



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105137084 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 09

(21) 申请号 201510513781. 9

(22) 申请日 2015. 08. 20

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO :C2010107 2010. 12. 07

(71) 申请人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明南路 422 号

(72) 发明人 颜江华 王生育 罗芳洪 吴婷
王勇军

(74) 专利代理机构 厦门南强之路专利事务所
(普通合伙) 35200

代理人 马应森 张凡忠

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

G01N 33/541(2006. 01)

G01N 1/34(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

权利要求书1页 说明书10页 附图4页

(54) 发明名称

一种葡聚糖的夹心酶联免疫吸附测定方法

(57) 摘要

一种葡聚糖的夹心酶联免疫吸附测定方法, 涉及葡聚糖。1) 酶标反应板的包被 ;2) 酶标反应板的封闭 ;3) 加检测样品 ;4) 加酶标二抗 ;5) 加底物显色 ;6) 终止反应 ;7) OD 值的测定。杂交瘤细胞株 D9 保藏编号为 CCTCC NO :C2010107。基于抗葡聚糖单克隆抗体建立的夹心酶联免疫吸附测定方法, 可定量检测样本中的葡聚糖, 具有特异性强、灵敏度高、快速简便易于操作、对仪器的要求低等优点, 更能适应大规模样品检测的需要。

1. 一种葡聚糖的夹心酶联免疫吸附测定方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 酶标反应板的包被,具体方法为:取葡聚糖单克隆抗体杂交瘤细胞株 D9 包被 96 孔酶标板,100 μ L/孔,同时设置阴性对照孔和空白孔,4 $^{\circ}$ C 过夜;

2) 酶标反应板的封闭,具体方法为:用洗涤液洗涤酶标板,拍干,加封闭液,37 $^{\circ}$ C 孵育;

3) 加检测样品,具体方法为:用洗涤液洗涤酶标板,拍干,加入 Dextran 2000 标准品或样品溶液,100 μ L/孔,同时设标准品零值孔、阴性孔,每个样品设 3 个复孔,37 $^{\circ}$ C 反应;

4) 加酶标二抗,具体方法为:用洗涤液洗涤酶标板,拍干,加入 D24 酶标抗体,37 $^{\circ}$ C 温育;

5) 加底物显色,具体方法为:用洗涤液洗涤酶标板,拍干,加入显色 OPD 溶液,37 $^{\circ}$ C 温育;

6) 终止反应,具体方法为:每孔加入 50 μ L H_2SO_4 溶液终止反应;

7) OD 值的测定,具体方法为:用酶标仪测定,以空白孔调零,在 A490 波长测定样品和阴性对照的 OD 值,完成葡聚糖的夹心酶联免疫吸附测定。

2. 如权利要求 1 所述一种葡聚糖的夹心酶联免疫吸附测定方法,其特征在于在步骤 1) 中,所述葡聚糖的质量浓度为 2.5 μ g/mL。

3. 如权利要求 1 所述一种葡聚糖的夹心酶联免疫吸附测定方法,其特征在于在步骤 1) 中,所述杂交瘤细胞株 D9 已于 2010 年 12 月 07 日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏中心保藏编号为 CCTCC NO :C2010107。

4. 如权利要求 1 所述一种葡聚糖的夹心酶联免疫吸附测定方法,其特征在于在步骤 1) 中,所述包被的包被液采用摩尔浓度为 0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液,pH 9.6。

5. 如权利要求 1 所述一种葡聚糖的夹心酶联免疫吸附测定方法,其特征在于在步骤 2) 中,所述洗涤剂采用 pH 7.2 的 PBST,所述洗涤的次数可为 5 次,每次洗涤的时间可为 90s。

6. 如权利要求 1 所述一种葡聚糖的夹心酶联免疫吸附测定方法,其特征在于在步骤 2) 中,所述封闭液采用 10mM 的 PBS 溶液,含 2% BSA ;所述封闭液的加入量为每孔加封闭液 200 μ L ;所述孵育的时间可为 2h。

7. 如权利要求 1 所述一种葡聚糖的夹心酶联免疫吸附测定方法,其特征在于在步骤 3)、4)、5) 中,所述洗涤剂采用 PBST,所述洗涤的次数为 5 次,每次洗涤的时间为 90s。

8. 如权利要求 1 所述一种葡聚糖的夹心酶联免疫吸附测定方法,其特征在于在步骤 3) 中,所述反应的时间可为 1h。

9. 如权利要求 1 所述一种葡聚糖的夹心酶联免疫吸附测定方法,其特征在于在步骤 4) 中,所述 D24 酶标抗体采用 1 : 8000 的 D24 酶标抗体,1 : 8000 的 D24 酶标抗体可通过改良的高碘酸氧化法制备 ;加入 D24 酶标抗体的量可为 100 μ L/孔 ;所述温育的时间可为 45min。

10. 如权利要求 1 所述一种葡聚糖的夹心酶联免疫吸附测定方法,其特征在于在步骤 5) 中,所述加入显色 OPD 溶液的量可为 50 μ L/孔 ;所述温育的时间可为 10min ;

在步骤 6) 中,所述 H_2SO_4 溶液的摩尔浓度可为 2mol/L。

一种葡聚糖的夹心酶联免疫吸附测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及葡聚糖,特别是涉及一种葡聚糖的夹心酶联免疫吸附测定方法。

背景技术

[0002] 葡聚糖,又名右旋糖酐,由数个葡萄糖分子聚合而成,具有较高的分子量,葡萄糖残基之间主要以 α -1,6 键连接,支链主要有 1,2 键,1,3 键,1,4 键等。葡聚糖可由蔗糖溶液中污染的细菌的葡聚糖蔗糖酶催化下产生:蔗糖 \rightarrow 葡聚糖+果糖。葡聚糖从结构上可以分为 α 型和 β 型;前者常见于细菌分解蔗糖产生,后者具有生理活性,存在于真菌细胞壁中。(1. 范瑞梅,范家恒. 葡聚糖的免疫作用及研究进展. 甘蔗糖业,2006,(6):38-41)

