



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103207277 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 15

(21) 申请号 201310103321. X

(22) 申请日 2013. 03. 28

(73) 专利权人 中国人民解放军第二军医大学
地址 200433 上海市杨浦区翔殷路 800 号

(72) 发明人 夏照帆 孙瑜 唐昊 韩姝

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事
务所(普通合伙) 31268

代理人 赵青

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1649902 A, 2005. 08. 03,
V. Rebmann et al. Biochemical analysis
of plasma-soluble invariant chains and
their complex formation with soluble
HLA-DR. 《Tissue antigens》. 1997, 第 49 卷

祁永健等. 检测血浆 sCD74 有助于肺癌诊
断. 《南京医科大学学报(自然科学版)》. 2008,
第 28 卷(第 5 期),

审查员 王在竹

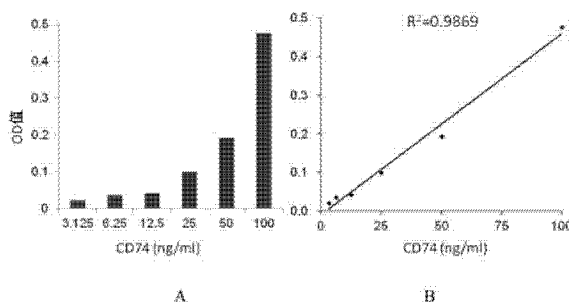
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种人源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试
剂盒及检测方法

(57) 摘要

本发明属于免疫学和生物技术领域, 本发明
提供了一种人源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测
试剂盒, 及其检测方法。本发明的试剂盒可准确检
测人体液或细胞上清中的人源性可溶型 CD74 蛋
白的含量, 结果由酶标仪定量分析, 排除了免疫组
化、免疫荧光、Western blot 等半定量方法的主观
性; 而且灵敏度高, 检测到的 CD74 蛋白最低可至
800pg/ml; 本发明检测时不需要复杂仪器, 易于
在科研院校和医疗机构中推广应用, 可大规模检
测临床标本, 快速获得人 CD74 蛋白相关的海量数
据和信息。



1. 一种人源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒,其特征在于,该试剂盒包括:
包被有人源性 CD74 抗体的 ELISA 酶标板,所述的人源性 CD74 抗体为羊抗人 CD74 抗体 C-16,抗体的包被浓度为 $0.25 \mu\text{g/ml}$;

检测人源性可溶型 CD74 抗原的抗体,为小鼠抗人 CD74 抗体 LN-2,浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$;

酶标二抗,HRP 标记的马抗小鼠 IgG,1:2000 稀释;

标准蛋白,为重组人 CD74 蛋白,R&D 公司。

2. 根据权利要求 1 所述一种人源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒,其特征在于,该试剂盒还包括:

样品稀释液、包被缓冲液、封闭液、ELISA 酶标板洗脱液、抗体稀释液、显色液,和终止液。

3. 根据权利要求 2 所述一种人源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒,其特征在于,所述的样品稀释液:样品为血清时,样品稀释液为 $1\times\text{PBS}$, pH 7.4;样品为细胞上清液时,样品稀释液为无血清培养基或 1% FCS 的培养基。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述一种人源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒,其特征在于,所述的 ELISA 酶标板为丹麦 NUNC 公司的 Maxisorp 系列 ELISA 酶标板,96 孔。

5. 根据权利要求 2 所述一种人源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒,其特征在于,所述的封闭液为 SuperBlock 的封闭液。

6. 根据权利要求 2 所述一种人源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒,其特征在于,所述的包被缓冲液为 $1\times\text{PBS}$, pH 7.4;所述的 ELISA 酶标板洗脱液为含 0.05% Tween-20 的 $1\times\text{PBS}$ 溶液;所述的抗体稀释液为 $1\times\text{PBS}$, pH7.4;所述的显色液为 Thermo 公司的 TMB substrate kit;所述的终止液为 2mol/L 的硫酸溶液。

7. 一种人源性可溶型 CD74 蛋白的抗体在制备定量检测人源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒中的应用,其特征在于,所述的 ELISA 检测试剂盒如权利要求 1 所述,利用该 ELISA 检测试剂盒定量检测人源性可溶型 CD74 蛋白的方法包括以下步骤:

血清样本或细胞上清样本,用样品稀释液以 1:10 稀释,以 $100 \mu\text{l}$ /孔的体积加样,室温孵育 2 小时;甩去各孔中的液体,加入 ELISA 酶标板洗脱液,每孔 $300 \mu\text{l}$,洗涤 3-5 次,甩干;将小鼠抗人 CD74 抗体 LN-2 稀释成 $1 \mu\text{g/ml}$,每孔 $100 \mu\text{l}$,室温孵育 2 小时;甩去各孔中的液体,加入 ELISA 酶标板洗脱液,每孔 $300 \mu\text{l}$,洗涤 3-5 次,甩干;加入 HRP 标记的马抗小鼠 IgG,每孔 $100 \mu\text{l}$,室温孵育 1 小时;甩去各孔中的液体,加入 ELISA 酶标板洗脱液,每孔 $300 \mu\text{l}$,洗涤 3-5 次,甩干;加入底物四甲基联苯胺和 H_2O_2 ,每孔 $100 \mu\text{l}$,室温避光孵育 10-15 分钟,加入 2mol/L 硫酸溶液终止反应,每孔 $50 \mu\text{l}$;在酶标仪上,450nm,测定 OD 值。

