

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200310113502.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/535 (2006.01)  
G01N 33/577 (2006.01)  
G01N 33/68 (2006.01)  
G01N 33/72 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年5月20日

[11] 授权公告号 CN 100489526C

[22] 申请日 2004.1.16

[21] 申请号 200310113502.7

[73] 专利权人 中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所

地址 100850 北京市太平路27号

[72] 发明人 张成岗 陈婷方 王春丽 高艳  
孙建伟 韩洪彦 徐文琳 王航雁

[56] 参考文献

CN1079825A 1993.12.22

WO03040332A2 2003.5.15

WO03013507A1 2003.2.20

CN1340099A 2002.3.13

审查员 李冰

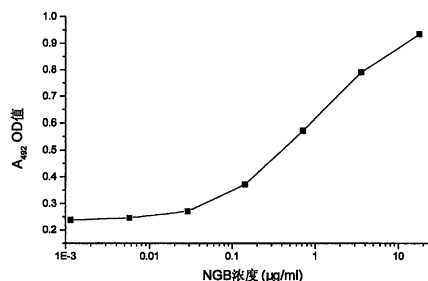
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

[54] 发明名称

一种人脑红蛋白检测及诊断试剂盒，其制备方法及其用途

[57] 摘要

本发明提供了一种新型人脑红蛋白检测及诊断试剂盒，其制备方法及其用途。该试剂盒主要由固相载体以及脑红蛋白的单克隆抗体、多克隆抗体和脑红蛋白标准品等组成；该试剂盒的制备方法包括抗原和抗体的制备、抗体的纯化、试剂盒的包装等步骤。本试剂盒具有较高的灵敏度，可用于检测样品中脑红蛋白的含量，并可为老年性痴呆、脑梗塞、创伤性脑损伤等涉及到神经元损伤和变性死亡等疾病中的早期诊断及治疗过程中的病程跟踪提供有效的检测手段。



1. 一种人脑红蛋白检测及诊断试剂盒，其特征在于该试剂盒主要由 96 孔酶标板 1 块，脑红蛋白标准品 1 瓶、脑红蛋白单克隆抗体 1 瓶，脑红蛋白多克隆抗体 1 瓶、阴性对照 1 瓶、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白 G 1 瓶、邻苯二胺 2 瓶、 20 倍浓缩洗涤液 1 瓶和终止液 2M 硫酸溶液 1 瓶组成。
2. 权利要求 1 所述的人脑红蛋白检测及诊断试剂盒，其特征在于所能够检测的脑红蛋白的浓度范围为：5.76ng/ml~18  $\mu$ g/ml。
3. 权利要求 1 所述的人脑红蛋白检测及诊断试剂盒，其特征在于其中所述的阴性对照液为正常人血清，浓洗涤液为磷酸-Tween-20。
4. 权利要求 1 所述的人脑红蛋白检测及诊断试剂盒在制备脑红蛋白检测试剂中的用途。

## 一种人脑红蛋白检测及诊断试剂盒，其制备方法及其用途

**技术领域** 本发明涉及一种免疫检测及诊断试剂，具体涉及一种新型人脑红蛋白酶联免疫检测及诊断试剂盒，还涉及其制备方法及其用途。

**背景技术** 脑红蛋白(Neuroglobin, NGB)是体内除了血红蛋白和肌红蛋白之外的第三类重要的携氧蛋白，在神经系统中特异表达，广泛分布于脑组织内。和肌红蛋白一样，脑红蛋白能可逆地结合氧，且与氧有很高的亲和力。肌红蛋白在正常人血清内含量极微，当心肌和骨骼肌损伤时，肌红蛋白可从受损细胞释放，快速入血，导致血清肌红蛋白升高。肌红蛋白已成为临床上一些重要疾病如心肌梗塞、肾功能衰竭等敏感而又特异的生化诊断指标。脑红蛋白和肌红蛋白在功能和性质上具有严格的相似性：脑红蛋白有151个氨基酸，分子量为17千道尔顿，而肌红蛋白则有154个氨基酸，分子量也为17千道尔顿。鉴于脑红蛋白与肌红蛋白在功能上具有严格的相似性，即肌红蛋白负责心肌和骨骼肌的氧供应，脑红蛋白则负责脑的氧供应，两者均能从损伤细胞中释放入血，因此，脑红蛋白在老年性痴呆、脑梗塞、创伤性脑损伤等涉及到神经元损伤和变性死亡等疾病的早期诊断中具有潜在的诊断价值，同时对上述疾病治疗过程中的病程跟踪也具有重要的参考价值。

