



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105116152 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 02

(21) 申请号 201510486502. 4

(22) 申请日 2015. 08. 10

(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 许传亮 马重 曾蜀雄 陈新
徐伟东 孙颖浩

(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 33/532(2006. 01)

权利要求书2页 说明书9页 附图4页

(54) 发明名称

一种人源性尿液 Endocan 蛋白的 ELISA 检测试剂盒及检测方法

(57) 摘要

本发明具体涉及一种人源性尿液 Endocan 蛋白的 ELISA 检测试剂盒及检测方法,属于免疫学和生物技术领域。本发明利用超滤和 ELISA 技术建立了检测人源性尿液 Endocan 蛋白的试剂盒,并首次证实在某些病理状态下人的尿液中存在 Endocan。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尿液 Endocan 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。

1. 一种人源性尿液 Endocan 蛋白的 ELISA 检测试剂盒, 主要包括:
内管量程为 5ml 的 10KD 截断值的超滤离心管;
捕获抗体, 小鼠抗人源性 Endocan 抗体;
检测抗体, 生物素标记的小鼠抗人源性 Endocan 的抗体;
标准蛋白, 为重组人 Endocan 蛋白;
辣根过氧化物酶标记的链菌素。
2. 根据权利要求 1 所述的一种人源性尿液 Endocan 蛋白的 ELISA 检测试剂盒, 其特征在于, 还包括有碳酸氢钠缓冲液、PBS 缓冲液、96 孔酶标板、显色液和终止液。
3. 根据权利要求 2 所述的一种人源性尿液 Endocan 蛋白的 ELISA 检测试剂盒, 其特征在于:
碳酸氢钠缓冲液为 0.1M, pH = 9.6;
PBS 缓冲液为含 0.1% BSA, 5mM EDTA, 0.1% Tween20 的 1×PBS 溶液;
显色液, 四甲基联苯胺底物;
终止液, 为 2mol/L 的硫酸溶液。
4. 一种人源性尿液 Endocan 蛋白的检测方法, 其特征在于, 先将采集的人尿液样品进行离心, 再将上清液超滤浓缩 10-20 倍, 然后用 ELISA 技术检测人源性尿液 Endocan 蛋白。
5. 根据权利要求 4 所述的一种人源性尿液 Endocan 蛋白的检测方法, 其特征在于, 该方法具体包括以下步骤:
室温下, 用碳酸氢钠缓冲液稀释捕获抗体至 2 μg/mL, 用每孔 100 μl 该捕获抗体溶液包被 96 孔酶标板, 4℃过夜孵育;
移除捕获抗体溶液, 酶标板每孔加入 300 μl PBS 缓冲液, 洗涤 3 遍; 移除 PBS 缓冲液, 每孔再加入 300 μl PSA 缓冲液后室温封闭 1 小时; 封闭后, 酶标板每孔加入 300 μl PBS 缓冲液, 洗涤 3 遍;
用 PBS 缓冲液制备 10ng/ml, 5ng/ml, 2.5ng/ml, 1.25ng/ml, 0.625ng/ml, 0.312ng/ml, 0.156ng/ml, 0ng/ml 8 个梯度浓度的重组人 Endocan 标准品溶液;
超纯水洗涤超滤离心管; 5ml 超纯水加入超滤离心管内管, 4℃离心, 水平离心机 4000×g, 或固定角度离心机 7500×g, 5 分钟; 弃去内管和外管超纯水;
采集人尿液样品后 1 小时内予以 4℃离心 1000×g, 10 分钟; 将离心后上清 1-5ml 加入洗涤后的超滤离心管内管; 4℃离心水平离心机 4000×g 或固定角度离心机 7500×g, 15 分钟; 记录内管剩余液体体积, 计算超滤后原液浓缩倍数;
以 100 μl/孔的体积将上述处理过的人尿液样品及 8 个梯度浓度的重组人 Endocan 标准品溶液加入上述处理过的酶标板各孔, 室温孵育 1 小时;
移除各孔中的液体, 每孔加入 PBS 缓冲液 300 μl, 洗涤 3 次, 甩干; 加入将生物素标记的小鼠抗人 Endocan 的抗体 0.2 μg/ml, 每孔 100 μl, 室温孵育 1 小时; 移除各孔中的液体, 加入 PBS 缓冲液, 每孔 300 μl, 洗涤 3 次, 甩干; 加入 HRP 标记的链菌素, 每孔 100 μl, 室温避光孵育 30 分钟; 移除各孔中的液体, 加入 PBS 缓冲液, 每孔 300 μl, 洗涤 3 次, 甩干; 加入底物四甲基联苯胺底物, 每孔 100 μl, 室温避光孵育 10 分钟; 加入 2mol/L 硫酸溶液终止反应, 每孔 50 μl; 在酶标仪上测定 450--630nm OD 值;
用重组人 Endocan 标准品溶液的 OD 值和 Endocan 浓度拟合出标准曲线和回归方程,

将所测人尿液样品的原始 OD 值减去浓度为 0ng/ml 的标准品所对应的 OD 值,将差值代入方程,得到 Endocan 浓度。

6. 根据权利要求 5 所述的一种人源性尿液 Endocan 蛋白的检测方法,其特征在于,所述的超滤离心管,包括外管 (1) 及内管 (2),所述外管 (1) 具有向外扩张呈喇叭状的外管开口 (11);

