



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109765360 B

(45)授权公告日 2020.01.21

(21)申请号 201811518946.1

审查员 舒霏霏

(22)申请日 2018.12.12

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109765360 A

(43)申请公布日 2019.05.17

(73)专利权人 杭州博谱医药科技有限公司

地址 311100 浙江省杭州市余杭区仓前街
道龙潭路8号1幢105室

(72)发明人 朱永良 王轶雄 程小龙

(74)专利代理机构 北京联瑞联丰知识产权代理

事务所(普通合伙) 11411

代理人 陈剑聪

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

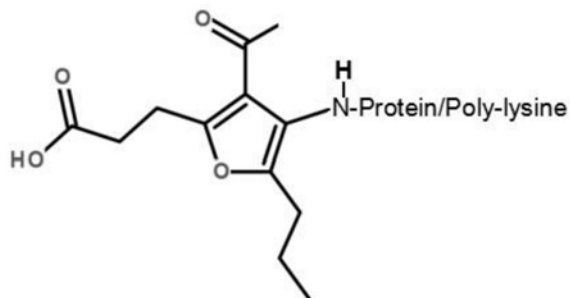
权利要求书4页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

CMPF均相酶免疫检测试剂盒、制备方法及检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种CMPF均相酶免疫检测试剂盒、制备方法及检测方法,试剂盒的CMPF抗体的免疫原由CMPF与蛋白质或多聚赖氨酸偶联物作为免疫原进行免疫获得。分别利用CMPF支链末端的-COOH与蛋白质或多聚赖氨酸分子上的-NH₂进行偶联;接着利用这些偶联物免疫物作为免疫原进行免疫小鼠或家兔,最后获得特异性的抗CMPF的单克隆或多克隆抗体;并基于该抗CMPF的单克隆或多克隆抗体建立CMPF含量检测方法;该检测方法可在生化分析仪等大型自动化仪器上进行大样本自动化检测分析。检测方法具有检测灵敏度高,特异性强,检测重复性高和稳定性好等优点,本发明方法检测灵敏度0.5 μg/L。



1. 一种CMPF均相酶免疫检测试剂盒,其特征在于,包括试剂R1、试剂R2和标准品溶液,所述试剂R1由如下组分和含量组成:

磷酸盐缓冲液	50-200mM,
CMPF抗体	5-500mg/L,
NAD辅酶	1-10mM,
G-6-P-Na ₂	3-20mM,
表面活性剂	0.01-10g/L,
稳定剂	0.1-0.5g/L;

所述试剂R2由如下组分和含量组成:

磷酸盐缓冲液	50-200mM,
G6PDH-CMPF偶联物	5-500U/L,
BSA	0.01-10g/L,
表面活性剂	0.01-10g/L;

所述标准品溶液,其由CMPF与校准品稀释液梯度稀释而成,所述标准品稀释液由如下组分和含量组成:

磷酸盐缓冲液	0.05-0.2M,
BSA	0.01-10g/L,
稳定剂	0.1-0.5g/L;

其中G6PDH-CMPF偶联物的制备,包括如下步骤:

称取100 mgCMPF,用10ml二甲亚砜溶解,10KU葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,溶解于200ml pH7.3,100mM的磷酸盐缓冲液中,室温搅拌15分钟,再加入25 mg水溶性碳二亚胺粉末,室温避光温和搅拌180分钟,装入透析袋,自由通透分子大小<14KD,置4℃透析,每6小时换液1次,连续6-8次;

用超滤膜包对透析液进行浓缩,浓缩体积至30ml,上G200凝胶层析柱3.0×50cm分离产物,收集G6PDH-CMPF峰,共收集80ml,对纯化水透析3次,冷冻干燥,得到4.7KU的G6PDH-CMPF;

其中抗CMPF的特异性鼠源性单克隆IgG型抗体的制备,包括如下步骤:

S1. CMPF-蛋白质偶联物或CMPF-多聚赖氨酸偶联物的制备

将CMPF与载体蛋白质混合,并加入碳二亚胺,在碳二亚胺作用下,CMPF与载体蛋白质进行偶联反应,然后透析得到CMPF-蛋白质偶联物;或者载体蛋白质用多聚赖氨酸代替,得到CMPF-多聚赖氨酸偶联物;

S2. 动物免疫

以CMPF-蛋白质偶联物或CMPF-多聚赖氨酸偶联物/次/只小鼠的浓度与等量的完全福氏佐剂混匀,皮下多点注射免疫Ba1b/c雌性小鼠,第1次与第2次间隔10-14天,以后每次间隔7天,连续5次,第2-5次CMPF-蛋白质偶联物或CMPF-多聚赖氨酸偶联物与等量的不完全福氏佐剂乳化混匀,间隔1周后采用尾静脉/腹腔注射无菌的CMPF-蛋白质偶联物或CMPF-多聚赖氨酸偶联物,以加强免疫1次,3天后细胞融合;

S3. 杂交瘤细胞的制备

取步骤S2免疫小鼠的脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞按体积比1:6在50%PEG的作用下融合,

融合细胞先在次黄嘌呤-氨基嘌呤-胸腺嘧啶选择培养基中,在37℃、5% CO₂及饱和湿度条件下培养,2周后换为次黄嘌呤-胸腺嘧啶培养基,继续在37℃、5% CO₂及饱和湿度条件下培养;待克隆孔长至1/3-1时,取培养上清液进行抗体检测筛选;

