



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108802372 A

(43)申请公布日 2018.11.13

(21)申请号 201810627586.2

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2018.06.19

(83)生物保藏信息

CGMCC No.15788 2018.05.24

CGMCC No.15789 2018.05.24

(71)申请人 上海伦泽生物科技有限公司

地址 201515 上海市金山区金山卫镇钱鑫
路301号124-Y室

(72)发明人 杨志红 赵伟

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限
公司 11245
代理人 关畅 张立娜

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

权利要求书1页 说明书22页

序列表2页 附图8页

(54)发明名称

检测人血清中内质网膜蛋白复合体亚单位
10的试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种用于检测人血清内质网
膜蛋白复合体亚单位10的试剂盒。本发明提供了
用于检测人血清中EMC10含量的试剂盒，包括捕
获抗体(抗EMC10的单克隆抗体6B9，由小鼠杂交
瘤细胞株6B9 CGMCC No.15789分泌产生)和检测
抗体(抗EMC10的单克隆抗体1F12，由小鼠杂交瘤
细胞株1F12 CGMCC No.15788分泌产生)。本发明
以小鼠杂交瘤细胞株6B9分泌产生的单抗作为捕
获抗体，小鼠杂交瘤细胞株1F12分泌产生的单抗
作为检测抗体，制备了用于检测人血清中EMC10
含量的试剂盒，已经成功在中国人群和高加索人
群血清中检测到了EMC10，且检测线很低，并且这
个方法已经非常稳定。

1. 一种用于检测人血清中内质网膜蛋白复合体亚单位10含量的化学发光免疫分析试剂盒,包括捕获抗体和检测抗体;所述捕获抗体为抗内质网膜蛋白复合体亚单位10的单克隆抗体6B9,所述检测抗体为抗内质网膜蛋白复合体亚单位10的单克隆抗体1F12;

所述单克隆抗体1F12由小鼠杂交瘤细胞株1F12分泌产生,所述小鼠杂交瘤细胞株1F12在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为CGMCC No.15788;

所述单克隆抗体6B9由小鼠杂交瘤细胞株6B9分泌产生,所述小鼠杂交瘤细胞株6B9在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为CGMCC No.15789。

2. 根据权利要求1所述的化学发光免疫分析试剂盒,其特征在于:所述化学发光免疫分析试剂盒中还含有内质网膜蛋白复合体亚单位10的标准品。

3. 根据权利要求1或2所述的化学发光免疫分析试剂盒,其特征在于:所述检测抗体为经标记物标记的所述单克隆抗体1F12;

进一步地,所述标记物为辣根过氧化物酶。

4. 根据权利要求1-3中任一所述的化学发光免疫分析试剂盒,其特征在于:所述化学发光免疫分析试剂盒中含有EMC10校准品、EMC10酶结合物、EMC10包被抗体板、发光底物液A、发光底物液B和浓缩洗涤液;

所述EMC10校准品为内质网膜蛋白复合体亚单位10的标准品;

所述EMC10酶结合物为经辣根过氧化酶标记的所述单克隆抗体1F12;

所述EMC10包被抗体板为包被有所述单克隆抗体6B9的微孔板;

所述发光底物液A为含有0.68mL/L过氧化氢的0.05MTris-HCl缓冲液;

所述发光底物液B为含有0.709g/L鲁米诺和0.264g/L对碘酚的0.05MTris-HCl缓冲液;

所述浓缩洗涤液为含有体积分数为0.5%的吐温-20的0.02M磷酸盐缓冲液。

5. 小鼠杂交瘤细胞株6B9,它在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为CGMCC No.15789。

6. 单克隆抗体,为由权利要求5所述的小鼠杂交瘤细胞株6B9分泌产生的单克隆抗体6B9。

7. 成套单克隆抗体,由单克隆抗体1F12和所述单克隆抗体6B9组成;所述单克隆抗体1F12由小鼠杂交瘤细胞株1F12分泌产生,所述小鼠杂交瘤细胞株1F12在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为CGMCC No.15788。

8. 权利要求5所述的小鼠杂交瘤细胞株6B9或权利要求6所述的单克隆抗体或权利要求7所述的成套单克隆抗体在制备权利要求1-4中任一所述的化学发光免疫分析试剂盒中的应用。

9. 权利要求1-4中任一所述的化学发光免疫分析试剂盒或权利要求5所述的小鼠杂交瘤细胞株6B9或权利要求6所述的单克隆抗体或权利要求7所述的成套单克隆抗体在如下任一中的应用:

(a1) 检测或辅助检测人血清中内质网膜蛋白复合体亚单位10;

(a2) 制备用于检测或辅助检测人血清中内质网膜蛋白复合体亚单位10的产品。

10. 根据权利要求1-4中任一所述的化学发光免疫分析试剂盒或权利要求8或9所述的应用,其特征在于:所述内质网膜蛋白复合体亚单位10的氨基酸序列如SEQ ID No.1或SEQ ID No.1的第28-254位所示。

检测人血清中内质网膜蛋白复合体亚单位10的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种用于检测人血清中内质网膜蛋白复合体亚单位10的试剂盒。

背景技术

[0002] 内质网膜蛋白复合体亚单位10 (ER membrane protein complex subunit 10, EMC10) 最初由王宣春等人从人胰岛素瘤组织的cDNA文库中克隆得到,当时命名为:INM02, 已将INM02基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列投递到GenBank数据库(登录号为:AY194293) [1]。王宣春所在团队在国际上首次报导了INM02基因的克隆及初步功能研究,文章已发表在《Journal of Endocrinology》杂志上[2]。因为EMC10与任何已知的蛋白或蛋白域均没有明显的同源性,所以EMC10被认为是一个新的蛋白。王宣春所在团队一直从事EMC10的研究工作,经过近10年的努力,已经揭示了EMC10的多种生物学功能。利用课题组建立的ELISA方法,在国际上首次报导了EMC10是一个在人血清中可以被检测得到的分泌蛋白,并且发现在小鼠胰岛β细胞中Emc10 (Inm02) 基因的表达受葡萄糖的调控,提示它在糖代谢中可能发挥重要的作用[2]。王宣春所在团队已成功建立了Emc10基因剔除的小鼠模型,发现Emc10基因缺失小鼠的3个重要表型,包括:糖耐量改善、抵抗饮食诱导的肥胖以及雄性不育,并初步明确了导致上述表型的病因和分子机制。Emc10基因缺失小鼠胰岛β细胞重量增加,空腹和葡萄糖刺激后的血清胰岛素水平显著升高,能够显著改善普通饮食和高脂饮食小鼠的糖耐量。Emc10基因敲除会导致雄性小鼠完全不育,缺少Emc10基因的精子表现出多方面的缺陷,包括形态学的异常、精子运动力减弱、精子获能受损、顶体反应缺失,因此无法使完整的和去透明带的卵子受精,然而,胞浆内单精注射技术 (ICSI) 能够挽救EMC10基因敲除导致的雄性不育。从机制上说,EMC10缺失会导致钠/钾-ATP酶失活,引起精子细胞内钠离子水平增加,从而导致精子运动力减弱、形态学异常;此外,EMC10缺失导致HCO₃⁻ 诱导的cAMP/PKA信号通路激活受损以及精子获能相关蛋白酪氨酸磷酸化水平的下降;王宣春所在团队的研究显示EMC10通过维持精子内Na⁺、HCO₃⁻的平衡,在雄性生育中发挥着不可或缺的作用。此外,他们还发现EMC10缺失能够阻止小鼠出现饮食诱导的肥胖,改善糖耐量异常、高胰岛素血症、胰岛素抵抗、高瘦素血症以及高脂血症等肥胖相关的代谢紊乱;而过表达EMC10则促进小鼠肥胖及其代谢紊乱的发生;代谢笼研究显示,通过增加棕色和皮下脂肪的耗氧量,高脂饮食的Emc10基因缺失小鼠的能量消耗显著高于野生小鼠;通过增强PKA/CREB和p38MAPK通路的活性,EMC10缺失既能促进基础状态下又能促进beta肾上腺素能激动剂刺激的脂肪细胞中UCP1和PGC1a基因的表达;上述结果提示EMC10在能量代谢调控和肥胖发生中的发挥重要的作用。

[0003] 除了王宣春所在团队以外,其他研究小组也对EMC10的功能进行了研究,有研究显示EMC10 (HSS1) 能够抑制胶质瘤细胞株的增殖、迁移、侵袭,同时也能够抑制内皮细胞的新生血管形成,因此EMC10被认为是治疗恶性胶质母细胞瘤潜在的靶点[4,5]。还有研究发现,在一个精神分裂小鼠模型中,升高的Mrita22 (人EMC10的小鼠同源基因) 能够抑制神经元细

胞树突和脊突的发育,通过降低Mrita22的水平能够完全挽救上述小鼠模型海马椎体神经元树突和脊突发育的缺陷,提示EMC10在小鼠神经元树突和脊突形成过程中发挥重要作用[6,7]。最近来自德国的研究者发现,在一个心肌梗塞的小鼠模型,Emc10缺失导致梗塞边缘区的血管新生减少,左心室收缩和舒张功能受损,给予心肌梗塞小鼠补充EMC10能够增加梗塞边缘区的血管新生,改善心梗后受损的左室功能,提示EMC10是一个心肌梗塞后促进组织修复的具有血管新生功能的生长因子[8]。

[0004] 综上所述,EMC10在糖尿病、肥胖、男性生育、心肌梗塞、精神分裂症以及肿瘤等疾病的发生过程中发挥作用,EMC10氨基酸结构N端有一个明显的信号肽序列,来自不同的研究小组均证实EMC10是一个在人和小鼠血清中能够检测得到的分泌肽,因此建立一种方法,检测不同疾病患者血清中EMC10的含量,对于明确EMC10在上述不同疾病中的作用以及EMC10作为某种或某些疾病的血清标志物均具有重要的科学和实际价值。目前除了王宣春所在团队还没有文献报道能够在人血清中检测到EMC10,课题组之前采用兔抗人EMC10的多克隆抗体建立了一个ELISA方法,在人血清中检测到了EMC10的存在(定性),由于在这个方法中EMC10多克隆抗体既做包被抗体又做检测抗体,因此对血清中EMC10的定量检测并不是十分准确,检测到人血清中EMC10的含量在1~10ng/mL。

[0005] 参考文献:

- [0006] [1]WANG X C,XU S Y,WU X Y,et al.Gene expression profiling in human insulinoma tissue:genes involved in the insulin secretion pathway and cloning of novel full-length cDNAs[J].Endocr Relat Cancer,2004,11(2):295~303.
- [0007] [2]WANG X,GONG W,LIU Y,et al.Molecular cloning of a novel secreted peptide,INM02, and regulation of its expression by glucose[J].J Endocrinol,2009,202(3):355~364.
- [0008] [3]ZHOU Y C,WU F,ZHANG M,et al.EMC10 governs male fertility via maintaining sperm ion balance[J].J Mol Cell Biol,2018(Accepted).
- [0009] [4]JUNES-GILL K S,GALLAHER T K,GLUZMAN-POLTORAK Z,et al.hHSS1:a novel secreted factor and suppressor of glioma growth located at chromosome 19q13.33[J].J Neurooncol,2011,102(2):197~211.
- [0010] [5]JUNES-GILL K S,LAWRENCE C E,WHEELER C J,et al.Human Hematopoietic Signal peptide-containing Secreted 1(hHSS1) modulates genes and pathways in glioma:implications for the regulation of tumorigenicity and angiogenesis[J].BMC Cancer,2014,14:920.
- [0011] [6]XU B,HSU P K,STARK K L,et al.Derepression of a neuronal inhibitor due to miRNA dysregulation in a schizophrenia-related microdeletion[J].Cell,2013,152(1~2):262~275.
- [0012] [7]DIAMANTOPOULOU A,SUN Z,MUKAI J,et al.Loss-of-function mutation in Mirta22/Emc10 rescues specific schizophrenia-related phenotypes in a mouse model of the 22q11.2 deletion[J].Proc Natl Acad Sci U S A,2017,114(30):E6127~E6136.
- [0013] [8]REBOLL M R,KORF-KLINGEBIEL M,KLEDE S,et al.EMC10 (Endoplasmic

Reticulum Membrane Protein Complex Subunit 10) Is a Bone Marrow-Derived Angiogenic Growth Factor Promoting Tissue Repair After Myocardial Infarction [J]. Circulation, 2017, 136 (19) :1809-1823.

