



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101846684 A

(43) 申请公布日 2010.09.29

(21) 申请号 201010113443.3

(22) 申请日 2010.02.25

(71) 申请人 四川大学

地址 610041 四川省成都市人民南路三段
20 号四川大学华西第二医院

(72) 发明人 屈艺 母得志 毛萌 庞秋霞
魏大鹏 赵凤艳 唐军 李熙鸿
熊英 陈大鹏

(74) 专利代理机构 成都科海专利事务有限责任
公司 51202

代理人 黄幼陵

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

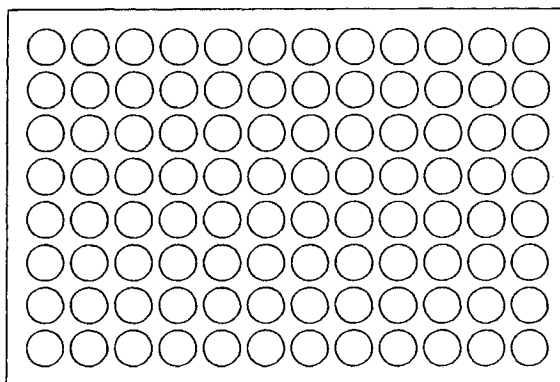
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

检测 AIB1 的双抗体夹心酶联免疫吸附试剂
盒及制备方法

(57) 摘要

一种检测 AIB1 的双抗体夹心酶联免疫吸附
测定试剂盒,由包被有 CmcAb 单克隆抗体的多孔
板、生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 检
测液、与生物素标记的单克隆抗体结合的亲和
素-辣根过氧化物酶和显色底物 3',3',5,
5'-四甲基联苯胺组成。上述试剂盒的制备方法
有以下工艺步骤:(1) 制备包被有 CmcAb 单克隆
抗体的多孔板;(2) 制备生物素标记的单克隆抗体
Biotin-NmcAb 检测液;(3) 配备亲和素-辣根过
氧化物酶和显色底物 3',3',5,5'-四甲基联
苯胺。



1. 一种检测 AIB1 的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒,其特征在於所述试剂盒由包被有 CmcAb 单克隆抗体的多孔板、生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 检测液、与生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 结合的亲和素-辣根过氧化物酶和显色底物 3', 3', 5,5' - 四甲基联苯胺组成。

2. 根据权利要求 1 所述的检测 AIB1 的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒,其特征在於所述多孔板每孔包被 CmcAb 单克隆抗体 $0.9\mu\text{g} \sim 1\mu\text{g}$ 。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的检测 AIB1 的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒,其特征在於所述生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 检测液主要由生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb、牛血清白蛋白、甘油和磷酸盐缓冲液组成,生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 的浓度为 24mg/ml ,牛血清白蛋白的浓度为 $1.5\text{g}/100\text{ml}$,甘油的浓度为 $50\text{ml}/100\text{ml}$ 。

4. 根据权利要求 3 所述的检测 AIB1 的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒,其特征在於所述生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 由生物素酰-N 羟基丁二酰亚胺酯和单克隆抗体 NmcAb 耦联而成,酰-N 羟基丁二酰亚胺酯与 NmcAb 的质量比为 $0.8 \sim 1 : 7$ 。

5. 一种检测 AIB1 的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒的制备方法,其特征在於工艺步骤如下:

(1) 制备包被有 CmcAb 单克隆抗体的多孔板

用 $\text{pH} = 8 \sim 10$ 的碳酸盐缓冲液将 CmcAb 单克隆抗体稀释为浓度 $10\mu\text{g/ml}$ 的稀释液,然后将所述 CmcAb 单克隆抗体稀释液加入多孔板的各孔内,在 4°C 包被至少 12 小时;包被时间届满后,将质量浓度 1% 的牛血清白蛋白溶液加入多孔板上的各孔并在 37°C 进行封闭反应,反应时间至少为 1 小时;封闭反应结束后,用 $\text{pH} = 7.2$ 的磷酸盐缓冲液洗涤多孔板,当多孔板上的未反应物被去除后即获得包被有 CmcAb 单克隆抗体的多孔板,其保存温度为 4°C ;

