



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104730250 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 24

(21) 申请号 201310706630. 6

(22) 申请日 2013. 12. 20

(71) 申请人 北京义翘神州生物技术有限公司

地址 100176 北京市经济技术开发区中和街
14 号 B-203

(72) 发明人 张杰 颜艳 黄序

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测人肾损伤分子的酶联免疫试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种人 KIM-1 双抗夹心法检测试剂盒, 主要包括抗 KIM-1 小鼠单克隆包被抗体, 酶标 KIM-1 小鼠单克隆抗体以及重组表达的 KIM-1 蛋白标准品。本发明可以用于定性或定量检测样本中的 KIM-1 水平, 优点是检验方法方便易行, 检测灵敏度和准确度高、特异性强, 能同时快速检测大批样本, 可在 KIM-1 相关基础和临床研究中发挥重要作用。

1. 一种检测人肾损伤分子的检测试剂盒,其特征在于,包括以识别人肾损伤分子不同表位的单克隆抗体分别作为捕获抗体和检测抗体,以重组表达的人肾损伤分子作为抗原标准品。

2. 权利要求 1 所述的抗原标准品为哺乳细胞表达的重组人肾损伤分子。

3. 权利要求 2 所述的抗原标准品为 293 细胞表达的重组人肾损伤分子。

4. 权利要求 1 所述的捕获抗体为小鼠单克隆抗体或兔单克隆抗体。

5. 权利要求 1 所述的捕获抗体是固定在微量滴定板或其他固相支持物上的。

6. 权利要求 1 所述的捕获抗体的量为 $2 \sim 4\mu\text{g/mL}$ 。

7. 权利要求 1 所述的检测抗体量为 $0.5 \sim 1\mu\text{g/mL}$ 。

8. 权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,包括包被缓冲液、封闭液、浓缩洗涤液、样品稀释液、显色液、反应终止液。

9. 权利要求 8 所述的包被缓冲液为磷酸盐缓冲液;所述封闭液是含有 2%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;所述浓缩洗涤液为含有 2%吐温的磷酸盐缓冲液;所述样品稀释液为含有 0.1%牛血清白蛋白和 0.1%吐温的磷酸盐缓冲液;所述显色液由显色液 A 和显色液 B 组成,显色液 A 为过氧化氢或过氧化脲,显色液 B 为四甲基联苯胺;所述终止液为 2M 的硫酸。

一种检测人肾损伤分子的酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫分析技术领域中的一种检测人肾损伤分子的酶联免疫试剂盒。

背景技术

[0002] Iehimura 等于 1998 年采用表象差异分析 (representational difference analysis, RDA) 在缺血一再灌注大鼠肾细胞中识别一种新的 I 型跨膜蛋白, 命名为肾损伤分子-1 (kidney injury molecule-1, KIM-1), 其大量表达于缺血一再灌注损伤后再生的近曲小管上皮细胞, 而在正常肾组织中表达甚微。人类 KIM-1 基因定位于第 5 号染色体长臂 (5q33.2), KIM-1 蛋白由 334 个氨基酸残基组成, 蛋白结构表明, KIM-1 可能属于免疫球蛋白超家族, 其胞外区包括 1 个信号肽、1 个 Ig 域和 1 个粘蛋白域, 执行膜受体 / 粘附分子的功能。KIM-1 胞内区较短。含一个保守的酪氨酸磷酸化位点, 可能为转导受体-配体相互作用的细胞内信号转导通路。KIM-1 的表达具有极高的组织特异性。RNA 印迹杂交分析表明, KIM-1 在胎肝、胎肾中不表达, 在正常成人肝、肾、脾有微弱表达, 而在缺血损伤后的肾组织中表达显著增强。免疫组织化学染色及 RNA 原位杂交显示, KIM-1 mRNA 及蛋白分子表达于外髓部外层及皮质髓射线的近曲小管 S3 区再生上皮细胞中, 亚细胞定位大多在基底膜细胞顶部。KIM-1 的生物学功能, 可能参与肾脏疾病的损伤及修复过程、对抗损伤性粘附与免疫反应过程。

