



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109580959 B

(45)授权公告日 2020.03.31

(21)申请号 201811545063.X

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2018.12.17

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109580959 A

CN 101970485 B, 2014.05.14,
CN 104749372 A, 2015.07.01,
CN 101978054 A, 2011.02.16,
CN 101511870 A, 2009.08.19,
CN 101589058 A, 2009.11.25,
WO 2014007242 A1, 2014.01.09,
US 2016083464 A1, 2016.03.24,
JP 2007135510 A, 2007.06.07,
CN 103109185 A, 2013.05.15,
CN 106397590 A, 2017.02.15,
刘红旗. 冠心病患者血清肝素结合表皮生长
因子样生长因子及超敏C反应蛋白水平的临床意
义.《万方》.2011,

(43)申请公布日 2019.04.05

(73)专利权人 江苏莱森生物科技研究院有限公
司

地址 212004 江苏省镇江市京口区新区丁
卯经十五路99号30幢

(72)发明人 刘晗青 屠志刚

(74)专利代理机构 北京德崇智捷知识产权代理
有限公司 11467

代理人 冯燕平

审查员 王在竹

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

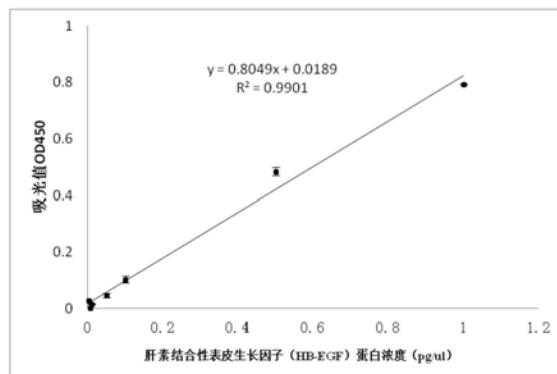
权利要求书1页 说明书11页
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

一种检测肝素结合性表皮生长因子的ELISA
试剂盒

(57)摘要

本发明属于免疫分析技术领域,具体涉及一
种检测肝素结合性表皮生长因子的ELISA试剂
盒。该试剂盒包括:预包被抗HB-EGF蛋白单克隆
抗体的96孔酶标板、辣根过氧化物酶(HRP)标
记的HB-EGF蛋白兔多克隆抗体、稀释液、洗涤液、显
色液、终止液和HB-EGF蛋白标准品。本发明制备
的双抗体夹心法检测试剂盒具有灵敏度高、特异
性强、定量准确、简单易用、重现性好等特点,可
检测细胞、血清、血浆和动物组织样品中HB-EGF
含量,可供基础研究和临床诊断中HB-EGF蛋白的
定性及定量检测,并可同时快速检测大批量样
本,应用前景十分广阔。



1. 一种用于检测肝素结合性表皮生长因子的ELISA试剂盒,所述试剂盒包括特异性的HB-EGF蛋白单克隆抗体,所述单克隆抗体轻链可变区如SEQ.ID.NO.2所示,重链可变区如SEQ.ID.NO.1所示;所述试剂盒还包括多克隆抗体,所述多克隆抗体为辣根过氧化物酶标记的多克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述HB-EGF蛋白单克隆抗体为鼠单克隆抗体。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述辣根过氧化物酶标记的多克隆抗体为兔多克隆抗体。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括样品稀释液、洗涤液、底物显色液、反应终止液和HB-EGF蛋白的标准品。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,所述样品稀释液为含有0.5% (重量百分比)牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;所述洗涤液为含有0.1% (体积百分比)吐温-20的0.1 mol/L磷酸盐缓冲液。

6. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,所述底物显示液由显色液A和显色液B组成,显色液A包括过氧化氢,显色液B包括四甲基联苯胺,显色液使用时取等体积的A、B液混匀;所述终止液为2 mol/L的硫酸。

7. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒的检测对象为血清、细胞上清、血浆或组织。

8. 一种获取肝素结合性表皮生长因子含量的系统,其特征在于,所述系统包括权利要求1-6任一项权利要求所述的试剂盒。

一种检测肝素结合性表皮生长因子的ELISA试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析技术领域,具体涉及一种检测肝素结合性表皮生长因子的ELISA试剂盒。

背景技术

[0002] 肝素结合表皮生长因子(Heparin-binding Epidermal Growth Factor,HB-EGF),即HB-EGF蛋白。

[0003] 近年来,大量研究结果提示,HB-EGF或可成为一个新的肿瘤标志物,有研究表明,部分乳腺癌和前列腺癌患者的HB-EGF表达水平与溶血磷脂酸-1(LPA-1,一种促肿瘤生长转移因子)的水平呈正相关,提示人们HB-EGF或可作为乳腺癌、卵巢癌及前列腺癌等多种癌症的诊断及临床监测的分子标志物。

[0004] HB-EGF作为多种肿瘤发生发展的重要的生物标志物,对其准确、快速的检测对肿瘤早期诊断、肿瘤发生发展机理的研究、发展分期的跟踪及临床治疗和预后情况判断的意义十分关键,故急需建立一种简便、高效、可用于对各类常见样本如细胞悬液、血清、血浆等的高通量快速检测的试剂和方法。

