



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102998464 A

(43) 申请公布日 2013. 03. 27

(21) 申请号 201110275129. X

(22) 申请日 2011. 09. 16

(71) 申请人 武汉优尔生科技股份有限公司

地址 430056 湖北省武汉市武汉经济技术开
发区出口加工区 8MC 地块 F 栋

(72) 发明人 何峰容 李华渊 童晓玲 杨娟
章秀波 汪景 谢正红

(51) Int. Cl.

G01N 33/74 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

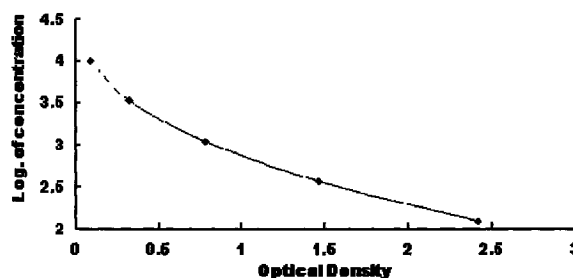
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

脱氢表雄酮酶联免疫吸附测定试剂盒的研制
方法

(57) 摘要

本发明公开的了一种脱氢表雄酮酶联免疫吸附测定试剂盒的研制方法,采用脱氢表雄酮和琥珀酸酐作为原料,利用混合酸酐法,分别制备脱氢表雄酮人工抗原 (DHEA-BSA 和 DHEA-OVA)、抗脱氢表雄酮 (DHEA) 单克隆抗体,进而制备酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒。通过与高效液相色谱 (HPLC) 法的比较,其操作步骤简单、可一次检测多个样本、且不需贵重仪器、同时在检测灵敏度、所需时间等方面均优于 HPLC 法。同时,相较于 HPLC 法 ELISA 方法无需使用正己烷、乙腈、甲醇等有机试剂,可减少对实验者及环境的毒害,在环保方面更胜一筹。



1. 一种脱氢表雄酮酶联免疫吸附测定试剂盒的研制方法,采用脱氢表雄酮和琥珀酸酐作为原料,其特征在于包括以下步骤:

步骤一、制备脱氢表雄酮人工抗原 (DHEA-BSA),采用混合酸酐法制备 DHEA-BSA,取脱氢表雄酮与琥珀酸酐作为原料,将两者反应、层析、洗脱、收集,合并后留取反应产物得到修饰的半抗原;取适量修饰过的半抗原,加入氯甲基异丁酯和三正丁胺,反应后得 A 液,取适量 BSA 溶解在碳酸盐缓冲液中得 B 液,将 A 液加入 B 液中,经过搅拌、洗脱、收集得到蛋白部分,再进行浓缩、冷冻、干燥后得到抗原 DHEA-BSA;

步骤二、制备脱氢表雄酮人工包被抗原 (DHEA-OVA),采用混合酸酐法制备 DHEA-OVA,取脱氢表雄酮与琥珀酸酐作为原料,将两者反应、层析、洗脱、收集,合并后留取反应产物得到修饰的半抗原;取修饰过的半抗原,加入氯甲基异丁酯和三正丁胺,反应后得 A 液,取适量 OVA 溶解在碳酸盐缓冲液中得 B 液,将 A 液加入 B 液中,经过搅拌、洗脱、收集得到蛋白部分,再进行浓缩、冷冻、干燥后得到人工抗原 DHEA-OVA;

步骤三、制备抗脱氢表雄酮 (DHEA) 单克隆抗体,融合形成表达 anti-DHEA 的杂交瘤细胞株;经多次有限稀释后由 ELISA 检测筛选 P/N 值最高的单克隆抗体;将细胞扩大培养后收取表达上清,选用蛋白 A 柱进行分离、纯化,浓缩后得到抗 DHEA 单克隆抗体;

步骤四、制备酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒,使用固相载体,包被步骤二所得的 DHEA-OVA 经过封闭、洗板处理后制成酶标板,依次加入不同浓度的标准品 / 待测标本及生物素化的抗 DHEA 单克隆抗体,再经生物素-亲和素放大系统,依次加入底物及终止液,完成 DHEA 的 ELISA 试剂盒的制备。

2. 如权利要求 1 所述的脱氢表雄酮酶联免疫吸附测定试剂盒的研制方法,其特征在于:所述步骤一中具体修饰的半抗原的步骤为:

1. 1) 取重量 1 : 1 的 25-75mg 脱氢表雄酮与 25-75mg 琥珀酸酐在室温下反应过夜;

