

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03153441.4

C12N 15/02 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006年4月26日

[11] 授权公告号 CN 1253567C

[22] 申请日 2003.8.13 [21] 申请号 03153441.4

[71] 专利权人 公安部第二研究所

地址 100038 北京市木樨地南里17楼

[72] 发明人 李兆隆 王俭 徐秀兰 张英兰

张琦 常彩琴 严红 王香菊

孙云青 陈东风

审查员 徐莉

[74] 专利代理机构 中国商标专利事务所有限公司

代理人 万学堂

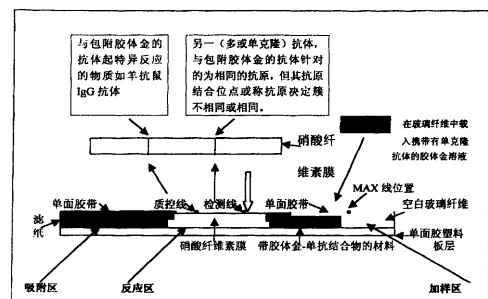
权利要求书3页 说明书12页 附图8页

[54] 发明名称

抗人精液特异蛋白 P30 检测试剂条及其含有的单克隆抗体

[57] 摘要

本发明公开了保藏号为 CGMCC 0971 和 CGMCC 0972 的杂交瘤细胞株 A7 和 H3F3，以及其产生的抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体及含有该抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体的胶体金免疫层析检测试剂条及该试剂条的制备方法。本发明由保藏号为 CGMCC 0971 和 CGMCC 0972 的杂交瘤细胞株 A7 和 H3F3 产生的抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体及制成的试剂条的灵敏度与国外最高水平的同类产品相当；但是特异性优于国外产品，或与最好的国外产品相同，完全符合法医学检验标准和要求，有利于迅速、准确地检验鉴定案件物证，快速破案，利民利国。



- 1、具有保藏号为 CGMCC 0971 的杂交瘤细胞株 A7。
- 2、具有保藏号为 CGMCC 0972 的杂交瘤细胞株 H3F3。
- 3、抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体,其从具有保藏号为 CGMCC 0971 的杂交瘤细胞株 A7 产生。
- 5 4、抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体,其从具有保藏号为 CGMCC 0972 的杂交瘤细胞株 H3F3 产生。
- 5、抗人精液特异蛋白 P30 的胶体金免疫层析检测试剂条,其特征就在于其包括:
加样区,其包括空白惰性材料区及包含包附胶体金的权利要求 4 所述抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体区;
- 10 反应区,其包含检测线和质控线;检测线是权利要求 3 所述的抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体,其与包附胶体金的权利要求 4 所述抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体针对的是相同的抗原;质控线是与包附胶体金的权利要求 4 所述的抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体起特异反应的抗抗体;
吸附区;
- 15 其中,反应区位于试剂条中央,加样区和吸附区分别在反应区两端;反应区的检测线邻近加样区,反应区的质控线邻近吸附区;加样区包附胶体金的权利要求 4 所述抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体区邻近反应区。
- 6、如权利要求 5 所述的检测试剂条,其特征是:加样区包附胶体金的权利要求 4 所述抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体加载在玻璃纤维中,加样区的空白惰性材料区是玻璃纤维。
- 20 7、如权利要求 5 所述的检测试剂条,其特征是:检测线和质控线加载在硝酸纤维素膜上。
- 8、如权利要求 7 所述的检测试剂条,其特征是:反应区的检测线喷涂的是含有 0.2—1%蔗糖的权利要求 3 所述的抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体。
- 25 9、如权利要求 7 所述的检测试剂条,其特征是:反应区的质控线喷涂的是含有 0.2—1%蔗糖的羊抗鼠 IgG 抗体。
- 10、如权利要求 5 所述的检测试剂条,其特征是吸附区是滤纸。
- 11、一种制备抗人精液特异蛋白 P30 胶体金免疫层析检测试剂条的方法,包括以下步骤:
- 30 1) 人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体的制备:将保藏号为 CGMCC 0971 杂交

- 瘤细胞株 A7 或 CGMCC 0972 杂交瘤细胞株 H3F3 按常规方法复苏并培养，分别注入小鼠腹腔内，处死小鼠，收集腹水；
- 2) 分离纯化步骤 1) 制备的抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体：以常规正辛酸加硫酸铵法或者亲和层析法进行；
 - 5 3) 胶体金的制备：将氯金酸以还原剂加热制成胶体金溶液；
 - 4) 胶体金—抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体结合物制备：将步骤 2) 中制得的 CGMCC 0972 杂交瘤细胞株 H3F3 产生的单克隆抗体加入胶体金溶液中，搅拌使抗体包附在胶体金颗粒表面上；
 - 10 5) 试剂条原材料的预处理：对与检测过程直接相关的材料玻璃纤维和硝酸纤维素膜进行预处理；
 - 6) 胶体金—抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体结合物处理及载入玻璃纤维：用包含 0.2~1.0%牛 IgG、0.1~0.5%PVP40 或 30、0.05~0.1%PEG20,000、0.5~2.0%BSA、0.02%NaN₃的生理 PBS 缓冲液、pH7.4 的稀释液稀释步骤 4) 制得的胶体金—抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体结合物，然后用稀释后的该结合物饱和浸泡玻璃纤维，然后干燥；
 - 15 7) 在处理好的反应区硝酸纤维素膜上喷涂检测线和质控线，该检测线是 CGMCC 0971 杂交瘤细胞株 A7 产生的抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体，其与包附胶体金的抗人精液特异蛋白 P30 抗体针对的是相同的抗原，该质控线是与包附胶体金的权利要求 4 所述的抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体起特异反应的抗抗体；
 - 20 8) 组装试剂条：在单面胶塑料板层上粘贴固定有加样区的步骤 5) 处理过的空白玻璃纤维区及步骤 6) 制得的胶体金—抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体结合物饱和浸泡的玻璃纤维、反应区的硝酸纤维素膜及吸附区的滤纸，其中，反应区位于试剂条中央，加样区和吸附区分别在反应区两端；
 - 25 加样区的空白玻璃纤维区一端与步骤 6) 制得的胶体金—抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体结合物饱和的玻璃纤维区一端有部分重叠；加样区的胶体金—抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体结合物饱和的玻璃纤维一端与反应区的硝酸纤维素膜的一端有部分重叠，反应区的硝酸纤维素膜的另一端与吸附区滤纸的一端有部分重叠；其中反应区的硝酸纤维素膜的一端部分与加样区的玻璃纤维上粘有单面胶带层，反应区的硝酸纤维素膜的另一端部分与滤纸上粘有单面胶胶层；
 - 30

9) 将8)所制成的母版试剂条裁剪成成品试剂条。

- 12、如权利要求11所述的制备抗人精液特异蛋白P30胶体金免疫层析检测试剂条的方法，其特征是：其中步骤5)是用含0.5%吐温80的50mM Tris-HCl, pH8.0缓冲液浸泡玻璃纤维过夜，现用现泡，无菌超纯水漂洗去盐，无菌高效过滤器下吹干；以含0.05%吐温20的20mM磷酸盐生理盐水缓冲液，pH7.4，浸泡硝酸纤维素膜1至2小时，无菌超纯水漂洗去盐，亦现用现泡并吹干，并且所有缓冲液均以0.45 μ m滤器过滤除菌。
- 5
- 13、如权利要求11所述的制备抗人精液特异蛋白P30胶体金免疫层析检测试剂条的方法，其特征是：反应区的检测线喷涂的是含有0.2—1%蔗糖的权利要求3所述
- 10
- 所述的单克隆抗体，反应区的质控线喷涂的是含有0.2—1%蔗糖的羊抗鼠IgG抗体。

