



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107884371 A

(43)申请公布日 2018.04.06

(21)申请号 201710297294.2

(22)申请日 2017.04.28

(71)申请人 南方医科大学

地址 510000 广东省广州市白云区广州大道北1838号

(72)发明人 唐时幸 王海鹰

(74)专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务所(普通合伙) 11350

代理人 赵蕊红

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/576(2006.01)

G01N 33/554(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

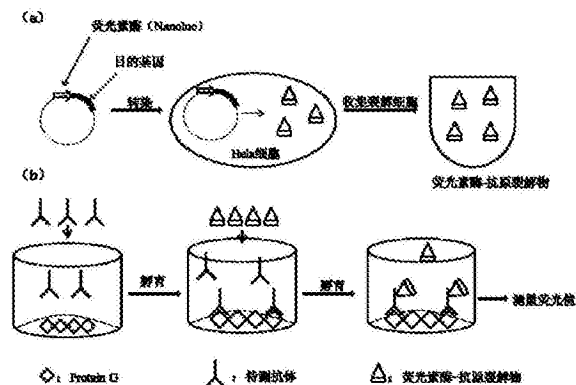
序列表3页 附图2页

(54)发明名称

用于高通量抗体快速检测的荧光素酶免疫吸附方法

(57)摘要

一种用于高通量抗体快速检测的荧光素酶免疫吸附方法,使用G蛋白(Protein G)或者A蛋白(Protein A)直接包被酶连免疫反应板,捕获待测样本的总抗体。采用荧光素酶与特定抗原融合表达质粒转染哺乳动物细胞后获得的细胞裂解物,作为检测抗原。用于检测的融合抗原无需纯化,可以快速获得。本发明通过检测荧光素酶催化底物产生的荧光信号,可以检测25pg/mL的抗体,定量范围可以从25pg/mL-10⁷pg/mL,具有检测敏感性高,定量范围广,且不需要抗宿主种属第二抗体作为检测抗体等优势。检测周期更短,可以广泛用于人、各种动物样本特异性抗体的检测,使用范围更广。



1. 一种用于高通量抗体快速检测的荧光素酶免疫吸附方法,其特征在于:采用Protein G或者Protein A蛋白作为包被抗原,采用动物细胞表达的含有荧光素酶的融合抗原,通过检测荧光素酶催化底物产生的荧光来判断待测样品中抗体的存在与含量。

2. 根据权利要求1所述的用于高通量抗体快速检测的荧光素酶免疫吸附方法,其特征在于:具体包括以下步骤:

S1. 构建目标抗原与荧光素酶融合表达质粒;

S2. 融合表达质粒转染至动物细胞,培养24-48h;

S3. 收集并裂解细胞,获得含荧光素酶-目标抗原融合蛋白的细胞裂解物;

S4. 将Protein G或者protein A蛋白作为捕捉抗原固定至固体支持物上,将待测样品加入一起孵育,待测样本中的抗体与所述捕捉抗原形成抗原-抗体复合物附着在固体支持物表面,洗去没有结合的样本;

S5. 将荧光素酶-目标抗原裂解物加入到所述固体支持物中一起孵育,当存在与目标抗原特异性反应的抗体时,目标抗原与S4的抗原-抗体复合物结合,吸附在固体支持物表面,洗去没有结合的荧光素酶-目标抗原裂解物;

S6. 将荧光素酶的底物加入所述固体支持物中;

S7. 使用可检测荧光的仪器测定待测样品中荧光强度,以此反映待检测样本中特定抗体的存在及含量。

3. 根据权利要求2所述的用于高通量抗体快速检测的荧光素酶免疫吸附方法,其特征在于:所述裂解细胞的裂解液成分为:50mM Tris,pH7.5,100mM氯化钠,5mM氯化镁,1%的曲拉通X-100,50%甘油和蛋白酶抑制剂,每50mL裂解液中含2片蛋白酶抑制剂。

4. 根据权利要求3所述的用于高通量抗体快速检测的荧光素酶免疫吸附方法,其特征在于:步骤S3裂解细胞具体是置于冰上裂解30min。

5. 根据权利要求1所述的用于高通量抗体快速检测的荧光素酶免疫吸附方法,其特征在于:具体采用哺乳动物细胞表达的含有荧光素酶的融合抗原。

用于高通量抗体快速检测的荧光素酶免疫吸附方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别是涉及一种用于高通量抗体快速检测的荧光素酶免疫吸附方法。

背景技术

[0002] 酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)是基于抗原抗体特异性反应和酶催化底物显色反应建立的一种具有高灵敏度和特异性的用于检测待测样品中抗原抗体的检测方法。由于其具有操作简单、快速,所需样品量少等优点而得到了广泛的应用。

