



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109870570 A

(43)申请公布日 2019.06.11

(21)申请号 201811647624.7

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2018.12.29

G01N 33/569(2006.01)

(71)申请人 广东云天抗体生物科技有限公司

G01N 33/536(2006.01)

地址 528315 广东省佛山市顺德区乐从镇
岭南大道南2号A栋6层621室

G01N 21/31(2006.01)

(72)发明人 毕利军 朱国峰 张晓莉 温娉婷
姚青青 李燕 黄健乐 苏欣莹

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 冯振宁

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

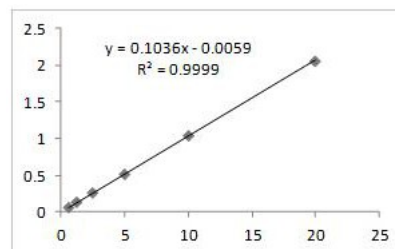
权利要求书2页 说明书10页 附图3页

(54)发明名称

一种检测猴IL-18的酶联免疫试剂盒

(57)摘要

一种检测猴IL-18的双抗夹心酶联免疫试剂盒,包括由捕获抗体包被的酶标板、检测抗体、稀释液、浓缩洗涤液、偶联物、显色液、终止液和标准品;其中,捕获抗体为IL-18的单克隆抗体;检测抗体为生物素标记的IL-18多克隆抗体;稀释液为0.5~4%干酪素钠的pH7.4磷酸缓冲液;捕获抗体包被在酶标板上,以质量分数1~5%牛血清白蛋白的pH7.4磷酸缓冲液作为封闭液进行抗体封闭;标准品为IL-18蛋白。本发明采用三明治法半定量ELISA的检测样品的IL-18的水平,检测方法操作简单,结果准确度高,能够检测大批量的样品。适用于科研领域非临床诊断目的的针对猴IL-18的特异性检测,有很大的推广应用价值。



1. 一种检测猴IL-18的双抗夹心酶联免疫试剂盒,其特征在于,包括由捕获抗体包被的酶标板、检测抗体、稀释液、浓缩洗涤液、偶联物、显色液、终止液和标准品;

其中,捕获抗体为IL-18的单克隆抗体;

检测抗体为生物素标记的IL-18多克隆抗体;

稀释液为0.5~4%干酪素钠的pH7.4磷酸缓冲液;

捕获抗体包被在酶标板上,以质量分数1~5%牛血清白蛋白的pH7.4磷酸缓冲液作为封闭液进行抗体封闭;

标准品为IL-18蛋白。

2. 根据权利要求1所述的双抗夹心酶联免疫试剂盒,其特征在于,捕获抗体包被在酶标板上,包括以下步骤:

S11. 用pH9.4磷酸盐缓冲液将捕获抗体稀释,加入酶标板,预包被;

S12. 用含有体积分数0.01~0.2%吐温20的pH7.4的PBS洗涤S11包被后的ELISA酶标板;

S13. 拍干,加入封闭液,封闭;

S14. 拍干,干燥,真空包装,保存。

3. 根据权利要求1所述的双抗夹心酶联免疫试剂盒,其特征在于,捕获抗体的包被浓度为0.5~4 μ g/ml,包被量为50~300 μ L。

4. 根据权利要求3所述的双抗夹心酶联免疫试剂盒,其特征在于,捕获抗体的包被浓度为1g/ml,包被量为100 μ L。

5. 根据权利要求1所述的双抗夹心酶联免疫试剂盒,其特征在于,检测抗体的使用浓度为0.25~2 μ g/ml,使用量为50~300 μ L。

6. 根据权利要求5所述的双抗夹心酶联免疫试剂盒,其特征在于,检测抗体的使用浓度为0.5 μ g/ml,使用量为50 μ L。

7. 根据权利要求1所述的双抗夹心酶联免疫试剂盒,其特征在于,浓缩洗涤液为含有体积分数0.01~0.2%的吐温的pH7.4的磷酸盐缓冲液,工作浓度需要稀释20倍。

8. 根据权利要求1所述的双抗夹心酶联免疫试剂盒,其特征在于,偶联物为辣根过氧化物标记的链霉亲和素;显色液为四甲基联苯胺;终止液为硫酸。

9. 权利要求1~8任一所述的双抗夹心酶联免疫试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

S21. 向酶标板,加入检测抗体;

S22. 将用稀释液梯度稀释的标准品和待测样本分别加入对应的孔内,振荡混匀,室温孵育;

S23. 用洗涤液洗涤酶标板;

S24. 加入偶联物,振荡混匀,室温孵育;

S25. 用洗涤液洗涤酶标板;

S26. 加入显色液,振荡混匀,室温避光显色;

S27. 加入终止液,终止反应;

S28. 分别检测450nm及620nm的OD值,计算其差值;

S29. 以OD₄₅₀与OD₆₂₀的差值为纵坐标,以标准品的浓度为横坐标,得到标准曲线和线性回归方程式;

S210. 将待测样本的OD₄₅₀与OD₆₂₀的差值带入线性回归方程式,计算其浓度。

10. 根据权利要求9所述的使用方法,其特征在于,标准品或待测样本的量为50~300μL/孔。

一种检测猴IL-18的酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物体外诊断技术领域,更具体地,涉及一种检测猴IL-18的酶联免疫试剂盒。