**发明内容** 本发明提供了一种新型人脑红蛋白酶联免疫测定试剂盒。该试剂盒是由96孔酶标板一块，脑红蛋白标准品1瓶、脑红蛋白单克隆抗体1瓶，脑红

蛋白多克隆抗体 1 瓶、辣根过氧化物酶(HRP)-羊抗兔免疫球蛋白(IgG) 1 瓶、邻苯二胺(OPD) 2 瓶、20 倍的浓缩洗涤液 1 瓶终止液(2M 的硫酸溶液(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)) 1 瓶组成。其中 HRP-羊抗兔 IgG 为中山公司产品。本发明还公开了试剂盒的制备方法、使用方法及其用途。

**用途** 本试剂盒具有较高的灵敏度，可用于检测样品中脑红蛋白的含量，并可作为老年性痴呆、脑梗塞、创伤性脑损伤等涉及到神经元损伤和变性死亡等疾病中的早期诊断及治疗过程中的病程跟踪提供有效的检测手段。

**制备方法** 本试剂盒的使用需要以下自备试剂:

- 1) 包被稀释液(0.05mol/L 碳酸盐缓冲液, pH9.6): Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.5g + NaHCO<sub>3</sub> 2.9g 溶于双蒸水, 加双蒸水补充体积至 1000ml。
- 2) 磷酸盐缓冲液(PBS, 0.02M, pH7.4): NaCl 16.0g + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.593g + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 5.8g, 加双蒸水至 2000ml。
- 3) 样本稀释液: PBS 100 ml + 0.1g BSA + 50μl Tween 20。
- 4) 封闭液(5%脱脂乳-PBS 溶液): 50g 脱脂乳+PBS 至 1000 ml。
- 5) 底物缓冲液: A 液(0.1mol/L 柠檬酸溶液): 柠檬酸 19.2g, 加双蒸水至 1000ml; B 液(0.2mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 71.7g, 加双蒸水至 1000ml; 临用前取 A 液 24.3 ml、B 液 25.7 ml 混合。
- 6) 30%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 ml。

**本试剂盒具体的制备方法:**

- 1) 抗原的制备: 将构建有脑红蛋白基因编码区的原核表达载体 pGEX-4T-2 转化大肠杆菌 BL21, 通过异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-1-thio-D-galactopyranoside, IPTG) 诱导表达, 获得可溶性表

- 达产物，用谷胱甘肽 S-转移酶(GST)亲和层析柱纯化后作为抗原(图 1，图 2)。
- 2) 抗体的制备：将 1)中制备的抗原免疫 Balb/c 小鼠，通过传统的细胞融合方法制备抗 NGB 单克隆抗体，同时免疫家兔制备抗 NGB 多克隆抗体(图 3，图 4)。
  - 3) 抗体的纯化：将 2)中所得的抗体经离心、沉淀、脱盐、得粗提抗体，然后经 Protein G 柱亲和纯化，即得纯化抗体。
  - 4) 试剂盒的制备：将试剂盒 8 种成份，按试剂盒需要量分装在小瓶或尖底离心管中。
  - 5) 鉴定试剂盒的特异性、灵敏度、精密度、稳定性合格(图 7)。

#### 使用方法 本试剂盒的使用方法如下：

- 1) 抗体的包被：将包被液稀释的抗脑红蛋白的单克隆抗体(10 $\mu$ g/ml)加入 96 孔酶标板中，每孔 100 $\mu$ l，4 $^{\circ}$ C 过夜，洗涤液洗涤 1 次，每次 3 分钟。加入封闭液 200 $\mu$ l/孔，40 $^{\circ}$ C 封闭 50~60 分钟(或 4 $^{\circ}$ C 过夜)。封闭结束后用洗涤液洗板 3 次，每次 3 分钟。
- 2) 加入样品：将含有通过 0.1% BSA 和 0.05%吐温(Tween) 20 样品稀释液适当稀释的待测样品和标准 NGB 蛋白(5.76ng/ml、28.8ng/ml、144ng/ml、720ng/ml、3.6 $\mu$ g/ml、18 $\mu$ g/ml)分别加入酶标反应板(100 $\mu$ l/孔)，置于 40 $^{\circ}$ C 温箱孵育 1 小时。弃去孔中液体，洗涤液洗板 3 次，每次 3 分钟。
- 3) 加入兔抗脑红蛋白多克隆抗体：取含有 0.1% BSA 和 0.05%吐温 20 样品稀释液最适稀释的兔抗脑红蛋白多克隆抗体(1:500)，加入酶标板中(100 $\mu$ l/孔)，置于 40 $^{\circ}$ C 温箱孵育 30 分钟。弃去孔中液体，洗涤液洗板 3 次，每次 3 分钟。

