



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110221058 A

(43)申请公布日 2019. 09. 10

(21)申请号 201910470145.0

(22)申请日 2019.05.31

(71)申请人 海南医学院

地址 570100 海南省海口市龙华区城西学
院路3号

(72)发明人 杨照新 常鹏环 黄绵庆 黄凌

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限
公司 44202

代理人 陈欢

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 21/78(2006.01)

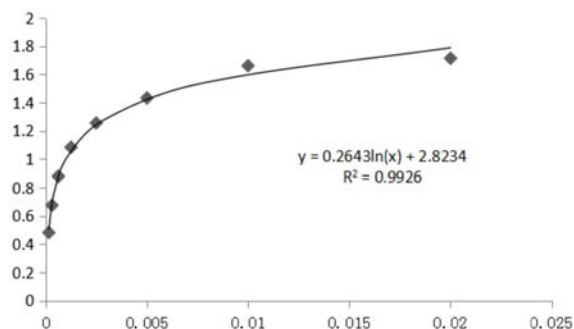
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒及
检测方法

(57)摘要

本发明提供一种小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒及检测方法,该检测试剂包括试剂盒体、抗原蛋白KLH、包被抗原蛋白的酶标板、生物素标记的山羊抗小鼠酶标二抗、标准品KLH抗体、样品稀释液、洗涤缓冲液、底物显色液A液、底物显色液B液和终止液;所述包被抗原蛋白的酶标板中,抗原蛋白KLH的包被浓度为80~85 $\mu\text{g/mL}$;所述生物素标记的山羊抗小鼠酶标二抗的稀释倍率为1:16000~1:20000,本发明的小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒,有效实现TDAR实验从定性到定量的转变,可直接进行小鼠TDAR实验的定量分析,并且具有检测灵敏度高,特异性强、操作便利和实用性好的特点。



1. 一种小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒,其特征在于:包括试剂盒体、抗原蛋白KLH、包被抗原蛋白的酶标板、生物素标记的山羊抗小鼠酶标二抗、标准品KLH抗体、样品稀释液、洗涤缓冲液、底物显色液A液、底物显色液B液和终止液;所述包被抗原蛋白的酶标板中,抗原蛋白KLH的包被浓度为80~85 μ g/mL;所述生物素标记的山羊抗小鼠酶标二抗的稀释倍率为1:16000~1:20000。

2. 根据权利要求1所述的一种小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒,其特征在于:所述样品稀释液为每100ml含有BSA 1g,NaCl 0.8g,KCl 0.02g,KH₂PO₄0.024g,Na₂HPO₄ 0.144g,其余为去离子水。

3. 根据权利要求1所述的一种小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒,其特征在于:所述洗涤缓冲液为每100ml含有吐温-20 50 μ L,NaCl 0.8g,KCl 0.02g,KH₂PO₄ 0.024g,Na₂HPO₄ 0.144g,其余为去离子水。

4. 根据权利要求1所述的一种小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒,其特征在于:所述底物显色液A液为每100mL含有EDTA-2Na 0.04g,柠檬酸0.19g,甘油10mL,TMB 0.04g,溶媒为去离子水;

所述底物显色液B液为每100mL含有醋酸钠2.72g,柠檬酸0.32g,30% H₂O₂60 μ L,溶媒为去离子水。

5. 根据权利要求1所述的一种小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒,其特征在于:所述终止液为浓度2mol/L的硫酸,溶媒为纯水。

6. 一种如权利要求1~5中任意一项所述的小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒的检测方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1) 取出包被抗原蛋白的酶标板,平衡至室温后去除外包装;

(2) 将标准品KLH抗体用样品稀释液依次稀释成1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200和1:6400八个梯度浓度;

(3) 将待检样品血清用样品稀释液稀释成1:400~1:800;

