



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107064504 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(21)申请号 201710253923.1

(22)申请日 2017.04.18

(71)申请人 上海佳牧生物制品有限公司  
地址 201106 上海市闵行区北翟路2901号

(72)发明人 李红 严华祥 易建中 刘成倩

(74)专利代理机构 上海容慧专利代理事务所  
(普通合伙) 31287

代理人 张竹梅

(51)Int.Cl.

G01N 33/573(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

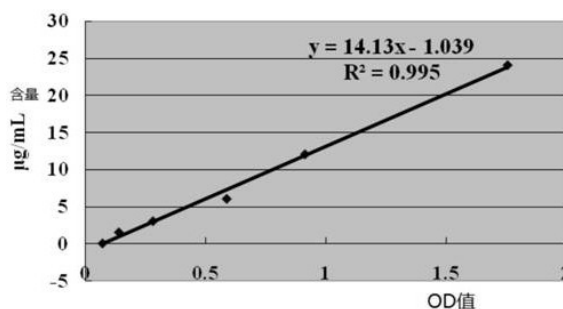
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种检测鸡蛋清中溶菌酶的方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测鸡蛋清中溶菌酶的方法,该方法包括如下步骤:(1)用2 μg/mL的单克隆抗体3E4包被ELISA板,100 μL/孔,4℃包被过夜;(2)0.5%的PBST洗涤3次,5min/次,拍干;(3)加入2.5%脱脂奶粉溶液封闭,200 μL/孔,37℃包被1h;(4)0.5%的PBST洗涤3次,5min/次,拍干;(5)加入系列稀释的溶菌酶标准品溶液、待检样品、及1:1600倍稀释的辣根过氧化物酶标记的多克隆抗体,各100 μL/孔,37℃孵育1h;(6)0.5%的PBST洗涤3次,5min/次,拍干;(7)加入TMB底物溶液,100 μL/孔,37℃避光反应15min;(8)加入3M硫酸终止反应,50 μL/孔;(9)酶标仪450nm处读值,记录OD值;(10)绘制标准曲线,计算待检样品中鸡蛋蛋清中溶菌酶的含量。本发明的溶菌酶的检测方法,检测程序简单易操作,检测时间不长,且高灵敏度,可用于制备快速、有效、低成本的抗原检测试剂盒。



1. 一种检测鸡蛋清中溶菌酶的方法,其特征在于该方法包括如下步骤:

(1) 用 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 的单克隆抗体3E4包被ELISA板, $100\mu\text{L}/\text{孔}$ , $4^{\circ}\text{C}$ 包被过夜;

(2) 0.5%的PBST洗涤3次,5min/次,拍干;

(3) 加入2.5%脱脂奶粉溶液封闭, $200\mu\text{L}/\text{孔}$ , $37^{\circ}\text{C}$ 包被1h;

(4) 0.5%的PBST洗涤3次,5min/次,拍干;

(5) 加入系列稀释的溶菌酶标准品溶液、待检样品、及1:1600倍稀释的辣根过氧化物酶标记的多克隆抗体,各 $100\mu\text{L}/\text{孔}$ , $37^{\circ}\text{C}$ 孵育1h;

(6) 0.5%的PBST洗涤3次,5min/次,拍干;

(7) 加入TMB底物溶液, $100\mu\text{L}/\text{孔}$ , $37^{\circ}\text{C}$ 避光反应15min;

(8) 加入3M硫酸终止反应, $50\mu\text{L}/\text{孔}$ ;

(9) 酶标仪450nm处读值,记录OD值;

(10) 绘制标准曲线,计算待检样品中鸡蛋蛋清中溶菌酶的含量;

其中所述的单克隆抗体3E4是通过溶菌酶免疫BALB/c雌性小鼠制备得到的;

其中所述的多克隆抗体是通过溶菌酶免疫新西兰大白兔后得到。

2. 一种检测鸡蛋清中溶菌酶的试剂盒,其特征在于该试剂盒包含:

单克隆抗体3E4、辣根过氧化物酶标记的多克隆抗体、包被液、封闭液、洗液、系列稀释的溶菌酶标准品溶液、酶标多抗稀释液、底物溶液和终止液;