(2) 制备生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 检测液

①以 N, N- 二甲基甲酰胺为溶剂,生物素酰-N 羟基丁二酰亚胺酯为溶质配制浓度为 $50\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的酰-N 羟基丁二酰亚胺酯溶液,以 $\text{pH} = 9.6$ 的碳酸盐缓冲液为溶剂, NmcAb 单克隆抗体为溶质配制浓度为 $48\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 NmcAb 单克隆抗体溶液,将所述酰-N 羟基丁二酰亚胺酯溶液和所述 NmcAb 单克隆抗体溶液的混合液在搅拌下于室温反应至少 4 小时,即获得生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb;反应结束后,将含生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 的反应液装入透析袋中,用 $\text{pH} = 9.2$ 的磷酸盐缓冲液在 4°C 进行透析,透析时间至少为 12 小时,其间更换透析液至少 3 次;继后在透析后的所述反应液中加入牛血清白蛋白,所述牛血清白蛋白的加入量以其浓度达到 $3\text{g}/100\text{ml}$ 为限;

②将步骤①制备的含生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 和牛血清白蛋白的透析后反应液与甘油按体积比 $1 : 1$ 计量,在室温下混合均匀即形成生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 检测液,其保存温度为 -20°C ;

(3) 配备亲和素-辣根过氧化物酶和显色底物 3', 3', 5,5' - 四甲基联苯胺。

6. 根据权利要求 5 所述的检测 AIB1 的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒的制备方法,其特征在於制备包被有 CmcAb 单克隆抗体的多孔板时,所述 CmcAb 单克隆抗体稀释液的加入量为 $100\mu\text{l}/\text{孔}$,所述质量浓度 1% 的牛血清白蛋白溶液的加入量为 $120\mu\text{l}/\text{孔}$ 。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的检测 AIB1 的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒的制备方法,其特征在于制备生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 时,按酰 -N 羟基丁二酰亚胺酯与 NmcAb 单克隆抗体的质量比 = 1 : 7 量取所述酰 -N 羟基丁二酰亚胺酯溶液和所述 NmcAb 单克隆抗体溶液形成混合液。

检测 AIB1 的双抗体夹心酶联免疫吸附试剂盒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医用试剂盒领域,特别涉及一种检测甾体激素受体共活化物(amplified inbreast cancer 1,下文中简称 AIB1)的试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] AIB1 属于细胞核激素受体共激活剂 P160 家族的成员,最初发现是在乳腺癌中扩增的一种转录辅激活因子,基因定位于人染色体 20q12、鼠染色体 2H2-4。研究表明,AIB1 不仅是正常体细胞生长所必须的物质,而且对于一些肿瘤的发生发展起重要作用,如乳腺癌、子宫内膜癌、胃癌、前列腺癌、胰腺癌和卵巢癌等(见 Liao L, Kuang SQ, Yuan Y, et al. Molecular structure and biological function of the cancer-amplified nuclear receptor coactivator SRC-3/AIB1. J Steroid Biochem Mol Biol 2002,83(1-5):3-14.)。因而,AIB1 可作为肿瘤辅助诊断的指标。AIB1 的检测,现有方法主要有免疫组织化学法或免疫印迹(western-blot)法。免疫组织化学法通过一种抗体识别 AIB1,检测标本为组织切片或细胞爬片,操作步骤包括组织切片脱蜡、一抗孵育、二抗孵育和显色,配套器械和设备包括包埋机、切片机、显微镜及图像分析系统,检测时间为 12~24 小时。免疫印迹法通过一种抗体识别 AIB1,检测标本为组织细胞裂解液或体液或血液,操作步骤包括电泳样品、转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育和显色,配套器械和设备包括垂直电泳仪、电转移仪和凝胶分析仪,检测时间为 12~24 小时。上述两种方法存在的问题是操作过程复杂,检测时间长,配套设备和器械较多,特异性较差(由于只通过一种抗体识别 AIB1)。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供一种检测 AIB1 的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒及其制备方法,以便快速、简便且更特异地检测 AIB1。