背景技术

[0002] IL-18由巨噬细胞和其他细胞产生,属于IL-1配体家族,结构与IL-1蛋白家族相似。IL-18cDNA编码193个氨基酸,半胱氨酸天冬酶在N端将其水解为成熟的IL-18,发挥其生物学活性。它是一个前炎症因子,可调节多种细胞发育及细胞因子分泌。研究表明,它是独特的依赖细胞因子周围环境而刺激Th1和Th2细胞反应的细胞因子。能促进外周单个核细胞产生IFN- γ 、IL-2和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子等细胞因子,增强NK细胞和Th1细胞的细胞毒作用,促进T细胞的增殖,并在Th1细胞分化和免疫反应中有促进和调节作用。在免疫调节、抗感染、抗肿瘤及慢性炎症性疾病发病过程中起着重要作用。在科研领域,非临床诊断目的的IL-18检测有着很大的市场前景。

[0003] 但是,目前市场上尚适用于科研领域非临床诊断目的的针对猴IL-18的特异性检测试剂盒,缺乏一种操作简单、检测灵敏度高、准确性强的猴IL-18的酶联免疫试剂盒。

发明内容

[0004] 本发明的目的是为了克服现有技术的缺乏一种操作简单、检测灵敏度高、准确性强的猴IL-18的酶联免疫试剂盒不足,提供一种操作简单、检测灵敏度高、准确性强的猴IL-18的酶联免疫试剂盒。

[0005] 为了实现上述目的,本发明是通过以下技术方案予以实现的:

[0006] 本发明的技术方案是将捕获抗体包被于酶标板,加入检测抗体和IL-18蛋白后,形成捕获抗体、抗原和检测抗体的复合物。待加入偶联物和显色液后,终止反应并读取样品的吸光值。通过与标准曲线比较计算得到待测样品中的IL-18的含量。

[0007] 一种检测猴IL-18的双抗夹心酶联免疫试剂盒,其特征在于,包括由捕获抗体包被的酶标板、检测抗体、稀释液、浓缩洗涤液、偶联物、显色液、终止液和标准品;

[0008] 其中,捕获抗体为IL-18的单克隆抗体;

[0009] 检测抗体为生物素标记的IL-18多克隆抗体;

[0010] 稀释液为0.5~4%干酪素钠的pH7.4磷酸缓冲液;

[0011] 捕获抗体包被在酶标板上,以质量分数1~5%牛血清白蛋白的pH7.4磷酸缓冲液作为封闭液进行抗体封闭;

[0012] 标准品为IL-18蛋白。

[0013] 优选地,捕获抗体为抗人IL-18的单克隆抗体。

[0014] 优选地,检测抗体为生物素标记的IL-18小鼠多克隆抗体。

[0015] IL-18蛋白为NCBI Reference Sequence:NP_001028006.1。

[0016] IL-18蛋白为大肠杆菌表达的IL-18。

- [0017] 优选地,标准品为IL-18蛋白冻干品。
- [0018] 优选地,捕获抗体包被在酶标板上,包括以下步骤:
- [0019] S11.用pH9.4磷酸盐缓冲液将捕获抗体稀释,加入酶标板,预包被;
- [0020] S12.用含有体积分数0.01~0.2%吐温20的pH7.4的PBS洗涤S1酶标板;
- [0021] S13.拍干,加入封闭液,封闭;
- [0022] S14.拍干,干燥,真空包装,保存。
- [0023] 优选地,步骤S11中,包被的条件为1~10℃,不少于12小时。
- [0024] 优选地,步骤S12中,用含有体积分数0.05%吐温20的pH7.4的PBS洗涤S1包被后的ELISA酶标板
- [0025] 优选地,步骤S13中,封闭的条件为25~37℃,2~8小时。
- [0026] 更优选地,步骤S13中,封闭的条件为25℃,4小时。
- [0027] 优选地,步骤S14中,干燥的条件为25~37℃,4~12小时,10%~60%湿度。
- [0028] 更优选地,步骤S14中,干燥的条件为25℃,6小时,30%湿度。
- [0029] 优选地,步骤S14中,保存的条件为4~25℃。
- [0030] 更优选地,步骤S14中,保存的条件4℃。
- [0031] 优选地,捕获抗体的包被浓度为0.5~4μg/ml,包被量为50~300μL。
- [0032] 优选地,捕获抗体的包被浓度为1μg/ml,包被量为100μL。
- [0033] 优选地,检测抗体的使用浓度为0.25~2μg/ml,使用量为50~300μL。
- [0034] 优选地,检测抗体的使用浓度为0.5μg/ml,使用量为50μL。
- [0035] 优选地,浓缩洗涤液为含有体积分数0.01~0.2%的吐温的pH7.4的磷酸盐缓冲液,工作浓度需要稀释20倍。
- [0036] 更优选地,浓缩洗涤液为含有体积分数0.05%的吐温的pH7.4的磷酸盐缓冲液,工作浓度需要稀释20倍。
- [0037] 优选地,偶联物为辣根过氧化酶标记的链霉亲和素,其工作浓度为0.1~1.μg/ml。
- [0038] 更优选地,偶联物的工作浓度为0.25μg/ml。
- [0039] 优选地,显色液为质量分数为0.01~0.05%四甲基联苯胺。
- [0040] 更优选地,显色液为质量分数为0.02%四甲基联苯胺。
- [0041] 优选地,终止液为1~4mol/L硫酸。
- [0042] 更优选地,终止液为2mol/L硫酸。
- [0043] 以上所述的双抗夹心酶联免疫试剂盒的使用方法,包括以下步骤:
- [0044] S21.向酶标板中,加入检测抗体;
- [0045] S22.将用稀释液梯度稀释的标准品和待测样本加入对应的孔内,振荡混匀,室温孵育;
- [0046] S23.用洗涤液洗涤酶标板;
- [0047] S24.加入偶联物,振荡混匀,室温孵育;
- [0048] S25.用洗涤液洗涤酶标板;
- [0049] S26.加入显色液,振荡混匀,室温避光显色;
- [0050] S27.加入终止液,终止反应;
- [0051] S28.分别检测450nm及620nm的OD值,计算其差值;

