

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910063674.5

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2010年1月27日

[11] 公开号 CN 101634656A

[22] 申请日 2009.8.21

[21] 申请号 200910063674.5

[71] 申请人 武汉三鹰生物技术有限公司

地址 430074 湖北省武汉市洪山区关山二路  
关东科技园7-4-402

[72] 发明人 彭进洪 兰 萍

权利要求书1页 说明书7页

[54] 发明名称

人 TDP - 43 的单抗包被酶标板的制法及  
ELISA 检测试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及一种新的人 TDP - 43 的单抗包被酶标板的制法及 ELISA 检测试剂盒，其关键技术之处主要在于，用基因工程方法制备特异性的鼠抗人单抗，并将此抗体纯化后包被的酶标板作为试剂盒的重要组成，然后与 TDP - 43 的多抗、辣根过氧化物酶标记的二抗、TDP - 43 标准品、TDP - 43 阳性对照、样品稀释液、洗涤液、显色液、终止液组装为人源 TDP - 43 的 ELISA 检测试剂盒；建立了敏感快捷的 ELISA 抗体捕获人血清或细胞、组织培养物中 TDP - 43 浓度的测定方法，具有高特异性，高稳定性。试剂盒主要供一般性实验室或神经病理学临床研究使用。

1、人 TDP-43 的单抗包被酶标板的制法，通过下列步骤制备而成：

- (1) 以 BC001487 DNA 为模板，扩增 TDP-43 基因片段，与载体 PET28a 连接，转化 BL21，表达大量 36KD TDP-43 蛋白片段；
- (2) 将 36KD TDP-43 蛋白免疫小白鼠，取其脾细胞与鼠骨髓瘤细胞融合，选择阳性杂交瘤细胞于鼠腹水中培养，纯化蛋白得到抗 TDP-43 的单抗；
- (3) 将所得单抗用 pH9.6 的碳酸盐缓冲溶液稀释后包被 96 孔板，100 $\mu$ l/孔，4 $^{\circ}$ C 16-24 小时，PBST 洗涤 3 次，每次 30 秒，然后除尽孔内液体；
- (4) 用含 8%小牛血清的 pH7.4 的 PBS 封闭，每孔 200 $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C，2 小时，PBST 洗涤 3 次，干燥后密封；该板即为抗 TDP-43 的单抗包被的酶标板，可用于 TDP-43 的特异性检测。

2、应用权利要求 1 所述的人 TDP-43 的单抗包被酶标板的 ELISA 检测试剂盒，其特征为：由权利要求 1 所述的抗 TDP-43 的单抗包被的酶标板、TDP-43 标准品、TDP-43 的阳性对照样品、抗 TDP-43 的多抗、样品稀释液、洗涤液、显色液、终止液构成，具体组分为：(1) 酶标板：由 TDP-43 的单抗包被；(2) 样品稀释液：含 8%小牛血清和 1%抗人 IgG 的 pH7.4 的 0.01mol/l PBS；(3) 洗涤液：pH7.4 PBST；(4) 酶标二抗：购自美国 R&D systems 的辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗兔 IgG；(5) TDP-43 标准品：全长 TDP-43 的 PBS 溶液，TDP-43 终浓度为 1mg/ml；(6) TDP-43 阳性对照样品：全长 TDP-43 的 PBS 溶液，TDP-43 终浓度为 5 $\mu$ g/ml；(7) 抗 TDP-43 的多抗：多抗的 PBS 溶液，多抗的终浓度为 1mg/ml；(8) 显色液：TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 系统；(9) 终止液：2mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液。

## 人 TDP-43 的单抗包被酶标板的制法及 ELISA 检测试剂盒

### 技术领域

本发明涉及一种新的生物制剂——抗人 TDP-43 的单抗，和一种用于人源 TDP-43 的 ELISA 检测试剂盒，适用于人组织、细胞培养物或血清中 TDP-43 的定量检测。

