



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104280553 B

(45) 授权公告日 2016.06.08

(21) 申请号 201410486924.7

(22) 申请日 2014.09.22

(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 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

《HEPATOLOGY》. 2013, 第 59 卷(第 2 期),

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),

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(第
5 期),

审查员 王在竹

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1649902 A, 2005.08.03,

CN 103458930 A, 2013.12.18,

CN 103207277 A, 2013.07.17,

David N. Assis et al. The Role
of Macrophage Migration Inhibitory
Factor in Autoimmune Liver Disease.

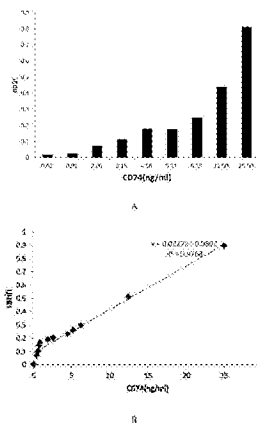
权利要求书2页 说明书8页 附图6页

(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蛋白多克隆抗体;
检测小鼠源性可溶型CD74的抗体,为大鼠抗小鼠CD74蛋白单克隆抗体;
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,为重组小鼠CD74蛋白;
所述的绵羊抗小鼠CD74蛋白多克隆抗体为R&D Systems公司的AF7478,工作浓度为0.25 μ g/ml;
所述的大鼠抗小鼠CD74蛋白单克隆抗体为R&D Systems公司的MAB7478,工作浓度为1 μ g/ml。
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,所述的辣根过氧化物酶标记的山羊抗大鼠IgG为Cell Signaling公司的#7077。
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,所述的重组小鼠CD74蛋白为R&D Systems公司的7478-CD。
4. 根据权利要求1至3任一项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。
5. 根据权利要求4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 \times PBS,pH:7.4。
6. 根据权利要求4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。
7. 根据权利要求4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 \times PBS,pH:7.4;所述的ELISA酶标板洗脱液为含0.05%Tween-20的1 \times PBS溶液;所述的抗体稀释液为1 \times 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2moI/L的硫酸溶液。
8. 一种小鼠源性可溶型CD74蛋白的检测试剂在制备如权利要求1所述的ELISA检测试剂盒中的应用,,其特征在于,ELISA检测方法包括如下步骤:
用CD74蛋白多克隆抗体包被ELISA酶标板,封闭液封闭后,分别加入标准重组小鼠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,制备标准重组小鼠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。
9. 根据权利要求8所述的小鼠源性可溶型CD74蛋白的检测试剂在制备如权利要求1所述的ELISA检测试剂盒中的应用,其特征在于,ELISA检测方法为:
包被缓冲液将AF7478稀释成0.25 μ g/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;用新鲜配置的ELISA酶标板洗脱液,每孔300 μ l,全自动洗板机EIx50洗涤3-5次,吸水纸上拍干;加入ELISA酶标板封闭液,每孔200 μ l,室温孵育2小时;同前法用ELISA酶标板洗脱液,每孔300 μ l,洗涤3-5次,拍干;放于4 $^{\circ}$ C,备用;
血清样本或BALF样本,用样品稀释液以1:2稀释,以100 μ 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 μ l,洗涤3-5次,拍干;将MAB7478稀释成1 μ g/ml,每孔100 μ l,室温孵育2小时;同前法用ELISA酶标板洗脱液,每孔300 μ l,洗涤3-5次,拍干;加

入HRP标记的山羊抗大鼠IgG,每孔100 μ I,室温孵育1小时;同前法用ELISA酶标板洗脱液,每孔300 μ I,洗涤5-7次,拍干;加入底物四甲基联苯胺和H₂O₂,每孔100 μ I,室温避光孵育10-15分钟,加入2moI/L硫酸溶液终止反应,每孔50 μ I;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- κ 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LdIr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- γ 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- κ 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为慢性胃炎,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- γ 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- γ 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 CD74polyclonal 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 $1\mu\text{g}/\text{mI}$ (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CeII 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: $25\text{ng}/\text{mI}$, $12.5\text{ng}/\text{mI}$, $6.25\text{ng}/\text{mI}$, $5.208\text{ng}/\text{mI}$, $4.557\text{ng}/\text{mI}$, $3.125\text{ng}/\text{mI}$, $2.604\text{ng}/\text{mI}$, $0.913\text{ng}/\text{mI}$, $0.651\text{ng}/\text{mI}$ 。用于检测ELISA试剂盒的敏感性,设置浓度为: $25\text{ng}/\text{mI}$, $12.5\text{ng}/\text{mI}$, $6.25\text{ng}/\text{mI}$, $3.125\text{ng}/\text{mI}$, $1.5625\text{ng}/\text{mI}$, $0.78125\text{ng}/\text{mI}$, $0.390625\text{ng}/\text{mI}$, $0\text{ng}/\text{mI}$ 。

