



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101985475 A

(43) 申请公布日 2011.03.16

(21) 申请号 200910263631.1

(22) 申请日 2009.12.19

(66) 本国优先权数据

200910055490.4 2009.07.28 CN

(71) 申请人 复旦大学附属华山医院

地址 200031 上海市乌鲁木齐中路 12 号

(72) 发明人 胡仁明 王宜春

(74) 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司

31200

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页

(54) 发明名称

新型分泌肽 INM02 的多克隆抗体及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,提供了新型分泌肽 INM02 的多克隆抗体及其制备方法,所述多克隆抗体通过下述步骤制备:(1) 将 INM02 蛋白与弗氏完全佐剂乳化,注射于白兔背部进行初次免疫;(2) 初次免疫后在第 4、7、9、11 周加强免疫;(3) 末次免疫后放血,分离免疫血清;(4) 免疫血清加 NaN_3 冷冻保存。该方法获得的 INM02 多克隆抗体特异性好、效价高,可方便快捷的检测 INM02 蛋白在样本中的分布和含量。研究表明 INM02 与胰岛素分泌有密切的关系,因此,本发明为未来糖尿病的治疗提供新的途径和方法。

1. 新型分泌肽 INM02 的多克隆抗体,其特征在于含有 SEQ ID NO 1 所示的氨基酸序列。
2. 权利要求 1 所述的新型分泌肽 INM02 的多克隆抗体的制备方法,其特征在于,该方法包括如下步骤:
 - (1) 将 INM02 蛋白与弗氏完全佐剂乳化,注射于白兔背部进行初次免疫;
 - (2) 初次免疫后在第 4、7、9、11 周加强免疫;
 - (3) 末次免疫后放血,分离免疫血清;
 - (4) 免疫血清加 NaN_3 冷冻保存。
3. 如权利要求 2 所述的多克隆抗体制备方法,其特征在于,步骤 (1) 中的 INM02 蛋白含量为 80-120 μg 。
4. 如权利要求 2 所述的多克隆抗体制备方法,其特征在于,步骤 (1) 中 INM02 蛋白发散 20-40 位点注射。
5. 如权利要求 2 所述的多克隆抗体制备方法,其特征在于,步骤 (2) 中,使用与初次免疫等量的 INM02 蛋白与弗氏不完全佐剂乳化后,注射白兔进行加强免疫。
6. 如权利要求 2 所述的多克隆抗体制备方法,其特征在于,分离免疫血清后,利用蛋白 A 亲和层析法从免疫血清中纯化 INM02 多克隆抗体。
7. 如权利要求 2 所述的多克隆抗体制备方法,其特征在于,步骤 (4) 中免疫血清加 NaN_3 至浓度 0.01-0.1% 后冷冻保存。
8. 权利要求 1 所述的多克隆抗体用于制备 ELISA 检测方法所用的抗体。
9. 权利要求 1 所述的多克隆抗体用于确定 INM02 蛋白的定位。
10. 权利要求 1 所述的多克隆抗体在制备用于检测 INM02 蛋白的含量。

新型分泌肽 INM02 的多克隆抗体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及新型分泌肽 INM02 的多克隆抗体及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 2000年,在美国国家科学院院报上,首次报告了正常人下丘脑-垂体-肾上腺轴组织的基因表达谱(Hu RM, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2000 Aug 15 ;97(17) :9543-8.), 之后又建立了人胰岛素瘤组织的基因表达谱(Wang XC, et al. Endocr-Relat Cancer, 2004 ;11(2) :295-303.)。从人胰岛素瘤组织中克隆到一个新基因,将其命名为 INM02。

[0003] 人类 INM02 基因染色体定位于 19q13.3-4,大小为 16.5kb,有 12 个外显子被 11 个内含子隔开, INM02 转录本大小为 3000bp 左右,编码序列包含 762bp,编码 254 个氨基酸残基的蛋白。SignalP 软件预测 INM02 蛋白在氨基端有一个明显的信号肽, ProtFun 2.2 软件功能预测 INM02 可能属于生长因子类。Northern blotting 技术建立了 INM02 基因的组织表达谱,显示 INM02 基因组织表达比较广泛,在胰岛、膀胱、睾丸、肺脏组织中表达尤为丰富。这预示 INM02 基因是个具有非常重要功能的基因。然而要确切的了解其功能,制备其多克隆抗体是非常必需的。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供新型分泌肽 INM02 的多克隆抗体及其制备方法。具体涉及分泌肽 INM02 的基因克隆、基因表达、蛋白纯化、多克隆抗体制备、INM02 蛋白 ELISA 检测方法建立。

