

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510044295.3

[43] 公开日 2006年2月8日

[11] 公开号 CN 1731181A

[22] 申请日 2005.8.24

[21] 申请号 200510044295.3

[71] 申请人 山东大学

地址 250100 山东省济南市山大南路 27 号

[72] 发明人 吉爱国 唐金宝 梁浩

[74] 专利代理机构 济南圣达专利商标事务所

代理人 郑华清

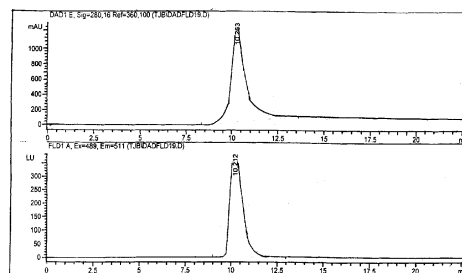
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种简便可靠的免疫荧光检测试剂及其制备方法与应用

[57] 摘要

本发明公开了一种简便可靠的免疫荧光检测试剂，由增强型绿色荧光蛋白与葡萄球菌蛋白 A 的融合蛋白(ProA - EGFP)组成。同时还公开了该试剂的制备方法，即构建绿色荧光蛋白(GFP)和葡萄球菌蛋白 A(ProA)融合基因表达载体，以大肠杆菌 E. coli DH5 α 菌株表达 ProA - EGFP 融合蛋白；分离纯化 ProA - EGFP 融合蛋白。本发明的免疫荧光检测试剂在制备免疫学诊断或检测试剂中具有广泛的应用。利用本发明的 ProA - EGFP 融合蛋白试剂可以替代现行免疫检测试剂盒中的两种以上试剂，且操作更加简便，稳定性、灵敏性和可靠性更好，尤其适用于采用荧光分析仪器进行的高通量分析。



1. 一种简便可靠的免疫荧光检测试剂，由增强型绿色荧光蛋白与葡萄球菌蛋白 A 的融合蛋白 (ProA-EGFP) 组成。

2. 权利要求 1 所述的简便可靠的免疫荧光检测试剂由下述方法制得，构建绿色荧光蛋白 (GFP) 和葡萄球菌蛋白 A (ProA) 融合基因表达载体，以大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 菌株表达 ProA-EGFP 融合蛋白；分离纯化 ProA-EGFP 融合蛋白。

3. 权利要求 2 所述的简便可靠的免疫荧光检测试剂的制备方法，其特征是，所述绿色荧光蛋白 (GFP) 基因是增强型绿色荧光蛋白基因 (EGFP)，作用表达载体为 pEZZ 18，引物按常规设计，用 PCR 扩增 EGFP 基因片段；在上游引物中设计有 *EcoR* I 内切酶酶切位点，在下游引物中设计有 *Pst* I 内切酶酶切位点和 6 \times His 序列。

4. 权利要求 2 所述的简便可靠的免疫荧光检测试剂的制备方法，其特征是，所述表达菌株的培养方法是：挑取 pEZZ-EGFP/*E. coli* 单克隆菌落，接种于 LB+Amp 液体培养基中，37 $^{\circ}$ C 振荡培养 10~18 小时，摇床转速为 240-270 转/分；之后，取活化的菌液，按体积比 1 : 10~30 的接种量，接于新鲜的 LB+Amp 液体培养基中培养，30 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.4-0.6 后，在培养基中加入终浓度为 1% Triton X-100 和 1% 甘氨酸，继续以 30 $^{\circ}$ C，如上振荡条件，培养 24-36 小时，然后常规条件离心培养液，分离纯化培养液上清中的 ProA-EGFP 融合蛋白；

其中：上述 LB+Amp 液体培养基的配方及配制方法是：

胰蛋白胨 10g，酵母提取物 5g，NaCl 5g，溶于 800ml 去离子水中，用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.5，加去离子水至总体积 1 升，1.031Mpa 高压灭菌 20 min；将高压灭菌后的 LB 培养基冷却至 60 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C，加入 Amp 储存液，使其终浓度为 100 μ g/ml。