[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 $1\times\text{PBS}$, $\text{pH}:7.4$ 。

[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 $1\times\text{PBS}$, $\text{pH}:7.4$;

[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 $1\times\text{PBS}$, $\text{pH}:7.4$;

[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 $2\text{mI}/\text{L}$ 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 $0.25\mu\text{g}/\text{mI}$ (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 $1\mu\text{g}/\text{mI}$ (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CeII Signaling公司HRP(辣根过氧化物酶)标记的山羊抗大鼠抗体(CeII 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°C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°C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2moI/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0.25μg/ml,在ELISA酶标板的每孔中加入100μI,封板后置于4°C孵育过夜;用新鲜配置的ELISA酶标板洗脱液,每孔300μI,全自动洗板机EIx50(BioTek)洗涤3-5次,吸水纸上拍干;加入ELISA酶标板封闭液,每孔200μI,室温孵育2小时;同前法用ELISA酶标板洗脱液,每孔300μI,洗涤3-5次,拍干;放于4°C,备用。
- [0049] 血清样本或BALF样本,用样品稀释液以1:2稀释,以100μI/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300μI,洗涤3-5次,拍干;将CD74抗体MAB7478稀释成1μg/ml,每孔100μI,室温孵育2小时;同前法用ELISA酶标板洗脱液,每孔300μI,洗涤3-5次,拍干;加入HRP标记的山羊抗大鼠IgG,每孔100μI,室温孵育1小时;同前法用ELISA酶标板洗脱液,每孔300μI,洗涤5-7次,拍干;加入底物四甲基联苯胺H2O2,每孔100μI,室温避光孵育10-15分钟,加入2moI/L硫酸溶液终止反应,每孔50μI;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 μ g/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;用新鲜配置的ELISA酶标板洗脱液,每孔300 μ l,全自动洗板机EIx50(BioTek)洗涤3-5次,吸水纸上拍干;加入ELISA酶标板封闭液,每孔200 μ l,室温孵育2小时;同前法用ELISA酶标板洗脱液,每孔300 μ l,洗涤3-5次,拍干;放于4 $^{\circ}$ 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 μ 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 μ l,洗涤3-5次,拍干;将CD74抗体MAB7478稀释成1 μ g/ml,每孔100 μ l,室温孵育2小时;同前法用ELISA酶标板洗脱液,每孔300 μ l,洗涤3-5次,拍干;加入HRP标记的山羊抗大鼠IgG,每孔100 μ l,室温孵育1小时;同前法用ELISA酶标板洗脱液,每孔300 μ l,洗涤5-7次,拍干;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2moI/L硫酸溶液终止反应,每孔50 μ 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 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,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 μ 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 μ g/ml, 1 μ g/ml, 0.5 μ 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 μ 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，加入有可溶型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 μ 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2μl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