S4. 特异性克隆孔筛选

用50 mM的碳酸盐缓冲液稀释CMPF-蛋白质偶联物至100L/孔包被反应微孔4℃过夜或37℃120 min,用含0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液洗涤3次,用10%小牛血清室温封闭30min,再加入100μl上述步骤S3培养上清液室温反应60min,用含0.05% Tween-20的磷酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液洗涤3次,最后再加入1:2000稀释的羊抗小鼠IgG-HRP室温反应60min,用含0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液洗涤3次,加入四甲基联苯氨底物显色观察;凡出现明显蓝色反应者为阳性,否则为阴性;保留与CMPF-蛋白质偶联物有反应的细胞克隆孔,再采用有限稀释法进行3次克隆筛选,建株的杂交瘤细胞再扩大培养、冻存,用于制备腹水;

S5. 腹水的制备和纯化

将稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞扩大培养后,以 0.5×10^4 - 5×10^5 个/只接种到预先用0.5 mL降植烷或液体石蜡致敏7-10天Balb/c小鼠的腹腔,7-12天内观察,收取腹水,离心后测定效价;经50%饱和硫酸铵沉淀保存或者低温冻存;腹水采用50%饱和硫酸铵沉淀-正辛酸沉淀,或者用50%饱和硫酸铵沉淀-rProtein A-Sepharose Fast Flow亲和层析纯化,最后用SDS-PAGE检测纯度,需达到90%,获得抗CMPF-蛋白质偶联物特异性单克隆抗体;

其中抗CMPF的兔源性多克隆IgG抗体的制备,包括如下步骤:

S1. CMPF-蛋白质偶联物或CMPF-多聚赖氨酸偶联物的制备

将CMPF与载体蛋白质混合,并加入碳二亚胺,在碳二亚胺作用下,CMPF与载体蛋白质进行偶联反应,然后透析得到CMPF-蛋白质偶联物;或者载体蛋白质用多聚赖氨酸代替,得到CMPF-多聚赖氨酸偶联物;

S2. 动物免疫

以10 mg CMPF-蛋白质偶联物/次/只与等量完全福氏佐剂混匀,家兔皮下多点注射免疫,每1-2周1次,连续5次,间隔1周后采用分离颈动脉,收集血液80-120毫升,室温放置2小时,4℃10000 rpm离心30min,分离收集血清;上述血清再用CMPF-蛋白质偶联物,亲和层析柱纯化抗CMPF的特异性IgG型抗体,最后用8% SDS-PAGE检测纯度,需达到90%;获得兔源性多克隆IgG抗体;

上述纯化的兔源性多克隆IgG抗体进一步在pH4.5的50mM醋酸盐缓冲液中用质量比0.1%的胃蛋白酶切除IgG的Fc'端,37℃反应12小时,然后在调或不调pH值的情况下,用饱和硫酸铵和/或SPA和/或CMPF-蛋白质偶联物亲和层析方法纯化F(ab')₂抗体片段;获得特异性的抗CMPF的F(ab')₂特异性抗体片段。

2. 根据权利要求1所述的CMPF均相酶免疫检测试剂盒,其特征在于,所述CMPF抗体为抗CMPF的特异性鼠源性单克隆IgG型抗体或抗CMPF的兔源性多克隆IgG抗体,所述特异性鼠源性单克隆IgG型抗体包括IgG1和/或IgG2a和/或IgG2b和/或IgG3和/或IgG4型抗体;所述兔源性多克隆IgG抗体包含F(ab')₂特异性抗体片段。

3. 根据权利要求2所述的CMPF均相酶免疫检测试剂盒,其特征在于,所述载体蛋白质为BSA、OVA、KLH中的一种或多种。

4. 根据权利要求3所述的CMPF均相酶免疫检测试剂盒,其特征在于,所述缓冲液为磷酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液。

5. 根据权利要求4所述的CMPF均相酶免疫检测试剂盒,其特征在于,所述表面活性剂为Triton X-100、Tween-20、Tween-40、Tween-60、Tween-80中的一种或多种,所述稳定剂为甘露醇、PEG-4000、PEG-6000、PEG-8000中的一种或多种。

6. 一种权利要求5所述的CMPF均相酶免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于,其中抗CMPF的特异性鼠源性单克隆IgG型抗体的制备,包括如下步骤:

S1. CMPF-蛋白质偶联物或CMPF-多聚赖氨酸偶联物的制备

将CMPF与载体蛋白质混合,并加入碳二亚胺,在碳二亚胺作用下,CMPF与载体蛋白质进行偶联反应,然后透析得到CMPF-蛋白质偶联物;或者载体蛋白质用多聚赖氨酸代替,得到CMPF-多聚赖氨酸偶联物;

S2. 动物免疫

以CMPF-蛋白质偶联物或CMPF-多聚赖氨酸偶联物/次/只小鼠的浓度与等量的完全福氏佐剂混匀,皮下多点注射免疫Balb/c雌性小鼠,第1次与第2次间隔10-14天,以后每次间隔7天,连续5次,第2-5次CMPF-蛋白质偶联物或CMPF-多聚赖氨酸偶联物与等量的不完全福氏佐剂乳化混匀,间隔1周后采用尾静脉/腹腔注射无菌的CMPF-蛋白质偶联物或CMPF-多聚赖氨酸偶联物,以加强免疫1次,3天后细胞融合;

S3. 杂交瘤细胞的制备

取步骤S2免疫小鼠的脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞按体积比1:6在50%PEG的作用下融合,融合细胞先在次黄嘌呤-氨基嘌呤-胸腺嘧啶选择培养基中,在37°C、5% CO₂及饱和湿度条件下培养,2周后换为次黄嘌呤-胸腺嘧啶培养基,继续在37°C、5% CO₂及饱和湿度条件下培养;待克隆孔长至1/3-1时,取培养上清液进行抗体检测筛选;