所述内管 (2) 具有向外扩张呈喇叭状的内管开口 (21);

所述内管 (2) 侧壁上设有与内管 (2) 容量对应的刻度值,每个刻度值对应设有刻度线,相邻刻度线之间形成的内管 (2) 容量为 1ml。

一种人源性尿液 Endocan 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尿液 Endocan 蛋白的 ELISA 检测试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] Endocan 即内皮素,又称为内皮细胞特异性分子-1(endothelial cell-specific molecule 1, ESM-1),是分子量为 50KDa 的可溶性蛋白多糖,由 165 个氨基酸的蛋白内核和连接在 137 位丝氨酸残基的硫酸软骨素链组成。在人类其基因定位于 5 号染色体长臂近端区域 (5q11.2),具有 3 个外显子和 2 个内含子。Endocan 已证实在人血管内皮细胞、肝细胞、肾小管上皮等组织细胞中表达。其主要功能与血管新生、肿瘤细胞生长、炎症反应相关。近来研究发现经血管内皮生长因子 A(VEGF-A) 刺激, Endocan 可以介导内皮细胞的迁移。体外细胞实验及小鼠体内实验均证实, Endocan 过表达可以促进肿瘤细胞生长。干扰 Endocan 表达可以抑制癌细胞增殖 (Overexpression of endothelial cell specific molecule-1(ESM-1) in gastric cancer)。研究还证实, Endocan 可以与人白细胞 CD11a/CD18 整合素 (淋巴细胞功能相关抗原-1, LFA-1) 结合,抑制其与细胞粘附因子 1(ICAM-1) 结合。

[0003] 已有研究证实 Endocan 参与了某些人体内常见恶性肿瘤的发生发展过程,并且血清中 Endocan 含量可作为某些肿瘤的诊断及预后标准物。与正常组织相比, Endocan 在肺癌、胃癌、肝细胞癌、乳腺癌、宫颈癌、肾癌、脑胶质瘤、膀胱癌等多种癌组织中明显高表达。已通过免疫组化证实,膀胱癌组织中 Endocan 表达量与膀胱癌恶性程度相关。与健康人群血清 Endocan 含量 ($26.82 \pm 10.80 \text{pg/ml}$) 相比,肝细胞癌患者血清中 Endocan 含量 ($87.30 \pm 25.69 \text{pg/ml}$) 明显升高,并且其含量与癌症分期密切相关。Endocan 诊断肝细胞癌的特异性可达 80.8%,敏感性可达 83.8%。在早期大肠癌患者中,血清 Endocan 含量低的患者 5 年生存率为 100%,而血清 Endocan 高的患者 5 年生存率为 80%,有显著统计学差异。(ESM-1 regulates cell growth and metastatic process through activation of NF- κ B in colorectal cancer)。研究证实,晚期胃癌患者中血清 Endocan 含量明显高于早期胃癌 ($87.23 \pm 15.1 \text{vs. } 80.25 \pm 15.6 \text{pg/ml}$, $P = 0.018$),且含量高者 5 年生产率明显降低 ($P < 0.001$)。(Overexpression of endothelial cell specific molecule-1(ESM-1) in gastric cancer)。在膀胱癌研究中,浸润性膀胱癌患者血浆 Endocan 含量明显 (平均 0.79ng/mL) 明显高于健康对照人群 (平均 0.43ng/mL)。以 0.43ng/mL 作为截断值,血浆 Endocan 诊断浸润性膀胱癌敏感性为 64%,特异性可达 80%。

[0004] 此外, Endocan 还参与全身炎症反应,并可作为脓毒症的诊断和预后的标志物。研究报道脓毒症患者血清 Endocan 含量 ($2.71 \pm 4.88 \text{ng/mL}$) 明显高于健康人群 ($0.77 \pm 0.44 \text{ng/mL}$),且在脓毒症休克的患者中含量最高 ($6.11 \pm 12.99 \text{ng/m}$)。(Endocan, a new endothelial marker in human sepsis)。在导致多器官衰竭的严重脓毒症患者中,血

清 Endocan 含量明显高于非多器官功能衰竭脓毒症患者 ($p < 0.05$), 其预测脓毒症转归效果好于降钙素原、器官序贯衰竭评分 (SOFA) 等传统指标。

[0005] 上述研究表明 Endocan 在肿瘤和炎症中发挥了重要作用, 其定量检测可用于相关疾病的诊断和预后判断。

[0006] 以往对 Endocan 表达的定量研究主要是采集患者和对照人群的静脉血液, 用 ELISA 检测血清中 Endocan 的含量。然而, 静脉采血是一种有创性操作, 会导致患者疼痛、晕针, 甚至有感染及传播疾病的风险。患者依从性差。采集样品量少。不仅如此, 静脉采血需要消毒器材、静脉针、肝素化或含 EDTA 试剂的专用采血管等设备, 更需要受过培训的专业医护人员, 成本高、用时长。而尿液, 作为人体一种自然排出的体液, 可以避免上述血液样品的缺点。具有患者无痛苦, 无操作相关并发症, 采集不需要专业医护人员, 可采集量大, 方便快捷等多种优势, 是理想的人体样品来源。经查阅, 目前对尿液中 Endocan 蛋白定量检测国内外尚属空白。