(5) 加样:加样前向包被抗原蛋白的酶标板中每孔加入200 μ L 5%脱脂奶粉室温再次封闭1h,倒空液体,用洗涤液清板两次,包被抗原蛋白的酶标板设有空白孔、标准品孔、待测样品孔,每个标准品孔、待测样品孔分别加入50 μ L稀释后的标准品KLH抗体及待检样品血清,空白孔为样品稀释液,每份样品均做复孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h或室温孵育3h;

(6) 洗板:重复洗板3次后,拍干;

(7) 每孔加入50 μ L稀释倍率为1:16000~1:20000山羊抗小鼠酶标二抗,室温孵育1h;

(8) 洗板:重复洗板3次,用洗涤缓冲液浸泡5min,再次洗板5次;

(9) 显色及检测:加入显色液100 μ L/孔,其中,底物显色液A液和底物显色液B液各50 μ L,室温避光孵育10~20min后,加入终止液50 μ L/孔,终止3~5min内,以450nm为检测波长测定OD值,参比波长为630nm。

7. 根据权利要求6所述的一种小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒的检测方法,其特征在于:所述包被抗原蛋白的酶标板的制备,包括如下步骤:

(1) 将抗原蛋白KLH按80~85 μ g/mL浓度溶解于包被液中,包被液为pH9.6碳酸盐缓冲液;

(2) 向96孔酶标板每孔中加入100 μ L步骤(1)配制的溶液,于4 $^{\circ}$ C包被过夜后,倒空液体

并去除残留液体,用洗涤缓冲液清板两次;

(3) 每孔中加入200 μ L 5%脱脂奶粉室温封闭1h,倒空液体4 $^{\circ}$ C真空包装避光保存备用。

8. 根据权利要求6所述的一种小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒的检测方法,其特征在于:所述标准品KLH抗体的制备,包括如下步骤:

(1) 选用SPF级BALB/c小鼠,通过腹腔注射抗原蛋白KLH,免疫剂量为5mg/Kg,免疫体积0.5mL/只,连续免疫4-5次,免疫间隔为7天;

(2) 末次免疫后第7天,通过内眦静脉采血,分离血清,采用抗原亲和层析法纯化KLH多克隆抗体,并检测抗体浓度和活性。

9. 根据权利要求6所述的一种小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒的检测方法,其特征在于:步骤(3)中,所述待检样品血清的获取,包括如下步骤:

选用成年SPF级BALB/c小鼠,分别设有空白对照组、阴性对照组和实验组;实验组为待测药物组,且实验组和阴性对照组分别通过腹腔注射抗原蛋白KLH,空白对照组给予等体积生理盐水,免疫剂量为5~10mg/Kg,连续免疫2次,免疫间隔为7天;首次免疫后第15天,通过内眦静脉采血,分离血清待检。

一种小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别涉及一种小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] TDAR是B细胞接触T细胞依赖性抗原后产生的抗体反应,在Th2细胞的参与下并产生特异性抗体的一种免疫功能反应。近年来TDAR试验被认为是检测药物潜在免疫毒性预测性较好的功能性试验,通过人为引入外来抗原KLH并检测KLH特异性IgG抗体生成水平,反映待测物对免疫系统整体的影响,预测免疫功能的改变,并能对药物的免疫调节和免疫毒性特点进行早期预测,因此该方法在药物免疫毒理学研究中逐渐得到广泛应用。

[0003] 然而,传统的TDAR试验由于存在抗原特异差、操作复杂及变异性大等问题,导致该试验的特异性、灵敏性、精密性、重复性及可操作性等都存在很大缺陷。KLH(keyhole limpet hemocyanin)KLH比SRBC具有性质稳定、易标准化和容易获得的优点,更适合作为T细胞依赖性抗原,与SRBC法相比变异性小,结果稳定。KLH做为特异性抗原的TDAR试验方法虽然有诸多优点,但目前也存在一些问题。首先灵敏性问题,不同的免疫剂量、免疫途径及周期可产生不同的免疫效果。其次,TDAR试验检测方法大多采用间接ELISA法,实验结果以定性为主,而对于不同的免疫抑制药物或刺激药物未必都能体现免疫毒性。一些已知免疫抑制剂如化疗药物,本身就存在免疫抑制,需要考察的是免疫抑制程度,可能需要与之相适应的免疫方法,例如定量分析。因此,鉴于这些情况,若能研究出一种可通过定量分析KLH特异性抗体生成量来评价TDAR结果,将极大提高TDAR试验的灵敏性及实用性,特别是在评价一些肿瘤化疗药的免疫抑制程度显得尤为重要。

