



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109633171 A

(43)申请公布日 2019.04.16

(21)申请号 201811639111.1

(22)申请日 2018.12.29

(71)申请人 上海八通生物科技股份有限公司

地址 200231 上海市徐汇区龙吴路2715号2  
号楼313室

(72)发明人 胡小龙 周丽 朱凯

(74)专利代理机构 上海科盛知识产权代理有限公司 31225

代理人 褚明伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图1页

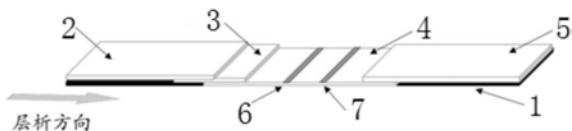
(54)发明名称

快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条及其制备与应用

(57)摘要

本发明涉及一种快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条及其制备与引用,快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条包括底板,沿底板长度依次设置的样品垫、结合物释放垫、层析膜及吸水垫,所述的层析膜上设有检测线与质控线,所述的检测线与质控线相互分离,所述的结合物释放垫上固定有荧光微球标记GFAP单克隆抗体的荧光探针,所述检测线处包被有与微球标记抗体配对的GFAP抗原,所述的质控线处包被有羊抗鼠IgG抗体。与现有技术相比,本发明通过制备GFAP重组抗原和单克隆抗体,结合时间分辨荧光侧向免疫层析技术,制备了快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条,并建立了一种快速检测血清中脑损伤标志物GFAP的方法,能够快速、定量检测人血清中GFAP的浓度。

A  
CN 109633171 A



1. 一种快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条，包括底板，沿底板长度依次设置的样品垫、结合物释放垫、层析膜及吸水垫，所述的层析膜上设有检测线与质控线，所述的检测线与质控线相互分离，其特征在于，所述的结合物释放垫上固定有荧光微球标记GFAP单克隆抗体的荧光探针，所述检测线处包被有与微球标记抗体配对的GFAP抗原，所述的质控线处包被有羊抗鼠IgG抗体。

2. 根据权利要求1所述的一种快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条，其特征在于，所述结合物释放垫为玻璃纤维材质，所述层析膜采用硝酸纤维素膜，所述样品垫上设有加样孔。

3. 如权利要求1所述快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1) 制备荧光微球标记GFAP单克隆抗体的荧光探针；

(2) 用浸泡结合物释放垫的方式将制备的荧光探针固定在结合物释放垫上，冷冻干燥后，密封保存备用；

(3) 包被GFAP抗原及羊抗鼠IgG抗体划线于层析膜上，分别为检测线和质控线；

(4) 将样品垫、结合物释放垫、层析膜与吸水垫粘帖在底板上，组成快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条。

4. 根据权利要求3所述快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条的制备方法，其特征在于，所述GFAP抗原的制备方法为：

1.1、表达质粒的构建：

1.1.1 双酶切：确定GFAP基因两侧的内切酶；

1.1.2 连接：将目的片段与载体片段连接后转染目的菌株；

1.1.3 转菌：转菌涂平板，通过菌落PCR鉴定片段的存在；

1.1.4 菌种保存：挑取阳性菌落在合适的抗性LB培养基培养并用灭菌甘油保存；

1.2、重组蛋白的表达和纯化：

1.2.1 培养：挑取含有GFAP表达质粒，接种入LB培养基中，震荡培养；

1.2.2 诱导表达：用IPTG诱导，E.coli表达GFAP并收集菌体；

1.2.3 蛋白纯化：菌体破碎后过镍柱，用咪唑洗脱纯化蛋白；

1.3、重组蛋白的鉴定：

1.3.1 纯化蛋白采用SDS-PAGE的方法鉴定纯度；

1.3.2 采用GFAP试剂盒鉴定目的蛋白是否正确收集。

5. 根据权利要求3所述快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条的制备方法，其特征在于，所述GFAP单克隆抗体的制备方法为：

2.1、动物免疫：GFAP蛋白对Balb/C小鼠进行免疫；

2.2 细胞融合：利用免疫小鼠的脾细胞和SP2/0细胞进行融合，得到杂交瘤细胞；

2.3 细胞筛选：利用有限稀释法结合间接ELISA方法来筛选得到阳性单克隆杂交瘤细胞；

2.4 抗体制备：利用小鼠腹水来体外扩增富集单克隆抗体；

2.5 抗体纯化：利用辛酸-硫酸铵法和亲和层析法对腹水进行纯化，透析后测定A280确定蛋白浓度待用。

6. 根据权利要求3所述快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条的制备方法，其特征在于，

所述荧光微球标记GFAP单克隆抗体的荧光探针中,所述荧光微球是时间分辨荧光微球;