[0004] 本发明所述检测 AIB1 的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒,由包被有 CmcAb(Carbon Monoclonal Antibody)单克隆抗体的多孔板、生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb(Nitric Monoclonal Antibody)检测液、与生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 结合的亲和素-辣根过氧化物酶和显色底物 3',3',5,5'-四甲基联苯胺组成。所述试剂盒中,包被有 CmcAb 单克隆抗体的多孔板、生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 检测液、亲和素-辣根过氧化物酶和 3',3',5,5'-四甲基联苯胺分别各自单独存放。

[0005] 实验表明,上述试剂盒所含包被有 CmcAb 单克隆抗体的多孔板,优选每孔包被 CmcAb 单克隆抗体 0.9 μg~1 μg。

[0006] 上述试剂盒中,所述生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 检测液主要由生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb、牛血清白蛋白、甘油和磷酸盐缓冲液组成;生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 的浓度优选 24mg/ml,牛血清白蛋白的浓度优选 1.5g/100ml,甘油的浓度优选 50ml/100ml。

[0007] 所述生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 由生物素酰 -N 羟基丁二酰亚胺酯和单克隆抗体 NmcAb 耦联而成, 酰 -N 羟基丁二酰亚胺酯与 NmcAb 的质量比优选 0.8 ~ 1 : 7。

[0008] 本发明所述检测 AIB1 的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒的制备方法, 工艺步骤如下:

[0009] (1) 制备包被有 CmcAb 单克隆抗体的多孔板

[0010] 用 pH = 8 ~ 10 的碳酸盐缓冲液将 CmcAb (Carbon Monoclonal Antibody) 单克隆抗体稀释为浓度 10 μ g/ml 的稀释液, 然后将所述 CmcAb 单克隆抗体稀释液加入多孔板的各孔内, 在 4 $^{\circ}$ C 包被至少 12 小时; 包被时间届满后, 将质量浓度 1% 的牛血清白蛋白溶液加入多孔板上的各孔并在 37 $^{\circ}$ C 进行封闭反应, 反应时间至少为 1 小时; 封闭反应结束后, 用 pH = 7.2 的磷酸盐缓冲液洗涤多孔板, 当多孔板上的未反应物被去除后即获得包被有 CmcAb 单克隆抗体的多孔板, 其保存温度为 4 $^{\circ}$ C (一般在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用);

[0011] (2) 制备生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 检测液

[0012] ①以 N, N-二甲基甲酰胺为溶剂, 生物素酰 -N 羟基丁二酰亚胺酯为溶质配制浓度为 50 μ g/ μ l 的酰 -N 羟基丁二酰亚胺酯溶液, 以 pH = 9.6 的碳酸盐缓冲液为溶剂, NmcAb 单克隆抗体为溶质配制浓度为 48 μ g/ μ l 的 NmcAb 单克隆抗体溶液, 将所述酰 -N 羟基丁二酰亚胺酯溶液和所述 NmcAb 单克隆抗体溶液的混合液在搅拌下于室温反应至少 4 小时, 即获得生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb; 反应结束后, 将含生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 的反应液装入透析袋中, 用 pH = 9.2 的磷酸盐缓冲液在 4 $^{\circ}$ C 进行透析, 透析时间至少为 12 小时, 其间更换透析液至少 3 次; 继而在透析后的所述反应液中加入牛血清白蛋白, 所述牛血清白蛋白的加入量以其浓度达到 3g/100ml 为限;

[0013] ②将步骤①制备的含生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 和牛血清白蛋白的透析后反应液与甘油按体积比 1 : 1 计量, 在室温下混合均匀即形成生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 检测液, 其保存温度为 -20 $^{\circ}$ C;