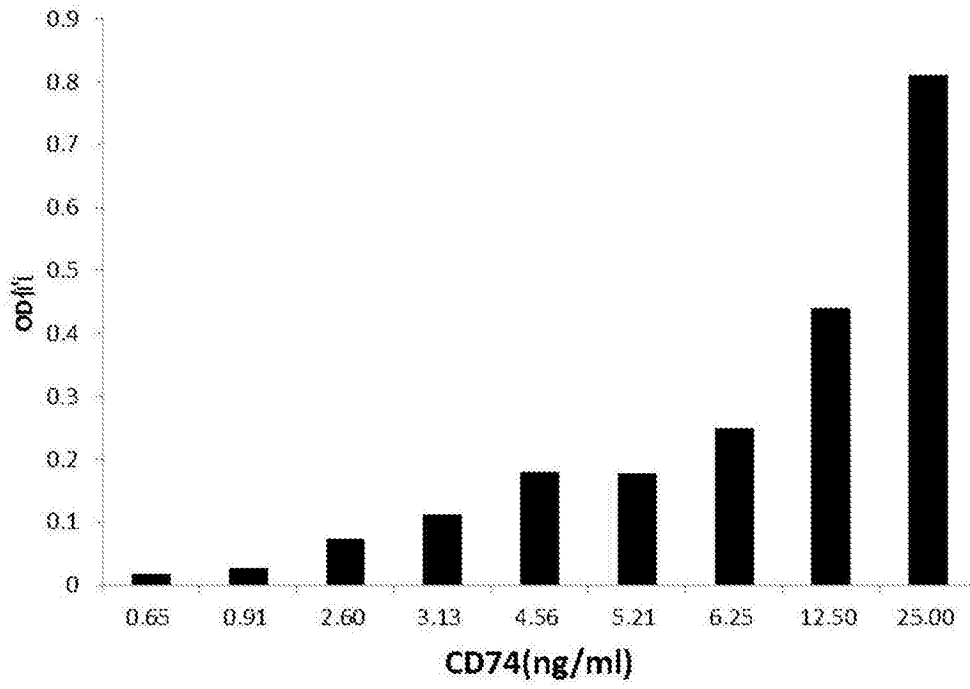
[0108] 急性肺损伤小鼠模型的建立, 血清、肺泡灌洗液的采集, 蛋白检测方法同前所述。

[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。

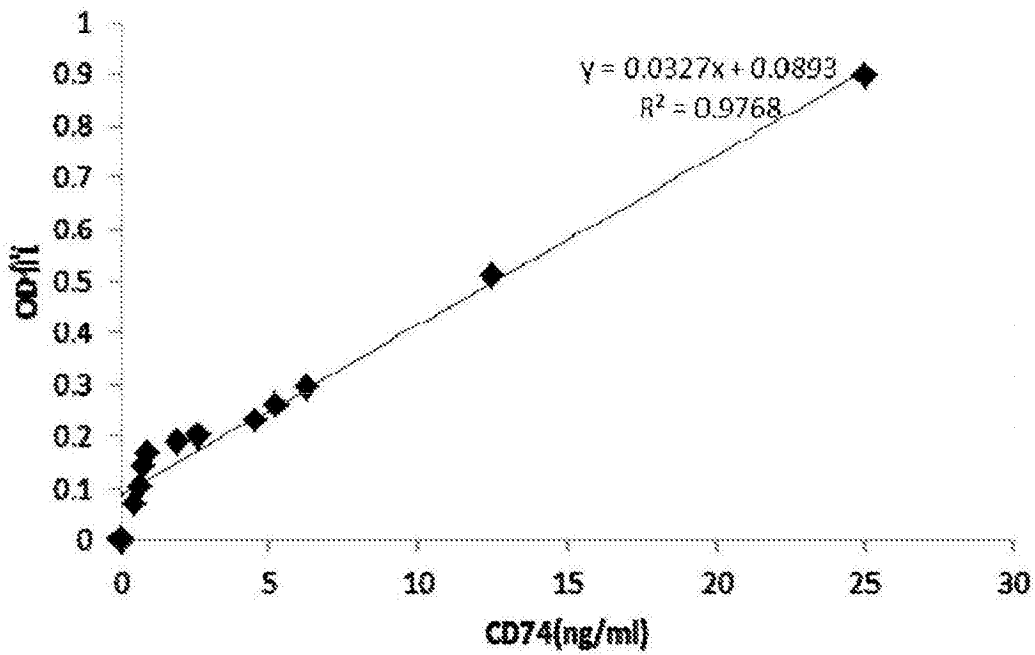
[0110] 结果如图5所示, 急性肺损伤小鼠血清及BALF中可溶型CD74含量均高于对照组, 且

