



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102368070 A

(43) 申请公布日 2012.03.07

(21) 申请号 201110183624.8

(22) 申请日 2011.07.01

(71) 申请人 上海永昶医学诊断用品有限公司

地址 201703 上海市青浦区赵巷镇沪青平公路 2933 弄 9 幢

申请人 复旦大学附属肿瘤医院

(72) 发明人 卢仁泉 郭林

(74) 专利代理机构 北京连城创新知识产权代理有限公司 11254

代理人 刘伍堂

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 11 页

(54) 发明名称

检测人血浆中 MR-1S 含量的试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明属于生物医药检验技术领域,具体涉及一种检测 S 亚型人肌纤维生成调节因子 1 含量的酶联免疫吸附测定试剂盒,由以下试剂组成:抗人 MR-1S 抗体预包被板 1 块或 MR-1S 抗原预包被板 1 块;抗人 MR-1S 抗体酶标记液 1 瓶;系列浓度的人 MR-1S 标准液;阳性质控液、阴性质控液、生理盐水各 1 支;洗涤液;样品稀释液;封闭液;底物液;终止液。本发明与现有技术相比,所建立的试剂盒的检测结果显示,对 MR-1S 浓度可实现定量检测,检测结果可反映人 MR-1S 的变化范围和发展趋势,满足临床诊断和治疗监测需求,且可在 120 分钟内完成测试,试剂、方法稳定、操作简便,灵敏度高、特异性较强,有较好的临床应用前景。

1. 一种检测人血浆中 MR-1S 含量的试剂盒,其特征在于由以下试剂组成:

抗人 MR-1S 抗体预包被板 1 块或 MR-1S 抗原预包被板 1 块,抗人 MR-1S 抗体预包被板中的包被物为浓度为 50 ~ 500 $\mu\text{g/ml}$ 的抗人 MR-1S 抗体;MR-1S 抗原预包被板中包被物为 1 ~ 10 $\mu\text{g/ml}$ 的人 MR-1S 融合蛋白;

抗人 MR-1S 抗体酶标记液 1 瓶;

系列浓度的人 MR-1S 标准液,即采用如下浓度的人 MR-1S 融合蛋白作为标准液:1500 ng/ml、750 ng/ml、375 ng/ml、187.5 ng/ml、93.8 ng/ml、0 ng/ml 各 1 支;

阳性质控液为含人 MR-1S 融合蛋白的磷酸盐溶液 PBS、阴性质控液为 0.9% 的生理盐水各 1 支,所述的含人 MR-1S 融合蛋白的浓度为 300 ng/ml;所述的磷酸盐溶液 PBS 的浓度为 0.01mol/L、pH 值为 7.4;

洗涤液采用 2.42g 的三羟基氨基甲烷 Tris、13ml 的 0.1 mol/L 的 HCl 和 0.5 ml 的 Tween-20 混合而成;

样品稀释液为 0.2 g 的 KH_2PO_4 、2.9 g 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、8.0g 的 NaCl、0.2g 的 KCl、0.5 ml 的 Tween-20 和 10g 的牛血清白蛋白 BSA 混合后加蒸馏水至 1000 ml 所构成;

封闭液采用上述配方的 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液 100 ml,再加入 1g BSA 混合而成;

底物液为由 A 液和 B 液组成,所述的 A 液由 5.1 ml 的 0.1mol/L 的 Na_2HPO_4 和 4 mg 邻甲苯胺混合而成,所述的 B 液由 4.9 ml 的 0.05 mol/L 的柠檬酸和 0.05 ml 的 30% 的 H_2O_2 混合而成;

终止液采用 2mol/L 的 H_2SO_4 ,即 177.6 ml 蒸馏水中加入 22.4 ml 的 98% 的浓 H_2SO_4 而成。

2. 按权利要求 1 所述的一种检测人血浆中 MR-1S 含量的试剂盒,其特征在于:所述的抗人 MR-1S 抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

3. 按权利要求 1 所述的一种检测人血浆中 MR-1S 含量的试剂盒,其特征在于:所述的预包被板采用聚苯乙烯板或聚氯乙烯板或聚氯乙烯酰胺板材质的 96 微孔板。

4. 按权利要求 1 所述的一种检测人血浆中 MR-1S 含量的试剂盒,其特征在于:所述的抗人 MR-1S 抗体酶标记液中所采用的酶为辣根过氧化物酶 HRP 或碱性磷酸酶 ALP。

5. 一种检测人血浆中 MR-1S 含量的试剂盒的制备方法,其特征在于将权利要求 1 所述的试剂通过下列步骤制备而成试剂盒:

a、人 MR-1S 融合蛋白的制备:抽提卵巢癌患者的血液基因组 DNA,以分子克隆的方法,即从血液基因组 DNA 中用 PCR 扩增目的基因人 MR-1S,双酶切后与同样双酶切的原核表达载体 pET21a (+) 或 PGEX-4T-1,构建 pET21a-MR-1S 或 PGEX-4T-1-MR-1S 重组质粒,转化大肠杆菌 BL21,异丙基硫代半乳糖苷 IPTG 诱导 MR-1S-His 融合蛋白或 MR-1S-GST 融合蛋白表达,亲和纯化后 Western blot 鉴定,MR-1S-His 融合蛋白或 MR-1S-GST 融合蛋白浓缩后,用 0.01mol/L、pH7.2 的 PBS 透析活化,冷冻干燥成冻干粉,得到人 MR-1S 融合蛋白,-20°C 保存;

b、抗人 MR-1S 抗体的制备及纯化:用上述纯化得到的人 MR-1S 融合蛋白免疫动物,制备特异的高效价的抗人 MR-1S 的抗体,并使用辛酸法和 / 或饱和硫酸铵纯化;

c、将抗人 MR-1S 抗体或作为抗原的人 MR-1S 融合蛋白与包被液混匀后,包被 96 微孔板,所述的包被液采用由 Na_2CO_3 0.16g, NaHCO_3 0.29 g 加蒸馏水至 100 ml 制得的 pH 9.6

的碳酸盐缓冲液；

d、上述包被好的 96 微孔板,过夜,吹干,再用封闭液封闭,吹干,加一包干燥剂,用铝箔袋封好,得抗人 MR-1S 抗体预包被板或 MR-1S 抗原预包被板；

e、抗人 MR-1S 抗体酶标记液的制备:采用过碘酸钠标记法试剂以过碘酸标记法制备,即通过调整所获得的抗人 MR-1S 抗体的 pH 值,再将酶标记于该抗体,然后储存于 10 ml 塑料瓶；

f、组合成检测人 MR-1S 的酶联免疫吸附测定试剂盒:将上述 d 步骤中封好的铝箔袋、上述制备而得的抗人 MR-1S 抗体酶标记液 1 瓶;系列浓度的人 MR-1S 标准液 6 支;阴性、阳性质控液各 1 支;样品稀释液 1 瓶;洗涤液 1 瓶;底物液 A 液、底物液 B 液和终止液各 1 瓶,置于一个纸制的外包装盒内。

6. 按权利要求 5 所述的一种检测人血浆中 MR-1S 含量的试剂盒的制备方法,其特征在于步骤 b 中所述的人 MR-1S 融合蛋白免疫动物制备特异的高效价的抗人 MR-1S 的抗体为:当制备单抗时为采用将获得的人 MR-1S 融合蛋白依次采用杂交瘤方法进行细胞融合、间接 ELISA 法筛选阳性孔、克隆培养获得抗人 MR-1S 单抗;当制备多抗时为采用将获得的人 MR-1S 融合蛋白与弗氏佐剂混匀,免疫实验动物,获得含多克隆抗体的抗血清。