[0005] 目前国内市售HB-EGF蛋白ELISA试剂盒存在特异性差,产量低等缺点,因此亟需开发高特异性、高亲和性的HB-EGF抗体及相关试剂盒的研制,支持国内HB-EGF蛋白的各项基础研究,并进一步研制临床体外诊断试剂盒提供关键材料,加速产品的开发,填补该技术领域的空白。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种低成本、检测灵敏度高、检测结果稳定、重复性好的肝素结合性表皮生长因子(HB-EGF)的双抗体夹心法ELISA试剂盒。

[0007] 本发明采用的技术方案为:

[0008] 一种用于检测肝素结合性表皮生长因子的ELISA试剂盒,所述试剂盒采用的是双抗体夹心法,所述试剂盒包括特异性的HB-EGF蛋白单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的多克隆抗体。

[0009] 所述单克隆抗体包括轻链可变区,其序列氨基酸序列如SEQ.ID.NO.2所示;还包括重链可变区,其氨基酸序列如SEQ.ID.NO.1所示。

[0010] 其中,所述的特异性的HB-EGF蛋白单克隆抗体用于包被;所述辣根过氧化物酶(HRP)标记的多克隆抗体用于HB-EGF蛋白检测。

[0011] 其中所述HB-EGF单克隆抗体为鼠单克隆抗体;HRP标记的多克隆抗体为兔多克隆抗体。

[0012] 所述用于检测肝素结合性表皮生长因子的ELISA试剂盒还包括样品稀释液、洗涤液、底物显色液、反应终止液及HB-EGF蛋白的标准品;

[0013] 所述样品稀释液为含有0.5%牛血清白蛋白(BSA)的磷酸盐缓冲液(PBS);所述洗

涤液为含有0.1%吐温-20 (Tween-20)的0.1mol/L磷酸盐缓冲液 (PBS);所述底物显示液由显色液A和显色液B组成,显色液A为过氧化氢,显色液B为四甲基联苯胺,显色液使用时取等体积的A、B液混匀;所述终止液为2mol/L的硫酸,所述HB-EGF蛋白标准品为重组HB-EGF蛋白。

[0014] 所述鼠单克隆抗体由重组HB-EGF蛋白免疫BALB/c鼠后,利用杂交瘤技术制备获得;所述HRP标记的兔多克隆抗体由重组HB-EGF蛋白免疫新西兰白兔,通过硫酸铵法纯化技术获得;按常规方法利用辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 标记抗体获得HRP标记的兔多克隆抗体,用于HB-EGF蛋白检测。

[0015] 本发明优选高特异性、高灵敏度的抗HB-EGF的单克隆抗体和多克隆抗体进行配对组合,将鼠单克隆抗体包被在固相载体上,它可特异性地结合重组HB-EGF蛋白及样本中的HB-EGF蛋白,当加入HRP标记的兔多克隆抗体,即形成固相抗体-抗原-酶标检测抗体复合物,应用显色剂对相应底物显色后终止,于450nm波长下读取各样本吸光度值,与标准曲线比较即可得出样品中HB-EGF蛋白的含量。

[0016] 本发明的有益效果:

[0017] 本发明采用双抗体夹心法定量检测样本中的HB-EGF蛋白含量,检测方法简便易行、检测灵敏度和准确度高、特异性强、重复性好、并能够同时快速检测大批量样本。

[0018] 本发明选择HB-EGF蛋白为标准品,HB-EGF含有一个21个氨基酸残基的肝素结合区,因而与肝素及其类似物硫酸乙酰肝素蛋白多糖 (heparan sulfate proteoglycan, HSPG) 有较强的亲和力。

[0019] 固相酶联免疫法 (ELISA法) 具备技术成熟、灵敏度高、特异性好、操作简单、检测成本低、适用于大批量样本检测等优势。

[0020] 本发明的试剂盒中包被抗体为鼠单抗,只有一个抗原表位,特异性很好;检测抗体为兔多抗,偶联HRP后进行检测。试剂盒的主要组成部分的包被和检测抗体均为自主研发产品,因此相对于进口国外产品大大降低了成本,将在HB-EGF的相关基础和临床研究中发挥重要作用,具有广阔的市场前景。

附图说明

[0021] 图1为96孔酶标板中各样品及对照组的加样示意图。

[0022] 图2为HB-EGF蛋白酶联免疫双抗体夹心法试剂盒的检测标准曲线图。

具体实施方式

[0023] 下面结合具体实施例来进一步解释本发明,但并不限制本发明的保护范围。以下实施例中的方法、设备、材料,如果未进行特别说明,均为本领域常规方法、设备和材料。

[0024] 实施例1:HB-EGF酶联免疫试剂盒的组分制备

[0025] (1) 重组HB-EGF蛋白标准品的制备:

[0026] 所述试剂中的标准品为重组HB-EGF蛋白,用pET-30a-HB-EGF (Invitrogen公司) 质粒转化入大肠杆菌诱导该蛋白在体外进行表达,再通过镍柱亲和层析法获得高纯度的HB-EGF蛋白。