抗人精液特异蛋白 P30 检测试剂条及其含有的单克隆抗体

技术领域

5 本发明属于法医学与免疫学检验技术领域，可直接用于法医物证对人精斑的确证，更具体地，本发明涉及抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体，产生该抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体的杂交瘤细胞，抗人精液特异蛋白 P30 胶体金免疫层析检测试剂条及试剂条的制备方法。

背景技术

10 在公安法医工作中，案件物证的尽快检验和做出鉴定，对于案件的及时侦破、抓捕犯罪分子或释放犯罪嫌疑人具有决定性的作用。胶体金免疫层析检测试剂条出现前，免疫学检验同类技术采用免疫电泳、免疫扩散、酶联免疫吸附分析(即 ELISA)等方法进行，这些方法或实验步骤相对较多、操作复杂、对检验人员的技术要求程度高，或检验所用时间较长，而且全都必需在室内进行。因此，建立一新方法对上述
15 上述这些问题和缺点进行改进、加以克服是很有必要的。胶体金免疫层析检测试剂条的研制及使用使得案件物证在现场就能检验并做出鉴定、甚至可由此确定犯罪嫌疑人，快速破案。但是目前国内检测人精斑的胶体金免疫层析检测试剂条，由于其中的抗人精液特异蛋白 P30 抗体的特异性没有完全达到公安或司法的检验标准，时有出现检验错误的情况，将阴道分泌物鉴定成了人精斑，而众所周知，公安或司法
20 的检验是不允许出现错检的，因为这关系着某个人的前途或命运。因此研制只对精液特异蛋白 P30 起反应、完全符合法医学检验标准和要求的抗人精液特异蛋白 P30 的单克隆抗体及试剂条非常迫切。

发明内容

25 本发明的目的是提供对人精液、纯化人 P30 液和人前列腺液起反应的抗人精液特异蛋白 P30 胶体金免疫层析检测试剂条，及该试剂条的制备方法。

本发明的另一目的是提供抗人精液特异蛋白 P30 的单克隆抗体。

本发明的另一目的是提供产生上述抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

为达上述目的，本发明的技术方案如下：

本发明使用的杂交瘤细胞株 A7, H3F3 已于 2003 年 7 月 1 日，在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏，保藏号分别为：CGMCC 0971, CGMCC 0972。

5 本发明提供了两种抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体，它们可以用常规技术分别从保藏号为 CGMCC 0971, CGMCC 0972 的杂交瘤细胞株 A7, H3F3 中产生。

本发明提供了抗人精液特异蛋白 P30 胶体金免疫层析检测试剂条，该试剂条包含至少一种本发明所述 CGMCC 0971 杂交瘤细胞株 A7 或 CGMCC 0972 杂交瘤细胞株 H3F3 产生的抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体。

10 本发明提供了抗人精液特异蛋白 P30 胶体金免疫层析检测试剂条，该试剂条依次包括：

加样区，其包括空白惰性材料区及包含包附胶体金的本发明所述的一种抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体区；

反应区，其包含检测线和质控线；

15 吸附区；

本发明检测试剂条，其特征是：加样区的空白惰性材料区一端与包含包附胶体金的本发明所述的一种抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体区一端有部分重叠。

本发明所述的检测试剂条，其特征是：加样区的一端与反应区的一端有部分重叠，反应区的另一端与吸附区的一端有部分重叠。

20 本发明所述的检测试剂条，其特征是：加样区、反应区和吸附区固定在单面胶塑料垫板层上。

本发明所述的检测试剂条，其特征是：反应区的一端部分与加样区上粘有单面胶带层，反应区的另一端部分与吸附区上粘有单面胶带层，其中反应区的一端部分与加样区上粘有的单面胶带层上标有检测时液面可达最大高度的 MAX 线。

25 本发明所述的检测试剂条，其特征是：反应区的一端部分与加样区上粘有的单面胶带层可以顺延回折包覆加样区的一端，并粘附固定在单面胶塑料垫板层的背面，反应区的另一端部分与吸附区上粘有的单面胶带层可以顺延回折包覆吸附区另一端，并粘附固定在单面胶塑料垫板层的背面。

30 本发明所述的检测试剂条，其特征是：加样区包附胶体金的本发明所述一种抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体加载在玻璃纤维中，加样区的空白惰性材料区是玻

玻璃纤维。

本发明所述的检测试剂条，其特征是：检测线和质控线加载在硝酸纤维素膜上。

5 本发明所述的检测试剂条，其特征是：反应区的检测线是另一抗人精液特异蛋白 P30 的多或单克隆抗体，其与包附胶体金的本发明所述抗人精液特异蛋白 P30 的抗体针对的是相同的抗原，但当其为单克隆抗体时，其抗原结合位点或称抗原决定簇不相同，当其为多克隆抗体时，其抗原结合位点或称抗原决定簇既有相同又有不相同。

10 本发明所述的检测试剂条，其特征是：反应区的检测线喷涂的是含有 0.2—1% 蔗糖的本发明所述 CGMCC 0971 杂交瘤细胞株 A7 产生的抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体。

本发明所述的检测试剂条，其特征是：反应区的质控线是与包附胶体金的本发明所述的抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体起特异反应的物质。

本发明所述的检测试剂条，其特征是：反应区的质控线喷涂的是含有 0.2—1% 蔗糖的羊抗鼠 IgG 抗体。

15 本发明所述的检测试剂条，其特征是：吸附区是滤纸，本发明所用滤纸是特定厚度的滤纸。

本发明的制备抗人精液特异蛋白 P30 胶体金免疫层析检测试剂条的方法，包括以下步骤：

- 20 1) 人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体的制备：将保藏号为 CGMCC 0971 杂交瘤细胞株 A7 或 CGMCC 0972 杂交瘤细胞株 HBF3 按常规方法复苏并培养，分别注入小鼠腹腔内，处死小鼠，收集腹水；
- 2) 分离纯化本发明抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体：以常规正辛酸加硫酸铵法或者亲和层析法等进行；
- 3) 胶体金的制备：将氯金酸（ HAuCl_4 ）以还原剂加热制成胶体金溶液；
- 25 4) 胶体金—抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体结合物制备：将步骤 2) 中制得的一种单克隆抗体加入胶体金溶液中，搅拌使抗体包附在胶体金颗粒表面上；
- 5) 试剂条原材料的预处理：对与检测过程直接相关的材料玻璃纤维和硝酸纤维素膜进行预处理；
- 30 6) 胶体金—抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体结合物处理及载入玻璃纤维：

用稀释液稀释步骤4)制得的胶体金-抗人精液特异蛋白P30单克隆抗体结合物,然后用稀释后的该结合物饱和浸泡玻璃纤维,然后干燥;

7) 在处理好的反应区硝酸纤维素膜上喷涂检测线和质控线;

8) 组装试剂条:在单面胶塑料板层上粘贴固定有加样区的步骤5)处理过的空白玻璃纤维区及步骤6)制得的胶体金-抗人精液特异蛋白P30单克隆抗体结合物饱和的玻璃纤维,反应区的硝酸纤维素膜及吸收区的滤纸;加样区的空白玻璃纤维区一端与步骤6)制得的胶体金-抗人精液特异蛋白P30单克隆抗体结合物饱和的玻璃纤维区一端有部分重叠;加样区的玻璃纤维一端与反应区的硝酸纤维素膜的一端有部分重叠,反应区的硝酸纤维素膜的另一端与吸收区滤纸的一端有部分重叠;其中反应区的硝酸纤维素膜的一端部分与加样区的玻璃纤维上粘有单面胶带层,反应区的硝酸纤维素膜的另一端部分与滤纸上粘有单面胶带层;