7. 按权利要求 5 所述的一种检测人血浆中 MR-1S 含量的试剂盒的制备方法,其特征在于步骤 e 中采用过碘酸钠标记法试剂制备抗人 MR-1S 抗体酶标记液的具体步骤为:(1)将 7.5mg HRP 加 0.5ml 蒸馏水溶解后;(2)加 0.5ml、0.06 mol/L 的 NaIO_4 , 混合后,置于 4°C 环境,3 分钟;(3)加 0.5ml、0.16 mol/L 乙二醇溶液,室温 30 分钟;(4)加 7mg/ml 的兔抗人 MR-1S 抗体 IgG 1.0ml 或 7mg/ml 的抗人 MR-1S 单抗 1.0ml;(5)混合后装透析袋,用 1000ml、0.05 mol/L、pH 9.5 碘酸缓冲液透析过夜;(6)第二天,吸出透析物,加 5mg/ml 的 NaBH_4 溶液 0.2ml 置冰箱 2 小时;(7)吸出上述综合物混合液,加入等体积饱和硫酸铵,冰箱 4°C,30 分钟后,离心 4000 转/分 15 分钟弃上清,沉淀溶于 1ml、pH7.4、0.02 mol/L PBS 溶液中,装入透析袋,再用 1000ml、0.1mol/L、pH7.4 的 PBS 溶液透析过夜,然后此透析过夜步骤再重复一次;(8)第二天,再离心去除不溶物,即得抗人 MR-1S 抗体酶标记液,简称“酶标抗体 IgG”,分装于 10 ml 塑料瓶中,4°C 保存。

8. 按权利要求 5 或 7 所述的一种检测人血浆中 MR-1S 含量的试剂盒的制备方法,其特征在于所述的过碘酸标记法试剂包括如下试剂:

0.06mol/L 的 NaIO_4 :0.13 克 NaIO_4 加水至 10ml;

0.16mol/L 的乙二醇溶液:乙二醇 0.1ml 加水至 10ml;

5mg/ml 的 NaBH_4 : NaBH_4 5mg 加水至 1ml;

0.05mol/L、pH 9.5 碘酸盐缓冲液:无水碳酸钠 10.6 克加水至 500ml 成 C 液;无水碳酸氢钠 16.8 克加水至 1000ml 成 D 液,C 液 16ml 和 D 液 34ml 混合后加水至 200 ml 制备而成;

0.02mol/L pH7.4 PBS 溶液:用 0.1mol/L 的 pH7.4 PBS 溶液稀释而成。

检测人血浆中 MR-1S 含量的试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药检验技术领域,具体涉及一种检测 S 亚型人肌纤维生成调节因子 1 含量的酶联免疫吸附测定试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 当前,恶性肿瘤发病率和死亡率呈逐年上升趋势。目前,肿瘤诊断主要依赖影像学检查,细胞学、生化学和免疫学检验。后者为主要检查血清或血浆中的肿瘤标志物(tumor marker),简称 TM,由于 TM 的检测较为经济,取材方便、检查时创伤小,且适合大批量标本检测,在临床恶性肿瘤患者的病情监测、预后评估中有较好的应用价值。

[0003] 中国疾控中心的最新统计资料表明,由于人们饮食结构、生活环境及方式的改变,恶性肿瘤,特别是卵巢癌、大肠癌、肝癌等发病近年呈上升趋势。任开环等的研究(J Bio Chem, 2008; 283(51): 35598-35605.)以及我们前期的研究均发现,一种新的肿瘤标志物——S 亚型人肌纤维生成调节因子 1 (Myofibrillogenesis Regulator-1 S, MR-1S,以下均简称“MR-1S”)与恶性肿瘤,如卵巢癌、肝癌的发生、发展与密切相关,更与肿瘤细胞的粘附、转移息息相关。MR-1 是一个新近报道的人类功能基因,该基因在转录过程中可形成 3 条长度不同的剪接异构体,即 MR-1L、MR-1M 和 MR-1S,分别含 10、9 和 3 个外显子,其中 S 亚型 MR-1 (Short-type MR-1)即 MR-1S 的长度最短而得名;MR-1S mRNA 全长 755bp,可编码一个 142 个氨基酸组成的蛋白质,第 75 至 92 位点 18 个氨基酸形成一疏水跨膜结构区域,为一种膜蛋白;MR-1S 可与转录起始因子 3 (initiation factor 3)以及具有 ADP 核糖基化因子(ARF)功能的蛋白(MRIP1)相互作用,其中转录因子的高表达可加速细胞进入细胞周期,增加细胞分裂的速度。因而,临床恶性肿瘤诊疗中需要这一敏感、有效的标志来辅助诊断、监测病情。

[0004] 该肿瘤标志物目前还没有市售的抗体及抗原,首先采用分子生物学的方法,获得 MR-1S 的融合蛋白,具有了较好的免疫原性;免疫动物获得了抗体;为制备检测 MR-1S 的试剂盒提供合适的、有保证的原料。

[0005] 常用的测定肿瘤标志物的方法有酶免疫法、放射免疫法、化学发光免疫法等所述的定量测定法等,已在诸多肿瘤标志物中有所应用,如甲胎蛋白 AFP、癌胚抗原 CEA 等。但到目前为止,MR-1S 作为一种潜在的、有较好的临床应用前景的肿瘤标志物其测定方法至今未见公开报道。

[0006] 酶联免疫吸附试验(Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay, ELISA)是目前临床的较认可的一种检测手段,其快速、操作简便、试剂稳定、不易污染等特点而得到广泛应用,适用于肿瘤高危人群的筛查以及肿瘤患者的随访测定。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于克服以往肿瘤标志物检测在临床应用中的不足,其中特别是在卵巢癌临床诊疗中缺乏敏感、有效的肿瘤标志物,提供了一种检测人 MR-1S 的试剂盒,更具

体涉及一种检测人 MR-1S 含量的酶联免疫测定试剂盒。

[0008] 为实现上述目的,本发明设计一种检测人血浆中 MR-1S 含量的试剂盒,其特征在于由以下试剂组成:

抗人 MR-1S 抗体预包被板 1 块或 MR-1S 抗原预包被板 1 块,抗人 MR-1S 抗体预包被板中的包被物为浓度为 50 ~ 500 $\mu\text{g/ml}$ 的抗人 MR-1S 抗体;MR-1S 抗原预包被板中包被物为 1 ~ 10 $\mu\text{g/ml}$ 的人 MR-1S 融合蛋白;

抗人 MR-1S 抗体酶标记液 1 瓶;

系列浓度的人 MR-1S 标准液,即采用如下浓度的人 MR-1S 融合蛋白作为标准液:1500 ng/ml、750 ng/ml、375 ng/ml、187.5 ng/ml、93.8 ng/ml、0 ng/ml 各 1 支;

阳性质控液为含人 MR-1S 融合蛋白的磷酸盐溶液 PBS、阴性质控液为 0.9% 的生理盐水各 1 支,所述的含人 MR-1S 融合蛋白的浓度为 300 ng/ml;所述的磷酸盐溶液 PBS 的浓度为 0.01mol/L、pH 值为 7.4;

洗涤液采用 2.42g 的三羟基氨基甲烷 Tris、13ml 的 0.1 mol/L 的 HCl 和 0.5 ml 的 Tween-20 混合而成;