[0027] (2) 抗HB-EGF鼠单克隆抗体的制备:

[0028] a. 动物免疫:

[0029] 采用雌性BALB/c纯系小鼠(购自南京大学动物模式研究所)作为免疫动物,以上述重组HB-EGF蛋白为免疫原进行免疫,免疫剂量为每只小鼠每次免疫100 μ g的重组HB-EGF。首次免疫时,将免疫原与等体积的完全弗氏佐剂制成乳化剂,腹部皮下多点注射,间隔3周后,取相同剂量免疫原与等体积不完全弗氏佐剂制成乳化剂,进行第二次加强免疫,二次免疫后尾静脉采血,使用间接ELISA法测定血清效价,血清效价达到1:10⁵以上后,选择两只效价最高的小鼠进行第三次加强免疫(方法同第二次加强免疫),间隔3周后,进行最后一次冲击免疫,冲击免疫为取200 μ g HB-EGF蛋白,添加PBS稀释到200 μ L,腹腔注射,完成冲击免疫3~4天后取小鼠脾脏细胞进行细胞融合。

[0030] 其中,所述的间接ELISA法具体方法如下:取出重组HB-EGF蛋白,用pH 9.6, 0.05mol/L的碳酸盐缓冲液将HB-EGF蛋白稀释为1 μ g/mL加入96孔酶标板,每孔100 μ L,4 $^{\circ}$ C包被过夜,取出包被过夜的酶标板,TBS-T洗涤3次后,拍干酶标板,第二次免疫后1周,从小鼠尾静脉适量采血,5000g离心15min分离血清,用样本稀释液(含有0.5%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液)将血清按1:100、1:1000、1:10000、1:100000、1:1000000梯度进行稀释,每孔100 μ L加入待检测酶标板,37 $^{\circ}$ C,孵育1h后,经TBS-T洗涤3次,拍干酶标板,每孔加入100 μ L的1:5000稀释HRP标记的山羊抗小鼠二抗(购自Jackson Immuno Research公司),37 $^{\circ}$ C孵育30min。取出酶标板,经TBS-T洗涤5次后,每孔加入100 μ L加入底物显示液,37 $^{\circ}$ C避光显色10~15min,随后加入50 μ L终止液终止反应,于酶标仪450nm波长下读取吸光值。选取血清效价达到1:10⁵以上小鼠,进行第三次免疫。

[0031] b. 细胞融合与克隆化

[0032] 取免疫完成的小鼠脾脏,经80目网筛研磨过滤离心得脾细胞悬液,细胞计数后,通过细胞融合技术将脾细胞按5:1的比例与处于对数生长期的SP2/0小鼠骨髓瘤细胞(购自中科院昆明细胞库)混合,利用HAT特殊培养基筛选杂交瘤细胞,骨髓瘤细胞和脾细胞等未融合或未有效融合的细胞将无法生长,而有效融合的杂交瘤细胞将在培养孔内生长、增殖、并分泌抗体。融合后第9~12天取细胞培养上清,以重组HB-EGF蛋白作为包被抗原,利用间接ELISA法测定上清液中抗体分泌量,筛选阳性孔,并通过有限稀释法对阳性细胞进行克隆化培养,直至得到稳定分泌抗HB-EGF特异性抗体的单克隆杂交瘤细胞株。

[0033] 以上细胞融合和克隆方法均为免疫学单克隆抗体技术中常用的经典方法。

[0034] c. 抗HB-EGF单克隆抗体的生产及纯化

[0035] 选取阳性杂交瘤细胞,按5 \times 10⁵个细胞数/只注射提前用液体石蜡致敏的BALB/c小鼠腹腔,7~14d观察小鼠腹部明显膨大,即可抽取腹水。腹水采集后12000g离心10min去除油脂和沉淀,收集上清,即为抗HB-EGF单克隆抗体,利用Protein G法纯化抗体,获得的抗体经SDS-PAGE电泳和间接ELISA法鉴定抗体纯度和特异性后分装,于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0036] Protein G法纯化抗体具体方法如下:抗体与醋酸盐缓冲液按体积比1:3充分混匀后逐滴加入正辛酸,4 $^{\circ}$ C静置1h后,2500g 4 $^{\circ}$ C离心30min,弃沉淀,收集上清液,随后加入0.1倍体积的10 \times PBS,调整pH至7.4,装入已经平衡的蛋白G-层析柱中,利用PBS洗去杂蛋白,最后经洗脱缓冲液(pH值为2~3的0.1mol/L的甘氨酸溶液)将抗体蛋白洗脱下来。

[0037] 抗体纯度经SDS-PAGE电泳验证,抗体经第二次洗脱即能获得较高的纯度,抗HB-EGF单克隆抗体IgG(H+L)分子量约为160KD,其中IgG重链约为55KD,IgG轻链约为25KD。

