XXXX DOI:

抗人HE4单克隆抗体的制备、纯化及在侧向免疫层析中的应用

杨 展[1],薛孟涵[1],武晋博[1],王志增[2],陈春霞[1]
(1.河南大学抗体药物开发技术国家地方联合工程实验室,开封 475004;
2.重庆大学医学院医学公共实验中心,重庆 401147)

【摘 要】目的:制备抗人附睾蛋白4(human epididymis protein 4,HE4)单克隆抗体,并将其应用于侧向免疫层析(lateral flow immunoassay,LFIA)试剂盒的研制。**方法:**利用HE4重组蛋白作为免疫原进行动物免疫,采用杂交瘤技术筛选HE4融合细胞株,并通过动物体内诱生法大量制备抗人HE4单克隆抗体,并对抗体的亚型、亲和力、特异性等进行评价。将制备出的抗体应用于胶体金LFIA试剂盒,通过检测灵敏度、特异性等指标评价其应用价值。**结果:**成功筛选了3株杂交瘤细胞(3F7、3E5、5F10)并制备出抗人HE4单克隆抗体,与HE4的亲和力依次为252 pM、89 pM、104 pM;抗体与CA125、AFP、CEA、CYFRA21-1、CA72-4、BSA、HCG均没有交叉反应。3F7和3E5抗体的亚型是IgG2b,5F10抗体的亚型IgG1型。成功应用至LFIA试剂盒的检测限为100 pmol/L,特异性良好。**结论:**以人HE4重组蛋白为免疫原制备出三种具有高亲和力和良好特异性的抗人HE4单克隆抗体,并成功建立了胶体金LFIA试剂盒用于人血清HE4检测,为卵巢癌早期快速检测奠定基础。

【关键词】人附睾蛋白4;单克隆抗体;蛋白纯化;杂交瘤细胞;侧向免疫层析
【中图分类号】R392.11 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2025-06-27

Preparation and purification of anti-human epididymis protein-4 monoclonal antibody and its application in lateral flow immunoassay

Yang Zhan[1], Xue Menghan[1], Wu Jinbo[1], Wang Zhizeng[2], Chen Chunxia[1]
(*1.Joint National Laboratory for Antibody Drug Engineering, Henan University;*
2.Department of Laboratory Medicine, School of Medicine, Chongqing University)

【Abstract】*Objective*: To prepare anti-human epididymis protein-4(HE4) monoclonal antibody, and to apply it in the development of lateral flow immunoassay(LFIA) kit. ***Methods*:** Animal immunization was conducted using the recombinant protein of HE4 as the immunogen, and the hybridoma technique was used to obtain hybridoma cell lines secreting anti-HE4 antibodies. *In vivo* animal induction was performed to prepare anti-human HE4 monoclonal antibodies in large quantities, and the antibodies were evaluated in terms of subtypes, affinity, and specificity. The antibodies prepared were used to develop colloidal gold LFIA kit, and the application value of the kit was assessed based on the indicators such as sensitivity and specificity. ***Results*:** Three hybridoma cell lines(3F7, 3E5, 5F10) were successfully screened, and anti-human HE4 monoclonal antibodies were prepared. The affinities between the three cell lines and HE4 were 252 pM, 89 pM, and 104 pM, respectively. The antibodies showed no cross-reactivities with CA125, AFP, CEA, CYFRA21-1, CA72-4, BSA, and HCG. The subtypes of 3F7 and 3E5 antibodies were IgG2b, and the subtype of 5F10 antibody was IgG1. The LFIA kit using these antibodies had a limit of detection of 100 pmol/L, with good specificity. ***Conclusion*:** Three anti-HE4 monoclonal antibodies with high affinity and good specificity are prepared using human HE4 recombinant protein as the immunogen, and a colloidal gold LFIA kit is successfully developed for the detection of human serum HE4, which lays a foundation for early and rapid identification of ovarian cancer.

【Key words】human epididymis protein-4; monoclonal antibody; protein purification; hybridoma cells; lateral flow immunoassay

人附睾蛋白4(Human epididymis protein 4,HE4)是一种肿瘤研究领域备受瞩目的可溶性标志物,最早发现于人远端附睾上皮细胞[1]。HE4在正常人体中表达量很低,但在肿瘤患者的组织、外周血、血清等中高表达[2],是肿瘤诊断和监测的关键指标。HE4是自CA125以来最先被美国食品和药物管理局批准作为卵巢癌早期诊断的肿瘤标志物。相较于CA125,HE4在早期卵巢癌诊断中展现出更高的灵敏度,特别是在绝经前女性卵巢癌的诊断上,HE4的优势更为明显,能够有效提高早期卵巢