其中所述的单克隆抗体3E4是通过溶菌酶免疫BALB/c雌性小鼠制备得到的;多克隆抗体是通过溶菌酶免疫新西兰大白兔后得;包被液为 $\text{pH}=7.2\pm 0.1$ 的磷酸缓冲液PBS;封闭液为2.5%脱脂奶粉溶液;洗液为0.5%PBST;溶菌酶标准品溶液的系列稀释浓度分别为0、1.5、3、6、12和 $24\mu\text{g}/\text{ml}$ ;酶标多抗稀释液为PBST(0.01M的PBS,含tween-20 0.5%),底物溶液为TMB溶液,终止液为3M硫酸。

## 一种检测鸡蛋清中溶菌酶的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物检验检疫领域,具体的说涉及一种用于检测鸡蛋清中溶菌酶的方法。

### 背景技术

[0002] 溶菌酶又称为N-乙酰胞壁质聚糖水解酶,胞壁质酶,是一种能水解致病菌中粘多糖的碱性酶。对革兰氏阳性菌的抗菌能力最强,也能抑制革兰氏阴性菌和真菌,还具有抗氧化能力。溶菌酶作为一种生物体内的非特异性免疫因子,在抑杀病原体时不易产生抗药性,并具有无毒、无害、无残留、抗菌谱广、活性稳定、安全性高等优良的抗菌特性。溶菌酶不仅在生物体内有非特异性免疫功能,哺乳动物还可以通过乳汁将这种功能传递给幼崽,提高幼崽的抗病力,家禽通过蛋清传递给种蛋,提高胚胎发育的抵抗力。在食品工业(防腐剂)、医药(酶类抗菌药)、饲料(替代抗生素)和生物工程(生物酶)等领域,溶菌酶已经得到广泛运用,并有替代抗生素的趋势。

[0003] 鸡蛋中的溶菌酶含量最高,占蛋清蛋白的3.5%,是提取溶菌酶的最佳来源。蛋清中的溶菌酶含量越高,酶活力越强,越有利于鸡蛋的储藏,因此测定鸡蛋蛋清中的溶菌酶对我国溶菌酶生产、禽蛋产品加工有重要的指导作用,也为蛋品质评定提供了一个重要参数。

[0004] 最早对溶菌酶的研究始于20世纪初,1922年英国弗莱明发现人的鼻涕、唾液、眼泪有强大的溶菌活性,并将这种溶菌因子成为溶菌酶。此后在人和动物的多种组织、分泌液以及植物、微生物中也发现溶菌酶的存在,其中鸡蛋蛋清中的溶菌酶含量最高,已成为溶菌酶生产的主要原料。但是蛋清中溶菌酶的定量测定还没有一个较便捷的方法。传统的方法是先提取蛋清中的溶菌酶,再测定提取液中的蛋白含量。由于不可能完全提取蛋清中的溶菌酶,这种方法计算出的蛋清溶菌酶含量比实际的数值偏低。

### 发明内容

[0005] 本发明提供一种检测鸡蛋清中溶菌酶的方法,该方法包括如下步骤:

[0006] (1) 用稀释好的单克隆抗体3E4 (2 $\mu$ g/mL) 包被ELISA板,100 $\mu$ L/孔,4 $^{\circ}$ C包被过夜;

[0007] (2) 0.5%的PBST洗涤3次,5min/次,拍干;

[0008] (3) 加入2.5%的脱脂奶粉溶液封闭,200 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C包被1h;

[0009] (4) 0.5%的PBST洗涤3次,5min/次,拍干;

[0010] (5) 加入系列稀释的溶菌酶标准品溶液或者待检样品及辣根过氧化物酶标记的多克隆抗体(1:1600倍稀释),各100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h;

[0011] (6) 0.5%的PBST洗涤3次,5min/次,拍干;

[0012] (7) 加入TMB底物溶液,100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C避光反应15min;

[0013] (8) 加入3M硫酸终止反应,50 $\mu$ L/孔;

[0014] (9) 酶标仪450nm处读值,记录OD值;

[0015] (10) 绘制标准曲线,计算待检样品中溶菌酶的含量。

[0016] 其中所述的单克隆抗体3E4是通过溶菌酶免疫BALB/c雌性小鼠制备得到的；

[0017] 其中所述的多克隆抗体是通过溶菌酶免疫新西兰大白兔后得到；

[0018] 具体的说,单克隆抗体3E4是通过如下方法制备得到的：

[0019] (a) 采用皮下免疫方案免疫健康BALB/c雌性小鼠：用1mg/mL的溶菌酶100 $\mu$ L与等量的弗氏完全佐剂混合,采用超声乳化,以乳化后滴入水中不扩散为准,大约40min；用酒精棉对小鼠要免疫的部位进行消毒,皮下多点注射；首免后2周用1mg/mL的溶菌酶100 $\mu$ L与等量的弗氏不完全佐剂混合均匀后皮下注射小鼠,二免后10天,对免疫小鼠采血,检测血清抗体水平,来确定是否需要三免；