[0003] KIM-1 在临床上可作为检测急性肾损伤的灵敏、特异、定量的生物学标记物: 急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是涉及多学科的一种常见病症, 早期发现和及时治疗可防止病情进一步恶化, 阻止其发展成肾衰竭。既往传统的血肌酐、尿素氮等指标无法满足 AKI 的临床早期诊断需要。KIM-1 被认为 AKI 的标志物之一, KIM-1 是一种新的 I 型跨膜糖蛋白, 在正常的肾组织中几乎不表达, 但在缺血、肾毒性等所致的 AKI 的肾小管上皮细胞呈高表达, 其细胞外域在金属基质蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 的作用下可裂解为可溶性片段释放到细胞外, 并排入尿中。动物研究表明, 尿 KIM-1 的升高早于血肌酐、尿素氮、尿蛋白等指标, 当人类发生 AKI 时, 尿 KIM-1 升高也较明显, 但 KIM-1 能否最终被广大的临床医生所公认并成为早期确诊 AKI 的灵敏指标, 还需在进一步的临床研究中得到证实。

[0004] KIM-1 还可用于肾肿瘤的早期诊断。已有报道表明, 可溶性 KIM-1 的粘蛋白域可对抗粘附, 起细胞保护作用, 肿瘤细胞上的粘蛋白过度表达, 也可抑制淋巴细胞与肿瘤细胞的粘附, 从而保护肿瘤细胞, 使其转移成为可能。肾细胞癌细胞株 769-P 能大量表达 KIM-1, 肾细胞癌患者肾活检标本通过免疫组化显示, 同样高度表达 KIM-1, 而在肾切除术后, 尿 KIM-1 水平迅速下降或消失, 表明 KIM-1 及其可溶性成分可能在肾肿瘤的发展及转移中起作用, 可作为肾肿瘤的早期诊断指标。

[0005] 基于 KIM-1 在临床研究和辅助诊断中可能具有的重要作用, 准确测定不同尿液样本中的 KIM-1 水平对于基础及临床研究均具有重要的意义。酶联免疫法由于检测设备要求

低,易于实现快速高通量,定量较为准确,因此是目前测定 KIM-1 的主要手段,本发明完全自主开发出了针对 KIM-1 不同位点的新型鼠抗 KIM-1 单克隆抗体,采用双抗夹心法组成了 KIM-1 检测试剂盒,可以被广泛应用于 KIM-1 的基础及临床研究。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种检测灵敏度高、准确性强、低成本的人 KIM-1 双抗夹心法检测试剂盒。

[0007] 本发明所提供的检测试剂盒包括特异性的 KIM-1 包被抗体,酶标 KIM-1 检测抗体以及人 KIM-1 蛋白标准品。

[0008] 其中所述 KIM-1 包被抗体和检测抗体皆为鼠源单克隆抗体,所述人 KIM-1 蛋白标准品为真核表达的重组人 KIM-1 蛋白。

[0009] 所述单克隆抗体采用重组人 KIM-1 蛋白免疫动物,利用杂交瘤技术制备获得。酶标抗体按照常规方法利用辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase,HRP) 标记抗体获得。所述重组人 KIM-1 蛋白是真核表达后纯化获得。

[0010] 本发明的技术方案为优选针对 KIM-1 不同表位,具有高灵敏度、高特异性的单克隆抗体配对组合,将一株单克隆抗体作为包被抗体吸附于固相载体上,包被抗体可以特异性的捕获样本中的 KIM-1 以及 KIM-1 蛋白标准品,加入酶标检测抗体后,形成包被抗体、抗原、检测抗体复合物,相应底物显色后终止,读取样本吸光值,通过与标准曲线比较即可得出 KIM-1 的含量。