1. 2) 采用 TLC 薄层检测反应产率,硅胶柱层析,石油醚 / 丙酮混合溶液梯度洗脱,按每瓶 50ml 收集,回收溶剂,TLC 跟踪检测,合并相同部分,用 TLC 与脱氢表雄酮对照,留取反应产物即为修饰的半抗原。

3. 如权利要求 2 所述的脱氢表雄酮酶联免疫吸附测定试剂盒的研制方法,其特征在于:所述步骤一中利用修饰过的半抗原制备抗原 DHEA-BSA 的具体步骤为:

1. 3) 取 5mg-20mg 修饰过的半抗原,加入 10-30ul 氯甲基异丁酯和 5-20ul 三正丁胺,在 4℃ 反应 2h,得 A 液;

1. 4) 将 10-30mgBSA 溶解在 1-4ml 碳酸盐缓冲液中,得 B 液,将其冷却至 4℃;

1. 5) 将 A 液逐滴加入 B 液中,搅拌反应 6h,然后过 Sephadex G-100 柱,PBS 洗脱,收集蛋白部分,除去未反应的半抗原;

1. 6) 对收集的蛋白部分进行超滤杯浓缩,SDS-PAGE 胶检测,DEHA-BSA 电泳条带滞后于载体蛋白 BSA 的电泳条带;

1. 7) 冷冻干燥 24h,冻干粉分装,得人工抗原 DEHA-BSA。

4. 如权利要求 1 所述的脱氢表雄酮酶联免疫吸附测定试剂盒的研制方法,其特征在于:所述步骤二中具体修饰的半抗原的步骤为:

2. 1) 取重量 1 : 1 的 25-75mg 脱氢表雄酮与 25-75mg 琥珀酸酐在室温下反应过夜;

2. 2) 采用 TLC 薄层检测反应产率,硅胶柱层析,石油醚 / 丙酮混合溶液梯度洗脱,按每

瓶 50ml 收集,回收溶剂,TLC 跟踪检测,合并相同部分,用 TLC 与脱氢表雄酮对照,留取反应产物即为修饰的半抗原。

5. 如权利要求 4 所述的脱氢表雄酮酶联免疫吸附测定试剂盒的研制方法,其特征在于:所述步骤二中利用修饰过的半抗原制备包被抗原 DHEA-OVA 的具体步骤为:

2. 3) 取 5mg-20mg 修饰过的半抗原,加入 10-30u1 氯甲基异丁酯和 5-20u1 三正丁胺,在 4℃ 反应 2h,得 A 液;

2. 4) 将 10-30mgOVA 溶解在 1-4ml 碳酸盐缓冲液中,得 B 液,将其冷却至 4℃;

2. 5) 将 A 液逐滴加入 B 液中,搅拌反应 6h,然后过 Sephadex G-100 柱,PBS 洗脱,收集蛋白部分,除去未反应的半抗原;

2. 6) 对收集的蛋白部分进行超滤杯浓缩,SDS-PAGE 胶检测,DEHA-OVA 电泳条带滞后于载体蛋白 OVA 的电泳条带;

2. 7) 冷冻干燥 24h,冻干粉分装,得人工抗原 DEHA-OVA。

6. 如权利要求 1 所述的脱氢表雄酮酶联免疫吸附测定试剂盒的研制方法,其特征在于:所述步骤三中制备杂交瘤细胞具体步骤为:

3. 1) 选用 BALB/C 小鼠,用 DHEA-BSA 免疫,每只 10-30ug,皮下多点及四脚掌初次免疫,14d 后相同剂量皮下加强免疫,每 2 周加强 1 次,加强后每隔 7d 尾部采血,分别测定针对半抗原和载体蛋白的抗体效价,于细胞融合前 3d 腹腔加强免疫;

3. 2) 用 PEG 融合处于对数生长期的骨髓瘤细胞和 BALB/C 小鼠腹水脾细胞,制备杂交瘤细胞。

7. 如权利要求 6 所述的脱氢表雄酮酶联免疫吸附测定试剂盒的研制方法,其特征在于:所述步骤三中利用杂交瘤细胞进一步制备得到抗 DHEA 抗体的具体步骤为:

3. 3) 在所述步骤 3. 2) 得到的杂交瘤细胞 2 周后用间接 ELISA 法检测细胞上清液,选取 P/N 值最高的采用有限稀释法进行 3-4 次克隆;

3. 4) 每次克隆后扩大培养建库的细胞上清;

