



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103245787 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201210022243. 6

(第 3 期),

(22) 申请日 2012. 02. 01

审查员 李倩

(73) 专利权人 浙江大学

地址 310012 浙江省杭州市西湖区余杭塘路
388 号

(72) 发明人 毛建山 纪小微 朱永良

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101796415 A, 2010. 08. 04,

CN 1987468 A, 2007. 06. 27,

CN 101302254 A, 2008. 11. 12,

WO 03045428 A2, 2003. 06. 05,

赵启仁等. 微量尿白蛋白的时间分辨荧光免疫分析. 《中国医学科学院学报》. 1994, 第 16 卷

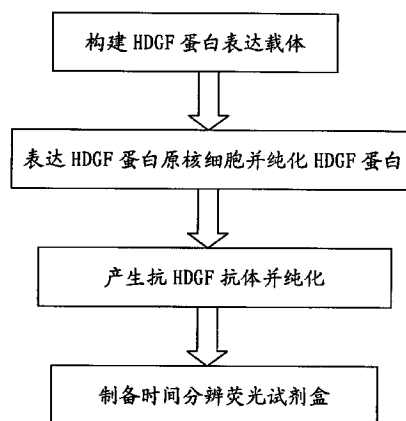
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备方法

(57) 摘要

本发明提供一种肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备方法,包括构建肝癌衍生生长因子 HDGF 蛋白的表达载体;表达 HDGF 蛋白原核细胞;产生抗 HDGF 抗体并纯化;制备时间分辨荧光试剂盒。肝癌衍生生长因子检测试剂盒包括兔抗 HDGF 多克隆抗体及用镧族金属元素 Eu 标记的鼠抗 HDGF 单克隆抗体,其中,鼠抗 HDGF 单克隆抗体作为二抗。采用本发明的肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备方法,制备简便、操作流程短,检测重复性好、灵敏度高、无放射性。



1. 一种肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

a) 构建肝癌衍生生长因子 HDGF 蛋白的表达载体,用聚合酶链式反应技术直接从体外培养细胞株中将 HDGF 克隆至 pET28 表达载体;

b) 表达 HDGF 蛋白原核细胞,用 His 金属镍 IDA 螯合树脂柱纯化 HDGF 蛋白,用 Thrombin 酶切除 His-tag 标签,得到 HDGF 蛋白;

c) 产生抗 HDGF 抗体并纯化,将已切除标签的 HDGF 作为抗原免疫大白兔和大鼠,产生 HDGF 抗体,收集血清,用硫酸铵沉淀、透析、protein-A-Sepharose 亲和柱纯化兔抗 HDGF 多克隆抗体和鼠抗 HDGF 单克隆抗体;

d) 制备时间分辨荧光试剂盒,在固相上结合兔抗 HDGF 多克隆抗体,鼠抗 HDGF 单克隆抗体作为二抗,镧族金属元素 Eu 络合生物素形成复合物并标记二抗。

2. 如权利要求 1 所述的一种肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述肝癌衍生生长因子检测试剂盒包括兔抗 HDGF 多克隆抗体及用镧族金属元素 Eu 标记的鼠抗 HDGF 单克隆抗体,其中,鼠抗 HDGF 单克隆抗体作为二抗;所述肝癌衍生生长因子检测试剂盒用于肝癌衍生生长因子 HDGF 的检测;所述肝癌衍生生长因子检测试剂盒的检测成分为患者血液或者血浆成分。

3. 如权利要求 2 所述的肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述用镧族金属元素 Eu 标记的鼠抗 HDGF 单克隆抗体是通过下述方法制备的:

a) 构建所述肝癌衍生生长因子 HDGF 蛋白的表达载体;

b) 表达所述 HDGF 蛋白原核细胞并纯化所述 HDGF 蛋白;

c) 产生所述鼠抗 HDGF 单克隆抗体并纯化;

d) 用镧族金属元素 Eu 络合生物素形成的复合物标记所述二抗。

4. 如权利要求 3 所述的肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备方法,其特征在于,其中步骤 d) 采用稀释缓冲液稀释所述鼠抗 HDGF 单克隆抗体并涂布于固相上,35 ~ 39℃ 孵育 2h,孵育后,用洗涤缓冲液洗涤所述固相表面数次;生物素与镧族金属离子 Eu 的盐溶液混合,形成荧光性络合部分;用所述稀释缓冲