样品稀释液为 0.2 g 的 KH_2PO_4 、2.9 g 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、8.0g 的 NaCl、0.2g 的 KCl、0.5 ml 的 Tween-20 和 10g 的牛血清白蛋白 BSA 混合后加蒸馏水至 1000 ml 所构成;

封闭液采用上述配方的 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液 100 ml,再加入 1g BSA 混合而成;

底物液为由 A 液和 B 液组成,所述的 A 液由 5.1 ml 的 0.1mol/L 的 Na_2HPO_4 和 4 mg 邻甲苯胺混合而成,所述的 B 液由 4.9 ml 的 0.05 mol/L 的柠檬酸和 0.05 ml 的 30% 的 H_2O_2 混合而成;

终止液采用 2mol/L 的 H_2SO_4 ,即 177.6 ml 蒸馏水中加入 22.4 ml 的 98% 的浓 H_2SO_4 而成。

[0009] 所述的抗人 MR-1S 抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0010] 所述的预包被板采用聚苯乙烯板或聚氯乙烯板或聚氯乙烯酰胺板材质的 96 微孔板。

[0011] 所述的抗人 MR-1S 抗体酶标记液中所采用的酶为辣根过氧化物酶 HRP 或碱性磷酸酶 ALP。

[0012] 所述的试剂通过下列步骤制备而成试剂盒:

a、人 MR-1S 融合蛋白的制备:抽提卵巢癌患者的血液基因组 DNA,以分子克隆的方法,即从血液基因组 DNA 中用 PCR 扩增目的基因人 MR-1S,双酶切后与同样双酶切的原核表达载体 pET21a (+) 或 PGEX-4T-1,构建 pET21a-MR-1S 或 PGEX-4T-1-MR-1S 重组质粒,转化大肠杆菌 BL21,异丙基硫代半乳糖苷 IPTG 诱导 MR-1S-His 融合蛋白或 MR-1S-GST 融合蛋白表达,亲和纯化后 Western blot 鉴定,MR-1S-His 融合蛋白或 MR-1S-GST 融合蛋白浓缩后,用 0.01mol/L、pH7.2 的 PBS 透析活化,冷冻干燥成冻干粉,得到人 MR-1S 融合蛋白,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存;

b、抗人 MR-1S 抗体的制备及纯化:用上述纯化得到的人 MR-1S 融合蛋白免疫动物,制备特异的高效价的抗人 MR-1S 的抗体,并使用辛酸法和 / 或饱和硫酸铵纯化;

c、将抗人 MR-1S 抗体或作为抗原的人 MR-1S 融合蛋白与包被液混匀后,包被 96 微孔板,所述的包被液采用由 Na_2CO_3 0.16g, NaHCO_3 0.29 g 加蒸馏水至 100 ml 制得的 pH 9.6

的碳酸盐缓冲液；

d、上述包被好的 96 微孔板,过夜,吹干,再用封闭液封闭,吹干,加一包干燥剂,用铝箔袋封好,得抗人 MR-1S 抗体预包被板或 MR-1S 抗原预包被板；

e、抗人 MR-1S 抗体酶标记液的制备:采用过碘酸钠标记法试剂以过碘酸标记法制备,即通过调整所获得的抗人 MR-1S 抗体的 pH 值,再将酶标记于该抗体,然后储存于 10 ml 塑料瓶；

f、组合成检测人 MR-1S 的酶联免疫吸附测定试剂盒:将上述 d 步骤中封好的铝箔袋、上述制备而得的抗人 MR-1S 抗体酶标记液 1 瓶;系列浓度的人 MR-1S 标准液 6 支;阴性、阳性质控液各 1 支;样品稀释液 1 瓶;洗涤液 1 瓶;底物液 A 液、底物液 B 液和终止液各 1 瓶,置于一个纸制的外包装盒内。

[0013] 步骤 b 中所述的人 MR-1S 融合蛋白免疫动物制备特异的高效价的抗人 MR-1S 的抗体为:当制备单抗时为采用将获得的人 MR-1S 融合蛋白依次采用杂交瘤方法进行细胞融合、间接 ELISA 法筛选阳性孔、克隆培养获得抗人 MR-1S 单抗;当制备多抗时为采用将获得的人 MR-1S 融合蛋白与弗氏佐剂混匀,免疫实验动物,获得含多克隆抗体的抗血清。

[0014] 步骤 e 中采用过碘酸钠标记法试剂制备抗人 MR-1S 抗体酶标记液的具体步骤为:(1)将 7.5mg HRP 加 0.5ml 蒸馏水溶解后;(2)加 0.5ml、0.06 mol/L 的 NaIO_4 , 混合后,置于 4°C 环境,3 分钟;(3)加 0.5ml、0.16 mol/L 乙二醇溶液,室温 30 分钟;(4)加 7mg/ml 的兔抗人 MR-1S 抗体 IgG 1.0ml 或 7mg/ml 的抗人 MR-1S 单抗 1.0ml;(5)混合后装透析袋,用 1000ml、0.05 mol/L、pH 9.5 碘酸缓冲液透析过夜;(6)第二天,吸出透析物,加 5mg/ml 的 NaBH_4 溶液 0.2ml 置冰箱 2 小时;(7)吸出上述综合物混合液,加入等体积饱和硫酸铵,冰箱 4°C,30 分钟后,离心 4000 转/分 15 分钟弃上清,沉淀溶于 1ml、pH7.4、0.02 mol/L PBS 溶液中,装入透析袋,再用 1000ml、0.1mol/L、pH7.4 的 PBS 溶液透析过夜,然后此透析过夜步骤再重复一次;(8)第二天,再离心去除不溶物,即得抗人 MR-1S 抗体酶标记液,简称“酶标抗体 IgG”,分装于 10 ml 塑料瓶中,4°C 保存。

[0015] 所述的过碘酸标记法试剂包括如下试剂:

0.06mol/L 的 NaIO_4 :0.13 克 NaIO_4 加水至 10ml;

0.16mol/L 的乙二醇溶液:乙二醇 0.1ml 加水至 10ml;

5mg/ml 的 NaBH_4 : NaBH_4 5mg 加水至 1ml;

0.05mol/L、pH 9.5 碘酸盐缓冲液:无水碳酸钠 10.6 克加水至 500ml 成 C 液;无水碳酸氢钠 16.8 克加水至 1000ml 成 D 液,C 液 16ml 和 D 液 34ml 混合后加水至 200 ml 制备而成;

0.02mol/L pH7.4 PBS 溶液:用 0.1mol/L 的 pH7.4 PBS 溶液稀释而成。

[0016] 本发明与现有技术相比,所建立的试剂盒的检测结果显示,对 MR-1S 浓度可实现定量检测,检测结果可反映人 MR-1S 的变化范围和发展趋势,满足临床诊断和治疗监测需求,且可在 120 分钟内完成测试,试剂、方法稳定、操作简便,灵敏度高、特异性较强,有较好的临床应用前景。

具体实施方式

[0017] 本发明提供了一种检测人血浆中 S 亚型肌纤维生成调节因子 1 含量,即 MR-1S 含

量的酶联免疫吸附测定试剂盒,该试剂盒根据里面包被板的包被物的不同来采用双抗体夹心法检测人血浆中的 MR-1S 含量或采用竞争法来检测,该试剂盒由以下试剂组成:

1、抗人 MR-1S 抗体预包被板 1 块或 MR-1S 抗原预包被板 1 块,抗人 MR-1S 抗体预包被板中的包被物为浓度为 $50 \sim 500 \mu\text{g/ml}$ 的抗人 MR-1S 抗体;MR-1S 抗原预包被板中包被物为 $1 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ 的人 MR-1S 融合蛋白。当采用抗人 MR-1S 抗体预包被板检测时采用双抗体夹心法检测;当采用 MR-1S 抗原预包被板检测时,则采用竞争法检测;

2、抗人 MR-1S 抗体酶标记液 1 瓶;

3、采用如下浓度的人 MR-1S 融合蛋白作为系列浓度的人 MR-1S 标准液:分别为 1500 ng/ml 、 750 ng/ml 、 375 ng/ml 、 187.5 ng/ml 、 93.8 ng/ml 、 0 ng/ml 各 1 支;

4、阳性质控液为含 MR-1S 的磷酸盐溶液 PBS、阴性质控液为 0.9% 的生理盐水各 1 支,其中含人 MR-1S 融合蛋白的浓度为 300 ng/ml ;所述的磷酸盐溶液 PBS 的浓度为 0.01 mol/L 、pH 值为 7.4;

5、洗涤液采用 2.42 g 的三羟基氨基甲烷 Tris、13 ml 的 0.1 mol/L 的 HCl 和 0.5 ml 的 Tween-20 混合而成。使用时加蒸馏水至 1000 ml 进行稀释使用;

6、样品稀释液为 0.2 g 的 KH_2PO_4 、2.9 g 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、8.0g 的 NaCl、0.2g 的 KCl、0.5 ml 的 Tween-20 和 10g 的牛血清白蛋白 BSA,加蒸馏水至 1000 ml 所制成;

7、封闭液采用上述配方的 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液 100 ml,再加入 1g BSA 混合而成;

8、底物液由 A 液和 B 液组成,所述的 A 液由 5.1 ml 的 0.1 mol/L 的 Na_2HPO_4 和 4 mg 邻甲苯胺混合而成,所述的 B 液由 4.9 ml 的 0.05 mol/L 的柠檬酸和 0.05 ml 的 30% 的 H_2O_2 混合而成;

9、终止液采用 2 mol/L 的 H_2SO_4 ,即 177.6 ml 蒸馏水中加入 22.4 ml 的 98% 的浓 H_2SO_4 而成。

[0018] 本发明通过以下技术方案实现:

主要是利用分子克隆的技术手段从卵巢癌患者的血液基因组 DNA 中扩增出人 MR-1S 的目标基因,与原核载体连接,转化大肠杆菌,诱导表达人 MR-1S 融合蛋白。以纯化的该人 MR-1S 融合蛋白作为抗原,通过免疫动物,得到一对特异性的高效价的抗体。获得的抗体经分离纯化后,若采用抗人 MR-1S 抗体预包被板,则将酶标记于该对抗体中的一株,将另一株包被到 96 微孔板中,根据双抗体夹心法的原理,对人 MR-1S 进行定量分析测定,得到定量结果,整个测试过程在 120 分钟内完成;当采用 MR-1S 抗原预包被板时,则将人 MR-1S 融合蛋白作为抗原包被到 96 微孔板中,并将酶标记于经分离纯化后的抗人 MR-1S 抗体中,采用竞争法检测,对人 MR-1S 进行定量分析测定,得到定量结果,整个测试过程在 120 分钟内完成。

[0019] 人 MR-1S 融合蛋白的制备:抽提卵巢癌患者的血液基因组 DNA,以分子克隆的方法,即从血液基因组 DNA 中用 PCR 扩增目的基因人 MR-1S,双酶切后与同样双酶切的原核表达载体 pET21a (+) 或 PGEX-4T-1,构建 pET21a-MR-1S 或 PGEX-4T-1-MR-1S 重组质粒,转化大肠杆菌 BL21,异丙基硫代半乳糖苷 IPTG 诱导 MR-1S-His 融合蛋白或 MR-1S-GST 融合蛋白表达,亲和纯化后 Western blot 鉴定,MR-1S-His 融合蛋白或 MR-1S-GST 融合蛋白浓缩后,用 10 mmol/L 、pH7.2 的 PBS 充分透析活化,冷冻干燥成冻干粉,得到人 MR-1S 融合蛋白, -20°C 保存。

[0020] 抗人 MR-1S 抗体的制备及纯化:用上述纯化得到的人 MR-1S 融合蛋白免疫实验动

物,制备特异的高效价的抗人 MR-1S 的抗体,并使用辛酸法和 / 或饱和硫酸铵纯化,所述的抗人 MR-1S 抗体为单克隆抗体或多克隆抗体,简称单抗或多抗,当制备单抗时为采用将获得的人 MR-1S 融合蛋白依次采用杂交瘤方法进行细胞融合、间接 ELISA 法筛选阳性孔、克隆培养获得抗 MR-1S 单抗;当制备多抗时为采用将获得的人 MR-1S 融合蛋白抗原与弗氏佐剂混匀,免疫实验动物,获得含多克隆抗体的抗血清。

[0021] 实施例 1

一、先配制如下试剂:

1、抗人 MR-1S 抗体预包被板 1 块,抗人 MR-1S 抗体预包被板中的包被物为浓度为 50-500 $\mu\text{g/ml}$ 的抗人 MR-1S 抗体;

2、抗人 MR-1S 抗体酶标记液 1 瓶;

3、系列浓度的人 MR-1S 标准液;

4、阳性质控液为含人 MR-1S 融合蛋白的磷酸盐溶液 PBS、阴性质控液为 0.9% 的生理盐水各 1 支,所述的含人 MR-1S 融合蛋白的浓度为 300 ng/ml ;所述的磷酸盐溶液 PBS 的浓度为 0.01 mol/L 、pH 值为 7.4;

5、洗涤液:三羟基氨基甲烷 Tris 2.42 g,0.1 mol/L HCl 13 ml,Tween-20 0.5 ml,加蒸馏水至 1000 ml;

6、样品稀释液: KH_2PO_4 0.2 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g,NaCl 8.0g,KCl 0.2g,Tween-20 0.5 ml,牛血清白蛋白 BSA 10g,加蒸馏水至 1000 ml;

7、封闭液:采用上述配方的 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液 100 ml 中加 1g BSA 而成;

8、底物液:为由 A 液和 B 液组成,所述的 A 液由 5.1 ml 的 0.1 mol/L 的 Na_2HPO_4 和 4 mg 邻甲苯胺混合而成,所述的 B 液由 4.9 ml 的 0.05 mol/L 的柠檬酸和 0.05 ml 的 30% 的 H_2O_2 混合而成;

9、终止液:2 mol/L 的 H_2SO_4 即 177.6 ml 蒸馏水中加 22.4ml 的浓 H_2SO_4 而成。

[0022] 上述试剂中,所涉及的制备如下:

(一)、采用如下分子克隆的方法获得人 MR-1S 融合蛋白:

PCR 扩增目的基因 MR-1S:取卵巢癌患者的外周血,抽提基因组 DNA;设计一对特异引物 P1:5'-CGGGATCCATGGCGG CGGTGGTAGCTGC-3' 和 P2:5'-CCGCTCGAGTCAGGTCTGCACCCAG AC-3',两对特异引物中分别引入 BamH I 和 XhoI I 酶切位点,扩增出人 MR-1S 基因;50 μl PCR 扩增体系由 cDNA 1 μl ,10 \times Taq buffer 5 μl ,2.5mM dNTP 5 μl ,上述两对特异引物各 1 μl 分别作为上下游引物,Taq 酶 1 μl 再加入去离子水 37 μl 混合而成,然后以 94 $^\circ\text{C}$ 反应 5min,再分别采用如下反应条件顺序:94 $^\circ\text{C}$ 30s、55 $^\circ\text{C}$ 30s、72 $^\circ\text{C}$ 45s 依次反应 36 个循环后,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。对扩增产物,2% 琼脂糖凝胶电泳后,用胶回收试剂盒进行产物回收。