9) 将8)所制成的母版试剂条裁剪成成品试剂条;

10) 检测试剂条的性能,确定其是否合格。

15 本发明所述的制备抗人精液特异蛋白P30胶体金免疫层析检测试剂条的方法的一个特征是:其中步骤4)搅拌后,以10%NaCl鉴定其稳定情况,加BSA(牛血清白蛋白)和PEG(聚乙二醇)溶液,12,000 r/min离心50分钟,沉淀以保护液:1.0mmol/L四硼酸钠-HCl,0.1%BSA,0.01%NaN₃, (pH7.4)重悬,置4°C保存备用。

20 本发明所述的制备抗人精液特异蛋白P30胶体金免疫层析检测试剂条的方法的一个特征是:其中步骤5)是用含0.5%吐温80的50mM Tris-HCl, pH8.0缓冲液浸泡玻璃纤维过夜,现用现泡,以无菌超纯水漂洗去盐,无菌高效过滤器下吹干;以含0.05%吐温20的20mM磷酸盐生理盐水缓冲液(pH7.4)浸泡硝酸纤维素膜1至2小时,以无菌超纯水漂洗去盐,亦现用现泡并吹干,并且所有缓冲液均以0.45μm

25 过滤器过滤除菌。

本发明所述的制备抗人精液特异蛋白P30胶体金免疫层析检测试剂条的方法的一个特征是:其中步骤6)中的稀释液是:0.2~1.0%牛IgG、0.1~0.5%PVP40或30、0.05~0.1%PEG20,000、0.5~2.0%BSA、0.02%NaN₃的生理PBS缓冲液, pH7.4。

30 本发明所述的制备抗人精液特异蛋白P30胶体金免疫层析检测试剂条:其特征是:反应区的检测线喷涂的是含有0.2~1%蔗糖的本发明所述CGMCC 0971杂交瘤

细胞株 A7 产生的抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体。

本发明所述的制备抗人精液特异蛋白 P30 胶体金免疫层析检测试剂条的方法，其特征是：反应区的质控线喷涂的是含有 0.2—1% 蔗糖的羊抗鼠 IgG 抗体。

5 本发明保藏号为 CGMCC 0971 的杂交瘤细胞株 A7 和保藏号为 CGMCC 0972 的杂交瘤细胞株 H3F3 产生的抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体及制成的试剂条的灵敏度与国外最高水平的同类产品相当；但是特异性优于国外产品，或与最好的国外产品相同，完全符合医学检验标准和要求，有利于迅速，准确地检验鉴定案件物证，快速破案，利国利民。

10 为了进一步理解本发明的实质，下面结合附图及具体实施方式对本发明做进一步说明。

附图说明

图 1 是本发明实施例 2 制得的抗人精液特异蛋白 P30 胶体金免疫层析检测试剂条灵敏度和特异性的测试结果。

15 图 2 是加拿大 IND 公司抗人精液特异蛋白 P30 胶体金免疫层析检测试剂条灵敏度和特异性的测试结果。

图 3 是美国 Pan Probe 公司抗人精液特异蛋白 P30 胶体金免疫层析检测试剂条灵敏度和特异性的测试结果。

20 图 4 是美国 Acon 公司（杭州加工）抗人精液特异蛋白 P30 胶体金免疫层析检测试剂条灵敏度和特异性的测试结果。

图 5 是美国 Medyl 公司抗人精液特异蛋白 P30 胶体金免疫层析检测试剂条灵敏度和特异性的测试结果。

25 图 6 是对保存不同年限（分别为 1985 年、1995 年和 1998 年的人精斑，分别编号为一、二、三号）的陈旧人精斑进行检验，用本发明实施例 2 制得的产品（A），同时与加拿大 IND 公司（B）、美国 Acon（在杭州加工制作）（C）、Medyl（D）、Pan Probe（E）公司的抗人精液特异蛋白 P30 胶体金试剂条进行测定的检验结果。

30 图 7 是从人血痕、常见十种动物（猪、羊、牛、马、驴、狗、兔、鸡、鸭、鹅）血痕及其混合血痕、空白检材、人精斑、人唾液斑、人初乳斑、阴道分泌物以及来自案件的人血痕等共 32 份中随机抽取 20 份，用本发明实施例 2 制得的产品 A 检测的结果。

图 8 是本发明抗人精液特异蛋白 P30 胶体金免疫层析检测试剂条的最佳示意图。

具体实施方式

5 实施例 1 产生抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体的 CGMCC 0971 杂交瘤细胞株 A7 和 CGMCC 0972 杂交瘤细胞株 H3F3 的制备:

按张琦、严红、王香菊《中国法医学杂志》1990; 5 (2): 72—76 页“分泌抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体杂交瘤细胞系的建立和初步应用”一文进行。经检测, 制备出了只与人精液、纯化人 P30 液和人前列腺液起反应的多个杂交瘤细胞株, 其中包括 CGMCC 0971 杂交瘤细胞株 A7 和 CGMCC 0972 杂交瘤细胞株 H3F3。产生抗体均是小鼠 IgG₁ 亚类, 效价分别是, H3F3: 培养上清 320 倍, 腹水 1.28×10^5 倍; A7: 培养上清 32 倍, 腹水 1.0×10^4 倍。

15 实施例 2 抗人精液特异蛋白 P30 胶体金免疫层析检测试剂条的制备

15

① 腹水单抗制备: 从液氮中取出 A7 和 H3F3 细胞株, 常规方法复苏并培养。分别将培养好的适当数量的 A7 和 H3F3 培养细胞注入小鼠腹腔内, 7~10 天后或观察可以宰杀时处死小鼠、分别收集小鼠腹水。

② 分离纯化的抗人精液特异蛋白 P30 抗体: 以常规正辛酸加硫酸铵法或者亲和层析法进行, 后者具体是: 小鼠腹水中加入 1/10 体积的 1.0 mol/L Tris-HCl, pH 8.0 缓冲液, 而后再加入饱和硫酸铵溶液或固体硫酸铵至 50% 饱和度, 放置 2hr 后, 离心, 沉淀以生理 PBS (20mmol/L 磷酸氢二钠和磷酸二氢钠, 0.1mol/L NaCl, pH 7.4) 缓冲液重溶并对该缓冲液充分透析。以透析缓冲液平衡 HiTrapTM Protein G HP 柱, 透析后蛋白溶液上柱, 而后先以平衡柱的缓冲液洗脱未结合的杂蛋白, 再以 0.1mol/L 甘氨酸-HCl, pH2.7 缓冲液洗脱结合的蛋白, 测 A₂₈₀ 值, 合并该值在 0.1 以上的组份, 此即为纯化的 CGMCC 0971 杂交瘤细胞株 A7 和 CGMCC 0972 杂交瘤细胞株 H3F3 产生的抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体, SDS-PAGE (即 SDS 聚丙烯酰胺凝胶变性电泳) 测纯度, 对 5mM NaCl 溶液透析, 浓缩至适宜的浓度, 待用。

③ 胶体金制备: 称取 Sigma 公司产氯金酸 (货号: G-4022) 并配成 1% 浓度,

30

取适量加入超纯水中，加热煮沸，快速加入 1%的柠檬酸钠溶液，煮至溶液变为紫红色。冷却，以 0.2mol/L K_2CO_3 调 pH 至 8.0~8.2，0.45 μ m 过滤。取适量稀释 1 倍，测 A_{530} 值为 1.915。