[0005] 本发明的另一个目的是提供上述多克隆抗体的应用。

[0006] 本发明提供了新型分泌肽 INM02 的多克隆抗体制备方法,该方法包括如下步骤:

[0007] (1) 将 INM02 蛋白与弗氏完全佐剂乳化,注射于白兔背部进行初次免疫;

[0008] (2) 初次免疫后在第 4、7、9、11 周加强免疫;

[0009] (3) 末次免疫后放血,分离免疫血清;

[0010] (4) 免疫血清加 NaN_3 冷冻保存。

[0011] 本发明的多克隆抗体制备方法,步骤(1)中的 INM02 蛋白氨基酸序列如 SEQ ID NO 1 所示。

[0012] 本发明的多克隆抗体制备方法,步骤(1)中的 INM02 蛋白含量可以为 80-120 μg , 例如 90 μg , 100 μg , 115 μg , 等。

[0013] 本发明的多克隆抗体制备方法,步骤(1)中 INM02 蛋白发散 20-40 位点注射。较好的,可以采用 24-36 位点注射。

[0014] 本发明的多克隆抗体制备方法,步骤(2)中,加强免疫是以与初次免疫等量的 INM02 蛋白与弗氏不完全佐剂乳化后注射白兔。

[0015] 本发明的多克隆抗体制备方法,分离免疫血清后,利用蛋白 A 亲和层析法从免疫

血清中纯化 INM02 多克隆抗体。

[0016] 本发明的多克隆抗体制备方法,步骤(4)中免疫血清加 NaN_3 至浓度 0.01-0.1% 后冷冻保存。例如,浓度为 0.02%,0.03%,0.05%,0.06%,0.08%,等等。冷冻保存可以采用 -70°C , -80°C 甚至液氮保存,等。

[0017] 本发明还提供了上述多克隆抗体的应用,即将所得 INM02 多克隆抗体用于制备 ELISA 检测方法所用的抗体。

[0018] 例如,将所得 INM02 多克隆抗体用于确定 INM02 蛋白的定位。或者,将所得 INM02 多克隆抗体用于检测 INM02 蛋白的含量。

[0019] 本发明中用于免疫的 INM02 蛋白可以采用基因工程或者人工合成方法获得,也可以是含有纯 INM02 蛋白的凝胶条带等。

[0020] 使用人工合成方法获得 INM02 蛋白,即按照 SEQ ID NO 1 的序列 (NCBI 登录号为 AA023975.2) 将相应的氨基酸残基逐个连接即可。

[0021] 应用基因工程及蛋白质工程进行蛋白质的表达及纯化,包括表达去除信号肽的 INM02 编码序列的蛋白质,在合适的表达载体中克隆包括去除信号肽的 INM02 的编码序列,用该载体转染宿主细胞,在适于表达该 DNA 片断的条件下培养该宿主细胞,以及从培养物中回收及纯化所需 INM02 蛋白。

[0022] 本发明中 INM02 基因的制备包括经 PCR 反应后进行纯化,核苷酸序列分析验证基因是否正确。

[0023] 将本发明的去除信号肽的 INM02 的 DNA 编码序列 (见 AY194293,其中 CDS 为 1027-1791) 与表达载体重组,形成重组表达质粒。本发明不限定特定的表达质粒。在一个优选实施方案中,本发明使用原核表达载体 pPROEX HT。

[0024] 同时将上述重组原核表达载体克隆按常规方法导入适宜原核宿主细胞。本发明不限于特定的宿主细胞,只要它能够表达所述重组表达载体。在一个优选方案中,本发明使用大肠杆菌 ROSSET (DE3) 等。