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。

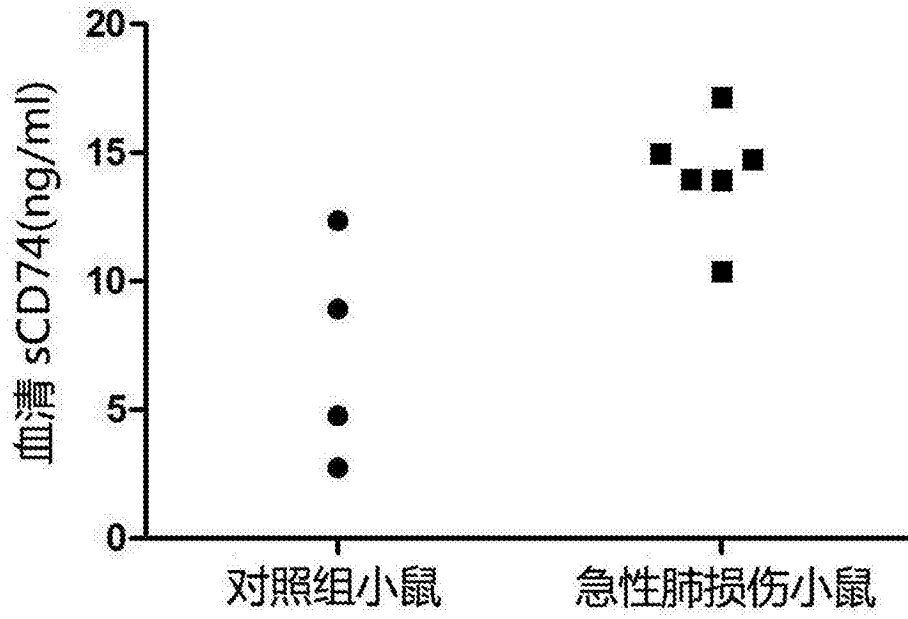


A

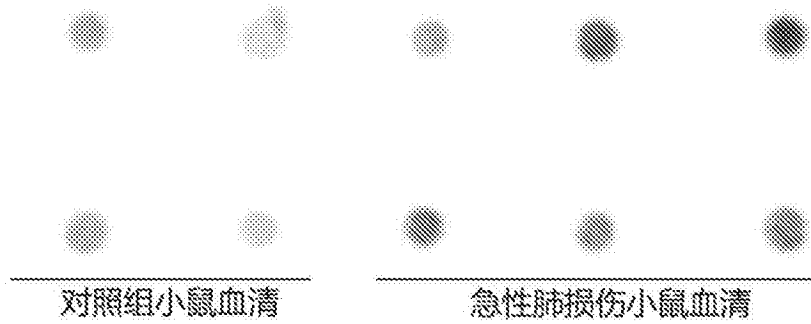