[0014] (3) 配备亲和素 - 辣根过氧化物酶和显色底物 3', 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺, 所述亲和素 - 辣根过氧化物酶和 3', 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺均为市售商品, 可直接从市场购买。

[0015] 上述方法中, 制备包被有 CmcAb 单克隆抗体的多孔板时, 所述 CmcAb 单克隆抗体稀释液的加入量为 100 μ l/孔, 所述质量浓度 1% 的牛血清白蛋白溶液的加入量为 120 μ l/孔。

[0016] 上述方法中, 制备生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 时, 按酰 -N 羟基丁二酰亚胺酯与 NmcAb 单克隆抗体的质量比 = 1 : 7 量取所述酰 -N 羟基丁二酰亚胺酯溶液和所述 NmcAb 单克隆抗体溶液形成混合液。

[0017] 本发明所述试剂盒及其制备方法中, CmcAb (Carbon Monoclonal Antibody) 单克隆抗体和 NmcAb (Nitric Monoclonal Antibody) 单克隆抗体本质上均为蛋白质, 能特异识别 AIB1。所述 CmcAb (Carbon Monoclonal Antibody) 的制备方法见: 抗 AIB1-C 单克隆抗体的制备及初步应用, 陕西医学杂志 2007 年 36 卷 3 期; 所述 NmcAb (Nitric Monoclonal Antibody) 单克隆抗体的制备方法见: 抗 AIB1-N 单克隆抗体的制备及鉴定, 四川大学学报 (医学版) 2006 年第 37 卷第 02 期。

[0018] 本发明所述检测 AIB1 的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒的检测标本为组织

细胞裂解液或体液或血液,所需设备为酶标仪,使用方法如下:

[0019] 在包被有 CmcAb 单克隆抗体的多孔板的孔中加入待检样品,4℃ 孵育 3 小时后洗涤去除未反应物;然后向所述多孔板的孔中加入 Biotin-NmcAb 检测液的稀释液,在 37℃ 反应 1h 后洗涤去除未反应物;继后向所述多孔板的孔中加入加入亲和素-辣根过氧化物酶稀释液,37℃ 反应 1h 后用 3',3',5,5' - 四甲基联苯胺显色,用酶标仪测所述多孔板各孔的 A450 值。

[0020] 本发明具有以下有益效果:

[0021] 1、由于本发明所述试剂盒含有两种 AIB1 识别抗体 (CmcAb 单克隆抗体和 NmcAb 单克隆抗体),因而使用本发明所述试剂盒检测 AIB1 特异性更好。

[0022] 2、使用本发明所述试剂盒进行 AIB1 检测,操作简单,一个样品所需时间仅 6 小时左右,与免疫组织化学法或免疫印迹 (western-blot) 法相比,检测时间缩短至少 6 小时。

[0023] 3、使用本发明所述试剂盒进行 AIB1 检测,配套设备仅需酶标仪,与免疫组织化学法或免疫印迹 (western-blot) 法相比,配套设备和器械大为减少。

附图说明

[0024] 图 1 是本发明所述检测 AIB1 的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒中多孔板的一种形状构造示意图。

具体实施方式

[0025] 下面通过实施例对本发明所述检测 AIB1 的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒及其制备方法和使用方法作进一步说明。

[0026] 下述实施例中涉及的材料来源或制备方法如下:

[0027] CmcAb (Carbon Monoclonal Antibody) 的制备方法见抗 AIB1-C 单克隆抗体的制备及初步应用,陕西医学杂志 2007 年 36 卷 3 期;

[0028] NmcAb (Nitric Monoclonal Antibody) 单克隆抗体的制备方法见抗 AIB1-N 单克隆抗体的制备及鉴定,四川大学学报 (医学版) 2006 年第 37 卷第 02 期;

[0029] 碳酸盐缓冲液 (CB),购自美国 sigma 公司;

[0030] 磷酸盐缓冲液 (PBS),购自美国 sigma 公司;

[0031] 牛血清白蛋白,购自美国 sigma 公司;

