

[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 200410101473.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

[43] 公开日 2006年6月21日

[11] 公开号 CN 1790024A

[22] 申请日 2004.12.16

[21] 申请号 200410101473.7

[71] 申请人 浙江永宁制药厂

地址 台湾省台州市黄岩区梅花井路4号

[72] 发明人 陆仙芸 林德君

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 龙 淳

权利要求书2页 说明书5页

[54] 发明名称

神经生长因子蛋白的含量测定方法及其应用

[57] 摘要

本发明涉及神经生长因子的蛋白含量测定方法，具体地说，涉及小鼠神经生长因子的双抗体夹心酶联免疫测定方法。该测定方法可用来定性或定量检测 NGF 的存在与否及其含量。

1. 一种神经生长因子的含量测定方法，所述方法包括：
将一种包被抗体定量包被在微孔板上，作为固相化抗体；
向其中加入一定量样品孵育后，洗去没有结合的组分；
再加入匹配量溶液抗体孵育；
洗去没有结合的组分后，利用酶标抗体与底物的显色反应显色；
测定样品吸收值，利用标准曲线，得出样品含量。

2. 一种神经生长因子的含量测定方法，该方法包括下述顺序的步骤：

(1) 用抗体稀释液稀释包被抗体，并将所述抗体包被在微孔板上作为固相化抗体，其中所述的包被抗体的浓度配制为 $1\sim 50\mu\text{g/ml}$ ，每孔加 $10\sim 360\mu\text{l}$ ， $0\sim 10^\circ\text{C}$ 密封过夜；

(2) 弃去孔内液体，用洗涤液洗 $1\sim 10$ 次，除尽孔内残液；

(3) 每孔加入封闭液 $50\sim 360\mu\text{l}$ ，室温孵育 30 分钟 \sim 3 小时；

(4) 弃去孔内液体，用洗涤液洗 $1\sim 10$ 次，除尽孔内残液；

(5) 每孔各加入 $10\sim 360\mu\text{l}$ 样品或系列稀释的标准品，室温孵育 30 分钟 \sim 5 小时；

(6) 弃去孔内液体，用洗涤液洗 $1\sim 10$ 次，除尽孔内残液；

(7) 每孔各加入 $10\sim 500\mu\text{l}$ 浓度为 $0.1\sim 10\mu\text{g/ml}$ 的溶液抗体，室温孵育 30 分钟 \sim 5 小时；

(8) 弃去孔内液体，用洗涤液洗 $1\sim 10$ 次，除尽孔内残液；

(9) 每孔各加入 $10\sim 360\mu\text{l}$ 以 $1:2000\sim 1:5000$ 稀释的酶标抗体，室温孵育 30 分钟 \sim 3 小时；

(10) 每孔各加入 $10\sim 360\mu\text{l}$ 底物混合液，避光处静置 $5\sim 60\text{min}$ ；

(11) 弃去孔内液体，用洗涤液洗 $1\sim 10$ 次，除尽孔内残液；

(12) 每孔各加入 $5\sim 360\mu\text{l}$ 终止液， $3\sim 60\text{min}$ 后测定吸收值，根据该吸收值得到样品含量。

3. 权利要求 2 的测定方法，其特征在于所述 NGF 是 mNGF。

4. 权利要求 2 的测定方法其特征在于包被抗体是抗人神经生长因

子单克隆抗体；溶液抗体是抗小鼠神经生长因子多克隆抗体。

5. 权利要求 2 的测定方法，其特征在于用包被液配制的包被抗体的溶液中含有 5~50 $\mu\text{g/ml}$ 的包被抗体，每孔加入 100~360 μl ，4~10 $^{\circ}\text{C}$ 密封过夜。

6. 权利要求 2 的测定方法，其特征在于每孔加入封闭液 200~360 μl ，室温孵育 60 分钟~3 小时。

7. 权利要求 2 的测定方法，其特征在于每孔各加入 100~360 μl 待测品，室温孵育 60~120 分钟。

8. 权利要求 2 的测定方法，其特征在于每孔各加入浓度为 1~10 $\mu\text{g/ml}$ 的溶液抗体 100~360 μl ，室温孵育 60~120 分钟。

9. 权利要求 2 的测定方法，其特征在于每孔各加入 100~360 μl 以 1: 2000~1: 5000 倍稀释的酶标抗体，室温孵育 30~60 分钟。

10. 权利要求 2 的测定方法，其特征在于每孔各加入 100~360 μl 底物混合液，避光处静置 5~10 min。

神经生长因子蛋白的含量测定方法及其应用

技术领域

本发明涉及神经生长因子蛋白的含量测定方法，具体地说，涉及小鼠神经生长因子的双抗体夹心酶联免疫测定方法。

背景技术

神经生长因子（NGF）是神经系统最重要的生物活性分子之一，也是最早发现和最典型的神经营养因子，它影响外周和中枢神经系统某些神经元的存活和分化。通常 NGF 由其效应神经元支配的靶组织细胞合成和分泌，它与神经末梢上的相应受体结合后进入轴突，再经逆行轴浆转运至胞体。在此过程中引起一系列的生物效应，如诱导突起生长，促进某些蛋白和酶的合成等。