- 5 ④ 胶体金-本发明抗人精液特异蛋白 P30 抗体结合物制备：按 25 μ g/ml 将纯化的 CGMCC 0972 杂交瘤细胞株 H3F3 产生的抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体加入到胶体金溶液中，搅拌 20~30 分钟，以 10%NaCl 鉴定其稳定情况。加 BSA（牛血清白蛋白）和 PEG（聚乙二醇）溶液适量，12,000 r/min 离心 50 分钟，沉淀以保护液（1.0mmol/L 四硼酸钠-HCl, 0.1%BSA, 0.01%NaN₃, pH 7.4）重悬，置 4 $^{\circ}$ C 保存备用。
- 10 ⑤ 试剂条原材料处理：为保证检验结果的准确性、特异性，对与检测过程直接相关的材料要进行预处理。具体是：以含 0.5%吐温 80 的 50 mM Tris-HCl, pH8.0 缓冲液浸泡玻璃纤维过夜，以无菌超纯水漂洗去盐，无菌高效过滤器下吹干；以含 0.05%吐温 20 的 20 mM 磷酸盐生理盐水缓冲液（pH7.4）浸泡硝酸纤维素膜 1 至 2 小时，以无菌超纯水漂洗去盐，亦现用现泡并凉干。（注：所有缓冲液均以 0.45 μ m 滤器过滤除菌）
- 15 ⑥ 胶体金-抗人精液特异蛋白 P30 抗体结合物的处理和载入玻璃纤维：以含 0.2%牛 IgG、0.5%PVP40（或 30）、0.1%PEG20,000、0.5BSA、0.02%NaN₃的生理 PBS 缓冲液，pH7.4 的稀释液将胶体金-单抗结合物稀释 8 倍，均匀地加到处理过的玻璃纤维上，37 $^{\circ}$ C 烘干。
- 20 ⑦ 在处理好的反应区硝酸纤维素膜上喷涂检测线和质控线：将步骤②纯化的 CGMCC 0971 杂交瘤细胞株 A7 产生的抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体（含量在 3mg/ml 以上）溶液（含 0.2~1%蔗糖）1 μ l 点在硝酸纤维素膜（宽约 20mm）上，点距硝酸纤维素膜相近的宽度边约 6~8mm；在距该点约 4~5 mm 的地方点 1 μ l 的羊抗鼠 IgG（含量 1mg/ml，也含 0.2~1%蔗糖）；凉干后，膜置封闭液（PBS 配制的 1.0~10%脱脂奶粉）中，37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时，取出再以洗涤液（20mM 磷酸缓冲液，pH7.0）洗两次，凉干。（注：以机器点样时，两个点样点为约 1mm 宽喷涂而成的线，其中喷 CGMCC 0971 杂交瘤细胞株 A7 产生的抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体的线称为检测线，而喷羊抗鼠 IgG 的线称为质控线。）
- 25 ⑧ 组装试剂条：在单面胶塑料垫板层（宽约 80mm、厚约 0.8mm）上，先粘贴⑦处理好的硝酸纤维素膜（注意不要粘贴有样品的一面），使其点或喷有 CGMCC 0971 杂交
- 30

瘤细胞株 A7 产生的抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体即检测线的一端距该垫板临近的宽度边约 30mm, 点或喷有羊抗鼠 IgG 即质控线的一端距垫板另一宽度边也约 30mm, 形成反应区; 将⑥处理好的材料覆盖点或喷有 CGMCC 0971 杂交瘤细胞株 A7 产生的抗人精液特异蛋白 P30 单克隆抗体一端的硝酸纤维素膜约 2mm, 其余部分粘帖于垫板上; 以⑤处理过的玻璃纤维(宽 25mm) 一端同垫板宽度边找齐并向上粘帖, 其余部分覆盖已粘帖于垫板的⑥处理好的材料, 形成加样区; 在已粘帖的硝酸纤维素膜的另一端, 以 Whatman 3M 或浙江产新华厚滤纸(宽约 30mm) 覆盖约 2mm, 其余部分粘帖于垫板上形成吸附区; 以单面胶胶带(其上应标示有指示检测时液面可达的最大高度的 MAX 线, 该线应距垫板临近宽度边约 15mm) 在粘有玻璃纤维的垫板一端覆盖约 33—35mm 再回折并粘帖于垫板背面, 在粘有滤纸的垫板另一端以单面胶胶带(通常带不同颜色) 覆盖约 33mm 也回折并粘帖于垫板背面, 注意胶带与硝酸纤维素膜的两个相接端一定要粘帖结实。由此而制成母版胶体金试剂条, 而后按 3~4mm 宽度顺垫板宽度方向裁切, 所得即为成品抗人精液蛋白 P30 胶体金检测试剂条, 如图 8 所示。

15

实验结果

成品试剂条的检测

实验1 灵敏度测定:

以6人份冻存混合人精液, SIGMA 公司产人 PSA (Prostate Specific Antigen 前列腺特异抗原) (货号 P-3338) 纯化蛋白为抗原, 用本发明实施例 2 制得的抗人精液特异蛋白 P30 胶体金检测试剂条(A), 同时与加拿大 IND 公司(B)、美国 Acon (在杭州加工制作) (C)、Medy1 (D)、Pan Probe (E) 公司的抗人精液蛋白 P30 胶体金检测, 结果见图 1 到图 5, 及表 1。

25

30

表1 灵敏度及与国外同类产品比较

抗原稀 释倍数	A		B		C		D		E		
	10	30	10	30	10	30	10	30	10	30	
5	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	2000	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	5000	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	10000	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	50000	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
10	100000	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	200000	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	300000	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
抗原定量浓度(ng/ml)											
15	500	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	100	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	50	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	10	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	4	+	+	±	±	+	+	+	+	-	-
20	2	±	±	-	-	+	+	+	+	-	-

注:表中“+”代表阳性;“-”代表阴性;“±”似阴似阳;10和30单位为分钟,表示观察时间。

结论:本发明抗人精液特异蛋白 P30 胶体金免疫层析检测试剂条的灵敏度相当或优于国外同类产品。

实验2 准确性、特异性测定:

以人阴道分泌物斑、混合人血清、唾液和初乳为抗原,用本发明实施例2制得的抗人精液蛋白 P₃₀胶体金检测试剂条(A),同时与加拿大 IND 公司(B)、美国 Acon(在杭州加工制作)(C)、Medyll(D)、Pan Probe(E)公司的抗人精液蛋白 P30 胶体金检测,结果见图1到图5,及表2。

表2 准确性、特异性、国外同类产品比较

	抗原及 稀释倍数	A		B		C		D		E	
		10	30	10	30	10	30	10	30	10	30
5	阴	20	-	-	-	-	-	-	±	+	+
	道										
	分	100	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	泌										
10	物	1000	-	-	-	-	-	-	-	±	±
	人	20	-	-	-	-	-	+	+	±	±
	血	100	-	-	-	-	-	+	+	±	±
	清	1000	-	-	-	-	±	+	-	-	-
15	人	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	唾	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	液	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	人	20	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	初	100	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	乳	1000	-	-	-	-	±	±	-	-	-
	生理盐水		-	-	-	-	-	-	-	-	-

注：表中“+”代表阳性；“-”代表阴性；“±”似阴似阳；10和30单位为分钟，表示观察时间。

结论：本发明抗人精液特异蛋白P30胶体金免疫层析检测试剂条的准确性和特异性优于国外同类产品。

实验3 陈旧人精斑检验

对保存不同年限（分别为1985年、1995年和1998年的人精斑，分别编为一、

二、三号)的陈旧人精斑进行检验;用本发明实施例2制得的抗人精液蛋白P30胶体金检测试剂条(A),同时与加拿大IND公司(B)、美国Acon(在杭州加工制作)(C)、Medy1(D)、Pan Probe(E)公司的抗人精液蛋白P30胶体金检测,结果见图6,及表3。