5. 如权利要求 3 所述的简便可靠的免疫荧光检测试剂的制备方法，其特征是，所述引物是：

上游引物 F1 5'GCAC GAATTC TATG GTGAGCAAGGGCG3'

下游引物 R1 5'GCTA CTGCAG TTA ATGATGATGATGATGATG
CTTGACAGCTCGTCCA3'。

6. 权利要求 1 所述的简便可靠的免疫荧光检测试剂在制备免疫学诊断或检测试剂中的应用。

7. 权利要求 6 所述的简便可靠的免疫荧光检测试剂在制备细胞免疫组化诊断或检测试剂中的应用。

一种简便可靠的免疫荧光检测试剂及其制备方法与应用

(一) 技术领域

本发明涉及一种免疫荧光检测试剂及其制备方法与应用，属于免疫荧光分析和基因工程应用领域。

(二) 背景技术

自标记免疫测定技术发展以来，发现和应用新的标记物一直是免疫测定技术的主要研究方向之一。开发和应用新的标记物，其目的是为了提提高免疫测定的灵敏度、特异性和稳定性，使测定过程简单化、快速化。

在免疫测定中，用酶或荧光物质标记抗体/抗原是必需的。传统的标记方法是将指示物通过化学交联法耦联到抗体/抗原分子上（如将酶通过具有双功能或多功能化学基团的交联剂结合到蛋白分子上，最为常用的有过碘酸钠、戊二醛等）。但这种方法有其缺点：大量的抗体或抗原分子、酶作为反应物参加耦合；需纯化步骤才可获得抗体-酶耦合物；交联后酶活性时常降低；而且在测定过程中因随机结合引发的空间位阻的干扰而影响免疫测定的灵敏度。

基因工程已是一项重要的生物技术。利用 DNA 重组技术在基因水平将标记物与抗体/抗原重组，使之表达为具有双功能或多功能的融合蛋白分子，即以融合的方式标记抗体/抗原，表达出的融合蛋白既有抗体/抗原活性又有标记物活性的新型免疫亲和试剂。利用基因工程技术直接将抗体或抗原与标记物（如酶）以融合的方式表达，不但避免了繁琐且低效率的酶与蛋白质的化学交联，而且无需得到纯化的酶和抗体或抗原。

自1994年GFP基因被克隆成功以来，其作为生物标记分子有着巨大的应用潜力，主要因为它具有以下特性：（1）种属不依赖性，原核、真核细胞中都可表达为有活性的GFP；（2）荧光的产生不需要反应底物与辅助因子；（3）相对较小的分子和单体蛋白使之易于融合；（4）GFP肽链中一些特定氨基酸的替代可使之产生不同颜色的荧光，可适应于不同研究的需要；（5）GFP可作为一种非侵入方法（无需细胞通透作用，无毒作用）检测体内基因表达或蛋白标记；（6）它构象稳定，无光漂白作用，荧光强度高；（7）对一系列与GFP的N端或C端融合蛋白的性质研究中，已证明融合蛋白具有GFP的荧光性质和配体蛋白质的生物功能。

GFP可以在很多物种中高效表达，这些物种包括细菌、哺乳动物、酵母、植物等。GFP发出荧光不需要外加任何底物或共作用因子，荧光性质稳定；相对分子质量小，对细胞无毒性；作为荧光靶使用方便，可直接用于活体测定。

由于 GFP 产生荧光不需要加入任何外源底物、酶或其他辅助因子，而且，GFP 发射的荧光用肉眼、紫外灯下或荧光显微镜就可以检测到。GFP 作为基因标签，与其他报告基因如 β -半乳糖苷酶（LacZ）、氯霉素乙酰转移酶（CAT）、葡萄糖苷酶基因（GUS）、荧光素酶基因（Luc）等相比，具有直观、及时、应用范围广的特点。在转入含 GFP 质粒