[0011] 本发明采用双抗夹心法定量或定性检测样本中的 KIM-1 水平,检验方法方便易行,检测灵敏度和准确度高、特异性强、能够同时快速检测大批样本,制备抗体所需免疫原和筛选抗原以及试剂盒中的蛋白标准品全部采用重组人 KIM-1 蛋白,试剂盒主要组成部分的抗体和蛋白标准品均为自主研发,因此成本低,可靠性强,预计将在 KIM-1 相关基础和临床研究中发挥重要作用。

附图说明

[0012] 图 1 重组人 KIM-1 蛋白标准品电泳鉴定图

[0013] 图 2 人 KIM-1 酶联免疫试剂盒检测标准曲线图

具体实施方式

[0014] 以下结合具体实施例对本发明做进一步的描述和说明。

[0015] 实施例 1 酶联免疫试剂盒的组分制备

[0016] 1. 人 KIM-1 蛋白小鼠单克隆抗体的制备:

[0017] 1) 动物免疫

[0018] 采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物,以义翘神州生物技术有限公司生产的重组人 KIM-1 蛋白为免疫原,免疫剂量为 $50 \mu\text{g}/\text{只}$,首次免疫将免疫原与等量的完全弗氏佐剂制成乳化剂,腹部皮下多点注射,间隔 2-3 周取相同剂量免疫原与等量不完全弗氏佐剂制成乳化剂,加强免疫两次,三次免疫后测定血清效价,取血清效价高的小鼠腹腔加强免疫一次,4 天后取脾细胞进行融合。

[0019] 2) 细胞融合和克隆化

[0020] 取免疫小鼠脾细胞,按 4 : 1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞混合,利用聚乙二醇法进行融合,获得杂交瘤细胞。采用重组人 KIM-1 蛋白作为包被抗原,用 ELISA 法测定细胞上清液,选取阳性孔通过有限稀释进行克隆化,直至得到稳定分泌 KIM-1 特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0021] 3) 单克隆抗体的生产与纯化

[0022] 选取杂交瘤细胞株,利用培养瓶或生物反应器进行细胞培养,收集细胞培养上清,利用蛋白 A 进行亲和纯化,鉴定抗体纯度和浓度后分装,于 -20℃ 低温保存。

[0023] 2. 酶标抗体的制备 :

[0024] 1) 称取 5mg HRP 溶解于 0.5ml 蒸馏水中。

[0025] 2) 于上液中加入 0.5ml 新配的 0.1M NaIO₄ 溶液,室温下避光搅拌 20 分钟。

[0026] 3) 将上述溶液装入透析袋中,对 1mM 的醋酸钠缓冲液 (pH4.4) 透析,4℃ 过夜

[0027] 4) 加 0.2M 碳酸盐缓冲液 (pH9.5),使以上醛化 HRP 的 pH 升高到 9.0 ~ 9.5,然后立即加入 5mg IgG 在 1ml0.01M 碳酸盐缓冲液中,室温避光轻轻搅拌 2 小时。

[0028] 5) 加 0.2ml 新配的 4mg/ml NaBH₄ 液,混匀,于 4℃ 放置 2 小时。

[0029] 6) 将上述液装入透析袋中,于 pH7.4,0.15M 的 PBS 透析,4℃ 过夜。

[0030] 实施例 2 检测人 KIM-1 的酶联免疫试剂盒的组建

[0031] 组建检测人 KIM-1 的酶联免疫试剂盒,包含以下试剂 :

[0032] 1) 小鼠抗人 KIM-1 单克隆包被抗体 ;

[0033] 2) HRP 标记的小鼠单克隆抗体 ;

[0034] 3) 重组人 KIM-1 蛋白标准品 ;

[0035] 4) 包被缓冲液为 pH7.4 的磷酸盐缓冲液 ;

[0036] 5) 封闭液是含有 2% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液 ;

[0037] 6) 样品稀释液为含有 0.1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液 ;

[0038] 7) 浓缩洗涤液为含有 2% 吐温的磷酸盐缓冲液洗涤液 ;