发明内容

[0014] 为了有效解决以上技术问题,本发明采用小鼠杂交瘤技术制备了8株小鼠抗人EMC10的单克隆抗体,筛选出一对单抗,其中包括本发明所用的1F12株,建立了双夹心CLIA(化学发光免疫分析)方法,使对人血清中EMC10检测的灵敏度和特异度大幅度提高,采用CLIA方法检测到健康体检人群(成人)血清EMC10正常参考值(95%)0.56~37.72ng/ml。

[0015] 本发明的目的是提供一种用于检测人血清中内质网膜蛋白复合体亚单位10含量的化学发光免疫分析试剂盒。

[0016] 第一,本发明要求保护一种用于检测人血清中内质网膜蛋白复合体亚单位10含量的化学发光免疫分析试剂盒。

[0017] 本发明所提供的用于检测人血清中内质网膜蛋白复合体亚单位10含量的化学发光免疫分析试剂盒,包括捕获抗体和检测抗体;所述捕获抗体为抗内质网膜蛋白复合体亚单位10的单克隆抗体6B9,所述检测抗体为抗内质网膜蛋白复合体亚单位10的单克隆抗体1F12;

[0018] 所述单克隆抗体1F12由小鼠杂交瘤细胞株1F12分泌产生,所述小鼠杂交瘤细胞株1F12在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为CGMCC No.15788;

[0019] 所述单克隆抗体6B9由小鼠杂交瘤细胞株6B9分泌产生,所述小鼠杂交瘤细胞株6B9在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为CGMCC No.15789。

[0020] 根据需要,所述化学发光免疫分析试剂盒中还含有内质网膜蛋白复合体亚单位10的标准品。

[0021] 进一步地,所述检测抗体经标记物标记的抗内质网膜蛋白复合体亚单位10的单克隆抗体1F12。其中,所述标记物可为辣根过氧化物酶。

[0022] 在本发明的一个实施例中,所述化学发光免疫分析试剂盒中具体含有EMC10校准品、EMC10酶结合物、EMC10包被抗体板、发光底物液A、发光底物液B和浓缩洗涤液。

[0023] 所述EMC10校准品为内质网膜蛋白复合体亚单位10的标准品;

[0024] 所述EMC10酶结合物为经辣根过氧化物酶标记的所述单克隆抗体1F12;

[0025] 所述EMC10包被抗体板为包被有所述单克隆抗体6B9的微孔板;

[0026] 所述发光底物液A为含有0.68mL/L过氧化氢的0.05MTris-HCl缓冲液;

[0027] 所述发光底物液B为含有0.709g/L鲁米诺(Luminol)和0.264g/L对碘酚(p-iodophenol)的0.05MTris-HCl缓冲液;

[0028] 所述浓缩洗涤液为含有体积分数为0.5%的吐温-20的0.02M磷酸盐缓冲液。

[0029] 第二,本发明要求保护小鼠杂交瘤细胞株6B9。

[0030] 本发明所提供的小鼠杂交瘤细胞株6B9,它在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为CGMCC No.15789。

- [0031] 第三,本发明要求保护如下单克隆抗体或成套单克隆抗体。
- [0032] 本发明所要求保护的单克隆抗体,为前文所述的单克隆抗体6B9。
- [0033] 本发明所要求保护的成套单克隆抗体,由单克隆抗体1F12和所述单克隆抗体6B9组成。所述单克隆抗体1F12由小鼠杂交瘤细胞株1F12分泌产生,所述小鼠杂交瘤细胞株1F12在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为CGMCC No.15788。
- [0034] 第四,本发明要求保护前文所述的小鼠杂交瘤细胞株6B9或前文所述的单克隆抗体或成套单克隆抗体在制备前文所述的化学发光免疫分析试剂盒中的应用。
- [0035] 第五,本发明要求保护所述化学发光免疫分析试剂盒或所述小鼠杂交瘤细胞株6B9或所述单克隆抗体或成套单克隆抗体在如下任一中的应用:
- [0036] (a1) 检测或辅助检测人血清中内质网膜蛋白复合体亚单位10;
- [0037] (a2) 制备用于检测或辅助检测人血清中内质网膜蛋白复合体亚单位10的产品。
- [0038] 在本发明中,所述内质网膜蛋白复合体亚单位10的氨基酸序列具体如SEQ ID No.1或SEQ ID No.1的第28-254位所示。SEQ ID No.1全长254aa,其中第1-27位为信号肽序列,第28-354位为EMC10成熟蛋白序列。
- [0039] 本发明通过小鼠杂交瘤技术获得了8株EMC10单克隆抗体,对包被抗体及检测抗体进行效价检测,发现4B12-1,4B12-2,1F12,6B9效价比较高,然后将8个单抗两两配对找到了一对最佳组合,6B9/1F12。基于此,本发明制备了用于检测人血清中EMC10含量的化学发光免疫分析试剂盒(6B9为捕获抗体,1F12为检测抗体),已经成功在中国人群和高加索人群血清中检测到了EMC10,且检测灵敏度高、特异性强,并且这个方法已经非常稳定。

[0040] 保藏说明

- [0041] 参据的生物材料(株):1F12
- [0042] 科学描述:小鼠杂交瘤细胞株
- [0043] 保藏机构:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心
- [0044] 保藏机构简称:CGMCC
- [0045] 地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号
- [0046] 保藏日期:2018年5月24日
- [0047] 保藏中心登记入册编号:CGMCC No.15788
- [0048] 参据的生物材料(株):6B9
- [0049] 科学描述:小鼠杂交瘤细胞株
- [0050] 保藏机构:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心
- [0051] 保藏机构简称:CGMCC
- [0052] 地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号
- [0053] 保藏日期:2018年5月24日
- [0054] 保藏中心登记入册编号:CGMCC No.15789

附图说明

- [0055] 图1为真核表达EMC10蛋白时pRAG2a-INM02转染后不同时间段电泳图。
- [0056] 图2为真核表达EMC10蛋白纯化一次后的电泳图。

- [0057] 图3为真核表达EMC10蛋白纯化两次后的电泳图。
- [0058] 图4为采用Dot blot的方法鉴定纯化后EMC10蛋白。采用的抗EMC10的抗体为兔抗人EMC10多克隆抗体。样本说明：初始上样量30ng，依次2倍稀释。1-9的上样量依次为30ng、15ng、7.5ng、3.75ng、1.875ng、0.9375ng、0.46875ng、0.234375ng和0.1171875ng。
- [0059] 图5为采用Western blot的方法鉴定纯化后EMC10蛋白。采用的抗EMC10的抗体为兔抗人EMC10多克隆抗体。
- [0060] 图6为采用Dot blot的方法鉴定纯化后EMC10蛋白。采用的抗EMC10的抗体为另一株兔抗人EMC10多克隆抗体。样本说明：初始上样量30ng，依次2倍稀释。1-9的上样量依次为30ng、15ng、7.5ng、3.75ng、1.875ng、0.9375ng、0.46875ng、0.234375ng和0.1171875ng。
- [0061] 图7为采用Western blot的方法鉴定纯化后EMC10蛋白。采用的抗EMC10的抗体为另一株兔抗人EMC10多克隆抗体。
- [0062] 图8为EMC10多抗包板，生物素标记抗体用6B9-Biotin的标准曲线。
- [0063] 图9为EMC10单抗(1F12)包板，生物素标记抗体用6B9-Biotin的标准曲线。
- [0064] 图10为EMC10单抗(6B9)包板，生物素标记抗体用6B9-Biotin的标准曲线。
- [0065] 图11为EMC10单抗(4B12-1)包板，生物素标记抗体用6B9-Biotin的标准曲线。
- [0066] 图12为EMC10单抗(4B12-2)包板，生物素标记抗体用6B9-Biotin的标准曲线。
- [0067] 图13为EMC10多抗包板，生物素标记抗体用4B12-2-Biotin的标准曲线。
- [0068] 图14为EMC10单抗(1F12)包板，生物素标记抗体用4B12-2-Biotin的标准曲线。
- [0069] 图15为EMC10单抗(6B9)包板，生物素标记抗体用4B12-2-Biotin的标准曲线。
- [0070] 图16为EMC10单抗(4B12-1)包板，生物素标记抗体用4B12-2-Biotin的标准曲线。
- [0071] 图17为EMC10单抗(4B12-2)包板，生物素标记抗体用4B12-2-Biotin的标准曲线。
- [0072] 图18为EMC10单抗(4B12-2)包板，生物素标记抗体用4B12-1-Biotin的标准曲线。

具体实施方式

- [0073] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。
- [0074] 下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。
- [0075] 真核表达载体pRAG2a：上海锐劲生物技术有限公司产品。
- [0076] HEK 293F细胞：Thermo Fisher, Cat No.R79007。
- [0077] 实施例1、EMC10单抗的制备
- [0078] 一、构建EMC10真核表达重组质粒
- [0079] (1) PCR克隆全长EMC10cDNA，并在片段两端引入NheI与XhoI酶切位点。
- [0080] 以SEQ ID No.2所示的DNA片段为模板为模版，以EMC10-F和EMC10-R为引物，PCR扩增得到700bp左右的产物，胶回收PCR产物并纯化。
- [0081] EMC10-F: 5' -CTAGCTAGCAAGCGGCTGCCGGCCGGACTG-3'；
- [0082] EMC10-R: 5' -CCGCTCGAGGCCCTCCTGTGGCGGTGGCG-3'。
- [0083] (2) NheI与XhoI双酶切胶回收产物，并将其连入同样酶切的真核表达载体pRAG2a中，T4DNA连接酶连接，构建重组质粒，转化入TOP10感受态细胞中。
- [0084] (3) 挑取阳性克隆PCR鉴定：鉴定正确的克隆测序验证，测序结果与目标基因序列完全一致的重组质粒命名为pRAG2a-EMC10。pRAG2a-EMC10的结构描述为：将SEQ ID No.2的

第82-762位所示DNA片段替换真核表达载体pRAG2a的酶切位点NheI与XhoI之间的小片段后得到的重组质粒。SEQ ID No.2为带有信号肽编码序列的EMC10基因的cDNA, 编码SEQ ID No.1所示的带有信号肽的EMC10蛋白。其中SEQ ID No.2的第1-81位为信号肽的编码基因(pRAG2a质粒上带有该序列)。

[0085] (4) 质粒抽提:50ml过夜培养物, 抽提质粒得到100 μ g以上质粒。

[0086] 二、转染与表达

[0087] (1) 培养 $>1 \times 10^8$ HEK 293F细胞备用。

[0088] (2) 用稀释液 (Opti-MEM) 将100 μ g步骤一构建的重组质粒pRAG2a-EMC10稀释到1ml,轻轻的混匀。

[0089] (3) 用稀释液 (Opti-MEM) 稀释200 μ l LipofectamineTM2000脂质体终体积至1ml。轻轻混匀,室温放置5min。

[0090] (4) 将稀释后的质粒加入到稀释好的LipofectamineTM2000脂质体中,使其混合物终体积为2ml,轻轻混匀。

[0091] (5) 室温孵育30min。

[0092] (6) 转移 1×10^8 HEK 293F细胞到500ml摇瓶中,加入新鲜、预热的Expression Medium使其终体积至98ml。

[0093] (7) 加入2ml孵育后的DNA-LipofectamineTM2000混合物

[0094] (8) 8%CO₂浓度的培养箱内,37℃,125rpm培养。

[0095] (9) 48h后收集细胞培养物,SDS-PAGE电泳检测。

[0096] (10) 根据分批SDS-PAGE检测结果(图1),4-5天左右离心,收集上清,纯化蛋白。所得蛋白为切除了信号肽的EMC10成熟蛋白(如SEQ ID No.1的第28-254位所示)。

[0097] 三、纯化蛋白及SDS-PAGE鉴定

[0098] (1) 样品准备:4℃,离心收集表达上清。离心上清中加入binding buffer (8M尿素,20mM磷酸钠,500mM NaCl,pH 7.8)以调整样品的成分。0.45 μ m滤膜处理,准备上样。

[0099] (2) 平衡:5个柱体积的binding buffer平衡镍柱。

[0100] (3) 上样:0.45 μ m滤膜处理好的样品全部上样。

[0101] (4) 洗杂:5个柱体积binding buffer洗杂,直至流穿无物质流出。

[0102] (5) 洗脱:5个柱体积elution buffer (8M尿素,20mM NaH₂P0₄,500mM NaCl,pH 4.0)洗脱,收集洗脱产物。

[0103] (6) SDS-PAGE检测:结果如图2和图3所示。图2、图3为真核表达蛋白EMC10的2次纯化电泳图,可见纯化后在36KD左右出现了表达条带,并且第二次纯化后比第一次明显浓集,此即为EMC10蛋白。

[0104] 四、Dot blot与Western blot鉴定

[0105] 1、采用Dot blot的方法鉴定步骤三纯化后所得的真核表达蛋白EMC10。采用的抗EMC10的抗体为兔抗人EMC10多克隆抗体(用SEQ ID No.1所示EMC10作为免疫原免疫新西兰大白兔后得到的多克隆抗体);二抗为山羊抗兔的HRP抗体(Thermo Fisher,Catalog#65-6120)。

[0106] 结果如图4所示。由图可见,2000倍稀释,样本蛋白稀释到约0.47ng有阳性结果;约0.23ng无阳性结果。

[0107] 2、采用Western blot的方法鉴定步骤三纯化后所得的真核表达蛋白EMC10。采用的抗EMC10的抗体为兔抗人EMC10多克隆抗体(用SEQ ID No.1所示EMC10作为免疫原免疫新西兰大白兔后得到的多克隆抗体)；二抗为山羊抗兔的HRP抗体(Thermo Fisher,Catalog# 65-6120)。

