



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108387724 A

(43)申请公布日 2018.08.10

(21)申请号 201710056789.6

(22)申请日 2017.02.03

(71)申请人 武汉三鹰生物技术有限公司

地址 430070 湖北省武汉市东湖高新区高新大道666号D3栋3号

(72)发明人 赵以睿 王慕元 王鹏 邢田径

(51)Int. Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图4页

### (54)发明名称

一种用于人细胞程序性死亡-配体1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,是一种新的抗人细胞程序性死亡-配体1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细胞程序性死亡-配体1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。试剂盒还包括人细胞程序性死亡-配体1的重组蛋白标准品、抗人细胞程序性死亡-配体1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人细胞程序性死亡-配体1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. 人细胞程序性死亡-配体1蛋白的单抗包被酶标板的制法,通过下列步骤制备而成:

(1) 以BC074984 DNA为模板,PCR扩增细胞程序性死亡-配体1蛋白(PD-L1) DNA片段(93nt-743nt)基因片段,与载体PET28a连接,转化BL21,表达大量28 KD PD-L1蛋白片段;

(2) 将28 KD 细胞程序性死亡-配体1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,纯化蛋白得到抗人细胞程序性死亡-配体1蛋白的单抗;

(3) 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;

(4) 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PD-L1的单抗包被的酶标板,可用于PD-L1的特异性检测。

2. 应用权利要求1所述的人细胞程序性死亡-配体1蛋白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所述的抗细胞程序性死亡-配体1蛋白的单抗包被的酶标板、细胞程序性死亡-配体1蛋白标准品、细胞程序性死亡-配体1蛋白的阳性对照样品、抗人细胞程序性死亡-配体1蛋白的多抗、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:由人细胞程序性死亡-配体1蛋白的单抗包被;(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的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG;(5)人细胞程序性死亡-配体1蛋白标准品:人细胞程序性死亡-配体1蛋白的PBS溶液,人细胞程序性死亡-配体1蛋白终浓度为20 ng/ml;(6)人细胞程序性死亡-配体1蛋白阳性对照样品:人细胞程序性死亡-配体1蛋白的PBS溶液,人细胞程序性死亡-配体1蛋白终浓度为20 ng/ml;(7)抗人细胞程序性死亡-配体1蛋白的多抗: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。

## 一种用于人细胞程序性死亡-配体1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细胞程序性死亡-配体1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] 细胞程序性死亡-配体1(PD-L1, programmed cell death-ligand 1)即细胞程序性死亡-配体1,也可以称为CD274或者B7-H1,是由CD274基因编码的I型跨膜蛋白,理论分子量为33kDa,但经过剪切或糖基化等修饰后能检测到27-35kDa、45-50kDa和65-70kDa等多个分子量。人细胞程序性死亡-配体1蛋白具有较为广泛的表达谱,在胎盘、心脏、脾脏、胰腺、淋巴结和胸腺等组织均能检测到其转录本,主要由抗原呈递细胞APCS、活化的T细胞、B细胞、DC细胞和巨噬细胞等产生;此外,多种肿瘤组织或细胞也有较高的表达水平。人细胞程序性死亡-配体1蛋白是PD1的配体之一,在正常情况下,免疫系统会对聚集在淋巴结或脾脏的外来抗原产生反应,促进具有抗原特异性的T细胞增殖,将外来抗原消灭;而PD1和人细胞程序性死亡-配体1蛋白结合后,可以传导抑制信号,减少T细胞的增殖,使产生免疫逃逸。由于肿瘤细胞可以表达人细胞程序性死亡-配体1蛋白,所以T细胞表面的PD1识别肿瘤细胞表面的人细胞程序性死亡-配体1蛋白后,传导抑制信号,导致T细胞不能发现肿瘤细胞,从而使肿瘤细胞逃避T细胞的攻击。因此,人细胞程序性死亡-配体1蛋白的表达情况与肿瘤的产生、发展、检测及死亡率有重要关系。Soomin Ahn等人通过对比正常人和甲状腺癌病人的人细胞程序性死亡-配体1蛋白表达量发现,病人体内的人细胞程序性死亡-配体1蛋白水平明显升高(S Ahn, T H Kim et al. Comprehensive screening for PD-L1 expression in thyroid cancer [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2017, 24(2): 97-106);S. Muenst研究发现人细胞程序性死亡-配体1蛋白的表达情况与乳腺癌的肿瘤大小、分级、淋巴结状态等密切相关,是乳腺癌预后的不利因素(Muenst S, Schaerli A R, Gao F, et al. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer [J]. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2014, 146(1):15-24);Xavier Frigola研究表明人细胞程序性死亡-配体1蛋白的高水平表达预示着肾细胞癌的肿瘤更大、时期更晚、死亡率更高(Frigola X, Inman B A, Lohse C M, et al. IDENTIFICATION OF A SOLUBLE FORM OF B7-H1 THAT RETAINS IMMUNOSUPPRESSIVE ACTIVITY AND IS ASSOCIATED WITH AGGRESSIVE RENAL CELL CARCINOMA [J]. *Clinical Cancer Research An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2011, 17(7):1915-23.)。此外,人细胞程序性死亡-配体1蛋白的表达还与结肠癌、子宫癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌、肝癌等众多癌症的检测、诊断及预后评估相关(Ohaegbulam K C, Assal A, Lazar-Molnar E, et al. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. [J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2015, 21(1):24-33.)。另外,Lydie Trautmann等人研