[0039] 8) 显色液 A 和显色液 B 组成,显色液 A 为过氧化氢或过氧化脲,显色液 B 为四甲基联苯 ;

[0040] 9) 终止液为 2mol/L 的硫酸

[0041] 实施例 3 检测人 KIM-1 的酶联免疫试剂盒的制备

[0042] 1. 利用正交试验摸索酶联免疫试剂盒的最佳抗体浓度

[0043] 按照紫外分光光度计法,测定抗体及抗原的浓度。采用正交试验方法,将抗 KIM-1 单克隆抗体稀释至浓度为 4 μg/ml、2 μg/ml、1 μg/ml,重组 KIM-1 蛋白浓度稀释至 4000pg/ml、400pg/ml、0pg/ml,HRP 标记的抗 KIM-1 小鼠克隆抗体稀释浓度至 4 μg/ml、2 μg/ml、1 μg/ml、0.5 μg/ml。综合考虑背景及重组蛋白的光吸收值,选择抗体的包被浓度为 2 μg/ml,HRP 标记抗体工作浓度为 0.5 μg/ml。

[0044] 2. 试剂盒的批量制备

[0045] 1) 包被酶标板 :用磷酸盐缓冲液 (PBS) 包被,将抗 KIM-1 抗体稀释至浓度为 2 μg/ml,100 μL/孔,包被 96 孔酶标板,4℃ 孵育过夜。

[0046] 2) 封闭 :倒去未包被的液体,用含 0.1% Tween 的 PBS (PBST) 200 μL/孔,洗板 1 次。

加入 300 μ l 封闭液封闭非特异性结合位点,室温孵育 1 小时。PBST 洗板 2 次,拍干后用真空包装机包装,4℃保存备用。

[0047] 3) 蛋白标准品的制备:用含 0.5% BSA 的 PBS 稀释重组的 KIM-1 蛋白,分装后冻干,4℃保存备用。

[0048] 4) 酶标抗体的制备:将作为检测抗体的抗 KIM-1 单克隆抗体纯化后,HRP 标记,加入 50%甘油,分装后 -20℃保存备用。

[0049] 实施例 4 试剂盒主要参数的测定

[0050] 对影响试剂盒质量的主要参数包括线性范围、特异性、灵敏度、精密度、线性、回收率等,其测定具体方法和结果如下:

[0051] 1. 试剂盒的线性范围:

[0052] 1) 将 KIM-1 蛋白用含 0.1% BSA 的 PBST 稀释成,10,000pg/mL,1000pg/mL,0.1pg/mL,0pg/mL,100 μ l/孔加入到上述包被好的酶标板中,室温孵育 2 小时。PBST 洗板 3 遍。

[0053] 2) 将 HRP 标记抗体用含 0.1% BSA 的 PBST 稀释成 1 μ g/mL,100 μ l/孔加入反应孔中,室温孵育 1 小时。PBST 洗板 3 遍。

[0054] 3) 加入 200 μ l 新鲜配置的 TMB 底物,室温避光显色 20 分钟,加入 50 μ l 2M 硫酸终止反应,酶标仪 450nm 波长的下读值。

[0055] 4) 试验结果表明,当 KIM-1 蛋白在浓度为 10,000pg/mL 时已经饱和,在 1000pg/mL 时,450nm 吸光值在线性范围内。

[0056] 5) 重复试验步骤 1)、2)、3);调整 KIM-1 蛋白的标准曲线各点为:4000pg/mL,2000pg/mL,1000pg/mL,500pg/mL,250pg/mL,125pg/mL,62.5pg/mL,0pg/mL. 使其线性相关系数在 0.99 以上;即该试剂盒的线性范围为 62.5pg/mL-4000pg/mL。

[0057] 2. 试剂盒的特异性:将重组的小鼠 KIM-1、大鼠 KIM-1、犬 KIM-1 和猴 KIM-1 稀释至 1250ng/mL,用人 KIM-1 酶联免疫检测试剂盒测试,试验结果证明,该试剂盒与 1250ng/mL 的小鼠 KIM-1、大鼠 KIM-1、犬 KIM-1 和猴 KIM-1 无交叉反应。