[0108] 结果如图5所示。由图可见,10ng样本上样,在36KD左右有阳性条带。

[0109] 3、将步骤1和2中的抗EMC10的抗体替换为兔抗人EMC10多克隆抗体(用SEQ ID No.1所示EMC10作为免疫原免疫新西兰大白兔后得到的多克隆抗体)后,再分别进行Dot blot和Western blot鉴定。

[0110] Dot blot鉴定结果如图6所示。由图可见,2000稀释,样本蛋白稀释到约7.5ng有阳性结果;约1.875ng无阳性结果。

[0111] Western blot鉴定结果如图7所示。由图可见,10ng样本上样,在36KD左右有阳性条带。

[0112] Dot blot与Western blot鉴定的结果表明表明EMC10蛋白真核表达成功。

[0113] 五、动物免疫

[0114] 选取6只6-8周龄雌性BALB/c小鼠,将步骤三纯化后的EMC10蛋白与弗氏完全佐剂体积比1:1混合首次免疫,皮下注射100 μ g,每2-3周加强免疫一次,采用混合剂皮下注射100 μ g。四免后采血检测,通过间接ELISA方法确定抗血清针对EMC10蛋白的效价(效价用样品孔OD值/阴性孔OD值 ≥ 2.1 的血清的最大稀释倍数表示),待效价大于1:10000,选择1-2只小鼠进行细胞融合安排。

[0115] 上述间接ELISA法测定血清效价的步骤具体如下:

[0116] (1)包板:吸取自行制备的标准品EMC10(在实施例1的步骤三中表达纯化)的溶解在0.1M PBS缓冲液中,制成浓度为1 μ g/ml的包被溶液。100 μ l/孔,4℃包被过夜。

[0117] (2)洗板:弃去孔内液体,甩干,洗板2次,每次浸泡1-2分钟,大约200 μ L/每孔,甩干并在吸水纸上轻拍将孔内液体拍干。

[0118] (3)封闭:封闭液250 μ l/孔,37℃,2h。

[0119] (4)洗板:弃去孔内液体,甩干,洗板5次,方法同步骤(2)。

[0120] (5)检测:吸取待测血清溶解在抗体稀释液(0.1M PBS)中,制成稀释倍数为1000、3000、9000、27000倍的工作液,每孔加不同浓度的工作液100 μ L,注意不要有气泡,加样时加于酶标板底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀。给酶标板覆膜,37℃孵育2h。

[0121] (6)洗板:弃去孔内液体,甩干,洗板5次,方法同步骤(2)。

[0122] (7)每孔加入兔抗鼠-HRP 100 μ L,加上覆膜,37℃温育1小时。

[0123] (8)弃去孔内液体,甩干,洗板5次,方法同步骤(2)。

[0124] (9)显色:底物显色A、B液1:1(体积比)混合后,每孔加100 μ L,酶标板加上覆膜,37℃避光孵育15分钟。

[0125] (10)每孔加终止液50 μ L,终止反应,此时蓝色立转黄色。终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。

[0126] (11)立即用酶标仪在450/630nm双波长测量各孔的光密度(OD值),并读数。应提前打开酶标仪电源,预热仪器,设置好检测程序。

[0127] (12)结果判断:样品孔OD值/阴性孔(即空白对照孔)OD值 ≥ 2.1 时为阳性。结果显示

示血清抗EMC10抗体稀释倍数大于10,000的样品孔为阳性,说明抗体效价大于1:10000。

[0128] 六、细胞融合

[0129] (1) 骨髓瘤细胞制备:融合前一周,用含10%FBS DMEM培养基扩大培养SP2/0细胞。到融合时,细胞长满大约6瓶T25细胞培养瓶,在融合当天收集SP2/0细胞到50ml离心管中,1000rpm,5min离心。弃上清,然后再加入20ml DMEM基础培养基,吹散细胞然后计数。

[0130] (2) 脾细胞制备:四次免疫后血清ELISA效价在1:10000以上的小鼠,在融合前3天终免,腹腔注射步骤三纯化后的EMC10蛋白与弗氏完全佐剂体积比1:1混合剂100 μ g。融合当天用颈椎脱臼法安乐死要融合的小鼠。用75%酒精浸泡5min。无菌取脾脏,把脾脏放入内有10ml DMEM基础培养的培养皿中。取筛网放入另一个平皿中,将脾脏转移到筛网上,用注射器内心研磨脾脏。加入DMEM到筛网上,冲洗筛网,使脾细胞更多的收集到平皿中。将细胞移至10ml离心管中,用不含血清的DMEM洗脾细胞两次,1000rpm离心5min,收集脾细胞计数。

[0131] (3) 细胞融合:混合骨髓瘤细胞和脾细胞,使骨髓瘤细胞同脾细胞数量比在1:20为宜。把细胞放到50ml离心管中,用DMEM基础培养基稀释,然后离心1000rpm 5min。弃上清。摇动离心管使细胞均匀。缓慢加入0.8ml 50%PEG,反应90秒,然后加入20-30ml DMEM培养基终止PEG。把融合的细胞放到37℃水浴锅中反应10分钟。1000rpm 5min离心,弃上清然后加入HAT DMEM培养基。把融合的细胞铺到96孔板中,每孔100 μ l。然后将细胞培养板放到CO₂培养箱中培养。

[0132] 融合后4天查看,杂交瘤细胞克隆率在50%以上,有少量的细胞碎片,细胞生长状态良好。融合10天后开始进行筛选检测。

[0133] 七、融合筛选及亚克隆

[0134] (1) 融合筛选:在检测的前一天,用PBS包被5 μ g/ml抗原(步骤三纯化后的EMC10蛋白)于ELISA板,过夜。次日吸取细胞上清100 μ l/孔进行ELISA检测,根据ELISA结果,判断阳性孔(样品孔OD值/阴性孔(空白对照孔)OD值 ≥ 2.1 ,则判定为阳性孔)。用单道移液器挑检整板检测出的阳性孔,进行第二次确认检测,进一步确认阳性孔。确定后的阳性孔细胞进行亚克隆。

[0135] (2) 亚克隆:吹打阳性孔中细胞,计数,在离心管中加入4ml DMEM培养基,取100 μ l细胞悬液到离心管中,吹匀后留1ml,补加DMEM到4ml,吹匀,留100 μ l(约2滴)在管底。在离心管中加DMEM至5ml,混匀后滴加至96孔板的前三行,每孔一滴管底留1.8-2ml左右,补加DMEM至5ml,吹匀后滴加至96孔板的D、E、F三行,每孔一滴,管底留1.5-1.8ml左右,补加DMEM至2.8-3ml左右,吹匀后滴加至96孔板的G、H行,每孔一滴,7-10天后在显微镜下观察,检测有克隆生长的孔,标记出单克隆的孔,尽可能挑取阳性的单克隆细胞进行再次亚克隆,检测至100%阳性后,挑出单克隆孔扩大培养定株。

[0136] 最终获得8个能够稳定分泌抗EMC10蛋白的单克隆抗体的杂交瘤细胞株,分别编号为8C11、6B9、1F12、4B12-1、1H11、4C2、4B12-2和8A3。

[0137] 八、腹水制备及纯化

[0138] (1) 腹水制备:每只小鼠腹腔内注射0.5ml液体石蜡,7天后30天以内向预处理过的小鼠腹腔内注射杂交瘤细胞。按每只小鼠注射1×10⁶个细胞的量,注射杂交瘤细胞。7至10天,用注射器针头小心从腹腔采出尽可能多的液体,并间接ELISA法进行效价测定(效价用样品孔OD值/阴性孔OD值 ≥ 2.1 的血清的最大稀释倍数表示,阴性孔为空白对照)。小鼠在最

后一次采集后颈椎脱位法处死。

[0139] (2) 纯化: 将所收集的腹水离心取上清, 准备好蛋白A琼脂糖介质并装柱, 将腹水用PBS稀释10倍后缓慢上样, 上样结束后用磷酸盐缓冲液洗涤至紫外检测仪达到最低值, 甘氨酸洗脱缓冲液洗脱, 即得到所需纯化抗体, 立即在PBS中进行4℃透析过夜, 隔日进行纯度, 浓度和效价测定(效价用样品孔OD值/阴性孔OD值 ≥ 2.1 的血清的最大稀释倍数表示, 阴性孔为空白对照)。

[0140] A. 定株后细胞株所得腹水ELISA效价如下:

[0141] 包被抗原: EMC10(步骤三纯化后的EMC10蛋白)

[0142] 包被浓度: 1 μ g/ml; 100 μ l/孔;

[0143] 一抗: 制得的八种抗EMC10单克隆抗体;

[0144] 二抗: 兔抗鼠-HRP(Santa Cruz, Cat No.sc-358917)。

[0145] 表1定株后细胞株所得腹水ELISA法测效价结果(OD值)

稀释倍数	定株后的各杂交瘤细胞株								
	1H11	4B12-1	4C2	4B12-2	8A3	1F12	8C11	6B9	
[0146]	1000	3.458	3.453	3.444	3.387	3.385	3.409	3.416	3.414
	3000	3.301	3.277	3.230	3.324	3.235	3.281	3.280	3.291
	9000	3.181	3.447	3.411	3.416	3.367	3.349	3.347	3.351
	27000	2.219	3.388	3.203	3.339	3.217	3.303	3.204	3.290
	81000	0.983	3.442	2.883	3.387	2.490	3.392	2.818	3.394
	243000	0.497	3.450	1.720	3.420	2.882	3.338	1.865	3.311
	729000	0.209	3.447	0.672	3.430	0.602	3.172	0.638	3.279
	2187000	0.126	3.393	0.303	3.405	0.233	2.397	0.012	0.010

[0147] 注: 表1中倒数第一行的最后两个数值是空白对照(即阴性孔)。

[0148] 根据表1可知: 阴性孔OD值约为0.01, 稀释倍数为2187000时, 各样品孔OD值分别为0.126、3.393、0.303、3.405、0.233、2.397。P/N均大于2.1, 因此各细胞株所得腹水ELISA效价均大于1:2187000。

[0149] B. 定株后细胞株所得腹水经纯化后ELISA效价如下:

[0150] 包被抗原: EMC10(步骤三纯化后的EMC10蛋白)

[0151] 包被浓度: 1 μ g/ml; 100 μ l/孔;

[0152] 一抗: 制得的八种抗EMC10单克隆抗体;

[0153] 二抗: 兔抗鼠-HRP(Santa Cruz, Cat No.sc-358917)。

[0154] 表2定株后细胞株所得腹水经纯化后ELISA法测效价结果(OD值)

浓度 ng/ml	定株后的各杂交瘤细胞株								
	8C11	6B9	1F12	4B12-1	1H11	4C2	4B12-2	8A3	
[0155]	1000.00	3.455	3.443	3.447	3.449	3.439	3.448	3.403	3.426
	333.33	3.314	3.338	3.298	3.338	3.114	3.255	3.359	3.270
	111.11	3.412	3.443	3.444	3.443	2.193	3.101	3.438	2.809
	37.04	2.301	3.356	3.357	3.335	0.972	1.585	3.401	1.440
	12.35	0.896	3.445	3.434	3.380	0.367	0.652	3.353	0.530
	4.12	0.361	2.778	2.690	2.707	0.156	0.280	3.011	0.236
	1.37	0.160	1.377	1.307	1.355	0.067	0.115	1.662	0.104
	0.46	0.078	0.528	0.533	0.488	0.038	0.054	0.024	0.040

[0156] 注:表2中倒数第一行的最后两个数值是空白对照(即阴性孔)。

[0157] 根据表2可知:阴性孔OD值约为0.14,根据P/N大于2.1为阳性这一判断标准,当OD值大于0.294时为阳性(见表2中黑体加粗数值)。

[0158] 其中,编号为1F12的小鼠杂交瘤细胞株已于2018年5月24日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,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,邮编100101),保藏编号为CGMCC No.15788。

[0159] 编号为6B9的小鼠杂交瘤细胞株已于2018年5月24日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,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,邮编100101),保藏编号为CGMCC No.15789。

[0160] 实施例2、EMC10不同抗体配对ELISA双抗夹心法检测人血清中EMC10的含量

[0161] 一、目的

[0162] EMC10ELISA双抗夹心法检测人血清中EMC10的含量。

[0163] 二、检测原理

[0164] 用纯化的抗体包被微孔板,制成固相载体,往包被抗EMC10抗体的微孔中依次加入标本或标准品、生物素化的抗EMC10抗体、HRP标记的亲和素,经过彻底洗涤后用底物TMB显色。TMB在过氧化物酶的催化下转化为蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样本中的EMC10呈正相关。用酶标仪在450/630nm双波长测量吸光度(OD值),计算样本浓度。

