



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108614112 A

(43)申请公布日 2018.10.02

(21)申请号 201810515291.6

(22)申请日 2018.05.25

(71)申请人 北京迈迪金生物科技股份有限公司

地址 100023 北京市大兴区经济技术开发区永昌北路3号1幢711单元1层和3层

申请人 北京中达健科生物科技有限公司

(72)发明人 李翀 赵文博 杨昭 康星 张旭

朱学加 王建华

(74)专利代理机构 北京知呱呱知识产权代理有

限公司 11577

代理人 李芙蓉 孙进华

(51)Int. Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

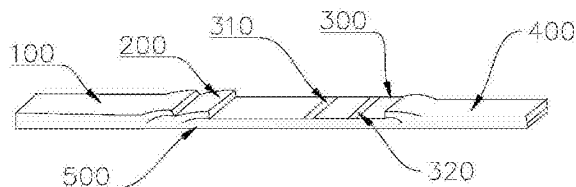
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种胶体金法半定量检测人转铁蛋白受体CD71检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种胶体金法半定量检测人转铁蛋白受体CD71检测试剂盒,其包括:底板、吸水纸、NC膜、结合垫以及样品垫,所述NC膜位于所述底板上,所述结合垫的一部分贴合于所述NC膜的一端,所述样品垫位于所述结合垫上部,所述吸水纸一部分与所述NC膜的另一端贴合,所述结合垫上包被有胶体金标记的CD71单克隆抗体,所述NC膜上分别设有检测线和质控线,所述检测线上包被有ABC71单克隆抗体,所述质控线上包被有羊抗鼠IgG。本发明采用双抗夹心侧向层析法,通过针对人转铁蛋白受体的ABC71单克隆抗体作为捕获抗体,以胶体金为标记载体,实现了简单、快速、精准地半定量检测人体液中转铁蛋白受体含量的目的。



1. 一种胶体金法半定量检测人转铁蛋白受体CD71检测试剂盒,其特征在于,所述检测试剂盒包括:底板、吸水纸、NC膜、结合垫以及样品垫,所述NC膜位于所述底板上,所述结合垫的一部分贴合于所述NC膜的一端,所述样品垫位于所述结合垫上部,所述吸水纸一部分与所述NC膜的另一端贴合,所述结合垫上包被有胶体金标记的CD71单克隆抗体,所述NC膜上分别设有检测线和质控线,所述检测线上包被有ABC71单克隆抗体,所述质控线上包被有羊抗鼠IgG。

2. 如权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,

所述胶体金颗粒大小为 $30 \pm 10\text{nm}$ 。

3. 如权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,

所述CD71单克隆抗体的胶体金结合浓度为 $45\text{--}55\mu\text{g/ml}$,最佳标记pH为8.0。

4. 如权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,

所述ABC71单克隆抗体的包被浓度为 $1\text{--}4\mu\text{g/cm}$ 。

5. 如权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,

所述山羊抗小鼠IgG的包被浓度为 $1\mu\text{g/cm}$ 。

6. 如权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,

所述检测试剂盒还包括比色卡,所述比色卡上显示有对应的检测线显示颜色的深浅度,其对应的检测样品中含有CD71抗体浓度的范围为 $0.5\text{--}8\text{mg/L}$ 。

7. 如权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,

所述胶体金的通过以下方法制备:量取0.01%的氯金酸水溶液100ml搅拌加热煮沸,然后迅速加入2ml的1%的枸橼酸三钠溶液,持续煮沸5-10min,直到溶液变为橙红色。

8. 如权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,

所述胶体金标记的CD71单克隆抗体通过以下方法制的:

取胶体金溶液,用0.2M的碳酸钾溶液调节 $\text{pH}=8.0$,按照抗体:胶体金= $50\mu\text{g}:1\text{ml}$ 的比例加入CD71单克隆抗体,室温搅拌20min,然后加入10%胶体金溶液至终浓度0.5%,搅拌10min,离心去上清,沉淀采用同体积复溶液复溶。

9. 如权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,

所述复溶液体复溶液的成分为50mM PB缓冲液, $\text{pH}8.0$ 、0.5%BSA、5%蔗糖、2%吐温、0.05%叠氮钠。

一种胶体金法半定量检测人转铁蛋白受体CD71检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫层析法生物技术检测技术领域,具体涉及一种胶体金法半定量检测人转铁蛋白受体CD71检测试剂盒。

