



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107024591 A

(43)申请公布日 2017.08.08

(21)申请号 201710301829.9

(22)申请日 2017.05.02

(71)申请人 浙江星博生物科技股份有限公司

地址 浙江省宁波市高新区新晖路139号

(72)发明人 房海燕 高攀 陈继勇

(74)专利代理机构 宁波高新区核心力专利代理

事务所(普通合伙) 33273

代理人 袁丽花

(51)Int.Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书3页 说明书8页

序列表1页 附图1页

(54)发明名称

用于检测InhibinB含量的流式检测试剂及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了用于检测Inhibin B含量的流式检测试剂及其制备方法和应用,特点是包括用于检测血清或精浆中INH B含量的Ab1抗体微球偶联物和Ab2抗体荧光分子标记物,制备方法包括INH $\alpha$ 和 $\beta_B$ 亚单位抗体的制备步骤;INH $\alpha$ 亚单位抗体Ab1与单分散微球偶联的步骤;INH $\beta_B$ 亚单位抗体Ab2的荧光分子标记的步骤;通过抗体微球偶联技术和抗体荧光标记技术,采用抗原抗体特异性结合,一定粒径的微球和荧光分子能被流式细胞仪所识别,荧光强弱直接反应了样本中INH含量的多少,实现了样本中INH的流式细胞仪定量检测,优点是灵敏度高、检测速度快以及准确率高。

1. 一种用于检测Inhibin B含量的流式检测试剂,其特征包括用于检测血清或精浆中INH B含量的Ab1抗体微球偶联物和Ab2抗体荧光分子标记物,其中所述的Ab1抗体微球偶联物结构通式如图1所示,所述的Ab2抗体荧光分子标记物结构通式如图2所示,其中M为高分子材料制成的单分散微球,R为功能结合键,Ab1为INH $\alpha$ 亚单位单克隆抗体Ab1,Ab2为INH $\beta$ 亚单位单克隆抗体Ab2,F为荧光分子。

2. 根据权利要求1所述的用于检测Inhibin B含量的流式检测试剂,其特征包括:所述的单分散微球的直径为1-50微米,材质为聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、二氧化硅、聚乳酸或聚乳酸羟基乙酸聚合物,所述的单分散微球的外表面功能化修饰羧基、氨基、羟基或巯基后,再对其表面进行聚乙二醇、聚甲基丙烯酸甲酯或Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>的涂层修饰改性;所述的功能结合键为羧基与氨基结合的酰胺键或者羟基与羧基的结合键或者巯基与羟基的结合键;所述的INH $\alpha$ 亚单位单克隆抗体Ab1为含精氨酸和赖氨酸的INH $\alpha$ 亚单位上截取成熟多肽片段SEQ-1免疫小鼠所制备的单克隆抗体1;所述的INH $\beta$ 亚单位单克隆抗体Ab2为含精氨酸和赖氨酸的INH $\beta$ 亚单位上截取成熟多肽片段SEQ-2免疫兔子所制备的单克隆抗体2,其中所述的SEQ-1氨基酸序列为STPLMSWPWSPSALRLLQRPPEEPAAHANCHRVALNLSFQELGWERWIVYPPSFIHYCHGGCGLHIPNLSLPVPGAPPTPAQPYSLLPGAQPCCAALPGTMRPLHVRTTSDGGYSFKYETVPNLLTQHCACI,所述的SEQ-2氨基酸序列为GLECDGRTNLCCRQQFFIDFRLIGWNDWIIAPTGYGNYCEGSCPAYLAGVPGSASSFHTAVVNQYRMRGLNPGTVNSCCIPTKLSTMSMLYFDDEYNIVKRDVPMIVEECGCA。

3. 根据权利要求1所述的用于检测Inhibin B含量的流式检测试剂,其特征包括:所述的荧光分子为偶联的荧光染料,所述的荧光染料为异硫氰酸荧光素、异硫氰酸盐罗丹明B、四乙基罗丹明,四甲基异硫氰酸罗丹明,罗丹明红-X,德克萨斯红,藻红蛋白,藻红蛋白/德克萨斯红串联染料,藻红蛋白/Alexa Fluor 610串联染料,藻红蛋白/Alexa Fluor647串联染料,藻红蛋白/花青染料5串联染料,藻红蛋白/花青染料5.5串联染料,藻红蛋白/Alexa Fluor 700串联染料,藻红蛋白/花青染料7串联染料,藻蓝蛋白,藻蓝蛋白/花青染料5.5串联染料,藻蓝蛋白/花青染料7串联染料或者花青染料。

4. 一种权利要求1所述的用于检测Inhibin B含量的流式检测试剂的制备方法,其特征包括以下步骤:

(1) INH $\alpha$ 和 $\beta$ 亚单位抗体的制备

从NCBI网站上获取INH $\alpha$ 亚单位的编码序列和翻译成熟的相应蛋白质的氨基酸序列,选取一段氨基酸序列SEQ-1作为制备Ab1抗体的抗原,将编码此抗原的碱基序列克隆至表达载体PET-28、PET-32或PET-41上,E.coli原核表达系统表达出INH $\alpha$ 亚单位抗原蛋白,纯化INH $\alpha$ 亚单位抗原蛋白;以INH $\alpha$ 亚单位抗原蛋白为免疫原合成鼠抗人Inhibin-B单克隆抗体Ab1,即得到INH $\alpha$ 亚单位单克隆抗体Ab1;其中所述的SEQ-1氨基酸序列为STPLMSWPWSPSALRLLQRPPEEPAAHANCHRVALNLSFQELGWERWIVYPPSFIHYCHGGCGLHIPNLSLPVPGAPPTPAQPYSLLPGAQPCCAALPGTMRPLHVRTTSDGGYSFKYETVPNLLTQHCACI;

同时,从NCBI网站上获取INH $\beta$ 亚单位的编码序列和翻译成熟的相应蛋白质的氨基酸序列,选取一段氨基酸序列SEQ-2作为制备Ab2抗体的抗原,将编码此抗原的碱基序列克隆至表达载体PET-28、PET-32或PET-41上,E.coli原核表达系统表达出INH $\beta$ 亚单位抗原蛋白,纯化INH $\beta$ 亚单位抗原蛋白;以INH $\beta$ 亚单位抗原蛋白为免疫原合成兔抗人Inhibin-B单克隆抗体Ab2,即得到INH $\beta$ 亚单位单克隆抗体Ab2;其中所述的SEQ-2氨基酸序列为