一种人源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学和生物技术领域,具体涉及一种人源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] CD74即主要组织相容性复合物 II 类分子相关恒定链(major histocompatibility complex, MHC- II -associated invariant chain, Ii),又称为 HLA-DR γ ,在人类其基因定位于 5 号染色体长臂 3 区 1 带至 3 区 3 带(5q31-q33),包含 9 个外显子。CD74 主要在树突状细胞、单核巨噬细胞、B 细胞、朗罕氏细胞等抗原递呈细胞中表达。作为 MHC- II 类分子伴侣,CD74 的主要功能与抗原递呈有关;作为 II 型膜蛋白,还有 2-5% 的 CD74 在细胞膜上表达,其功能和 MHC- II 类分子无关。近来研究发现 CD74 是巨噬细胞移动抑制因子(Macrophage Migration Inhibitory Factor, MIF)的受体,与 MIF 结合可激活 NF- κ B、ERK1/2 等信号转导途径,进而诱导炎性细胞因子的分泌;研究还发现,CD74 除了表达于抗原递呈细胞,与抗原递呈有关外,CD74 蛋白还在内皮细胞、肿瘤细胞表达,与相应疾病的发生、发展相关。

[0003] 已有研究证实 CD74 参与了某些炎症性疾病或自身免疫性疾病的发病过程。与健康人群相比,动脉粥样硬化病人的斑块和外周血单核细胞中的 CD74 表达增高。具有动脉硬化斑块形成倾向的 Ldlr 基因敲除小鼠,如同时缺失 CD74 基因,则动脉粥样硬化的程度减轻。可自发形成糖尿病的 NOD 小鼠,如果敲除 CD74 基因,则血糖水平降低。就系统性红斑狼疮而言,两种具有狼疮倾向的小鼠品系,其循环血液中 MIF 水平的升高与疾病的发展和肾小球性血管炎的形成具有密切的时间依赖关系。同时,肾脏 MIF,CD74,和 CD44 (CD74 的协同分子)mRNA 和蛋白的表达也随着炎症的发展显著升高。最近研究发现来源于系统性红斑狼疮小鼠的 B 细胞,其 MIF 和 CD74 的表达均明显增高,如激活这类 B 细胞的 MIF/CD74 通路,则可延长系统性红斑狼疮小鼠的存活时间。

[0004] 慢性炎症的病程后期组织发生恶变可形成肿瘤。幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, HP)感染时,胃上皮的 CD74 表达明显增加。HP 的尿素酶可直接与胃上皮的 CD74 蛋白结合,结合的同时促进 CD74 基因和蛋白的表达。细胞表面累积的 CD74 导致了胃上皮的持续炎症。CD74 的配体 MIF 在 HP 感染时也显著增高。MIF 通过结合 CD74 激活胞内信号途径 NF- κ B 和 ERK1/2,促进炎性细胞因子的产生,加快细胞增殖和延长细胞存活。由 HP 引发的长期炎症刺激可演变成为慢性胃炎,形成胃溃疡,并最终引发胃的恶性病变。

[0005] CD74 不仅是 MHC- II 类分子伴侣,并参与炎症和自身免疫性疾病的发病过程,而且近年多篇文献报道 CD74 和多种肿瘤的发生发展相关。如 Ishinami 等研究发现,CD74 表达阴性的胃癌患者术后预后优于 CD74 表达阳性的患者;Nagata 等发现 CD74 可作为预测胰腺腺癌的生物分子标志物。此外,CD74 及其配体 MIF 在多种肿瘤中高表达,如肺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、膀胱癌、肾癌。在慢性淋巴细胞白血病中,MIF/CD74 通过 NF- κ B 途径促进 B 细胞分泌 IL-8,分泌的 IL-8 进一步诱导了抗凋亡蛋白 Bcl-2 的转录和翻译,从而促进了 B 细胞的

存活。此外,MIF/CD74 还能通过上调 TAp63 直接调控 Bcl-2 蛋白,从而影响 B 细胞的存活。Hertlein 等发现在慢性淋巴细胞白血病患者中,疗效甚好的 CD74 单克隆抗体 Milatuzumab 并不像其他单抗那样通过特异性结合细胞膜蛋白,发生抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用杀死靶细胞,而是通过上调靶细胞膜表面 CD74 的表达引起细胞凋亡达到治疗目的。

[0006] 上述研究表明 CD74 在炎症和肿瘤中发挥了重要的作用,可能成为这些疾病的生物标记物,亦可能成为相关疾病的疗效判定和预后指标。

[0007] 以往对 CD74 表达的研究主要是采用免疫组化、免疫荧光、Western blot 以及 RT-PCR 等半定量的方法。通过资料检索,国内外尚无任何关于定量检测人源性 CD74 蛋白的报道,且目前仍无法确定 CD74 蛋白是否存在可溶型形式。

