



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112415210 A

(43)申请公布日 2021.02.26

(21)申请号 201910776116.7

(22)申请日 2019.08.22

(71)申请人 武汉戴安生物技术有限公司

地址 430000 湖北省武汉市东湖新技术开
发区高新大道666号生物产业(九峰)
创新基地B7、B8栋

(72)发明人 习月 曾凡明 杨毅 易秋分
陈娟

(51)Int.Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

鱼生长激素双抗体夹心酶联免疫吸附测定
试剂

(57)摘要

本发明公开了鱼生长激素双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂,其含有:酶标板、GH标准品、包被有兔多抗的多孔板、检测抗体单克隆抗体1B5、HRP标记的山羊抗小鼠抗体和显色底物3',3',5和5'-四甲基联苯胺(TMB),所述酶标板包括固相载体和包被层,所述固相载体上设置有多个微孔,所述包被层附着在所述固相载体的微孔表面。本发明中,提供的鱼生长激素双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂,无放射污染、操作简便,成本低,稳定性好,可以满足普通实验室的要求。

1. 鱼生长激素双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂,其特征在於,其含有:
酶标板、GH标准品、包被有兔多抗的多孔板、检测抗体单克隆抗体1B5、HRP标记的山羊抗小鼠抗体和显色底物3',3',5和5'-四甲基联苯胺(TMB)。
2. 根据权利要求1所述的鱼生长激素双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂,其特征在於,所述酶标板包含固相载体和包被层,所述固相载体上设置有多个微孔,所述包被层附着在所述固相载体的微孔表面。
3. 根据权利要求1所述的鱼生长激素双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂,其特征在於,所述GH标准品为GH重组蛋白。
4. 根据权利要求2所述的鱼生长激素双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂,其特征在於,所述包被层含有针对鱼生长激素的多抗。
5. 根据权利要求2所述的鱼生长激素双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂,其特征在於,所述固相载体是聚苯乙烯试剂板。
6. 鱼生长激素双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂的生产方法,包括以下步骤:
 - a. 制备GH标准品;
 - b. 制备包被抗体;
 - c. 制备检测抗体。
7. 根据权利要求6所述的鱼生长激素双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂的生产方法,其特征在於,所述的b步骤分为蛋白表达、动物免疫和抗血清纯化三个步骤。
8. 根据权利要求6所述的鱼生长激素双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂的生产方法,其特征在於,所述的c步骤蛋白表达、动物免疫、抗血清纯化、细胞融合及亚克隆和腹水制备及抗体纯化六个步骤。

鱼生长激素双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及鱼生长激素双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂。

背景技术

[0002] 鱼类生长激素对鱼体的生长、发育起着重要的调节作用,鱼类生长激素是由脑垂体分泌,通过激活靶细胞膜上的受体来实现其生物学效应,摘除垂体的鱼生长发育与体内蛋白质的合成随即停止,当注射纯化的生长激素后,去除垂体的鱼又恢复生长,外源生长激素的接纳对鱼体生长表现出补偿效应。

[0003] 在分子量和氨基酸组成上,鱼类生长激素与其他高等脊椎动物生长激素有很高的同源性,分子质量在2.2ku左右,由173~190个氨基酸残基组成。亮氨酸、谷氨酸和天冬氨酸的含量较高,色氨酸和蛋氨酸的含量较低,其他氨基酸含量大致相等。鱼类生长激素蛋白的一级结构中含4个或5个半胱氨酸,分子内形成两个二硫键,构成特征性的一个大环和一个小环。在空间构型中, α -螺旋占50%,折叠成4个反向平行的螺旋段,即A,B,C,D段,在每一区段之间至少有一个脯氨酸存在。序列比较发现,在生长激素蛋白的羧基端螺旋D区,氨基酸的保守性比其他位置更强,这一区域的疏水氨基酸埋在蛋白质内部,作为受体结合位点,同时在维持蛋白质四级结构中起重要作用。