[0003] 目前ELISA方法是最常用于样本中抗体检测的方法,其基本原理是将对应的抗原加入到固相支持物表面,加入待检测样本后,通过孵育、洗涤等步骤,再加入酶标抗体或者酶标抗原进行孵育,洗涤后加入酶的作用底物显色,通过底物显色的强弱反应待测样本中抗体的水平。目前应用最广泛的标记酶为辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase,HRP),常用的底物为四甲基联苯胺(TMB)等显色底物,在HRP催化下产生有色产物,其灵敏度低于化学发光底物和荧光底物。

[0004] 经典ELISA方法中用于包被到固相载体上的抗原,常需要采用原核或者真核表达系统制备获得纯化的抗原,制备周期长。且原核表达抗原易形成包涵体,蛋白纯化、复性步骤复杂,且不易保留天然抗原的结构和抗原表位。此外,真核表达的抗原蛋白表达量较低,且纯化过程复杂,也严重制约了抗体检测方法的应用,不能满足快速检测的需求。

[0005] 另外,传统ELISA方法中,待检测样本如果是动物或者媒介生物,则检测时需要加入对应种属的酶标二抗进行检测,而一些诸如螨虫、蚊子等媒介生物,或者是蝙蝠等非实验室常用动物,较难获得特异的种属二抗,从而也限制了其检测应用的范围。

[0006] 近年来新发传染病越发常见,且多是动物来源的病原体感染。快速建立针对新病原体感染的抗体检测方法,开展动物疫源地的溯源调查,对于疫情防控十分重要。因此,针对传统ELISA方法的不足,提供一种用于高通量抗体快速检测的荧光素酶免疫吸附方法,以克服传统ELISA方法不足很有必要。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于避免现有技术的不足之处,提供一种用于高通量抗体快速检测的荧光素酶免疫吸附方法(Luciferase immunosorbent assay,LISA),该方法可以应用于高通量抗体检测,具有检测灵敏度更高、检测周期更短,可以广泛用于人、各种动物的生物样本特异性抗体的检测,使用范围广。

[0008] 本发明的上述目的通过如下技术手段实现。

[0009] 提供一种用于高通量抗体快速检测的荧光素酶免疫吸附方法,采用G蛋白(Protein G)或者A蛋白(Protein A)作为包被抗原,采用动物细胞表达的含有荧光素酶的融合抗原,通过检测荧光素酶催化底物产生的荧光来判断待测样品中抗体的存在与含量。

[0010] 优选的,上述的用于高通量抗体快速检测的荧光素酶免疫吸附方法,具体包括以下步骤:

[0011] S1.构建目标抗原与荧光素酶融合表达质粒;

[0012] S2.融合表达质粒转染至动物细胞,培养24-48h;

[0013] S3.收集并裂解细胞,获得含荧光素酶-目标抗原融合蛋白的细胞裂解物;

[0014] S4.将Protein G/A蛋白作为捕捉抗原固定至固体支持物上,将待测样品加入一起孵育,待测样本中的抗体与所述捕捉抗原形成抗原-抗体复合物附着在固体支持物表面,洗去没有结合的样本;

[0015] S5.将荧光素酶-目标抗原裂解物加入到所述固体支持物中一起孵育,当存在与目标抗原特异性反应的抗体时,目标抗原与S4的抗原-抗体复合物结合,吸附在固体支持物表面,洗去没有结合的荧光素酶-目标抗原裂解物;

[0016] S6.将荧光素酶的底物加入所述固体支持物中;

[0017] S7.使用可检测荧光的仪器测定待测样品中荧光强度,以此反映待检测样本中特定抗体的存在及含量。

[0018] 优选的,上述裂解细胞的裂解液成分为:50mM Tris,pH7.5, 100mM氯化钠,5mM氯化镁,1%的曲拉通X-100,50%甘油和蛋白酶抑制剂,每50mL裂解液中含2片蛋白酶抑制剂。

[0019] 优选的,上述步骤S3裂解细胞具体是置于冰上裂解30min。

[0020] 优选的,上述用于高通量抗体快速检测的荧光素酶免疫吸附方法,具体采用哺乳动物细胞表达的含有荧光素酶的融合抗原。

[0021] 本发明的用于高通量抗体快速检测的荧光素酶免疫吸附方法,使用G蛋白(Protein G)或者A蛋白(protein A)直接包被酶连免疫反应板,捕获待测样本的总抗体。采用荧光素酶与特定抗原融合表达质粒转染哺乳动物细胞后获得的细胞裂解物,作为检测抗原。用于检测的融合抗原无需纯化,可以快速获得。本发明通过检测荧光素酶催化底物产生的荧光信号,具有检测敏感性高,定量范围广,且不需要抗宿主种属第二抗体作为检测抗体等优势。本发明较传统的ELISA方法检测灵敏度更高,实验周期更短,可以广泛用于人、各种动物样本特异性抗体的检测,使用范围更广。