3. 5) 用硫酸铵沉淀法粗提单抗,用亲和层析法纯化分离得到特异性高的抗 DHEA 的抗体。

8. 如权利要求 1 所述的脱氢表雄酮酶联免疫吸附测定试剂盒的研制方法,其特征在于:所述步骤四具体包括以下步骤:

4. 1) 使用 96 孔聚苯乙烯试剂板 (PS) 作为固相载体,先将其置于紫外光下辐照 2 小时,使 PS 板活化;

4. 2) 在试剂板微孔条上预先包被一定浓度的 DHEA-OVA,4℃ 过夜,经洗板及牛血清白蛋白封闭处理后制成包被好的酶标板;

4. 3) 检测时,依次加入不同浓度的标准品 / 待测标本及生物素化的抗 DHEA 单克隆抗体,形成标准品 / 待测标本中的 DHEA 和酶标板上包被的 DHEA 竞争结合生物素化抗 DHEA 抗体的局面,再通过生物素 - 亲和素放大信号,以 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 及硫酸分别作为底物及终止液,完成 DHEA 的 ELISA 试剂盒的制备。

脱氢表雄酮酶联免疫吸附测定试剂盒的研制方法

技术领域

[0001] 本发明是一种脱氢表雄酮酶联免疫吸附测定试剂盒的研制方法,设计生物技术领域。

背景技术

[0002] 脱氢表雄酮 (DHEA), 是一种 C19 类固醇激素, 主要由肾上腺皮质网状带分泌, 在循环血液中以 DHEA 及其储存硫酸盐形式 (DHEAS) 存在 (体内后者是前者的 100 倍左右), DHEA 能转化为雌激素、雄激素、孕激素、皮质醇和皮质酮等其他激素, 因此被誉为多向性“激素缓冲剂”。许多研究表明, DHEA 在促进脂肪代谢、抗氧化、提高机体免疫力、增强细胞活性、防治老年性痴呆等方面均有积极的作用。机体衰老后体内 DHEA 及 DHEAS 水平显著下降, 导致各种类固醇激素的含量明显下降, 同时伴随心血管疾病、肿瘤发病率的上升以及免疫功能的下降。在实际应用中, DHEA 已作为抗衰老保健药进入市场, 它不仅抗衰老, 还对糖尿病、心脏病、乳腺癌、子宫癌的预防和治疗有明显作用。同时该激素是近年来国际奥委会列出的禁用药物之一, 是常规的兴奋剂检测项目。目前对血清和尿液中 DHEA 的检测方法主要分为色谱技术和免疫分析技术。色谱分析法包括气相色谱法 (HPLC)、气质联用和液质联用法等, 该类技术需要昂贵的仪器设备, 而且 DHEA 和 DHEAS 在检测过程中能衍生成同种物质, 干扰测定, 所以样本首先需要通过固相萃取分离法除去 DHEAS, 这使得操作过程相对繁琐, 技术要求较高。

[0003] 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测技术是利用抗原 - 抗体之间特异性的免疫反应识别生物液体中的靶分子, 并利用酶 - 底物的显色反应定量的反应待测样本中靶分子的含量。由于其特异性强、灵敏度、操作简便及不需大型仪器等优点, 现广泛用于生物样本的定量检测实验中。实现该测定的重要环节是针对待测分子的高特异性、高亲和力抗体的制备。但许多小分子半抗原免疫原性较弱, 通过传统的免疫方法不易产生特异性的抗体, 需要将其偶联到大分子物质上 (载体) 后获得免疫原性, 然后才能产生高质量的抗体。偶联方法的选择, 需要根据小分子的结构以及载体的特性来决定, 可利用小分子含的羧基、氨基或者羟基与蛋白质分子形成共价键, 将小分子连接到载体上去。连接后的小分子成为完全抗原, 经过鉴定后可以用来免疫动物获得抗体, 并完成后续 ELISA 试剂盒的制备。

[0004] DHEA 的分子式是 $C_{19}H_{28}O_2$, 分子量为 288. 41, 不具备免疫原性, 为此, 必须先设法将半抗原 DHEA 与载体蛋白偶联制备成全抗原, 才能用于免疫动物。本专利从 ELISA 试剂盒制备的源头入手, 将 DHEA 与载体蛋白 BSA 偶联, 并利用新技术提高偶联效率, 制备稳定的 DHEA-BSA, 再使用免疫技术制备特异性高亲和力强的抗体, 为试剂盒的制备提供高品质原材料。

