



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103575901 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 21

(21) 申请号 201210253713. X

CN 101858909 A, 2010. 10. 13, 全文.

(22) 申请日 2012. 07. 23

陈灿玉等. 金属卟啉标记物在化学发光免疫检测中优势的理论分析. 《杭州师范大学学报(自然科学版)》. 2011, 第 10 卷(第 3 期), 233-236.

(73) 专利权人 苏州长光华医生物试剂有限公司
地址 215163 江苏省苏州市高新区科技城锦峰路 8 号 4 号楼

李涛等. 新型含羧基卟啉及其金属配合物的合成. 《化学试剂》. 2002, 第 24 卷(第 4 期), 221-222.

(72) 发明人 徐海伟 李勇 胡庆锋 常立峻
陈秀发

审查员 李宏悦

(74) 专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限公司 32224

代理人 董建林

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

US 006001573 A, 1999. 12. 14, 全文.

WO 02/00662 A1, 2002. 01. 03, 全文.

EP 1616871 A1, 2006. 01. 18, 全文.

CN 101671340 A, 2010. 03. 17, 全文.

权利要求书3页 说明书9页

(54) 发明名称

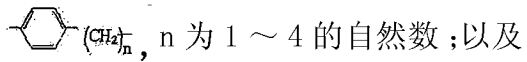
一种检测 EGFR 蛋白的试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测 EGFR 蛋白的试剂盒及其制备方法, 涉及化学发光免疫分析技术领域, 为解决目前 EGFR 蛋白超微量检测的技术问题, 根据本发明的试剂盒包括: 1) EGFR 蛋白校准品; 2) 链亲和素偶联的固相载体; 3) 生物素化的 EGFR 蛋白配体; 4) 5, 10, 15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉偶联标记的 EGFR 蛋白配体; 以及 5) 所作用的化学发光底物。进一步, 根据本发明制备上述试剂盒的方法。本发明主要用途为 EGFR 蛋白超微量检测。

1. 一种检测 EGFR 蛋白的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:

- 1) EGFR 蛋白校准品;
- 2) 链亲和素偶联的固相载体;
- 3) 生物素化的 EGFR 蛋白配体;
- 4) 5,10,15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉偶联标记的 EGFR 蛋白配体,其中 R 为



5) 上述 5,10,15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉所作用的化学发光底物。

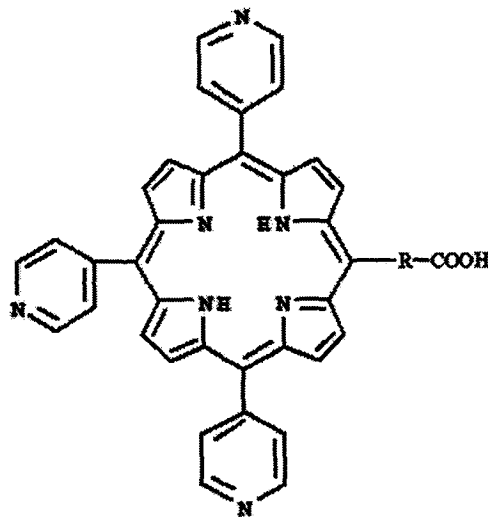
2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述 EGFR 蛋白为表皮生长因子受体。

3. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述 EGFR 蛋白校准品为表皮生长因子受体配制的校准品冻干品,校准品内所用的保护基质蛋白为牛血清白蛋白,卵清蛋白。

4. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述链亲和素偶联的固相载体为磁性颗粒,塑料颗粒。

5. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述 EGFR 蛋白配体为可以与 EGFR 蛋白特异性结合反应的单克隆抗体、多克隆抗体、基因工程抗体。

6. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述 5,10,15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉结构式如 (I) 所示:



(I)

结构式 (I) 中 R 为 $(\text{CH}_2)_n$, n 为 1~4 的自然数。

7. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述 5,10,15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉偶联标记的 EGFR 蛋白配体所用的偶联剂为 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺 (EDC), N,N'-二环己基碳二亚胺 (DCC)。

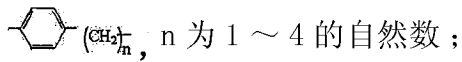
8. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述 5,10,15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉所作用的化学发光底物为吡啶酯、吡啶磺酰胺。

9. 一种制备权利要求 1 所述试剂盒的方法,其特征在于包括以下步骤:

- 1) 以 EGFR 蛋白纯品配制 EGFR 蛋白校准品;
- 2) 使链亲和素偶联固相载体;

3) 使 EGFR 蛋白配体生物素化；

4) 用 5,10,15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉偶联标记 EGFR 蛋白配体,其中 R 为