作者介绍:杨 展,Email:Yzemail@henu.edu.cn,
研究方向:单克隆抗体的制备及应用研究。
通信作者:陈春霞,Email:ccxchem@163.com。

癌的检出率，为患者争取宝贵的治疗时间[3-4]。研究发现，HE4不仅在卵巢癌中高表达，而且在胃癌、肺癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤中也异常升高，为肿瘤的早期发现、病情评估和预后判断提供了丰富的信息，在肿瘤筛查与诊断方面具有重要价值[5-6]。

肿瘤标志物的即时检测可有效提升肿瘤的早期发现率。目前HE4的临床检测方法主要为化学发光法，其存在耗费时间长，检测地点受限，成本较高等局限，无法满足早筛和普筛需求。以侧向免疫层析为代表的即时检测因其快速、便捷等优势被广泛应用，成为疾病早期筛查的快捷有力手段之一[7-8]，该类检测体系对生物原材料具有较高的要求，单克隆抗体的性能对于侧向免疫层析检测结果的准确性和灵敏度具有重要影响。单克隆抗体凭借其高度的特异性，能够精确识别HE4抗原。目前，全球超过80%的体外诊断试剂源于欧洲、北美和日本，我国的体外诊断行业起步较晚，抗原抗体等核心原材料主要依赖国外进口，成本昂贵[9]，限制了国民肿瘤早期筛查的普及。因此研发国产化的抗体和诊断产品，实现体外诊断技术和供应链的国产自主化具有重要意义。

本课题旨在运用杂交瘤细胞技术筛选具有高亲和力和特异性的抗人HE4单克隆抗体，为HE4诊断试剂的研发奠定原材料基础。同时，将制备的mAb应用于胶体金免疫层析（LFIA）试剂盒的研制，以期能够提供可用于肿瘤早期筛查的方案。

1 材料与方法

1.1 材料

人HE4重组蛋白购自艾博抗（上海）贸易有限公司；BALB/c小鼠来自北京维通利华有限公司；小鼠骨髓瘤细胞（SP2/0）购买于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库；HAT培养基、1640培养基和胎牛血清均为Gibco产品；弗氏不完全佐剂为Sigma产品；PEG-4000购自北京索莱宝科技有限公司；8-氮鸟嘌呤（8-AG）购自上海麦克林生化科技股份有限公司；小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒购自武汉三鹰生物技术有限公司；30 nm胶体金、玻璃纤维和硝酸纤维素膜均来自上海捷宁生物；山羊抗鼠IgG购自洛阳佰奥通实验器材中心。

1.2 方法

1.2.1 抗人HE4单克隆抗体的制备

1.2.1.1 雌性BALB/c小鼠的免疫 将人HE4重组蛋白用PBS稀释至2 mg/mL，与弗氏完全佐剂等体积混合，选取6只6~8周的雌性BALB/c小鼠，采用腹股沟皮下多点注射方式进行首次免疫，每只小鼠的免疫量为100 μg。将重组蛋白与弗氏不完全佐剂混合用于后续免疫，第二次免疫间隔14 d，第三次至第六次免疫间隔7 d，在第六次采用抗原腹腔注射方式进行冲击免疫。自第二次免疫之后，每次免疫后的第7天收集小鼠血清，检测抗体效价。

1.2.1.2 脾细胞与SP2/0细胞融合 小鼠冲击免疫后第三天取脾脏研磨。用甘油（Glycerol）、氯化钠（NaCl）、氯化钾（KCl）混合溶液（GNK）重悬，1 000 r/min离心6 min弃去上清。沉淀用红细胞裂解液冰上静置裂解5 min，1 000 r/min离心6 min弃上清。将收集到的脾细胞与经过8-AG筛选处理的SP2/0细胞按照5∶1的比例混合，搅拌加入2 mL 50%（W/V）的PEG-4000，随后在水浴锅中轻轻晃动90 s。接着加入10 mL预热的GNK溶液。轻轻混匀，转移至50 mL离心管中，补加GNK溶液直至总体积为40 mL，1 000 r/min离心6 min弃上清。沉淀用HAT（含次黄嘌呤：H，氨基蝶呤：A，胸腺嘧啶核苷：T）培养基悬浮，铺在含饲养层细胞的96孔板中，7 d观察细胞融合状态。