发明内容

[0005] 本技术利用混合酸酐法, 通过多次实验, 调整反应试剂比例, 以最适比例得到最佳偶联结合比的 DHEA-BSA, 并采用紫外吸收法、质谱分析法、SDS-PAGE 及分光光度法分别针

对人工抗原的浓度、纯度、结构以及欧联比进行综合评估,筛选出最好的作为免疫原,制备兔多抗。

[0006] 本发明提供的脱氢表雄酮酶联免疫吸附测定试剂盒的研制方法采用脱氢表雄酮和琥珀酸酐作为原料,包括以下步骤:

[0007] 步骤一、制备脱氢表雄酮全抗原 (DHEA-BSA),采用混合酸酐法制备 DHEA-BSA,取脱氢表雄酮与琥珀酸酐作为原料,将两者反应、层析、洗脱、收集,合并后留取反应产物得到修饰的半抗原;取适量修饰过的半抗原,加入氯甲基异丁酯和三正丁胺,反应后得 A 液,取适量 BSA 溶解在碳酸盐缓冲液中得 B 液,将 A 液加入 B 液中,经过搅拌、洗脱、收集得到蛋白部分,再进行浓缩、冷冻、干燥后得到抗原 DHEA-BSA;

[0008] 步骤二、制备脱氢表雄酮包被抗原 (DHEA-OVA),采用混合酸酐法制备 DHEA-OVA,取脱氢表雄酮与琥珀酸酐作为原料,将两者反应、层析、洗脱、收集,合并后留取反应产物得到修饰的半抗原;取修饰过的半抗原,加入氯甲基异丁酯和三正丁胺,反应后得 A 液,取适量 OVA 溶解在碳酸盐缓冲液中得 B 液,将 A 液加入 B 液中,经过搅拌、洗脱、收集得到蛋白部分,再进行浓缩、冷冻、干燥后得到抗原 DHEA-OVA;

[0009] 步骤三、制备抗脱氢表雄酮 (DHEA) 抗体,融合形成表达 anti-DHEA 的杂交瘤细胞株;经多次有限稀释后由 ELISA 检测筛选 P/N 值最高的单克隆抗体;将细胞扩大培养后收取表达上清,选用蛋白 A 柱进行分离、纯化,浓缩后得到抗 DHEA 单克隆抗体;

[0010] 步骤四、制备酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒,使用固相载体,包被步骤二所得的 DHEA-OVA 经过封闭、洗板处理后制成酶标板,加入不同浓度的标准品 / 待测标本及生物素化的抗 DHEA 单克隆抗体,通过生物素-亲和放大系统,依次加入底物及终止液,完成 DHEA 的 ELISA 试剂盒的制备。

[0011] 优选的,上述步骤一中具体修饰的半抗原的步骤为

[0012] 1.1) 取重量 1 : 1 的 25-75mg 脱氢表雄酮与 25-75mg 琥珀酸酐在室温下反应过夜;

[0013] 1.2) 采用 TLC 薄层检测反应产率,硅胶柱层析,石油醚 / 丙酮混合溶液梯度洗脱,按每瓶 50ml 收集,回收溶剂,TLC 跟踪检测,合并相同部分,用 TLC 与脱氢表雄酮对照,留取反应产物即为修饰的半抗原。

[0014] 优选的,上述步骤一中利用修饰过的半抗原制备抗原 DHEA-BSA 的具体步骤为:

[0015] 1.3) 取 5mg-20mg 修饰过的半抗原,加入 10-30ul 氯甲基异丁酯和 5-20ul 三正丁胺,在 4℃ 反应 2h,得 A 液;

[0016] 1.4) 将 10-30mgBSA 溶解在 1-4ml 碳酸盐缓冲液中,得 B 液,将其冷却至 4℃;

[0017] 1.5) 将 A 液逐滴加入 B 液中,搅拌反应 6h,然后过 Sephadex G-100 柱,PBS 洗脱,收集蛋白部分,除去未反应的半抗原

[0018] 1.6) 对收集的蛋白部分进行超滤杯浓缩,SDS-PAGE 胶检测,DEHA-BSA 电泳条带滞后于载体蛋白 BSA 的电泳条带;

[0019] 1.7) 冷冻干燥 24h,冻干粉分装,得抗原 DEHA-BSA。

[0020] 优选的,上述步骤二中具体修饰的半抗原的步骤为

[0021] 2.1) 取重量 1 : 1 的 25-75mg 脱氢表雄酮与 25-75mg 琥珀酸酐在室温下反应过夜;