发明内容

[0004] 鉴于此,本发明提出一种检测灵敏度高,特异性强,并且能够进行定量分析的小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒。

[0005] 本发明的技术方案是这样实现的:

[0006] 一种小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒,其特征在于:包括试剂盒体、抗原蛋白KLH、包被抗原蛋白的酶标板、生物素标记的山羊抗小鼠酶标二抗、标准品KLH抗体、样品稀释液、洗涤缓冲液、底物显色液A液、底物显色液B液和终止液;所述包被抗原蛋白的酶标板中,抗原蛋白KLH的包被浓度为80~85 μ g/mL;所述生物素标记的山羊抗小鼠酶标二抗的稀释倍率为1:16000~1:20000。本发明提出的一种小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒,涉及免疫功能定量分析检测技术,包含了免疫蛋白及与之相匹配的检测系统,能够进行有效的T细胞依赖性抗体反应(TDAR)定量分析,其主要是通过采集被特异性抗原蛋白KLH免疫的Balb/c小鼠血清,并结合特定的KLH抗原包被浓度、以及山羊抗小鼠酶标二抗和相应的待检血清的稀释倍率,以满足定量分析的配比条件,使检测系统可通过OD值有效定量分析TDAR实验结果,克服现有实验只能定性分析而不能进行定量分析的缺陷,从而达到了TDAR实验

从定性到定量的转变,可直接进行小鼠TDAR实验的定量分析,其具有检测灵敏度高,特异性强、操作便利和实用性好的特点。

[0007] 进一步说明,所述样品稀释液为每100ml含有BSA 1g,NaCl 0.8g,KCl 0.02g,KH₂PO₄ 0.024g,Na₂HPO₄ 0.144g,其余为去离子水。

[0008] 进一步说明,所述洗涤缓冲液为每100ml含有吐温-20 50μL,NaCl 0.8g,KCl 0.02g,KH₂PO₄ 0.024g,Na₂HPO₄ 0.144g,其余为去离子水。

[0009] 进一步说明,所述底物显色液A液为每100mL含有EDTA-2Na 0.04g,柠檬酸0.19g,甘油10mL,TMB 0.04g,溶媒为去离子水;所述底物显色液B液为每100mL含有醋酸钠2.72g,柠檬酸0.32g,30%H₂O₂ 60μL,溶媒为去离子水。

[0010] 进一步说明,所述终止液为浓度2mol/L的硫酸,溶媒为纯水。

[0011] 本发明提供一种小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒的检测方法,包括如下步骤:

[0012] (1) 取出包被抗原蛋白的酶标板,平衡至室温后去除外包装;

[0013] (2) 将标准品KLH抗体用样品稀释液依次稀释成1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200和1:6400八个梯度浓度;

[0014] (3) 将待检样品血清用样品稀释液稀释成1:400~1:800;

[0015] (5) 加样:加样前向包被抗原蛋白的酶标板中每孔加入200μL 5%脱脂奶粉室温再次封闭1h,倒空液体,用洗涤液清板两次,包被抗原蛋白的酶标板设有空白孔、标准品孔、待测样品孔,每个标准品孔、待测样品孔分别加入50μL稀释后的待检样品血清及标准品KLH抗体,空白孔为样品稀释液,每份样品均做复孔,37℃孵育1h或室温孵育3h;

[0016] (6) 洗板:重复洗板3次后,拍干;

[0017] (7) 每孔加入50μL稀释倍率为1:16000~1:20000山羊抗小鼠酶标二抗,室温孵育1h;

[0018] (8) 洗板:重复洗板3次,用洗涤缓冲液浸泡5min,再次洗板5次;