的细菌中表达 GFP 或融合蛋白可使菌落呈现绿色, 便于筛选, 可以代替 *lacZ'* 的蓝/白斑筛选法, 且不需要昂贵的底物。

葡萄球菌A蛋白 (staphylococcal protein A, SPA) 是金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 细胞壁分离出的一种分子量为42000的单一多肽链。

SPA 具有许多生物学活性如激活补体、促有丝分裂、抑制吞噬等。其中 SPA 可与人和多种哺乳动物血清中 IgG 的 Fc 片段非特异性结合, 且这种结合不影响 Fab 片段与抗原特异性结合的免疫活性, 利用这一特性, 结合放射、荧光、酶联及免疫电镜等技术建立了许多敏感、特异、快速、简便的实验方法, 用于疾病诊断和其它方面的研究。目前 SPA 除用于免疫球蛋白和单克隆抗体的纯化外, 以生物素 (biotin)、过氧化物酶 (peroxidase)、异硫氰酸荧光素 (FITC)、胶体金 (colloidal gold) 等标记蛋白 SPA, 在免疫组化、免疫电镜、Western Blotting 和 ELISA 中得到大量应用, 被称为“广泛二抗”。

但是, 在所述的诸多免疫荧光检测试剂中, 将增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 基因与葡萄球菌蛋白 A (staphylococcal protein A, SPA) 基因重组, 表达既有 EGFP 荧光活性又有葡萄球菌蛋白 A 生物学活性的双功能蛋白质并用于制备免疫荧光检测试剂和进行免疫测定的研究、开发和应用, 经检索, 还未见相关报道。

(三) 发明内容

针对现有技术的不足, 本发明要解决的问题是提供一种简便可靠的免疫荧光检测试剂, 目的是将增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 基因与葡萄球菌蛋白 A (staphylococcal protein A, SPA) 基因重组, 表达既有 EGFP 荧光活性又有葡萄球菌蛋白 A 生物学活性的双功能蛋白质。利用 EGFP 的荧光特性使免疫反应呈绿色荧光可以直接观测, 同时利用蛋白 A 能与多种哺乳动物血清中 IgG 的 Fc 非特异性结合, 尝试建立一种特异、灵敏、简便和快速的新型免疫亲和试剂。

本发明提供的简便可靠的免疫荧光检测试剂, 由增强型绿色荧光蛋白与葡萄球菌蛋白 A 的融合蛋白 (ProA-EGFP) 组成。

上述免疫荧光检测试剂由下述方法制得, 构建绿色荧光蛋白 (GFP) 和葡萄球菌蛋白 A (ProA) 融合基因表达载体, 以大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 菌株表达 ProA-EGFP 融合蛋白; 分离纯化 ProA-EGFP 融合蛋白。

其中, 所述绿色荧光蛋白 (GFP) 基因优选是增强型绿色荧光蛋白基因 (EGFP), 作用表达载体为 pEZZ 18, 引物按常规设计, 用 PCR 扩增 EGFP 基因片段; 在上游引物中设计有 *EcoR* I 内切酶酶切位点, 在下游引物中设计有 *Pst* I 内切酶酶切位点和 6 \times His 序列。

在上述免疫荧光检测试剂的制备方法中, 所述引物是:

上游引物 F1 5'GCAC GAATTC TATG GTGAGCAAGGGCG3'

下游引物 R1 5'GCTA CTGCAG TTA ATGATGATGATGATGATG
CTTGTACAGCTCGTCCA3'

