

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410056983.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/547 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007年5月16日

[11] 授权公告号 CN 1316249C

[22] 申请日 2004.8.25

[21] 申请号 200410056983.7

[73] 专利权人 北京健平九星生物医药科技有限公司

地址 100085 北京市上地信息路26号中关村创业大厦719室

[72] 发明人 邹检平

[56] 参考文献

WO0064946A2 2000.11.2

CN1260492A 2000.7.19

CN1420987A 2003.5.28

审查员 辜学英

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 周长兴

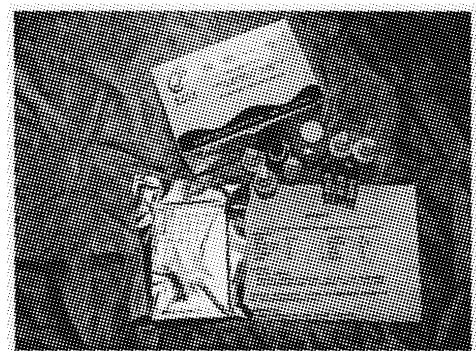
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

[54] 发明名称

一种酶联检测试剂盒及制备方法

[57] 摘要

一种检测人血管内皮细胞生长因子(VEGF)的酶联检测试剂盒,试剂盒盒体内包括:从昆虫细胞表达纯化的VEGF受体包被的酶联反应板、辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗体加保护剂配置的酶结合物、作为阳性对照的VEGF蛋白的冻干粉、作为阴性对照蛋白冻干粉、样品稀释液、PBST浓缩漂洗液、3,3',5,5'-四甲基联苯胺配置的显色底物、作为终止液的 $2\text{MH}_2\text{SO}_4$ 、封板胶纸。本试剂盒可用于癌症、心血管病、糖尿病或其他某些疾病患者的诊断和预后,具有准确、特异、灵敏、稳定、方便等优点。同时,本发明还提供了运用昆虫细胞高效表达外源蛋白的方法。



1. 一种酶联检测试剂盒，其组成为：

酶联板、阳性对照、阴性对照、样品稀释液、酶联物、浓缩洗涤液、显色剂 A、显色剂 B、双蒸水、终止液和封板胶纸；

其中：

酶联板为血管内皮细胞生长因子能特异性结合的 VEGF 受体包被酶联板；

阳性对照为血管内皮细胞生长因子蛋白冻干粉；

阴性对照为动物血清冻干粉；

样品稀释液：0.05%吐温-20、1% 牛血清白蛋白、10mM 乙二胺四乙酸二钠、0.05%硫柳汞、0.4M NaCl、pH6.5；

酶联物为辣根过氧化物酶标记血管内皮生长因子多克隆抗体；

浓缩洗涤液：137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na₂HPO₄、2mM KH₂PO₄、0.05% 吐温-20，pH 7.4；

显色剂 A、显色剂 B，其中显色剂 A 为 H₂O₂ 溶液，显色剂 B 为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液；