### 技术背景

TDP-43 (TAR DNA-binding protein) 即 TAR DNA 结合蛋白，广泛表达在人细胞核内，结合 DNA 和 RNA，调节胞内核酸的转录和拼接，也参与细胞核内小 RNA 的合成、凋亡和细胞分裂。于 1995 年被首次发现之后，TDP-43 的不正常表达在痴呆病人的血清和尸检中被大量检出。研究表明 TDP-43 在胞内表达量、定位情况、蛋白质长度、突变或过磷酸化、泛素化修饰均会造成脑组织部分功能的缺失或紊乱 (Neumann, M. et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis [J]. Science, 2006, 314, 130-133.)。

在体内，TDP-43 表达量的升高通过影响神经胶质的功能而导致的脑神经元毒性。阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease) 亦称老年性痴呆，占总痴呆症的 50-70%，阿尔茨海默病人脑部特征为一些关键位点大量神经元和神经突触的缺失，同时可见  $\beta$ -淀粉样肽斑块和神经纤维损伤，而 TDP-43 的错误折叠参与了阿尔茨海默病病理发生。

额颞痴呆症 (Frontotemporal dementia) 发病年龄小于 60 岁，病例少于阿尔茨海默病，同样不可被治愈。额颞痴呆症表现为肌肉和骨骼的恶性病变，含缬酪肽蛋白 (valosin-containing protein) 的病变可导致额颞痴呆，但在 FTDU-17 型额颞痴呆症病人的尸检中发现，是 TDP-43 而不是含缬酪肽蛋白的泛素化包含体在患者脑部异常堆积，因此，TDP-43 被认为是 FTDU-17 型额颞痴呆症的一个标识分子。

额颞叶变性 (frontotemporal lobar degeneration) 有 2 条蛋白质病理途径，一条为 tau 途径，另一条为 TDP-43 途径，后者被认为 TDP-43 从细胞核中转移，在神经元胞质中渐进累积所致。

运动神经元疾病 (motor-neuron disease) 也称为肌萎缩性脊髓侧索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis) 或葛雷克氏症 (Lou Gehrig's disease)，其症状表现为运动神经元退化所引起的肌肉渐进性衰弱和痉挛状态。TDP-43 的过磷酸化、泛素化或者羧基端某个氨基酸的突变可导致运动神经元疾病。绝大多数运动神经元疾病为 TDP-43 异常所引起，由过氧化物歧化酶突变所致的病例只占到 2%。因此，TDP-43 被认为是运动神经元疾病的一个主要的标志蛋白。

佩里综合症 (Perry syndrome) 表现为体重减轻、情绪低落和肺换气不足，它的病理学特征为 TDP-43 免疫染色阳性，但与在额颞痴呆症和运动神经元疾病中 TDP-43 影响中枢神经系统神经元不同的是，TDP-43 在佩里综合症影响了锥体外系统的皮层区域和运动神经元。

此外，亦有研究发现错误折叠的 TDP-43 参与了在帕金森病 (Parkinson's disease)、朊蛋白病 (prion diseases) 等神经性病理过程。

鉴于 TDP-43 为神经病理学的一个标记分子(Slegers, K. and Broeckhoven, C.V. Rogue gene in the family [J].Nature, 2009, 458:415-417.), 该蛋白质异常表达的及时发现将有利于相关病症的早发现早治疗, 减轻病人自身和家庭的负担, 从而提高人类的生活质量。多数痴呆症平均发病年龄早于 50 岁, 60 岁以上人口中老年痴呆症患病比例约为 5%, 而 80 岁以上患病比例约为 15%, 这意味加强 TDP-43 的检测具有巨大的现实需求和实践意义 (Selkoe, D. J. Alzheimer's disease is a synaptic failure [J]. Science, 2002, 298, 789-791.)。

目前, 国际上几大 ELISA 试剂盒生产商只是单一地生产 TDP-43 蛋白或抗体, 而尚未有生产整套 TDP-43 ELISA 试剂盒的报道, 对 TDP-43 的研究通常使用 TDP-43 过表达或错义突变的模式物, 如神经细胞、鸡胚或小鼠, 而缺乏 TDP-43 在人的血液、组织或细胞中定量的研究。同时, 国内厂家推出的少数几个产品处于初创阶段, 甚至连个阳性对照和内参都无法提供, 测量所得结果自然令人生疑。问题的原因一方面可能是厂家质量意识淡漠, 另一方面, 其捕获抗体和检测抗体的纯度和活性在技术上可能也难以达到试剂盒的相应要求。