1.2.1.3 杂交瘤细胞的筛选与克隆 融合成功的细胞第10天用HAT培养基进行全换液。第14天，更换为HT培养基（含次黄嘌呤：H，胸腺嘧啶核苷：T），7 d后更换1640完全培养基。当细胞长至80%时，取细胞上清按照间接ELISA法进行检测。结果阳性的细胞进行扩大培养，再次取细胞上清检测。再次阳性的细胞进行亚克隆，将细胞稀释至浓度为10~20个/mL，转到铺有饲养层细胞的96孔板中培养。重复3~4次，直至阳性率达到95%以上。采用快速瑞氏-吉姆萨染液试剂盒对杂交瘤细胞的染色体数目进行观察。

1.2.1.4 单克隆抗体的类型鉴定 采用小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒进行亚型鉴定。收集的杂交瘤细胞上清用PBST稀释100倍后加入到样品孔中。无需孵育，直接加入羊抗鼠IgM+IgG-HRP，轻轻混匀1 min，封板后室温孵育1 h。弃去液体，PBST洗板三次，加入显色液，避光显色10~20 min。加入终止液，测量OD450值，OD值最高孔即为相应的亚型。

1.2.1.5 杂交瘤细胞的冻存和稳定性验证 按照比例1640∶FBS∶DMSO=7∶2∶1配制冻存液。收集对数生长期杂交瘤细胞进行冻存。冻存一个月之后，复苏细胞并连续传代，收集第5代、第10代、第15代、第20代的细胞上清，使用间接ELISA法检测细胞的抗体分泌能力。

1.2.1.6 单克隆抗体的大量制备和纯化 选取8~10周的BALB/c小鼠，腹腔注入无菌石蜡油0.5 mL。7 d之后，再注射0.5 mL杂交瘤细胞。杂交瘤细胞浓度为2×10^6个/mL，细胞活率为92%。10 d之后收集腹水，5 000 r/min离心10 min，弃去上层的石蜡油及下层的沉淀。采用间接ELISA法对收集的腹水进行抗体效价的检测，蛋白质A亲和色谱层析法进行纯化[10-11]。收集的样品进行SDS-PAGE电泳，验证单克隆抗体的纯度。

1.2.1.7 单克隆抗体的亲和力及抗原表位的鉴定 采用生物传感器对mAb进行亲和力检测，亲和力检测时His1K传感器固定10 μg/mL的HE4蛋白，数据拟合后得到亲和力KD数据。mAb识别的抗原表位采用间接ELISA相加实验进行测定[12]，预先包被HE4蛋白的酶标板中先加入一种饱和浓度的mAb反应完全后，加入另一种饱和浓度的mAb孵育反应，再加入HRP标记的羊抗鼠IgG，最后测量OD450值，按照下面的公式计算相加指数AI。

AI=[2A1+2/(A1+A2)−1]×100%

式中A1，A2为两种mAb检测的OD450值。AI>50%时表示两种mAb针对的抗原表位不一样，AI<10%时表示两种mAb针对的抗原表位一致或相似，10%<AI<50%时表示两种mAb针对的抗原表位可能有差异。

1.2.1.8　单克隆抗体的特异性验证　采用间接ELISA的方法，对单克隆抗体的特异性进行验证。选用抗原CA125、AFP、CEA、CYFRA21−1、CA72−4、HCG、BSA和HE4包被ELISA酶标板，单克隆抗体作为一抗进行孵育，HRP标记的羊抗鼠IgG作为二抗进行孵育，加入显色液和终止液进行检测。

1.2.2　单克隆抗体的应用

1.2.2.1　胶体金免疫层析试剂盒的制备　首先对胶体金进行表征，接着进行抗体标记。将胶体金调节至适宜的pH，加入制备的抗HE4单克隆抗体，室温孵育。加入终浓度为1%的BSA封闭30 min，10 000 r/min离心10 min弃去上清。沉淀用工作液[0.01 M PBS，0.5%(W/V)BSA，10%(W/V)蔗糖，0.5%(W/V)海藻糖]重悬，均匀铺在GF−06玻璃纤维上，40 ℃干燥4 h，制成结合垫。用PBS(pH7.4)将山羊抗鼠IgG稀释为1 mg/mL，mAb 3F7稀释为1.5 mg/mL，使用划膜喷金仪以1.0 μL/cm的速度在硝酸纤维素膜上进行划线，分别为质控线(Control line，CL)与检测线(Test line，TL)，40 ℃干燥3 h。样品垫在含5% FBS和1%吐温−20的10 mM PBS中浸泡30 min后干燥。各组分依次在底板上组装，切割成3 mm宽并组装到卡壳中得到HE4 LFIA试剂盒。试剂盒中滴加75 μL的样品进行检测，10 min观察结果。当质控线和检测线均显现，结果为阳性；只有质控线显现时，结果为阴性；质控线不显现时，检测结果无效。