[0004] 在硬骨鱼中,生长激素的促生长作用主要是作为新陈代谢的调控子元件,促进脂肪更多地分解作为能源,使吸收的氨基酸更多地用于生长;提高饵料中蛋白质的转化效率,促进蛋白质的合成;对糖类代谢的影响表现在可促进肝糖原的消耗,增强对碳水化合物的利用能力。生长激素在鱼体内的多层次上的调节功能,有效地促进了鱼体的生长、发育。鱼血液中生长激素含量的变化在10~100ng/mL。注射外源生长激素不仅能加快受体鱼的生长,而且提高了对咸水环境的适应性,其机制是提高了 Na^+-K^+ ATP酶的活性并增加了氯化物细胞的数目,抑制鱼类从淡水到海水迁移时引起的血浆渗透性和离子浓度的提高。鱼类生长激素和肝膜受体结合,促进肝脏中胰岛素样生长因子-1(IGF-1)mRNA的表达,增加血液中IGF-1的含量,IGF-1直接促进细胞的分裂,血液中IGF-1的含量同时对垂体GH的分泌有反馈调节的作用。

[0005] 鱼类GH放免测定方法的原理与人的相同,主要采用具有放射性的同位素 ^{125}I 标记GH纯品,与样品中的GH共同竞争特异性的一抗,加入相应的二抗,通过层析、离心等方法将结合抗体的标记抗原与未标记抗原分离,测定结合抗体的标记抗原的放射性比活,据标准曲线可算出样品中GH的含量。这种系统由于使用了放射性碘作为标记物,具有很高的灵敏度,同时采用特异的一抗与抗原结合,具有很好的特异性,但正因为使用了放射性标记物,使得此系统存在明显的缺点:高辐射危害人体健康,污染环境,高辐射对标记蛋白同样存在损害以及放射性碘的半衰期短(60天),使得标记物稳定性不够,需定期标记;同时 ^{125}I 放出的 γ 射线能量很低,需灵敏的 γ 射线检测仪才能测出,这就使得GH的放免测定技术难以在一般实验室应用,限制了放免分析方法的普及。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于:为了解决GH的放免测定技术难以在一般实验室应用,限制了放免分析方法的普及的问题,而提出的鱼生长激素双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂。

[0007] 为了实现上述目的,本发明采用了如下技术方案:

[0008] 鱼生长激素双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂,其含有:

[0009] 酶标板、GH标准品、包被有兔多抗的多孔板、检测抗体单克隆抗体1B5、HRP标记的山羊抗小鼠抗体和显色底物3',3',5和5'-四甲基联苯胺(TMB)。

[0010] 作为上述技术方案的进一步描述:

[0011] 所述酶标板包括固相载体和包被层,所述固相载体上设置有多个微孔,所述包被层附着在所述固相载体的微孔表面。

[0012] 作为上述技术方案的进一步描述:

[0013] 所述GH标准品为GH重组蛋白。

[0014] 作为上述技术方案的进一步描述:

[0015] 所述包被层含有针对鱼生长激素的多抗。

[0016] 作为上述技术方案的进一步描述:

[0017] 所述固相载体是聚苯乙烯试剂板。

[0018] 作为上述技术方案的进一步描述:

[0019] 包括以下步骤:

[0020] a. 制备GH标准品;

[0021] b. 制备包被抗体;

[0022] c. 制备检测抗体;

[0023] 作为上述技术方案的进一步描述:

[0024] 所述的b步骤分为蛋白表达、动物免疫和抗血清纯化三个步骤。

[0025] 作为上述技术方案的进一步描述:

[0026] 所述的c步骤蛋白表达、动物免疫、抗血清纯化、细胞融合及亚克隆和腹水制备及抗体纯化六个步骤。

[0027] 综上所述,由于采用了上述技术方案,本发明的有益效果是:

[0028] 本发明中,提供的鱼生长激素双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂,无放射污染、操作简便,成本低,稳定性好,可以满足普通实验室的要求。

附图说明

[0029] 图1为本发明提出的鱼生长激素双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂的步骤a中的载体信息结构示意图;

[0030] 图2为本发明提出的鱼生长激素双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂的步骤b中的载体信息结构示意图;

[0031] 图3为本发明提出的鱼生长激素双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂的步骤c中的载体信息结构示意图。

具体实施方式

[0032] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其它实施例,都属于本发明保护的范围。

[0033] 实施例1

[0034] 请参阅图1-3,鱼生长激素双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂,其含有:

[0035] 酶标板、GH标准品、包被有兔多抗的多孔板、检测抗体单克隆抗体1B5、HRP标记的山羊抗小鼠抗体和显色底物3',3',5',5'-四甲基联苯胺(TMB),检测抗体单克隆抗体1B5为小鼠单克隆抗体1B5,GH标准品,包被有兔多抗的多孔板、检测抗体单克隆抗体1B5、HRP标记的山羊抗小鼠抗体和显色底物3',3',5',5'-四甲基联苯胺(TMB)放置于同一个试剂盒中各自单独存放。

[0036] 请参阅图1,实施例2

[0037] 制备GH标准品分为以下步骤:

[0038] 1.载体构建

[0039] 根据客户提供的蛋白质序列,按照大肠杆菌(*Escherichia coli*)的密码子偏好,人工合成目的基因插入表达载体,目的蛋白序列如下:

[0040] Masenqrlfnavirvqhlhqlaakmindfednllpeerrqlskifplsfncsdsieaptgldetqks
smlkllrisfrlieswefpsqtlsgqvsnsltvgnpnqitekkladlkgvisvlikgcldgqpnmdndslplpfed
fyltmgesslresfrllacfkdkdmhkvetylrvancrrsldsnctl;

[0041] 插入指定载体Pet32

[0042] pET-32载体为氨苄抗性,含有Trx标签及6xHis标签。Trx硫氧还蛋白标签有利于增强蛋白可溶性表达,分子量大约20kDa,在pET-32载体中位于目的基因的N-端。

[0043] 插入基因序列。

[0044] 阳性克隆鉴定:经测序验证,合成序列正确。

[0045] 2.小样表达

[0046] 将构建好的质粒转化BL21DE3感受态细胞,接种抗性LB平板培养基,生长过夜;

[0047] 挑选转化平板的6个单克隆,分别接种3ml抗性液体培养基;

[0048] 37°C,220RPM培养至OD600nm0.5-0.6,加入0.5mMIPTG20°C诱导表达3.5小时;

[0049] 离心收集菌体,超声破碎,SDS-PAGE检测表达情况。

[0050] 小样表达结果分析:蛋白质在上清和包涵体中均有表达,可继续进行可溶性表达纯化。

[0051] 3.大样表达

[0052] 选择小样表达良好的菌株进行大样表达。

[0053] 接种60ul菌种至200ml抗性培养基中,37°C,220RPM培养过夜。

[0054] 次日加入新鲜抗性培养基至800ml,培养1-2h至OD600nm 0.5-0.6。

[0055] 加入200ul的1M IPTG(28°C或37°C)诱导表达3.5h。

[0056] 4°C离心收集菌体(66转/秒×15min),弃上清,加入30ml PBST悬浮菌体,加入终浓度1mM PMSF,冰浴条件下超声波200W破碎6min。