- [0052] S29. 以OD₄₅₀与OD₆₂₀的差值为纵坐标,以标准品的浓度为横坐标,得到标准曲线和线性回归方程式;
- [0053] S210. 将待测样本的OD₄₅₀与OD₆₂₀的差值带入线性回归方程式,计算其浓度。
- [0054] 优选地,步骤S21中,加入检测抗体的量为50~300μL/孔。
- [0055] 更优选地,步骤S21中,加入检测抗体的量为50μL/孔。
- [0056] 优选地,步骤S22中,加入抗原或待测样本的量为50~300μL/孔。
- [0057] 更优选地,步骤S22中,加入抗原或待测样本的量为50μL/孔。
- [0058] 优选地,步骤S22中,孵育时间为1~3h。
- [0059] 更优选地,步骤S22中,孵育时间为2h。
- [0060] 优选地,步骤S23中,洗涤酶标板为洗涤液200~400μL/孔,洗涤2~6次,每次20~60秒,拍干。
- [0061] 更优选地,步骤S23中,洗涤酶标板为洗涤液300μL/孔,洗涤3次,每次30秒,拍干。
- [0062] 优选地,步骤S24中,加入偶联物的量50~200μL/孔。
- [0063] 更优选地,步骤S24中,加入偶联物的量100μL/孔。
- [0064] 优选地,步骤S24中,孵育时间为15~60min。
- [0065] 更优选地,步骤S24中,孵育时间为30min。
- [0066] 优选地,步骤S25中,洗涤ELISA酶标板为洗涤液200~400μL/孔,洗涤2~6次,每次20~60秒,拍干。
- [0067] 更优选地,步骤S25中,洗涤ELISA酶标板为洗涤液300μL/孔,洗涤5次,每次30秒,拍干。
- [0068] 优选地,步骤S26中,加入显色液的量50~200μL/孔。
- [0069] 更优选地,步骤S26中,加入显色液的量100μL/孔。
- [0070] 优选地,步骤S26中,显色时间为15~60min。
- [0071] 更优选地,步骤S26中,显色时间为15min。
- [0072] 优选地,步骤S27中,加入终止液的量25~100μL/孔。
- [0073] 更优选地,步骤S27中,加入终止液的量50μL/孔。
- [0074] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:
- [0075] 本发明采用三明治法半定量ELISA的检测样品的IL-18的水平,检测方法操作简单,结果准确度高,能够检测大批量的样品。适用于科研领域非临床诊断目的的针对猴IL-18的特异性检测,有很大的推广应用价值。

附图说明

- [0076] 图1为实施例1中猴IL-18标准品检测标准曲线。
- [0077] 图2为实施例3中选择一步法得到的猴IL-18标准品标准曲线。
- [0078] 图3为实施例3中选择二步法得到的猴IL-18标准品标准曲线。
- [0079] 图4为实施例4中选择2%BSA的pH7.4磷酸缓冲液作为封闭液得到的猴IL-18标准品标准曲线。
- [0080] 图5为实施例4中选择3%BSA的pH7.4磷酸缓冲液作为封闭液得到的猴IL-18标准品标准曲线。

[0081] 图6为实施例5中选择1%干酪素钠的pH7.4磷酸缓冲液作为稀释液得到的猴IL-18标准品检测标准曲线。

[0082] 图7为实施例5中选择1%BSA的pH7.4磷酸缓冲液作为稀释液得到的猴IL-18标准品检测标准曲线。

具体实施方式

[0083] 下面结合说明书附图和具体实施例对本发明作出进一步地详细阐述,所述实施例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法;所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,为可从商业途径得到的试剂和材料。

[0084] 以下实施例以MBL (MEDICAL&BIOLOGICAL LABORATORIES CO.,LTD), 货号为D044-3的抗人IL-18的单克隆抗体作为捕获抗体, MBL (MEDICAL&BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD) 公司货号为D045-6的小鼠多克隆抗体作为检测抗体, 为例说明本发明的技术方案, 其并不是本发明的唯一适合的抗体的选择。

[0085] 实施例1一种检测猴IL-18的酶联免疫试剂盒

[0086] 一、组成

[0087] 包被有捕获抗体的酶标板:捕获抗体为抗人IL-18的单克隆抗体;