双蒸水

终止液为 2M H₂SO₄。

2. 根据权利要求 1 的试剂盒，其特征在于，各物质的量以酶联板的孔数为标准。

3. 根据权利要求 1 的试剂盒，其特征在于，所述酶联板为 96 孔。

4. 根据权利要求 1 所述试剂盒的制备方法，主要步骤为：

(a)将基因工程表达的血管内皮细胞生长因子受体包被于固体支持物酶联反应板上；

(b)用封闭液封闭；

(c)将生物标本加入到预包装的酶联反应板反应孔中，生物标本中的血管内皮细胞生长因子特异地与血管内皮细胞生长因子受体结合；

(d) 用血管内皮细胞生长因子多克隆抗体检测血管内皮细胞生长因子；

(e)显色底物为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺。

5. 根据权利要求 4 的方法,其特征在于,步骤 a 所述的基因工程受体用昆虫细胞表达。

6. 根据权利要求 5 的方法,其特征在于,所述昆虫细胞为 sf9、sf12、sf158 或 c127 细胞株。

7. 根据权利要求 5 的方法,其特征在于,所述昆虫细胞表达的基因工程受体用 Ni 柱纯化。

8. 根据权利要求 4 的方法,其特征在于,步骤 c 所述的生物标本为癌症患者、血管病患者的血清、血浆、脑脊液、唾液、组织提取液或尿液。

9. 根据权利要求 4 的方法,其特征在于,步骤 d 所述的血管内皮细胞生长因子多克隆抗体用的血管内皮细胞生长因子用昆虫细胞表达并用 Ni 柱纯化。

10. 根据权利要求 4 的方法,其特征在于,步骤 d 中所述的多克隆抗体是用血管内皮细胞生长因子免疫家兔所得。

11. 根据权利要求 4 的方法,其特征在于,步骤 d 中所述多克隆抗体用辣根过氧化物酶标记。

一种酶联检测试剂盒及制备方法

技术领域

本发明属于生物医药技术领域，具体地说涉及一种检测人血管内皮细胞生长因子(VEGF)的酶联检测试剂盒。

本发明还涉及上述试剂盒的制备方法。

背景技术

肿瘤的发展和转移是多阶段的、复杂的、具有高度选择性的过程，涉及肿瘤细胞与宿主之间错综复杂的关系，其机理尚不甚清楚。近年来关于新的血管生成与肿瘤发展、转移和预后关系的研究进展迅速，证明新的血管生成(Angiogenesis)是肿瘤生长、转移和转移灶生长的必要条件，而血管内皮细胞生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)是调节新血管生成的最重要的细胞因子。

在牛垂体滤泡星状细胞体外培养液中首先分离纯化出一种肝素结合因子(Ferrara 等, *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 161 (2) :851 - 855), 因它能特异作用于血管内皮细胞, 引起血管内皮细胞增殖, 并在体内诱导血管生成, 故称之为血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor VEGF), 又因其能增加微血管通透性, 又称之为血管渗透因子(Vascular Permeability Factor, VPF)。它是目前发现的最强烈的血管通透性因子, 作用比组胺强 50000 倍。

随后在鼠垂体前叶肿瘤细胞系 AtT20、人单核细胞、豚鼠瘤、鼠神经胶质瘤细胞系等细胞培养液中也纯化出了 VEGF 蛋白。已证实 VEGF 是唯一对血管形成具有特异性的重要生长因子, 其他生长因子如成纤维细胞生长因子、血小板衍生性生长因子等能作用于包括血管内皮细胞在内的多种细胞, 是不具特异性的。研究表明血管内皮细胞生长因子在血管系统的发育分化中具有不可替代的作用(Ferrara et al. *Endocr. Rev.* 1997, 18:4-25)。

VEGF 是一个分子量为 45KD 的高度糖基化的碱性蛋白，由两个相同亚单位通过二硫键结合形成，等电点为 8.5，有很强的耐热和耐酸能力。它是血小板源生长因子(PDGF)家族的一个成员，可由一些正常细胞产生和分泌，也可由多种肿瘤细胞产生。人类 VEGF 基因位于染色体的 6p21.3 (Vincenti,V.et al,Circulation 93,1493-1495,1996)，全长 28kb，编码 VEGF 的基因长约 14kb，由 8 个外显子和 7 个内含子交替构成。VEGF 不同的亚型由该基因不同的剪接方式形成。人 VEGF 基因经编码后即经过转录水平剪接成 5 种不同的转录子(异构体)，分别为 VEGF206、VEGF189、VEGF165、VEGF145、VEGF121。异构体之间功能上的差异表现为它们与细胞表面和细胞外基质中肝素结合活性不同。胎盘生长因子(PLGF)是从人胎盘中克隆到的，与 VEGF 在氨基酸水平上有 53%的同源性，也被认为是 VEGF 生长因子家族中的一员，但是 PLGF 仅限于在胎盘中表达 (Maglione D et al. PNAS USA, 1991,88:9267)。

VEGF 高亲和力结合位点仅位于血管内皮细胞上的 3 种 VEGF 受体，即 VEGFR-1(Flt-1)，VEGFR-2(Flk-1/ KDR)和 VEGFR-3(Flt-4)，这 3 种受体主要分布于血管内皮细胞表面，由含 7 个免疫球蛋白样结构的细胞外区、膜区及酪氨酸激酶区组成，均是跨膜受体，属于 RTK(receptor tyrosine kinase)III 型，其共同特点是催化域内有酪氨酸激酶插入区，该酪氨酸激酶的活性通过受体和配体结合而激活，由受体磷酸化而引起细胞内许多酶和其他反应，在细胞的生长和分化中起重要作用。研究表明，VEGF 受体在体外与 VEGF 有高度的亲和力(Kendall et al. PNAS USA, 1993, 90:10705-9)。