[0025] 本发明的表达产物以包涵体的形式存在于宿主细胞的胞体中,破解分离包涵体,高浓度尿素溶解包涵体,分离纯化 INM02,将纯化后蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,凝胶放入考马斯亮兰染液染色、脱色之后,用无菌手术刀片割下含有 INM02 蛋白的目的条带。

[0026] 本发明采用新西兰大白兔作为免疫动物。将含有 INM02 蛋白的凝胶碾碎,与弗氏完全佐剂乳化,多次注射免疫兔子,末次免疫后心脏采血,分离出免疫血清,采用 Western Blot 方法检测抗体的质量和滴度。

[0027] 本发明利用制备好的 INM02 多克隆抗体,同时用 HRP 标记 INM02 多克隆抗体,以原核表达纯化的 INM02 蛋白作为标准品,建立了检测血清或细胞培养液中 INM02 蛋白含量的双夹心 ELISA 方法。

[0028] 本发明利用上述获得的 INM02 多克隆抗体和 ELISA 方法,检测了人血清和 MIN6 细胞培养液中 INM02 的含量,发现 INM02 是一个在血清或 MIN6 细胞培养液中可以被检测得到的新型分泌蛋白。

[0029] 本发明利用制备好的 INM02 多克隆抗体采用免疫双组化观察 INM02 在大鼠胰腺中的定位,结果发现 INM02 定位于胰岛中,在 α 细胞和 β 细胞均有表达。

[0030] 本发明利用 Northern Blot 和 ELISA 方法观察了不同浓度葡萄糖对小鼠胰岛素瘤

细胞 MIN6 细胞的 INM02 基因和蛋白分泌的影响。结果发现随着葡萄糖浓度的升高, MIN6 细胞的 INM02 基因和蛋白分泌量逐渐增高。

[0031] 以上技术方案中所有基本分子生物学操作技术均参照《分子克隆第三版》。

[0032] 本发明应用原核表达载体 -pPROEX HT 表达纯化了 HIS-INM02 融合蛋白, 免疫家兔后得到了 INM02 的多克隆抗体。建立了检测 INM02 蛋白的 ELISA 方法, 结果显示在正常人以及不同疾病患者的血清中都检测到了 INM02 蛋白的存在, 证实 INM02 为一种新型的分泌蛋白。初步研究了 INM02 与胰岛功能或糖尿病的关系, Northern blotting 和免疫组织化学显示, INM02 基因和蛋白在胰腺主要表达于胰岛, 外分泌腺极少。细胞水平的研究显示, 葡萄糖能够调节 INM02 基因的表达和蛋白的分泌, 同低糖 (5.5mM) 相比, 高糖 (25mM) 能够明显上调 INM02mRNA 的水平和 INM02 蛋白的分泌。ELISA 的检测结果显示, 糖尿病病人血清中的 INM02 蛋白比血糖正常的人低。上述研究表明 INM02 与胰岛素分泌有密切的关系, 可能是一个与胰岛 β 细胞功能或糖尿病相关的新分泌蛋白。

[0033] 本发明应用基因工程方法生产得到特异性好、高效和高质量的 INM02 多克隆抗体, 并建立了血清或细胞培养液中 INM02 蛋白的检测方法, 这些为进一步探讨 INM02 的生理功能及其作用机制打下了基础, 为未来糖尿病的治疗提供新的途径。

具体实施方式

[0034] 实施例 1 INM02 的表达、纯化和多克隆抗体的制备

[0035] (1) INM02 原核表达载体的构建

[0036] 将编码去除信号肽的 INM02 全长蛋白的 cDNA 与 pET32a 进行双酶切 (EcoRI 和 HindIII), 用 T4 连接酶进行连接, 建立 INM02 原核表达载体。将重组载体 pPROEX HT-INM02 转化大肠杆菌 ROSSET (DE3), 氨苄青霉素培养基筛选阳性菌株, 扩增提取质粒酶切鉴定和测序证实序列正确。

