

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810025340.4

[43] 公开日 2008年9月24日

[11] 公开号 CN 101271113A

[22] 申请日 2008.4.25

[21] 申请号 200810025340.4

[71] 申请人 南京师范大学

地址 210046 江苏省南京市亚东新城区文苑
路1号

[72] 发明人 张双全 任芳

[74] 专利代理机构 南京知识律师事务所

代理人 卢亚丽

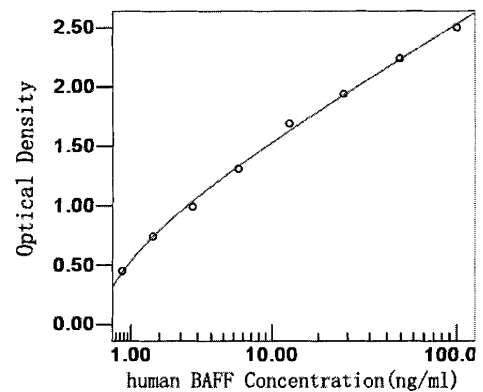
权利要求书1页 说明书8页 附图2页

[54] 发明名称

检测人B淋巴细胞刺激因子的酶联免疫试剂盒及其制备方法

[57] 摘要

本发明提供了一种检测人B淋巴细胞刺激因子(BAFF)的酶联免疫试剂盒及其制备方法。该试剂盒包括包被纯化的人BAFF的单克隆抗体的固相载体,生物素标记的人BAFF多克隆抗体、HRP标记的链酶亲和素。其制备方法包括抗原、抗体的制备,抗体的纯化,纯化抗体的标记,试剂盒的制备等步骤;本发明的试剂盒,检测灵敏度可达1ng/ml,为BAFF的研究提供了有效的检测手段。



1、一种检测人 B 淋巴细胞刺激因子的酶联免疫试剂盒，包括包括包被纯化的人 BAFF 的单克隆抗体的固相载体，生物素标记的人 BAFF 多克隆抗体、HRP 标记的链酶亲和素。

2、如权利要求 1 所述的检测人 B 淋巴细胞刺激因子的酶联免疫试剂盒，其特征在于，还包括还包括人 B 淋巴细胞刺激因子标准品蛋白、显色剂、终止液、浓缩洗涤液、样品稀释液。

3、如权利要求 2 所述的检测人 B 淋巴细胞刺激因子的酶联免疫试剂盒，其特征在于，所说的人 B 淋巴细胞刺激因子单克隆抗体为鼠源，多克隆抗体为兔源；所述浓缩洗涤液为含 1 % Tween 20 的磷酸缓冲液，显色剂由显色液 A 液和显色液 B 液组成，显色液 A 为过氧化氢，显色 B 液为邻苯二胺，反应终止液为 H₂SO₄；样品稀释液是 0.5 % BSA，0.05 % Tween 20，5mM EDTA，0.35M NaCl，pH 7.2 的 PBS。

4、一种制备权利要求 1 所述的检测人 B 淋巴细胞刺激因子的酶联免疫试剂盒的方法，其特征在于，包括如下步骤：

(1) 抗体的制备：用 hsBAFF 分别免疫小鼠和兔子，制备人 B 淋巴细胞刺激因子的单克隆抗体和多克隆抗体；

(2) 抗体的纯化：(1) 中所得的抗体经离心、沉淀、亲和纯化，得到纯化抗体；

(3) 抗体的标记：用生物素标记 (2) 中所得到的纯化多抗；

(4) 试剂盒的制备：用 (2) 中所得的纯化单克隆抗体包被固相载体。

检测人 B 淋巴细胞刺激因子的酶联免疫试剂盒及其制备方法

技术领域

本发明涉及生物技术领域，更具体地说是涉及检测人 B 淋巴细胞刺激因子的酶联免疫试剂盒及其制备方法。

相关领域描述

B 淋巴细胞刺激因子(B cell activating factor belonging to the TNF family, BAFF)又称为 BlyS (B lymphocyte stimulator)、THANK (TNF homology that activates apoptosis, nuclear factor- κ B and c-Jun NH2-terminal kinase)、及 TALL-1 (TNF-and apoptosis ligand-related leukocyte-expressed ligand 1), 是肿瘤坏死因子超家族 (TNF) 的第 17 位成员, 它能与 B 淋巴细胞特异结合并诱导其增殖、分化并分泌 IgG、IgA 和 IgM 等免疫球蛋白, 在体液免疫反应中发挥着重要作用。现已确定, BAFF 与多种自身免疫性疾病的发病机理有关, 包括自系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、干燥综合症等。