VEGF 是癌症生长、转移所必需的一种因子。目前研究表明，在人类各种恶性肿瘤(即癌症)疾病中，VEGF 的分泌增加有着普遍性和广泛性，即当人体内有恶性肿瘤生长时，VEGF 分泌就会大大增加，并释放进入血液循环。有大量文献报道，VEGF 在正常人和癌症患者中的浓度明显不同，正常人中的 VEGF 浓度很低或检测不到，而在癌症患者中 VEGF 浓度很高。因此，检测人血液中 VEGF 浓度，能够用于癌症的早期普查诊断。另一方面，VEGF 在人体血液中的浓度随肿瘤的消长情况而变化。肿块大、生长快时，VEGF 的血液浓度就高；而当肿瘤因化疗或手术“临

床治愈”时，VEGF 的血液浓度降低。故 VEGF 的检测可作为疗效观察和预后的指标。VEGF 是恶性肿瘤诊断中的一个重要组成部分。另外，血液 VEGF 水平增高亦见于糖尿病、血管炎症性疾病、某些免疫性疾病和妊娠等。

Yeo et al.(Clin. Chem. 1992,38:71)报道了以免疫荧光为基础的检测 VEGF 的 ELISA 方法，但其检测灵敏度较低。Houck et al.(J Biol. Chem. 1992,267:26031)报道了以比色法为基础的检测 VEGF 的 ELISA 方法，但其检测敏感度仅为 ng/ml。Hanatani et al.(Biosci. Biotechnol. Biochem. 1995,59:1985)报道了测定 VEGF 的化学发光 ELISA，测定正常人中的血清 VEGF 水平为 8-36ng/l。

发明内容

本发明的目的是提供一种酶联检测人血管内皮细胞生长因子(VEGF)的试剂盒。该试剂盒结果准确稳定、特异性强、灵敏度高、使用方便、便于推广。

本发明的另一目的是提供上述酶联检测试剂盒的生产制备及使用方法。

为实现上述目的，本发明提供的试剂盒组成为：

1、酶联板；2、阳性对照(冻干)；3、阴性对照(冻干)；4、样品稀释液；5、酶联物；6、浓缩洗涤液；7、显色剂 A&B；8、双蒸水；9、终止液；10、封板胶纸。

本发明提供的上述试剂盒的制备方法及操作步骤如下：

a)以酶联反应板为固体支持物，将基因工程表达的 VEGF 受体包被于固体支持物上；

b)用封闭液进行封闭

c)将生物标本与固定与酶联反应板上的 VEGF 受体接触和保温，生物标本中的 VEGF 特异地与 VEGF 受体结合；

d)从 VEGF 受体上分离生物标本；

e)用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase HRP)标记的 VEGF 多克隆抗体检测 VEGF，所用显色底物为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)。

本发明试剂盒的独特性在于，它使用 VEGF 受体包被酶联板，能够确保较低水平的 VEGF 能被本试剂盒所检测，能对本标本有更准确的测定。

本试剂盒检测生物标本中的 VEGF，优选来自癌症、血管病病人或者其他疾病病人的标本。

附图说明

图 1：本发明试剂盒盒体及组成成份。

图 2：从昆虫细胞中表达纯化的 VEGF 蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳图。

图 3：从昆虫细胞中表达纯化的 VEGF 受体蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳图。

具体实施方式

下述实施例是为了更详细的解释本发明，但不应理解为本发明局限于此。

实施例 1：

本发明的试剂盒举例可以是下列物质：

- 1) VEGF 受体包被酶联板，以及
- 2) 阳性对照(VEGF 蛋白冻干粉) 1 支；
- 3) 阴性对照(动物血清冻干粉) 1 支；
- 4) 样品稀释液：0.05%吐温-20(Tween-20)，1%牛血清白蛋白(BSA)，10mM 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)，0.05%硫柳汞，0.4M NaCl，pH6.5，1 瓶；
- 5) 酶联物(辣根过氧化物酶标记 VEGF 多克隆抗体) 2 瓶；
- 6) PBST 浓缩洗涤液(137mM NaCl，2.7mM KCl，10mM Na₂HPO₄，2mM KH₂PO₄，0.05% Tween-20，pH 7.4) 1 瓶；
- 7) 显色剂 A&B，其中 A 液为 H₂O₂ 溶液，B 液为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)溶液 各 1 瓶；
- 8) 双蒸水 1 瓶；
- 9) 终止液(2M H₂SO₄) 1 瓶；
- 10) 封板胶纸 2 张；