在上述免疫荧光检测试剂的制备方法中，所述表达菌株优选的培养方法是：

挑取 pEZZ-EGFP/*E. coli* 单克隆菌落，接种于 LB+Amp 液体培养基中，37℃振荡培养 10~18 小时，摇床转速为 240-270 转/分；之后，取活化的菌液，按体积比 1 : 10~30 的接种量，接于新鲜的 LB+Amp 液体培养基中培养，30℃振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.4-0.6 后，在培养基中加入终浓度为 1% Triton X-100 和 1%甘氨酸，继续以 30℃，如上振荡条件，培养 24-36 小时，然后常规条件离心培养液，分离纯化培养液上清中的 ProA-EGFP 融合蛋白；

其中：上述 LB+Amp 液体培养基的配方及配制方法是：

胰蛋白胨 10g，酵母提取物 5g，NaCl 5g，溶于 800ml 去离子水中，用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.5，加去离子水至总体积 1 升，1.031Mpa 高压灭菌 20 min；将高压灭菌后的 LB 培养基冷却至 60℃±2℃，加入 Amp 储存液，使其终浓度为 100 μg/ml。

在上述免疫荧光检测试剂的制备方法中，分离纯化 ProA-EGFP 融合蛋白的方法是：

对少量样品纯化分析时，采用 HisTrap Chelating HP (1ml) 手动上样洗脱；对大量 ProA-EGFP 融合蛋白制备时，采用 HisTrap Chelating HP (5ml) HPLC 操作系统。

具体方法如下：

(1) 小量样品分离纯化步骤：

1) 准备七种含有不同咪唑浓度的缓冲液。

结合缓冲液 (Binding Buffer) 中咪唑终浓度为 10mM，洗脱缓冲液从 A-F (以下简称 A-F) 含有逐渐升高的咪唑梯度浓度。

2) 用 5ml 蒸馏水冲洗柱子，取 0.5ml 0.1M 的硫酸镍溶液结合镍离子后，再用 5ml 蒸馏水冲洗柱子。

3) 用注射器吸取 10ml 的 Binding Buffer 平衡柱子。

4) 上样，收集流通液，流通液重复上柱 2 次。

5) 用 10ml Binding buffer 冲洗，收集流出部分。

6) 用 5ml A 洗提，每管收集 1ml 洗出液 (下同)。

7) 用 5ml 逐渐提高的咪唑梯度浓度的 B-F 洗提，重复 6。

Binding Buffer 是第一步最低的咪唑浓度，Binding buffer 中使用较高的咪唑浓度可能得到更纯的蛋白质。

8) 蛋白质洗脱后，再生柱子从步骤 3 开始。现在柱子可以重新进行纯化，不需要再加金属离子。柱子的再次使用依赖于纯化的样品的性质，仅用来纯化一种重组蛋白质，避免交叉污染。

9) 对目的蛋白质浓度最大组分以 10000rpm 离心超滤脱盐、浓缩。

10) 12% SDS-PAGE 电泳检测纯化蛋白质。

(2) 目的蛋白——ProA-EGFP 融合蛋白的大量纯化制备：

HisTrap Chelating HP (5ml) 处理同上；操作按 HPLC 系统说明书。流速 1ml/min；紫外、荧光检测仪同时检测：紫外检测波长为 280nm，荧光检测波长 Ex=489nm/Em=511nm。每一咪唑梯度都洗脱至 (紫外、荧光) 检测仪基线水平 (1-2 个柱体积)。收集紫外、荧光最大洗脱峰。对目的蛋白质浓度最大组分以 10000rpm 离心超滤脱盐、浓缩。12% SDS-PAGE 电泳检测纯化蛋白质。

上述 ProA-EGFP 融合蛋白的检测:

(1) ProA-EGFP 融合蛋白的荧光光谱测定

采用 F-250 日立荧光分光光度计 (HITACHI) 对纯化的 ProA-EGFP 进行荧光激发光谱、荧光发射光谱测定 (狭缝 $5\text{nm} \times 5\text{nm}$)。