5 表3 与国外同类产品对陈旧人精斑的检测比较

不同年代人精斑	A		B		C		D		E	
	5	30	5	30	10	30	10	30	10	30
一	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
二	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 三	+	+	+	+	±	+	+	+	±	+

注:表中“+”代表阳性;“-”代表阴性;“±”似阴似阳;5、10和30单位为分钟,表示观察时间。

结论:抗人精液特异蛋白P30胶体金免疫层析检测试剂条在检测陈旧人精斑方面性能相当或优于国外同类产品。

15

实验4 随机盲测

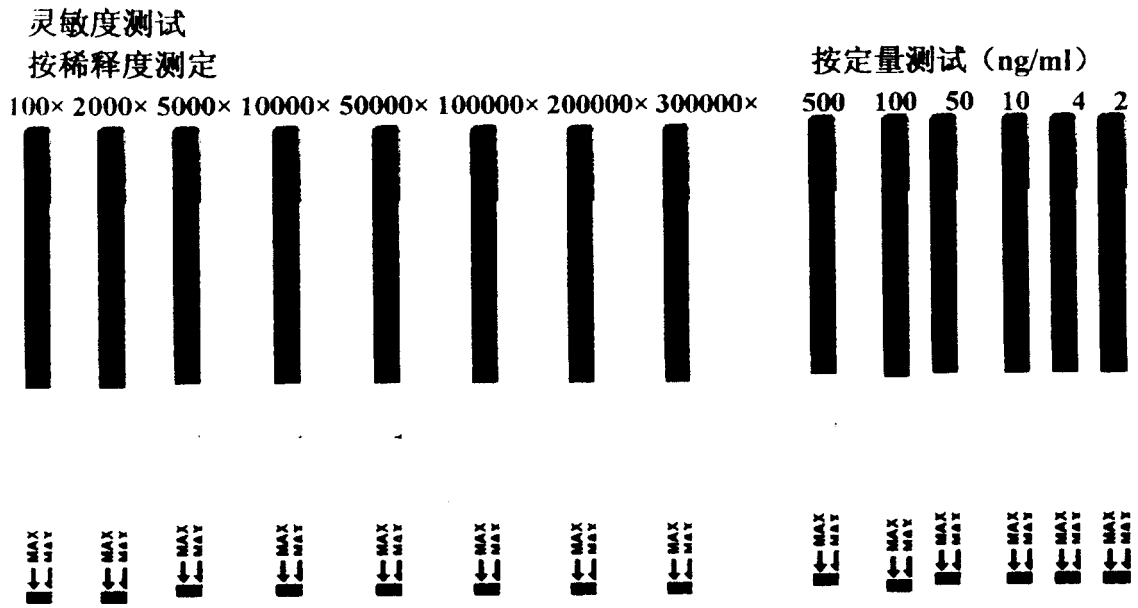
20 从人血痕、常见十种动物(猪、羊、牛、马、驴、狗、兔、鸡、鸭、鹅)血痕及其混合血痕、空白检材、人精斑、人唾液斑、人初乳斑、阴道分泌物以及来自案件的人血痕等共32份中随机抽取20份,对本发明所研制抗人精液蛋白P30胶体金检测试剂条进行检测,结果见表4。

表4 盲测检验结果

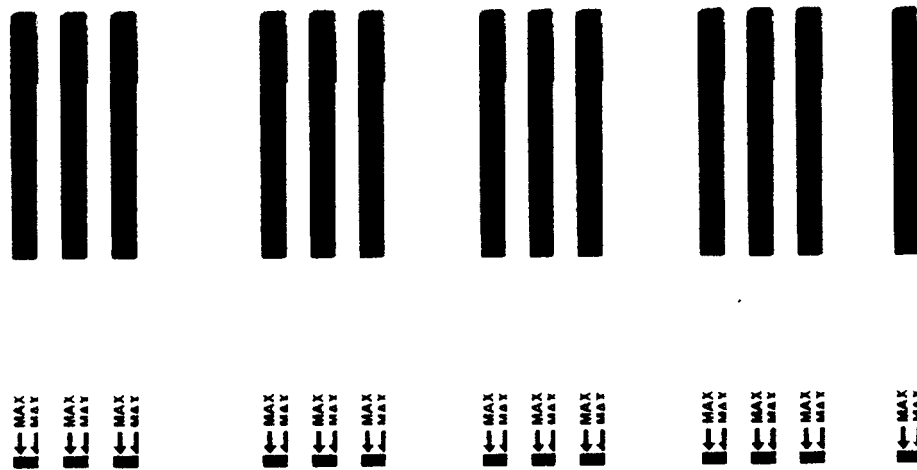
编号	检材名称	结果	编号	检材名称	结果
1	人血斑	-	11	人精斑	+
2	唾液斑	-	12	狗血痕	-
3	阴道分泌物	-	13	鸡血痕	-
4	人精斑	+	14	人血斑	-
5	兔血痕	-	15	猪血痕	-
6	空白检材	-	16	王辉血样	-
7	人初乳	-	17	人精斑	+
8	常见十种动物混合血斑	-	18	羊血痕	-
9	死者贾继兵血样	-	19	阴道分泌物	-
10	人精斑	+	20	牛血痕	-

结论: 本发明抗人精液特异蛋白 P30 胶体金免疫层析检测试剂条对盲测检材做出了准确检验。

实验结果表明, 本发明所制备的抗人精液蛋白 P30 胶体金检测试剂条灵敏度与国外最高水平的同类产品相当; 但特异性则优于国外产品, 国外产品都或多或少存在非特异反应; 而对陈旧人精斑的检验也说明其达到国际领先水平; 对实际检材的盲测完全正确。证明了其在法医学上的独特价值。



特异性测定



阴道分泌物(20× 100× 1000×) 人血清(20× 100× 1000×) 人初乳(20× 100× 1000×) 人唾液(20× 100× 1000×) 生理盐水