[0020] (b) 细胞融合及阳性杂交瘤细胞株的筛选与克隆化：

[0021] 融合前5天用与步骤(a)中相同剂量、相同方法加强免疫一次。尾静脉采血,分离血清作为阳性对照,小鼠颈脱位致死,75%酒精消毒体表5min,无菌条件下取出小鼠脾脏,用电动移液枪吸取DMEM培养基反复冲洗脾脏以制备脾脏细胞悬液,放入含有10mL DMEM基础培养基的玻璃皿中,用平头镊子夹碎脾脏,反复吹打制成脾细胞悬液。用灭菌铜网过滤除去脂肪类块状组织,过滤后细胞悬液吸入15mL离管,300g,4 $^{\circ}$ C离心10min。吸净上清,加入5mL预冷的0.17M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 重悬细胞,放入4 $^{\circ}$ C冰箱,静置10min溶解红细胞,计数脾细胞。按脾细胞和SP2/0细胞8:1的比例充分混合,在37 $^{\circ}$ C水浴下与50%PEG1000进行细胞融合。将融合后的细胞按照脾细胞 $2 \times 10^6$ /ml,100 $\mu$ L/孔的要求,轻轻加入所需预温的HT培养基(SIGMA公司)。24h后,每孔补加含有2倍量A (Aminoperin) 的HT培养基,每孔100 $\mu$ L。4天后,半量换预温的HAT培养基(HAT培养基中添加Aminopterin,称为HAT培养基)。7天后,半量换预温的HT培养基。每天观察细胞,标记融合的细胞,待克隆细胞生长至孔底1/4面积以上时,利用间接ELISA法对上清液进行抗体效价检测,筛选阳性杂交瘤细胞。对抗体效价高、细胞生长状态良好的孔,利用有限稀释法进行克隆纯化,直到阳性率连续3次不低于90%,然后扩大培养、冻存。阳性杂交瘤细胞腹腔注射预先经石蜡油处理过的雌性BALB/c小鼠,1 $\times 10^6$ 个细胞/只,注意观察小鼠的腹水及存活情况,及时抽取腹水。如发现小鼠活动受限,要立即处死放腹水。5000r/min离心去除杂物,用饱和硫酸铵和Protein G Resin纯化抗体,经紫外吸收法测定MAb浓度,通过SDS-PAGE电泳分析其纯度。先后三次细胞融合的融合率分别为17.7%、19.4%和78.2%,阳性率分别为0、0和1.89%,经过三次克隆化筛选,最后获得一株能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株命名为3E4,其亲和力常数为 $4.1 \times 10^8$ mol/L。

[0022] 其中所述的多克隆抗体是通过溶菌酶免疫新西兰大白兔后得到；

[0023] 具体的说所述的多克隆抗体是通过如下方法制备得到的：

[0024] (a) 用溶菌酶免疫健康新西兰大白兔3只,免疫剂量为500 $\mu$ g/只,一免是将溶菌酶与等体积的弗氏完全佐剂进行乳化,乳化完全后多点注射于兔子颈部及背部皮下,2周后加强免疫一次,加强免疫为溶菌酶与等体积的弗氏不完全佐剂,免疫剂量和免疫方法同第一次免疫,第三次加强免疫是将未乳化的溶菌酶,进行兔子的耳静脉注射,注射量500 $\mu$ g/只。静脉注射后7天采集静脉血测定血清效价,当血清效价达到 $2^4$ 及以上时,颈动脉采血并在37 $^{\circ}$ C放置2h,4 $^{\circ}$ C静置过夜后3000rpm离心20min,收集血清,即获得多克隆抗体。

[0025] (b) 多克隆抗体的纯化

[0026] 采用辛酸-硫酸铵法纯化收集的兔血清,具体步骤如下：(1) 兔血清4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心15min,去除杂质。(2) 取1份血清与2份醋酸盐缓冲液(0.06mol/L,pH 4.8)混合,室温搅