本例所述的各种物质量均以酶联板为 96 孔（12 条 8 孔或 8 条 12 孔）的例子计算的，如果酶联板的孔数多于或少于 96 孔，则各物质的量也相应或多或少。

该试剂盒外观可参阅图 1 所示。

其制备方法：

1) VEGF 基因和 VEGF 受体基因的克隆

以人胎盘 cDNA 文库为模板进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)反应。依据 VEGF 基因的报道序列设计引物，PCR 反应条件：94℃变性 40 秒，52℃退火 1 分钟，72℃延伸 1 分钟，30 个循环后 72℃保温 10 分钟。依据 VEGF 受体基因的报道序列设计引物，PCR 反应条件：94℃变性 40 秒，52℃退火 1 分钟，72℃延伸 2 分钟，30 个循环后 72℃保温 10 分钟。

反应体系：ddH ₂ O	20.0 μl
10×Buffer	2.5 μl
dNTP (10mM)	0.5 μl
3'primer(100ng/μl)	0.5 μl
5'primer(100ng/μl)	0.5 μl
Taq 酶(5U/μl)	0.5 μl
模板 DNA	0.5 μl
总体积	25 μl

凝胶电泳回收 PCR 扩增的片段，克隆到载体 pMT18-T 中，转化大肠杆菌 DH5α，提取重组质粒进行酶切鉴定。VEGF 基因的重组质粒命名为 pMT18-1，VEGF 受体基因的重组质粒命名为 pMT18-2。DNA 序列分析由上海博亚生物工程有限公司完成。

2) 昆虫表达载体的构建

用 Sall、BamHI 分别酶切质粒 pMT18-1 和 pMT18-2，分别回收 VEGF 基因片段和 VEGF 受体基因片段。同时用 Sall、BamHI 酶切质粒 pFastBac-HT，回收 4.7kb 片段。将 VEGF 基因片段和 VEGF 受体基因片段分别与 4.7kb 片段进行连接，构建载体 pFastBac-1 和 pFastBac-2。用不同的限制性内切酶进行酶切鉴定，表明所构建载体正确。

分别将载体 pFastBac-1 和 pFastBac-2 转化 DH10Bac 感受态细胞。采用蓝白斑筛选，24 小时后将白斑划到新平板上，确认其是否白斑。将菌落挑到 2ml LB 培养基中，37°C，250rpm 振荡培养 12 小时。

提取培养的菌液中的质粒方法如下：

a1)将 1.5ml 菌液转入离心管中，10,000rpm 离心 30s，弃上清，将离心管倒立于纸巾上，使细菌沉淀尽可能干燥；

b1)加 300 μ l 溶液 I(50mM 葡萄糖，25mM Tris-HCl，10mM EDTA，pH8.0)，在振荡器上震荡混匀；

c1)加 300 μ l 现配的溶液 II(0.2N NaOH，1% SDS)，混匀，室温放置 5 分钟；

d1)加 300 μ l 预冷的溶液 III(5M KAc，pH5.5)，冰预 5min；

e1)12,000rpm 离心 15min；

f1)转移上清至一新离心管中，加 2 倍体积的无水乙醇，混匀；

g1)10,000~12,000rpm 离心 10min；

h1)用 70%和无水乙醇洗涤沉淀；

i1)吹干，溶于 50 μ l 加 RNase 的 TE(10mMTris-HCl；1mMEDTA，pH8.0)中，于 37°C 放置一小时，置于 -20°C 备用。

对提取的质粒进行 PCR 鉴定，PCR 反应依据前述的方法。

3)转染昆虫细胞(以 sf9 细胞为例，但不仅限于 sf9 细胞，采用 sf21、sf158 或 c127 细胞株都可以得到相同的效果，在此不一一叙述)。

sf9 细胞培养于 Grace 培养液中，添加 15%胎牛血清、青霉素 50U/ml、链霉素 50ug/ml，转染方法如下：

a2)转染前一天将细胞分到 24 孔板；

b2)转染前 2 小时，更换新鲜无血清、无双抗培养液，洗一次，然后加入 500ul 培养液；

c2)在 50ul 无血清、无双抗培养液中分别加入 2ul 脂质体、5ul 前述的重组质粒，室温放置 5 分钟，将质粒加入到脂质体中，室温放置 20 分钟；

e2)将上一步骤的混合物加到细胞中，27°C 培养；

f2)转染 4 小时后，吸掉培养液，加入 1ml 新鲜有血清、有双抗 Grace

培养液，27℃培养 72 小时；

g2)转染 72 小时后，观察是否有出毒迹象；

h2)将有杆状病毒上清感染新 sf9 细胞。

4)昆虫表达蛋白的纯化(Ni 柱吸附法)