5) 配制化学发光底物液；

6) 分装上述 EGFR 蛋白校准品、链亲和素偶联固相载体、生物素化的 EGFR 蛋白配体、5,10,15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉偶联标记的 EGFR 蛋白配体和化学发光底物液；以及

7) 组装为成品。

10. 如权利要求 9 所述的方法,其特征在于,所述制备 EGFR 蛋白校准品的步骤 1) 采用以下方法：

配制含牛血清白蛋白 2%,卵清蛋白 1.5%,水解明胶 0.5%,2.5%蔗糖的 0.01M PB 缓冲溶液为校准品基质液,用基质液配制含不同浓度 EGFR 蛋白的校准品,用西林瓶分装 1mL/瓶,冻干处理后,-20℃保存。

11. 如权利要求 9 所述的方法,其特征在于,所述制备链亲和素化固相载体的步骤 2) 采用以下磁性颗粒方法：

250mg 氨基末端磁性颗粒置于烧杯,加入甲醇及丙酮各 5mL 反复清洗,磁性分离,弃去上清,加入 DMF 溶解的 10mL0.2%的 1,4-二异硫氰酸酯 (PDITC) 溶液,置于恒温振荡器,反应 10h,最后将反应后的磁性颗粒用丙酮及超纯水反复清洗 6 遍,取新制备经 PDITC 活化的磁性颗粒置于 30mL 离心管中,加入 PBS 25mL,加入 4mg 链亲和素,置于恒温振荡器中反应 20min,磁性分离,测定反应前后溶液在 280nm 的 OD 值,以 PBS 清洗 3 次,收集,加入等量丙三醇,-20℃保存。

12. 如权利要求 9 所述的方法,其特征在于,所述制备链亲和素化固相载体的步骤 2) 采用以下塑料颗粒方法：

250mg 氨基末端塑料颗粒置于烧杯,加入甲醇及丙酮各 5mL 反复清洗,离心分离,弃去上清,加入 DMF 溶解的 10mL0.2%的 1,4-二异硫氰酸酯 (PDITC) 溶液,置于恒温振荡器,反应 10h,最后将反应后的塑料颗粒用丙酮及超纯水反复清洗 6 遍,取新制备经 PDITC 活化的塑料颗粒置于 30mL 离心管中,加入 PBS 25mL,加入 4mg 链亲和素,置于恒温振荡器中反应 20min,离心分离,测定反应前后溶液在 280nm 的 OD 值,以 PBS 清洗 3 次,收集,加入等量丙三醇,-20℃保存。

13. 如权利要求 9 所述的方法,其特征在于,所述制备 EGFR 蛋白配体生物素化的步骤 3) 采用以下方法：

将生物素-N-羟基磺酸基琥珀酰亚胺酯 (Sulfo-NHS-Biotin) 冰箱取出平衡至室温；0.01M 的 PBS 稀释 EGFR 蛋白配体至浓度 2mg/mL；称取 Sulfo-NHS-Biotin 2mg 于西林瓶中加超纯水 300 μ L,轻轻摇匀活化；立即将活化的生物素溶液 54 μ L 缓慢加入 2mLEGFR 蛋白配体溶液中,室温反应 30min,反应液用 0.01M 的 PBS 透析 4℃ 8h 并换液 4 次,收集,加入等量丙三醇,-20℃保存。

14. 如权利要求 9 所述的方法,其特征在于,所述制备 5,10,15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉偶联标记 EGFR 蛋白配体的步骤 4) 采用以下方法：将 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺 (EDC) 冰柜取出平衡至室温,取 10mg 5,10,15-三(4-吡啶

基)-20-R-羧基卟啉和 20mgEDC 分别溶于 1ml 超纯水中使其溶解,将两者在 4℃混合搅拌反应 30min,然后向此混合液中缓慢滴加入含 30mg/mL EGFR 蛋白配体溶液,室温搅拌反应 2h,层析纯化后,-20℃保存。

一种检测 EGFR 蛋白的试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及化学发光免疫分析技术领域,特别涉及一种检测 EGFR 蛋白的试剂盒及其制备方法,结合了生物素-亲和素免疫放大技术和化学发光免疫分析技术。

背景技术

[0002] 表皮生长因子受体 (Epidermal Growth Factor Receptor ;EGFR) 是表皮生长因子 (EGF) 细胞增殖和信号传导的受体。EGFR 属于 ErbB 受体家族的一种,该家族包括 EGFR(ErbB-1),HER2/c-neu(ErbB-2),Her3(ErbB-3) 和 Her4(ErbB-4)。EGFR 也被称作 HER1、ErbB1。EGFR 是一种糖蛋白,属于酪氨酸激酶型受体,细胞膜贯通,分子量 170kDa。在科研和生产过程中,需要测定溶液中 EGFR 蛋白含量变化,来监控实验条件和监控生产过程。