[0008] 最新研究发现 CD74 是参与调控性内膜蛋白水解(Regulated Intramembrane Proteolysis, RIP)过程的家族一员。作为 II 型跨膜蛋白,在受外界刺激或应激状态下,CD74 的胞外段首先在蛋白酶的作用下被剪切后与细胞膜分离,同时暴露内膜蛋白酶结合位点;随后在内膜蛋白酶的水解下,CD74 的胞内段与细胞膜分离,并转移至细胞核作为转录因子启动相关基因的转录。这个在内膜蛋白酶作用下发生的跨膜蛋白胞内段的信号传递过程称为 RIP。CD74 的 RIP 过程已在 B 细胞的成熟和分化中被证实。参与 RIP 过程的 CD74 蛋白,其胞外段必须先与细胞膜分离暴露内膜蛋白酶结合位点才能继续完成 RIP 的过程。根据上述理论,与细胞膜分离的 CD74 胞外段是否就是可溶型的 CD74 (soluble CD74, sCD74) 呢?目前对于 sCD74 的研究国内外尚属空白。

[0009] 许多细胞因子的膜受体都存在可溶型形式。这些可溶型细胞因子受体以其多种方式在人体内发挥相应的生理和病理作用。以往研究证实部分可溶型膜分子在相关疾病的诊断、发病机制和治疗中发挥重要作用,例如 sIL-1R, sIL-6R。鉴于 sCD74 存在的可能性,以及 CD74 在炎症、自身免疫性疾病以及肿瘤等病人的组织细胞中异常高表达,因而有必要开发针对实验室或临床生物样本中 sCD74 的定量检测方法,从而有望将 sCD74 作为一种新的生物标记物,为疾病的诊断、病程判断、疗效观察、指导用药及预后提供一种辅助判定指标,也为进一步研究 sCD74 蛋白的功能奠定基础。

发明内容

[0010] 本发明的目的是提供一种人源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒,本发明的另一目的是提供利用上述试剂盒的检测方法。本发明旨在为检测临床和实验室样品中人源性可溶型 CD74 蛋白含量提供准确、简便、灵敏度高、并可被广泛使用的检测手段。

[0011] 本发明采用的技术方案如下:

[0012] 本发明利用 ELISA 技术建立了检测人源性可溶型 CD74 蛋白的试剂盒,并首次证实某些病理状态下人的血清和细胞上清中存在可溶型 CD74。

[0013] 本发明第一方面,提供了一种人源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒,主要包括:

[0014] 包被有人源性 CD74 抗体的 ELISA 酶标板,所述的人源性 CD74 抗体为羊抗人 CD74 抗体 C-16;

[0015] 检测人源性可溶型 CD74 抗原的抗体,为小鼠抗人 CD74 抗体 LN-2;

[0016] 酶标二抗,HRP (辣根过氧化物酶) 标记的马抗小鼠 IgG;