背景技术

[0002] 转铁蛋白受体(TfR)是细胞膜转运蛋白,广泛地存在于人的多种细胞膜上,如胎盘绒毛滋养层合体细胞、合成Hb的幼红细胞以及活跃的肿瘤细胞等。TfR分为2种亚型,即TfR1和TfR2。TfR1是一种介导细胞内铁摄取并能调节细胞生长相关的II型跨膜蛋白,由完全相同的2条单体通过第89和92位上的胱氨酸残基形成的两条二硫键连接而成。每条单体含780个氨基酸残基,分子量90kD,分为3个区域,N端的61个氨基酸残基处于细胞内,C端的671个氨基酸残基处于细胞外,中间的28个氨基酸氨基为跨膜区。其C端区域为外功能区,包含3个N糖基化位点和1个O糖基化位点,同TF介导的胞内转运是细胞获得铁元素的重要方式。

[0003] TfR2则主要表达于肝脏,N端的80个氨基酸组成胞内区,24个氨基酸组成跨膜区,C端的696个氨基酸残基组成胞外区。其胞外区与TfR1氨基酸序列45%一致,66%同源。

[0004] 实际测定的是人体液中的可溶性TfR,即sTfR。sTfR分子量75kD,是由TfR1胞外区的100-101氨基酸之间的肽键断裂形成,胞外分泌后与Tf结合,与TfR1保持一定比例,主要分布于人的血液中,分泌物(如唾液)及排泄物中(如尿液、粪便)也含有少量。

[0005] 可溶性转铁蛋白受体sTfR目前主要用于人缺铁性疾病的判断,其含量的多少直接反映了人体内铁含量的缺乏或过剩,对于区分贫血病人是缺铁性贫血或其他慢性疾病引起的贫血以及人体内红细胞生成的评价有一定参考意义。

[0006] 并且,癌细胞的生成经常伴随着TfR大量的表达,因此sTfR的含量检测能为某些癌症的早期诊断提供辅助依据。目前经临床研究,鼻咽癌、肝癌、血液系统肿瘤以及乳腺癌、胃癌、膀胱癌等大多数恶性肿瘤病人都伴随有TfR的大量表达,其含量直接预示了肿瘤细胞的增殖活性。由于转铁蛋白受体与肿瘤细胞存在密切关系,目前其用于癌症的辅助诊断和作为载体用于癌症的治疗成为研究热点。

[0007] 目前市面上用来测定sTfR含量的试剂盒不在少数,但一般局限在酶联免疫吸附法、免疫比浊法等。酶联免疫法虽有较好的线性和灵敏度,但操作过程烦琐,整个检测过程至少需要4小时以上的时间,对检测样品数量也有最低要求;免疫比浊法则对抗原与标记物形成的分子量及数量有一定的要求,否则比较难以测定。

[0008] 由此可见,传统的检测方法检测时间长,操作过程复杂,检测的准确度低,亟待进一步改进。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供一种胶体金法半定量检测人转铁蛋白受体CD71检测试剂盒,用以解决现有检测试剂盒操作时间长,操作过程复杂,检测准确度低的缺陷。

[0010] 为实现上述目的,本发明提供一种胶体金法半定量检测人转铁蛋白受体CD71检测试剂盒,其包括:底板、吸水纸、NC膜、结合垫以及样品垫,所述NC膜位于所述底板上,所述结合垫的一部分贴合于所述NC膜的一端,所述样品垫位于所述结合垫上部,所述吸水纸一部分与所述NC膜的另一端贴合,所述结合垫上包被有胶体金标记的CD71单克隆抗体,所述NC膜上分别设有检测线和质控线,所述检测线上包被有ABC71单克隆抗体,所述质控线上包被有羊抗鼠IgG。

[0011] 优选的,所述胶体金颗粒大小为 $30 \pm 10\text{nm}$ 。

[0012] 优选的,所述CD71单克隆抗体的胶体金结合浓度为 $45\text{--}55\text{ug/ml}$,最佳标记pH为8.0。

[0013] 优选的,所述ABC71单克隆抗体的包被浓度为 $1\text{--}4\text{ug/cm}$ 。

[0014] 优选的,所述山羊抗小鼠IgG的包被浓度为 1ug/cm 。

[0015] 优选的,所述检测试剂盒还包括比色卡,所述比色卡上显示有对应的检测线显示颜色的深浅度,其对应的检测样品中含有CD71抗体浓度的范围为 $0.5\text{--}8\text{mg/L}$ 。