究发现,人细胞程序性死亡-配体1蛋白在HIV的诊断治疗方面也有一定作用(Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction.[J]. Nature Medicine, 2006, 12(10):1198-1202.)。

[0003] 因此,细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)是肿瘤相关检测及治疗的一个重要指标。目前国际上几大ELISA试剂盒生产商只是单一地生产人细胞程序性死亡-配体1蛋白蛋白或抗体,而未有生产整套人细胞程序性死亡-配体1蛋白 ELISA试剂盒的报道,缺乏人细胞程序性死亡-配体1蛋白在人的血液、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人细胞程序性死亡-配体1蛋白的浓度。

## 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细胞程序性死亡-配体1蛋白定量检测的ELISA试剂盒。

[0005] 本发明技术方案如下:

1、抗人细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)特异性单抗包被反应板的制备,通过以下步骤:

(1) 28 KD人细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)蛋白片段的获得:

28 KD细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)蛋白片段的原核表达:以BC074984 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扩增人细胞程序性死亡-配体1蛋白 DNA片段(93nt-743nt),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,结果表明人细胞程序性死亡-配体1蛋白 cDNA片段正确克隆至pET28a,为一个具有651 bp的完整开放式阅读框,与GenBank中人源人细胞程序性死亡-配体1蛋白基因100%同源,推算其表达的蛋白质分子量为28 KD,PI为6.4。

[0006]

①28 KD人细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)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28 KD附近新增一条带,经Western blotting鉴定,能与人细胞程序性死亡-配体1蛋白的抗体发生强阳性反应,说明该28 KD的人细胞程序性死亡-配体1蛋白蛋白具有较强的免疫原性。

[0007] ②28 KD的人细胞程序性死亡-配体1蛋白蛋白片段的制备与纯化:经大量培养、诱导、表达,使用Ni<sup>2+</sup>亲和层析柱(购自Pharmacia)纯化带有6×His标记的人细胞程序性死亡-配体1蛋白蛋白,得到大量28 KD 人细胞程序性死亡-配体1蛋白蛋白片段。

[0008] (2)制备抗人细胞程序性死亡-配体1(PD-L1蛋白)的单抗:

①人细胞程序性死亡-配体1蛋白蛋白的动物免疫:将28KD的人细胞程序性死亡-配体1蛋白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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C,2小时孵育后,PBST洗涤3次,干燥后密封;该板即为抗人细胞程序性死亡-配体1蛋白的单抗包被的酶标反应板,可用于人细胞程序性死亡-配体1蛋白的定量检测。

[0013] 2、人细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)标准品蛋白溶液的制备:

(1)人细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)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扩增人细胞程序性死亡-配体1蛋白(93nt-743nt)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,结果表人细胞程序性死亡-配体1蛋白蛋白质的cDNA正确克隆至pET28a,为一个具有651 bp的完整开放式阅读框,与GenBank中人细胞程序性死亡-配体1蛋白基因100%同源,推算其分子量为28 KD,PI为6.3。

[0014] (2)人细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)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28 KD附近新增一条带,将蛋白用聚丙烯酰胺电泳进行鉴定(图2),能与人细胞程序性死亡-配体1蛋白的抗体发生强阳性反应,说明人细胞程序性死亡-配体1蛋白蛋白具有较强的免疫原性。

[0015] (3)人细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)蛋白的制备与纯化:经大量培养、诱导、表达,使用Ni<sup>2+</sup>亲和层析柱纯化,得到大量人细胞程序性死亡-配体1蛋白蛋白。

[0016] (4)人细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)标准品制备:将人细胞程序性死亡-配体1蛋白蛋白保存于含55%甘油、0.1%BHA和0.01%硫柳汞的0.01mol/l、pH7.4的PBS之中,并使人细胞程序性死亡-配体1蛋白蛋白的终浓度为20 ng/mL

3、人细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)阳性对照样品的制备:将人细胞程序性死亡-配体1蛋白蛋白溶于含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,并使人细胞程序性死亡-配体1蛋白蛋白的终浓度为20 ng/ml。

[0017] 4、人细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)的多抗的制备:

(1)动物免疫:取纯化好的人细胞程序性死亡-配体1蛋白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:用人细胞程序性死亡-配体1蛋白交联的亲层析柱(购自Pharmacia)纯化,得到人细胞程序性死亡-配体1蛋白的多抗,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) 将得到多抗用Hep2细胞进行蛋白印迹检测和鼠心脏免疫组织化学检测(图3和图4),结果说明我们制得多抗能与人天然的人细胞程序性死亡-配体1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、本试剂盒对人细胞程序性死亡-配体1蛋白的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,人细胞程序性死亡-配体1蛋白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,将特异性的抗人细胞程序性死亡-配体1蛋白的多抗加入孔内,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人细胞程序性死亡-配体1蛋白结合。

[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人细胞程序性死亡-配体1蛋白的含量呈正相关。

[0026] (5) 用酶标仪在450nm波长下测定吸光度(O.D.值),计算样品中人细胞程序性死亡-配体1蛋白浓度。

[0027] 这种新的人细胞程序性死亡-配体1蛋白ELISA检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒由上述特异性的人细胞程序性死亡-配体1蛋白的单抗包被的酶标板、人细胞程序性死亡-配体1蛋白标准品、人细胞程序性死亡-配体1蛋白的阳性对照样品、人细胞程序性死亡-配体1蛋白的多抗、辣根过氧化物酶标记的二抗构成,具体组分为:(1)酶标板:由人细胞程序性死亡-配体1蛋白的单抗包被;(2)样品稀释液:含8%小牛血清pH7.4的0.01mol/l PBS;(3)洗涤液;(4)人细胞程序性死亡-配体1蛋白标准品;(5)人细胞程序性死亡-配体1蛋白的阳性对照样品;(6)人细胞程序性死亡-配体1蛋白的多抗;(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人细胞程序性死亡-配体1(PD-L1蛋白)的ELISA试剂盒的报道,而国内厂家的产品处于初创阶段,基本没有人细胞程序性死亡-配体1蛋白的阳性内参,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0.04 ng/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人细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)片段,并将其作为抗原免疫小鼠得到特异性的高纯度单抗。对抗进行特异性检测,用人扁桃体组织免疫组织化学检测(图5),验证单抗能特异性识别人天然的人细胞程序性死亡-配体1蛋白蛋