S4. 特异性克隆孔筛选

用50 mM的碳酸盐缓冲液稀释CMPF-蛋白质偶联物至100L/孔包被反应微孔4°C过夜或37°C 120 min,用含0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液洗涤3次,用10%小牛血清室温封闭30min,再加入100μl上述步骤S3培养上清液室温反应60min,用含0.05% Tween-20的磷酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液洗涤3次,最后再加入1:2000稀释的羊抗小鼠IgG-HRP室温反应60min,用含0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液洗涤3次,加入四甲基联苯氨底物显色观察;凡出现明显蓝色反应者为阳性,否则为阴性;保留与CMPF-蛋白质偶联物有反应的细胞克隆孔,再采用有限稀释法进行3次克隆筛选,建株的杂交瘤细胞再扩大培养、冻存,用于制备腹水;

S5. 腹水的制备和纯化

将稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞扩大培养后,以 0.5×10^4 - 5×10^5 个/只接种到预先用0.5 mL降植烷或液体石蜡致敏7-10天Balb/c小鼠的腹腔,7-12天内观察,收取腹水,离心后测定效价;经50%饱和硫酸铵沉淀保存或者低温冻存;腹水采用50%饱和硫酸铵沉淀-正辛酸沉淀,或者用50%饱和硫酸铵沉淀-rProtein A-Sepharose Fast Flow亲和层析纯化,最后用SDS-PAGE检测纯度,需达到90%,获得抗CMPF-蛋白质偶联物特异性单克隆抗体。

7. 一种权利要求5所述的CMPF均相酶免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于,其中抗CMPF的兔源性多克隆IgG抗体的制备,包括如下步骤:

S1. CMPF-蛋白质偶联物或CMPF-多聚赖氨酸偶联物的制备

将CMPF与载体蛋白质混合,并加入碳二亚胺,在碳二亚胺作用下,CMPF与载体蛋白质进行偶联反应,然后透析得到CMPF-蛋白质偶联物;或者载体蛋白质用多聚赖氨酸代替,得到CMPF-多聚赖氨酸偶联物;

S2. 动物免疫

以10 mg CMPF-蛋白质偶联物/次/只与等量完全福氏佐剂混匀,家兔皮下多点注射免疫,每1-2周1次,连续5次,间隔1周后采用分离颈动脉,收集血液80-120毫升,室温放置2小时,4℃10000 rpm离心30min,分离收集血清;上述血清再用CMPF-蛋白质偶联物,亲和层析柱纯化抗CMPF的特异性IgG型抗体,最后用8% SDS-PAGE检测纯度,需达到90%;获得兔源性多克隆IgG抗体;

上述纯化的兔源性多克隆IgG抗体进一步在pH 4.5的50mM醋酸盐缓冲液中用质量比0.1%的胃蛋白酶切除IgG的Fc'端,37℃反应12小时,然后在调或不调pH值的情况下,用饱和硫酸铵和/或SPA和/或CMPF-蛋白质偶联物亲和层析方法纯化F(ab')₂抗体片段;获得特异性的抗CMPF的F(ab')₂特异性抗体片段。

8. 一种非诊断目的的CMPF含量的检测方法,其特征在于,采用权利要求6或7的制备方法制备得到的CMPF均相酶免疫检测试剂盒进行CMPF含量的检测,包括如下步骤:

S1. 标准曲线的建立

将试剂R1与标准品溶液混合,混合体积比例为10-200:1,恒温孵育1-10分钟,加入等体积的试剂R2,在自动生化分析仪或紫外分光光度计上,用340nm波长,测定光密度OD值或吸光度A值,以标准品浓度为横坐标,光密度OD值或吸光度A值为纵坐标,绘制标准曲线;

S2. 样品的测试

将试剂R1与样品混合,样品体积与标准品溶液一致,恒温孵育1-10分钟,加入等体积的试剂R2,在自动生化分析仪或紫外分光光度计上,用340nm波长,测定光密度OD值或吸光度A值;

S3. CMPF含量的测定

记录样品加入后的OD值或吸光度A值,根据标准曲线读数,得到样品中CMPF的含量浓度。

CMPF均相酶免疫检测试剂盒、制备方法及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及临床生化检测技术领域,具体为一种CMPF均相酶免疫检测试剂盒、制备方法及检测方法,更具体为一种CMPF均相酶免疫检测试剂盒、CMPF均相酶免疫检测试剂盒的制备方法,以及利用该试剂盒实现的呋喃脂肪酸代谢产物3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-呋喃丙酸(3-carboxy-4-methyl--propyl-2-furanpropanoic acid,简称CMPF)含量的检测方法。

背景技术

[0002] 蛋白结合类毒素是尿毒症毒素中重要的一类物质,其本身均为小分子物质(分子量<500Da),人体内该类物质易与人血清蛋白(human serumalbumin,HAS)结合,形成中大分子,马尿酸(hippuric acid,HA)、硫酸吲哚酚(indoxyl sulfate,IS)、硫酸对甲酚(p-cresyl sulfate,PCS)及3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-呋喃丙酸(3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid,CMPF)为蛋白结合类毒素的典型代表。蛋白结合类毒素的蛋白结合率是研究蛋白结合类毒素代谢学的重要参数之一,与该类毒素在体内分布、代谢、发挥毒性及排泄密切相关,对临床治疗有重要意义。

[0003] 除此之外,最近的研究发现,CMPF作为特定的呋喃脂肪酸代谢产物,其在妊娠糖尿病和2型糖尿病患者的血液中显著增加。小鼠实验表明,CMPF含量浓度的增加,可诱导葡萄糖耐受不良(glucose intolerance),损坏葡萄糖刺激的胰岛素分泌,并降低葡萄糖的利用,从而导致胰腺中 β 细胞的胰岛素分泌下降,导致糖尿病的进一步发展。因此,CMPF也可用于糖尿病监控的生化指标。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明目的是提供一种CMPF均相酶免疫检测试剂盒、制备方法及检测方法,具体为一种CMPF均相酶免疫检测试剂盒、CMPF均相酶免疫检测试剂盒的制备方法,以及利用该试剂盒实现的外周血(包括血清、血浆和全血)等体液中呋喃脂肪酸代谢产物3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-呋喃丙酸(3-carboxy-4-methyl--propyl-2-furanpropanoic acid,简称CMPF)含量的检测方法,检测方法具有检测灵敏度高,特异性强,检测重复性高和稳定性好等优点。