液稀释络合的结合物后涂布于所述固相上,35 ~ 39℃ 孵育 2h,孵育后,用所述洗涤缓冲液洗涤所述固相表面数次。

5. 如权利要求 1 所述的肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备方法,其特征在于,其中步骤 d) 将用含 NaCl 的磷酸盐缓冲液稀释一抗溶液并将其涂布到固相上,2 ~ 6℃ 孵育 20h 以上,将所述一抗固定到所述固相上;用洗涤缓冲液洗涤涂布了所述一抗的所述固相表面;洗涤后将所述固相保存于 -20℃,直至需要进行测定之前;预先用稀释缓冲液对血液样本进行稀释,涂布于所述固相上,35 ~ 39℃ 孵育 2h,孵育后,用所述洗涤缓冲液洗涤所述固相表面数次,接着用所述稀释缓冲液稀释的所述鼠抗 HDGF 单克隆抗体涂布于所述固相上,35 ~ 39℃ 孵育 2h,孵育后,用所述洗涤缓冲液洗涤所述固相表面数次;生物素与镧族金属离子 Eu 的盐溶液混合,形成荧光性络合部分;用所述稀释缓冲液稀释络合的结合物后涂布于所述固相上,35 ~ 39℃ 孵育 2h,孵育后,用所述洗涤缓冲液洗涤所述固相表面数次;将所述镧系金属元素 Eu 络合生物素形成的复合物进行固相或液相的时间分辨荧光测定;测定条件为延迟时间为 0.2 ~ 0.3ms,窗口时间为 0.2 ~ 0.6ms,闪烁速度为 0.5 ~ 1.5ms,激发波长为 337.1nm 测定波长为 615nm。

6. 如权利要求 1 所述的肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述肝癌衍生生长因子检测试剂盒制备中采用的稀释缓冲液为三羟甲基氨基甲烷 Tris 和 HCL 构成的弱碱性缓冲液,即 Tris-HCL, pH 为 7.5 ~ 8.0,浓度为 0.025 ~ 0.075M。

7. 如权利要求 6 所述的肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述稀释缓冲液还包括牛血清白蛋白 BSA 和 NaCL,其中,所述 BSA 的浓度为 0.15% ~ 0.25%,所述 NaCL 的浓度为 0.6% ~ 1.2%;所述稀释缓冲液的稀释倍数,即体液样本与缓冲液比例为 1 : 5 ~ 1 : 15。

8. 如权利要求 1 所述的肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述肝癌衍生生长因子检测试剂盒制备中采用的洗涤缓冲液为由 Tris 和 HCL 构成弱碱性缓冲液,即 Tris-HCL,含有非离子表面活性剂,该非离子表面活性剂为聚氧乙烯山梨糖醇酐酸酯。

一种肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测用的试剂盒的制备方法,尤其涉及一种用于肝癌衍生生长因子 HDGF 检测的检测试剂盒的制备方法。

背景技术

[0002] 肝癌衍生生长因子 HDGF 具有促进细胞增殖、分化,组织器官生长发育,损伤后组织修复等功能,参与体内多种生理病理过程。HDGF 能促进胎肝细胞增殖,参与胎肝发育过程中肝细胞生长发育调控。在大鼠颈动脉气囊扩张损伤模型中,损伤后的动脉新生内膜及肌层 HDGF 表达明显增高,HDGF 参与血管损伤后新生内膜形成中血管平滑肌细胞的增殖与迁移反应。

[0003] 我们研究胃上皮细胞癌 HDGF 表达时发现,HDGF 核标记指数 HDGF-LI 在胃癌前病变,如肠上皮化生和不典型增生,发展过程中逐渐增加,如肠上皮化生和不典型增生。胃癌早期继续增加,在进展期胃癌表达水平更高,提示 HDGF 参与胃癌的形成。胃癌 UICC I 期患者 HDGF-LI 低于 UICC II、III、IV 期患者,无淋巴转移 NO 患者 HDGF-LI 低于淋巴结转移 N1、N2、N3 患者,浸润黏膜及黏膜下层肿瘤相对于侵袭浆膜层肿瘤 HDGF-LI 低,提示 HDGF 表达水平与胃癌分期、胃癌淋巴结转移及侵袭深度相关。HDGF 与肿瘤发生、发展有关,在肿瘤组织中表达增加,HDGF 与肿瘤患者预后相关,有望成为肿瘤诊断新的分子标志物及潜在治疗靶点。

[0004] HDGF 现有检测方法主要有免疫组化和 ELISA 法,但是免疫组化是半定量的蛋白检测方法,且检测过程繁琐;而 ELISA 法的检测灵敏度和重复性均较差。

[0005] 有鉴于此,制备一种检测过程简单,灵敏度高、重复性好的肝癌衍生生长因子检测试剂盒成为提高 HDGF 检测质量和效率的一项重要研究课题。

发明内容

[0006] 本发明的目的是针对现有的免疫组化和 ELISA 法检测过程繁琐,灵敏度不高,重复性较差的问题,提供一种肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备方法。