人 BAFF (GenBank 序列号: AF116456) 全长为 285 个氨基酸, 其中 47-73 氨基酸为跨膜区, 74-285 氨基酸为胞外区, 通常在某些特定的蛋白酶(如弗林蛋白酶)的作用下发生水解, 形成可溶性功能片段 sBAFF(C 端 A134-L285)。BAFF 的空间结构具有如下特点: 单体呈楔形 (wedge-like) 样的 β “三明治”结构, 由两个平行的 β 折叠片层组成, 分别含有 5 条 β 折叠股; BAFF 以同源三聚体的形式发挥生物学作用。BAFF 与肿瘤坏死因子家族的另一个成员: 增值诱导配体 (a proliferation inducing ligand, APRIL) 具有高度的同源性。

文献广泛报道, 自身免疫性疾病如红斑狼疮、类风湿性关节炎、系统性干燥症等病人体内 B 淋巴细胞刺激因子 (BAFF) 含量升高; 最新的研究发现, 淋巴瘤、自身免疫性肝炎、HIV 病人体内 BAFF 含量也升高。因此研制高灵敏度的人 BAFF 检测试剂盒, 对于愈后指标检测等是极为必要的。

发明内容

本发明的目的是提供一种检测人 B 淋巴细胞刺激因子 (BAFF) 的酶联免疫试剂盒。

本发明的另一目的在于提供上述试剂盒的制备方法。

本发明的检测人 B 淋巴细胞刺激因子的酶联免疫试剂盒，包括包被纯化的人 BAFF 的单克隆抗体的固相载体，生物素标记的人 BAFF 多克隆抗体、HRP 标记的链酶亲和素。

上述的检测人 B 淋巴细胞刺激因子的酶联免疫试剂盒，其中固相载体是常规的，优选 96 孔聚苯乙烯酶标板。所说的人 B 淋巴细胞刺激因子单克隆抗体为鼠源，多克隆抗体为兔源。人 B 淋巴细胞刺激因子标准品为大肠杆菌重组表达后纯化的产物。

为了方便使用，所说的试剂盒还包括人 B 淋巴细胞刺激因子标准品蛋白、显色剂、终止液、浓缩洗涤液、样品稀释液。

所述浓缩洗涤液为含 1% Tween 20 的磷酸缓冲液，显色剂由显色液 A 液和显色液 B 液组成，显色液 A 为过氧化氢，显色 B 液为邻苯二胺(OPD)，反应终止液为 H₂SO₄；样品稀释液是 0.5% BSA，0.05% Tween 20，5mM EDTA，0.35M NaCl，pH 7.2 的 PBS。

本发明的检测人 B 淋巴细胞刺激因子的酶联免疫试剂盒的制备方法，包括如下步骤：

(1) 抗原的制备：将克隆的人 B 淋巴细胞刺激因子基因在大肠杆菌中表达，得到的融合蛋白，经纯化后作为抗原；

(2) 抗体的制备：将 (1) 中的抗原免疫兔制备特异性的人 B 淋巴细胞刺激因子多克隆抗体；复苏分泌人 B 淋巴细胞刺激因子单克隆抗体的杂交瘤细胞并注射入小鼠腹腔，收集腹水，制备人 B 淋巴细胞刺激因子单克隆抗体；