附图说明

[0022] 利用附图对本发明作进一步的说明,但附图中的内容不构成对本发明的任何限制。

[0023] 图1是本发明一种用于高通量抗体快速检测的荧光素酶免疫吸附方法(LISA)的原理图。

[0024] 图2是经典ELISA方法检测抗体的原理图。

[0025] 图3是采用新本发明的方法(LISA)检测HIV-1P24抗体时的灵敏度示意图。

[0026] 图4是采用传统ELISA方法检测HIV-1P24抗体时的灵敏度示意图。

[0027] 图5是采用本发明的方法检测马血清中的肝炎病毒NS3抗体的结果示意图。

具体实施方式

[0028] 结合以下实施例对本发明作进一步描述。

[0029] 实施例1。

[0030] 一种用于高通量抗体快速检测的荧光素酶免疫吸附方法,采用Protein G或者protein A蛋白作为包被抗原,采用动物细胞表达的含有荧光素酶的融合抗原,通过检测荧光素酶催化底物产生的荧光来判断待测样品中抗体的存在与含量。

[0031] 该用于高通量抗体快速检测的荧光素酶免疫吸附方法,具体包括以下步骤:

[0032] S1.构建目标抗原与荧光素酶融合表达质粒;

[0033] S2.融合表达质粒转染至动物细胞,培养24-48h;

[0034] S3.收集并裂解细胞,获得含荧光素酶-目标抗原融合蛋白的细胞裂解物;

[0035] S4.将Protein G/protein A蛋白作为捕捉抗原固定至固体支持物上,将待测样品加入一起孵育,待测样本中的抗体与所述捕捉抗原形成抗原-抗体复合物附着在固体支持物表面,洗去没有结合的样本;

[0036] S5.将荧光素酶-目标抗原裂解物加入到所述固体支持物中一起孵育,当存在与目标抗原特异性反应的抗体时,目标抗原与S4的抗原-抗体复合物结合,吸附在固体支持物表面,洗去没有结合的荧光素酶-目标抗原裂解物;

[0037] S6.将荧光素酶的底物加入所述固体支持物中;

[0038] S7.使用可检测荧光的仪器测定待测样品中荧光强度,以此反映待检测样本中特定抗体的存在及含量。

[0039] 其中,裂解细胞的裂解液成分为:50mM Tris,pH7.5,100mM 氯化钠,5mM氯化镁,1%的曲拉通X-100,50%甘油和蛋白酶抑制剂,每50mL裂解液中含2片蛋白酶抑制剂。

[0040] 其中,步骤S3裂解细胞具体是置于冰上裂解30min。

[0041] 本发明通过检测荧光素酶催化底物产生的荧光信号,具有检测敏感性高,定量范围广,且不需要抗宿主种属第二抗体作为检测抗体等优势。

[0042] 以下结合具体实例,对本发明的方法做进一步说明。以下实施例中用到的仪器、实验材料和试剂如下:

[0043] 实验仪器:

[0044] 酶标仪(Tecan,infinite M200PRO,帝肯(上海)贸易有限公司)。

[0045] 洗板机(Tecan,Hydro FLEX,帝肯(上海)贸易有限公司)。

[0046] 实验材料与试剂:

[0047] ELISA高吸附力白板(康宁公司,美国),

[0048] pNLF1-N载体(promega公司,美国),

[0049] Furimazine底物(Promega公司,美国),

[0050] 基因克隆所需的各类试剂(Takara公司,中国),

[0051] Lipofectamine 3000(Invitrogen公司,美国),

[0052] 常规生化试剂(鼎国,中国),

[0053] 质粒提取所需的试剂盒(天根,中国),

[0054] 细胞培养试剂和耗材(康宁,美国),

[0055] 细胞裂解液(50mM Tris,PH7.5,100mM NaCl,5mM MgCl₂, 1%Triton X-100,50%甘油,每50mL裂解液加入2片蛋白酶抑制剂),

[0056] 蛋白酶抑制剂(罗氏公司,美国),

[0057] Protein G (GenScript, 美国)。

[0058] 本发明中使用的荧光素酶Nanoluc载体及其底物属于Promega 公司已开发的现有产品技术,在此不再赘述。

[0059] 实施例2。

[0060] 采用本发明的用于高通量抗体快速检测的荧光素酶免疫吸附方法检测血清样本中HIV-1 P24抗体,以具体实施例进行详细说明。

[0061] 如图1所示,具体通过如下步骤进行:

[0062] S1:获得HIV-1 P24基因与荧光素酶Nanoluc的融合表达质粒。

[0063] 1A.PCR扩增全长HIV-1P24基因,扩增引物为:

[0064] 正义链:5'-CGGAATTCCCTATAGTGCAGAACATCCAG-3' (SEQ ID NO.1);酶切位点EcoR1;