B

图1

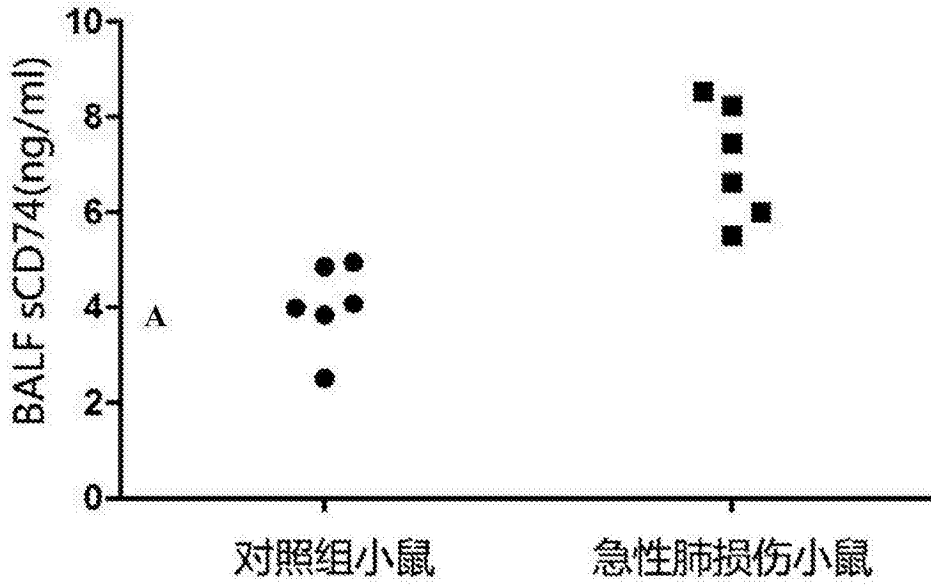


A

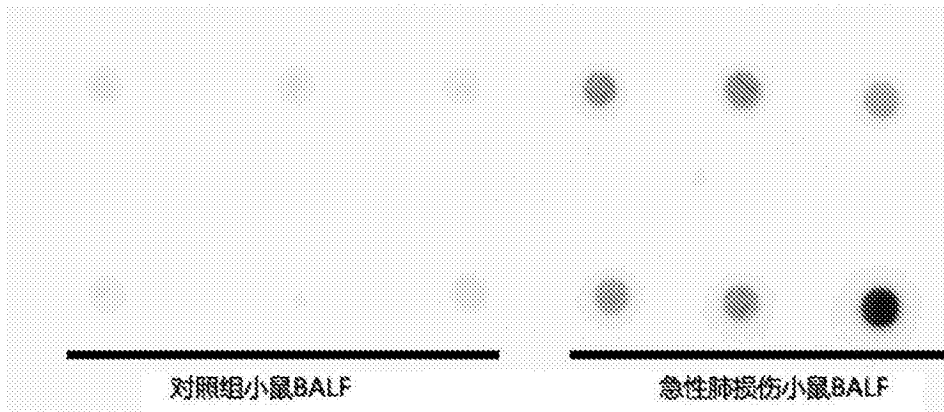


B

图2



A



B