GLECDGRTNLCCRQQFFIDFRLIGWNDWIIAPTGYGNYCEGSCPAYLAGVPGSASSFHTAVVNQYRMRGLNPGTVN  
SCCIPTKLSTMSMLYFDDEYNIVKRDVPMIVEECGCA;

(2) INHB $\alpha$ 亚单位抗体Ab1与单分散微球偶联

将碳二亚胺(EDC)粉末和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)粉末加入到浓度为1mg/mL的INHB $\alpha$ 亚单位单克隆抗体Ab1溶液中,室温避光反应5-10分钟,然后涡旋震荡混匀1次后,继续室温避光反应5分钟,再向反应溶液中加入浓度为0.5wt%的单分散微球溶液,30℃避光震荡反应4小时,用含1wt%的SDS溶液洗涤微球2次,浓度为0.5wt%吐温-20的PBS溶液洗涤微球3次,即得到用于检测血清或精浆中Inhibin B含量的Ab1抗体微球偶联物,其结构通式如图1所示,其中M为高分子材料制成的单分散微球,R为功能结合键,Ab1为INHB $\alpha$ 亚单位单克隆抗体Ab1,将Ab1抗体微球偶联物保存于含0.5wt%NaCl,PH=7.4的PB溶液中,待用;

(3) INHB  $\beta$ 亚单位抗体Ab2的荧光分子标记

将浓度为1-10mg/ml的待交联的INHB  $\beta$ 亚单位单克隆抗体Ab2溶液,于4℃用交联反应液透析三次至pH=9.0得到抗体Ab2溶液;将荧光分子溶于二甲基亚砷中配制成浓度为1mg/mL的荧光分子溶液;将荧光分子溶液缓慢加入抗体Ab2溶液中,边加边轻轻晃动使其与抗体混合均匀,避光4℃反应8h;然后在反应液中加入5mol/L的NH<sub>4</sub>Cl直至NH<sub>4</sub>Cl终浓度为50mmol/L,4℃终止反应2h,然后在PBS缓冲液中透析四次以上直至透析液清亮,即得到用于血清或精浆中Inhibin B含量的Ab2抗体荧光分子标记物,其结构通式如图2所示,其中Ab2为INHB  $\beta$ 亚单位单克隆抗体2,其中F为荧光分子,将Ab2抗体荧光分子标记物置于pH=7.4的含有0.1wt%NaN<sub>3</sub>、1wt%BSA磷酸盐缓冲液中,4℃避光保存。

5. 根据权利要求4所述的用于检测Inhibin B含量的流式检测试剂的制备方法,其特征在于步骤(1)中以INHB $\alpha$ 亚单位抗原蛋白为免疫原合成鼠抗人Inhibin-B单克隆抗体Ab1的具体步骤如下:

将INHB $\alpha$ 亚单位抗原蛋白用水溶性佐剂接种免疫5只6-8周龄Balb/c品系小鼠,于第一天、第十四天、第二十一天和第三十五天分别进行免疫,采集小鼠第一天和第三十五天的血清各100uL,ELISA检测血清效价;当效价达到1:50000后,选取血清效价最高的小鼠的脾细胞与小鼠Balb/c品系骨髓瘤细胞sp2/0进行3次融合;融合效率大于1hybridoma/1000B cells,有限稀释融合细胞,采用96孔板克隆化细胞,HAT筛选杂交瘤细胞;检测出抗原阳性100-500个阳性细胞,扩大培养至48孔板,挑取阳性克隆扩增,ELISA检测克隆培养上清,根据检测结果,挑选1-20株效价最高的阳性克隆进行亚克隆化,每个亚克隆做96孔板有限稀释培养,ELISA筛选培养上清,每个母克隆挑选2个阳性亚克隆;阳性克隆扩大培养,ELISA检测上清效价大于1:20000,挑取3-5个效价最高的克隆做96孔板有限稀释培养,放大培养至T-25Flask培养,培养的上清用protein A或protein G纯化即得到,即得到INHB $\alpha$ 亚单位单克隆抗体Ab1;

以INHB  $\beta$ 亚单位抗原蛋白为免疫原合成兔抗人Inhibin-B单克隆抗体Ab2的具体步骤如下:将得到的INHB  $\beta$ 亚单位抗原蛋白免疫三只实验兔,经过血清blot和ELISA实验初步筛选,选取一只效价最高的兔子的兔脾细胞与240E兔骨髓瘤样细胞株融合,产生能分泌INHB  $\beta$ 亚单位抗原蛋白抗体的兔-兔杂交瘤细胞,用HAT作为选择性培养基对融合后的细胞进行筛选培养,运用ELISA法和WB法,筛选获得阳性克隆,选取其中WB和ELISA信号最强的克隆进入抗体质粒重组阶段,再进一步筛选,选取分泌单克隆抗体最强的杂交瘤细胞株进

入单克隆抗体大转生产,纯化后即得到INH $\beta$ 亚单位单克隆抗体Ab2。

6. 根据权利要求4所述的用于检测Inhibin B含量的流式检测试剂的制备方法,其特征在于:步骤(2)中所述的碳二亚胺、所述的N-羟基琥珀酰亚胺、所述的单分散微球溶液与所述的INH $\alpha$ 亚单位单克隆抗体Ab1溶液的混合比例为28g:56g:2ml:1ml。

7. 根据权利要求6所述的用于检测Inhibin B含量的流式检测试剂的制备方法,其特征在于:所述的单分散微球的直径为1-50微米,材质为聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、二氧化硅、聚乳酸或聚乳酸羟基乙酸聚合物,所述的单分散微球的外表面功能化修饰羧基、氨基、羟基或巯基后,再对其表面进行聚乙二醇、聚甲基丙烯酸甲酯或Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>的涂层修饰改性;所述的功能结合键为羧基与氨基结合的酰胺键或者羟基与羧基的结合键或者巯基与羟基的结合键。

8. 根据权利要求4所述的用于检测Inhibin B含量的流式检测试剂的制备方法,其特征在于:步骤(3)中所述的INH $\beta$ 亚单位单克隆抗体Ab2与所述的荧光分子交联时的比例为1mg:15 $\mu$ g。

9. 根据权利要求8所述的用于检测Inhibin B含量的流式检测试剂的制备方法,其特征在于:所述的荧光分子为偶联的荧光染料,所述的荧光染料为异硫氰酸荧光素、异硫氰酸盐罗丹明B、四乙基罗丹明,四甲基异硫氰酸罗丹明,罗丹明红-X,德克萨斯红,藻红蛋白,藻红蛋白/德克萨斯红串联染料,藻红蛋白/Alexa Fluor 610串联染料,藻红蛋白/Alexa Fluor 647串联染料,藻红蛋白/花青染料5串联染料,藻红蛋白/花青染料5.5串联染料,藻红蛋白/Alexa Fluor 700串联染料,藻红蛋白/花青染料7串联染料,藻蓝蛋白,藻蓝蛋白/花青染料5.5串联染料,藻蓝蛋白/花青染料7串联染料或者花青染料。