[0007] 尿液蛋白需由肾脏滤过膜透过或泌尿系统细胞裂解、分泌产生, 往往浓度较低。尿液中 Endocan 蛋白因浓度较低, 采用传统的用于血液的 ELISA 检测试剂盒无法实现定量检测。因此, 建立尿液中 Endocan 蛋白检测试剂盒及检测方法可为其作为无创性诊断和预后标志物的研究奠定基础。

发明内容

[0008] 发明人购买了市场上测血清 Endocan 蛋白 ELISA 检测试剂盒, 用以检测人源性尿液 Endocan 蛋白, 发现有以下问题: 1. 试剂盒适用范围不包括尿液, 亦没有尿液样品的处理方法; 2. 按照现有试剂盒的样品处理方法检测不出人源性尿液 Endocan 蛋白的浓度; 3. 现有试剂盒在 Endocan 浓度在 0.3-10ng/ml 范围时最准确, 人源性尿液 Endocan 蛋白多低于此浓度。

[0009] 本发明的目的是提供一种人源性尿液 Endocan 蛋白的 ELISA 检测试剂盒及检测方法。本发明旨在为检测临床和实验室样品中人源性尿液 Endocan 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。

[0010] 本发明采用的技术方案如下:

[0011] 本发明利用超滤和 ELISA 技术建立了检测人源性尿液 Endocan 蛋白的试剂盒, 并首次证实在某些病理状态下人的尿液中存在 Endocan。

[0012] 本发明第一方面, 提供了一种人源性尿液 Endocan 蛋白的 ELISA 检测试剂盒, 主要包括:

[0013] 内管量程为 5ml 的 10KD 截断值的超滤离心管。

[0014] 捕获抗体, 小鼠抗人源性 Endocan 抗体;

[0015] 检测抗体, 生物素标记的小鼠抗人源性 Endocan 的抗体;

[0016] 标准蛋白, 为重组人 Endocan 蛋白;

[0017] 辣根过氧化物酶标记的链菌素;

[0018] 所述的试剂盒, 还包括有:

[0019] 碳酸氢钠缓冲液、PBS 缓冲液、96 孔酶标板、显色液和终止液。

[0020] 所述的试剂盒, 96 孔酶标板为市售的 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] 捕获抗体, 小鼠抗人源性 Endocan 抗体, 可选用法国 Lunginnov 公司的 LIK-1101

[0022] 检测抗体, 生物素标记的小鼠抗人 Endocan 抗体, 可选用法国 Lunginnov 公司的 LIK-1101;

[0023] 重组人 Endocan 标准蛋白可选用法国 Lunginnov 公司的 LIK-1101;

[0024] 碳酸氢钠缓冲液为 0.1M, pH = 9.6;

[0025] PBS 缓冲液为含 0.1% BSA, 5mM EDTA, 0.1% Tween20 的 1×PBS 溶液;

[0026] 显色液, 四甲基联苯胺底物;

[0027] 终止液, 较优的为 2mol/L 的硫酸溶液。

[0028] 本发明的第二方面, 是提供人源性尿液 Endocan 蛋白的检测方法, 其特征在于, 先将采集的人尿液样品进行离心, 再将上清液超滤浓缩 10-20 倍, 然后用优化的 ELISA 技术检测人源性尿液 Endocan 蛋白。

[0029] 该方法具体包括以下步骤:

[0030] 室温下, 用碳酸氢钠缓冲液稀释捕获抗体至 2 μg/mL, 用每孔 100 μl 该捕获抗体溶液包被 96 孔酶标板, 4℃ 过夜孵育。

[0031] 移除捕获抗体溶液, 酶标板每孔加入 300 μl PBS 缓冲液, 洗涤 3 遍。移除 PBS 缓冲液, 每孔再加入 300 μl PSA 缓冲液后室温封闭 1 小时。封闭后, 酶标板每孔加入 300 μl PBS 缓冲液, 洗涤 3 遍。

[0032] 用 PBS 缓冲液制备 10ng/ml, 5ng/ml, 2.5ng/ml, 1.25ng/ml, 0.625ng/ml, 0.312ng/ml, 0.156ng/ml, 0ng/ml 等 8 个梯度浓度的重组人 Endocan 标准品溶液

[0033] 超纯水洗涤超滤离心管。5ml 超纯水加入超滤离心管内管, 4℃ 离心 4000×g (水平离心机) 或 7500×g (固定角度离心机), 5 分钟。弃去内管和外管超纯水。

[0034] 采集人尿液样品后 1 小时内予以 4℃ 离心 1000×g, 10 分钟。将离心后上清 1-5ml 加入洗涤后的超滤离心管内管。4℃ 离心 4000×g (水平离心机) 或 7500×g (固定角度离心机), 15 分钟。记录内管剩余液体体积。计算超滤后原液浓缩倍数。

[0035] 以 100 μl/孔的体积将上述处理过的人尿液样品及 8 个梯度浓度的重组人 Endocan 标准品溶液加入上述处理过的酶标板各孔, 室温孵育 1 小时。较优地, 孵育时可轻度振荡。