图3

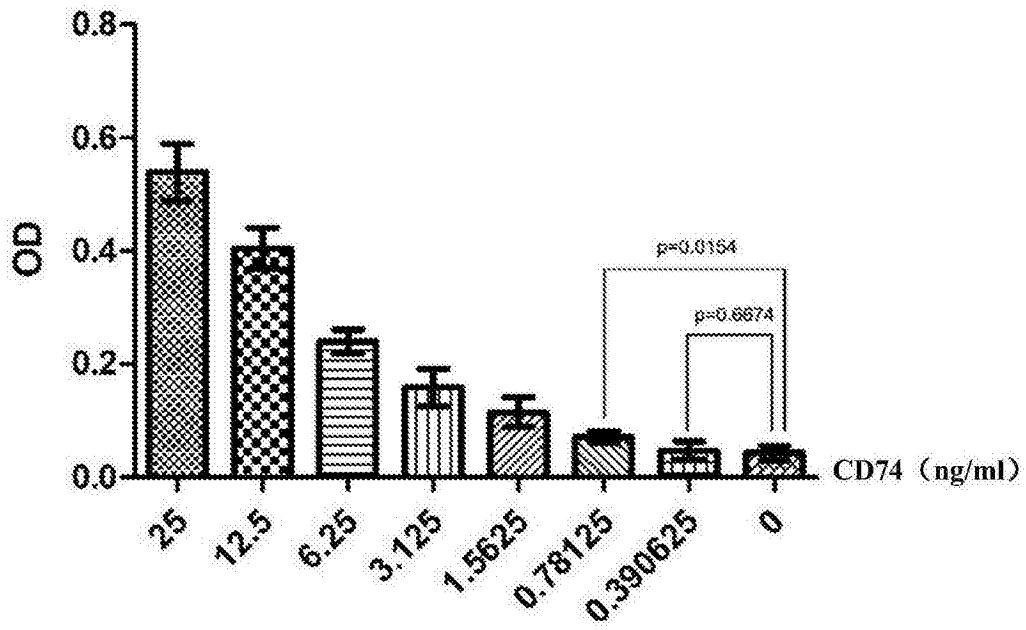
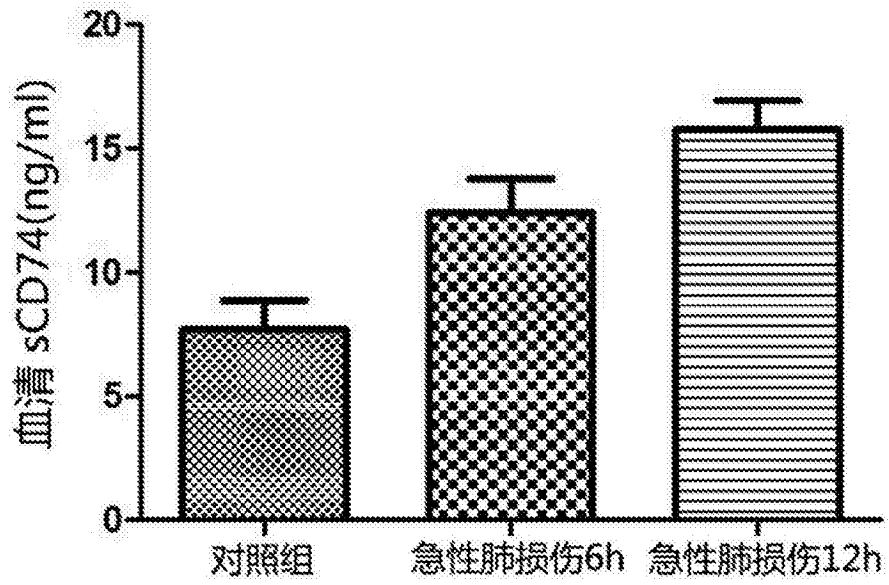
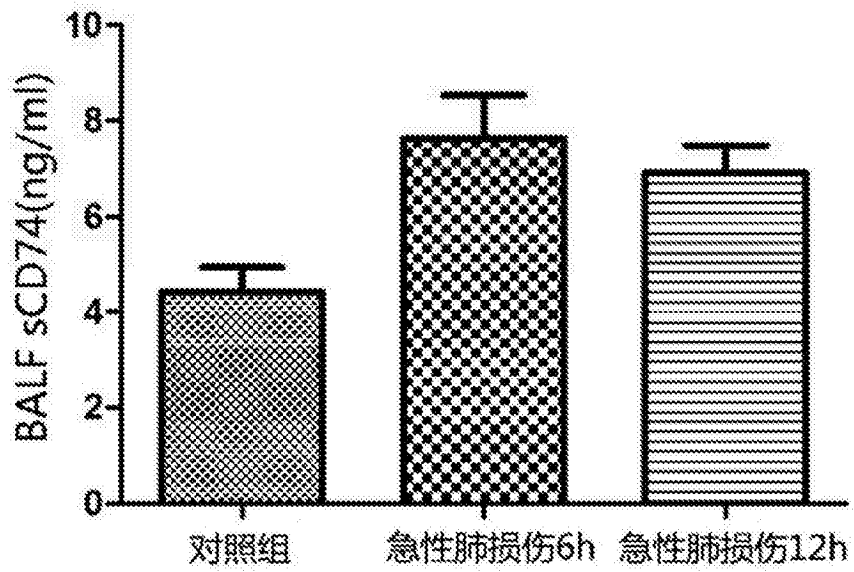