1.2.2.2　胶体金免疫层析试剂盒的性能验证　试剂盒中滴加CA125、CEA、AFP、CA153、CYFRA21−1、CA199、CA72−4标准品验证该试剂盒的特异性。为了验证所制备的胶体金免疫层析试剂盒的临床应用潜力，在河南大学淮河医院收集不同年龄段的临床样本20例，并通过该试剂盒进行检测。本研究符合作者所在单位人体试验伦理委员会所制定的伦理学标准，并取得病人的知情同意。伦理审批编号HUSOM2023−110。

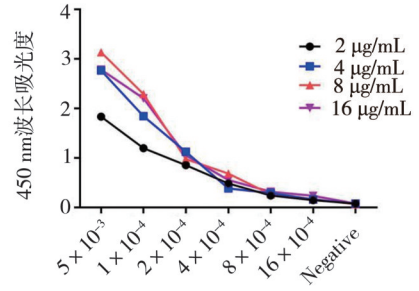
1.2.3　图像采集与统计学方法　图像采用佳能数码相机拍摄，分辨率为300 DPI。统计学分析采用Graphpad Prism 9.5软件进行，计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)的形式呈现。数据来自至少3个独立重复实验的结果。检验水准α=0.05。

2　结　果

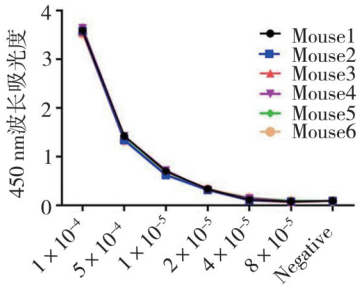
2.1　抗人HE4单克隆抗体的制备

2.1.1　小鼠免疫及杂交瘤细胞株的建立　间接ELISA的方法检测第二次免疫后的小鼠血清，结果见图1A，包被量为2 μg/mL时检测的血清效价为8万倍，低于包被量为4 μg/mL、8 μg/mL和16 μg/mL时的16万倍，因此确定了人HE4重组蛋白最佳包被量为4 μg/mL。随后以此包被量进行了效价检测。经过6次免疫之后，见图1B，血清效价达到40万倍，4号小鼠的血清抗体效价最高。对其进行冲击免疫，取脾细胞与经过8~AG筛选处理的SP2/0细胞进行融合，在第7天观察细胞状态，见图1C，细胞呈团状生长，4个96孔板中，共有189个孔有杂交瘤细胞生长。取细胞上清检测，共有171个孔检测为阳性，阳性率达到90.4%。最终成功获得3株HE4杂交瘤细胞株，分别命名为3F7、3E5和5F10。杂交瘤细胞染色体数目缺失，容易造成细胞分泌抗体的不稳定性。经过检测分析，见图1D~F，所检测的HE4杂交瘤细胞株的染色体数目没有缺失。

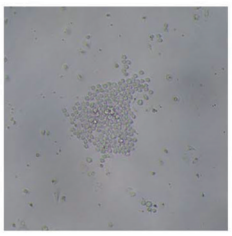
2.1.2　单克隆抗体的类型鉴定及腹水抗体效价检测　对3F7、3E5和5F10杂交瘤细胞株进行培养，收集细胞上清鉴定抗体亚型。见图2A，根据抗体重链的不同，3F7和3E5分泌的抗体为IgG2b亚型，5F10分泌的抗体是IgG1亚型，轻链



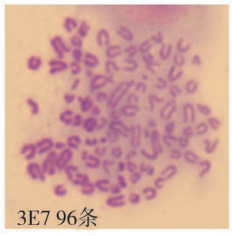
A. 二次免疫后不同HE4包被浓度下抗体效价



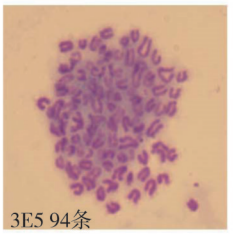
B. 六次免疫后不同小鼠抗体效价



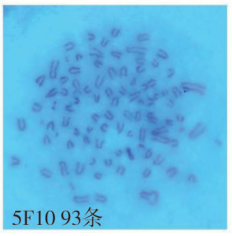
C. 融合细胞生长状态



D. 3F7细胞株染色体统计



E. 3E5细胞株染色体统计



F. 5F10细胞株染色体统计

图1　小鼠免疫后血清抗体效价检测和杂交瘤细胞株的筛选

类型均为Kappa型。收集不同生长代数的培养上清，检测上清中抗体分泌情况。见图2B，杂交瘤细胞株3F7、3E5和5F10在传代5~20次间分泌抗体的能力没有明显变化，表明细胞株具有稳定的抗体分泌能力。通过间接ELISA的方法检测腹水中抗体效价，OD450的值大于阴性值的2.1倍视为阳性。见图2C，3E7的腹水抗体效价为1×10^{-7}，3F75的腹水抗体效价为5×10^{-6}，5F10腹水抗体效价为2×10^{-6}。