[0003] 近年来,由于葡聚糖在医学和食品工业上的应用不断增多,有关葡聚糖的检测也引起了人们的关注,针对葡聚糖含量的检测在方法上有了很大的发展,已经建立起了多种检测方法,但是由于免疫学方法自身的诸多优点,使其很快在葡聚糖的检测上得到了重视。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供具有特异性强、灵敏度高、快速简便、易于操作、对仪器的要求低等优点,可用于对不同样品中的葡聚糖进行定量检测的一种葡聚糖的夹心酶联免疫吸附测定方法。

[0005] 本发明包括以下步骤:

[0006] 1) 酶标反应板的包被,具体方法为:取葡聚糖单克隆抗体杂交瘤细胞株 D9 包被 96 孔酶标板,100 μ L/孔,同时设置阴性对照孔和空白孔,4 $^{\circ}$ C 过夜;

[0007] 2) 酶标反应板的封闭,具体方法为:用洗涤液洗涤酶标板,拍干,加封闭液,37 $^{\circ}$ C 孵育;

[0008] 3) 加检测样品,具体方法为:用洗涤液洗涤酶标板,拍干,加入 Dextran 2000 标准品或样品溶液,100 μ L/孔,同时设标准品零值孔、阴性孔,每个样品设 3 个复孔,37 $^{\circ}$ C 反应;

[0009] 4) 加酶标二抗,具体方法为:用洗涤液洗涤酶标板,拍干,加入 D24 酶标抗体,37 $^{\circ}$ C 温育;

[0010] 5) 加底物显色,具体方法为:用洗涤液洗涤酶标板,拍干,加入显色 OPD 溶液,37 $^{\circ}$ C 温育;

[0011] 6) 终止反应,具体方法为:每孔加入 50 μ L H_2SO_4 溶液终止反应;

[0012] 7) OD 值的测定,具体方法为:用酶标仪测定,以空白孔调零,在 A490 波长测定样品和阴性对照的 OD 值,完成葡聚糖的夹心酶联免疫吸附测定。

[0013] 在步骤 1) 中,所述葡聚糖的质量浓度可为 2.5 μ g/mL,所述杂交瘤细胞株 D9 已于 2010 年 12 月 07 日保藏于中国典型培养物保藏中心,地址:中国武汉武汉大学,邮编:430072,保藏中心保藏编号为 CCTCC NO:C2010107;所述包被的包被液可采用摩尔浓度为 0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液,pH 9.6。

[0014] 在步骤 2) 中,所述洗涤剂可采用 pH 7.2 的 PBST,所述洗涤的次数可为 5 次,每次

洗涤的时间可为 90s ;所述封闭液可采用 10mM 的 PBS 溶液,含 2% BSA ;所述封闭液的加入量可为每孔加封闭液 200 μ L ;所述孵育的时间可为 2h。

[0015] 在步骤 3) 中,所述洗涤剂可采用 PBST,所述洗涤的次数可为 5 次,每次洗涤的时间可为 90s ;所述反应的时间可为 1h。

[0016] 在步骤 4) 中,所述洗涤剂可采用 PBST,所述洗涤的次数可为 5 次,每次洗涤的时间可为 90s ;所述 D24 酶标抗体可采用 1 : 8000 的 D24 酶标抗体,1 : 8000 的 D24 酶标抗体可通过改良的高碘酸氧化法制备 ;加入 D24 酶标抗体的量可为 100 μ L/ 孔 ;所述温育的时间可为 45min。

[0017] 在步骤 5) 中,所述洗涤剂可采用 PBST,所述洗涤的次数可为 5 次,每次洗涤的时间可为 90s ;所述加入显色 OPD 溶液的量可为 50 μ L/ 孔 ;所述温育的时间可为 10min。

[0018] 在步骤 6) 中,所述 H_2SO_4 溶液的摩尔浓度可为 2mol/L。

[0019] 本发明基于抗葡聚糖单克隆抗体建立的夹心酶联免疫吸附测定 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 方法,可定量检测样本中的葡聚糖,具有特异性强、灵敏度高、快速简便易于操作、对仪器的要求低等优点,更能适应大规模样品检测的需要。

附图说明

[0020] 图 1 为抗体纯化 SDS-PAGE 电泳鉴定。

[0021] 图 2 为酶标抗体效价测定。

[0022] 图 3 为不同株抗体 ELISA 实验。

[0023] 图 4 为抗体与酶标抗体棋盘滴定实验。

[0024] 图 5 为 ELISA 标准曲线及线性范围。

[0025] 图 6 为抗体稳定性比较。

[0026] 图 7 为抗体特异性鉴定。

具体实施方式

[0027] 下面结合实施例对本发明做进一步的说明,以下所述,仅是对本发明的较佳实施例而已,并非对本发明做其他形式的限制,任何熟悉本专业的技术人员可能利用上述揭示的技术内容加以变更为同等变化的等效实施例。凡是未脱离本发明方案内容,依据本发明的技术实质对以下实施例所做的任何简单修改或等同变化,均落在本发明的保护范围内。

[0028] 实施例 1 :葡聚糖双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立

[0029] 1、材料

[0030] 1.1 抗葡聚糖单克隆抗体

[0031] 抗葡聚糖单克隆抗体 D9 为高效的杂交瘤细胞分泌的,制备方法见第 2.2 节。

[0032] 1.2 主要试剂及仪器

[0033] Dextran 标准品 Pharmacia 公司 ;rProtein A 填料 SepharoseTM;辣根过氧化物酶 (HRP) 购自 Sigma 公司 ;BSA, OVA 购自 Sigma 公司 ;OPD 购自 Sigma 公司,高碘酸钠购自上海生工 ;硼氢化钠购自上海生工 ;包被板条购自 JET 公司 ;BSA 购自 Sigma 公司 ;其它常规化学试剂均为国产分析纯试剂。

[0034] 2、方法

[0035] 2.1 葡聚糖检测试剂标准品配制

[0036] 称取 1g Dextran 2000,用磷酸盐缓冲液 (pH7.2,0.01mol/L PBS) 稀释到 1000mL,得到浓度为 1000 μ g/mL 的母液,再按实验要求用 PBS 将母液稀释得到各种浓度。