[0165] 三、实验仪器

[0166] 1、主要设备

[0167] (1) 多功能酶标仪:型号:Model 680;生产厂家:Bio-Rad。

[0168] (2) 37℃恒温箱:型号:GSP-9160MBE;生产厂家:上海博迅实业有限公司。

[0169] 2、主要器具

[0170] (1) 单道移液器:规格:10μL、20μL、100μL、200μL、1000μL。

[0171] (2) 多道移液器:规格:300μL、100μL。

[0172] 四、实验材料

[0173] 1、主要材料

[0174] XRI酶标板:货号:59797;生产厂家:深圳市金灿华实业有限公司;批号:2844;备

注:常温保存。

[0175] 2、其它材料

[0176] (1) 水:级别:蒸馏。

[0177] (2) 试剂瓶:规格:1L。

[0178] (3) EP管:规格:0.5和1.5ml。

[0179] 五、检测前准备工作

[0180] 1、配制0.05%的PBST洗液(含有0.05%体积百分含量吐温-20的PBS缓冲液)5L。

[0181] 2、标准品:加入标准品EMC10(在实施例1的步骤三中表达纯化)根据需要进行倍比稀释,配制成以下浓度:100、33.333、11.111、3.704、1.235、0.412、0.137、0.046、0.015、0.005、0.002、0ng/mL,样品稀释液(0.1M PBS)直接作为空白孔0ng/mL。如配制33.333ng/mL标准品:取800μL 100ng/mL的上述标准品加入含有1600μL样品稀释液的EP管中,混匀即可,其余浓度依此类推。

[0182] 3、血清样本:

[0183] 血清样本A:从下述不同人血清样本:585(30')、585(2h)、593(2h)、602(30')、602(2h)、604(2h)中各取250μl混合使用。

[0184] 血清样本B:从下述不同人血清样本:598(2h)、600(2h)、584(2h)、586(2h)、593(30')、584(30')中各取250μl混合使用。

[0185] 4、生物素标记抗体工作液:使用前10分钟,3种生物素化抗体(6B9-Biotin、4B12-1-Biotin、4B12-2-Biotin;其中,6B9是由实施例1中小鼠杂交瘤细胞株6B9分泌的单克隆抗体,4B12-1是由实施例1中小鼠杂交瘤细胞株4B12-1分泌的单克隆抗体,4B12-2是由实施例1中小鼠杂交瘤细胞株4B12-2分泌的单克隆抗体)均用抗体稀释液(0.1M PBS)稀释为500ng/ml的工作液。当日使用。

[0186] 5、辣根过氧化物酶标记亲和素工作液:辣根过氧化物酶标记亲和素Streptavidin-HRP按1:2000倍用抗体稀释液进行稀释。如4μl亲和素标记抗体加7996μl亲和素标记抗体稀释液,轻轻混匀。辣根过氧化物酶标记亲和素EMC10(8C11)-HRP(8C11是由实施例1中小鼠杂交瘤细胞株8C11分泌的单克隆抗体)稀释至1μg/ml,用抗体稀释液稀释。在使用前10分钟内配妥。

[0187] 六、洗涤方法

[0188] 手工洗板:甩尽孔内液体,在洁净的吸水纸上拍干,每孔加洗涤液200μL,浸泡1-2分钟,甩掉酶标板内的液体,在厚的吸水纸上拍干。

[0189] 七、操作步骤

[0190] 实验开始前,各试剂均应平衡至室温30分钟;试剂或样品配制时,均需充分混匀,并尽量避免起泡。

[0191] 1、包板:吸取兔抗人EMC10多克隆抗体(用SEQ ID No.1所示EMC10作为免疫原免疫新西兰大白兔后得到的多克隆抗体),EMC10单克隆抗体(6B9),EMC10单克隆抗体(4B12-1),EMC10单克隆抗体(4B12-2)分别溶解在0.1M PBS缓冲液中,制成浓度为1μg/ml的包被溶液。吸取EMC10单克隆抗体(1F12)溶解在0.1M PBS缓冲液中,制成浓度5μg/ml的包被液。100μl/孔,4℃包被过夜。

[0192] 2、洗板:弃去孔内液体,甩干,洗板2次,每次浸泡1-2分钟,大约200μL/每孔,甩干

并在吸水纸上轻拍将孔内液体拍干。

[0193] 3、封闭:封闭液(PBS+1%BSA+5%蔗糖,%表示g/100mL)250μl/孔,37℃,2h。

[0194] 4、洗板:弃去孔内液体,甩干,洗板5次,方法同步骤2。

[0195] 5、检测:5种EMC10抗体包板的板条,分别设标准品孔、待测样本孔。空白孔加样品稀释液100μL,余孔分别加标准品EMC10(在实施例1的步骤三中表达纯化)或待测样品100μL,注意不要有气泡,加样时将样品加于酶标板底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀。给酶标板覆膜,37℃孵育2h。

[0196] 6、洗板:弃去孔内液体,甩干,洗板5次,方法同步骤2。

[0197] 7、加生物素标记抗体工作液:每个孔中加入生物素标记抗体工作液100μL,酶标板加上覆膜,37℃温育1小时。

[0198] 8、洗板:弃去孔内液体,甩干,洗板5次,方法同步骤七中的2。

[0199] 9、每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素Streptavidin-HRP工作液(临用前10分钟内配制)100μL,加上覆膜,37℃温育30分钟。

[0200] 10、弃去孔内液体,甩干,洗板5次,方法同步骤七中的2。

[0201] 11、两种方法检测的酶标板同时显色。底物显色A、B液1:1(体积比)混合后,每孔加100μL,酶标板加上覆膜,37℃避光孵育15分钟。

[0202] 12、每孔加终止液50μL,终止反应,此时蓝色立转黄色。终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。

[0203] 13、立即用酶标仪在450/630nm双波长测量各孔的光密度(OD值),并读数。应提前打开酶标仪电源,预热仪器,设置好检测程序。

[0204] 14、实验完毕后将未用完的试剂按规定的保存温度放回冰箱保存。

[0205] 八、结果判断

[0206] 1、每个标准品的OD值减去空白孔的OD值后作图,如设置复孔,则应取其平均值计算。以标准品的浓度为横坐标,OD值为纵坐标,绘出标准曲线。亦可以OD值为横坐标,标准品的浓度为纵坐标,绘出标准曲线。

[0207] 2、推荐使用专业的曲线制作软件,如curve expert 1.3或1.4,在软件界面既可根据样品OD值,由标准曲线查出相应的浓度,乘以稀释倍数;亦可将样品的OD值代入标准曲线的拟合方程式,计算出样品浓度,再乘以稀释倍数,即为样品的实际浓度。(在线软件“Four Parameter Logistic Fit”也比较好用)

[0208] 3、若样品OD值高于标准曲线上限,应适当稀释后重测,计算浓度时应乘以稀释倍数。

[0209] 九、实验结果

[0210] 1、第一块板(生物素标记抗体用6B9-Biotin)

[0211] (1) 样品排列顺序如表3所示。

[0212] 表3第一块板(生物素标记抗体用6B9-Biotin)的样品排列顺序

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[0213]	EMC10 多抗包板 6B9-Biotin		1F12 包板 6B9-Biotin		6B9 包板 6B9-Biotin		4B12-1 包板 6B9-Biotin		4B12-2 包板 6B9-Biotin	
	A	100 ng/ml	0.015 ng/ml	100 ng/ml	0.015 ng/ml	100 ng/ml	0.015 ng/ml	100 ng/ml	0.015 ng/ml	100 ng/ml
[0214]	B	33.333 ng/ml	0.005 ng/ml	33.333 ng/ml	0.005 ng/ml	33.333 ng/ml	0.005 ng/ml	33.333 ng/ml	0.005 ng/ml	33.333 ng/ml
	C	11.111 ng/ml	0.002 ng/ml	11.111 ng/ml	0.002 ng/ml	11.111 ng/ml	0.002 ng/ml	11.111 ng/ml	0.002 ng/ml	11.111 ng/ml
	D	3.704 ng/ml	0 ng/ml	3.704 ng/ml	0 ng/ml	3.704 ng/ml	0 ng/ml	3.704 ng/ml	0 ng/ml	3.704 ng/ml
	E	1.235 ng/ml	A	1.235 ng/ml	A	1.235 ng/ml	A	1.235 ng/ml	A	1.235 ng/ml
	F	0.412 ng/ml	B	0.412 ng/ml	B	0.412 ng/ml	B	0.412 ng/ml	B	0.412 ng/ml
	G	0.137 ng/ml		0.137 ng/ml		0.137 ng/ml		0.137 ng/ml		0.137 ng/ml
	H	0.046 ng/ml		0.046 ng/ml		0.046 ng/ml		0.046 ng/ml		0.046 ng/ml

[0215] 注:表中的各浓度为标注品的浓度,A和B分别表示血清样本A和血清样本B。

[0216] (2) 原始OD值如表4所示。

[0217] 表4第一块板(生物素标记抗体用6B9-Biotin)的样品的原始OD值

[0218]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	2.665	0.175	3.457	0.326	3.457	0.185	3.458	0.155	3.458	0.197
B	1.526	0.163	3.462	0.326	3.34	0.169	3.439	0.145	3.458	0.185
C	0.791	0.143	3.458	0.306	3.414	0.173	3.394	0.143	3.386	0.184
D	0.416	0.16	3.277	0.31	2.992	0.181	2.545	0.158	2.636	0.184
E	0.263	0.179	2.287	0.793	1.309	0.35	1.129	0.384	1.266	0.361
F	0.219	0.187	1.272	0.457	0.6	0.225	0.478	0.218	0.502	0.244
G	0.194		0.66		0.328		0.289		0.322	
H	0.189		0.448		0.248		0.207		0.237	

[0219] 注:表4中所示的原始OD值对应的加样顺序如表3所示。

[0220] (3) 标准曲线

[0221] 第一个:EMC10多抗包板,生物素标记抗体用6B9-Biotin的标准曲线,如图8所示。
MSE 0.000118225 R² 0.9998 SS 0.00130048 SYX 0.0136302 a 0.00847709 b 0.877181
c 108.108 d 5.17826。

[0222] 第二个:EMC10单抗(1F12)包板,生物素标记抗体用6B9-Biotin的标准曲线,如图9所示。
MSE 0.00312063 R² 0.9983 SS 0.0343269 SYX 0.0700275 a 0.029948 b 1.34619
c 0.803861 d 3.20718。

[0223] 第三个:EMC10单抗(6B9)包板,生物素标记抗体用6B9-Biotin的标准曲线,如图10

所示。MSE 0.00638516 R² 0.9968 SS 0.0702368 SYX 0.100169 a 0.0586796 b 2.01446 c 1.63825 d 3.25984。

[0224] 第四个:EMC10单抗(4B12-1)包板,生物素标记抗体用6B9-Biotin的标准曲线,如图11所示。MSE 0.00253437 R² 0.9987 SS 0.0278781 SYX 0.0631077 a 0.0305326 b 1.63975 c 2.10936 d 3.34699。

[0225] 第五个:EMC10单抗(4B12-2)包板,生物素标记抗体用6B9-Biotin的标准曲线,如图12所示。MSE 0.00132131 R² 0.9993 SS 0.0145344 SYX 0.0455669 a 0.034137 b 1.61639 c 1.94033d 3.31914。

[0226] 对以上结果的解释说明:应用软件做四参数法拟合曲线,用于估计剂量反应关系。

[0227] MSE (mean-square error):均方误差。指参数估计值与参数真值之差平方的期望值;MSE可以评价数据的变化程度。

[0228] R2 (coefficient of determination):判定系数。反映回归直线的拟合程度。

[0229] SS (sum of squares of deviation from mean):离均差平方和。计算每个观察值与平均数的差,将其平方后相加。是统计中离散趋势的重要指标之一。

[0230] SYX:估计标准误差。

[0231] a:曲线上渐近线估值。

[0232] d:曲线下渐近线估值。

[0233] b:曲线的斜率。

[0234] c:最大结合一半时对应的剂量。c值越小,灵敏度越高。

[0235] (4) 样品浓度(ng/ml) 如表5所示。

[0236] 表5第一块板(生物素标记抗体用6B9-Biotin)的样品浓度

[0237]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	100.000	0.015	100.000	0.015	100.000	0.015	100.000	0.015	100.000	0.015
B	33.333	0.005	33.333	0.005	33.333	0.005	33.333	0.005	33.333	0.005
C	11.111	0.002	11.111	0.002	11.111	0.002	11.111	0.002	11.111	0.002
D	3.704	0	3.704	0	3.704	0	3.704	0	3.704	0
E	1.235	0.093	1.235	0.212	1.235	0.313	1.235	0.389	1.235	0.287
F	0.412	0.177	0.412	0.071	0.412	<Lower Limit	0.412	0.119	0.412	0.097
G	0.137		0.137		0.137		0.137		0.137	
H	0.046		0.046		0.046		0.046		0.046	

[0238] 注:表5中所示的样品浓度对应的加样顺序如表3所示。

[0239] 2、第二块板(生物素标记抗体用4B12-2-Biotin,另一种4B12-2包板的用4B12-1-Biotin)