[0005] 所采用的技术方案为:

[0006] 本发明的第一方面,一种CMPF均相酶免疫检测试剂盒,包括如下试剂:

[0007] 试剂R1,其含有CMPF抗体、NAD辅酶和G-6-P-Na₂;

[0008] 试剂R2,其含有G6PDH-CMPF偶联物和载体;

[0009] 标准品溶液,其由CMPF与校准品稀释液梯度稀释而成,所述校准品稀释液含有缓冲液和载体。

[0010] 进一步地,所述CMPF抗体为抗CMPF的特异性鼠源性单克隆IgG型抗体或抗CMPF的兔源性多克隆IgG抗体,所述特异性鼠源性单克隆IgG型抗体包括IgG1和/或IgG2a和/或

IgG2b和/或IgG3和/或IgG4型抗体；所述兔源性多克隆IgG抗体包含F(ab')₂特异性抗体片段。

[0011] 进一步地，所述载体为载体蛋白质和/或多聚赖氨酸，所述载体蛋白质为BSA、OVA、KLH中的一种或多种。

[0012] 进一步地，所述缓冲液为磷酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液。

[0013] 进一步地，所述试剂R1由如下组分和含量组成：

磷酸盐缓冲液	50-200mM,
CMPF 抗体	5-500mg/L,
NAD 辅酶	1-10mM,
[0014] G-6-P-Na2	3-20mM,
表面活性剂	0.01-10g/L,
稳定剂	0.1-0.5g/L;

[0015] 所述试剂R2由如下组分和含量组成：

[0016] 磷酸盐缓冲液	50-200mM,
G6PDH-CMPF 偶联物	5-500U/L,
[0017] BSA	0.01-10g/L,
表面活性剂	0.01-10g/L;

[0018] 所述标准品稀释液由如下组分和含量组成：

[0019] 磷酸盐缓冲液	0.05-0.2M,
[0020] BSA	0.01-10g/L,
[0021] 稳定剂	0.1-0.5g/L。

[0022] 进一步地，所述表面活性剂为Triton X-100、Tween-20、Tween-40、Tween-60、Tween-80中的一种或多种，所述稳定剂为甘露醇、PEG-4000、PEG-6000、PEG-8000中的一种或多种。

[0023] 本发明的第二方面，一种上述方案所述的CMPF均相酶免疫检测试剂盒的制备方法，其中G6PDH-CMPF偶联物的制备，包括如下步骤：

[0024] 将CMPF与G6PDH混合，并加入碳二亚胺，在碳二亚胺作用下，CMPF的羧基与G6PDH的氨基结合进行偶联反应，将反应液上柱，然后分离纯化得到G6PDH-CMPF偶联物。

[0025] 进一步地，其中抗CMPF的特异性鼠源性单克隆IgG型抗体的制备，包括如下步骤：

[0026] S1. CMPF-蛋白质偶联物或CMPF-多聚赖氨酸偶联物的制备

[0027] 将CMPF与载体蛋白质混合，并加入碳二亚胺，在碳二亚胺作用下，CMPF与载体蛋白质进行偶联反应，然后透析得到CMPF-蛋白质偶联物；或者载体蛋白质用多聚赖氨酸代替，得到CMPF-多聚赖氨酸偶联物；

[0028] S2. 动物免疫

[0029] 以CMPF-蛋白质偶联物或CMPF-多聚赖氨酸偶联物/次/只小鼠的浓度与等量的完全福氏佐剂混匀,皮下多点注射免疫Balb/c雌性小鼠,第1次与第2次间隔10-14天,以后每次间隔7天,连续5次,第2-5次CMPF-蛋白质偶联物或CMPF-多聚赖氨酸偶联物与等量的不完全福氏佐剂乳化混匀,间隔1周后采用尾静脉/腹腔注射无菌的CMPF-蛋白质偶联物或CMPF-多聚赖氨酸偶联物,以加强免疫1次,3天后细胞融合;

[0030] S3. 杂交瘤细胞的制备

[0031] 取步骤S2免疫小鼠的脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞按体积比1:6在50%PEG的作用下融合,融合细胞先在次黄嘌呤-氨甲喋呤-胸腺嘧啶选择培养基中,在37℃、5%CO₂及饱和湿度条件下培养,2周后换为次黄嘌呤-胸腺嘧啶培养基,继续在37℃、5%CO₂及饱和湿度条件下培养;待克隆孔长至1/3-1时,取培养上清液进行抗体检测筛选;

[0032] S4. 特异性克隆孔筛选

[0033] 用50mM的碳酸盐缓冲液稀释CMPF-蛋白质偶联物至100L/孔包被反应微孔4℃过夜或37℃120min,用含0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液洗涤3次,用10%小牛血清室温封闭30min,再加入100μl上述步骤2.2培养上清液室温反应60min,用含0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液洗涤3次,最后再加入1:2000稀释的羊抗小鼠IgG-HRP室温反应60min,用含0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液洗涤3次,加入四甲基联苯氨底物显色观察;凡出现明显蓝色反应者为阳性,否则为阴性;保留与CMPF-蛋白质偶联物有反应的细胞克隆孔,再采用有限稀释法进行3次克隆筛选,建株的杂交瘤细胞再扩大培养、冻存,用于制备腹水;