图 1

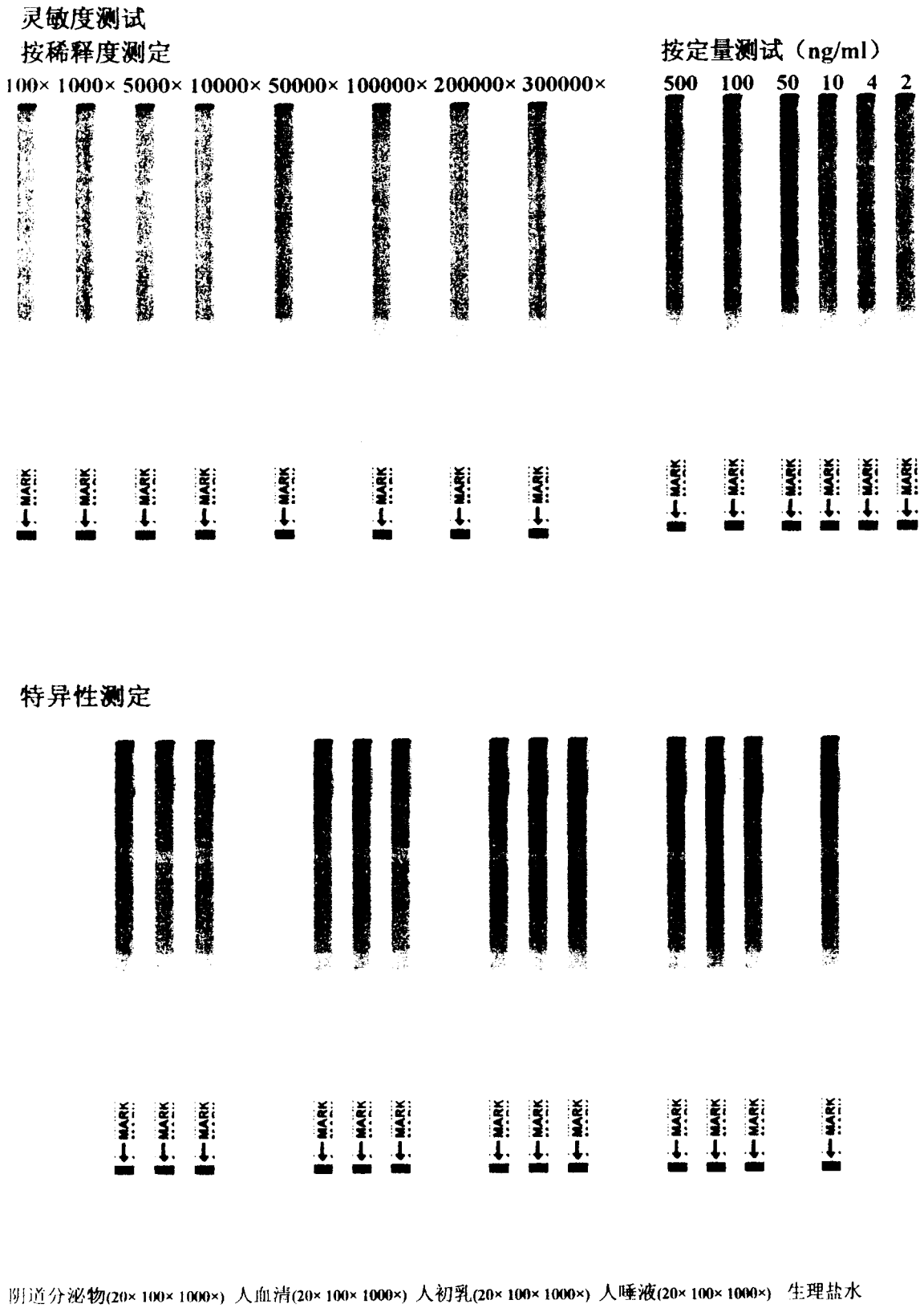


图 2

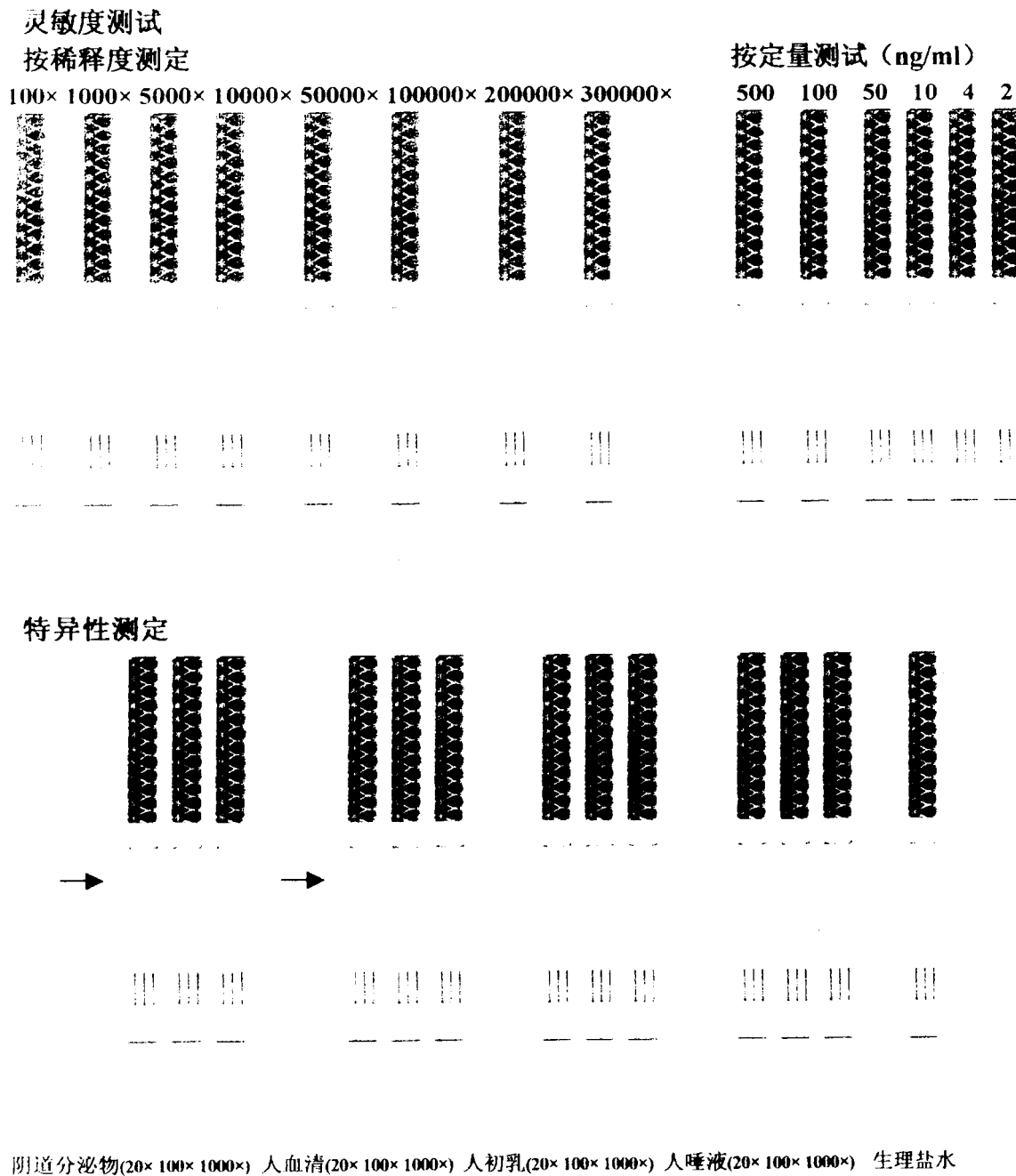
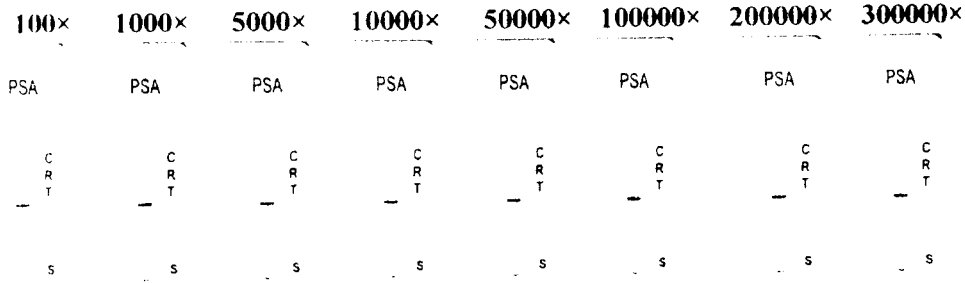
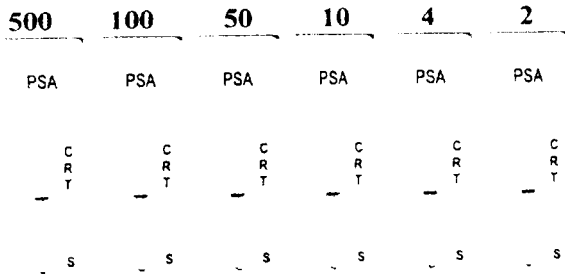


