



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104280553 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 14

(21) 申请号 201410486924. 7

(22) 申请日 2014. 09. 22

(71) 申请人 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 伍国胜 孙瑜 唐昊 陈郑礼  
王星童 唐洪泰

(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)

权利要求书2页 说明书8页 附图6页

(54) 发明名称

一种小鼠源性可溶型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,本发明提供了一种小鼠源性可溶型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小鼠体液中的可溶型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781.25pg/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,可大规模检测基础研究生物标本,快速获得小鼠CD74蛋白相关的海量数据和信息。

1. 一种小鼠源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒,其特征在于,该试剂盒包括:包被 ELISA 酶标板的小鼠源性 CD74 抗体,为绵羊抗小鼠 CD74 抗体;检测小鼠源性可溶型 CD74 的抗体,为大鼠抗小鼠 CD74 单克隆抗体;酶标二抗,为辣根过氧化物酶标记的山羊抗大鼠 IgG;标准蛋白,为重组鼠 CD74 蛋白。
2. 根据权利要求 1 所述的一种小鼠源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒,其特征在于,所述的绵羊抗小鼠 CD74 抗体为 R&D Systems 公司的 AF7478,工作浓度为 0.25ug/ml。
3. 根据权利要求 1 所述的一种小鼠源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒,其特征在于,所述的大鼠抗小鼠 CD74 单克隆抗体为 R&D Systems 公司的 MAB7478,工作浓度为 1 μg/ml。
4. 根据权利要求 1 所述的一种小鼠源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒,其特征在于,所述的辣根过氧化物酶标记的山羊抗大鼠抗体为 CellSignaling 公司的 #7077。
5. 根据权利要求 1 所述的一种小鼠源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒,其特征在于,所述的重组鼠 CD74 蛋白为 R&D Systems 公司的 7478-CD。
6. 根据权利要求 1 至 5 任一所述的一种小鼠源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒,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。
7. 根据权利要求 6 所述的一种小鼠源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒,其特征在于,所述的样品稀释液:样品为血清或肺泡灌洗液时,样品稀释液为 1×PBS, pH:7.4。
8. 根据权利要求 6 所述的一种小鼠源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒,其特征在于,所述的封闭液,为 Thermo 公司的 SuperBlock 封闭缓冲液。
9. 根据权利要求 6 所述的一种小鼠源性可溶型 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×PBS, pH:7.4;所述的 ELISA 酶标板洗脱液为含 0.05% Tween-20 的 1×PBS 溶液;所述的抗体稀释液为 1×PBS, pH:7.4;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。
10. 一种如权利要求 1 所述的小鼠源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测方法,其特征在于,该方法包括如下步骤:

用 CD74 蛋白多克隆抗体包被 ELISA 酶标板,封闭液封闭后,分别加入标准重组鼠 CD74 蛋白和待测样品的稀释液,再加入 CD74 蛋白单克隆抗体,然后加酶标二抗,洗涤后加底物显色,用酶标仪在 450nm 波长下测定 OD 值,制的标准重组鼠 CD74 蛋白的标准曲线,通过标准曲线计算待测样品中可溶型 CD74 蛋白的浓度。
11. 根据权利要求 10 所述的小鼠源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测方法,其特征在于,该方法为:

包被缓冲液将 AF7478 稀释成 0.25 μg/ml,在 ELISA 酶标板的每孔中加入 100 μl,封板后置于 4℃ 孵育过夜;用新鲜配置的 ELISA 酶标板洗脱液,每孔 300 μl,全自动洗板机 E1x50 洗涤 3-5 次,吸水纸上拍干;加入 ELISA 酶标板封闭液,每孔 200 μl,室温孵育 2 小时;同前法用 ELISA 酶标板洗脱液,每孔 300 μl,洗涤 3-5 次,拍干;放于 4℃,备用;

血清样本或 BALF 样本,用样品稀释液以 1:2 稀释,以 100 μl/孔的体积加样,室温孵育 2 小时;同前法用 ELISA 酶标板洗脱液,每孔 300 μl,洗涤 3-5 次,拍干;将 CD74 抗体

MAB7478 稀释成  $1 \mu\text{g/ml}$ , 每孔  $100 \mu\text{l}$ , 室温孵育 2 小时; 同前法用 ELISA 酶标板洗脱液, 每孔  $300 \mu\text{l}$ , 洗涤 3-5 次, 拍干; 加入 HRP 标记的山羊抗大鼠 IgG, 每孔  $100 \mu\text{l}$ , 室温孵育 1 小时; 同前法用 ELISA 酶标板洗脱液, 每孔  $300 \mu\text{l}$ , 洗涤 5-7 次, 拍干; 加入底物四甲基联苯胺 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 每孔  $100 \mu\text{l}$ , 室温避光孵育 10-15 分钟, 加入  $2\text{mol/L}$  硫酸溶液终止反应, 每孔  $50 \mu\text{l}$ ; 在酶标仪上 450nm 测定 OD 值。

## 一种小鼠源性可溶型 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,具体涉及一种小鼠源性可溶型 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), 是一种非多态性 II 型跨膜糖蛋白, 可分为膜内段、跨膜段及膜外段。CD74 主要存在于细胞内, 作为 MHC- II 类分子的分子伴侣, 促进内质网加工释放 MHC II 类分子, 转运至胞内体, 阻止 MHC II 类分子在内质网内与内源性多肽结合。此外, 约 2-5% 的 CD74 表达于细胞表面, 如 B 细胞系、上皮细胞、单核细胞等, 且不依附于 MHC II 类分子, 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) 的高亲和力膜受体, 与 MIF 结合可激活 NF- $\kappa$  B、ERK1/2 等信号转导途径, 进而诱导炎性细胞因子的分泌。

