

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610041751.3

[51] Int. Cl.
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)
G01N 21/31 (2006.01)

[43] 公开日 2006年8月30日

[11] 公开号 CN 1825117A

[22] 申请日 2006.1.28

[21] 申请号 200610041751.3

[71] 申请人 中国人民解放军第四军医大学

地址 710032 陕西省西安市长乐西路17号第
四军医大学基础部免疫学教研室

[72] 发明人 金伯泉 徐竹蔚 宋朝君

[74] 专利代理机构 西安慈源有限责任专利事务所
代理人 鲍燕平

权利要求书1页 说明书6页

[54] 发明名称

标签蛋白或含标签的融合蛋白的定量检测方法

[57] 摘要

本发明涉及一种利用双抗体夹心酶联免疫吸附试验来定量检测标签蛋白或含标签的融合蛋白的方法，其定量检测方法是：它利用在制备抗标签蛋白单克隆抗体的基础上，经过配对抗体的筛选，建立的双抗体夹心酶联免疫吸附试验，来定量检测标签蛋白或含标签的融合蛋白。为了克服免疫印迹法的不足，本发明提供一种标签蛋白或含标签的融合蛋白的定量检测方法，它不仅可以在定量检测，而且特异性强、灵敏度高、重复性好、简便易行，非常适合于快速定量检测标签蛋白或含标签的融合蛋白。

1、标签蛋白或含标签的融合蛋白的定量检测方法，其定量检测方法是：它利用在制备抗标签蛋白单克隆抗体的基础上，经过配对抗体的筛选，建立的双抗体夹心酶联免疫吸附试验，来定量检测标签蛋白或含标签的融合蛋白。

2、根据权利要求1所述的标签蛋白或含标签的融合蛋白的定量检测方法，其定量检测方法包括：抗标签蛋白的单克隆抗体的制备、配对抗体的筛选及双抗体夹心酶联免疫吸附试验的建立。

3、根据权利要求2所述的标签蛋白或含标签的融合蛋白的定量检测方法，其特征是：所述的抗标签蛋白单克隆抗体的制备方法是分别用不同的标签蛋白作为免疫原，采用常规弗氏佐剂全程免疫的方案免疫 BALB/c 小鼠；第一次免疫：加弗氏完全佐剂，30 μ g 免疫原/只；30 天后第二次免疫：加弗氏不完全佐剂，20 μ g 免疫原/只；30 天后第三次免疫：不加佐剂，20 μ g 免疫原/只；第三次免疫 10 天后由小鼠尾静脉取血，用间接酶联免疫吸附试验法检测免疫小鼠血清，效价达 1:64000 以上，供融合；融合前 3 天，取血清效价最高的一只小鼠，以 20 μ g 免疫原腹腔注射加强免疫，采用聚乙二醇为促融剂，进行免疫 B 细胞与骨髓瘤细胞融合，HAT 选择培养法筛选杂交瘤，并用有限稀释法进行克隆化，得到抗目的标签蛋白的单克隆抗体；其中 HAT，H 是次黄嘌呤；A 是氨基喋呤；T 是胸腺嘧啶核苷。

4、根据权利要求1所述的标签蛋白或含标签的融合蛋白的定量检测方法，其特征是：所述的配对双抗体的筛选方法是，将得到的单克隆抗体分别常规标记辣根过氧化物酶，分别将未标记酶的单克隆抗体作为包被抗体，将标记酶的单克隆抗体作为酶标抗体，采用阵列法两两配对挑选最好条件的配对抗体，建立双抗体夹心酶联免疫吸附试验的系统。

5、根据权利要求4所述的标签蛋白或含标签的融合蛋白的定量检测方法，其特征是：所述的最好条件的配对抗体的挑选方法是选择敏感性最高，即检测相同浓度的标签蛋白的光吸收值最高，且特异性高的配对抗体。