拌下逐滴加入正辛酸75 $\mu$ L/mL兔血清。(3) 室温混合30min。(4) 4 $^{\circ}$ C静置2h以上,使其充分沉淀。(5) 4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心30min,弃沉淀。(6) 上清经砂芯漏斗过滤后,于50倍体积的0.01M PBS (pH 7.4) 中4 $^{\circ}$ C透析6h。(7) 在透析后的上清中加入等体积饱和硫酸铵,使成50%饱和度,边加边搅拌,4 $^{\circ}$ C静置1h以上。(8) 4 $^{\circ}$ C,10000rpm离心30min,弃上清。(9) 沉淀用适量含137mM NaCl、2.6mM KCL、0.2mM EDTA的PBS (pH 7.4) 溶解,于50~100倍体积的上述PBS中4 $^{\circ}$ C过夜透析。(10) 取少量透析后样品适当稀释后,以紫外分光光度计检测蛋白含量,SDS-PAGE检测抗体浓度,并分装保存至-80 $^{\circ}$ C备用。

[0027] (c) 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记多克隆抗体

[0028] 纯化后的多克隆抗体用一种活化的辣根过氧化物酶试剂盒 (HRP, Galaxybio公司) 进行标记,标记方法按照试剂盒说明书进行,具体操作方法如下:(1) 取100 $\mu$ L抗体溶液 (1mg/mL) 转入REAGENT I活化辣根过氧化物酶,稍离心,使辣根过氧化物酶沉到管底,辣根酶管壁上的干粉HRP要完全冲洗溶解。总的反应体系控制在100 $\mu$ L/mg活化HRP左右,体系增大影响标记率,按照按mg活化HRP对应抗体100-500 $\mu$ g,HRP:X的分子mol比保持在30:15~1左右。(2) 以REAGENT II调pH值至9.5左右,4 $^{\circ}$ C过夜。(3) 加入REAGENT III (约3倍体积的REAGENT II),确保酶结合pH在7.0左右,可以多加REAGENT III调整,混匀终止反应。(4) 加甘油至50%,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0029] 本发明还提供了一种检测溶菌酶的试剂盒,该试剂盒包括:

[0030] 前述的单克隆抗体3E4和辣根过氧化物酶标记的多克隆抗体;以及包被液、封闭液、洗液、系列稀释的溶菌酶标准品溶液、酶标多抗稀释液、底物溶液和终止液;

[0031] 该试剂盒中还包括使用说明书。

[0032] 其中单克隆抗体3E4为包被抗体;辣根过氧化物酶标记的多克隆抗体为检测抗体;包被液为pH=7.2 $\pm$ 0.1的磷酸缓冲液PBS;封闭液为2.5% (重量含量) 脱脂奶粉溶液;洗液为0.5% PBST;溶菌酶标准品溶液的系列稀释浓度分别为0、1.5、3、6、12和24 $\mu$ g/ml;酶标多抗稀释液为PBST (0.01M的PBS,含tween-20 0.5%),底物溶液为TMB溶液,终止液为3M硫酸。

[0033] 本发明以特异性高的单克隆抗体为包被抗体,以HRP标记的多克隆抗体为检测抗体,实验操作简单,时间短,且灵敏度高,最低检测限可达到0.3125ng/mL,可以制备快速、有效、低成本的溶菌酶检测试剂盒,容易实现,具有很好的推广价值。

## 附图说明

[0034] 图1实施例3中绘制得到的标准曲线

## 具体实施方式

[0035] 实施例1溶菌酶免疫BALB/c小鼠 (复旦大学上海医学院),制备单克隆抗体

[0036] (一) 体的免疫方法如下:

[0037] 用1mg/mL的溶菌酶 (南京建成生物工程研究所) 100 $\mu$ L与等量的弗氏完全佐剂混合,超声乳化40min。腹腔及背部皮下多点注射100 $\mu$ g/100 $\mu$ L的溶菌酶,两周后进行二次免疫,100 $\mu$ g/100 $\mu$ L溶菌酶与等量弗氏不完全佐剂混合乳化,加强免疫每次间隔两周,三免后10天尾静脉检测小鼠血清效价。

[0038] (2) 细胞融合及阳性杂交瘤细胞株的筛选与克隆化:

[0039] 强免后5天,小鼠尾静脉采血,分离血清留作阳性对照,无菌采集小鼠脾脏,用移液枪吸取DMEM培养基(Hyclone公司)反复冲洗脾脏以制备脾细胞悬液,NH<sub>4</sub>Cl处理脾细胞中红细胞,将脾细胞按8:1的比例与SP2/0细胞充分混合,将融合后的细胞按照脾细胞 $2 \times 10^6$ /ml,100 $\mu$ L/孔的要求,轻轻加入所需预温的HT培养基。24h后,每孔补加含有2倍量A(Aminoperin,SIGMA公司)的HT培养基,每孔100 $\mu$ L。4天后,半量换预温的HAT培养基(SIGMA公司)。7天后,半量换预温的HT培养基。每天观察细胞,标记融合的细胞,待克隆细胞生长至孔底1/4面积以上时,利用间接ELISA法对上清液进行抗体效价检测,筛选阳性杂交瘤细胞。并选择阳性高,细胞生长状态好的孔,采用有限稀释法进行克隆,然后扩大培养、冻存,直到所有的克隆细胞孔都为阳性为止。先后三次细胞融合的融合率分别为17.7%、19.4%和78.2%,阳性率分别为0.0和1.89%,经过三次克隆化筛选,最后获得一株能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株命名为3E4,其亲和力常数为 $4.1 \times 10^8$ mol/L。

[0040] (三) 单抗亚型鉴定及腹水大量制备:

[0041] 选用Sigma公司小鼠单克隆抗体MAb亚型鉴定试剂盒(Mouse monoclonal Antibody Isotype Reagent),根据操作说明使用ELISA方法鉴定单抗亚型。具体方法如下:

[0042] (1) 用溶菌酶2 $\mu$ g/mL包被酶标板,4 $^{\circ}$ C过夜;

[0043] (2) 弃掉抗原,PBST洗涤3次,5min/次,甩干;

[0044] (3) 加入适当稀释的腹水或细胞培养上清,37 $^{\circ}$ C,1h;

[0045] (4) PBST洗涤3次,5min/次;

[0046] (5) 加入2.5%脱脂奶粉溶液作为封闭液,200 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C作用1h,洗涤方法同上;

[0047] (6) 用2.5%脱脂奶粉溶液稀释单克隆抗体细胞培养液上清,100 $\mu$ L/孔加入,37 $^{\circ}$ C作用1h,洗涤方法同上;

[0048] (7) 按说明书加入1:1000稀释的Goat Anti-Mouse IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM和IgA抗体,100 $\mu$ L/孔,室温孵育30min,洗涤;

[0049] (8) 加入稀释的HRP标记兔抗羊IgG二抗,100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C作用1h,洗涤;

[0050] (9) 每孔加入TMB底物溶液100 $\mu$ L,室温避光作用15min;

[0051] (10) 加入3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,50 $\mu$ L/孔,终止反应;

[0052] (11) 提前预热酶标仪,读值结果见如下表1,判定3E4抗体属于IgG2b亚型。

[0053] 表1 MAb亚型鉴定结果

[0054]

细胞株	IgG 亚类					
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgA
3E4	0.045	0.058	1.847	0.064	0.07	0.055

[0055] 小鼠腹水大量制备的具体操作:取健壮的8~10周龄雌性BALB/c小鼠,每只小鼠腹腔注射500 $\mu$ L高压灭菌的石蜡油,5天后腹腔注射处于对数生长期的杂交瘤细胞 $1 \sim 2 \times 10^6$ 个/只,注射细胞5~7天后,选择腹腔明显膨胀,行动不便的小鼠,将注射器针头插入小鼠腹腔内,引流腹腔内淡黄色液体至离心管中,5000rpm离心10min,取淡黄色上清,分装、标记后-80 $^{\circ}$ C保存备用。约间隔2天,待小鼠体内腹水再次聚积后,同样方法获取腹水。

[0056] (四) 辛酸-硫酸铵沉淀纯化腹水:

[0057] 具体操作如下：

[0058] (1) 腹水4℃,12000rpm离心15min,去除杂质。

[0059] (2) 取1份腹水与2份醋酸盐缓冲液(0.06mol/L,pH 4.8)混合,室温搅拌下逐滴加入正辛酸33μL/mL腹水。

[0060] (3) 室温混合30min。

[0061] (4) 4℃静置2h以上,使其充分沉淀。

[0062] (5) 4℃,12000rpm离心30min,弃沉淀。

[0063] (6) 上清经砂芯漏斗过滤后,加入1/10体积的0.1M PBS(pH 7.4),用2M NaOH调pH值到7.4。

[0064] (7) 冰浴下于30min内加入0.277g/mL的硫酸铵,使成45%饱和度。

[0065] (8) 4℃静置1h以上。

[0066] (9) 4℃,10000rpm离心30min,弃上清。

[0067] (10) 沉淀用适量含137mM NaCl、2.6mM KCL、0.2mM EDTA的PBS(pH 7.4)溶解,于50~100倍体积的上述PBS中4℃过夜透析。