[0022] 2.2) 采用 TLC 薄层检测反应产率, 硅胶柱层析, 石油醚 / 丙酮混合溶液梯度洗脱, 按每瓶 50ml 收集, 回收溶剂, TLC 跟踪检测, 合并相同部分, 用 TLC 与脱氢表雄酮对照, 留取反应产物即为修饰的半抗原。

[0023] 优选的, 上述步骤二中利用修饰过的半抗原制备包被抗原 DHEA-OVA 的具体步骤为:

[0024] 2.3) 取 5mg-20mg 修饰过的半抗原, 加入 10-30u1 氯甲基异丁酯和 5-20u1 三正丁胺, 在 4℃ 反应 2h, 得 A 液;

[0025] 2.4) 将 10-30mgOVA 溶解在 1-4ml 碳酸盐缓冲液中, 得 B 液, 将其冷却至 4℃;

[0026] 2.5) 将 A 液逐滴加入 B 液中, 搅拌反应 6h, 然后过 Sephadex G-100 柱, PBS 洗脱, 收集蛋白部分, 除去未反应的半抗原

[0027] 2.6) 对收集的蛋白部分进行超滤杯浓缩, SDS-PAGE 胶检测, DEHA-OVA 电泳条带滞后于载体蛋白 OVA 的电泳条带;

[0028] 2.7) 冷冻干燥 24h, 冻干粉分装, 得抗原 DEHA-OVA。

[0029] 优选的, 上述步骤三中制备杂交瘤细胞具体步骤为:

[0030] 3.1) 选用 BALB/C 小鼠, 用 DHEA-BSA 免疫, 每只 10-30ug, 皮下多点及四脚掌初次免疫, 14d 后相同剂量皮下加强免疫, 每 2 周加强 1 次, 加强后每隔 7d 眼眶采血, 分别测定针对半抗原和载体蛋白的抗体效价, 于细胞融合前 3d 腹腔加强免疫;

[0031] 3.2) 用 PEG 融合处于对数生长期的骨髓瘤细胞和 BALB/C 小鼠脾细胞, 制备杂交瘤细胞。

[0032] 优选的, 上述步骤三中利用杂交瘤细胞进一步制备得到抗 DHEA 抗体的具体步骤为:

[0033] 3.3) 在所述步骤 3.2) 得到的杂交瘤细胞 2 周后用间接 ELISA 法检测细胞上清液, 选取 P/N 值最高的采用有限稀释法进行 3-4 次克隆

[0034] 3.4) 每次克隆后扩大培养建库的细胞上清;

[0035] 3.5) 用硫酸铵沉淀法粗提单抗, 用亲和层析法纯化分离得到特异性高的抗 DHEA 的抗体。

[0036] 优选的, 上述步骤四具体包括以下步骤:

[0037] 4.1) 使用 96 孔聚苯乙烯试剂板 (PS) 作为固相载体, 先将其置于紫外光下辐照 2 小时, 使 PS 板活化;

[0038] 4.2) 在试剂板微孔条上预先包被一定浓度的 DHEA-OVA, 4℃ 过夜, 经洗板及牛血清白蛋白封闭处理后制成包被好的酶标板;

[0039] 4.3) 检测时, 依次加入不同浓度的标准品 / 待测标本及生物素化的抗 DHEA 单克隆抗体, 形成标准品 / 待测标本中的 DHEA 和酶标板上包被的 DHEA 竞争结合生物素化抗 DHEA 抗体的局面, 再通过生物素 - 亲和素放大信号, 以 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 及硫酸分别作为底物及终止液, 完成 DHEA 的 ELISA 试剂盒的制备。

[0040] 本发明通过高效的偶联方法的得到稳定性好的 DHEA-BSA, 并通过免疫动物得到特异性高及亲和力强的单克隆抗体, 用来制备 DHEA 的 ELISA 试剂盒。通过与高效液相色谱 (HPLC) 法的比较, 其操作步骤简单、可一次检测多个样本、且不需贵重仪器、同时在检测灵敏度、所需时间等方面均优于 HPLC 法。同时, 该试剂盒具有稳定性高和低毒性的优点, 相较