[0036] 移除各孔中的液体, 每孔加入 PBS 缓冲液 300 μl, 洗涤 3 次, 甩干; 加入将生物素标记的小鼠抗人 Endocan 的抗体 0.2 μg/ml, 每孔 100 μl, 室温孵育 1 小时; 移除各孔中的液体, 加入 PBS 缓冲液, 每孔 300 μl, 洗涤 3 次, 甩干; 加入 HRP 标记的链菌素, 每孔 100 μl, 室温避光孵育 30 分钟; 移除各孔中的液体, 加入 PBS 缓冲液, 每孔 300 μl, 洗涤 3 次, 甩干; 加入底物四甲基联苯胺底物, 每孔 100 μl, 室温避光孵育 10 分钟; 加入 2mol/L 硫酸溶液终止反应, 每孔 50 μl; 在酶标仪上测定 450--630nm OD 值。

[0037] 用 8 个梯度浓度的重组人 Endocan 标准品溶液的 OD 值和 Endocan 浓度拟合出标准曲线和回归方程, 将所测人尿液样品的原始 OD 值减去浓度为 0ng/ml 的标准品所对应的 OD 值, 将差值代入方程, 得到 Endocan 浓度。

[0038] 所述的超滤离心管, 包括外管及内管, 所述外管具有向外扩张呈喇叭状的外管开口;

[0039] 所述内管具有向外扩张呈喇叭状的内管开口；

[0040] 所述内管侧壁上设有与内管容量对应的刻度值，每个刻度值对应设有刻度线，相邻刻度线之间形成的内管容量为 1ml。超滤离心管管口处向外扩张呈喇叭状的开口设计增加了管口的口径，便于对液体样品取样、收集。以往的超滤离心管内管的容量标注刻度值过小，无法了解超滤前超滤离心管内液体样品的真实体积，只能通过超滤离心管内管得到超滤后根据液体样品获得的悬浮的微小颗粒（如细胞、生物大分子的沉淀等）的体积，而本结构提升了超滤离心管内管标注的刻度尺寸的最大体积量，可以有效了解超滤前超滤离心管内原始液体样品的真实体积。

[0041] 所述的内管上的刻度线为 1000 μ l、2000 μ l、3000 μ l 及 4000 μ l。以往的内管容量为 4ml 的超滤离心管其内管刻度只标有 50 μ l、100 μ l、250 μ l、500 μ l 这四条刻度线，无法了解超滤前超滤离心管内液体样品的真实体积，而本结构中超滤离心管内管的容量略大于 4000 μ l，且将该内管所标注的最大容量提升至 4000 μ l，可以有效了解超滤前超滤离心管内原始液体样品的真实体积。

[0042] 优选地，所述的内管上的刻度线还包括 50 μ l、100 μ l、250 μ l、500 μ l。

[0043] 优选地，所述的内管的容量为 5ml，该内管上的刻度线还包括 5000 μ l。

[0044] 优选地，所述的内管的容量为 15ml，该内管上的刻度线为 1ml-15ml。内管容量为 15ml 的超滤离心管其内管刻度只标至 4ml，无法了解超滤前超滤离心管内液体样品的真实体积，而本结构将超滤离心管内管所标注的最大容量提升至 15ml，可以有效了解超滤前超滤离心管内原始液体样品的真实体积。

[0045] 优选地，所述的内管开口的内壁对侧设有凹槽；

[0046] 所述超滤离心管还包括漏斗，该漏斗外侧壁的对侧伸出卡接头，所述卡接头与凹槽进行卡接，漏斗的底部伸入所述超滤离心管的内管开口。将漏斗与超滤离心管配合使用，便于液体样品更顺利地进入内管中。当要进行取样操作时，将漏斗放置在超滤离心管上方，把漏斗的卡接头卡接在超滤离心管内管的凹槽内，使漏斗牢固固定在超滤离心管上，便可进行取样操作。

[0047] 优选地，所述的超滤离心管还包括管盖，所述管盖的内壁为向内收缩结构，盖管内壁与超滤离心管的管口外壁形状相匹配。

[0048] 优选地，所述刻度线对应的刻度值还包括 5000 μ l。

[0049] 优选地，所述外管的长度为 8-10cm，外管开口的外径为 1.5-2cm，外管开口的长度为 0.8-1.5cm。

[0050] 本发明的有益效果：

[0051] 1) 准确：目前市场上无商业化的人源性尿液 Endocan 蛋白的 ELISA 检测试剂盒，经文献检索没有定量检测人源性尿液 Endocan 蛋白含量的方法，因此对于人的尿液 Endocan 蛋白无法精确定量。此 ELISA 试剂盒可准确检测人源性尿液 Endocan 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：用该方法可以检测到的 pg 级每毫升的 Endocan 蛋白，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

[0073] 采集人尿液样品后 1 小时内予以 4℃ 离心 1000×g, 10 分钟。将离心后上清 1-5ml 加入洗涤后的超滤离心管内管。4℃ 离心 4000×g(水平离心机)或 7500×g(固定角度离心机), 15 分钟。记录内管剩余液体体积。计算超滤后原液浓缩倍数。

[0074] 以 100 μl/孔的体积将上述处理过的人尿液样品或 8 个梯度浓度的重组人 Endocan 标准品溶液加入上述处理过的酶标板, 室温孵育 1 小时。较优地, 孵育时可轻度振荡。