## 发明内容

本发明的目的: 提供一种新的用于人血清、组织或细胞中人源 TDP-43 定量检测的 ELISA 试剂盒。

本发明技术方案如下:

### 1、抗人 TDP-43 的特异性单抗包被反应板的制备, 通过以下步骤:

#### (1) 36KD TDP-43 蛋白片段的获得:

- ① 36KD TDP-43 蛋白片段的原核表达: 以 BC001487 DNA(购自美国典型培养物保藏中心, ATCC)为模板, 用一对特异性的正反引物, PCR 扩增 TDP-43 DNA 片段 (88nt-870nt), 将所得片段克隆于载体 pET28a (购自德国 Merck 公司), 转化 BL21 (DE3) (购自 Merck) 感受态大肠杆菌, 根据卡那霉素抗性筛选阳性克隆。提取阳性克隆的质粒 DNA 进行鉴定, 得到与目的片段分子量相一致的片段, 初步判定为阳性。以 PCR 阳性克隆提取质粒 DNA, 进行测序, 结果表明 TDP-43 cDNA 片段正确克隆至 pET28a, 为一个具有 783bp 的完整开放式阅读框, 与 GenBank 中人源 TDP-43 基因 100%同源, 推算其表达的蛋白质分子量为 36KD, PI 为 5.0。
- ② 36KD TDP-43 蛋白片段的鉴定: 转化了重组质粒的大肠杆菌 BL21 经诱导后将菌体收集, 超声波裂解, 菌体蛋白经 SDS-PAGE 蛋白电泳及考马斯染色显示, 在 36KD 附近新增一条带, 经 Western blotting 鉴定, 能与 TDP-43 的抗体发生强阳性反应, 说明该 36KD 的 TDP-43 蛋白具有较强的免疫原性。
- ③ 36KD 的 TDP-43 蛋白片段的制备与纯化: 经大量培养、诱导、表达, 使用 Ni<sup>2+</sup>亲和层析柱 (购自 Pharmacia) 纯化带有 6×His 标记的 TDP-43 蛋白, 得到大量 36KD TDP-43 蛋白片段。

#### (2) 制备抗 TDP-43 的单抗:

- ① TDP-43 蛋白的动物免疫: 将 36KD 的 TDP-43 蛋白片段与福氏佐剂混合并经充分乳

化后，皮下注射，免疫鼠龄在 8~12 周的 BALB/c 健康小鼠（购自湖北省实验动物研究中心）3 至 4 只，每次免疫间隔为 2 周，直至血清效价高于 40000:1。

- ② 杂交瘤细胞的制备：在末次免疫后 4 天，分离鼠脾细胞，在 PEG 存在条件下选择与对数生长期的 Sp2/0 骨髓瘤细胞株（购自中国典型培养物保藏中心，CCTCC）以 4:1 的比例融合，饲养细胞来自小鼠腹腔细胞。融合后的细胞以含 HAT 的培养基筛选，经有限稀释后选出高抗体分泌孔，将孔内细胞克隆，进行抗原特异的 ELISA 测定，挑选高分泌性细胞株扩大培养或冻存。
- ③ 单抗制备：将分泌特异性单抗的杂交瘤细胞株进行小鼠腹腔接种，待产生明显腹水后收集腹水，用葡萄球菌 A 蛋白交联的亲和层析柱（购自 Pharmacia 公司）纯化单抗。抗体存于含 55%甘油、0.1%BHA 和 0.01%硫柳汞的 0.01mol/l、pH7.4 的 PBS 之中。
- (3) 以所得单抗包被反应板：单抗用 pH9.6 的碳酸盐缓冲溶液稀释成适当浓度，包被 96 孔板，每孔 100 $\mu$ l，置于 4 $^{\circ}$ C 湿盒 16-24 小时，PBST 洗涤 3 次，每次 30 秒，然后拍干，除尽孔内液体。
- (4) 封闭：用含 8%小牛血清的 pH7.4 的 PBS 封闭，每孔 200 $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C，2 小时孵育后，PBST 洗涤 3 次，干燥后密封；该板即为抗 TDP-43 的单抗包被的酶标反应板，可用于 TDP-43 的定量检测。