白,以此单抗作为捕获人细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)的抗体,保证了检测结果的特异性,最大程度避免了假阳性。对多抗进行特异性检测,用Hep2细胞进行蛋白印迹检测(图3)和鼠心脏免疫组织化学检测(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:人细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳图。

[0033] 图3:抗人细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)多克隆抗体的蛋白印迹图,检测样本是Hep2细胞的裂解液,抗体稀释比例是1:600。

[0034] 图4:抗人细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)多克隆抗体的免疫组化图,检测样本是石蜡包埋的鼠心脏,抗体稀释比1:50。

[0035] 图5:抗人细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)单克隆抗体的免疫组化图,检测样本是石蜡包埋的人扁桃体组织,抗体稀释比1:500。

## 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)人细胞程序性死亡-配体1蛋白标准品:全长216个氨基酸的人细胞程序性死亡-配体1蛋白蛋白的0.01mol/l PBS溶液,pH7.4,含55%甘油、0.1%BHA和0.01%硫柳汞,人细胞程序性死亡-配体1蛋白终浓度为20 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) 人细胞程序性死亡-配体1蛋白的阳性对照样品:人细胞程序性死亡-配体1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,人细胞程序性死亡-配体1蛋白的终浓度为20 ng/ml,使用时用标本稀释液作1:1000稀释。

[0043] (8) 抗人细胞程序性死亡-配体1蛋白的多抗: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-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>尿素):Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>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100 ng/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加入标准样和人细胞程序性死亡-配体1蛋白阳性对照、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,选取人细胞程序性死亡-配体1蛋白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200 $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C,2小时,PBST洗涤3次,干燥后密封;该板即为抗人细胞程序性死亡-配体1蛋白的单抗包被的酶标板,可用于人细胞程序性死亡-配体1蛋白的特异性检测。

[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、人细胞程序性死亡-配体1蛋白标准品、人细胞程序性死亡-配体1蛋白阳性对照样品、多抗、底物、终止液组成,具体组分为:

- ①酶标板:人细胞程序性死亡-配体1蛋白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;
- ⑤人细胞程序性死亡-配体1蛋白标准品:人细胞程序性死亡-配体1蛋白蛋白的PBS溶液,人细胞程序性死亡-配体1蛋白终浓度为20 ng/ml;
- ⑥人细胞程序性死亡-配体1蛋白阳性对照样品:人细胞程序性死亡-配体1蛋白蛋白的PBS溶液,人细胞程序性死亡-配体1蛋白终浓度为20 ng/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、血清中人细胞程序性死亡-配体1蛋白浓度的方法:

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1:1、阳性对照1:1稀释;标准品用标本稀释液稀释成10、5、2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0 ng/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100 $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C孵育1小时,PBST洗涤3次,每次洗涤均拍干孔内液体;

③将抗人细胞程序性死亡-配体1蛋白的多抗加入酶标孔内,每孔100 $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C孵育1小时,PBST洗涤3次;

④加入酶标二抗,每孔100 $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C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100 $\mu$ l,室温孵育20分钟后加入终止液,每孔50 $\mu$ l;

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(20 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人细胞程序性死亡-配体1蛋白浓度。