所述荧光微球标记GFAP单克隆抗体的荧光探针的方法为:

(1)、用NHS及EDC溶液活化微球;

(2)、充分混匀后,静置;

(3)、将GFAP单克隆抗体加入到活化好的微球中,使微球的终浓度为0.5mg/ml,先静置偶联,再静置过夜;

(4)、在偶联好的微球中加入封闭液和10%Tween-20,混匀,静置;

(5)、离心清洗微球;

(6)、吸去上清后,加入微球保存液,分散均匀,即为荧光微球标记GFAP单克隆抗体的荧光探针。

7. 如权利要求1所述快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条的应用,其特征在于,样本滴加入样品垫后在毛细作用下向前层析,通过含标记物的结合物释放垫,使标记物重新水化,并与荧光微球标记GFAP单克隆抗体相互反应,然后一起向前泳动,若样本中含有GFAP,其会与荧光微球标记GFAP单克隆抗体结合,在层析作用下沿着层析膜向前移动至检测区,越过检测线被质控线捕获,而未结合的荧光微球标记GFAP单克隆抗体与被层析膜上包被的GFAP抗原捕获形成复合物吸附在检测线区域,在激光源的作用下,荧光物质发射特定波的荧光信号,荧光免疫分析仪俘获荧光信号。

8. 根据权利要求7所述快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条的应用,其特征在于,在一定范围内样本含GFAP的量越多,检测线上积聚的复合物越少,荧光信号越弱,由于荧光微球标记GFAP单克隆抗体的过量存在,所以无论样本中是否含有GFAP,荧光微球标记GFAP单克隆抗体会层析至质控线形成荧光微球标记GFAP单克隆抗体-羊抗鼠IgG复合物,显示荧光信号。

9. 根据权利要求7所述快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条的应用,其特征在于,质控线显示的荧光信号是判定加样量是否足够及层析过程是否正常的标准。

10. 根据权利要求7所述快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条的应用,其特征在于,根据检测线荧光强度和质控线荧光强度的比值T/C,根据荧光免疫定量分析仪的内置曲线判读样本中GFAP的浓度;

荧光免疫定量分析仪的内置曲线是由一系列已知GFAP浓度的标准品,采用所述快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条,以标准品GFAP浓度和已知GFAP浓度的标准品检测线荧光强度和质控线荧光强度的比值T/C为两个因素拟合的曲线。

## 快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条及其制备与应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于荧光免疫检测技术领域,尤其是涉及一种快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条及其制备与应用。

### 背景技术

[0002] 创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 是神经外科中最常见的疾病,是世界范围内主要的死亡及致残因素之一;其发生率及病死率位居第三位,仅次于癌症和心血管疾病;在外伤性死亡原因中占首要位置。TBI按照发生的顺序可分为原发性脑损伤和继发性脑损伤。原发性脑损伤指暴力直接或间接作用于头部时立即发生的损伤,病理改变包括挫伤、裂伤、出血等。继发性脑损伤指受伤后出现的脑损伤病变,涉及细胞、分子等方面改变,可能发生缺血、缺氧、水肿、炎症等病理改变。继发性脑损伤是多种细胞因子和生化物质共同参与的损伤与抗损伤的病理生理过程。

[0003] 虽然近年来现代影像学技术极大地提高了对TBI的诊疗水平和能力,但它仍然难以全面、动态评估TBI过程中脑细胞损伤情况。最新研究表明,选择其中具有高度特异性和敏感性的细胞因子和生化物质作为监测颅脑损伤的生物标志物,可以在一定程度上反映颅脑损伤程度及损伤后经过时间。生物标志物一般是指可供客观测定和评价的一个普通生理或病理或治疗过程中的某种特征性的生化指标,通过对它的测定可以获知机体当前所处的生物学过程中的进程。检查一种疾病特异性的生物标志物,对于疾病的鉴定、早期诊断及预防、治疗过程中的监控可能起到帮助作用。TBI发生后通常伴随着颅内血管内膜损伤和血脑屏障的破坏,造成神经元、神经胶质细胞、微血管的不可逆伤害。胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 作为星形胶质细胞的标志性蛋白之一,表达于发育成熟的胶质细胞中,对胶质细胞损伤有着高度的敏感性和特异性,胶质细胞发生损伤后其表达可迅速发生变化。