[0038] d.HB-EGF单克隆细胞株序列的测定

[0039] 在本实施例中,利用分子生物学技术对阳性单克隆细胞株进行重链和轻链区基因扩增,并进行序列测定。

[0040] 抗体基因提取扩增具体方法如下:收集生长状态良好的杂交瘤细胞,利用Thermo公司的Trizol提取杂交瘤细胞总RNA,按南京诺唯赞公司的HiScript Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)说明书的操作方案将mRNA逆转录为cDNA,-20℃冻存备用。逆转录反应体系为5μLRNA (2500ng),10μL 4×gDNA,10μL 5×supermix II,加dd H₂O补足至50μL,总反应体积为50μL。

[0041] 通过NCBI数据库查找鼠源轻链FR1区及恒定区基因序列(NC000072.6),根据序列设计轻链PCR引物,上游序列为:GCGGAGCTCGATRRTTGATGACCCARAC,下游序列为:GCGTCTAGACTCATTCTGTTGAAGCTCT;

[0042] 通过NCBI数据库查找鼠源重链FR1区及铰链区基因序列(NC000078.6),根据序列设计重链PCR引物,上游序列为:GCGCTCGAGCAGKTCCAGCTGAAGCAGTC,下游序列为:GCGACTAGTGCATTTGCATGGAGGACAG。

[0043] 以杂交瘤细胞株的cDNA为模板,PCR扩增,获得抗体的轻链和重链片段。按南京诺唯赞公司的Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase说明书的操作方案进行PCR,PCR反应体系为:25μL 2×Phanta,1μL dNTP,4μL 10μM引物对,4μL杂交瘤细胞cDNA,1μL DNA聚合酶,总反应体积为50μL。扩增条件为:预变性94℃,3min;变性94℃,30s;退火64℃,30s;延伸72℃,5min。按照OMEGA公司胶回收试剂盒说明书对PCR产物进行胶回收并测序分析,获得杂交瘤细胞的重链可变区氨基酸序列为SEQ.ID.NO.1,轻链可变区序列氨基酸序列为SEQ.ID.NO.2。

[0044] 进一步的,经验证本发明中纯化后的单克隆抗体的效价均达到 1×10^8 。

[0045] (3) HB-EGF兔多克隆抗体的制备

[0046] 选取新西兰兔(购自南京大学动物模式研究所)作为免疫动物,以重组HB-EGF蛋白为免疫原进行免疫,免疫剂量为每只兔子每次免疫500μg的重组HB-EGF蛋白。首次免疫将免疫原与等量的完全弗氏佐剂制成乳化剂,颈背部皮下多点注射,间隔2~3周取相同剂量免疫原与等量不完全弗氏佐剂制成乳化剂,加强免疫,共免疫4~5次,间接ELISA法测定血清效价达到 $1:10^5$ 以后,颈总动脉取血,通过硫酸铵法纯化多克隆抗体,分装,于-20℃低温保存用于酶标抗体的制备。其中硫酸铵法纯化抗体具体步骤如下:

[0047] a. 抗体血清与PBS按体积比1:1混合,随后逐滴加入饱和硫酸铵溶液,充分混合均匀使之成为20%的硫酸铵溶液,静置30min,于4℃,2500g离心30min,弃沉淀,收上清液;

[0048] b. 往上清液中继续滴加饱和硫酸铵溶液,使之成为50%的硫酸铵溶液,充分混合,静置30min,于4℃,2500g离心30min,弃上清,收集沉淀;

[0049] c. 往沉淀中加入1倍体积的PBS,充分溶解沉淀后继续加入硫酸铵溶液,使之成为40%的硫酸铵溶液,充分混合,静置30min,于4℃,2500g离心30min,弃上清,收及沉淀,此步骤重复2~3次;

[0050] d. 用PBS溶解沉淀,即为HB-EGF兔多克隆抗体粗提纯品。

[0051] (4) 辣根过氧化物酶标记的抗体制备

[0052] a. 称取HRP 5mg溶解于1mL0.2mol/L pH5.6醋酸盐缓冲液中,加入含1%DNFB的无

水乙醇溶液0.1mL,室温下轻微搅拌1h;

[0053] b.加入0.5mL新鲜配置的0.1mol/L NaIO_4 溶液,4℃放置30min,随后加入步骤(3)制备得到的待标记的多克隆抗体5~10mg,利用碳酸盐缓冲液调整pH值至9.0~9.5,充分混匀,4℃放置过夜;

[0054] c.加入0.1mL新鲜配制的4mg/ml NaBH_4 溶液,混匀,于4℃放置3h;

[0055] d.将上述液体装入透析袋中,于pH 7.4,0.01mol/L的PBS溶液中透析,4℃过夜;

[0056] e.收集透析袋中液体,3000g离心30min,去除沉淀物,上清液即为酶标记抗体。

[0057] 实施例2:检测HB-EGF蛋白的酶联免疫试剂盒的组建

[0058] 组建检测HB-EGF蛋白的酶联免疫试剂盒,包含以下试剂:

[0059] a.抗HB-EGF蛋白小鼠单克隆抗体;

[0060] b.HRP标记的抗HB-EGF蛋白兔多克隆抗体;

[0061] c.重组HB-EGF蛋白标准品;

[0062] d.包被缓冲液:pH值为9.6,0.05mol/L的碳酸盐缓冲液;

[0063] e.封闭液:含有0.5%(体积百分含量)牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;