[0034] S5. 腹水的制备和纯化

[0035] 将稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞扩大培养后,以 0.5×10^4 - 5×10^5 个/只接种到预先用0.5mL降植烷或液体石蜡致敏7-10天Balb/c小鼠的腹腔,7-12天内观察,收取腹水,离心后测定效价;经50%饱和硫酸铵沉淀保存或者低温冻存;腹水采用50%饱和硫酸铵沉淀-正辛酸沉淀,或者用50%饱和硫酸铵沉淀-rProtein A-Sepharose Fast Flow亲和层析纯化,最后用SDS-PAGE检测纯度,需达到90%,获得抗CMPF-蛋白质偶联物特异性单克隆抗体。

[0036] 进一步地,其中抗CMPF的兔源性多克隆IgG抗体的制备,包括如下步骤:

[0037] S1. CMPF-蛋白质偶联物或CMPF-多聚赖氨酸偶联物的制备

[0038] 将CMPF与载体蛋白质混合,并加入碳二亚胺,在碳二亚胺作用下,CMPF与载体蛋白质进行偶联反应,然后透析得到CMPF-蛋白质偶联物;或者载体蛋白质用多聚赖氨酸代替,得到CMPF-多聚赖氨酸偶联物;

[0039] S2. 动物免疫

[0040] 以10mg CMPF-蛋白质偶联物/次/只与等量完全福氏佐剂混匀,家兔皮下多点注射免疫,每1-2周1次,连续5次,间隔1周后采用分离颈动脉,收集血液约80-120毫升,室温放置2小时,4℃10000rpm离心30min,分离收集血清;上述血清再用CMPF-蛋白质偶联物,亲和层析柱纯化抗CMPF的特异性IgG型抗体,最后用8%SDS-PAGE检测纯度,需达到90%;获得兔源性多克隆IgG抗体;

[0041] 上述纯化的兔源性多克隆IgG抗体进一步在pH 4.5的50mM醋酸盐缓冲液中用0.1% (质量比)的胃蛋白酶切除IgG的Fc'端,37℃反应12小时,然后在调或不调pH值的情况

下,用饱和硫酸铵和/或SPA和/或CMPF-蛋白质偶联物亲和层析方法纯化F(ab')₂抗体片段;获得特异性的抗CMPF的F(ab')₂特异性抗体片段。

[0042] 综上,本发明制备抗体的免疫原由CMPF与蛋白质或多聚赖氨酸偶联物作为免疫原进行免疫获得。分别利用CMPF支链末端的-COOH与蛋白质或多聚赖氨酸分子上的-NH₂进行偶联;接着利用这些偶联物免疫物作为免疫原进行免疫小鼠或家兔,最后获得特异性的抗CMPF单克隆或多克隆抗体。

[0043] 本发明的第三方面,一种CMPF含量的检测方法,采用上述方案所述的制备方法制备得到的CMPF均相酶免疫检测试剂盒进行CMPF含量的检测,包括如下步骤:

[0044] S1. 标准曲线的建立

[0045] 将试剂R1与标准品溶液混合,混合体积比例为10-200:1,恒温孵育1-10分钟,加入等体积的试剂R2,在自动生化分析仪或紫外分光光度计上,用340nm波长,测定光密度OD值或吸光度A值,以标准品浓度为横坐标,光密度OD值或吸光度A值为纵坐标,绘制标准曲线;

[0046] S2. 样品的测试

[0047] 将试剂R1与样品混合,样品体积与标准品溶液一致,恒温孵育1-10分钟,加入等体积的试剂R2,在自动生化分析仪或紫外分光光度计上,用340nm波长,测定光密度OD值或吸光度A值;

[0048] S3. CMPF含量的测定

[0049] 记录样品加入后的OD值或吸光度A值,根据标准曲线读数,得到样品中CMPF的含量浓度。

[0050] 本发明的有益效果在于:

[0051] 本发明外周血中CMPF的检测方法可在生化分析仪等大型自动化仪器上进行大样本自动化检测分析。检测方法具有检测灵敏度高,特异性强,检测重复性高和稳定性好等优点,本发明方法检测灵敏度0.5μg/L。

附图说明

[0052] 图1为CMPF与载体蛋白质和/或多聚赖氨酸偶联示意图;

[0053] 图2为奥林帕斯5400定标曲线图,其中纵坐标OD值无量纲,横坐标CONC表示含量浓度,单位为μg/mL。

[0054] 图3为与质谱法比对相关性的临床标本测定结果相关性图。

具体实施方式

[0055] 下面通过实施例进一步阐述本发明,但本发明的保护范围并不局限于此。

[0056] 需要说明的是,在本技术领域里,一般用M(单位)表示mol/L。1mM=1mmol/L,即1毫摩尔每升。

[0057] 实施例1.G6PDH-CMPF偶联物的制备

[0058] 称取100mgCMPF(美国Sigma公司),用10ml二甲亚砜溶解,10KU葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH,美国ROCHE公司),溶解于200ml pH7.3,100mM的磷酸盐缓冲液中,室温搅拌15分钟,再加入25mg水溶性碳二亚胺粉末(上海阿拉丁公司),室温避光温和搅拌180分钟,装入透析袋(自由通透分子大小<14KD),置4℃透析,每6小时换液1次,连续6-8次。

[0059] 用超滤膜包对透析液进行浓缩,浓缩体积至30ml,上G200凝胶层析柱(3.0×50cm)分离产物,收集G6PDH-CMPF峰,共收集80ml,对纯化水透析3次,冷冻干燥,得到4.7KU的G6PDH-CMPF。