[0004] 胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 在1971年被Eng等首次成功分离,是一种分子量约为50~53kDa的酸性蛋白,是星形胶质细胞特有的骨架蛋白。大量的GFAP单体聚合形成星形胶质细胞的细胞骨架,并以可溶性蛋白和中间丝蛋白两种形式存在于神经胶质细胞的胞质中。GFAP由8个不同亚基组成,其基因由9个外显子和8个内含子组成,再加上4个选择性外显子和2个选择性内含子DNA,从而形成一个大小约为10kb的DNA片段。GFAP在人脑中最早出现于胚胎发育的第8周,逐渐表达于胶质细胞中,主要表达于星形胶质细胞中,而在室管膜细胞、少突胶质细胞等胶质细胞也有分布。GFAP是星形细胞中主要的单体中间丝蛋白,是中枢神经系统所独有的特异性细胞骨架蛋白,是星形细胞的标志性蛋白。

[0005] 在中枢神经系统受损时,伴随着反应性星形胶质化的发生,GFAP在星形胶质细胞中大量的合成与堆积。随后,神经细胞和胶质细胞的大量坏死和血脑屏障的破坏,GFAP会释放入脑脊液中,然后通过受损的血脑屏障进入外周血,导致外周血中GFAP浓度明显升高。有研究表明,发生TBI后,大约1h就可在患者血清中检测到GFAP,且轻度TBI发生后血清GFAP浓

度就会升高。颅脑损伤程度越严重,坏死的神经胶质细胞越多,血脑屏障的破坏程度越严重,释放入外周血的GFAP就会越多。推测血清中GFAP的浓度与脑损伤严重程度呈正相关,早期就有学者证实了这一点。临幊上常用GFAP作为特异性生物标记物来评价脑损伤的严重程度及预后情况。除此之外,GFAP随脑损伤时间的推移呈现出时序性变化。学者通过模拟不同动物损伤模型来发现GFAP随时间变化而表达变化规律。综上发现,损伤后GFAP浓度峰值的出现时间不同,可能是由于各组动物模型、损伤程度、实验方法的不同所致。但均呈现出大致相同的规律,反映出GFAP的表达是随时间而变化的,这为法医学鉴定中利用GFAP推断损伤时间提供了理论依据。

[0006] 2017年美国FDA批准了Banyan Biomarker公司的GFAP作为TBI的诊断试剂,但是,其检测方法为ELISA的模式,这一技术从原理上讲是有效的,但是操作复杂且时间成本较高。

[0007] 专利CN 107102146A公开了一种基于碳点为荧光标记物的双抗体夹心定量检测血清中GFAP的方法,这一技术从原理上讲是有效的,但是由于碳点的稳定性不强,所以实用性不足。

[0008] 专利CN 106568750A公开了一种基于荧光共振能量转移法(FRET)的GFAP检测方法,但是制备工艺复杂且工艺成本较高,不具备可操作性。

[0009] 在20世纪末期,单克隆抗体技术、胶体金免疫层析技术和新材料技术等技术迅速发展,随之在此基础上发展起来了一项新型体外诊断技术即为侧向层析技术,它具有便捷、单人份检测、经济实惠的优点。

[0010] 侧向层析免疫试纸条(Lateral Flow Immunochromatographic Strips,LFIS)由于同时具备了层析法卓越的分离能力和常规免疫检测法的高度特异性,继1980年首次报道应用于人体绒毛膜促性腺激素( $\beta$ -HCG)检测之后,现已广泛应用于医学检测、食品质量监测、环境监测、农业和畜牧业和法医定案等领域的现场快速定性定量检测和即时检验中。侧向层析免疫试剂条的检测原理是通过可以生色或产生电化学信号的探针来标记固定于层析试纸条结合物释放垫上的抗体或抗原,经可视化的颜色反应或仪器来测定光强度、电化学信号等,从而实现对靶标分析物的测定。随着新兴技术和新型材料的日新月异发展,不断涌现出许多新形式的侧向层析免疫试纸条。根据标记探针类型可以对试纸条进行大致分类,比如胶体金纳米粒子(Colloidal Gold Nanoparticles,AuNPs)免疫试纸条、荧光免疫试纸条(镧系元素、荧光色素等)、上转换磷光(Upconverting Phosphor,UCP)免疫试纸条、量子点(Quantum Dots,QDs)免疫试纸条和胶体碳纳米粒子(Carbon Nanotubes Nanoparticles,CNPs)免疫试纸条等。最常用于定量检测的是镧系元素标记的时间分辨免疫荧光探针。