## 2、TDP-43 标准品（全长的 TDP-43 蛋白溶液）的制备：

- (1) 全长的 TDP-43 蛋白的原核表达：以 BC095435 DNA(购自 ATCC)为模板，用一对特异性的正反引物，PCR 扩增 TDP-43（87nt-1331nt）目的基因，将所得基因克隆于载体 pET28a，转化 BL21（DE3）感受态大肠杆菌，根据卡那霉素抗性筛选阳性克隆。提取阳性克隆的质粒 DNA 进行鉴定，得到与目的片段分子量相一致的片段，初步判定为阳性。以 PCR 阳性克隆提取质粒 DNA，进行测序，结果表明全长的 TDP-43 蛋白质的 cDNA 正确克隆至 pET28a，为一个具有 1245bp 的完整开放式阅读框，与 GenBank 中 TDP-43 基因 100%同源，推算其分子量为 56KD，PI 为 6.5。
- (2) 全长的 TDP-43 蛋白的鉴定：转化了重组质粒的大肠杆菌 BL21 经诱导后将菌体收集，超声波裂解，菌体蛋白经 SDS-PAGE 蛋白电泳及考马斯染色显示，在 56KD 附近新增一条带，经 Western blotting 鉴定，能与 TDP-43 的抗体发生强阳性反应，说明全长的 TDP-43 蛋白具有较强的免疫原性。
- (3) 全长的 TDP-43 蛋白的制备与纯化：经大量培养、诱导、表达，使用 Ni<sup>2+</sup>亲和层析柱纯化，得到大量全长的 TDP-43 蛋白。
- (4) TDP-43 标准品制备：将全长的 TDP-43 蛋白保存于含 55%甘油、0.1%BHA 和 0.01%硫柳汞的 0.01mol/l、pH7.4 的 PBS 之中，并使 TDP-43 蛋白的终浓度为 1mg/ml

3、TDP-43 阳性对照样品的制备：将全长的 TDP-43 蛋白溶于含 50%甘油、10%人血清、0.5%BSA、0.1%BHA 和 0.01%硫柳汞的 0.01mol/l、pH7.4 的 PBS 之中，并使 TDP-43 蛋白的终浓度为 5  $\mu$ g/ml。

#### 4、TDP-43 的多抗的制备:

- (1) 动物免疫: 取纯化好的全长的 TDP-43 蛋白与福氏佐剂混合并经充分乳化后, 脊柱两侧、对称多点皮下注射, 免疫 3-4 月龄、体重在 1.7Kg 以上的健康日本大耳白兔 (购自湖北省实验动物研究中心) 3 至 4 只, 每次免疫间隔为 2 周, 免疫 1 月后再次免疫后第 8 天耳静脉取血测血清效价, 直至血清效价高于 40000:1。
- (2) 血清获取: 兔中耳动脉取血, 每次 40ml, 静置 30 分钟后离心, 3000rpm、5 分钟, 上清即为血清。
- (3) 多抗的纯化: 用全长的 TDP-43 蛋白交联的亲层析柱 (购自 Pharmacia) 纯化, 得到 TDP-43 的多抗, 保存于含 55%甘油、0.1%BHA 和 0.01%硫柳汞的 0.01mol/l、pH7.4 的 PBS 之中, 多抗的终浓度为 1mg/ml。

5、酶标二抗: 购自美国 R&D systems, 为辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗兔 IgG。

#### 6、本试剂盒对 TDP-43 的 ELISA 检测步骤包括:

- (1) 待测样品、标准样、阳性对照依次加入微孔中, 进行孵育, TDP-43 将与固相载体表面的捕获抗体——预先包被在孔内的抗体相结合。
- (2) 经过洗涤, 将特异性的抗 TDP-43 的多抗加入孔内, 在第二次孵育中, 多抗扮演检测抗体, 并与第一次孵育中被捕获的 TDP-43 结合。
- (3) 洗去多余的多抗, 加入酶标二抗, 在第三次孵育中, 酶标二抗与上一步中的多抗——检测抗体相结合, 形成一个 4 组分的夹心形状的结合物。
- (4) 洗去未结合的酶标二抗, 加入酶的底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (tetramethyl benzidine, TMB), 孔内液体在过氧化物酶的催化下转化成蓝色, 加入终止液, 转化成黄色。颜色的深浅和样品中 TDP-43 的含量呈正相关。
- (5) 用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (O.D.值), 计算样品中 TDP-43 浓度。