[0037] (2) INM02 的表达

[0038] 挑单克隆菌落接种至 5ml YTA medium, 37°C \times 250rpm 至 OD600 = 1-2, 接种至 500ml YTA medium, 37°C \times 250rpm 至 OD600 = 1-2, 加 1M IPTG 至终浓度 1mM, 25°C 诱导表达 3h, 4°C 4000rpm 20min, 收集菌体, 超声裂解细菌并离心, 将上清和沉淀 (0.01% PBS 溶解) 分别用 5 \times 上样缓冲液混合后, 作 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮兰染色后, 可见诱导后沉淀中在分子量约 32kd 处有一浓集条带, 而上清中表达量低。提示 INM02 蛋白表达在包涵体中。

[0039] (3) INM02 纯化

[0040] 将诱导后全菌离心, 用 BugBuster (Novagen 公司) 和超声裂解细菌, 再次离心, 离心后沉淀用含有 8M 尿素的 1 \times binding buffer 溶解, 溶解的上清加入经 NiSO₄ 处理好的 resin 柱, 洗涤后用 1 \times elute buffer 置换柱中 INM02 蛋白, 得到纯化好的 INM02 蛋白。

[0041] (4) INM02 多克隆抗体制备

[0042] 将上述纯化的 INM02 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 将凝胶放入考马斯亮兰染液进行染色约 4 小时, 取出凝胶放入脱色液中进行脱色约 4~8 小时, 用无菌手术刀片割下所需的条带, 1 \times PBS 洗涤 2 次, 4°C 保存备用。采用新西兰大白兔作为免疫动物。白兔作免疫接种前采集血样以作阴性对照。将约含有 100ug INM02 蛋白的凝胶碾碎, 与弗氏完全佐剂乳化, 在白兔背部刮毛后, 分散 24-36 位点注射, 初次免疫后在 4、7、9、11 周分别以等量的抗原

与弗氏不完全佐剂乳化后加强免疫。末次免疫后心脏采血,用 Western Blot 方法检测抗体效价。末次免疫后第 10 天颈动脉放血,分离出免疫血清,免疫血清加 NaN_3 至终浓度 0.02%,分装于 1.5ml 离心管, -80° 保存备用。Western Blot 方法检测抗体滴度和质量,结果显示,均符合多抗制备要求。

[0043] 实施例 2 INM02 多克隆抗体的纯化

[0044] 应用蛋白 A 亲和层析法从兔抗血清中纯化 INM02 多克隆抗体。按体积比 1 : 1 的比例向血清中加入 Binding/Washing Buffer,向空吸附柱中加入 1ml 的 Protein A Resin 悬浊液,待树脂沉淀后,排干缓冲液,加入 5ml Binding/Washing Buffer 洗一遍树脂,向装好的吸附柱中缓慢加入稀释的血清,控制过柱流量为 1ml/min,样品完全过柱后,加 30ml Binding/Washing Buffer 洗柱子,向吸附柱中加入 10ml Elution Buffer 洗脱抗体,收集洗脱液,立即向洗脱液中加入 1M 的 Tris-HCl,调整 pH 至 7.4 ~ 8.0。

[0045] 实施例 3 HRP 标记 INM02 多克隆抗体

[0046] 用 HRP 标记 INM02 多克隆抗体,制备用于双夹心 ELISA 的第二个抗体。称取 HRP 25mg 溶于 1.25% 戊二醛溶液中,于室温静置过夜,反应后的酶溶液过 Sephadex G-25 层析柱,用生理盐水洗脱,流速控制在 1ml/1 分钟,收集棕色流出液,放置于 25ml 小烧杯中,缓慢搅拌,取待标记的抗体溶液 5ml,搅拌下逐滴加入酶溶液中,加入 1M PH9.5 碳酸缓冲液 0.25ml,继续搅拌 3 小时,在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置 4°C 1 小时,3000rpm 离心半小时,弃上清,沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次,最后沉淀物溶于少量 0.15M PH7.4 的 PBS 中,将上述溶液装入透析袋中,对 0.15M PH7.4 的 PBS 缓冲盐水透析,去除铵离子,10,000rpm 离心 30 分钟去除沉淀,上清液即为酶结合物,分装后,冰冻保存。