[0011] 时间分辨免疫分析法(Time-resolved Fluoroimmunoassay,TRFIA)是超微量检测领域中一项新兴的检测技术,是继放射免疫分析技术、酶免疫分析技术、发光免疫分析技术之后,在传统荧光免疫分析的基础上,于上个世纪年代初问世的一种非放射性标记免疫分析技术。它具有高灵敏度、专一性、高稳定性和非放射性等优点,受到基础医学、临床检测、分子生物学等领域的关注和应用。TRFIA用镧系元素标记抗原或抗体,根据镧系元素螯合物荧光寿命长、斯托克(stokes)位移大、量子产率高、发射峰窄、激发和发射波长理想等发光特点,用时间分辨技术测量荧光,同时检测波长和时间两个参数进行信号分辨,可有效地排

除非特异荧光的干扰,极大地提高了分析灵敏度。

## 发明内容

[0012] 基于对发生脑损伤的现实情形,TBI的诊断关键是快速,现场操作的意义重大,因此,开发一种现场或床边使用,操作便捷,结果快速的诊断试剂具有重大的价值。基于此,本申请提供一种快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条及其制备与应用。

[0013] 本发明的目的可以通过以下技术方案来实现:

[0014] 一种快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条,包括底板,按层析方向,沿底板长度依次设置的样品垫、结合物释放垫、层析膜及吸水垫,所述的层析膜上设有检测线(T线)与质控线(C线),所述的检测线与质控线相互分离,所述的结合物释放垫上固定有荧光微球标记GFAP单克隆抗体的荧光探针,所述检测线处包被有与微球标记抗体配对的GFAP抗原,所述的质控线处包被有羊抗鼠IgG抗体。

[0015] 荧光微球标记GFAP单克隆抗体作为指示标记物。

[0016] 所述结合物释放垫为玻璃纤维材质,所述层析膜采用硝酸纤维素膜(NC膜),所述样品垫上设有加样孔。

[0017] 所述快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0018] (1)制备荧光微球标记GFAP单克隆抗体的荧光探针;

[0019] (2)用浸泡结合物释放垫的方式将制备的荧光探针固定在结合物释放垫上,冷冻干燥后,密封保存备用;

[0020] (3)包被GFAP抗原及羊抗鼠IgG抗体划线于层析膜上,分别为检测线和质控线;

[0021] (4)将样品垫、结合物释放垫、层析膜与吸水垫粘帖在底板上,组成快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条。

[0022] 所述GFAP抗原的制备方法为:

[0023] 1.1、表达质粒的构建:

[0024] 1.1.1双酶切:确定GFAP基因两侧的内切酶;

[0025] 1.1.2连接:将目的片段与载体片段连接后转染合适的目的菌株;

[0026] 1.1.3转菌:转菌涂平板,通过菌落PCR鉴定片段的存在;

[0027] 1.1.4菌种保存:挑取阳性菌落在合适的抗性LB培养基培养并用灭菌甘油保存于-80°C;

[0028] 1.2、重组蛋白的表达和纯化:

[0029] 1.2.1培养:挑取含有GFAP表达质粒,接种入LB培养基中,震荡培养;

[0030] 1.2.2诱导表达:用IPTG诱导,E.coli表达GFAP并收集菌体;

[0031] 1.2.3蛋白纯化:菌体破碎后过镍柱,用咪唑洗脱纯化蛋白;

[0032] 1.3、重组蛋白的鉴定:

[0033] 1.3.1纯化蛋白采用SDS-PAGE的方法鉴定纯度;

[0034] 1.3.2采用GFAP试剂盒鉴定目的蛋白是否正确收集。

[0035] 所述GFAP单克隆抗体的制备方法为:

[0036] 2.1、动物免疫:GFAP蛋白对Balb/C小鼠进行免疫;

[0037] 2.2细胞融合:利用免疫小鼠的脾细胞和SP2/0细胞进行融合,得到杂交瘤细胞;