图4



A



B

图5

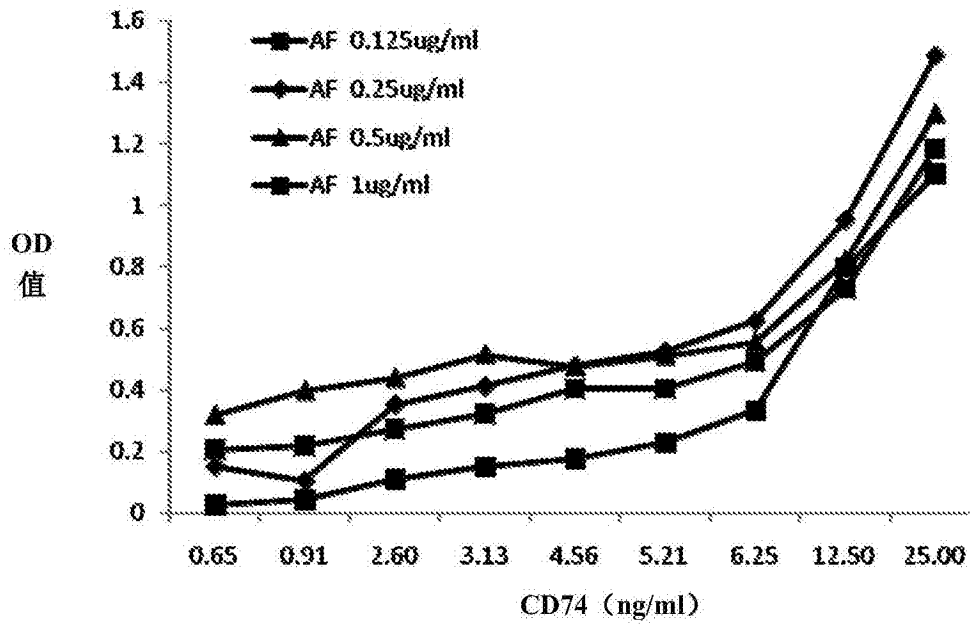


图6

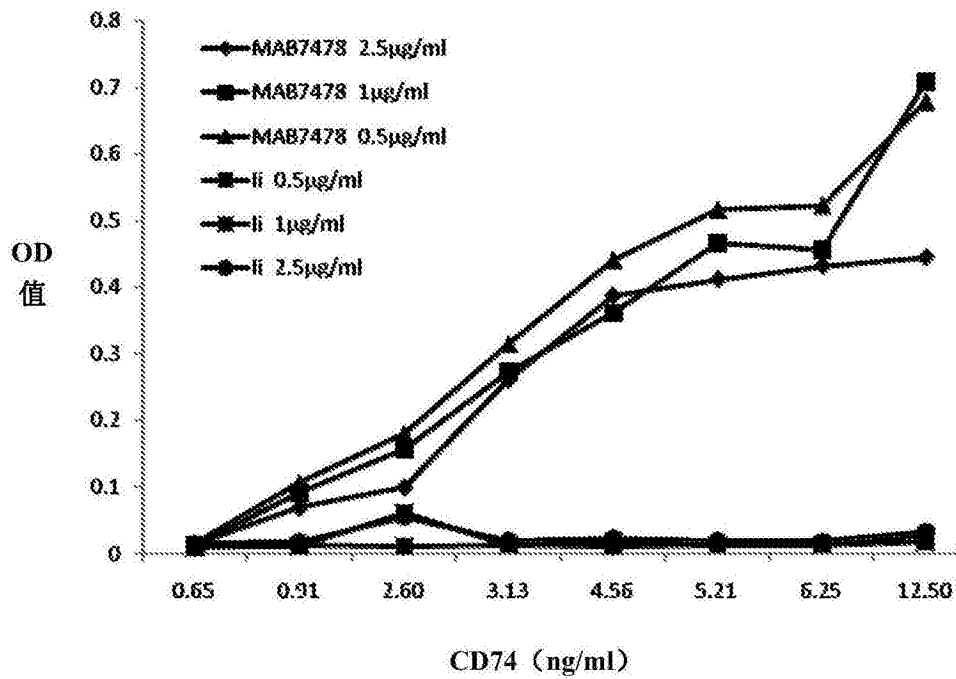
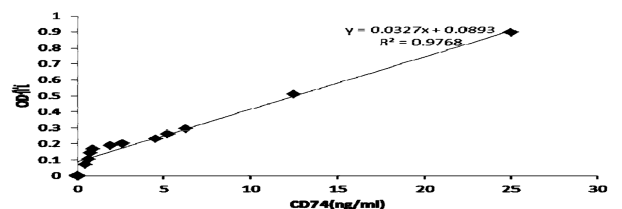
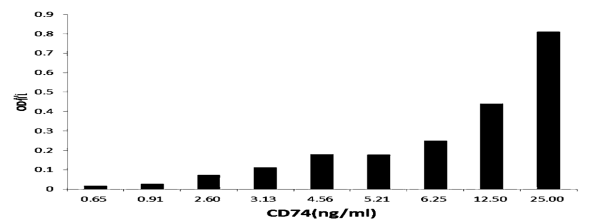


图7

专利名称(译)	一种小鼠源性可溶型CD74蛋白的ELISA检测试剂盒及检测方法		
公开(公告)号	CN104280553B	公开(公告)日	2016-06-08
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	CN104280553A		
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。



B