[0003] 目前 EGFR 蛋白测定方法有胶体金免疫层析 (GICA) ;蛋白质印迹 (WB) ;酶联免疫吸附试验 (ELISA),化学发光法免疫分析 (CLIA) ;GICA、ELISA、WB 的优点是相对成本低廉,缺点是灵敏度低,EGFR 蛋白含量少的情况下检测不出,CLIA 检测灵敏度比上述方法高,但还是不能满足科研上对 EGFR 蛋白超微量检测的需要。为了适应科研和生产上对检测灵敏度的更高要求,需要对化学发光技术进行创新。

[0004] 1977 年, Halmann 将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应结合起来,建立了化学发光免疫分析法 (CLIA)。经过几十年的发展。目前根据标记物的不同,化学发光免疫分析可分以下四个类型:(1) 以辣根过氧化物酶 (HRP) 为标记物的酶促化学发光系统。该系统的发光底物为鲁米诺及其衍生物,在氧化剂存在下,HRP 催化鲁米诺及其衍生物发光,波长 425nm。苯酚类化合物可增强其发光强度;(2) 以碱性磷酸酶为标记物的酶促化学发光系统。该系统的发光底物为 1,2-二氧环乙烷衍生物(或称金刚烷衍生物)。例如 AMPPD, CSPD, CDP-Star, Lumi-phos480, Lumiphos-530 等。表面活性剂会增强并延长其发光强度,发光波长 470nm;(3) 以吖啶酯类为标记物的化学发光系统。该系统采用直接标记吖啶酯类发光剂,吖啶酯类发光剂在碱性 H_2O_2 作用下直接发光,波长 430nm 处吖啶酯类发光系统发光强度高;(4) 以三联吡啶钌 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 为标记物的电化学发光系统。是通过施加一定的电压进行电化学反应,在电极表面产生电生物物质,然后电生物物质与体系中三丙胺 (TPA) 之间通过电子传递形成激发态,之后激发态的能量以光的形式释放出来。在波长 350 ~ 420nm 处发光强度高。

[0005] 1982 年, Ikarlyama 等以氯化血红素代替辣根过氧化物酶 (HRP),用碳二亚胺法将其标记在人体血清白蛋白 (HSA) 上,结合酶免疫分析技术,对 HSA 的化学发光免疫测试进行了初步探讨。他们这一开创性的研究,为金属卟啉在酶免疫分析中的应用奠定了基础。

[0006] 1984 年, Hara 等将铁卟啉配合物标记于 HSA 抗体上用于检测 HSA,并将这一体系应用于分析化学中。

[0007] 1992 年, Adam 等对铁卟啉和锰卟啉的催化机理进行的研究,并与辣根过氧化酶的催化发光效应进行了比较。

[0008] 1993 年, Motsenbocker 等用光敏剂和金属卟啉标记抗体进行免疫检测。

[0009] 1994 年,慈云祥等课题组对于金属卟啉催化剂替代辣根过氧化酶催化化学发光反应也进行了一些探索。

[0010] 2006 年, Komagoe 等卟啉诱导的光学生成过氧化氢的测定,用鲁米诺发光法:在水溶液中与卟啉聚集的一个结构活性关系进行研究。

[0011] 2006 年, Rana 等电化学产生过氧化氢和卟啉化学发光法进行了尝试。

[0012] 2006 年,李春艳等四苯基卟啉锌掺杂 8-羟基喹啉铝与四苯基联苯二胺的电致发光性能进行了研究。

[0013] 2007 年,刘波等发光材料四苯基卟啉及其金属配合物的合成及性能进行了研究。

[0014] 2008 年,吴俊等卟啉掺杂 MEH-PPV 的发光性能进行了探讨。

[0015] 2011 年, D Wu 等新型化学发光流动注射分析减少其对鲁米诺-间-四(3-甲氧基-4-羟基)苯基卟啉锰催化过氧化氢的反应进行了研究。

[0016] 2012 年, Kazemi 等对动力学化学发光锰(III)-四(4-磺酸)卟啉鲁米诺过氧化氢体系的人和牛血清白蛋白的影响进行了研究探索。

[0017] 上述研究,主要在卟啉类标记物替代辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶及其他酶促化学发光技术,在过氧化氢等过氧化物,鲁米诺及鲁米诺衍生物为底物基础上进行的探索,取得一些效果,但没有满足科研方面对超微量检测的需求。我们通过实验发现水溶性的 5,10,15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉在促进吡啶酯和吡啶磺酰胺在非碱性条件下的化学发光效果方面明显优于上述四种常用化学发光常见系统及文献报道,能够提高对超微量被测物的检测能力。