- [0057] 摇床4℃孵育1h。
- [0058] 4℃高速离心,133转/秒×15min,取上清,加入400ul镍柱4℃结合过夜。
- [0059] 收集镍柱(33转/秒×5min),用20mMimidazole洗涤液洗涤beads,洗去杂蛋白(1ml×3次)。
- [0060] 加入300ul 300mMimidazole洗脱液,让洗脱液与beads充分结合1h,离心收集上清。向beads中再次加入300ul的洗脱液,洗脱1h,离心收集上清,两次洗脱液合为一管。
- [0061] 对PBS缓冲液透析换液。
- [0062] SDS-PAGE鉴定蛋白质分子量,纯度及浓度。
- [0063] 大样表达结果分析:目标蛋白质为可溶性上清表达,总量3mg,预计分子量40kDa,在表达过程中无降解。
- [0064] 请参阅图2,实施例3
- [0065] 制备包被抗体分为以下步骤:
- [0066] 1. 蛋白表达
- [0067] 1.1载体构建
- [0068] 合成目的基因插入表达载体,目的蛋白序列如下:
- [0069] SENQRLFNNVIRVQHLHQLAAKMINDFEDNLLPEERRQLSKIFPLSFCNSDSIEAPTGKDETQKSSML
KLLRISFRLIESWEFPSQTLGAVSNSLTVGNPNQITEKLADLVKGISVLIKGCLDGQPNMDDNDSLPLPFEDFYLT
MGESSLRESFRLACFKKDMHKVETYLRVANCRRSLDSNCTL
- [0070] 插入指定载体:Pet32a
- [0071] pET-32载体为氨苄抗性,含有Trx标签及6xHis标签。Trx硫氧还蛋白标签有利于增强蛋白可溶性表达,分子量大约20kDa,在pET-32载体中位于目的基因的N-端。
- [0072] 插入基因序列
- [0073] 阳性克隆鉴定:经测序验证,合成序列正确。
- [0074] 1.2小样表达
- [0075] 挑选转化平板6个单克隆,分别接种3ml抗性培养基;
- [0076] 培养至OD600nm 0.5-0.6,加入0.5mM IPTG 28℃诱导表达3.5小时;
- [0077] 离心收集菌体,超声破碎,SDS-PAGE检测表达情况。
- [0078] 小样表达结果分析:蛋白质在上清和包涵体中均有表达,可继续进行可溶性表达纯化。
- [0079] 1.3大样表达
- [0080] 选择小样表达良好的菌株接种至抗性培养基;
- [0081] 培养至OD600nm 0.5-0.6,加入0.5mM IPTG 28℃诱导表达3.5小时;
- [0082] 离心收集菌体,超声破碎,加入镍柱孵育,以0.5Mimidazole洗脱,分管收集;
- [0083] 合并收集峰,对PBS透析过夜;
- [0084] 2. 动物免疫
- [0085] 2.1动物:试验用兔2只。
- [0086] 2.2免疫流程:

[0087]

Animal No.:S0118-1	Date	Animal No.:S0118-1 -2	Date
Primary Immunization:	2017-09-30	Primary Immunization:	2017-09-30
Boost 1:	2017-10-28	Boost 1:	2017-10-28
Boost 2:	2017-11-04	Boost 2:	2017-11-04
Boost 3:	2017-11-11	Boost 3:	2017-11-11
Test Bleed:	2017-11-18	Test Bleed:	2017-11-18
Boost 4:	2017-11-18	Boost 4:	2017-11-18
Final Bleed:	2017-11-25	Final Bleed:	2017-11-25
Final Bleed Volume:	50ml	Final Bleed Volume:	50ml
Elisa Titer:		Elisa Titer:	
Rabbit Note:		Rabbit Note:	

[0088] 3. 抗血清纯化

[0089] 以常规方法将第二套标签表达的蛋白质共价连接至Sepharose柱。

[0090] 10ml血清与亲和纯化柱孵育,pH2.5 HCl,0.15M glycine洗脱,pH7.5PBS缓冲液中和;

[0091] ELISA比较抗血清及亲和纯化抗体效价。

[0092] 请参阅图3,实施例4

[0093] 制备检测抗体分为以下步骤:

[0094] 1. 蛋白表达

[0095] 1.1载体构建

[0096] 根据客户提供的蛋白质序列,按照大肠杆菌(*Escherichia coli*)的密码子偏好,人工合成目的基因插入表达载体。目的蛋白序列如下:[0097] Masenqrlfnnavirvqhlhqlaakmindfednllpeerrqlskifplsfncnsdsieaptgldetqks
smkllrisfrlieswefpsqtlsgqvsnsltvgnpnqitekldlkgvisvlikgldgqpnmdndslplpfed
fyltmgesslresfrllacfkkmhkvetylrancrrsldsnct1

[0098] 插入指定载体Pet32

[0099] pET-32载体为氨苄抗性,含有Trx标签及6xHis标签。Trx硫氧还蛋白标签有利于增强蛋白可溶性表达,分子量大约20kDa,在pET-32载体中位于目的基因的N-端。

[0100] 插入基因序列

[0101] 阳性克隆鉴定:经测序验证,合成序列正确。

[0102] 1.2小样表达

[0103] 将构建好的质粒转化BL21 DE3感受态细胞,接种抗性LB平板培养基,生长过夜;

[0104] 挑选转化平板的6个单克隆,分别接种3ml抗性液体培养基;