[0064] f.样品稀释液:含有0.5%(体积百分含量)牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;

[0065] g.洗涤液:含有0.1%(体积百分含量)吐温的磷酸盐缓冲液;

[0066] h.底物显色液:由显色液A和显色液B组成,显色液A为过氧化氢,显色液B为四甲基联苯胺,显色液使用时取等体积的A、B液混匀;

[0067] i.终止液:2mol/L的硫酸。

[0068] 实施例3:HB-EGF蛋白酶联免疫试剂盒的制备

[0069] (1)正交试验摸索酶联免疫试剂盒的最佳抗体组合及工作浓度

[0070] 采用正交试验方法摸索最佳抗体组合以及最佳抗体使用浓度,将抗HB-EGF蛋白小鼠单克隆抗体稀释为2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,HRP标记的抗HB-EGF蛋白兔多克隆抗体稀释为2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,标准品浓度为100 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 、10 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 、1 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 和0.1 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 。根据正交实验结果(表1),在不同浓度的标准蛋白组中,HB-EGF鼠单克隆抗体浓度在1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后检测的吸光度值出现明显减弱趋势,HB-EGF兔多克隆抗体浓度在0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后检测的吸光度值出现明显减弱趋势,则确定HB-EGF鼠单克隆抗体作为包被抗体的最佳工作浓度为1-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,优选1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,HRP标记兔多克隆抗体的最佳工作浓度为0.5-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,优选0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0071] 表1.正交试验摸索酶联免疫试剂盒的最佳抗体组合及工作浓度结果

标准品浓度 (pg/ μ L)	兔抗浓度 (μ g/mL)	鼠抗浓度 (μ g/mL)			
		2	1	0.5	0.25
100	2	0.892	0.919	0.587	0.194
	1	0.886	0.840	0.584	0.174
	0.5	0.774	0.797	0.467	0.143
	0.25	0.614	0.606	0.323	0.102
10	2	0.836	0.805	0.482	0.167
	1	0.878	0.736	0.447	0.135
	0.5	0.771	0.681	0.339	0.098
	0.25	0.545	0.472	0.234	0.068
1	2	0.482	0.563	0.206	0.064
	1	0.351	0.331	0.167	0.041
	0.5	0.271	0.220	0.108	0.029
	0.25	0.173	0.140	0.096	0.025
0.1	2	0.276	0.256	0.146	0.055
	1	0.217	0.189	0.118	0.047
	0.5	0.097	0.112	0.046	0.048
	0.25	0.075	0.078	0.027	0.025

[0072] (2) 试剂盒的批量制备

[0073] a. 酶标板的大量制备:

[0074] 包被酶标板: 用包被缓冲液, 将抗HB-EGF单克隆抗体稀释至浓度 $1\mu\text{g/mL}$, $100\mu\text{L}$ /孔, 包被96孔酶标板, 4°C 孵育过夜; 用洗涤液 $200\mu\text{L}$ /孔, 洗板3次; 封闭: 每孔加入 $100\mu\text{L}$ 封闭液封闭非特异性结合位点, 室温孵育1h; 然后用洗涤液 $200\mu\text{L}$ /孔, 洗板3次; 拍干后用真空包装机包装, 4°C 保存备用。

[0075] b. 蛋白标准品的大量制备: 用样品稀释液稀释HB-EGF蛋白, 分装后冻干, -20°C 保存备用。

[0076] c. 酶标抗体的大量制备: 将纯化后的抗HB-EGF蛋白兔多克隆用HRP标记, 加入50%甘油, 分装后 -20°C 保存备用。

[0077] 实施例4: HB-EGF蛋白酶联免疫试剂盒的检测步骤

[0078] 本实施例中涉及细胞、血液、组织等位科研所用的鼠源或人源的, 未有特殊说明, 均为常规购买所得。

[0079] (1) 样品的收集、处理和保存

[0081] a. 细胞培养上清液:1000×g离心10min去除颗粒和聚合物,收集上清,-20℃保存备用。

[0082] b. 血清:静脉采血,使用不含热源和内毒素的试管收集血液后,4℃1000×g离心15min,避免溶血,收集血清,-20℃保存备用。

[0083] c. 血浆:静脉采血,使用EDTA试管收集血液,4℃下1000×g离心15min,去除细胞和颗粒,-20℃保存备用。

[0084] d. 组织样品:切割标本后,称取重量,液氮迅速冷冻保存备用,标本解冻后仍需保持2~8℃的温度,加入适量体积的PBS,用剪刀或匀浆器将标本匀浆充分,1000×g离心15min,收集上清液用于检测。

[0085] (2) 加样

[0086] a. 取出酶标包被板及冻干的标准品,标准品为1ng HB-EGF蛋白,加入1mL样品稀释液稀释标准品,标准品浓度1pg/μL,室温下放置20分钟,将标准品从1pg/μL开始起,按2倍倍比进行梯度稀释,稀释7个点,将稀释液各取100μL按照图1的位置加入96孔酶标板中,空白孔为阴性对照即为同等体积的样品稀释液,图1中A行1、2、3三个孔设置为空白对照孔,HB-EGF蛋白在0.001~1pg/μL区间为较好的线性范围。