(3) 抗体的纯化：(2) 中所得的人 B 淋巴细胞刺激因子多克隆抗体和单克隆抗体分别经离心、沉淀、亲和层析，得到纯化抗体；

(4) 抗体的标记：用生物素标记(3) 中所得到的纯化多克隆抗体；

(5) 试剂盒的制备：用(3) 中所得的纯化单克隆抗体包被固相载体。

本发明的试剂盒的使用方法，包括以下操作步骤：

(1) 将检测样本与固定于固相支持物的捕捉试剂接触和保温。其中捕捉试剂是抗人 BAFF 的单克隆抗体。

(2) 将检测抗体与结合于捕捉抗体上的检测样本接触和保温。检测抗体为生

物素标记的抗人 BAFF 的多克隆抗体。

(3) 用 HRP 标记的链酶亲和素特异性地捕捉结合于检测抗体上的生物素, 并用显色剂显色, 从而测定结合于捕捉抗体的 BAFF 水平。

本发明建立了双抗体夹心法测定样品中 B 淋巴细胞刺激因子水平, 测定灵敏度可达 1 ng/ml, 为 B 淋巴细胞刺激因子检测提供了有效的检测手段。

附图描述

图 1 是人 BAFF 可溶性区段基因的表达结果。BL21(DE3)/ pET30a-hsBAFF 菌经诱导后超声破碎细胞, 用包涵体洗涤液洗涤包涵体, 取样进行 12% SDS-PAGE, 考马斯亮蓝 R250 染色, 结果如图所示, 大部分杂蛋白被洗去。割胶回收目的条带可用作抗原。1 Marker; 2 诱导前全菌; 3 诱导后全菌; 4 包涵体。

图2 是人BAFF多克隆抗体的纯化结果。12% SDS-PAGE结果显示, 纯化后的多克隆抗体有明显的两条带, 分别为相对分子量为25 000 KDa左右的轻链和相对分子量为50 000 KDa左右的重链。1 Marker; 2 多抗血清; 3-4 纯化后抗体

图 3 是人 BAFF 单克隆抗体的纯化结果。小鼠腹水纯化后, 12% SDS-PAGE 结果如图所示, 纯化后的多克隆抗体有明显的两条带, 分别为相对分子量为 25 000 KDa 左右的轻链和相对分子量为 50 000 KDa 左右的重链。M Marker; 1 纯化前腹水; 2-3 纯化后单克隆抗体

图 4 是人 BAFF 双抗体夹心法检测的标准曲线。实验数据运用 SPSS 软件分析进行拟合分析, 结果如图所示, 在 1-100 ng/ml 之间, 曲线性较好 $R^2=0.995$ 。回归曲线方程为: $Y=0.534 + 0.433 \ln X$

具体实施方式

下面结合实施例对本发明作进一步说明, 但不以任何形式限制本发明。

大肠杆菌 BL21/pET 30a-hsBAFF 由申请人保存, 可向公众提供, 其构建参见 (P. Cao et al. / Protein Expression and Purification 41 (2005) 199–206)。

实施例 1、抗体的制备

1 多克隆抗体的制备

(1) 抗原制备

在大肠杆菌BL21/pET 30a-hsBAFF中诱导表达hsBAFF 基因, 超声破碎细胞

后收集包涵体。用包涵体溶解液(8 M 尿素, 20 mM Tris-Cl, pH 8.3, 1 mM EDTA, 5 mM β -巯基乙醇) 4 °C 过夜溶解包涵体, 离心取上清, 加入不含 β -巯基乙醇的上样缓冲液(注意: 样品不用煮沸), 进行12% SDS-PAGE。电泳结束后, 去离子水清洗凝胶, 用冰冻的0.25 mol/l KCl显色, 目的条带相应位置呈现乳白色。切割目的条带并充分碾磨, 装入2 ml 注射器, 准备免疫。结果如图1所示。

(2) 免疫方案

免疫方法为腹部皮下多点注射抗原, 每次免疫量为1 mg。每隔15天免疫一次, 第三次免疫结束10天后, 耳静脉采血检测抗血清效价, 若效价大于30, 000, 准备收集血清; 若效价小于30, 000, 加强免疫一次。