[0060] 实施例2.CMPF-蛋白质偶联物或CMPF-多聚赖氨酸偶联物的制备

[0061] 称取100mgCMPF(美国Sigma公司),用10ml二甲亚砜溶解,10mg牛血清白蛋白(BSA)或血蓝蛋白(KLH)或卵清蛋白(OVA)或多聚赖氨酸(德国Roche公司)溶解于pH7.6,100mM的磷酸盐缓冲液中,室温搅拌15分钟,再加入125mg水溶性碳二亚胺粉末(上海阿拉丁公司),室温避光温和搅拌180分钟,装入透析袋(自由通透分子大小<14KD),置4℃透析,每6小时换液1次,连续6-8次。

[0062] 得到的CMPF-蛋白质偶联物或CMPF-多聚赖氨酸偶联物的分子结构图参见图1所示。

[0063] 实施例3.抗CMPF的单克隆IgG型抗体制备方法

[0064] 3.1.动物免疫

[0065] 以上述实施例2制备的CMPF-蛋白质偶联物,以CMPF-血蓝蛋白为优选,以100gCMPF-蛋白质偶联物/次/只小鼠的浓度与等量的完全福氏佐剂混匀,皮下多点注射免疫Balb/c雌性小鼠(5-6周龄,体重18-20g),第1次与第2次间隔10-14天,以后每次间隔7天,连续5次,第2-5次CMPF-蛋白质偶联物与等量的不完全福氏佐剂乳化混匀,间隔1周后采用尾静脉/腹腔注射无菌的100

[0066] gCMPF-多聚赖氨酸偶联物(以尾静脉为优选),以加强免疫1次,3天后细胞融合。

[0067] 3.2.杂交瘤细胞的制备

[0068] 按照常规细胞融合方法进行。取实施例3的步骤3.1免疫小鼠的脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞按体积比1:6在50%PEG(MW400-800)的作用下融合,融合细胞先在次黄嘌呤-氨基嘌呤-胸腺嘧啶(HAT)选择培养基中(美国Hyclone公司),在37℃、5%CO₂及饱和湿度条件下培养,2周后换为次黄嘌呤-胸腺嘧啶(HT)培养基(美国Hyclone公司),继续在37℃、5%CO₂及饱和湿度条件下培养。待克隆孔长至1/3-1时,取培养上清液进行抗体检测筛选。

[0069] 3.3.特异性克隆孔筛选

[0070] 用ELISA法筛选抗体表达阳性孔。用50mM的碳酸盐缓冲液稀释CMPF-蛋白质偶联物(以CMPF-OVA为优选)至100L/孔包被反应微孔4℃过夜或37℃120min,用含0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液(PBS)或Tris-HCl缓冲液洗涤3次,用10%小牛血清室温封闭30min,再加入100μl上述步骤2.2培养上清液室温反应60min,用含0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液(PBS)或Tris-HCl缓冲液洗涤3次,最后再加入1:2000稀释的羊抗小鼠IgG-HRP室温反应60min,用含0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液(PBS)或Tris-HCl缓冲液洗涤3次,加入四甲基联苯胺(TMB)底物显色观察。凡出现明显蓝色反应者为阳性,否则为阴性。保留与CMPF-蛋白质偶联物有反应的细胞克隆孔,再采用有限稀释法进行3次克隆筛选,建株的杂交瘤细胞再扩大培养、冻存,用于制备腹水。

[0071] 3.4.腹水的制备和纯化

[0072] 将稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞扩大培养后,以 0.5×10^4 - 5×10^5 个/只接种到预先用0.5mL降植烷或液体石蜡致敏7-10天Balb/c小鼠的腹腔,7-12天内观察,收取腹水,离心后测定效价。经50%饱和硫酸铵沉淀保存或者低温冻存。腹水采用50%饱和硫酸铵

沉淀-正辛酸沉淀,或者用50%饱和硫酸铵沉淀-rProtein A-Sepharose Fast Flow亲和层析纯化,最后用SDS-PAGE检测纯度,需达到90%。本步骤制备的抗CMPF-蛋白质偶联物特异性单克隆抗体能与CMPF-蛋白质偶联物发生特异性结合反应,而不与非CMPF-蛋白质偶联物发生非特异性反应。

[0073] 实施例4抗CMPF的多克隆IgG抗体制备

[0074] 以上述实施例2制备的CMPF-蛋白质偶联物,以10mg CMPF-蛋白质偶联物/次/只与等量完全福氏佐剂混匀,以CMPF-血蓝蛋白为优选,家兔皮下多点注射免疫。每1-2周1次,连续5次,间隔1周后采用分离颈动脉,收集血液约80-120毫升,室温放置2小时,4℃10000rpm离心30min,分离收集血清。上述血清再用CMPF-蛋白质偶联物(以CMPF-OVA为优选),亲和层析柱纯化抗CMPF的特异性IgG型抗体,最后用8%SDS-PAGE检测纯度,需达到90%。获得兔源性多克隆IgG抗体。

[0075] 为获得抗CMPF的F(ab')₂特异性抗体片段,上述纯化的兔源性多克隆IgG抗体进一步在pH 4.5的50mM醋酸盐缓冲液中用0.1%(质量比)的胃蛋白酶切除IgG的Fc'端,37℃反应12小时,然后在调或不调pH值的情况下,用饱和硫酸铵和/或SPA和/或CMPF-蛋白质偶联物亲和层析方法纯化F(ab')₂抗体片段。获得特异性的抗CMPF的F(ab')₂特异性抗体片段。

