



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105461793 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 06

(21) 申请号 201510809763. 5

(22) 申请日 2015. 11. 20

(71) 申请人 首都医科大学附属北京胸科医院

地址 101199 北京市通州区马厂 97 号

申请人 北京市结核病胸部肿瘤研究所

(72) 发明人 岳文涛 滕宇 马丽 赵晓婷

江妹 王子宇

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事

务所(普通合伙) 11201

代理人 李志东

(51) Int. Cl.

C07K 14/47(2006. 01)

C07K 16/18(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书2页 说明书13页

序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

多肽、单克隆抗体及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种分离的多肽、单克隆抗体及其制备方法以及用于检测血清中细胞周期因子 Y 的试剂盒和方法。其中,多肽具有 SEQ ID NO :1 所示氨基酸序列、利用该多肽制备单克隆抗体,利用该单克隆抗体包被试剂板,进而制备用于检测血清中细胞周期因子 Y 的试剂盒,并利用包被单克隆抗体的试剂板检测血清中细胞周期因子 Y。

1. 一种分离的多肽,所述多肽具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列。
2. 一种单克隆抗体,所述单克隆抗体的识别表位是SEQ ID NO:1所示氨基酸序列。
3. 根据权利要求2所述的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体为鼠源性单克隆抗体。
4. 一种制备权利要求2或3所述的单克隆抗体的方法,其特征在于,包括:
将权利要求1所述的多肽与KLH载体蛋白进行连接,以便得到载体-多肽连接体溶液;
将所述载体-多肽连接体溶液与弗氏佐剂混合并乳化,以便得到免疫乳剂;
利用所述免疫乳剂对哺乳动物进行初次免疫,以便得到初次免疫后的哺乳动物;
利用所述免疫乳剂对所述初次免疫后的哺乳动物进行加强免疫,以便得到加强免疫后的哺乳动物;
提取所述加强免疫后的哺乳动物的脾细胞,并将所述脾细胞与骨髓瘤细胞融合,以便得到杂交瘤细胞;
将所述杂交瘤细胞腹腔接种至经降植烷预处理的哺乳动物,其中,每只哺乳动物接种的所述杂交瘤细胞的数量为 5.0×10^6 – 5.0×10^7 ,以便得到腹水;以及
将所述腹水进行纯化,以便获得所述单克隆抗体。
5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述载体-多肽连接体溶液的浓度为3毫克/毫升,
任选地,所述载体-多肽连接体溶液与所述弗氏佐剂的体积比为1:1。
6. 一种试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括固相载体,其中,所述固相载体上携带权利要求2或3所述的单克隆抗体。
7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其特征在于,进一步包括:识别细胞周期因子Y的多克隆抗体,
任选地,所述多克隆抗体为兔源性细胞周期因子Y多克隆抗体,
任选地,所述多克隆抗体的浓度为100–300微克/毫升。
8. 根据权利要求6所述的试剂盒,其特征在于,进一步包括:细胞周期因子Y标准品、标准品稀释液、辣根酶标记抗体、辣根酶标记抗体稀释液、洗涤浓缩液、底物显色液和终止液,
任选地,所述细胞周期因子Y标准品的成份为:0.01–0.03微克细胞周期因子Y;
所述标准品稀释液的成份为:基于20毫升所述标准品稀释液,含有0.05–0.15克的NaCl,0.003–0.008克的KCl,0.003–0.007克的 KH_2PO_4 和0.02–0.05克的 Na_2HPO_4 ;
所述辣根酶标记抗体的成份为:0.1–0.3微克/毫升辣根酶标记的羊抗兔IgG;
所述辣根酶标记抗体稀释液的成份为:基于20毫升所述辣根酶标记抗体稀释液,含有0.05–0.15克的NaCl,0.002–0.008克的KCl,0.003–0.007克的 KH_2PO_4 和0.02–0.05克的 Na_2HPO_4 ;
所述洗涤浓缩液的成份为:基于20毫升所述洗涤浓缩液,含有1–3克的NaCl,含有0.05–0.15克的KCl,0.05–0.15克的 KH_2PO_4 ,0.5–1克的 Na_2HPO_4 和200–600微升的吐温-20;
所述底物显色液包括底物显色液A和底物显色液B,其中,所述底物显色液A的成份为:基于5毫升所述底物显色液A,含有0.1–0.15克的醋酸钠,0.01–0.02克的柠檬酸和1–5微升的体积百分浓度为30%的 H_2O_2 ;所述底物显色液B的成份为:基于5毫升所述底物显色液B,含有0.001–0.003克的EDTA-钠,0.005–0.015克的柠檬酸,0.3–0.8毫升的丙三醇和0.001–