[0019] (9) 显色及检测:加入显色液100μL/孔,其中,底物显色液A液和底物显色液B液各50μL,室温避光孵育10~20min后,加入终止液50μL/孔,终止3~5min内,以450nm为检测波长测定OD值,参比波长为630nm。

[0020] 本发明提出的一种小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒,不仅通过控制了抗原蛋白KLH的包被浓度和二抗的稀释倍数的两个条件,而进一步制备标准品KLH抗体、KLH免疫条件及待检样品的有效稀释倍率,使整体检测系统更适应于通过OD值更有效分析TDAR实验结果。

[0021] 进一步说明,所述包被抗原蛋白的酶标板的制备,包括如下步骤:

[0022] (1) 将抗原蛋白KLH按80μg/mL浓度溶解于包被液中,包被液为pH9.6碳酸盐缓冲液;

[0023] (2) 向96孔酶标板每孔中加入100μL步骤(1)配制的溶液,于4℃包被过夜后,倒空液体并去除残留液体,用洗涤缓冲液清板两次;

[0024] (3) 每孔中加入200μL 5%脱脂奶粉室温封闭1h,倒空液体4℃真空包装避光保存备用。

[0025] 进一步说明,所述标准品KLH抗体的制备,包括如下步骤:

[0026] (1) 选用SPF级BALB/c小鼠,通过腹腔注射抗原蛋白KLH,免疫剂量为5mg/Kg,免疫

体积0.5mL/只,连续免疫4-5次,免疫间隔为7天;

[0027] (2) 末次免疫后第7天,通过内眦静脉采血,分离血清,采用抗原亲和层析法纯化KLH多克隆抗体,并检测抗体浓度和活性。

[0028] 进一步说明,步骤(3)中,所述待检样品血清的获取,包括如下步骤:选用成年SPF级BALB/c小鼠,分别设有空白对照组、阴性对照组和实验组;实验组注射待测药物,且实验组和阴性对照组分别通过腹腔注射抗原蛋白KLH,空白对照组给予等体积生理盐水,免疫剂量为5~10mg/Kg,连续免疫2次,免疫间隔为7天;首次免疫后第15天,通过内眦静脉采血,分离血清待检。

[0029] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:通过采集被特异性抗原蛋白KLH免疫的Balb/c小鼠血清,并结合特定的KLH抗原包被浓度、以及山羊抗小鼠酶标二抗和待检血清的稀释倍率,满足定量分析的配比条件,使检测系统可通过OD值有效定量分析TDAR实验结果,克服现有实验只能定性分析而不能进行定量分析的缺陷,从而达到了TDAR实验从定性到定量的转变,可直接进行小鼠TDAR实验的定量分析,其具有检测灵敏度高,特异性强、操作便利和实用性好的特点。

附图说明

[0030] 图1为小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒线性及线性范围检测结果的曲线图;

[0031] 图2为实施例2的各组BALB/c小鼠血清KLH IgG抗体检测结果的柱状图。

具体实施方式

[0032] 为了更好地理解本发明技术内容,下面提供具体实施例,对本发明做进一步的说明。

[0033] 本发明实施例所用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0034] 本发明实施例所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0035] 实施例1—一种小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒,包括试剂盒体、抗原蛋白KLH、包被抗原蛋白的酶标板、生物素标记的山羊抗小鼠酶标二抗、标准品KLH抗体(多克隆IgG)、样品稀释液、洗涤缓冲液、底物显色液A液、底物显色液B液和终止液;所述包被抗原蛋白的酶标板中,抗原蛋白KLH的包被浓度为80~85 μ g/mL;所述生物素标记的山羊抗小鼠酶标二抗(Goat Anti-Mouse IgG/HRP)的稀释倍率为1:16000~1:20000。

[0036] 所述抗原蛋白KLH(钥孔虫戚血蓝蛋白)为市售,CAS号:9013-72-3。

[0037] 所述样品稀释液为每100ml含有BSA 1g,NaCl 0.8g,KCl 0.02g,KH₂PO₄0.024g,Na₂HPO₄ 0.144g,其余为去离子水。