(3) 分离抗血清

心脏采血, 将血液在37 °C放置2 小时后, 转移到4 °C冰箱过夜, 收集析出液, 离心, 上清即为多抗血清。分装血清, -70 °C保存。

2 单克隆抗体的制备

采用体内诱生法制备单克隆抗体。复苏分泌人 B 淋巴细胞刺激因子单克隆抗体的杂交瘤细胞, 并用 RPMI 1640 培养液大量培养。取 6-8 周龄的 Bal b/c 小鼠每只腹腔注射 0.5 ml 石蜡油, 1 周后每只小鼠注射 1×10^6 杂交瘤细胞。待小鼠腹部明显膨大到一定成度时, 抽取腹水, 反复收集数次。腹水经 12, 000 g 离心 20 min 后, 分装 -70 °C 保存。

实施例 2、抗体的纯化及标记

1 多克隆抗体的纯化

(1) 50%饱和硫酸铵沉淀样品: 多抗血清中加入 1/10 体积 1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 然后一边搅拌一边加入等体积的饱和硫酸铵溶液, 4°C, 搅拌 4 小时。12, 000rpm 离心 20 分钟, 弃上清, 用最小体积的磷酸盐缓冲液, pH 7.4 (PBS) 溶解沉淀。

(2) 33%饱和硫酸铵沉淀样品: 把上述溶液中加入 1/10 体积 1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 然后一边搅拌一边加入 1/2 体积的饱和硫酸铵溶液, 4°C, 搅拌 4 小时。12, 000 rpm 离心 20 分钟, 弃上清, 用最小体积的 PBS 溶解沉淀。重复一次。

(3) 脱盐: 用 PBS 透析上述溶液, 中间换三次液。

(4) 利用 Biologic LP 层析系统, 样品液以 0.5 ml/min 流速上样至结合缓冲液(20mM 磷酸钠, pH 7.4, 150mM NaCl)预平衡的 rProtein A Sepharose Fast Flow 亲和层析柱;

(5) 用结合缓冲液以 0.5 ml/min 流速冲洗, 至流出液 OD280 值到达基线;

(6) 用洗脱缓冲液 (100mM 甘氨酸-HCl, pH 3.0) 以 0.5 ml/min 流速洗脱抗体, 至流出液 OD280 值到达基线, 用含 1/10 柱体积的 1 mol/l Tris-HCl (pH 8.0) 的试管收集洗脱液, 将各管缓慢摇匀, 使其 pH 值恢复至中性;

(7) 取所收集的溶液 10 μ l, 进行 12% SDS-PAGE 分析。

多克隆抗体的纯化结果如图 2 所示。

2 单克隆抗体的纯化

(1) 50%饱和硫酸铵沉淀样品: 小鼠腹水中加入 1/10 体积 1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 然后一边搅拌一边加入等体积的饱和硫酸铵溶液, 4 $^{\circ}$ C, 搅拌 4 小时。12, 000rpm 离心 20 分钟, 弃上清, 用最小体积的 PBS 溶解沉淀。

(2) 脱盐: 用 PBS 透析上述溶液, 中间换三次液。

(3) 利用 Biologic LP 层析系统, 样品液以 0.5 ml/min 流速上样至结合缓冲液(20mM 磷酸钠, pH 7.4, 150mM NaCl)预平衡的 rProtein A Sepharose Fast Flow 亲和层析柱;

(4) 用结合缓冲液以 0.5 ml/min 流速冲洗, 至流出液 OD280 值到达基线;

(5) 用洗脱缓冲液 (100mM 甘氨酸-HCl, pH 3.0) 以 0.5 ml/min 流速洗脱抗体, 至流出液 OD280 值到达基线, 用含 1/10 柱体积的 1 mol/l Tris-HCl (pH 8.0) 的试管收集洗脱液, 将各管缓慢摇匀, 使其 pH 值恢复至中性;

(6) 取所收集的溶液 10 μ l, 进行 12% SDS-PAGE 分析。

单克隆抗体的纯化结果如图 3 所示。

3 间接ELISA测定纯化后抗体效价

用 10 μ g/ml hsBAFF 包被酶标板, 每孔 100 μ l, 4 $^{\circ}$ C过夜, 用洗涤缓冲液洗 3 次, 每次 3 min; 5%脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C封闭 2 h; 取纯化后单抗或者多抗梯度稀释, 每孔加入 100 μ l, 以骨髓瘤细胞培养液或者免疫前血清为阴性对照, 以抗体的稀释液为空白对照, 每个样设 3 个重复, 置 37 $^{\circ}$ C孵育 1 h, 然后洗涤; 加入 1: 1000 稀释 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体或者羊抗兔 IgG 抗体, 置 37 $^{\circ}$ C孵