[0075] 移除各孔中的液体, 每孔加入 PBS 缓冲液 300 μl, 洗涤 3 次, 甩干; 加入将生物素标记的小鼠抗人 Endocan 的抗体 0.2 μg/ml, 每孔 100 μl, 室温孵育 1 小时; 移除各孔中的液体, 加入 PBS 缓冲液, 每孔 300 μl, 洗涤 3 次, 甩干; 加入 HRP 标记的链菌素, 每孔 100 μl, 室温避光孵育 30 分钟; 移除各孔中的液体, 加入 PBS 缓冲液, 每孔 300 μl, 洗涤 3 次, 甩干; 加入底物四甲基联苯胺底物, 每孔 100 μl, 室温避光孵育 10 分钟; 加入 2mol/L 硫酸溶液终止反应, 每孔 50 μl; 在酶标仪上测定 450--630nm OD 值。

[0076] 用 8 个梯度浓度的重组人 Endocan 标准品溶液的 OD 值(见表 1)和 Endocan 浓度拟合出标准曲线和回归方程, 将所测人尿液样品的原始 OD 值减去浓度为 0ng/ml 的标准品所对应的 OD 值, 将差值代入方程, 得到 Endocan 浓度。将测得的 Endocan 浓度除以浓缩倍数即可得到原尿液中 Endocan 的浓度。

[0077] 以下表 1 中的标准品指冻干的人源性重组 Endocan 蛋白标准品, 于室温解冻后, 用 PBS 稀释成浓度为 10ng/ml, 5ng/ml, 2.5ng/ml, 1.25ng/ml, 0.625ng/ml, 0.312ng/ml, 0.156ng/ml, 0ng/ml 等 8 个梯度浓度标准品溶液。可选用法国 Lunginnov 公司的 LIK-1101。

[0078] 表 1 不同浓度 Endocan 蛋白标准品 ELISA 检测法结果

[0079]

样品编号	OD 值	Endocan 浓度 (ng/ml)
标准品 1	2.549	10
标准品 2	2.407	5
标准品 3	1.910	2.5
标准品 4	1.112	1.25
标准品 5	0.549	0.625
标准品 6	0.204	0.312
标准品 7	0.122	0.156
标准品 8	0.023	0

[0080] 得到 Logistic 曲线方程:

$$[0081] \quad y = (2.57292 + 0.00181) / [(1 + (x/2.19809)^{2.29173})]^{0.55508} - 0.00181$$

[0082] $r^2 = 0.99978$

[0083] 人源性尿液 Endocan 蛋白 ELISA 检测法标准曲线见图 1。

[0084] 表 2 膀胱癌患者尿液 Endocan 蛋白 ELISA 检测法结果

[0085]

患者编号	OD 值差值	Endocan 浓度 (ng/ml)
1	2.112	3.187
2	2.387	5.112
3	0.405	0.524
4	0.598	0.723
5	1.689	2.081
6	0.574	0.698
7	2.449	6.199
8	2.370	4.898
9	0.071	0.133
10	0.098	0.171
11	0.063	0.122
12	2.544	11.973
13	0.046	0.096
14	0.026	0.063
15	0.037	0.081

[0086] OD 值差值 = 人尿液样品的原始 OD 值 - 浓度为 0ng/ml 的标准品所对应的 OD 值。

[0087] 样品来源于长海医院泌尿外科临床诊断为膀胱癌的患者尿液。收集患者晨起后第一次排尿尿液, 1 小时内送至实验室按上述流程处理。

[0088] 实施例 2 条件的优化

[0089] 1. 超滤浓缩步骤的优化

[0090] 将同一患者的同次尿液 4℃ 离心 $1000 \times g$, 10 分钟后, 分别用上述的超滤离心管对上清液采用超滤离心 0 分钟 (方案 1)、超滤离心 10 分钟 (方案 2)、超滤离心 15 分钟 (方案 3), 其余步骤按照实施例 1, 对多个患者的尿液 Endocan 进行检测。根据获得的 OD 值差值, 计算相应的浓度。发现超滤离心 15 分钟, 可保证最多的样品浓度在 0.3-10ng/ml, 即试

剂盒最准确的检测范围。并且 15 分钟是市售超滤管推荐的离心时间,故超滤浓缩的最佳时间为 15 分钟。

[0091] 如编号 6 的膀胱癌患者尿液:

[0092] 方案 1 得到的 OD 值差值为 0.074,计算得到的相应的浓度为 0.138ng/ml;

[0093] 方案 2 得到的 OD 值差值为 0.574,计算得到的相应的浓度为 0.698ng/ml。

[0094] 编号 17 的膀胱癌患者尿液

[0095] 方案 1 得到的 OD 值差值为 0.000,不能计算相应的浓度;

[0096] 方案 3 得到的 OD 值差值为 0.020,计算得到的相应的浓度为 0.065ng/ml。

[0097] 编号 18 的膀胱癌患者尿液

[0098] 方案 1 得到的 OD 值差值为 0.080,计算得到的相应的浓度为 0.198ng/ml;