[0038] 所述洗涤缓冲液为每100ml含有吐温-20 50 μ L,NaCl 0.8g,KCl 0.02g,KH₂PO₄ 0.024g,Na₂HPO₄ 0.144g,其余为去离子水。

[0039] 所述底物显色液A液为每100mL含有EDTA-2Na 0.04g,柠檬酸0.19g,甘油10mL,TMB(四甲基联苯胺)0.04g,溶媒为去离子水。

[0040] 所述底物显色液B液为每100mL含有醋酸钠2.72g,柠檬酸0.32g,30%H₂O₂60 μ L,溶媒为去离子水。

[0041] 所述终止液为浓度2mol/L的硫酸,溶媒为纯水。

[0042] 实施例2—一种小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒的检测方法,包括如下步骤:

[0043] 1. 实验准备

[0044] A. 包被抗原蛋白的酶标板的制备:

[0045] (1) 将抗原蛋白KLH按80 μ g/mL浓度溶解于包被液中,包被液为pH9.6碳酸盐缓冲液;

[0046] (2) 向96孔酶标板每孔中加入100 μ L步骤(1)配制的溶液,于4 $^{\circ}$ C包被过夜后,倒空液体并去除残留液体,用洗涤缓冲液清板两次;

[0047] (3) 每孔中加入200 μ L 5%脱脂奶粉室温封闭1h,倒空液体4 $^{\circ}$ C真空包装避光保存备用。

[0048] B. 标准品KLH抗体的制备:

[0049] (1) 选用SPF级BALB/c小鼠,通过腹腔注射抗原蛋白KLH,免疫剂量为5mg/Kg,免疫体积0.5mL/只,连续免疫4-5次,免疫间隔为7天;

[0050] (2) 末次免疫后第7天,通过内眦静脉采血,分离血清,采用抗原亲和层析法纯化KLH多克隆抗体,并检测抗体浓度和活性。

[0051] C. 获取待检样品血清:

[0052] 实验组采用环磷酰胺作为待测药物,选用成年SPF级BALB/c小鼠,分别设有空白对照组、阴性对照组和实验组;实验组腹腔注射环磷酰胺,且实验组和阴性对照组分别通过腹腔注射抗原蛋白KLH,空白对照组给予等体积生理盐水,免疫剂量为5~10mg/Kg,连续免疫2次,免疫间隔为7天;首次免疫后第15天,通过内眦静脉采血,分离血清待检。

[0053] 2. 小鼠TDAR实验定量分析检测

[0054] (1) 取出包被抗原蛋白的酶标板,平衡至室温后去除外包装;

[0055] (2) 将标准品KLH抗体用样品稀释液依次稀释成1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200和1:6400八个梯度浓度;

[0056] (3) 将待检样品血清用样品稀释液稀释成1:400~1:800;

[0057] (5) 加样:加样前向包被抗原蛋白的酶标板中每孔加入200 μ L 5%脱脂奶粉室温再次封闭1h,倒空液体,用洗涤液清板两次,包被抗原蛋白的酶标板设有空白孔、标准品孔、待测样品孔,每个标准品孔、待测样品孔分别加入50 μ L稀释后的标准品KLH抗体及待检样品血清,空白孔为PBS磷酸盐缓冲液,每份样品均做复孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h或室温孵育3h;

[0058] (6) 洗板:重复洗板3次后,拍干;

[0059] (7) 每孔加入50 μ L稀释倍率为1:16000山羊抗小鼠酶标二抗,室温孵育1h;

[0060] (8) 洗板:重复洗板3次,用洗涤缓冲液浸泡5min,再次洗板5次;

[0061] (9) 显色及检测:加入显色液100 μ L/孔,其中,底物显色液A液和底物显色液B液各50 μ L,室温避光孵育10~20min后,加入终止液50 μ L/孔,终止3~5min内,以450nm为检测波长测定OD值,参比波长为630nm。