[0037] 2.2 抗体的制备与纯化鉴定

[0038] 采用腹水法制备抗体。石蜡油注射到小鼠腹腔,0.5mL/只,1~2周后每只小鼠腹腔注射 2×10^6 个杂交瘤细胞,注射细胞 10~15d 后,收集小鼠腹水,3000r/min 离心 10min,弃油脂,收集中间澄清腹水,备用。采用亲和层析法纯化抗体,依照 rProtein A 试剂说明书进行纯化,Lowry 法检测抗体蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳鉴定抗体的纯度,间接 ELISA 测定抗体效价。选择效价最高的抗体进行酶标。

[0039] 2.3 抗体的酶标与效价测定

[0040] 采用高碘酸氧化法标酶,步骤如下:

[0041] (1) 称取 5mg HRP 溶解于 1mL 蒸馏水中;

[0042] (2) 加入 0.2mL 新配的 0.1M NaIO_4 溶液,室温下避光搅拌 20min;

[0043] (3) 将上述溶液装入透析袋中,对 1mM pH4.4 的醋酸钠缓冲液透析,4 $^\circ\text{C}$ 过夜;

[0044] (4) 加 0.2M pH9.6 碳酸盐缓冲液,使醛化的 HRP 的 pH 升高到 9.0~9.6,然后立即加入 10mg 葡聚糖抗体,室温避光轻轻搅拌 2h;

[0045] (5) 加 0.1mL 新配的 4mg/mL NaBH_4 液,混匀,置 4 $^\circ\text{C}$ 2h;

[0046] (6) 将上述液装入透析袋中,对 0.15M pH7.4PBS 透析,4 $^\circ\text{C}$ 过夜;

[0047] (7) 在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置 4 $^\circ\text{C}$ 1h;

[0048] (8) 3000rpm 离心 30min,弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次,最后沉淀物溶于少量 0.15M pH7.4 的 PBS 中;

[0049] (9) 将上述溶液装入透析袋中,对 0.15M pH7.4 的 PBS 缓冲液透析,换液 4~6 次,10,000rpm 离心 30min 取上清液,加等量甘油,分装,-20 $^\circ\text{C}$ 保存;

[0050] (10) 以 Dextran 40-OVA 为包被抗原,直接 ELISA 法检测酶标抗体的效价。

[0051] 2.4 捕获抗体的确定

[0052] 将纯化的抗体按 5 μ g/mL 分别包被微孔板,每孔 100 μ L,4 $^\circ\text{C}$,过夜;加入 1 μ g/mL 的 Dextran 2000 标准品 100 μ L/孔,37 $^\circ\text{C}$ 反应 1h;加入倍比稀释的葡聚糖酶标抗体 100 μ L/孔,PBST 洗板。OPD 显色, H_2SO_4 终止,酶联检测仪测 OD_{490nm} 值。依据反应曲线和 P/N 值 (阳性与阴性 OD 值比值),确定最佳检测抗体。

[0053] 2.5 捕获抗体包被浓度和酶标抗体工作浓度的确定

[0054] 采用棋盘滴定法,方法如下:

[0055] (1) 分别将抗体于浓度为 10 μ g/mL、5 μ g/mL、2.5 μ g/mL、1.25 μ g/mL、0.625 μ g/mL、0.312 μ g/mL,100 μ L/孔包被微孔板,4 $^\circ\text{C}$ 包被过夜;

[0056] (2) 以含有 2% BSA 的 PBS 37 $^\circ\text{C}$ 封闭 2h;

[0057] (3) 加入 1 μ g/mL 的 Dextran 2000 标准品 100 μ L/孔,37 $^\circ\text{C}$ 反应 1h;

[0058] (4) 加入不同稀释倍数的葡聚糖酶标抗体,37 $^\circ\text{C}$ 反应 45min;

[0059] (5) OPD 显色, H_2SO_4 终止,酶联检测仪测 OD_{490nm} 值。依据反应曲线及 P/N 值,确定最佳抗体组合、抗体包被浓度及酶标抗体工作浓度。

[0060] 2.6 双抗体夹心 ELISA 方法最适反应条件的确定

[0061] 2.6.1 抗原包被方式的选择

[0062] 分别用 4℃ 过夜, 37℃, 1h 和 2h 方式包被抗体, 2% BSA 封闭后, 加入 1 μg/mL 的 Dextran2000 标准品 100 μL/孔, 同时设立阴性孔, 进行夹心 ELISA 检测, 根据 P/N 值选择合适的包被方式。

[0063] 2.6.2 封闭剂的选择

[0064] 以最佳包被方式包被抗体, 分别用 0.5% 明胶、5% 脱脂奶粉、2% BSA 封闭微孔板, 37℃ 温箱封闭 2h, 其余同夹心 ELISA 方法, 根据 P/N 值选择合适的封闭剂。

[0065] 2.6.3 酶标二抗作用时间

[0066] 根据已经确定的反应条件, 将酶标抗体的孵育时间分别设为 30min、45min 和 1h, 其他步骤同上述夹心 ELISA, 根据 P/N 值选择合适的作用时间。

[0067] 2.6.4 底物作用时间的选择

[0068] 根据已经确定的 ELISA 反应条件, 将底物作用时间选择 37℃ 温育 5min、10min、15min, 根据 P/N 值选择最佳的底物作用时间。

[0069] 2.7 夹心 ELISA 反应体系特性研究

[0070] 2.7.1 标准曲线的建立

[0071] 选择确立的最佳抗体, 按最佳包被浓度包被微孔板, 封闭, 洗涤后, 加入 Dextran 2000 标准品, 用优化的夹心 ELISA 方法进行实验, 以 Dextran 2000 标准品浓度为横坐标, 以 OD 值为纵坐标绘制标准曲线, 并根据曲线的具体情况选择最佳的拟合模型。