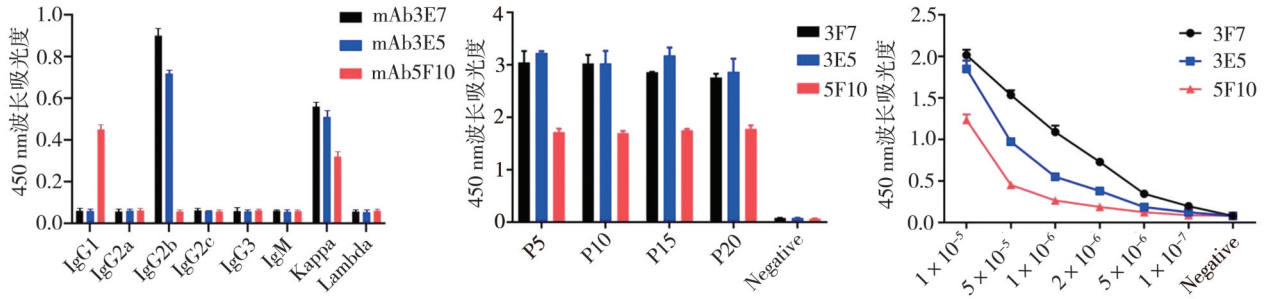
2.1.3 单克隆抗体的纯化 单克隆抗体通过亲和层析纯化后，采用SDS-PAGE进行纯度分析，结果见图3A，所纯化的单克隆抗体为3F7，泳道4和5中在55 kDa和20 kDa附近时有目的条带，55 kDa附近条带为抗体的重链，20 kDa附近条带为抗体的轻链，表明单克隆抗体纯化成功。经过ImageJ软件计算，抗体纯度达到94.2%。同样的方法，见图3B成功获得单克隆抗体3E5和5F10。采用ELISA法验证单克隆抗体的特异性，见图3C，mAb 3F7、mAb 3E5和mAb 5F10均不与抗原CA125、AFP、CEA、CYFRA21-1、CA72-4、HCG、BSA发生反应，与抗原HE4能够特异性结合。

2.1.4 单克隆抗体的亲和力和抗原表位的鉴定 通过生物传感器的方法检测抗体的亲和力，图4A和4B，3F7分泌抗体亲和力KD为252 pM，3E5亲和力KD为89 pM，亲和力高于3F7。5F10分泌抗体的亲和力经计算得KD为104 pM。ELISA相加实验分析mAb识别的抗原表位，见图4C，10%<AI<50%，mAb 3F7与5F10识别的抗原表位有差异；见图4D，AI<10%，mAb 3F7与3E5识别的抗原表位一致或相似。

2.2 单克隆抗体的应用

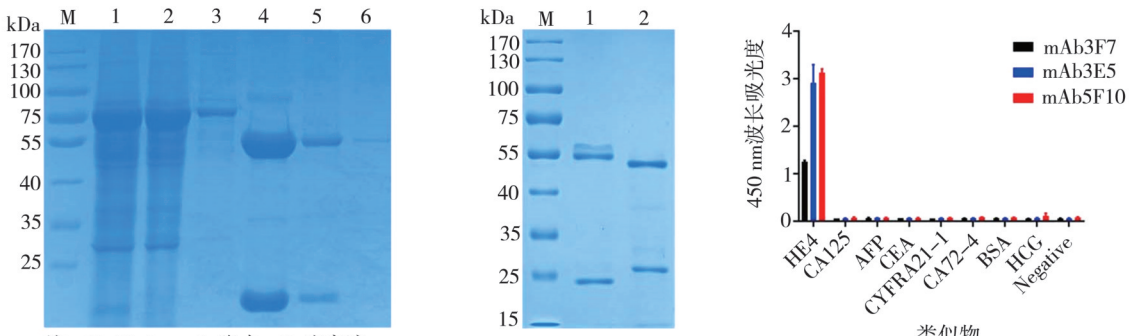
2.2.1 胶体金免疫层析试剂盒的制备 胶体金颗粒的形态均匀度和理化特性对免疫层析结果至关重要。见图5A，波长扫描显示吸收峰在525 nm处，峰宽较窄，胶体金颗粒大小较均一；见图5B，透射电镜结果表明胶体金颗粒近似球形，大小为30 nm左右，无聚集。选取获得的亲和力较高且抗原表位存在差异的3F5和5F10分别作为标记抗体和包被抗体。在阴性血清中加入HE4蛋白标准品，用制备的胶体金免疫层析试剂盒进行检测，见图5C，阴性血清中只有CL显色。当血清中HE4水平达到100 pmol/L时，TL开始显色，检测结果为阳性。因此，试剂盒检测限为100 pmol/L，低于临床安全值105.1 pmol/L。另外，由于每人辨色能力不同，所以采用Image J灰度分析的方法对检测线TL的显色强度进行统计，见图5D。