[0088] 检测抗体为生物素标记的小鼠多克隆抗体;

[0089] 浓缩洗涤液:含有体积分数0.5%的吐温的pH7.4的磷酸盐缓冲液,工作浓度需要稀释20倍;

[0090] 偶联物:辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素,工作浓度稀释 $2000\times$ 为 $0.25\mu\text{g}/\text{ml}$;

[0091] 显色液:质量分数为0.02%四甲基联苯胺;

[0092] 终止液:2mol/L硫酸;

[0093] 稀释液:质量分数1%干酪素钠的pH7.4磷酸缓冲液;

[0094] 标准品:重组猴IL-18蛋白冻干标准品。

[0095] 其中,包被有捕获抗体的ELISA酶标板是按照以下方法制备的:

[0096] 1、包被

[0097] 用包被液(pH9.4磷酸盐缓冲液)将捕获抗体稀释至 $1\mu\text{g}/\text{mL}$, $100\mu\text{L}/\text{孔}$, 4°C 包被过夜。

[0098] 2、封闭

[0099] 倾倒板内液体,用含有0.05%吐温20的PBS洗涤2次, $300\mu\text{L}/\text{孔}$ 。拍干。加入封闭液(含有3%牛血清白蛋白的pH7.4磷酸缓冲液), $300\mu\text{L}/\text{孔}$, 室温封闭4小时。倾倒板内液体,拍干。

[0100] 3、干燥

[0101] 25°C , 30%湿度干燥6小时,用真空包装机包装, 4°C 保存备用。

[0102] 二、使用方法

[0103] 1、加样

[0104] 加入生物素标记抗体 $50\mu\text{L}/\text{孔}$ (检测抗体浓度为 $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$)。然后,将用稀释液稀释好的6个浓度梯度 $20\text{ng}/\text{mL}$, $10\text{ng}/\text{mL}$, $5\text{ng}/\text{mL}$, $2.5\text{ng}/\text{mL}$, $1.25\text{ng}/\text{mL}$, $0.625\text{ng}/\text{mL}$ 的标准品,

(空白孔则加入稀释液)和待测样本加入对应的实验孔中,每孔加入50 μ L。盖上封板膜,轻轻振荡混匀,室温(以下均指18 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C)孵育2h。

[0105] 2、洗涤

[0106] 倾倒孔内液体,洗涤液300 μ L/孔洗涤3次,每次30秒,每次洗完在吸水纸上拍干。如果用洗板机洗涤,洗涤次数增加一次。

[0107] 3、偶联物

[0108] 100 μ L/孔加入偶联物,盖上封板膜,轻轻振荡混匀,室温孵育30min。

[0109] 4、洗涤

[0110] 倾倒孔内液体,洗涤液300 μ L/孔洗涤5次,每次30秒,每次洗完在吸水纸上拍干。如果用洗板机洗涤,洗涤次数增加一次。

[0111] 5、显色

[0112] 100 μ L/孔加入显色液。盖上封板膜,轻轻振荡混匀,室温避光显色15min。

[0113] 6、终止

[0114] 取出ELISA酶标板,直接50 μ L/孔加入终止液,终止反应(此时蓝色立即转为黄色)。

[0115] 7、检测

[0116] 终止结束后,用酶标仪于主波长450nm及参考波长620~650nm进行检测,OD₄₅₀减OD₆₂₀读取结果(以下均以OD₄₅₀减OD₆₂₀计算检测结果)。于终止反应后15分钟内完成检测。

[0117] 8、标准曲线的建立

[0118] 猴IL-18标准品的浓度为横坐标,相应的OD值(以下均指OD₄₅₀减OD₆₂₀)为纵坐标,做得相应的标准曲线(图1),计算出标准曲线的线性回归方程式(计算时忽略零浓度标准品)。将样本的OD值代入方程式计算出其IL-18浓度。

[0119] 实施例2一种检测猴IL-18的酶联免疫试剂盒的制备

[0120] 一、棋盘法摸索检测试剂盒的最佳抗体对浓度

[0121] 1、实验方法

[0122] 将抗IL-18的捕获抗体稀释至浓度为4 μ g/mL、2 μ g/mL、1 μ g/mL和0.5 μ g/mL,抗IL-18的检测抗体稀释至浓度为2 μ g/mL、1 μ g/mL、0.5 μ g/mL和0.25 μ g/mL,重组IL-18蛋白稀释至40ng/mL、20ng/mL和10ng/mL,按照实施例1进行检测。

[0123] 2、实验结果

[0124] 综合分析空白吸光值和响应值,保证空白值低于0.1,响应值越低越好。选择抗体的包被浓度为1 μ g/mL,检测抗体浓度为0.5 μ g/mL。

[0125] 二、酶标板的制备

[0126] 1、包被

[0127] 用包被液(pH9.4磷酸盐缓冲液)将捕获抗体稀释至1 μ g/mL,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C包被过夜。

[0128] 2、封闭

[0129] 倾倒板内液体,用含有0.05%吐温20的PBS洗涤2次,300 μ L/孔。拍干。加入封闭液(含有3%牛血清白蛋白的pH7.4磷酸缓冲液),300 μ L/孔,室温封闭4小时。倾倒板内液体,拍干。

