



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108362870 A

(43)申请公布日 2018.08.03

(21)申请号 201710061908.7

(22)申请日 2017.01.27

(71)申请人 武汉三鹰生物技术有限公司

地址 430000 湖北省武汉市东湖高新技术  
开发区高新大道666号D3-3栋

(72)发明人 赵以睿 王慕元 王力军 刑田径

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图5页

### (54)发明名称

一种用于人FKBP蛋白的酶联免疫检测及制备方法

### (57)摘要

本发明涉及一种酶联免疫及其检测方法,是一种新的抗人FKBP蛋白的单抗包被酶标板及酶联免疫试剂盒的制备方法。其关键之处主要在于用基因工程方法制备特异性的鼠抗人FKBP蛋白的单抗,并将此抗体纯化后包被于酶标板上,做为试剂盒的一部分。试剂盒还包括FKBP的重组蛋白标准品、抗人FKBP蛋白的多抗、辣根过氧化物酶标记的二抗、样本稀释液、抗体稀释液、显色液、终止液。试剂盒建立了快捷简便测定人血清和血浆中FKBP蛋白浓度的测定方法。试剂盒主要用于供科学研究和临床实验的研究使用。

1. 人FKBPL的单抗包被酶标板的制法,通过下列步骤制备而成:

以BC004168 DNA为模板,PCR扩增FKBPL DNA片段(259nt-966nt)基因片段,与载体PET28a连接,转化BL21,表达大量48 KD FKBPL蛋白片段;

将48 KD FKBPL蛋白免疫小白鼠,取其脾细胞与鼠骨髓瘤细胞融合,选择阳性杂交瘤细胞于鼠腹水中培养,纯化蛋白得到抗FKBPL的单抗;

将所得单抗用pH9.6的碳酸盐缓冲溶液稀释后包被96孔板,100 $\mu$ l/孔,4 $^{\circ}$ C 16-24小时,PBST洗涤3次,每次30秒,然后除尽孔内液体;

用含8% 小牛血清的pH7.4的PBS封闭,每孔200 $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C,2小时,PBST洗涤3次,干燥后密封;该板即为抗FKBPL的单抗包被的酶标板,可用于FKBPL的特异性检测。

2. 应用权利要求1所述的人FKBPL的单抗包被酶标板的ELISA检测试剂盒,其特征为:由权利要求1所述的抗FKBPL的单抗包被的酶标板、FKBPL标准品、FKBPL的阳性对照样品、抗FKBPL的多抗、样品稀释液、洗涤液、显色液、终止液构成,具体组分为:(1)酶标板:由FKBPL的单抗包被;(2)样品稀释液:含8% 小牛血清的pH7.4的0.01mol/l PBS;(3)洗涤液:pH7.4 PBST;(4)酶标二抗:购自美国R&D systems的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔IgG;(5)FKBPL标准品:FKBPL的PBS溶液,FKBPL终浓度为10 ng/ml;(6)FKBPL阳性对照样品:FKBPL的PBS溶液,FKBPL终浓度为10 ng/ml;(7)抗FKBPL的多抗:多抗的PBS溶液,多抗的终浓度为1mg/ml;(8)显色液:TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>系统;(9)终止液:2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液。

## 一种用于人FKBPL蛋白的酶联免疫检测及制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体地说涉及一种检测人FKBPL蛋白(FK506结合蛋白类似蛋白)的酶联免疫检测试剂盒。本发明还涉及上述试剂盒的制备方法。

