



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110208539 A

(43)申请公布日 2019.09.06

(21)申请号 201910196297.6

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2019.03.15

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

(83)生物保藏信息

CGMCC No.17294 2019.02.18

CGMCC No.17295 2019.02.18

(71)申请人 中国农业科学院蜜蜂研究所

地址 100093 北京市海淀区香山北沟1号

(72)发明人 胡菡 魏俏红 陈思 冯毛

孟丽峰 韩宾 房宇 马川

李建科

(74)专利代理机构 北京思元知识产权代理事务

所(普通合伙) 11598

代理人 余光军 杨惠

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书1页 说明书26页

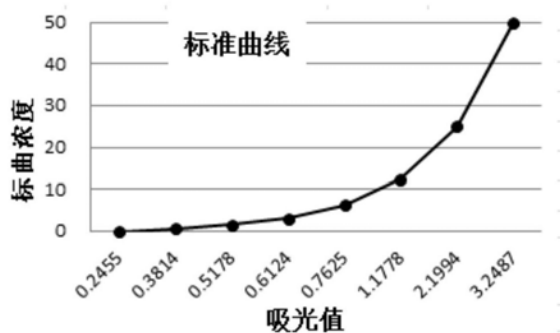
序列表2页 附图7页

(54)发明名称

抗MRJP4的配对单克隆抗体、检测MRJP4的ELISA试剂盒和胶体金免疫试纸

(57)摘要

本发明公开了抗MRJP4的配对单克隆抗体、检测MRJP4的ELISA试剂盒及胶体金免疫试纸。本发明以MRJP4重组蛋白为抗原采用细胞融合得到阳性细胞株,通过与其它蜂王浆主蛋白交叉反应检测获得MRJP4特异性融合细胞株,根据抗原表位配对检测进行配对初筛,根据配对结果、抗体表位检测和标准曲线绘制及样本测定等,最终确定了有较好线性关系且灵敏度高的抗MRJP4的配对单克隆抗体6H9和8C9。本发明分别构建了检测MRJP4的ELISA检测试剂盒以及胶体金免疫检测试纸。本发明试剂盒特异性强,检测范围为1.563-100ng/mL,检测灵敏度为3.758ng/mL,批内批间CV值小于10%。



1. 一株稳定分泌抗MRJP4单克隆抗体的杂交瘤细胞株6H9,其特征在于,其微生物保藏编号为:CGMCC No.17294。

2. 由权利要求1所述杂交瘤细胞株6H9分泌的抗MRJP4单克隆抗体。

3. 一株稳定分泌抗MRJP4单克隆抗体的杂交瘤细胞株8C9,其特征在于,其微生物保藏编号为:CGMCC No.17295。

4. 由权利要求3所述杂交瘤细胞株8C9分泌的抗MRJP4单克隆抗体。

5. 权利要求2或4所述的抗MRJP4单克隆抗体在定性检测样品中是否含有MRJP4或定量检测样品中MRJP4含量的用途。

6. 一种检测MRJP4含量的酶联免疫试剂盒,包括:抗MRJP4的一抗,生物素标记的抗MRJP4的二抗,标准品,辣根过氧化物酶标记亲和素,生物素标记抗体稀释液,辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液,样本稀释液,浓洗涤液,底物溶液和终止液;其特征在于:所述的一抗是权利要求2所述的抗MRJP4单克隆抗体,所述的二抗是权利要求4所述的抗MRJP4单克隆抗体;或者所述的一抗是权利要求4所述的抗MRJP4单克隆抗体,所述的二抗是权利要求2所述的抗MRJP4单克隆抗体。

7. 一种检测MRJP4的胶体金免疫检测试纸,包括:金标垫,含有检测线和质控线的NC膜,样本垫,吸水垫和检测底板;其特征在于,所述的金标垫含有权利要求2所述的单克隆抗体与胶体金的结合物;所述的NC膜含有一条检测线和一条质控线;所述的检测线由权利要求4所述的单克隆抗体组成,所述的质控线由羊抗鼠IgG抗体组成;或者,所述的金标垫含有权利要求4所述的单克隆抗体与胶体金的结合物;所述的NC膜含有一条检测线和一条质控线;所述的检测线由权利要求2所述的单克隆抗体组成,所述的质控线由羊抗鼠IgG抗体组成。

8. 按照权利要求7所述的胶体金免疫检测试纸,其特征在于,所述的金标垫的制备方法,包括:

(1) 将胶体金溶液与权利要求2或权利要求4所述的单克隆抗体结合得到胶体金-抗体结合物原液;

(2) 用工作液将胶体金-抗体结合物溶液稀释后均匀加在玻璃纤维膜上,烤干,即得金标垫。

9. 按照权利要求8所述的胶体金免疫检测试纸,其特征在于,步骤(1)中将权利要求2或权利要求4所述的单克隆抗体与胶体金溶液在pH值为7.4时进行结合;步骤(2)中用工作液将胶体金-抗体结合物溶液按照1:4的体积比进行稀释后均匀加在玻璃纤维膜上。

10. 按照权利要求7所述的胶体金免疫检测试纸,其特征在于,权利要求2或权利要求4所述的单克隆抗体在检测线上的工作浓度为2mg/mL,羊抗鼠IgG抗体在质控线上的工作浓度为1mg/mL。

抗MRJP4的配对单克隆抗体、检测MRJP4的ELISA试剂盒和胶体金免疫试纸

技术领域

[0001] 本发明涉及蜂王浆主蛋白4 (MRJP4) 单克隆抗体的制备及其应用,尤其涉及配对的MRJP4 单克隆抗体的制备,本发明进一步涉及用所制备的配对的MRJP4单克隆抗体构建的检测MRJP4 的ELISA检测试剂盒和胶体金免疫检测试纸及其在定量或定性检测MRJP4中的应用,属于 MRJP4的定性和定量检测领域。

背景技术

[0002] 蜂王浆是一种具有滋补保健和延年益寿功能的天然功能性蜂产品。蜂王浆成分复杂,营养丰富,其中蛋白质含量为12.0%~15.0%。由于蜂王浆不易保存,极易变质。因而,蜂王浆的品质和其新鲜度紧密相关。目前,国际上缺少一个公认的,可以广泛推广、能如实反映蜂王浆新鲜度的方法,着也是现行蜂王浆质量标准的一个缺陷。

[0003] 中国是世界蜂王浆的第一生产国和第一出口国。因此,探求和建立蜂王浆新鲜度评价方法势在必行。研究表明,蜂王浆主蛋白与蜂王浆的新鲜度呈正相关,即蜂王浆越新鲜其王浆主蛋白含量越高。MRJP4对温度非常敏感,在冷藏或室温包藏条件下,随时间的延长其浓度逐渐降低。

[0004] 利用MRJP4抗原进行细胞融合方法筛选出特异性好、灵敏度高的配对的抗体对,进一步利用该配对的单克隆抗体构建出ELISA试剂盒和胶体金免疫检测试纸。ELISA检测试剂盒能实现对MRJP4绝对定量,胶体金免疫检测试纸则能在数分钟内对MRJP4蛋白实现现场快速检测,这将为蜂王浆新鲜度检测提供可靠和可实际应用的检测方法。

发明内容

[0005] 本发明的目的之一是提供针对MRJP4蛋白的特异性好、灵敏度高的MRJP4单克隆抗体对;

[0006] 本发明的目的之二是将所制备的一对MRJP4单克隆抗体应用于MRJP4的定性或定量检测;

[0007] 本发明的目的之三提供一种定量检测检测样品中MRJP4含量的ELISA试剂盒;

[0008] 本发明的目的之四提供一种定性检测样品中是否含有MRJP4的胶体金免疫检测试纸。

[0009] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:

[0010] 本发明将MRJP4的全序列经过跨膜区分析、信号肽分析、疏水性分析、无序序列分析、抗原性分析、同源性分析和结构域分析,最终选定SEQ ID No.1所述氨基酸序列为抗原序列在大肠杆菌中进行表达制备抗原。本发明进一步将所制备的抗原纯化后免疫Ba1b/c小鼠,采用细胞融合技术制备融合细胞;进行半固体和液体融合共12板,一共获得阳性细胞株64株;挑选其中的 20株进行一亚,一亚检测后筛选出14株二亚,再经过三轮的亚克隆;经过与其它蜂王浆主蛋白的重组蛋白和天然蛋白交叉反应检测,去除有交叉反应的细胞株,最

终获得9株MRJP4特异性融合细胞株,挑选了其中亲和力最高的5株进行后续抗体表位检测和配对实验,根据抗原表位配对检测进行下一步的配对初筛,最终根据抗体表位检测和配对、标准曲线绘制及样本测定结果发现,6H92B8(以下简称为6H9)和8C93B10(以下简称为8C9)这对配对的抗体有较好的线性关系且灵敏度高,故最终确定6H9和8C9用于构建检测MRJP4的ELISA试剂盒以及胶体金免疫检测试纸。

[0011] 本发明将分泌6H9和8C9的杂交瘤细胞系分别提交提交专利认可的机构进行保藏;其中,分泌单克隆抗体6H9的杂交瘤细胞株的微生物保藏编号为:CGMCC No.17294;分类命名为:小鼠杂交瘤细胞。保藏单位:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心;保藏时间是2019年2月18日;保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0012] 分泌单克隆抗体8C9的杂交瘤细胞株的微生物保藏编号为:CGMCC No.17295;分类命名为:小鼠杂交瘤细胞。保藏单位:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心;保藏时间是2019年2月18日;保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0013] 本发明进一步提供了一种采用ELISA法定量检测MRJP4的酶联免疫试剂盒,包括:抗MRJP4的一抗,生物素标记的抗MRJP4的二抗,标准品,辣根过氧化物酶标记亲和素,生物素标记抗体稀释液,辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液,样本稀释液,浓洗涤液,底物溶液和终止液;其中,所述的一抗是抗MRJP4的单克隆抗体6H9,所述的二抗是抗MRJP4的单克隆抗体8C9;或者,所述的一抗是抗MRJP4的单克隆抗体8C9,所述的二抗是抗MRJP4的单克隆抗体6H9。

[0014] 本发明试剂盒检测MRJP4含量的工作原理或使用如下:用纯化的抗体包被微孔板制成固相载体,向包被抗MRJP4抗体的微孔中依次加入标本或标准品、生物素化的抗MRJP4抗体、HRP标记的亲和素,经过彻底洗涤后用底物TMB显色。TMB在过氧化物酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样本中的MRJP4呈正相关。用酶标仪在450nm波长下测定吸光度(OD值),计算样本浓度。

[0015] 应用本发明酶联免疫试剂盒采用双抗体夹心ELISA法定量测定样本中MRJP4含量的结果表明,其检测范围为1.563ng/mL-100ng/mL,检测灵敏度为3.758ng/mL。

[0016] 本发明进一步提供了一种快速定性检测MRJP4的胶体金免疫检测试纸,包括:金标垫,含有检测线和质控线的NC膜,样本垫,吸水垫和检测底板;其中,所述的金标垫含有单克隆抗体6H9或8C9与胶体金的结合物;所述的NC膜含有一条检测线和一条质控线;所述的检测线由单克隆抗体6H9或8C9组成,所述的质控线由羊抗鼠IgG抗体组成。

[0017] 所述的金标垫以及含有检测线和质控线的NC膜可以按照胶体金免疫试剂盒的常规制备方法制备得到。

[0018] 作为参考,本发明提供一种金标垫的制备方法,包括:

[0019] (1) 将胶体金溶液与单克隆抗体6H9或8C9结合得到胶体金-抗体结合物原液;

[0020] (2) 将胶体金-抗体结合物溶液稀释后均匀加在玻璃纤维膜上,烤干,即得金标垫。

[0021] 本发明进一步对金标垫以及含有检测线和质控线的NC膜的制备方法中的各项参数进行了优化,通过优化试验发现,采用下述制备方法能够有效的提升检测效果:

[0022] 本发明通过胶体金梯度法试验发现,单克隆抗体6H9或8C9与胶体金溶液在pH值为7.4时进行结合,具有最优的结合效果。

[0023] 本发明通过蛋白梯度法试验发现,单克隆抗体6H9或8C9稳定1mL胶体金所需的最小抗体量为10 μ g/mL。

[0024] 经试验测试结果显示,当胶体金-抗体结合物原液的工作浓度为1:4时,制得的金标垫检测效果最佳。

[0025] 其中,在制备含有检测线(T线)和质控线(C线)的NC膜本发明进一步对NC膜上T线及C线的包被抗体设置几个浓度梯度进行试验,结果表明,检测显色效果最优的一组浓度为:单克隆抗体6H9或8C9在T线上的最佳工作浓度为2mg/mL,羊抗鼠IgG抗体(C线上)的最佳工作浓度为1mg/mL。

[0026] 本发明进一步提供了一种应用本发明胶体金免疫检测试纸定性检测样品中是否含有MRJP4的方法,包括:

[0027] (1) 将样品加到试剂盒样本垫的加样孔中;

[0028] (2) 若样本为阳性,加样后在T区出现一条紫红色条带;若样本为阴性,则T区不会出现紫红色条带;无论样本中是否有MRJP4蛋白存在,C区都会出现一条紫红色条带。

[0029] 本发明提供的检测MRJP4的胶体金免疫检测试纸具有方便、快速、灵敏等特点,适用于现场大批量样本检测。应用本发明酶联免疫检测试剂盒定量测定样本中MRJP4含量的结果表明,本发明酶联免疫检测试剂盒的检测范围为1.563ng/mL-100ng/mL,检测灵敏度为3.758ng/mL;特异性实验结果表明,本发明酶联免疫检测试剂盒以及胶体金免疫检测试纸能够特异性检测MRJP4,不与其它相关蛋白(MRJP1、MRJP2、MRJP3、以及MRJP5)产生交叉反应。

附图说明

[0030] 图1稳定分泌阳性抗体且与MRJP1、MRJP2、MRJP3以及MRJP5无交叉反应的9株细胞株亚型的Western Blotting检测结果。

[0031] 图2抗体6H9和抗体8C9腹水纯化后的SDS检测结果;Marker浓度:0.1mg/mL,上样5 μ L; Marker大小:116/66.2/45/35/25/18.5/14.5kDa;泳道1:抗体6H9上样5 μ L;泳道2:抗体8C9上样5 μ L。

