



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105158478 B

(45)授权公告日 2017.06.23

(21)申请号 201510459480.2

GO1N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2015.07.30

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105158478 A

CN 103570833 A,2014.02.12,  
JP 2000-146962 A,2000.05.26,  
JP S58-201067 A,1983.11.22,  
Patrick H.C. van Berkel 等

(43)申请公布日 2015.12.16

(83)生物保藏信息

CGMCC No.10594 2015.05.08

CGMCC No.10595 2015.05.08

.Characterization of monoclonal  
antibodies against human lactoferrin.  
《Journal of Immunological Methods》.2002,  
第267卷(第2期),

(73)专利权人 中国检验检疫科学研究院

地址 100123 北京市朝阳区高碑店北路甲3  
号

Patrick H. C. VAN BERKEL 等

(72)发明人 林祥梅 王勤 刘晓飞 付伟

冯春燕 李晓琳 仇松寅 刘丹丹

.Heterogeneity in utilization of N-  
glycosylation sites Asn624 and Asn138 in  
human lactoferrin: a study with  
glycosylation-site mutants.《Biochemical  
Journal》.1996,第319卷(第1期),

(74)专利代理机构 北京英创嘉友知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11447

代理人 耿超 王浩然

审查员 段晓露

(51)Int.Cl.

GO1N 33/68(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

(54)发明名称

一种人乳铁蛋白双抗夹心酶联免疫检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种人乳铁蛋白双抗夹心酶联免疫检测试剂盒,其中,该试剂盒包括:酶联板、包被缓冲液、第一单克隆抗体、封闭液、酶标记的第二单克隆抗体、显色底物和终止液;所述第一单克隆抗体由保藏编号为CGMCC NO.10594的杂交瘤细胞株分泌得到,所述第二单克隆抗体由保藏编号为CGMCC NO.10595的杂交瘤细胞株分泌得到。通过上述技术方案,本发明能够通过双抗夹心酶联免疫检测方法,对人乳铁蛋白的检测取得1ng/mL的灵敏度,对牛乳铁蛋白和羊乳铁蛋白不呈现交叉反应,并且对人溶菌酶转基因牛、人 $\alpha$ -乳清白蛋白转基因牛不呈现交叉反应,具有较高的敏感度和特异性。

CN 105158478 B

1. 一种人乳铁蛋白双抗夹心酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:该试剂盒包括:酶联板、包被缓冲液、第一单克隆抗体、封闭液、酶标记的第二单克隆抗体、显色底物和终止液;所述第一单克隆抗体由保藏编号为CGMCC NO.10594的杂交瘤细胞株分泌得到,所述第二单克隆抗体由保藏编号为CGMCC NO.10595的杂交瘤细胞株分泌得到;

其中,该试剂盒还含有人乳铁蛋白标准品;

其中,所述包被缓冲液为含有0.05-0.1体积%吐温-20的磷酸盐缓冲液;

其中,所述封闭液为含有0.05-0.1体积%吐温-20和5-10重量%酪蛋白的磷酸盐缓冲液。

## 一种人乳铁蛋白双抗夹心酶联免疫检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体地,涉及一种人乳铁蛋白双抗夹心酶联免疫检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] “硕鼠”的问世(Palmiter et al.,1982),加速了转基因生物的研究。克隆绵羊“多莉”的诞生(Wilmut et al.,1997),促进了转基因技术在哺乳动物方面的广泛应用。目前研制成功多种用于生产药用或食用蛋白、提高瘦肉率、改善营养、增强抗病力的转基因猪、牛、羊(Schnieke et al.,1997;Toledo et al.,2006),其潜在的经济效益和社会效益巨大,具有良好的商品化前景。但是由于转基因生物及其产品存在风险,转基因生物及产品的管理一直受到各国政府的高度重视。

[0003] 为了保护人类自身的健康和生存环境,包括我国在内的许多国家相继制定了转基因生物安全法规,对转基因生物及产品采用标识制度,对转基因食品进出境进行严格管理。要使这些法规、制度得以顺利实施,需要有效的检测技术做支撑。目前转基因生物及其加工食品的检测方法主要包括基因水平的检测和蛋白水平的检测,在蛋白检测方面,目前人乳铁蛋白的检测方法以ELISA检测法为主,但是现有的抗人乳铁蛋白的抗体因敏感性和特异性较低,无法满足双抗夹心酶联免疫检测人乳铁蛋白的要求。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种敏感性和特异性更高的双抗夹心酶联免疫检测人乳铁蛋白的技术方案。