[0087] b. 取待测血清或血浆样本,加入反应孔中,100μL/孔,37℃孵育1h;

[0088] c. 洗涤液洗板3次,200μL/孔,拍干酶标板。

[0089] (3) 加入检测抗体

[0090] a. 将HRP标记抗体用样品稀释液稀释至0.5μg/mL,加入反应孔中,100μL/孔,室温下孵育1h;

[0091] b. 洗涤液洗板3次,200μL/孔,拍干酶标板。

[0092] (4) 显色

[0093] a. 加入100μL底物显色液(A、B液按体积比1:1混合),室温反应15min,然后加入50μL终止液终止反应;

[0094] b. 酶标仪450nm波长下读取吸光值。

[0095] (5) 标准曲线的建立以HB-EGF蛋白标准品的浓度为横坐标,吸光值为纵坐标建立标准曲线(如图2),方程式 $y=0.8049x+0.0189$,回归系数 $R^2\geq 0.99$,根据标准曲线计算样品中的HB-EGF蛋白含量。

[0096] 实施例5:HB-EGF蛋白酶联免疫试剂盒主要参数的测定

[0097] 对试剂盒的主要参数进行测定,包括试剂盒的特异性、准确度和精密度,具体方法和结果如下:

[0098] (1) 试剂盒的特异性检测

[0099] 将重组蛋白EGFR、TNF-α、IL-1β、HGF稀释至100pg/μL,用HB-EGF蛋白酶联免疫检测试剂盒进行检测,试验结果证明,该试剂盒与100pg/μL的EGFR、TNF-α、IL-1β、HGF均无交叉反应,显示该试剂盒特异性较好,能够专一性地识别HB-EGF蛋白。。

[0100] (2) 试剂盒的准确度测定

[0101] 通过添加回收实验来检测试剂盒的准确度,向人血清样品(由江苏大学附属医院检验科提供)中添加重组HB-EGF蛋白,所添加的HB-EGF蛋白浓度为1pg/μL、0.1pg/μL、0.05pg/μL和0pg/μL,然后用所制备试剂盒对添加后样品进行检测,根据标准曲线计算得到

各个样品中的HB-EGF蛋白含量,减去空白血清中的HB-EGF蛋白含量即得到所测定的HB-EGF蛋白含量,除以理论添加的蛋白量即为添加回收率。

[0102] 结果见表2,结果显示添加回收率为95%-110%,说明所制备试剂盒的准确度良好,血清基质对检测无明显干扰。

[0103] 表2.HB-EGF蛋白试剂盒准确度测定

添加的重组HB-EGF浓度 (pg/ μ L)	测定值	回收率
0	0.032	-
0.05	0.059	117.0%
0.1	0.111	111.6%
1	0.975	97.50%

[0105] (3) 试剂盒的精密度测定

[0106] a. 重复性试验

[0107] 选择5份含有不同HB-EGF蛋白浓度的血清样品(来源于江苏大学附属医院检验科提供),平行在3块酶标板检测,每块板上每个样品3个重复,各板分别设置标准品对照曲线,分别计算每个检测结果的变异系数C.V, $C.V = (\text{标准偏差SD} / \text{平均值Mean}) \times 100\%$,见表3,平均变异系数为7.631%(当C.V>15%表明不同组别之间差异性较大),说明所制备试剂盒有很好的重复性。

[0108] 表3.HB-EGF蛋白试剂盒的批内重复性试验

样品编号	HB-EGF 蛋白含量 (pg/ μ L)			C.V.(%)
	板 1	板 2	板 3	
1	2.156	1.846	1.759	10.87
2	1.777	1.736	1.782	1.430
3	1.190	1.318	1.076	10.13
4	0.628	0.549	0.589	6.710
5	1.303	1.089	1.181	9.013

[0110] b. 批间差异检测

[0111] 选择5份含有不同HB-EGF蛋白浓度的血清样品,分批重复检测5次,每次每个样品设3个重复,每次板内设置标准品对照曲线。计算同一份样品5次检测结果间的变异系数(C.V),见表4,5份样品5次检测结果的变异系数平均为12.64%(当C.V>15%表明不同组别之间差异性较大),说明所制备试剂盒批间差异较小。

[0112] 表4.HB-EGF蛋白试剂盒批间差异检测

样品编号	HB-EGF 蛋白含量 (pg/ μ L)					平均值	C.V.(%)
	结果 1	结果 2	结果 3	结果 4	结果 5		
1	0.818	0.998	0.891	0.822	0.845	0.875	8.54
2	0.499	0.393	0.606	0.456	0.570	0.505	16.99
3	0.449	0.562	0.405	0.494	0.482	0.478	12.14
4	0.373	0.538	0.384	0.486	0.508	0.458	16.34
5	1.465	1.524	1.306	1.232	1.286	1.3626	9.19