[0099] 方案 3 得到的 OD 值差值为 1.568,计算得到的相应的浓度为 2.077ng/ml。

[0100] 2. 孵育前 PBS 缓冲液体积的优化

[0101] 将同一患者的同次尿液 4℃ 离心 1000×g,10 分钟,超滤离心 15 分钟,分别加入 PBS 缓冲液 0ml (方案 4),体积比 1:1 (PBS 缓冲液体积:尿液样品体积) 加入 PBS 缓冲液 (方案 5),1:4 加入 PBS 缓冲液 (方案 6),其余步骤按照实施例 1,对多个患者的尿液 Endocan 进行检测。根据获得的 OD 值差值,计算相应的浓度。发现不加入 PBS 缓冲液,可保证最多的样品浓度在 0.3-10ng/ml,即试剂盒最准确的检测范围。故较优地,孵育前不加入 PBS 缓冲液。

[0102] 如编号 19 的膀胱癌患者尿液

[0103] 方案 4 得到的 OD 值差值为 0.029,计算得到的相应的浓度为 0.071ng/ml;

[0104] 方案 5 得到的 OD 值差值为 0.000,不能计算得到的相应的浓度。

[0105] 编号 20 的膀胱癌患者尿液

[0106] 方案 4 得到的 OD 差值值为 0.003,计算得到的相应的浓度为 0.016ng/ml;

[0107] 方案 6 得到的 OD 值差值为 -0.002,不能计算得到的相应的浓度。

[0108] 实施例 3

[0109] 如图 2-4 所示的一种超滤离心管,包括外管 1 及内管 2,所述外管 1 具有向外扩张呈喇叭状的外管开口 11;

[0110] 所述内管 2 具有向外扩张呈喇叭状的内管开口 21;

[0111] 所述内管 2 侧壁上对应设有刻度值,每个刻度值对应设有刻度线,所述内管 2 侧壁上设有与内管 2 容量对应的刻度值,每个刻度值对应设有刻度线,相邻刻度线之间形成的内管 2 容量为 1ml。超滤离心管管口处向外扩张呈喇叭状的开口设计增加了管口的口径,便于对液体样品取样、收集。以往的超滤离心管内管的容量标注刻度值过小,无法了解超滤前超滤离心管内液体样品的真实体积,只能通过超滤离心管内管得到超滤后根据液体样品获得的悬浮的微小颗粒(如细胞、生物大分子的沉淀等)的体积,而本结构提升了超滤离心管内管标注的刻度尺寸的最大体积量,可以有效了解超滤前超滤离心管内原始液体样品的真实体积。

[0112] 所述的内管 2 上的刻度线为 1000 μl、2000 μl、3000 μl 及 4000 μl。以往的内管容量为 4ml 的超滤离心管其内管刻度只标有 50 μl、100 μl、250 μl、500 μl 这四条刻度线,无法了解超滤前超滤离心管内液体样品的真实体积,而本结构中超滤离心管内管的容量略

大于 4000 μ l, 且将该内管所标注的最大容量提升至 4000 μ l, 可以有效了解超滤前超滤离心管内原始液体样品的真实体积。

[0113] 所述的内管上的刻度线还包括 50 μ l、100 μ l、250 μ l、500 μ l。

[0114] 所述外管 1 的长度为 8cm, 外管开口 11 的外径为 2cm, 外管开口 11 的长度为 1cm。

[0115] 所述的内管开口 21 的内壁对侧设有凹槽 22 ;

[0116] 所述超滤离心管还包括漏斗 3, 该漏斗 3 外侧壁的对侧伸出卡接头 31, 所述卡接头 31 与凹槽 22 进行卡接, 漏斗 3 的底部伸入所述超滤离心管的内管开口 21。将漏斗与超滤离心管配合使用, 便于液体样品更顺利地进入内管中。当要进行取样操作时, 将漏斗放置在超滤离心管上方, 把漏斗的卡接头卡接在超滤离心管内管的凹槽内, 使漏斗牢固固定在超滤离心管上, 便可进行取样操作。

[0117] 所述的超滤离心管还包括管盖 4, 所述管盖 4 的内壁为向内收缩结构, 盖管 4 内壁与外管开口 11 外壁形状相匹配。

[0118] 内管 2 套入外管 1 后, 将漏斗 3 置入内管 2 的管口内。漏斗 3 的上端开口接通被检者尿道外口直接收集尿液, 或将其他容器中的液体倒入漏斗 3 内, 去除漏斗 3, 盖上管盖 4。根据内管 2 上的刻度线得出内管 2 中收集液体的体积, 旋紧管盖 4, 置入离心机即可。超滤离心管的喇叭口结构伸出在离心机外, 即该超滤离心管可采用现有的离心机进行离心操作。