[0003] 已有研究证实胞内及胞膜上 CD74 参与了某些炎症性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤的发病过程。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。研究发现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, 且 CD74 的表达与血管内皮厚度相关, 提示 CD74 可作为动脉粥样硬化的生物学诊断指标和治疗靶点。此外, MIF 与肺泡巨噬细胞膜表面 CD74 作用, 活化 ERK1/2 信号通路, 诱导中性粒细胞在肺泡腔的聚集, 抗 -CD74 抗体可阻断上述过程, 提示 CD74 参与 MIF 介导的肺炎反应。正常生理情况下, 尿路上皮细胞膜表面不表达或少量表达 CD74, 不会参与 MIF 启动的信号通路。炎症条件下, 神经递质 P 物质可上调尿路上皮细胞 MIF 和 CD74 的表达, 参与膀胱炎症反应。在细胞因子 IFN- $\gamma$  的刺激下, 胃粘膜上皮细胞表面 CD74 表达增加, 伴随幽门螺旋杆菌量上升; 使用抗 CD74 抗体或 CD74 水解酶后, 附着细菌量则减少。研究发现幽门螺旋杆菌感染后两周, MIF 和 CD74 的表达均增加, MIF 通过结合 CD74 激活胞内信号途径 NF- $\kappa$  B 和 ERK1/2, 促进炎性细胞因子的产生, 加快细胞增殖和抑制细胞凋亡, 长期炎症刺激可演变成慢性胃炎, 形成胃溃疡, 并最终引发胃的恶性病变。

[0004] 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。

[0005] 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手术预后优于 CD74 表达阳性的患者; Nagata 等发现 CD74 可作为预测胰腺癌的生物分子标志物。此外, CD74 及其配体 MIF 也参与多种肿瘤的发生。MIF 结合 CD74, 活化 NF- $\gamma$  B, 上调 Tap63, 分泌炎性因子 IL-8, 促进慢性淋巴细胞白血病细胞的存

活。MIF 与异位表达于人胚胎肾细胞 293 (HEK293) 的 CD74 结合, 激活 ERK 和 PI3K/AKT 信号通路, 继而活化 NF- $\gamma$  B, 上调血管内皮细胞生长因子 D, 促进肿瘤的生长和转移。

[0006] CD74 介导的信号通路不仅参与疾病的发生, 也参与保护损伤的脏器。在肺炎症后期, MIF 与 CD74 结合可诱导肺 II 型上皮细胞 (AEC- II) 的增殖, 促进肺泡上皮细胞的修复。MIF 作用于 CD74 可激活心肌细胞单磷酸腺苷激活的蛋白激酶 (adenosine mono phosphate-activated protein kinase, AMPK) 信号通路, 促进葡萄糖的摄取, 保护心肌细胞免受缺血再灌注损伤。Heinrichs 等人发现 MIF 作用于 CD74 激活肝星状细胞内 AMPK 信号通路, 抑制肝星状细胞增殖, 具有抗纤维化作用。

[0007] 上述研究表明 CD74 在炎症、自身免疫性疾病、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。

[0008] 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。本申请人前期已设计出人源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测方法, 并成功运用于临床研究 (中国专利申请 CN201310103321. X, 发明名称为“一种人源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒及检测方法”, 公开号为 CN103207277A)。Assis 也于 2013 年 8 月报道了一种检测人源性可溶型 CD74 的 ELISA 方法, 推测可溶型 CD74 为胞膜上 CD74 的胞外片段, 是在蛋白酶的作用下被剪切后释放至外周循环或体液中的, 并可中和 MIF 的功能。然而可溶型 CD74 的作用究竟是抵抗 MIF 还是协同 MIF, 还有很多未知, 相关的研究才刚刚起步 (David N. Assis, et al. The role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in autoimmune liver disease, *Hepatology*. 2014, 59 (2) :580-91.)。

[0009] 由于小鼠源性 CD74 与人源性 CD74 存在种属特异性, 前期我们采用人源性可溶型 CD74 的 ELISA 检测方法 (CN103207277A) 未能检测出小鼠源性可溶型 CD74 蛋白。并且, 目前国内外尚无任何关于定量检测小鼠源性可溶型 CD74 蛋白的报道, 对基础研究造成一定的阻碍, 因而有必要开发针对基础实验生物样本中可溶型 CD74 的定量检测方法, 为进一步研究 CD74 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小鼠源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒, 本发明的另一目的在于提供利用上述试剂盒的一种小鼠源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测方法, 本发明旨在为基础研究中小鼠源性可溶型 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] 本发明的第一方面, 提供了一种小鼠源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒, 该试剂盒包括:

[0012] 包被 ELISA 酶标板的小鼠源性 CD74 抗体, 为绵羊抗小鼠 CD74 抗体;

[0013] 检测小鼠源性可溶型 CD74 的抗体, 为大鼠抗小鼠 CD74 单克隆抗体;

[0014] 酶标二抗, 为 HRP (辣根过氧化物酶) 标记的山羊抗大鼠 IgG;

[0015] 标准蛋白, 为重组鼠 CD74 蛋白。

[0016] 优选地, 所述的绵羊抗小鼠 CD74 抗体为 R&D Systems, AF7478, sheep anti-mouse CD74 polyclonal antibody, 最佳工作浓度为 0.25ug/ml (稀释倍数 1:800)。

[0017] 优选地, 所述的大鼠抗小鼠 CD74 单克隆抗体为 R&D Systems, MAB7478, rat

anti-mouse CD74 monoclonal antibody, 最佳工作浓度为  $1\ \mu\text{g/ml}$  (稀释倍数 1:500)。

[0018] 优选地, 所述的 HRP (辣根过氧化物酶) 标记的山羊抗大鼠抗体为 Cell Signaling, #7077, goat anti-rat HRP-linked antibody, 最佳稀释倍数 1:2000。

[0019] 优选地, 所述的重组鼠 CD74 蛋白为 R&D Systems, 7478-CD, recombinant mouse CD74, 用于建立标准曲线, 所设置浓度为: 25ng/ml, 12.5ng/ml, 6.25ng/ml, 5.208ng/ml, 4.557ng/ml, 3.125ng/ml, 2.604ng/ml, 0.913ng/ml, 0.651ng/ml。用于检测 ELISA 试剂盒的敏感性, 设置浓度为: 25ng/ml, 12.5ng/ml, 6.25ng/ml, 3.125ng/ml, 1.5625ng/ml, 0.78125ng/ml, 0.390625ng/ml, 0ng/ml。

[0020] 所述的一种小鼠源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒, 还包括:

[0021] 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。

[0022] 优选地, 所述的样品稀释液: 样品为血清或肺泡灌洗液时, 样品稀释液为  $1\times\text{PBS}$ , pH:7.4。

[0023] 优选地, 所述的封闭液, 为 Thermo 公司的 SuperBlock 封闭缓冲液。

[0024] 优选地, 所述的包被缓冲液为  $1\times\text{PBS}$ , pH:7.4;