0.003克的四甲基联苯胺;以及

所述终止液的成份为:1-3mol/LH₂SO₄溶液。

9.一种用于检测细胞周期因子Y的方法,其特征在于,包括:

(1)包被权利要求2或3所述的单克隆抗体至试剂板,4℃过夜后洗板,以便得到包被所述单克隆抗体的固相载体;

(2)向所述包被细胞周期因子Y的固相载体中加入2-10%胎牛血清封闭液,4℃封闭过夜后洗板,以便得到封闭后的固相载体;

(3)将细胞周期因子Y和待检测的样品进行梯度稀释,并加入到所述封闭后的固相载体中,孵育后洗板;

(4)向步骤(3)得到的固相载体中加入识别所述细胞周期因子Y的多克隆抗体,孵育后洗板;

(5)向步骤(4)得到的固相载体中加入辣根酶标记抗体,孵育后洗板;

(6)向步骤(5)得到的固相载体中加入底物显色液;以及

(7)向步骤(4)得到的固相载体中加入终止液,终止反应,检测OD₄₅₀的值,通过分析OD₄₅₀值的大小,判断人细胞周期因子Y的浓度。

10.根据权利要求9所述的方法,其特征在于,所述多克隆抗体为兔源性细胞周期因子Y多克隆抗体,

任选地,所述多克隆抗体的浓度为100-300μg/ml,

任选地,所述辣根酶标记抗体为辣根酶标记的羊抗兔IgG,

任选地,所述方法是利用权利要求6-8任一项所述的试剂盒进行的。

多肽、单克隆抗体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体地,多肽、单克隆抗体及其制备方法和应用,更具体地,涉及分离的多肽、单克隆抗体及其制备方法以及用于检测血清中细胞周期因子Y的试剂盒和方法。

背景技术

[0002] 细胞周期因子Y(CCN Y)又称Cyclin Y、cyc-Y、周期素盒蛋白1(cyclin box protein 1)、周期素折叠蛋白1(cyclin fold protein 1)或周期素盒携带蛋白1(cyclin-box carrying protein 1),是近年来新发现的一种细胞周期蛋白,其编码基因ccny定位于10号染色体,全长3968bp,有10个外显子,9个内含子。细胞周期因子Y含有341个氨基酸,分子量约为39KD。研究显示,CCNY基因水平的变化影响着细胞周期的进程,进一步影响着肿瘤细胞的增殖,迁移与侵袭能力,从而影响着肿瘤的发生、发展的进程。据最新的研究显示,细胞周期因子Y不仅能够促进脑胶质瘤细胞的增殖,细胞周期因子Y还能促进直肠癌细胞粘附能力、细胞的迁移和侵袭,从而影响着直肠癌细胞的转移。关于细胞周期因子Y表达水平的研究显示,应用免疫组化的方法对非小细胞肺癌组织以及癌旁组织中的细胞周期因子Y水平进行检测,结果显示细胞周期因子Y水平在癌症组织中明显高于癌旁组织。因此细胞周期因子Y表达水平的改变与肿瘤的发生、发展存在着一定的关系。

[0003] 目前临床蛋白水平检测最常见的使用方法是免疫组织化学法,但是免疫组织化学法所需的组织标本一般是通过有创的手段如活体取样或是通过手术获得,在无创情况下难以得到,并且大部分患者是在疾病已经发生了影像学改变的情况下才进行免疫组织化学的检测,因此拖延了诊断和治疗时间。以免疫反应为基础的酶联免疫吸附实验(ELISA)的检测方法,可以快速,可靠,有效的对血清中细胞周期因子Y进行检测,与免疫组织化学相比较,ELISA检测方法成本低,所需设备简单,检测样本易获得,高效,快速,操作方便,易于临床推广。