[0240] (1) 样品排列顺序如表6所示。

[0241] 表6第二块板(生物素标记抗体用4B12-2-Biotin,另一种4B12-2包板的用4B12-1-Biotin)的样品排列顺序

[0242]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	EMC10 多抗包板 4B12-2-Biotin		1F12 包板 4B12-2-Biotin		6B9 包板 4B12-2-Biotin		4B12-1 包板 4B12-2-Biotin		4B12-2 包板 4B12-2-Biotin		4B12-2 包板 4B12-1-Biotin	
A	100 ng/ml	0.015 ng/ml	100 ng/ml	0.015 ng/ml	100 ng/ml	0.015 ng/ml	100 ng/ml	0.015 ng/ml	100 ng/ml	0.015 ng/ml	100 ng/ml	0.015 ng/ml
B	33.333 ng/ml	0.005 ng/ml	33.333 ng/ml	0.005 ng/ml	33.333 ng/ml	0.005 ng/ml	33.333 ng/ml	0.005 ng/ml	33.333 ng/ml	0.005 ng/ml	33.333 ng/ml	0.005 ng/ml
C	11.111 ng/ml	0.002 ng/ml	11.111 ng/ml	0.002 ng/ml	11.111 ng/ml	0.002 ng/ml	11.111 ng/ml	0.002 ng/ml	11.111 ng/ml	0.002 ng/ml	11.111 ng/ml	0.002 ng/ml
D	3.704 ng/ml	0 ng/ml	3.704 ng/ml	0 ng/ml	3.704 ng/ml	0 ng/ml	3.704 ng/ml	0 ng/ml	3.704 ng/ml	0 ng/ml	3.704 ng/ml	0 ng/ml

[0243]

E	1.235 ng/ml	A										
F	0.412 ng/ml	B										
G	0.137 ng/ml											
H	0.046 ng/ml											

[0244] 注:表中的各浓度为标注品的浓度,A和B分别表示血清样本A和血清样本B。

[0245] (2) 原始OD值如表7所示。

[0246] 表7第二块板(生物素标记抗体用4B12-2-Biotin,另一种4B12-2包板的用4B12-1-Biotin)的样品的原始OD值

[0247]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.472	0.113	3.453	0.189	3.452	0.11	3.452	0.095	3.455	0.118	3.451	0.212
B	1.413	0.089	3.455	0.147	3.461	0.101	3.395	0.098	3.462	0.113	3.46	0.219
C	0.731	0.101	3.454	0.136	3.393	0.101	3.349	0.088	3.31	0.112	3.326	0.251
D	0.332	0.089	3.274	0.117	2.341	0.086	2.087	0.076	2.026	0.096	2.379	0.225
E	0.184	0.086	2.113	0.426	0.869	0.197	0.79	0.238	0.832	0.209	0.982	0.469
F	0.141	0.102	0.977	0.168	0.366	0.121	0.319	0.109	0.353	0.138	0.512	0.19
G	0.129		0.48		0.199		0.17		0.209		0.346	
H	0.123		0.269		0.154		0.123		0.169		0.291	

[0248] 注:表7中所示的原始OD值对应的加样顺序如表6所示。

[0249] (3) 标准曲线

[0250] 第一个:EMC10多抗包板,生物素标记抗体用4B12-2-Biotin的标准曲线,如图13所示。MSE 0.000167396 R² 0.9997 SS 0.00184136 SYX 0.0162188 a 0.0148881 b 0.899527 c 87.6449 d 4.48268。

[0251] 第二个:EMC10单抗(1F12)包板,生物素标记抗体用4B12-2-Biotin的标准曲线,如

图14所示。MSE 0.00455926 R² 0.9978 SS 0.0501519 SYX 0.0846437 a 0.0774159 b 1.48304 c 0.923095 d 3.3951。

[0252] 第三个:EMC10单抗(6B9)包板,生物素标记抗体用4B12-2-Biotin的标准曲线,如图15所示。MSE 0.00284514 R² 0.9986 SS 0.0312965 SYX 0.066865 a 0.0581838 b 1.78093 c 2.53142 d 3.42743。

[0253] 第四个:EMC10单抗(4B12-1)包板,生物素标记抗体用4B12-2-Biotin的标准曲线,如图16所示。MSE 0.00411806 R² 0.9979 SS 0.0452987 SYX 0.080444 a 0.0514179 b 1.72431 c 2.89721 d 3.4252。

[0254] 第五个:EMC10单抗(4B12-2)包板,生物素标记抗体用4B12-2-Biotin的标准曲线,如图17所示。MSE 0.00414401 R² 0.9979 SS 0.0455841 SYX 0.0806971 a 0.0588961 b 1.62647 c 3.03901 d 3.44268。

[0255] 第六个:EMC10单抗(4B12-2)包板,生物素标记抗体用4B12-1-Biotin的标准曲线,如图18所示。MSE 0.00243536 R² 0.9987 SS 0.026789 SYX 0.0618628 a 0.047415 b 1.69935 c 2.52443 d 3.27712。

[0256] (4) 样品浓度(ng/ml)如表8所示。

[0257] 表8第二块板(生物素标记抗体用4B12-2-Biotin,另一种4B12-2包板的用4B12-1-Biotin)的样品浓度

[0258]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100.000	0.015	100.000	0.015	100.000	0.015	100.000	0.015	100.000	0.015	100.000	0.015
B	33.333	0.005	33.333	0.005	33.333	0.005	33.333	0.005	33.333	0.005	33.333	0.005
C	11.111	0.002	11.111	0.002	11.111	0.002	11.111	0.002	11.111	0.002	11.111	0.002
D	3.704	0	3.704	0	3.704	0	3.704	0	3.704	0	3.704	0
E	1.235	< Lower Limit	1.235	0.161	1.235	0.248	1.235	0.407	1.235	0.241	1.235	0.505
F	0.412	< Lower Limit										
G	0.137		0.137		0.137		0.137		0.137		0.137	
H	0.046		0.046		0.046		0.046		0.046		0.046	

[0259] 注:表8中所示的样品浓度值对应的加样顺序如表6所示。

[0260] 综合以上结果:根据标准曲线c值的大小,最终确定,ELISA法“1F12单抗作为捕获抗体,6B9-Biotin单抗作为检测抗体”为最优组合,效果最好,灵敏度最高。

[0261] 实施例3、EMC10定量检测试剂盒(化学发光法)的制备

[0262] 一、化学发光免疫分析(CLIA)中1F12单抗和6B9单抗分别作为捕获抗体检测效果比较

[0263] 基于实施例2所得的结果,在ELISA方法中“1F12单抗作为捕获抗体,6B9-Biotin单抗作为检测抗体”为最优组合,效果最好。发明人先采用化学发光免疫分析(CLIA)“1F12单

抗作为捕获抗体,6B9单抗作为检测抗体”的方法定量检测系列人血清待测样本(见表9)中EMC10的含量。具体操作参照以下步骤二相关步骤进行。

[0264] 但从检测结果可以看出,仍有一部分人血清用该方法检测不到EMC10(表9)。为此发明人对检测方法进行了改进,采用化学发光免疫分析(CLIA)“6B9单抗作为捕获抗体,1F12单抗作为检测抗体”的方法进行检测,结果显示,在CLIA法“1F12单抗作为捕获抗体,6B9单抗作为检测抗体”组合中未被检测到的血清(包括编号为如下的各样本:19#、30#、31#、33#、34#、35#、36#、38#、40#、52#、54#、61#、62#、67#、75#、76#、78#、81#、82#、83#、86#、92#、96#),在CLIA法“6B9单抗作为捕获抗体,1F12单抗作为检测抗体”组合中均检测到了EMC10的含量,并且其它血清样本中EMC10在后者组合中检测的数值也高于前者组合,最终确定人血清中EMC10的检测方法为“6B9单抗作为捕获抗体,1F12单抗作为检测抗体”组合的化学发光免疫分析(CLIA)的方法。

[0265] 表9两种CLIA法检测人血清中EMC10蛋白含量的结果比较

		20161104 数据			
		方法一: 1F12 为捕获抗体; 6B9 为检测抗体		方法二: 6B9 为捕获抗体; 1F12 为检测抗体	
	模式	项目	发光值	参数	发光值
[0266]					

(EMC10 标准品浓度, ng/ml)				
S0 (0)	231	-	154	-
S1 (0.9375)	843	-	267	-
S2 (1.875)	1300	-	378	-
S3 (3.75)	2240	-	512	-
S4 (7.5)	5320	-	1034	-
S5 (15)	11061	-	2282	-
S6 (30)	24987	-	6480	-
S7 (60)	63164	-	25530	-
S8 (120)	103960	-	59678	-
S9 (240)	155468	-	186420	-
S10 (480)	233854	-	368331	-
待测人血清样本编号	发光值	测定值 (EMC10 蛋白的含量, ng/ml)	发光值	测定值
19#	201	#NUM!	540	3.24
20#	9552	13.70	17612	52.37
21#	1532	1.98	3476	15.59
22#	699	0.73	1834	9.47
23#	168138	234.40	271352	388.20
24#	333230	459.25	259246	375.47
25#	1389	1.77	3574	15.92
26#	20886	29.93	32076	81.37
27#	378	0.23	1878	9.66
29#	279	0.08	768	4.54
30#	184	#NUM!	903	5.25
31#	186	#NUM!	1125	6.35
32#	260	0.05	765	4.53
33#	138	#NUM!	368	2.10
34#	112	#NUM!	436	2.57
35#	134	#NUM!	500	2.99
36#	114	#NUM!	189	0.56
37#	72	#NUM!	111	#NUM!
38#	78	#NUM!	360	2.05
40#	112	#NUM!	440	2.60
41#	464	0.37	2882	13.50
42#	1976	2.64	6782	25.82
43#	7436	10.64	19029	55.44
45#	252	0.03	1474	7.94

[0267]

[0268]

46#	28290	40.44	66993	139.59
47#	7672	10.98	25106	67.97
48#	68	#NUM!	152	#NUM!
49#	375	0.23	774	4.58
51#	138675	193.94	212244	324.41
52#	66	#NUM!	414	2.43
53#	288	0.09	1008	5.78
54#	86	#NUM!	591	3.54
55#	266	0.06	495	2.96
56#	18856	27.04	35856	88.30
57#	49034	69.65	72434	147.80
58#	21537	30.86	7962	29.10
59#	4282	6.04	21789	61.25
60#	3219	4.48	4372	18.56
61#	231	#NUM!	333	1.85
62#	114	#NUM!	870	5.08
63#	236	0.01	1204	6.72
64#	404	0.27	1430	7.75
65#	7335	10.49	20872	59.34
66#	13438	19.29	30711	78.81
67#	104	#NUM!	183	0.49
68#	270	0.06	921	5.34
69#	820	0.91	3327	15.07
70#	606	0.58	2980	13.85
71#	11072	15.89	33003	83.09
73#	320	0.14	2152	10.75
74#	28652	40.95	36938	90.25
75#	208	#NUM!	2265	11.19
76#	117	#NUM!	266	1.31
77#	574	0.53	338	1.88
78#	75	#NUM!	212	0.81
81#	220	#NUM!	786	4.64
82#	57	#NUM!	260	1.26
83#	40	#NUM!	204	0.73
84#	53728	76.22	37107	90.55
86#	129	#NUM!	674	4.02
88#	1803	2.38	1378	7.52
89#	90	#NUM!	98	#NUM!
90#	93	#NUM!	87	#NUM!
91#	3882	5.46	13088	42.07

92#	124	#NUM!	1035	5.91	
93#	342	0.18	1110	6.28	
94#	39128	55.73	36848	90.09	
95#	266	0.06	3942	17.16	
96#	80	#NUM!	272	1.36	
630 0h	15218	21.84	23158	64.06	
605 30'	2542	3.48	3066	14.16	
615 30'	3794	5.33	11208	37.51	
624 30'	26	#NUM!	58	#NUM!	
[0269]	647 30'	8242	11.81	4137	17.80
	647 2H	8150	11.67	4569	19.19
	606 2H	2409	3.29	7362	27.45
	617 2H	660	0.67	1214	6.77
	626 2H	592	0.56	1324	7.27
	617 OH	2316	3.15	5068	20.75
	631 OH	25569	36.58	133946	231.72
	630 2H	64536	91.32	77724	155.62
	617 30'	2318	3.15	4672	19.51
	606 30'	2942	4.07	3369	15.22

[0270] 注:表中#NUM!表示检测失败,无检测数据。

[0271] 二、用于定量检测人血清中EMC10的化学发光免疫分析(CLIA)试剂盒的制备

[0272] 基于步骤一的检测结果,制备得到用于定量检测人血清中EMC10的化学发光免疫分析(CLIA)试剂盒,其具体相关信息如下:

[0273] 1、检验原理

[0274] 本试剂盒采用双抗体夹心法。首先将一株EMC10单克隆抗体包被于固相载体表面,在微孔板各孔中分别加入标准品或血清样品后,再加入酶标记的另一株EMC10单克隆抗体,温育后即形成固相抗体-抗原-酶标抗体复合物。充分洗涤后加入化学发光底物液,其发光强度与EMC10浓度成正比。测定每孔发光值,以各标准品发光值的对数(需减去S0的发光值)为纵坐标(Y轴),各标准品浓度的对数为横坐标(X轴)作图,得到标准曲线。通过数学模型Log-Log回归处理得到回归直线,样品中EMC10浓度可从标准曲线上查出。

