



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102590529 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 18

(21) 申请号 201210034733. 8

(22) 申请日 2012. 02. 16

(71) 申请人 邵伟

地址 316100 浙江省舟山市普陀区沈家门街
道宫下路 90 号

(72) 发明人 邵伟

(74) 专利代理机构 舟山固浚专利事务所 33106

代理人 范荣新

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 11 页

(54) 发明名称

血清中 PCDH10 的 TRFIA 法检测用试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种血清中 PCDH10 的 TRFIA 法检测用试剂盒,包括:PCDH10N-端融合蛋白、能与 PCDH10N-端融合蛋白结合的第一抗体和 PCDH10C-端融合蛋白、能与 PCDH10C-端融合蛋白及镧系金属离子络合物结合的第二抗体,应用于检测血清样品中 PCDH10 蛋白的时间分辨荧光免疫检测方法。与现有技术相比,本发明在应用中具有较长荧光寿命,可排除标本中非特异性荧光的干扰,所得信号完全是镧系金属离子络合物发射的特异性荧光。另外其激发光与荧光的波长转变达 270nm,可有效排除激发光的干扰,测得的荧光为镧系金属离子络合物发出的特异性荧光信号。所测得的荧光信号强度与待测样品含量成正比。

1. 一种血清 PCDH10 的 TRFIA 法检测用试剂盒,具有能与 PCDH10C- 端融合蛋白结合并被 Eu^{3+} 络合物标记的第二抗体冻干品;该第二抗体冻干品是经 1) 以聚合酶链式反应将 PCDH10C 3' 端碱基序列克隆至原核细胞,构建 PCDH10C 端融合蛋白的原核细胞表达载体;2) 将表达载体转化 BL21DE3pLysS 大肠杆菌,建立 PCDH10C 端融合蛋白的原核细胞表达系统,用 His 金属螯和树脂纯化 PCDH10C 端融合蛋白,用 Thrombin 酶切除 PCDH10C 端融合蛋白 N 端的 His-tag 标签,得到 PCDH10C 端融合蛋白;3) 用已切除标签的 PCDH10C 端融合蛋白作为抗原免疫大白兔,产生抗 PCDH10C 端抗体,收集抗血清,用硫酸铵沉淀、透析、Protein A-Sepharose 亲和柱纯化所得;其特征是:还有包被有具有固相结合部分及能与 PCDH10N- 端融合蛋白结合的第一抗体的多孔型微量滴度板。

2. 权利要求书 1 所述的试剂盒,其特征是:其中第一抗体为 PCDH10N- 端融合蛋白的动物抗体;其中第二抗体为 PCDH10C- 端融合蛋白的动物抗体。

3. 权利要求书 1 所述的试剂盒,其特征是:此检测试剂盒还包括 PCDH10 标准蛋白冻干品、洗涤液、优选牛血清 BSA 和增强液。

4. 权利要求书 1 所述的试剂盒,其特征是:其中包被有具有固相结合部分及能与 PCDH10N- 端融合蛋白结合的第一抗体的制备方法为:

(a) 采用聚合酶链式反应技术直接从体外培养细胞株中将 PCDH10N 3' 端碱基序列克隆至原核细胞,构建 PCDH10N- 端融合蛋白的原核细胞 PCDH10N/PET32a 表达载体。其特征是在经逆转录酶转录 mRNA 获得的 cDNA 两端设计上游包含 BamH I 酶切位点之引物和下游包含 Hind III 酶切位点之引物的 cDNA 片段经高温多聚酶链式反应扩增为含 BamH I 和 Hind III 位点的双链 DNA PCDH10N- 端基因,然后克隆入 PET32a 载体的 BamH I/Hind III 位点;

构建 PCDH10N- 端融合蛋白的具体方法是:将表达 PCDH10 的 $1 \times 10^5 \sim 10^7$ 人白血病 K562 细胞离心沉淀,加入 0.5 ~ 1.5ml Trizol 充分混匀,提取总 RNA,再用逆转录酶转录 RNA 至 cDNA;然后设计上游引物包含 BamH I 内切酶位点 GGATCC 和下游引物包含 Hind III 内切酶位点 AAGCTT,通过 PCR 的方法直接将 PCDH10N- 端 DNA 序列克隆至 PET32a BamH I/Hind III 位点,经 BamH I 和 Hind III 内切酶酶切鉴定合格后,进一步用 DNA 测序验证,合格即为 PCDH10N/PET32a 表达载体;

(b) 将 PCDH10N/PET32a 表达载体转化至 BL21DE3pLysS 大肠杆菌,建立 PCDH10N- 端融合蛋白的原核细胞表达系统,用 His 金属螯树脂纯化 PCDH10N- 端融合蛋白,用 Thrombin 酶切除 PCDH10N- 端融合蛋白 N- 端的 His-tag 标签,得到 PCDH10N 端融合蛋白;

所述的将 PCDH10N/PET32a 表达载体转化至 BL21DE3pLysS 大肠杆菌,建立 PCDH10N- 端融合蛋白的原核细胞表达系统,用 His 金属螯树脂纯化 PCDH10N- 端融合蛋白,用 Thrombin 酶切除 PCDH10N- 端融合蛋白 N 端的 His-tag 标签包括如下步骤:

(1) 取 1 ~ 3 μl 鉴定合格的 PCDH10N/PET32a 重组质粒加至 10 ~ 90 μl 感受态的 BL21DE3pLysS 大肠杆菌,冰浴 15 ~ 45min,42 $^{\circ}\text{C}$ 60s 休克,加入 50 ~ 350 μl LB 液 30 ~ 44 $^{\circ}\text{C}$ 30 ~ 90min,涂布含 50 ~ 150 $\mu\text{g/ml}$ 的 LB 平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱培养过夜,次日,用灭菌牙签挑取单个菌落于一管 6 ~ 8ml 新的 LB 液中,至 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱静置过夜,取 OD 为 0.4 ~ 0.6 的过夜菌液 300 ~ 1000 μl 于一管 6 ~ 8ml 新的 LB 液中,30 ~ 44 $^{\circ}\text{C}$ 扩大培养 2 ~ 8h,加入终浓度为 1 ~ 7mM 的 IPTG 诱导 0.5 ~ 6h,离心收集细菌沉淀;

将细菌沉淀以每克湿重细菌加入 1 ~ 5ml pH6 ~ 8,含 0.5 ~ 1.5% Triton,0.02 ~

0.08M 的磷酸盐缓冲液,重悬细菌,冰浴下超声粉碎细菌,高速冷冻离心区上清液,沉淀继续超声粉碎,高速冷冻离心,合并上清液,上 His 金属螯合树脂柱,用含 5mM 咪唑的 pH6 ~ 8,0.02 ~ 0.08M 的磷酸盐缓冲液充分洗柱,用 5% 的柳硫汞检测至无蛋白流出为止,改用含 500mM 咪唑, pH6 ~ 8,0.02 ~ 0.08M 的磷酸盐缓冲液洗脱,收集流出的蛋白液,装入透析袋,2 ~ 8°C 对 pH6 ~ 8,0.005 ~ 0.015M 的磷酸盐缓冲液透析除盐,每隔 3 ~ 12h 换液 1 次,共 3 ~ 9 次;在透析平衡结束后,用 MW10000 ~ 30000 的聚乙二醇浓缩至 0.5 ~ 1.5mg/ml,取 5 ~ 10mg 重组蛋白用 Thrombin 酶切除 N- 端的 His-tag 标签,同时通过加入 Avidin-agarose 的方法去除 Thrombin 蛋白,得到纯化的 PCDH10N- 端重组蛋白,该蛋白用 SDS-PAGE 电泳时,5 ~ 20 μ g/lane 应无杂蛋白区带发现。

(c) 用已切除标签的 PCDH10N- 端融合蛋白作为抗原免疫动物,产生抗 PCDH10N- 端抗体;具体包括如下步骤:

(1) 分别取 1mg 的 PCDH10N 端重组蛋白与完全福氏佐剂混匀,充分乳化,接种动物皮下 3 ~ 20 余点,每隔 5 ~ 12 天强化免疫 1 次,待第 3 ~ 4 周末,用 0.5 ~ 1.5mg PCDH10N 端重组蛋白进行直接的兔耳静脉内注射,5 ~ 7 天后分离动物颈总动脉,剪短放血至三角烧瓶,2 ~ 8°C 倾斜放置过夜,次日离心收集血清;

(2) 将收集的抗血清,用硫酸铵沉淀、透析、ProteinA-Sepharose 亲和柱纯化兔抗 PCDH10N- 端抗体的方法是:将收集的兔血清用 2 ~ 6 倍预冷的 0.005 ~ 0.03M, pH 6 ~ 8PBS 稀释,在不断搅拌的同时缓慢加入 1 ~ 2 倍体积的饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,2 ~ 8°C 放置 20 ~ 30min,离心,去上清,沉淀用 0.5 ~ 2 倍原体积的 PBS 复溶后,再分别用 50% 和 33.3% 的饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 重复沉淀各 1 次,最后蛋白沉淀用 2 ~ 3ml PBS 复溶后,装入透析袋,2 ~ 8°C 对 0.005 ~ 0.03M, pH 6 ~ 8PBS 透析除盐,每隔 3 ~ 12h 换液 1 次,加至预经 0.01M, pH 6 ~ 8PBS 平衡的 ProteinA-Sepharose 柱,流速 0.5ml/min,流尽后,用 0.02 ~ 0.08M, pH 6 ~ 8 的磷酸盐缓冲液充分洗至无蛋白流出为止,改用 3M, pH 6 ~ 8 硫氰酸钠洗脱结合的 IgG,合并洗脱液,2 ~ 8°C 对 pH 6 ~ 8,0.005 ~ 0.015M 的磷酸盐缓冲液透析除盐,每隔 3 ~ 12h 换液 1 次,共 3 ~ 9 次,用 MW10000 ~ 30000 的聚乙二醇浓缩至 0.5 ~ 1.5mg/ml,分装,-20°C 保存。

5. 权利要求书 1 所述的试剂盒,其特征是:其中的具有固相结合部分及能与 PCDH10N- 端融合蛋白结合的第一抗体的多孔型微量滴度板固相包被方法为:用 Corning 公司的多孔型微量滴度板作为固相载体与等量第一抗体在同一实验条件下进行反应从而把第一抗体包被于固相载体上;其具体步骤是:用 0.05M, pH9.6 碳酸盐包被缓冲液将第一抗体稀释至蛋白质含量为 1 ~ 10 μ g/ml;在每个聚苯乙烯板的反应孔中加 0.1ml,4°C 过夜;次日,弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗 3 次,每次 3 分钟。冻干后 -20°C 保存,直到需要进行测定之前。

6. 权利要求书 1 所述的试剂盒,其特征是:其中的第二抗体冻干品的制备方法中所说的表达载体是 PCDH10C/PET32a。

7. 权利要求书 1 所述的试剂盒,其特征是:其中的具有能与 PCDH10C- 端融合蛋白结合并被 Eu^{3+} 络合物标记的第二抗体冻干品的 Eu^{3+} 络合物标记方法是将兔抗 PCDH10C 端抗体与无水 DTPA 一步交联,过 SephadexG-75 凝胶柱层析把游离的 Eu^{3+} 去掉,冻干备用。

8. 权利要求书 1 所述的试剂盒,其特征是:其使用方法是在固相包被有第一抗体的多

孔型微量滴度板上加入待测样品盒和一定浓度梯度的标准 PCDH10 蛋白和标记 Eu^{3+} 络合物的第二抗体,其加入顺序不限形成双抗体夹心免疫复合体,用洗涤液洗去游离的第二抗体和其他杂蛋白,再加入增效液后进行 TRFIA 时间分辨免疫荧光分析;测定对照组和样品组的数据,由标准曲线即可得到样品中 PCDH10 蛋白的含量;

其具体步骤如下:加入待测样品和标记 Eu^{3+} 络合物的第二抗体:

(1) 加入血清样本 $100 \mu\text{l}$, 37°C , 孵育 $1 \sim 2\text{h}$, 洗涤, 洗涤液为 Tris-HCl, 或还添加有 $0.005 \sim 0.2\%$ 的 Tween, 同时做空白孔, 阴性对照孔及阳性对照孔及标准 PCDH10 对照;

(2) 加入 Eu^{3+} 标记的第二抗体: 加入用 BSA 稀释的第二抗体 $100 \mu\text{l}$ 。 37°C , 孵育 2h , 充分洗涤; 这里加入浓度约为 0.5% 左右的优选牛血清白蛋白, 目的是消除实验中非特异性反应, 提高灵敏度;

(3) 增强液的加入以及时间分辨荧光仪结果测定;

(a) 加增强液: $100 \mu\text{l}$; 增强液由伞酮、popop 即 1,4-双(5-苯基-2-噁唑基)苯、甲醇组成, 其目的是增强荧光强度, 提高检测灵敏度;

(b) TRFIA 测定条件特征是, 延迟时间约为 $0.2 \sim 0.3$ 毫秒, 窗口时间为 $0.2 \sim 0.6\text{ms}$, 闪烁速度为 $0.5 \sim 1.5\text{ms}$, 激发波长为 337.1nm , 测定波长为 615nm ; 测定对照组合样品组的数据, 由标准曲线即可得到样品中 PCDH10 蛋白的含量。

9. 权利要求书 3 所述的试剂盒, 其特征是其中的洗涤液为 Tris-HCl。

10. 权利要求书 3 所述的试剂盒, 其特征是其中增效液由伞酮、popop 即 1,4-双(5-苯基-2-噁唑基)苯和甲醇组成。

血清中 PCDH10 的 TRFIA 法检测用试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种血清中 PCDH10 的 TRFIA 法检测用试剂盒,涉及 PCDH10 蛋白 C-端和 N-端的特异性多肽片段的两种特异抗体的制备,并利用所制备的双抗体,采用时间分辨荧光免疫法 (TRFIA) 检测血清样品中 PCDH10 方法。属于 PCDH10 蛋白的抗体制备和时间分辨荧光免疫 (TRFIA) 分析领域。

背景技术

[0002] PCDH10 是一个新的肿瘤抑制基因,PCDH10 蛋白在血清中的显著降低对一些肿瘤 (如大肠癌等) 有提示作用。PCDH10 是属于 Ca^{2+} 依赖性钙粘蛋白家族的一员,具有 6 个重复串联的胞外区和 1 个独特的胞内区。浙江大学朱永良等人在对原代肿瘤干细胞基因表达谱时用病毒文库技术筛选时发现 $pcdh10^{-/-}$ 细胞易游出和穿过“Transwell”的半透膜,而 $pcdh10^{+/+}$ 的细胞迁移性较弱。通过生物信息学分析,进一步克隆了 $pcdh10$ 的全长 cDNA 序列并构建了表达 $pcdh10$ 的真核细胞表达载体,通过脂质体瞬时转染 k562 细胞、SW480 大肠癌细胞发现异位表达 PCDH10 抑制了这些细胞在体外的增殖,并增加了细胞的凋亡。进一步发现对这些细胞进行无血清饥饿和添加化疗药物等处理后 PCDH10 表达水平随时间和浓度的增加而增加,提示 PCDH10 参与了细胞凋亡,可能是一个肿瘤抑制基因。然对其参与细胞凋亡的分子机制尚不明了。