发明内容

[0004] 本发明旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。为此,本发明的一个目的在于提出一种简单易行,灵敏、准确和快速检测血清细胞周期因子Y的试剂盒和方法。

[0005] 根据本发明的一个方面,本发明提供了一种分离的多肽。根据本发明的实施例,所述多肽具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列。

[0006] 根据本发明的又一方面,本发明提供了一种单克隆抗体。根据本发明的实施例,所述单克隆抗体的识别表位是SEQ ID NO:1所示氨基酸序列。

[0007] 根据本发明的另一方面,本发明提供了一种制备前述单克隆抗体的方法。根据本发明的实施例,该方法包括:将前述的多肽与KLH载体蛋白进行连接,以便得到载体-多肽连接体溶液;将所述载体-多肽连接体溶液与弗氏佐剂混合并乳化,以便得到免疫乳剂;利用所述免疫乳剂对哺乳动物进行初次免疫,以便得到初次免疫后的哺乳动物;利用所述免疫

乳剂对所述初次免疫后的哺乳动物进行加强免疫,以便得到加强免疫后的哺乳动物;提取所述加强免疫后的哺乳动物的脾细胞,并将所述脾细胞与骨髓瘤细胞融合,以便得到杂交瘤细胞;将所述杂交瘤细胞腹腔接种至经降植烷预处理的哺乳动物,其中,每只哺乳动物接种的所述杂交瘤细胞的数量为 5.0×10^6 – 5.0×10^7 ,以便得到腹水;以及将所述腹水进行纯化,以便获得所述单克隆抗体。由此,利用该方法获得识别细胞周期因子Y中段的单克隆抗体。

[0008] 根据本发明的再一方面,本发明提供了一种试剂盒。根据本发明的实施例,所述试剂盒包括固相载体,其中,所述固相载体上携带前述的单克隆抗体。由此,利用该试剂盒可以简便、准确、灵敏和高效的检测细胞周期因子Y,尤其是人血清和血浆中的细胞周期因子Y。

[0009] 根据本发明的另一方面,本发明提供了一种用于检测细胞周期因子Y的方法。根据本发明的实施例,该方法包括:(1)包被前述的单克隆抗体至试剂板,4℃过夜后洗板,以便得到包被所述单克隆抗体的固相载体;(2)向所述包被细胞周期因子Y的固相载体中加入2–10%胎牛血清封闭液,4℃封闭过夜后洗板,以便得到封闭后的固相载体;(3)将细胞周期因子Y和待检测的样品进行梯度稀释,并加入到所述封闭后的固相载体中,孵育后洗板;(4)向步骤(3)得到的固相载体中加入识别所述细胞周期因子Y的多克隆抗体,孵育后洗板;(5)向步骤(4)得到的固相载体中加入辣根酶标记抗体,孵育后洗板;(6)向步骤(5)得到的固相载体中加入底物显色液;以及(7)向步骤(4)得到的固相载体中加入终止液,终止反应,检测OD450的值,通过分析OD450值的大小,判断人细胞周期因子Y的浓度。由此,利用该方法可以简便、准确、灵敏和高效的检测细胞周期因子Y,尤其是人血清和血浆中的细胞周期因子Y。

[0010] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

附图说明

[0011] 本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解,其中:

[0012] 图1显示了根据本发明一个实施例的制备单克隆抗体的方法流程图;

[0013] 图2显示了根据本发明一个实施例的用于检测血清中细胞周期因子Y的方法流程图;

[0014] 图3显示了根据本发明一个实施例的标准曲线的示意图。

具体实施方式

[0015] 下面详细描述本发明的实施例,所述实施例的示例在附图中示出,其中自始至终相同或类似的标号表示相同或类似的元件或具有相同或类似功能的元件。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0016] 在本发明的描述中,术语“纵向”、“横向”、“上”、“下”、“前”、“后”、“左”、“右”、“竖直”、“水平”、“顶”、“底”等指示的方位或位置关系为基于附图所示的方位或位置关系,仅是为了便于描述本发明而不是要求本发明必须以特定的方位构造和操作,因此不能理解为对本发明的限制。

[0017] 需要说明的是,术语“第一”、“第二”仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此,限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。进一步地,在本发明的描述中,除非另有说明,“多个”的含义是两个或两个以上。