[0275] 2、主要组份

[0276] 主要组分见表10。

[0277] 表10 EMC10定量检测试剂盒(化学发光法)的主要组分

组成	编号	名称	制品状态	数量
[0278] 主要组成	1	EMC10 校准品(S0-S5)	液体	6 瓶
	2	EMC10 酶结合物	96 孔板	
	3	EMC10 包被抗体板	液体	1 瓶
	4	发光底物液 A	液体	1 瓶
	5	发光底物液 B	液体	1 瓶
	6	浓缩洗涤液(20×)	液体	1 瓶

[0279]	辅助成分	1	不干胶封膜		1
		2	封口袋		2
		3	说明书		1

[0280] 其中,各EMC10校准品浓度为:S0:0ng/ml;S1:0.3ng/ml;S2:1.5ng/ml;S3:7.5ng/ml;S4:30ng/ml;S5:120ng/ml。

[0281] (1) EMC10校准品:在实施例1的步骤三中表达纯化。

[0282] (2) EMC10酶结合物:用辣根过氧化酶标记抗EMC10的单克隆抗体1F12,单克隆抗体1F12为由实施例1中小鼠杂交瘤细胞株1F12分泌的单克隆抗体。EMC10酶结合物配制方法:将HRP-抗EMC10单抗1F12用酶结合物稀释液(配方:0.02M磷酸盐缓冲液PH7.4、BSA(1%))按1:50000(体积比)稀释为工作液即表12中EMC10酶结合物。

[0283] (3) EMC10包被抗体板:抗EMC10的单克隆抗体6B9(单克隆抗体6B9为由实施例1中小鼠杂交瘤细胞株6B9分泌的单克隆抗体。)用包被缓冲液(配方:0.02M磷酸盐缓冲液,pH7.4)稀释成5μg/mL,100μl/孔加到白色微孔板板孔中,2-8℃过夜放置20-24小时,取出扣干加入150μl/孔的封闭液(配方:0.02M磷酸盐缓冲液pH7.4、BSA(1%)、蔗糖(5%),%表示g/100mL 37℃放置2小时,扣干,晾干备用。

[0284] (4) 发光底物液A:0.05MTris-HCl缓冲液、过氧化氢(0.68ml/L)。

[0285] (5) 发光底物液B:0.05MTris-HCl缓冲液、鲁米诺(Luminol)(0.709g/L)、对碘酚(p-iodophenol)(0.264g/L);

[0286] (6) 浓缩洗涤液(20×):0.5%(体积百分含量)TWEEN-20,0.02M磷酸盐缓冲液。

[0287] 3、试验方法

[0288] (1) 实验准备

[0289] A、在实验进行之前,先将试剂盒及待测样品放在室温环境中使之与外界温度达到平衡,充分混匀。

[0290] B、试剂盒内提供的浓缩洗涤液用蒸馏水1:20(体积比)稀释用。

[0291] (2) 实验操作

[0292] 1) 加样枪分别加入50μl EMC10校准品、质控品(QC1:7.53-9.71-11.88ng/ml,QC2:34.8-52.74-75.16ng/ml;质控品含有一定浓度特定抗原(inomo),用于评判实验结果是否可靠,三个数值分别是低限-靶值-高限。质控品测值处于低限-高限范围内,表明本次实验结果可靠)或待测血清样本到相应孔中。

[0293] 2) 每孔加入50μl EMC10酶结合物。

[0294] 3) 加样完毕后将微孔板用微量震荡器震荡使各孔内溶液充分混匀后放置在2-8℃冰箱中反应20-24小时。

[0295] 4) 弃去微孔板内液体,每孔加入洗涤液,静置30秒钟后吸干或甩干。如此反复洗涤5次。结束后在纸上将微孔板扣干。

[0296] 5) 将发光底物液A和发光底物液B按照1:1(体积比)比例混合,100μl/孔加入到板孔内。加样完毕后将微孔板震荡混合。

[0297] 6) 在室温(14~28℃)环境下闭光反应10分钟后在96孔板式发光仪上测量各孔发光值。

[0298] (3) 数据处理

[0299] 1) 联机处理:由电脑自动处理得结果。注意选择适合的处理软件,使用Log-Log,线性拟和方式(本试剂盒推荐使用此拟和方式,但也可根据不同情况采用其它拟和方式)进行数据处理。

[0300] 2) 手工作图:以各标准品发光值(需减去S0的发光值)的对数为纵坐标(Y轴),各标准品的浓度的对数为横坐标(X轴)作图,得到标准曲线。样品中EMC10浓度可从标准曲线上查出。

[0301] 3) 计算器处理:使用有线性拟和方式的计算器,可以比较方便的计算出样品浓度值,具体操作请查阅计算器使用说明书。

[0302] 三、用于定量检测人血清中EMC10的化学发光免疫分析(CLIA)试剂盒的应用实例

[0303] 1、选择2017年9月至10月在本院健康体检成人样本(体检者知情并同意),经全身体检,去除存在血检异常的样本。

[0304] 2、标本收集

[0305] 清晨空腹采集静脉血2mL,离血清并检测。标本无溶血。收集该740例样本相应的BMI、血压、血常规、尿常规、肝功能、肾功能、电解质、血脂、血糖等指标

[0306] 3、检测方法

[0307] CLIA法测定血清EMC10浓度,具体操作参见步骤二。

[0308] 4、数据分析

[0309] 应用SPSS 20软件进行数据分析,对血清EMC10的值进行统计,确定参考范围。

[0310] 5、结果

[0311] 如表11所示,对数据进行开四次方处理,P>0.05,符合正态分布。成人血清EMC10正常参考值(95%)0.56~37.72ng/ml。

[0312] 表11健康体检人群中血清EMC10蛋白参考范围的测定结果

		统计量	标准误
EMC10 均值		1.6713	.01514
均值的 95% 置信 区间	下限	1.6416	
	上限	1.7010	
方差		.170	
标准差		.41173	
极小值		.56	
极大值		2.64	
偏度		-.003	.090
峰度		-.533	.179

Kolmogorov-Smirnov ^a 正态性检验			
	统计量	df	Sig.
EMC10	.033	740	.057
a. Lilliefors 显著水平修正			

[0314] 另外,发明人采用CLIA法“6B9单抗作为捕获抗体,1F12单抗作为检测抗体”对人丙种球蛋白、血清白蛋白、兔血清以及牛血清白蛋白分别进行检测,结果都是阴性的,证明本发明所提供的CLIA试剂盒特异性强。

<110> 上海伦泽生物科技有限公司

<120> 检测人血清中内质网膜蛋白复合体亚单位10的试剂盒

<130> GNCLN180076

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 254

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ala Ala Ser Ala Gly Ala Thr Arg Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Met Ala Val Ala Ala Pro Ser Arg Ala Arg Gly Ser Gly Cys Arg Ala
20 25 30

Gly Thr Gly Ala Arg Gly Ala Gly Ala Glu Gly Arg Glu Gly Glu Ala
35 40 45

Cys Gly Thr Val Gly Leu Leu Leu Glu His Ser Phe Glu Ile Asp Asp
50 55 60

Ser Ala Asn Phe Arg Lys Arg Gly Ser Leu Leu Trp Asn Gln Gln Asp
65 70 75 80

Gly Thr Leu Ser Leu Ser Gln Arg Gln Leu Ser Glu Glu Glu Arg Gly
85 90 95

Arg Leu Arg Asp Val Ala Ala Leu Asn Gly Leu Tyr Arg Val Arg Ile
100 105 110

Pro Arg Arg Pro Gly Ala Leu Asp Gly Leu Glu Ala Gly Gly Tyr Val
115 120 125

Ser Ser Phe Val Pro Ala Cys Ser Leu Val Glu Ser His Leu Ser Asp
130 135 140

Gln Leu Thr Leu His Val Asp Val Ala Gly Asn Val Val Gly Val Ser
145 150 155 160

Val Val Thr His Pro Gly Gly Cys Arg Gly His Glu Val Glu Asp Val
165 170 175

Asp Leu Glu Leu Phe Asn Thr Ser Val Gln Leu Gln Pro Pro Thr Thr
180 185 190

Ala Pro Gly Pro Glu Thr Ala Ala Phe Ile Glu Arg Leu Glu Met Glu
195 200 205

Gln Ala Gln Lys Ala Lys Asn Pro Gln Glu Gln Lys Ser Phe Phe Ala
210 215 220

Lys Tyr Trp His Ile Ile Leu Gly Gly Ala Val Leu Leu Thr Ala Leu
225 230 235 240
Arg Pro Ala Ala Pro Gly Pro Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala
245 250
<210> 2
<211> 765
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 2
atggcggcag ccagcgctgg ggcaacccgg ctgctcctgc tcttgctgat ggcggtagca 60
gcgc(ccagtc gagcccccggg cagcggctgc cgggcggga ctggtgcgcg aggggctggg 120
gcggaaggtc gagagggcga ggcctgtggc acggtgtggc tgctgctgaa gcactcattt 180
gagatcgatg acagtgccaa cttccggaag cggggctcac tgctctgaa ccagcaggat 240
gttaccttgt ccctgtcaca gcggcagctc acgcaggagg agcggggccg actccggat 300
gtggcagccc tgaatggcct gtaccgggtc cggatccaa ggccgacccgg ggccctggat 360
ggcctggaag ctggtggtcta tgtctcctcc tttgtccctg cgtgctccct ggtggagtcg 420
cacctgtcgg accagctgac cctgcacgtg gatgtggccg gcaacgtggt gggcgtgtcg 480
gtggtgacgc accctggggg ctgccccggc catgagggtgg aggacgtgga cctggagctg 540
ttcaacacct cggtgcagct gcagccgccc accacagccc caggccctga gacggcggcc 600
ttcattgagc gcctggagat ggaacaggcc cagaaggcca agaaccccc ggagcagaag 660
tccttcttcg ccaaatactg gcacatcatc ctgggggggg ccgtgttgc cacagccctg 720
cgtcctgctg cgccagggcc cgcccccaccg ccacaggagg cctga 765