[0003] 浙江大学朱永良等人的发明专利“针对 PCDH10C-端蛋白片段分子的特异性抗体的制备方法”(专利号为 ZL200810060201) 中,利用了 PCR 技术从体外培养细胞中克隆了 PCDH10 蛋白的 C-端 DNA 序列并转化入原核细胞中进行表达,获得了纯化的 PCDH10C-端多肽,并免疫大白兔,收集并纯化大白兔的抗血清,纯化后获得了 PCDH10 蛋白 C-端多肽的抗体。但尚未发现针对 PCDH10 蛋白 N-端多肽的特异性抗体。所述针对 PCDH10C 端蛋白片段分子的特异性抗体的制备方法的具体步骤是:“1) 采用聚合酶链式反应技术直接从体外培养细胞株中将 PCDH10C 3'端碱基序列克隆至原核细胞,构建 PCDH10C 端融合蛋白的原核细胞 PCDH10C/pET15b 表达载体;2) 将 PCDH10C/pET15b 表达载体转化 BL21 DE3pLysS 大肠杆菌,建立 PCDH10C 端融合蛋白的原核细胞表达系统,用 His 金属螯和树脂纯化 PCDH10C 端融合蛋白,用 Thrombin 酶切除 PCDH10C 端融合蛋白 N 端的 His-tag 标签,得到 PCDH10C 端融合蛋白;3) 用已切除标签的 PCDH10C 端融合蛋白作为抗原免疫大白兔,产生抗 PCDH10C 端抗体,收集抗血清,用硫酸铵沉淀、透析、Protein A-Sepharose 亲和柱纯化兔抗 PCDH10C 端抗体。”

[0004] 目前市面上尚未有商品试剂盒用于检测该蛋白,所以发明一种简单而高灵敏度的方法来测定血清中 PCDH10 蛋白含量以评价患癌症的几率,意义非常重大。

[0005] 时间分辨荧光免疫分析是自上个世纪 70 年代末 80 年代初,新发展起来的一项免疫分析方法,它克服了利用荧光素进行荧光免疫分析时背景干扰严重的影响。TRFIA 原理是利用具有双功能基团结构的螯合剂,一般采用 BHHCT (4,4' -二(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3'' -七氟 -4'',6'' -己二酮 -6'' -酰基) - 氯磺化邻三联苯),其一端与镧系元素结

合,另一端与抗体(蛋白质)分子中的自由氨基结合,制成镧系元素标记的(一般用 Eu^{3+} 标记)抗体。它与待定抗原结合为免疫复合物。理想情况下,测定复合物中 Eu^{3+} 的荧光强度就能确定样品中抗原的量,但是实际上这种复合物种镧系元素的荧光强度非常弱,只有加入一种增强液,使镧系元素从复合物中解离下来,并与增强液中所含的 β -萘甲酰三氟丙酮(β -NAT)重新形成微胶囊,在紫外等光的激发下发射很强的荧光,增强效果上百万倍。用时光分辨荧光仪测定荧光强度 cps,即可确定样品抗原中的量。

[0006] 近年来以利用镧络合物为代表的分辨型荧光免疫检测方法,因其操作方便、环保和高灵敏度的优点正逐渐替代传统的 ELISA 测定方法,用于临床上。游离的、形成了络合物的镧离子(Eu^{3+})的放射波为 615nm,不会受到激发波长(340nm)或某种蛋白质造成的短寿命背景荧光(350nm~600nm)的影响,所以很适合。BHHCT- Eu^{3+} 络合物作为标记化合物,可与蛋白质直接结合,通过分辨型荧光测定可以进行高灵敏度分析。BHHCT 具有 β -二酮结构,与 Eu^{3+} 结合的稳定系数高达 10^{10}M^{-1} 。文献报道,BHHCT- Eu^{3+} 络合物已经用于检测人血浆中肿瘤标志物甲胎蛋白和免疫球蛋白 E(IgE) 的含量。

[0007] 但是,还没有应用上述 Eu^{3+} 络合物及 PCDH10 双抗体检测血清中 PCDH10 蛋白方法。

[0008] 如上所述,开发一种正确定量、操作简单、稳定而灵敏的检测血清样品中 PCDH10 蛋白的方法,将对临床诊断和科研研究起到极为重要的作用。

发明内容

[0009] 本发明的目的是提供一种血清中 PCDH10 的 TRFIA 法检测用试剂盒,同时提出 PCDH10 蛋白 N-端肽链的制备及其特异性抗体的制备方法,并结合浙江大学 PCDH10 蛋白 C-端肽链特异性抗体制备的方法,以利用这两种方法制备出来的抗体为材料,用时间分辨荧光免疫分析方法测定血清中 PCDH10 蛋白的含量。该血清中 PCDH10 的 TRFIA 法检测用试剂盒简便可行、灵敏度高。

[0010] 本发明的一种血清中 PCDH10 的 TRFIA 法检测用试剂盒,具有能与 PCDH10C-端融合蛋白结合并被 Eu^{3+} 络合物标记的第二抗体冻干品;该第二抗体冻干品是经 1) 以聚合酶链式反应将 PCDH10C 3'端碱基序列克隆至原核细胞,构建 PCDH10C 端融合蛋白的原核细胞表达载体;2) 将表达载体转化 BL21DE3pLysS 大肠杆菌,建立 PCDH10C 端融合蛋白的原核细胞表达系统,用 His 金属螯和树脂纯化 PCDH10C 端融合蛋白,用 Thrombin 酶切除 PCDH10C 端融合蛋白 N 端的 His-tag 标签,得到 PCDH10C 端融合蛋白;3) 用己切除标签的 PCDH10C 端融合蛋白作为抗原免疫大白兔,产生抗 PCDH10C 端抗体,收集抗血清,用硫酸铵沉淀、透析、Protein A-Sepharose 亲和柱纯化所得;还有包被有具有固相结合部分及能与 PCDH10N-端融合蛋白结合的第一抗体的多孔型微量滴度板。

[0011] PCDH10 蛋白检测试剂盒的具体制作方法包括如下步骤:

[0012] (一)PCDH10N-端片段蛋白质的制备及能与 PCDH10N-端融合蛋白结合的第一抗体的制备。

[0013] a) 采用聚合酶链式反应技术直接从体外培养细胞株中将 PCDH10N 3'端碱基序列克隆至原核细胞,构建 PCDH10N-端融合蛋白的原核细胞 PCDH10N/PET32a 表达载体。

[0014] 所述的采用聚合酶链式反应技术直接从体外培养细胞株中将 PCDH10N3'端碱基序列克隆至原核细胞,构建 PCDH10N-端融合蛋白的方法是:将表达 PCDH10 的 $1 \times 10^5 \sim 10^7$ 人

白血病 K562 细胞离心沉淀,加入 0.5 ~ 1.5ml Trizol 充分混匀,提取总 RNA,再用逆转录酶转录 RNA 至 cDNA;然后设计上游引物包含 BamH I 内切酶位点 GGATCC 和下游引物包含 Hind III 内切酶位点 AAGCTT,通过 PCR 的方法直接将 PCDH10N- 端 DNA 序列克隆至 pET32aBamH I/Hind III 位点,经 BamH I 和 Hind III 内切酶酶切鉴定合格后,进一步用 DNA 测序验证,合格即为 PCDH10N/PET32a 表达载体。

[0015] b) 将 PCDH10N/PET32a 表达载体转化至 BL21DE3pLysS 大肠杆菌,建立 PCDH10N- 端融合蛋白的原核细胞表达系统,用 His 金属螯合树脂纯化 PCDH10N- 端融合蛋白,用 Thrombin 酶切除 PCDH10N- 端融合蛋白 N- 端的 His-tag 标签,得到 PCDH10N- 端融合蛋白。

[0016] 所述的将 PCDH10N/PET32a 表达载体转化至 BL21DE3pLysS 大肠杆菌,建立 PCDH10N- 端融合蛋白的原核细胞表达系统,用 His 金属螯合树脂纯化 PCDH10N- 端融合蛋白,用 Thrombin 酶切除 PCDH10N- 端融合蛋白 N- 端的 His-tag 标签包括如下步骤:

[0017] 1) 取 1 ~ 3 μ l 鉴定合格的 PCDH10N/PET32a 重组质粒加至 10 ~ 90 μ l 感受态的 BL21 DE3 pLysS 大肠杆菌,冰浴 15 ~ 45min,42 $^{\circ}$ C 60s 休克,加入 50 ~ 350 μ l LB 液 30 ~ 44 $^{\circ}$ C 30 ~ 90min,涂布含 50 ~ 150 μ g/ml 的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 孵箱培养过夜,次日,用灭菌牙签挑取单个菌落于一管 6 ~ 8ml 新的 LB 液中,至 37 $^{\circ}$ C 孵箱静置过夜,取 OD 为 0.4 ~ 0.6 的过夜菌液 300 ~ 1000 μ l 于一管 6 ~ 8ml 新的 LB 液中,30 ~ 44 $^{\circ}$ C 扩大培养 2 ~ 8h,加入终浓度为 1 ~ 7mM 的 IPTG 诱导 0.5 ~ 6h,离心收集细菌沉淀。

[0018] 2) 将细菌沉淀以每克湿重细菌加入 1 ~ 5ml pH6 ~ 8,含 0.5 ~ 1.5% Triton,0.02 ~ 0.08M 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液,沉淀继续超声粉碎,高速冷冻离心,合并上清液,上 His 金属螯合树脂柱,用含 5mM 咪唑的 pH6 ~ 8,0.02 ~ 0.08M 的磷酸盐缓冲液充分洗柱,用 5% 的柳硫汞检测至无蛋白流出为止,改用含 500mM 咪唑,pH6 ~ 8,0.02 ~ 0.08M 的磷酸盐缓冲液洗脱,收集流出的蛋白液,装入透析袋,2 ~ 8 $^{\circ}$ C 对 pH6 ~ 8,0.005 ~ 0.015M 的磷酸盐缓冲液透析除盐,每隔 3 ~ 12h 换液 1 次,共 3 ~ 9 次。在透析平衡结束后,用 MW10000 ~ 30000 的聚乙二醇浓缩至 0.5 ~ 1.5mg/ml,取 5 ~ 10mg 重组蛋白用 Thrombin 酶切除 N- 端的 His-tag 标签,同时通过加入 Avidin-agarose 的方法去除 Thrombin 蛋白,得到纯化的 PCDH10N- 端重组蛋白,该蛋白用 SDS-PAGE 电泳时,5 ~ 20 μ g/lane 应无杂蛋白区带发现。

[0019] c) 用已切除标签的 PCDH10N- 端融合蛋白作为抗原免疫动物(这里采用大白兔),产生抗 PCDH10N- 端抗体,收集抗血清,用硫酸铵沉淀、透析、ProteinA-Sepharose 亲和柱纯化兔抗 PCDH10N- 端抗体。

[0020] 所述的用已切除标签的 PCDH10N- 端融合蛋白作为抗原免疫动物(这里采用大白兔),产生抗 PCDH10N- 端抗体的包括如下步骤:

[0021] 1) 分别取 1mg 的 PCDH10N- 端重组蛋白与完全福氏佐剂混匀,充分乳化,接种大白兔皮下 3 ~ 20 余点,每隔 5 ~ 12 天强化免疫 1 次,待第 3 ~ 4 周末,用 0.5 ~ 1.5mg PCDH10N- 端重组蛋白进行直接的兔耳静脉内注射,5 ~ 7 天后分离大白兔颈总动脉,剪短放血至三角烧瓶,2 ~ 8 $^{\circ}$ C 倾斜放置过夜,次日离心收集血清。

[0022] 2) 将收集的抗血清,用硫酸铵沉淀、透析、ProteinA-Sepharose 亲和柱纯化兔抗 PCDH10N- 端抗体的方法是:将收集的兔血清用 2 ~ 6 倍预冷的 0.005 ~ 0.03M, pH 6 ~ 8PBS 稀释,在不断搅拌的同时缓慢加入 1 ~ 2 倍体积的饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,2 ~ 8 $^{\circ}$ C 放置 20 ~

30min, 离心, 去上清, 沉淀用 0.5 ~ 2 倍原体积的 PBS 复溶后, 再分别用 50% 和 33.3% 的饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 重复沉淀各 1 次, 最后蛋白沉淀用 2 ~ 3ml PBS 复溶后, 装入透析袋, 2 ~ 8°C 对 0.005 ~ 0.03M, pH 6 ~ 8 PBS 透析除盐, 每隔 3 ~ 12h 换液 1 次, 加至预经 0.01M, pH 6 ~ 8 PBS 平衡的 ProteinA-Sepharose 柱, 流速 0.5ml/min, 流尽后, 用 0.02 ~ 0.08M, pH 6 ~ 8 的磷酸盐缓冲液充分洗至无蛋白流出为止, 改用 3M, pH 6 ~ 8 硫氰酸钠洗脱结合的 IgG, 合并洗脱液, 2 ~ 8°C 对 pH 6 ~ 8、0.005 ~ 0.015M 的磷酸盐缓冲液透析除盐, 每隔 3 ~ 12h 换液 1 次, 共 3 ~ 9 次, 用 MW10000 ~ 30000 的聚乙二醇浓缩至 0.5 ~ 1.5mg/ml, 分装, -20°C 保存。

[0023] (二) PCDH10C- 端片段蛋白质的制备及能与 PCDH10C- 端融合蛋白及 Eu^{3+} 络合物结合的第二抗体的制备:

[0024] a) 采用聚合酶链式反应技术直接从体外培养细胞株中将 PCDH10C 3' 端碱基序列克隆至原核细胞, 构建 PCDH10C- 端融合蛋白的原核细胞 PCDH10C/PET32a 表达载体;

[0025] 所述的采用聚合酶链式反应技术直接从体外培养细胞株中将 PCDH10C 3' 端碱基序列克隆至原核细胞, 构建 PCDH10C- 端融合蛋白的方法是: 将表达 PCDH10 的 $1 \times 10^5 \sim 10^7$ 人白血病 K562 细胞离心沉淀, 加入 0.5 ~ 1.5ml Trizol 充分混匀, 提取总 RNA, 再用逆转录酶转录 RNA 至 cDNA; 然后设计上游引物包含 NdeI 内切酶位点 CATATG 和下游引物包含 BamH I 内切酶位点 GGATCC, 通过 PCR 的方法直接将 PCDH10C- 端 DNA 序列克隆至 pET32a NdeI/BamH I 位点, 经 Nde I 和 BamH I 内切酶酶切鉴定合格后, 进一步用 DNA 测序验证, 合格即为 PCDH10C/PET32a 表达载体。

[0026] b) 将 PCDH10C/PET32a 表达载体转化至 BL21DE3pLysS 大肠杆菌, 建立 PCDH10C- 端融合蛋白的原核细胞表达系统, 用 His 金属螯合树脂纯化 PCDH10C- 端融合蛋白, 用 Thrombin 酶切除 PCDH10C- 端融合蛋白 N- 端的 His-tag 标签, 得到 PCDH10C- 端融合蛋白。

[0027] 所述的将 PCDH10C/PET32a 表达载体转化至 BL21DE3pLysS 大肠杆菌, 建立 PCDH10C- 端融合蛋白的原核细胞表达系统, 用 His 金属螯合树脂纯化 PCDH10C- 端融合蛋白, 用 Thrombin 酶切除 PCDH10C- 端融合蛋白 N- 端的 His-tag 标签包括如下步骤:

[0028] 1) 取 1 ~ 3 μl 鉴定合格的 PCDH10C/PET32a 重组质粒加至 10 ~ 90 μl 感受态的 BL21DE3pLysS 大肠杆菌, 冰浴 15 ~ 45min, 42°C 60s 休克, 加入 50 ~ 350 μl LB 液 30 ~ 44°C 30 ~ 90min, 涂布含 50 ~ 150 $\mu\text{g/ml}$ 的 LB 平板, 37°C 孵箱培养过夜, 次日, 用灭菌牙签挑取单个菌落于一管 6 ~ 8ml 新的 LB 液中, 至 37°C 孵箱静置过夜, 取 OD 为 0.4 ~ 0.6 的过夜菌液 300 ~ 1000 μl 于一管 6 ~ 8ml 新的 LB 液中, 30 ~ 44°C 扩大培养 2 ~ 8h, 加入终浓度为 1 ~ 7mM 的 IPTG 诱导 0.5 ~ 6h, 离心收集细菌沉淀。