- [0038] 2.3细胞筛选:利用有限稀释法结合间接ELISA方法来筛选得到阳性单克隆杂交瘤细胞;
- [0039] 2.4抗体制备:利用小鼠腹水来体外扩增富集单克隆抗体;
- [0040] 2.5抗体纯化:利用辛酸-硫酸铵法和亲和层析法对腹水进行纯化,透析后测定A280确定蛋白浓度待用。
- [0041] 所述荧光微球标记GFAP单克隆抗体的荧光探针中,所述荧光微球是时间分辨荧光微球;
- [0042] 时间分辨荧光微球是一种以具有独特荧光特性的镧系元素及其螯合剂(如EuCl<sub>3</sub>)作为示踪物的特殊功能微球,微球材料通常为聚苯乙烯,表面修饰有合适密度的羧基或其它功能基团,用于与蛋白或抗体的共价偶联,提高了标记物的稳定性。
- [0043] 所述荧光微球标记GFAP单克隆抗体的荧光探针的方法为:
- [0044] (1)、用NHS及EDC溶液活化微球(用量:1mg微球使用0.2mg NHS及0.2mgEDC);
- [0045] (2)、充分混匀后,于37℃静置30min;
- [0046] (3)、将GFAP单克隆抗体加入到活化好的微球中,使微球的终浓度为0.5mg/ml,先静置37℃偶联30min,再静置4℃过夜(不低于8H);
- [0047] (4)、在偶联好的微球中加入封闭液和10%Tween-20,混匀,静置37℃30min;
- [0048] (5)、13000rpm,离心15min清洗微球两次;
- [0049] (6)、吸去上清后,加入微球保存液,分散均匀,4℃保存,即为GFAP单克隆抗体的荧光探针。
- [0050] 所述快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条的应用,样本滴加入样品垫上的加样孔后在毛细作用下向前层析,通过含标记物的结合物释放垫,使标记物重新水化,并与荧光微球标记GFAP单克隆抗体相互反应,然后一起向前泳动,若样本中含有GFAP,其会与荧光微球标记GFAP单克隆抗体结合,在层析作用下沿着层析膜向前移动至检测区,越过检测线被质控线捕获,而未结合的荧光微球标记GFAP单克隆抗体与被层析膜上包被的GFAP抗原捕获形成复合物吸附在检测线区域,在激光源的作用下,荧光物质发射特定波的荧光信号,荧光免疫分析仪俘获荧光信号。
- [0051] 在一定范围内样本含GFAP的量越多,检测线上积聚的复合物越少,荧光信号越弱,由于荧光微球标记GFAP单克隆抗体的过量存在,所以无论样本中是否含有GFAP,荧光微球标记GFAP单克隆抗体会层析至质控线形成荧光微球标记GFAP单克隆抗体-羊抗鼠IgG复合物,显示荧光信号。
- [0052] 质控线显示的荧光信号是判定加样量是否足够及层析过程是否正常的标准。
- [0053] 根据检测线荧光强度和质控线荧光强度的比值T/C,根据荧光免疫定量分析仪的内置曲线判读样本中GFAP的浓度;
- [0054] 荧光免疫定量分析仪的内置曲线是由一系列已知GFAP浓度的标准品,采用所述快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条,以标准品GFAP浓度和已知GFAP浓度的标准品检测线荧光强度和质控线荧光强度的比值T/C为两个因素拟合的曲线。
- [0055] 与现有技术相比,本发明通过制备GFAP重组抗原和单克隆抗体,结合时间分辨荧光侧向免疫层析技术,制备了快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条,并建立了一种快速检测血清中脑损伤标志物GFAP的方法,能够快速、定量检测人血清中GFAP的浓度。

## 附图说明

[0056] 图1为快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条结构示意图。

## 具体实施方式

[0057] 下面结合附图和具体实施例对本发明进行详细说明。

### 实施例

[0059] 一种快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条,如图1所述,包括底板1,按层析方向,沿底板1长度依次设置的样品垫2、结合物释放垫3、层析膜4及吸水垫5,层析膜4上设有检测线6(T线)与质控线7(C线),检测线6与质控线7相互分离,结合物释放垫3上固定有荧光微球标记GFAP单克隆抗体的荧光探针,检测线6处包被有与微球标记抗体配对的GFAP抗原,质控线7处包被有羊抗鼠IgG抗体。

[0060] 荧光微球标记GFAP单克隆抗体作为指示标记物。所述结合物释放垫为玻璃纤维材质,所述层析膜采用硝酸纤维素膜(NC膜),所述样品垫上设有加样孔。

[0061] 所述快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0062] (1)制备荧光微球标记GFAP单克隆抗体的荧光探针;

[0063] (2)用浸泡结合物释放垫的方式将制备的荧光探针固定在结合物释放垫上,冷冻干燥后,密封保存备用;

[0064] (3)包被GFAP抗原及羊抗鼠IgG抗体划线于层析膜上,分别为检测线和质控线;

[0065] (4)将样品垫、结合物释放垫、层析膜与吸水垫粘贴在底板上,组成快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条。

[0066] 所述GFAP抗原的制备方法为:

[0067] 1.1、表达质粒的构建:

[0068] 1.1.1双酶切:确定GFAP基因两侧的内切酶;

[0069] 1.1.2连接:将目的片段与载体片段连接后转染合适的目的菌株;

[0070] 1.1.3转菌:转菌涂平板,通过菌落PCR鉴定片段的存在;