2.2.2 胶体金免疫层析试剂盒性能验证 当加入过量浓度（1 nmol/L）的CA125、CEA、AFP、CYFRA21-1、CA199、CA72-4和CA153标准品时，图6A和6B所示，均不发生交叉反应，证明该试剂盒特异性较好。从医院收集的临床样本，1~4号样本使用化学发光法（CLIA）检测时HE4浓度均大于100 pmol/L，5~20号样本HE4浓度均低于100 pmol/L。胶体金免疫层析试剂盒对样本进行检测时，见图6C和6D，1~3号检测结果阳性，4~20号检测结果为阴性，与化学发光法检测的符合率为95%，唯一未检出样本浓度（102.7 pmol/L）在检测限附近，证明该试剂盒性能良好，具备临床应用价值。



A. 单克隆抗体亚型鉴定图 B. 杂交瘤细胞多代培养抗体分泌能力验证 C. 不同杂交瘤细胞株腹水效价检测

图2 抗体类型鉴定及腹水抗体效价检测结果



注：M, Marker；1, 腹水；2, 流穿液；3, 平衡液；4~6, 洗脱样品
A. 单克隆抗体3F7 SDS-PAGE结果

注：M, Marker；1, 3F5；2, 5F10
B. 单克隆抗体3F5和5F10 SDS-PAGE结果

C. 抗体特异性验证

图3 单克隆抗体纯化及特异性验证

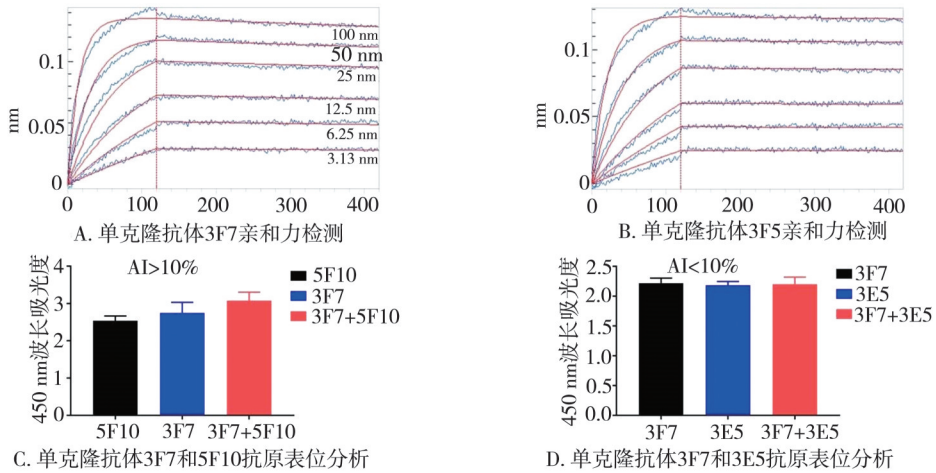


图4　抗体亲和力和表位分析

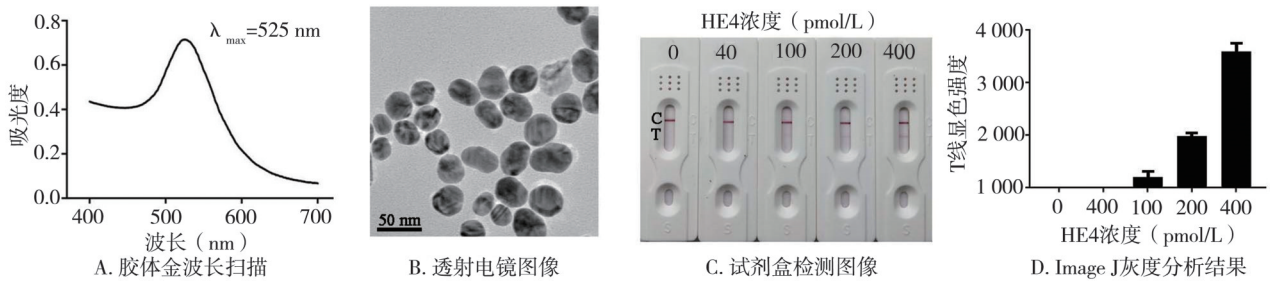


图5　胶体金免疫层析试剂盒检测限验证

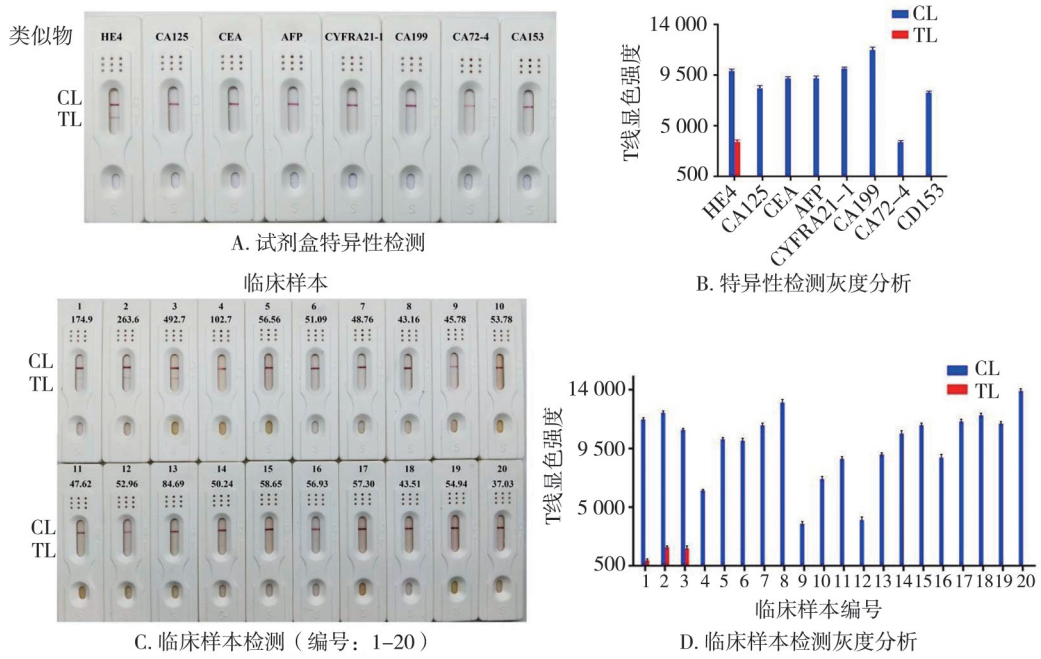


图6　HE4胶体金免疫层析试剂盒验证

3　讨　论

HE4，又被称为WFDC2，是一个包含两个乳清酸性蛋白（WAP）域的蛋白质，发现于人的远端附睾上皮细胞，是一种可溶性的肿瘤标志物[13]。利用杂交瘤技术制备特异性抗体，开发出一种快速高效的检测方法，对HE4的进一步临床应用具有重要意义。

杂交瘤技术是通过细胞融合，将能够分泌特异性抗体的B细胞和具有无限繁殖能力的骨髓瘤细胞