[0016] 优选的,所述胶体金的通过以下方法制备:量取0.01%的氯金酸水溶液100ml搅拌加热煮沸,然后迅速加入2ml的1%的枸橼酸三钠溶液,持续煮沸5-10min,直到溶液变为橙红色。

[0017] 优选的,所述胶体金标记的CD71单克隆抗体通过以下方法制的:

[0018] 取胶体金溶液,用0.2M的碳酸钾溶液调节 $\text{pH}=8.0$,按照抗体:胶体金 $=50\text{ug}:1\text{ml}$ 的比例加入CD71单克隆抗体,室温搅拌20min,然后加入10%胶体金溶液至终浓度0.5%,搅拌10min,离心去上清,沉淀采用同体积复溶液复溶。

[0019] 优选的,所述复溶液体复溶液的成分为50mM PB缓冲液, $\text{pH}8.0$ 、0.5%BSA、5%蔗糖、2%吐温、0.05%叠氮钠。

[0020] 本发明具有如下优点:

[0021] 本发明采用双抗夹心侧向层析法,通过针对人转铁蛋白受体的ABC71单克隆抗体作为捕获抗体,以胶体金为标记载体,实现了简单、快速、精准地半定量检测人体液中转铁蛋白受体含量的目的。可以半定量地检测人血清或其他样本中的CD71含量。本发明的检测试剂盒结构简单、快速、准确地半定量测定人体液中转铁蛋白受体含量的基于胶体金免疫层析技术的检测试剂盒。其具有灵敏度高,特异性好的优点。

附图说明

[0022] 图1本发明胶体金法半定量检测人转铁蛋白受体CD71检测试剂盒的结构示意图。

[0023] 图2本发明胶体金法半定量检测人转铁蛋白受体CD71检测试剂盒的标准比色卡。

具体实施方式

[0024] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0025] 实施例1

[0026] 如图1所示,本发明的胶体金法半定量检测人转铁蛋白受体CD71检测试剂盒,本试剂盒采用的检测方法学为双抗夹心法,将ABC71小鼠单抗捕获抗体,将商品化的CD71小鼠单抗作为检测抗体,羊抗鼠IgG作为质控抗体。其包括:PVC底板500、吸水纸400、NC膜300、结合

垫200以及样品垫100,NC膜300位于底板500上,结合垫200的一部分贴合于NC膜500的一端,样品垫100位于结合垫200上部,吸水纸400一部分与NC膜300的另一端贴合,结合垫200上包被有胶体金标记的CD71单克隆抗体,结合垫200由胶体金标记的CD71单克隆抗体(Abcam, ab1086)均匀喷于聚酯膜材料烘干而成;NC膜300上分别设有检测线310和质控线320,检测线310上包被有ABC71单克隆抗体,ABC71单克隆抗体的包被浓度为1-4ug/cm。质控线320上包被有羊抗鼠IgG,羊抗小鼠IgG的包被浓度为1ug/cm,检测线310位于靠近结合垫200的一端,质控线320位于靠近吸水垫400的一端。本发明的检测试剂盒结合ABC71单克隆抗体作为捕获抗体,具有良好的特异性和较高的灵敏度,具有方便、快速、经济实用的优点。

[0027] 其中,样品垫100采用硼酸盐缓冲液、吐温、牛血清白蛋白的混合溶液进行浸泡处理,以增加试剂盒的稳定性和精密度。本发明的检测试剂盒的检测样本采用血清或尿液,可直接上样检测。也可采用唾液或粪便等,但上样前需采用磷酸缓冲液进行稀释离心等预处理步骤,稀释比例为1:2-1:5。样品垫100是将玻璃纤维裁至合适尺寸,采用样品垫处理液浸泡5min后取出,37℃恒温干燥箱过夜烘干后使用。