[0071] 1.1.4菌种保存:挑取阳性菌落在合适的抗性LB培养基培养并用灭菌甘油保存于-80℃;

[0072] 1.2、重组蛋白的表达和纯化:

[0073] 1.2.1培养:挑取含有GFAP表达质粒,接种入LB培养基中,震荡培养;

[0074] 1.2.2诱导表达:用IPTG诱导,E.coli表达GFAP并收集菌体;

[0075] 1.2.3蛋白纯化:菌体破碎后过镍柱,用咪唑洗脱纯化蛋白;

[0076] 1.3、重组蛋白的鉴定:

[0077] 1.3.1纯化蛋白采用SDS-PAGE的方法鉴定纯度;

[0078] 1.3.2采用GFAP试剂盒鉴定目的蛋白是否正确收集。

[0079] 本实施例中给出了一种具体的得到GFAP抗原蛋白的方法,如下:

[0080] 1、GFAP重组蛋白的表达

[0081] 1.1表达质粒的构建

[0082] 1.1.1双酶切:用Vector NTI打开载体文件,点击酶切点搜索,添加所有酶切位点,选择常用酶切位点,并且在搜索酶切位点中点击Remove all并重新添加,确保所选酶切位

点在载体中是唯一的，并且在目的基因两侧，此次选择的是HindIII与NotI限制性内切酶

[0083] 1.1.2连接：将目的片段：载体片段=3:1的方式连接，载体是PET-28a (+)，加入连接酶和缓冲液。16℃连接1h后转染合适的目的菌株(DH5 $\alpha$ )

[0084] 1.1.3转菌：转菌涂平板，通过菌落PCR鉴定片段的存在

[0085] 1.1.4菌种保存：挑取阳性菌落在合适的抗性LB培养基中37℃，200rpm过夜培养抽取0.5mL的过夜培养物和等体积的50%灭菌甘油混匀，保存于-80℃并做好标记。

[0086] 1.2重组蛋白的表达和纯化

[0087] 1.2.1挑取含有GFAP表达质粒pET-28a的BL21菌株，接种入含有50 $\mu$ g/mL卡那霉素的LB培养基100mL中，震荡培养过夜。

[0088] 1.2.2取出2mL空白LB培养基作为背景，在600nm波长下作为空白调零设置分光光度计。

[0089] 1.2.3将过夜培养物倒入四瓶500mL的LB培养基100mL中，每一瓶加入50mg/mL卡那霉素，将两瓶500mL加入卡那霉素和过夜培养物的培养基合并为一瓶，倒入时摇晃混匀后分装回两瓶500mL的状态，确保两瓶间的均一性。对另外两瓶同样操作。

[0090] 1.2.4震荡培养2-3h，测定OD值(600nm)，按照每500mL加入12.5mL过滤除菌的IPTG，每两瓶合并到一瓶后，倒入过滤除菌的100mM的IPTG混匀后，分装回两瓶500mL的状态，确保两瓶间的均一性。对另外两瓶同样操作。

[0091] 1.2.5离心收集菌体。

[0092] 1.2.6取菌体加200mL破碎缓冲液(pH7.4的50mM磷酸缓冲液)在冰上混合，冰浴超声破碎2h。离心，收集上清。

[0093] 1.2.7过镍柱，用咪唑洗脱纯化蛋白，收集洗脱液，即得到GFAP抗原蛋白。

[0094] 所述GFAP单克隆抗体的制备方法为：

[0095] 2.1、动物免疫：GFAP蛋白对Balb/C小鼠进行免疫；

[0096] 2.2细胞融合：利用免疫小鼠的脾细胞和SP2/0细胞进行融合，得到杂交瘤细胞；

[0097] 2.3细胞筛选：利用有限稀释法结合间接ELISA方法来筛选得到阳性单克隆杂交瘤细胞；

[0098] 2.4抗体制备：利用小鼠腹水来体外扩增富集单克隆抗体；

[0099] 2.5抗体纯化：利用辛酸-硫酸铵法和亲和层析法对腹水进行纯化，透析后测定A280确定蛋白浓度待用。

[0100] 本实施例中给出了一种具体的GFAP单克隆抗体的制备方法，如下：

[0101] 1、免疫：取8-12周龄的雌性balb/c小鼠，采用多点皮下注射的方式免疫GFAP抗原。

本次实施免疫程序如下：

[0102]

天数	操作	佐剂	免疫部位	免疫量
0	采阴性血清	/	/	/
	第一次免疫	CFA	皮下、皮内多点	80ug/只
20	第二次免疫	IFA	皮下、皮内多点	100ug/只
34	第三次免疫	IFA	皮下、皮内多点	100ug/只
44	采血清测效价	/	/	/
48	第四次免疫	IFA	皮下、皮内多点	100ug/只
融合前三天	冲击免疫	/	尾静脉	100ug/只