- 4) 加入 HRP-羊抗兔 IgG: 取最适稀释 HRP-羊抗兔 IgG(1: 5000), 加入酶标板中 100 $\mu$ l/孔, 置于 40 $^{\circ}$ C 温箱孵育 40 分钟。弃去孔中液体, 洗涤液洗板 3 次, 每次 3 分钟。
- 5) 显色: 取底物液 A 液 24.3ml 和 B 液 25.7ml 混合, 加入邻苯二胺至浓度 4~10mg/ml, 最后加入 30% $H_2O_2$  溶液 25~50 $\mu$ l。取新鲜配制的底物缓冲液 100 $\mu$ l/孔加入反应板。室温避光反应 5~10 分钟。
- 6) 终止反应: 当阳性对照出现明显颜色变化或阴性对照略有显色时, 每孔加入终止液 50 $\mu$ l 终止反应。
- 7) 结果计算: 在 492nm 处测定光吸收值(A)。以标准蛋白浓度作为横坐标, 测得的标准蛋白孔  $A_{492nm}$  值为纵坐标, 绘制标准曲线。通过标准曲线查得待测样品的脑红蛋白含量, 再乘以稀释倍数, 即得待测样品中的实际含量。

#### 附图说明

图 1: 融合蛋白 GST-NGB 的表达结果。泳道 1: 转染空载体 pGEX-4T-2 后大肠杆菌 *E. coli*(DE3) 中表达的总蛋白; 泳道 2: 用 GST 亲和柱纯化转染空载体 pGEX-4T-2 后大肠杆菌 *E. coli*(DE3) 中表达的蛋白, 获得 GST 蛋白样品。泳道 3: 转染表达载体 pGEX-4T-2/NGB 后大肠杆菌 *E. coli*(DE3) 中表达的总蛋白; 泳道 4: 用 GST 亲和柱纯化获得的 GST-NGB 融合蛋白; 泳道 5: 蛋白质中分子量标记。

图 2: GST-NGB 经过凝血酶酶切后, 得到的 NGB 蛋白。泳道 1: 蛋白质中分子量标记; 泳道 2: GST-NGB 经过凝血酶酶切后, 得到的 NGB 样品。

图 3: 小鼠抗 NGB 单克隆抗体的质量鉴定。应用 Western blotting 技术对获得的单抗进行检测, 证明单克隆抗体具有很高的特异性, 各株抗体均能与 NGB 和 GST-NGB 结合, 而与 GST 及菌体蛋白无反应, 而且特异性地检测到 NGB 的真核表达产物(GFP-NGB)。

图 4: 本试剂盒中所制备的小鼠抗 NGB 单克隆抗体的亚型鉴定。经鉴定, 确认四株抗 NGB 单克隆抗体 3G8, 3H2, 2E7, 1E12 的重链均为 IgG1, 轻链为 $\kappa$ 链。

图 5: 兔抗 NGB 多克隆抗体的质量鉴定: 兔抗 NGB 多克隆抗体能够检测到真核细胞中表达的 NGB 蛋白。方法: 分别用表达载体 pcDNA3.1/V5/6xHis/NGB、pcDNA3.1/V5/6xHis/LacZ 和空载体转染 COS-7 细胞后, 收集转染 48h 后的细胞总蛋白, Western blotting 检测。泳道 1: 兔抗 NGB 多克隆抗体可检测到约 20kDa 的条带; 泳道 2: 阴性对照, 空载体转染 COS7 细胞用兔抗 NGB 多克隆抗体未能检测到任何条带; 泳道 3: 用抗 6xHis 单克隆抗体可检测到 NGB-6xHis 融合表达蛋白; 泳道 4: 阳性对照: 用抗 6xHis 单克隆抗体可检测到 LacZ-6xHis 融合表达蛋白。