(2) ProA-EGFP 融合蛋白的免疫学活性测定

采用竞争 ELISA 测定方法。

经交叉试验法确定包被用抗体、一抗和 SPA-HRP 最佳工作度。

ProA-EGFP 融合蛋白 ELISA 竞争法的建立:

1) 将山羊 IgG 抗体用包被稀释液稀释后 (500ng/ml) 包被酶标反应板, 每孔 $100\ \mu\text{l}$, 4°C 温育过夜, 用 PBST 洗涤 3 次, 每次 3min。

2) 每孔加入封闭液 $200\ \mu\text{l}$, 于 37°C 封闭酶标反应板 1h, PBST 洗涤 3 次, 每次 3min。

3) 每孔加入兔抗山羊 IgG 抗体 ($1\ \mu\text{g/ml}$) $100\ \mu\text{l}$, 于 37°C 反应结合 1h, PBST 洗涤 3 次, 每次 3min。

4) 将待测样品 (ProA-EGFP 融合蛋白) 适当梯度稀释后, 每样品加双孔用于测定过程, 每孔加入 $50\ \mu\text{l}$, 再加入 SPA-HRP (1:2000) $50\ \mu\text{l}$; 对照双孔各加入 SPA-HRP (1:2000) $100\ \mu\text{l}$ 和样品稀释液 $100\ \mu\text{l}$, 于 37°C 反应结合 30—60min, PBST 洗涤 3 次, 每次 3min。

5) 每孔加入 TMB 底物液 $100\ \mu\text{l}$, 37°C 避光显色 10—15min, 当对照孔出现明显颜色反应时, 每孔加入终止液 $50\ \mu\text{l}$, 于 20min 内测定结果。

6) 结果测定: 用酶标仪读数, 双波长 450/620nm, 读取各孔 OD 值。

7) 数据处理: 以未加 ProA-EGFP 融合蛋白 (加入 ProA-HRP) 的孔为空白孔, 计算百分抑制率 $(B_0 - B) / B_0\%$ (B_0 值, 即只加 SPA-HRP 不加 ProA-EGFP 孔的 $A_{450/620}$; B 值, 即加入不同稀释度的 ProA-EGFP 与 SPA-HRP 孔的 $A_{450/620}$)。以 ProA-EGFP 稀释度的负对数 $(-\text{Log}X)$ 为横坐标, 百分抑制率 $(B_0 - B) / B_0\%$ 为纵坐标, 绘制 ProA-EGFP 融合蛋白抑制标准曲线。

本发明以 EGFP 作标记物融合标记蛋白 A, 得到既能发射荧光又具有“抗体”活性的双功能融合蛋白, 参加抗原抗体反应, 利用 EGFP 的荧光特性使免疫反应呈绿色荧光从而可以直接观测, 无需显色步骤, 使免疫检测过程更为简便、快速, 同时也避免了传统标记技术中需要分离、纯化、化学计量等复杂的过程。由于反应体系中无游离标记物的存在, 使本底降低, 为开发新型免疫亲和试剂提供依据。

鉴于此, 本发明所述的简便可靠的免疫荧光检测试剂在制备免疫学诊断或检测试剂中, 特别是在制备细胞免疫组化诊断或检测试剂中具有广泛的应用。

利用本发明所述的免疫荧光检测试剂——ProA-EGFP 融合蛋白进行免疫荧光测试, EGFP 在紫外光照射下能够发射荧光的特性和 ProA 与免疫球蛋白 G (IgG) 的非特异性亲和作用, 能够特异和准确地检测和指示 IgG 与其抗原 (包括此 IgG 的抗原和第一抗体) 的免疫亲和反应, 真正实现了检测过程的直观、方便、快捷、准确。

在具体的免疫检测工作中, 利用本发明涉及的 ProA-EGFP 融合蛋白一种试剂可以替代现行免疫检测试剂盒中的两种以上试剂, 且操作更加简便, 稳定性、灵敏性和可靠性更好, 尤其适用于采用荧光分析仪器进行的如药物筛选等高通量分析。