[0032] 图3抗体6H9的效价检测结果。

[0033] 图4抗体8C9的效价检测结果。

[0034] 图5抗体WB验证蜂王浆样本;所有泳道:蜂王浆样本15 μ l/6 \times loading buffer;泳道1:6E2 2C2抗体1/1000;泳道2:7G8 3B8抗体1/1000;泳道3:6H9 2B8抗体1/1000;泳道4:4H5 1D5 抗体1/1000;泳道5:8C9 3B10抗体1/1000;二抗:IgG(H+L)-HRP(1:5000);Marker:120/85/50/35/25/20(kDa)。

[0035] 图6 8C9细胞株抗体特异性检测结果。

[0036] 图7 6H9细胞株抗体特异性检测结果。

[0037] 图8 不同检测条件的初步测样的标准曲线。

[0038] 图9不同检测条件的初步测样的标准曲线。

[0039] 图10冻干标准品再次测定的标准曲线。

[0040] 图11本发明制备的检测MRJP4 ELISA试剂盒的测样数据结果。

[0041] 图12本发明制备的MRJP4胶体金检测试纸检测结果判定标准。

[0042] 图13本发明制备的MRJP4胶体金试纸测样结果展示。

[0043] 图14本发明制备的检测MRJP4 ELISA试剂盒批间批内差测试结果。

具体实施方式

[0044] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但是应理解所述实施例仅是范例性的,不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改或替换均落入本发明的保护范围。

[0045] 实施例1 MRJP4单克隆抗体制备及抗体配对

[0046] 一、MRJP 4基因的序列分析以及抗原序列的选择

[0047] MRJP 4基因编码464个氨基酸,无跨膜区,1-21aa为可能信号肽序列,整体蛋白亲水性较好,且序列区别于MRJP_s家族其他同源性较高蛋白。

[0048] 经过跨膜区分析、信号肽分析、疏水性分析、无序序列分析、抗原性分析、同源性分析和结构域分析,最终选定SEQ ID No.1所述氨基酸序列为抗原序列在大肠杆菌中进行表达制备抗原。

[0049] 二、抗原的制备和纯化

[0050] 1. 小量表达

[0051] 1.1将测序鉴定正确的重组质粒转化表达宿主。

[0052] 1.2挑取含重组质粒的单菌落至3mL LB(含抗生素)中37℃过夜培养。

[0053] 1.3取30μL过夜培养菌液加入到含3mL LB培养基中,37℃震荡培养至OD600约0.6;剩余的过夜培养液添加甘油到20%置于-80℃,作为工作种子备用。

[0054] 1.4取部分液体作为未诱导的对照组,余下的加入IPTG诱导剂至终浓度0.5mM作为实验组,两组继续37℃震荡培养3h。

[0055] 1.5取菌体1mL,离心12000g×30s收获沉淀,用100μL 1%SDS重悬,混匀,100℃10min。12000g离心10min,取上清进行SDS-PAGE检测分析。

[0056] 2. 蛋白表达与破菌检测

[0057] 2.1取保存于-80℃的菌种20μL转接入20mL液体LB培养基(含相应抗生素)。

[0058] 2.2取2mL过夜培养菌液加入到2000mL LB培养基中,37℃震荡培养至OD600约0.6,降低温度到30℃。

[0059] 2.3加入IPTG诱导剂至终浓度0.5mM作为实验组,30℃继续震荡培养3h。

[0060] 2.4收集发酵液,6000g离心10min收集菌体;将菌体悬浮于40mL预冷的NTA-0缓冲液中。

[0061] 2.5冰浴超声波破碎细菌,控制功率为300W,超声4s,暂停4s,超声90次。

[0062] 2.6 20000g 4℃离心30min,收集上清以及沉淀。

[0063] 2.7取少量样品进行SDS-PAGE检测;剩余上清及沉淀至于0-7℃备用。

[0064] 抗原MRJP4在大肠杆菌中重组表达后,放大纯化的SDS结果。蛋白浓度为2mg/mL,分子量大小为38Kd,纯度为80%。

[0065] 3. 蛋白纯化

[0066] 3.1将Ni-NTA树脂装入合适的层析柱,用10倍柱床体积的NTA-0Buffer冲洗。

- [0067] 3.2将样品加到层析柱中,流速控制在0.5mL/min左右,收集穿透部分。
- [0068] 3.3层析用10倍柱床体积的NTA-0Buffer冲洗,流速控制在1mL/min小时左右。
- [0069] 3.4分别用10倍柱床体积的NTA-20,NTA-60,NTA-200,NTA-500Buffer洗脱(注:NTA-20、NTA-60、NTA-200、NTA-500溶液分别为NTA-0溶液含咪唑20mmol/L、60mmol/L、200mmol/L、500mmol/L),流速控制在1mL/min左右,收集各洗脱峰。
- [0070] 3.5 SDS-PAGE检测各组分。
- [0071] 3.6纯度达到要求的组分,至于透析带中,4℃以1×PBS透析(换液2次)。
- [0072] 3.7 4℃超滤浓缩透析产物。
- [0073] 三、抗体的制备
- [0074] 1.小鼠免疫及血清效价评价
- [0075] 1.1免疫Balb/c小鼠,8周左右成年雌性,抗原与等体积完全佐剂(首免)和不完全佐剂(加强免疫)混合并进行乳化,充分混合至油包水状态进行皮下多点免疫,2-3次加强免疫,每次免疫间隔周期2周之后进行效价检测,高于>1:50000后1周内进行腹腔冲击,直接将免疫剂量的抗原溶于PBS中,具体免疫程序见表1。

[0076] 表1小鼠免疫程序

[0077]

免疫次数	免疫原制备	免疫途径	免疫周期	免疫剂量(小鼠)
一免	抗原+完全弗佐+PBS	皮下(或皮内)	2-3周	50-100 μg/只
二免	抗原+不完全弗佐+PBS	皮下(或皮内)	2周	50-80 μg/只
三免	抗原+不完全弗佐+PBS	皮下(或皮内)	2周	50-80 μg/只
效价以及滴度检测	若效价和滴度较低,继续四免		1周	
四免	抗原+不完全弗佐+PBS	皮下(或皮内)	1周	50-80 μg/只
效价以及滴度检测	四免7天后检测,若效价和滴度满足,效价>1:12800,且有滴度,可安排融合			
冲击加强	抗原+PBS	腹腔	融合前3天	50-100 μg/只

- [0078] 1.2免疫后效价检测方法:间接法检测血清效价,具体方法如下:
- [0079] 1.2.1包被:将抗原按1μg/mL浓度包被96孔板每孔50μL,37℃2h或4℃过夜;
- [0080] 1.2.2封闭:2%BSA或者5%的脱脂牛奶封闭液200μL/孔,37℃1h或4℃过夜,TBST洗4遍;
- [0081] 1.2.3一抗:加入抗血清,用样稀将血清按1:1000,1:2000,1:4000,1:8000,1:16000,1:32000,1:64000,1:128000依次进行倍比稀释;
- [0082] 1.2.4 37℃温育1h后洗板4次,加二抗,用酶稀按1:10000稀释Jackson二抗,100μL/孔,37℃温育1h;
- [0083] 1.2.5洗板4次后显色:加底物溶液100μL/孔,37℃恒温箱放置5~10min;
- [0084] 1.2.6终止反应、比色:加30μL/孔终止液,颜色变黄;用酶标仪测定450nm的吸光值。

- [0085] 1.3.血清效价结果
 [0086] 效价检测结果见表2。
 [0087] 表2血清效价检测结果
 [0088]

E-MRJP4蛋白三免抗血清效价 2015.6.22									
稀释度	1-左	1-右	1-中	1-无	2-左	2-右	2-中	2-无	空白血
1/1000	2.7311	2.8809	2.8325	2.856	2.981	2.856	2.8325	3.2662	0.3045
1/2000	2.6592	2.953	2.758	2.6977	2.886	2.7488	2.7966	3.0321	0.1088
1/4000	2.6467	2.8027	2.7082	2.9085	2.8027	2.7912	2.9085	3.2918	0.0952
1/8000	2.7585	2.8302	2.9589	2.8531	2.7681	2.8531	2.9741	3.1203	0.095
1/16000	2.7819	2.837	2.837	2.7239	2.837	2.8867	2.837	3.2912	0.0399
1/32000	2.438	2.7804	2.6835	2.7592	2.6582	2.6749	2.7293	3.0023	0.0242
1/64000	2.0077	2.4377	2.4713	2.1855	2.3734	2.3577	2.3655	2.6948	0.0076
1/128000	1.2849	2.0094	2.1806	1.5955	1.5993	1.9036	2.0281	2.4623	0.012

E-MRJP4蛋白四免抗血清效价 2015.7.6									
稀释度	1-左	1-右	1-中	1-无	2-左	2-右	2-中	2-无	空白血
1/1000	2.835	2.8443	2.8943	2.835	3.1453	2.916	3.0599	2.8366	0.254
1/2000	2.6964	2.7657	2.8584	2.9502	2.9376	2.9502	2.8482	2.9124	0.883
1/4000	2.7976	2.8283	2.7878	2.8178	3.0261	2.8613	3.0431	2.9992	0.3678
1/8000	2.7034	2.8075	2.7034	2.8655	2.8553	2.876	2.8453	3.1467	0.0801
1/16000	2.5778	2.6528	2.7674	2.8014	2.8014	2.8582	2.8788	3.0167	0.0963
1/32000	2.5072	2.6615	2.6189	2.5749	2.7381	2.7381	2.7232	2.9619	0.0437
1/64000	2.3246	2.5952	2.5054	2.4474	2.5249	2.6319	2.5506	2.5236	0.0306
1/128000	1.8411	2.4785	2.2799	1.9458	2.2455	2.3142	2.2455	2.0905	0.04

[0089] 根据效价检测结果可见,免疫后小鼠血清效价好,灵敏度较高,完全满足后续实验要求。

[0090] 2.细胞融合

[0091] 末次冲击3天后,摘除眼球处死,并收集阳性对照血,取出脾脏,制备成单细胞悬液,然后取出处于对数期的SP2/0细胞处理后,与脾细胞以一定比例混合(1:5-1:10),50% PEG1450作用1min,以基础培养基DMEM稀释终止,低速离心后,再用含20%胎牛血清的HAT培养基轻轻悬浮并混匀,按照 2×10^7 /板铺至预先准备好的饲养层细胞板里,置于5%CO₂,37℃下培养。具体步骤如下:

[0092] 2.1脾细胞:小鼠解剖取出免疫好的脾脏,并分离脾脏中的淋巴细胞;

[0093] 2.1.1在超净工作台中准备一个1.5mL离心管,加入1mL无血清培养基,两个3.5cm培养皿,加入2mL无血清培养基,两根15mL离心管,其中一根加入10mL无血清培养基,手术器械(高压湿热灭菌),绢网,移液器(1mL),枪头。

[0094] 2.1.2.取已经免疫的BALB/c小鼠,摘除眼球采血,并分离血清作为抗体检测时的阳性对照血清。同时通过断颈处死小鼠,浸泡于75%酒精中5min,放蜡盘上固定后剪开脾脏上皮肤,用镊子取出脾脏,放在1.5mL离心管中。

[0095] 2.1.3将脾脏转移到超净台里的其中一个3.5cm培养皿中,摘除脾脏上面的脂肪和结缔组织,洗一遍,铺开一张绢网放在培养皿盖子上,将脾脏轻轻挤破,放在绢网中间位置。将绢网两次对折,用移液器吸取无血清培养基轻轻吹散,用研磨棒研磨,使脾脏内淋巴细胞透过绢网制成单细胞悬液,收集单细胞悬液于15mL离心管中,1000rpm离心5min。

[0096] 2.2 SP2/0准备:取瘤分离制备单细胞悬液后,1000rpm,离心5min后弃掉上清,10-20mL DMEM(根据瘤子大小而定)重悬并混匀,利用淋巴细胞分离液进行分离,其与DMEM体积比为1:1,缓慢滴加分离液于重悬的细胞中,然后2500rpm,离心15min,后小心放置到超净工作台上,用移液枪将中间一层乳白色的晕圈转移至新的离心管中(事先准备好30mL DMEM于

管中),1000rpm,离心5min,最后弃掉上清,收集细胞于10cm培养皿中,用10%的胎牛血清调整状态并扩大培养,通常一只小鼠的瘤子当天可制备3-5皿,第二天离心扩大到30皿,然后冻存30-35管。

[0097] 准备融合时,按下列步骤进行:

[0098] (a).第一天复苏;

[0099] (b).第二天根据融合的数量传代,5皿/1个融合;

[0100] (c).约两天后观察细胞状态,是否达到对数期,然后收集细胞准备融合;

[0101] 2.3饲养层细胞准备:将健康的Balb/c小鼠在无菌条件下取出其脾脏,并用含20%胎牛血清的HAT培养基制成单个脾细胞悬液,然后根据铺板数量,预先将其铺入到96孔板中。

[0102] 2.4终止液:基础培养基DMEM 20mL预先放入37℃水浴锅中孵育。

[0103] 3.细胞建株

[0104] 3.1.融合板检测

[0105] 待融合板换液细胞长至中等大小约1万个细胞以上开始检测(检测方法为ELISA方法)在 ELISA质控合格(即阴性对照 <0.2 ,阳性对照 >1.0)后挑选阳性孔(一般 $OD_{450} \geq 0.5$)作亚克隆。

[0106] 3.1.1检测方法:本效价检测-间接ELISA

[0107] 3.1.1.1抗原包被:用包被液稀释抗原到 $2\mu\text{g}/\text{mL}$, $100\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入聚苯乙烯96孔反应板中, 4°C 放置过夜。

[0108] 3.1.1.2洗涤:次日弃掉孔内的液体,洗涤液洗3次。

[0109] 3.1.1.3封闭:加 $150\mu\text{L}/\text{孔}$ 封闭液,室温放置0.5h。

[0110] 3.1.1.4洗涤:用洗涤液洗3次。

[0111] 3.1.1.5加待测样品(一抗):加入抗血清(取血 4°C 过夜后 $4000\text{r}/\text{min}$ 离心10min得上清),用样稀将血清按 $1:200,1:400,1:800,1:1600,1:3200,1:6400,1:12800$ 依次进行倍比稀释(空白血清做阴性对照),每孔 $100\mu\text{L}$,温育1h。

[0112] 3.1.1.6洗涤:用洗涤液洗3次。

[0113] 3.1.1.7加酶标抗抗体:加入HRP标记羊抗鼠IgG($1:5000$,酶稀稀释), $100\mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 孵育40min。

