



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109870571 A

(43)申请公布日 2019.06.11

(21)申请号 201811647660.3

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)

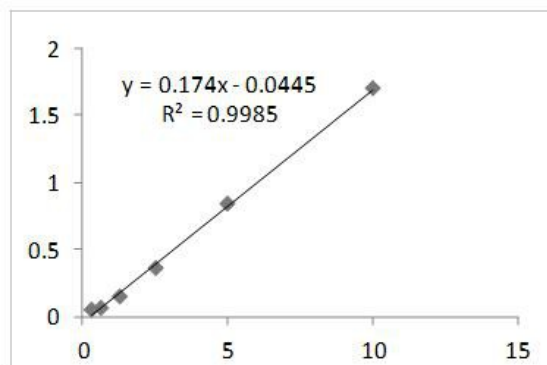
权利要求书2页 说明书10页 附图3页

(54)发明名称

一种检测猴G-CSF的酶联免疫试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种检测猴G-CSF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G-CSF的单克隆抗体;检测抗体为生物素标记的G-CSF多克隆抗体;稀释液为0.5~2%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1~4%干酪素钠的pH7.4磷酸缓冲液作为封闭液进行抗体封闭;标准品为G-CSF蛋白。本发明采用三明治法半定量ELISA的检测样品的G-CSF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G-CSF的特异性检测,有很大的推广应用价值。



1. 一种检测猴G-CSF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G-CSF的单克隆抗体;

检测抗体为生物素标记的G-CSF多克隆抗体;

稀释液为0.5~2%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1~4%干酪素钠的pH7.4磷酸缓冲液作为封闭液进行抗体封闭;

标准品为G-CSF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G-CSF抗原包被在酶标板上,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S1包被后的酶标板;

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0.625~5 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2.5 μ g/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1 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1~4%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酶标记的链霉亲和素;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,其特征在于,包括以下步骤:

S21. 向酶标板中加入检测抗体;

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G-CSF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G-CSF的酶联免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 集落刺激因子(Colony stimulating factor,CSF),是一类可刺激不同的造血干细胞在半固体培养基中形成细胞集落的细胞因子。根据集落刺激因子的作用范围,分别命名为粒细胞CSF(G-CSF),巨噬细胞CSF(M-CSF),粒细胞和巨噬细胞CSF(GM-CSF)和多能集落刺激因子(multi-CSF,又称IL-3)。它们对不同发育阶段的造血干细胞起促增殖、分化的作用,是血细胞发生必不可少的刺激因子。粒细胞集落刺激因子(G-CSF)主要由内毒素、TNF- α 和IFN- γ 可活化单核细胞和巨噬细胞产生,具有刺激粒系母细胞的增殖和分化,并可增强成熟粒细胞功能的作用。它在抗感染的非特异性细胞免疫过程中起重要作用。当化脓菌或其毒素侵人人人体时,G-CSF在血清或体液中迅速升高,并在感染得到控制后又降至正常水平。在科研领域,非临床诊断目的的粒细胞集落刺激因子(G-CSF)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G-CSF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G-CSF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G-CSF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G-CSF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G-CSF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G-CSF的含量。

[0007] 一种检测猴G-CSF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;

[0008] 其中,捕获抗体为G-CSF的单克隆抗体;

[0009] 检测抗体为生物素标记的G-CSF多克隆抗体;

[0010] 稀释液为0.5~2%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1~4%干酪素钠的pH7.4磷酸缓冲液作为封闭液进行抗体封闭;