[0114] 实施例6:试剂盒检测人血清中HB-EGF蛋白含量的应用

[0115] 利用所制备的HB-EGF蛋白酶联免疫检测试剂盒测定人血清HB-EGF蛋白含量,共检测20个人血清样品(来自健康的志愿者),结果见表5,在检测的人血清中HB-EGF蛋白含量范围为0.1~5pg/ μ L,符合人血清中HB-EGF蛋白含量的正常值范围。以上结果表明,利用本发明试剂盒能定量检测出人血清标本中HB-EGF蛋白的含量,因此,本发明涉及的ELISA试剂盒灵敏度完全能够满足基础研究和临床诊断需要,对人HB-EGF蛋白含量进行准确定量测定。

[0116] 表5. 人血清中HB-EGF蛋白含量测定

血清样本	HB-EGF蛋白含量 (pg/ μ L)
血清1	0.674
血清2	0.389
血清3	0.687
血清4	0.578
血清5	2.174
血清6	0.879
血清7	1.369
血清8	0.753
血清9	0.645
血清10	0.414
血清11	0.941
血清12	0.587
血清13	0.844
血清14	0.524
血清15	0.247
血清16	0.574
血清17	2.178
血清18	0.894
血清19	1.017

血清20	0.249
------	-------

[0118] 实施例7:试剂盒检测细胞上清中HB-EGF蛋白含量的应用

[0119] 利用所制备的HB-EGF蛋白酶联免疫检测试剂盒测定人乳腺癌细胞系MDA-MB-231、人卵巢癌细胞系SKOV3、支气管上皮细胞系BEAS-2B细胞(购自中科院昆明细胞库)培养上清液中HB-EGF蛋白含量,结果见表6,检测结果符合细胞上清液中HB-EGF蛋白含量的正常值范围,这表明-,利用本发明试剂盒能定量检测出细胞上清中HB-EGF蛋白的含量。

[0120] 表6.细胞上清中HB-EGF蛋白含量测定

细胞	HB-EGF 蛋白含量 (pg/ μ L)		
	孔 1	孔 2	孔 3
[0121] MDA-MB-231	0.168	0.145	0.188
SKOV3	0.038	0.027	0.037
BEAS-2B	0.037	0.031	0.042

[0122] 实施例8:试剂盒检测人血浆中HB-EGF蛋白含量的应用

[0123] 采用EDTA抗凝试管收集20个健康志愿者的血液,4 $^{\circ}$ C1000 \times g离心15min,利用所制备的HB-EGF蛋白酶联免疫检测试剂盒检测人血浆中HB-EGF蛋白含量,结果见表7,符合人血浆中HB-EGF蛋白含量的正常值范围,以上结果表明,利用本发明试剂盒能定量检测出人血浆样本中HB-EGF蛋白的含量。

[0124] 表7.人血浆中HB-EGF蛋白含量测定

血浆样本	HB-EGF 蛋白含量 (pg/ μ L)
血浆 1	0.075
血浆 2	0.178
血浆 3	0.087
血浆 4	0.134
血浆 5	0.047
血浆 6	0.111
血浆 7	0.174
血浆 8	0.147
[0125] 血浆 9	0.074
血浆 10	0.068
血浆 11	0.057
血浆 12	0.054
血浆 13	0.137
血浆 14	0.124
血浆 15	0.098
血浆 16	0.067
血浆 17	0.113
血浆 18	0.121
血浆 19	0.097
血浆 20	0.088

[0126] 实施例9:试剂盒检测组织样本中HB-EGF蛋白含量的应用

[0127] 收集10只雌性成年小鼠(购自南京大学动物模式研究所)的卵巢组织作为检测标本,切割标本后,称取重量,按1 μ g/ μ L的浓度比例加入PBS,利用匀浆器将标本匀浆充分,

1000×g离心15min,收集上清液用于检测,结果见表8,符合动物组织中HB-EGF蛋白含量的正常值范围,以上结果表明,利用本发明试剂盒能定量检测出小鼠卵巢组织样本中HB-EGF蛋白的含量。

[0128] 表8.组织中HB-EGF蛋白含量测定

[0129]

组织样本	HB-EGF蛋白含量 (pg/ μ L)
1	0.0102
2	0.0361
3	0.0305
4	0.0285
5	0.0235
6	0.0656
7	0.0451
8	0.0230
9	0.0556
10	0.0237

[0039]	50	55	60	
[0040]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
[0041]	65	70	75	80
[0042]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly			
[0043]		85	90	95
[0044]	Lys His Val Leu Pro Thr Phe			
[0045]		100		
[0046]	<210> 3			
[0047]	<211> 29			
[0048]	<212> DNA			
[0049]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0050]	<400> 3			
[0051]	gcgagactcg atrttgtgat gaccarac 29			
[0052]	<210> 4			
[0053]	<211> 29			
[0054]	<212> DNA			
[0055]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0056]	<400> 4			
[0057]	gcgtctagac tcattcctgt tgaagctct 29			
[0058]	<210> 5			
[0059]	<211> 29			
[0060]	<212> DNA			
[0061]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0062]	<400> 5			
[0063]	gcgctcgagc agktccagct gaagcagtc 29			
[0064]	<210> 6			
[0065]	<211> 28			
[0066]	<212> DNA			
[0067]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0068]	<400> 6			
[0069]	gcgactagtg catttgcagtg gaggacag 28			