[0005] 为了实现上述目的,本发明提供了一种人乳铁蛋白双抗夹心酶联免疫检测试剂盒,其中,该试剂盒包括:酶联板、包被缓冲液、第一单克隆抗体、封闭液、酶标记的第二单克隆抗体、显色底物和终止液;所述第一单克隆抗体由保藏编号为CGMCC NO.10594的杂交瘤细胞株分泌得到,所述第二单克隆抗体由保藏编号为CGMCC NO.10595的杂交瘤细胞株分泌得到。

[0006] 通过上述技术方案,本发明能够通过双抗夹心酶联免疫检测方法,对人乳铁蛋白的检测取得1ng/mL的灵敏度,对牛乳铁蛋白和羊乳铁蛋白不呈现交叉反应,并且对人溶菌酶转基因牛、人 $\alpha$ -乳清白蛋白转基因牛不呈现交叉反应,具有较高的敏感度和特异性。

[0007] 本发明的其他特征和优点将在随后的具体实施方式部分予以详细说明。

[0008] 生物材料保藏

[0009] 本发明的一株杂交瘤细胞株是本发明的发明人自行融合筛选得到的,其保藏编号为CGMCC NO.10594,保藏日期为2015年5月8日,保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址位于北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,分类命名为杂交瘤细胞株。

[0010] 本发明的另一株杂交瘤细胞株是本发明的发明人自行融合筛选得到的,其保藏编

号为CGMCC NO.10595,保藏日期为2015年5月8日,保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址位于北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,分类命名为杂交瘤细胞株。

### 具体实施方式

[0011] 以下对本发明的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是,此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本发明,并不用于限制本发明。

[0012] 本发明提供了一种人乳铁蛋白双抗夹心酶联免疫检测试剂盒,其中,该试剂盒包括:酶联板、包被缓冲液、第一单克隆抗体、封闭液、酶标记的第二单克隆抗体、显色底物和终止液;所述第一单克隆抗体由保藏编号为CGMCC NO.10594的杂交瘤细胞株分泌得到,所述第二单克隆抗体由保藏编号为CGMCC NO.10595的杂交瘤细胞株分泌得到。

[0013] 其中,为了提高定量检测的准确性并提高试剂盒的易用性,优选地,该试剂盒还含有人乳铁蛋白标准品。其中,所述人乳铁蛋白标准品可以为从人乳纯化出来的人乳铁蛋白,也可以是转人乳铁蛋白基因的牛乳中纯化出来的重组人乳铁蛋白,还可以是转人乳铁蛋白基因的大米中纯化出来的重组人乳铁蛋白。

[0014] 其中,所述包被缓冲液可以为常规的ELISA包被缓冲液,例如为含有0.05-0.1体积%吐温-20的磷酸盐缓冲液。

[0015] 其中,所述封闭液可以为常规的ELISA封闭液,例如为含有0.05-0.1体积%吐温-20和5-10重量%酪蛋白的磷酸盐缓冲液。

[0016] 其中,对第二单克隆抗体的酶标记可以为本领域常规的酶标记方案,例如,可以按照Pierce HRP标记试剂盒(Cat No31488)的说明书中的方法进行酶标记。优选地,酶标记的第二单克隆抗体的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶,当标记酶为辣根过氧化物酶时,所述显色底物包括显色底物A和显色底物B,所述显色底物A为过氧化氢或过氧化脲,所述显色底物B为邻苯二胺或四甲基联苯胺,所述终止液为1-2mol/L的硫酸或盐酸缓冲液;当标记酶为碱性磷酸酶时,所述显色底物为对硝基磷酸盐缓冲液,所述终止液为1-2mol/L氢氧化钠。

[0017] 本发明的试剂盒的使用方法可以包括:将第一单克隆抗体(人乳铁蛋白单克隆抗体5C5,保藏编号为CGMCC NO.10594)用包被缓冲液稀释后包被于酶联板上,然后用包被缓冲液洗去多余的第一单克隆抗体;接着用封闭液封闭经包被的酶联板,然后用包被缓冲液洗板以洗去多余的封闭液;接着加入待检测样品,然后用包被缓冲液洗板以洗去多余的待检测样品;接着加入酶标记的第二单克隆抗体(人乳铁蛋白单克隆抗体3B4,保藏编号为CGMCC NO.10595),然后用包被缓冲液洗板以洗去多余的酶标记的第二单克隆抗体;接着加显色底物显色,然后加终止液终止反应;测定OD450值;若待测样品中含有人乳铁蛋白,则会有显色反应,若不含人乳铁蛋白,则呈阴性。可以使用梯度稀释后的人乳铁蛋白标准品替代被检测样品,以获得标准曲线,然后通过标准曲线比对,定量检测人乳铁蛋白。