[0047] 实施例 4 INM02 蛋白双夹心 ELISA 检测方法的建立

[0048] 用上述蛋白 A 纯化的 INM02 抗体和 HRP 标记的抗体进行双夹心 ELISA,检测血清和细胞培养液中 INM02 蛋白的含量。用 0.05M PH 9.6 的碳酸盐包被缓冲液将抗体稀释至 $20 \mu\text{g/ml}$,在每个聚苯乙烯板的反应孔中加 0.1ml, 4°C 过夜,弃去孔内溶液,用 0.15M PH7.4 的 PBS 洗 3 次,每次 3 分钟,加血清 0.1ml 于上述已包被的反应孔中,置 37°C 孵育 1 小时,弃去孔内溶液,用 0.15M PH7.4 的 PBS 洗 3 次,每次 3 分钟,各孔中加入新鲜稀释的 HRP 标记的 INM02 抗体 (1 : 500) 0.1ml, 37°C 孵育 1 小时,弃去孔内溶液,用 0.15M PH7.4 的 PBS 洗 3 次,每次 3 分钟,于各反应孔中加入临时配制的 TMB 显色液 0.1ml, 37°C 30 分钟,于各反应孔中加入 2M 硫酸 0.05ml,终止反应,在 ELISA 检测仪上,于 450nm 处测各孔 OD 值。

[0049] 实施例 5 INM02 蛋白在胰腺组织中的细胞定位

[0050] 制备大鼠的胰腺组织石蜡切片,利用上述获得的 INM02 多克隆抗体和免疫组化方法研究 INM02 蛋白在胰腺组织中的细胞定位,结果显示 INM02 蛋白在胰腺主要表达于胰岛, α 和 β 细胞都有表达,而在外分泌腺极少。

[0051] 实施例 6 检测 INM02 蛋白在血清中的含量

[0052] 应用 SignalP 3.0 软件预测到 INM02 蛋白在氨基端有一个明显的信号肽 (MAAASAGATRLLLLLLMAVAAPSRARG, SEQ ID NO 2)。我们在华山医院体检和住院病人中,挑选了一批健康人群和糖尿病、甲状腺功能亢进、胰腺癌、肺癌、膀胱癌、前列腺增生、前列腺癌、脑膜瘤、神经鞘瘤以及性腺功能低下等病人共计 50 人,应用建立的双夹心 ELISA 方法检测了上述血清中 INM02 蛋白的含量,以大于阴性对照 2 倍值作为阳性结果。结果显示,在所有

被检测血清中,检测到了 INM02 蛋白的存在,含量最高的为一名膀胱肉瘤患者,含量最低的是性腺功能低下的患者,同时发现糖尿病患者血清中 INM02 蛋白也偏低。此外,在 MIN6 细胞培养液中也检测到了 INM02 蛋白的存在。

[0053] 实施例 7 葡萄糖调节 INM02 基因的表达和蛋白的分泌

[0054] 分别用低糖 (5.5mM) 和高糖 (25mM) 干预 MIN6 细胞和原代培养的大鼠胰岛细胞 1 小时、24 小时和 48 小时,观察 INM02 基因和蛋白分泌的改变情况。

[0055] Northern blotting 结果显示,与低糖相比,高糖能够明显上调 MIN6 细胞中 INM02 基因的表达,在 1 小时上调将近 2 倍,在 24 和 48 小时上调在 3 倍左右。同时,ELISA 结果显示,高糖培养的 MIN6 细胞 INM02 蛋白的分泌也明显增加,与低糖相比,24 小时增加 2.1 倍,48 小时增加 3.2 倍。

[0056] Real-time PCR 结果显示,与低糖相比,高糖也能够明显上调原代培养的大鼠胰岛细胞中 INM02 基因的表达,在 24 和 48 小时上调在 4 倍左右。

[0057] 同时,ELISA 结果显示,高糖培养的原代培养的大鼠胰岛细胞 INM02 蛋白的分泌也明显增加,与低糖相比,24 小时增加 2.3 倍,48 小时增加 3.1 倍。