[0018] 吡啶酯类发光剂标记物合成后,会有微量发光剂在没有碱性条件刺激下缓慢发光,这点也影响了其长期稳定性及对缓冲液的选择性。5,10,15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉化学结构非常稳定,且对酸碱 pH 值适应的范围宽,可长期稳定保存。

[0019] 同时,目前没有发现 5,10,15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉作为标记物,吡啶酯,吡啶磺酰胺为底物的化学发光法检测 EGFR 蛋白的研究及报道。

[0020] 生物素-亲和素系统(biotin-avidin system, BAS)具有多级的信号放大作用,并且不增加非特异性干扰,且具有特异性好、稳定性高、和实验成本低等特点。

[0021] 本发明结合 BAS 技术,首次提出采用水溶性 5,10,15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉作为标记物构建化学发光免疫检测 EGFR 蛋白的方法,该方法集合了 CLIA 灵敏度、BAS 放大作用和 5,10,15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉稳定性,克服了传统 CLIA 法灵敏度无法满足科研超微量研究的弊端,本发明试剂盒的高灵敏度,稳定性方面 5,10,15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉作为标记物明显好于常规直接标记吡啶酯,吡啶磺酰胺标记物,发光信号更强,对于检测超微量物质提供了一个全新的化学发光技术方法。

发明内容

[0022] 本发明克服了当前化学发光法不能满足对 EGFR 蛋白超微量检测的技术问题,即通过生物素-亲和素免疫放大技术结合化学发光技术和水溶性 5,10,15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉作为标记物构建化学发光免疫分析高灵敏度检测 EGFR 蛋白,提供了一种检测 EGFR 蛋白的试剂盒及其制备方法。

[0023] 本发明采用的技术方案是:

[0024] 本发明的目的是提供一种生物素-亲和素免疫放大技术结合化学发光技术和水溶性 5,10,15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉作为标记物方法,检测 EGFR 蛋白的试剂盒。

[0025] 本发明的再一目的是提供一种制备上述试剂盒的方法。

[0026] 根据本发明的试剂盒包括:1)EGFR 蛋白校准品;2)链亲和素偶联的固相载体;3)生物素化的 EGFR 蛋白配体;4)5,10,15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉偶联标记的 EGFR 蛋白配体;以及 5)上述 5,10,15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉所作用的化学发光底物。

[0027] 根据本发明的试剂盒,其中,所述 EGFR 蛋白为表皮生长因子受体。

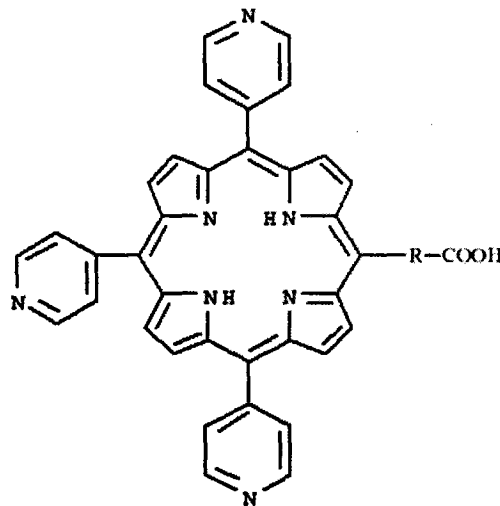
[0028] 根据本发明的试剂盒,其中,所述 EGFR 蛋白校准品为表皮生长因子受体配制的校准品冻干品,校准品内所用的保护基质蛋白为牛血清白蛋白,卵清蛋白。

[0029] 根据本发明的试剂盒,其中,所述链亲和素偶联的固相载体为磁性颗粒,塑料颗粒。

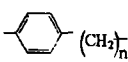
[0030] 根据本发明的试剂盒,其中,所述 EGFR 蛋白配体为可以与 EGFR 蛋白特异性结合反应的单克隆抗体、多克隆抗体、基因工程抗体、蛋白质、大分子有机化合物。

[0031] 根据本发明的试剂盒,其中,所述 5,10,15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉结构式如(I)所示:

[0032]



[0033] (I)

[0034] 结构式(I)中 R 为 , n 为 1~4 的自然数。

[0035] 根据本发明的试剂盒,其中,所述 5,10,15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉偶联标记的 EGFR 蛋白配体所用的偶联剂为 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC),N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)。

[0036] 根据本发明的试剂盒,其中,所述 5,10,15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉所作用的化学发光底物为吡啶酯、吡啶磺酰胺。

[0037] 进一步,本发明提供了一种制备上述试剂盒的方法,包括以下步骤:

[0038] 1)以 EGFR 蛋白纯品配制 EGFR 蛋白校准品;

[0039] 2)使链亲和素偶联固相载体;