[0018] 本发明的试剂盒的可能原理包括:第一单克隆抗体首先结合至酶联板上,而后封闭液封闭酶联板上的空白位点,接着待检测样品若含有人乳铁蛋白,则人乳铁蛋白与第一单克隆抗体结合,然后酶标记的第二单克隆抗体与人乳铁蛋白结合,形成第一单克隆抗体-人乳铁蛋白-酶标记的第二单克隆抗体复合体,而后通过显色底物显示出复合体中酶的存

在,从而显示出人乳铁蛋白的存在,由此进行人乳铁蛋白的定性和定量分析。

[0019] 其中,用于构建本发明的试剂盒的第一单克隆抗体和第二单克隆抗体需要分别针对人乳铁蛋白的不同抗原表位并且具有配对检测效果。用于构建本发明的试剂盒的第一单克隆抗体和第二单克隆抗体可以通过免疫胶体金试纸法进行筛选。

[0020] 以下,通过实施例进一步详细说明本发明。

[0021] 实施例1

[0022] 本实施例用于说明人乳铁蛋白单克隆抗体对的筛选。

[0023] 人乳铁蛋白(hLF)的蛋白序列如NCBI Genbank序列号:U95626所示。按照文献(Penghua Yang, et al., Cattle Mammary Bioreactor Generated by a Novel Procedure of Transgenic Cloning for Large-Scale Production of Functional Human Lactoferrin., PLoS ONE, 2008, 3 (10), e3453)中的方法获得人乳铁蛋白(hLF)的转基因乳牛。

[0024] 向转基因乳牛肌肉注射催乳针(购自西安草滩制药厂生产的不孕牛催乳针,该产品为盒装,1号针10支,11号针3支)进行催乳,其中1号针连续肌肉注射10天,每日一次。11号针在第13、15、17天各注射一支。从注射7天开始每天温水按摩转基因乳牛乳房,11号针注射完毕后开始人工挤乳两周,每天两次,得到奶样。

[0025] 将奶样于4℃、4500rpm离心15min后取出,可见上层为凝固的乳脂,将下层液体吸出并转移到另一个离心管。将脱脂乳用1M盐酸调节pH值至3.8-4.6,使得酪蛋白沉淀出来,其中脱脂乳与1M的HCl的体积比为25:1;然后将调好pH值的奶样于4℃、5000rpm离心12min。取出,沉淀为酪蛋白,上清液为乳清蛋白,将上清液转移到另一离心管。用1M的NaOH水溶液将上清液的pH值调回至7.5,其中上清液与1M的NaOH水溶液的体积比为25:1。将调好pH值的奶样于4℃、5000rpm离心15min,将离心后的上清收集,得到纯化的乳清。

[0026] 使用HiLoad™ 16/10SP Sepharose High performance色谱柱,将其预先用0.4M的NaCl、20mM的Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH7.5)平衡5个柱体积。15ml脱脂乳通过注射器上样,进入上样环。用0.4M的NaCl、20mM的Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH7.5)平衡5个柱体积,未结合的蛋白收集到一离心管中,用0.4M-1M的NaCl、20mM的Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH7.5)洗脱15个柱体积,收集分离到的各个峰值蛋白,并合并同一峰值的洗脱液。再用1M的NaCl、20mM的Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH7.5)继续洗脱2个柱体积,最后用1M的NaCl、20mM的Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH7.5)洗脱5个柱体积。上述操作均在AKTA purifier 10液相色谱仪上进行。最后得到在0.6M的NaCl的洗脱峰。收集该洗脱峰的洗脱液并进行超滤浓缩和冷冻干燥,然后经N端测序和蛋白电泳,证明该洗脱峰为重组提纯的人乳铁蛋白(hLF)。

[0027] 用提纯的人乳铁蛋白(hLF)免疫雌性BALB/c小鼠,取脾细胞和骨髓瘤细胞进行细胞融合,经ELISA法进行阳性克隆筛选、通过有限稀释法进行亚克隆,获得稳定分泌抗hLF单克隆抗体的10个克隆的细胞株。将这些杂交瘤细胞株分别注射至小鼠腹腔,收集腹水,亲和柱纯化得10种单克隆抗体。

[0028] 将这10种单克隆抗体两两组合得到45个组合,将各个组合分别制备胶体金免疫试纸,具体地,将每一个组合中的一个抗体进行胶体金标记并制备金标垫,另外一个抗体用于制备T线。