a3))Ni 柱的准备

i)取 1ml Ni-NTA 到一离心管中，1500g 离心 5 分钟；

ii)去掉上清，将 Ni-NTA 用 1 倍体积的洗涤缓冲液(20mM Tris-HCl, 500mM KCl, 20mM 咪唑, 2mM 巯基乙醇, 10%甘油, pH8.5)重悬；

iii)将重悬液到入柱中，用 5-10 倍体积的 wash buffer 平衡。

b3)细胞抽提物的准备

i)500g 离心 5 分钟收集 50ml 细胞；

ii)用裂解缓冲液(50mM Tris-HCl, 100mM KCl, 20mM 咪唑, 5mM 巯基乙醇, 1mM 苯甲基磺酰氟, pH8.5)重悬细胞；

iii)10,000g 离心 10 分钟，将上清液转移到一新管中。

c3)蛋白纯化

i)将上一步骤的上清液加到平衡好的 Ni 柱中；

ii)用 10 倍体积的 buffer A(20mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 20 mM 咪唑, 5 mM 巯基乙醇, 10%甘油, pH8.5)洗柱；

iii)用 2 倍体积的 buffer B(20mM Tris-HCl, 1M KCl, 20 mM 咪唑, 5 mM 巯基乙醇, 10%甘油, pH8.5)洗柱；

iv)用 2 倍体积的 buffer A 洗柱；

v)用 5-10 倍 buffer C(20mM Tris-HCl, 100mM KCl, 100mM 咪唑, 5mM 巯基乙醇, 10%甘油, pH8.5)洗脱，收集洗脱液。

vi)用 SDS-PAGE 胶检测所纯化蛋白的浓度与纯度；检测结果参阅图 2 和图 3 所示。

5)VEGF 多克隆抗体的制备、纯化及标记

用家兔作为免疫动物，先用 5-10mg 卡介苗注射刺激动物。一周后，将 VEGF 蛋白制成福氏完全佐剂，采用皮下多点注射进行第一次免疫。2 周后，进行第二次免疫。2 周后，试血并测效价。如效价偏低，则进行加强免疫。

采集家兔全血，离心取血清。向血清中加入饱和硫酸铵，血清与硫酸铵的体积比为 2:1，使抗体沉淀，离心分离，抗体纯度达 98%以上。

采用戊二醛法将辣根过氧化物酶(HRP)标记到 VEGF 多克隆抗体上。

6)试剂盒的制备

酶联板的包被采用以下步骤：抗原用包被缓冲液稀释一定倍数，每孔加 100ul。37℃水浴或温箱中包被 2 小时，然后放在室温过夜。每孔加满 PBST 洗涤液，放置 30 秒左右，甩干。每孔加 120ul 封闭液，室温放置 2 小时。封闭液配方主要含有 BSA、一些盐类等。甩掉封闭液，拍打除去残余封闭液。超净台上吹干。或超净台上吹数小时，然后室温放置过夜。用真空包装机进行包装。

实施例 2：试剂盒使用方法

1. 从已平衡至室温的密封袋中取出所需板条，其它板条请密封放回 4℃。

2. 留一孔为空白孔，其他各孔加入样品稀释液 100 μl(或 2 滴)。

3. 除空白孔外，加入阴性对照 1 孔、阳性对照 2 孔、血清标本各 100 μl 至相应孔中，轻弹混匀。用封板胶纸封住反应孔，37℃60 分钟。

4. 洗板 3 次：(1)自动洗板机：甩尽孔内液体，要求注入的洗涤液为 350 μl，注入与吸出间隔 15~30 秒，洗板 3 次。(2)手工洗板：甩尽孔内液体，每孔加洗涤液 350 μl，静置 30 秒后甩尽液体，在厚迭吸水纸上拍干，洗 3 次。