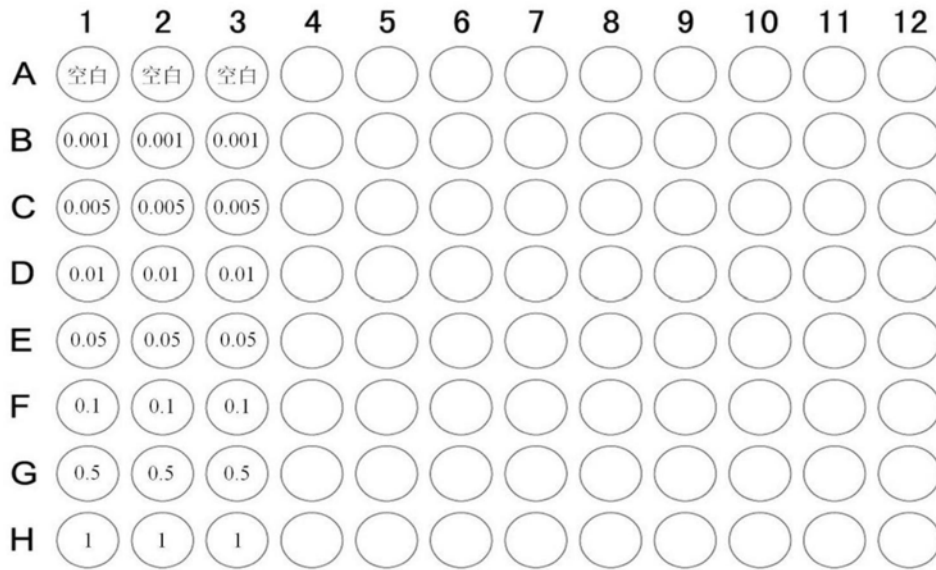


图1

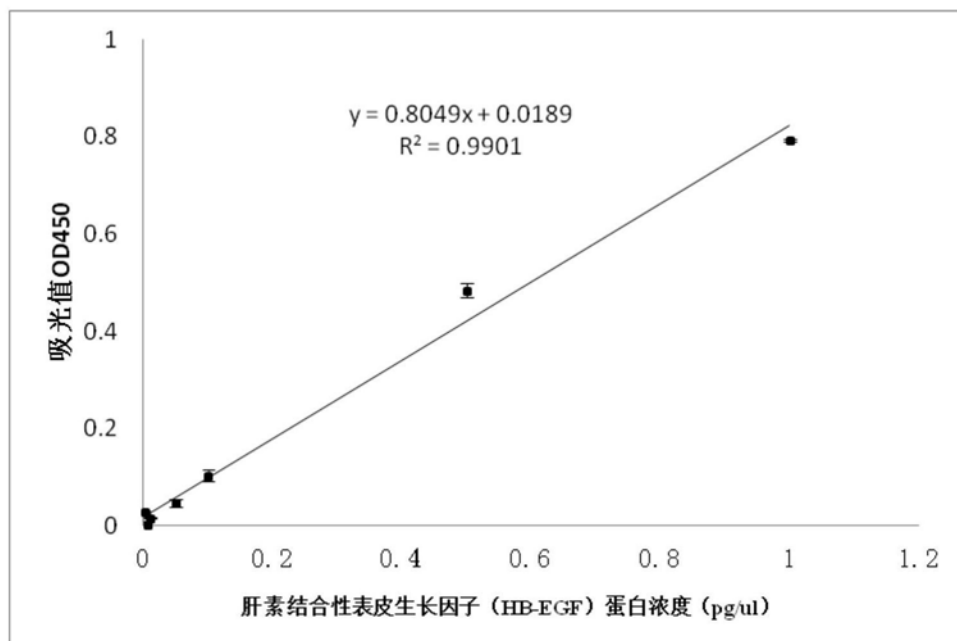


图2

专利名称(译)	一种检测肝素结合性表皮生长因子的ELISA试剂盒		
公开(公告)号	CN109580959B	公开(公告)日	2020-03-31
申请号	CN201811545063.X	申请日	2018-12-17
[标]发明人	刘晗青 屠志刚		
发明人	刘晗青 屠志刚		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/58 G01N33/577 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/577 G01N33/581 G01N33/6863		
代理人(译)	冯燕平		
其他公开文献	CN109580959A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫分析技术领域，具体涉及一种检测肝素结合性表皮生长因子的ELISA试剂盒。该试剂盒包括：预包被抗HB-EGF蛋白单克隆抗体的96孔酶标板、辣根过氧化物酶（HRP）标记的HB-EGF蛋白兔多克隆抗体、稀释液、洗涤液、显色液、终止液和HB-EGF蛋白标准品。本发明制备的双抗体夹心法检测试剂盒具有灵敏度高、特异性强、定量准确、简单易用、重现性好等特点，可检测细胞、血清、血浆和动物组织样品中HB-EGF含量，可供基础研究和临床诊断中HB-EGF蛋白的定性及定量检测，并可同时快速检测大批量样本，应用前景十分广阔。