### 背景技术

[0002] FKBPL(FK506-binding protein like)即FK506结合蛋白,与免疫亲和素蛋白家族很相似,能够参与免疫调控以及细胞过程中的蛋白质折叠和运输。FKBPL被认为对射线诱导的抵抗能力方面有潜在的作用,还能够参与到细胞周期的调控中。FKBPL蛋白能够参与对细胞应激的应答,在1999年首次被单独提出来,并命名为DIR1(Robson T. et al. A novel human stress response-related gene with a potential role in induced radioresistance[J]. Radiat Res, 1999, 152, 451-461.)后来又因为它与FKBP蛋白家族的同源性被重新分类,并重新命名为FKBL类似蛋白,并且有研究发现它能够参与新合成的P21蛋白(后来命名为Wisp39蛋白)的稳定合成。(Jascur T. et al. Regulation of p21(WAF1/CIP1) stability by WISp39, a Hsp90 binding TPR protein[J]. Mol Cell, 2005, 17, 237-249.)FKBPL蛋白能够与Hsp90、糖皮质激素受体以及肌动蛋白相互作用,从而起到一定的信号传导作用,功能方面跟FKBPs家族蛋白很相似。(McKeen HD. et al. A novel FK506-like binding protein interacts with the glucocorticoid receptor and regulates steroid receptor signaling[J]. Endocrinology, 2008, 149, 5724-5734.)有研究发现FKBPL蛋白能够影响雌激素受体信号传导,并且对乳腺癌药物tamoxifen的反应有着决定性作用。(McKeen HD. et al. FKBPL regulates estrogen receptor signaling and determines response to endocrine therapy[J]. Cancer Res, 2010, 70, 1090-1100.)罗宾逊等人在1999年发现将L132或者UM-UC-3人膀胱癌细胞中的FKBPL敲除掉,会导致细胞周期的G2、G1和S期减缓,并通过促进DNA单链断裂来增加细胞对x射线的抵抗能力。(Robson T. et al. A novel human stress response-related gene with a potential role in induced radioresistance[J]. Radiat Res, 1999, 152, 451-461.)Valentine等人在2011年发现全长的FKBPL的表达会抑制HMEC-1细胞的迁移,血小管以及体内外微血管的形成。(Valentine A. et al. FKBPL and peptide derivatives: novel biological agents that inhibit angiogenesis by a CD44-dependent mechanism[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17, 1044-1056.)McKeen等人通过基因芯片技术发现FKBPL的高表达与乳腺癌患者存活率之间存在高度相关性,FKBPL的药物研发也深入到癌症I期的研究中。

[0003] 因此,FKBPL更是一种在癌症中具有独特和重要功能的标记物,这对于癌症前期诊断具有重大意义。(Robson T. et al. The therapeutic and diagnostic potential of FKBPL; a novel anticancer protein[J]. Drug Discov Today, 2012, 17, 544-548.)而目前国际上几大ELISA试剂盒生产商只是单一地生产FKBPL蛋白或抗体,而尚未有生产整套FKBPL ELISA试剂盒的报道,缺乏FKBPL在人的血液、组织或细胞中定量的研究。本发明构

建了一套用酶联免疫方法定量测定人样本中内源性FKBPL的浓度。

## 发明内容

[0004] 本发明的目的:提供一种新的用于人血清、或细胞培养上清中人源FKBPL定量检测的ELISA试剂盒。

[0005] 本发明技术方案如下:

1、抗人FKBPL的特异性单抗包被反应板的制备,通过以下步骤:

(1) 48 KD FKBPL蛋白片段的获得:

48 KD FKBPL蛋白片段的原核表达:以BC004168 DNA(购自美国典型培养物保藏中心, ATCC)为模板,用一对特异性的正反引物,PCR扩增FKBPL DNA片段(259nt-966nt),将所得片段克隆于载体pET28a(购自德国Merck公司),转化BL21 (DE3) (购自Merck)感受态大肠杆菌,根据卡那霉素抗性筛选阳性克隆。提取阳性克隆的质粒DNA进行鉴定,得到与目的片段分子量相一致的片段,初步判定为阳性。以PCR阳性克隆提取质粒DNA,进行测序,结果表明FKBPL cDNA片段正确克隆至pET28a,为一个具有708 bp的完整开放式阅读框,与GenBank中人源FKBPL基因100%同源,推算其表达的蛋白质分子量为48 KD,PI为5.2。

[0006]

①48 KD FKBPL蛋白片段的鉴定:转化了重组质粒的大肠杆菌BL21经诱导后将菌体收集,超声波裂解,菌体蛋白经SDS-PAGE蛋白电泳及考马斯染色显示,在48 KD附近新增一条带,经Western blotting鉴定,能与FKBPL的抗体发生强阳性反应,说明该48 KD的FKBPL蛋白具有较强的免疫原性。

[0007] ② 48 KD的FKBPL蛋白片段的制备与纯化:经大量培养、诱导、表达,使用 $\text{Ni}^{2+}$ 亲和层析柱(购自Pharmacia)纯化带有6×His标记的FKBPL蛋白,得到大量48 KD FKBPL蛋白片段。