- [0017] 标准蛋白,为重组人 CD74 蛋白,R&D 公司;
- [0018] 所述的试剂盒,还包括有:
- [0019] 常规的样品稀释液、包被缓冲液、封闭液、ELISA 酶标板洗脱液、抗体稀释液、显色液,和终止液。
- [0020] 所述的试剂盒,ELISA 酶标板为市售的 ELISA 酶标板,较优地,可选用丹麦 NUNC 公司的 Maxisorp 系列 ELISA 酶标板(96 孔,#44-2404)。
- [0021] 包被缓冲液,较优的为 1×PBS, pH:7.4;
- [0022] 封闭液,较优的为 SuperBlock 的封闭液;
- [0023] ELISA 酶标板洗脱液,较优的为含 0.05%Tween-20 的 1×PBS 溶液
- [0024] 样品稀释液:样品为血清时,较优的为 1×PBS, pH:7.4;样品为细胞上清液时,较优的为无血清培养基或 1%FCS 的培养基。
- [0025] 抗体稀释液,较优的为 1×PBS, pH:7.4;
- [0026] 显色液,较优的为 Thermo 公司的 TMB substrate kit (#34021);
- [0027] 终止液,较优的为 2mol/L 的硫酸溶液。
- [0028] 本发明的试剂盒所用试剂、条件进一步优化:分别选用不同的包被抗体(C-16)浓度:5 μg/ml,2.5 μg/ml,1 μg/ml,0.5 μg/ml,0.25 μg/ml,0.125 μg/ml 包被 ELISA 酶标板。结果发现 C-16 的最佳抗体包被浓度为 0.25 μg/ml。
- [0029] 本发明的试剂盒,分别选用不同的封闭液:含 1%牛血清白蛋白+1%蔗糖的 PBS 溶液,含 5%牛血清白蛋白+1%蔗糖的 PBS 溶液,SuperBlock 的封闭液;封闭时间选择室温 1 小时,室温 2 小时,4℃过夜。结果发现最佳封闭液和封闭时间为 SuperBlock 的封闭液(Thermo 公司的 SuperBlock Blocking Buffer in PBS,#37515)室温封闭 2 小时为最佳组合。
- [0030] 本发明的试剂盒,分别选用不同的检测抗体:LN-2(小鼠抗人 CD74 抗体,BD Pharmingen 公司,#555612)、M-B741(小鼠抗人的 CD74 抗体,BD Pharmingen 公司,#555538),检测浓度选用 5 μg/ml,2.5 μg/ml,1 μg/ml,0.5 μg/ml,0.25 μg/ml,0.125 μg/ml。结果发现最佳检测抗体和工作浓度为 LN-2 的工作浓度 1 μg/ml 为最佳配伍。
- [0031] 本发明的试剂盒,分别选用不同的酶标二抗:马抗小鼠 HRP 标记的 IgG 抗体(Cell Signaling 公司,#7076),驴抗小鼠 HRP 标记的 IgG 抗体(Thermo 公司,#PA1-28748),羊抗小鼠 HRP 标记的 IgG 抗体(Santa Cruz 公司,#sc-2005)抗体稀释倍数选择 1:1000,1:2000,1:3000,1:5000,1:10000。结果发现最佳酶标二抗和稀释浓度为马抗小鼠 HRP 标记的 IgG 抗体,1:2000 稀释为最佳。
- [0032] 本发明的试剂盒,分别选用不同的样品稀释液:(1)血清样本检测时样品稀释液选用 1×PBS (pH:7.4)或含 0.1%BSA,0.5%Tween-20 的 1×TBS 溶液。结果发现最佳血清样本稀释液为 1×PBS (pH:7.4)优于含 0.1%BSA,0.5%Tween-20 的 1×TBS 溶液。(2)细胞上清样本检测时样本稀释液分别选用无血清培养基、1%FCS 的培养基和 10%FCS 的培养基。结果发现最佳细胞上清样本稀释液为无血清培养基或 1%FCS 的培养基。
- [0033] 本发明的试剂盒,检测前:
- [0034] 包被缓冲液将抗 C-16 表位的人源性 CD74 抗体(C-16,#sc-5438,Santa Cruz)稀释成 250ng/ml,在 ELISA 酶标板的每孔中加入 100 μl,封板后置于 4℃孵育过夜;甩去各孔中的液体,用新鲜配置的 ELISA 酶标板洗脱液,每孔 300 μl,洗涤 3-5 次,甩干;加入 ELISA

酶标板封闭液,每孔 200 μ l,室温孵育 2 小时;甩去各孔中的液体,加入 ELISA 酶标板洗脱液,每孔 300 μ l,洗涤 3-5 次,甩干;放于 4 $^{\circ}$ C,备用。

[0035] 本发明的第二方面,是提供利用上述的人源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒定量检测人源性可溶型 CD74 蛋白的方法,该方法包括以下步骤:

[0036] 血清样本或细胞上清样本,用样品稀释液以 1:10 稀释,以 100 μ l/孔的体积加样,室温孵育 2 小时;甩去各孔中的液体,加入 ELISA 酶标板洗脱液,每孔 300 μ l,洗涤 3-5 次,甩干;将抗 LN-2 表位的人源性 CD74 抗体(LN-2,#555612,BD Pharmingen)稀释成 1 μ g/ml,每孔 100 μ l,室温孵育 2 小时;甩去各孔中的液体,加入 ELISA 酶标板洗脱液,每孔 300 μ l,洗涤 3-5 次,甩干;加入 HRP 标记的马抗小鼠 IgG,每孔 100 μ l,室温孵育 1 小时;甩去各孔中的液体,加入 ELISA 酶标板洗脱液,每孔 300 μ l,洗涤 3-5 次,甩干;加入底物四甲基联苯胺 H₂O₂,每孔 100 μ l,室温避光孵育 10-15 分钟,加入 2mol/L 硫酸溶液终止反应,每孔 50 μ l;在酶标仪上(450nm)测定 OD 值。

[0037] 本发明的有益效果:

[0038] 1)准确:目前市场上无商业化的人源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒,经文献检索没有定量检测人源性可溶型 CD74 蛋白含量的方法,因此对于人的体液或细胞上清中的人源性可溶型 CD74 蛋白无法精确定量。此 ELISA 试剂盒可准确检测人体液或细胞上清中的人源性可溶型 CD74 蛋白的含量,结果由酶标仪定量分析,排除了免疫组化、免疫荧光、Western blot 等半定量方法的主观性。

[0039] 2)灵敏度高:用该方法检测到的 CD74 蛋白最低可至 800pg/ml,敏感性明显高于普通的 western blot 和免疫组化等半定量方法。

[0040] 3)简单方便:本方法中所用试剂和实验耗材均为市售商业化产品,容易获得;检测中仅需移液器和酶标仪进行加样和读数,普通的实验室均可开展此项检测。

[0041] 本发明提供的 ELISA 试剂盒操作简单方便,可准确、高灵敏度地检测到人的体液或细胞上清中的可溶型 CD74 蛋白含量,为基础实验和临床检验提供了一种新的手段和方法。