[0025] 优选地, 所述的 ELISA 酶标板洗脱液为含 0.05% Tween-20 的  $1\times\text{PBS}$  溶液;

[0026] 优选地, 所述的抗体稀释液为  $1\times\text{PBS}$ , pH:7.4;

[0027] 优选地, 所述的显色液为 Thermo 公司的 TMB substrate kit;

[0028] 优选地, 所述的终止液为 2mol/L 的硫酸溶液。

[0029] 优选地, 所述的 ELISA 酶标板为丹麦 NUNC 公司的 Maxisorp 系列 ELISA 酶标板, 96 孔。

[0030] 本发明的第二方面, 提供了一种小鼠源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测方法, 包括如下步骤:

[0031] 用 CD74 蛋白多克隆抗体包被 ELISA 酶标板, 封闭液封闭后, 分别加入标准重组鼠 CD74 蛋白和待测样品的稀释液, 再加入 CD74 蛋白单克隆抗体, 然后加酶标二抗, 洗涤后加底物显色, 用酶标仪在 450nm 波长下测定 OD 值, 制的标准重组鼠 CD74 蛋白的标准曲线, 通过标准曲线计算待测样品中可溶型 CD74 蛋白的浓度。

[0032] 优选地, 所述 CD74 蛋白多克隆抗体为购置于 R&D Systems 公司的绵羊抗小鼠 CD74 抗体 (R&D Systems, AF7478, sheep anti-mouse CD74 polyclonal antibody), 最佳工作浓度为  $0.25\ \mu\text{g/ml}$  (稀释倍数 1:800)。

[0033] 优选地, 所述 CD74 蛋白单克隆抗体为购置于 R&D Systems 公司的大鼠抗小鼠 CD74 抗体 (R&D Systems, MAB7478, rat anti-mouse CD74 monoclonal antibody), 最佳工作浓度为  $1\ \mu\text{g/ml}$  (稀释倍数 1:500)。

[0034] 所述的重组鼠 CD74 蛋白为购置于 R&D Systems 公司 (R&D Systems, 7478-CD, recombinant mouse CD74)。

[0035] 优选地, 所述酶标二抗为购置于 Cell Signaling 公司 HRP (辣根过氧化物酶) 标记的山羊抗大鼠抗体 (Cell Signaling, #7077, goat anti-rat HRP-linked antibody), 最佳稀释倍数 1:2000。

[0036] 优选地, 所述封闭液为含 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,或 Thermo 公司的 SuperBlock 封闭缓冲液。

[0037] 优选地,封闭时间选择室温 1 小时,室温 2 小时,4℃过夜。

[0038] 更为优选地,所述封闭液为 Thermo 公司的 SuperBlock 封闭缓冲液 37℃封闭 2 小时。

[0039] 本发明另一方面,提供一种小鼠源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒,除上述试剂,还包括常规的样品稀释液、包被缓冲液、ELISA 酶标板洗脱液、抗体稀释液、显色液,和终止液。

[0040] 所述的试剂盒,ELISA 酶标板为市售的 ELISA 酶标板,优选地,可选用丹麦 NUNC 公司的 Maxisorp 系列 ELISA 酶标板 (96 孔, #44-2404)。

[0041] 包被缓冲液,优选地为 1×PBS, pH:7.4 ;

[0042] ELISA 酶标板洗脱液,优选地为含 0.05% Tween-20 的 1×PBS 溶液

[0043] 样品稀释液:样品为血清或肺泡灌洗液时,优选地为 1×PBS, pH:7.4。

[0044] 抗体稀释液,优选地为 1×PBS, pH:7.4 ;

[0045] 显色液,优选地为 Thermo 公司的 TMB substrate kit (#34021) ;

[0046] 终止液,优选的为 2mol/L 的硫酸溶液。

[0047] 所述小鼠源性可溶型 CD74 蛋白的双抗体夹心 ELISA 检测方法,包括如下步骤:

[0048] 包被缓冲液将 AF7478 稀释成 0.25 μg/ml,在 ELISA 酶标板的每孔中加入 100 μl,封板后置于 4℃孵育过夜;用新鲜配置的 ELISA 酶标板洗脱液,每孔 300 μl,全自动洗板机 Elx50 (BioTek) 洗涤 3-5 次,吸水纸上拍干;加入 ELISA 酶标板封闭液,每孔 200 μl,室温孵育 2 小时;同前法用 ELISA 酶标板洗脱液,每孔 300 μl,洗涤 3-5 次,拍干;放于 4℃,备用。

[0049] 血清样本或 BALF 样本,用样品稀释液以 1:2 稀释,以 100 μl/孔的体积加样,室温孵育 2 小时;同前法用 ELISA 酶标板洗脱液,每孔 300 μl,洗涤 3-5 次,拍干;将 CD74 抗体 MAB7478 稀释成 1 μg/ml,每孔 100 μl,室温孵育 2 小时;同前法用 ELISA 酶标板洗脱液,每孔 300 μl,洗涤 3-5 次,拍干;加入 HRP 标记的山羊抗大鼠 IgG,每孔 100 μl,室温孵育 1 小时;同前法用 ELISA 酶标板洗脱液,每孔 300 μl,洗涤 5-7 次,拍干;加入底物四甲基联苯胺 H2O2,每孔 100 μl,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 μl;在酶标仪上 (450nm) 测定 OD 值。

[0050] 与现有技术相比,本发明的有益效果如下:

[0051] 1) 准确:目前市场上无商业化的小鼠源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 检测试剂盒,经文献检索没有定量检测小鼠源性可溶型 CD74 蛋白含量的方法,因此对于小鼠的体液(血清、BALF)中的可溶型 CD74 蛋白无法精确定量。此 ELISA 试剂盒可准确检测小鼠体液中的可溶型 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。

[0052] 2) 灵敏度高:用该方法检测到的 CD74 蛋白最低可至 781.25pg/ml,敏感性明显高于普通的 western blot 和免疫组化等半定量方法。

[0053] 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。

[0054] 本发明提供的 ELISA 试剂盒操作简单方便,可准确、高灵敏度地检测到小鼠的体液中的可溶型 CD74 蛋白含量,为基础研究提供了一种新的手段和方法。

[0055] 本发明的试剂盒可用于基础研究中小鼠自身免疫性疾病、各种炎症、肿瘤等模型的体液样品中可溶型 CD74 蛋白的定量检测,及各种生物学样品(如细胞培养上清液、细胞裂解液)中的 CD74 蛋白的检测。