[0007] 本发明的提供了一种肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0008] a) 构建肝癌衍生生长因子 HDGF 蛋白的表达载体,用聚合酶链式反应技术直接从体外培养细胞株中将 HDGF 克隆至 pET28 表达载体;

[0009] b) 表达 HDGF 蛋白原核细胞,用 His 金属镍 IDA 螯合树脂柱纯化 HDGF 蛋白,用 Thrombin 酶切除 His-tag 标签,得到 HDGF 蛋白;

[0010] c) 产生抗 HDGF 抗体并纯化,将已切除标签的 HDGF 作为抗原免疫大白兔和大鼠,产生 HDGF 抗体,收集血清,用硫酸铵沉淀、透析、protein-A-Sepharose 亲和柱纯化兔抗 HDGF 多克隆抗体和鼠抗 HDGF 单克隆抗体;

[0011] d) 制备时间分辨荧光试剂盒,在固相上结合兔抗 HDGF 多克隆抗体,鼠抗 HDGF 单克隆抗体作为二抗,镧族金属元素 Eu 络合生物素形成复合物并标记二抗。

[0012] 优选的,肝癌衍生生长因子检测试剂盒包括兔抗 HDGF 多克隆抗体及用镧族金属元素 Eu 标记的鼠抗 HDGF 单克隆抗体,其中,鼠抗 HDGF 单克隆抗体作为二抗;肝癌衍生生长因子检测试剂盒用于肝癌衍生生长因子 HDGF 的检测;肝癌衍生生长因子检测试剂盒的检测成分为患者血液或者血浆成分。

[0013] 优选地,肝癌衍生生长因子检测试剂盒中用镧族金属元素 Eu 标记的鼠抗 HDGF 单克隆抗体是通过下述方法制备的:

[0014] a) 构建肝癌衍生生长因子 HDGF 蛋白的表达载体;

[0015] b) 表达 HDGF 蛋白原核细胞并纯化 HDGF 蛋白;

[0016] c) 产生鼠抗 HDGF 单克隆抗体并纯化;

[0017] d) 用镧族金属元素 Eu 络合生物素形成的复合物标记二抗。

[0018] 优选地,其中步骤 d) 采用稀释缓冲液稀释所述鼠抗 HDGF 单克隆抗体并涂布于固相上,35 ~ 39℃ 孵育 2h,孵育后,用洗涤缓冲液洗涤所述固相表面数次;生物素与镧族金属离子 Eu 的盐溶液混合,形成荧光性络合部分;用所述稀释缓冲液稀释络合的结合物后涂布于所述固相上,35 ~ 39℃ 孵育 2h,孵育后,用所述洗涤缓冲液洗涤所述固相表面数次。

[0019] 优选地,肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备方法中步骤 d) 将用含 NaCl 的磷酸盐缓冲液稀释一抗溶液并将其涂布到固相上,2 ~ 6℃ 孵育 20h 以上,将所述一抗固定到所述固相上;用洗涤缓冲液洗涤涂布了所述一抗的所述固相表面;洗涤后将所述固相保存于 -20℃,直至需要进行测定之前;预先用稀释缓冲液对血液样本进行稀释,涂布于所述固相上,35 ~ 39℃ 孵育 2h,孵育后,用所述洗涤缓冲液洗涤所述固相表面数次,接着用所述稀释缓冲液稀释的所述鼠抗 HDGF 单克隆抗体涂布于所述固相上,35 ~ 39℃ 孵育 2h,孵育后,用所述洗涤缓冲液洗涤所述固相表面数次;生物素与镧族金属离子 Eu 的盐溶液混合,形成荧光性络合部分;用所述稀释缓冲液稀释络合的结合物后涂布于所述固相上,35 ~ 39℃ 孵育 2h,孵育后,用所述洗涤缓冲液洗涤所述固相表面数次;将所述镧族金属元素 Eu 络合生物素形成的复合物进行固相或液相的时间分辨荧光测定;测定条件为延迟时间为 0.2 ~ 0.3ms,窗口时间为 0.2 ~ 0.6ms,闪烁速度为 0.5 ~ 1.5ms,激发波长为 337.1nm 测定波长为 615nm。

[0020] 优选地,肝癌衍生生长因子检测试剂盒制备中采用的稀释缓冲液为三羟甲基氨基甲烷 Tris 和 HCL 构成的弱碱性缓冲液,即 Tris-HCL, pH 为 7.5 ~ 8.0,浓度为 0.025 ~ 0.075M。