[0058] 这进一步验证,本发明的 INM02 多克隆抗体的制备是成功的。

[0059] 本领域技术人员可最大限度地应用本发明。因此,上述的优选具体实施方案应被理解为仅是举例说明,而非已以任何方式限制本发明的范围。

[0060] 从以上描述,本领域技术人员可很容易地理解本发明的本质特征。而且在不偏离其主旨和范围的情况下,可对本发明进行各种变更和改进。

[0061] 序列表

[0062] <210>1

[0063] <211>254

[0064] <212>PRT

[0065] <213>Homo sapiens

[0066] <400>1

[0067] Met Ala Ala Ala Ser Ala Gly Ala Thr Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu

[0068] 1 5 10 15

[0069] Met Ala Val Ala Ala Pro Ser Arg Ala Arg Gly Ser Gly Cys Arg Ala

[0070] 20 25 30

[0071] Gly Thr Gly Ala Arg Gly Ala Gly Ala Glu Gly Arg Glu Gly Glu Ala

[0072] 35 40 45

[0073] Cys Gly Thr Val Gly Leu Leu Leu Glu His Ser Phe Glu Ile Asp Asp

[0074] 50 55 60

[0075] Ser Ala Asn Phe Arg Lys Arg Gly Ser Leu Leu Trp Asn Gln Gln Asp

[0076] 65 70 75 80

[0077] Gly Thr Leu Ser Leu Ser Gln Arg Gln Leu Ser Glu Glu Glu Arg Gly

[0078] 85 90 95

[0079] Arg Leu Arg Asp Val Ala Ala Leu Asn Gly Leu Tyr Arg Val Arg Ile

[0080] 100 105 110

[0081] Pro Arg Arg Pro Gly Ala Leu Asp Gly Leu Glu Ala Gly Gly Tyr Val
 [0082] 115 120 125
 [0083] Ser Ser Phe Val Pro Ala Cys Ser Leu Val Glu Ser His Leu Ser Asp
 [0084] 130 135 140
 [0085] Gln Leu Thr Leu His Val Asp Val Ala Gly Asn Val Val Gly Val Ser
 [0086] 145 150 155 160
 [0087] Val Val Thr His Pro Gly Gly Cys Arg Gly His Glu Val Glu Asp Val
 [0088] 165 170 175
 [0089] Asp Leu Glu Leu Phe Asn Thr Ser Val Gln Leu Gln Pro Pro Thr Thr
 [0090] 180 185 190
 [0091] Ala Pro Gly Pro Glu Thr Ala Ala Phe Ile Glu Arg Leu Glu Met Glu
 [0092] 195 200 205
 [0093] Gln Ala Gln Lys Ala Lys Asn Pro Gln Glu Gln Lys Ser Phe Phe Ala
 [0094] 210 215 220
 [0095] Lys Tyr Trp His Ile Ile Leu Gly Gly Ala Val Leu Leu Thr Ala Leu
 [0096] 225 230 235 240
 [0097] Arg Pro Ala Ala Pro Gly Pro Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala
 [0098] 245 250
 [0099] <210>2
 [0100] <211>27
 [0101] <212>PRT
 [0102] <213>Artificial
 [0103] <400>2
 [0104] Met Ala Ala Ala Ser Ala Gly Ala Thr Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu
 [0105] 1 5 10 15
 [0106] Met Ala Val Ala Ala Pro Ser Arg Ala Arg Gly
 [0107] 20 25

专利名称(译)	新型分泌肽INM02的多克隆抗体及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN101985475A	公开(公告)日	2011-03-16
申请号	CN200910263631.1	申请日	2009-12-19
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院		
申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院		
[标]发明人	胡仁明 王宣春		
发明人	胡仁明 王宣春		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53		
代理人(译)	吴桂琴		
优先权	200910055490.4 2009-07-28 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物技术领域，提供了新型分泌肽INM02的多克隆抗体及其制备方法，所述多克隆抗体通过下述步骤制备：(1)将INM02蛋白与弗氏完全佐剂乳化，注射于白兔背部进行初次免疫；(2)初次免疫后在第4、7、9、11周加强免疫；(3)末次免疫后放血，分离免疫血清；(4)免疫血清加NaN₃冷冻保存。该方法获得的INM02多克隆抗体特异性好、效价高，可方便快捷的检测INM02蛋白在样本中的分布和含量。研究表明INM02与胰岛素分泌有密切的关系，因此，本发明为未来糖尿病的治疗提供新的途径和方法。