[0056] 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,可大规模检测生物标本,快速获得小鼠 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

[0057] 图 1 是双抗体夹心 ELISA 方法检测重组鼠源性 CD74 蛋白的结果,其中 A 图为柱状图, B 图为散点图(呈线性相关);

[0058] 图 2 是双抗体夹心 ELISA 及 Dot blot 方法检测急性肺损伤小鼠血清标本中可溶型 CD74 蛋白,其中 A 图为 ELISA 结果, B 图为 Dot blot 结果;

[0059] 图 3 是双抗体夹心 ELISA 及 Dot blot 方法检测急性肺损伤小鼠肺泡灌洗液

[0060] (BALF) 标本中可溶型 CD74 蛋白,其中 A 图为 ELISA 结果, B 图为 Dot blot 结果;

[0061] 图 4 是双抗体夹心 ELISA 方法的灵敏度结果;

[0062] 图 5 是双抗体夹心 ELISA 方法检测 LPS 诱导的急性肺损伤小鼠血清和 BALF 标本中可溶型 CD74 蛋白的结果,其中 A 图为血清中可溶型 CD74 蛋白结果, B 图为 BALF 中可溶型 CD74 蛋白结果;

[0063] 图 6 是筛选包被抗体 AF7478 的最佳浓度;

[0064] 图 7 是筛选检测抗体 MAB7478 的最佳浓度。

#### 具体实施方式

[0065] 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。

[0066] 实施例 1:实验方法

[0067] 检测 ELISA 酶标板的制备:包被缓冲液将 AF7478 稀释成  $0.25 \mu\text{g/ml}$ ,在 ELISA 酶标板的每孔中加入  $100 \mu\text{l}$ ,封板后置于  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜;用新鲜配置的 ELISA 酶标板洗脱液,每孔  $300 \mu\text{l}$ ,全自动洗板机 E1x50 (BioTek) 洗涤 3-5 次,吸水纸上拍干;加入 ELISA 酶标板封闭液,每孔  $200 \mu\text{l}$ ,室温孵育 2 小时;同前法用 ELISA 酶标板洗脱液,每孔  $300 \mu\text{l}$ ,洗涤 3-5 次,拍干;放于  $4^\circ\text{C}$ ,备用。

[0068] 血清样本或 BALF 样本,用样品稀释液以 1:2 稀释,以  $100 \mu\text{l}$ /孔的体积加样,室温孵育 2 小时;同前法用 ELISA 酶标板洗脱液,每孔  $300 \mu\text{l}$ ,洗涤 3-5 次,拍干;将 CD74 抗体 MAB7478 稀释成  $1 \mu\text{g/ml}$ ,每孔  $100 \mu\text{l}$ ,室温孵育 2 小时;同前法用 ELISA 酶标板洗脱液,每孔  $300 \mu\text{l}$ ,洗涤 3-5 次,拍干;加入 HRP 标记的山羊抗大鼠 IgG,每孔  $100 \mu\text{l}$ ,室温孵育 1 小时;同前法用 ELISA 酶标板洗脱液,每孔  $300 \mu\text{l}$ ,洗涤 5-7 次,拍干;加入底物四甲基联苯胺 H2O2,每孔  $100 \mu\text{l}$ ,室温避光孵育 10-15 分钟,加入  $2\text{mol/L}$  硫酸溶液终止反应,每孔  $50 \mu\text{l}$ ;在酶标仪上 (450nm) 测定 OD 值。

[0069] 实施例 2:条件优化

[0070] 一、包被抗体浓度的优化:

[0071] 分别选用不同浓度的包被抗体 AF7478 ( $1 \mu\text{g/ml}$ ,  $0.5 \mu\text{g/ml}$ ,  $0.25 \mu\text{g/ml}$ ,

0.125  $\mu$ 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, OD 值 (减去空白组 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。AF7478 的最佳抗体包被浓度为 0.25  $\mu$ g/ml。

[0072] 筛选包被抗体 AF7478 的最佳浓度详见图 6。

[0073] 二、封闭液的优化:

[0074] 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, Thermo 公司的 SuperBlock 封闭缓冲液; 封闭时间选择室温 1 小时, 室温 2 小时, 4 $^{\circ}$ C 过夜。

[0075] 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。

[0076] 最终以 Thermo 公司的 SuperBlock 封闭缓冲液室温封闭 2 小时为最佳组合。

[0077] 三、检测抗体的优化:

[0078] 检测抗体选用 MAB7478、Ii-1 (BD Pharmingen, #555317, rat anti-mouse CD74 antibody), 检测浓度选用 (2.5  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, 0.5  $\mu$ g/ml)。

[0079] 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, OD 值 (减去空白组 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。

[0080] MAB7478 的工作浓度 1  $\mu$ g/ml 为最佳配伍。

[0081] 筛选检测抗体 MAB7478 的最佳浓度, 详见图 7。

[0082] 四、酶标二抗的优化:

[0083] 酶标二抗选用马抗大鼠 HRP 标记的 IgG 抗体, 驴抗大鼠 HRP 标记的 IgG 抗体, 山羊抗大鼠 HRP 标记的 IgG 抗体, 抗体稀释倍数选择 1:1000, 1:2000, 1:3000。

[0084] 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。

[0085] 山羊抗大鼠 HRP 标记的 IgG 抗体, 1:2000 稀释为最佳。

[0086] 五、样品稀释液的优化:

[0087] 急性肺损伤小鼠检测时血清及 BALF 样品稀释液选用 1 $\times$ PBS (pH:7.4) 或含 0.1% BSA, 0.5% Tween-20 的 1 $\times$ TBS 溶液, 按照实施例 1 中的操作步骤进行检测, 加入有可溶性 CD74 蛋白的阳性样本, 选择样品稀释后稀释倍数与 OD 值的线性关系最为密切的为最佳样品稀释液。

[0088] 1 $\times$ PBS (pH:7.4) 优于含 0.1% BSA, 0.5% Tween-20 的 1 $\times$ TBS 溶液, 为较优样品稀释液。