[0029] 胶体金的制备方法包括:将0.01重量%的HAuCl<sub>4</sub>溶液加热煮沸后加入1重量%的柠檬酸三钠溶液直至溶液的颜色完全变为透明的红色时,继续回流10min后停止加热,冷却

至室温,即得到胶体金。将单克隆抗体进行胶体金标记的方法包括:取1ml制取好的胶体金,用1重量%的 $K_2CO_3$ 调节pH值到8.0,加入8 $\mu$ g单克隆抗体,混合均匀,室温反应40min;加入5重量%的BSA至终浓度为0.1重量%,静置30min;先用低速(1500r/min)离心15分钟,弃去由凝聚的金胶粒形成的沉淀;然后用10000r/min离心30分钟;仔细吸出上清,沉淀物用0.1ml含1%BSA的0.1M PBS (pH7.4)复溶,加入5%叠氮钠至终浓度为0.05%,4 $^{\circ}$ C保存。

[0030] 用喷金点膜机将第二单克隆抗体和羊抗鼠IgG喷于硝酸纤维素膜上,形成相互平行的检测T线和质控C线,然后烘干;将胶体金标记的第一单克隆抗体用喷金点膜机均匀的喷在金标垫上;然后,将样品垫、金标垫、喷有T线和C线的基膜(硝酸纤维素膜)和吸水纸依次连接组装,而后裁切包装备用。共得到45种免疫胶体金试纸。

[0031] 将人乳铁蛋白的PBS溶液作为阳性样本,将牛乳铁蛋白PBS溶液作为阴性样本,对上述45种免疫胶体金试纸进行筛选。去除44种对人乳铁蛋白呈现阴性反应或对牛乳铁蛋白呈现阳性反应的免疫胶体金试纸,最终得到一种免疫胶体金试纸,该免疫胶体金试纸能够对10ng/mL的人乳铁蛋白PBS溶液呈现阳性反应,并且对100 $\mu$ g/mL的牛乳铁蛋白PBS溶液不呈现阳性反应。该免疫胶体金试纸即为本实施例筛选得到的免疫胶体金试纸。该免疫胶体金试纸所用的第一单克隆抗体是由杂交瘤细胞株3B4分泌得到的,该杂交瘤细胞株的保藏编号为CGMCC NO.10595;该免疫胶体金试纸所用的第二单克隆抗体是由杂交瘤细胞株5C5分泌得到的,该杂交瘤细胞株的保藏编号为CGMCC NO.10594。经鉴定这两株单克隆抗体亚型均为IgG1+kappa。

#### [0032] 实施例2

[0033] 按照Pierce HRP标记试剂盒(Cat No31488)产品说明书进行第二单克隆抗体(人乳铁蛋白单克隆抗体3B4,保藏编号为CGMCC NO.10595)的HRP(辣根过氧化物酶)标记操作,得到辣根过氧化物酶标记的第二单克隆抗体。

[0034] 酶联免疫吸附法(ELISA)检测步骤如下:(1)包被:以含有0.08体积%吐温-20的磷酸盐缓冲液为包被缓冲液,将第一单克隆抗体(人乳铁蛋白单克隆抗体5C5,保藏编号为CGMCC NO.10594)用包被缓冲液稀释至5 $\mu$ g/mL,100 $\mu$ L/孔加入酶联板,37 $^{\circ}$ C放置2h,包被缓冲液洗涤3次;(2)封闭:加150 $\mu$ L/孔的封闭液(含有0.08体积%吐温-20和6重量%的酪蛋白的磷酸盐缓冲液),37 $^{\circ}$ C放置1h后,包被缓冲液洗涤3次,拍干;加待测样品:将辣根过氧化物酶标记的第二单克隆抗体用封闭液稀释至抗体终浓度为3.74 $\mu$ g/mL,每孔100 $\mu$ L加入酶联板,37 $^{\circ}$ C孵育30min,包被缓冲液洗板4次,拍干。(4)显色:四甲基联苯胺按100 $\mu$ L/孔加入酶联板,37 $^{\circ}$ C显色10min。(5)终止:加入终止液(2M  $H_2SO_4$ ) 50 $\mu$ L/孔。(6)读数:以450nm单波长测定各孔OD值。其中,待测样品如表1所列,相应检测得到的OD值也如表1所示。

#### [0035] 表1

[0036]