[0008] (2) 制备抗FKBPL的单抗:

① FKBPL蛋白的动物免疫:将48KD的FKBPL蛋白片段与福氏佐剂混合并经充分乳化后,皮下注射,免疫鼠龄在8~12周的BALB/c健康小鼠(购自湖北省实验动物研究中心)3至4只,每次免疫间隔为2周,直至血清效价高于40000:1。

[0009] ②杂交瘤细胞的制备:在末次免疫后4天,分离鼠脾细胞,在PEG存在条件下选择与对数生长期的Sp2/0骨髓瘤细胞株(购自中国典型培养物保藏中心,CCTCC)以4:1的比例融合,饲养细胞来自小鼠腹腔细胞。融合后的细胞以含HAT的培养基筛选,经有限稀释后选出高抗体分泌孔,将孔内细胞克隆,进行抗原特异的ELISA测定,挑选高分泌性细胞株扩大培养或冻存。

[0010] ③单抗制备:将分泌特异性单抗的杂交瘤细胞株进行小鼠腹腔接种,待产生明显腹水后收集腹水,用葡萄球菌A蛋白交联的亲合层析柱(购自Pharmacia公司)纯化单抗。抗体存于含55%甘油、0.1%BHA和0.01%硫柳汞的0.01mol/l、pH7.4的PBS之中。

[0011] (3)以所得单抗包被反应板:单抗用pH 9.6的碳酸盐缓冲溶液稀释成适当浓度,包被96孔板,每孔100 $\mu$ l,置于4℃湿盒 16-24小时,PBST洗涤3次,每次30秒,然后拍干,除尽孔内液体。

[0012] (4)封闭:用含8%小牛血清的pH7.4的PBS封闭,每孔200 $\mu$ l,37℃,2小时孵育后,

PBST洗涤3次,干燥后密封;该板即为抗FKBPL的单抗包被的酶标反应板,可用于FKBPL的定量检测。

[0013] 2、FKBPL标准品(FKBPL蛋白溶液)的制备:

(1)FKBPL蛋白的原核表达:以DNA(购自ATCC)为模板,用一对特异性的正反引物,PCR扩增FKBPL(259nt-966nt)目的基因,将所得基因克隆于载体pET28a,转化BL21(DE3)感受态大肠杆菌,根据卡那霉素抗性筛选阳性克隆。提取阳性克隆的质粒DNA进行鉴定,得到与目的片段分子量相一致的片段,初步判定为阳性。以PCR阳性克隆提取质粒DNA,进行测序,结果表FKBPL蛋白质的cDNA正确克隆至pET28a,为一个具有708 bp的完整开放式阅读框,与GenBank中FKBPL基因100%同源,推算其分子量为48 KD,PI为5.2。

[0014] (2)FKBPL蛋白的鉴定:转化了重组质粒的大肠杆菌BL21经诱导后将菌体收集,超声波裂解,菌体蛋白经SDS-PAGE蛋白电泳及考马斯染色显示,在48 KD附近新增一条带,经Western blotting鉴定,能与FKBPL的抗体发生强阳性反应,说明FKBPL蛋白具有较强的免疫原性。

[0015] (3)FKBPL蛋白的制备与纯化:经大量培养、诱导、表达,使用 $\text{Ni}^{2+}$ 亲和层析柱纯化,得到大量FKBPL蛋白。

[0016] (4) FKBPL标准品制备:将FKBPL蛋白保存于含55%甘油、0.1%BHA和0.01%硫柳汞的0.01mol/l、pH7.4的PBS之中,并使FKBPL蛋白的终浓度为10 ng/mL

3、FKBPL阳性对照样品的制备:将FKBPL蛋白溶于含50%甘油、0.5%BSA、0.1%BHA和0.01%硫柳汞的0.01mol/l、pH7.4的PBS之中,并使FKBPL蛋白的终浓度为10 ng/ml。

[0017] 4、FKBPL的多抗的制备:

(1)动物免疫:取纯化好的FKBPL蛋白与福氏佐剂混合并经充分乳化后,脊柱两侧、对称多点皮下注射,免疫3-4月龄、体重在1.7Kg以上的健康日本大耳白兔(购自湖北省实验动物研究中心)3至4只,每次免疫间隔为2周,免疫1月后再次免疫后第8天耳静脉取血测血清效价,直至血清效价高于40000:1。

[0018] (2)血清获取:兔中耳动脉取血,每次40ml,静置30分钟后离心,3000rpm、5分钟,上清即为血清。

[0019] (3)多抗的纯化:用FKBPL蛋白交联的亲和层析柱(购自Pharmacia)纯化,得到FKBPL的多抗,保存于含55%甘油、0.1%BHA和0.01%硫柳汞的0.01mol/l、pH7.4的PBS之中,多抗的终浓度为1mg/ml。

[0020] (4)将得到多抗进行人血浆的蛋白印迹和睾丸组织样本免疫组化,图3,结果说明我们制得多抗能与天然的人FKBPL蛋白反应,且具有特异性。

[0021] 5、酶标二抗:购自美国R & D systems,为辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的羊抗兔IgG。

[0022] 6、本试剂盒对FKBPL的ELISA检测步骤包括:

(1)待测样品、标准样、阳性对照依次加入微孔中,进行孵育,FKBPL将与固相载体表面的捕获抗体——预先包被在孔内的抗体相结合。

[0023] (2)经过洗涤,将特异性的抗FKBPL的多抗加入孔内,在第二次孵育中,多抗扮演检测抗体,并与第一次孵育中被捕获的FKBPL结合。

[0024] (3)洗去多余的多抗,加入酶标二抗,在第三次孵育中,酶标二抗与上一步中的多

抗——检测抗体相结合,形成一个4组分的夹心形状的结合物。

[0025] (4) 洗去未结合的酶标二抗,加入酶的底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(tetramethyl benzidine,TMB),孔内液体在过氧化物酶的催化下转化成蓝色,加入终止液,转化成黄色。颜色的深浅和样品中FKBPL的含量呈正相关。

[0026] (5) 用酶标仪在450nm波长下测定吸光度(O.D.值),计算样品中FKBPL浓度。

[0027] 这种新的FKBPL ELISA检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒由上述特异性的FKBPL的单抗包被的酶标板、FKBPL蛋白标准品、FKBPL的阳性对照样品、FKBPL的多抗、辣根过氧化物酶标记的二抗构成,具体组分为:(1)酶标板:由FKBPL的单抗包被;(2)样品稀释液:含8%小牛血清pH7.4的0.01mol/l PBS;(3)洗涤液;(4)FKBPL蛋白标准品;(5)FKBPL的阳性对照样品;(6)FKBPL的多抗;(7)辣根过氧化物酶标记的二抗;(8)显色液:TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>系统;(9)终止液:2mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液。

[0028] 本试剂盒所有指标符合美国R&D systems ELISA试剂盒各项指标的严格要求。目前,国外几大ELISA试剂盒生产商尚未有FKBPL的ELISA试剂盒的报道,而国内厂家的产品处于初创阶段,基本没有FKBPL的阳性内参,所得到的测量结论值得商榷。本试剂盒采用20个阴性样品的平均值加上2倍标准方差作为最低检出线,为7 pg/ml,本发明提高了检出精度。

[0029] 本发明选取包含了识别功能区的FKBPL片段,并将其作为抗原免疫小鼠得到特异性的高纯度单抗。对单抗进行特异性检测,用人血浆进行蛋白印迹检测(图5),验证单抗能特异性识别人天然的FKBPL蛋白,以此单抗作为捕获FKBPL的抗体,保证了检测结果的特异性,最大程度避免了假阳性。验证多抗的特异性(图2,图3和图4),随后以特异性多抗作为检测抗体,进一步排除了假阳性;加入酶标二抗,形成一个4组分的夹心形状的结合物,最后加入底物显色液,将以上得到的正确信号有效放大,对比同步平行进行的标准品和内参实验,进一步排除实验中的试剂或操作误差,最终得到可信赖的结论。

[0030] 本发明与现有技术相比具有以下优点和效果:

- 1、应用范围广泛:适用于人血清、组织和细胞培养物;
- 2、检测速度快:仅约3小时;
- 3、使用便捷:不需要复杂仪器;
- 4、步骤简单;