10. 权利要求1-8中任一项用于检测Inhibin B含量的流式检测试剂的应用,其特征在于将流式检测试剂用于检测Inhibin B含量具体步骤如下:

将待测样本血清或精浆加入到Ab1抗体微球偶联物溶液中,然后加入一定体积的Ab2抗体荧光分子标记物溶液,37度孵育30min,样本中的INH $\beta$ 分别与Ab1抗体微球偶联物和Ab2抗体荧光分子标记物结合形成微球-Ab1-INH $\beta$ -Ab2-荧光分子复合体,经流式细胞仪可以检测出荧光分子发射出的荧光,根据荧光强度与INH $\beta$ 的浓度关系,计算获得样本中的Inhibin B含量,其中Ab1抗体微球偶联物与Ab2抗体荧光分子标记物的摩尔比为1:1。

## 用于检测Inhibin B含量的流式检测试剂及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及血清或精浆中Inhibin B(抑制素B)含量的检测技术,尤其是涉及一种用于检测Inhibin B含量的流式检测试剂及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 抑制素B(INH B)是转化生长因子 $\beta$ 超家族成员之一,属于糖蛋白激素;由 $\alpha$ 和 $\beta_B$ 两个亚单位通过二硫键相连组成异二聚体( $\alpha$ - $\beta_B$ ),仅二聚体才有生物学活性。人们认为抑制素结合蛋白(INHBP)和III型转化生长因子 $\beta$ 受体(TGFBRIII)是INH B受体。INH B主要有以下功能:①通过拮抗II型受体(type II receptors)调节活化素的生理功能。但仅在活化素反应的情况下具有活性。②调控与反映支持细胞功能,作为监测睾丸功能及评估精子发生的指标之一。③参与垂体功能的调节。从青春期开始血清INH B与卵泡刺激素(FSH)形成稳定的负反馈调控关系,而且在精曲小管功能正常情况下是主要的来自性腺的调节因素。

[0003] INHB在临床上具有非常重要的参考作用,主要通过以下几个方面来表现:①INH B与精子发生障碍有重要联系。因为INH B绝大部分来自睾丸支持细胞及各级生精细胞,因此INH B和精子发生状态、精子计数呈正相关。认为血清中INH B是精子发生的血清标志物。精子发生功能受损时,血清INH B水平下降。此外,不育男性的间质细胞受损,功能降低,其产生INH B的 $\beta_B$ 亚单位较少,也是血清INH B水平下降原因之一。目前认为,以抑制素B极显著降低和FSH 3倍以上增高作为标准,可能取代睾丸活检判断精子发生障碍。②INH B在鉴别梗阻性与非梗阻性无精子症方面具有重要的参考价值。INH B可作为NOA患者睾丸晚期精子细胞抽吸(TESE)的预测指标。Ron Eckardstein 等报道,以睾丸活检形态学为金标准,发现血清INH B作为预测精子发生状态的指数比血清FSH更具敏感性。③测定血清INH B水平可作为早期诊断POF的一项重要指标。卵巢早衰(POF)患者卵巢储备降低,表现为卵巢内卵泡数和卵子质量均下降。由于INH B能够比基础FSH(bFSH)值更早、更直接反映卵巢储备,当INH B水平不足以维持 bFSH在正常范围时,在表现为血液bFSH的升高。因此测定血清INH B水平可作为早期诊断POF的一项重要指标。④INHB可以对IVF前卵巢反应进行判定。已有实验表明:在月经周期第3天外源性FSH卵巢刺激实验中发现,卵巢储备功能正常女性INHB 水平在实验前后24h的差值明显高于卵巢反应差的妇女。在IVF-ET治疗中发现,月经周期第3天INH B较低者,其促卵所需FSH用量大,对E2的反应性低、获卵数少,临床妊娠率低,周期取消率高,与第3天正常者相比,各项值有显著差异。并且第3天INH B的下降要早于FSH的上升。⑤INH B不仅能评估卵巢储备能力进而对辅助生殖治疗的预后进行预测,而且对有效控制超促排卵用药具有指导作用。国内已有研究发现nFSH 超排卵治疗第3天时,如INH B>40pg/mL,86%的患者可完成取卵,而INH B<40pg/mL,仅70%患者完成取卵泡。

[0004] 由于INH B在人类的健康领域起着重要的作用,使得科学家们和医学工作者们不得不寻找可靠的方法来检测人体样本中INH B的水平,来为医学诊断与用药提供可靠的指导意见。临床上检测血清或精浆中INH B的方法有放射免疫分析(RIA)法和酶联免疫吸附法

(双抗体夹心ELISA法)。由于RIA法不能区分INH A与INH B以及无活性的抑制素,因此实验结果无从分析。ELISA法使用一对高度特异的抗体,仅与有功能的INH B分子特异性结合。其检测原理是用微孔包被的 $\beta$ B亚单位的单克隆抗体捕获抗原,再与检测抗体(与酶耦联的 $\alpha$ 亚单位的特异性单克隆抗体)结合并显色;虽然与INH A会有0.5%的交叉反应,其特异性与敏感性基本能够满足科研和临床检测需要。

[0005] 但是目前国外文献报道的血清INH B实验室正常参考值各家不一,集中在176.8~238ng/L区间,但与一些病理情况重叠,可能与受试者睾丸体积、测试样本量、FSH的波动及肥胖等有关,这使得科学工作者们无法确定一个统一的标准来给出确定性的意见对于哪些样本是正常的哪些样本是超出正常值域的。还有就是,在正常成年男性血清和精浆中可检出INH B,但不能在尿液中检出,表明目前市面上最通用的双抗体夹心ELISA法的检测灵敏度还不够高,无法检测一些样本获取度难的患者。由于目前使用的检测方法是双抗体夹心ELISA法,检测过程中需要抗体抗原的孵育,洗脱,测吸光度等步骤,使得检测步骤繁琐费时(大于2小时),费用昂贵以及无法多样本高通量检测。

## 发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是提供一种灵敏度高,检测速度快的用于检测Inhibin B含量的流式检测试剂及其制备方法和应用。

[0007] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案为:

[0008] 1、一种用于检测Inhibin B含量的流式检测试剂,包括用于检测血清或精浆中INH B含量的Ab1抗体微球偶联物和Ab2抗体荧光分子标记物,其中所述的Ab1抗体微球偶联物结构通式如图1所示,所述的Ab2抗体荧光分子标记物结构通式如图2所示,其中M为高分子材料制成的单分散微球,R为功能结合键,Ab1为INH $\alpha$ 亚单位单克隆抗体Ab1,Ab2为INH $\beta$ B亚单位单克隆抗体Ab2,P为荧光分子。

[0009] 所述的单分散微球的直径为1-50微米,材质为聚苯乙烯(PS)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、二氧化硅(SiO<sub>2</sub>)、聚乳酸(PLA)或聚乳酸羟基乙酸聚合物(PLGA),所述的单分散微球的外表面功能化修饰羧基、氨基、羟基或巯基后,再对其表面进行聚乙二醇(PEG)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)或Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>的涂层修饰改性;所述的功能结合键为羧基与氨基结合的酰胺键或者羟基与羧基的结合键或者巯基与羟基的结合键;所述的INH $\alpha$ 亚单位单克隆抗体Ab1为含精氨酸和赖氨酸的INH $\alpha$ 亚单位上截取成熟多肽片段SEQ-1免疫小鼠所制备的单克隆抗体1;所述的INH $\beta$ B亚单位单克隆抗体Ab2为含精氨酸和赖氨酸的INH $\beta$ B亚单位上截取成熟多肽片段SEQ-2免疫兔子所制备的单克隆抗体2,其中所述的SEQ-1氨基酸序列为STPLMSWPSPSALRLLQRPPEEPAAHANCHRVALNISFQELGWERWIVYPPSFIFHYCHGGCGLHIPPNLSLPVPGAPPTPAQPYSLLPGAQPCCAALPGTMRPLHVRTTSDGGYSFKYETVPNLLTQHCACI,所述的SEQ-2氨基酸序列为GLECDGRTNLCCRQQFFIDFRLIGWNDWIIAPTGYGNYCEGSCPAYLAGVPGSASSFHTAVVNQYRMRLNPGTVNSCCIPTKLSTMSMLYFDDEYNIVKRDVPMIVEECGCA。

[0010] 所述的荧光分子为偶联的荧光染料,所述的荧光染料为异硫氰酸荧光素(FITC)、异硫氰酸盐罗丹明B(RBITC)、四乙基罗丹明(RIB200),四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC),罗丹明红-X(Red-X),德克萨斯红(Texas Red),藻红蛋白(AlexaFluor 488, PE),藻红蛋白/德克萨斯红串联染料(PE-TR),藻红蛋白/Alexa Fluor 610串联染料(PE-Alexa Fluor

610),藻红蛋白/Alexa Fluor 647串联染料(PE-Alexa Fluor 647),藻红蛋白/花青染料5串联染料(PE-cy5),藻红蛋白/花青染料5.5串联染料(PE-cy5.5),藻红蛋白/Alexa Fluor 700串联染料(PE-Alexa Fluor 700),藻红蛋白/花青染料7串联染料(PE-Cy7),藻蓝蛋白(Allophycocyanin,APC),藻蓝蛋白/花青染料5.5串联染料(APC-Cy5.5),藻蓝蛋白/花青染料7串联染料(APC-Cy7)或者花青染料(Cy2/3/5)。

[0011] 2、上述用于检测Inhibin B含量的流式检测试剂的制备方法,包括以下步骤:

[0012] (1) INHB $\alpha$ 和 $\beta_B$ 亚单位抗体的制备

[0013] 从NCBI网站上获取INHB $\alpha$ 亚单位的编码序列和翻译成熟的相应蛋白质的氨基酸序列,选取一段氨基酸序列SEQ-1作为制备Ab1抗体的抗原,将编码此抗原的碱基序列克隆至表达载体PET-28、PET-32或PET-41上,E.coli原核表达系统表达出INHB $\alpha$ 亚单位抗原蛋白,纯化INHB $\alpha$ 亚单位抗原蛋白;以INHB $\alpha$ 亚单位抗原蛋白为免疫原合成鼠抗人Inhibin-B单克隆抗体Ab1,即得到INHB $\alpha$ 亚单位单克隆抗体Ab1;其中所述的SEQ-1氨基酸序列为STPLMSWPSPSALRLLQRPPEEPAAHANCHRVALNISFQELGWERWIVPPSFIFHYCHGGCGLHIPPNLSLPVPGAPPTPAQPYSLLPGAQPCCAALPGTMRPLHVRTTSDGGYSFKYETVPNLLTQHCACI;

[0014] 同时,从NCBI网站上获取INHB $\beta_B$ 亚单位的编码序列和翻译成熟的相应蛋白质的氨基酸序列,选取一段氨基酸序列SEQ-2作为制备Ab2抗体的抗原,将编码此抗原的碱基序列克隆至表达载体PET-28、PET-32或PET-41上,E.coli原核表达系统表达出INHB $\beta_B$ 亚单位抗原蛋白,纯化INHB $\beta_B$ 亚单位抗原蛋白;以INHB $\beta_B$ 亚单位抗原蛋白为免疫原合成兔抗人Inhibin-B单克隆抗体Ab2,即得到INHB $\beta_B$ 亚单位单克隆抗体Ab2;其中所述的SEQ-2氨基酸序列为GLECDGRTNLCCRQQFFIDFRLIGWNDWIIAPTGYGNYCEGSCPAYLAGVPGSASSFHTAVVNQYRMRGLNPGTVNSCCIPTKLSTMSMLYFDDEYNIVKRDVPMIVEECGCA;

[0015] (2) INHB $\alpha$ 亚单位抗体Ab1与单分散微球偶联

[0016] 将碳二亚胺(EDC)粉末和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)粉末加入到浓度为1mg/mL的INHB $\alpha$ 亚单位单克隆抗体Ab1溶液中,室温避光反应5-10分钟,然后涡旋震荡混匀1次后,继续室温避光反应5分钟,再向反应溶液中加入浓度为0.5wt%的单分散微球溶液,30℃避光震荡反应4小时,用含1wt%的SDS溶液洗涤微球2次,浓度为0.5wt%吐温-20的PBS溶液洗涤微球3次,即得到用于检测血清或精浆中Inhibin B含量的Ab1抗体微球偶联物,其结构通式如图1所示,其中M为高分子材料制成的单分散微球,R为功能结合键,Ab1为INHB $\alpha$ 亚单位单克隆抗体Ab1,将Ab1抗体微球偶联物保存于含0.5wt%NaCl,PH=7.4的PB溶液中,待用;