[0023] 重组质粒:取上述 3 μl PCR 产物与 1 μl pUCm-T 载体在 T4 连接酶的作用下,16 $^\circ\text{C}$ 连接 4 小时,连接产物转化入感受态 DH5 α 细菌中,涂布于有 IPTG 和 X-gal 的含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上,其中氨苄青霉素的浓度为 100 mg/L ,37 $^\circ\text{C}$,16-24 小时,进行蓝白斑筛选;挑取白色菌落,接种含氨苄青霉素的 LB 培养液,37 $^\circ\text{C}$ 培养过夜;用 3S Spin 质粒小抽试剂提取质粒,并且进行双酶切鉴定。将双酶切鉴定正确的重组质粒送上海生工生物公司进行测序,将测序结果进行 BLAST 同源序列比对。采用 pET21a (+) 质粒构建原核表达载体,将测序验证正确的重组质粒经 BamH I 和 XhoI I 双酶切后,琼脂糖凝胶回收目的基因片段,

并与用相同双酶切处理的 pET21a (+) 质粒在 T4 连接酶的作用下, 16℃ 连接过夜。

[0024] 转化大肠杆菌 BL21 : 将该连接产物转化感受态表达菌 BL21 中, 接种至含浓度为 100mg/L 的氨苄青霉素的 LB 平板, 37℃ 培养过夜 ; 挑选出阳性克隆进行测序鉴定。

[0025] 诱导 MR-1S-His 融合蛋白表达 : 将上述鉴定正确的阳性克隆菌接种后, 扩大培养至对数生长期, 利用浓度分别为 0.1 mmol/L、0.5mmol/L、1.0 mmol/L、1.5 mmol/L 的 IPTG, 每个浓度的 IPTG 分别在温度 28℃、30℃ 和 35℃ 的条件下诱导 0、1、2、3、4 和 5 小时后, 6000 r/min 离心 10 min, 收集菌体。用 pH 7.4 、0.01mol/L 的 PBS, 悬浮菌体, 加入 0.3 mg/ml 溶菌酶。超声裂解后, 加入 10 μg/ml DNase, 12000×g 离心 10min, SDS-PAG 电泳分析上清及沉淀中 MR-1S-His 融合蛋白的表达情况。

[0026] 亲和纯化后 Western blot 鉴定 : 将原核表达的 MR-1S-His 融合蛋白在非变性条件下经 NTA 柱亲和层析纯化, 用不同浓度的咪唑洗脱目的蛋白, SDS-PAG 电泳确定最佳洗脱的咪唑浓度。该最佳浓度下的洗脱产物用 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 透析。此外, 将纯化产物和诱导前 BL21 菌裂解物经 SDS-PAG 电泳后, 电转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭过夜 ; 再分别与鼠抗 His 抗体、HRP 标记的兔抗鼠 IgG 作用, 加化学发光底物, 然后 X 胶片显影。

[0027] 该 MR-1S-His 融合蛋白经 PEG 浓缩后, 用 0.01mol/L、pH7.2 的 PBS 充分透析活化, 用 BCA (Bicinchoninic Acid) 法测定蛋白质的浓度, 再经冷冻干燥成冻干粉得最终的人 MR-1S 融合蛋白——MR-1S-His 融合蛋白, 分装, -20℃ 保存。

[0028] (二)、抗人 MR-1S 抗体采用如下方法制备及纯化 :

本例中抗人 MR-1S 抗体的制备采用多抗制备, 即制备抗人 MR-1S 抗血清, 其按常规抗血清制备法。首先, 将上述纯化的人 MR-1S 融合蛋白——MR-1S-His 融合蛋白自冰箱中取出 3 mg, 复温至室温, 溶于 0.5ml 、0.01 mol/L 的 pH 7.4 的磷酸缓冲液中, 再用生理盐水稀释至 3ml 制成人 MR-1S 融合蛋白溶液, 将其三等份, 即每等份为 1ml 的 1mg/ml 的人 MR-1S 融合蛋白溶液。免疫实验采用 3 只新西兰雄性兔, 体重 2.5kg 左右, 先于每只新西兰雄性兔的双后足掌皮下注射弗氏完全佐剂与一等份的人 MR-1S 融合蛋白溶液的混合物, 弗氏完全佐剂 : 人 MR-1S 融合蛋白溶液 (体积比) = 1 : 1, 初次免疫用弗氏完全佐剂与人 MR-1S 融合蛋白溶液充分混匀至呈“油包水”状抗原乳化液。再给新西兰大白兔的颈背部多点及脚垫内注射一等份的人 MR-1S 融合蛋白溶液, 为基础免疫。每两周加强一次, 共免疫 6 次。最后一次免疫后 8-10 天抽血测试效价, 效价符合要求后, 心脏采血, 分离得到抗血清, 抗血清再经辛酸-饱和硫酸铵, 即 50% 饱和 (NH₄)₂SO₄, 分步沉淀纯化成特异高效价的抗人 MR-1S 抗体——兔抗人 MR-1S 抗体 IgG。

[0029] 抗血清的纯化采用辛酸-饱和硫酸铵法。将上述制得兔抗人 MR-1S 抗体 IgG 1ml, 加上 4 ml、0.06 mol/L、pH 4.0 的醋酸缓冲液, 加 120 μl 辛酸, 4℃ 搅拌 30 min, 10000rpm 离心 30 min, 取上清用 50 倍体积 0.02 mol/L、pH 7.4 的 PBS 作透析液, 4℃ 透析过夜, 取出, 加等体积的 pH 8.0 饱和 (NH₄)₂SO₄, 轻轻搅拌 30 min, 于 4℃ 10000 rpm 离心 20 min, 去上清。沉淀溶于 1ml 的 0.02 mol/L、pH7.4 的 PBS 溶液中, 然后对 50 倍体积的上述的透析液于 4℃ 透析 36 小时, 换透析液三次, 即再重复透析三次。再 4℃、8000 rpm 离心 15 min, 去除不溶物, 得最终的抗人 MR-1S 抗体, 也即兔抗人 MR-1S 抗体 IgG。在紫外分光光度计上测定 A₂₈₀ 和 A₂₆₀, 根据公式 : $(1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260}) \times \text{稀释倍数}$, 计算蛋白浓度即为免疫球蛋白的含量, 分装, -20℃ 冻存备用。

[0030] (三)、抗人 MR-1S 抗体酶标记液的制备：

本例中为酶标兔抗 MR-1S 抗体 IgG 交联物的制备：经纯化所得的兔抗人 MR-1S 抗体 IgG 与辣根过氧化物酶用改良的过碘酸钠交联获得抗人 MR-1S 抗体酶标记液，简称“酶标抗体 IgG”，具体制备如下：

(1) 过碘酸钠标记法试剂的配制：

A. 0.06mol/L 的 NaIO_4 ：0.13 克 NaIO_4 ，加水至 10ml；

B. 0.16mol/L 的乙二醇溶液：乙二醇 0.1ml 加水至 10ml；

C. 5mg/ml 的 NaBH_4 ： NaBH_4 5mg 加水至 1ml；

D. 0.05mol/L 的 pH 9.5 碘酸盐缓冲液：无水碳酸钠 10.6 克加水至 500ml 混合而成的 C 液；无水碳酸氢钠 16.8 克加水至 1000ml 混合而成的 D 液，取 C 液 16ml+D 液 34ml，加水至 200ml 制备而成；

