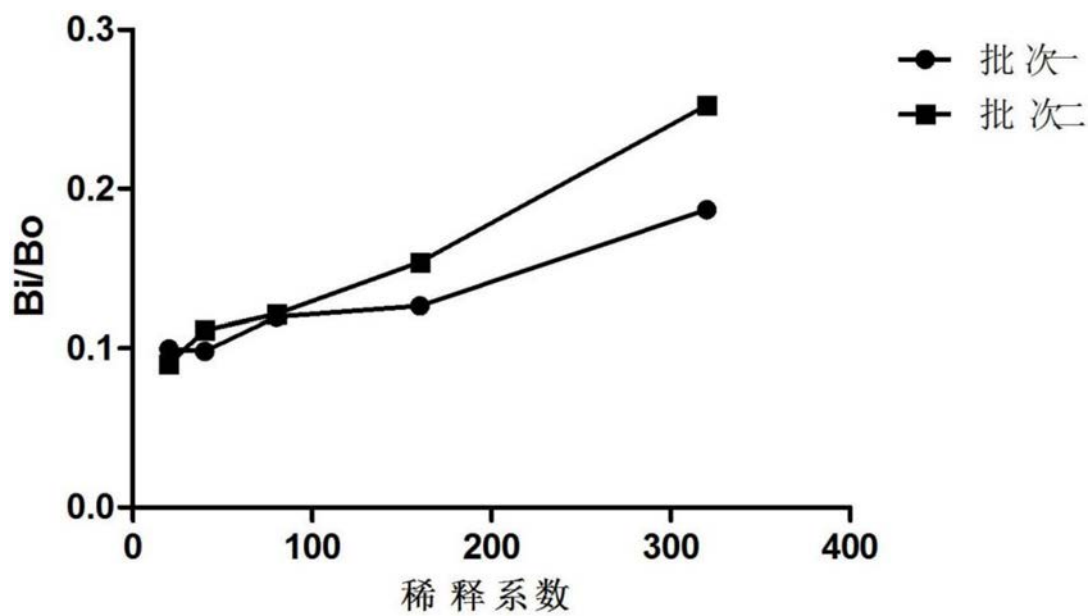


图5

专利名称(译)	一种检测与量化人促卵泡激素体外生物学活性的同源竞争酶联免疫分析法		
公开(公告)号	CN107255725A	公开(公告)日	2017-10-17
申请号	CN201710549251.9	申请日	2017-07-07
[标]申请(专利权)人(译)	江西科技师范大学		
申请(专利权)人(译)	江西科技师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	江西科技师范大学		
[标]发明人	曾斌 胡建文 刘华 韩继忠 刘梦梦 孙云龙		
发明人	曾斌 胡建文 刘华 韩继忠 刘梦梦 孙云龙		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/543 G01N33/535 G01N33/577 G01N21/31		
CPC分类号	G01N33/74 G01N21/31 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/577 G01N2021/3185 G01N2021/3196 G01N2333/59		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种人促卵泡激素同源竞争酶联免疫分析方法来检测与量化促卵泡激素药物或相关促卵泡激素样品的体外生物学活性。本发明是一种利用抗原-抗体免疫亲和性来检测、量化和反映人促卵泡激素体外生物学活性的分析方法。本发明与临床上化学发光免疫分析法检测人促卵泡激素的效果相比，其易于操作，生产成本较低，能同时检测多个样品浓度，并在一定范围内根据酶标仪检测的吸光值可直接反映出测试的人促卵泡激素的体外生物学活性。本发明所检测的曲线范围宽广，且标品或样品稀释梯度符合线性规律(直接采用倍比稀释)。此外检测灵敏度虽然以IU/ml为单位，实质性达到了以mIU/ml为单位计算促卵泡激素体外生物学活性。