融合成一个具有两种亲本母细胞特性的新细胞，该技术保留了天然B细胞内DNA的真实序列和配对，使得抗体的结构，氨基酸顺序等能保持一致[14]。细胞融合效率是影响杂交瘤细胞抗体表达的关键因素之一，常用的融合方法有化学助剂PEG和电细胞融合[15]。此外，脾细胞活率也会对融合效率产生影响，脾细胞悬液制备方法包括铜网研磨法、剪碎法、压片法、酶消化法或利用gentelMACS分离器等[16-17]。脾细胞分离时一般不用含血清或Hepes的培养基、缓冲液，因为它们会加大PEG对细胞的毒副作用。抗体亚型的鉴定是一项必要的工作，不同的抗体亚型具有不同的用途。若为五聚体的IgM，则不利于后期试剂盒的制备。因此，为了避免这一现象，在亚克隆之前就对细胞分泌的抗体进行了初步的亚型鉴定，直接舍弃了IgM型抗体的细胞株。本实验通过杂交瘤技术成功获得了3株能够分泌抗人HE4单克隆抗体的HE4杂交瘤细胞株，细胞株经过染色体分析和多次传代培养后，能够稳定分泌抗体。由于用作免疫原的人HE4重组蛋白中含有His标签，对所制备的抗体进行验证，结果显示其不与His蛋白结合，表明抗体对HE4的高度特异性。筛选出的3株杂交瘤细胞产生的抗体中均能与人血清中天然的HE4发生反应。侧向免疫层析以其快速便捷的优势被广泛应用，其在标志物筛查方面拥有巨大的潜力[18-19]。本实验研制的LFIA试剂盒检测限为（100 pmol/L）与临床安全值（105.1 pmol/L）接近，可能会出现假阳性结果，后续将优化制备工艺，提高检测灵敏度，降低潜在风险。另外后期将进行大量临床样本验证，并与化学发光法做对比，进一步验证本研究制备出抗体的性能。

综上所述，本研究筛选出3株杂交瘤细胞，成功纯化出性能优异的抗HE4单克隆抗体，具备高纯度和高活性。将其应用于侧向层析检测中，显示出优异的性能，在临床样本检测中也取得较为满意的结果。有望应用于社区癌症筛查和家庭自检，也为后续多种检测方法的建立奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Qiu MH, Zou SC, Yu Z, et al. Clinical utility of human epididymis protein 4[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2025: 1-25.