图 3

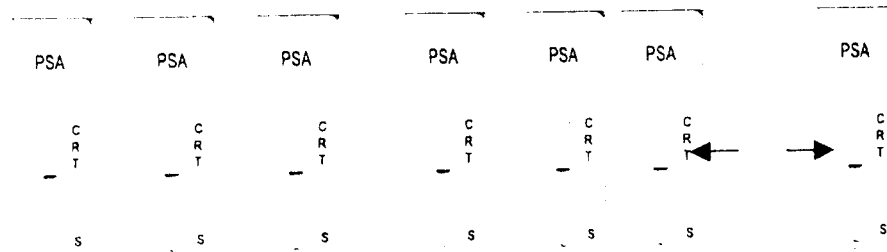
**灵敏度测试
按稀释度测定**



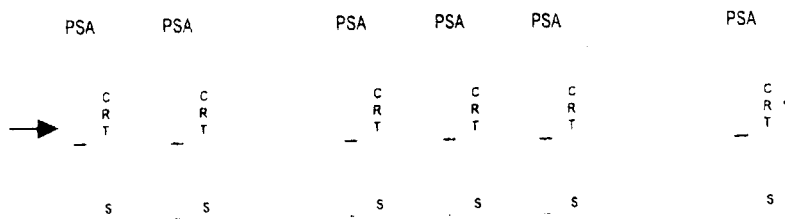
按定量测试 (ng/ml):