E. 0.02mol/L 的 pH7.4 PBS：用 0.1mol/L、pH7.4 PBS 稀释而成。

[0031] (2) 过碘酸标记法的操作步骤如下：

1、7.5mg HRP 加 0.5ml 蒸馏水溶解；2、再加入 0.06 mol/L 的 NaIO_4 0.5ml，混合后置 4℃，3 分钟；3、加入 0.16mol/L 的乙二醇溶液 0.5 ml，室温 30 分钟；4、加入 7mg/ml 的兔抗人 MR-1S 抗体 IgG 1.0ml；5、混合后装透析袋，用 1000ml、0.05 mol/L、pH 9.5 的碘酸缓冲液透析过夜；6、第二天，吸出透析物，加 5mg/ml 的 NaBH_4 溶液 0.2ml 置冰箱 2 小时；7、吸出上述综合物混合液，加入等体积饱和硫酸铵，冰箱 4℃，30 分钟后，离心 4000 转 / 分 15 分钟弃上清，沉淀溶于 1ml、pH7.4、0.02 mol/L 的 PBS 中，装入透析袋，再用 1000ml、0.1mol/L、pH7.4 的 PBS 透析过夜，然后此透析过夜步骤再重复一次；8、第二天，再离心去除不溶物，即得抗人 MR-1S 抗体酶标记液，简称“酶标抗体 IgG”，分装储存于 10ml 塑料瓶中，4℃ 保存。

[0032] 二、表达和纯化的人 MR-1S 融合蛋白抗原的鉴定

纯化后冻干的 MR-1S-His 融合蛋白干粉用 10 ~ 100 μ l，0.01mol/L、pH7.2 的 PBS 充分溶解，经 SDS-PAG 电泳后，考马斯亮蓝染色显示为单一条带，证明抗原已纯化。同样蛋白经 SDS-PAG 电泳后，电转移至 PVDF 膜上，5% 脱脂奶粉封闭过夜；再分别与鼠抗 His 抗体、HRP 标记的兔抗鼠 IgG 作用，加化学发光底物，然后 X 胶片显影。结果显示可与抗 His 抗体结合，出现一条明显的发光条带，条带所在的位置为 23,000 左右，与预期要求的完全符合。所得 MR-1S-His 融合蛋白用 BCA 法测定其蛋白含量以作抗原。

[0033] 三、人 MR-1S 抗体的鉴定

经辛酸-饱和硫酸铵纯化的兔抗人 MR-1S 抗体 IgG，经免疫固定电泳后，鉴定结果 MR-1S 为单一沉淀线，而其他蛋白如牛血清白蛋白 BSA、血红蛋白 Hb 未出现沉淀线。

[0034] 四、标准曲线的制备

取人 MR-1S 融合蛋白倍比稀释成系列浓度 MR-1S 标准液，分别为 1500 ng/ml、750 ng/ml、375 ng/ml、187.5 ng/ml、93.8 ng/ml、0 ng/ml，作双抗体夹心法的 ELISA 测定，绘制出标准曲线，标准曲线呈“S”型，线性范围为 93.8-1500 ng/ml，灵敏度良好，最低检测限为 93.8 ng/ml。在 ELISA 夹心法的酶标板上的标准曲线浓度梯度良好，可以满足临床测定的需要。

[0035] 五、试剂盒的组装

100 μ l 的 100 μ g/ml 的抗人 MR-1S 抗体与包被液混匀后包被 96 微孔板，然后过夜，

吹干,加封闭液 200 μ l,封闭 2 小时吹干后,得抗人 MR-1S 抗体预包被板,加一包干燥剂,真空密封包装于铝箔袋中;将抗人 MR-1S 抗体酶标记液储存于 10 ml 塑料瓶中;系列浓度的 MR-1S 标准液 6 支和阴性、阳性质控液各 1 支,每支 2ml;50 ml 的样品稀释液 1 瓶;40 ml 的洗涤液 1 瓶;底物液 A 液、B 液和终止液各 1 瓶,置于一个纸制的外包装盒内制成试剂盒。所述的包被液采用由 Na_2CO_3 0.16g, NaHCO_3 0.29 g 加蒸馏水至 100 ml 制得的 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液。

[0036] 六、采用上述制备的试剂盒,采用双抗体夹心法检测人血浆中 MR-1S 含量的操作步骤:

a、取出抗人 MR-1S 抗体预包被板,采用洗涤液洗涤;

b、再在抗人 MR-1S 抗体预包被板加入样品,即在抗人 MR-1S 抗体预包被板的不同微孔中分别加入待测血浆、系列浓度的人 MR-1S 标准液、阳性、阴性质控液各 0.1ml,以 37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时后,采用洗涤液洗涤;

c、加入 0.1 ml 经酶标稀释液稀释过的酶标抗体 IgG,37 $^{\circ}$ C、1 小时后,采用洗涤液洗涤;所述的经酶标稀释液稀释过的酶标抗体 IgG 为上述所制得的酶标抗体 IgG 采用酶标稀释液稀释,其稀释比例为酶标抗体 IgG :酶标稀释液稀释的体积比为 1:2000;

d、再加入 0.1ml 底物液,该底物液中 A 液与 B 液为 1:1 等量配比,37 $^{\circ}$ C,30 分钟;

e、加入 0.05 ml 2mol/L 的 H_2SO_4 ,终止反应;

f、490 nm 测 OD 值,采用 Tecan 酶免仪测试,如果测得 OD > 2.5,则需要将 b 步骤中的样品采用样品稀释液以体积比 1:10 进行稀释后,重新进行 b~f 步骤;

g、计算 MR-1S 浓度值。

[0037] 实施例 2

一、先配制如下试剂:

1、MR-1S 抗原预包被板 1 块,MR-1S 抗原预包被板中包被物是作为抗原的 1~5 μ g/ml 的人 MR-1S 融合蛋白;

2、抗人 MR-1S 抗体酶标记液 1 瓶;

3、系列浓度的人 MR-1S 标准液;

4、阳性质控液:含人 MR-1S 融合蛋白的磷酸盐溶液 PBS;阴性质控液:0.9% 的生理盐水,所述的含人 MR-1S 融合蛋白的浓度为 300 ng/ml;所述的磷酸盐溶液 PBS 的浓度为 0.01mol/L、pH 值为 7.4;

5、洗涤液:三羟基氨基甲烷 Tris 2.42 g,0.1 mol/L HCl 13 ml,Tween-20 0.5 ml,加蒸馏水至 1000 ml;

6、样品稀释液: KH_2PO_4 0.2 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g, NaCl 8.0g, KCl 0.2g, Tween-20 0.5 ml,牛血清白蛋白 BSA10g,加蒸馏水至 1000 ml;

7、封闭液:pH 9.6 的碳酸盐缓冲液 100 ml 中加 1g BSA 而成;

8、底物液:为由 A 液和 B 液组成,所述的 A 液由 5.1 ml 的 0.1mol/L 的 Na_2HPO_4 和 4 mg 邻甲苯胺混合而成,所述的 B 液由 4.9 ml 的 0.05 mol/L 的柠檬酸和 0.05 ml 的 30% 的 H_2O_2 混合而成;

9、终止液:2mol/L 的 H_2SO_4 即 177.6 ml 蒸馏水中加 22.4ml 的浓 H_2SO_4 而成。

[0038] 上述试剂中,涉及的制备方法如下:

(一)、采用如下分子克隆的方法获得人 MR-1S 融合蛋白：

PCR 扩增目的人基因 MR-1S：取卵巢癌细胞株 SKOV3，培养细胞至对数期，抽提其中的基因组 DNA；设计一对特异引物 P1：5'-CGGGATCCATGGCGG CGGTGGTAGCTGC-3' 和 P2：5'-CCGCTCGAGTCAGGTCTGCACCCCAGAC-3'，两对引物分别引入 BamH I 和 XhoI I 酶切位点，扩增出 MR-1S 基因。50 μ l PCR 扩增体系为由 cDNA 1 μ l, 10 \times Taq buffer 5 μ l, 2.5 mmol/L dNTP 5 μ l, 上述两对特异引物各 1 μ l 分别作为上下游引物, Taq 酶 1 μ l 再加入去离子水 37 μ l 混合而成, 然后以 94 $^{\circ}$ C 反应 5 min; 然后再分别采用 94 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 45 s 的条件依次顺序反应 36 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。对扩增产物, 2% 琼脂糖凝胶电泳后, 用胶回收试剂盒进行产物回收。

[0039] 重组质粒：取上述 3 μ l PCR 产物与 1 μ l pUCm-T 载体在 T4 连接酶的作用下, 16 $^{\circ}$ C 连接 4 小时。连接产物转化入感受态 DH5 α 细菌中, 涂布于有 IPTG 和 X-gal 的含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上, 其中含氨苄青霉素的浓度为 100mg/L, 37 $^{\circ}$ C, 16-24 小时, 进行蓝白斑筛选。挑取白色菌落, 接种含氨苄青霉素的 LB 培养液, 含氨苄青霉素的浓度为 100mg/L, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。用 3S Spin 质粒小抽试剂提取质粒, 并且进行双酶切鉴定。将双酶切鉴定正确的重组质粒送上海生工生物公司进行测序, 将测序结果进行 BLAST 同源序列比对。利用 PGEX-4T-1 质粒构建原核表达载体, 测序验证正确的重组质粒经 BamH I 和 XhoI I 双酶切后, 琼脂糖凝胶回收目的基因片段, 并与用相同酶切处理的 PGEX-4T-1 质粒在 T4 连接酶的作用下, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。

[0040] 转化大肠杆菌 BL21：将该连接产物转化感受态表达菌 BL21 中, 接种至含氨苄青霉素的 LB 平板, 含氨苄青霉素的浓度为 100mg/L, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑出阳性克隆进行测序鉴定。

[0041] 诱导 MR-1S-GST 融合蛋白表达：将上述鉴定正确的阳性克隆菌接种后, 扩大培养至对数生长期, 采用 0.1mmol/L、0.5mmol/L、1.0mmol/L、1.5 mmol/L 终浓度的 IPTG, 每个浓度的 IPTG 分别在 28 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 和 35 $^{\circ}$ C 的温度条件下, 诱导 0、1、2、3、4 和 5 小时后, 6000 r/min 离心 10 min, 收集菌体。用 pH 7.4、0.01mol/L PBS, 悬浮菌体, 加入 0.3 mg/ml 溶菌酶。超声裂解后, 加入 10 μ g/ml DNase, 12 000 \times g 离心 10 min, SDS-PAG 电泳分析上清及沉淀中融合蛋白的表达情况。

[0042] 亲和纯化后 Western blot 鉴定：将原核表达的 MR-1S-GST 融合蛋白在非变性条件下经 NTA 柱亲和层析纯化, 用不同浓度的咪唑洗脱目的蛋白, SDS-PAG 电泳确定最佳洗脱的咪唑浓度。该浓度下的洗脱产物用 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 透析。此外, 将纯化产物和诱导前 BL21 菌裂解物经 SDS-PAG 电泳后, 电转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭过夜; 再分别与鼠抗 GST 抗体、HRP 标记的兔抗鼠 IgG 作用, 加化学发光底物, 然后 X 胶片显影。

[0043] 该 MR-1S-GST 融合蛋白经 PEG 浓缩后, 用 0.01mol/L、pH7.2 的 PBS 充分透析活化, 用 BCA (Bicinchoninic Acid) 法测定蛋白质的浓度, 再经冷冻干燥成冻干粉, 得最终的人 MR-1S 融合蛋白——MR-1S-GST 融合蛋白, 分装 -20 $^{\circ}$ C 保存。

[0044] (二)、人 MR-1S 抗体采用如下方法制备及纯化：

本例中人 MR-1S 抗体的制备采用单克隆体, 即抗人 MR-1S 单克隆抗体的制备：将取上述 MR-1S-GST 融合蛋白冻干粉自冰箱中取出, 复温至室温, 称取 0.3mg, 溶解于 3ml 生理盐水中作为 MR-1S 抗原, 并分成三等份, 每一等份为 100 μ g/ml 的 MR-1S 抗原 1ml。将免疫

8 周龄, 体重 20 克左右的 BALB/c 小鼠 3 只。首次每只小鼠取一部份 MR-1S 抗原加弗氏完全佐剂腹腔注射, MR-1S 抗原与弗氏佐剂的体积比为 1:1。间隔两周, 第二次同样 MR-1S 抗原剂量加弗氏不完全佐剂腹腔注射, 其体积比 = 1:1。此后间隔三周。第三次 MR-1S 抗原 100 μ g/只, 不加弗氏佐剂直接溶解于 1ml 生理盐水 N.S 中腹腔注射, 在第三次免疫一周后, 取小鼠眼眶血以间接 ELISA 法测定抗体效价。经三次免疫后小鼠休息一个月, 取抗体效价高的小鼠, 细胞融合前三天, 腹腔注射 50 μ g MR-1S 抗原、尾静脉注射 50 μ g MR-1S 抗原以加强免疫。于加强免疫后三天, 通过无菌术取免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞, 细胞比例为 5:1, 在 pH7.8-8.0 的 50%PEG4000 的作用下, 按常规方法进行细胞融合。融合细胞以 RPMI1640 液洗涤一次去除 PEG4000 后, 重新悬浮于 HAT 选择性培养液中。接种于预置饲养细胞层的 96 微孔细胞培养板中, 每孔接种 1×10^5 个细胞。置 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的细胞培养箱中培养 10-13 天。期间显微境观察杂交瘤细胞生长情况, 当细胞克隆长至一个中倍镜视野大小时, 取其培养上清液采用间接 ELISA 法对杂交瘤细胞进行筛选, 筛选出的阳性孔, 用有限稀释法进行克隆化培养, 经过 3-5 次克隆化培养, 获得了稳定分泌抗人 MR-1S 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。将已建株的单克隆杂交瘤细胞注入预先用硅胶 H 处理过的 BALB/c 小鼠腹腔, 待腹部膨大时抽取腹水。3000rpm 离心 30min, 取上清液加入 1/1000 (w/v)NaN₃ 后, 4 $^{\circ}$ C 保存待纯化鉴定。

[0045] 单克隆抗体腹水的纯化采用辛酸法。1ml 腹水加 2ml 0.06mol/L pH4.0 的醋酸缓冲液, 用 1mol/L HCl 调至 pH4.8, 加 33 μ l 辛酸, 摇匀。于室温继续搅拌 30min, 再 4 $^{\circ}$ C、10000rpm 离心 30min, 取上清用 50 倍体积的 0.02mol/L、pH7.4 的 PBS 作为透析液, 4 $^{\circ}$ C 透析 24 小时, 换透析液两次重复上述步骤。上清用 BCA 法测定蛋白质的浓度即为免疫球蛋白的含量, 分装, 得最终的抗人 MR-1S 单克隆抗体, 简称“抗人 MR-1S 单抗”, -20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