[0062] 各组BALB/c小鼠血清IgG抗体检测结果如下表:

[0063] 表.1 各组血清IgG抗体检测结果 (OD值)

[0064]

组别 Groups	KLH IgG (OD)
空白对照组	1.3875±0.1764
阴性对照组	0.1679±0.0245
实验组	0.6540±0.1090 ^{*△}

[0065] 注：与空白对照组相比，*P<0.05，与平行对照组相比[△]P<0.05

[0066] 各组的血清IgG抗体检测结果(OD值)实验组与阴性对照组相比，*P<0.05，与平行对照组相比[△]P<0.05，差异具有统计学意义(表1及图2)。

[0067] 小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒线性及线性范围检测结果如下：如图1所示，用样品稀释液将标准品KLH抗体稀释至不同浓度(1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200和1:6400)，其余步骤均与实施例2相同，进行OD值检测。利用对数回归对测定结果拟合，得出方程： $y=0.2643\ln(x)+2.8234$ ， $R^2=0.9926$ ，x为稀释倍数，y为OD值，表明本方法的线性良好(图1)。

[0068] 实施例3-根据实施例2的小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒的检测方法，区别在于，在包被抗原蛋白的酶标板的制备过程中，将抗原蛋白KLH按85μg/mL浓度溶解于包被液中，其余均实验步骤和参与实施例2相同。

[0069] 实施例4-根据实施例2的小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒的检测方法，区别在于，在小鼠TDAR实验定量分析检测的过程，加入50μL稀释倍率为1:20000山羊抗小鼠酶标二抗，其余均实验步骤和参与实施例2相同。

[0070] 实施例5-根据实施例2的小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒的检测方法，区别在于，在小鼠TDAR实验定量分析检测的过程，将待检样品血清用样品稀释液稀释成1:800，其余均实验步骤和参与实施例2相同。

[0071] 由实施例3~5中各组血清的IgG抗体检测结果(OD值)均落入实施例2各组血清的IgG抗体检测结果(OD值)的范围中。

[0072] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

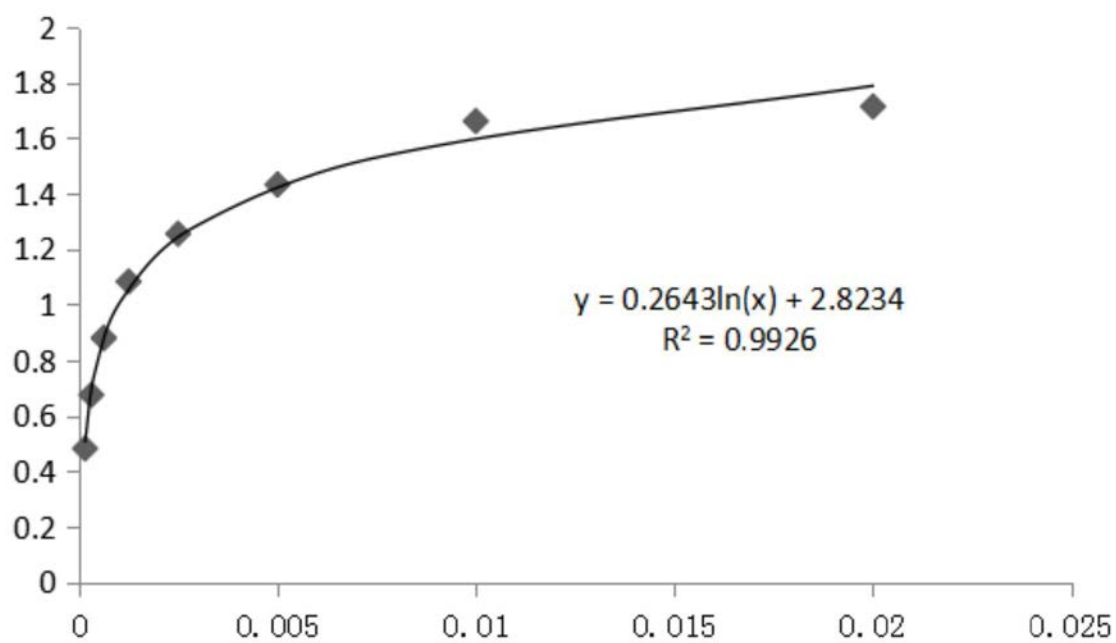


图1

KLH IgG (OD)