6、根据权利要求1所述的标签蛋白或含标签的融合蛋白的定量检测方法，其特征是：所述的双抗体夹心酶联免疫吸附试验的方法是在 96 孔板中，顺序加入包被抗体、待测标本和标准品、酶标抗体及底物，于波长 410nm 测定光吸收值，将上述挑选的最好的一对抗体分别用作包被抗体和酶标抗体来检测相应的标签蛋白，用 5mg/L 包被抗体包被 96 孔板，24 小时后用含牛血清白蛋白的缓冲液封闭 96 孔板，洗涤后加入待测标本和倍比稀释的相应标签蛋白标准品，孵育及洗涤后加入酶标抗体，再次孵育及洗涤后以 2,2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻吡咯啉-磺酸)底物显色，于波长 410nm 测定光吸收值，以标准品的光吸收值为纵坐标，相应浓度为横坐标，作标准曲线，根据待测标本的光吸收值，经曲线拟合或换算，得出待测标本中相应的标签蛋白或含标签的融合蛋白的浓度。

标签蛋白或含标签的融合蛋白的定量检测方法

技术领域

本发明涉及一种利用双抗体夹心酶联免疫吸附试验来定量检测标签蛋白或含标签的融合蛋白的方法。

背景技术

随着“人类基因组计划”的完成，人类已经进入“功能基因组计划”，其中首当其冲的就是蛋白质组学的研究。蛋白质结构和功能的多样性决定了蛋白质组学研究的难度是基因研究所无法比拟的，尤其是新基因所编码的蛋白质的结构和功能的揭示对生物学家来说是极富挑战性的。而在蛋白组学的研究领域中，标签蛋白是一种重要的工具。已有大量的试验表明，应用适当的融合标签，可以增加目的基因表达产物(即目的蛋白)的稳定性，使目的蛋白易于检测和纯化，增加表达水平，提高可溶性，并能帮助目的蛋白保留天然构像及与配体结合的能力。常见的标签包括：多聚精氨酸、多聚组氨酸、钙调蛋白结合多肽、c-myc(序列为EQKLISEEDL)、谷胱甘肽S转移酶(GST)、FLAG多肽(序列为DYKDDDDK)、葡萄球菌蛋白A、麦芽糖结合蛋白、硫氧化还原蛋白等。融合蛋白表达后，需要定性和定量的检测。目前对标签蛋白或含标签的融合蛋白的检测方法主要是免疫印迹法，它操作复杂、实验过程较长，一般需2天，用的试剂较贵，每次试验要几百元，并且只是一种定性的方法。

发明内容

为了克服免疫印迹法的不足，本发明提供一种标签蛋白或含标签的融合蛋白的定量检测方法，它不仅可以定量检测，而且特异性强、灵敏度高、重复性好、简便易行，非常适合于快速定量检测标签蛋白或含标签的融合蛋白。

本发明解决其技术问题所采用的技术方案是：提供一种标签蛋白或含标签的融合蛋白的定量检测方法，其特征是：它利用在制备抗标签蛋白单克隆抗体的基础上，经过配对抗体的筛选，建立的双抗体夹心酶联免疫吸附试验，来定量检测标签蛋白或含标签的融合蛋白。

所述的定量检测方法包括：抗标签蛋白的单克隆抗体的制备、配对抗体的筛选及双抗体

夹心酶联免疫吸附试验的建立。

所述的抗标签蛋白单克隆抗体的制备方法是分别用不同的标签蛋白作为免疫原，采用常规弗氏佐剂全程免疫的方案免疫 BALB/c 小鼠；第一次免疫：加弗氏完全佐剂，30 μ g 免疫原/只；30 天后第二次免疫：加弗氏不完全佐剂，20 μ g 免疫原/只；30 天后第三次免疫：不加佐剂，20 μ g 免疫原/只；第三次免疫 10 天后由小鼠尾静脉取血，用间接酶联免疫吸附试验法检测免疫小鼠血清，效价达 1:64000 以上，供融合；融合前 3 天，取血清效价最高的一只小鼠，以 20 μ g 免疫原腹腔注射加强免疫，采用聚乙二醇为促融剂，进行免疫 B 细胞与骨髓瘤细胞融合，HAT 选择培养法筛选杂交瘤，并用有限稀释法进行克隆化，得到抗目的标签蛋白的单克隆抗体；其中 HAT，H 是次黄嘌呤；A 是氨基嘌呤；T 是胸腺嘧啶核苷。