[0018] 分离的多肽、单克隆抗体及其制备方法

[0019] 根据本发明的一个方面,本发明提供了一种分离的多肽。根据本发明的实施例,所述多肽具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列,其中,SEQ ID NO:1所示氨基酸序列具体如下:

[0020] E N L H P L S K S E V P P D Y D K H N P E Q K Q I Y R F V R (SEQ ID NO:1)

[0021] 本文所用术语“分离的”是指如核酸或者蛋白质等材料,与其天然存在的环境相分离。所述分离的材料任选包含在其天然环境中未发现的材料。

[0022] 根据本发明的又一方面,本发明提供了一种单克隆抗体。根据本发明的实施例,所述单克隆抗体的识别表位是SEQ ID NO:1所示氨基酸序列。SEQ ID NO:1所示氨基酸序列存在于细胞周期因子Y的氨基酸序列中段,进而,该单克隆抗体可以特异性地与细胞周期因子Y结合。

[0023] 抗体与抗原的结合被称为“特异性结合”,这意味着:(1)抗原抗体之间显示出结合活性的阈水平,(2)特异性结合的表现在于单克隆抗体仅识别并结合细胞周期因子Y中段氨基酸序列,不能识并结合别细胞周期因子Y其他位点的氨基酸,(3)单克隆抗体结合在细胞周期因子Y中段的氨基酸后,其他抗体不能再结合此位点,抗原或抗体不与已知的相关多肽分子发生显著的交叉反应。本领域的普通技术人员可以很方便地使用某种技术测定抗体的结合亲合力,如通过Scatchard分析(Scatchard G. The attraction s of proteins for small molecules and ions[J]. Ann. NY Acad. Sci., 1949; 51: 660-672.)。本发明的抗体与细胞周期因子Y的结合极显著高于其它细胞周期因子Y相关蛋白。在本发明的一些实施例中,本发明的抗体不与已知的相关的多肽分子特异性结合,例如,使用标准的Westem blotting分析,它们与细胞周期因子Y结合的同时不与已知的相关多肽结合。其它本领域众所周知的分析的典型例子包括:放射性免疫分析(RIA)、放射免疫沉淀法、酶联免疫吸附分析(ELISA)、点杂交或抑制或竞争分析和三明治分析法。

[0024] 本文所述“多克隆抗体”,简称“多抗”,指通过多次皮下(sc)、腹腔内(ip)或肌肉(im)注射相应抗原和助剂,在动物中产生的离散抗体的混合物。本文所用的术语“单克隆抗体”,简称“单抗”,指获自基本上同源的抗体群的抗体,即组成该群体的抗体个体都相同,而非离散抗体的混合物。

[0025] 根据本发明的一些实施例,单克隆抗体为鼠源性单克隆抗体。由此,单克隆抗体识别位点单一,更好地识别所检测的蛋白,减少非特异性结合,提高敏感性。

[0026] 根据本发明的另一方面,本发明提供了一种制备前述单克隆抗体的方法。参考图1,根据本发明的实施例,对该方法进行解释说明,该方法包括:

[0027] S100:将多肽与KLH载体蛋白进行连接,得到载体-多肽连接体溶液

[0028] 根据本发明的实施例,将前述的多肽与KLH载体蛋白进行连接,得到载体-多肽连接体溶液。由此,前述的多肽太小不足以激起充分的免疫反应,将该多肽与带有很多抗原表位的KLH载体蛋白有利于刺激辅助性T细胞,进一步诱导B细胞免疫反应,激发哺乳动物的免

疫反应。

[0029] S200将载体-多肽连接体溶液与弗氏佐剂混合并乳化

[0030] 根据本发明的实施例,将载体-多肽连接体溶液与弗氏佐剂混合并乳化,得到免疫乳剂。由此,将载体-多肽连接体溶液与弗氏佐剂混合并乳化,利用弗氏佐剂提高载体-多肽连接体对机体的免疫原性,从而提高载体-多肽连接体的效价,激发哺乳动物的免疫反应。