[0029] 2) 将细菌沉淀以每克湿重细菌加入 1 ~ 5ml pH6 ~ 8, 含 0.5 ~ 1.5% Triton, 0.02 ~ 0.08M 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液, 沉淀继续超声粉碎, 高速冷冻离心, 合并上清液, 上 His 金属螯合树脂柱, 用含 5mM 咪唑的 pH6 ~ 8, 0.02 ~ 0.08M 的磷酸盐缓冲液充分洗柱, 用 5% 的柳硫汞检测至无蛋白流出为止, 改用含 500mM 咪唑, pH6 ~ 8, 0.02 ~ 0.08M 的磷酸盐缓冲液洗脱, 收集流出的蛋白液, 装入透析袋, 2 ~ 8°C 对 pH6 ~ 8、0.005 ~ 0.015M 的磷酸盐缓冲液透析除盐, 每隔 3 ~ 12h 换液 1 次, 共 3 ~ 9 次。在透析平衡结束后, 用 MW10000 ~ 30000 的聚乙二醇浓缩至 0.5 ~ 1.5mg/ml, 取 5 ~ 10mg 重组蛋白用 Thrombin 酶切除 N- 端的 His-tag 标签, 同时通过加入

Avidin-agarose 的方法去除 Thrombin 蛋白,得到纯化的 PCDH10C- 端重组蛋白,该蛋白用 SDS-PAGE 电泳时,5 ~ 20 μ g/lane 应无杂蛋白区带发现。

[0030] c) 用已切除标签的 PCDH10C- 端融合蛋白作为抗原免疫动物(这里采用大白兔),产生抗 PCDH10C- 端抗体,收集抗血清,用硫酸铵沉淀、透析、ProteinA-Sepharose 亲和柱纯化兔抗 PCDH10C- 端抗体。

[0031] 所述的用已切除标签的 PCDH10C- 端融合蛋白作为抗原免疫动物(这里采用大白兔),产生兔抗 PCDH10C- 端抗体的包括如下步骤:

[0032] 1) 分别取 1mg 的 PCDH10C- 端重组蛋白与完全福氏佐剂混匀,充分乳化,接种大白兔皮下 3 ~ 20 余点,每隔 5 ~ 12 天强化免疫 1 次,待第 3 ~ 4 周末,用 0.5 ~ 1.5mg PCDH10C- 端重组蛋白进行直接的兔耳静脉内注射,5 ~ 7 天后分离大白兔颈总动脉,剪短放血至三角烧瓶,2 ~ 8 $^{\circ}$ C 倾斜放置过夜,次日离心收集血清。

[0033] 2) 将收集的抗血清,用硫酸铵沉淀、透析、ProteinA-Sepharose 亲和柱纯化兔抗 PCDH10C- 端抗体的方法是:将收集的兔血清用 2 ~ 6 倍预冷的 0.005 ~ 0.03M, pH 6 ~ 8PBS 稀释,在不断搅拌的同时缓慢加入 1 ~ 2 倍体积的饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,2 ~ 8 $^{\circ}$ C 放置 20 ~ 30min,离心,去上清,沉淀用 0.5 ~ 2 倍原体积的 PBS 复溶后,再分别用 50% 和 33.3% 的饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 重复沉淀各 1 次,最后蛋白沉淀用 2 ~ 3ml PBS 复溶后,装入透析袋,2 ~ 8 $^{\circ}$ C 对 0.005 ~ 0.03M, pH 6 ~ 8PBS 透析除盐,每隔 3 ~ 12h 换液 1 次,加至预经 0.01M, pH 6 ~ 8PBS 平衡的 ProteinA-Sepharose 柱,流速 0.5ml/min,流尽后,用 0.02 ~ 0.08M, pH 6 ~ 8 的磷酸盐缓冲液充分洗至无蛋白流出为止,改用 3M, pH 6 ~ 8 硫氰酸钠洗脱结合的 IgG,合并洗脱液,2 ~ 8 $^{\circ}$ C 对 pH 6 ~ 8、0.005 ~ 0.015M 的磷酸盐缓冲液透析除盐,每隔 3 ~ 12h 换液 1 次,共 3 ~ 9 次,用 MW10000 ~ 30000 的聚乙二醇浓缩至 0.5 ~ 1.5mg/ml,分装,-20 $^{\circ}$ C 保存。

[0034] d) 将兔抗 PCDH10C- 端抗体与无水 DTPA 一步交联,过 SephadexG-75 凝胶柱层析把游离的镧离子 (Eu^{3+}) 去掉。

[0035] (三) 具有固相结合部分和能与 PCDH10N- 端融合蛋白结合的第一抗体的固相包埋。

[0036] 作为“固相”可应用任意形状和材质的固体物质,只要能进行抗体的结合且不妨碍上述复合物形成以及后述的荧光测定即可。不管何种载体,在使用前均可进行筛选:用等量抗原包被,在同一实验条件下进行反应,观察其显色反应是否均一性,据此判明其吸附性能是否良好。本发明中应用的为 Corning 公司的多孔型微量滴度板。

[0037] “第一抗体”是以与上述固相结合的状态存在,且通过抗原-抗体反应与所期望的 PCDH10 蛋白结合的抗体。

[0038] 把第一抗体包被于固相载体上的步骤:用 0.05M, pH9.6 碳酸盐包被缓冲液将第一抗体稀释至蛋白质含量为 1 ~ 10 μ g/ml。在每个聚苯乙烯板的反应孔中加 0.1ml,4 $^{\circ}$ C 过夜。次日,弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗 3 次,每次 3 分钟。-20 $^{\circ}$ C 保存,直到需要进行测定之前。

[0039] (四) 加入待测样品和标记 Eu^{3+} 络合物的第二抗体:

[0040] a) 加入血清样本 100 μ l,37 $^{\circ}$ C,孵育 1 ~ 2h,洗涤(洗涤液为 Tris-HCl,必要时可添加适量的具有蛋白质促溶能力的非离子表面活性剂,例如 Tween,浓度代表性的为约

0.005 ~ 约 0.2%，优选 0.01 ~ 约 0.1%）。（同时做空白孔，阴性对照孔及阳性对照孔）。

[0041] b) 加入 Eu^{3+} 标记的第二抗体：加入用 BSA 适当稀释的第二抗体 100 μl 。37°C，孵育 2h，充分洗涤。这里加入浓度约为 0.5% 左右的优选牛血清白蛋白 (BSA)，目的是消除实验中非特异性反应，提高灵敏度。

[0042] 此步骤中，存在于血清样品中的所期望的 PCDH10 蛋白或作为标准对照的 PCDH10 蛋白，它通过与第一抗体结合而固定到固相上。PCDH10 蛋白不必以游离状态与第一抗体接触，它可与标记 Eu^{3+} 络合物的第二抗体结合后再与第一抗体结合。这样本发明中样品和标记 Eu^{3+} 络合物的第二抗体的加入次序不分先后。

[0043] (五) 增强液的加入以及时间分辨荧光仪 (TRFIA) 结果测定。

[0044] a) 加增强液：100 μl 。增强液由伞酮、popop 即 1,4-双(5-苯基-2-噁唑基)苯、甲醇组成，其目的是增强荧光强度，提高检测灵敏度。

[0045] 结果测定：测定上述步骤得到的含有镧系络合物的复合物装置是由 Wellac 公司提供的的时间分辨型荧光检测仪。测定条件是，代表性的是延迟时间约为 0.2 ~ 约 0.3 毫秒 (ms)，窗口时间为约 0.2 ~ 约 0.6ms，闪烁速度为约 0.5 ~ 约 1.5ms，激发波长为 337.1nm (氮激光的波长)，测定波长为 615nm。测定对照组合样品组的数据，由标准曲线即可得到样品中 PCDH10 蛋白的含量。