[0072] 2.7.2 标准品回收率

[0073] 选取某一 Dextran 2000 标准品浓度, 加入高、中、低 3 个浓度的 Dextran 2000 标准品, 进行夹心 ELISA 实验, 读取 OD 值, 根据曲线方程获得各加标浓度 Dextran 2000 标准品测量值, 用测量值除以理论值 (已知值), 即可得 Dextran 2000 标准品加标回收率, 检测 ELISA 方法的准确性。

[0074] 2.7.3 最低检测限

[0075] 做标准曲线的同时, 随机选择 12 个孔做零 Dextran 2000 标准品孔, 进行夹心 ELISA 试验, 求所得 12 个 OD 值的平均值 (A_0) 和标准差 (SD), 在标准曲线上对应 (A_0+2SD) 的 Dextran 2000 标准品浓度即为此方法的最低检测限, 即该系统的灵敏度。

[0076] 2.7.4 变异系数

[0077] 2.7.4.1 批内重复性试验

[0078] 取同批次包被的微孔条, 对不同浓度的 Dextran 2000 标准品进行平行测定 3 次, 记录 OD 值, 计算变异系数, 考察批内变异系数。

[0079] 2.7.4.2 批间重复性试验

[0080] 取不同包被日期的包被条, 对不同浓度的 Dextran 2000 标准品进行平行测定 3 次, 记录 OD 值, 计算变异系数, 考察批间变异系数。

[0081] 2.7.5 稳定性

[0082] 同批次包被的包被条, 分别在 4℃、-20℃ 保存 180d, 用 Dextran 2000 标准品进行夹心 ELISA 检测, 记录 OD 值, 绘制标准曲线。分析不同保存条件下抗体的稳定性。

[0083] 2.7.6 特异性鉴定

[0084] 用确立的抗体包被微孔板, 封闭, 洗涤后加入从 1000ng/mL 开始倍比稀释的

Dextran 2000 标准品、 β -葡聚糖、淀粉、蔗糖、白糖、葡萄糖 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 反应 45min, PBST 洗涤后加入最佳浓度稀释的酶标抗体, 37 $^{\circ}$ C 反应 45min, 洗涤后加入 OPD 底显色, H_2SO_4 终止反应, 酶联检测仪测定 OD_{490nm} 值, 以 $P/N \geq 2.1$ 为阳性, 考察抗体 ELISA 反应的特异性。

[0085] 3、结果

[0086] 3.1 抗体的制备与纯化鉴定

[0087] 选取 4 株杂交瘤细胞 (D9, D24, D27, D29) 制备腹水, 腹水经 rProteinA 亲和柱纯化, 得到 2 个蛋白峰, SDS-PAGE 结果显示重、轻链两条蛋白带, 相对分子质量分别为 55KDa 和 25KDa (图 1), 其纯度可达 95% 以上。经蛋白分光光度计测定, 纯化的抗体蛋白浓度分别为 1.72mg/mL、2.13mg/mL、1.2mg/mL、1.85mg/mL。间接 ELISA 方法测定表明, 纯化的抗体效价分别为 1.28×10^6 、 2.56×10^6 、 5.12×10^5 、 1.28×10^6 。

[0088] 3.2 酶标抗体活性测定

[0089] 以浓度为 5 μ g/mL 的 Dextran 40-OVA 为包被抗原, 直接 ELISA 法检测酶标抗体的效价。结果表明 OD 值随着酶标抗体的稀释度变大而变小, 当酶标抗体的稀释度为 1 : 64000 时其 OD 均值为 0.419 ($P = 0.419$, $N = 0.085$, $P/N \geq 2.1$), 表明 D24 酶标抗体 (D24-HRP) 效价大于 10^5 , 具有较强的抗原结合活性与酶活性 (图 2)。

[0090] 3.3 捕获抗体的确定

[0091] ELISA 实验结果显示, 在同样包被浓度 (5 μ g/mL) 下, D9 抗体和 D24 酶标抗体配对所产生的 OD 值最高, P/N 值最大, 因此确立 D9 抗体为最佳捕获抗体 (图 3)。

[0092] 3.4 捕获抗体包被浓度和酶标抗体工作浓度的确定

[0093] 棋盘滴定实验结果显示, 随着 D9 抗体包被浓度的增加, OD 值呈上升趋势, 当包被浓度为 2.5 μ g/mL, OD 值随着包被浓度的增加变化不明显, 表明包被抗体趋于饱和。而 D24 酶标抗体稀释度为 1 : 8000 时 P/N 值最高 ($P/N = 24.66$, $P = 1.608$, $N = 0.065$)。因此确立 D9 抗体包被浓度为 2.5 μ g/mL, D24 酶标抗体稀释度为 1 : 8000 (图 4)。

[0094] 3.5 夹心 ELISA 体系的优化

[0095] 3.5.1 抗原包被方式的选择

[0096] 分别用 4 $^{\circ}$ C 包被过夜、37 $^{\circ}$ C 包被 1h、2h 三种方式包被 D9 抗体, 加入 1 μ g/mL 的 Dextran2000 标准品, D24 酶标抗体 1 : 8000 稀释, 进行 ELISA 检测, 结果见表 1。从表 1 中可以看出, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜 OD 值最高, P/N 最大, 故采用 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。

[0097] 表 1 不同包被方式的效果比较

[0098]

样本	4 $^{\circ}$ C 过夜	37 $^{\circ}$ C, 1h	37 $^{\circ}$ C, 2h
阳性孔平均 OD 值	1.985	1.725	1.912
阴性孔平均 OD 值	0.068	0.094	0.074
P/N	29.19	18.35	25.83

[0099] 3.5.2 封闭剂的选择

[0100] 分别用 0.5% 明胶、5% 脱脂奶粉、2% BSA 作为封闭液, 进行夹心 ELISA 试验, 结果见表 2, 3 种封闭液的差别不大, 因此选择 P/N 最大的 2% BSA 作为封闭液。

[0101] 表 2 不同封闭剂的效果比较

[0102]

样本	0.5%明胶	5%脱脂奶粉	2% BSA
阳性孔平均 OD 值	1.896	1.878	1.925
阴性孔平均 OD 值	0.068	0.072	0.066
P/N	27.89	26.08	29.16