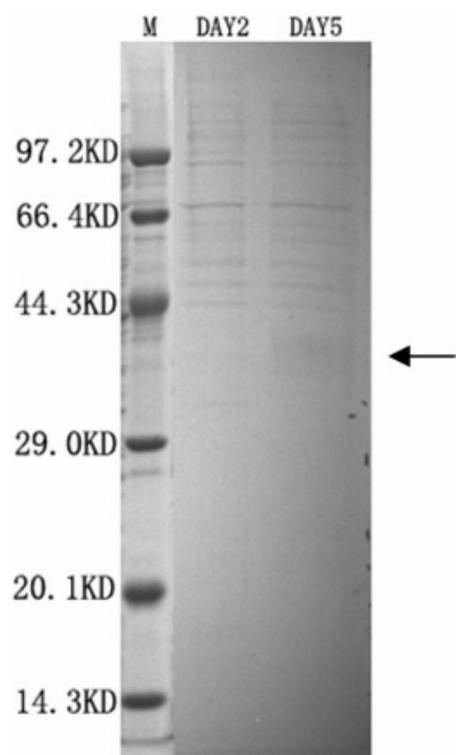


图1

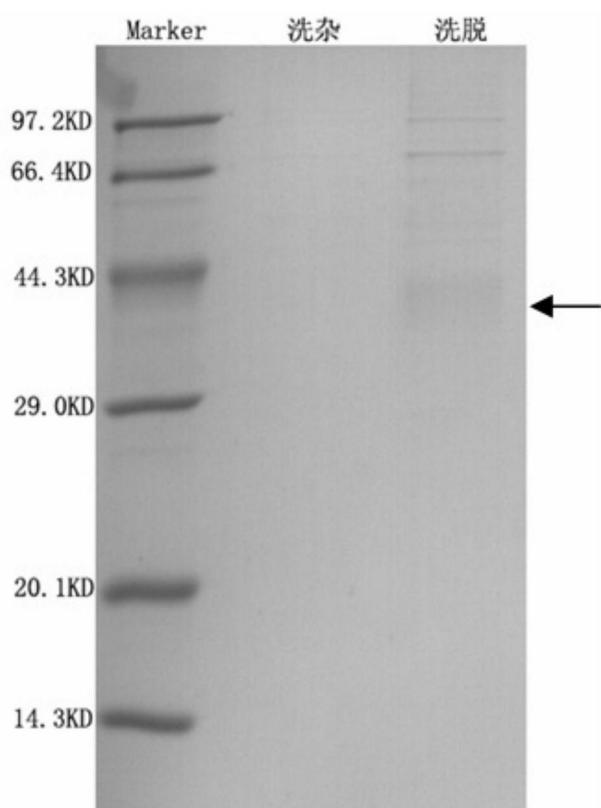


图2

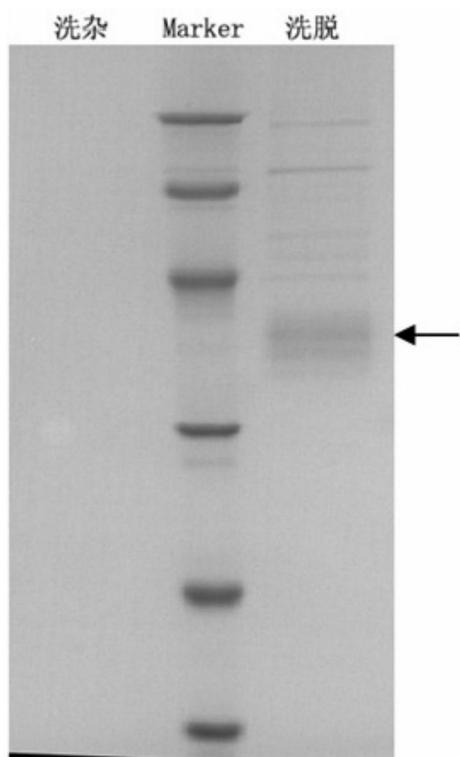


图3

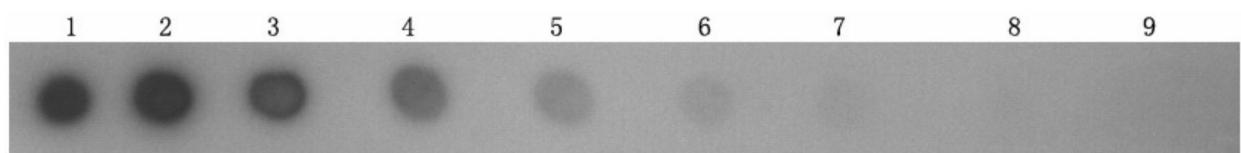


图4

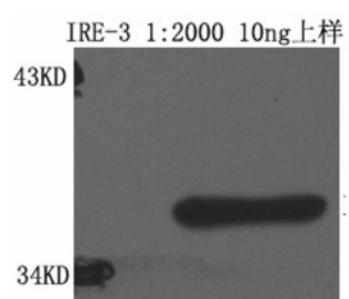


图5

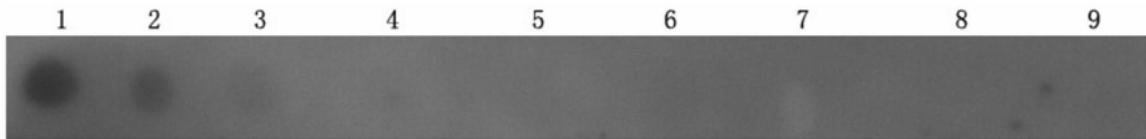


图6

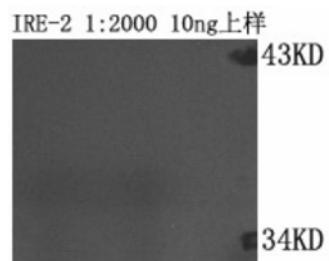


图7

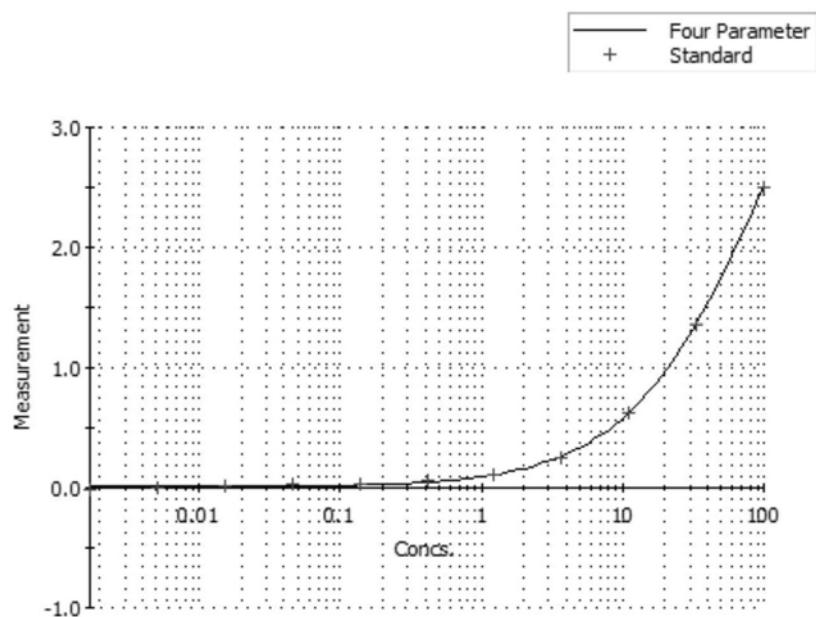


图8

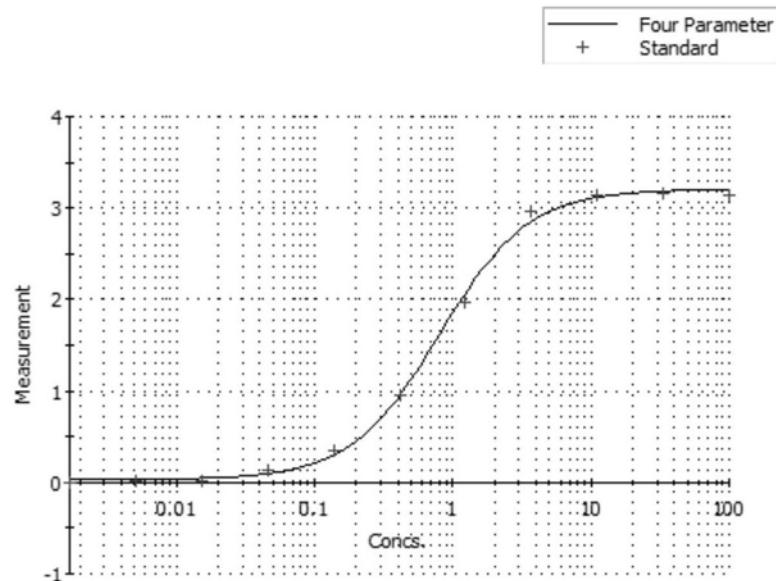


图9

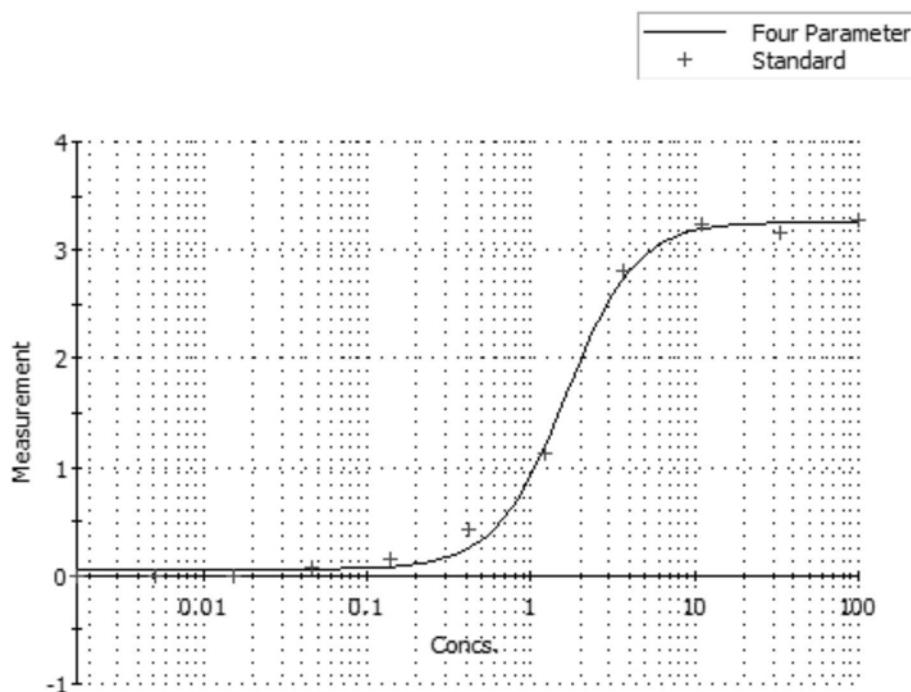


图10

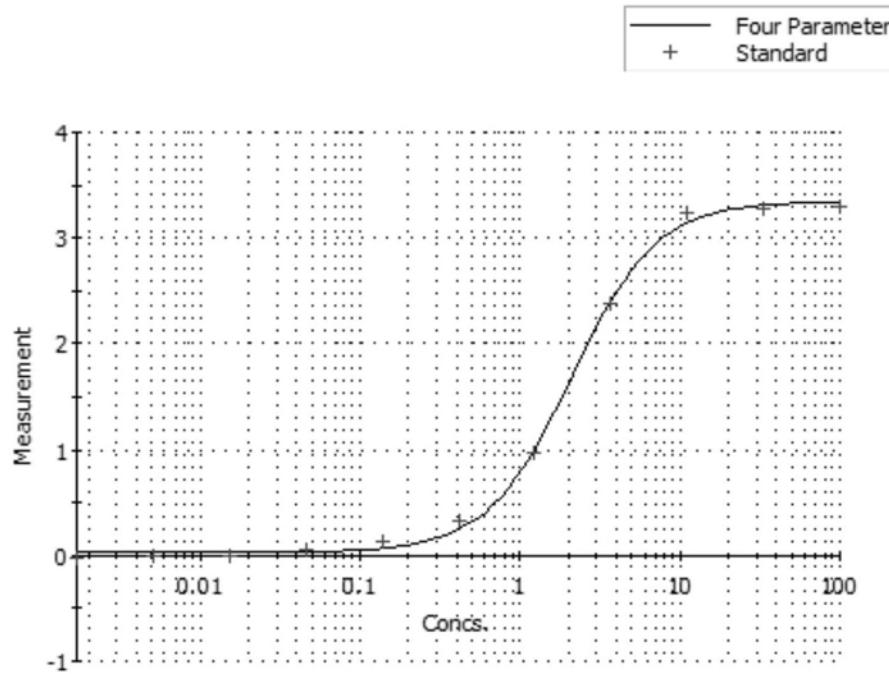


图11

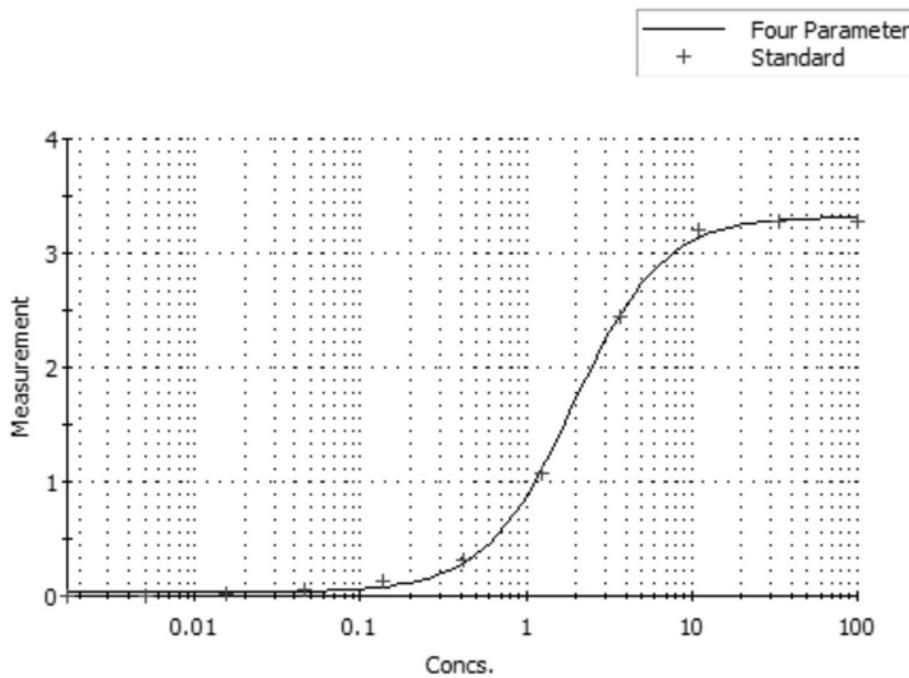


图12

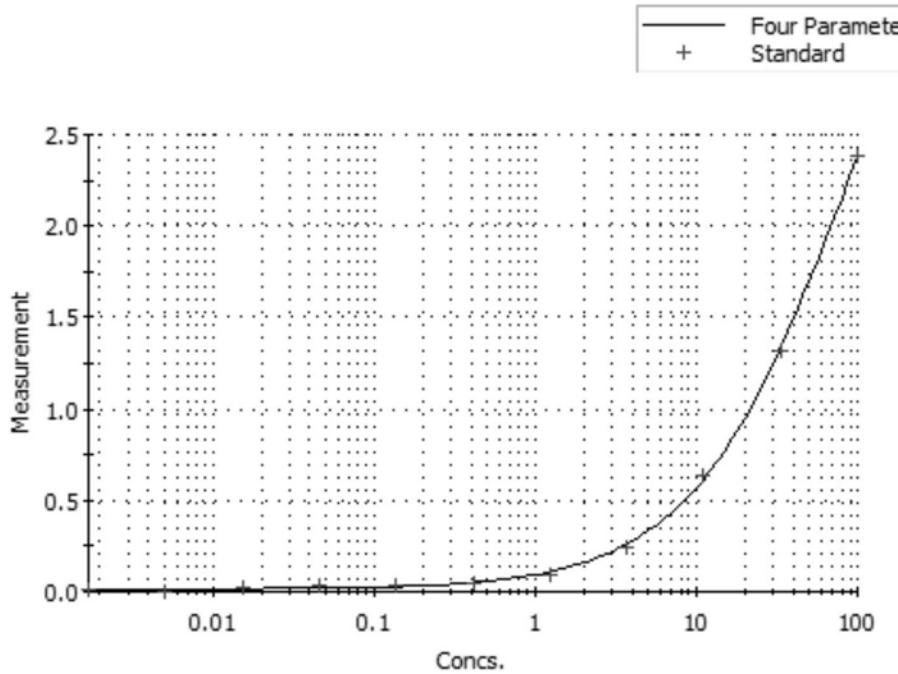


图13

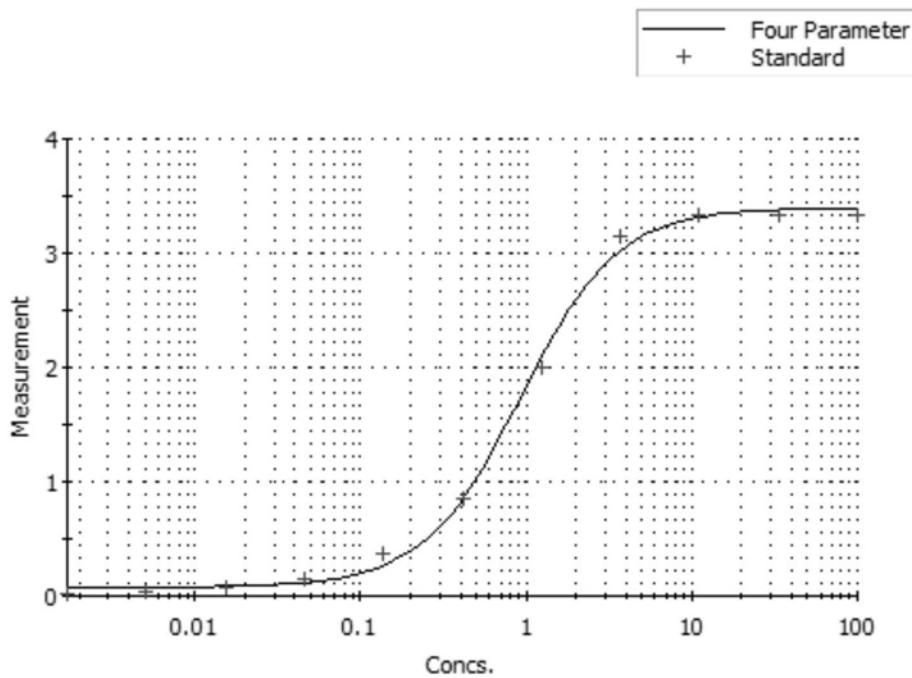


图14

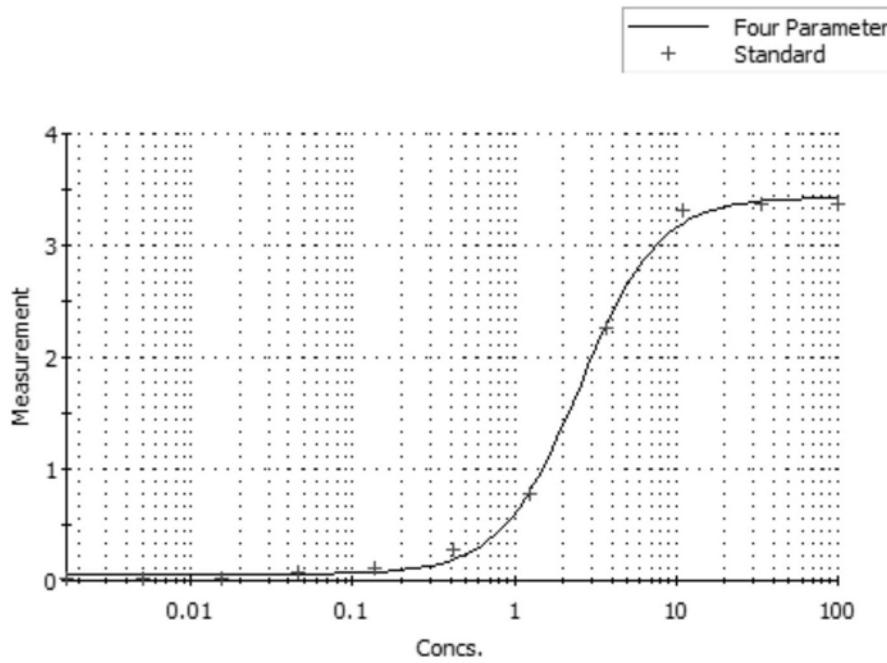


图15

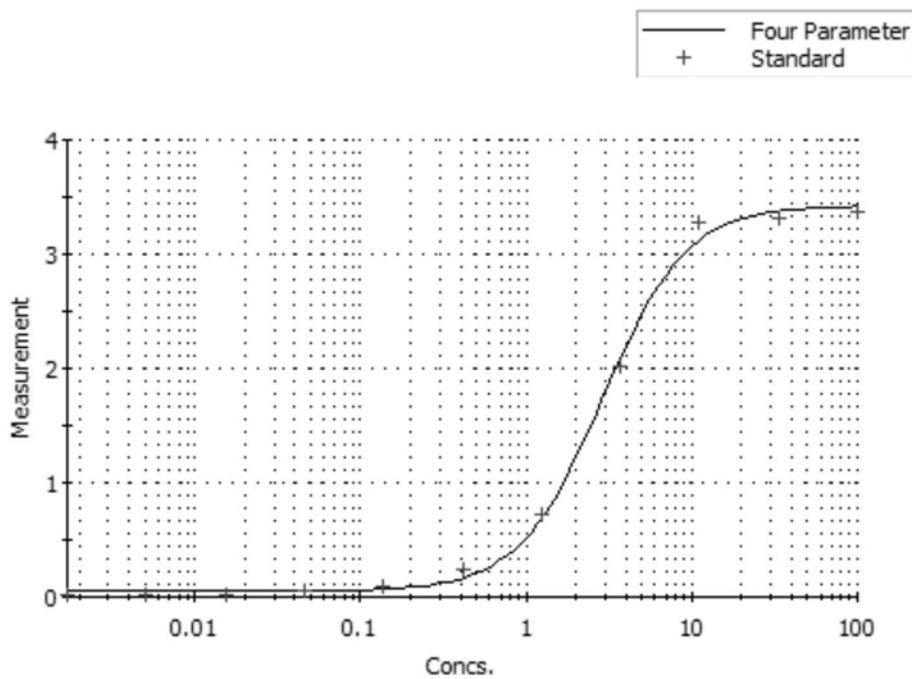


图16

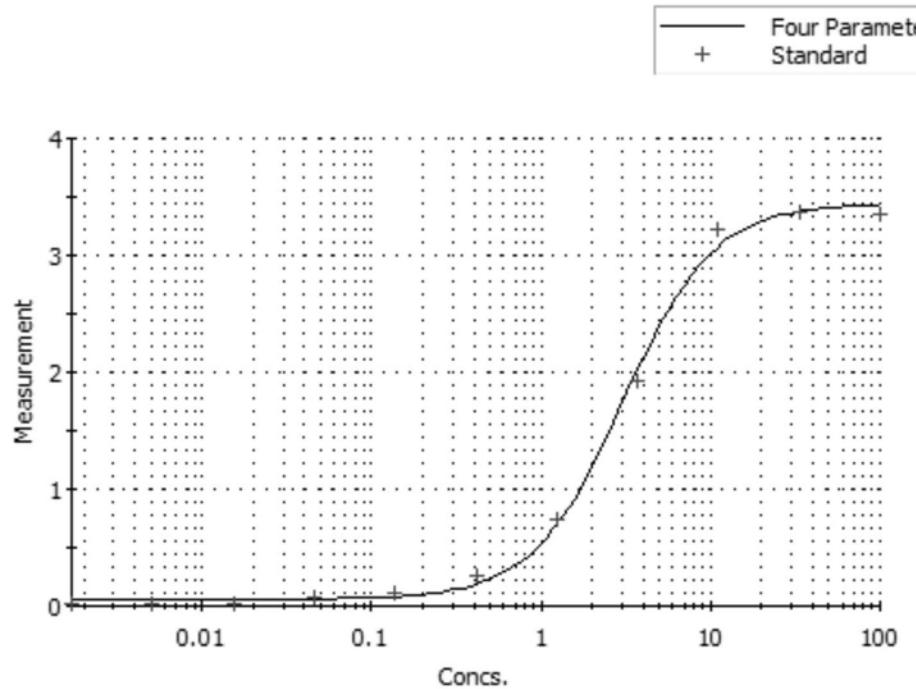


图17

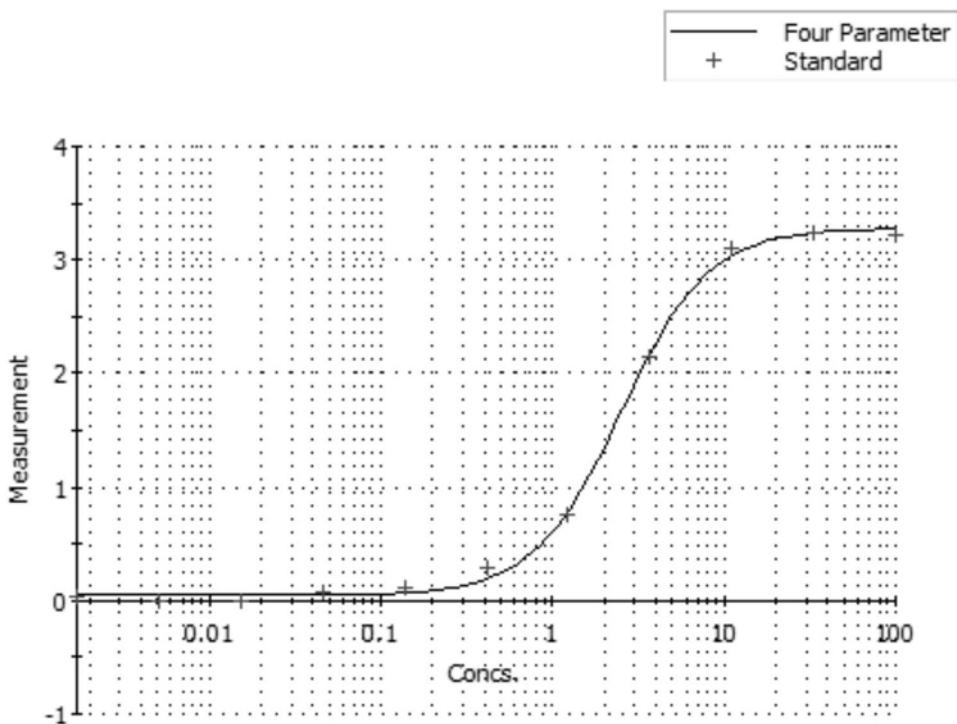


图18

专利名称(译)	检测人血清中内质网膜蛋白复合体亚单位10的试剂盒								
公开(公告)号	CN108802372A				公开(公告)日	2018-11-13			
申请号	CN201810627586.2				申请日	2018-06-19			
[标]发明人	杨志红 赵伟								
发明人	杨志红 赵伟								