[0076] 本实施例制备的抗CMPF多克隆抗体能与CMPF发生特异性结合反应,而不与非CMPF-蛋白质偶联物发生非特异性反应。

[0077] 实施例5. 检测试剂盒的配制

[0078] 5.1. 标准品溶液的配制

[0079] 5.1.1. 标准品稀释液pH5-8

[0080] 表1:校准品稀释液组成

组分	浓度	单位
磷酸盐缓冲液(PBS)	0.05-0.2	M
牛血清白蛋白(BSA)	0.01-10	g/L
稳定剂	0.1-0.5	g/L

[0082] 5.1.2. 将CMPF用上述标准品稀释液梯度稀释至0.5、10、20、40、80μg/mL,即为标准品溶液。

[0083] 5.2. 检测试剂的配制

[0084] 5.2.1. 试剂R1的配制pH5.5-8.0

[0085] 表2试剂R1组成

组分	浓度	单位
磷酸盐缓冲液(PBS)	50-200	mM
CMPF抗体	5-500	mg/L
NAD辅酶	1-10	mM
D-葡萄糖-6-磷酸二钠(G-6-P-Na ₂)	3-20	mM
表面活性剂	0.01-10	g/L
稳定剂	0.1-0.5	g/L

[0087] CMPF抗体选择实施例3的抗CMPF的特异性鼠源性单克隆IgG型抗体或实施例4的抗CMPF的兔源性多克隆IgG抗体。

[0088] 5.2.2. 试剂R2的配制pH5.5-8.5

[0089] 表3试剂R2组成

组分	浓度	单位
磷酸盐缓冲液 (PBS)	50-200	mM
G6PDH-CMPF 偶联物	5-500	U/L
BSA	0.01-10	g/L
表面活性剂	0.01-10	g/L

[0091] 实施例6. 检测方法

[0092] 4.1. 标准曲线的建立

[0093] 将试剂R1与上述配制的标准品溶液混合,混合体积比例为10-200:1,恒温孵育1-10分钟,加入等体积的R2,在自动生化分析仪或紫外分光光度计上,用340nm波长,测定吸光度A值变化,也即光密度OD值(吸光度A值=光密度OD值)变化,以标准品浓度为横坐标,OD值为纵坐标,绘制标准曲线。

[0094] 4.2. 样品的测试

[0095] 将试剂R1与样品混合,样品体积与标准品一致,恒温孵育1-10分钟,加入等体积的R2,在自动生化分析仪或紫外分光光度计上,用340nm波长,测定吸光度A值变化或光密度OD值变化。

[0096] 4.3. CMPF的含量浓度的测定

[0097] 记录样品加入后的吸光度A值或光密度OD值,根据标准曲线读数,即可得到样品中CMPF的含量浓度。

[0098] 本方法可以在自动生化分析仪上实现检测,以奥林巴斯5400为例,定标参数如下:

[0099] 表4生化分析仪测定参数(奥林巴斯5400)

项目名称	CMPF	小数位数	2	结果单位	mg/L
R1	240	R2	60	S	15
主波长	340nm	辅助波长	405nm	测定方法	END
反应起止点	14-26	定标方式	6AB	反应方向	上升
Method	END	Formula	POLYGONAL		

[0101] 定标结果的曲线图如图2所示。

[0102] 4.4测定结果比对

[0103] 1. 比对方法

[0104] 采用奥林巴斯5400生化分析仪,测定了21份血清标本,与质谱法进行了对照,质谱条件为(《空军医学杂志》,2015,31(5):284-287):

[0105] CAPCELL PAKC-18MG(100mm×2.1mm,5μm)色谱柱;水(含5mM醋酸铵)-乙腈为流动相;柱温:室温;流速:0.2ml/min;进样量:5μl;洗脱梯度:1~2min:5%乙腈;2~6min:95%乙腈;6~7min:5%乙腈。

[0106] 2. 比对结果

[0107] 测定21份临床标本,与质谱法进行比对,测定数据见表,相关性见图3, $R^2=0.9736$,结果表明相关性良好,本发明可以用于临床标本的检测。

[0108] 表5与质谱法(对照)比对结果

[0109]	序号	测定值 (mg/L)	对照值 (mg/L)
	1	0.25	0.22
	2	0.37	0.05
	3	0.42	0.16
	4	0.59	0.2
	5	0.61	0.08
	6	0.81	0.52
	7	0.94	0.58
	8	1.24	0.6
	9	1.5	0.95
	10	1.54	1.28
	11	1.69	0.81
	12	2.13	1.23
	13	2.26	2.47
	14	3.41	2.55
	15	3.44	3.97
	16	3.54	4.01
	17	5.45	6.02
	18	7.78	6.6
	19	8.48	7.66
	20	10.01	12.3
	21	15.6	18.9

[0110] 本发明的优点：

[0111] 与现有技术相比，本发明有益效果主要体现在：本发明所述检测外周血中CMPF的方法可在生化分析仪等大型自动化仪器上进行大样本自动化检测分析。方法具有检测灵敏度高，特异性强，检测重复性高和稳定性好等优点，本发明方法检测灵敏度0.5 μ g/L。

[0112] 最后需要说明的是，本发明所述制备的抗体包括特异性鼠源性单克隆IgG型（包括IgG1和/或IgG2a和/或IgG2b和/或IgG3和/或IgG4型）和兔源性多克隆IgG抗体（包含F(ab')₂特异性抗体片段）。本发明仅仅举例了上述两种抗体，作为本发明方法学所提供的检测方法，也适用于其他方法制备的抗体，如兔单克隆抗体，利用其它动物免疫制备的多克隆抗体，如羊抗，鸡抗等。

[0113] 以及需要说明的是，R1，R2仅作为试剂标示用，用于区别两种试剂，并不代表试剂加入的先后顺序，也不代表明示或暗示相对重要性，可将R1标示为R2，此时R2即标示为R1。

[0114] 上文所列出的一系列的详细说明仅仅是针对本发明的可行性实施例的具体说明，它们并非用以限制本发明的保护范围，凡未脱离本发明技艺精神所作的等效实施例或变更均应包含在本发明的保护范围之内。