[0130] 3、干燥

[0131] 25℃,30%湿度干燥6小时,用真空包装机包装,4℃保存备用。

[0132] 实施例3检测方法的选择优化

[0133] 1、实验方法

[0134] 用二步法代替实施例1中的检测方法,使用实施例1构建的酶联免疫法试剂盒进行检测。与实施例1中的检测方法进行比较。分别将标准品用稀释液稀释至0.625、1.25、2.5、5、10和20ng/ml进行检测。

[0135] 二步法的具体检测步骤如下:

[0136] (1)、加入抗原

[0137] 将上述稀释好的6个浓度梯度20ng/mL,10ng/mL,5ng/mL,2.5ng/mL,1.25ng/mL和0.625ng/mL的标准品加入对应的实验孔中,每孔加入100μL。盖上封板膜,室温(以下均指18℃~30℃)孵育2h。

[0138] (2)、洗涤

[0139] 倾倒孔内液体,洗涤液300μL/孔洗涤3次,每次30秒,每次洗完在吸水纸上拍干。如果用洗板机洗涤,洗涤次数增加一次。

[0140] (3)、加入检测抗体

[0141] 加入浓度为0.5μg/mL生物素标记抗体100μL/孔。盖上封板膜,室温(以下均指18℃~30℃)孵育1h。

[0142] (4)、洗涤

[0143] 倾倒孔内液体,洗涤液300μL/孔洗涤3次,每次30秒,每次洗完在吸水纸上拍干。如果用洗板机洗涤,洗涤次数增加一次。

[0144] (5)、偶联物

[0145] 100μL/孔加入偶联物,盖上封板膜,轻轻振荡混匀,室温孵育30min。

[0146] (6)、洗涤

[0147] 倾倒孔内液体,洗涤液300μL/孔洗涤5次,每次30秒,每次洗完在吸水纸上拍干。如果用洗板机洗涤,洗涤次数增加一次。

[0148] (7)、显色

[0149] 100μL/孔加入显色液。盖上封板膜,轻轻振荡混匀,室温避光显色15min。

[0150] (8)、终止

[0151] 取出酶标板,直接50μL/孔加入终止液,终止反应(此时蓝色立即转为黄色)。

[0152] (9)、检测

[0153] 终止结束后,用酶标仪于主波长450nm及参考波长620~650nm进行检测,OD450减OD620读取结果(以下均以OD450减OD620计算检测结果)。于终止反应后15分钟内完成检测。

[0154] (10)、标准曲线的建立

[0155] 猴IL-18标准品的浓度为横坐标,相应的OD值(以下均指OD450减OD620)为纵坐标,做得相应的标准曲线,计算出标准曲线的线性回归方程式(计算时忽略零浓度标准品)。将样本的OD值代入方程式计算出其IL-18浓度。

[0156] 2、实验结果

[0157] 检测结果见表1和图2~3,本发明提供的检测方法的标准曲线的回归方程为 $y = 0.1023x + 0.0271$ ($R^2 = 0.9992$);选择二步法得到的标准曲线的回归方程为 $y = 0.0647x +$

0.0853 ($R^2=0.9993$)。本发明提供的检测方法相对于传统二步法OD值高,并且可以节省原材料的用量。

[0158] 表1:

抗原 ng/ml	二步法			实施例 1		
	1	2	平均值	1	2	平均值
0.625	0.103	0.087	0.095	0.073	0.07	0.0715
1.25	0.148	0.144	0.146	0.139	0.132	0.1355
2.5	0.254	0.234	0.244	0.281	0.25	0.2655
5	0.436	0.417	0.4265	0.533	0.519	0.526
10	0.729	0.744	0.7365	1.088	1.03	1.059
20	1.382	1.365	1.3735	2.092	2.056	2.074

[0160] 实施例4封闭液的选择优化

[0161] 1、实验方法

[0162] 封闭液分别选择含2%和3%BSA的pH7.4磷酸缓冲液,其余部分与实施例1相同。构建检测猴IL-18的酶联免疫试剂盒,按照实施例1的方法检测标准品(重组猴IL-18蛋白)。分别将标准品用稀释液稀释至0、5、10、和20ng/ml进行检测。

[0163] 2、实验结果

[0164] 结果见表2和图4、图5所示,选择2%BSA的pH7.4磷酸缓冲液作为封闭液得到的标准曲线为: $y=0.1181x+0.0372$ ($R^2=0.9867$);选择3%BSA的pH7.4磷酸缓冲液作为封闭液得到的标准曲线为: $y=0.1117x+0.0251$ ($R^2=0.9971$)。由此可知,选择3%BSA的pH7.4磷酸缓冲液作为封闭液获得的线性方程 $R^2>0.99$,并且空白样本的检测值更低,检测方法更加准确。

[0165] 表2:

抗原 ng/ml	2% BSA			3% BSA		
	1	2	平均值	1	2	平均值
0	0.025	0.026	0.0255	0.015	0.016	0.0155
5	0.529	0.534	0.5315	0.538	0.555	0.5465
10	1.371	1.401	1.386	1.173	1.261	1.217
20	2.36	2.319	2.3395	2.348	2.114	2.231