所述的配对双抗体的筛选方法是，将得到的单克隆抗体分别常规标记辣根过氧化物酶，分别将未标记酶的单克隆抗体作为包被抗体，将标记酶的单克隆抗体作为酶标抗体，采用阵列法两两配对挑选最好条件的配对抗体，建立双抗体夹心酶联免疫吸附试验的系统。

所述的最好条件的配对抗体的挑选方法是选择敏感性最高，即检测相同浓度的标签蛋白的光吸收值最高，且特异性高的配对抗体。

所述的双抗体夹心酶联免疫吸附试验的方法是在 96 孔板中，顺序加入包被抗体、待测标本和标准品、酶标抗体及底物，于波长 410nm 测定光吸收值，将上述挑选的最好的一对抗体分别用作包被抗体和酶标抗体来检测相应的标签蛋白，用 5mg/L 包被抗体包被 96 孔板，24 小时后用含牛血清白蛋白的缓冲液封闭 96 孔板，洗涤后加入待测标本和倍比稀释的相应标签蛋白标准品，孵育及洗涤后加入酶标抗体，再次孵育及洗涤后以 2,2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻吡咯啉-磺酸)底物显色，于波长 410nm 测定光吸收值，以标准品的光吸收值为纵坐标，相应浓度为横坐标，作标准曲线，根据待测标本的光吸收值，经曲线拟合或换算，得出待测标本中相应的标签蛋白或含标签的融合蛋白的浓度。

本发明的有益效果是，它可以快速定量检测标签蛋白或含标签的融合蛋白，因为这是在单克隆抗体基础上建立的方法，而单克隆抗体是识别单一表位的抗体，所以本发明的特异性强；又因为经过抗体的配对筛选，所以本发明的灵敏度高；本发明是建立在酶联免疫吸附试

验的基础上的，免疫印迹整个过程约需2天，而本发明只需先用5分钟左右包被抗体，放到冰箱24小时后做后面一半，后面一半约4个小时，且各复孔间的光吸收值间误差极小，所以本发明还有简便易行、重复性好的特点。

具体实施方式

抗标签蛋白单克隆抗体的制备是分别用不同的标签蛋白作为免疫原，免疫动物后，经细胞融合、筛选及克隆化得到目的单克隆抗体，采用常规弗氏佐剂全程免疫的方案免疫 BALB/c 小鼠；第一次免疫：加弗氏完全佐剂，30 μ g 免疫原/只；30 天后第二次免疫：加弗氏不完全佐剂，20 μ g 免疫原/只；30 天后第三次免疫：不加佐剂，20 μ g 免疫原/只；第三次免疫 10 天后由小鼠尾静脉取血，用间接酶联免疫吸附试验法检测免疫小鼠血清，效价达 1 : 64000 以上，供融合；融合前 3 天，取血清效价最高的一只小鼠，以 20 μ g 免疫原腹腔注射加强免疫，采用聚乙二醇为促融剂，进行免疫 B 细胞与骨髓瘤细胞融合，HAT 选择培养法筛选杂交瘤，并用有限稀释法进行克隆化，得到抗目的标签蛋白的单克隆抗体。其中 HAT，H 是次黄嘌呤；A 是氨基喋呤；T 是胸腺嘧啶核苷。