于 HPLC 法无需使用正己烷、乙腈、甲醇等有机试剂,减少对实验者及环境的毒害,在环保方面更胜一筹。

附图说明

[0041] 图 1 为本发明试剂盒质量指标检测浓度 - 光密度示意图。

具体实施方式

[0042] 为了便于本领域普通技术人员理解和实施本发明,下面结合附图及具体实施方式对本发明作进一步的详细描述。

[0043] 本专利采用效率高的新型偶联技术,获得稳定性好的 DHEA-BSA,并利用免疫技术制备高特异性及高亲和力的单克隆抗体,将其应用于 ELISA 试剂盒的制备和生产中。其中将半抗原 DHEA 与载体蛋白 BSA 偶联制备成全抗原是制备高品质 DHEA 酶联免疫试剂盒的最为关键的因素之一。

[0044] 主要的技术路线如下:

[0045] DHEA 酶联免疫试剂盒的研制方法,其具体步骤为

[0046] a、DHEA 全抗原及包被抗原的制备:

[0047] 采用混合酸酐法制备 DHEA-BSA. 取 25-75mg 脱氢表雄酮与 25-75mg 琥珀酸酐(重量 1 : 1) 在室温下反应过夜, TLC 薄层检测反应产率,硅胶柱层析,石油醚 / 丙酮混合溶液梯度洗脱,按 50ml 每瓶收集,回收溶剂, TLC 跟踪检测,合并相同部分,用 TLC 与脱氢表雄酮对照,留取反应产物即为修饰的半抗原。

[0048] 取 5mg-20mg 修饰过的半抗原,加入 10-30ul 氯甲基异丁酯和 5-20ul 三正丁胺,在 4℃ 反应 2h,得 A 液。将 10-30mgBSA 溶解在 1-4ml 碳酸盐缓冲液中,得 B 液,将其冷却至 4℃。将 A 液逐滴加入 B 液中,搅拌反应 6h,然后过 Sephadex G-100 柱, PBS 洗脱,收集蛋白部分,除去未反应的半抗原。收集的蛋白部分超滤杯浓缩, SDS-PAGE 胶检测, DHEA-BSA 电泳条带滞后于载体蛋白 BSA 的电泳条带。冷冻干燥 24h,冻干粉分装,得抗原脱氢表雄酮-BSA。同法制得包被抗原 DHEA-OVA。

[0049] b、抗 DHEA 抗体的制备:

[0050] 选用 BALB/C 小鼠,用 DHEA-BSA 免疫,每只 10-30ug,皮下多点及四脚掌初次免疫, 14d 后相同剂量腹腔加强免疫,每 2 周加强 1 次,加强后每隔 7d 眼眶采血,分别测定针对半抗原和载体蛋白的抗体效价,于细胞融合前 3d 尾静脉加强免疫。用 PEG 融合处于对数生长期的骨髓瘤细胞和 BALB/C 小鼠腹水脾细胞,制备杂交瘤细胞。2 周后用间接 ELISA 法检测细胞上清液,选取 P/N 值最高的采用有限稀释法进行 3-4 次克隆。每次克隆后扩大培养建库的细胞上清。用硫酸铵沉淀法粗提单抗,用亲和层析法纯化分离得到特异性高的抗 DHEA 的抗体。采用间接 ELISA 法进行鉴定,抗体效价为 1 : 160000-1 : 320000。

[0051] c、ELISA 试剂盒的研制:

[0052] 本试剂盒应用竞争抑制酶联免疫分析法测定血清或血浆样本中 DHEA 的水平。制备过程如下:使用 96 孔聚苯乙烯试剂板 (PS) 作为固相载体,先将其置于紫外光下辐照 2 小时,使 PS 板活化。在试剂板微孔条上预先包被一定浓度的 DHEA-OVA, 4℃ 过夜,经洗板及牛血清白蛋白封闭处理后制成包被好的酶标板。检测时,依次加入不同浓度的标准品 / 待测

标本及生物素化的抗 DHEA 单克隆抗体,形成标准品 / 待测标本中的 DHEA 和酶标板上包被的 DHEA 竞争结合生物素化抗 DHEA 抗体的局面,再通过生物素 - 亲和素放大信号,以 3,3', 5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 及硫酸分别作为底物及终止液,完成 DHEA 的 ELISA 试剂盒的制备。

[0053] 2、经过对试剂盒一系列的质量指标检测,包括灵敏度、重复性、特异性、回收率及线性测定,表明该检测体系成熟,本试剂盒各项指标检测结果:

[0054] a. 标准曲线

[0055] b. 灵敏度:ELISA 法检测血清标本时最低检测限为 55.1pg/ml;