[0105] 37°C,220RPM培养至OD600nm 0.5-0.6,加入0.5mM IPTG 20°C诱导表达3.5小时;

[0106] 离心收集菌体,超声破碎,SDS-PAGE检测表达情况。

[0107] 小样表达结果分析:蛋白质在上清和包涵体中均有表达,可继续进行可溶性表达纯化。

- [0108] 1.3大样表达
- [0109] 选择小样表达良好的菌株进行大样表达。
- [0110] 接种60ul菌种至200ml抗性培养基中,37℃,220RPM培养过夜。
- [0111] 次日加入新鲜抗性培养基至800ml,培养1-2h至OD600nm 0.5-0.6。
- [0112] 加入200ul的1M IPTG (28℃或37℃) 诱导表达3.5h。
- [0113] 4℃离心收集菌体 (66转/秒×15min),弃上清,加入30ml PBST悬浮菌体,加入终浓度1mM PMSF,冰浴条件下超声波200W破碎6min。
- [0114] 摇床4℃孵育1h。
- [0115] 4℃高速离心,133转/秒×15min,取上清,加入400ul镍柱4℃结合过夜。
- [0116] 收集镍柱 (33转/秒×5min),用20mMimidazole洗涤液洗涤beads,洗去杂蛋白 (1ml×3次)。
- [0117] 加入300ul 300mMimidazole洗脱液,让洗脱液与beads充分结合1h,离心收集上清。向beads中再次加入300ul的洗脱液,洗脱1h,离心收集上清,两次洗脱液合为一管。
- [0118] 对PBS缓冲液透析换液。
- [0119] SDS-PAGE鉴定蛋白质分子量,纯度及浓度。
- [0120] 2.动物免疫
- [0121] 2.1动物
- [0122] 5-8周龄Balb/C小鼠2只。
- [0123] 2.2佐剂
- [0124] 第一次主注射使用弗氏完全佐剂,以后加强注射使用弗氏不完全佐剂,均与等体积抗原充分混匀后注射。
- [0125] 2.3免疫方法
- [0126] 背部多点注射。
- [0127] 2.4免疫量
- [0128] 主注射100ug抗原/只实验兔,加强注射50ug抗原/只实验兔。
- [0129] 2.5免疫周期
- [0130]

Animal No:M0068-1,2,3	Date	Immune dose
Primary Immunization:	2017-8-22	0.10mg
Boost 1:	2017-9-5	0.05mg
Boost 2:	2017-9-19	0.05mg
Boost 3:	2017-10-3	0.05mg
Test Bleed:	2017-10-13	
Boost 4:	2017-12-11	0.05mg
Fusion:	2017-12-15	

- [0131] 3.抗血清检测
- [0132] 3.1从小鼠尾静脉取少量血,制备抗血清。
- [0133] 3.2间接ELISA方法检测抗血清效价。
- [0134] 4.细胞融合及亚克隆

[0135] 骨髓瘤细胞制备

[0136] 融合前一周,复苏SP2/0细胞,正常培养至对数期。

[0137] 脾细胞制备

[0138] 选定要融合的小鼠,融合当天用颈椎脱臼法处死,取脾,标准流程收集脾细胞并计数。

[0139] 细胞融合

[0140] 按1:3-1:10的比例混合骨髓瘤细胞和脾细胞,标准流程进行细胞融合操作,随后用HAT DMEM完全培养基培养,融合后3天即可以看到杂交瘤细胞,第7天换1/2HAT完全培养基,第8天换1/2HT培养基。融合后10天左右开始进行筛选检测。

[0141] 细胞融合结果:融合后用HAT选择性培养基培养,显微镜下观察,看到多个生长的杂交瘤细胞,证明融合操作成功。

[0142] 融合筛选

[0143] 吸取细胞上清100u1/孔进行间接ELISA检测。根据ELISA结果,判断阳性孔。用单道移液器挑检整板检测出的阳性孔,进行第二次复检,进一步确认阳性孔。