[0021] 优选地,稀释缓冲液还包括牛血清白蛋白 BSA 和 NaCl,其中,所述 BSA 的浓度为 0.15% ~ 0.25%,所述 NaCl 的浓度为 0.6% ~ 1.2%;所述稀释缓冲液的稀释倍数,即体液样本与缓冲液比例为 1 : 5 ~ 1 : 15。

[0022] 优选地,肝癌衍生生长因子检测试剂盒制备中采用的洗涤缓冲液为由 Tris 和 HCL 构成弱碱性缓冲液,即 Tris-HCL,含有非离子表面活性剂,该非离子表面活性剂为聚氧乙烯山梨糖醇酐酸酯。

[0023] 本发明的其它方面,所述技术领域的人员可根据现有技术得知。

[0024] 本发明的测定原理:利用聚合酶链式反应技术直接从体外培养的细胞株中将 HDGF 序列克隆至原核表达载体,通过大肠杆菌表达 HDGF 重组蛋白,对重组蛋白进行过柱和蛋白标签切除处理后获得高纯度的 HDGF 蛋白。再将该 HDGF 蛋白免疫大白兔及大鼠,获得

抗 HDGF 特异性的抗血清,进行 Protein A 亲和层析获得高纯度、高活性的 HDGF 兔多克隆抗体和 HDGF 鼠单克隆抗体。在固相上包被兔抗 HDGF 多克隆抗体,鼠抗 HDGF 单克隆抗体作为二抗,镧族金属元素络合生物素形成复合物标记二抗,制备时间分辨荧光试剂盒。

[0025] 本发明的有益效果在于:

[0026] 1) 肝癌衍生生长因子是 HDGF 相关蛋白质家族第一个被发现的成员,具有促进细胞增殖、分化,组织器官生长发育,损伤后组织修复等功能。HDGF 广泛参与体内生理病理过程,深入研究 HDGF,可以解释众多疾病的发生发展;

[0027] 2) HDGF 具有增加肿瘤细胞增殖和抑制肿瘤细胞凋亡的功能,HDGF 表达水平与肿瘤分期、淋巴结转移及侵袭深度相关,HDGF 参与与肿瘤发生、发展,在肿瘤组织中表达增加,与肿瘤患者预后相关,有望成为肿瘤诊断新的分子标志物及潜在治疗靶点。肝癌衍生生长因子 (HDGF) 时间分辨荧光分析法 (TRFIA) 检测试剂盒是研究肿瘤基因表达改变、肿瘤转移及预测肿瘤患者预后的重要手段。

附图说明

[0028] 读者在参照附图阅读了本发明的具体实施方式之后,将会更清楚地了解本发明的各个方面。其中,

[0029] 图 1 示出了依据本发明,肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备方法流程图;

[0030] 图 2 示出了依据本发明,肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备中表达 HDGF 蛋白原核细胞及纯化 HDGF 蛋白的方法流程图;

[0031] 图 3 示出了依据本发明,肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备中产生抗 HDGF 抗体及纯化的方法流程图。

具体实施方式

[0032] 为了更清楚地理解本发明的技术内容,下面参照附图,对本发明的实施方式作进一步的详细描述。

[0033] 本发明提供了一种利用时间分辨荧光分析法 TRFIA 检测肝癌衍生生长因子 HDGF 的试剂盒,包括兔抗 HDGF 多克隆抗体及用镧族金属元素 Eu 标记的鼠抗 HDGF 单克隆抗体,其中,鼠抗 HDGF 单克隆抗体作为二抗。本发明还提供了一种利用时间分辨荧光分析法 TRFIA 检测肝癌衍生生长因子 HDGF 试剂盒的制备方法。

[0034] 图 1 示出了肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备方法流程图。参照图 1,本发明采用的肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备方法,包括构建肝癌衍生生长因子 HDGF 蛋白的表达载体,表达 HDGF 蛋白原核细胞并纯化 HDGF 蛋白,产生抗 HDGF 抗体并纯化,以及制备时间分辨荧光试剂盒。

[0035] 实施例 1

[0036] 构建肝癌衍生生长因子 HDGF 蛋白的表达载体。

[0037] 采用聚合酶链式反应技术直接从体外培养细胞株中将 HDGF 克隆至 pET28 表达载体,在本实施例的一个方面,将 1×10^5 人胃上皮细胞癌 AGS 细胞离心沉淀,加入 0.5ml Trizol 提取总 RNA,再用逆转录试剂逆转录 RNA 至 cDNA,然后设计上游引物包含 BamH I 内切酶位点 GGATCC,通过聚合酶链式反应技术直接将 HDGF 序列克隆至 pET28BamH I 位点,