图1

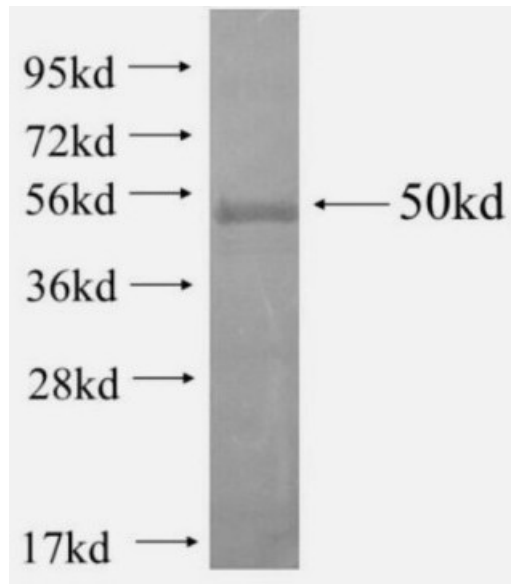


图2

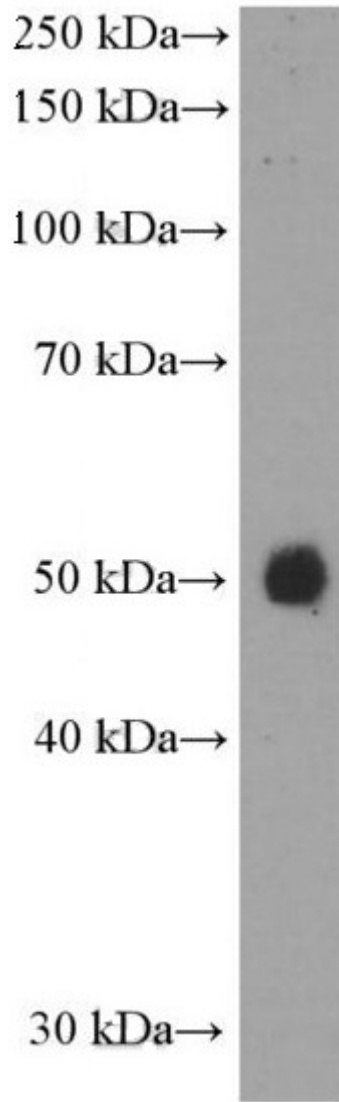


图3

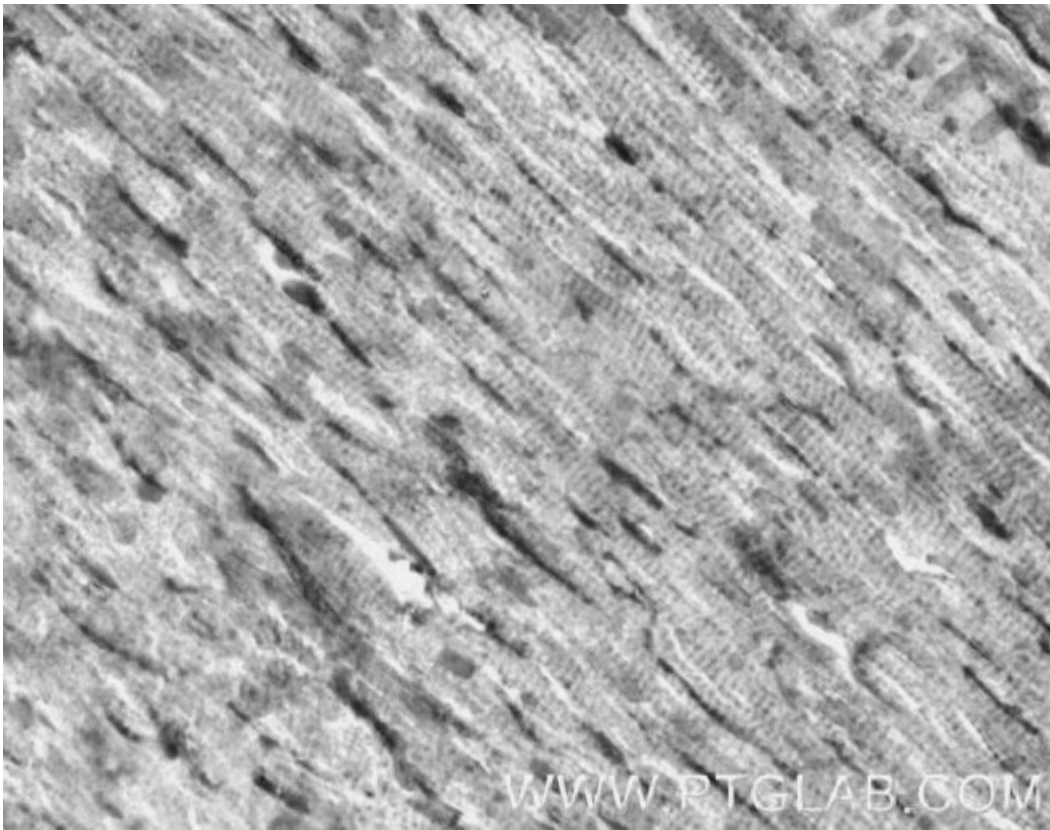


图4

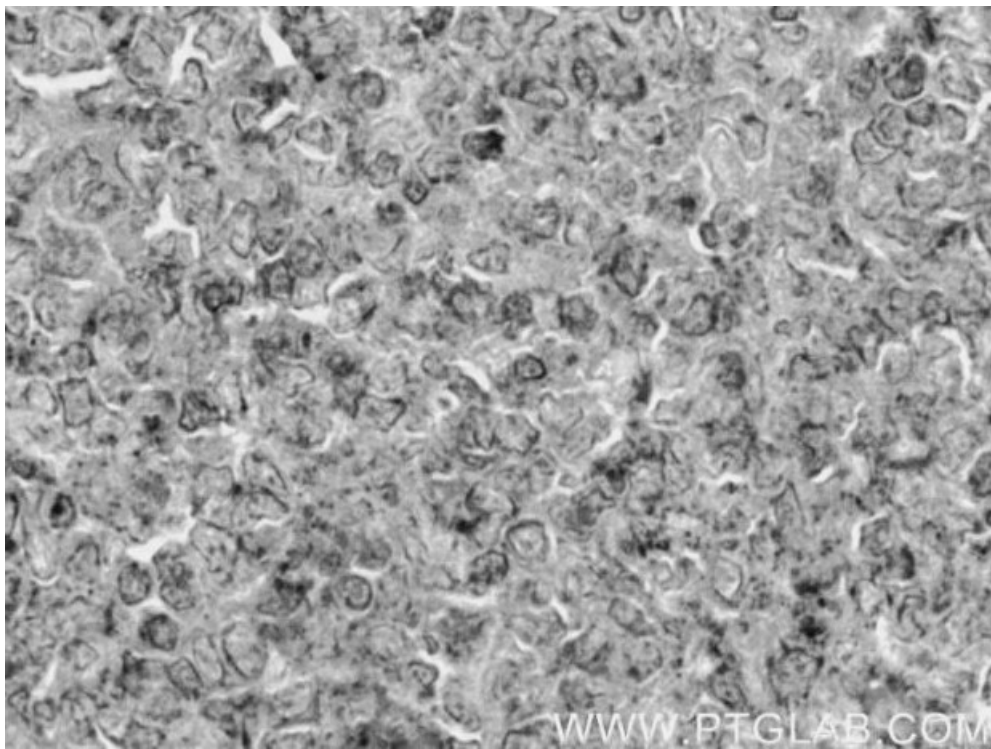


图5

专利名称(译)	一种用于人细胞程序性死亡-配体1蛋白的酶联免疫检测及制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN108387724A</a>	公开(公告)日	2018-08-10
申请号	CN2017110056789.6	申请日	2017-02-03
[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 王鹏 邢田径		
发明人	赵以睿 王慕元 王鹏 邢田径		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N21/31		
CPC分类号	G01N33/535 G01N21/31 G01N33/54306		
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，是一种新的抗人细胞程序性死亡-配体1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细胞程序性死亡-配体1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。试剂盒还包括人细胞程序性死亡-配体1的重组蛋白标准品、抗人细胞程序性死亡-配体1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人细胞程序性死亡-配体1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。