[0103] 2.融合：

- [0104] 2.1、于融合前2天,扩大培养骨髓瘤细胞SP2/0制备得到骨髓瘤细胞悬液。
- [0105] 2.2、于融合前2天,取未经免疫的balb/c小鼠,颈脱位致死。取巨噬细胞约 $3-5*10^6$ 个,用HAT重悬至 $2*10^5/ml$ ,铺96孔板,于37℃,6%CO<sub>2</sub>培养箱中培养备用。
- [0106] 2.3、取免疫好GFAP的balb/c小鼠,摘除眼球采血作为阳性对照血清。
- [0107] 2.4、颈脱位致死小鼠,解剖取脾脏细胞,得到约 $6*10^8$ 脾细胞,并将细胞重悬于10ml不完全培养基中。
- [0108] 2.5、将 $1-10^8$ 脾细胞和 $2*10^7$ 骨髓瘤细胞SP2/0混合于一支50ml融合管内,加不完全培养基30ml,离心后加50%PEG1ml融合。
- [0109] 2.6、90S内加不完全培养基20-30ml,于37℃静置10min。
- [0110] 2.7、离心去上清,重悬,并补加含巨噬细胞的HAT培养基至80ml。
- [0111] 2.8、分装96孔板,每孔0.1ml,于37℃,6%CO<sub>2</sub>培养箱内培养。
- [0112] 2.9、5天后用HAT培养基换出1/2培养基;7-10天后用HT培养基换出HAT培养基;14天后用普通培养基。
- [0113] 2.10、观察杂交瘤细胞的生产,待其长至孔底面积1/10以上时,吸出上清
- [0114] 3、抗体捕捉Elisa筛选杂交瘤细胞:
- [0115] 3.1、羊抗鼠IgG包被酶标板,每孔加100ul,37℃2h。
- [0116] 3.2、洗涤,拍干后加2.10上清,37℃2h。
- [0117] 3.3、洗涤,拍干后加GFAP抗原,37℃2h。
- [0118] 3.4、洗涤,拍干后加HRP-IgG,37℃2h。
- [0119] 3.5、洗涤,拍干后加TMB底物显色,判读结果,筛选出阳性杂交瘤细胞孔。
- [0120] 4、杂交瘤细胞的克隆化:
- [0121] 4.1、采用有限稀释法对3.5筛选出阳性杂交瘤细胞进行系列稀释至10个细胞/ml,每孔接种100ul。
- [0122] 4.2、37℃,7.5%CO<sub>2</sub>培养7-10天,至出现肉眼可见的克隆。