[0042] 本发明的试剂盒可用于自身免疫性疾病、各种炎症、肿瘤等病人的体液样品中可溶型 CD74 蛋白的定量检测,基础研究中各种生物学样品(如细胞培养上清液、细胞裂解液)中的 CD74 蛋白的检测。

[0043] 本发明检测时不需要复杂仪器,易于在科研院校和医疗机构中推广应用,可大规模检测临床标本,快速获得人 CD74 蛋白相关的海量数据和信息,为 CD74 相关的基础和临床医学研究推波助澜,具有广阔的市场前景和较大的经济、社会效益。

附图说明

[0044] 图 1 是 Western blot 方法检测血清标本中人源性可溶型 CD74 蛋白;

[0045] 图 2 是双抗体夹心 ELISA 方法检测人源性 CD74 蛋白的结果,

[0046] 其中 A 图为柱状图,B 图为散点图(呈线性相关),

[0047] $y=0.0047 \times -0.0084R^2=0.9869$;

[0048] 图 3 是双抗体夹心 ELISA 方法检测人慢性 B 淋巴细胞性白血病细胞培养上清液中 CD74 蛋白的结果;

[0049] 图 4 是双抗体夹心 ELISA 方法检测心脏手术病人术中收集获得的血清中 CD74 蛋白的结果。

具体实施方式

[0050] 现结合实施例和附图,对本发明作进一步描述,但本发明的实施并不仅限于此。

[0051] 实施例 1:

[0052] 检测 ELISA 酶标板的制备:包被缓冲液将抗 C-16 表位的人源性 CD74 抗体稀释成 250ng/ml,在 ELISA 酶标板的每孔中加入 100 μ l,封板后置于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;甩去各孔中的液体,用新鲜配置的 ELISA 酶标板洗脱液,每孔 300 μ l,洗涤 3-5 次,甩干;加入 ELISA 酶标板封闭液,每孔 200 μ l,室温孵育 2 小时;甩去各孔中的液体,加入 ELISA 酶标板洗脱液,每孔 300 μ l,洗涤 3-5 次,甩干;放于 4 $^{\circ}$ C,备用。

[0053] 血清样本和标准蛋白的检测:血清样本用样品稀释液以 1:10 稀释,以 100 μ l/孔的体积加样,室温孵育 2 小时;标准蛋白用样品稀释液稀释成不同浓度梯度,以 100 μ l/孔的体积加样,室温孵育 2 小时;甩去各孔中的液体,加入 ELISA 酶标板洗脱液,每孔 300 μ l,洗涤 3-5 次,甩干;将抗 LN-2 表位的人源性 CD74 抗体稀释成 1 μ g/ml,每孔 100 μ l,室温孵育 2 小时;甩去各孔中的液体,加入 ELISA 酶标板洗脱液,每孔 300 μ l,洗涤 3-5 次,甩干;加入 HRP 标记的马抗小鼠 IgG,每孔 100 μ l,室温孵育 1 小时;甩去各孔中的液体,加入 ELISA 酶标板洗脱液,每孔 300 μ l,洗涤 3-5 次,甩干;加入底物,四甲基联苯胺 H₂O₂,每孔 100 μ l,室温避光孵育 10-15 分钟,加入 2mol/L 硫酸溶液终止反应,每孔 50 μ l;在酶标仪上(450nm)测定 OD 值。

[0054] 实施例 2:条件的优化

[0055] 1、包被抗体浓度的优化:

[0056] 分别选用不同的包被抗体(C-16)浓度(5 μ g/ml,2.5 μ g/ml,1 μ g/ml,0.5 μ g/ml,0.25 μ g/ml,0.125 μ g/ml)包被 ELISA 酶标板,按照实施例 1 中的操作步骤进行检测,加入已知的不同浓度 CD74 蛋白标准品。根据获得的 OD 值,选择空白组 OD 值最小,且 OD 值和标准蛋白浓度之间的线性关系最为密切的作为最佳抗体包被浓度。C-16 的最佳抗体包被浓度为 0.25 μ g/ml。

[0057] 2、封闭液的优化:

[0058] 封闭液选用含 1% 牛血清白蛋白 +1% 蔗糖的 PBS 溶液,含 5% 牛血清白蛋白 +1% 蔗糖的 PBS 溶液,SuperBlock 的封闭液;封闭时间选择室温 1 小时,室温 2 小时,4 $^{\circ}$ C 过夜。按照实施例 1 中的操作步骤进行检测,加入已知的不同浓度 CD74 蛋白标准品,选择空白组 OD 值最小,且 OD 值和标准蛋白浓度之间的线性关系最为密切的作为最佳封闭液和封闭时间。SuperBlock 的封闭液室温封闭 2 小时为最佳组合。

[0059] 3、检测抗体的优化:

[0060] 检测抗体选用 LN-2 或 M-B741(小鼠抗人的 CD74 抗体,BD Pharmingen,#555538),检测浓度选用(5 μ g/ml,2.5 μ g/ml,1 μ g/ml,0.5 μ g/ml,0.25 μ g/ml,0.125 μ g/ml)。按照实施例 1 中的操作步骤进行检测,加入已知的不同浓度 CD74 蛋白标准品,选择空白组 OD 值最小,且 OD 值和标准蛋白浓度之间的线性关系最为密切的作为最佳检测抗体和工作浓度。LN-2 的工作浓度 1 μ g/ml 为最佳配伍。

[0061] 4、酶标二抗的优化：

[0062] 酶标二抗选用马抗小鼠 HRP 标记的 IgG 抗体，驴抗小鼠 HRP 标记的 IgG 抗体，羊抗小鼠 HRP 标记的 IgG 抗体，抗体稀释倍数选择 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:5000, 1:10000。按照实施例 1 中的操作步骤进行检测，加入已知的不同浓度 CD74 蛋白标准品，选择空白组 OD 值最小，且 OD 值和标准蛋白浓度之间的线性关系最为密切的作为最佳酶标二抗和稀释浓度。马抗小鼠 HRP 标记的 IgG 抗体，1:2000 稀释为最佳。

[0063] 5、样品稀释液的优化：

[0064] 病人血清样本检测时样品稀释液选用 1×PBS (pH:7.4) 或含 0.1%BSA, 0.5%Tween-20 的 1×TBS 溶液，按照实施例 1 中的操作步骤进行检测，加入有可溶型 CD74 蛋白的阳性血清样本，选择血清样本稀释后稀释倍数与 OD 值的线性关系最为密切的为最佳血清样本稀释液。1×PBS (pH:7.4) 优于含 0.1%BSA, 0.5%Tween-20 的 1×TBS 溶液，为较优血清样本稀释液。细胞上清样本检测时样品稀释液分别选用无血清培养基、1%FCS 的培养基和 10%FCS 的培养基，按照实施例 1 中的操作步骤进行检测，加入已知的不同浓度 CD74 蛋白标准品，选择 OD 值和标准蛋白浓度之间的线性关系最为密切的作为最佳细胞上清样本稀释液。无血清培养基、1%FCS 的培养基均可作为细胞上清的样本稀释液。

[0065] 实施例 3：人源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 试剂盒的特异性和敏感性评价

[0066] 1、特异性试验

[0067] 用所建立的 ELISA 方法检测 100 例心脏手术病人的血清样本，将重组的 CD74 标准蛋白作为阳性对照，根据所得 OD 值将血清样本分为有可溶型 CD74 蛋白的阳性标本 (sCD74⁺血清) 和无可溶型 CD74 蛋白的阴性标本 (sCD74⁻血清)，进一步用 Western blot 方法进行验证。将阳性标本和阴性标本分别稀释 8 倍，16 倍和 32 倍，SDS page 电泳后，用不同于 ELISA 方法中的小鼠抗人 CD74 抗体 (MB741, #555538, BD Pharmingen) 检测，如图 1 所示阳性标本 (6B 和 6C) 和标准蛋白均能检测出 CD74 蛋白，阴性标本 (10B) 未能检测出明显的 CD74 蛋白。

[0068] 2、敏感性试验

[0069] 将重组的 CD74 标准蛋白 (100ng/ml) 用 1×PBS 作 2 倍比连续稀释，并排设置 2 个复孔，得出标准蛋白各个稀释点的平均 OD 值与空白组 OD 值有统计学差异的最高稀释倍数。CD74 标准蛋白稀释 128 倍后的 OD 值与空白组 OD 值仍有统计学差异，表明可检测的可溶型 CD74 蛋白最低浓度为 800pg/ml。

[0070] 实施例 4：ELISA 试剂盒检测重组人源性 CD74 蛋白

[0071] 将重组人源性 CD74 标准蛋白倍比稀释，从 100ng/ml 开始稀释，连续稀释 6 个浓度，100ng/ml, 50ng/ml, 25ng/ml, 12.5ng/ml, 6.25ng/ml, 3.125ng/ml，每个样品设置 3 个复孔，100 μl/孔，按照实施例 1 的步骤重复检测 3 次，结果相似，如图 2 所示，重组人源性 CD74 蛋白与抗体的反应具有良好的浓度依赖关系，且成明显的直线相关。

[0072] 实施例 5：ELISA 试剂盒检测人慢性 B 淋巴细胞性白血病细胞 (CLL) 上清液中的可溶型 CD74 蛋白

[0073] 根据文献报道，PMA 或抗 CD74 抗体 (C-16) 作用于 B 细胞后可切断全长的 CD74 蛋白，从而使得 CD74 蛋白的细胞外部分从细胞上脱落。我们收集分别用 PMA、CD74 抗体或 PMA+CD74 抗体刺激后的细胞上清液，按照实施例 1 的操作步骤，检测上清液中的 CD74 蛋白

浓度。结果如图 3,经 CD74 抗体或 PMA 刺激 30min 后,上清液中的 CD74 含量均显著升高,两者共同作用后可达 150ng/ml,而未刺激的空白对照上清液中则测不出 CD74 的含量。