样品	浓度	平均 OD 值
空白对照	磷酸缓冲液	0.098
人乳铁蛋白标准品 (纯化)	0.1ng/mL	0.2305
	1ng/mL	0.592
	10ng/mL	1.1011
人乳铁蛋白标准品 (重组表达)	0.1ng/mL	0.295
	1ng/mL	0.669
	10ng/mL	0.8685
牛乳铁蛋白标准品	0.1ng/mL	0.071
	1ng/mL	0.125
	10ng/mL	0.198
羊乳铁蛋白标准品	0.1ng/mL	0.092
	1ng/mL	0.137
	10ng/mL	0.13
人溶菌酶 标准品	0.1ng/mL	0.073
	1ng/mL	0.093
	10ng/mL	0.106
人 $\alpha$ -乳清白 标准品	0.1ng/mL	0.132
	1ng/mL	0.125
	10ng/mL	0.113

[0037] 根据表1的数据可见,本发明的对人乳铁蛋白的检测取得1ng/mL的灵敏度,对牛乳铁蛋白和羊乳铁蛋白不呈现交叉反应,并且对人溶菌酶、人 $\alpha$ -乳清白蛋白也不呈现交叉反应。

[0038] 实施例3

[0039] 采集140份已知人乳铁蛋白阴性的牛奶(其中包括100份采集自位于河北大厂的奶牛养殖场的非转基因奶牛,20份位于中国农业大学的奶牛养殖场的转人溶菌酶的转基因奶牛和20份位于中国农业大学的奶牛养殖场的转人 $\alpha$ -乳清白蛋白的转基因奶牛)、和22份已知人乳铁蛋白阳性牛奶(采集自位于中国农业大学的奶牛养殖场,转人乳铁蛋白基因奶牛),共162份样品。

[0040] 参照实施例2相同的方法,对待测样品进行检测,其中,待测样品如表2所列,相应检测得到的OD值也如表2所示

[0041] 表2

[0042]

样品	稀释比例 (体积比)	平均 OD 值
空白对照	磷酸缓冲液	0.097
非转基因奶牛牛乳	1:10	0.101
	1:100	0.13
	1:1000	0.135
转人溶菌酶的转基因奶牛牛乳	1:10	0.094
	1:100	0.129
	1:1000	0.133
转人 $\alpha$ -乳清白蛋白的转基因奶牛牛乳	1:10	0.116
	1:100	0.121
	1:1000	0.138
转人乳铁蛋白的转基因奶牛牛乳	1:10	1.845
	1:100	1.012
	1:1000	0.585

[0043] 根据表2的数据可见,本发明的对转人乳铁蛋白的转基因奶牛牛乳的检测取得1000倍稀释的灵敏度,不呈现交叉反应,并且对非转基因奶牛牛乳、转人溶菌酶的转基因奶牛牛乳和转人 $\alpha$ -乳清蛋白的转基因奶牛牛乳也不呈现交叉反应。

[0044] 以上详细描述了本发明的优选实施方式,但是,本发明并不限于上述实施方式中的具体细节,在本发明的技术构思范围内,可以对本发明的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本发明的保护范围。

[0045] 另外需要说明的是,在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征,在不矛盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合,为了避免不必要的重复,本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

[0046] 此外,本发明的各种不同的实施方式之间也可以进行任意组合,只要其不违背本发明的思想,其同样应当视为本发明所公开的内容。

专利名称(译)	一种人乳铁蛋白双抗夹心酶联免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN105158478B</a>	公开(公告)日	2017-06-23
申请号	CN201510459480.2	申请日	2015-07-30
申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
[标]发明人	林祥梅 王勤 刘晓飞 付伟 冯春燕 李晓琳 仇松寅 刘丹丹		
发明人	林祥梅 王勤 刘晓飞 付伟 冯春燕 李晓琳 仇松寅 刘丹丹		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/6803		
代理人(译)	耿超 王浩然		
审查员(译)	段晓露		
其他公开文献	CN105158478A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种人乳铁蛋白双抗夹心酶联免疫检测试剂盒，其中，该试剂盒包括：酶联板、包被缓冲液、第一单克隆抗体、封闭液、酶标记的第二单克隆抗体、显色底物和终止液；所述第一单克隆抗体由保藏编号为CGMCC NO.10594的杂交瘤细胞株分泌得到，所述第二单克隆抗体由保藏编号为CGMCC NO.10595的杂交瘤细胞株分泌得到。通过上述技术方案，本发明能够通过双抗夹心酶联免疫检测方法，对人乳铁蛋白的检测取得1ng/mL的灵敏度，对牛乳铁蛋白和羊乳铁蛋白不呈现交叉反应，并且对人溶菌酶转基因牛、人 $\alpha$ -乳清白蛋白转基因牛不呈现交叉反应，具有较高的敏感度和特异性。