[0028] 结合垫200是将胶体金标记的CD71采用复溶液稀释2-5倍,3-5ul/cm均匀地喷于聚酯膜,37℃恒温干燥箱烘干2-4小时形成的。NC膜的包被:将NC膜贴至PVC底板的指定区域,然后将ABC71单克隆抗体、羊抗小鼠IgG均采用PBS稀释成2mg/ml和1mg/ml,采用1.0l/cm的划膜速度划于检测线310和质控线320相应的区域,二者间隔5mm,37℃恒温干燥箱过夜烘干。本发明的检测试剂盒将上述制备完成的结合垫200、吸水纸400、样品垫100分别贴合至PVC底板500指定区域,采用斩切机切成宽4mm的试纸条,装至指定卡壳,压壳机压平,装至含有干燥剂的铝箔袋备用。

[0029] 如图2所示,本发明的胶体金半定量检测试剂盒还包括比色卡,比色卡上显示有对应的检测线显示颜色的深浅度,其对应的检测样品中含有CD71抗体,其浓度范围为0.5-8mg/L。

[0030] 其中,本发明的胶体金的通过以下方法制备:量取0.01%的氯金酸水溶液100ml搅拌加热煮沸,然后迅速加入2ml的1%的枸橼酸三钠溶液,持续煮沸5-10min,直到溶液变为橙红色,此时的胶体金颗粒大小为30nm±10nm。胶体金标记的CD71单克隆抗体的制备过程为:取上述制备的胶体金溶液,用0.2M的碳酸钾溶液调节pH=8.0,按照CD71单克隆抗体:胶体金=(45-55)ug:1ml的比例加入CD71单克隆抗体,室温搅拌20min,然后加入10%胶体金溶液至终浓度0.5%,搅拌10min,离心去上清,沉淀采用同体积复溶液复溶。其中,复溶液的成分为50mM PB缓冲液,pH8.0、0.5%BSA、5%蔗糖、2%吐温以及0.05%叠氮钠。

[0031] 实施2本发明的ABC71单克隆抗体的制备和纯化

[0032] ABC71单克隆抗体的详细制备信息已公布于专利号2017106928722的专利申请文件中。

[0033] (1) 杂交瘤细胞的制备

[0034] 1) 动物免疫及细胞培养:将人膀胱癌组织匀浆后提取总蛋白,免疫Balb/C小鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司),按每只小鼠50ug总蛋白的剂量进行腹腔免疫。每隔两周对小鼠再次免疫。小鼠血清效价达到要求后再加强免疫一次,3天后取小鼠脾脏制备成脾细胞悬液,准备进行细胞融合。复苏小鼠骨髓瘤细胞Sp2/0(ATCC CRL-1772),并用8-AG(8氮杂鸟嘌呤)筛选以维持细胞对HAT的敏感性。

[0035] 2) 细胞融合:将步骤1) 制备好的脾细胞悬液与骨髓瘤细胞进行融合,具体方法参照《精编免疫学实验指南》((美国) J.E. 科学根(美国) D.H. 马古利斯等,科学出版社,2009年1月出版)。将融合后细胞悬液加入含有饲养细胞培养基中培养。24小时后,加HAT选择培养基(购自Sigma公司;HAT即H:Hypoxanthine次黄嘌呤,A:Aminopterin甲氨喋呤,T:Thymidine胸腺嘧啶核苷)进行选择培养。

[0036] 3) 抗体检测:通过ELISA方法确定分泌抗体的杂交瘤细胞株。具体方法是:提取膀胱癌组织总蛋白,用0.05mol/L碳酸盐缓冲液(pH9.6) 4℃包被过夜,加入5%牛血清白蛋白(BSA) 37℃封闭3小时。PBST洗涤3次,然后再加入100u1待检上清,37℃孵育1h。洗涤3次,加入辣根过氧化物酶标记的抗小鼠二抗IgG-HRP(购自北京康为世纪生物科技有限公司),37℃孵育1h。洗涤3次,加入50u1 TMB(购自北京中杉金桥生物技术有限公司)显色5min后,加入50u1终止液。用酶标仪读取波长为450nm的OD值。OD值大于阴性对照OD值的2倍以上的视为阳性。

[0037] 4) 杂交瘤的克隆化和冻存:使用有限稀释法将筛选出的阳性杂交瘤细胞进行克隆化培养。经过5轮的克隆化培养,筛选出高效价单克隆抗体的杂交瘤细胞进行扩大培养。