[0040] 3)使 EGFR 蛋白配体生物素化;

[0041] 4)用 5,10,15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉偶联标记 EGFR 蛋白配体;

[0042] 5) 配制化学发光底物液；

[0043] 6) 分装上述 EGFR 蛋白校准品、链亲和素偶联固相载体、生物素化的 EGFR 蛋白配体、5, 10, 15- 三 (4- 吡啶基) -20-R- 羧基卟啉偶联标记的 EGFR 蛋白配体和化学发光底物液；以及

[0044] 7) 组装为成品。

[0045] 根据本发明的方法, 优选, 所述制备 EGFR 蛋白校准品的步骤 1) 采用以下方法：

[0046] 配制含牛血清白蛋白 2%，卵清蛋白 1.5%，水解明胶 0.5%，2.5% 蔗糖的 0.01M PB 缓冲溶液为校准品基质液, 用基质液配制含不同浓度 EGFR 蛋白的校准品, 用西林瓶分装 1mL/ 瓶, 冻干处理后, -20℃ 保存。

[0047] 根据本发明的方法, 优选, 所述制备链亲和素化固相载体的步骤 2) 采用以下磁性颗粒方法：

[0048] 250mg 氨基末端磁性颗粒置于烧杯, 加入甲醇及丙酮各 5mL 反复清洗, 磁性分离, 弃去上清, 加入 DMF 溶解的 10mL 0.2% 的 1,4- 二异硫氰酸酯 (PDITC) 溶液, 置于恒温振荡器, 反应 10h, 最后将反应后的磁性颗粒用丙酮及超纯水反复清洗 6 遍, 取新制备经 PDITC 活化的磁性颗粒置于 30mL 离心管中, 加入 PBS 25mL, 加入 4mg 链亲和素, 置于恒温振荡器中反应 20min, 磁性分离, 测定反应前后溶液在 280nm 的 OD 值, 以 PBS 清洗 3 次, 收集, 加入等量丙三醇, -20℃ 保存。

[0049] 根据本发明的方法, 优选, 所述制备链亲和素化固相载体的步骤 2) 采用以下塑料颗粒方法：

[0050] 250mg 氨基末端塑料颗粒置于烧杯, 加入甲醇及丙酮各 5mL 反复清洗, 离心分离, 弃去上清, 加入 DMF 溶解的 10mL 0.2% 的 1,4- 二异硫氰酸酯 (PDITC) 溶液, 置于恒温振荡器, 反应 10h, 最后将反应后的塑料颗粒用丙酮及超纯水反复清洗 6 遍, 取新制备经 PDITC 活化的塑料颗粒置于 30mL 离心管中, 加入 PBS 25mL, 加入 4mg 链亲和素, 置于恒温振荡器中反应 20min, 离心分离, 测定反应前后溶液在 280nm 的 OD 值, 以 PBS 清洗 3 次, 收集, 加入等量丙三醇, -20℃ 保存。

[0051] 根据本发明的方法, 优选, 所述制备 EGFR 蛋白配体生物素化的步骤 3) 采用以下方法：

[0052] 将生物素 -N- 羟基磺酸基琥珀酰亚胺酯 (Sulfo-NHS-Biotin) 冰箱取出平衡至室温。0.01M 的 PBS 稀释 EGFR 蛋白配体至浓度 2mg/mL。称取 Sulfo-NHS-Biotin 2mg 于西林瓶中加超纯水 300 μ L, 轻轻摇匀活化。立即将活化的生物素溶液 54 μ L 缓慢加入 2mL EGFR 蛋白配体溶液中, 室温反应 30min, 反应液用 0.01M 的 PBS 透析 4℃ 8h (换液 4 次), 收集, 加入等量丙三醇, -20℃ 保存。

[0053] 根据本发明的方法, 优选, 所述制备 5, 10, 15- 三 (4- 吡啶基) -20-R- 羧基卟啉偶联标记 EGFR 蛋白配体的步骤 4) 采用以下方法：

[0054] 将 1- 乙基 - (3- 二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺 (EDC) 冰柜取出平衡至室温, 取 10mg 5, 10, 15- 三 (4- 吡啶基) -20-R- 羧基卟啉和 20mg EDC 分别溶于 1ml 超纯水中使其溶解, 将两者在 4℃ 混合搅拌反应 30min, 然后向此混合液中缓慢滴加入含 30mg/mL EGFR 蛋白配体溶液, 室温搅拌反应 2h, 层析纯化后, -20℃ 保存。