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/558 G01N33/577								
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/558 G01N33/577								
代理人(译)	关畅 张立娜								
外部链接	Espacenet Sipo								

摘要(译)

本发明公开了一种用于检测人血清内质网膜蛋白复合体亚单位10的试剂盒。本发明提供了用于检测人血清中EMC10含量的试剂盒，包括捕获抗体(抗EMC10的单克隆抗体6B9，由小鼠杂交瘤细胞株6B9 CGMCC No. 15789分泌产生)和检测抗体(抗EMC10的单克隆抗体1F12，由小鼠杂交瘤细胞株1F12 CGMCC No.15788分泌产生)。本发明以小鼠杂交瘤细胞株6B9分泌产生的单抗作为捕获抗体，小鼠杂交瘤细胞株1F12分泌产生的单抗作为检测抗体，制备了用于检测人血清中EMC10含量的试剂盒，已经成功在中国人群和高加索人群血清中检测到了EMC10，且检测线很低，并且这个方法已经非常稳定。

稀释倍数	定株后的各杂交瘤细胞株							
	1H11	4B12-1	4C2	4B12-2	8A3	1F12	8C11	6B9
1000	3.458	3.453	3.444	3.387	3.385	3.409	3.416	3.414
3000	3.301	3.277	3.230	3.324	3.235	3.281	3.280	3.291
9000	3.181	3.447	3.411	3.416	3.367	3.349	3.347	3.351
27000	2.219	3.388	3.203	3.339	3.217	3.303	3.204	3.290
81000	0.983	3.442	2.883	3.387	2.490	3.392	2.818	3.394
243000	0.497	3.450	1.720	3.420	2.882	3.338	1.865	3.311
729000	0.209	3.447	0.672	3.430	0.602	3.172	0.638	3.279
2187000	0.126	3.393	0.303	3.405	0.233	2.397	0.012	0.010