[0089] 实施例 3: ELISA 试剂盒检测重组鼠源性 CD74 蛋白, 建立标准曲线

[0090] 将重组鼠源性 CD74 标准蛋白从 25ng/ml 开始稀释, 稀释 9 个浓度, 25ng/ml, 12.5ng/ml, 6.25ng/ml, 5.208ng/ml, 4.557ng/ml, 3.125ng/ml, 2.604ng/ml, 0.913ng/ml, 0.651ng/ml, 每个样品设置 3 个复孔, 100  $\mu$ l/孔, 按照实施例 1 的步骤重复检测 3 次, 结果

相似,如图 1 所示,重组鼠源性 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。

[0091] 实施例 4:小鼠源性可溶型 CD74 蛋白的 ELISA 试剂盒的特异性和敏感性评价

[0092] 急性肺损伤小鼠模型的建立参考文献 (Xinqi Peng, et al. Protective effects of sphingosine 1-phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004, 169(11):1245-51.) 所述,取血方法:小鼠麻醉后用 1ml 注射器经心脏穿刺取血 (0.5-0.8ml),室温放置 1h,1500g 离心 10min 取血清。肺泡灌洗液采集方法:小鼠取血完毕后,行气管切开,经气道注入 0.8ml 生理盐水,反复抽吸 3 次后回抽,2000r 4℃离心 10min 待检测相关蛋白。

[0093] ELISA 实验步骤如前所述(实施例 1:实验方法);

[0094] Dot blot 实验步骤:

[0095] 1. 用甲醛浸泡硝酸纤维素膜 1 分钟,1×TBST(1×TBS 含 1% Tween-20) 洗涤 3min,室温放置风干;

[0096] 2. 将 PBS PH7.4 稀释 (2×) 的样品液 2ul 点于硝酸纤维素膜上,置 37℃温箱中干燥 20 ~ 30 分钟;

[0097] 3. 用封闭液(含 5%脱脂奶粉的 1×TBST) 室温封闭 30min,1×TBST 洗涤 3 次;

[0098] 4. 5% BSA(含 5% BSA 的 1×TBST) 稀释一抗 (Ii-1, 稀释倍数 1:500) 4℃孵育过夜;

[0099] 5. 1×TBST 洗涤 3 次,5% BSA 稀释二抗 (goat anti-rat HRP-linked antibody, 稀释倍数 1:2000) 室温孵育 1h;

[0100] 6. 1×TBST 洗涤 3 次;

[0101] 7. 自动化学发光仪显影 (ECL Western Blotting 检测试剂)。

[0102] 一、特异性试验

[0103] 用本发明所建立的 ELISA 方法检测 6 只 LPS 诱导的急性肺损伤小鼠(气道滴入 LPS 后 6h、12h 取材)和 4 只空白对照小鼠的血清样本,结果如图 2A。进一步用 Dot blot 方法进行验证,用 Ii-1 检测,如图 2B 所示急性肺损伤小鼠的血清检测出 CD74 蛋白较空白对照组明显。蛋白印迹方法与 ELISA 方法结果相似。

[0104] 用所建立的 ELISA 方法检测 6 只 LPS 诱导的急性肺损伤小鼠(气道滴入 LPS 后 6h、12h 取材)和 6 只空白对照小鼠的 BALF 样本,结果如图 3A。进一步用 Dot blot 方法进行验证,用 Ii-1 检测,如图 3B 所示急性肺损伤小鼠的 BALF 能检测出 CD74 蛋白,空白对照组未能检测出明显的 CD74 蛋白。蛋白印迹方法与 ELISA 方法结果相似。

[0105] 二、敏感性试验

[0106] 将重组的 CD74 标准蛋白(初始浓度 25ng/ml)用 1×PBS 作 2 倍比连续稀释,并排设置 5 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。如图 4 所示,CD74 标准蛋白稀释 256 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 781.25pg/ml。

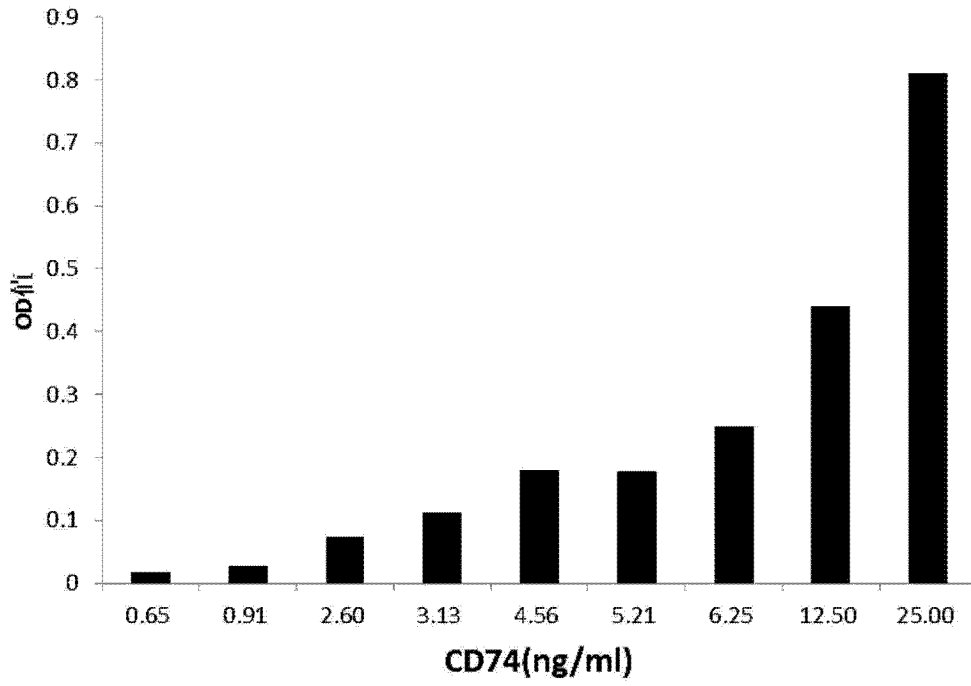
[0107] 实施例 5:ELISA 试剂盒检测 LPS 诱导的急性肺损伤小鼠的血清和 BALF 中可溶型 CD74 蛋白浓度