图 6: 兔抗 NGB 多克隆抗体的质量鉴定。用本试剂盒中所制备的兔抗 NGB 多克隆抗体检测 NGB 在成年大鼠脑中的组织分布, 可见 NGB 免疫反应阳性细胞广泛分布于海马的各区(CA<sub>1</sub>、CA<sub>2</sub>、CA<sub>3</sub>、CA<sub>4</sub>)锥体细胞层和小脑蒲肯野细胞及其细胞突起中。

图 7: 本试剂盒的标准曲线。可检测 NGB 浓度的浓度范围在 5.76ng/ml~18 $\mu$ g/ml。

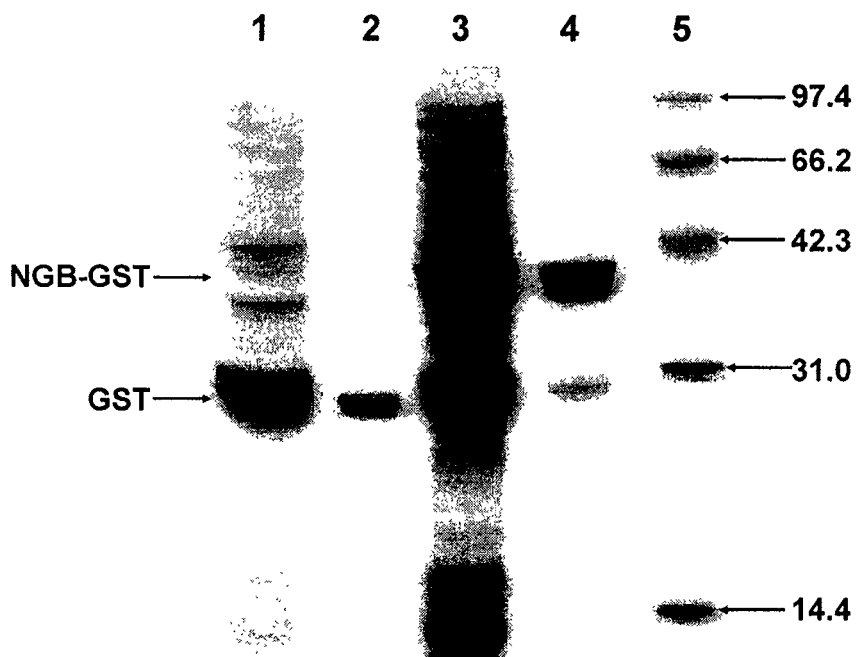


图1

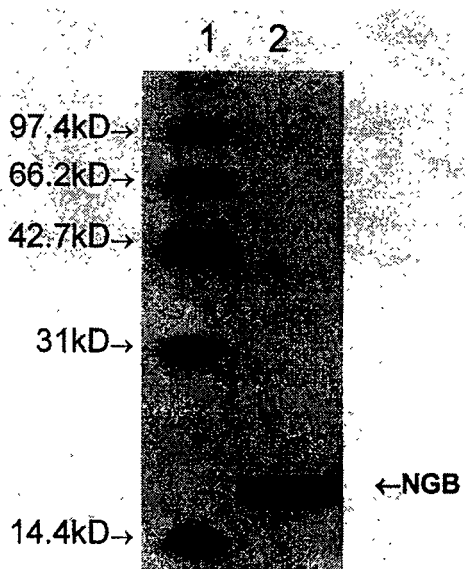


图2



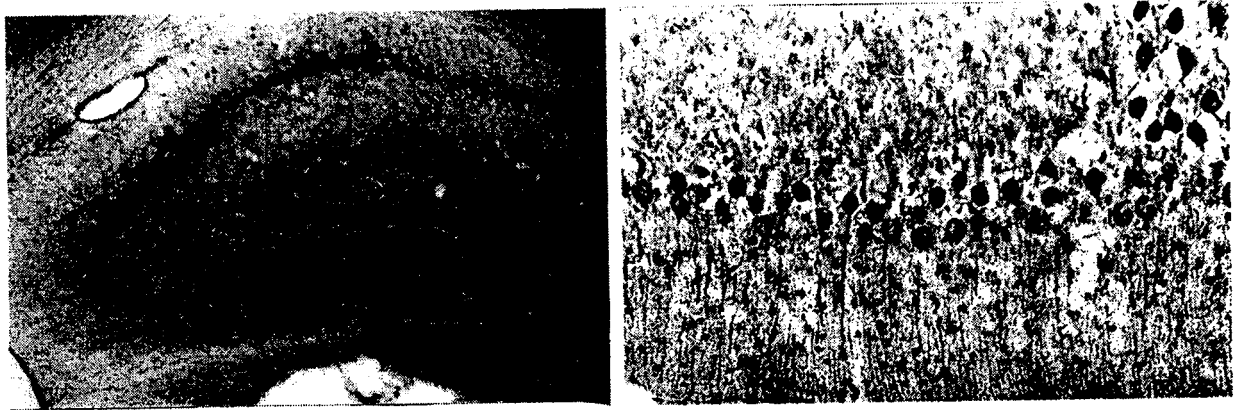


图6

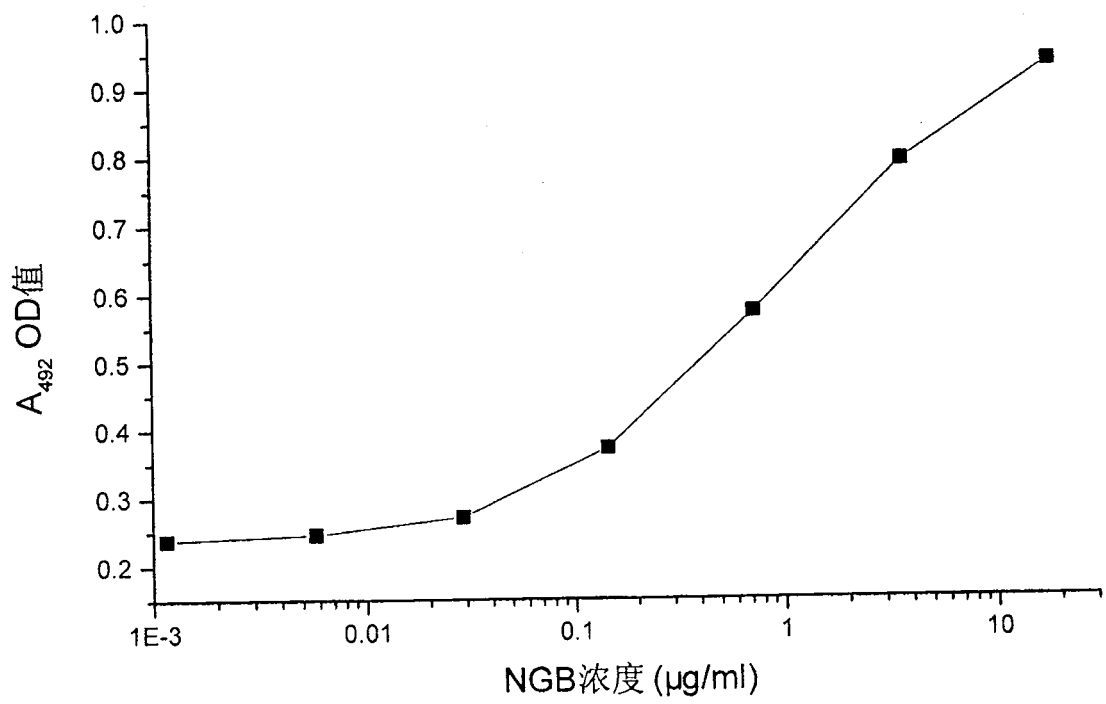


图7

专利名称(译)	一种人脑红蛋白检测及诊断试剂盒，其制备方法及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN100489526C</a>	公开(公告)日	2009-05-20
申请号	CN200310113502.7	申请日	2004-01-16
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院放射医学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院放射医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所		
[标]发明人	张成岗 陈婷方 王春丽 高艳 孙建伟 韩洪彦 徐文琳 王航雁		
发明人	张成岗 陈婷方 王春丽 高艳 孙建伟 韩洪彦 徐文琳 王航雁		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/577 G01N33/68 G01N33/72		
审查员(译)	李冰		
其他公开文献	CN1641351A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种新型人脑红蛋白检测及诊断试剂盒，其制备方法及应用。该试剂盒主要由固相载体以及脑红蛋白的单克隆抗体、多克隆抗体和脑红蛋白标准品等组成；该试剂盒的制备方法包括抗原和抗体的制备、抗体的纯化、试剂盒的包装等步骤。本试剂盒具有较高的灵敏度，可用于检测样品中脑红蛋白的含量，并可为老年性痴呆、脑梗塞、创伤性脑损伤等涉及到神经元损伤和变性死亡等疾病中的早期诊断及治疗过程中的病程跟踪提供有效的检测手段。