经 BamH I 单酶切鉴定合格后, DNA 测序检验, 合格即为 HDGF/pET28 表达载体。

[0038] 在本实施例的另一方面, 我们将 1×10^7 人胃上皮细胞癌 AGS 细胞离心沉淀, 加入 1.5ml Trizol 提取总 RNA, 再用逆转录试剂逆转录 RNA 至 cDNA, 然后设计上游引物包含 BamH I 内切酶位点 GGATCC, 通过聚合酶链式反应技术直接将 HDGF 序列克隆至 pET28BamH I 位点, 经 BamH I 单酶切鉴定合格后, DNA 测序检验, 合格即为 HDGF/pET28 表达载体。

[0039] 实施例 2

[0040] 进行 HDGF 蛋白原核细胞表达及蛋白纯化。

[0041] 图 2 示出了依据本发明, 肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备中表达 HDGF 蛋白原核细胞及纯化 HDGF 蛋白的方法流程图。参照图 2, 将 HDGF/pET28 表达载体转化 BL21 DE3 大肠杆菌, 建立 HDGF 蛋白的原核细胞表达系统, 用 His 金属镍 IDA 螯合树脂柱纯化 HDGF 蛋白, 用 Thrombin 酶切除 His-tag 标签, 得到 HDGF 蛋白。在本实施例的一个方面, 取 1ul 鉴定合格的 HDGF/Pet28 重组质粒加至 50ul 感受态 BL21 DE3 pLysS 大肠杆菌, 冰浴 30min, 42℃ 60min, 加入 500ml LB 液, 37℃ 30min, 涂布 LB 平板, 37℃ 培养过夜, 接种 2000ml LB 液, 37℃ 扩大培养 2h, 加入终浓度为 4mM 的 IPTG 诱导 1h, 离心收集细菌沉淀。

[0042] 将细菌沉淀以每克湿重细菌加入 1ml pH7.4, 含 1% Triton, 0.5mg/ml Lysome, 1u/ml Benzonase 0.05M 的磷酸盐缓冲液, 重悬细菌, 冰浴下超声粉碎细菌, 高速冷冻离心取上清, 沉淀继续超声粉碎, 高速冷冻离心, 合并上清液。将上清上 His 金属镍 IDA 螯合树脂柱, 用含 5mM 咪唑的 pH7.4, 0.05M 的磷酸盐缓冲液充分洗柱, 用含 5% 的硫柳汞检测至无蛋白流出为止, 改用含 10mM 咪唑, 300mM NaCl, pH8.0, 0.05M 的磷酸盐缓冲液洗脱, 收集流出的蛋白液, 装入透析袋, 2~8℃, pH8.0, 0.05M 的磷酸盐缓冲液透析除盐, 每个 6h 换液 1 次, 共 3 次。在透析平衡结束后, 用 MW10000 的聚乙二醇浓缩至 0.5mg/ml, 取 5mg 重组蛋白用 Thrombin 酶切除 N 段 His-tag 标签, 同时加入 Avidin-agarose 去除 Thrombin 蛋白, 得到纯化的 HDGF 蛋白, 该蛋白用 SDS-PAGE 电泳时, 70ug/lane 应无杂蛋白区带发现。

[0043] 在本实施例的另一方面, 取 3ul 鉴定合格的 HDGF/Pet28 重组质粒加至 50ul 感受态 BL21 DE3 0 大肠杆菌, 冰浴 30min, 42℃ 60min, 加入 500ml LB 液, 37℃ 90min, 涂布 LB 平板, 37℃ 培养过夜, 接种 4000ml LB 液, 37℃ 扩大培养 8h, 加入终浓度为 4mM 的 IPTG 诱导 6h, 离心收集细菌沉淀。

[0044] 将细菌沉淀以每克湿重细菌加入 5ml pH7.4, 含 1% Triton, 0.5mg/ml Lysome, 1u/ml Benzonase 0.05M 的磷酸盐缓冲液, 重悬细菌, 冰浴下超声粉碎细菌, 高速冷冻离心取上清, 沉淀继续超声粉碎, 高速冷冻离心, 合并上清液。将上清上 His 金属镍 IDA 螯合树脂柱, 用含 5mM 咪唑的 pH7.4, 0.05M 的磷酸盐缓冲液充分洗柱, 用含 5% 的硫柳汞检测至无蛋白流出为止, 改用含 10mM 咪唑, 300mM NaCl, pH8.0, 0.05M 的磷酸盐缓冲液洗脱, 收集流出的蛋白液, 装入透析袋, 8℃, pH8.0, 0.05M 的磷酸盐缓冲液透析除盐, 每个 6h 换液 1 次, 共 6 次。在透析平衡结束后, 用 MW30000 的聚乙二醇浓缩至 1.5mg/ml, 取 10mg 重组蛋白用 Thrombin 酶切除 N 段 His-tag 标签, 同时加入 Avidin-agarose 去除 Thrombin 蛋白, 得到纯化的 HDGF 蛋白, 该蛋白用 SDS-PAGE 电泳时, 70ug/lane 应无杂蛋白区带发现。