5. 除空白孔外，每孔加酶联物 200 μl(或 4 滴)，封住板孔，37℃60 分钟。

6. 洗板 3 次。

7. 显色反应：将显色剂 A、B 液各 100 μl(或 2 滴)加到反应孔(包括空白孔)内，避光室温显色 25 分钟。

8. 终止反应：每孔(包括空白孔)各加终止液 50 μl(或 1 滴)，混匀，测量 450nmOD 值。

本发明具有的优点：

1. 时间短、成本低、制备简单。一般包被物使用单克隆抗体，而单克隆抗体的制备时间长，一般需要 9-12 个月，最快也需要 6-8 个月，费

用较高，而且单克隆抗体的制备较为繁琐；而本发明中，受体作为包被物，通过昆虫细胞表达的基因工程受体的制备仅需3个月左右，成本低，制备较为简单。

2. 结果特异性强。受体与配体的结合具有高度的特异性，本发明中包被物是 VEGF 的受体，而被检物(配体)是 VEGF。而一种蛋白的单克隆抗体由于针对某一抗原决定簇，筛选不完全所制备的单克隆抗体容易与其它蛋白发生交叉反应，相对于受体-配体结合，特异性较低。

3. 灵敏度高。检测灵敏度能达到 ng/L 水平。

4. 稳定。本发明于 4℃ 保藏，有效期达 9-12 个月

5. 方便。本发明操作简便，所需检测仪器(酶标仪)在各大医院和检测中心普遍使用。



图 1

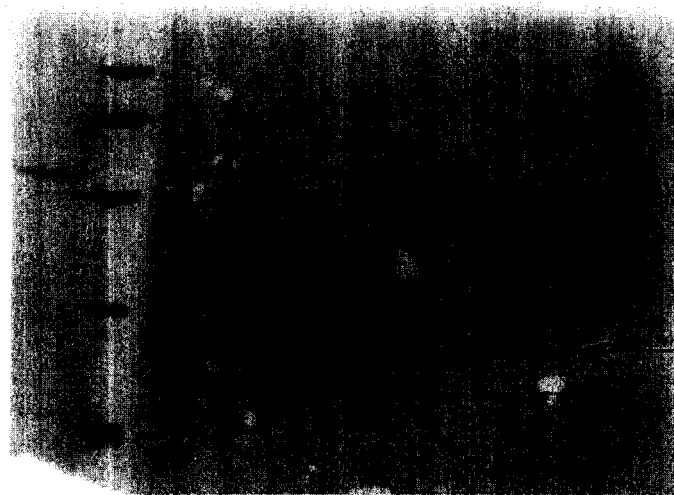


图 2

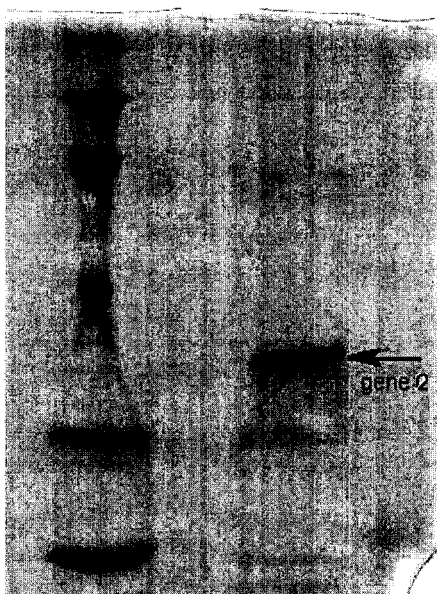


图 3

专利名称(译)	一种酶联检测试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN1316249C	公开(公告)日	2007-05-16
申请号	CN200410056983.7	申请日	2004-08-25
[标]申请(专利权)人(译)	北京健平九星生物医药科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京健平九星生物医药科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京健平九星生物医药科技有限公司		
[标]发明人	邹检平		
发明人	邹检平		
IPC分类号	G01N33/547 G01N33/535 G01N33/52		
代理人(译)	周长兴		
其他公开文献	CN1740793A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测人血管内皮细胞生长因子(VEGF)的酶联检测试剂盒，试剂盒盒体内包括：从昆虫细胞表达纯化的VEGF受体包被的酶联反应板、辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗体加保护剂配置的酶结合物、作为阳性对照的VEGF蛋白的冻干粉、作为阴性对照蛋白冻干粉、样品稀释液、PBST浓缩漂洗液、3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺配置的显色底物、作为终止液的2MH₂SO₄、封板胶纸。本试剂盒可用于癌症、心血管病、糖尿病或其他某些疾病患者的诊断和预后，具有准确、特异、灵敏、稳定、方便等优点。同时，本发明还提供了运用昆虫细胞高效表达外源蛋白的方法。