[0144] 亚克隆

[0145] 对复筛的阳性孔细胞做两轮亚克隆。(因为第一次亚克隆得到的阳性孔细胞株尚不稳定,有可能包含多个杂交瘤细胞,普遍认为第二次亚克隆后杂交瘤细胞为单个细胞株,并确定为阳性)。

[0146] 第一次亚克隆有限稀释阳性孔中细胞,至多个孔中,加HT DMEM培养基培养,7天左右在显微镜下观察,间接ELISA检测有克隆生长的孔,取OD值高的孔为阳性孔;挑取阳性孔的细胞进行第二次亚克隆,检测出稳定阳性的杂交瘤细胞株,作为最终制备单抗的细胞,并扩大培养。

[0147] 单克隆抗体亚型鉴定

[0148] 用美国Southern Biotech的单抗亚型鉴定试剂盒分别测各个上清的亚型。准备好包被有免疫原蛋白的板条,50ng/孔,每个克隆收集600u1上清,分别滴加到6个对应蛋白的酶标孔中,100u1/孔。37°孵育1h,PBST洗三遍,将稀释好的分型二抗抗IgM,IgA,IgG1,IgG2a,IgG2b,IgG3的抗体加入6个孔中,37°孵育1h,PBST洗三遍,TMB显色。有信号反应的孔对应的鉴定二抗亚型即为该抗体的亚型。

[0149] 经过两轮亚克隆及复检,确定阳性细胞株及亚型。

[0150] 5. 腹水制备及抗体纯化

[0151] 5.1腹水制备

[0152] 将上述阳性细胞扩大培养并注射至Ba1b/C小鼠(经弗氏不完全佐剂至敏)的腹腔,一般7-10日可见小鼠腹部隆起即代表有腹水产生。当小鼠有明显腹水产生时及时抽取腹水。

[0153] 5.2腹水纯化

[0154] 将上述细胞的腹水,进行纯化,纯化后抗体纯度大于90%。纯化方法如下:

[0155] 辛酸硫酸铵+DEAE离子柱法纯化(IgG1,IgG2a,IgG2b,IgG3亚型抗体):

[0156] 腹水离心,吸出淡黄色液体计算体积,用4倍体积的60mM醋酸缓冲液(pH4.0)1:3稀释,逐滴加入辛酸(终浓度为25u1/ml稀释腹水),室温搅拌30min,然后4°C静置2h以上,使其

充分沉淀。

[0157] 10000r/min,4℃,20min,收集上清,加入1/10体积的10*PBS(0.1M pH7.4)。根据每ml上述混合液加0.277g固体硫酸铵(0℃条件下,45%饱和硫酸铵为0.291g/ml),继续静置至少60min以上。