5、所得结果准确可靠:通过多步特异性的抗原、抗体的亲和反应,层层有效地降低了非特异性反应;而且除提供标准品外,还提供阳性对照,确保所得数据排除了众多试剂、温度等因子的干扰。

[0031] 附图说明:

图1:本发明试剂盒盒体及组成成分。

[0032] 图2:用MCF-7 细胞检测FKBPL蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳图。

[0033] 图3:用人脑组织总蛋白检测FKBPL蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳图。

[0034] 图4: FKBPL多克隆抗体的免疫组化图,检测样本是石蜡包埋的人睾丸,抗体稀释比1:50。

[0035] 图5:FKBPL多克隆抗体的免疫组化图,检测样本是石蜡包埋的人乳腺癌组织,抗体稀释比1:50。

## 具体实施方式

### [0036] 1、试剂：

(1) 包被液(0.02mol/l, pH9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液):  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.6g,  $\text{NaHCO}_3$  1.16g,  $\text{Na}_2\text{N}_3$  0.2g, 加双蒸水至1000ml, 调pH至9.6。

[0037] (2) 标本稀释液(含8%小牛血清pH7.4的0.01mol/l PBS):  $\text{NaCl}$  8.0g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.3g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g,  $\text{KCl}$  0.2g, 硫柳汞0.1g, 加双蒸水至1000ml, 调pH至7.4。

[0038] (3) 封闭液(8%小牛血清/PBS溶液): 小牛血清80ml, 0.01mol/l pH7.4 PBS 920ml。

[0039] (4) 洗涤液(pH7.4 PBST):  $\text{NaCl}$  8.0g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.3g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g, Tween 20 0.5g, 硫柳汞0.1g, 加双蒸水至1000ml, 调pH至7.4。

[0040] (5) 酶标二抗(HRP标记的羊抗兔多抗): 购自美国R&D systems, 使用时用PBS稀释至1:10000稀释。

[0041] (6) FKBPL蛋白标准品: 全长235个氨基酸的FKBPL蛋白的0.01mol/l PBS溶液, pH7.4, 含55%甘油、0.1%BHA和0.01%硫柳汞, FKBPL终浓度为10 ng/ml, 使用时用标本稀释液稀释至10、5、2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0 ng/ml 八个梯度。

[0042] (7) FKBPL的阳性对照样品: FKBPL蛋白的0.01mol/l、pH7.4的PBS溶液, 含50%甘油、10% 牛血清、0.5%BSA、0.1%BHA和0.01%硫柳汞, FKBPL的终浓度为10 ng/ml, 使用时用标本稀释液作1:1000稀释。

[0043] (8) 抗FKBPL的多抗: 多抗的PBS溶液, 含55%甘油、0.1%BHA和0.01%硫柳汞的0.01mol/l、pH7.4, 多抗的终浓度为1mg/ml, 使用时用标本稀释液作1:10000稀释。

[0044] (9) 底物显色液(TMB- $\text{H}_2\text{O}_2$ 系统):

① 底物液A(3',3',5,5'-四甲基联苯胺tetramethyl benzidine,TMB): TMB 200毫克, 无水乙醇100ml, 加双蒸水至990ml;

② 底物液B( $\text{H}_2\text{O}_2$ 尿素):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  36.8g, 柠檬酸9.3g, 1%过氧化氢尿素4.8ml, 加双蒸水至1000ml, 调pH至5.2。

[0045] ③加入酶标孔前10分钟将底物液A和底物液B两者1:1混合, 作为底物显色液。

[0046] (10) 终止液(2mol/l  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 溶液): 烧杯内预先加入600ml双蒸水, 将浓硫酸100ml缓慢滴加, 不断搅拌, 冷却至室温后定容至900ml。

### [0047] 2、主要仪器：

(1) 酶标仪: BIO-RAD Model 680。

[0048] (2) ELISA反应板: 美国Corning Incorporated costar R 96 Well EIA/RIA plate。

[0049] (3) 水浴锅: 购自美国Napco公司, Model 203。

### [0050] 3、方法：

(1) 酶标二抗最适滴度的选择

① 将100ng/ml 兔IgG包被反应板, 洗涤;