[0056] c. 回收率:用同一血清样本分别添加不同量的定值标准品,作回收试验 (n = 5)。

[0057] 平均回收率 98.74% (表 1)。

[0058] 如图 1 所示,为本发明试剂盒质量指标检测浓度 - 光密度示意图。

[0059]	浓度 (pg/ml)	Log (浓度)	标准品 OD 值		OD 值平均值
	123.5	2.092	2.441	2.395	2.418
	370.4	2.569	1.471	1.457	1.464
	1111.1	3.046	0.788	0.775	0.7815
	3333.3	3.523	0.326	0.316	0.321
[0060]	10000	4	0.091	0.088	0.0895

[0061] 表 1 本发明试剂盒质量指标检测结果

[0062]

定值标准品 (pg/ml)	回收率 (%)
5000	94.76
1500	103.14
200	98.32
平均回收率	98.74

[0063] 表 2ELISA 法测定 DHEA 的回收试验

[0064] d. 精密度实验:

[0065] 用两法对高、中、低值质控品分别进行精密度实验,实验方法为分别用这两个试剂盒测定三个定值样本 188.5pg/ml、425.3pg/ml、736.6pg/ml,每个样本重复测定 20 次,表 3 中结果可见 ELISA 方法精密度较好。

[0066]

	批内差 CV (%)	批间差 CV (%)
736.6pg/ml	5.1	6.4
425.3pg/ml	5.8	6.8

188.5pg/ml	6.1	
------------	-----	--

[0067] 表 3ELISA 试剂盒精密度测试

[0068] 由此可以总结得出,本发明的原料的制备和试剂盒的研制方法,比常规的检测方法灵敏度更高、特异性好。

[0069] 我们对比了 ELISA 法(本公司生产的 ELISA 试剂盒)和目前普遍使用的高效液相色谱(HPLC)法,可见 ELISA 试剂盒较 HPLC 法检测 DHEA 有很多优势。

[0070]

	ELISA 试剂盒	高效液相色谱(HPLC)
样本前处理	无需	将 DHEA 衍化成肟衍生物和酰化衍化物
检测限	123.5-10000pg/ml	0.02-0.5g/L
灵敏度	55.1pg/ml	0.3ug/ml
仪器	酶标仪(价格较低)	高效液相色谱仪(价格较高)
操作	简单,无需特殊培训	繁琐,对操作人员技术要求较高
检测时间	5 小时	一天左右
检测成本	大批量检测成本较低	成本高

[0071] 表 4ELISA 试剂盒和 HPLC 法的比较

[0072] 下面通过几个实施例进行进一步描述:

[0073] 该试剂盒用于检测不同年龄阶段正常男性和女性血清样本中 DHEA 的浓度。

[0074] 1. 用本发明专利制备的 DHEA 试剂盒的操作步骤:

[0075] a. 制备标准品溶液:取标准品一瓶,加入 0.8mL 标准品稀释液稀释,其浓度为 10,000pg/mL,再依次将该溶液三倍稀释成 6,666.7pg/mL,2,222.2pg/mL,740.7pg/mL,246.9pg/mL,标准品稀释液(0pg/mL)直接作为空白孔。

[0076] b. 加样:分别设标准孔、待测样品孔、空白孔。设标准孔 5 孔,依次加入 50 μ L 不同浓度的标准品。空白孔加 50 μ L 校准品稀释液,余孔加待测样品 50 μ L,然后立即每孔加生物素化的 DHEA 工作液 50 μ L,轻轻振动混匀,酶标板加上覆膜,37℃温育 1 小时。

[0077] c. 弃去孔内液体,每孔用 350 μ L 的洗涤液洗涤,浸泡 1-2 分钟后倾倒板内液体,重复洗板 3 次。

[0078] d. 每孔加亲和素化的 HRP 工作液 100 μ L,加上覆膜,37℃温育 30 分钟。

[0079] e. 弃去孔内液体,甩干,洗板 5 次。

[0080] f. 每孔加底物 TMB 溶液 90 μ L,酶标板加上覆膜,37℃避光显色,待标准品梯度明显后,每孔加终止溶液 50 μ L,终止反应。

[0081] e. 在确保酶标板底无水滴及孔内无气泡后,立即用酶标仪在 450nm 波长测量各孔的光密度(O.D.值)。

[0082] 2. 检测结果

[0083]	女性	年龄段 (岁)	例数(n)	范围 (pg/ml)
		<10	15	589-1896
		10-20	20	897-3125
		21-30	20	1342-4308
		31-40	20	1054-3246
		41-50	20	623-3147
		50-60	20	259-1874
[0084]	男性	<10	15	659-2104
		10-20	20	1024-5627
		21-30	20	2247-4863
		31-40	20	1237-4315
		41-50	20	541-3348
		50-60	20	627-2968