[0158] 10000r/min,4℃,20min,弃上清,将沉淀溶解于少量PBS中。对PBS透析,4℃透析过夜。

[0159] 5.3检测浓度纯度后,调整浓度以利于保存。

[0160] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

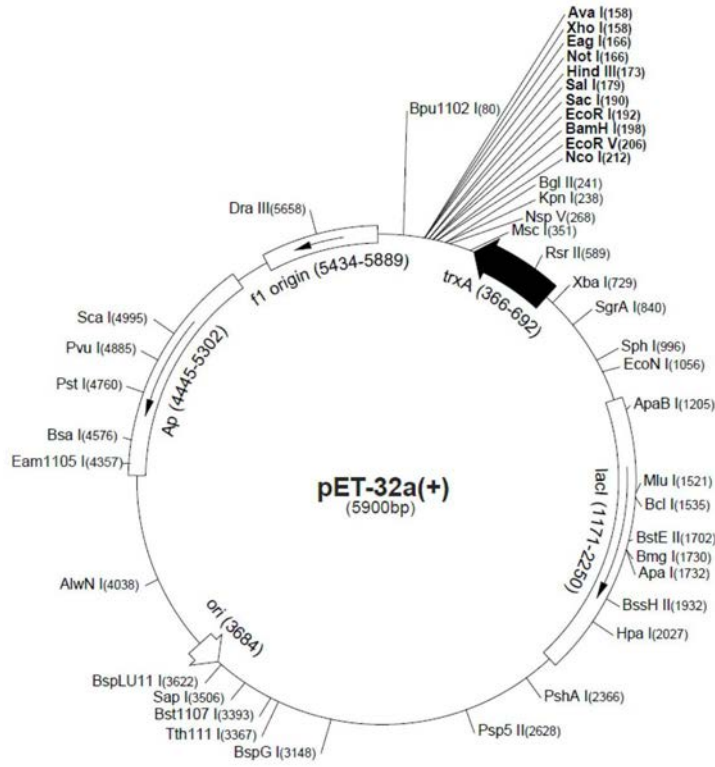


图1

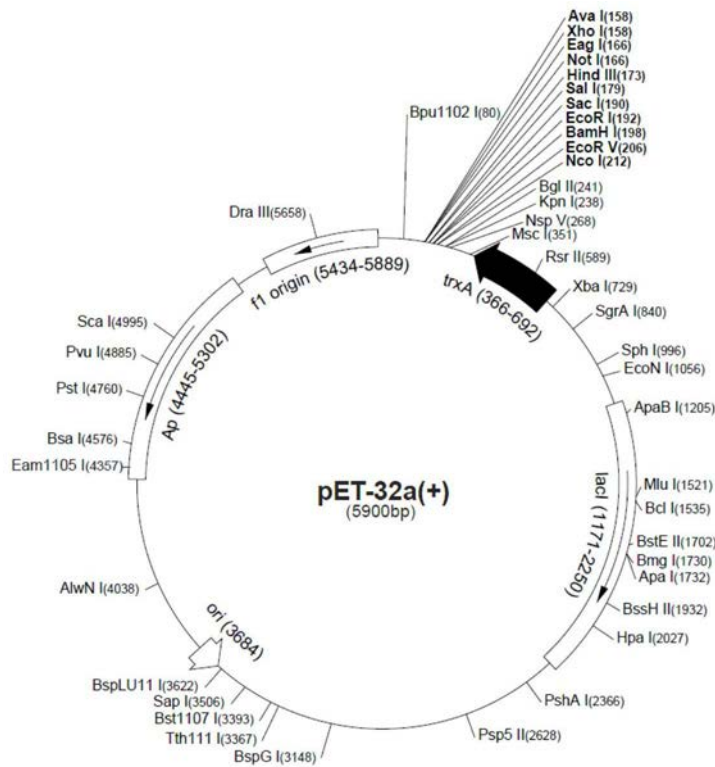


图2

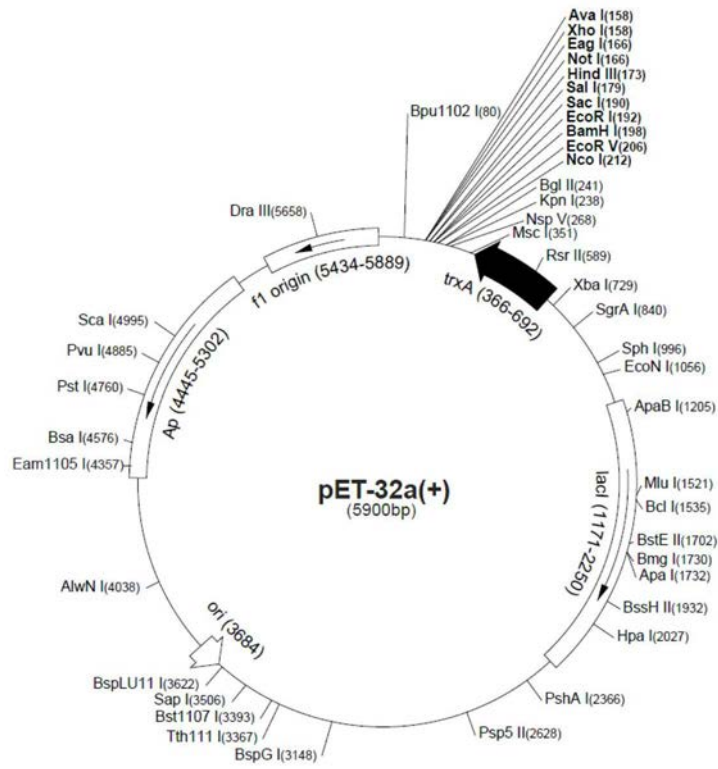


图3