[0045] 实施例 3

[0046] 产生抗 HDGF 抗体并纯化。

[0047] 图 3 示出了依据本发明, 肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备中产生抗 HDGF 抗体

及纯化的方法流程图。参照图 3, 将已切除标签的 HDGF 作为抗原免疫大白兔和大鼠, 产生 HDGF 抗体, 收集血清, 用硫酸铵沉淀、透析、protein-A-Sepharose 亲和柱纯化兔抗 HDGF 多克隆抗体和鼠抗 HDGF 单克隆抗体。在本实施例的一个方面, 分别取 1mg 的 HDGF 蛋白与完全福式佐剂混匀, 充分乳化, 接种大白兔和大鼠 20 余点, 每个 5 天强化免疫 1 次, 待 3 后, 用 0.5mgHDGF 蛋白进行直接的兔静脉内注射和鼠尾静脉内注射, 5 天后, 分离大鼠颈总动脉, 剪断放血至三角烧瓶, 2℃ 倾斜放置过夜, 次日离心收集血清。

[0048] 将收集的血清用 2 倍预冷的 0.01M, pH7.4PBS 稀释, 在不断搅拌的同时缓慢加入等体积的饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4℃ 放置 30min, 离心弃上清, 沉淀用 1 倍原体积的 PBS 复容后, 再分别用 1/2 体积的饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 重复沉淀 1 次, 最后沉淀用 2mlPBS 复容, 装入透析袋, 2℃ 对 0.01M, pH7.4PBS 透析除盐, 每隔 6h 换液 1 次, 共 3 次, 在透析平衡结束后, 蛋白液 13000rpm 4℃ 离心 15min, 取上清液, 加至 0.01M, pH7.4PBS 平衡的 Protein A-Sepharose 柱, 流速 0.5ml/min, 流尽后, 用 0.01M, pH7.4 的磷酸盐缓冲液充分洗柱至无蛋白流出为止, 改用 0.1M, pH2.8 甘氨酸盐酸缓冲液洗脱结合的 IgG, 合并洗脱液, 2℃, pH7.4, 0.01M 的磷酸盐缓冲液透析除盐, 每隔 6h 换液 1 次, 共 3 次, 用 MW10000 的聚乙二醇浓缩至 0.5mg/ml, 分装, -20℃ 储存。

[0049] 在本实施例的另一方面, 分别取 1mg 的 HDGF 蛋白与完全福式佐剂混匀, 充分乳化, 接种大白兔和大鼠 20 余点, 每个 12 天强化免疫 1 次, 待 4 后, 用 1.5mgHDGF 蛋白进行直接的兔静脉内注射和鼠尾静脉内注射, 7 天后, 分离大鼠颈总动脉, 剪断放血至三角烧瓶, 8℃ 倾斜放置过夜, 次日离心收集血清。

[0050] 将收集的血清用 6 倍预冷的 0.01M, pH7.4PB 稀释, 在不断搅拌的同时缓慢加入等体积的饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4℃ 放置 30min, 离心弃上清, 沉淀用 1 倍原体积的 PBS 复容后, 再分别用 1/2 体积的饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 重复沉淀 1 次, 最后沉淀用 3mlPBS 复容, 装入透析袋, 8℃ 对 0.01M, pH7.4PBS 透析除盐, 每隔 6h 换液 1 次, 共 9 次, 在透析平衡结束后, 蛋白液 13000rpm 4℃ 离心 15min, 取上清液, 加至 0.01M, pH7.4PBS 平衡的 Protein A-Sepharose 柱, 流速 0.5ml/min, 流尽后, 用 0.01M, pH7.4 的磷酸盐缓冲液充分洗柱至无蛋白流出为止, 改用 0.1M, pH2.8 甘氨酸盐酸缓冲液洗脱结合的 IgG, 合并洗脱液, 8℃, pH7.4, 0.01M 的磷酸盐缓冲液透析除盐, 每隔 6h 换液 1 次, 共 6 次, 用 MW30000 的聚乙二醇浓缩至 1.5mg/ml, 分装, -20℃ 储存。