[0108] 急性肺损伤小鼠模型的建立,血清、肺泡灌洗液的采集,蛋白检测方法同前所述。

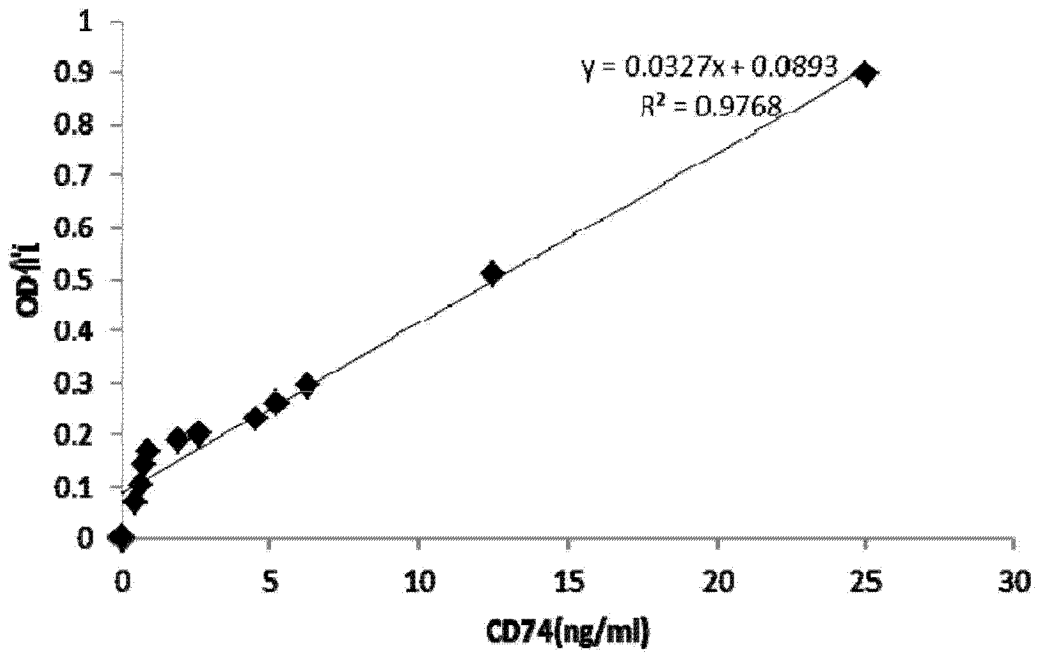
[0109] 同窝 C57B/6 小鼠随机分为空白对照组、LPS 急性肺损伤 6h 组、LPS 急性肺损伤 12h 组 (5 只 / 组), 在相应时间点取血及 BALF, 按照实施例 1 的操作步骤, 检测血清及 BALF 中可溶型 CD74 蛋白浓度。

[0110] 结果如图 5 所示, 急性肺损伤小鼠血清及 BALF 中可溶型 CD74 含量均高于对照组, 且血清中可溶型 CD74 的含量 12h 组高于 6 小组。