② 将酶标二抗用标本稀释液作一系列稀释, 加入孔内, 37℃, 孵育40分钟后, PBST洗涤3次;

③ 加入底物显色, 20分钟后加入终止液;

④读取吸光值,取吸光值为1.0时的酶标二抗稀释度——1:10000作为酶标二抗的最佳稀释度。

[0051] (2) 棋盘法选择单抗的最佳包被滴度

①用包被液将单抗作一系列稀释后,4℃包被反应板16-24小时,PBST洗涤3次,除尽孔内液体;

②加入标准样和FKBPL阳性对照、阴性参考溶液,孵育,洗涤;

③加入多抗溶液,孵育,洗涤;

④加入酶标二抗,孵育,洗涤;

⑤加入底物显色,20分钟后加入终止液;

⑥读取吸光值,选取FKBPL阳性对照样吸光值为0.8至1.0,阴性对照的吸光值小于0.1的单抗包被稀释度——1:10000作为最佳稀释度。

(3) 单抗包被反应板的制备方法:

①以碳酸盐缓冲液稀释单抗,包被96孔板,每孔100μl,置于4℃湿盒16-24小时,PBST洗涤3次,每次30秒,然后拍干,除尽孔内液体;

②用含8%小牛血清的pH7.4的PBS封闭,每孔200μl,37℃,2小时,PBST洗涤3次,干燥后密封;该板即为抗FKBPL的单抗包被的酶标板,可用于FKBPL的特异性检测。

[0052] (4) 试剂盒的构成:

所述试剂盒由特异性单抗包被反应板制得的酶标板、标本稀释液、洗涤液、酶标二抗、FKBPL标准品、FKBPL阳性对照样品、多抗、底物、终止液组成,具体组分为:

①酶标板:FKBPL的单抗包被的酶标板;

②标本稀释液:含8%小牛血清和pH7.4的0.01mol/l PBS;

③洗涤液:pH7.4 PBST;

④酶标二抗:HRP标记的羊抗兔IgG;

⑤FKBPL标准品: FKBPL蛋白的PBS溶液,FKBPL终浓度为10 ng/ml;

⑥FKBPL阳性对照样品: FKBPL蛋白的PBS溶液,FKBPL终浓度为1mg/ml;

⑦ 多抗:多抗的PBS溶液,抗体终浓度为1mg/ml;

⑧底物显色液:TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>系统;

⑨终止液:2mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液。

[0053] (5) 利用上述试剂盒检测组织或细胞培养物、血清中FKBPL浓度的方法:

①将待测样品、标准品、阳性对照样品进行处理:用标本稀释液将血清样品进行1:10000、阳性对照1:10000稀释;标准品用标本稀释液稀释成2000、1000、500、250、125、62.5、31.25、0 pg/ml 八个梯度;

②将待测样品、标准样、阳性对照依次加入酶标孔中,每孔100μl,37℃孵育1小时,PBST洗涤3次,每次洗涤均拍干孔内液体;

③将抗FKBPL的多抗加入酶标孔内,每孔100μl,37℃孵育1小时,PBST洗涤3次;

④加入酶标二抗,每孔100μl,37℃孵育40分钟,PBST洗涤3次,每次洗涤均拍干孔内液体;

⑤加入酶的底物,每孔100μl,室温孵育20分钟后加入终止液,每孔50μl;

⑥用酶标仪在450nm波长下测定吸光度,制作不同浓度标准品的吸光值为Y轴、以其浓



度的对数为X轴制得标准曲线。

[0054] ⑦计算结果:如果阳性对照样品的测定值和标示值(10 ng/ml)相比较,其变异系数小于10%,说明测定过程可靠,可依据标准曲线计算所测样品中FKBPL浓度。