配对双抗体的筛选方法是：将得到的单克隆抗体分别常规标记辣根过氧化物酶，分别将未标记酶的单克隆抗体作为包被抗体，将标记酶的单克隆抗体作为酶标抗体，采用阵列法两两配对挑选最好条件的配对抗体，建立双抗体夹心酶联免疫吸附试验的系统。最好条件的配对抗体的挑选方法是：选择敏感性最高，即检测相同浓度的标签蛋白的光吸收值最高，且特异性高（即检测无关蛋白的光吸收值最低，也即非特异本底最低）的配对抗体。

实施例 1 定量检测麦芽糖结合蛋白的方法：

将麦芽糖结合蛋白作为免疫原，采用常规弗氏佐剂全程免疫的方案免疫 BALB/c 小鼠。第一次免疫：加弗氏完全佐剂，30 μ g 免疫原/只；30 天后第二次免疫：加弗氏不完全佐剂，20 μ g 免疫原/只；30 天后第三次免疫：不加佐剂，20 μ g 免疫原/只。第三次免疫 10 天后由小鼠尾静脉取血，用间接酶联免疫吸附试验法检测免疫小鼠血清，效价达 1 : 64000 以上，供融合。融合前 3 天，取血清效价最高的一只小鼠，以 20 μ g 免疫原腹腔注射加强免疫。采用聚乙二醇为促融剂，进行免疫 B 细胞与骨髓瘤细胞融合，HAT 选择培养法筛选杂交瘤，并用

有限稀释法进行克隆化。用麦芽糖结合蛋白免疫 BALB/c 小鼠后经细胞融合、筛选及克隆化，共得到 14 株抗麦芽糖结合蛋白的单克隆抗体，分别命名为 FMU-MBP1~FMU-MBP14。

经过抗体的配对筛选后，将 FMU-MBP12 作为包被抗体，而将 FMU-MBP4 标记辣根过氧化物酶后作为酶标抗体。用 pH9.6、0.05mol/L 的 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲液稀释包被抗体 FMU-MBP12 至 5mg/L，加入 96 孔板，100 μl /孔，保湿，4 $^\circ\text{C}$ 放置 24 小时。用洗涤缓冲液洗 96 孔板 3 次，加入含 0.3%牛血清白蛋白的缓冲液，室温封闭 30 分钟。洗板 3 次，加入待测标本和倍比稀释的麦芽糖结合蛋白标准品，100 μl /孔，37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 小时。洗板 3 次，加入 1:300 稀释的酶标抗体 FMU-MBP4，100 μl /孔，37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 小时。洗板 3 次，以 2,2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻吡咯啉-磺酸)底物显色，100 μl /孔，37 $^\circ\text{C}$ 放置 5 分钟，于波长 410nm 测定光吸收值。以标准品的光吸收值为纵坐标，相应浓度为横坐标，作标准曲线，其灵敏度达 31.3 ng/mL。根据待测标本的光吸收值，经曲线拟合，得出待测标本中麦芽糖结合蛋白的浓度为 596.3 ng/mL。标准品，即已知浓度的用来免疫小鼠的免疫原。

实施例 2 定量检测含麦芽糖结合蛋白标签的融合蛋白 MBP-RPMS1 的方法：

将麦芽糖结合蛋白作为免疫原，采用常规弗氏佐剂全程免疫的方案免疫 BALB/c 小鼠。第一次免疫：加弗氏完全佐剂，30 μg 免疫原/只；30 天后第二次免疫：加弗氏不完全佐剂，20 μg 免疫原/只；30 天后第三次免疫：不加佐剂，20 μg 免疫原/只。第三次免疫 10 天后由小鼠尾静脉取血，用间接酶联免疫吸附试验法检测免疫小鼠血清，效价达 1 : 64000 以上，供融合。融合前 3 天，取血清效价最高的一只小鼠，以 20 μg 免疫原腹腔注射加强免疫。采用聚乙二醇为促融剂，进行免疫 B 细胞与骨髓瘤细胞融合，HAT 选择培养法筛选杂交瘤，并用有限稀释法进行克隆化。用麦芽糖结合蛋白免疫 BALB/c 小鼠后经细胞融合、筛选及克隆化，共得到 14 株抗麦芽糖结合蛋白的单克隆抗体，分别命名为 FMU-MBP1~FMU-MBP14。