[0032] N,N- 二甲基甲酰胺,购自美国 sigma 公司;

[0033] 酰-N 羟基丁二酰亚胺酯,购自美国 sigma 公司;

[0034] 甘油的规格是分析醇,购自美国 sigma 公司;

[0035] 亲和素-辣根过氧化物酶,购自北京中杉金桥生物技术有限公司;

[0036] 3',3',5,5' - 四甲基联苯胺,购自北京中杉金桥生物技术有限公司;

[0037] PBS-Tween20,购自美国 sigma 公司;

[0038] 多孔板为 96 孔的多孔板,其形状和构造如图 1 所示。

[0039] 乳腺癌细胞株 T47D,购自美国标准生物制品收藏中心 (ATCC),将其用 RIPA 蛋白裂解液 (购自碧云天生物技术研究所以) 常规裂解制备成 T47D 裂解液。

[0040] 实施例 1

[0041] 本实施例中,采用以下工艺步骤制备检测 AIB1 的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒:

[0042] (1) 制备包被有 CmcAb 单克隆抗体的多孔板

[0043] 用 pH = 8、浓度为 1mol/l 的碳酸盐缓冲液将 CmcAb(Carbon Monoclonal Antibody) 单克隆抗体稀释为浓度 10 μ g/ml 的稀释液,然后将所述 CmcAb 单克隆抗体稀释液按 100 μ l/孔的量加入多孔板(见图 1)的各孔内,在 4 $^{\circ}$ C 包被 12 小时;包被时间届满后,将质量浓度 1% 的牛血清白蛋白溶液按 120 μ l/孔的量加入多孔板的各孔内并在 37 $^{\circ}$ C 进行封闭反应,反应时间为 1 小时;封闭反应结束后,用 pH = 7.2、浓度为 0.05mol/l 的磷酸盐缓冲液洗涤多孔板 3 次,每次 3 分钟,即获得包被有 CmcAb(Carbon Monoclonal Antibody) 单克隆抗体的多孔板,然后将其置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用;

[0044] (2) 制备生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 检测液

[0045] ①以 N,N-二甲基甲酰胺为溶剂,生物素酰-N 羟基丁二酰亚胺酯为溶质配制浓度为 50 μ g/ μ l 的酰-N 羟基丁二酰亚胺酯溶液,以 pH = 9.6、浓度为 1mol/l 的碳酸盐缓冲液为溶剂,NmcAb 单克隆抗体为溶质配制浓度为 48 μ g/ μ l 的 NmcAb 单克隆抗体溶液,按酰-N 羟基丁二酰亚胺酯与 NmcAb 单克隆抗体的质量比 = 1 : 7 量取所述酰-N 羟基丁二酰亚胺酯溶液和所述 NmcAb 单克隆抗体溶液形成混合液,将所述酰-N 羟基丁二酰亚胺酯溶液和所述 NmcAb 单克隆抗体溶液的混合液在搅拌下(磁力搅拌器,搅拌速度 200 转/分)于室温反应 4 小时,即获得生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb;反应结束后,将含生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 的反应液装入透析袋中,用 pH = 9.2、浓度为 0.05mol/l 的磷酸盐缓冲液在 4 $^{\circ}$ C 进行透析,透析时间为 12 小时,其间更换透析液 3 次;继后在透析后的反应液中加入牛血清白蛋白,所述牛血清白蛋白的加入量以其浓度达到 3g/100ml 为限;

[0046] ②将步骤①制备的含生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 和牛血清白蛋白的透析后反应液 10000 μ l 与甘油 10000 μ l 在室温下混合均匀即形成生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 检测液,其保存温度为 -20 $^{\circ}$ C;

[0047] (3) 配备亲和素-辣根过氧化物酶 20000 μ l,配备 3',3',5,5'-四甲基联苯胺 20000 μ l。

[0048] 用本实施例制备的检测 AIB1 的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒对乳腺癌细胞株 T47D 裂解液和血清进行 AIB1 检测,操作如下:

[0049] 将乳腺癌细胞株 T47D 裂解液和血清用 pH = 7.2、浓度为 0.05mol/l 的磷酸盐缓冲液稀释成表 1 中的稀释倍数,将生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 检测液用 pH = 7.2、浓度为 0.05mol/l 的磷酸盐缓冲液按 1 : 500 稀释,将亲和素-辣根过氧化物酶用 pH = 7.2、浓度为 0.05mol/l 的磷酸盐缓冲液按 1 : 1000 稀释,对照磷酸盐缓冲液的 pH = 7.2、浓度为 0.05mol/l。

[0050] 向包被有 CmcAb 单克隆抗体的多孔板的各列孔中分别加入不同稀释倍数的乳腺癌细胞株 T47D 裂解液、血清及对照磷酸盐缓冲液(PBS),加入量为 100 μ l/孔,在 4 $^{\circ}$ C 孵育 3 小时后用 pH = 7.2、浓度为 0.05mol/l 的磷酸盐缓冲液洗涤 5 次,然后加入 1 : 500 稀释的生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 检测液,加入量为 100 μ l/孔,在 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时后用 PBS-Tween20 洗涤 5 次,继后加入 1 : 1000 稀释的亲和素-辣根过氧化物酶稀释液,加入量为 100 μ l/孔,在 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时后按 100 μ l/孔加入饱和浓度的 3',3',5,

5' - 四甲基联苯胺显色,并用酶标仪测所述多孔板各孔的 A450 值(光密度值),所测 A450 值见表 1:

[0051] 表 1:检测结果

[0052]

检测标本稀释倍数	1	1/4	1/16	1/64	1/256	1/1024	PBS 对照
血清 A ₄₅₀ 值	2.353	1.126	0.510	0.304	0.252	0.228	0.175
T47D 裂解液 A ₄₅₀ 值	1.476	0.765	0.476	0.255	0.242	0.216	0.136

[0053] 从上表可以看出,随着检测标本中 AIB1 抗原量的减低,A450 值也随着减低。

[0054] 实施例 2

[0055] 本实施例中,采用以下工艺步骤制备检测 AIB1 的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒:

[0056] (1) 制备包被有 CmcAb 单克隆抗体的多孔板

[0057] 用 pH = 10 的碳酸盐缓冲液将 CmcAb (Carbon MonoclonalAntibody) 单克隆抗体稀释为浓度 10 μg/ml 的稀释液,然后将所述 CmcAb 单克隆抗体稀释液按 100 μl/孔的量加入多孔板的各孔内,在 4℃ 包被 12 小时;包被时间届满后,将质量浓度 1% 的牛血清白蛋白溶液按 120 μl/孔的量加入多孔板的各孔内并在 37℃ 进行封闭反应,反应时间为 1 小时;封闭反应结束后,用 pH = 7.2 的磷酸盐缓冲液洗涤多孔板 3 次,每次 3 分钟即获得包被有 CmcAb (Carbon Monoclonal Antibody) 单克隆抗体的多孔板,然后将其置于 4℃ 冰箱中保存备用;

[0058] (2) 制备生物素标记的单克隆抗体 Biotin-NmcAb 检测液

[0059] 制备方法与实施例 1 相同。

[0060] (3) 配备亲和素-辣根过氧化物酶 20000 μl,配备 3',3',5,5' - 四甲基联苯胺 20000 μl。

[0061] 用本实施例制备的检测 AIB1 的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒对乳腺癌细胞株 T47D 裂解液和血清进行 AIB1 检测,操作与实施例 1 相同。所测 A450 值见表 2:

[0062] 表 2:检测结果

[0063]

检测标本稀释倍数	1	1/4	1/16	1/64	1/256	1/1024	PBS 对照
血清 A ₄₅₀ 值	2.342	1.130	0.502	0.305	0.252	0.225	0.174
T47D 裂解液 A ₄₅₀ 值	1.483	0.771	0.472	0.254	0.244	0.218	0.135