[0012] 标准品为G-CSF蛋白。

[0013] 优选地,捕获抗体为抗人G-CSF的单克隆抗体。

[0014] 优选地,检测抗体为生物素标记的G-CSF羊多克隆抗体。

- [0015] G-CSF蛋白为NCBI Reference Sequence:XP_001095097.1。
- [0016] G-CSF蛋白为大肠杆菌表达的G-CSF。
- [0017] 优选地,标准品为G-CSF蛋白冻干品。
- [0018] 优选地,捕获抗体G-CSF抗原包被在酶标板上,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包被后的酶标板;
- [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0.05%吐温20的PBS洗涤S1的酶标板。
- [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0.625~5μg/ml,包被量为50~300μL。
- [0032] 更优选地,捕获抗体的包被浓度为2.5μg/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] 更优选地,检测抗体的使用浓度为1μg/ml,使用量为50μL。
- [0035] 优选地,浓缩洗涤液为含有体积分数1~4%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0.5%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0.1~1.0μg/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,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分别加入对应的孔内,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50~300 μ L/孔。
- [0055] 更优选地, 步骤S21中, 加入检测抗体的量为50 μ L/孔。
- [0056] 优选地, 步骤S22中, 加入抗原或待测样本的量为50~300 μ L/孔。
- [0057] 更优选地, 步骤S22中, 加入抗原或待测样本的量为50 μ L/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200~400 μ L/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300 μ L/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50~200 μ L/孔。
- [0063] 更优选地, 步骤S24中, 加入偶联物的量100 μ L/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, 洗涤预包被为洗涤液200~400 μ L/孔, 洗涤2~6次, 每次20~60秒, 拍干。
- [0067] 更优选地, 步骤S25中, 洗涤酶标板为洗涤液300 μ L/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50~200 μ L/孔。
- [0069] 更优选地, 步骤S26中, 加入显色液的量100 μ L/孔。
- [0070] 优选地, 步骤S26中, 显色时间为5~30min。
- [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25~100 μ L/孔。
- [0073] 更优选地, 步骤S27中, 加入终止液的量50 μ L/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G-CSF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G-CSF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G-CSF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G-CSF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G-CSF标准品标准曲线。
- [0079] 图4为实施例4中选择2%干酪酸钠的pH7.4磷酸缓冲液作为封闭液得到的猴G-CSF标准品标准曲线。
- [0080] 图5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G-CSF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G-CSF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G-CSF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R&D (MEDICAL&BIOLOGICAL LABORATORIES CO.,LTD) 公司货号为MAB214-500的抗人G-CSF的单克隆抗体作为捕获抗体,R&D (MEDICAL&BIOLOGICAL LABORATORIES CO.,LTD) 公司货号为BAF214的羊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G-CSF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G-CSF的单克隆抗体;

[0088] 检测抗体为生物素标记的羊多克隆抗体;

[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pH7.4,工作浓度需要稀释20倍;

[0090] 偶联物:辣根过氧化酶标记的链霉亲和素,工作浓度稀释2000×为0.25μg/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G-CSF蛋白冻干标准品。

[0095] 其中,包被有捕获抗体的酶标板是按照一下方法制备的:

[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2.5μg/mL,100μL/孔,4℃包被过夜。

[0098] 2、封闭

[0099] 倾倒板内液体,用含有0.05%吐温20的pH7.4的PBS洗涤2次,300μL/孔。拍干。加入封闭液 (2%干酪素钠的pH7.4磷酸缓冲液),300μL/孔,室温封闭4小时。倾倒板内液体,拍干。

[0100] 3、干燥

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

[0102] 二、使用方法

[0103] 1、加样

[0104] 加入浓度为1μg/mL生物素标记抗体50μL/孔。然后,将上述稀释好的6个浓度梯度

10ng/mL, 5ng/mL, 2.5ng/mL, 1.25ng/mL, 0.625ng/mL和0.3125ng/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G-CSF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G-CSF浓度。

[0119] 实施例2一种检测猴G-CSF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G-CSF的捕获抗体稀释至浓度为5 μ g/mL、2.5 μ g/mL、1.25 μ g/mL和0.625 μ g/mL, 抗G-CSF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G-CSF蛋白稀释至10ng/mL、5ng/mL和2.5ng/mL, 按照实施例1进行检测。

[0123] 2、实验结果

[0124] 综合分析空白孔OD读值小于0.1和信噪比值, 选择抗体的包被浓度为2.5 μ g/mL, 检测抗体浓度为1 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2.5 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pH7.4的PBS洗涤2次, 300 μ L/孔。拍干。加入封闭液 (2%干酪素钠的磷酸缓冲液), 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、0.625、1.25、2.5、5和10ng/ml进行检测。二步法的具体检测步骤如下:

[0135] (1)、加入抗原

[0136] 将上述稀释好的标准品,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。

[0137] (2)、洗涤

[0138] 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。

[0139] (3)、加入检测抗体

[0140] 加入浓度为1μg/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。

[0141] (4)、洗涤

[0142] 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。

[0143] (5)、偶联物

[0144] 100μL/孔加入偶联物,盖上封板膜,轻轻振荡混匀,室温孵育30min。

[0145] (6)、洗涤

[0146] 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。

[0147] (7)、显色

[0148] 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。

[0149] (8)、终止

[0150] 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)。

[0151] (9)、检测

[0152] 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。

[0153] (10)、标准曲线的建立

[0154] 猴G-CSF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G-CSF浓度。

[0155] 2、实验结果

[0156] 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 $y = 0.2003x + 0.0084$ ($R^2 = 0.9905$);选择二步法得到的标准曲线的回归方程为 $y = 0.122x + 0.0194$ ($R^2 = 0.9951$)。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。