[0103] 3.5.3 酶标抗体作用时间

[0104] 根据已经确定的反应条件,将 D24 酶标抗体的反应时间分别设为 37℃,30min、45min 和 1h,结果见表 3,实验表明, D24 酶标抗体反应时间为 30min 时, OD 值较低,反应不完全;而反应 1h 后,阴性孔值偏高,因此,选择 37℃,45min 作为 D24 酶标抗体反应时间。

[0105] 表 3 酶标抗体作用时间比较

[0106]

	30 min	45 min	1 h
阳性孔平均 OD 值	1.574	1.937	2.015
阴性孔平均 OD 值	0.056	0.067	0.104
P/N	28.11	28.91	19.37

[0107] 3.5.4 底物作用时间的选择

[0108] 在夹心 ELISA 中取不同的底物作用时间看 OD 值变化,结果见表 4。从表 4 中可以看出,在 10min 时 P/N 值最大,所以选择 10min 作为底物作用时间。

[0109] 表 4 底物作用时间的效果比较

[0110]

样本	显色时间 (min)		
	5	10	15
阳性孔平均 OD 值	1.554	1.975	2.371
阴性孔平均 OD 值	0.065	0.069	0.124
P/N	23.91	28.62	19.12

[0111] 3.5.5 夹心 ELISA 体系的建立

[0112] (1) 将 D9 抗体以 2.5 μg/mL 包被于微孔板,100 μL/孔,4℃包被过夜;

[0113] (2) 用 pH 7.2 的 PBST 洗涤 5 次,每次 90s;

[0114] (3) 2% BSA 封闭,200 μL/孔,37℃温育 2h;

[0115] (4) 用 PBST 洗涤 5 次,每次 90s;

[0116] (5) Dextran 2000 标准品或样品溶液 100 μL/孔,同时设标准品零值孔、阴性孔,每个样品设 3 个复孔、37℃反应 1h;

[0117] (6) 用 PBST 洗涤 5 次,每次 90s;

[0118] (7) 加入 D24 酶标抗体 (二抗, 1 : 8000), 每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温育 45min ;

[0119] (8) 用 PBST 洗涤 5 次, 每次 90s ;

[0120] (9) 加入 OPD 底物溶液, 每孔 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温育 10min, 每孔滴加 50 μ L 2M H_2SO_4 溶液终止反应, 酶联检测仪测定 OD₄₉₀ 值。

[0121] 3.6 夹心 ELISA 反应体系特性研究

[0122] 3.6.1 标准曲线的建立

[0123] 选择 10 个 Dextran 2000 标准品浓度, 从 1000ng/mL 开始, 依次倍比稀释, 用已经建立的夹心 ELISA 方法检测, 实验结果表明, D29 抗体能有效与 Dextran 2000 标准品进行反应, 葡聚糖浓度越高, OD 值越大, 并体现一定量效关系, 结果见表 5。以 Dextran 2000 标准品浓度为横坐标, 以 OD 值为纵坐标绘制标准曲线, 分析数据可得, OD 值随葡聚糖浓度增加而增加, 曲线在葡聚糖浓度为 7.8ng/mL ~ 500ng/mL 范围内线性关系良好 (图 5), 相关系数 $R^2 = 0.9909$, 变异系数小于 5%。

[0124] 表 5 标准品的 ELISA 测定结果

[0125]

	Dextran 2000 (ng/mL)										
	1.95	3.9	7.8	15.6	31.25	62.5	125	250	500	1000	0
OD 值均值	0.106	0.15	0.24	0.424	0.644	0.983	1.357	1.628	1.848	1.96	0.073
标准差	0.006	0.005	0.01	0.008	0.01	0.016	0.04	0.019	0.025	0.09	0.005
变异系数	5.66	3.333	4.167	1.887	1.553	1.628	2.948	1.167	1.353	4.592	
回收率			119.7	93.8	80.2	91.8	114.4	110.9	95.1		

[0126] 3.6.2 加标回收实验

[0127] 在 Dextran 浓度为 5ng/mL Dextran 2000 标准品中, 分别加入 10ng/mL、100ng/mL、400ng/mL 的 Dextran 2000, 进行夹心 ELISA 实验。结果 (见表 6) 表明, 3 个添加水平的样品回收率范围为 97.8% ~ 108.3%, 变异系数小于 7%, 表明该方法准确度较高, 有较好的重复性。

[0128] 表 6 加标回收实验结果

[0129]

原浓度 (ng/mL)	加入量 (ng/mL)	测量值 (ng/mL)	变异系数 (%)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
5	10	16.25±1.06	6.42	108.3	
5	100	106.54±2.32	2.18	101.5	102.5
5	400	396.32±2.684	6.66	97.8	

[0130] 3.6.3 最低检测限

[0131] 做标准曲线的同时, 随机选择 12 个孔做零 Dextran 2000 标准品进行夹心 ELISA 实验, 所得 12 个孔 OD 值的平均值 (A_0) 为 0.065, 标准差 (SD) 为 0.006, 见表 7。在标准曲线上对应 A_0+2SD (0.077) 的标准品浓度为 6.34ng/mL, 即此方法的最低检测限。

[0132] 表 7 零标准品 ELISA 检测结果

[0133]

葡聚糖零标准品												均值	SD
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
0.064	0.064	0.057	0.069	0.065	0.075	0.076	0.068	0.058	0.061	0.063	0.069	0.065	0.006

[0134] 3.6.4 变异系数

[0135] 3.6.4.1 批内重复性试验

[0136] 取同批次包被条 9 条,对线性范围内的 Dextran 2000 标准品进行平行测定 3 次,实验结果显示,各浓度标准品的变异系数在 2.891%~11.93%之间,均小于 15%,见表 8,表明该方法有较好的重复性。

[0137] 表 8 标准品的批内重复试验结果

[0138]