虽然对于神经生长因子的测定已经有一些研究成果，但其测定的准确度差。因此，长期以来一直需要提供一种简便准确的测定方法。本发明的发明人经过长期试验，在小鼠神经生长因子的成品中，添加了保护剂和稳定剂，采用双抗体夹心酶联免疫测定方法，测定了神经生长因子的含量。

发明内容

本发明要解决的问题是提供一种 NGF 的蛋白含量测定方法，该方法包括：

- （1）用抗体稀释液稀释包被抗体，并将所述抗体包被在聚苯乙烯微孔板上作为固相化抗体，其中所述的包被抗体用包被液配制使得其浓度为 1~50 $\mu\text{g/ml}$ ，每孔加 10~360 μl ，0~10 $^{\circ}\text{C}$ 密封过夜；
- （2）弃去孔内液体，用洗涤液洗 1~10 次，除尽孔内残液；
- （3）每孔加入封闭液 50~360 μl ，室温孵育 30 分钟~3 小时；
- （4）弃去孔内液体，用洗涤液洗 1~10 次，除尽孔内残液；
- （5）每孔各加入 10~360 μl 样品或系列稀释的标准品，室温孵育

30 分钟~5 小时;

(6) 弃去孔内液体, 用洗涤液洗 1~10 次, 除尽孔内残液;

(7) 每孔各加入 10~360 μ l 溶液抗体 (0.1~10 μ g/ml), 室温孵育 30 分钟~5 小时;

(8) 弃去孔内液体, 用洗涤液洗 1~10 次, 除尽孔内残液;

(9) 每孔各加入 10~360 μ l 酶标抗体 (1: 2000~1: 5000 稀释), 室温孵育 30 分钟~3 小时;

(10) 每孔各加入 10~360 μ l 底物混合液, 避光处静置 5~60 min;

(11) 弃去孔内液体, 用洗涤液洗 1~10 次, 除尽孔内残液;