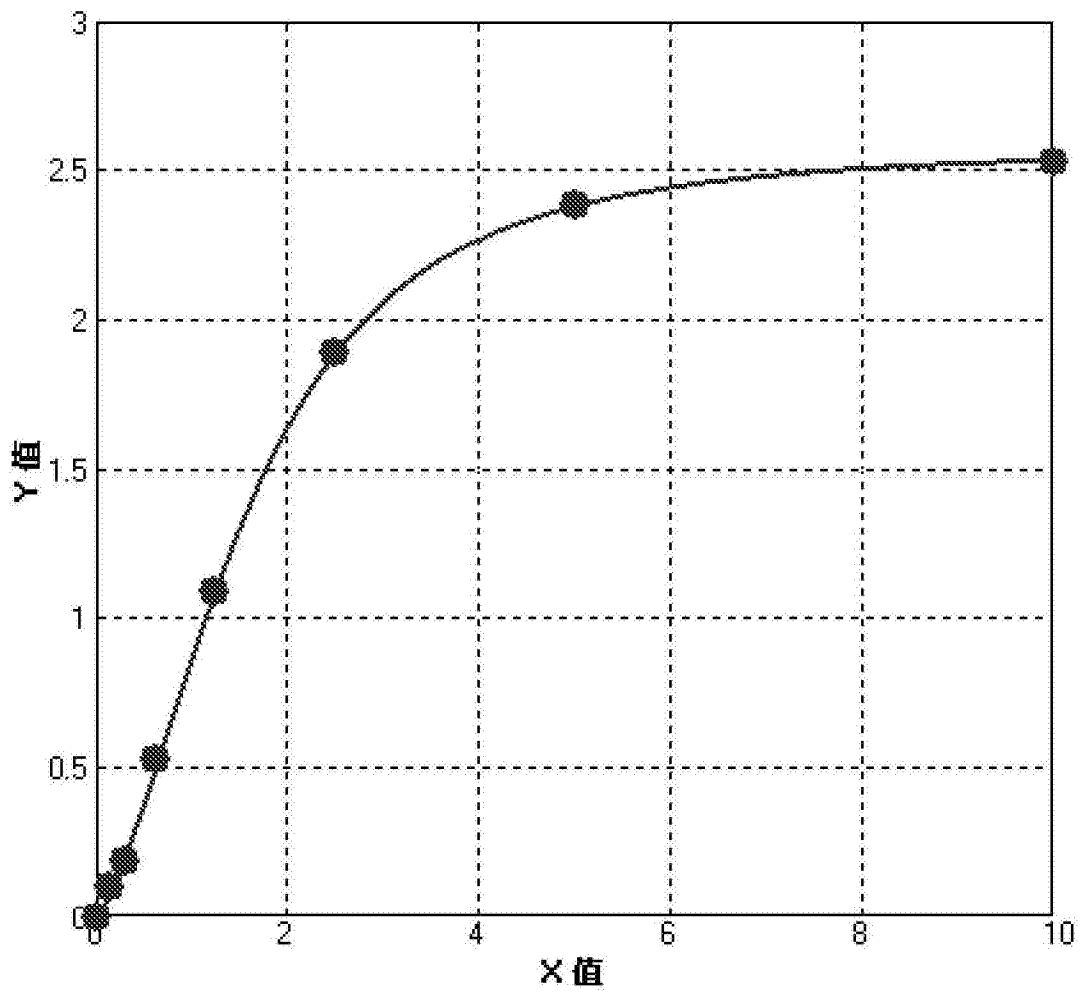


图 1

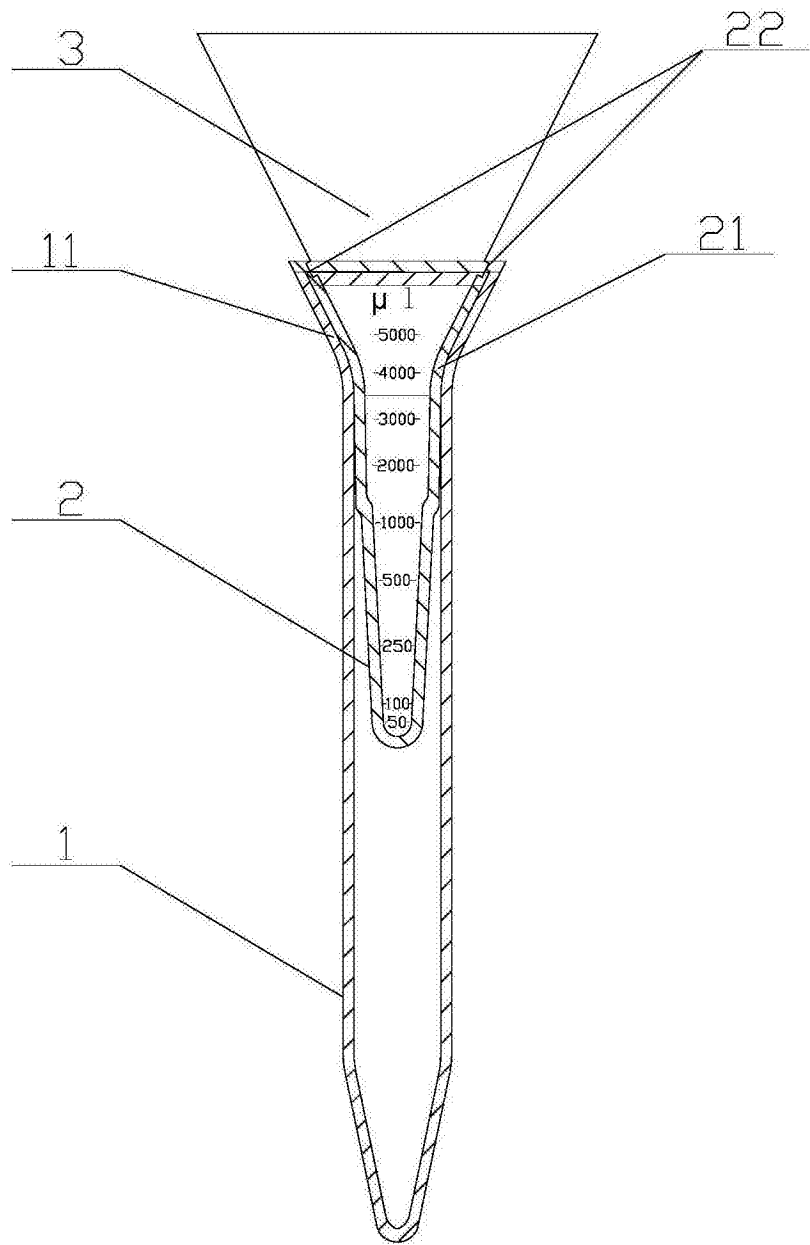


图 2

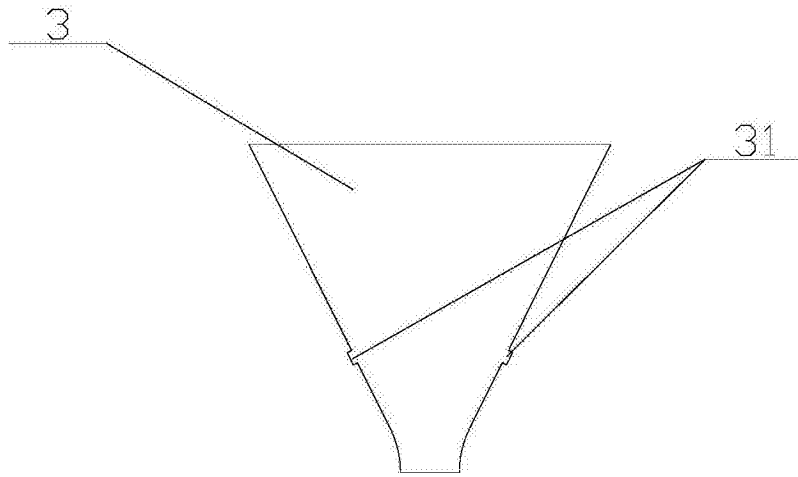


图 3

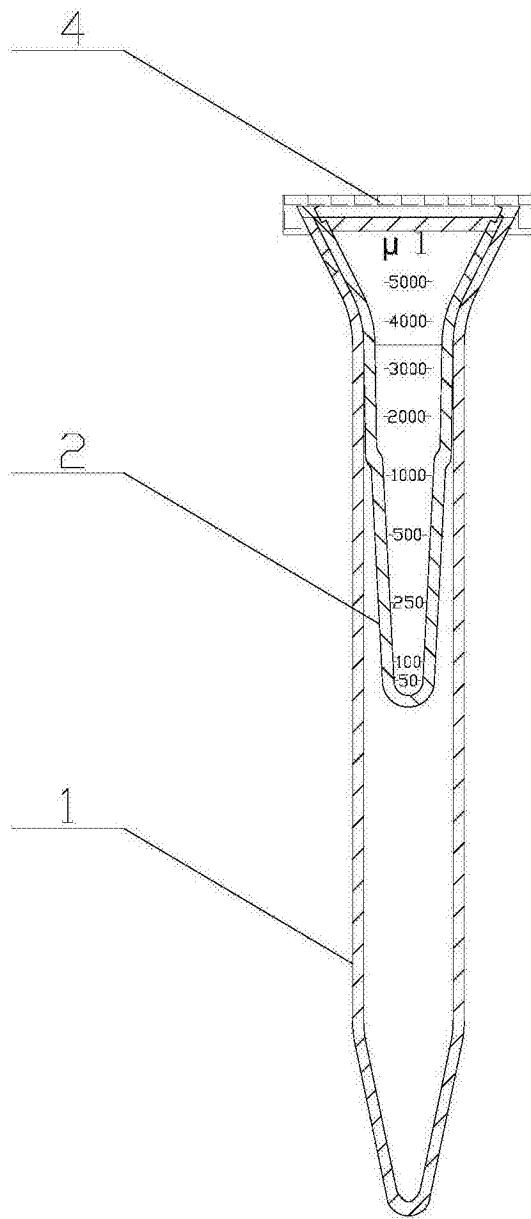


图 4

专利名称(译)	一种人源性尿液Endocan蛋白的ELISA检测试剂盒及检测方法		
公开(公告)号	CN105116152A	公开(公告)日	2015-12-02
申请号	CN201510486502.4	申请日	2015-08-10
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	许传亮 马重 曾蜀雄 陈新 徐伟东 孙颖浩		
发明人	许传亮 马重 曾蜀雄 陈新 徐伟东 孙颖浩		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/68 G01N2333/4722		
代理人(译)	赵青		
其他公开文献	CN105116152B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明具体涉及一种人源性尿液Endocan蛋白的ELISA检测试剂盒及检测方法，属于免疫学和生物技术领域。本发明利用超滤和ELISA技术建立了检测人源性尿液Endocan蛋白的试剂盒，并首次证实某些病理状态下人的尿液中存在Endocan。本发明提供的ELISA试剂盒操作简单方便，可准确、高灵敏度地检测到尿液Endocan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。