[0111] 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。

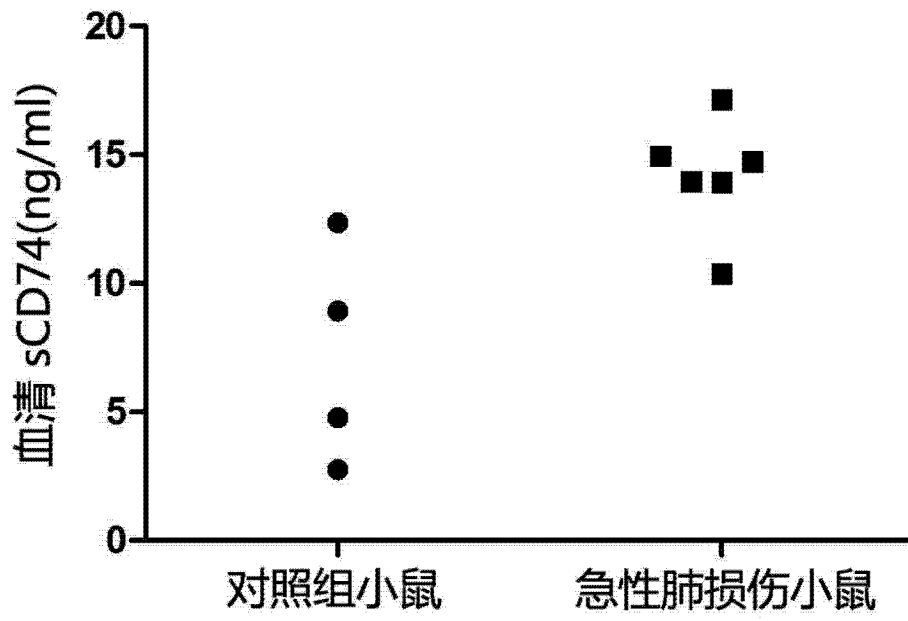


A

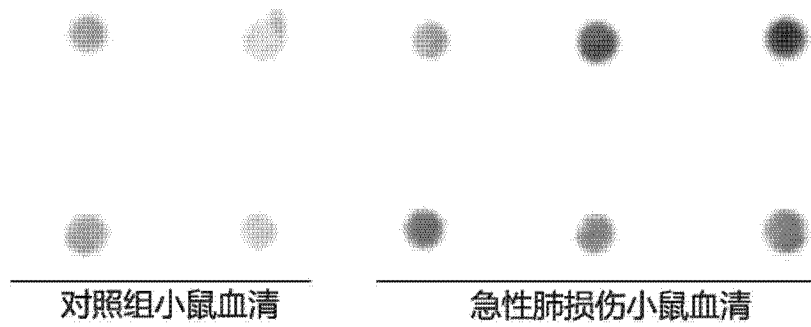


B

图 1

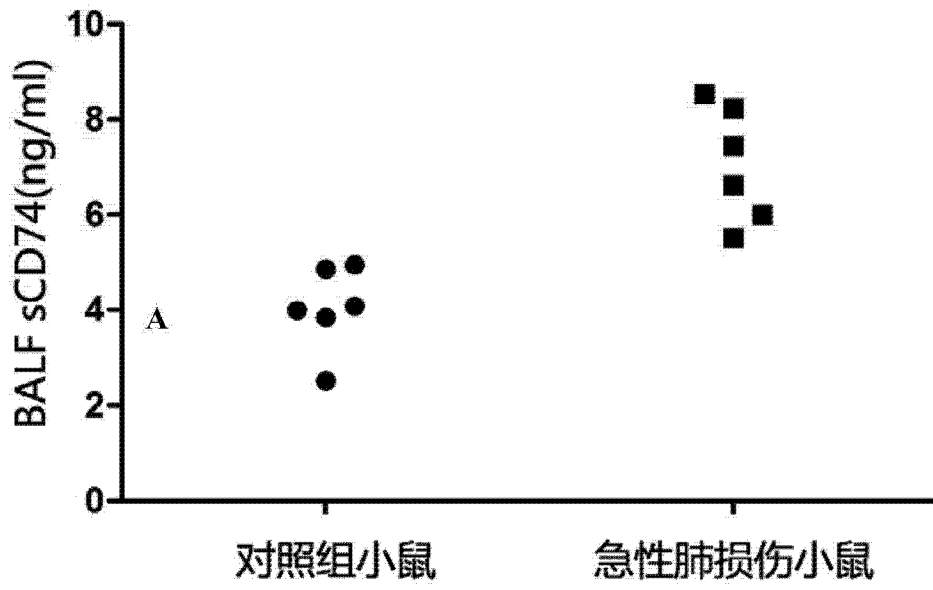


A

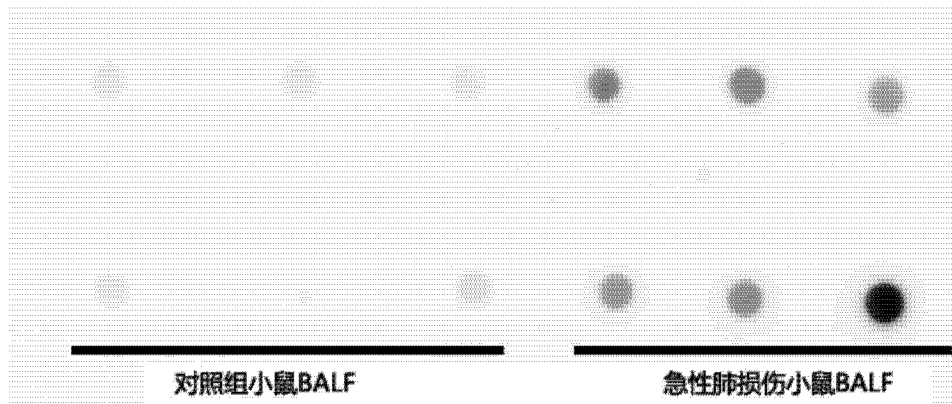


B

图 2



A



B

图 3

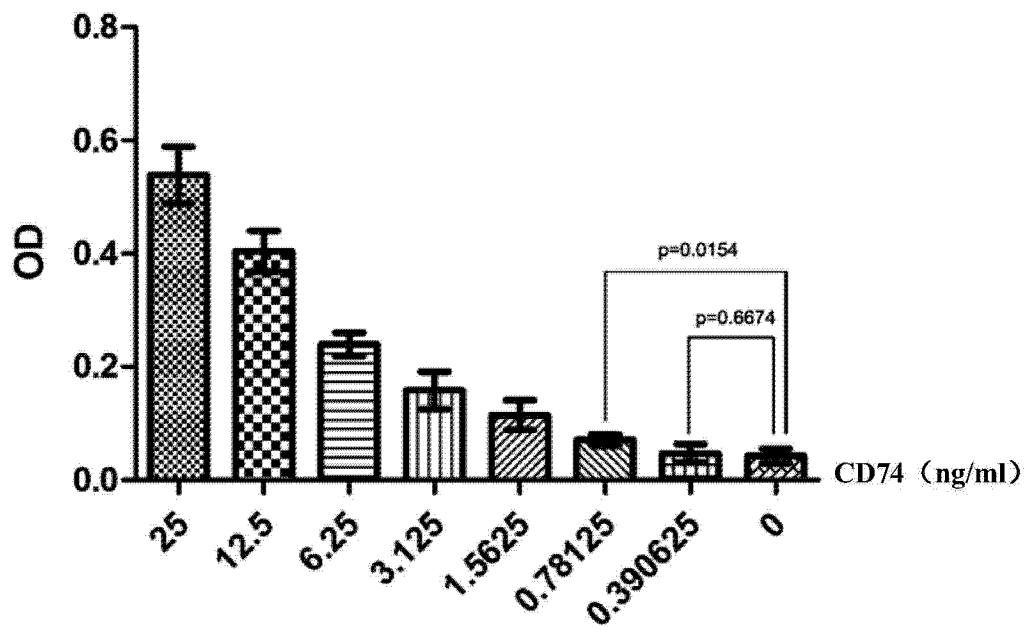
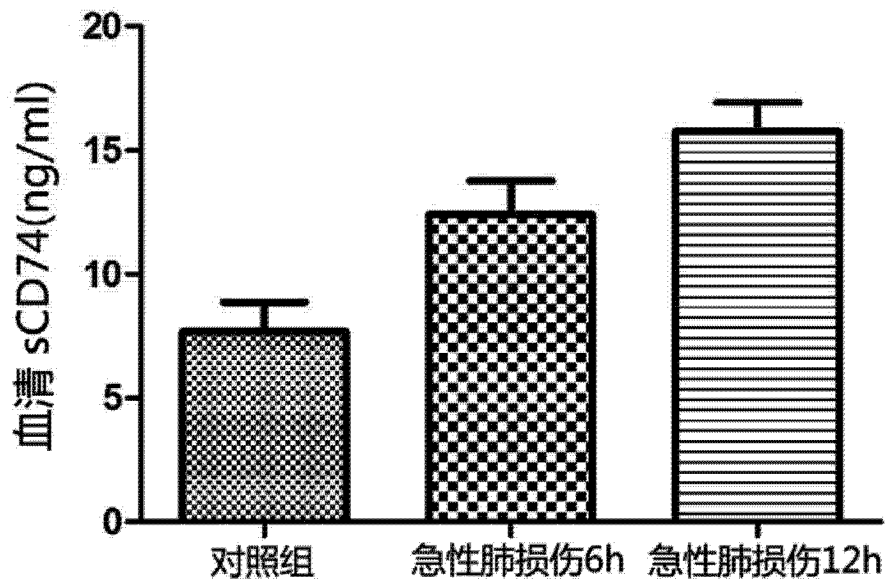
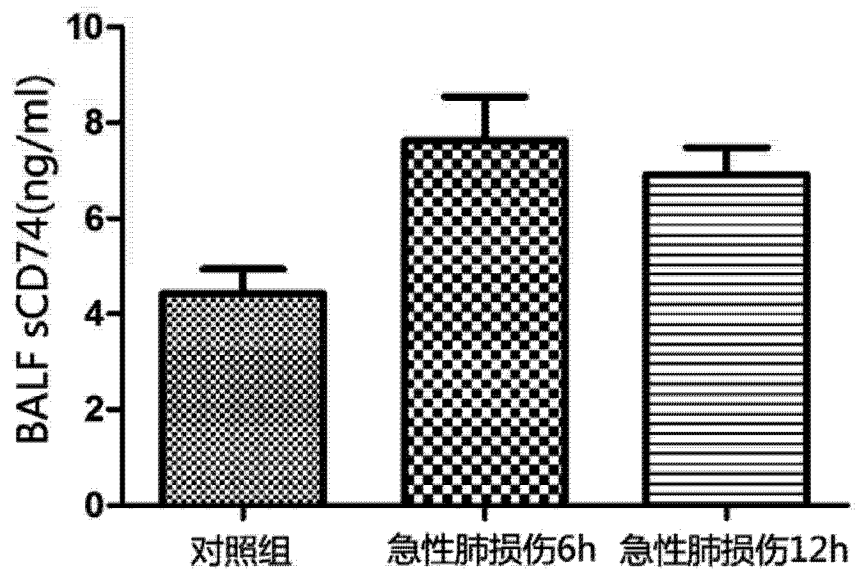