具体实施方式

[0046] 以下对本发明的具体实施进行更详细的说明。

[0047] 本发明试剂盒是基于时间分辨荧光双抗体免疫检测 (TRFIA) 方法提出的。“时间分辨荧光免疫检测”是应用如本发明镧系金属络和物的能发射长寿命荧光的荧光化合物，通过免疫学反应标记测定对象物，在较短寿命的背景荧光消失后，对来自标记物的荧光信号进行时间分辨型测定的测定方法。

[0048] 本发明试剂盒用来测血清 PCDH10 蛋白具有高灵敏度、高准确性且操作简单的优点。

[0049] 本发明试剂盒的应用，为了选择性捕捉、标记血清样品中所期望的 PCDH10 蛋白，在固相上形成含该蛋白的复合物。具体而言，含有该 PCDH10 蛋白的复合物是由以下成分在适宜的固相上形成的：

[0050] (a) 具有固相结合部分和能与 PCDH10N- 端融合蛋白结合的第一抗体；

[0051] (b) PCDH10 蛋白；

[0052] (c) 具有能与 PCDH10C- 端融合蛋白和 Eu^{3+} 络合物结合的第二抗体。

[0053] 据此，本发明试剂盒内包含 PCDH10N- 端融合蛋白、能与 PCDH10N- 端融合蛋白结合的第一抗体和 PCDH10C- 端融合蛋白、能与 PCDH10C- 端融合蛋白和 Eu^{3+} 络合物结合的第二抗体。

[0054] 以下，对各成分进行说明。

[0055] 1、将能与固相和 PCDH10N- 端融合蛋白结合的第一抗体包被于固相上。作为“固相”可应用任意形状和材质的固体物质，只要能进行抗体的结合且不妨碍上述复合物形成以及后述的荧光测定即可。不管何种载体，在使用前均可进行筛选：用等量抗原包被，在同一实验条件下进行反应，观察其显色反应是否均一性，据此判明其吸附性能是否良好。本发

明中应用的为 Corning 公司的多孔型微量滴度板。

[0056] 第一抗体是以与上述固相结合的状态存在,且通过抗原-抗体反应与所期望的 PCDH10 蛋白结合的抗体。

[0057] 第一抗体的制备步骤如下:

[0058] 1) 采用聚合酶链式反应技术直接从体外培养细胞株中将 PCDH10N 3' 端碱基序列克隆至原核细胞,构建 PCDH10N- 端融合蛋白的原核细胞 PCDH10N/PET32a 表达载体;

[0059] 2) 将 PCDH10N/PET32a 表达载体转化至 BL21DE3pLysS 大肠杆菌,建立 PCDH10N- 端融合蛋白的原核细胞表达系统,用 His 金属螯合树脂纯化 PCDH10N- 端融合蛋白,用 Thrombin 酶切除 PCDH10N- 端融合蛋白 N- 端的 His-tag 标签,得到 PCDH10N- 端融合蛋白;

[0060] 3) 用已切除标签的 PCDH10N- 端融合蛋白作为抗原免疫大白兔,产生抗 PCDH10N- 端抗体,收集抗血清,用硫酸铵沉淀、透析、ProteinA-Sepharose 亲和柱纯化兔抗 PCDH10N- 端抗体。

[0061] 2、存在于血清样品中的所期望的 PCDH10 蛋白,代表性的是通过与第一抗体结合而固定到固相上。PCDH10 蛋白不必以游离状态与第一抗体接触,它可与后述的第二抗体结合后与第一抗体结合。这样本发明中复合物的形成不限于各成分结合的次序。

[0062] 3、具有能与 PCDH10C- 端融合蛋白和 Eu^{3+} 络合物结合的第二抗体的制备步骤如下:

[0063] 1) 采用聚合酶链式反应技术直接从体外培养细胞株中将 PCDH10C 3' 端碱基序列克隆至原核细胞,构建 PCDH10C- 端融合蛋白的原核细胞 PCDH10C/PET32a 表达载体;

[0064] 2) 将 PCDH10C/PET32a 表达载体转化至 BL21DE3pLysS 大肠杆菌,建立 PCDH10C- 端融合蛋白的原核细胞表达系统,用 His 金属螯合树脂纯化 PCDH10C- 端融合蛋白,用 Thrombin 酶切除 PCDH10C- 端融合蛋白 N- 端的 His-tag 标签,得到 PCDH10C- 端融合蛋白;

[0065] 3) 用已切除标签的 PCDH10C- 端融合蛋白作为抗原免疫动物(这里采用大白兔),产生抗 PCDH10C- 端抗体,收集抗血清,用硫酸铵沉淀、透析、ProteinA-Sepharose 亲和柱纯化兔抗 PCDH10C- 端抗体。

[0066] 4) 将兔抗 PCDH10C- 端抗体与无水 DTPA 一步交联,过 SephadexG-75 凝胶柱层析把游离的铕离子(Eu^{3+})去掉。

[0067] 第二抗体中还需加入优选牛血清白蛋白(BSA),其浓度代表性的为约 0.05 ~ 约 0.5% 左右,优选约 0.1 ~ 约 0.3%。其目的是来消除试验中非特异性反应,从而提高其灵敏度。

[0068] 第二抗体工作浓度的选择:首先采取预实验进行初步效价的滴定,然后再固定其它条件或采取“方阵法”(包被物、待检样品的参考品及铕标记抗体分别为不同的稀释度)在正式实验系统里准确地滴定其工作浓度。

[0069] 本发明方法中第一抗体包埋和样品检测的步骤可以概括如下:

[0070] 1) 把第一抗体包被于固相载体上:用 0.05M, pH9.6 碳酸盐包被缓冲液将第一抗体稀释至蛋白质含量为 1 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在每个聚苯乙烯板的反应孔中加 0.1ml, 4°C 过夜。次日,弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗 3 次,每次 3 分钟。-20°C 保存,直到需要进行测定之前。

[0071] 2) 加样:加入血清样本 100 μl , 37°C, 孵育 1 ~ 2h, 洗涤(洗涤液为 Tris-HCl, 必要时可添加适量的具有蛋白质促溶能力的非离子表面活性剂,例如 Tween, 浓度代表性的为约