[0114] 3.1.1.8洗涤:用洗涤液洗5次,蒸馏水洗2次。

[0115] 3.1.1.9显色:加新鲜配制的底物溶液 $100\mu\text{L}/\text{孔}$,室温暗处放置5-30min

[0116] 3.1.1.10终止反应、比色:加 $50\mu\text{L}/\text{孔}$ 终止液。颜色变黄;用酶标仪测定 450nm 处各孔的吸光值。

[0117] 3.2细胞融合检测结果

[0118] 进行半固体和液体融合共12板,一共获得阳性细胞株64株;其中效价值 $OD > 2.0$ 的有50株; OD 在 $1.0-2.0$ 之间的有14株。

[0119] 4.亚克隆方法及检测

[0120] 从上述结果中挑出融合板中检测阳性值高的孔进行有限稀释,以每板60%的单克隆孔数量计数做亚克隆,每次均挑取阳性值较高的单克隆孔进行有限稀释,每次亚克隆5-7天即可进行ELISA检测,直到最终筛选出能稳定分泌阳性抗体的单克隆细胞株进行扩大培

养。

- [0121] 4.1第一次亚克隆检测
- [0122] 第一次亚克隆的结果见表5。
- [0123] 表5第一次亚克隆结果
- [0124]

检测方法: 间接ELISA													
一抗: 一亚克隆培养上清原液													
二抗: 羊抗鼠IgG1:10000													
检测时间: 2015.11.2													
包重组蛋白 $\mu\text{g/ml}$													
6B9		7F1		6H9		6D2		6F4		6E2		8F6	
3.2574	3.1531	0.8742	0.6329	4.1196	3.3543	3.1836	3.1241	3.5389	3.0579	3.1798	3.3236	2.0884	0.786
3.3515	3.5564	0.6592	0.663	3.2071	3.1772	2.7916	3.1185	4.4716	3.1736	3.1473	3.5675	1.5754	2.4758
3.1373	4.438	0.8577	0.5778	3.1393	4.4504	3.0712	3.2488	3.271	3.2429	3.3	3.1657	2.7998	1.6542
3.2103	3.3699	1.0686	0.5717	2.9476	3.0926	2.9658	3.0766	3.0351	3.3092	3.1551	3.7546	1.5278	0.4186
3.4961	3.2408	0.8999	0.5122	2.9852	3.8049	3.2656	3.1103	2.975	3.1523	3.1208	4.3995	0.7121	2.5341
3.388	3.1687	0.6806	0.6514	2.9688	2.9848	3.1802	3.0255	3.1614	3.297	3.1859	3.5317	2.9061	0.7721
3.2203	3.1857	0.3816	0.5255	3.1438	2.9164	3.0001	3.3816	3.7641	3.3816	4.4585	3.7535	0.7826	0.8453
3.2935	3.6248	0.1925	0.6236	3.6497	3.6607	3.3486	3.1541	3.5336	3.1577	3.2721	3.4193	0.8554	0.3428
4H5		8C9		7G8		12A1		6C12		10H6		5G10	
3.1881	3.2632	4.419	3.7224	2.6584	2.2281	0.037	0.0169	2.319	2.0466	0.0065	0.0099	2.8645	4.4298
3.1645	3.2808	3.4576	3.7605	1.9399	3.2836	0.0432	0.7283	2.9993	2.2451	0.0084	0.0441	1.639	0.4947
29207	2.9769	2.9769	3.388	1.9186	0.5431	0.6276	0.0227	1.7122	3.0218	0.3105	0.021	0.7846	2.9473
2.726	2.7899	3.0433	3.4357	1.4672	2.4404	0.4152	0.6586	1.8012	2.4533	0.0091	0.0052	2.5172	1.2211
2.9418	2.894	3.1629	3.1825	2.3289	3.1009	0.0163	0.0471	3.1755	2.0139	0.0051	0.4117	3.3349	1.646
2.83	3.4683	3.3083	3.059	2.7645	2.9871	0.1279	0.1886	0.6009	1.5524	0.0103	0.0087	3.1892	0.48
2.9125	3.2909	2.9724	3.4339	1.2381	2.993	0.0135	0.0309	2.5496	2.7721	0.0076	0.0065	0.5654	3.1822
2.7125	3.1228	2.8418	3.2859	2.6695	2.9719	0.1104	0.0683	2.6384	1.2967	0.0352	0.1905	0.6704	3.8311

- [0125] 4.2第二次亚克隆结果
- [0126] 第二次亚克隆的结果见表6。
- [0127] 表6第二次亚克隆结果
- [0128]

检测方法:													
一抗: 二亚克隆培养上清原液													
二抗: 羊抗鼠IgG1:10000													
检测时间: 2015.11.15													
包重组蛋白 $\mu\text{g/ml}$													
6B9		7F1		6H9		6D2		6F4		6E2		8F6	
0.0466	3.2838	2.4782	2.6686	2.7774	2.939	2.6654	2.6943	2.801	0.781	0.0127	4.4269	0.0561	0.0387
0.2451	0.0884	0.6425	2.591	2.7296	3.0946	2.8415	1.863	2.7957	3.1417	2.9201	0.0207	0.0314	0.0302
3.0218	1.3946	2.4412	1.481	2.6675	2.6149	2.7634	2.2441	2.9158	2.925	1.3118	2.4451	0.0309	0.0409
2.4533	0.4658	2.342	2.4064	2.5337	2.6189	2.7698	2.6389	2.5581	2.7533	3.6535	3.5967	0.033	0.0932
2.0139	1.2188	2.531	0.8986	2.5131	2.6946	2.688	2.6899	2.8557	0.4672	0.0273	0.0688	0.6852	0.0317
0.5524	2.7753	2.3746	2.3261	2.4993	2.4885	2.5077	2.7801	2.5942	0.6632	3.8211	3.0038	0.0389	0.0358
2.7721	2.8246	2.2521	0.802	2.5237	2.559	2.659	2.6867	2.6639	2.6034	1.0093	1.6104	0.0352	0.0351
1.2967	0.794	1.7294	2.3544	2.3316	2.4288	2.216	1.5563	2.5287	2.5041	3.381	0.0578	0.709	0.0498
4H5		8C9		7G8		12A1		6C12		10H6		5G10	
3.9663	3.4367	4.4313	3.4349	3.8189	0.3041	0.0127	4.4269	3.8189	0.3041	4.4167	3.2657	0.0343	0.0392
3.173	4.162	3.3003	3.2932	3.4625	0.8739	2.9201	0.0207	3.4625	0.8739	3.2117	0.0176	0.0261	0.0274
3.2768	3.339	3.7547	3.414	3.2901	2.8669	1.3118	2.4451	3.2901	2.8669	0.0238	4.4316	0.1817	0.0425
3.2493	3.2266	3.2564	3.0762	3.0416	0.2605	3.6535	3.5967	3.0416	0.2605	1.2016	3.0765	0.0279	0.0399
2.88	3.1935	30582	3.0251	2.9634	0.0185	0.0273	0.0688	2.9634	0.0185	1.8624	0.0201	0.1879	0.0268
2.9088	2.9487	2.9337	3.044	0.989	2.6903	3.8211	3.0038	0.989	2.6903	0.0279	0.0187	0.0362	0.0478
3.0317	3.3156	3.2563	3.1139	0.3685	0.0194	1.0093	1.6104	0.3685	0.0194	0.0307	0.7303	0.0321	0.0395
2.904	3.3573	3.1849	3.1625	2.884	0.0341	3.381	0.0578	2.884	0.0341	2.9664	1.1215	0.0385	0.0405

- [0129] MRJP4阳性较多,融合检测后筛选出52株阳性,挑选其中的20株进行一亚,一亚检

测后筛选出14株二亚。

[0130] 5.MRJP4特异性细胞株筛选

[0131] 经过与重组蛋白和天然蛋白交叉反应检测,去除有交叉反应的细胞株,最终获得9株MRJP4 融合细胞株。根据表7的部分结果可见,MRJP4与其余四种重组蛋白共有10株交叉。

[0132] 表7 MRJP4特异性细胞株筛选结果

克隆号	包1ug/ml E-MRJP4	包1ug/ml E-MRJP1	包1ug/ml E-MRJP2	包1ug/ml E-MRJP3	包1ug/ml E-MRJP5
6B9	2.3145	0.2142	0.1023	0.0254	0.0364
3B6	2.2035	0.5142	0.6428	0.1528	0.2415
6H9	2.541	0.1542	0.0142	0.0256	0.1301
6D2	2.3148	0.2031	0.0231	0.0247	0.0167
6F4	2.3694	0.1698	0.1214	0.1105	0.1324
7H8	2.0254	0.6897	1.3015	0.3183	0.2143
6E2	2.2156	0.2163	0.1324	0.0251	0.0397
4H5	2.2369	0.1974	0.2316	0.1364	0.0247
8C9	2.6987	0.1572	0.1987	0.1021	0.0471
7G8	2.7102	0.1694	0.201	0.0473	0.0632
6C12	2.3016	0.2015	0.1324	0.0112	0.103
5A2	2.0236	0.6287	0.9334	0.3142	0.2589
5D12	2.3654	1.0236	0.9123	0.5123	0.3169
5D8	2.1326	0.4163	0.2563	0.3425	0.2269
5D10	1.3692	1.023	0.8142	0.4598	0.3148
5E9	2.3694	0.4812	0.7105	0.3126	0.2941
6B10	1.0258	0.6125	0.2163	0.112	0.1987
6D10	1.9643	0.0125	0.3615	0.241	0.2643
2D2	2.3649	0.633	0.4206	0.3154	0.2215
7D11	2.2015	0.915	0.5231	0.4215	0.236

[0134] MRJP4与重组蛋白筛完交叉后,选取测试结果较好的20株与天然蛋白MRJP1、MRJP2测交叉,交叉测定结果见表8。

[0135] 表8交叉测定结果

[0136]

包 1μg/mL 天然 MRJP1 (单)			包 1μg/mL 天然 MRJP2		
0.0174	1.2561	0.8412	0.0154	1.0984	1.0362
0.0215	0.6415	0.6354	0.0147	0.7412	0.9412
0.0165	0.4289	0.0152	0.0326	0.6315	0.0327
0.0412	0.9871	0.0125	0.0258	1.0445	0.5305
0.0326	0.8125		0.0251	0.5873	
0.0512	0.3615		0.0216	0.6125	
0.6489	0.0152		1.7423	0.0132	
1.2364	0.0014		0.9458	0.0236	

[0137] 由表8可见,MRJP4与天然蛋白MRJP1、MRJP2有11株交叉,故MRJP4现剩余9株。

[0138] 6. 9株细胞株定株及亚型鉴定

[0139] 将亚克隆阶段筛选出的稳定分泌阳性抗体且与MRJP1、MRJP2无交叉反应的9株细胞株,扩大培养于24孔板,扩大后收集上清进行抗原检测,采用ELISA梯度稀释及WB验证其稳定性,收集细胞扩大于10cm培养皿中,再次收集上清并检测其中抗体的效价,挑选出较高的1-3株细胞株培养于细胞瓶中,进行冻存。9株细胞株定株及亚型鉴定的结果见表9。

[0140] 表9 9株细胞株定株及亚型鉴定结果

[0141]

株号	亚型
6B9 2D11	IgG2a
6H9 2B8	IgG2a
6D2 1D11	IgG2a
6F4 2C6	IgG2a
6E2 2C2	IgG2a
4H5 1D5	IgG2b
8C9 3B10	IgG2b
7G8 3D8	IgG2b
6C12 3C3	IgG2b

[0142] 7. 细胞株冻存鉴定

[0143] 在细胞株冻存完毕后必须复苏同一批次中的一支进行鉴定, 鉴定标准: ①复苏活细胞数 ≥ 100 万个细胞/支; ②活细胞中有活力细胞 ≥ 50 万/株; ③复苏细胞中不能有除细胞株细胞以外的其它微生物(如: 细菌. 真菌. 支原体等) 出现; ④复苏细胞生长到一定数目后选出生长好的细胞作单克隆计数铺板, 并检测单克隆的分泌抗体能力是否全阳或有抗体分泌; ⑤细胞培养上清也需作ELISA, 以确定是否分泌阳性抗体的同时做western-bolting的鉴定, 鉴定结果见图1。

[0144] 8. 腹水制备

[0145] 制备腹水: 先用降植烷或液体石蜡行小鼠腹腔注射, 一周后将杂交瘤细胞接种到小鼠腹腔中。细胞定株后扩大培养选用10%胎牛血清培养基, 当细胞密度达到以 $1 \times 10^6 - 2 \times 10^6$ /mL时, 800 rpm离心, 收集沉淀, 并用PBS重悬后, 腹腔注入到小鼠(液体石蜡)体内, 7-10天后, 收集腹水准备纯化。

[0146] 9. 腹水纯化

[0147] 腹水纯化的流程见表10。

[0148] 表10抗体纯化步骤

[0149]

抗体纯化操作步骤		
流程	试剂与操作 (简要)	反应时间
1.项目名称		/
2.亲和层析柱	ProteinA	/
3.层析柱预处理	10 倍柱床体积的去离子水冲洗, 1 mL/min 10 倍柱体积的 1% NaAc 冲洗, 1 mL/min	1.5 h
4.样品上样	10 mL 腹水, 0.22 μ L 滤膜过滤, 加入 40 mL 1% NaAc, 0.5 mL/min 上样	3.5 h
5.洗杂	1% NaAc 冲洗至无蛋白流出, 4 mL/min	0.5 h
6.抗体洗脱	3.5%冰乙酸冲洗, 收集洗脱产物至无蛋白流出。	/
7.pH 值调节	饱和碳酸钠调节洗脱产物 pH 至中性	/
8.样品浓缩	10kDa 超滤管, 超滤浓缩至 10 mL 左右	/
9.透析	5 L, 1 \times PBS 透析过夜, 第二天换液 1 次	/
10.层析柱洗涤	去离子水冲洗层析柱至中性	/
11.层析柱贮存	5 倍柱床体积 20%乙醇重新层析柱后, 4 $^{\circ}$ C 封存	/
12.加防腐剂/甘油/BSA	/	/

[0150] 腹水纯化后的抗体得率的数据见表11, SDS的检测结果见图2。

[0151] 表11腹水纯化后的抗体得率

[0152]

细胞株克隆号	腹水体积	抗体得率
6H9	3mL	2.5mg
8C9	2mL	6mg

[0153] SDS检测结果: 抗体6H9浓度约2.5mg/mL, 纯度90%; 抗体8C9浓度约4mg/mL, 纯度90%。

[0154] 10. 抗体效价的检测

[0155] 检测方法: 基本效价检测-间接ELISA;