[0017] (3) INHB $\beta_B$ 亚单位抗体Ab2的荧光分子标记

[0018] 将浓度为1-10mg/ml的待交联的INHB $\beta_B$ 亚单位单克隆抗体Ab2溶液,于4℃用交联反应液(交联反应液配制方法:7.56g NaHCO<sub>3</sub>,1.06g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,7.36g NaCl,加水定容至1L)透析三次至pH=9.0得到抗体Ab2溶液;将荧光分子溶于二甲基亚砜中配制成浓度为1mg/mL的荧光分子溶液(每次交联使用的荧光分子溶液均应新鲜配制,避光);将荧光分子溶液缓慢加入抗体Ab2溶液中,边加边轻轻晃动使其与抗体混合均匀,避光4℃反应8h;然后在反应液中加入5mol/L的NH<sub>4</sub>Cl直至NH<sub>4</sub>Cl终浓度为50mmol/L,4℃终止反应2h,然后在PBS缓冲液中透析四次以上直至透析液清亮,即得到用于血清或精浆中Inhibin B含量的Ab2抗体荧光分子标记物,其结构通式如图2所示,其中Ab2为INHB $\beta_B$ 亚单位单克隆抗体2,其中F为荧光分子,将Ab2抗体荧光分子标记物置于pH=7.4的含有0.1wt%NaN<sub>3</sub>、1wt%BSA磷酸盐缓冲液

中,4℃避光保存。

[0019] 步骤(1)中以INHBA亚单位抗原蛋白为免疫原合成鼠抗人Inhibin-B单克隆抗体Ab1的具体步骤如下:将INHBA亚单位抗原蛋白用水溶性佐剂接种免疫5只6-8周龄 Balb/c品系小鼠,于第一天、第十四天、第二十一天和第三十五天分别进行免疫,采集小鼠第一天和第三十五天的血清各100uL,ELISA检测血清效价;当效价达到1:50000 后,选取血清效价最高的小鼠的脾细胞与小鼠Balb/c品系骨髓瘤细胞sp2/0进行3次融合;融合效率大于1hybridoma/1000B cells,有限稀释融合细胞,采用96孔板克隆化细胞,HAT筛选杂交瘤细胞;检测出抗原阳性100-500个阳性细胞,扩大培养至48孔板,挑取阳性克隆扩增,ELISA检测克隆培养上清,根据检测结果,挑选1-20株效价最高的阳性克隆进行亚克隆化,每个亚克隆做96孔板有限稀释培养,ELISA筛选培养上清,每个母克隆挑选2个阳性亚克隆;阳性克隆扩大培养,ELISA检测上清效价大于1: 20000,挑取3-5个效价最高的克隆做96孔板有限稀释培养,放大培养至T-25Flask培养,培养的上清用protein A或protein G纯化即得到,即得到INHBA亚单位单克隆抗体 Ab1;

[0020] 以INHBB<sub>B</sub>亚单位抗原蛋白为免疫原合成兔抗人Inhibin-B单克隆抗体Ab2的具体步骤如下:将得到的INHBB<sub>B</sub>亚单位抗原蛋白免疫三只实验兔,经过血清blot和ELISA 实验初步筛选,选取一只效价最高的兔子的兔脾细胞与240E兔骨髓瘤样细胞株融合,产生能分泌INHBB<sub>B</sub>亚单位抗原蛋白抗体的兔-兔杂交瘤细胞,用HAT作为选择性培养基对融合后的细胞进行筛选培养,运用ELISA法和WB法,筛选获得阳性克隆,选取其中WB和ELISA信号最强的克隆进入抗体质粒重组阶段,再进一步筛选,选取分泌单克隆抗体最强的杂交瘤细胞株进入单克隆抗体大转生产,纯化后即得到INHBB<sub>B</sub>亚单位单克隆抗体Ab2。

[0021] 步骤(2)中所述的碳二亚胺、所述的N-羟基琥珀酰亚胺、所述的单分散微球溶液与所述的INHBA亚单位单克隆抗体Ab1溶液的混合比例为28g:56g:2ml:1ml。

[0022] 所述的单分散微球的直径为1-50微米,材质为聚苯乙烯(PS)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、二氧化硅(SiO<sub>2</sub>)、聚乳酸(PLA)或聚乳酸羟基乙酸聚合物(PLGA),所述的单分散微球的外表面功能化修饰羧基、氨基、羟基或巯基后,再对其表面进行聚乙二醇(PEG)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)或Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>的涂层修饰改性;所述的功能结合键为羧基与氨基结合的酰胺键或者羟基与羧基的结合键或者巯基与羟基的结合键。

[0023] 步骤(3)中所述的INHBB<sub>B</sub>亚单位单克隆抗体Ab2与所述的荧光分子交联时的比例为1mg:15μg。

[0024] 所述的荧光分子为偶联的荧光染料,所述的荧光染料为异硫氰酸荧光素(FITC)、异硫氰酸盐罗丹明B(RBITC)、四乙基罗丹明(RIB200),四甲基异硫氰酸罗丹明 (TRITC),罗丹明红-X(Red-X),德克萨斯红(Texas Red,),藻红蛋白(AlexaFluor 488, PE),藻红蛋白/德克萨斯红串联染料(PE-TR),藻红蛋白/Alexa Fluor 610串联染料 (PE-Alexa Fluor 610),藻红蛋白/Alexa Fluor 647串联染料(PE-Alexa Fluor 647),藻红蛋白/花青染料5串联染料(PE-cy5),藻红蛋白/花青染料5.5串联染料(PE-cy5.5),藻红蛋白/Alexa Fluor 700串联染料(PE-Alexa Fluor 700),藻红蛋白/花青染料7串联染料 (PE-Cy7),藻蓝蛋白(Allophycocyanin,APC),藻蓝蛋白/花青染料5.5串联染料 (APC-Cy5.5),藻蓝蛋白/花青染料7串联染料(APC-Cy7)或者花青染料(Cy2/3/5)。

[0025] 上述用于检测Inhibin B含量的流式检测试剂的应用,将流式检测试剂用于检测

Inhibin B含量具体步骤如下:将待测样本血清或精浆加入到Ab1抗体微球偶联物溶液中,然后加入一定体积的Ab2抗体荧光分子标记物溶液,37度孵育30min,样本中的 INHB分别与Ab1抗体微球偶联物和Ab2抗体荧光分子标记物结合形成微球 -Ab1-INHB-Ab2-荧光分子复合体,经流式细胞仪可以检测出荧光分子发射出的荧光,根据荧光强度与INHB的浓度关系,计算获得样本中的Inhibin B含量,其中Ab1抗体微球偶联物与Ab2抗体荧光分子标记物的摩尔比为1:1。