[0038] 本发明中获得的一种阳性杂交瘤细胞株为抗人膀胱癌的单克隆杂交瘤细胞株,该杂交瘤细胞株于2017年7月27日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC,中国,北京),保藏号为CGMCCNo.14312。

[0039] (2) ABC71单克隆抗体的制备和纯化

[0040] 将上述分泌ABC71单克隆抗体的杂交瘤细胞株(保藏号CGMCCNo.14312)扩大培养,并收集细胞培养上清。采用Protein G对ABC71单克隆抗体进行亲和层析纯化。步骤是:首先用磷酸盐缓冲液PBS平衡Protein G亲和层析柱(购自GE公司);然后将含ABC71单克隆抗体的细胞培养上清通过Protein G亲和层析柱;随后用PBS洗涤层析柱,直到流出柱子的洗涤液的OD值接近零;使用0.2mol/L的甘氨酸-HCL溶液(PH2.8)洗脱Protein G亲和层析柱,收集洗脱液,测定OD值。含ABC71单克隆抗体的洗脱液经PBS透析后,于-20℃冻存。

[0041] 本发明中的ABC71单克隆抗体的鉴定:

[0042] 使用本发明制备的ABC71单克隆抗体对人膀胱癌组织和人正常膀胱组织切片进行免疫组化。结果表明,人膀胱癌组织经ABC71单克隆抗体免疫组化染色后呈现阳性反应,而人正常膀胱组织经ABC71单克隆抗体免疫组化染色后呈现阴性反应。本发明制备的ABC71单克隆抗体与人膀胱癌组织呈强阳性反应,而与人正常膀胱组织无交叉反应。

[0043] 表1免疫组化检测抗人膀胱癌ABC71单克隆抗体对人膀胱癌组织与正常膀胱组织的免疫反应

[0044]

组织(癌组织和正常组织)	ABC71抗体
人膀胱癌组织(病人#1)	强阳性(+++)
人正常膀胱组织(病人#1)	阴性(-)
人膀胱癌组织(病人#2)	强阳性(+++)
人正常膀胱组织(病人#2)	阴性(-)
人膀胱癌组织(病人#3)	强阳性(+++)
人正常膀胱组织(病人#3)	阴性(-)

人膀胱癌组织(病人#4)	阳性(++)
人正常膀胱组织(病人#4)	阴性(-)
人膀胱癌组织(病人#5)	强阳性(+++)
人正常膀胱组织(病人#5)	阴性(-)

[0045] 实施例3本发明胶体金免疫层析法半定量检测人转铁蛋白受体CD71的检测试剂盒方法学指标

[0046] 1、本发明胶体金免疫层析法半定量检测试剂盒的灵敏度

[0047] 取一份志愿者血清样本,采用美国R&D公司的Human sTfR Quantikine IVD ELISA Kit测定其CD71含量为20.8nmol/L,即1.52mg/L。我们采用磷酸盐缓冲液将其稀释成1.5mg/L、1.0mg/L、0.5mg/L、0.1mg/L上样测试,结果发现在样品浓度在0.5mg/L时T线显示人眼刚能辨别的微红线,样品浓度0.1mg/L时T线为空白,故本检测试剂盒的检测灵敏度不高于0.5mg/L。

[0048] 2、本发明检测试剂盒结果的判读

[0049] 取一份志愿者血清样本,本发明采用美国R&D公司的Human sTfR Quantikine IVD ELISA Kit测定其CD71单克隆抗体的含量为20.8nmol/L,即1.52mg/L。通过添加空白磷酸盐缓冲液稀释或添加CD71重组抗原,配制成CD71浓度分别为1mg/L、2mg/L、3mg/L、4mg/L、5mg/L、6mg/L、7mg/L、8mg/L的样品进行上样,如图2所示:浓度小于3mg/L时,T线颜色深度小于C线颜色深度;浓度等于4mg/L时,T线颜色深度与C线颜色深度几乎一致;浓度大于4mg/L时,T线颜色深度大于C线;但浓度8mg/L时T线颜色深度却略浅于7mg/L,说明CD71浓度在8mg/L开始出现hook效应。根据不同浓度T线出线的颜色深浅制备了一个颜色比色卡,通过对比T线出线的颜色深浅可直观地大致判断样本中CD71的含量。