[0068] (11) 取少量透析后样品适当稀释后,以紫外分光光度计检测蛋白含量,SDS-PAGE检测抗体浓度,并分装保存至-80℃备用。

[0069] (五) 间接ELISA检测纯化后腹水效价：

[0070] 具体操作如下：

[0071] (1) 用溶菌酶蛋白(南京建成生物工程研究所)包被酶标板,4℃过夜；

[0072] (2) 弃掉抗原,PBST洗涤3次,5min/次,甩干；

[0073] (3) 纯化后的腹水从5千倍开始倍比稀释,每个浓度有2个重复孔,37℃孵育1h,同时设定阴性对照孔,阴性对照是注射骨髓瘤细胞产生的腹水；

[0074] (4) PBST洗涤3次,5min/次,甩干；

[0075] (5) 每孔加入100μL辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗(1:10000倍稀释),37℃孵育1h；

[0076] (6) 洗涤方法同上；

[0077] (7) 每孔加入TMB底物溶液100μL,室温显色15min,酶标仪读OD450nm值记录结果。

[0078] (六) 单克隆抗体分子量及腹水蛋白含量测定：

[0079] 将纯化前和纯化后的腹水经变性SDS-PAGE电泳后,以Marker中标记蛋白在凝胶中的相对迁移率为横坐标,以标记蛋白分子量的对数为纵坐标绘制标准曲线。根据抗体轻链和重链在凝胶中的迁移情况,计算单抗3E4分子量为154,368Da。利用BCA法测定蛋白浓度,绘制标准曲线,根据吸光度值,查找标准曲线,求出3E4的腹水蛋白含量为11.78mg/mL。

[0080] (七) 单克隆抗体亲和力测定：

[0081] 具体操作如下：

[0082] 将抗原溶菌酶按照8μg/ml、4μg/ml、2μg/ml、1μg/ml包被酶标板,将单抗从一定浓度开始倍比稀释,其余步骤与间接ELISA法一致。以抗体浓度(mol/L)的对数值为横坐标,对应的吸光度值为纵坐标,可在一个坐标系内作出4条S形曲线。找出S形曲线的顶部,设定为OD<sub>max</sub>。在曲线中分别找出4条曲线各自50%OD<sub>max</sub>对应的抗体浓度。将4个浓度两两一组,根据下列公式计算单抗的亲和力常数。

[0083]  $K_a = (n-1) / 2 (n[Ab']_t - [Ab]_t)$

[0084] 其中n为每组中两个包被浓度的倍数,  $[Ab']_t$ 和 $[Ab]_t$ 分别为每组中两个50% OD<sub>max</sub>对应的抗体浓度(mol/L)

[0085] 根据该公式可求得3E4单抗的亲和力常数为 $4.1 \times 10^8$ mol/L,属于高亲和力抗体,适合ELISA检测。

[0086] 实施例2溶菌酶多克隆抗体的制备

[0087] (一) 免疫得到多克隆抗体

[0088] 用溶菌酶免疫健康新西兰大白兔(复旦大学上海医学院)3只,免疫剂量为500 $\mu$ g/只,一免是将溶菌酶与等体积的弗氏完全佐剂进行乳化,乳化完全后多点注射于兔子颈部及背部皮下,2周后加强免疫一次,加强免疫为溶菌酶与等体积的弗氏不完全佐剂,免疫剂量和免疫方法同第一次免疫,第三次加强免疫是将未乳化的溶菌酶,进行兔子的耳静脉注射,注射量500 $\mu$ g/只。静脉注射后7天采集静脉血测定血清效价,当血清效价达到 $2^4$ 及以上时,颈动脉采血并在37 $^{\circ}$ C放置2h,4 $^{\circ}$ C静置过夜后3000rpm离心20min,收集血清,即获得多克隆抗体。

[0089] (二) 辛酸-硫酸铵法纯化多克隆抗体:

[0090] 具体操作如下:

[0091] (1) 兔血清4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心15min,去除杂质。

[0092] (2) 取1份血清与2份醋酸盐缓冲液(0.06mol/L,pH 4.8)混合,室温搅拌下逐滴加入正辛酸75 $\mu$ L/mL兔血清。

[0093] (3) 室温混合30min。

[0094] (4) 4 $^{\circ}$ C静置2h以上,使其充分沉淀。

[0095] (5) 4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心30min,弃沉淀。

[0096] (6) 上清经砂芯漏斗过滤后,于50倍体积的0.01M PBS(pH 7.4)中4 $^{\circ}$ C透析6h。

[0097] (7) 在透析后的上清中加入等体积饱和硫酸铵,边加边搅拌,4 $^{\circ}$ C静置1h以上。

[0098] (8) 4 $^{\circ}$ C,10000rpm离心30min,弃上清。

[0099] (9) 沉淀用适量含137mM NaCl、2.6mM KCL、0.2mM EDTA的PBS(pH 7.4)溶解,于50~100倍体积的上述PBS中4 $^{\circ}$ C过夜透析。

[0100] (10) 取少量透析后样品适当稀释后,以紫外分光光度计检测蛋白含量,SDS-PAGE检测抗体浓度,并分装保存至-80 $^{\circ}$ C备用。

[0101] (三) 辣根过氧化物酶标记多克隆抗体

[0102] 纯化后的多克隆抗体用活化的辣根过氧化物酶试剂盒(Galaxybio公司)进行标记,标记方法按照试剂盒说明书进行,具体操作方法如下:(1)取100 $\mu$ L抗体溶液(1mg/mL)转入REAGENT I活化辣根过氧化物酶,稍离心,使辣根过氧化物酶沉到管底,辣根酶管壁上的干粉HRP要完全冲洗溶解。总的反应体系控制在100 $\mu$ L/mg活化HRP左右,体系增大影响标记率,按照按mg活化HRP对应抗体100-500 $\mu$ g,HRP:X的分子mol比保持在30:15~1左右。(2)以REAGENT II调pH值至9.5左右,4 $^{\circ}$ C过夜。(3)加入REAGENT III(约3倍体积的REAGENT II),确保酶结合pH在7.0左右,可以多加REAGENT III调整,混匀终止反应。(4)加甘油至50%,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0103] 实施例3溶菌酶双抗夹心ELISA检测方法的操作

[0104] (1) 用实施例1中制备得到的抗溶菌酶的单抗3E4 2 $\mu$ g/ml包被酶标板,100 $\mu$ L/孔,4 $^{\circ}$ C包被过夜;

[0105] (2) 0.5%的PBST洗涤3次,每次5min;

[0106] (3) 新鲜配制的2.5%脱脂奶粉(上海生工生物工程有限公司)溶液作为封闭剂,200 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C封闭1h;

[0107] (4) 0.5%的PBST洗涤3次,每次5min;

[0108] (5) 将溶菌酶标准品用生理盐水分别稀释为0、1.5、3、6、12、24 $\mu$ g/ml的浓度(对应A1-A6孔)、及用生理盐水进行1000倍稀释的待检样品—蛋清(共86个,分别对应其余86个孔,上海家禽育种有限公司),与辣根过氧化物酶标记的多抗(实施例2中制备得到的)(1:1600),各100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h;

[0109] (6) 0.5%的PBST洗涤3次,每次5min;

[0110] (7) 加入TMB底物溶液,100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育15min,立即加入3M硫酸终止反应,50 $\mu$ L/孔,酶标仪测定OD450nm值。

[0111] (8) 绘制标准曲线见图1,并根据标准曲线计算部分待检样品中溶菌酶的含量,计算结果见如下表2。

[0112] 表2各样品中溶菌酶的浓度

[0113]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	标品 S0	标品 S1	标品 S2	标品 S3	标品 S4	标品 S5	3.426	2.225	1.490	3.596	3.638	1.787
B	2.112	1.872	3.299	3.002	3.680	2.790	1.462	1.589	2.818	1.914	2.734	3.680
C	2.762	3.384	2.380	3.624	2.578	2.098	2.197	3.115	3.737	3.257	2.550	3.045
D	2.169	3.709	3.313	2.847	3.016	2.239	2.366	3.737	2.310	3.525	3.610	3.355
E	3.779	2.380	2.055	3.384	2.804	3.073	2.564	3.355	2.310	2.267	2.960	3.779
F	1.858	3.666	1.377	1.420	1.504	2.903	1.519	1.547	2.310	2.098	2.395	2.932
G	3.483	3.596	3.115	1.434	3.610	1.660	3.073	2.508	2.027	3.426	3.723	1.999
H	3.567	2.705	1.928	2.070	2.112	2.960	1.504	1.900				