图1



图2

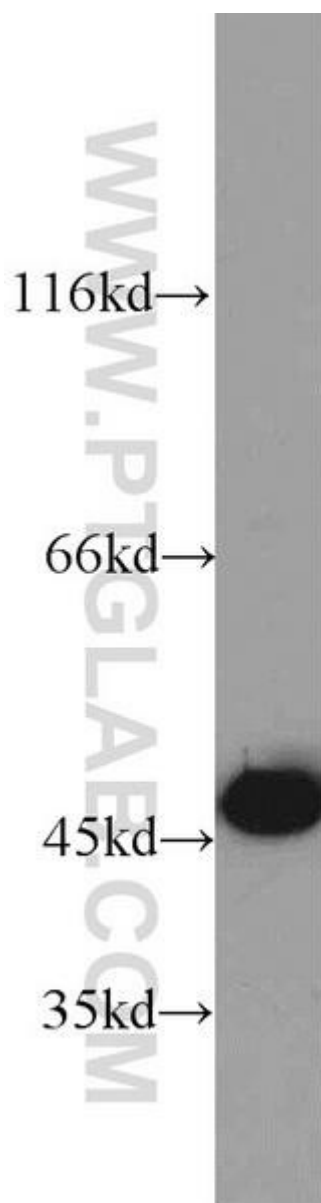


图3

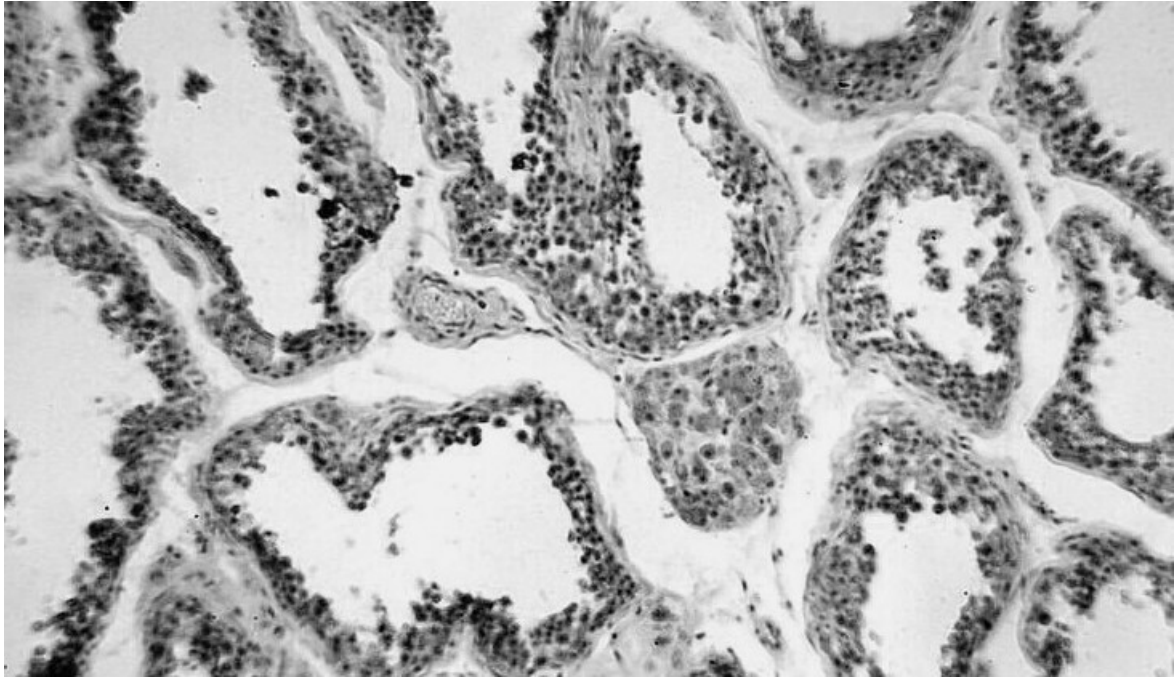


图4

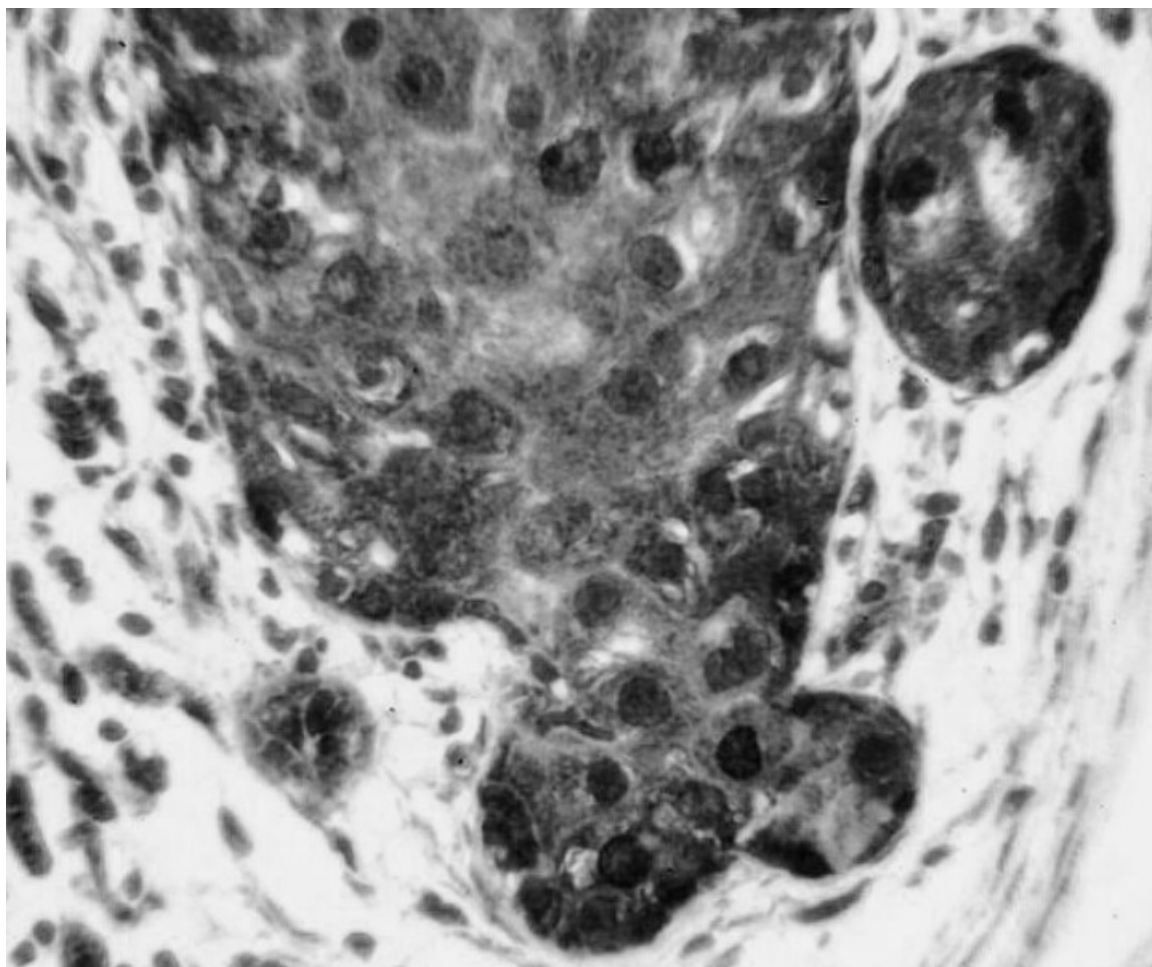


图5

专利名称(译)	一种用于人FKBP蛋白的酶联免疫检测及制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN108362870A</a>	公开(公告)日	2018-08-03
申请号	CN2017110061908.7	申请日	2017-01-27
[标]申请(专利权)人(译)	武汉三鹰生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉三鹰生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉三鹰生物技术有限公司		
[标]发明人	赵以睿 王慕元 王力军 刑田径		
发明人	赵以睿 王慕元 王力军 刑田径		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/68 G01N33/577 G01N33/574 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/543 G01N33/57484 G01N33/57488 G01N33/577 G01N33/68		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种酶联免疫及其检测方法，是一种新的抗人FKBP蛋白的单抗包被酶标板及酶联免疫试剂盒的制备方法。其关键之处主要在于用基因工程方法制备特异性的鼠抗人FKBP蛋白的单抗，并将此抗体纯化后包被于酶标板上，做为试剂盒的一部分。试剂盒还包括FKBP的重组蛋白标准品、抗人FKBP蛋白的多抗、辣根过氧化物酶标记的二抗、样本稀释液、抗体稀释液、显色液、终止液。试剂盒建立了快捷简便测定人血清和血浆中FKBP蛋白浓度的测定方法。试剂盒主要用于供科学研究和临床实验的研究使用。