[0065] 反义链:

[0066] 5'-GCTCTAGATTACAAAACCTCTTGCCTTATGGC-3' (SEQ ID No.2);酶切位点Xba1;

[0067] PCR反应体系为:

[0068]	反应组分	体积
	PrimeSTAR HS (Premix, 含聚合酶)	50uL
	正义链 (10uM)	2uL
	反义链 (10uM)	2uL
	ddH ₂ O	45uL
	模板	1uL

[0069] PCR扩增条件:

[0070] 首先在95℃下保温5min,然后进入步骤T2;

[0071] T2:在95℃下保温30s,再在52℃下保温30s,接着再在72℃下保温30s;

[0072] 将步骤T2重复进行30个循环,最后再在72℃下保温8min。

[0073] PCR反应结束后,采用天根凝胶回收试剂盒回收PCR产物。

[0074] 1B.PCR产物与荧光素酶载体分别采用Takara公司的限制性内切酶进行双酶切反应,双酶切反应的条件是在37℃下反应2h。PCR产物双酶切反应体系:

[0075]	反应组分	体积
	HIV-1 P24	14uL (2ug)

[0076]

EcoR I	2uL
XbaI	2uL
10×Buffer	4uL
ddH ₂ O	18uL

[0077] 荧光素酶载体pNLF1-N双酶切反应体系：

[0078]

反应组分	体积
pNLF1-N	2uL (2ug)
EcoR I	2uL
XbaI	2uL
10×Buffer	4uL
ddH ₂ O	30uL

[0079] 双酶切反应后采用天根DNA纯化试剂盒回收片段。

[0080] 1C. 将回收后的片段和载体进行连接反应, 连接所需的反应体系：

[0081]

反应组分	体积
DNA Ligation solution	7.5uL
pNLF1-N	5uL
HIV-1P24	2.5uL

[0082] 连接反应于16℃进行, 连接反应时间为: 12-16小时

[0083] 1D. 连接产物转化大肠杆菌DH5α, 具体步骤如下: 取5uL连接产物至100uL DH5α感受态中, 冰上放置30min; 然后在42℃下热激90s, 快速置于冰上2min; 加入800uL无抗性LB培养基, 在37℃、220rpm的条件下复苏45min; 取复苏培养液100uL, 涂布于含有100ug/mL氨苄抗性的LB固体培养板上; 于37℃条件下倒置培养16h。

[0084] 1E. 菌液PCR鉴定

[0085] 从过夜培养的平板上挑取单克隆于含有100ug/mL氨苄抗性的 LB液体培养基, 在220rpm条件下, 摇床振荡培养5h; 取菌液进行PCR鉴定。鉴定引物为:

[0086] 正义链: 5' -GGCTAGCGCTCACCATGG-3' (SEQ ID No.3);

[0087] 反义链: 5' -GCTCTAGATTACAAACTCTTGCCTTATGGC-3' (SEQ ID No.2);

[0088] 反应体系为:

[0089]

反应组分	体积
菌液	1uL
正义链 (10uM)	0.2uL
反义链 (10uM)	0.2uL
ddH ₂ O	3.6uL
ExTaq	5uL

[0090] 菌液PCR反应条件和PCR反应条件一致。

[0091] 1F. 双酶切鉴定

[0092] 菌液PCR鉴定的阳性菌,采用天根质粒提取试剂盒提取质粒,采用EcoR1和Xba1进行双酶切鉴定,酶切反应体系为:

[0093]

反应组分	体积
阳性质粒	5uL
EcoR 1	1uL
Xba1	1uL
10×Buffer	2uL
ddH ₂ O	11uL

[0094] 双酶切正确的质粒,进行测序。

[0095] 1G. 测序正确的菌株,采用天根大提试剂盒进行质粒抽提,抽取的质粒作为融合表达质粒。

[0096] S2. 融合表达质粒转染至宿主细胞中

[0097] 2A. 复苏Hela细胞,进行细胞常规培养与维持,以备细胞转染。

[0098] 2B. 转染前一天接种 2×10^6 细胞于100×20mm培养皿中,在37℃、CO₂培养箱中培养,转染当天,细胞汇合度为70-90%,转染试剂采用Lipofectamine 3000。240uL Opti-MEM (Gibco公司) 培养基中加入10uL Lipofectamine3000,充分混匀;使用Opti-MEM 培养基稀释质粒,制备240uL质粒(含5ug质粒)预混液,然后加入10uL P3000试剂,充分混匀;将稀释的上述Lipofectamine3000 试剂与稀释的质粒混匀置于室温孵育5min,将500uL质粒-脂质体复合物加至细胞中,在37℃、CO₂培养箱中培养。