[0114] 实施例4溶菌酶双抗夹心ELISA检测试剂盒的组装

[0115] 试剂盒包括:包被用的单克隆抗体3E4、辣根过氧化物酶标记的多克隆抗体、包被液、封闭剂、洗液、系列稀释的溶菌酶标准品溶液、酶标多抗稀释液、底物溶液和终止液;以及说明书一份;

[0116] 其中包被抗体为实施例1中制备得到的单克隆抗体3E4,检测抗体为实施例2中制备得到的辣根过氧化物酶标记的多克隆抗体;封闭剂为2.5%脱脂奶粉溶液;洗液为0.5% PBST;溶菌酶标准品溶液的系列稀释浓度分别为0、1.5、3、6、12和24 $\mu$ g/ml;酶标多抗稀释液为PBST(0.01M的PBS,含tween-20 0.5%);底物溶液为TMB溶液;终止液为3M硫酸。

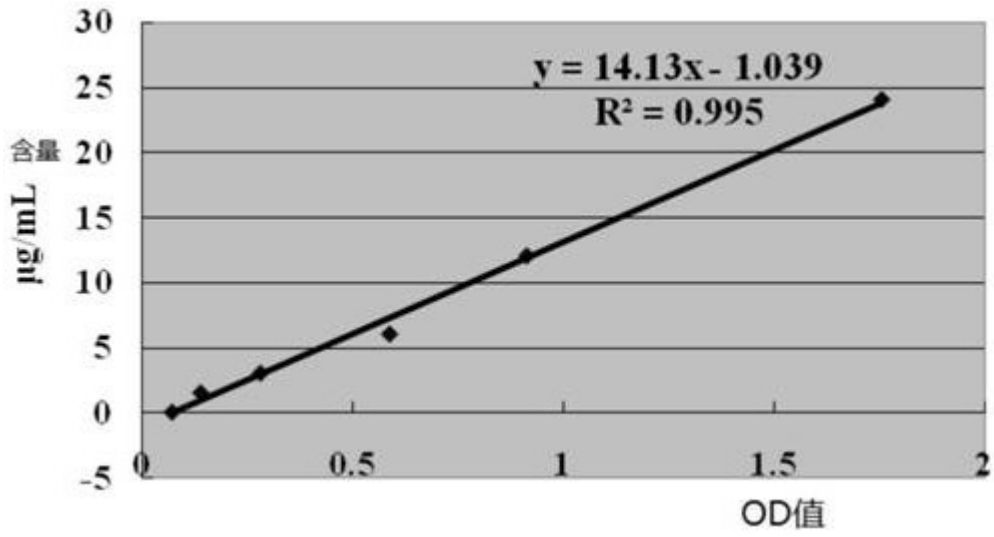


图1

专利名称(译)	一种检测鸡蛋清中溶菌酶的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107064504A</a>	公开(公告)日	2017-08-18
申请号	CN2017110253923.1	申请日	2017-04-18
[标]申请(专利权)人(译)	上海佳牧生物制品有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海佳牧生物制品有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海佳牧生物制品有限公司		
[标]发明人	李红 严华祥 易建中 刘成倩		
发明人	李红 严华祥 易建中 刘成倩		
IPC分类号	G01N33/573 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/573 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/577 G01N2333/936		
代理人(译)	张竹梅		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种检测鸡蛋清中溶菌酶的方法，该方法包括如下步骤：  
 (1)用2μg/mL的单克隆抗体3E4包被ELISA板，100μL/孔，4°C包被过夜；  
 (2)0.5%的PBST洗涤3次，5min/次，拍干；(3)加入2.5%脱脂奶粉溶液封闭，200μL/孔，37°C包被1h；(4)0.5%的PBST洗涤3次，5min/次，拍干；  
 (5)加入系列稀释的溶菌酶标准品溶液、待检样品、及1:1600倍稀释的辣根过氧化物酶标记的多克隆抗体，各100μL/孔，37°C孵育1h；(6)0.5%的PBST洗涤3次，5min/次，拍干；(7)加入TMB底物溶液，100μL/孔，37°C避光反应15min；(8)加入3M硫酸终止反应，50μL/孔；(9)酶标仪450nm处读值，记录OD值；(10)绘制标准曲线，计算待检样品中鸡蛋清中溶菌酶的含量。本发明的溶菌酶的检测方法，检测程序简单易操作，检测时间不长，且高灵敏度，可用于制备快速、有效、低成本的抗原检测试剂盒。