[0051] 实施例 4

[0052] 制备时间分辨荧光试剂盒。

[0053] 在固相上结合兔抗 HDGF 多克隆抗体, 鼠抗 HDGF 单克隆抗体作为二抗, 镧族金属元素 Eu 络合生物素形成复合物并标记二抗, 制备时间分辨荧光试剂盒。将用含适量 NaCL 的磷酸盐缓冲液稀释一抗溶液并将其涂布到固相上, 采用 96 孔微量滴度板, 2℃ 孵育 20h 以上, 将一抗固定到固相。用洗涤缓冲液洗涤涂布了一抗的固相表面。洗涤后将固相保存于 -20℃, 直至需要进行测定之前。预先用稀释缓冲液对血液样本进行稀释。涂布于固相上, 35℃ 孵育 2h, 孵育后, 用洗涤缓冲液洗涤固相表面数次。接着用缓冲液稀释的鼠单克隆抗体涂布于固相上, 35℃ 孵育 2h, 孵育后, 用洗涤缓冲液洗涤固相表面数次。生物素与镧族金属离子 Eu 的盐溶液混合, 形成荧光性络合部分。用稀释液稀释络合的结合物后涂布于固相上, 35℃ 孵育 2h, 孵育后, 用洗涤缓冲液洗涤固相表面数次。将由上述步骤得到的含镧族

元素 Eu 的复合物进行固相或液相的时间分辨荧光测定。测定条件为延迟时间约为 0.2 毫秒 ms, 窗口时间约为 0.2ms, 闪烁速度 flash rate 约为 0.5ms, 激发波长为 337.1nm 测定波长为 615nm。

[0054] 在本实施例的另一方面, 将用含适量 NaCL 的磷酸盐缓冲液稀释一抗溶液并将其涂布到固相上, 采用 96 孔微量滴度板, 6℃ 孵育 20h 以上, 将一抗固定到固相。用洗涤缓冲液洗涤涂布了一抗的固相表面。洗涤后将固相保存于 -20℃, 直至需要进行测定之前。预先用稀释缓冲液对血液样本进行稀释。涂布于固相上, 39℃ 孵育 2h, 孵育后, 用洗涤缓冲液洗涤固相表面数次。接着用缓冲液稀释的鼠单克隆抗体涂布于固相上, 39℃ 孵育 2h, 孵育后, 用洗涤缓冲液洗涤固相表面数次。生物素与镧族金属离子 Eu 的盐溶液混合, 形成荧光性络合部分。用稀释液稀释络合的结合物后涂布于固相上, 39℃ 孵育 2h, 孵育后, 用洗涤缓冲液洗涤固相表面数次。将由上述步骤得到的含镧族元素 Eu 的复合物进行固相或液相的时间分辨荧光测定。测定条件为延迟时间约为 0.3 毫秒 ms, 窗口时间约为 0.6ms, 闪烁速度 flash rate 约为 1.5ms, 激发波长为 337.1nm 测定波长为 615nm。

[0055] 因此, 籍由本发明涉及的肝癌衍生生长因子检测试剂盒及其制备方法, 可以有效解决其它检测方法检测过程繁琐, 检测灵敏度和重复性差的问题, 制备简便, 操作流程短, 检测重复性好、灵敏度高, 无放射性。

[0056] 上文中描述了本发明的具体实施方式。但是, 在本领域中的普通技术人员能够理解, 不偏离本发明的精神和范围的情况下, 还可以对本发明的具体实施方式作各种变更和替换。这些变更和替换都落在本发明权利要求书限定的范围内。