[0058] 3. 试剂盒的灵敏度

[0059] 以 20 个空白样品的平均光吸收值加上三倍标准偏差,计算相应 KIM-1 含量,得到试剂盒的最低检出限即灵敏度为 0.008pg/mL;说明本试剂盒有较高的检测灵敏度。

[0060] 4. 试剂盒的精密度测定

[0061] 1) 试验内精密度的测定

[0062] 选择 4 份含有不同 KIM-1 浓度的尿液样品,每个样品 20 个重复,在同一块酶标板检测,分别计算每个检测结果的变异系数(C.V),平均变异系数为 3.1%(见表 1)。

[0063] 表 1KIM-1ELISA 试剂盒的试验内精密度实验

样本编号	1	2	3	4
重复数	20	20	20	20
[0064] 平均含量(ng/mL)	0.861	1.206	0.242	1.303
标准偏差	0.017	0.026	0.008	0.065
变异系数(%)	2.0%	2.2%	3.3%	5.0%

[0065] 2) 试验间精密度的测定

[0066] 选择 4 份含有不同 KIM-1 浓度的尿液样品,每个样品 2 个重复,重复检测 5 次,每

次板内设置标准品对照曲线,计算同一份样品 5 次检测结果间的变异系数 (C.V),4 份样品 5 次检测结果的变异系数平均为 7.7% (见表 2)。

[0067] 表 2KIM-1 试剂盒的试验间精密度实验

样本编号	1	2	3	4
试验次数	5	5	5	5
[0068] 平均含量(ng/mL)	0.905	1.205	0.280	1.329
标准偏差	0.053	0.078	0.029	0.110
变异系数(%)	5.8%	6.4%	10.2%	8.3%

[0069] 5. 试剂盒的线性测定 :

[0070] 为评估试剂盒的线性,对 4 份有较高含量 KIM-1 的尿液样本进行一系列系数,各样本各稀释度回收率在 80% -120%之间,说明该试剂盒具有很好的线性,具体结果见表 3。

[0071] 表 3KIM-1 试剂盒的线性

线性	样本(n=4)
1:2	测定平均回收率(%) 100
	范围 (%) 92-106
1:4	测定平均回收率(%) 100
	范围 (%) 88-107
1:8	测定平均回收率(%) 100
	范围 (%) 84-116
1:16	测定平均回收率(%) 100
	范围 (%) 86-111

[0073] 6. 试剂盒回收率的测定 :

[0074] 将 3 个不同浓度重组 KIM-1 蛋白分别添加到 4 份尿液样本中进行试验,计算各浓度回收率,3 个不同浓度在 4 份尿液样本中的平均回收率为 92%,范围为 :80% -105%,具有较好的回收率。

[0075] 实施例 5KIM-1 酶联免疫试剂盒的检测步骤

[0076] 1. 样品的收集、处理和保存

[0077] 尿液样本的采集 :用无菌容器收集中段晨尿,1000×g 离心 10 分钟去除颗粒和聚合物,取上清分装,-20℃保存备用。

[0078] 2. 加样

[0079] 1) 取出包被好的酶标板及冻干的标准品,加 1ml 含 0.1% BSA 的 PBST 将标准品将其溶解。室温下放置 20 分钟。将标准品从 4000pg/ml 起,做 2 倍的倍比稀释,稀释 7 个点,将稀释液各取 100u。按照下表的顺序加入 96 孔酶标板中。

[0080] 2) 取待测尿液样本,100 μ L/ 孔加入反应孔中。

[0081] 3) 室温孵育 2 小时。洗液 200 μ L/ 孔洗板 3 次,拍干酶标板。

[0082] 3. 加入检测抗体

[0083] 将 HRP 标记抗体用 0.1% BSA 的 PBST 稀释至 0.5ug/ml,100 μ l/ 孔加入反应孔中。室温孵育 1 小时。洗液 200 μ l/ 孔洗板 3 次,拍干酶标板。