[0085] 从检测结果可以看出,该试剂盒可以有效的检测出不同年龄阶段男性和女性血清内 DHEA 的含量,该激素在男性及女性发育期和青壮年期含量升高,随着年龄的增长,该值逐渐下降,与大量的研究结果相符。

[0086] 本发明通过高效的偶联方法的得到稳定性好的 DHEA-BSA,并通过免疫动物的到特异性高及亲和力强的抗体,用来制备 DHEA 的 ELISA 试剂盒。通过与高效液相色谱 (HPLC) 法的比较,其操作步骤简单、可一次检测多个样本、且不需贵重仪器、同时在检测灵敏度、所需时间等方面均优于 HPLC 法。同时该试剂盒具有稳定性高和低毒性的优点,相较于 HPLC 法无需使用正己烷、乙腈、甲醇等有机试剂,减少对实验者及环境的毒害,在环保方面更胜一筹。

[0087] 以上所述,仅是用以说明本发明的具体实施案例而已,并非用以限定本发明的可实施范围,举凡本领域熟练技术人员在未脱离本发明所指示的精神与原理下所完成的一切等效改变或修饰,仍应由本发明权利要求的范围所覆盖。

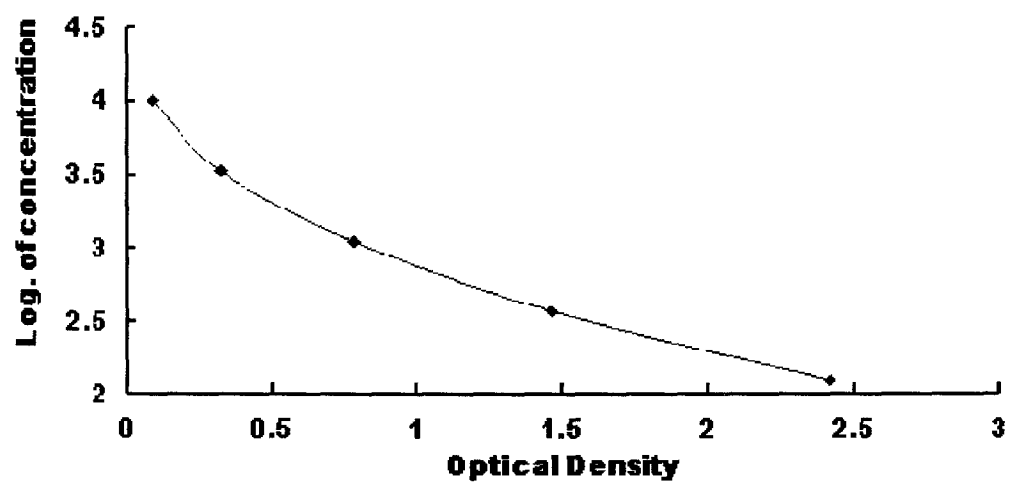


图 1

专利名称(译)	脱氢表雄酮酶联免疫吸附测定试剂盒的研制方法		
公开(公告)号	CN102998464A	公开(公告)日	2013-03-27
申请号	CN201110275129.X	申请日	2011-09-16
[标]申请(专利权)人(译)	武汉优尔生科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉优尔生科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉优尔生科技股份有限公司		
[标]发明人	何峰容 李华渊 童晓玲 杨娟 章秀波 汪景 谢正红		
发明人	何峰容 李华渊 童晓玲 杨娟 章秀波 汪景 谢正红		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开的了一种脱氢表雄酮酶联免疫吸附测定试剂盒的研制方法，采用脱氢表雄酮和琥珀酸酐作为原料，利用混合酸酐法，分别制备脱氢表雄酮人工抗原(DHEA-BSA和DHEA-OVA)、抗脱氢表雄酮(DHEA)单克隆抗体，进而制备酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒。通过与高效液相色谱(HPLC)法的比较，其操作步骤简单、可一次检测多个样本、且不需贵重仪器、同时在检测灵敏度、所需时间等方面均优于HPLC法。同时，相较于HPLC法ELISA方法无需使用正己烷、乙腈、甲醇等有机试剂，可减少实验者及环境的毒害，在环保方面更胜一筹。