(四) 附图说明

图 1 ProA-EGFP 融合蛋白咪唑梯度洗脱 HPLC 图谱图

(五) 具体实施方式

实施例 1: ProA-EGFP 融合蛋白的制备方法

1. 构建增强型绿色荧光蛋白基因 (EGFP) 和葡萄球菌蛋白 A (ProA) 融合基因表达载体, 以大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 菌株表达 ProA-EGFP 融合蛋白; 分离纯化 ProA-EGFP 融合蛋白。

其中: 作用表达载体为 pEZZ 18, 引物是:

上游引物 F1 5'GCAC GAATTC TATG GTGAGCAAGGGCG3'

下游引物 R1 5'GCTA CTGCAG TTA ATGATGATGATGATGATG

CTTGTCACAGCTCGTCCA3'

用 PCR 扩增 EGFP 基因片段; 在上游引物中设计有 *EcoR* I 内切酶酶切位点, 在下游引物中设计有 *Pst* I 内切酶酶切位点和 6 \times His 序列。

2. 上述生产 ProA-EGFP 融合蛋白的培养条件

挑取 pEZZ-EGFP/*E. coli* 单克隆菌落, 接种于 LB+Amp (100 μ g/ml) 液体培养基 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。次日, 取活化的菌液以 1/10 的接种量接于新鲜的 LB+Amp (100 μ g/ml) 液体培养基中培养, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 OD₆₀₀ 至 0.4—0.6 (约 6—8h) 后, 在培养基中加入终浓度 1% Triton X-100 及 1% 甘氨酸, 继续 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 30—36h。培养液离心, 提取纯化培养上清中的 ProA-EGFP。

其中: 上述 LB+Amp 液体培养基的配方及配制方法是:

胰蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, NaCl 5g, 溶于 800ml 去离子水中, 用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.5, 加去离子水至总体积 1 升, 1.031Mpa 高压灭菌 20 min; 将高压灭菌后的 LB 培养基冷却至 60 $^{\circ}$ C, 加入 Amp 储存液, 使其终浓度为 100 μ g/ml。

3. ProA-EGFP 融合蛋白的分离纯化

上清液通过 0.45 μ m 的滤膜去除细胞碎片及其他物质。使用高效液相色谱进行分离纯化: 色谱柱: HisTrap Chelating HP (5mL); 流速: 1mL/min; 紫外检测波长: 280nm, 荧光检测波长: Ex=489nm/Em=511nm; 室温; 咪唑梯度洗脱。收集紫外、荧光最大洗脱峰。对目的蛋白质浓度最大组分以 10000rpm 离心超滤脱盐、浓缩, 得纯化 ProA-EGFP 融合蛋白。

高效液相分离纯化图谱见图 1。

实施例 2: 蛋白 A-绿色荧光蛋白 (ProA-EGFP) 融合蛋白在免疫酶斑点检测中的应用
采用免疫酶斑点测定方法 (Dot-ELISA)。

1、蛋白 A-辣根过氧化物酶 (ProA-HRP) 对照实验

- 取 NC 膜用铅笔作好加样方格 (5mm \times 5mm) 并作好相应标记。
- 将膜浸入 0.01mol/L PH7.4 的 PBS 中 15~30min, 取出用滤纸吸干。