这种新的 TDP-43 ELISA 检测试剂盒, 其特征在于: 所述试剂盒由上述特异性的 TDP-43 的单抗包被的酶标板、TDP-43 蛋白标准品、TDP-43 的阳性对照样品、TDP-43 的多抗、辣根过氧化物酶标记的二抗构成, 具体组分为: (1) 酶标板: 由 TDP-43 的单抗包被; (2) 样品稀释液: 含 8%小牛血清和 1%抗人 IgG 的 pH7.4 的 0.01mol/l PBS; (3) 洗涤液; (4) TDP-43 蛋白标准品; (5) TDP-43 的阳性对照样品; (6) TDP-43 的多抗; (7) 辣根过氧化物酶标记的二抗; (8) 显色液: TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 系统; (9) 终止液: 2mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液。

TDP-43 结合 DNA 和 RNA, 调节胞内核酸的转录和拼接, 也参与细胞核内小 RNA 的合成、凋亡和细胞分裂, 其识别核酸的 2 个功能区位于蛋白质的第 105 个至 257 个之间, 因此, 我们选择性克隆了其 N 端的 262 个氨基酸片段, 该片段包括了其抗原性、核酸识别的功能区。再采用原核表达的该蛋白制备特异性的单抗, 进而采取夹心 ELISA, 简洁有效地检出人血清、组织和细胞培养物中 TDP-43 的浓度。本试剂盒所有指标符合美国 R&D systems ELISA 试剂盒各项指标的严格要求。目前, 国外几大 ELISA 试剂盒生产商尚未有 TDP-43 的 ELISA 试剂盒的报道, 而国内厂家的产品处于初创阶段, 基本没有 TDP-43 的阳性内参, 所得到的测量

结论值得商榷。本试剂盒采用 20 个阴性样品的平均值加上 2 倍标准方差作为最低检出线，为 0.1ng/ml，国内其它公司的 TDP-43 ELISA 检测试剂盒的最低检出线通常高于 0.5mg/ml，本发明提高了检出精度。

本发明选取包含了全部的 2 个核酸识别功能区的 TDP-43 片段，并将其作为抗原免疫小鼠得到特异性的高纯度单抗。以此单抗作为捕获 TDP-43 的抗体，保证了检测结果的特异性，最大程度避免了假阳性。随后以特异性多抗作为检测抗体，进一步排除了假阳性；加入酶标二抗，形成一个 4 组分的夹心形状的结合物，最后加入底物显色液，将以上得到的正确信号有效放大，对比同步平行进行的标准品和内参实验，进一步排除实验中的试剂或操作误差，最终得到可信赖的结论。

本发明与现有技术相比具有以下优点和效果：

- 1、应用范围广泛：适用于人血清、组织和细胞培养物；
- 2、检测速度快：仅约 3 小时；
- 3、使用便捷：不需要复杂仪器；
- 4、步骤简单；
- 5、所得结果准确可靠：通过多步特异性的抗原、抗体的亲和反应，层层有效地降低了非特异性反应；而且除提供标准品外，还提供阳性对照，确保所得数据排除了众多试剂、温度等因子的干扰。