[0074] 实施例 6 :ELISA 试剂盒检测心脏手术病人术中收集获得的血清中可溶型 CD74 蛋白浓度

[0075] 收集具有心脏基础疾病需行心脏手术的病人血清 100 例,按照实施例 1 的操作步骤,检测血清中可溶型 CD74 蛋白浓度。如图 4 所示,100 例病人中有 14 例病人检测所获的 OD 值高于空白对照组 OD 值,其他 86 例病人低于或等于空白对照组 OD 值,表明 14 例病人的血清中可检测出 CD74 蛋白,其他 86 例病人未能检测出 CD74 蛋白,或蛋白浓度低于 800pg/ml。

[0076] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征和本发明的优点。本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理,在不脱离本发明精神和范围的前提下本发明还会有各种变化和改进,这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等同物界定。

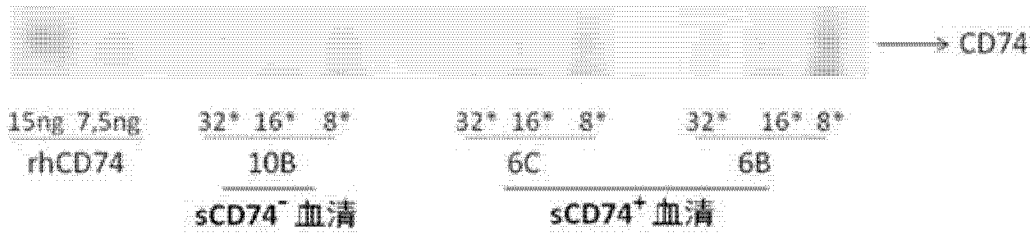


图 1

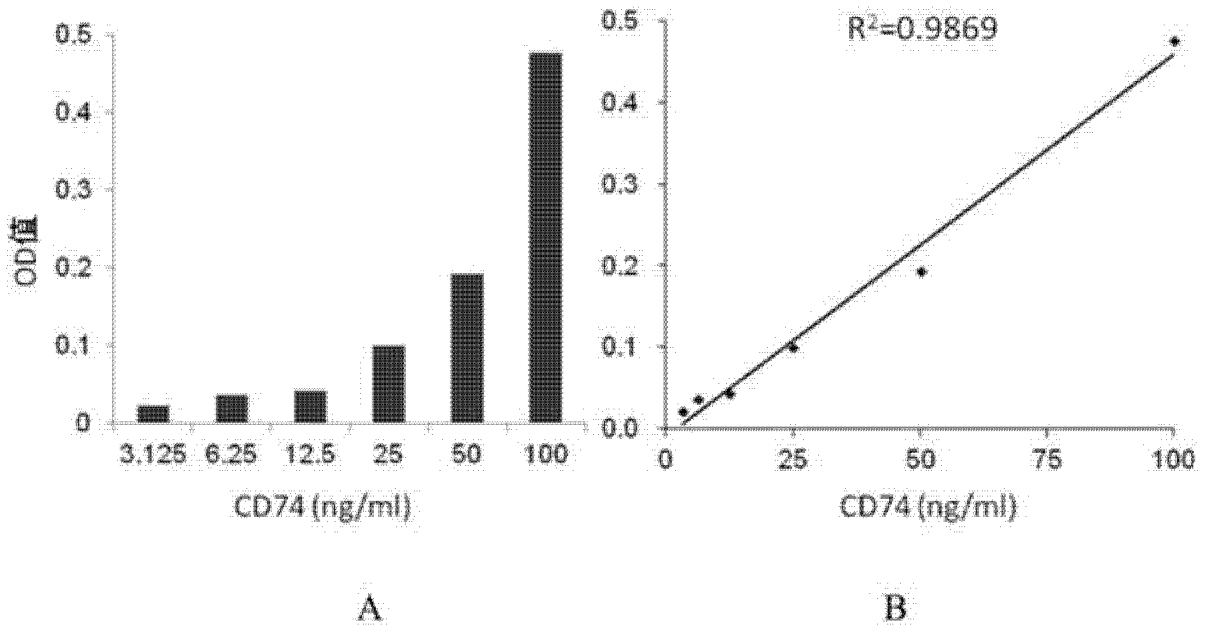


图 2

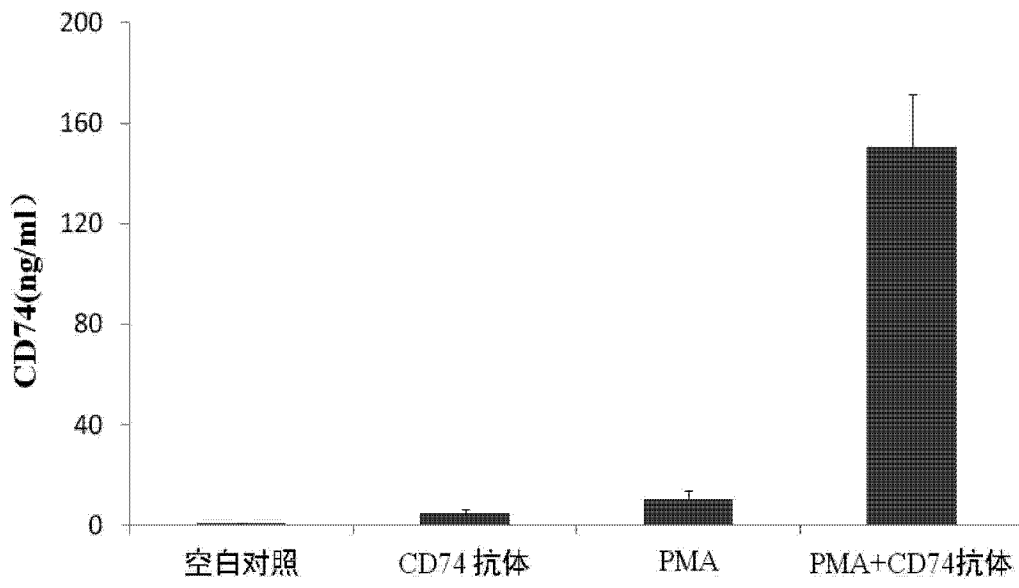


图 3