[0167] 实施例5稀释液的选择优化

[0168] 1、实验方法

[0169] 稀释液分别选择1%干酪素钠的磷酸缓冲液和1%BSA的PBS缓冲液,其余部分与实施例1相同。构建检测猴IL-18的酶联免疫试剂盒,按照实施例1的方法检测标准品(重组猴

IL-18蛋白)。分别将标准品用稀释液稀释至0、5、10、和20ng/ml进行检测。

[0170] 2、实验结果

[0171] 结果见表3、表4和图6、图7所示,选择1%干酪素钠的磷酸缓冲液得到的标准曲线的回归方程为 $y=0.1002x-0.0226$ ($R^2=1$);选择1%BSA的PBS缓冲液得到的标准曲线的回归方程为 $y=0.1098x+0.2125$ ($R^2=0.9638$)。由此可知,选择1%干酪素钠的磷酸缓冲液作为稀释液获得的线性方程 R^2 更大,检测方法更加准确。

[0172] 表3:选择1%干酪素钠的PBS缓冲液做稀释液

[0173]	抗原 ng/ml	1	2	平均值
	0	0.026	0.025	0.026
[0174]	5	0.528	0.522	0.525
	10	1.035	0.997	1.016
	20	2.132	1.927	2.030

[0175] 表4:选择1%BSA的PBS缓冲液做稀释液

[0176]	抗原 ng/ml	1	2	平均值
	0	0.028	0.03	0.029
	5	0.898	0.861	0.880
	10	1.493	1.508	1.501
	20	2.259	2.309	2.284

[0177] 实施例6试剂盒主要参数的测定

[0178] 一、试剂盒的线性范围

[0179] 1、实验方法

[0180] 将IL-18冻干标准品用1%干酪素钠稀释成20ng/mL, 10ng/mL, 5ng/mL, 2.5ng/mL, 1.25ng/mL, 0.625ng/mL和0ng/mL,使用实施例1中的酶联免疫试剂盒,按照实施例1中的方法进行检测。

[0181] 2、实验结果

[0182] 当IL-18冻干标准品的浓度在0.625~20ng/mL间时,获得的线性回归方程的其线性相关系数为0.99以上,即该试剂盒的线性范围为0.625~20ng/mL。

[0183] 二、试剂盒的特异性

[0184] 1、实验方法

[0185] 将重组的非人灵长类CX3CL1、CXCL10、CCL17、CXCL13、PD-1、TWEAK、TRAIL、CXCL12、CXCL7稀释至2μg/mL,使用实施例1中的酶联免疫试剂盒,按照实施例1中的方法进行检测。

[0186] 2、实验结果

[0187] 结果显示,该试剂盒与非人灵长类CX3CL1、CXCL10、CCL17、CXCL13、PD-1、TWEAK、TRAIL、CXCL12、CXCL7没有可见的交叉反应。

[0188] 三、试剂盒的灵敏度

[0189] 1、实验方法

[0190] 使用实施例1中的酶联免疫试剂盒,检测16个空白样品的平均吸光值加上两倍标准偏差,计算IL-18的含量。

[0191] 2、实验结果

[0192] 结果显示,最低检测限为灵敏度为99.7pg/mL。说明本试剂盒有较高的检测灵敏度。

[0193] 四、试剂盒精密度

[0194] (I) 试验内精密度

[0195] 1、实验方法

[0196] 选取了4组样品,每组含有两个不同浓度(10ng/mL和2.5ng/mL),每个浓度有10个重复,分别计算检测结果的变异系数(C.V)。

[0197] 2、实验结果

[0198] 结果见表5,平均变异系数为2.56%。

[0199] 表5:

[0200]

样品编号	1		2		3		4	
重复数	10	10	10	10	10	10	10	10
标准品平均含量 ng/ml	9.904	2.319	9.340	2.239	10.336	2.293	10.264	2.523
标准偏差	0.705	0.122	0.623	0.109	0.615	0.164	0.857	0.213
变异系数%	7.12	5.24	6.66	4.88	5.95	7.16	8.35	8.46

[0201] (II) 试验间精密度的测定

[0202] 1、实验方法

[0203] 选取了两个不同浓度(10ng/mL和2.5ng/mL),每个浓度有10个重复,进行了3次实验,计算3批次检测结果的变异系数(C.V)。

[0204] 2、实验结果

[0205] 结果见表6,平均变异系数为7.96%。

[0206] 表6:

[0207]	标准品平均含量 ng/ml	9.198	2.439
	标准偏差	0.843	0.165
	变异系数%	9.16	6.75

[0208]

[0209] 五、试剂盒回收率

[0210] 1、实验方法

[0211] 将3个不同浓度(20ng/mL, 10ng/mL和5ng/mL)的重组蛋白IL-18分别添加到食蟹猴血清和RPMI 1640培养基中使用实施例1中的酶联免疫试剂盒,按照实施例1中的方法进行检测,计算各个浓度的回收率。