(12) 每孔各加入 5~360 μ l 终止液, 3~60min 后利用酶联仪在 450nm 的波长下测定该标准品的吸收值 (OD₄₅₀ 值)。

在本发明的一个优选实施方案中, 该测定方法是双抗体夹心酶联免疫测定方法。

在本发明的一个优选实施方案中, 该测定方法是一种 mNGF 的双抗体夹心酶联免疫测定方法。

在本发明的一个优选实施方案中, 该测定方法中包被抗体是抗人神经生长因子单克隆抗体; 溶液抗体是抗小鼠神经生长因子多克隆抗体。

在本发明的一个优选实施方案中, 包被液浓度配制成含包被抗体 5~50 μ g/ml, 每孔加入量为 100~360 μ l。

在本发明的一个优选实施方案中, 洗涤液的用量为 200~300 μ l/孔, 每次洗涤分 3~5 次进行, 以除尽孔内残液。

在本发明的一个优选实施方案中, 封闭液的加入量为 200~360 μ l/孔, 室温孵育 60 分钟~3 小时。

在本发明的一个优选实施方案中, 样品或系列稀释的标准品的加入量为 100~360 μ l/孔, 室温孵育 60~120 分钟。

在本发明的一个优选实施方案中, 溶液抗体的浓度为 1~10 μ g/ml, 其加入量为 100~360 μ l/孔, 室温孵育 60~120 分钟。

在本发明的一个优选实施方案中, 酶标抗体以 1: 2000~1: 5000 倍稀释, 每孔各加入 100~360 μ l, 室温孵育 30~60 分钟。

在本发明的一个优选实施方案中, 每孔各加入 100~360 μ l 底物混

合液，避光处静置 5~10 min。

在本发明的一个优选实施方案中，每孔各加入 50~360 μ l 终止液，5~60min 后测定 OD₄₅₀。

该测定方法可用来定性或定量检测 NGF 的存在与否及其含量。

具体实施方式

下面通过具体实施方式描述本发明的方法，其用于说明本发明的内容，而非限制其范围。

本发明方法中所用试剂、材料及设备如下所述：

包被抗体：抗人神经生长因子单克隆抗体(anti hNGF monoclonal antibody)，进口；

溶液抗体：抗小鼠神经生长因子多克隆抗体(anti mNGF polyclonal antibody)，进口；

酶标抗体：辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L)，进口分装；

标准品 mNGF 应用国家药检所提供的标准品 mNGF 标定的工作标准，准确配制所需的各标准品浓度溶液；

包被液：PBS，pH7.4；

封闭液：1-3%BSA, 5% sucrose, 0.05%NaN₃ in PBS；

洗涤液：0.1~0.3%Tween20 in PBS，pH7.4；

抗体稀释液：0.1%BSA, 0.1~0.3% Tween20 in TBS, pH7.3(20mM Trizma base, 150mM NaCl)；

底物显色液：用前等体积混合底物显色液 A 液和 B 液；

终止液：1M H₂SO₄；

仪器与设备：

微孔板：可拆卸 96 孔酶联板，Costar 产品；

酶标仪、多道移液器等仪器设备使用前校准。

样品准备：样品为注射用冻干粉，测定前每支安瓿准确用注射用生理盐水 1ml 溶解，再用抗体稀释液根据需要稀释。

实施例 1

1. 先用抗体稀释液稀释包被抗体后，用包被液配制 5 μ g/ml 包被抗

体，并将其包被在聚苯乙烯微孔板上，作为固相化抗体，以 3 个孔做平行实验，每孔加 100 μ l，4 $^{\circ}$ C 密封过夜；

2. 弃去孔内液体，用洗涤液 200-300 μ l/孔洗 3-5 次，除尽孔内残液；
3. 每孔加入封闭液 200 μ l，室温孵育 60min；
4. 重复步骤 2，300 μ l/孔洗 5 次，除尽孔内残液；
5. 每孔各加入 100 μ l 浓度为 12.5ng/ml 的标准品，室温孵育 60~120min；
6. 重复步骤 4；
7. 每孔各加入 100 μ l 溶液抗体（1 μ g/ml），室温孵育 60~120min；
8. 重复步骤 4；
9. 每孔各加入 100 μ l 酶标抗体（1：2000~1：5000 稀释），室温孵育 30~60min；
10. 重复步骤 4；
11. 每孔各加入 100 μ l 底物混合液，避光处静置 5~10 min；
12. 每孔各加入 50 μ l 终止液，5min 后利用酶联仪在 450nm 的波长下测定该标准品的吸收值（OD₄₅₀ 值）。

实施例 2-5

重复实施例 1 的操作步骤进行实施例 2-5，只是标准品的浓度分别为 0 ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、100ng/ml。根据各个浓度下标准品所测得的数据计算其平均值，根据得到的平均值绘制标准曲线。

实施例 6-8

重复实施例 1 的操作步骤进行实施例 6-8，只是将其中的标准品分别替换为所测样品 1-3。利用得到的标准曲线，根据所测结果可以得出样品中神经生长因子的测定结果。

样品含量可以通过公式 $y(\text{样品浓度})=a(\text{截距})+b(\text{斜率})x(\text{OD}_{450} \text{ 值})$ 进行计算。实际样品浓度需要乘以样品稀释倍数获得。样品 1-3 中的含量测定结果见下表 1。

表 1 三批样品测定结果

编号	测定值 1	测定值 2	测定值 3	均值($\mu\text{g/ml}$)
样品 1	28.67 $\mu\text{g/ml}$	30.93 $\mu\text{g/ml}$	31.88 $\mu\text{g/ml}$	30.49
样品 2	31.80 $\mu\text{g/ml}$	27.66 $\mu\text{g/ml}$	29.04 $\mu\text{g/ml}$	29.50
样品 3	29.67 $\mu\text{g/ml}$	28.34 $\mu\text{g/ml}$	30.55 $\mu\text{g/ml}$	29.52

以上参考具体实施方式描述了本发明内容，其只用于说明本发明的内容，而非用于限制本发明的范围。本发明的范围应当以所附权利要求书为准。本领域的普通技术人员根据本发明的描述进行的多种修改和变动都将落入本发明的精神和范围内。

专利名称(译)	神经生长因子蛋白的含量测定方法及其应用		
公开(公告)号	CN1790024A	公开(公告)日	2006-06-21
申请号	CN200410101473.7	申请日	2004-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	浙江永宁制药厂		
申请(专利权)人(译)	浙江永宁制药厂		
当前申请(专利权)人(译)	浙江永宁制药厂		
[标]发明人	陆仙芸 林德君		
发明人	陆仙芸 林德君		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/52 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及神经生长因子的蛋白含量测定方法，具体地说，涉及小鼠神经生长因子的双抗体夹心酶联免疫测定方法。该测定方法可用于定性或定量检测NGF的存在与否及其含量。

表1 三批样品测定结果

编号	测定值1	测定值2	测定值3	均值(μg/ml)
样品1	28.67μg/ml	30.93μg/ml	31.88μg/ml	30.49
样品2	31.80μg/ml	27.66μg/ml	29.04μg/ml	29.50
样品3	29.67μg/ml	28.34μg/ml	30.55μg/ml	29.52