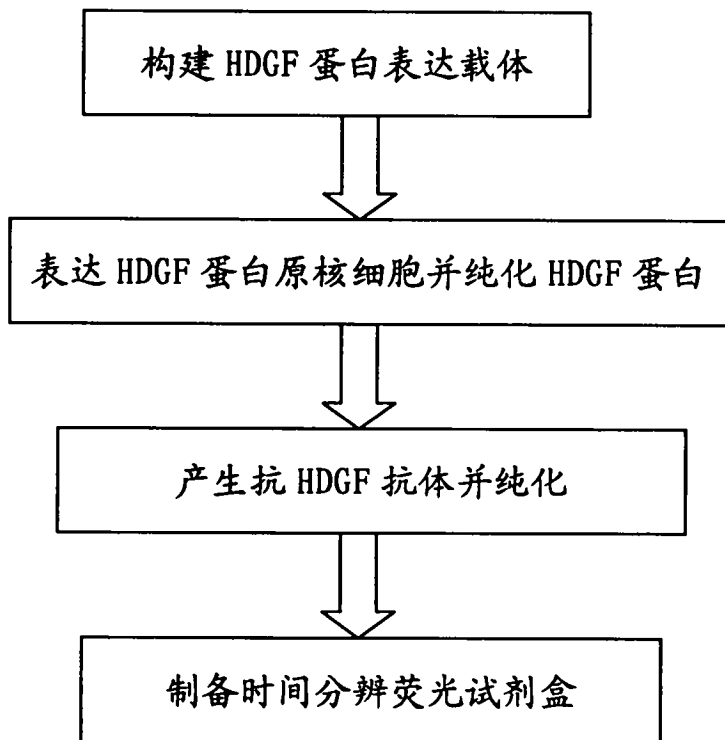


图 1

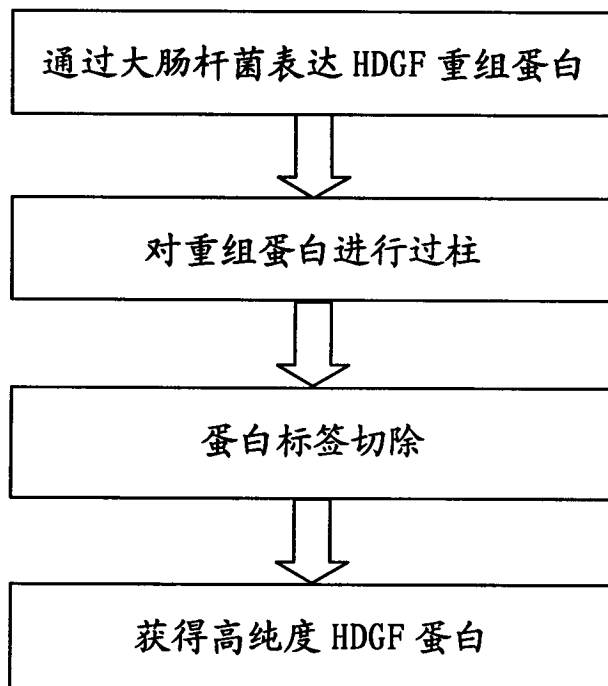


图 2

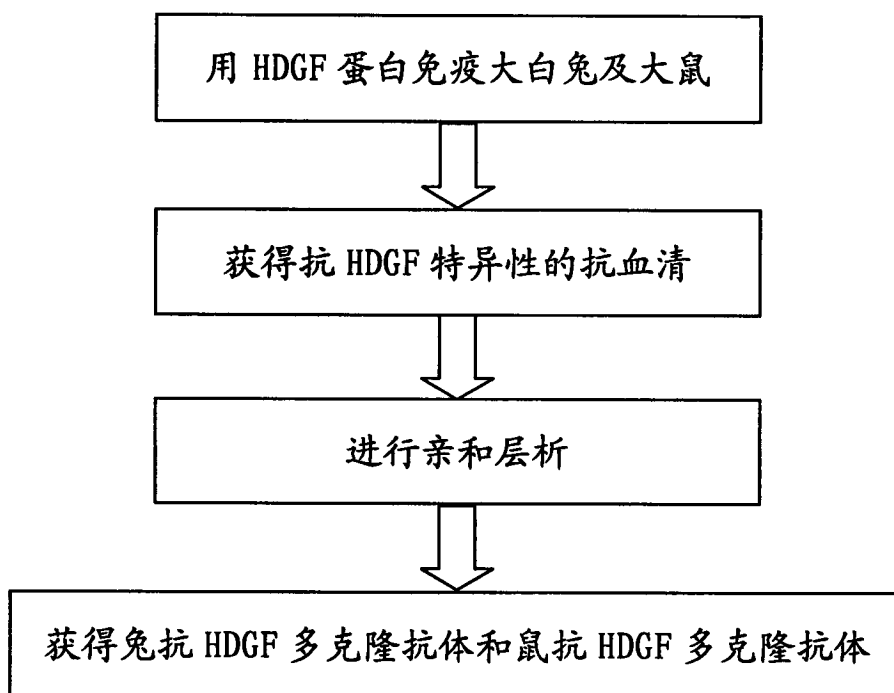


图 3

专利名称(译)	一种肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备方法		
公开(公告)号	CN103245787B	公开(公告)日	2016-01-20
申请号	CN201210022243.6	申请日	2012-02-01
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	毛建山 纪小微 朱永良		
发明人	毛建山 纪小微 朱永良		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/532		
审查员(译)	李倩		
其他公开文献	CN103245787A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备方法，包括构建肝癌衍生生长因子HDGF蛋白的表达载体；表达HDGF蛋白原核细胞；产生抗HDGF抗体并纯化；制备时间分辨荧光试剂盒。肝癌衍生生长因子检测试剂盒包括兔抗HDGF多克隆抗体及用镧族金属元素Eu标记的鼠抗HDGF单克隆抗体，其中，鼠抗HDGF单克隆抗体作为二抗。采用本发明的肝癌衍生生长因子检测试剂盒的制备方法，制备简便、操作流程短，检测重复性好、灵敏度高、无放射性。