[0156] 抗原包被: 用包被液稀释抗原到2 μ g/mL, 100 μ L/孔加入聚苯乙烯96孔反应板中, 4 $^{\circ}$ C放置过夜。

[0157] 洗涤: 次日弃掉孔内的液体, 洗涤液洗3次。

[0158] 封闭: 加150 μ L/孔封闭液, 室温放置0.5h。

[0159] 洗涤: 用洗涤液洗3次。

[0160] 加待测样品 (一抗): 加入抗血清 (取血4 $^{\circ}$ C过夜后4000r/min离心10min得上清), 用样稀将血清按1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800.....进行倍比稀释 (空白血清做阴性对照), 每孔100 μ L, 温育1h。

[0161] 洗涤: 用洗涤液洗3次。

[0162] 加酶标抗抗体: 加入HRP标记羊抗鼠IgG (1:5000, 酶稀稀释), 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C孵育40 min。

[0163] 洗涤: 用洗涤液洗5次, 蒸馏水洗2次。

[0164] 显色: 加新鲜配制的底物溶液100 μ L/孔, 室温暗处放置5~30min;

[0165] 终止反应、比色：加50 μ L/孔终止液。颜色变黄；用酶标仪测定450nm处各孔的吸光值。

[0166] 抗体6H9的效价检测结果见表12和图3；

[0167] 抗体8C9的效价检测结果见表13和图4。

[0168] 表12抗体6H9的效价检测的结果

株号	一抗浓度	OD值
[0169] 6H9 2B8	1 μ g/ml	3.2636
	0.5 μ g/ml	3.2206
	0.25 μ g/ml	3.6263
	0.125 μ g/ml	3.3053
	62.5ng/ml	3.1116
	31.25ng/ml	2.6988
	15.625ng/ml	1.7319
	7.813ng/ml	1.1693
	3.906ng/ml	0.8084
	1.953ng/ml	0.461
	0.977ng/ml	0.2496
	0.498ng/ml	0.0912
0	0.0199	

[0170] 表13抗体8C9的效价检测的结果

株号	一抗浓度	OD值
[0171] 8C9 3B10	1 μ g/ml	4.394
	0.5 μ g/ml	3.3808
	0.25 μ g/ml	3.4493
	0.125 μ g/ml	3.2723
	62.5ng/ml	3.6673
	31.25ng/ml	2.8093
	15.625ng/ml	2.0596
	7.813ng/ml	1.5505
	3.906ng/ml	0.8127
	1.953ng/ml	0.4073
	0.977ng/ml	0.2035
	0.498ng/ml	0.1165
0	0.0275	

[0172] 抗体WB验证蜂王浆样本见图5。

[0173] 11. 抗体的特异性检测

[0174] 抗体8C9的特异性检测结果见图6；抗体6H9的特异性检测结果见图7；从特异性检测结果可见，抗体6H9以及抗体8C9只与只与MRJP4发生特异性反应反应，与MRJP1、MRJP2、MRJP3、以及MRJP5蛋白无交叉反应。

[0175] 四、抗体表位检测及抗体配对筛选

[0176] 1通过阻断实验进行抗原表位配对检测

[0177] 具体步骤如下：

[0178] 1.1经过亲和力以及样本检测，选择8C9制备抗体并标记生物素，摸索最佳的稀释比例；

[0179] 1.2包被：用CBS包被对应的抗原，浓度为1 μ g/mL，100 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C 2小时或者4 $^{\circ}$ C 过夜；

[0180] 1.3封闭：5%PBS的脱脂奶粉或者2%PBS的BSA封闭，37 $^{\circ}$ C 1h或者4 $^{\circ}$ C 过夜；

[0181] 1.4一抗：将标记的抗体和检测的抗体均按照方阵摸索的稀释度(1:1000和1:2000)稀释；阴性对照：50 μ L标记抗体+50 μ L自身抗体；阳性对照：50 μ L标记抗体+50 μ L无关抗

体；

[0182] 1.5二抗:羊抗或者兔抗均可,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C1h;

[0183] 1.6底物:根据标记的酶选择合适的底物,100 μ L/孔,10min;

[0184] 1.7显色,终止,读数。

[0185] 首先通过梯度试验确定8C9生物素标记抗体的稀释比例,梯度试验的结果见表14。

[0186] 表14 8C9生物素标记抗体的稀释梯度实验结果

抗体株号	一抗稀释比	OD值
8C9 3B10-Bio 标记抗体	1/1000	4.4082
	1/2000	3.1092
	1/4000	4.4222
	1/8000	4.373
	1/16000	3.5095
	1/32000	3.0833
	1/64000	2.2718
	0	0.0057

[0188] 由上述结果选择标记抗体的稀释比例为1/50000,进行接下来的阻断实验。

[0189] 阻断实验的检测方法为间接竞争ELISA方法:

[0190] 包被浓度为1 μ g/mL,CB直包;一抗检测:50 μ L标记抗体+50 μ L检测抗体;阴性对照为:50 μ L标记抗体+50 μ L自身抗体;阳性对照为:50 μ L标记抗体+50 μ L SP2/0培养上清;

[0191] 阻断实验的方法见表15,筛选结果见表16。

[0192] 表15抗体表位配对检测结果

[0193]

检测方法: 间接竞争 ELISA
包被浓度: 1 μ g/mL CB 直包;
一抗检测: 50 μ L 标记抗体+ 50 μ L 检测抗体; 阴性对照为: 50 μ L 标记抗体+ 50 μ L 自身抗体; 阳性对照为: 50 μ L 标记抗体+ 50 μ L SP2/0 培养上清
酶标二抗羊抗鼠 IgG: 1/10000

[0194] 表16阻断实验的筛选结果

[0195]

待测抗体株号	8C9 3B10-Bio 标记抗体 1/50000
4H5 1D5	0.101
6E2 2C2	0.1154
6H9 2B8	1.5701

[0196]

7C8 3B8	0.2218
阴性对照	0.1047
阳性对照	1.8032

[0197] 根据表16的阻断实验结果可见,6H9与标记抗体为不同表位。选取与标记抗体8C9不同表位的6H9进行腹水制备、抗体纯化及标记实验,经效价检测显示2株抗体均具有较高亲和力,进入下一阶段的研发实验。

[0198] 2. 配对标准曲线摸索及抗体配对测样

[0199] 初步滴定:挑选8C9以及6H9这两对配对的抗体对进行初步滴定试验:

[0200] 试验方法:双抗夹心方法;6H9 2 μ g/mL CB直包;8C9为检测抗体,生物素标记,稀释比例1:2000;HRP 1:4000;试验反应时间:2h+1h+1h+20min;配对的抗体对进行初步滴定试验结果见表17。

[0201] 表17双抗夹心方法的抗体对进行初步滴定试验结果

[0202]

标曲	OD1	OD2	平均OD
1 μ g/mL	3.1633	3.2145	3.1889
500ng/mL	3.1483	3.1579	3.1531
100ng/mL	1.6819	1.6247	1.6533
50ng/mL	1.0125	0.9875	1.0000
10ng/mL	0.4532	0.4614	0.4573
5ng/mL	0.1798	0.1249	0.1524
2.5ng/mL	0.0357	0.0426	0.0392
0	0.1001	0.1053	0.1027

[0203] 棋盘滴定:摸索捕获抗体、标记抗体及样本的稀释比例;

[0204] 试验方法:双抗夹心方法;6H9CB直包;8C9为检测抗体,生物素标记;HRP 1:4000,试验反应时间:2h+1h+1h+20min。

[0205] 棋盘滴定摸索捕获抗体、标记抗体及样本的稀释比例的结果见表18。

[0206] 表18棋盘滴定摸索捕获抗体、标记抗体及样本的稀释比例的结果

[0207]

标曲 (ng)	6H9 1 μ g/mL 包, 8C9-Bio 1:4000 检			6H9 2 μ g/mL 包, 8C9-Bio 1:8000 检			6H9 4 μ g/mL 包, 8C9-Bio 1:8000 检		
	OD1 值	OD2 值	Mean OD 值	OD1 值	OD2 值	Mean OD 值	OD1 值	OD2 值	Mean OD 值
200	2.7346	2.8105	2.7726	2.2139	2.2729	2.2434	2.2574	2.3105	2.2840
100	1.5788	1.5934	1.5861	1.2273	1.2918	1.2595	1.3571	1.3057	1.3314
50	0.9004	1.0231	0.9618	0.7422	0.7678	0.7550	0.7523	0.7712	0.7618
25	0.4642	0.5102	0.4872	0.4361	0.4536	0.4449	0.4033	0.4468	0.4251
12.5	0.2524	0.2631	0.2578	0.2453	0.2665	0.2559	0.2566	0.2615	0.2591
6.25	0.1904	0.1849	0.1877	0.1574	0.1425	0.1500	0.1818	0.1634	0.1726
3.125	0.1577	0.1624	0.1601	0.1143	0.1103	0.1123	0.1228	0.1143	0.1186
0	0.0821	0.0156	0.0489	0.0656	0.0185	0.0421	0.0985	0.0178	0.0582

[0208] 根据上述摸索的包被抗体、检测抗体的稀释条件,进行初步测样:

[0209] 试验方法一:双抗夹心方法;6H9 1 μ g/mL CB直包CB直包;8C9为检测抗体,生物素标记,稀释比例1:2000;HRP 1:4000;试验反应时间:2h+1h+1h+20min。初步测样结果见表19,不同检测条件的初步测样的标准曲线图8。

[0210] 表19初步测样的结果

[0211]

标曲 (ng/mL)	OD值	OD2值	平均OD	样本	OD值
200	3.1848	3.0542	3.1195	蜂王浆1:300	3.095
100	2.9796	2.8795	2.9296	蜂王浆1:300	3.177
50	2.1159	2.2105	2.1632	蜂王浆1:300	3.4243
25	1.2531	1.2634	1.2583	蜂王浆1:300	2.8752
12.5	0.7618	0.8123	0.7871	蜂王浆1:300	3.7793
6.25	0.47	0.4916	0.4808		
3.125	0.3462	0.3215	0.3339		
0	0.2185	0.2018	0.2102		

[0212] 试验方法二:双抗夹心方法;6H9 1 μ g/mL CB直包CB直包;8C9为检测抗体,生物素标记,稀释比例1:3000;HRP 1:4000;试验反应时间:2h+1h+1h+20min;初步测样结果见表20,不同检测条件的初步测样的标准曲线见图9。

[0213] 表20初步测样的结果

[0214]

标曲 (ng/mL)	OD1 值	OD2 值	平均 OD	样本	OD 值
100	2.5877	2.6043	2.5960	蜂王浆 1:1500	1.8496
50	1.6016	1.6473	1.6245	蜂王浆 1:3000	1.4151
25	0.8974	0.9123	0.9049	蜂王浆 1:6000	1.1269
12.5	0.5165	0.5548	0.5357	蜂王浆 1:12000	0.8302
6.25	0.3251	0.3625	0.3438	王浆冻干粉 1:1500	1.3173
3.125	0.2283	0.2432	0.2358	王浆冻干粉 1:3000	0.9016
1.563	0.2008	0.1352	0.1680	王浆冻干粉 1:6000	0.6244
0	0.1269	0.1126	0.1198	王浆冻干粉 1:12000	0.3529

[0215] 将冻干标准品进行再次测定:双抗夹心方法;6H9 1 μ g/mL CB直包CB直包;8C9为检测抗体,生物素标记,稀释比例1:3000;HRP 1:4000;试验反应时间:2h+1h+1h+20min;冻干标准品再次测定结果见表21、表22;冻干标准品再次测定的标准曲线见图10。

[0216] 表21冻干标准品的测定结果

[0217]

标曲 (ng/mL)	OD1 值	OD2 值	平均 OD	样本	OD 值
100	2.6571	2.6952	2.6762	蜂王浆 1:1600	1.6968
50	1.6878	1.6248	1.6563	蜂王浆 1:3200	0.9778
25	0.985	1.0025	0.9938	蜂王浆 1:6400	0.6108
12.5	0.614	0.6935	0.6538	蜂王浆 1:12800	0.4542
6.25	0.4356	0.4636	0.4496	蜂王浆 1:25600	0.3245
3.125	0.2819	0.2359	0.2589	蜂王浆 1:51200	0.2542
1.563	0.1404	0.1259	0.1332	蜂王浆 1:102400	0.2344
0	0.1293	0.1068	0.1181		0.1801

[0218] 表22样本定量结果

[0219]

样本	OD 值	代入公式计算浓度 (ng/mL)	实际浓度 (ng/mL)
蜂王浆 1:1600	1.6968	52.20017203	83520.27525
蜂王浆 1:3200	0.9778	23.14169658	74053.42907
蜂王浆 1:6400	0.6108	11.84138043	75784.83478
蜂王浆 1:12800	0.4542	7.723859319	98865.39928
蜂王浆 1:25600	0.3245	4.610880958	118038.5525
蜂王浆 1:51200	0.2542	3.030799997	155176.9598
蜂王浆 1:102400	0.2344	2.598937038	266131.1527

[0220] 五、抗体纯化

[0221] 1用10倍柱体积的PBS (或者TBS,下同) 洗涤平衡层析柱。

[0222] 2含抗体的血清或其它体液高速离心后,将上清与等体积2×PBS缓冲液混合,调整pH以及离子浓度后,缓慢加入层析柱。

[0223] 3用10倍柱体积以上的PBS洗涤,至流出液无蛋白检出。

[0224] 4加入2倍柱体积0.1M柠檬酸(Citrate Acid,pH 2.7),夹住流出管,静置5分钟后收集穿出液,重复三次。测定OD280估算抗体浓度,如果所得抗体较多可以使用SDS-PAGE检测纯度。也可以选择0.1M甘氨酸(Glycine,pH 3.0)洗脱。

[0225] 5洗脱后的抗体加入2/5体积的1M Tris,pH 8.0中和,使用Millipore蛋白浓缩管切换到所需缓冲液,通常为2×PBS含有0.02%Na₃N以及1mM EDTA。

[0226] 6浓缩到所需体积,经过SDS-PAGE检测纯度,-20℃保存,避免冻结。

[0227] 实施例2蜂王浆MRJP4双夹心酶联免疫方法的建立以及蜂王浆MRJP4ELISA检测试剂盒的制备

[0228] 蜂王浆MRJP4双夹心酶联免疫方法检测原理:用纯化的抗体包被微孔板,制成固相载体,往包被抗MRJP4抗体的微孔中依次加入标本或标准品、生物素化的抗MRJP4抗体、HRP标记的亲素,经过彻底洗涤后用底物TMB显色。TMB在过氧化物酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样本中的MRJP4呈正相关。用酶标仪在450nm波长下测定吸光度(OD值),计算样本浓度。