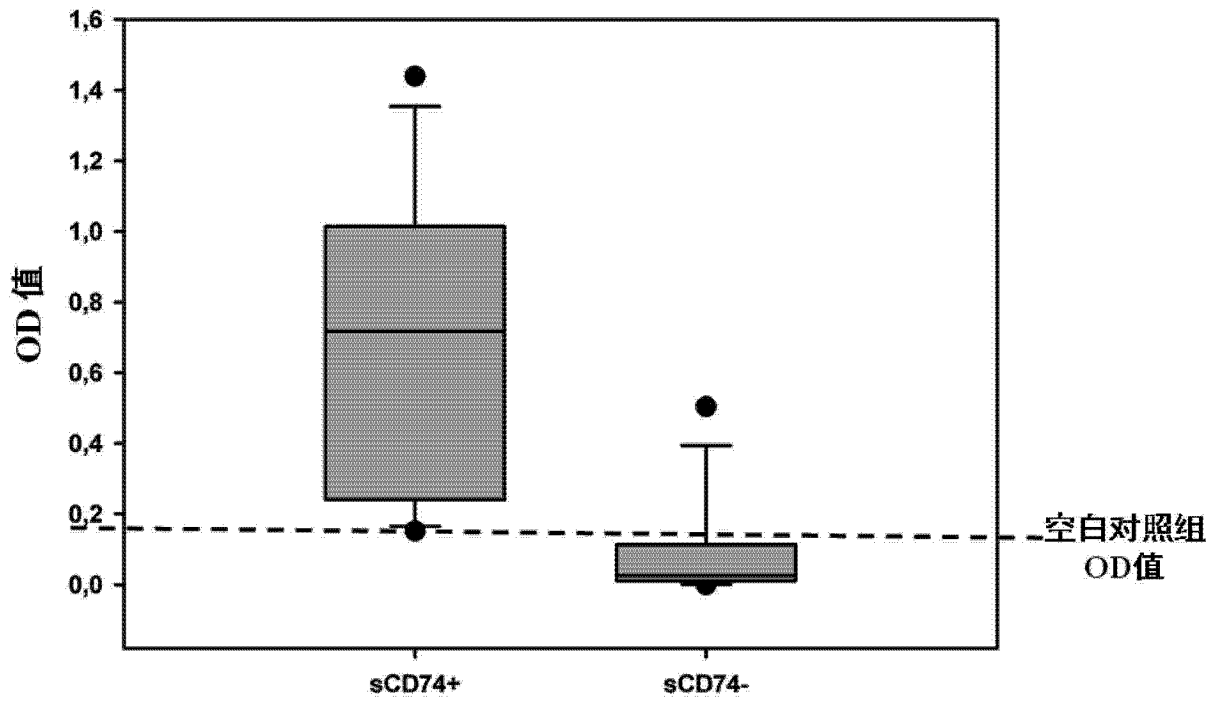


图 4

专利名称(译)	一种人源性可溶型CD74蛋白的ELISA检测试剂盒及检测方法		
公开(公告)号	CN103207277B	公开(公告)日	2015-04-15
申请号	CN201310103321.X	申请日	2013-03-28
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学		
[标]发明人	夏照帆 孙瑜 唐昊 韩姝		
发明人	夏照帆 孙瑜 唐昊 韩姝		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
代理人(译)	赵青		
其他公开文献	CN103207277A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫学和生物技术领域，本发明提供了一种人源性可溶型CD74蛋白的ELISA检测试剂盒，及其检测方法。本发明的试剂盒可准确检测人体液或细胞上清中的人源性可溶型CD74蛋白的含量，结果由酶标仪定量分析，排除了免疫组化、免疫荧光、Western blot等半定量方法的主观性；而且灵敏度高，检测到的CD74蛋白最低可至800pg/ml；本发明检测时不需要复杂仪器，易于在科研院校和医疗机构中推广应用，可大规模检测临床标本，快速获得人CD74蛋白相关的海量数据和信息。