[0050] 3、本发明胶体金半定量检测试剂盒的准确性

[0051] 本发明采集了100份不同的人血清样本,采用美国R&D公司的Human sTfR Quantikine IVD ELISA Kit进行定量,测得浓度在1-2mg/L的样本为38份,在2-3mg/L的样本为46份,样本在3-4mg/L的样本有16份。采用本发明检测试剂盒测得的结果为浓度在1-2mg/L的样本为40份,在2-3mg/L的样本为45份,样本在3-4mg/L的样本有15份,具体如表1:

[0052] 表1本发明的检测试剂盒准确性统计结果

[0053]

样本浓度 试剂种类	1-2mg/L	2-3mg/L	3-4mg/L	5-6mg/L
R&D	38	46	16	0
本发明	40	45	15	0
CV (%)	2.56	1.10	3.23	0

[0054] 规定本二者CV值控制在5%以内为可接受范围。通过表格中的结果可以看出,本发明的检测试剂盒的准确性符合要求。

[0055] 本发明的检测试剂盒的精密度,取1份志愿者血清样本,采用美国R&D公司的Human

sTfR Quantikine IVD ELISA Kit测定其CD71含量为19.6nmol/L,即1.43mg/L。参照实施例1中“本发明试剂盒结果的判读”的样本处理方法,制备浓度分别为1.5mg/ml、3.5mg/ml、6.5mg/ml的样本,每个浓度分别对3个批次的检测试剂卡重复检测10次,对比比色卡,核对符合率,结果如表2:

[0056] 表2本发明试剂盒批内、间差统计结果

[0057]

不同浓度血清样本	第一批		第二批		第三批	
	符合	不符合	符合	不符合	符合	不符合
1-2mg/L	10	0	10	0	10	0
3-4mg/L	10	0	10	0	10	0
6-7mg/L	10	0	10	0	10	0

[0058] 本发明通过测试结果显示三个批次检测试剂卡批内精密度及批间精密度均良好,符合测试要求。

[0059] 5、本发明的检测试剂盒的稳定性

[0060] 将本发明的检测试剂盒包装于装有干燥剂的铝箔袋内,取同一批次的检测试剂卡分别置于37℃恒温恒湿培养箱及4℃冰箱中连续放置,同时,另取一部分置于25℃室温放置,以CD71含量3mg/L的血清样本为质控品,每隔7天检测一次,极端情况与室温条件下均连续检测12个月。通过统计结果得知,本发明的检测试剂盒极端条件下放置于室温放置,有效期均在12个月以上。

[0061] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施例对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范畴。

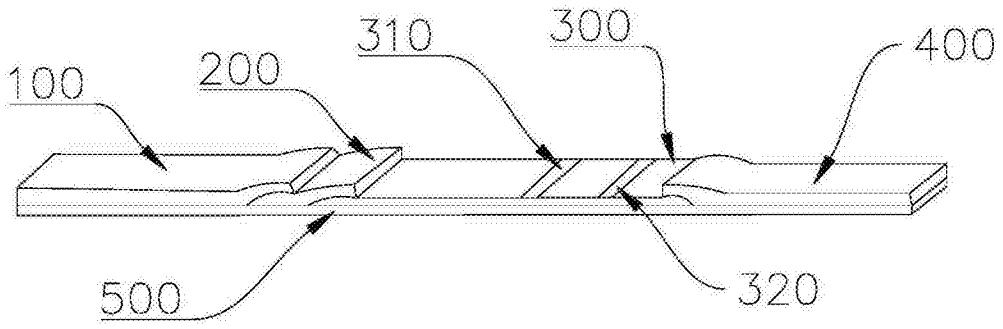


图1

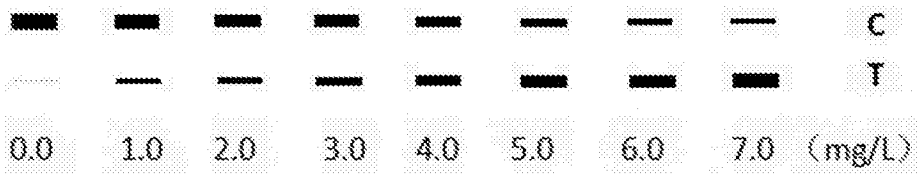


图2