育 1 h, 然后洗涤; 各反应孔中加入临时配制的显色剂溶液 100 μ l, 室温反应 20 min; 各反应孔中加入 2 M 硫酸 50 μ l; 在 ELISA 检测仪上 490 nm 读数, 以空白对照孔调零后测各孔 OD 值。

抗体效价以稀释度表示, 检测结果以 $(A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{空白}}) \geq 2.1$ 为阳性, 以阳性孔对应的最高稀释倍数为效价。间接 ELISA 测定, 纯化后单克隆抗体的效价为 10^6 ; 多克隆抗体的效价为 8×10^4 。

4 纯化多克隆抗体的标记

(1) 用无水 DMSO 配置 5mg/ml 生物素-N-羧基琥珀酸亚胺酯 (Biotin-NHS) (sigma) 溶液。

(2) 用 0.1 mol/L, pH 9.5 碳酸盐缓冲液透析纯化后多克隆抗体, 并浓缩抗体浓度至 1-3mg/ml。

(3) 按照 100 μ g/ml 的比率将生物素酯加入抗体溶液中, 混合均匀并在室温下孵育 4 小时。

(4) 每 250 μ g 生物素酯内加入 20 μ l 1 mol/L 氯化铵, 室温孵育 10 分钟。

(5) 用 0.15 mol/L PBS (pH 7.4) 充分透析上述溶液

实施例3、检测人BAFF的酶联免疫试剂盒

1 所用试剂的配置

a. BAFF标准品溶液: 1mg/ml 人BAFF标准蛋白0.5ml。

b. 浓缩洗涤液: 1% Tween 20 的磷酸盐缓冲液(0.15M, pH 7.4), 为正常使用浓度的10-15倍。

c. 样品稀释液: 0.5% BSA, 0.05% Tween 20, 5mM EDTA, 0.35M NaCl, pH 7.2 的PBS。

d. 检测抗体: 1mg/ml 生物素标记的人BAFF多克隆抗体0.2ml。

e. HRP标记的链酶亲和素 1mg/ml 0.1ml。

f. 底物显色液A液: 过氧化氢10ml。

g. 底物显色液B液: 邻苯二胺(OPD) 10ml。

h. 终止液: 2 M 硫酸, 10ml。

2 抗体最佳工作浓度的选择

应用棋盘滴定法。用包被缓冲液把BAFF 单克隆抗体稀释至2.5、5.0、10和

20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，分别在酶标板上进行包被，每一个浓度包被3个横行，洗涤；在第一个横行各包被孔中加入强阳性抗原液（200 ng/ml BAFF 蛋白溶液），在第二个横行中加入弱阳性抗原液（1 ng/ml BAFF 蛋白溶液），第三横行加入阴性对照液（样品稀释液），温育，洗涤；用样品稀释液将生物素标记BAFF 多克隆抗体稀释成4个浓度2、4、8、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。每个浓度加入两个纵行，温育，洗涤；加入1: 12 000 稀释的HRP标记的链酶亲和素，温育，洗涤；加入显色剂显色，加终止液终止反应，读取A490值。以强阳性抗原的A490值在2左右，阴性参考的A490值小于0.1的条件作为最适条件，据此选择包被抗体和生物素标记抗体的工作浓度。BAFF 单克隆抗体的最适包被浓度是10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，生物素标记多克隆抗体的最适工作浓度是8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3 抗BAFF 单克隆抗体包被板的制备

用包被缓冲液（pH 9.6 0.05 M 碳酸钠）将 hBAFF 单抗稀释至 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，酶标板每孔中加 100 μl ，4 $^{\circ}\text{C}$ 12 小时。弃去包被液，用洗涤液（PBS，pH 7.4-Tween 20，0.05 %）洗涤各孔四次，每次两分钟，随之拍干。每孔加入封闭液（2% BSA，0.01% 硫柳汞，PBS）200 μl ，4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 4 小时，随后弃去封闭液，洗涤三次，拍干，室温干燥 24 小时。干燥后的酶标板迅速真空封口包装，保存于 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 。