[0157] 表1:

抗原 ng/ml	实施例 1			二步法		
	1	2	平均值	1	2	平均值
0	0.042	0.049	0.0455	0.037	0.032	0.0345
0.625	0.124	0.133	0.1285	0.068	0.065	0.0665
1.25	0.184	0.17	0.177	0.129	0.125	0.127
2.5	0.432	0.429	0.4305	0.29	0.291	0.2905
5	0.958	1.007	0.9825	0.616	0.685	0.6505
10	1.968	2.14	2.054	1.215	1.271	1.243

[0159] 实施例4封闭液的选择优化

[0160] 1、实验方法

[0161] 封闭液分别选择含2%干酪酸钠的pH7.4磷酸缓冲液和2%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G-CSF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G-CSF蛋白)。分别将标准品用稀释液稀释至0、2.5、5、和10ng/ml进行检测。

[0162] 2、实验结果

[0163] 结果见表2和图3、图4所示,选择2%干酪酸钠的pH7.4磷酸缓冲液作为封闭液得到的标准曲线为: $y=0.2276x+0.0706$ ($R^2=0.998$);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: $y=0.1362x+0.005$ ($R^2=0.996$)。由此可知,选择2%干酪酸钠的pH7.4磷酸缓冲液作为封闭液获得的线性方程 $R^2>0.99$,并且样本的检测OD值更高。

[0164] 表2:

[0165]

抗原 ng/ml	含有 2%干酪素钠 pH7.4 磷酸缓冲液			含有 2%BSA pH7.4 磷酸缓冲液		
	1	2	平均值	1	2	平均值
0	0.056	0.055	0.0555	0.046	0.044	0.045
2.5	0.587	0.645	0.616	0.303	0.314	0.3085
5	1.269	1.279	1.274	0.703	0.62	0.6615
10	2.326	2.313	2.3195	1.442	1.335	1.3885

[0166] 实施例5稀释液的选择优化

[0167] 1、实验方法

[0168] 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G-CSF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G-CSF蛋白)。分别将标准品用稀释液稀释至0、2.5、5和10ng/ml进行检测。

[0169] 2、实验结果

[0170] 结果见表3、表4和图5、图6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 $y=0.2306x+0.0627$ ($R^2=0.9996$);选择1%BSA的PBS缓冲液得到的标准曲线的回归方程为 $y=0.2429x+0.0258$ ($R^2=0.9946$)。由此可知,选择1%干酪素钠的磷酸缓冲液作为稀释液空白样本的检测值更低,获得的线性方程 R^2 更高,检测方法更加准确。

[0171] 表3:选择1%干酪素钠的PBS缓冲液做稀释液

抗原 ng/ml	1	2	平均值
0	0.049	0.052	0.0505
2.5	0.64	0.632	0.636
5	1.249	1.24	1.2445
10	2.434	2.275	2.3545

[0173] 表4:选择1%BSA的PBS缓冲液做稀释液

抗原 ng/ml	1	2	平均值
0	0.106	0.112	0.109
2.5	0.5454	0.5652	0.5553
5	1.2654	1.116	1.1907
10	2.5956	2.403	2.4993

[0175] 实施例6试剂盒主要参数的测定

[0176] 一、试剂盒的线性范围

[0177] 1、实验方法

[0178] 将G-CSF冻干标准品用1%干酪素钠稀释成10ng/mL,5ng/mL,2.5ng/mL,1.25ng/mL,0.625ng/mL,0.3125ng/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。

[0179] 2、实验结果

[0180] 当G-CSF冻干标准品的浓度在0.3125~10ng/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0.3125~10ng/mL。

[0181] 二、试剂盒的特异性

[0182] 1、实验方法

[0183] 将重组的非人灵长类与非人灵长类IL-1 α 、IL-1 β 、IL-3、IL-10、IL-16、IL-19、IL-22、IL-31、IFN- γ 、IFN- α 4、IFN- α 8、IFN- α 13、IFN- α 14、Latent TGF- β 1稀释至1 μ g/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。

[0184] 2、实验结果

[0185] 结果显示,该试剂盒与与非人灵长类与非人灵长类IL-1 α 、IL-1 β 、IL-3、IL-10、IL-16、IL-19、IL-22、IL-31、IFN- γ 、IFN- α 4、IFN- α 8、IFN- α 13、IFN- α 14、LatentTGF- β 1没有可见的交叉反应。