[0055] 与现有技术相比, 本发明的有益效果是发光信号明显提高, 对超微量的 EGFR 蛋白

检测效果明显优于现有化学发光免疫分析技术方法。本发明主要用途为 EGFR 蛋白超微量检测。实施例 1 制备本发明的检测 EGFR 蛋白的试剂盒

具体实施方式

实施例 1 制备本发明的检测 EGFR 蛋白的试剂盒

[0056] 一、校准品基质液的制备

[0057]

NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O	0.2g
Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O	2.9g
牛血清白蛋白	20g
卵清蛋白	15g
水解明胶	5g
蔗糖	25g
双蒸水	定容至 1000mL

[0058] 将上述试剂称量好放入洁净容器中,加双蒸水定容,溶解混匀,测定 pH 值。贴签后置 2 ~ 8° C 保存。

[0059] 二、EGFR 蛋白校准品的制备

[0060] 用校准品基质液及 EGFR 蛋白纯品配制校准品,浓度分别为 0、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100ng/mL, (其中 0ng/mL 为校准品基质液,不含 EGFR 蛋白),配制系列浓度校准品,各浓度校准品用 3mL 规格西林瓶分装 1mL/ 瓶,冻干处理后,-20°C 保存。

[0061] 三、配方稀释液的制备

[0062]

NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O	0.2g
Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O	2.9g
牛血清白蛋白	10g
Proclin 300	1mL
双蒸水	定容至 1000mL

[0063] 四、链亲和素化固相磁性颗粒的制备

[0064] (1) 称取 250mg 氨基末端磁性颗粒置于烧杯;

[0065] (2) 加入甲醇及丙酮各 5mL 反复清洗 5 遍;

[0066] (3) 磁性分离,弃去上清;

[0067] (4) 加入 DMF 溶解的 10mL0.2% 的 1,4-二苯基二异硫氰酸酯 (PDITC) 溶液,置于恒温振荡器,反应 10h;

[0068] (5) 将反应后的磁性颗粒用丙酮及超纯水反复清洗 6 遍;

[0069] (6) 取新制备经 PDITC 活化的磁性颗粒置于 30mL 离心管中;

[0070] (7) 加入 PBS25mL,加入 4mg 链亲和素,置于恒温振荡器中反应 20min;

[0071] (8) 磁性分离,测定反应前后溶液在 280nm 的 OD 值,以 PBS 清洗 3 次,收集,加入等量丙三醇,-20°C 保存。

[0072] 用配方稀释液梯度稀释,通过实验检测效价,在根据最近效价稀释比例配制链亲和素化固相磁性颗粒工作液。用 5mL 规格西林瓶分装 1mL/ 瓶,冻干处理后, -20℃ 保存。

[0073] 五、EGFR 蛋白单克隆抗体生物素化的制备

[0074] (1) 将生物素 -N- 羟基磺酸基琥珀酰亚胺酯 (Sulfo-NHS-Biotin) 冰箱取出平衡至室温;

[0075] (2) 0.01M 的 PBS 稀释 EGFR 蛋白单克隆抗体至浓度 2mg/mL;

[0076] (3) 称取 Sulfo-NHS-Biotin 2mg 于西林瓶中加超纯水 300 μ L, 轻轻摇匀活化。

[0077] (4) 立即将活化的生物素溶液 54 μ L 缓慢加入 2mL EGFR 蛋白单克隆抗体溶液中, 室温反应 30min;

[0078] (5) 反应液用 0.01M 的 PBS 透析 4℃ 8h (换液 4 次), 收集, 加入等量丙三醇, -20℃ 保存。

[0079] 用配方稀释液梯度稀释,通过实验检测效价,在根据最近效价稀释比例配制 EGFR 蛋白单克隆抗体生物素化工作液。用 5mL 规格西林瓶分装 1mL/ 瓶,冻干处理后, -20℃ 保存。

[0080] 六、5, 10, 15- 三 (4- 吡啶基) -20- 对苯乙酸卟啉偶联标记 EGFR 蛋白单克隆抗体的制备

[0081] (1) 将 1- 乙基 - (3- 二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺 (EDC) 冰柜取出平衡至室温;

[0082] (2) 取 10mg 5, 10, 15- 三 (4- 吡啶基) -20- 对苯乙酸卟啉和 20mg EDC 分别溶于 1ml 超纯水中使其溶解;

[0083] (3) 将上述 5, 10, 15- 三 (4- 吡啶基) -20- 对苯乙酸卟啉溶液和 EDC 溶液, 在 4℃ 混合搅拌反应 30min;

[0084] (4) 然后向此混合液中缓慢滴加入含 30mg/mL EGFR 蛋白单克隆抗体溶液, 室温搅拌反应 2h, 层析纯化后, -20℃ 保存。

[0085] 用配方稀释液梯度稀释,通过实验检测效价,在根据最近效价稀释比例配制 5, 10, 15- 三 (4- 吡啶基) -20- 对苯乙酸卟啉偶联标记 EGFR 蛋白单克隆抗体化工作液。用 5mL 规格西林瓶分装 1mL/ 瓶,冻干处理后, -20℃ 保存。