4 试剂盒检测操作程序

(1) 加样 用样品稀释液将hsBAFF 稀释至200 ng/ml —0.05 ng/ml ，每孔加 100 μL ；阴性对照孔，每孔加100 μL 样品稀释液。每个样设三个重复。37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 小时。用洗涤液洗涤四次。

(2) 生物素标记多克隆抗体 用样品稀释液将生物素标记抗体稀释至8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，加入样孔中，每孔100 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 温育1小时。洗涤六次。

(3) HRP-链酶亲和素 用0.1% BSA将HRP-链酶亲和素储液按1: 12000稀释，分别加入设计好的样孔中，每孔100 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 温育1小时。洗涤六次。

(4) 检测 每个样孔中加入新鲜配置的显色液 50 μL ，室温（18-25 $^{\circ}\text{C}$ ）静置 25 分钟。每个样孔中加入反应终止液（2 M H_2SO_4 ）50 μL 。在酶标仪 490 nm 下读数。

5 检测范围测定

将hsBAFF 稀释至200 ng/ml ，100 ng/ml ，50 ng/ml ，25 ng/ml ，12.5 ng/ml ，

6.3 ng/ml, 3.2 ng/ml, 1.6 ng/ml, 0.8 ng/ml, 0.4 ng/ml, 0.2 ng/ml, 0.1 ng/ml, 0.05 ng/ml, 加入到ELISA系统中进行检测。以hsBAFF 浓度为横坐标, A490为纵坐标, 运用CurveExper 1.38 ELISA标准曲线拟合软件分析并绘制标准曲线。结果如图4 所示, 在1-100 ng/ml之间, 曲线性较好 $R^2=0.995$ 。回归曲线方程为: $Y=0.534 + 0.433 \ln X$ 。

6 特异性检测

稀释hsAPRIL 至50 ng/ml, 25 ng/ml, 12.5 ng/ml, 6.3 ng/ml, 3.2 ng/ml, 1.6 ng/ml, 0.8 ng/ml, 分别加入ELISA系统中进行检测。结果表明, 即使hsAPRIL浓度达到50 ng/ml, 也没有观察到明显的交叉反应或者干扰。

7 精确度检测

批内精确度分析: 取三份已知浓度的BAFF 样品, 在同一块酶标板上检测20次, 计算变异系数 (CV)。批间精确度分析: 取已知浓度的BAFF 样品, 在多块酶标板上分别检测, 计算变异系数 (CV)。实验结果表明, 不论是批内还是批间, 变异系数 (CV) 都在10% 以内。