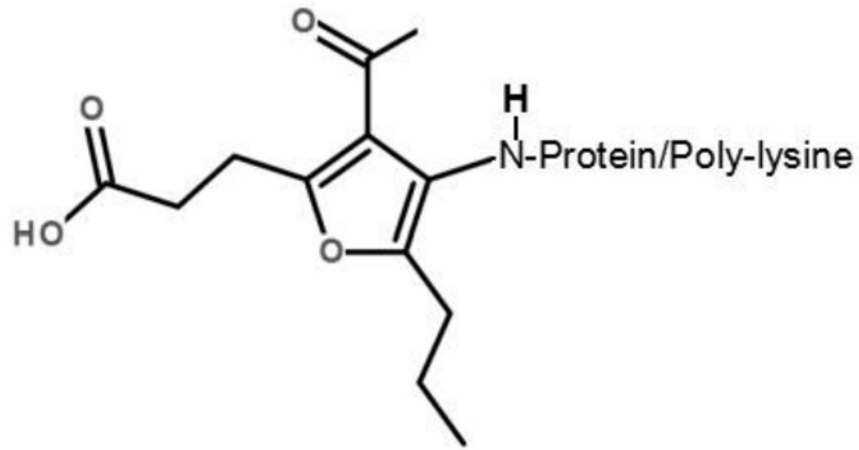


图1

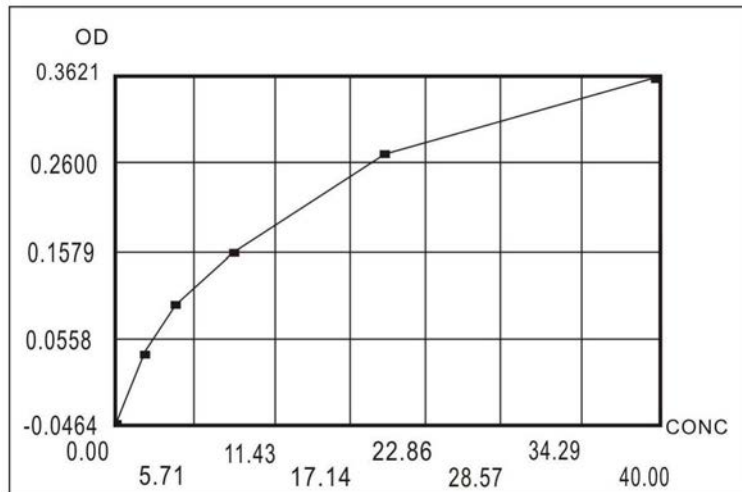


图2

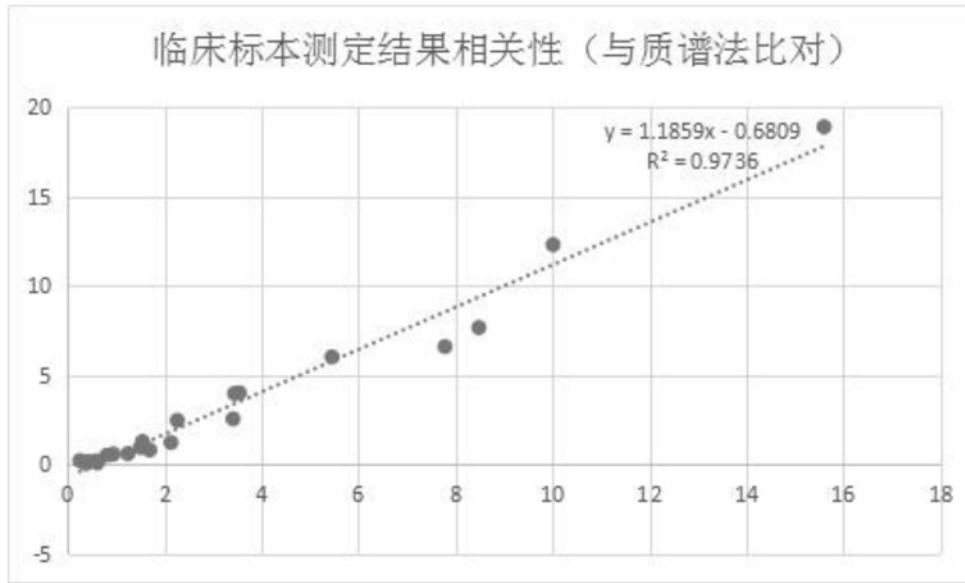


图3

专利名称(译)	CMPF均相酶免疫检测试剂盒、制备方法及检测方法		
公开(公告)号	CN109765360B	公开(公告)日	2020-01-21
申请号	CN201811518946.1	申请日	2018-12-12
[标]申请(专利权)人(译)	杭州博谱医药科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	杭州博谱医药科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	杭州博谱医药科技有限公司		
[标]发明人	朱永良 王轶雄 程小龙		
发明人	朱永良 王轶雄 程小龙		
IPC分类号	G01N33/535		
其他公开文献	CN109765360A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种CMPF均相酶免疫检测试剂盒、制备方法及检测方法，试剂盒的CMPF抗体的免疫原由CMPF与蛋白质或多聚赖氨酸偶联物作为免疫原进行免疫获得。分别利用CMPF支链末端的-COOH与蛋白质或多聚赖氨酸分子上的-NH₂进行偶联；接着利用这些偶联物免疫物作为免疫原进行免疫小鼠或家兔，最后获得特异性的抗CMPF的单克隆或多克隆抗体；并基于该抗CMPF的单克隆或多克隆抗体建立CMPF含量检测方法；该检测方法可在生化分析仪等大型自动化仪器上进行大样本自动化检测分析。检测方法具有检测灵敏度高，特异性强，检测重复性高和稳定性好等优点，本发明方法检测灵敏度0.5μg/L。