[0212] 2、实验结果

[0213] 在食蟹猴血清基质中的平均回收率为31.8%, RPMI 1640培养基中的平均回收率为158.33%。

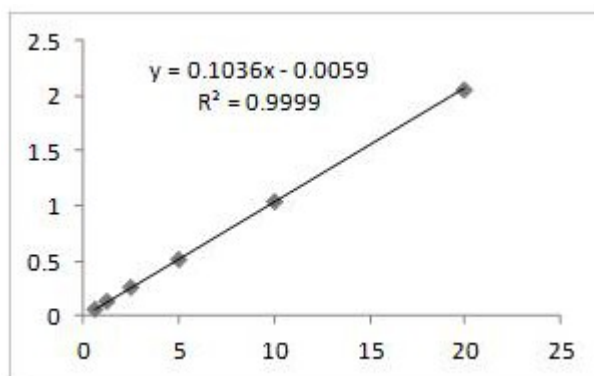


图1

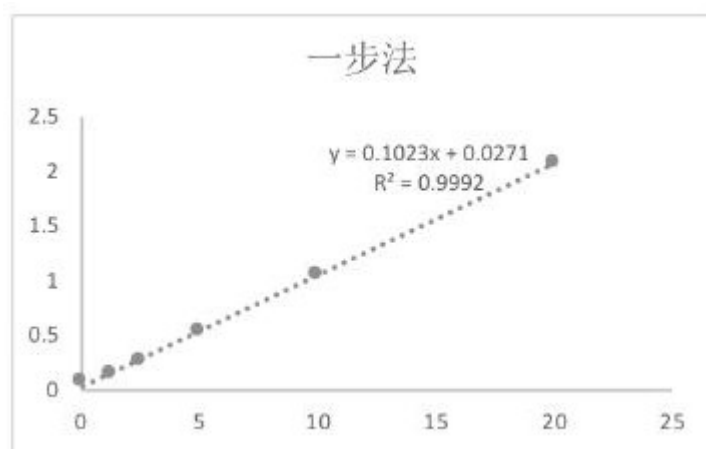


图2

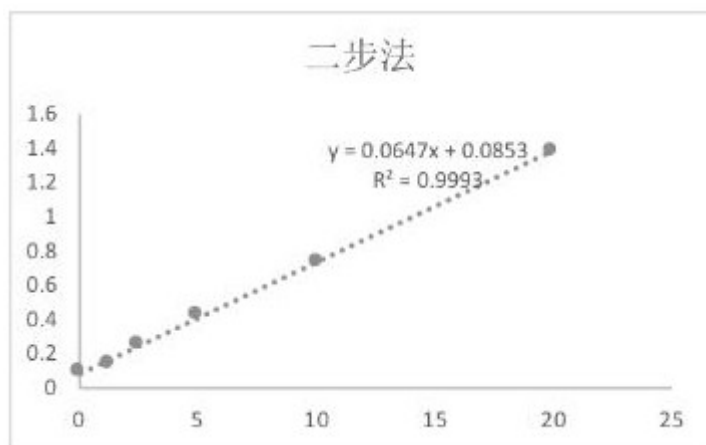


图3

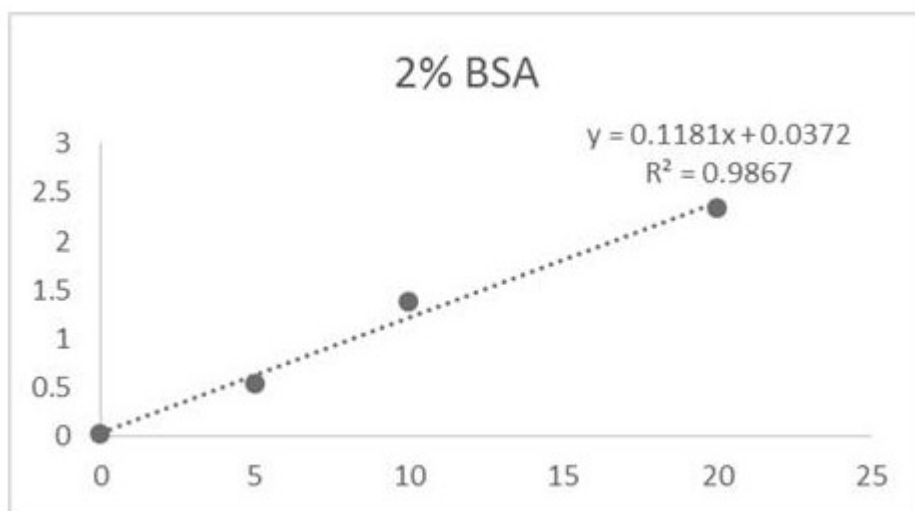


图4

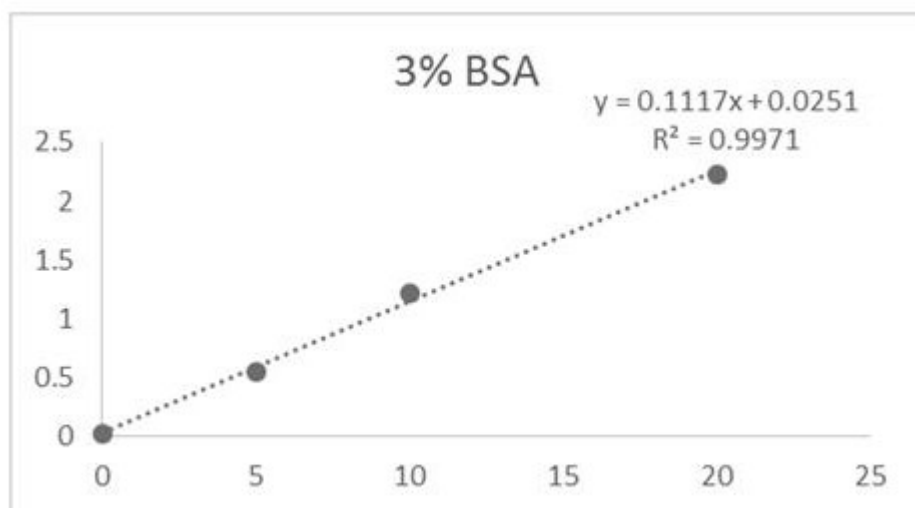


图5

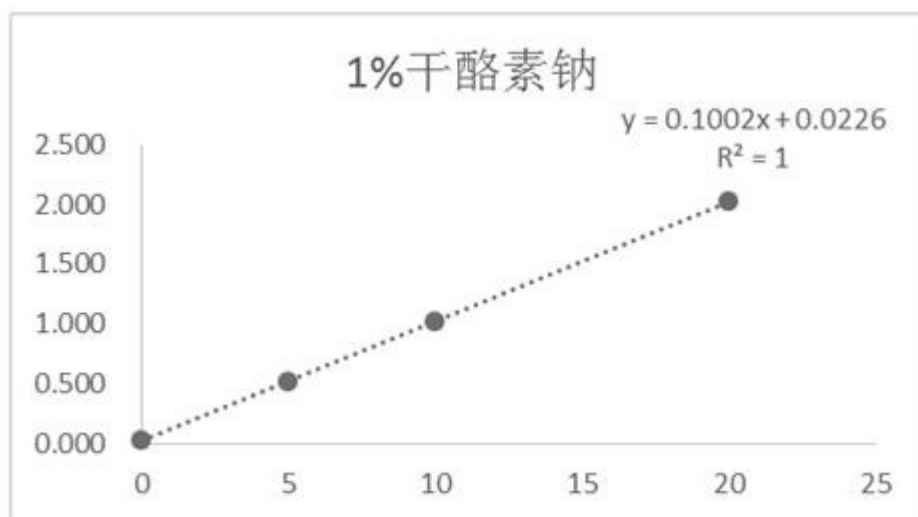


图6

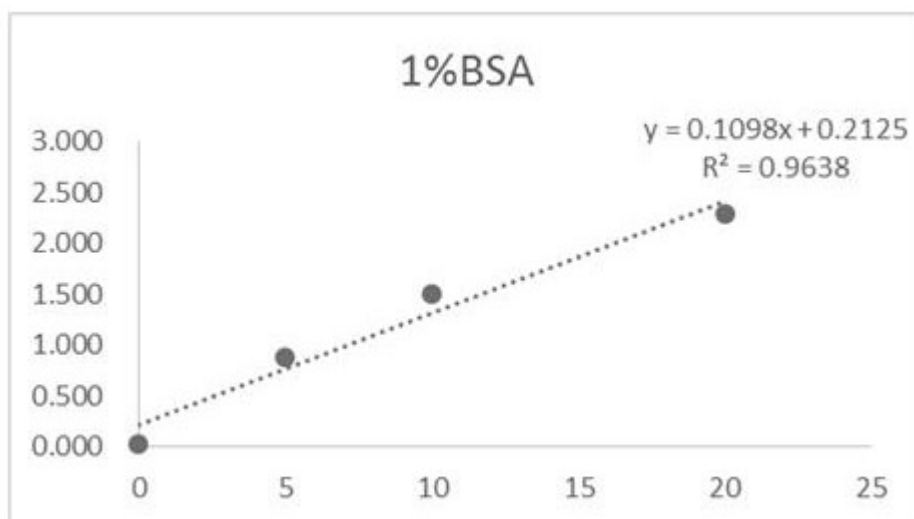


图7

专利名称(译)	一种检测猴IL-18的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN109870570A	公开(公告)日	2019-06-11
申请号	CN201811647624.7	申请日	2018-12-29
[标]发明人	毕利军 朱国峰 张晓莉 姚青青 李燕 黄健乐		
发明人	毕利军 朱国峰 张晓莉 温婧婷 姚青青 李燕 黄健乐 苏欣莹		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/535 G01N33/577 G01N33/569 G01N33/536 G01N21/31		
代理人(译)	冯振宁		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测猴IL-18的双抗夹心酶联免疫试剂盒，包括由捕获抗体包被的酶标板、检测抗体、稀释液、浓缩洗涤液、偶联物、显色液、终止液和标准品；其中，捕获抗体为IL-18的单克隆抗体；检测抗体为生物素标记的IL-18多克隆抗体；稀释液为0.5~4%干酪素钠的pH7.4磷酸缓冲液；捕获抗体包被在酶标板上，以质量分数1~5%牛血清白蛋白的pH7.4磷酸缓冲液作为封闭液进行抗体封闭；标准品为IL-18蛋白。本发明采用三明治法半定量ELISA的检测样品的IL-18的水平，检测方法操作简单，结果准确度高，能够检测大批量的样品。适用于科研领域非临床诊断目的的针对猴IL-18的特异性检测，有很大的推广应用价值。