[0026] 具体检测原理如下:将血清或精浆等样本加入到INHB $\alpha$ 亚单位抗体Ab1-微球偶联物溶液中,然后加入一定体积的INHB $\beta_B$ 亚单位抗体Ab2的荧光分子标记物溶液,37 度孵育30min。由于抗原抗体结合的特异性,样本中的INHB会分别与Ab1-微球偶联物, Ab2的荧光分子标记物结合形成微球-Ab1-INHB-Ab2-荧光分子复合体,此复合体具有一定粒径大小,经流式细胞仪上机检测可被检测,同时此复合体上标记有荧光分子,经流式细胞仪可以检测出荧光分子发射出的荧光,荧光强度的强弱与样本中INHB的含量成正相关性,据此可以对样本中的INHB进行定量。

[0027] 与现有技术相比,本发明的优点在于:本发明首次公开了用于检测Inhibin B含量的流式检测试剂及其制备方法和应用,其采用INHB $\alpha$ 亚单位和 $\beta_B$ 亚单位分别免疫小鼠和兔子,得到两种不同种属的抗体,并同时能够与IHNB抗原结合,能够排除样本中抑制素A,激活素A,激活素B,激活素AB的干扰,特异性的与样本中的抑制素B结合,使得检测结果更加准确。首次通过微球偶联抗体技术和荧光标记抗体技术实现了流式细胞仪检测IHNB,根据荧光值的强弱直接判断INHB含量的高低,简化了检测过程中的实验操作步骤,同时适合于高通量多样本的连续检测,极大的提高了检测的效率,具有灵敏度高为50pg/ml和检测速度快的优势。

[0028] 综上所述,本发明一种用于检测样本(血清或精浆)中INHB含量的抗体微球偶联物与抗体荧光分子标记物的制备及其应用,通过抗体微球偶联技术和抗体荧光标记技术,采用抗原抗体特异性结合,一定粒径的微球和荧光分子能被流式细胞仪所识别,荧光强弱直接反应了样本中INHB含量的多少,实现了样本中INHB的流式细胞仪定量检测,并采用INHB抗原的不同表位( $\alpha$ 亚单位和 $\beta_B$ 亚单位)去制备不同种属的抗体,最大限度的减少了样本中其他类似成分的干扰,使得检测准确度更高。

## 附图说明

[0029] 图1为本发明Ab1抗体微球偶联物结构通式的示意图;

[0030] 图2为本发明Ab2抗体荧光分子标记物结构通式的示意图。

## 具体实施方式

[0031] 以下结合附图实施例对本发明作进一步详细描述。

[0032] 具体实施例一

[0033] 一种用于检测Inhibin B含量的流式检测试剂,包括用于检测血清或精浆中INH B含量的Ab1抗体微球偶联物和Ab2抗体荧光分子标记物,其中Ab1抗体微球偶联物结构通式如图1所示,Ab2抗体荧光分子标记物结构通式如图2所示,其中M为高分子材料制成的单分散微球,R为功能结合键,Ab1为INHB $\alpha$ 亚单位单克隆抗体Ab1,Ab2为INHB $\beta_B$ 亚单位单克隆抗

体Ab2,F为荧光分子。

[0034] 上述单分散微球的直径为1-50微米,材质为聚苯乙烯(PS)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、二氧化硅(SiO<sub>2</sub>)、聚乳酸(PLA)或聚乳酸羟基乙酸聚合物(PLGA),所述的单分散微球的外表面功能化修饰羧基、氨基、羟基或巯基后,再对其表面进行聚乙二醇(PEG)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)或Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>的涂层修饰改性。上述表面改性并进一步经涂层修饰的单分散微球可通过天津市倍思乐色谱技术开发中心,苏州知益微球科技有限公司和Aladdin等直接购买获得。

[0035] 上述功能结合键为羧基与氨基结合的酰胺键或者羟基与羧基的结合键或者巯基与羟基的结合键。

[0036] 上述INH $\alpha$ 亚单位单克隆抗体Ab1为含精氨酸和赖氨酸的INH $\alpha$ 亚单位上截取的成熟多肽片段SEQ-1免疫小鼠所制备的单克隆抗体1;INH $\beta$ 亚单位单克隆抗体 Ab2为含精氨酸和赖氨酸的INH $\beta$ 亚单位上截取的成熟多肽片段SEQ-2免疫兔子所制备的单克隆抗体2,其中SEQ-1氨基酸序列为 STPLMSWPWSPSALRLLQRPPEEPAAHANCHRVALNISFQELGWERWIVYPPSFI FHYCHGGCGLHIPPNLSLPVPGAPPTPAQPYSLLPGAQPCCAALPGTMRPLHVRTTSDGGYS FKYETVPNLLTQHCACI,SEQ-2氨基酸序列为GLECDGRTNLCCRQQFFIDFRLIGWNDWIAPTGYGNYCEG SCPAYLAGVPGSASSFHTAVVNQYRMRGLNPGTVNSCCIPTKLSTMSMLYFDDEYNIVKRDVPMIVEECGCA。

[0037] 上述荧光分子为偶联的荧光染料,所述的荧光染料为异硫氰酸荧光素(FITC)、异硫氰酸盐罗丹明B(RBITC)、四乙基罗丹明(RIB200),四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC),罗丹明红-X(Red-X),德克萨斯红(Texas Red,),藻红蛋白(AlexaFluor 488,PE),藻红蛋白/德克萨斯红串联染料(PE-TR),藻红蛋白/Alexa Fluor 610串联染料(PE-Alexa Fluor 610),藻红蛋白/Alexa Fluor 647串联染料(PE-Alexa Fluor 647),藻红蛋白/花青染料5串联染料(PE-cy5),藻红蛋白/花青染料5.5串联染料(PE-cy5.5),藻红蛋白/Alexa Fluor 700串联染料(PE-Alexa Fluor 700),藻红蛋白/花青染料7串联染料(PE-Cy7),藻蓝蛋白(Allophycocyanin,APC),藻蓝蛋白/花青染料5.5串联染料(APC-Cy5.5),藻蓝蛋白/花青染料7串联染料(APC-Cy7)或者花青染料(Cy2/3/5)。