[0229] 1标准曲线图及标准曲线线性范围

[0230] 1.1抗体配对初筛

[0231] 具体步骤如下:

[0232] 1.1.1包被:将待测的抗体2μg/mL包被,37℃2h或者4℃过夜;

[0233] 1.1.2封闭:2%BSA或者5%的脱脂牛奶封闭液200μL/孔,37℃1h或4℃过夜,TBST洗4遍;

[0234] 1.1.3标品及样本:标准品及样本按照图中备注信息添加到96孔中,50μL/孔,37℃2h;

[0235] 1.1.4二抗:生物素标记的抗体按照推荐的稀释比例加入96孔中,90μL/孔,37℃1h;

[0236] 1.1.5二二抗:HRP-avidin,目前使用浓度1:4000,90μL/孔,37℃1h;

[0237] 1.1.6底物:90μL/孔,37℃放置5-15min;

[0238] 1.1.7终止反应、比色：加30μL/孔终止液，颜色变黄；用酶标仪测定450nm的吸光值。

[0239] 表23配对筛选结果

项目编号	PA1-18100037-MRJP4		
实验方法	双抗夹心法		
包抗	6H9 2ug/ml CB直包		
检抗	8C9-Bio 1:2000		
HRP	1:4000		
实验反应时间	2h+1h+1h+20min		
实验日期	2018-10-18		
标曲	OD1	OD2	mean OD
1ug/ml	3.1633	3.2145	3.1889
500ng/ml	3.1483	3.1579	3.1531
100ng/ml	1.6819	1.6247	1.6533
50ng/ml	1.0125	0.9875	1.0000
10ng/ml	0.4532	0.4614	0.4573
5ng/ml	0.1798	0.1249	0.1524
2.5ng/ml	0.0357	0.0426	0.0392
0	0.1001	0.1053	0.1027
结论：	1、可初步配对； 2、棋盘滴定的最高点可从500ng/ml测试。		

[0241] 根据表23的配对筛选结果可见，就灵敏度而言，抗体6H9和8C9较高，符合预期，下一步直接测样，再次检测。

[0242] 1.2标准曲线设置

[0243] 标准曲线的设置原则以样本检出浓度为基准，即此曲线需包含各样本的检出浓度范围。固定标准品的浓度，选取不同的包检、检抗及二抗的浓度进行棋盘滴定实验(见表24)以此选取各个参数合适的浓度条件。

[0244] 表24棋盘滴定结果

[0245]

项目编号	PA1-18100037-MRJP4						
实验方法	双抗夹心法						
包抗	6H9 CB直包						
检抗	8C9-Bio						
HRP	1:4000						
实验反应时间	2h+1h+1h+20min						
实验日期	2018-10-19						
8C9-Bio检抗比例	包抗6H9浓度 (ug/ml)						
		4ug/ml		2ug/ml		1ug/ml	
		蛋白 (ng/ml)	OD值	蛋白 (ng/ml)	OD值	蛋白 (ng/ml)	OD值
	1:500	500	3.0577	500	3.2155	500	3.1002
		S0	1.8576	S0	1.534	S0	1.023
	1:1000	500	4.4274	500	2.9942	500	3.347
		S0	0.9735	S0	0.7482	S0	0.4814
	1:2000	500	3.3853	500	3.3839	500	4.3881
		S0	0.5013	S0	0.4062	S0	0.2146
	1:4000	500	3.461	500	3.4539	500	3.0132
		S0	0.2094	S0	0.2	S0	0.1289

[0246] 具体步骤如下：

[0247] 1.2.1包被：将待测的抗体按照图中标注的1μg/mL、2μg/mL、4μg/mL分别包被，37℃ 2h 或者4℃过夜；

[0248] 1.2.2封闭：2%BSA或者5%的脱脂牛奶封闭液200μL/孔，37℃ 1h或4℃过夜，TBST

洗 4遍；

[0249] 1.2.3重组蛋白为标准品:标准品设置S7和S0添加到96孔中,50μL/孔,37℃2h;

[0250] 1.2.4二抗:生物素标记的抗体按照推荐的稀释比例加入96孔中,90μL/孔,37℃1h;

[0251] 1.2.5二二抗:HRP-avidin,目前使用浓度1:4000,90μL/孔,37℃1h;

[0252] 1.2.6底物:90μL/孔,37℃放置5-15min;1.2.7终止反应、比色:加30μL/孔终止液,颜色变黄;用酶标仪测定450nm的吸光值。

[0253] 1.3标准曲线调整

[0254] 适当调整包抗、检抗及HRP的浓度来优化标准曲线,确保标曲R2≥0.99视为合格。

[0255] 表25第一次标准曲线摸索

[0256]

项目编号	PA1-18100037-MRJP4								
实验方法	双抗夹心法								
包抗	6H9 CB直包								
检抗	8C9-Bio								
HRP	1:4000								
实验反应时间	2h+1h+1h+20min								
实验日期	2018-10-22								
	6H9 1ug/ml包, 8C9-Bio 1:4000检			6H9 2ug/ml包, 8C9-Bio 1:8000检			6H9 4ug/ml包, 8C9-Bio 1:8000检		
标曲 (ng)	OD1值	OD2值	Mean OD值	OD1值	OD2值	Mean OD值	OD1值	OD2值	Mean OD值
200	2.7346	2.8105	2.7726	2.2139	2.2729	2.2434	2.2574	2.3105	2.2840
100	1.5788	1.5934	1.5861	1.2273	1.2918	1.2595	1.3571	1.3057	1.3314
50	0.9004	1.0231	0.9618	0.7422	0.7678	0.7550	0.7523	0.7712	0.7618
25	0.4642	0.5102	0.4872	0.4361	0.4536	0.4449	0.4033	0.4468	0.4251
12.5	0.2524	0.2631	0.2578	0.2453	0.2665	0.2559	0.2566	0.2615	0.2591
6.25	0.1904	0.1849	0.1877	0.1574	0.1425	0.1500	0.1818	0.1634	0.1726
3.125	0.1577	0.1624	0.1601	0.1143	0.1103	0.1123	0.1228	0.1143	0.1186
0	0.0821	0.0156	0.0489	0.0656	0.0185	0.0421	0.0985	0.0178	0.0582

[0257] 从以上三组条件测试结果来看,标准曲线性均较好,但低值较低;根据测样结果进一步调试标准曲线。

[0258] 表26第二次标准曲线摸索

[0259]

项目编号	PA1-18100037-MRJP4			结论: 标曲最高点可继续下调,测试蜂王浆样本有值,但测值较高,怀疑吸样时未混均匀!	
实验方法	双抗夹心法				
包抗	6H9 1ug/ml CB直包				
检抗	8C9-Bio 1:2000检				
HRP	1:4000				
实验反应时间	2h+1h+1h+20min				
实验日期	2018-10-25				
标曲 (ng/ml)	OD值	OD2值	mean OD	样本	OD值
200	3.1848	3.0542	3.1195	蜂王浆 1:300	3.095
100	2.9796	2.8795	2.9296	蜂王浆 1:300	3.177
50	2.1159	2.2105	2.1632	蜂王浆 1:300	3.4243
25	1.2531	1.2634	1.2583	蜂王浆 1:300	2.8752
12.5	0.7618	0.8123	0.7871	蜂王浆 1:300	3.7793
6.25	0.47	0.4916	0.4808		
3.125	0.3462	0.3215	0.3339		
0	0.2185	0.2018	0.2102		

[0260] 结果显示标曲最高点可继续下调,测试蜂王浆样本有值,但测值较高,怀疑吸样时未混均匀。

[0261] 表27第三次标准曲线摸索

[0262]

项目编号	PA1-18100037-MRJP4				
实验方法	双抗夹心法				
包抗	6H9 1ug/ml CB直包				
检抗	8C9-Bio 1:3000检				
HRP	1:4000				
实验反应时间	2h+1h+1h+20min				
实验日期	2018-10-29				
标曲 (ng/ml)	OD1值	OD2值	mean OD	样本	OD值
100	2.5877	2.6043	2.5960	蜂王浆 1:1500	1.8496
50	1.6016	1.6473	1.6245	蜂王浆 1:3000	1.4151
25	0.8974	0.9123	0.9049	蜂王浆 1:6000	1.1269
12.5	0.5165	0.5548	0.5357	蜂王浆 1:12000	0.8302
6.25	0.3251	0.3625	0.3438	王浆冻干粉 1:150	1.3173
3.125	0.2283	0.2432	0.2358	王浆冻干粉 1:300	0.9016
1.563	0.2008	0.1352	0.1680	王浆冻干粉 1:600	0.6244
0	0.1269	0.1126	0.1198	王浆冻干粉 1:120	0.3529

[0263] 从标曲线性来看,1 μ g/ml包被,1:3000检的条件更合适;测试不同稀释比的样本,OD值随稀释比例的降低呈线性下降,符合预期;改变标品形态,测试稳定性。

[0264] 2样品的检测及评价方法的建立

[0265] 2.1样本前处理

[0266] 2.1.1根据样本类型提前处理样本;

[0267] 2.1.2测试中均设置复孔;

[0268] 2.1.3对于个别含量较高的项目,需要稀释后梯度测试样本。

[0269] 表28 MRJP4测样本

项目编号	PA1-18100037-MRJP4				
实验方法	双抗夹心法				
包抗	6H9 1ug/ml CB直包				
检抗	8C9-Bio 1:3000检				
HRP	1:4000				
实验反应时间	2h+1h+1h+20min				
实验日期	2018-11-9				
标曲 (ng/ml)	OD1值	OD2值	Mean OD	样本	OD值
100	2.6571	2.6952	2.6762	蜂王浆 1:1600	1.6968
50	1.6878	1.6248	1.6563	蜂王浆 1:3200	0.9778
25	0.985	1.0025	0.9938	蜂王浆 1:6400	0.6108
12.5	0.614	0.6935	0.6538	蜂王浆 1:12800	0.4542
6.25	0.4356	0.4636	0.4496	蜂王浆 1:25600	0.3245
3.125	0.2819	0.2359	0.2589	蜂王浆 1:51200	0.2542
1.563	0.1404	0.1259	0.1332	蜂王浆 1:102400	0.2344
0	0.1293	0.1068	0.1181	样稀	0.1801

[0271] 3 ELISA方法的考核评估

[0272] 3.1稳定性

[0273] 3.1.1稳定性测试

[0274] 含4天及7天的稳定性,测试方法如下:分别将包被板(已包被抗体)、标准品(冻干粉)、中间浓度检抗各2套放置于37 $^{\circ}$ C培养箱,于4天后取出一套,7天后取出一套;7天后将放热破的2套原料与4 $^{\circ}$ C放置的原料一起做标曲的比较,计算OD值的下降率。

[0275] 3.1.2评判标准

[0276] 37 $^{\circ}$ C培养箱热破7天后,下降率 \leq 30%即视为稳定性合格。

[0277] 表29 37 $^{\circ}$ C热破坏试验结果

[0278]

项目编号	PA1-18100037-MRJP4			
实验方法	双抗夹心法			
包抗	6H9 1ug/ml CB直包			
检抗	8C9-Bio 1:3000检			
HRP	1:4000			
实验反应时间	2h+1h+1h+20min			
实验日期	2018-11-27			
标曲 (ng/ml)	OD值-0天	OD值-4天	OD值-7天	下降率
100	2.872	2.6978	2.1478	25%
50	1.9835	1.745	1.5274	23%
25	1.271	1.0524	0.9702	24%
12.5	0.7655	0.6855	0.6917	10%
6.25	0.4689	0.4125	0.4834	-3%
3.125	0.3235	0.2997	0.2635	19%
1.563	0.2388	0.2451	0.2374	1%
0	0.1635	0.1722	0.1814	-11%

[0279] 热稳定性7天下降均<30%，热稳合格，进入下一步批内批间。

[0280] 3.2批内批间差

[0281] 3.2.1批内变异系数:要求≤8%，方法:测试高、中、低浓度各24份，用其标准差/平均值×100%，即为其变异系数值。

[0282] 3.2.2批间变异系数:要求≤10%，方法:测试高、中、低浓度各24份，用其标准差/平均值×100%，即为其变异系数值。

[0283] 表30批内批间试验结果

[0284]

项目编号	PA1-18100037-MRJP4					
实验方法	双抗夹心法					
包抗	6H9 1ug/ml CB直包					
检抗	8C9-Bio 1:3000检					
HRP	1:4000					
实验反应时间	2h+1h+1h+20min					
实验日期	2018-11-29					
批内批间						
标曲 (ng/ml)	OD1值	OD2值	mean OD	OD-背景值	SD	CV%
100	2.423	2.543	2.483	2.459	0.084923524	3.420
50	1.612	1.524	1.568	1.544	0.062225397	3.968
25	1.085	0.985	1.035	1.011	0.070710678	6.829
12.5	0.698	0.681	0.690	0.666	0.012020815	1.743
6.25	0.414	0.393	0.403	0.379	0.014919953	3.700
3.125	0.323	0.291	0.307	0.283	0.022556706	7.344
1.563	0.212	0.193	0.202	0.178	0.012798633	6.322
0	0.152	0.145	0.149	0.000	0.005020458	3.375

[0285] 3.3最低检测限

[0286] 一般满足在标曲最低端浓度的二分之一。公式:20份空白样品测定均值加上2倍标准差。

[0287] 4试剂盒产品性能指标

[0288] 检测范围:1.563ng/mL-100ng/mL。

[0289] 灵敏度:3.758ng/mL。

[0290] 精密密度:批内差CV%<8%，批间差CV%<10%。

[0291] 特异性:本试剂盒特异性检测MRJP4，且与其他相关蛋白无交叉反应。

[0292] 稳定性结果:稳定性测试合格。

[0293] 5试剂盒组成成分

[0294] 表31试剂盒组成成分

[0295]