[0031] 根据本发明的一些实施例,载体-多肽连接体溶液的浓度为3毫克/毫升。由此,保证免疫乳剂中含有足量的多肽,以便诱发针对该多肽的免疫反应。

[0032] 根据本发明的实施例,弗氏佐剂的种类和与载体-多肽连接体溶液比例不受特别的限制,可以根据待免疫的哺乳动物的种类进行调整,可以在初次免疫时采用弗氏完全佐剂,在加强免疫时采用弗氏不完全佐剂,并且,根据选择的弗氏佐剂的类型调整载体-多肽连接体溶液与弗氏佐剂的体积比,根据本发明的一些实施例,载体-多肽连接体溶液与完全弗氏佐剂混合乳化,制备初次免疫的免疫乳剂,载体-多肽连接体溶液与不完全弗氏佐剂混合乳化,制备加强免疫的免疫乳剂的体积比为1:1。

[0033] S300利用免疫乳剂对哺乳动物进行初次免疫

[0034] 根据本发明的实施例,利用免疫乳剂对哺乳动物进行初次免疫,得到初次免疫后的哺乳动物。由此,利用免疫乳剂对哺乳动物进行初次免疫,激发哺乳动物产生免疫反应。根据本发明的一些实施例,哺乳动物为小鼠,优选地,为18-20g的Balb/c雌鼠。

[0035] S400利用免疫乳剂进行加强免疫

[0036] 根据本发明的实施例,利用所述免疫乳剂对所述初次免疫后的哺乳动物进行加强免疫,得到加强免疫后的哺乳动物。由此,对初次免疫哺乳动物进行加强免疫,诱发更强烈的免疫反应,产生大量特异性CCNY单抗的淋巴B细胞。

[0037] S500提取脾细胞,并将脾细胞与骨髓瘤细胞融合

[0038] 根据本发明的实施例,提取所述加强免疫后的哺乳动物的脾细胞,该脾细胞含有特异性单抗的淋巴B细胞,并将该脾细胞与骨髓瘤细胞融合,得到杂交瘤细胞。融合后的细胞可以利用选择培养基,如HAT培养基,进行筛选,经有限稀释后选出高抗体分泌孔,将孔内细胞克隆,进行抗原特异的ELISA测定,挑选高分泌性细胞株扩大培养或冻存。

[0039] S600将杂交瘤细胞腹腔接种至哺乳动物,得到腹水

[0040] 根据本发明的实施例,将杂交瘤细胞腹腔接种至经降植烷预处理的哺乳动物,其中,每只哺乳动物接种的所述杂交瘤细胞的数量为 5.0×10^6 - 5.0×10^7 ,以便得到腹水,该腹水中含有针对细胞周期因子Y的大量单克隆抗体。根据本发明的一些实施例,哺乳动物为小鼠,优选地,为18-20g的Balb/c雌鼠。

[0041] S700将所述腹水进行纯化

[0042] 根据本发明的实施例,将所述腹水进行纯化,获得针对前述多肽的单克隆抗体。根据本发明的一些实施例,利用亲和层析柱对腹水进行纯化,得到纯化后的单克隆抗体。

[0043] 根据本发明的再一方面,本发明提供了一种试剂盒。根据本发明的实施例,所述试剂盒包括固相载体,其中,所述固相载体上携带前述的单克隆抗体。由此,利用该试剂盒可以简便、准确、灵敏和高效的检测细胞周期因子Y,尤其是人血清和血浆中的细胞周期因子Y。

[0044] 用于检测血清中细胞周期因子Y的试剂盒和方法

[0045] 根据本发明的再一方面,本发明提供了一种试剂盒。根据本发明的实施例,所述试剂盒包括固相载体,其中,所述固相载体上携带前述的单克隆抗体。由此,利用该试剂盒可以简便、准确、灵敏和高效的检测细胞周期因子Y,尤其是人血清和血浆中的细胞周期因子Y。

[0046] 根据本发明的一些实施例,该试剂盒进一步包括:识别细胞周期因子Y的多克隆抗体。由此,利用该多克隆抗体作为检测抗体,与结合到固相载体上的细胞周期因子Y结合,多克隆抗体的抗原识别的能力强,可以避免单抗对其结合位点干扰而影响其检测性能,提高检出率,并且,可以进一步避免假阳性结果,同时,辣根酶标记抗体与该多克隆抗体结合,便于催化后续显色反应,对细胞周期因子Y进行检测。