经过抗体的配对筛选后，将 FMU-MBP12 作为包被抗体，而将 FMU-MBP4 标记辣根过氧化物酶后作为酶标抗体。用 pH9.6、0.05mol/L 的 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲液稀释包被抗体 FMU-MBP12 至 5mg/L，加入 96 孔板，100 μl /孔，保湿，4 $^\circ\text{C}$ 放置 24 小时。用洗涤缓冲液洗 96 孔板 3 次，加入含 0.3%牛血清白蛋白的缓冲液，室温封闭 30 分钟。洗板 3 次，加入待测

标本和倍比稀释的麦芽糖结合蛋白标准品, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。洗板 3 次, 加入 1:300 稀释的酶标抗体 FMU-MBP4, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。洗板 3 次, 以 2,2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻吡咯啉-磺酸)底物显色, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 放置 5 分钟, 于波长 410nm 测定光吸收值。以标准品的光吸收值为纵坐标, 相应浓度为横坐标, 作标准曲线。根据待测标本的光吸收值, 经曲线拟合和分子量换算, 得出待测标本中融合蛋白 MBP-RPMS1 的浓度为 303.6 ng/mL。

实施例 3 定量检测谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 的方法:

将 GST 作为免疫原, 采用常规弗氏佐剂全程免疫的方案免疫 BALB/c 小鼠。第一次免疫: 加弗氏完全佐剂, 30 μ g 免疫原/只; 30 天后第二次免疫: 加弗氏不完全佐剂, 20 μ g 免疫原/只; 30 天后第三次免疫: 不加佐剂, 20 μ g 免疫原/只。第三次免疫 10 天后由小鼠尾静脉取血, 用间接酶联免疫吸附试验法检测免疫小鼠血清, 效价达 1 : 64000 以上, 供融合。融合前 3 天, 取血清效价最高的一只小鼠, 以 20 μ g 免疫原腹腔注射加强免疫。采用聚乙二醇为促融剂, 进行免疫 B 细胞与骨髓瘤细胞融合, HAT 选择培养法筛选杂交瘤, 并用有限稀释法进行克隆化。用 GST 免疫 BALB/c 小鼠后经细胞融合、筛选及克隆化, 共得到 5 株抗 GST 的单克隆抗体, 分别命名为 FMU-GST1~FMU-GST5。

经过抗体的配对筛选后, 将 FMU- GST5 作为包被抗体, 而将 FMU- GST4 标记辣根过氧化物酶后作为酶标抗体。用 pH9.6、0.05mol/L 的 Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液稀释包被抗体 FMU-GST5 至 5mg/L, 加入 96 孔板, 100 μ l/孔, 保湿, 4 $^{\circ}$ C 放置 24 小时。用洗涤缓冲液洗 96 孔板 3 次, 加入含 0.5%牛血清白蛋白的缓冲液, 室温封闭 30 分钟。洗板 3 次, 加入待测标本和倍比稀释的 GST 标准品, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。洗板 3 次, 加入 1:500 稀释的酶标抗体 FMU- GST4, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。洗板 3 次, 以 2,2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻吡咯啉-磺酸)底物显色, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 放置 5 分钟, 于波长 410nm 测定光吸收值。以标准品的光吸收值为纵坐标, 相应浓度为横坐标, 作标准曲线, 其灵敏度达 15.6 ng/mL。根据待测标本的光吸收值, 经曲线拟合, 得出待测标本中 GST 的浓度为 145.6ng/mL。

实施例 4 定量检测含 GST 标签的融合蛋白 GST-1D2 的方法:

将 GST 作为免疫原, 采用常规弗氏佐剂全程免疫的方案免疫 BALB/c 小鼠。第一次免疫:

加弗氏完全佐剂, 30 μ g 免疫原/只; 30 天后第二次免疫: 加弗氏不完全佐剂, 20 μ g 免疫原/只; 30 天后第三次免疫: 不加佐剂, 20 μ g 免疫原/只。第三次免疫 10 天后由小鼠尾静脉取血, 用间接酶联免疫吸附试验法检测免疫小鼠血清, 效价达 1:64000 以上, 供融合。融合前 3 天, 取血清效价最高的一只小鼠, 以 20 μ g 免疫原腹腔注射加强免疫。采用聚乙二醇为促融剂, 进行免疫 B 细胞与骨髓瘤细胞融合, HAT 选择培养法筛选杂交瘤, 并用有限稀释法进行克隆化。用 GST 免疫 BALB/c 小鼠后经细胞融合、筛选及克隆化, 共得到 5 株抗 GST 的单克隆抗体, 分别命名为 FMU-GST1~FMU-GST5。

经过抗体的配对筛选后, 将 FMU-GST5 作为包被抗体, 而将 FMU-GST4 标记辣根过氧化物酶后作为酶标抗体。用 pH9.6、0.05mol/L 的 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液稀释包被抗体 FMU-GST5 至 5mg/L, 加入 96 孔板, 100 μ l/孔, 保湿, 4 $^\circ\text{C}$ 放置 24 小时。用洗涤缓冲液洗 96 孔板 3 次, 加入含 0.5% 牛血清白蛋白的缓冲液, 室温封闭 30 分钟。洗板 3 次, 加入待测标本和倍比稀释的 GST 标准品, 100 μ l/孔, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 小时。洗板 3 次, 加入 1:500 稀释的酶标抗体 FMU-GST4, 100 μ l/孔, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 小时。洗板 3 次, 以 2,2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻吡咯啉-磺酸)底物显色, 100 μ l/孔, 37 $^\circ\text{C}$ 放置 5 分钟, 于波长 410nm 测定光吸收值。以标准品的光吸收值为纵坐标, 相应浓度为横坐标, 作标准曲线。根据待测标本的光吸收值, 经曲线拟合和分子量换算, 得出待测标本中融合蛋白 GST-1D2 的浓度为 250.1 ng/mL。

实施例 5~14 同实施例 3 和 4 的方法基本相同, 它建立了定量检测其他 10 种含 GST 标签的融合蛋白的方法。作出标准曲线后, 根据待测标本的光吸收值, 经曲线拟合和分子量换算, 得出待测标本中融合蛋白 GST-AML1、GST-GRASP65、GST-GRASP65-P、GST-GRASP55N、GST-Smad7、GST-SLCO6A1、GST-FMR1NB、GST-PDGF α R、GST-PDGF β R、GST-IL-2R α 的浓度分别为 427.8、373.2、447.2、377.8、624.3、497.7、250、494.6、303.4、644.7 ng/mL。

专利名称(译)	标签蛋白或含标签的融合蛋白的定量检测方法		
公开(公告)号	CN1825117A	公开(公告)日	2006-08-30
申请号	CN200610041751.3	申请日	2006-01-28
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第四军医大学		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第四军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第四军医大学		
[标]发明人	金伯泉 徐竹蔚 宋朝君		
发明人	金伯泉 徐竹蔚 宋朝君		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535 G01N21/31		
其他公开文献	CN100573151C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种利用双抗体夹心酶联免疫吸附试验来定量检测标签蛋白或含标签的融合蛋白的方法，其定量检测方法是：它利用在制备抗标签蛋白单克隆抗体的基础上，经过配对抗体的筛选，建立的双抗体夹心酶联免疫吸附试验，来定量检测标签蛋白或含标签的融合蛋白。为了克服免疫印迹法的不足，本发明提供一种标签蛋白或含标签的融合蛋白的定量检测方法，它不仅定量检测，而且特异性强、灵敏度高、重复性好、简便易行，非常适合于快速定量检测标签蛋白或含标签的融合蛋白。