[0064] 从上表可以看出,随着检测标本中 AIB1 抗原量的减低,A450 值也随着减低,结果与实施例 1 结果差别微小。

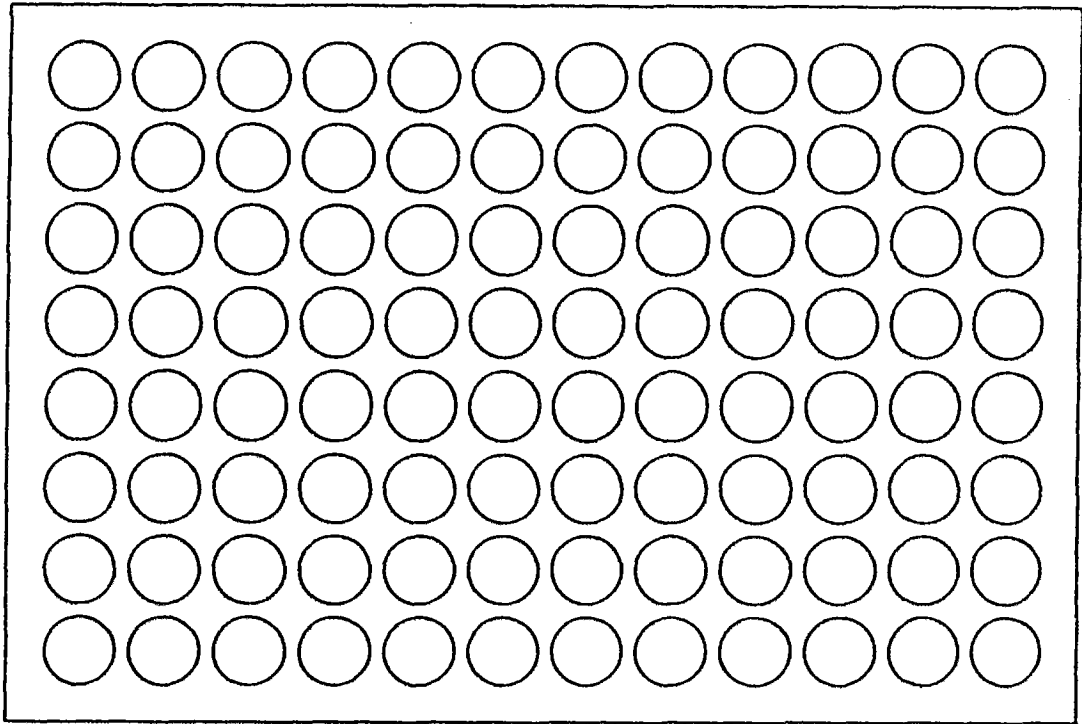


图 1

专利名称(译)	检测AIB1的双抗体夹心酶联免疫吸附试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN101846684A	公开(公告)日	2010-09-29
申请号	CN201010113443.3	申请日	2010-02-25
[标]申请(专利权)人(译)	四川大学		
申请(专利权)人(译)	四川大学		
当前申请(专利权)人(译)	四川大学		
[标]发明人	屈艺 母得志 毛萌 庞秋霞 魏大鹏 赵凤艳 唐军 李熙鸿 熊英 陈大鹏		
发明人	屈艺 母得志 毛萌 庞秋霞 魏大鹏 赵凤艳 唐军 李熙鸿 熊英 陈大鹏		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/543		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测AIB1的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒，由包被有CmcAb单克隆抗体的多孔板、生物素标记的单克隆抗体Biotin-NmcAb检测液、与生物素标记的单克隆抗体结合的亲和素-辣根过氧化物酶和显色底物3', 3', 5', 5'-四甲基联苯胺组成。上述试剂盒的制备方法有以下工艺步骤：(1)制备包被有CmcAb单克隆抗体的多孔板；(2)制备生物素标记的单克隆抗体Biotin-NmcAb检测液；(3)配备亲和素-辣根过氧化物酶和显色底物3', 3', 5', 5'-四甲基联苯胺。