[0046] (三)、抗人 MR-1S 抗体酶标记液的制备:

本例中为酶标抗 MR-1S 单克隆抗体交联物的制备: 经纯化所得的抗人 MR-1S 单抗与辣根过氧化物酶用改良的过碘酸钠交联获得抗人 MR-1S 抗体酶标记液, 简称“酶标抗体 IgG”。

[0047] (1) 过碘酸钠标记法试剂的配制:

- A. 0.06mol/L 的 NaIO₄: 0.13 克 NaIO₄, 加水至 10ml;
- B. 0.16mol/L 的乙二醇溶液: 乙二醇 0.1ml 加水至 10ml;
- C. 5mg/ml 的 NaBH₄: NaBH₄ 5mg 加水至 1ml;
- D. 0.05mol/L、pH 9.5 碘酸盐缓冲液: 无水碳酸钠 10.6 克加水至 500ml 成 C 液; 无水碳酸氢钠 16.8 克加水至 1000ml 成 D 液, 取 C 液 16ml+D 液 34ml, 加水至 200 ml 制备而成;
- E. 0.02mol/L pH7.4 PBS: 用 0.1mol/L 的 pH7.4 PBS 稀释而成。

[0048] (2) 过碘酸标记法的操作步骤:

1、7.5mg HRP 加 0.5ml 蒸馏水溶解; 2、加 0.5ml、0.06 mol/L 的 NaIO₄, 混合后置 4 $^{\circ}$ C, 3 分钟; 3、加 0.5ml、0.16 mol/L 乙二醇溶液, 室温 30 分钟; 4、加 7mg/ml 的抗人 MR-1S 单抗 1.0ml; 5、混合后装透析袋, 用 1000ml、0.05 mol/L、pH 9.5 碘酸盐缓冲液透析过夜; 6、第二天, 吸出透析物, 加 5mg/ml 的 NaBH₄ 溶液 0.2ml 置冰箱 2 小时; 7、吸出上述综合物混合液, 加入等体积饱和硫酸铵, 冰箱 4 $^{\circ}$ C, 30 分钟后, 离心 4000 转/分 15 分钟弃上清, 沉淀溶于 1ml、pH7.4、0.02 mol/L PBS 中, 装入透析袋, 再用 1000ml、0.1mol/L、pH7.4 的 PBS 透析过

夜,然后此透析过夜步骤再重复一次;8、第二天,再离心去除不溶物,即得抗人 MR-1S 抗体酶标记液,简称“酶标抗体 IgG”,分装塑料瓶中,4℃保存。

[0049] 二、表达和纯化的 MR-1S 融合蛋白抗原鉴定

纯化后冻干的 MR-1S-GST 融合蛋白干粉用 10 ~ 100 μ l、0.01mol/L、pH7.2 的 PBS 充分溶解,经 SDS-PAG 电泳后,考马斯亮蓝染色显示为单一条带,证明抗原已纯化。同样蛋白经 SDS-PAG 电泳后,电转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭过夜;再分别与鼠抗 GST 抗体、HRP 标记的兔抗鼠 IgG 作用,加化学发光底物,然后 X 胶片显影。结果显示可与抗 GST 抗体结合,出现一条明显的发光条带,条带所在的位置为 49,000 左右,与预期要求的完全符合。所得融合蛋白用 BCA 法测定蛋白含量以作抗原。

[0050] 三、抗人 MR-1S 单抗的鉴定

经辛酸-饱和硫酸铵纯化的抗人 MR-1S 单抗,经免疫固定电泳后,鉴定结果 MR-1S 为单一沉淀线,而其他蛋白如牛血清白蛋白 BSA、血红蛋白 Hb 未出现沉淀线。

[0051] 四、标准曲线的制备

取人 MR-1S 融合蛋白倍比稀释成系列浓度的 MR-1S 标准液,分别为 1500 ng/ml、750 ng/ml、375 ng/ml、187.5 ng/ml、93.8 ng/ml、0 ng/ml,作竞争法的 ELISA 测定,绘制出标准曲线,标准曲线呈“L”型,线性范围为 93.8-750 ng/ml,灵敏度良好。最低检测限为 93.8 ng/ml。在 ELISA 夹心法的酶标板上的标准曲线浓度梯度良好,也可以满足临床测定的需要。

[0052] 五、试剂盒的组装

取 100 μ l 的 10 μ g/ml 的 MR-1S 抗原与包被液混匀后包被 96 微孔板,过夜,吹干,加封闭液 200 μ l,封闭 2 小时,吹干后,得 MR-1S 抗原预包被板,加一包干燥剂,用铝箔袋封好,其余步骤同实施例 1。所述的包被液采用由 Na₂CO₃ 0.16g, NaHCO₃ 0.29 g 加蒸馏水至 100 ml 制得的 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液。

[0053] 六、采用上述制备的试剂盒,竞争法检测 MR-1S 含量的操作步骤:

a、取 MR-1S 抗原预包被板,采用洗涤液洗涤;

b、再在 MR-1S 抗原预包被板加入样品,即在 MR-1S 抗原预包被板的不同微孔中分别加入待测血浆、系列浓度的人 MR-1S 标准液、阳性、阴性质控液各 0.1ml,37℃,2 小时后,采用洗涤液洗涤;

c、加入 0.1 ml 经酶标稀释液稀释过的酶标单抗,37℃ 1 小时后,采用洗涤液洗涤;所述的经酶标稀释液稀释过的酶标单抗为上述所得的酶标抗体 IgG 采用酶标稀释液稀释,其稀释比例为 1:2000;

d、再加入 0.1 ml 底物液,该底物液中 A 液与 B 液为 1:1 等量配比,37℃,30 分钟;

e、再加入 0.05 ml、2mol/L 的 H₂SO₄,终止反应;

f、490 nm 测 OD 值,采用 Tecan 酶免仪,如果测得 OD > 2.5,则需要将 b 步骤中的样品采用样品稀释液以体积比 1:10 进行稀释后,重新进行 b~f 步骤;

g、计算 MR-1S 浓度值。

专利名称(译)	检测人血浆中MR-1S含量的试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN102368070A	公开(公告)日	2012-03-07
申请号	CN201110183624.8	申请日	2011-07-01
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学附属肿瘤医院		
申请(专利权)人(译)	复旦大学附属肿瘤医院		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学附属肿瘤医院		
[标]发明人	卢仁泉 郭林		
发明人	卢仁泉 郭林		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物医药检验技术领域，具体涉及一种检测S亚型人肌纤维生成调节因子1含量的酶联免疫吸附测定试剂盒，由以下试剂组成：抗人MR-1S抗体预包被板1块或MR-1S抗原预包被板1块；抗人MR-1S抗体酶标记液1瓶；系列浓度的人MR-1S标准液；阳性质控液、阴性质控液、生理盐水各1支；洗涤液；样品稀释液；封闭液；底物液；终止液。本发明与现有技术相比，所建立的试剂盒的检测结果显示，对MR-1S浓度可实现定量检测，检测结果可反映人MR-1S的变化范围和发展趋势，满足临床诊断和治疗监测需求，且可在120分钟内完成测试，试剂、方法稳定、操作简便，灵敏度高、特异性较强，有较好的临床应用前景。