- c. 将要包被的抗体（兔 IgG 抗体）0.01mol/L PH7.4 的 PBS 稀释至工作浓度。
- d. 加样 $1\mu\text{l}$ 于相应格内，室温自然干燥。
- e. 将膜片放入封闭液中振荡封闭 30min。
- f. 将膜片放入洗涤液中振荡洗涤 3 次，每次 30min。
- g. 用滤纸吸干，将膜片放入酶标记抗体（ProA-HRP, 1: 2000）溶液中，室温振荡 30min。
- h. 将膜片放入洗涤液中振荡洗涤 4 次，每次 30min。
- i. 将膜片浸入底物溶液中，在振荡条件下显色，一般在 15min 左右显色充分，用蓝色 DAB 系统底物时显色呈蓝灰色。
- j. 用流水冲洗数分钟，放入蒸馏水中终止反应。
- k. 结果判断
可根据有无显色反应判断结果为阳性或阴性。对于需要作半定量判断的实验，须与同一次实验中不同浓度的标准品的灰色深度作比较判断。

2、ProA-EGFP 融合蛋白检测

步骤 a-f, 同 1 中 a-f。

- h. 用滤纸吸干，将膜片放入 Pro-EGFP（工作浓度约为 1mg/ml）溶液中，室温振荡 30min。
- i. 将膜片放入洗涤液中振荡洗涤 4 次，每次 30min。
- j. 将膜片置于紫外灯（365nm）下观察。

结果：可根据有无绿色荧光判断结果为阳性或阴性。对于需要作半定量判断的实验，须与同一次实验中不同浓度的标准品的颜色深度作比较判断。

实施例 3: Pro-EGFP 融合蛋白在细胞免疫组化中的应用

肌动蛋白 (Actin), 是细胞微丝的主要成分, 而微丝又是构成细胞骨架的主要成分。在所有细胞, 尤其是肌细胞中高表达。本实验选择体外培养的大鼠神经细胞作为实验细胞, 以免抗大鼠 Actin 多抗为一抗, 标记神经细胞; 以 ProA-EGFP 来代替经典标记的二抗, 目的是检测 ProA-EGFP 的染色效果。

1、荧光抗体染色实验:

- a. 固定: 将培养有细胞的片取出, 0.1M PBS 冲洗 3 次, 每次 5min; 4%多聚甲醛固定 15-20min; 0.1M PBS 冲洗 3 次, 每次 5min。
- b. 增强膜透性: 用 0.3%Triton X-100 处理 20 min; 0.1M PBS 冲洗 3 次, 每次 5min。
- c. 封闭: 用正常山羊血清封闭, 37°C, 40min;
- d. 在被检标本上滴加第一抗体液, 并将其放入湿盒中, 4°C 过夜。
- e. PBS 冲洗 3 次, 每次 10min。
- f. 滴加 ProA-EGFP 工作液, 37°C, 30min。
- h. PBS 冲洗 3 次, 每次 10min。
- i. 封片, 荧光显微镜观察, 拍照。

同时, 设立阴性对照实验, 不加一抗 (兔抗大鼠 Actin 多抗), 其他操作步骤相同。

结果：荧光显微镜下肌动蛋白呈现为绿色荧光，阴性对照无荧光。

实施例 4：ProA-EGFP 融合蛋白在 Dot-ELISA 中的应用

将纯化 ProA-EGFP (1mg/ml) 倍比稀释 (20, 1, 2...) 至浓度分别为 200ng/ μ l、100ng/ μ l、50ng/ μ l、25ng/ μ l、12.5ng/ μ l，分别将 200ng、100ng、50ng、25ng、12.5ng (1 μ l) 点样 NC 膜；在紫外灯 (365nm) 照射下，可观察到 25ng 点样点发出的绿色荧光。

取 5 μ l 兔 IgG 抗体 (1mg/0.25ml)，加到 195 μ l PBS 中，倍比稀释 (20, 1, 2...) 至浓度分别为 100ng/ μ l、50ng/ μ l、25ng/ μ l、12.5ng/ μ l、6.25ng/ μ l 和 3.13ng/ μ l，各取 1 μ l 包被于 NC 膜上；则 IgG 的包被量分别为 100ng、50ng、25ng、12.5ng、6.25ng 和 3.13ng。