组份	96T
酶标板 (Assay plate)	12 条×8 孔
标准品 (Standard)	2 瓶 (冻干品)
生物素标记抗体 (Biotin-antibody)	1 ×120 μL/瓶 (100×)
辣根过氧化物酶标记亲和素 (HRP-avidin)	1 ×120 μL/瓶 (100×)
生物素标记抗体稀释液 (Biotin-antibody Diluent)	1 ×15 mL/瓶
辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液 (HRP-avidin Diluent)	1 ×15 mL/瓶
样本稀释液 (Sample Diluent)	1× 50 mL/瓶
浓洗涤液 (Wash Buffer)	1 × 20 mL/瓶 (25×)
底物溶液 (TMB Substrate)	1 ×10 mL/瓶
终止液 (Stop Solution)	1 × 10 mL/瓶
板贴	4

[0296] 6样本采集及保存

[0297] 6.1.血清:全血标本请于室温放置2h或4℃过夜后于2℃-8℃1000×g离心15min,取上清即可立即检测;或进行分装,并将标本放于-20℃或-80℃保存,但应避免反复冻融;解冻后的样品应再次离心,然后检测。

[0298] 6.2.血浆:可用EDTA或肝素作为抗凝剂,标本采集后30min内于2℃-8℃1000×g离心 15min,取上清即可立即检测或进行分装,并将标本放于-20℃或-80℃保存,但应避免反复冻融;解冻后的样品应再次离心,然后检测。

[0299] 6.3.细胞培养物上清:标本于2-8℃1000×g离心15min取上清,上清立即用于实验或分装后于-20℃或-80℃保存,避免反复冻融。

[0300] 6.4.尿液:用无菌管收集尿液于2℃-8℃,1000×g离心15min取上清,上清立即用于实验或分装后于-20℃或-80℃保存;避免反复冻融。试验前再次离心,以去除在样本保存期间可能出现的一些沉淀。

[0301] 6.5.组织裂解液:取100mg组织,用1×PBS洗去血污。剪成小块放入组织研磨器(匀浆管)中,加入1mL 1×PBS,制成匀浆,然后置于-20℃过夜。经过反复冻融2次处理破坏细胞膜后,将组织匀浆于2-8℃5000×g离心5min取上清。取适量上清液立即进行实验,或将上清分装保存于-20℃或-80℃。解冻后的样品应再次离心,然后检测;避免反复冻融。

[0302] 6.6.蜂王浆原液处理办法:样本加入3倍体积PBS稀释,充分震荡后,超声20次,于10,000×g离心15min,取上清。因样本粘稠度较高,推荐1:200倍稀释,混匀后立即用于实验或分装后于-20℃或-80℃保存。避免反复冻融。

[0303] 注:标本溶血会影响最后检测结果,因此溶血标本不宜进行此项检测。

[0304] 7试剂配制

[0305] 7.1标准品

[0306] 7.1.1从试剂盒中取出一支标准品,于6000-10000rpm离心30s。用1mL样本稀释液溶解,并用枪头对准冻存管底部反复吸打5次以助溶解,充分混匀得到标准品S7,放置备用。

[0307] 7.1.2取7个1.5mL离心管(S0-S6)依次排列,各加入250 μ L样本稀释液,吸取250 μ L标准品S7到第一个离心管中(S6),轻轻吹打混匀。从S6中吸取250 μ L到第二个EP管中(S5),轻轻吹打混匀,以此类推进行标准品的倍比稀释,S0为样本稀释液。

[0308] 表32标准品浓度

[0309]

编号	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1	S0
ng/mL	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0

[0310] 7.2洗液工作液

[0311] 浓洗涤液按1:25倍用去离子水进行稀释。例如用量筒量取240mL去离子水,倒入烧杯或其他洁净容器中,再量取10mL浓洗涤液,均匀加入,搅拌混匀,在临用前配妥。浓洗涤液低温保存会有盐析出,稀释时可在水浴中加温助溶。

[0312] 7.3生物素标记抗体工作液

[0313] 生物素标记抗体液按1:100倍用生物素标记抗体稀释液进行稀释。如10 μ L生物素标记抗体加990 μ L生物素标记抗体稀释液,轻轻混匀,在临用前10分钟内配妥。

[0314] 7.4辣根过氧化物酶标记亲和素工作液

[0315] 辣根过氧化物酶标记亲和素按1:100倍用辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液进行稀释。如10 μ L辣根过氧化物酶标记亲和素加990 μ L辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液,轻轻混匀,在临用前10min内配妥。

[0316] 8将新鲜蜂王浆样品梯度稀释后应用本发明酶联免疫检测试剂盒检测后的数据展示结果见表33。

[0317] 表33新鲜蜂王浆样品梯度稀释后测样数据展示

[0318]

	吸光值		吸光值		吸光值		吸光值		吸光值
PBS稀释150倍	2.7059	PBS稀释300倍	1.6091	PBS稀释450倍	1.3302	PBS稀释600倍	1.0482	PBS稀释750倍	0.8680
PBS稀释150倍	2.8036	PBS稀释300倍	1.6824	PBS稀释450倍	1.3148	PBS稀释600倍	1.1794	PBS稀释750倍	0.8694
PBS稀释150倍	2.9190	PBS稀释300倍	1.8174	PBS稀释450倍	1.5163	PBS稀释600倍	1.1443	PBS稀释750倍	0.9344
PBS稀释150倍	2.8145	PBS稀释300倍	1.7774	PBS稀释450倍	1.4568	PBS稀释600倍	1.1256	PBS稀释750倍	0.8888
PBS稀释150倍	2.8253	PBS稀释300倍	1.7102	PBS稀释450倍	1.4025	PBS稀释600倍	1.1554	PBS稀释750倍	0.8569
平均值	2.8137		1.7193		1.4041		1.1306		0.8835
MRJP4浓度 (ng/100g)	2.4		2.4		2.52		2.52		2.4

[0319] 图11为采用本发明酶联免疫检测试剂盒测定新鲜蜂王浆样品的检测结果。

[0320] 实施例3蜂王浆MRJP4胶体金免疫层析方法的建立以及蜂王浆MRJP4胶体金免疫检测试纸的开发

[0321] 1.蜂王浆MRJP4胶体金免疫层析方法的建立

[0322] 1.1抗体标记最适pH值的优化

[0323] 用0.02%20nm胶体金标记鼠MRJP4单克隆抗体1,用胶体金梯度法确定抗体与胶体金结合的最适pH值。具体如下:

[0324] 1.1.1取9支小玻璃试管,分别加入1mL制备好的胶体金溶液;

- [0325] 1.1.2用0.2mol/L碳酸钾溶液将胶体金溶液的pH分别调为6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5;
- [0326] 1.1.3取50 μ L 1mg/mL的鼠MRJP4单克隆抗体1加入上述胶体金管中,混匀后室温放20min;
- [0327] 1.1.4然后每管分别加入100 μ L 10%NaCl溶液,混匀,室温静置1-2h;
- [0328] 1.1.5观察胶体金颜色变化,记录保持红色的最低pH;
- [0329] 1.1.6再将pH调为梯度最低pH \pm 0.1;重复上述试验,记录仍保持红色的最低pH,即为最适pH。
- [0330] 经胶体金梯度法试验确定鼠MRJP4单克隆抗体1与胶体金结合的最适pH为7.4。
- [0331] 1.2抗体最适标记量的选择
- [0332] 采用蛋白梯度法确定鼠MRJP4单克隆抗体1与胶体金结合的最适浓度。具体如下:
- [0333] 1.2.1取10支小玻璃试管,分别加入1mL调到最适pH胶体金溶液;
- [0334] 1.2.2将鼠MRJP4单克隆抗体1用纯化水稀释成1mg/mL,各取0 μ L、5 μ L、10 μ L、20 μ L、30 μ L、40 μ L、60 μ L、80 μ L按顺序加入上述小试管中混匀;
- [0335] 1.2.4放置10min后,在每一小试管中加入10%NaCl水溶液0.1mL,混匀,室温静置1-2h,观察结果;
- [0336] 1.2.5观察小试管颜色变化,对照管和加入蛋白质的量不足以稳定胶体金的试管,呈现由红变蓝的聚沉现象,而加入的蛋白量达到或超过最低稳定量的试管则保持红色不变,找出胶体金液由红变蓝的交界管,其所含的蛋白量即为稳定1mL胶体金所需的最小蛋白量。实际胶体金探针制备工作中,加入的抗体量往往为最小蛋白量的120%-130%。
- [0337] 经蛋白梯度法试验显示,鼠MRJP4单克隆抗体1稳定1mL胶体金所需的最小抗体量为10 μ g/mL。
- [0338] 1.3胶体金探针的制备和纯化
- [0339] 将最适pH胶体金溶液20mL加入鼠MRJP4单克隆抗体8C9中,在室温下搅拌30min,制得胶体金-抗体结合物溶液,将10%BSA 2mL加入制得的胶体金-抗体结合物溶液中(终浓度0.4%),室温搅拌10min,或者加入10%聚乙二醇(MW20000)0.2ML,室温搅拌10min,9000-11000r/min 离心40-60min,弃去上清,沉淀溶于2mL胶体金-抗体保存液中,用0.45 μ m滤膜过滤,所得即为胶体金-抗体结合物原液。在1mL胶体金-抗体结合物溶液中加入10%NaCl水溶液1mL后,溶液仍为无沉淀的紫红色液体,说明制得的胶体金-抗体结合物原液具有良好的稳定性。
- [0340] 1.4胶体金-抗体结合物原液工作浓度的确定和金标垫的制备
- [0341] 用工作液将胶体金-抗体结合物原液按1:2、1:4、1:8、1:16进行稀释,取1.4mL胶体金-抗体结合物稀释液,均匀地加在玻璃纤维膜上,置37 $^{\circ}$ C烤干,即为金标垫,测试后确定胶体金标记抗体的最适工作浓度。
- [0342] 经试验测试结果显示,当胶体金-抗体结合物原液的工作浓度为1:4时,制得的金标垫检测效果最佳。
- [0343] 1.5不同型号硝酸纤维素膜(NC膜)的选择
- [0344] 选择几种不同型号的NC膜,通过跑板功能测试、胶体金溶液在不同型号NC膜上流动性、滞后度和背景残留的测试和NC膜的重新选择测试等试验,确定最适型号的NC膜。

[0345] 通过跑板功能测试、层析性能测试和重新选择试验,综合评定后,NC膜型号为赛多利斯 CN140。

[0346] 1.6检测线(T线)及质控线(C线)条件的建立和优化

[0347] 将NC膜上T线及C线的包被抗体设置几个浓度梯度,选择显色效果最优的一组作为使用浓度(T线)和羊抗鼠IgG抗体使用浓度(C线)。

[0348] 结果表明,检测显色效果最优的一组浓度:鼠MRJP4单克隆抗体6H9(T线上)工作浓度为2 mg/mL,羊抗鼠IgG抗体(C线上)工作浓度为1mg/mL。

[0349] 1.7 T线及C线的点膜

[0350] 用0.01mol/L pH 8.0PBS将鼠MRJP4单克隆抗体2和羊抗鼠IgG抗体分别稀释至所需浓度,用划膜机在NC膜上点膜。T线与C线的距离为0.5cm,参数均为1 μ L/cm,喷好的NC膜置37 $^{\circ}$ C-45 $^{\circ}$ C烤干干燥8h以上。

[0351] 2. 蜂浆MRJP4胶体金试纸条的组装和结果判定

[0352] 2.1 组装

[0353] (1) 将PVC底板切成宽2.8mm \times 长6cm的条;

[0354] (2) 在PVC底板中间粘贴抗体固相NC膜,距离上段1.5cm;

[0355] (3) 在PVC底板下端(即靠近NC膜的T线端)粘贴玻璃纤维膜探针条带,并与固相抗体NC膜重叠0.1cm,然后在下端粘贴1.7cm宽样本垫(玻璃纤维膜)与探针条带重叠0.1-0.2cm;

[0356] (4) 在PVC底板上端(即靠近NC膜的C线端)粘贴1.7cm宽的吸水纸,并与抗体固相NC膜重叠0.1-0.2cm;

[0357] (5) 切成2.8mm宽的试纸条。

[0358] 2.2 结果判定

[0359] 将随机抽取的试纸条检测卡,向加样孔中滴加60 μ L处理好的待检样品,室温下反应15min。检测结果显示,标准阴性仅在C线出现一条玫瑰红线;检测结果显示,标准阳性为出现T线、C线 2条玫瑰红线;C线必须显色,否则说明该试纸条无效。

[0360] 2.3 MRJP4胶体金免疫检测试纸的各项性能

[0361] MRJP4靶点快速检测卡具有方便、快速、灵敏等特点,适用于现场大批量样本检测。检测卡含有被事先固定于硝酸纤维素膜测试区(T)的抗原和控制区(C)的II抗以及固定于结合垫上的金标抗体。若样本为阳性,加样后在T区出现一条紫红色条带;若样本为阴性,则T区不会出现紫红色条带。无论样本中是否有MRJP4蛋白存在,C区都会出现一条紫红色条带。

[0362] 样本采集及保存

[0363] 1血清:全血标本请于室温放置2小时或4 $^{\circ}$ C过夜后于2-8 $^{\circ}$ C 1000g离心15min,取上清即可立即检测;或进行分装,并将标本放于-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C保存,但应避免反复冻融。解冻后的样品应再次离心,然后检测。

[0364] 2血浆:可用EDTA或肝素作为抗凝剂,标本采集后30分钟内于2-8 $^{\circ}$ C 1000g离心15分钟,取上清即可立即检测;或进行分装,并将标本放于-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C保存,但应避免反复冻融。解冻后的样品应再次离心,然后检测。

[0365] 3细胞培养物上清:标本于2-8 $^{\circ}$ C 1000g离心15分钟取上清,上清立即用于实验,或

分装后于-20℃或-80℃保存。避免反复冻融。

[0366] 4尿液:用无菌管收集尿液于2-8℃1000g离心15min取上清,上清立即用于实验,或分装后于-20℃或-80℃保存。避免反复冻融。试验前再次离心,以去除在样本保存期间可能出现的一些沉淀。

[0367] 5动物组织裂解液:取100mg组织,用1X PBS洗去血污。剪成小块放入组织研磨器(匀浆管)中,加入1mL 1X PBS,制成匀浆,然后置于-20℃过夜。经过反复冻融2次处理破坏细胞膜后,将组织匀浆于2-8℃5000g离心5分钟取上清。取适量上清液立即进行实验,或将上清分装保存于-20℃或-80℃。解冻后的样品应再次离心,然后检测。避免反复冻融。