[0047] 根据本发明的一些实施例,所述多克隆抗体为兔源性细胞周期因子Y多克隆抗体,其中,该兔源性细胞周期因子Y多克隆抗体识别细胞周期因子Y的N端,避免和单克隆抗体识别位点竞争抑制而影响结合能力。另外,采用兔源性多克隆抗体可以避免与固相载体上的鼠源性单克隆抗体同源,进而,防止辣根酶标记抗体在检测时非特异性地识别固相载体上的鼠源性单克隆抗体,导致双抗夹心反应链不成立,造成检测失败。根据本发明的一些实施例,该多克隆抗体的浓度为100-300 μ g/ml。

[0048] 根据本发明的一些实施例,该试剂盒进一步包括:细胞周期因子Y标准品、标准品稀释液、辣根酶标记抗体、辣根酶标记抗体稀释液、洗涤浓缩液、底物显色液和终止液。

[0049] 根据本发明的一些实施例,细胞周期因子Y标准品的成份为:0.01-0.03微克细胞周期因子Y;标准品稀释液的成份为:基于20毫升标准品稀释液,含有0.05-0.15克的NaCl,0.003-0.008克的KCl,0.003-0.007克的KH₂PO₄和0.02-0.05克的Na₂HPO₄;辣根酶标记抗体的成份为:0.1-0.3 μ g/ml辣根酶标记的羊抗兔IgG;辣根酶标记抗体稀释液的成份为:基于20毫升辣根酶标记抗体稀释液,含有0.05-0.15克的NaCl,0.002-0.008克的KCl,0.003-0.007克的KH₂PO₄和0.02-0.05克的Na₂HPO₄;洗涤浓缩液的成份为:基于20毫升洗涤浓缩液,含有1-3克的NaCl,含有0.05-0.15克的KCl,0.05-0.15克的KH₂PO₄,0.5-1克的Na₂HPO₄和200-600微升的吐温-20;底物显色液包括底物显色液A和底物显色液B,其中,底物显色液A的成份为:基于5毫升所述底物显色液A,含有0.1-0.15克的醋酸钠,0.01-0.02克的柠檬酸和1-5微升的体积百分浓度为30%的H₂O₂;底物显色液B的成份为:基于5毫升所述底物显色液B,含有0.001-0.003克的EDTA-钠,0.005-0.015克的柠檬酸,0.3-0.8毫升的丙三醇和0.001-0.003克的四甲基联苯胺;以及终止液的成份为:1-3mol/L H₂SO₄溶液。由此,上述试剂和固相载体以及多克隆抗体公共构成Elisa试剂盒,利用该试剂盒对细胞周期因子Y进行检测,成本低,灵敏度高,简便快捷。

[0050] 根据本发明实施例的试剂盒,采用双抗夹心法,以特异性单克隆抗体作为捕获细胞周期因子Y的抗体,识别蛋白位点单一,保证了检测结果的特异性,最大程度避免了假阳性,随后以特异性多抗作为检测抗体,该检测抗体与细胞周期因子Y的亲合性极高,充分识别与固相载体上的单克隆抗体相结合的细胞周期因子Y,不仅进一步排除了检测过程中的假阳性结果,而且检测的灵敏度更高,此外,单抗识别CCNY蛋白中间段位点,而多抗识别CCNY蛋白N端位点,二者有效地避免了竞争抑制的产生,并且辣根酶标记抗体特异性识别多抗,而与单抗不存在非特异性结合,故而形成一个4组分的夹心形状的结合物,特异性强,最后加入底物显色液,将以上得到的正确信号有效放大,对比同步平行进行的标准品和内参

实验,进一步排除实验中的试剂或操作误差,最终得到可信赖的结论。由此,利用该试剂盒可以简便、准确、灵敏和高效的检测细胞周期因子Y,尤其是人血清和血浆中的细胞周期因子Y。

[0051] 根据本发明的另一方面,本发明提供了一种用于检测细胞周期因子Y的方法。根据本发明的实施例,参考图2,对该方法进行解释说明,该方法包括:

[0052] S800包被前述的单克隆抗体至试剂板

[0053] 根据本发明的实施例,包被前述的单克隆抗体至试剂板,4℃过夜后洗板,得到包被该单克隆抗体的固相载体。由此,以该特异性单克隆抗体作为捕获细胞周期因子Y的抗体,保证了检测结果的特异性,最大程度避免了假阳性。