[0086] 七、化学发光底物液的制备

[0087]

NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O	0.2g
Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O	2.9g
吖啶酯	0.1g
KCl	1.5g
双蒸水	定容至 1000mL

[0088] 八、洗涤缓冲液

[0089]

NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O	0.2g
Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O	2.9g
NaCl	0.5g
Tween-20	0.2mL
双蒸水	定容至 1000mL

[0090] 九、半成品及成品组成

[0091] 上述步骤所得产品分装即为半成品。抽出三份经过特异性、精密性、灵敏度及稳定性检定合格才能组装成 EGFR 蛋白试剂盒。组装成试剂盒后还需抽检合格。

[0092] 综上,在本发明的研究过程中,本发明的发明人首先对所用的原材料进行了筛选试验和质量鉴定,包括 5,10,15-三(4-吡啶基)-20-对苯乙酸卟啉单克隆抗体、生物素化单克隆抗体的活性、亲和素化磁性颗粒的吸附性能和变异大小、化学发光底物的发光强度及发光持续时间等。同时对亲和素化载体的方法进行了研究,用不同的合成比例及反应时间进行交叉对比,选出效果最佳的制备工艺。5,10,15-三(4-吡啶基)-20-对苯乙酸卟啉再次通过多次方阵交叉试验选出各个组分间最佳的配比关系。实验结果表明在同等条件下,本发明 5,10,15-三(4-吡啶基)-20-对苯乙酸卟啉标记物促进吡啶酯发光强度高于传统吡啶酯发光强度一个数量级(10 倍)以上。提高了在检测超微量 EGFR 蛋白的能力。

[0093] 利用本发明的试剂盒进行检测,灵敏度高,稳定性好,非常适用于科研对超微量 EGFR 蛋白的检测需求。

[0094] 实施例 2 制备本发明的检测 EGFR 蛋白的试剂盒

[0095] 四、链亲和素化固相塑料颗粒的制备

[0096] (1) 称取 250mg 氨基末端塑料颗粒置于烧杯;

[0097] (2) 加入甲醇及丙酮各 5mL 反复清洗 5 遍;

[0098] (3) 离心分离,弃去上清;

[0099] (4) 加入 DMF 溶解的 10mL0.2% 的 1,4-二异硫氰酸酯 (PDITC) 溶液,置于恒温振荡器,反应 10h;

[0100] (5) 将反应后的塑料颗粒用丙酮及超纯水反复清洗 6 遍;

[0101] (6) 取新制备经 PDITC 活化的塑料颗粒置于 30mL 离心管中;

[0102] (7) 加入 PBS25mL,加入 4mg 链亲和素,置于恒温振荡器中反应 20min;

[0103] (8) 离心分离,测定反应前后溶液在 280nm 的 OD 值,以 PBS 清洗 3 次,收集,加入等量丙三醇,-20°C 保存。

[0104] 用配方稀释液梯度稀释,通过实验检测效价,在根据最近效价稀释比例配制链亲和素化固相塑料颗粒工作液。用西林瓶分装 1mL/瓶,冻干处理后,-20°C 保存。其余均以与实施例 1 相同的方法制备本发明的检测 EGFR 蛋白的试剂盒。

[0105] 实施例 3~6 制备本发明的检测 EGFR 蛋白的试剂盒

[0106] 单克隆抗体分别替换为多克隆抗体、基因工程抗体、蛋白质、大分子有机化合物,其余均以与实施例 1 相同的方法制备本发明的检测 EGFR 蛋白的试剂盒。

[0107] 实施例 7 制备本发明的检测 EGFR 蛋白的试剂盒

[0108] 六、5,10,15-三(4-吡啶基)-20-对苯乙酸卟啉偶联标记 EGFR 蛋白单克隆抗体的制备

[0109] (1) 将 N, N' 一二环己基碳二亚胺 (DCC) 冰柜取出平衡至室温 ;

[0110] (2) 取 10mg5,10,15- 三 (4- 吡啶基)-20- 对苯乙酸卟啉和 20mgDCC 分别溶于 1ml 超纯水中使其溶解 ;

[0111] (3) 将上述 5,10,15- 三 (4- 吡啶基)-20- 对苯乙酸卟啉溶液和 DCC 溶液, 在 4℃ 混合搅拌反应 30min ;