[0368] 6植物组织裂解液:称取约0.5g洗净后(滤纸吸干)的植物组织,用消毒的剪刀尽量剪碎于灭菌后的预冷研钵中,液氮研磨成粉末,收集粉末至标记好的相应2mL EP管中(约0.5mL 粉末);加入1mL含有蛋白酶抑制剂混合物(临用前加入)的植物组织提取液,用移液枪头轻轻吹打混匀;冰浴静置20min,每10min涡旋一次;超声5min,功率为20%;4℃12000r/min离心20min,取上清即为总蛋白。

[0369] 注:标本溶血会影响最后检测结果,因此溶血标本不宜进行此项检测。

[0370] 检测步骤

[0371] 1从-80℃冰箱取出样本,解冻之后,待检测;

[0372] 2取出检测卡,开封后平放于桌面,使用本产品附带滴管吸取待检样本上清液,加入3滴于样本孔中;

[0373] 3加样后5-10min,观察显色区,判定结果。

[0374] 4结果判定:参考图12。

[0375] 阳性:C线显色,T线肉眼可见,无论颜色深浅均判为阳性;阴性:C线显色,T线肉眼不显色,判为阴性;无效:C线不显色,无论T线是否显色,该检测卡均判为无效。

[0376] 图13是采用本发明制备的胶体金检测卡测样检测的一种结果。

[0377] 试验例1本发明胶体金检测试纸检测蜂王浆MRJP4的特异性试验

[0378] 用磷酸缓冲溶液稀释新鲜蜂王浆样本代替蜂王浆样品,对试纸条特异性进行测定,结果显示, PBS和样本稀释液仅在C线出现1条玫瑰红线;蜂王浆样品出现T线、C线2条玫瑰红线,说明蜂王浆MRJP4胶体金试纸条只与MRJP4发生特异性反应反应,与其他相关蛋白无交叉反应(王浆主蛋白家族有蛋白1-9,其中1-5含量最高,占王浆主蛋白含量的82%~90%)。

[0379] 试验例2本发明酶联免疫检测试剂盒检测蜂王浆MRJP4的蜂王浆MRJP4的灵敏度试验

[0380] 根据检测结果可见,本发明试剂盒检测蜂王浆MRJP4的蜂王浆MRJP4的灵敏度为3.758ng/mL。

[0381] 试验例3本发明酶联免疫检测试剂盒的热破坏测试试验

[0382] 测定结果:样本测试及下降率:样本(-80℃保存)浓度测值为1260ng/mL;4℃/-20℃/室温破坏后样本下降率较接近,下降率在30~50%之间。

[0383] 表34试剂盒的热破测试结果

[0384]

标曲 (ng/mL)	OD值-0天	OD值-4天	OD值-7天	下降率
------------	--------	--------	--------	-----

100	2.872	2.6978	2.1478	25%
50	1.9835	1.745	1.5274	23%
25	1.271	1.0524	0.9702	24%
12.5	0.7655	0.6855	0.6917	10%
6.25	0.4689	0.4125	0.4834	-3%
3.125	0.3235	0.2997	0.2635	19%
1.563	0.2388	0.2451	0.2374	1%
0	0.1635	0.1722	0.1814	-11%

[0385] 根据试验结果可见,热稳定性7天下降均<30%,热稳定性合格,进入下一步的批间批内测试,评估试剂盒的重复性。

[0386] 试验例4本发明酶联免疫检测试剂盒检测蜂王浆MRJP4的重复性试验

[0387] 用本发明酶联免疫检测试剂盒检测5份不同批次蜂王浆样品和5份同批次的样品,每个样品重复检测10次,检测结果完全一致,不同批次间、同一批次内检测结果趋势一致(图14),符合预期。

[0388] 表35试剂盒的重复性试验结果

[0389]

标曲 (ng/mL)	OD1 值	OD2 值	平均 OD	OD-背景值	SD	CV%
100	2.423	2.543	2.483	2.459	0.084923524	3.420
50	1.612	1.524	1.568	1.544	0.062225397	3.968
25	1.085	0.985	1.035	1.011	0.070710678	6.829
12.5	0.698	0.681	0.690	0.666	0.012020815	1.743
6.25	0.414	0.393	0.403	0.379	0.014919953	3.700
3.125	0.323	0.291	0.307	0.283	0.022556706	7.344
1.563	0.212	0.193	0.202	0.178	0.012798633	6.322
0	0.152	0.145	0.149	0.000	0.005020458	3.375

SEQUENCE LISTING

<110> 中国农业科学院蜜蜂研究所

<120> 抗蜂王浆主蛋白4的配对单克隆抗体、检测蜂王浆主蛋白4的ELISA试剂盒和胶体金免疫检测试纸

<130> BJ-2009-190101A

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 333

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<400> 1

```

Ile Ala Ile Asp Glu Tyr Glu Arg Leu Trp Val Leu Asp Ser Gly Leu
1           5           10           15
Val Asn Asn Thr Gln Pro Met Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ala Phe Asp
           20           25           30
Leu Asn Thr Ser Gln Leu Leu Lys Gln Val Glu Ile Pro His Asp Val
           35           40           45
Ala Thr Thr Gly Lys Gly Glu Leu Val Ser Leu Thr Val Gln Ala Met
           50           55           60
Asp Ser Thr Asn Thr Met Val Tyr Met Val Asp Asn Lys Asn Thr Leu
65           70           75           80
Ile Ile Tyr Gln Asn Ala Asp Asp Ser Phe His Arg Leu Ser Ser His
           85           90           95
Thr Leu Asn His Asn Ser Asp Lys Met Ser Asp Gln Gln Glu Asn Leu
           100          105          110
Thr Leu Lys Glu Val Asp Asn Lys Val Tyr Gly Met Ala Leu Ser Pro
           115          120          125
Val Thr His Asn Leu Tyr Tyr Asn Ser Pro Ser Ser Glu Asn Leu Tyr
           130          135          140
Tyr Val Asn Thr Glu Ser Leu Met Lys Ser Glu Asn Gln Gly Asn Asp
145          150          155          160
Val Gln Tyr Glu Arg Val Gln Asp Val Phe Asp Ser Gln Leu Thr Val
           165          170          175
Lys Ala Val Ser Lys Asn Gly Val Leu Leu Phe Gly Leu Ala Asn Asn
           180          185          190
Thr Leu Ser Cys Trp Asn Glu His Gln Ser Leu Asp Arg Gln Asn Ile
           195          200          205

```

Asp	Val	Val	Ala	Arg	Asn	Glu	Asp	Thr	Leu	Gln	Met	Val	Val	Ser	Met
210						215					220				
Lys	Ile	Lys	Gln	Asn	Val	Pro	Gln	Ser	Gly	Arg	Val	Asn	Asn	Thr	Gln
225					230					235					240
Arg	Asn	Glu	Tyr	Leu	Leu	Ala	Leu	Ser	Asp	Arg	Asn	Gln	Asn	Val	Leu
				245						250					255
Asn	Asn	Asp	Leu	Asn	Leu	Glu	His	Val	Asn	Phe	Gln	Ile	Leu	Gly	Ala
			260							265					270
Asn	Val	Asn	Asp	Leu	Ile	Arg	Asn	Ser	Arg	Cys	Ala	Asn	Phe	Asp	Asn
			275						280					285	
Gln	Asp	Asn	Asn	His	Tyr	Asn	His	Asn	His	Asn	Gln	Ala	Arg	His	Ser
290							295					300			
Ser	Lys	Ser	Asp	Asn	Gln	Asn	Asn	Asn	Gln	His	Asn	Asp	Gln	Ala	His
305					310						315				320
His	Ser	Ser	Lys	Ser	Asn	Asn	Arg	His	Asn	Asn	Asn	Asp			
					325						330				