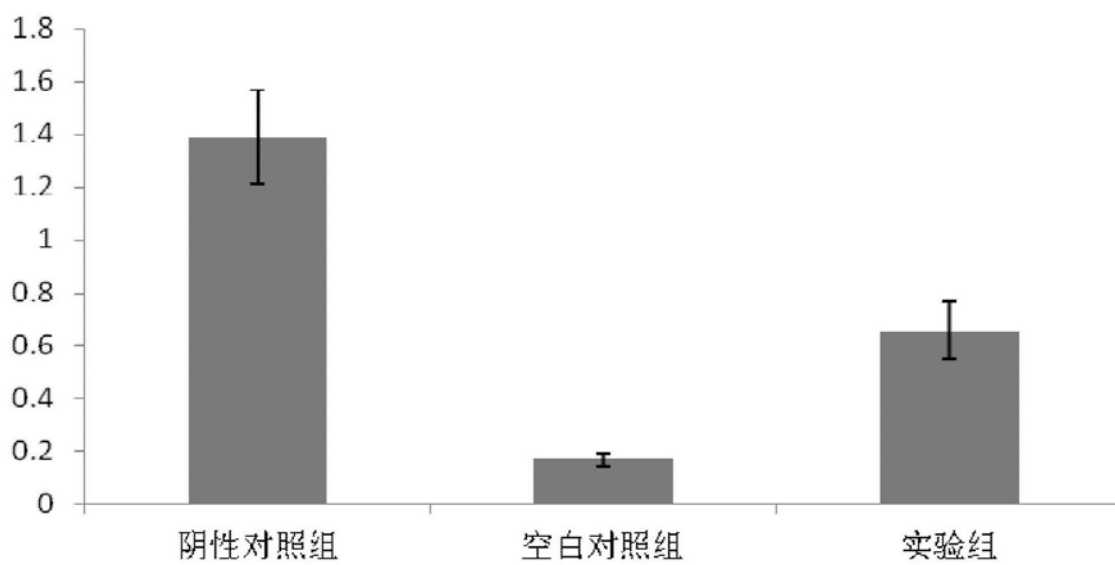


图2

专利名称(译)	一种小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒及检测方法		
公开(公告)号	CN110221058A	公开(公告)日	2019-09-10
申请号	CN201910470145.0	申请日	2019-05-31
[标]申请(专利权)人(译)	海南医学院		
申请(专利权)人(译)	海南医学院		
当前申请(专利权)人(译)	海南医学院		
[标]发明人	杨照新 黄绵庆 黄凌		
发明人	杨照新 常鹏环 黄绵庆 黄凌		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/536 G01N33/68 G01N21/78		
CPC分类号	G01N21/78 G01N33/535 G01N33/536 G01N33/6854		
代理人(译)	陈欢		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒及检测方法，该检测试剂包括试剂盒体、抗原蛋白KLH、包被抗原蛋白的酶标板、生物素标记的山羊抗小鼠酶标二抗、标准品KLH抗体、样品稀释液、洗涤缓冲液、底物显色液A液、底物显色液B液和终止液；所述包被抗原蛋白的酶标板中，抗原蛋白KLH的包被浓度为80~85μg/mL；所述生物素标记的山羊抗小鼠酶标二抗的稀释倍率为1:16000~1:20000，本发明的小鼠TDAR实验定量分析检测试剂盒，有效实现TDAR实验从定性到定量的转变，可直接进行小鼠TDAR实验的定量分析，并且具有检测灵敏度高，特异性强、操作便利和实用性好的特点。