[0038] 具体实施例二

[0039] 上述具体实施例一用于检测Inhibin B含量的流式检测试剂的制备方法,包括以下步骤:

[0040] (1) INH $\alpha$ 和 $\beta$ 亚单位抗体的制备

[0041] 从NCBI网站上获取INH $\alpha$ 亚单位的编码序列和翻译成熟的相应蛋白质的氨基酸序列,用蛋白相关软件分析氨基酸序列的稳定性,抗原表位性,选取部分成熟片段(成熟片段较稳定,不会被降解)的氨基酸序列SEQ-1作为制备Ab1抗体的抗原,将编码此抗原的碱基序列克隆至表达载体PET-28、PET-32或PET-41上,E.coli原核表达系统表达出INH $\alpha$ 亚单位抗原蛋白,纯化INH $\alpha$ 亚单位抗原蛋白;以INH $\alpha$ 亚单位抗原蛋白为免疫原合成鼠抗人Inhibin-B单克隆抗体Ab1,即得到INH $\alpha$ 亚单位单克隆抗体 Ab1;以INH $\alpha$ 亚单位抗原蛋白为免疫原合成鼠抗人Inhibin-B单克隆抗体Ab1的具体步骤如下:

[0042] 将INH $\alpha$ 亚单位抗原蛋白用水溶性佐剂接种免疫5只6-8周龄Balb/c品系小鼠,于第一天、第十四天、第二十一天和第三十五天分别进行免疫,采集小鼠第一天和第三十五天的血清各100uL,ELISA检测血清效价;当效价达到1:50000后,选取血清效价最高的小鼠的

脾细胞与小鼠Balb/c品系骨髓瘤细胞sp2/0进行3次融合；融合效率大于1hybridoma/1000B cells,有限稀释融合细胞,采用96孔板克隆化细胞,HAT筛选杂交瘤细胞；检测出抗原阳性100-500个阳性细胞,扩大培养至48孔板,挑取阳性克隆扩增,ELISA检测克隆培养上清,根据检测结果,挑选1-20株效价最高的阳性克隆进行亚克隆化,每个亚克隆做96孔板有限稀释培养,ELISA筛选培养上清,每个母克隆挑选2个阳性亚克隆；阳性克隆扩大培养,ELISA检测上清效价大于1:20000,挑取3-5个效价最高的克隆做96孔板有限稀释培养,放大培养至T-25Flask培养,培养的上清用protein A或protein G纯化即得到,即得到INHBA亚单位单克隆抗体Ab1；其中 SEQ-1氨基酸序列为STPLMSWPWSPSALRLLQRPPEEPAAHANCHRVALNISFQELGWERWIVYPPSFIFHYC HGGCGLHIPPNLSLPVPGAPPTPAQPYSLPGAQPCCAALPGTMRPLHVRTTSDGGYSFKYETVPNLLTQHCACI；

[0043] 同理,从NCBI网站上获取INHBB<sub>B</sub>亚单位的编码序列和翻译成熟的相应蛋白质的氨基酸序列,用蛋白相关软件分析氨基酸序列的稳定性,抗原表位性,选取选取部分成熟片段(成熟片段较稳定,不会被降解)的氨基酸序列SEQ-2作为制备Ab2抗体的抗原,将编码此抗原的碱基序列克隆至表达载体PET-28、PET-32或PET-41上,E.coli原核表达系统表达出INHBB<sub>B</sub>亚单位抗原蛋白,纯化INHBB<sub>B</sub>亚单位抗原蛋白；以INHBB<sub>B</sub>亚单位抗原蛋白为免疫原合成兔抗人Inhibin-B单克隆抗体Ab2,即得到INHBB<sub>B</sub>亚单位单克隆抗体Ab2；以INHBB<sub>B</sub>亚单位抗原蛋白为免疫原合成兔抗人Inhibin-B单克隆抗体Ab2的具体步骤如下：将得到的INHBB<sub>B</sub>亚单位抗原蛋白免疫三只实验兔,经过血清blot和ELISA实验初步筛选,选取一只效价最高的兔子的兔脾细胞与240E兔骨髓瘤样细胞株融合,产生能分泌INHBB<sub>B</sub>亚单位抗原蛋白抗体的兔-兔杂交瘤细胞,用HAT 作为选择性培养基对融合后的细胞进行筛选培养,运用ELISA法和WB法,筛选获得阳性克隆,选取其中WB和ELISA信号最强的克隆进入抗体质粒重组阶段,再进一步筛选,选取分泌单克隆抗体最强的杂交瘤细胞株进入单克隆抗体大转生产,纯化后即得到INHBB<sub>B</sub>亚单位单克隆抗体Ab2；其中SEQ-2氨基酸序列为GLECDGRTNLCCRQQFFIDFRLIGWNDWIIAPTGYGNYCEGSCPAYLAGVPGSASSFHTAVVNQYRMRGLNPGTVNSCCIPTKLSTMSMLYFDDEYNIVKRDVPMIVEECGCA ；

[0044] (2) INHBA亚单位抗体Ab1与单分散微球偶联

[0045] 将碳二亚胺(EDC)粉末和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)粉末加入到浓度为1mg/mL的INHBA亚单位单克隆抗体Ab1溶液中,室温避光反应5-10分钟,然后涡旋震荡混匀1次后,继续室温避光反应5分钟,再向反应溶液中加入浓度为0.5wt%的单分散微球溶液,30℃避光震荡反应4小时,用含1wt%的SDS溶液洗涤微球2次,浓度为0.5wt%吐温-20的PBS溶液洗涤微球3次,即得到用于检测血清或精浆中Inhibin B含量的Ab1抗体微球偶联物,其结构通式如图1所示,其中M为高分子材料制成的单分散微球,R为功能结合键,Ab1 为INHBA亚单位单克隆抗体Ab1,将Ab1抗体微球偶联物保存于含0.5wt%NaCl,PH=7.4 的PB溶液中,待用；碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、单分散微球溶液与INHBA亚单位单克隆抗体Ab1溶液的混合比例为28g:56g:2ml:1ml；该单分散微球的直径为1-50微米,材质为聚苯乙烯(PS)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、二氧化硅(SiO<sub>2</sub>)、聚乳酸(PLA)或聚乳酸羟基乙酸聚合物(PLGA),所述的单分散微球的外表面功能化修饰羧基、氨基、羟基或巯基后,再对其表面进行聚乙二醇(PEG)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)或Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>的涂层修饰改性；功能结合键为羧基与氨基结合的酰胺键或者羟基与羧基的结合键或者巯基与羟基的结合键；