[0099] S3. 获得荧光素酶-P24抗原裂解上清液

[0100] 3A. 培养24h或者48h后,去除培养基,用2mL PBS洗涤细胞,然后除尽PBS。

[0101] 3B. 向细胞中加入2mL胰酶消化细胞2-3min,加入6mL细胞培养基终止反应,并将细胞转移至15mL管中,3000rpm离心5min 收集获得细胞。

[0102] 3C. 用1mL预冷的PBS重悬细胞,并转移至1.5mL管里,在12000rpm条件下离心1min,除尽PBS。

[0103] 3D. 加入1mL预冷的细胞裂解液,于冰上裂解30min;

[0104] 3E. 在12000rpm、4℃条件下离心4min,收集获得上清;

[0105] 3F. 取5uL裂解上清,加入20uL PBS混合,并转移至ELISA 孔板(白板)中,与孔中25uL荧光素酶检测底物反应,测定light Unit (LU)。

- [0106] 3G.裂解液分装保存于-80℃,备用。
- [0107] S4.利用荧光素酶免疫吸附方法进行血清样本检测
- [0108] 4A.将Protein G蛋白用PBS (0.01M,pH7.5) 稀释至5ug/mL,加至ELISA板中,每孔加入50uL,4℃包被12h;
- [0109] 4B.用洗板机洗涤ELISA板三次,洗涤液为PBST (0.05%吐温),最后一次尽量拍干;
- [0110] 4C.每孔加入封闭液 (5%的脱脂奶粉) 300uL,置于37℃恒温箱内孵育1h;
- [0111] 4D.用洗板机洗涤ELISA板三次,洗涤液为PBST (0.05%Tween),最后一次尽量拍干;
- [0112] 4E.用2%脱脂奶粉 (0.05%Tween的PBST配置) 对HIV-1P24 单抗 (1mg/mL) 进行5倍系列稀释,并按每孔100uL加入ELISA 板中,设置不加血清的孔作为阴性对照,将ELISA板置于37℃恒温箱内孵育1h;
- [0113] 4F.用洗板机洗涤ELISA板五次,洗涤液为PBST (0.05%Tween),最后一次尽量拍干;
- [0114] 4G.用2%脱脂奶粉 (0.05%Tween的PBST配置) 稀释荧光素酶-P24抗原裂解上清液1000倍,每孔加入50uL,置于37℃恒温箱内孵育30min;
- [0115] 4H.用洗板机洗涤ELISA板五次,洗涤液为PBST (0.05%Tween),最后一次尽量拍干;
- [0116] 4I.每孔加入荧光素酶的底物Furimazine 50uL,使用按照说明书进行,采用酶标仪读取荧光值,读数需在2小时内完成。
- [0117] 4J.结果判定:将荧光值>2.1倍阴性对照平均值判定为阳性,荧光值≤2.1倍阴性对照平均值判定为阴性,结果如图3所示,阴性对照平均值为 1373 ± 60 (均值±标准差),所以荧光值>2883对应的稀释度为阳性,荧光值≤2883对应的稀释度为阴性。本实施例中,10⁸倍稀释的荧光值为5335,为阳性,10⁹倍稀释的荧光值为 2403,为阴性,所以本发明LISA方法检测灵敏性可达到10⁸倍稀释 (对应的HIV-1P24单抗的浓度为25pg/mL)。
- [0118] 实施例3。
- [0119] 作为对比例,实施例3提供传统ELISA方法检测血清样本中 HIV-1P24抗体,如图2所示,具体步骤如下:
- [0120] (1) 重组表达的P24抗原用PBS (0.01M,pH7.4) 稀释至 5μg/mL,加至ELISA板中,每孔加入50μL,4℃包被12h;
- [0121] (2) 用洗板机洗涤ELISA板五次,洗涤液为PBST (0.05%吐温),最后一次尽量拍干;
- [0122] (3) 每孔加入封闭液 (5%的脱脂奶粉) 300μL,置于37℃恒温箱内孵育1h;
- [0123] (4) 用洗板机洗涤ELISA板五次,洗涤液为PBST (0.05%吐温),最后一次尽量拍干;
- [0124] (5) 用2%脱脂奶粉 (0.05%Tween的PBST配置) 对HIV-1 P24单抗 (1mg/mL) 进行5倍系列稀释,并按每孔100uL加入 ELISA板中,设置不加血清的孔作为阴性对照,将ELISA板置于 37℃恒温箱内孵育1h;
- [0125] (6) 用洗板机洗涤ELISA板五次,洗涤液为PBST (0.05%吐温),最后一次尽量拍干;
- [0126] (7) 将辣根过氧化物酶标记的抗人IgG抗体用2%脱脂奶 (0.05%PBST稀释) 稀释5000倍,每孔加入50μL,置于37℃恒温箱内孵育30min;
- [0127] (8) 用洗板机洗涤ELISA板五次,洗涤液为PBST (0.05%吐温),最后一次尽量拍干;