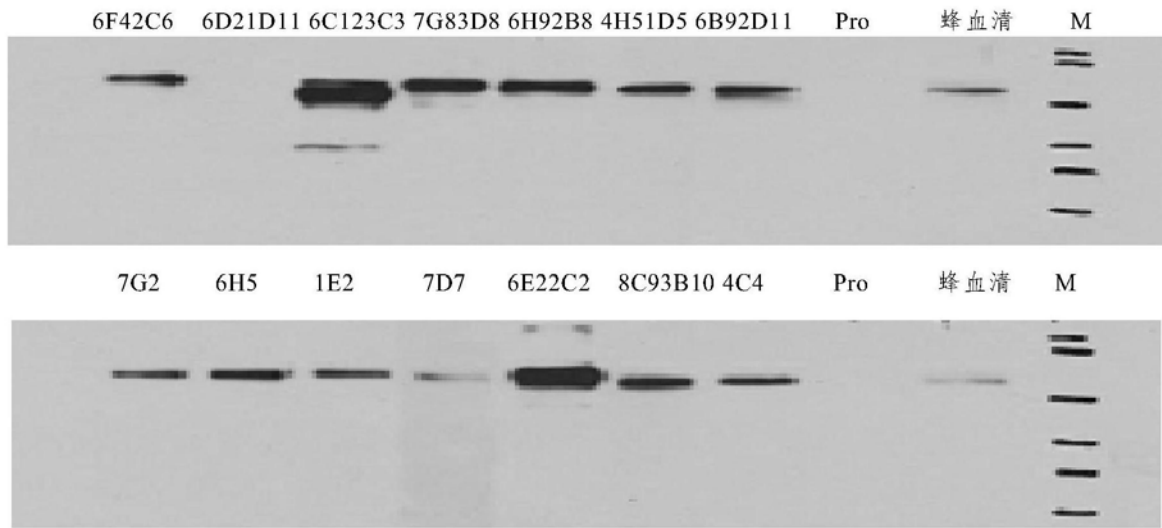


图1

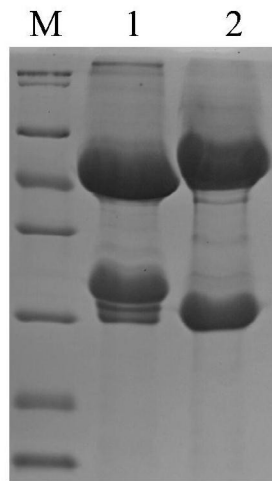


图2

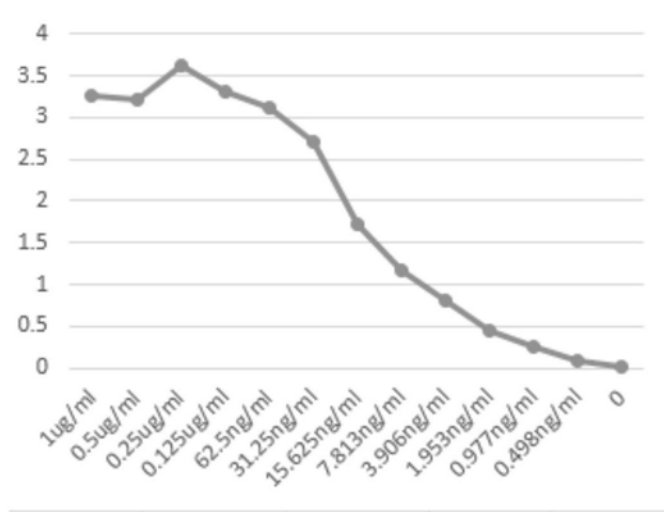


图3

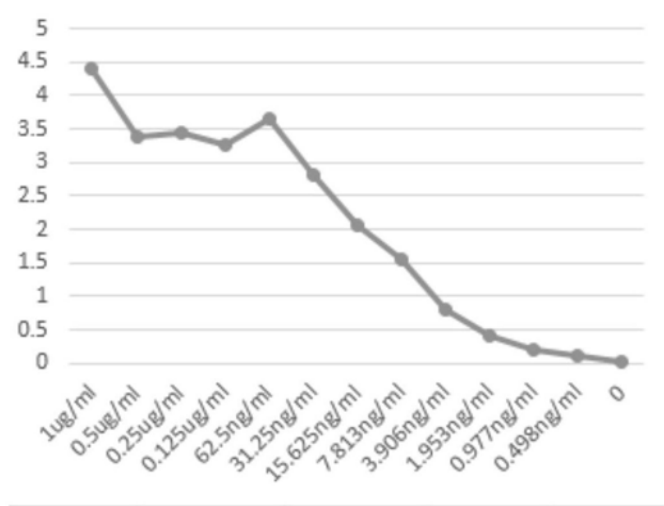


图4

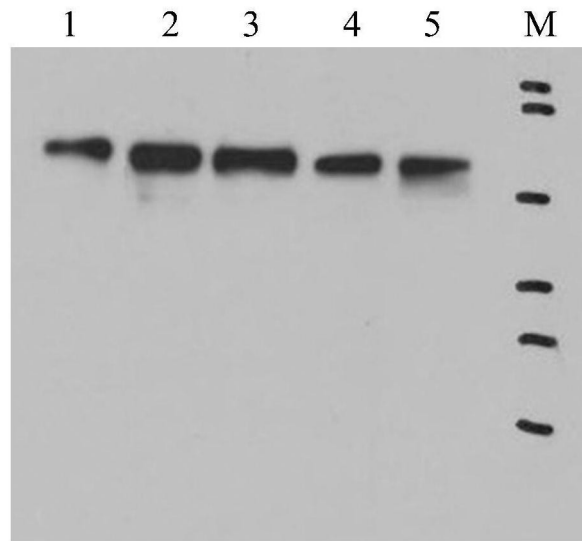


图5

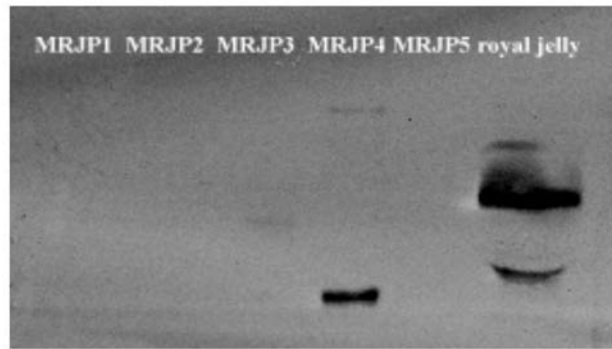


图6

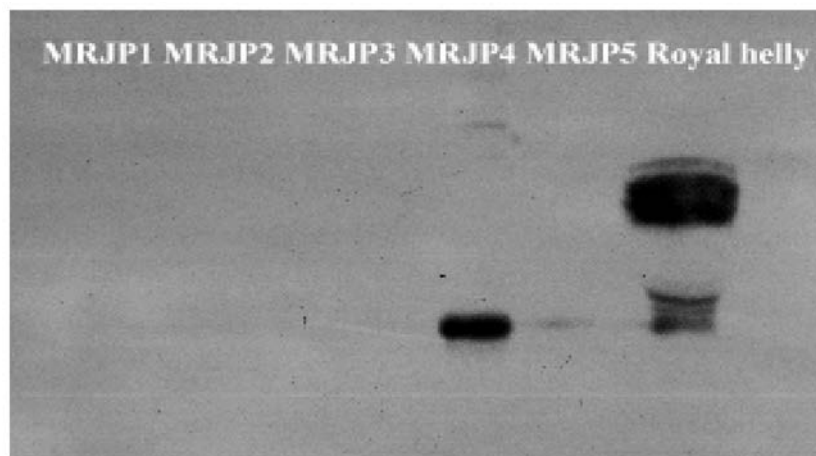


图7

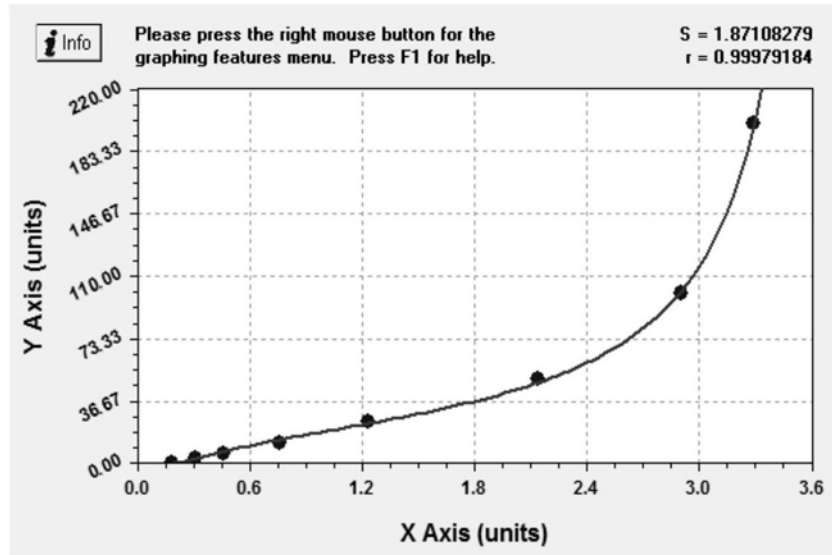


图8

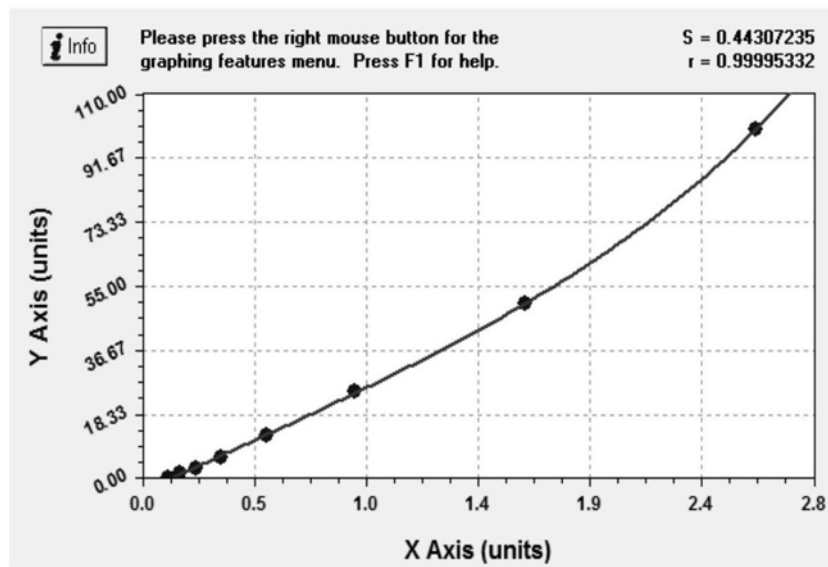


图9

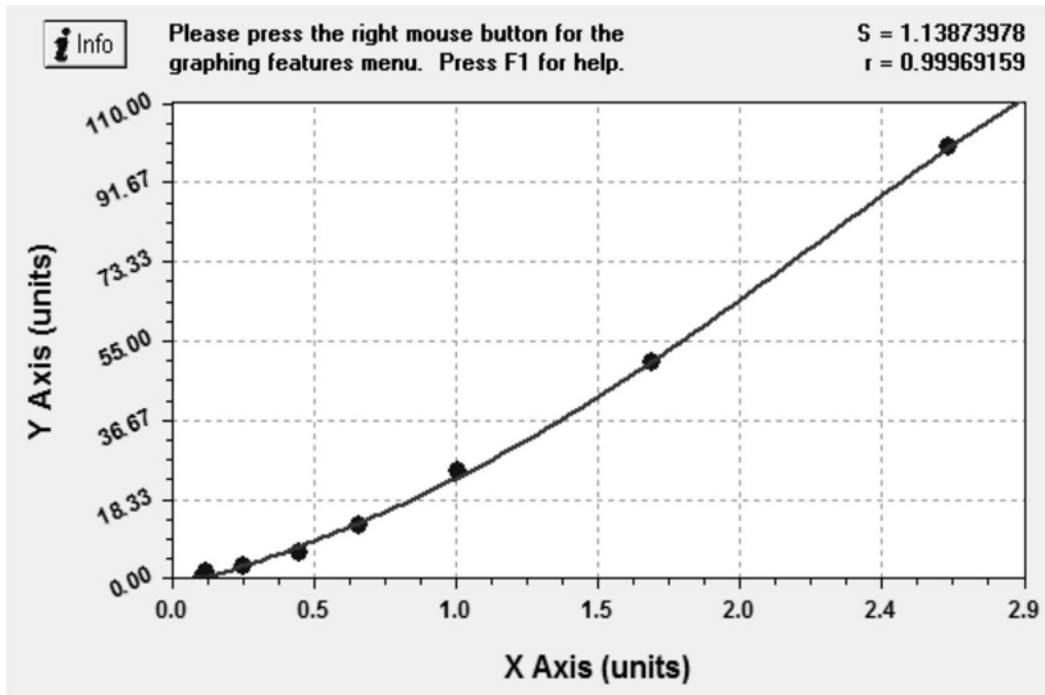


图10

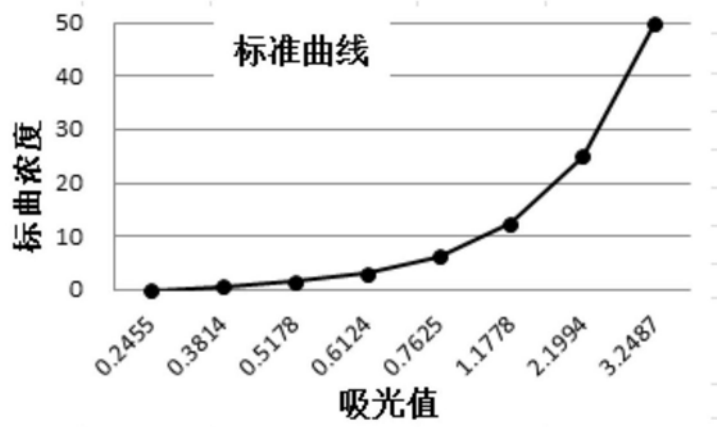


图11

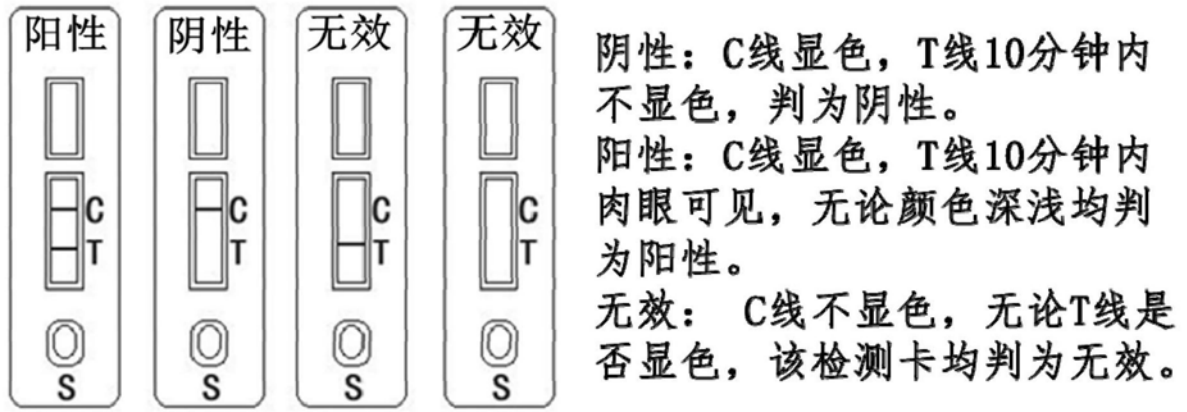


图12

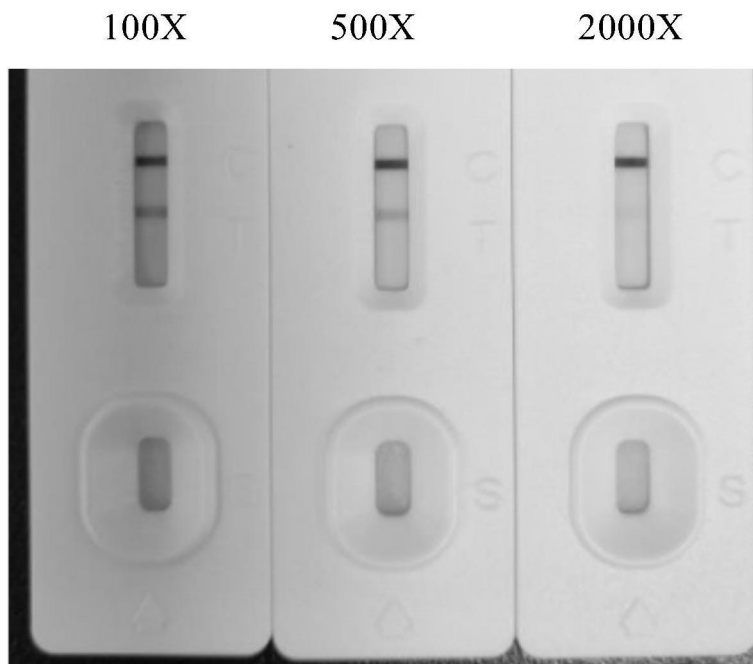


图13

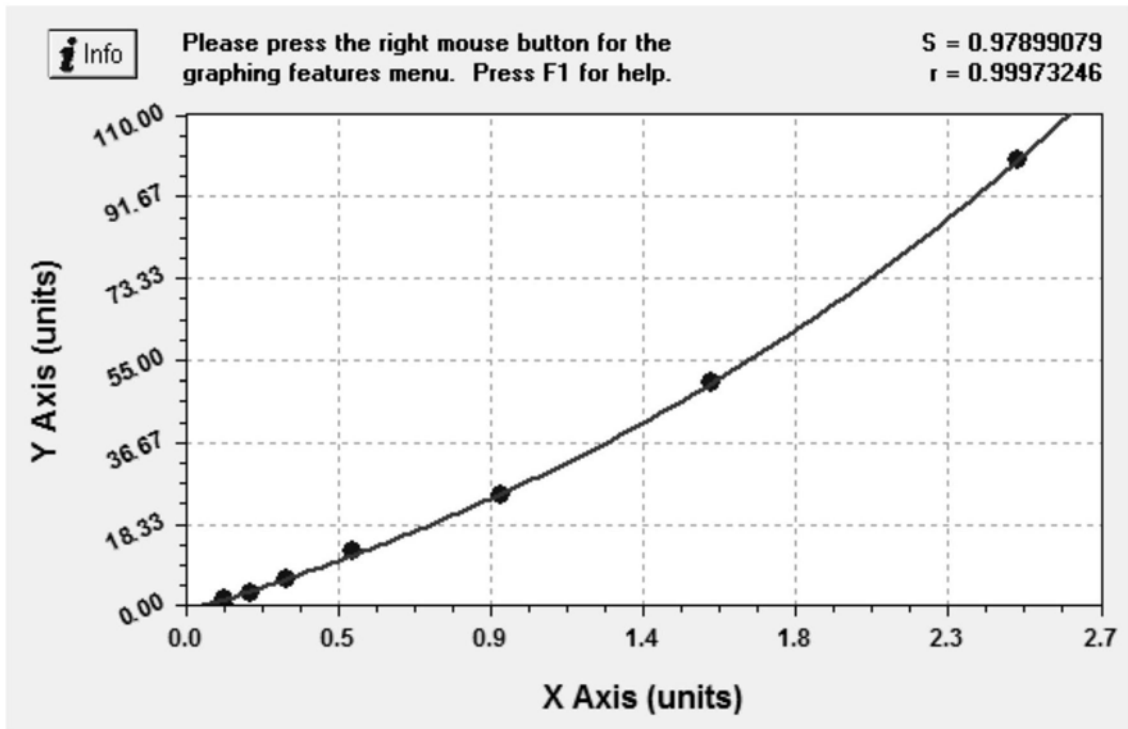


图14

专利名称(译)	抗MRJP4的配对单克隆抗体、检测MRJP4的ELISA试剂盒和胶体金免疫试纸		
公开(公告)号	CN110208539A	公开(公告)日	2019-09-06
申请号	CN201910196297.6	申请日	2019-03-15
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院蜜蜂研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院蜜蜂研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院蜜蜂研究所		
[标]发明人	胡茵 陈思 冯毛 孟丽峰 韩宾 房宇 马川 李建科		
发明人	胡茵 魏俏红 陈思 冯毛 孟丽峰 韩宾 房宇 马川 李建科		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/535 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/68		
代理人(译)	余光军 杨惠		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了抗MRJP4的配对单克隆抗体、检测MRJP4的ELISA试剂盒及胶体金免疫试纸。本发明以MRJP4重组蛋白为抗原采用细胞融合得到阳性细胞株，通过与其它蜂王浆主蛋白交叉反应检测获得MRJP4特异性融合细胞株，根据抗原表位配对检测进行配对初筛，根据配对结果、抗体表位检测和标准曲线绘制及样本测定等，最终确定了有较好线性关系且灵敏度高的抗MRJP4的配对单克隆抗体6H9和8C9。本发明分别构建了检测MRJP4的ELISA检测试剂盒以及胶体金免疫检测试纸。本发明试剂盒特异性强，检测范围为1.563-100ng/mL，检测灵敏度为3.758ng/mL，批内批间CV值小于10%。