[0054] S900向固相载体中加入2-10%胎牛血清封闭液,进行封板

[0055] 根据本发明的实施例,向包被细胞周期因子Y的固相载体中加入2-10%胎牛血清封闭液,4℃封闭过夜后洗板,得到封闭后的固相载体。由此,通过胎牛血清对固相载体进行封板,避免其它蛋白与固相载体结合,产生假阳性结果。

[0056] S1000加入细胞周期因子Y和待检测的血清进行梯度稀释

[0057] 根据本发明的实施例,将细胞周期因子Y和待检测的样品进行梯度稀释,并加入到所述封闭后的固相载体中,孵育后洗板。由此,以细胞周期因子Y作为标准品,通过固相载体上单克隆抗体捕获待测血清中的细胞周期因子Y,从而对其进行检测。根据本发明的一些实施例,该样品为血清或血浆

[0058] S1100加入识别细胞周期因子Y的多克隆抗体

[0059] 根据本发明的实施例,向S1000得到的固相载体中加入识别细胞周期因子Y的多克隆抗体,孵育后洗板。利用该多克隆抗体作为检测抗体,与结合到固相载体上的细胞周期因子Y结合,该检测抗体与细胞周期因子Y的亲合性极高,充分识别与固相载体上的单克隆抗体相结合的细胞周期因子Y,不仅进一步排除了检测过程中的假阳性结果,而且检测的灵敏度更高,同时,辣根酶标记抗体与该多克隆抗体结合,便于催化后续显色反应,对细胞周期因子Y进行检测。

[0060] 根据本发明的一些实施例,所述多克隆抗体为兔源性细胞周期因子Y多克隆抗体。由此,采用兔源性多克隆抗体可以避免与固相载体上的鼠源性单克隆抗体同源,进而,防止辣根酶标记抗体在检测时非特异性地识别固相载体上的鼠源性单克隆抗体,导致双抗夹心反应链不成立,造成检测失败。根据本发明的一些实施例,该多克隆抗体的浓度为100-300μg/ml。

[0061] S1200加入辣根酶标记抗体

[0062] 根据本发明的实施例,向S1100得到的固相载体中加入辣根酶标记抗体,孵育后洗板。由此,辣根酶标记抗体与该多克隆抗体结合,便于催化后续显色反应,对细胞周期因子Y进行检测。

[0063] S1300加入底物显色液

[0064] 根据本发明的实施例,向S1200得到的固相载体中加入底物显色液。由此,底物显色液在结合到多克隆抗体上的辣根酶标记抗体催化下,进行显色反应。

[0065] S1400加入终止液,终止反应,检测OD450的值

[0066] 根据本发明的实施例,向S1300得到的固相载体中加入终止液,终止反应,检测

OD450的值,通过分析OD450值的大小,判断人细胞周期因子Y的浓度。由此,固相载体各孔颜色的深浅与样品中细胞周期因子Y的含量呈正相关,通过检测固相载体中的溶液的OD450值,可以有效、准确和快捷的判断血清中细胞周期因子Y抗体浓度。

[0067] 根据本发明的一些实施例,该方法可以利用前述的试剂盒进行。由此,操作更简便,结果更准确。

[0068] 根据本发明实施例的方法,采用双抗夹心法,以特异性单克隆抗体作为捕获细胞周期因子Y的抗体,保证了检测结果的特异性,最大程度避免了假阳性;随后以特异性多抗作为检测抗体,该检测抗体与细胞周期因子Y的亲合性极高,充分识别与固相载体上的单克隆抗体相结合的细胞周期因子Y,不仅进一步排除了检测过程中的假阳性结果,而且检测的灵敏度更高,再加入辣根酶标记抗体,形成一个4组分的夹心形状的结合物,最后加入底物显色液,将以上得到的正确信号有效放大,对比同步平行进行的标准品和内参实验,进一步排除实验中的试剂或操作误差,最终得到可信赖的结论。由此,利用该方法可以简便、准确、灵敏和高效的检测细胞周期因子Y,尤其是人血清和血浆中的细胞周期因子Y。