图 4



A



B

图 5

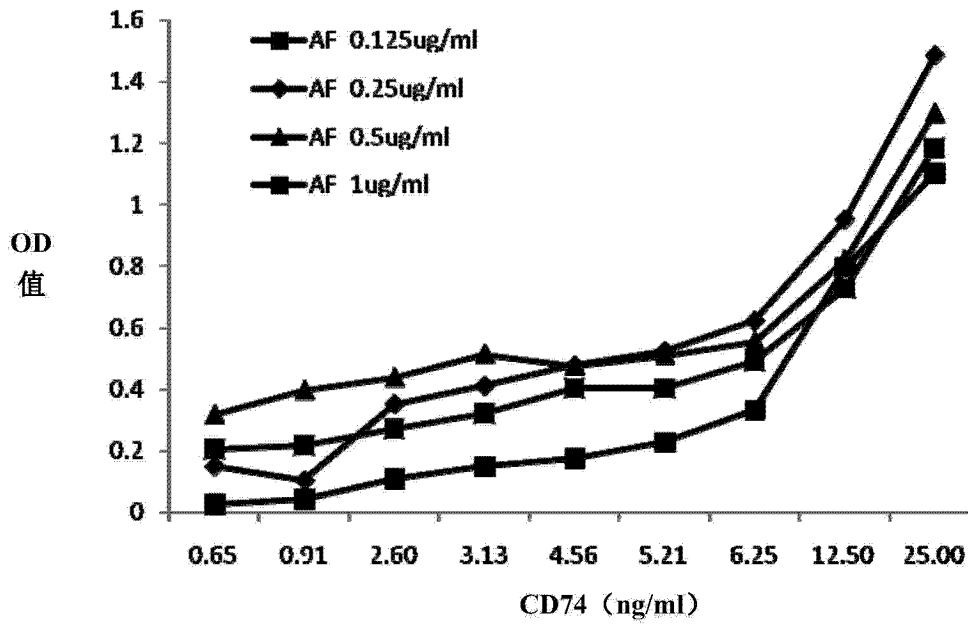


图 6

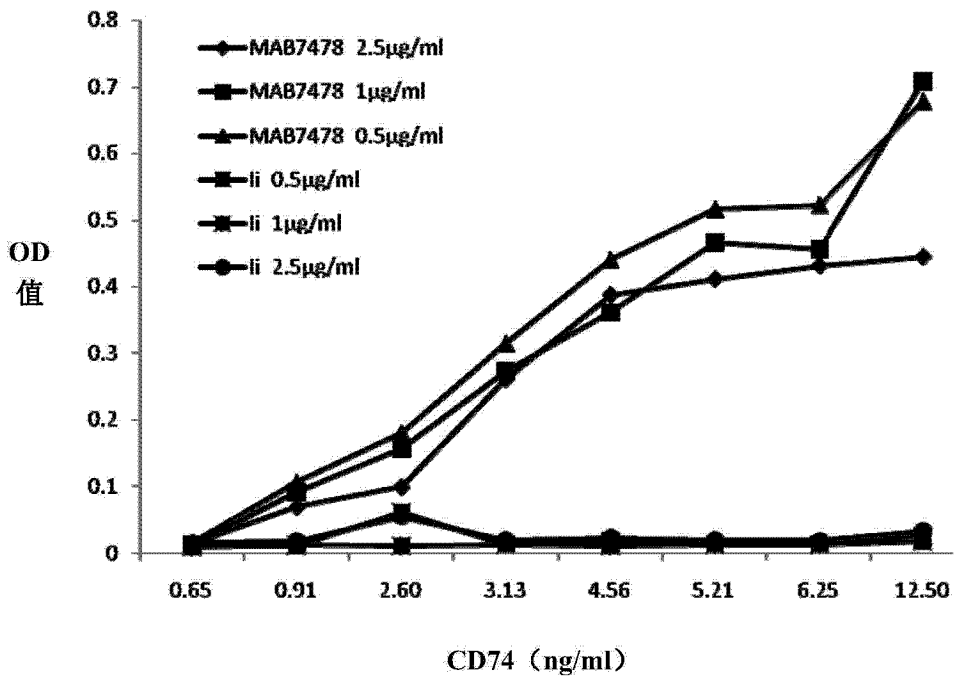


图 7

专利名称(译)	一种小鼠源性可溶性CD74蛋白的ELISA检测试剂盒及检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104280553A</a>	公开(公告)日	2015-01-14
申请号	CN201410486924.7	申请日	2014-09-22
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	伍国胜 孙瑜 唐昊 陈郑礼 王星童 唐洪泰		
发明人	伍国胜 孙瑜 唐昊 陈郑礼 王星童 唐洪泰		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/6893		
代理人(译)	赵青		
其他公开文献	CN104280553B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于免疫学和生物技术领域，本发明提供了一种小鼠源性可溶性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小鼠体液中的可溶性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781.25pg/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，可大规模检测基础研究生物标本，快速获得小鼠CD74蛋白相关的海量数据和信息。