[0046] (3) INHB $\beta$ <sub>B</sub>亚单位抗体Ab2的荧光分子标记

[0047] 将浓度为1-10mg/ml的待交联的INHB $\beta$ <sub>B</sub>亚单位单克隆抗体Ab2溶液,于4℃用交联反应液(交联反应液配制方法:7.56g NaHCO<sub>3</sub>,1.06g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,7.36g NaCl,加水定容至1L)透析三次至pH=9.0得到抗体Ab2溶液;将荧光分子溶于二甲基亚砜中配制成浓度为1mg/mL的荧光分子溶液(每次交联使用的荧光分子溶液均应新鲜配制,避光);将荧光分子溶液缓慢加入抗体Ab2溶液中,边加边轻轻晃动使其与抗体混合均匀,避光4℃反应8h;然后在反应液中加入5mol/L的NH<sub>4</sub>Cl直至NH<sub>4</sub>Cl终浓度为50mmol/L,4℃终止反应 2h,然后在PBS缓冲液中透析四次以上直至透析液清亮,即得到用于血清或精浆中 Inhibin B含量的Ab2抗体荧光分子标记物,其结构通式如图2所示,其中Ab2为INHB $\beta$ <sub>B</sub>亚单位单克隆抗体2,其中F为荧光分子,将Ab2抗体荧光分子标记物置于pH=7.4的含有0.1wt%NaN<sub>3</sub>、1wt%BSA磷酸盐缓冲液中,4℃避光保存;INHB $\beta$ <sub>B</sub>亚单位单克隆抗体Ab2与荧光分子交联时的比例为1mg:15 $\mu$ g。该荧光分子为偶联的荧光染料,所述的荧光染料为异硫氰酸荧光素(FITC)、异硫氰酸盐罗丹明B(RBITC)、四乙基罗丹明(RIB200),四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC),罗丹明红-X(Red-X),德克萨斯红(Texas Red,),藻红蛋白(AlexaFluor 488,PE),藻红蛋白/德克萨斯红串联染料(PE-TR),藻红蛋白/Alexa Fluor 610串联染料(PE-Alexa Fluor 610),藻红蛋白/Alexa Fluor 647串联染料(PE-Alexa Fluor 647),藻红蛋白/花青染料5串联染料(PE-cy5),藻红蛋白/花青染料 5.5串联染料(PE-cy5.5),藻红蛋白/Alexa Fluor 700串联染料(PE-Alexa Fluor 700),藻红蛋白/花青染料7串联染料(PE-Cy7),藻蓝蛋白(Allophycocyanin,APC),藻蓝蛋白/花青染料5.5串联染料(APC-Cy5.5),藻蓝蛋白/花青染料7串联染料(APC-Cy7)或者花青染料(Cy2/3/5)。

[0048] 具体实施例三

[0049] 上述具体实施例一、二所述的用于检测Inhibin B含量的流式检测试剂的应用,将流式检测试剂用于检测Inhibin B含量具体步骤如下:

[0050] 将待测样本血清或精浆加入到Ab1抗体微球偶联物溶液中,然后加入一定体积的Ab2抗体荧光分子标记物溶液,37度孵育30min,样本中的INHB分别与Ab1抗体微球偶联物和Ab2抗体荧光分子标记物结合形成微球-Ab1-INHB-Ab2-荧光分子复合体,经流式细胞仪可以检测出荧光分子发射出的荧光,根据荧光强度与INHB的浓度关系,计算获得样本中的Inhibin B含量,其中Ab1抗体微球偶联物与Ab2抗体荧光分子标记物的摩尔比为1:1。

[0051] 上述说明并非对本发明的限制,本发明也并不限于上述举例。本技术领域的普通技术人员在本发明的实质范围内,作出的变化、改型、添加或替换,也应属于本发明的保护范围。

## 序 列 表

<110> 浙江星博生物科技股份有限公司

<120> 用于检测Inhibin B 含量的流式检测试剂及其制备方法和应用

<130>

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 134

<212> 氨基酸

<213> 人工序列

<220>

<223> INHB  $\alpha$ 亚单位上截取成熟多肽片段SEQ-1

<400> 1

STPLMSWPWSPSALRLLQRPEEPAAHANCHRVALNISFQELGWERWIVYPPSFIFHYCHGGCGLHIPPNLSL  
PVPGAPPTPAQPYSLLPGAQPCCAALPGTMRPLHVRTTSDGGYSFKYETVPNLLTQHCACI 134

<210> 2

<211> 115

<212> 氨基酸

<213> 人工序列

<220>

<223> INHB  $\beta$ B亚单位上截取成熟多肽片段SEQ-2

<400> 2

GLECDGRTNLCCRQQFFIDFRLIGWNDWIIAPTGYYGNYCEGSCPAYLAGVPGSASSFHTAVVNQYRMRGLNP  
GTVNSCCIPTKLSTMSMLYFDDEYNIVKRDVPMIVEECGA 115

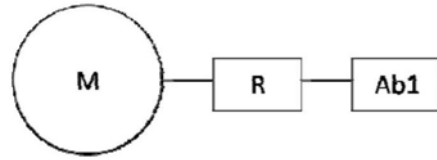


图1

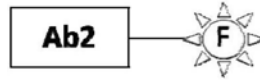


图2

专利名称(译)	用于检测InhibinB含量的流式检测试剂及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN107024591A</a>	公开(公告)日	2017-08-08
申请号	CN2017110301829.9	申请日	2017-05-02
[标]申请(专利权)人(译)	浙江星博生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	浙江星博生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	浙江星博生物科技股份有限公司		
[标]发明人	房海燕 高攀 陈继勇		
发明人	房海燕 高攀 陈继勇		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/74 G01N33/533		
代理人(译)	袁丽花		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了用于检测Inhibin B含量的流式检测试剂及其制备方法和应用，特点是包括用于检测血清或精浆中INH B含量的Ab1抗体微球偶联物和Ab2抗体荧光分子标记物，制备方法包括INH $\alpha$ 和 $\beta$ B亚单位抗体的制备步骤；INH $\alpha$ 亚单位抗体Ab1与单分散微球偶联的步骤；INH $\beta$ B亚单位抗体Ab2的荧光分子标记的步骤；通过抗体微球偶联技术和抗体荧光标记技术，采用抗原抗体特异性结合，一定粒径的微球和荧光分子能被流式细胞仪所识别，荧光强弱直接反应了样本中INH含量的多少，实现了样本中INH的流式细胞仪定量检测，优点是灵敏度高、检测速度快以及准确率高。