特异性测定



阴道分泌物(20× 100× 1000×) 人血清(20× 100× 1000×) 人初乳(20×



100× 1000×) 人唾液(20× 100× 1000×) 生理盐水

图 4

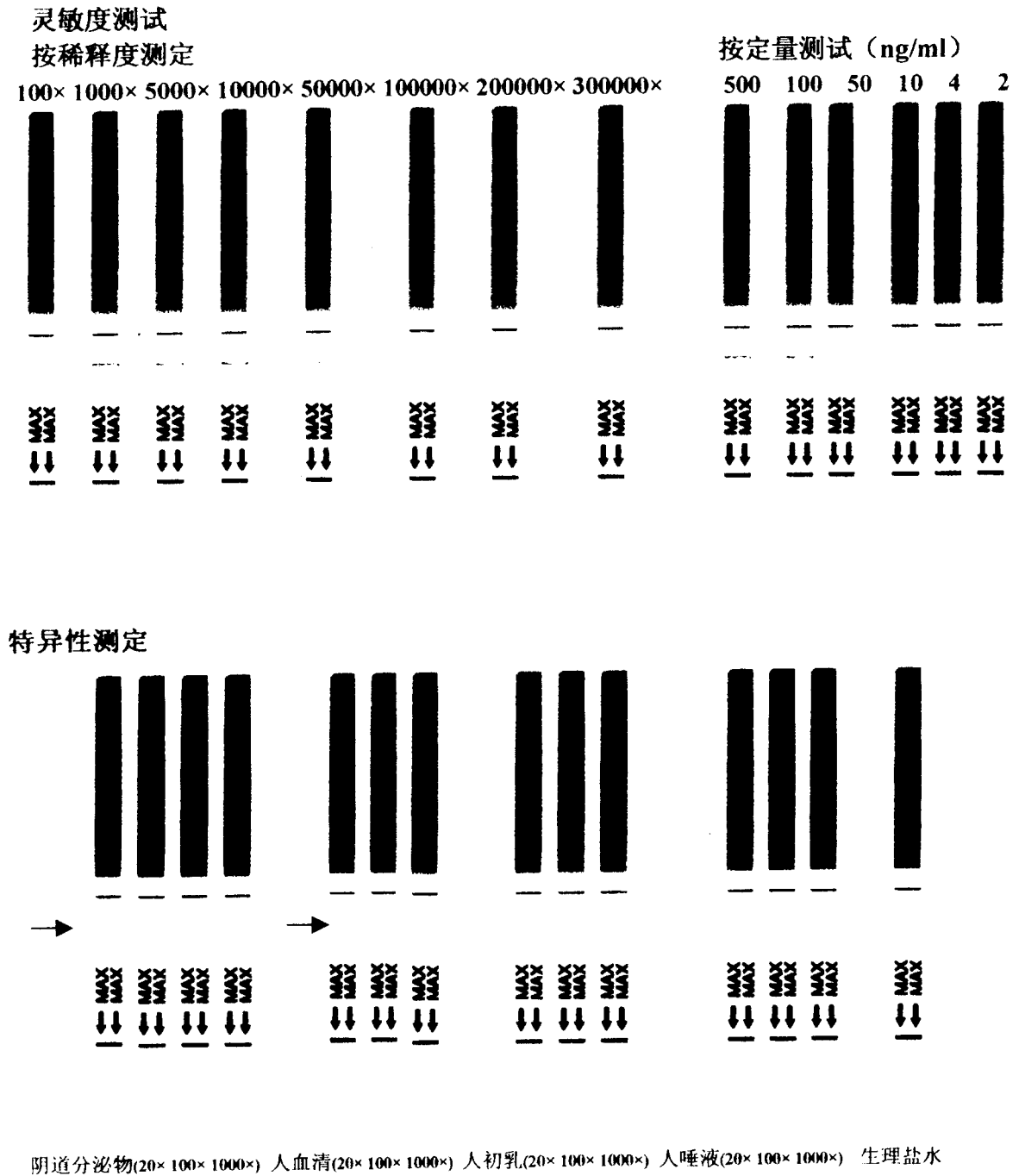


图 5

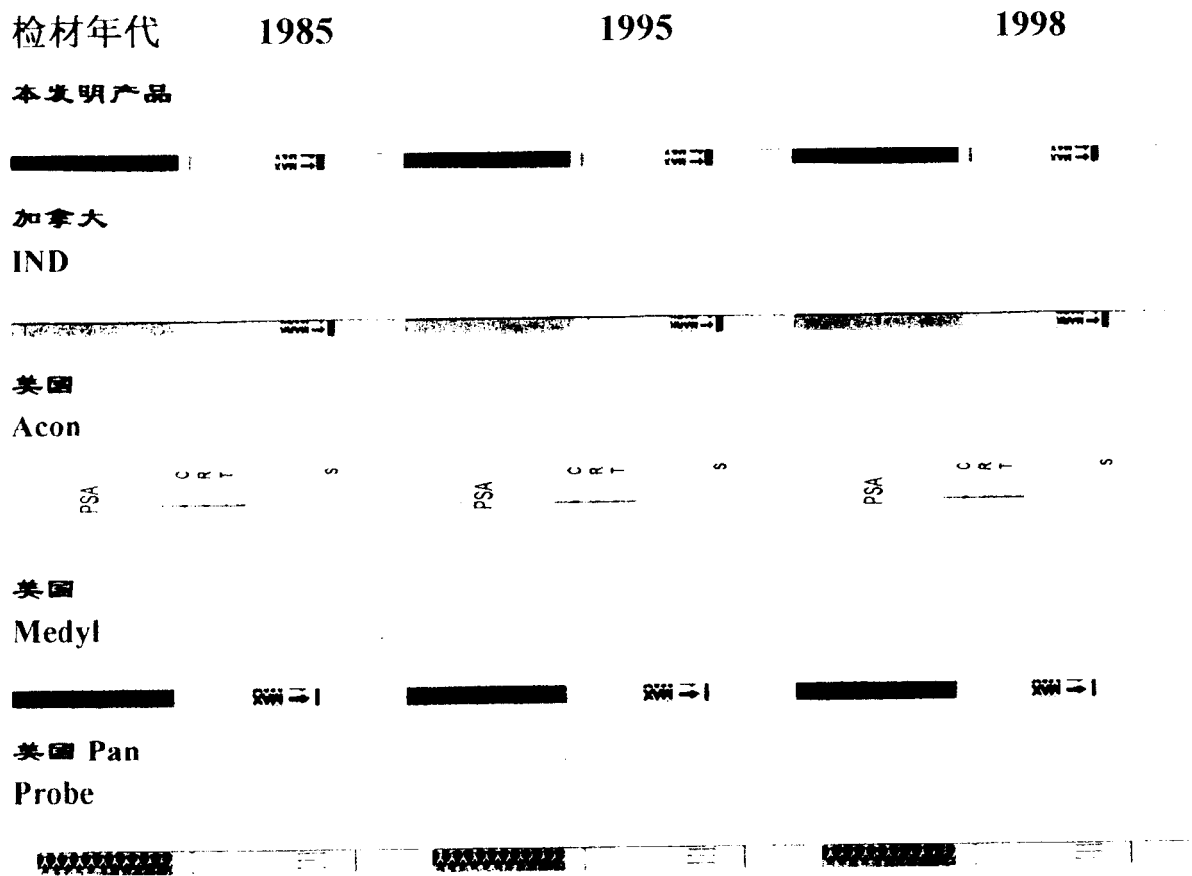


图 6

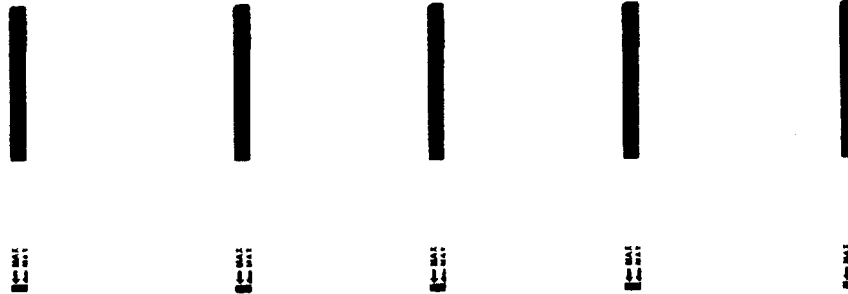
检材 1. 人血斑 2. 唾液斑 3. 阴道分泌物 4. 人精斑 5. 兔血痕 6. 空白检材



检材 7. 人初乳 8. 常见十种动物混合血斑 9. 死者贾继兵血样 10. 人精斑



检材 11. 人精斑 12. 狗血痕 13. 鸡血痕 14. 人血斑 15. 猪血痕



检材 16. 王辉血样 17. 人精斑 18. 羊血痕 19. 阴道分泌物 20. 牛血痕

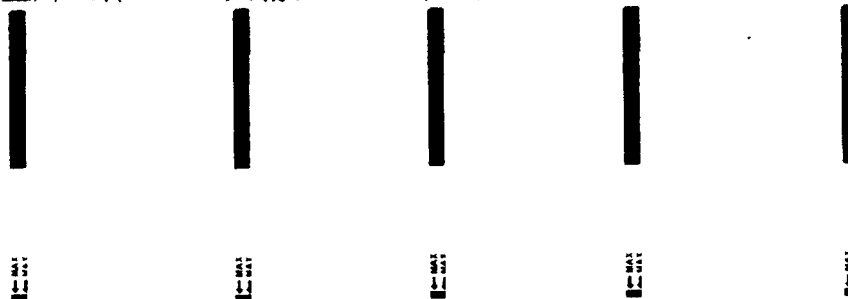


图 7

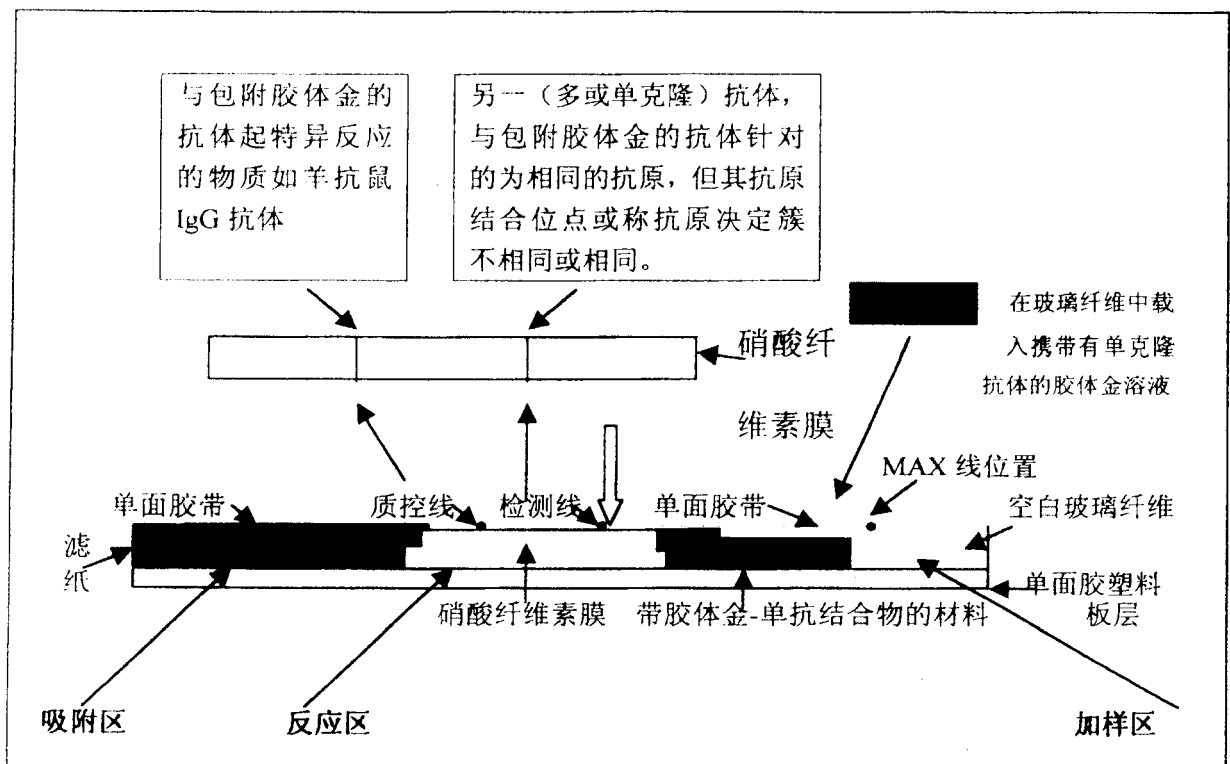


图 8

专利名称(译)	抗人精液特异蛋白P30检测试剂条及其含有的单克隆抗体		
公开(公告)号	CN1253567C	公开(公告)日	2006-04-26
申请号	CN03153441.4	申请日	2003-08-13
[标]发明人	李兆隆 王俭 徐秀兰 张英兰 张琦 常彩琴 严红 王香菊 孙云青 陈东风		
发明人	李兆隆 王俭 徐秀兰 张英兰 张琦 常彩琴 严红 王香菊 孙云青 陈东风		
IPC分类号	C12N15/02 C07K16/00 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/543		
其他公开文献	CN1490408A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了保藏号为CGMCC 0971和CGMCC 0972的杂交瘤细胞株A7和H3F3，以及其产生的抗人精液特异蛋白P30单克隆抗体及含有该抗人精液特异蛋白P30单克隆抗体的胶体金免疫层析检测试剂条及该试剂条的制备方法。本发明由保藏号为CGMCC 0971和CGMCC 0972的杂交瘤细胞株A7和H3F3产生的抗人精液特异蛋白P30单克隆抗体及制成的试剂条的灵敏度与国外最高水平的同类产品相当；但是特异性优于国外产品，或与最好的国外产品相同，完全符合法医学检验标准和要求，有利于迅速，准确地检验鉴定案件物证，快速破案，利国利民。