[0186] 三、试剂盒的灵敏度

[0187] 1、实验方法

[0188] 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G-CSF的含量。

[0189] 2、实验结果

[0190] 结果显示,最低检测限为灵敏度为67pg/mL。说明本试剂盒有较高的检测灵敏度。

[0191] 四、试剂盒精密度

[0192] (I) 试验内精密度

[0193] 1、实验方法

[0194] 选取了4组样品,每组含有两个不同浓度(5ng/mL和1.25ng/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)。

[0195] 2、实验结果

[0196] 结果见表5,平均变异系数为2.56%。

[0197] 表5:

[0198]

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	4.828	1.110	4.648	1.127	4.848	1.172	4.904	1.178
标准偏差	0.182	0.031	0.105	0.022	0.143	0.031	0.169	0.022
变异系数%	3.77	2.85	2.26	1.92	2.94	2.64	3.44	1.84

[0199] (II) 试验间精密度的测定

[0200] 1、实验方法

[0201] 选取了两个不同浓度(5ng/mL和1.25ng/ml),每个浓度有10个重复,进行了4次实验,计算4批次检测结果的变异系数(C.V)。

[0202] 2、实验结果

[0203] 结果见表6,平均变异系数为4.32%。

[0204] 表6:

[0205]	标准品平均含量 ng/ml	4.951	1.128
	标准偏差	0.223	0.046
[0206]	变异系数%	4.5	4.14

[0207] 五、试剂盒回收率

[0208] 1、实验方法

[0209] 将3个不同浓度(10ng/mL,5ng/mL和2.5ng/mL)的重组蛋白G-CSF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。