- 0.005 ~ 约 0.2%, 优选 0.01 ~ 约 0.1%)。(同时做空白孔, 阴性对照孔及阳性对照孔)。
- [0072] 3) 加入第二抗体: 加入用 BSA 适当稀释的第二抗体 100 μ l。37 $^{\circ}$ C, 孵育 2h, 充分洗涤。
- [0073] 4) 加增强液: 100 μ l。增强液由伞酮、popop、甲醇组成, 其目的是增强荧光强度, 提高检测灵敏度。
- [0074] 5) 结果测定: 测定上述步骤得到的含有镧系络合物的复合物装置是由 Well ac 公司提供的的时间分辨型荧光检测仪。测定条件是, 代表性的是延迟时间约为 0.2 ~ 约 0.3 毫秒 (ms), 窗口时间为约 0.2 ~ 约 0.6ms, 闪烁速度为约 0.5 ~ 约 1.5ms, 激发波长为 337.1nm (氮激光的波长), 测定波长为 615nm。时间分辨荧光免疫检测 (TRFIA) 方法, 是以免疫学反应为基础, 将抗原、抗体的特异性反应与荧光物质检测的敏感性和直观性结合起来的一种免疫分析技术。此发明中时间分辨荧光免疫测定是用镧系金属离子络合物 (如 Eu³⁺ 络合物) 标记抗体, 检测样品中相应的 PCDH10 抗原。此络合物具有较长荧光寿命, 利用时间分辨荧光分析仪延长测量时间, 可排除标本中非特异性荧光的干扰, 所得信号完全是镧系金属离子络合物发射的特异荧光。另一特点是激发光与荧光的波长差别显著, 其波长转变达 270nm, 可有效排除激发光的干扰, 测得的荧光为镧系金属离子络合物发出的特异性荧光信号。所测得的荧光信号强度与待测样品含量成正比。对比标准样品曲线和被测样品数据即可获得血清中 PCDH10 蛋白的数值。
- [0075] 实施例 1: 具有固相结合部分和能与 PCDH10N- 端融合蛋白结合的第一抗体制备
- [0076] 1、采用聚合酶链式反应技术直接从体外培养细胞株中将 PCDH10N 3' 端碱基序列克隆至原核细胞, 构建 PCDH10N- 端融合蛋白的方法是: 将表达 PCDH10 的 $1 \times 10^5 \sim 10^7$ 人白血病 K562 细胞离心沉淀, 加入 0.5 ~ 1.5ml Trizol 充分混匀, 提取总 RNA, 再用逆转录酶转录 RNA 至 cDNA; 然后设计上游引物包含 BamH I 内切酶位点 GGATCC 和下游引物包含 Hind III 内切酶位点 AAGCTT, 通过 PCR 的方法直接将 PCDH10N- 端 DNA 序列克隆至 pET32aBamH I/Hind III 位点, 经 BamH I 和 Hind III 内切酶酶切鉴定合格后, 进一步用 DNA 测序验证, 合格即为 PCDH10N/PET32a 表达载体。
- [0077] 2、将 PCDH10N/PET32a 表达载体转化至 BL21DE3pLysS 大肠杆菌, 建立 PCDH10N- 端融合蛋白的原核细胞表达系统, 用 His 金属螯合树脂纯化 PCDH10N- 端融合蛋白, 用 Thrombin 酶切除 PCDH10N- 端融合蛋白 N- 端的 His-tag 标签包括如下步骤:
- [0078] 1) 取 1 ~ 3 μ l 鉴定合格的 PCDH10N/PET32a 重组质粒加至 10 ~ 90 μ l 感受态的 BL21DE3pLysS 大肠杆菌, 冰浴 15 ~ 45min, 42 $^{\circ}$ C 60s 休克, 加入 50 ~ 350 μ l LB 液 30 ~ 44 $^{\circ}$ C 30 ~ 90min, 涂布含 50 ~ 150 μ g/ml 的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 孵箱培养过夜, 次日, 用灭菌牙签挑取单个菌落于一管 6 ~ 8ml 新的 LB 液中, 至 37 $^{\circ}$ C 孵箱静置过夜, 取 OD 为 0.4 ~ 0.6 的过夜菌液 300 ~ 1000 μ l 于一管 6 ~ 8ml 新的 LB 液中, 30 ~ 44 $^{\circ}$ C 扩大培养 2 ~ 8h, 加入终浓度为 1 ~ 7mM 的 IPTG 诱导 0.5 ~ 6h, 离心收集细菌沉淀。
- [0079] 2) 将细菌沉淀以每克湿重细菌加入 1 ~ 5ml pH6 ~ 8, 含 0.5 ~ 1.5% Triton, 0.02 ~ 0.08M 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液, 沉淀继续超声粉碎, 高速冷冻离心, 合并上清液, 上 His 金属螯合树脂柱, 用含 5mM 咪唑的 pH6 ~ 8, 0.02 ~ 0.08M 的磷酸盐缓冲液充分洗柱, 用 5% 的柳硫汞检测至无蛋白流出为止, 改用含 500mM 咪唑, pH6 ~ 8, 0.02 ~ 0.08M 的磷酸盐缓冲液洗脱, 收集流出的蛋白液, 装入

透析袋, 2 ~ 8℃对 pH6 ~ 8、0.005 ~ 0.015M 的磷酸盐缓冲液透析除盐, 每隔 3 ~ 12h 换液 1 次, 共 3 ~ 9 次。在透析平衡结束后, 用 MW10000 ~ 30000 的聚乙二醇浓缩至 0.5 ~ 1.5mg/ml, 取 5 ~ 10mg 重组蛋白用 Thrombin 酶切除 N- 端的 His-tag 标签, 同时通过加入 Avidin-agarose 的方法去除 Thrombin 蛋白, 得到纯化的 PCDH10N- 端重组蛋白, 该蛋白用 SDS-PAGE 电泳时, 5 ~ 20 μg/lane 应无杂蛋白区带发现。

[0080] 3、用已切除标签的 PCDH10N- 端融合蛋白作为抗原免疫动物 (这里采用大白兔), 产生抗 PCDH10N- 端抗体的包括如下步骤:

[0081] 1) 分别取 1mg 的 PCDH10N- 端重组蛋白与完全福氏佐剂混匀, 充分乳化, 接种大白兔皮下 3 ~ 20 余点, 每隔 5 ~ 12 天强化免疫 1 次, 待第 3 ~ 4 周末, 用 0.5 ~ 1.5mg PCDH10N- 端重组蛋白进行直接的兔耳静脉内注射, 5 ~ 7 天后分离大白兔颈总动脉, 剪短放血至三角烧瓶, 2 ~ 8℃倾斜放置过夜, 次日离心收集血清。

[0082] 2) 将收集的抗血清, 用硫酸铵沉淀、透析、ProteinA-Sepharose 亲和柱纯化兔抗 PCDH10N- 端抗体的方法是: 将收集的兔血清用 2 ~ 6 倍预冷的 0.005 ~ 0.03M, pH 6 ~ 8PBS 稀释, 在不断搅拌的同时缓慢加入 1 ~ 2 倍体积的饱和 (NH₄)₂SO₄, 2 ~ 8℃放置 20 ~ 30min, 离心, 去上清, 沉淀用 0.5 ~ 2 倍原体积的 PBS 复溶后, 再分别用 50% 和 33.3% 的饱和 (NH₄)₂SO₄ 重复沉淀各 1 次, 最后蛋白沉淀用 2 ~ 3ml PBS 复溶后, 装入透析袋, 2 ~ 8℃对 0.005 ~ 0.03M, pH6 ~ 8PBS 透析除盐, 每隔 3 ~ 12h 换液 1 次, 加至预经 0.01M, pH 6 ~ 8PBS 平衡的 ProteinA-Sepharose 柱, 流速 0.5ml/min, 流尽后, 用 0.02 ~ 0.08M, pH 6 ~ 8 的磷酸盐缓冲液充分洗至无蛋白流出为止, 改用 3M, pH 6 ~ 8 硫氰酸钠洗脱结合的 IgG, 合并洗脱液, 2 ~ 8℃对 pH 6 ~ 8、0.005 ~ 0.015M 的磷酸盐缓冲液透析除盐, 每隔 3 ~ 12h 换液 1 次, 共 3 ~ 9 次, 用 MW10000 ~ 30000 的聚乙二醇浓缩至 0.5 ~ 1.5mg/ml, 分装, -20℃保存。

[0083] 实施例 2: 具有能与 PCDH10C- 端融合蛋白和 BHHCT-Eu³⁺ 络合物结合的第二抗体制备

[0084] 1、采用聚合酶链式反应技术直接从体外培养细胞株中将 PCDH10C 3' 端碱基序列克隆至原核细胞, 构建 PCDH10C- 端融合蛋白的方法是: 将表达 PCDH10 的 1 × 10⁵ ~ 10⁷ 人白血病 K562 细胞离心沉淀, 加入 0.5 ~ 1.5ml Trizol 充分混匀, 提取总 RNA, 再用逆转录酶转录 RNA 至 cDNA; 然后设计上游引物包含 NdeI 内切酶位点 CATATG 和下游引物包含 BamHI 内切酶位点 GGATCC, 通过 PCR 的方法直接将 PCDH10C- 端 DNA 序列克隆至 pET32a Nde I/BamHI 位点, 经 Nde I 和 BamHI 内切酶酶切鉴定合格后, 进一步用 DNA 测序验证, 合格即为 PCDH10C/PET32a 表达载体。

[0085] 2、将 PCDH10C/PET32a 表达载体转化至 BL21DE3pLysS 大肠杆菌, 建立 PCDH10C- 端融合蛋白的原核细胞表达系统, 用 His 金属螯合树脂纯化 PCDH10C- 端融合蛋白, 用 Thrombin 酶切除 PCDH10C- 端融合蛋白 N- 端的 His-tag 标签包括如下步骤:

[0086] 1) 取 1 ~ 3 μl 鉴定合格的 PCDH10C/PET32a 重组质粒加至 10 ~ 90 μl 感受态的 BL21DE3pLysS 大肠杆菌, 冰浴 15 ~ 45min, 42℃ 60s 休克, 加入 50 ~ 350 μl LB 液 30 ~ 44℃ 30 ~ 90min, 涂布含 50 ~ 150 μg/ml 的 LB 平板, 37℃ 孵箱培养过夜, 次日, 用灭菌牙签挑取单个菌落于一管 6 ~ 8ml 新的 LB 液中, 至 37℃ 孵箱静置过夜, 取 OD 为 0.4 ~ 0.6 的过夜菌液 300 ~ 1000 μl 于一管 6 ~ 8ml 新的 LB 液中, 30 ~ 44℃ 扩大培养 2 ~ 8h, 加入终浓

度为 1 ~ 7mM 的 IPTG 诱导 0.5 ~ 6h, 离心收集细菌沉淀。

[0087] 2) 将细菌沉淀以每克湿重细菌加入 1 ~ 5ml pH6 ~ 8, 含 0.5 ~ 1.5% Triton, 0.02 ~ 0.08M 的磷酸盐缓冲液, 重悬细菌, 冰浴下超声粉碎细菌, 高速冷冻离心区上清液, 沉淀继续超声粉碎, 高速冷冻离心, 合并上清液, 上 His 金属螯合树脂柱, 用含 5mM 咪唑的 pH6 ~ 8, 0.02 ~ 0.08M 的磷酸盐缓冲液充分洗柱, 用 5% 的柳硫汞检测至无蛋白流出为止, 改用含 500mM 咪唑, pH6 ~ 8, 0.02 ~ 0.08M 的磷酸盐缓冲液洗脱, 收集流出的蛋白液, 装入透析袋, 2 ~ 8℃ 对 pH6 ~ 8, 0.005 ~ 0.015M 的磷酸盐缓冲液透析除盐, 每隔 3 ~ 12h 换液 1 次, 共 3 ~ 9 次。在透析平衡结束后, 用 MW10000 ~ 30000 的聚乙二醇浓缩至 0.5 ~ 1.5mg/ml, 取 5 ~ 10mg 重组蛋白用 Thrombin 酶切除 N- 端的 His-tag 标签, 同时通过加入 Avidin-agarose 的方法去除 Thrombin 蛋白, 得到纯化的 PCDH10C- 端重组蛋白, 该蛋白用 SDS-PAGE 电泳时, 5 ~ 20 μg/lane 应无杂蛋白区带发现。

[0088] 3、用已切除标签的 PCDH10C- 端融合蛋白作为抗原免疫动物 (这里采用大白兔), 产生抗 PCDH10C- 端抗体的包括如下步骤 :

[0089] 1) 分别取 1mg 的 PCDH10C- 端重组蛋白与完全福氏佐剂混匀, 充分乳化, 接种大白兔皮下 3 ~ 20 余点, 每隔 5 ~ 12 天强化免疫 1 次, 待第 3 ~ 4 周末, 用 0.5 ~ 1.5mg PCDH10C- 端重组蛋白进行直接的兔耳静脉内注射, 5 ~ 7 天后分离大白兔颈总动脉, 剪短放血至三角烧瓶, 2 ~ 8℃ 倾斜放置过夜, 次日离心收集血清。

[0090] 2) 将收集的抗血清, 用硫酸铵沉淀、透析、ProteinA-Sepharose 亲和柱纯化兔抗 PCDH10C- 端抗体的方法是 : 将收集的兔血清用 2 ~ 6 倍预冷的 0.005 ~ 0.03M, pH 6 ~ 8PBS 稀释, 在不断搅拌的同时缓慢加入 1 ~ 2 倍体积的饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 ~ 8℃ 放置 20 ~ 30min, 离心, 去上清, 沉淀用 0.5 ~ 2 倍原体积的 PBS 复溶后, 再分别用 50% 和 33.3% 的饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 重复沉淀各 1 次, 最后蛋白沉淀用 2 ~ 3ml PBS 复溶后, 装入透析袋, 2 ~ 8℃ 对 0.005 ~ 0.03M, pH6 ~ 8PBS 透析除盐, 每隔 3 ~ 12h 换液 1 次, 加至预经 0.01M, pH 6 ~ 8PBS 平衡的 ProteinA-Sepharose 柱, 流速 0.5ml/min, 流尽后, 用 0.02 ~ 0.08M, pH 6 ~ 8 的磷酸盐缓冲液充分洗至无蛋白流出为止, 改用 3M, pH 6 ~ 8 硫氰酸钠洗脱结合的 IgG, 合并洗脱液, 2 ~ 8℃ 对 pH 6 ~ 8, 0.005 ~ 0.015M 的磷酸盐缓冲液透析除盐, 每隔 3 ~ 12h 换液 1 次, 共 3 ~ 9 次, 用 MW10000 ~ 30000 的聚乙二醇浓缩至 0.5 ~ 1.5mg/ml, 分装, -20℃ 保存。

[0091] 实施例 3 : 把第一抗体包被于固相载体上

[0092] 用 0.05M, pH9.6 碳酸盐包被缓冲液将第一抗体稀释至蛋白质含量为 1 ~ 10 μg/ml。在每个聚苯乙烯板的反应孔中加 0.1ml, 4℃ 过夜。次日, 弃去孔内溶液, 用洗涤缓冲液洗 3 次, 每次 3 分钟。-20℃ 保存, 直到需要进行测定之前。

[0093] 实施例 4 : 标准品的 TRFIA

[0094] 在已包被第一抗体的 96 孔微量滴度板中加入含 PCDH10 蛋白标准溶液 (100 μl), 37℃ 孵育 2h, 用洗涤液洗涤 3 次 ; 加入用 BHHCT-Eu³⁺ 标记的第二抗体 100 μl, 37℃ 孵育 2h, 用洗涤液充分洗涤 ; 加增强液 100 μl ; 应用 Well ac 公司的 1420 型多标记计数仪对该板进行固相荧光测定。

[0095] 实施例 5 : 血清样品的制备

[0096] 用 BD 公司一次性静脉真空采血管 (不含抗凝剂管 : 红色盖或黄色盖) 抽取血液,

然后 3000 ~ 5000rpm 离心 5 ~ 10 分钟,得到血清。-80℃保存血清样品,分析前融化使用,不要反复冻融。

[0097] 实施例 6 :用血清样品进行的 TRFIA

[0098] 在已包被第一抗体的 96 孔微量滴度板中加入血清样品和阴、阳性对照各 100 μ l, 37℃孵育 2h,用洗涤液洗涤 3 次 ;加入用 BHHCT-Eu³⁺ 标记的第二抗体 100 μ l, 37℃孵育 2h,用洗涤液充分洗涤 ;加增强液 100 μ l ;应用 Well ac 公司的 1420 型多标记计数器对该板进行固相荧光测定。

专利名称(译)	血清中PCDH10的TRFIA法检测用试剂盒		
公开(公告)号	CN102590529A	公开(公告)日	2012-07-18
申请号	CN201210034733.8	申请日	2012-02-16
[标]申请(专利权)人(译)	邵伟		
申请(专利权)人(译)	邵伟		
当前申请(专利权)人(译)	邵伟		
[标]发明人	邵伟		
发明人	邵伟		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种血清中PCDH10的TRFIA法检测用试剂盒，包括：PCDH10N-端融合蛋白、能与PCDH10N-端融合蛋白结合的第一抗体和PCDH10C-端融合蛋白、能与PCDH10C-端融合蛋白及镧系金属离子络合物结合的第二抗体，应用于检测血清样品中PCDH10蛋白的时间分辨荧光免疫检测方法。与现有技术相比，本发明在应用中具有较长荧光寿命，可排除标本中非特异性荧光的干扰，所得信号完全是镧系金属离子络合物发射的特异荧光。另外其激发光与荧光的波长转变达270nm，可有效排除激发光的干扰，测得的荧光为镧系金属离子络合物发出的特异性荧光信号。所测得的荧光信号强度与待测样品含量成正比。