[0128] (9) 每孔加入辣根过氧化物酶的底物TMB 50 μ L, 室温显色 15min, 采用酶标仪读取光密度值。

[0129] (10) 结果判定: 将OD值 >2.1 倍阴性对照平均值判定为阳性, OD值 ≤ 2.1 倍阴性对照平均值判定为阴性, 结果如图4所示, 阴性对照平均值为 0.07 ± 0.01 (均值 $\pm$ 标准差), 所以OD值 >0.15 对应的稀释度为阳性, OD值 ≤ 0.15 对应的稀释度为阴性。本实施例中, 10^4 倍稀释的OD值0.36, 为阳性, 10^5 倍稀释的OD值为 0.13, 为阴性, 所以传统ELISA方法检测灵敏性可达到 10^4 倍稀释 (对应的HIV-1P24单抗的浓度为400ng/mL)。

[0130] 图3、图4显示了采用本发明的方法及传统的ELISA方法检测血清样本中HIV-1P24抗体时灵敏度比较结果, 从两幅图中可以看出, 发明较传统的酶联免疫吸附方法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测定量范围更广, 灵敏度更高, 检测周期更短。

[0131] 实施例4。

[0132] 采用本发明的方法检测马血清样本中针对肝炎NS3的抗体。从马血清中扩增肝炎NS3基因, 采取巢式PCR扩增, 引物为:

[0133] 外引物正义链: 5'-TTTGTCTGCCTCCGTTAC-3' (SEQ 1D No.4)

[0134] 外引物反义链: 5'-TCGGATGGCTTTGGAGTA-3' (SEQ 1D No.5)

[0135] 内引物正义链: 5'-CGGAATTCATACACTTTGCAGACATGCG-3' (SEQ 1D NO.6); 酶切位点EcoRI;

[0136] 内引物反义链:

[0137] 5'-GCTCTAGATTAGGTGTTACAATCGGTCCTG-3' (SEQ 1D NO.7); 酶切位点XbaI;

[0138] 第一轮PCR扩增反应体系:

[0139]

反应组分	体积
PrimeSTAR HS (Premix, 含聚合酶)	10 μ L
外引物正义链 (10 μ M)	1 μ L
外引物反义链 (10 μ M)	1 μ L
ddH ₂ O	6 μ L
模板	2 μ L

[0140] PCR扩增条件:

[0141] 首先在95 $^{\circ}$ C下保温5min, 然后进入步骤T2;

[0142] T2: 在98 $^{\circ}$ C下保温10s, 再在55 $^{\circ}$ C下保温5s, 接着再在72 $^{\circ}$ C下保温50s;

[0143] 将步骤T2重复进行30个循环, 最后再在72 $^{\circ}$ C下保温8min。第二轮PCR扩增反应体系:

[0144]

反应组分	体积
PrimeSTAR HS (Premix, 含聚合酶)	10 μ L
外引物正义链 (10 μ M)	1 μ L
外引物反义链 (10 μ M)	1 μ L
ddH ₂ O	6 μ L
第一轮产物	2 μ L

[0145] PCR反应条件与第一轮相同,扩增5管,进行PCR产物回收。获得目的基因后,其他操作步骤与实施例1相同。

[0146] 图5显示了用本发明的方法检测马血清中肝炎病毒NS3抗体的结果示意图。结果表明采用本发明的方法能检测到马血清样本中针对肝炎病毒NS3的抗体。

[0147] 本发明使用G蛋白 (Protein G) 或者A蛋白 (protein A) 直接包被酶连免疫反应板,捕获待测样本的总抗体。采用荧光素酶与特定抗原融合表达质粒转染哺乳动物细胞后获得的细胞裂解物,作为检测抗原。用于检测的融合抗原无需纯化,可以快速获得。实验发现,本发明的方法,可以检测25pg/mL的抗体,定量范围为25pg/mL-10⁷pg/mL,具有检测敏感性高,定量范围广,且不需要抗宿主种属第二抗体作为检测抗体等优势。

[0148] 本发明较传统的酶联免疫吸附方法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测灵敏度更高,检测周期更短,可以广泛用于各种生物包括人、动物等样本特异性抗体的检测,使用范围更广。

[0149] 最后应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

SEQUENCE LISTING

<110> 南方医科大学

<120> 用于高通量抗体快速检测的荧光素酶免疫吸附方法

<130> GZZRH0504-17-1-172

<140> 2017102972942

<141> 2017-04-28

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

[0001]

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

cggaattccc tatagtgcag aacatccag

29

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

	gctctagatt acaaaactct tgccttatgg c	31
	<210> 3	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 3	
	ggctagegct caccatgg	18
	<210> 4	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 4	
	ttgtttctgc ctccgttac	19
	<210> 5	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 5	
	tcggatggct ttggagta	18