以 ProA-HRP 为酶标抗体和蓝色 DAB 系统底物显色，可检测到 6.25ng 的兔 IgG；利用 ProA-EGFP 检测，在紫外灯 (365nm) 下可检测到 50ng 的兔 IgG。

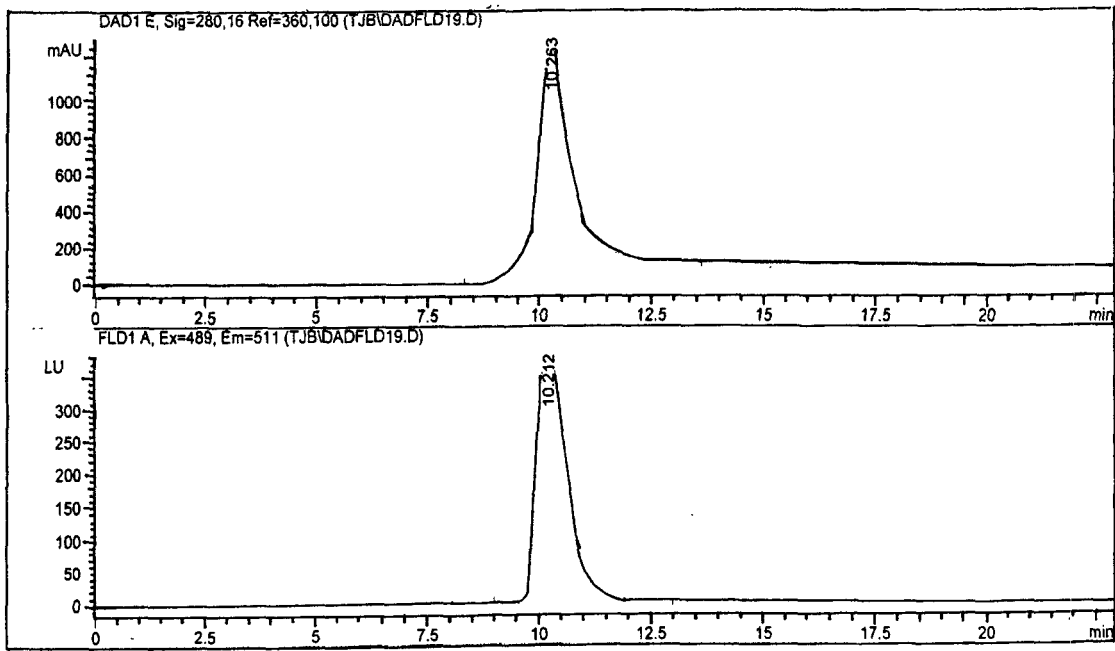


图 1

专利名称(译)	一种简便可靠的免疫荧光检测试剂及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN1731181A	公开(公告)日	2006-02-08
申请号	CN200510044295.3	申请日	2005-08-24
[标]申请(专利权)人(译)	山东大学		
申请(专利权)人(译)	山东大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东大学		
[标]发明人	吉爱国 唐金宝 梁浩		
发明人	吉爱国 唐金宝 梁浩		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/533 C12M1/00		
代理人(译)	郑华清		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种简便可靠的免疫荧光检测试剂，由增强型绿色荧光蛋白与葡萄球菌蛋白A的融合蛋白(ProA - EGFP)组成。同时还公开了该试剂的制备方法，即构建绿色荧光蛋白(GFP)和葡萄球菌蛋白A(ProA)融合基因表达载体，以大肠杆菌E.coli DH5α菌株表达ProA - EGFP融合蛋白；分离纯化ProA - EGFP融合蛋白。本发明的免疫荧光检测试剂在制备免疫学诊断或检测试剂中具有广泛的应用。利用本发明的ProA - EGFP融合蛋白试剂可以替代现行免疫检测试剂盒中的两种以上试剂，且操作更加简便，稳定性、灵敏性和可靠性更好，尤其适用于采用荧光分析仪器进行的高通量分析。