	Dextran 标准品浓度 (ng/mL)							
	500	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	0
No1 OD 均值	1.843	1.632	1.353	0.968	0.638	0.418	0.287	0.059
No2 OD 均值	1.896	1.699	1.373	0.941	0.656	0.457	0.294	0.065
No3 OD 均值	2.039	1.788	1.522	0.997	0.718	0.528	0.339	0.074
3 次平均值	1.926	1.706	1.416	0.969	0.671	0.468	0.307	0.066
标准差	0.101	0.078	0.092	0.028	0.042	0.056	0.028	0.008
变异系数(%)	5.264	4.586	6.521	2.891	6.258	11.93	9.202	11.44

[0139] 3.6.4.2 批间重复性试验

[0140] 取 3 个不同包被日期的包被条,对不同浓度的 Dextran 2000 标准品进行平行测定 3 次,实验结果显示,线性范围内 Dextran 2000 标准品变异系数在 2.574%~12.61%之间,均小于 15%,见表 9,表明该方法有较好的批间重复性。

[0141] 表 9 标准品的批间重复试验结果

[0142]

	Dextran 2000 标准品浓度 (ng/mL)							
	500	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	0
No1 OD 均值	1.852	1.638	1.349	0.937	0.627	0.406	0.228	0.057
No2 OD 均值	2.014	1.706	1.418	0.986	0.698	0.506	0.294	0.067
No3 OD 均值	1.839	1.615	1.355	0.956	0.638	0.454	0.266	0.072
3 次平均值	1.902	1.653	1.374	0.96	0.654	0.455	0.263	0.065
标准差	0.098	0.047	0.038	0.025	0.038	0.05	0.033	0.008
变异系数 (%)	5.127	2.863	2.782	2.574	5.84	10.98	12.61	11.69

[0143] 3.6.5 稳定性

[0144] 同批次包被的微孔条,分别在 4℃、-20℃密封保存 180d,用 Dextran 2000 标准品进行夹心 ELISA 检测,记录 OD 值,绘制标准曲线(图 6)。实验结果表明,包被条置于 4℃和 -20℃保存 180d 没有明显差别;放置在 4℃的 OD 值整体稍微偏低,线性相关系数较低。说明抗体具有较好的稳定性。

[0145] 3.6.6 特异性测定

[0146] 夹心 ELISA 实验表明,包被的 D9 抗体与 Dextran 2000 有良好的反应性,随着 Dextran2000 浓度的增加,OD 值呈规律增加,而加入从 1000ng/mL 开始倍比稀释的 β -葡聚糖、淀粉、蔗糖、白糖、葡萄糖的孔,OD 值并没有产生显著性的变化(图 7)。说明 D9 抗体与这些糖类似物并不能发生反应,表明该抗体具有较强的特异性。

[0147] 实施例 2:蜂蜜样品中葡聚糖的定量检测

[0148] 对收集的蜂蜜样品用夹心 ELISA 进行检测,平行测量 3 次后取其平均 OD 值,代入标准曲线方程,得到样品的葡聚糖含量测量值,结果表明,在 5 份蜂蜜样品中,2 份检出葡聚糖,葡聚糖含量分别为 2.06 μ g/g、7.39 μ g/g。对这两份样品进行加标回收实验,结果表明,样品回收率在 91.28%~114.1%之间(见表 10)。

[0149] 表 10 蜂蜜样品加标回收实验

[0150]

	样品中含量 (ng/mL)	加入量 (ng/mL)	测量值 (ng/mL)	回收率 (%)
	0	50	52.12	104.2
PBS	0	100	103.8	103.8
	0	200	197	98.48
	0	10	11.41	114.1
蜂蜜 2	0	50	53.51	107
	0	100	97.16	97.16
	10.3	0	9.41	91.36
蜂蜜 3	10.3	10	18.53	91.28
	10.3	50	64.87	107.6
	10.3	100	106.3	96.37
	36.95	0	41.36	111.9
蜂蜜 5	36.95	10	48.74	103.8
	36.95	50	82.58	94.97
	36.95	100	131.5	96.02