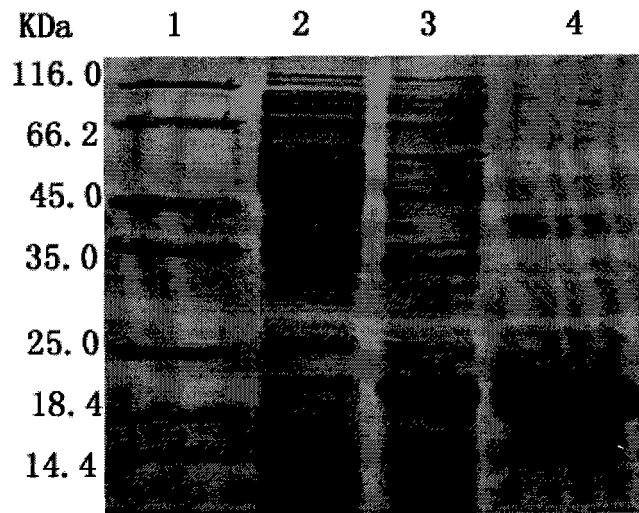


图 1

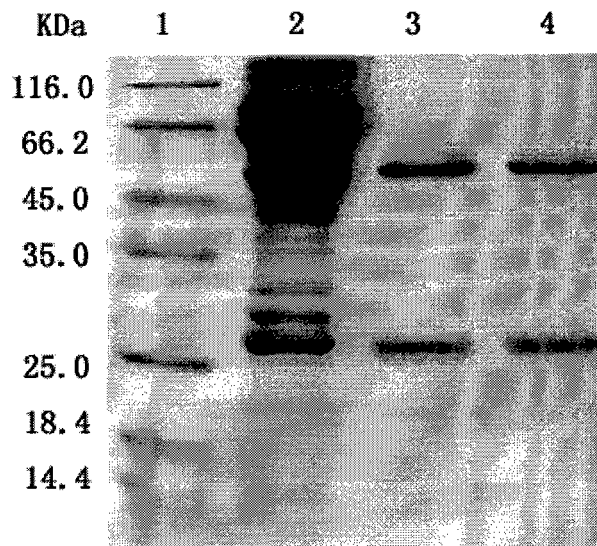


图 2

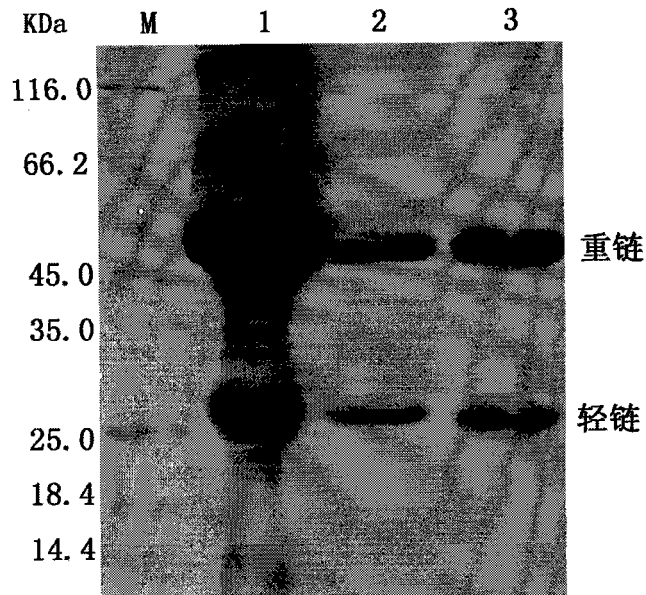


图 3

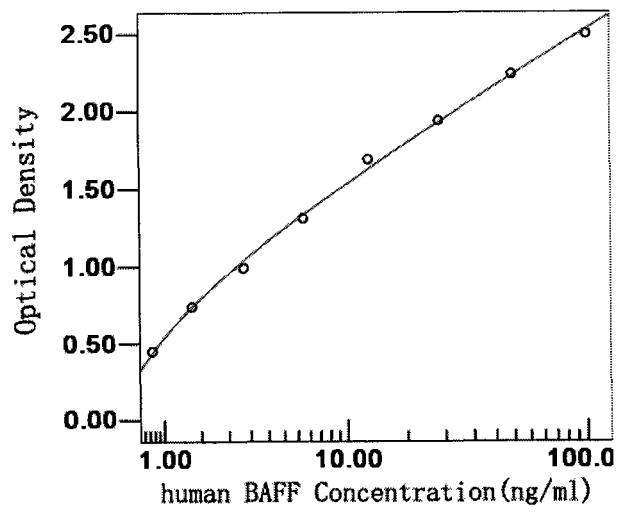


图 4

专利名称(译)	检测人B淋巴细胞刺激因子的酶联免疫试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN101271113A	公开(公告)日	2008-09-24
申请号	CN200810025340.4	申请日	2008-04-25
[标]申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
[标]发明人	张双全 任芳		
发明人	张双全 任芳		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532		
代理人(译)	卢亚丽		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测人B淋巴细胞刺激因子(BAFF)的酶联免疫试剂盒及其制备方法。该试剂盒包括包被纯化的人BAFF的单克隆抗体的固相载体，生物素标记的人BAFF多克隆抗体、HRP标记的链酶亲和素。其制备方法包括抗原、抗体的制备，抗体的纯化，纯化抗体的标记，试剂盒的制备等步骤；本发明的试剂盒，检测灵敏度可达1ng/ml，为BAFF的研究提供了有效的检测手段。