## 具体实施方式

### 1、试剂：

- (1) 包被液(0.02mol/l, pH9.6 的碳酸钠——碳酸氢钠缓冲液):  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.6g,  $\text{NaHCO}_3$  1.16g,  $\text{Na}_2\text{N}_3$  0.2g, 加双蒸水至 1000ml, 调 pH 至 9.6。
- (2) 标本稀释液 (含 8%小牛血清和 1%抗人 IgG 的 pH7.4 的 0.01mol/l PBS):  $\text{NaCl}$  8.0g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.3g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g,  $\text{KCl}$  0.2g, 硫柳汞 0.1g, 加双蒸水至 1000ml, 调 pH 至 7.4。
- (3) 封闭液 (8%小牛血清/PBS 溶液): 小牛血清 80ml, 0.01mol/l pH7.4 PBS 920ml。
- (4) 洗涤液 (pH7.4 PBST):  $\text{NaCl}$  8.0g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.3g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g, Tween 20 0.5g, 硫柳汞 0.1g, 加双蒸水至 1000ml, 调 pH 至 7.4。
- (5) 酶标二抗 (HRP 标记的羊抗兔多抗): 购自美国 R&D systems, 使用时用标本稀释液作 1:10000 稀释。
- (6) TDP-43 蛋白标准品: 全长 415 个氨基酸的 TDP-43 蛋白的 0.01mol/l PBS 溶液, pH7.4, 含 55%甘油、0.1%BHA 和 0.01%硫柳汞, TDP-43 终浓度为 1mg/ml, 使用时用标本稀释液稀释至 128、32、8、2、0.5、0ng/ml 六个梯度。
- (7) TDP-43 的阳性对照样品: 全长的 TDP-43 蛋白的 0.01mol/l、pH7.4 的 PBS 溶液, 含 50%甘油、10%人血清、0.5%BSA、0.1%BHA 和 0.01%硫柳汞, TDP-43 的终浓度为 5  $\mu$ g/ml, 使用时用标本稀释液作 1:100 稀释。

- (8) 抗 TDP-43 的多抗: 多抗的 PBS 溶液, 含 55%甘油、0.1%BHA 和 0.01%硫柳汞的 0.01mol/l、pH7.4, 多抗的终浓度为 1mg/ml, 使用时用标本稀释液作 1:10000 稀释。
- (9) 底物显色液 (TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 系统):
- ① 底物液 A (3',3',5,5'-四甲基联苯胺 tetramethyl benzidine, TMB): TMB 200 毫克, 无水乙醇 100ml, 加双蒸水至 990ml;
  - ② 底物液 B (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 尿素): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 36.8g, 柠檬酸 9.3g, 1%过氧化氢尿素 4.8ml, 加双蒸水至 1000ml, 调 pH 至 5.2。
  - ③ 加入酶标孔前 10 分钟将底物液 A 和底物液 B 两者 1:1 混合, 作为底物显色液。
- (10) 终止液 (2mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液): 烧杯内预先加入 600ml 双蒸水, 将浓硫酸 100ml 缓慢滴加, 不断搅拌, 冷却至室温后定容至 900ml。

## 2、主要仪器:

- (1) 酶标仪: BIO-RAD Model 680。
- (2) ELISA 反应板: 美国 Corning Incorporated costar R 96 Well EIA/RIA plate。
- (3) 水浴锅: 购自美国 Napco 公司, Model 203。

## 3、方法:

### (1) 酶标二抗最适滴度的选择

- ① 将 100ng/ml 兔 IgG 包被反应板, 洗涤;
- ② 将酶标二抗用标本稀释液作一系列稀释, 加入孔内, 37℃, 孵育 40 分钟后, PBST 洗涤 3 次;
- ③ 加入底物显色, 20 分钟后加入终止液;
- ④ 读取吸光值, 取吸光值为 1.0 时的酶标二抗稀释度——1:10000 作为酶标二抗的最佳稀释度。

### (2) 棋盘法选择单抗的最佳包被滴度

- ① 用包被液将单抗作一系列稀释后, 4℃包被反应板 16-24 小时, PBST 洗涤 3 次, 除尽孔内液体;
- ② 加入标准样和 TDP-43 阳性对照、阴性参考血清溶液, 孵育, 洗涤;
- ③ 加入多抗溶液, 孵育, 洗涤;
- ④ 加入酶标二抗, 孵育, 洗涤;
- ⑤ 加入底物显色, 20 分钟后加入终止液;
- ⑥ 读取吸光值, 选取 TDP-43 阳性对照样吸光值为 0.8 至 1.0, 阴性对照的吸光值小于 0.1 的单抗包被稀释度——1:10000 作为最佳稀释度。