[0151] 由表 10 表明,该夹心 ELISA 方法能够相对准确测定样品中的葡聚糖含量,证实夹心 ELISA 在临床上测定葡聚糖含量的可行性。

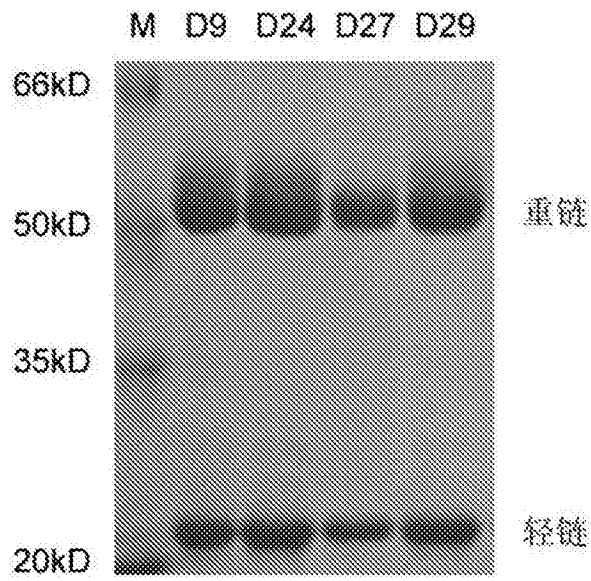


图 1

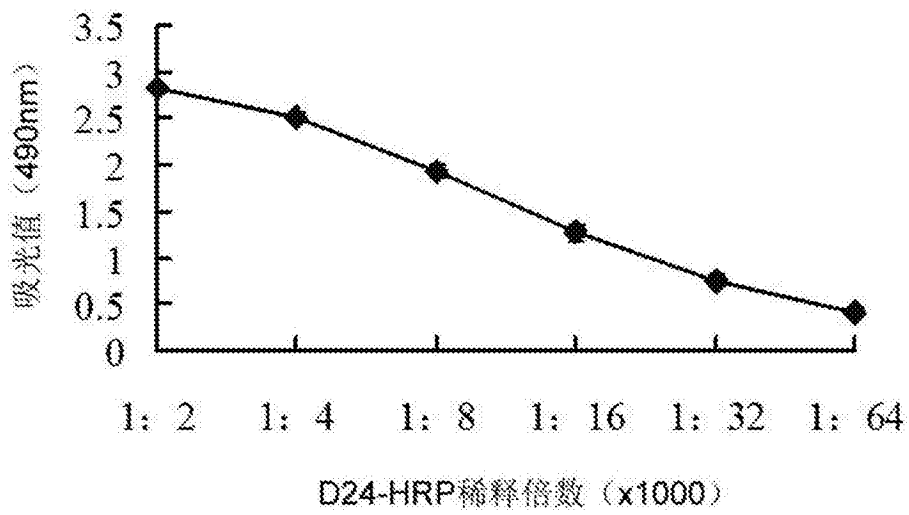


图 2

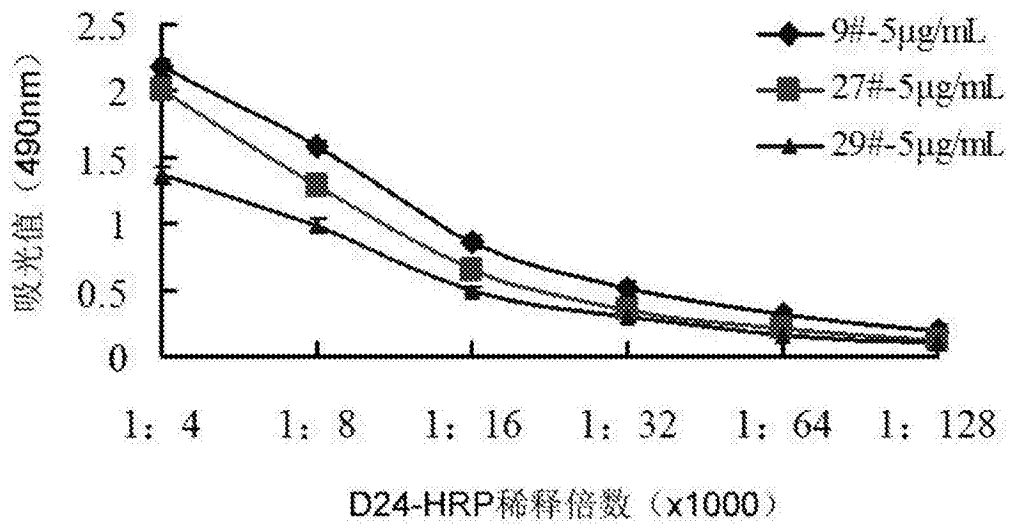


图 3

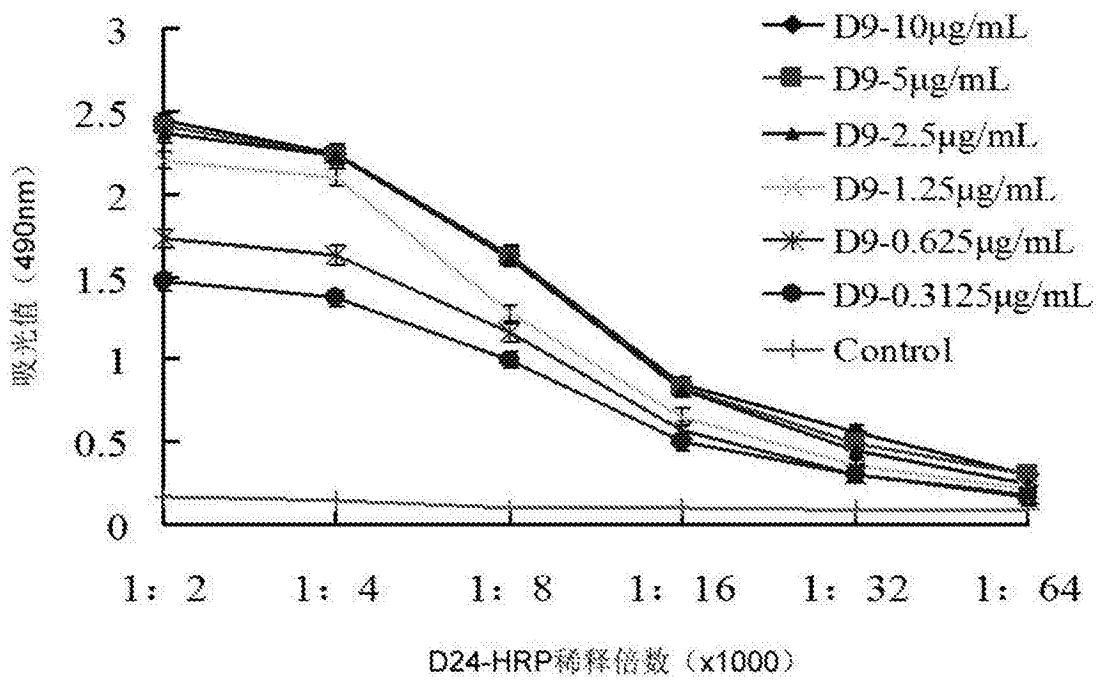


图 4

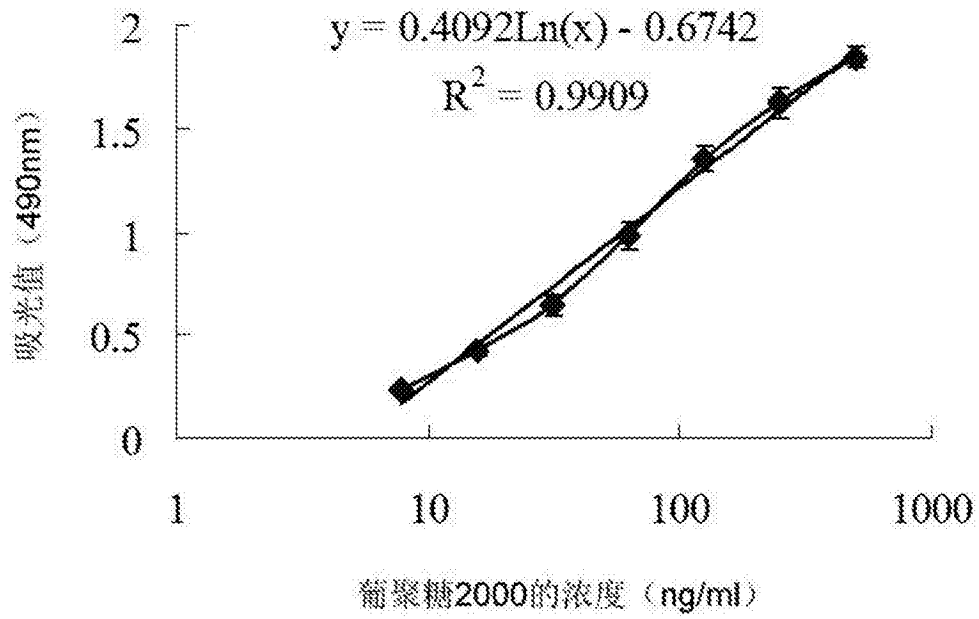


图 5

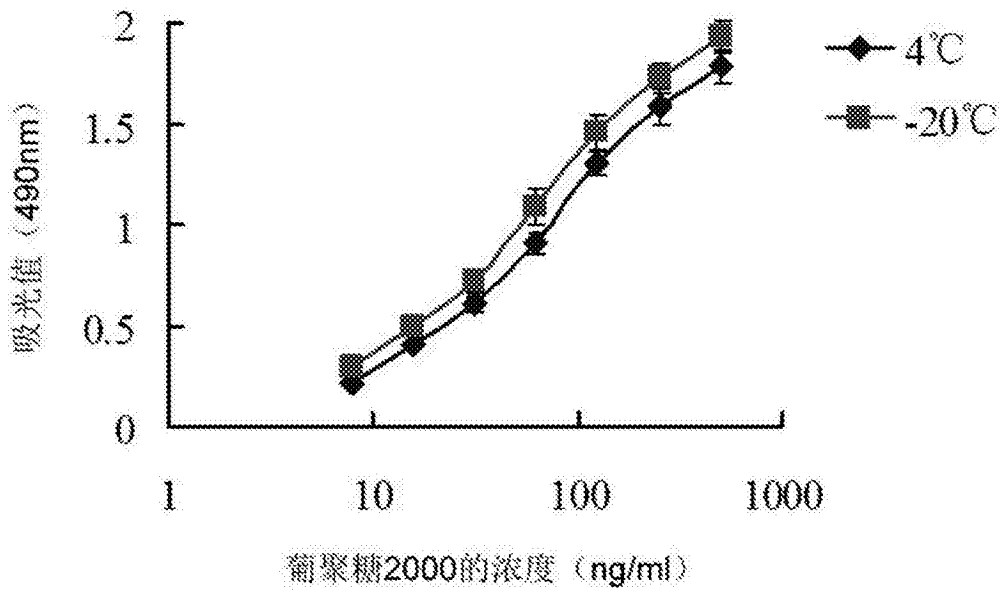


图 6

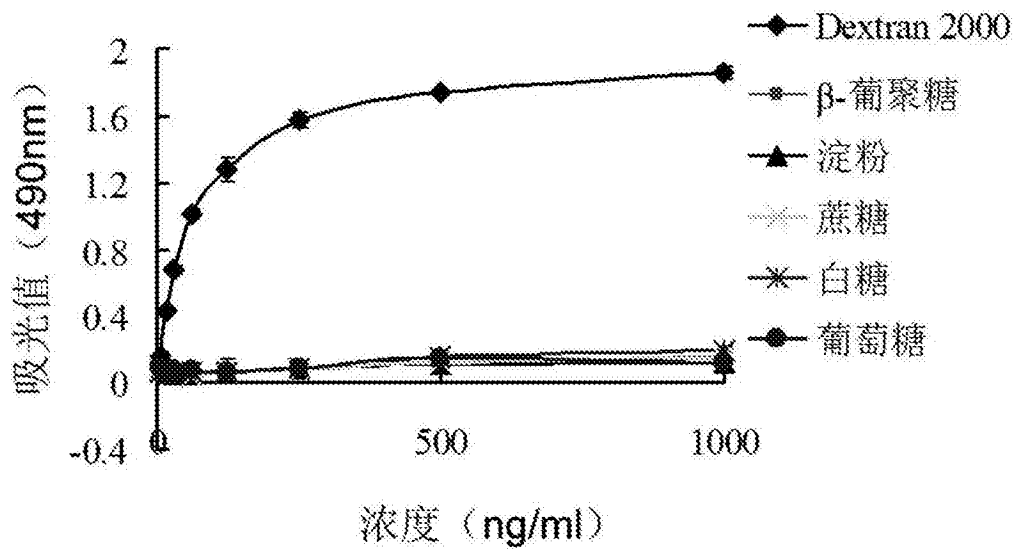


图 7

专利名称(译)	一种葡聚糖的夹心酶联免疫吸附测定方法		
公开(公告)号	CN105137084A	公开(公告)日	2015-12-09
申请号	CN201510513781.9	申请日	2015-08-20
[标]申请(专利权)人(译)	厦门大学		
申请(专利权)人(译)	厦门大学		
当前申请(专利权)人(译)	厦门大学		
[标]发明人	颜江华 王生育 罗芳洪 吴婷 王勇军		
发明人	颜江华 王生育 罗芳洪 吴婷 王勇军		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535 G01N33/541 G01N1/34 G01N21/76		
CPC分类号	G01N1/34 G01N21/76 G01N33/535 G01N33/541 G01N33/577		
代理人(译)	张凡忠		
其他公开文献	CN105137084B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种葡聚糖的夹心酶联免疫吸附测定方法，涉及葡聚糖。1)酶标反应板的包被；2)酶标反应板的封闭；3)加检测样品；4)加酶标二抗；5)加底物显色；6)终止反应；7)OD值的测定。杂交瘤细胞株D9保藏编号为CCTCC?NO：C2010107。基于抗葡聚糖单克隆抗体建立的夹心酶联免疫吸附测定方法，可定量检测样本中的葡聚糖，具有特异性强、灵敏度高、快速简便易于操作、对仪器的要求低等优点，更能适应大规模样品检测的需要。