[0002]

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

cggaattcat acacttgca gacatgcg

28

[0003]

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

gctctagatt aggtgttaca atcggtcact g

31

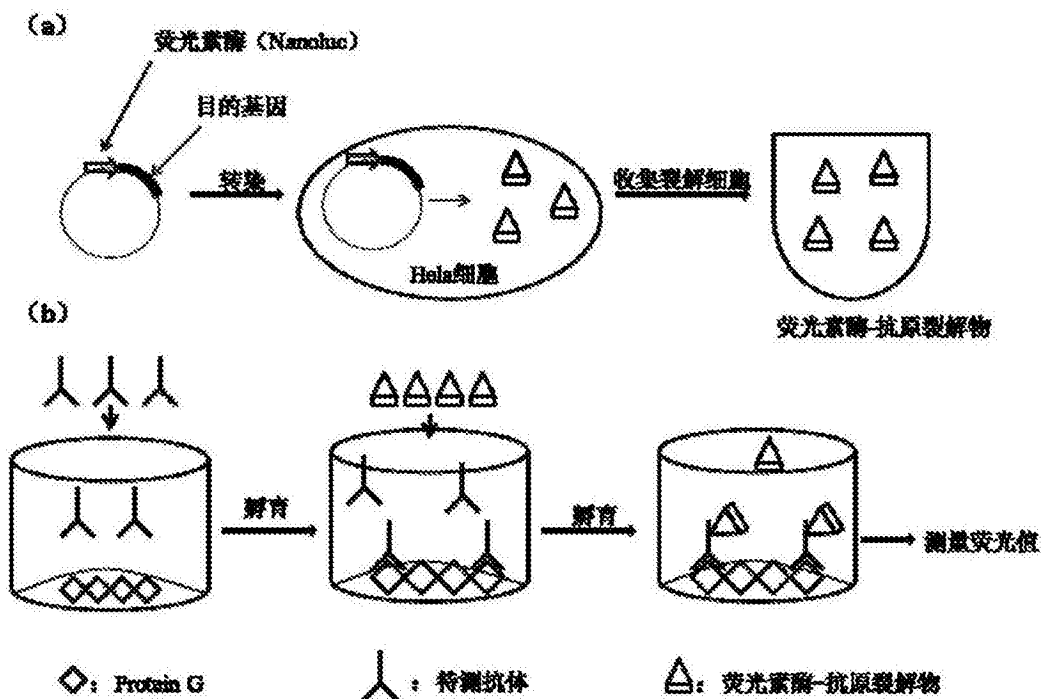


图1

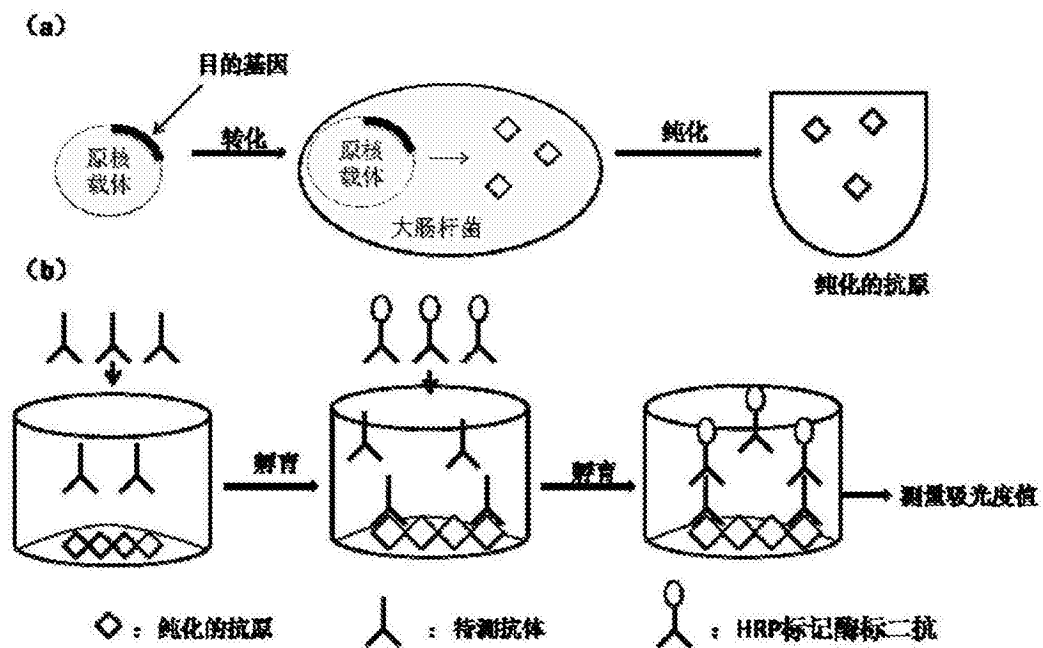


图2

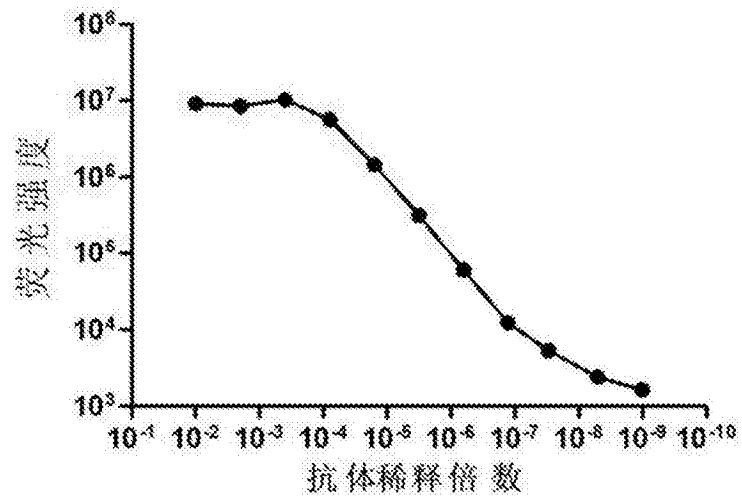


图3

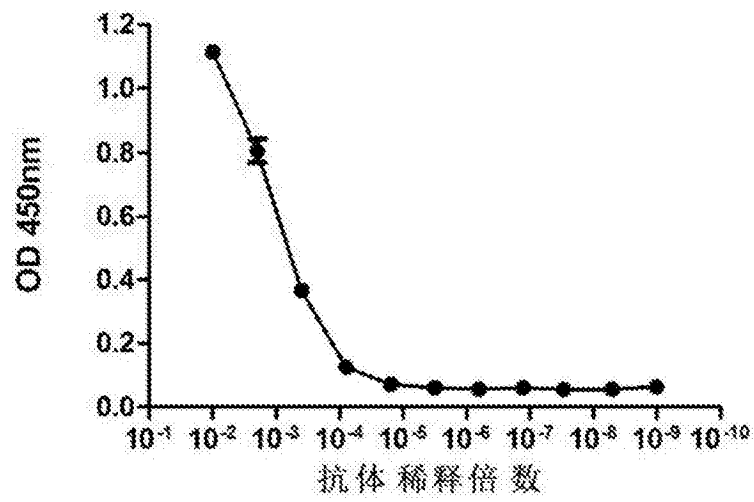


图4

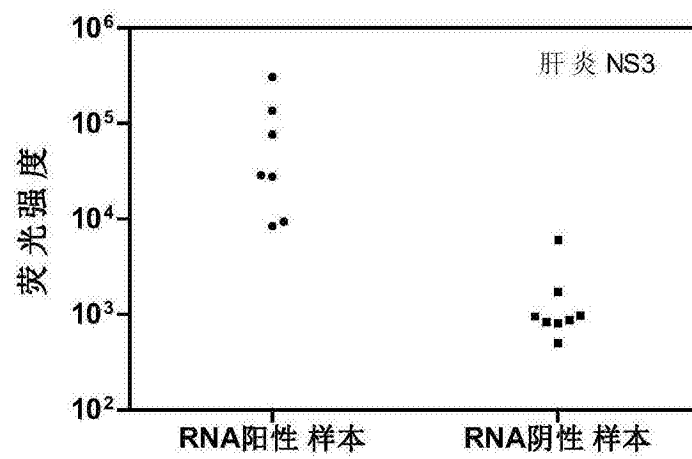


图5

专利名称(译)	用于高通量抗体快速检测的荧光素酶免疫吸附方法		
公开(公告)号	CN107884371A	公开(公告)日	2018-04-06
申请号	CN201710297294.2	申请日	2017-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
[标]发明人	唐时幸 王海鹰		
发明人	唐时幸 王海鹰		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/576 G01N33/554 G01N33/535 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种用于高通量抗体快速检测的荧光素酶免疫吸附方法，使用G蛋白(Protein G)或者A蛋白(Protein A)直接包被酶连免疫反应板，捕获待测样本的总抗体。采用荧光素酶与特定抗原融合表达质粒转染哺乳动物细胞后获得的细胞裂解物，作为检测抗原。用于检测的融合抗原无需纯化，可以快速获得。本发明通过检测荧光素酶催化底物产生的荧光信号，可以检测25pg/mL的抗体，定量范围可以从25pg/mL-107pg/mL，具有检测敏感性高，定量范围广，且不需要抗宿主种属第二抗体作为检测抗体等优势。检测周期更短，可以广泛用于人、各种动物样本特异性抗体的检测，使用范围更广。