[0210] 2、实验结果

[0211] 在食蟹猴血清基质中的平均回收率为52.31%,RPMI 1640培养基中的平均回收率为73.45%。

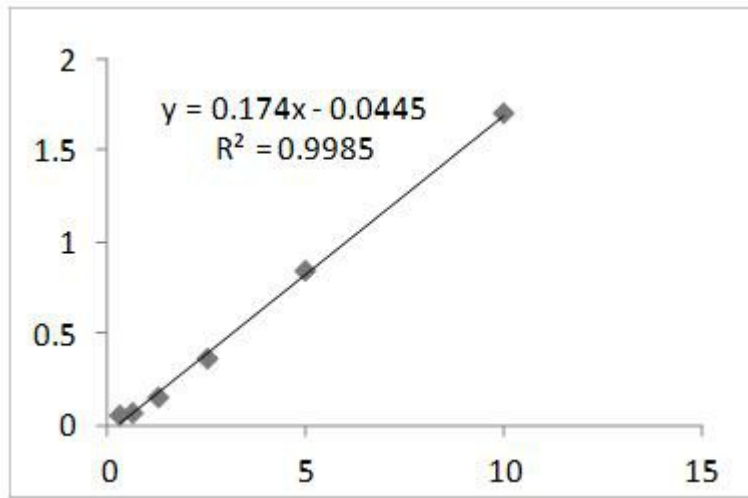


图1

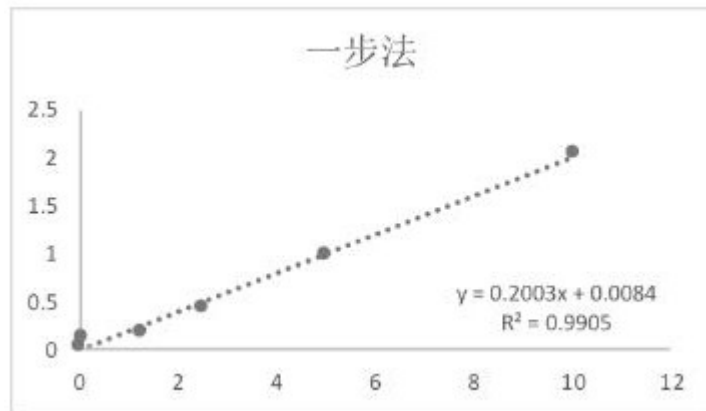


图2

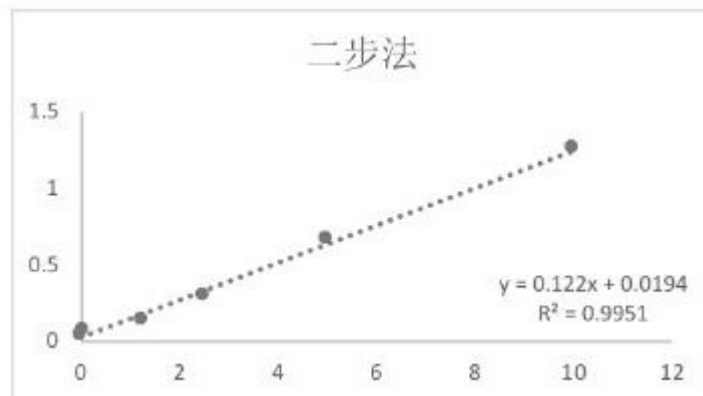


图3

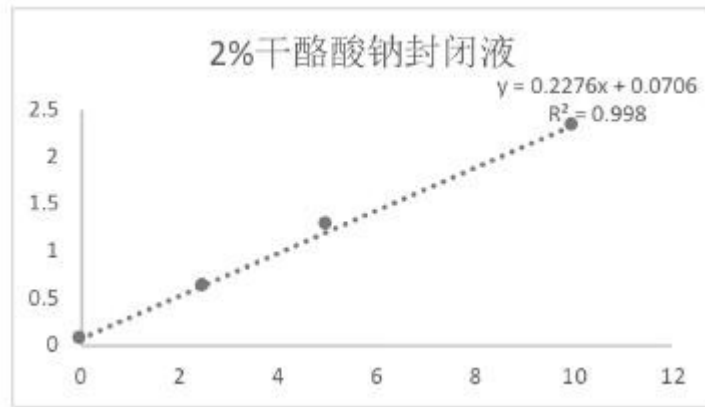


图4

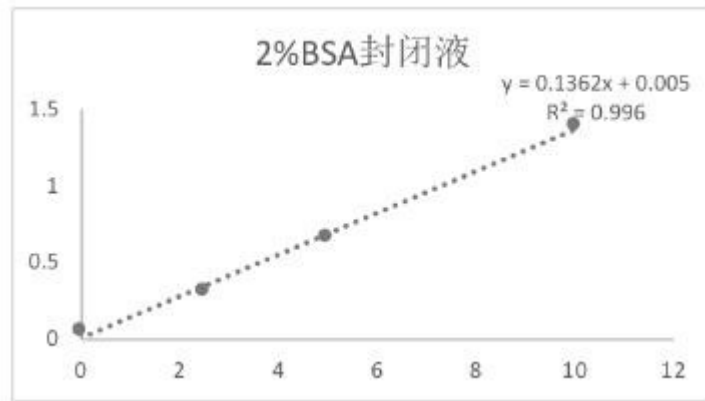


图5

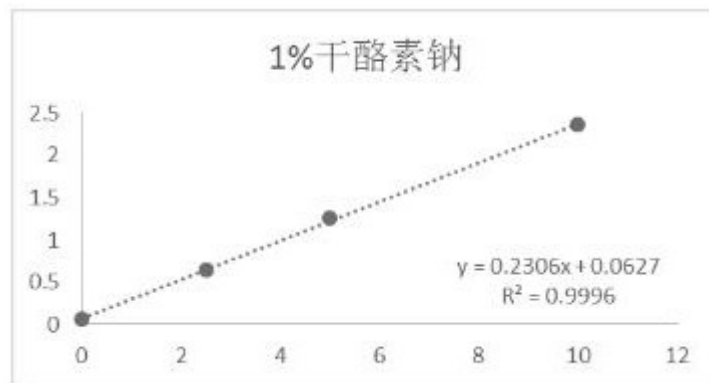


图6

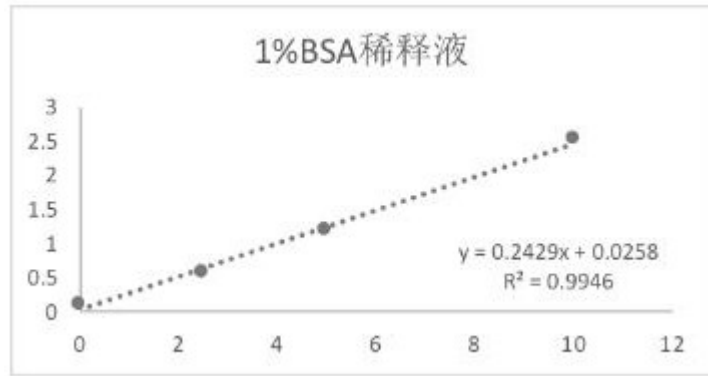


图7

专利名称(译)	一种检测猴G-CSF的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN109870571A	公开(公告)日	2019-06-11
申请号	CN201811647660.3	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)

本发明公开了一种检测猴G-CSF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G-CSF的单克隆抗体；检测抗体为生物素标记的G-CSF多克隆抗体；稀释液为0.5~2%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1~4%干酪素钠的pH7.4磷酸缓冲液作为封闭液进行抗体封闭；标准品为G-CSF蛋白。本发明采用三明治法半定量ELISA的检测样品的G-CSF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G-CSF的特异性检测，有很大的推广应用价值。