[2] Jia MM, Deng J, Cheng XL, et al. Diagnostic accuracy of urine HE4 in patients with ovarian cancer: a meta-analysis[J]. Oncotarget, 2017, 8(6): 9660-9671.

[3] Dai C, Zheng Y, Li YJ, et al. Prognostic values of HE4 expression in patients with cancer: a meta-analysis[J]. Cancer Manag Res, 2018, 10: 4491-4500.

[4] Anastasi E, Farina A, Granato T, et al. Recent insight about HE4 role in ovarian cancer oncogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(13): 10479.

[5] Kim NI, Park MH, Lee JS. Assessment of human epididymis protein 4 expression in breast ductal carcinoma *in situ*[J]. Diagnostics (Basel), 2025, 15(9): 1058.

[6] Behrouzi R, Barr CE, Crosbie EJ. HE4 as a biomarker for endometrial cancer[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(19): 4764.

[7] Chen CX, Duan SJ, Ji JN, et al. Structured protein probes modified with selenium nanoparticle for 1-minute measurement of SARS-CoV-2 antigen[J]. Biosens Bioelectron, 2025, 268: 116878.

[8] Chen XH, Liu HX, Ma NY, et al. Precise determination of CpG methylation through entropy-driven cascade circuit[J]. Anal Chem, 2025, 97(25): 13325-13334.

[9] 张孝明，杨 振，周 诚，等. 我国体外诊断试剂标准现状分析及思考[J]. 中国药事，2019，33(9)：1058-1062.
Zhang XM, Yang Z, Zhou C, et al. Analysis and thoughts on the status of *in vitro* diagnostic reagents standards in China[J]. Chin Pharm Aff, 2019, 33(9): 1058-1062.

[10] Lingg N, Daxbacher A, Womser-Matlschweiger D, et al. Alkaline treatment enhances mass transfer in Protein A affinity chromatography [J]. J Chromatogr A, 2022, 1673: 463058.

[11] Ramos-de-la-Peña AM, González-Valdez J, Aguilar O. Protein A chromatography: Challenges and progress in the purification of monoclonal antibodies[J]. J Sep Sci, 2019, 42(9): 1816-1827.

[12] Xie QG, Huang YH, Zhang XL, et al. Development of an indirect competitive ELISA based on a stable epitope of β-lactoglobulin for its detection in hydrolyzed formula milk powder[J]. Foods, 2024, 13(21): 3477.

[13] James NE, Gura M, Woodman M, et al. A bioinformatic analysis of *WFDC2* (*HE4*) expression in high grade serous ovarian cancer reveals tumor-specific changes in metabolic and extracellular matrix gene expression[J]. Med Oncol, 2022, 39(5): 71.

[14] Mitra S, Tomar PC. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects[J]. J Genet Eng Biotechnol, 2021, 19(1): 159.

[15] Kou JQ, Shen JZ, Wang ZH, et al. Advances in hybridoma preparation using electrofusion technology[J]. Biotechnol J, 2023, 18(10): e2200428.

[16] 汪兴泽. 探究杂交瘤技术制备单克隆抗体时与骨髓瘤细胞有效融合的细胞类型[J]. 生物学通报，2023，58(11)：75-78.
Wang XZ. To explore the cell types fusing effectively with myeloma cells in preparation of monoclonal antibody by hybridoma technique[J]. Bull Biol, 2023, 58(11): 75-78.

[17] Lu Y, Fu CH, Xia C, et al. A method for separation and purification of mouse splenocytes by density gradient centrifugation[J]. Prep Biochem Biotechnol, 2021, 51(5): 415-421.

[18] Sun MF, Yang Z, Ma ZW, et al. A ultra-stable point of care nanozyme-based kit for cTnI detection in human serum[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2025, 13: 1570668.

[19] Chen CX, Yang Z, Ma JJ, et al. Recent research progress on the biological functions, synthesis and applications of selenium nanoparticles[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2025, 1252: 124448.

（责任编辑：李青颖）