[0112] (4) 然后向此混合液中缓慢滴加入含 30mg/mL EGFR 蛋白单克隆抗体溶液, 室温搅拌反应 2h, 层析纯化后, -20℃ 保存。

[0113] 用配方稀释液梯度稀释, 通过实验检测效价, 在根据最近效价稀释比例配制 5, 10, 15- 三 (4- 吡啶基)-20- 对苯乙酸卟啉偶联标记 EGFR 蛋白单克隆抗体化工作液。用西林瓶分装 1mL/ 瓶, 冻干处理后, -20℃ 保存。

[0114] 其余均以与实施例 1 相同的方法制备本发明的检测 EGFR 蛋白的试剂盒。

[0115] 实施例 8 ~ 10 制备本发明的检测 EGFR 蛋白的试剂盒

[0116] 5,10,15- 三 (4- 吡啶基)-20- 对苯乙酸卟啉分别替换为 5,10,15- 三 (4- 吡啶基)-20- 对苯丙酸卟啉、5,10,15- 三 (4- 吡啶基)-20- 对苯丁酸卟啉、5,10,15- 三 (4- 吡啶基)-20- 对苯戊酸卟啉, 其余均以与实施例 1 和实施例 7 相同的方法制备本发明的检测 EGFR 蛋白的试剂盒。

[0117] 实施例 11 制备本发明的检测 EGFR 蛋白的试剂盒

[0118] 七、化学发光底物液的制备

[0119]

NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O	0.2g
Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O	2.9g
吡啶磺酰胺	0.1g
KCl	1.5g
双蒸水	定容至 1000mL

[0120] 其余均以与实施例 1 相同的方法制备本发明的检测 EGFR 蛋白的试剂盒。

[0121] 实施例 12 本发明的试剂盒的使用方法

[0122] (1) 从冰箱取出试剂盒平衡至室温 ;

[0123] (2) 将校准品浓度为 0、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100ng/mL 的冻干品每瓶加入 1mL 纯化水进行溶解 ;

[0124] (3) 向链亲和素化固相磁性颗粒冻干品瓶中加入 5mL 纯化水进行溶解 ;

[0125] (4) 向 EGFR 蛋白单克隆抗体生物素化工作液冻干品瓶中加入 5mL 纯化水进行溶解 ;

[0126] (5) 向 5,10,15- 三 (4- 吡啶基)-20- 苯乙酸卟啉偶联标记 EGFR 蛋白单克隆抗体冻干品瓶中加入 5mL 纯化水进行溶解 ;

[0127] (6) 在反应杯中分别加入 0、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100ng/mL 校准品、质控品、待测样本各 50 μ L ;

[0128] (7) 在每个反应杯中依次加入链亲和素化固相磁性颗粒复溶液各 50 μ L, EGFR 蛋白单克隆抗体生物素化复溶液各 50 μ L, 及 5,10,15- 三 (4- 吡啶基)-20-R- 羧基卟啉偶联标记 EGFR 蛋白单克隆抗体复溶液各 50 μ L ;

[0129] (8) 37℃温育 30 分钟：

[0130] (9) 磁场吸附，吸去上清液，用 300 μ L 洗涤缓冲液冲洗，再次磁场吸附，吸取上清液，重复 4 遍。

[0131] (10) 在每个反应杯中依次加入化学发光底物液 200 μ L

[0132] (11) 在化学发光测量仪上依序测量各孔的发光强度 (RLU)

[0133] (12) 分别对校准品浓度和对应 RLU 取对数，在双对数坐标图上建立标准曲线，以校准品浓度为横坐标，RLU 值为纵坐标绘出标准曲线，以待测样本的 RLU 值在标准曲线上查出该样本的浓度值。

专利名称(译)	一种检测EGFR蛋白的试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN103575901B	公开(公告)日	2015-10-21
申请号	CN201210253713.X	申请日	2012-07-23
[标]申请(专利权)人(译)	苏州长光华生物试剂有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州长光华生物试剂有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州长光华生物试剂有限公司		
[标]发明人	徐海伟 李勇 胡庆锋 常立峻 陈秀发		
发明人	徐海伟 李勇 胡庆锋 常立峻 陈秀发		
IPC分类号	G01N33/68 G01N21/76 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/54326 G01N33/544 G01N33/6803		
代理人(译)	董建林		
其他公开文献	CN103575901A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测EGFR蛋白的试剂盒及其制备方法，涉及化学发光免疫分析技术领域，为解决目前EGFR蛋白超微量检测的技术问题，根据本发明的试剂盒包括：1)EGFR蛋白校准品；2)链亲和素偶联的固相载体；3)生物素化的EGFR蛋白配体；4)5，10，15-三(4-吡啶基)-20-R-羧基卟啉偶联标记的EGFR蛋白配体；以及5)所作用的化学发光底物。进一步，根据本发明制备上述试剂盒的方法。本发明主要用途为EGFR蛋白超微量检测。