- [0123] 4.3、吸取上清,检测抗体,阳性孔继续克隆化。
- [0124] 4.4、本次实施经过三轮克隆化后得到全阳性克隆。
- [0125] 4.5、将得到的单克隆细胞株进行扩大培养并冻存。
- [0126] 5、打腹水:
- [0127] 5.1、取成年balb/c小鼠,腹腔接种降植烷,每只小鼠0.5ml。
- [0128] 5.2、7天后腹腔接种用PBS稀释的杂交瘤细胞,每只小鼠 $5*10^5/0.2ml$ 。
- [0129] 5.3、10天后发现小鼠腹部明显膨大且毛炸开,行动迟缓,即可CO<sub>2</sub>窒息处死小鼠,用移液器吸取腹腔中的腹水。每只小鼠约2-3ml。
- [0130] 6、抗体纯化:
- [0131] 6.1、采用辛酸-硫酸铵沉淀法提纯5.3腹水,得到GFAP单抗粗提液。
- [0132] 6.2、采用ProteinG亲和层析柱过柱提纯GFAP单抗粗提液,得到纯化好的GFAP单抗溶液。
- [0133] 6.3、用1\*PBS透析GFAP单抗溶液,用A280检测GFAP抗体浓度约为2mg/ml。
- [0134] 所述荧光微球标记GFAP单克隆抗体的荧光探针中,所述荧光微球是时间分辨荧光微球;
- [0135] 时间分辨荧光微球是一种以具有独特荧光特性的镧系元素及其螯合剂(如EuCl<sub>3</sub>)作为示踪物的特殊功能微球,微球材料通常为聚苯乙烯,表面修饰有合适密度的羧基或其它功能基团,用于与蛋白或抗体的共价偶联,提高了标记物的稳定性。
- [0136] 所述荧光微球标记GFAP单克隆抗体的荧光探针的方法为:
- [0137] (1)、用NHS及EDC溶液活化微球(用量:1mg微球使用0.2mg NHS及0.2mgEDC);
- [0138] (2)、充分混匀后,于37℃静置30min;
- [0139] (3)、将GFAP单克隆抗体加入到活化好的微球中,使微球的终浓度为0.5mg/ml,先静置37℃偶联30min,再静置4℃过夜(不低于8H);
- [0140] (4)、在偶联好的微球中加入封闭液和10%Tween-20,混匀,静置37℃30min;
- [0141] (5)、13000rpm,离心15min清洗微球两次;
- [0142] (6)、吸去上清后,加入微球保存液,分散均匀,4℃保存,即为GFAP单克隆抗体的荧光探针。
- [0143] 所述快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条的应用,样本滴加入样品垫上的加样孔后在毛细作用下向前层析,通过含标记物的结合物释放垫,使标记物重新水化,并与荧光微球标记GFAP单克隆抗体相互反应,然后一起向前泳动,若样本中含有GFAP,其会与荧光微球标记GFAP单克隆抗体结合,在层析作用下沿着层析膜向前移动至检测区,越过检测线被质控线捕获,而未结合的荧光微球标记GFAP单克隆抗体与被层析膜上包被的GFAP抗原捕获形成复合物吸附在检测线区域,在激光源的作用下,荧光物质发射特定波的荧光信号,荧光免疫分析仪俘获荧光信号。
- [0144] 在一定范围内样本含GFAP的量越多,检测线上积聚的复合物越少,荧光信号越弱,由于荧光微球标记GFAP单克隆抗体的过量存在,所以无论样本中是否含有GFAP,荧光微球标记GFAP单克隆抗体会层析至质控线形成荧光微球标记GFAP单克隆抗体-羊抗鼠IgG复合物,显示荧光信号。质控线显示的荧光信号是判定加样量是否足够及层析过程是否正常的标准。根据检测线荧光强度和质控线荧光强度的比值T/C,根据荧光免疫定量分析仪的内置

曲线判读样本中GFAP的浓度；荧光免疫定量分析仪的内置曲线是由一系列已知GFAP浓度的标准品，采用所述快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条，以标准品GFAP浓度和已知GFAP浓度的标准品检测线荧光强度和质控线荧光强度的比值T/C为两个因素拟合的曲线。

[0145] 上述的对实施例的描述是为便于该技术领域的普通技术人员能理解和使用发明。熟悉本领域技术的人员显然可以容易地对这些实施例做出各种修改，并把在此说明的一般原理应用到其他实施例中而不必经过创造性的劳动。因此，本发明不限于上述实施例，本领域技术人员根据本发明的揭示，不脱离本发明范畴所做出的改进和修改都应该在本发明的保护范围之内。

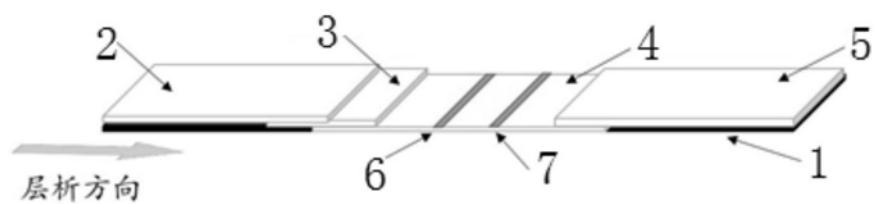


图1

专利名称(译)	快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条及其制备与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN109633171A</a>	公开(公告)日	2019-04-16
申请号	CN201811639111.1	申请日	2018-12-29
[标]发明人	胡小龙 周丽 朱凯		
发明人	胡小龙 周丽 朱凯		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/533 G01N33/54306		
代理人(译)	褚明伟		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条及其制备与引用，快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条包括底板，沿底板长度依次设置的样品垫、结合物释放垫、层析膜及吸水垫，所述的层析膜上设有检测线与质控线，所述的检测线与质控线相互分离，所述的结合物释放垫上固定有荧光微球标记GFAP单克隆抗体的荧光探针，所述检测线处包被有与微球标记抗体配对的GFAP抗原，所述的质控线处包被有羊抗鼠IgG抗体。与现有技术相比，本发明通过制备GFAP重组抗原和单克隆抗体，结合时间分辨荧光侧向免疫层析技术，制备了快速检测GFAP的荧光免疫层析试纸条，并建立了一种快速检测血清中脑损伤标志物GFAP的方法，能够快速、定量检测人血清中GFAP的浓度。