[0084] 4. 显色

[0085] 加入 200 μ L 新鲜配制的 TMB 显色液,室温反应 20 分钟。加入 50 μ L2M 硫酸终止

反应。酶标仪 450nm 波长的下读值。

[0086] 5. 标准曲线的建立

[0087] 以标准品的浓度为横坐标, OD 值为纵坐标建立对数曲线 (图 2)。将测得的样品 OD 值代入公式, 算出样品中的 KIM-1 含量。

[0088] 最后, 还需要注意的是, 以上列举的仅是本发明的具体实施例子。显然, 本发明不限于以上实施例子, 还可以有许多变型。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变型, 均应认为是本发明的保护范围。

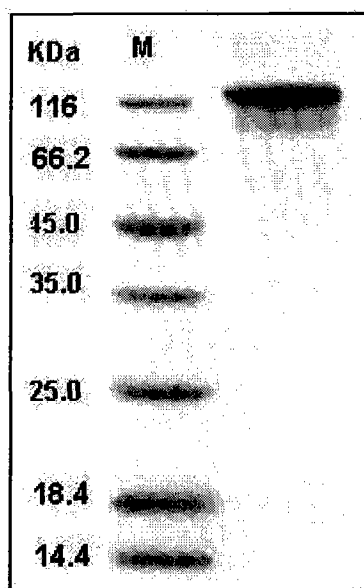


图 1.

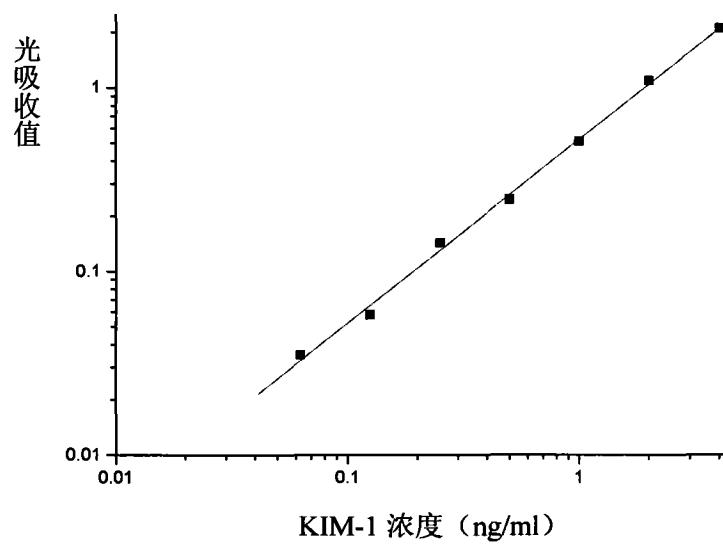


图 2

专利名称(译)	一种检测人肾损伤分子的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN104730250A	公开(公告)日	2015-06-24
申请号	CN201310706630.6	申请日	2013-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	北京义翹神州生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京义翹神州生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京义翹神州生物技术有限公司		
[标]发明人	张杰 颜艳 黄序		
发明人	张杰 颜艳 黄序		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/68 G01N2333/70503		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种人KIM-1双抗夹心法检测试剂盒，主要包括抗KIM-1小鼠单克隆包被抗体，酶标KIM-1小鼠单克隆抗体以及重组表达的KIM-1蛋白标准品。本发明可以用于定性或定量检测样本中的KIM-1水平，优点是检验方法方便易行，检测灵敏度和准确度高、特异性强，能同时快速检测大批样本，可在KIM-1相关基础和临床研究中发挥重要作用。

样本编号	1	2	3	4
重复数	20	20	20	20
平均含量(ng/mL)	0.861	1.206	0.242	1.303
标准偏差	0.017	0.026	0.008	0.065
变异系数(%)	2.0%	2.2%	3.3%	5.0%