### (3) 单抗包被反应板的制备方法:

- ① 以碳酸盐缓冲液稀释单抗, 包被 96 孔板, 每孔 100μl, 置于 4℃湿盒 16-24 小时, PBST 洗涤 3 次, 每次 30 秒, 然后拍干, 除尽孔内液体;
- ② 用含 8%小牛血清的 pH7.4 的 PBS 封闭, 每孔 200μl, 37℃, 2 小时, PBST 洗涤 3 次, 干燥后密封; 该板即为抗 TDP-43 的单抗包被的酶标板, 可用于 TDP-43 的特异性检

测。

(4) 试剂盒的构成:

所述试剂盒由特异性单抗包被反应板制得的酶标板、标本稀释液、洗涤液、酶标二抗、TDP-43 标准品、TDP-43 阳性对照样品、多抗、底物、终止液组成, 具体组分为:

- ① 酶标板: TDP-43 的单抗包被的酶标板;
- ② 标本稀释液: 含 8%小牛血清和 1%抗人 IgG 的 pH7.4 的 0.01mol/l PBS;
- ③ 洗涤液: pH7.4 PBST;
- ④ 酶标二抗: HRP 标记的羊抗兔 IgG;
- ⑤ TDP-43 标准品: 全长 TDP-43 蛋白的 PBS 溶液, TDP-43 终浓度为 1mg/ml;
- ⑥ TDP-43 阳性对照样品: 全长 TDP-43 蛋白的 PBS 溶液, TDP-43 终浓度为 5 $\mu$ g/ml;
- ⑦ 多抗: 多抗的 PBS 溶液, 抗体终浓度为 1mg/ml;
- ⑧ 底物显色液: TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 系统;
- ⑨ 终止液: 2mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液。

(5) 利用上述试剂盒检测组织或细胞培养物、血清中 TDP-43 浓度的方法:

- ① 将待测样品、标准品、阳性对照样品进行处理: 用标本稀释液将血清样品进行 1:10、细胞或组织裂解液 1:5、阳性对照 1:100 稀释; 标准品用标本稀释液稀释成 128、32、8、2、0.5、0ng/ml 六个梯度;
- ② 将待测样品、标准样、阳性对照依次加入酶标孔中, 每孔 100 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, PBST 洗涤 3 次, 每次洗涤均拍干孔内液体;
- ③ 将抗 TDP-43 的多抗加入酶标孔内, 每孔 100 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, PBST 洗涤 3 次;
- ④ 加入酶标二抗, 每孔 100 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 40 分钟, PBST 洗涤 3 次, 每次洗涤均拍干孔内液体;
- ⑤ 加入酶的底物, 每孔 100 $\mu$ l, 室温孵育 20 分钟后加入终止液, 每孔 50 $\mu$ l;
- ⑥ 用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度, 制作不同浓度标准品的吸光值为 Y 轴、以其浓度的对数为 X 轴制得标准曲线。
- ⑦ 计算结果: 如果阳性对照样品的测定值和标示值 (5  $\mu$ g/ml) 相比较, 其变异系数小于 15%, 说明测定过程可靠, 可依据标准曲线计算所测样品中 TDP-43 浓度。

专利名称(译)	人TDP - 43的单抗包被酶标板的制法及ELISA检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101634656A</a>	公开(公告)日	2010-01-27
申请号	CN200910063674.5	申请日	2009-08-21
[标]申请(专利权)人(译)	武汉三鹰生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉三鹰生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉三鹰生物技术有限公司		
[标]发明人	彭进洪 兰萍		
发明人	彭进洪 兰萍		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/535		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种新的人TDP - 43的单抗包被酶标板的制法及ELISA检测试剂盒，其关键技术之处主要在于，用基因工程方法制备特异性的鼠抗人单抗，并将此抗体纯化后包被的酶标板作为试剂盒的重要组成，然后与TDP - 43的多抗、辣根过氧化物酶标记的二抗、TDP - 43标准品、TDP - 43阳性对照、样品稀释液、洗涤液、显色液、终止液组装为人源TDP - 43的ELISA检测试剂盒；建立了敏感快捷的ELISA抗体捕获人血清或细胞、组织培养物中TDP - 43浓度的测定方法，具有高特异性，高稳定性。试剂盒主要供一般性实验室或神经病理学临床研究使用。