[0069] 下面参考具体实施例,对本发明进行说明,需要说明的是,这些实施例仅仅是说明性的,而不能理解为对本发明的限制。

[0070] 实施例1

[0071] 以多肽(多肽的氨基酸序列:ENLHPLSKSEVPPDYDKHNPEQKQIYRFVR,SEQ ID NO:1)为抗原免疫小鼠,获取分泌特异性单抗的淋巴B细胞,后者与鼠骨髓瘤细胞融合得杂交瘤细胞,将杂交瘤细胞直接接种至小鼠腹腔获取单抗。制备鼠源性细胞周期因子Y单克隆抗体,具体步骤如下:

[0072] (1)选用Balb/c小鼠,将采用MBS连接法将KLH载体蛋白与该多肽进行连接,得到KLH-多肽连接体(KLH载体蛋白-ENLHPLSKSEVPPDYDKHNPEQKQIYRFVR)溶液,该溶液的浓度为3mg/ml。

[0073] (2)0.3mlKLH-多肽连接体溶液与等量的完全弗氏佐剂混合,乳化,得到免疫乳剂。

[0074] (3)将免疫乳剂皮下多点注射Balb/c小鼠5只(18-22g,雌性,购买于维通利华实验动物中心)进行初次免疫。

[0075] (4)三周后,采用相同剂量免疫乳剂腹腔注射,加强免疫,其中,该加强免疫的免疫乳剂为0.3mlKLH-多肽连接体溶液与等量的不完全弗氏佐剂混合乳化得到的,10天后,眼眶取血,分别测定每只小鼠的抗体效价,选取抗体滴度高的小鼠做融合试验。

[0076] (5)无菌的条件下获取抗体滴度高的Balb/c小鼠脾细胞,用PEG融合处于对数生长期的骨髓瘤细胞和Balb/c小鼠脾细胞,制备杂交瘤细胞。

[0077] (6)杂交瘤细胞以HAT选择性培养液进行培养,经有限稀释后选出高抗体分泌孔,将孔内细胞克隆,进行筛选和鉴定,然后细胞进行扩大培养。

[0078] (7)将Balb/c小鼠腹腔注射0.5ml降植烷进行预处理。

[0079] (8)2周后,将预处理后的小鼠腹腔内接种1ml对数生长的 1.0×10^7 个细胞/ml杂交瘤细胞。2-4周后,小鼠腹部膨大,收集腹水。

[0080] (9)采用蛋白G微珠层析柱将腹水进行亲和层析纯化获得细胞周期因子Y鼠源性单克隆抗体。

[0081] 实施例2

[0082] 利用PCR法对编码细胞周期因子Y的基因进行扩增,具体如下:

[0083] (1)样本DNA的获取

[0084] 以A549肺腺癌细胞为原料收集样本DNA,具体方法如下:

[0085] A、收集A549肺腺癌细胞 1×10^6 个。

[0086] B、利用TRIzol RNA抽提试剂提取A549肺腺癌细胞的RNA样本。

[0087] C、利用反转录试剂盒 SuperScript® III CellsDirect™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen™)对RNA样本进行反转录,获得A549肺腺癌细胞的cDNA模板。

[0088] (2)PCR反应

[0089] 上游引物:5'-TAACCCATGGGGAACACTACCTCGTGC-3'(SEQ ID NO:2)

[0090] 下游引物:5'-AATACTCGAGCTAAGAGATGATGGC-3'(SEQ ID NO:3)

[0091] PCR反应体系:

[0092] cDNA模板2μl

[0093] 2U/μl pfuDNA聚合酶1μl

[0094] 10mM dNTP 1μl

[0095] 10mM上、下游引物各1μl,

[0096] 10×PCR buffer 5μl

[0097] 补水至50μl。

[0098] PCR条件:

[0099] 热启动95°C 5min

变性 94°C 30s

[0100] 退火温度 62.5°C 45s } 30个循环

延伸 72 °C 1min

[0101] 72°C延伸10min

[0102] 4°C终止反应。

[0103] (3)扩增产物的纯化

[0104] 利用琼脂糖凝胶回收试剂盒(购自天根生化科技(北京)有限公司,产品编号:DP209),对扩增产物进行纯化,纯化步骤详见试剂盒说明书,得到纯化的CCNY的编码基因。

[0105] 实施例3

[0106] 利用实施例2获得扩增后的细胞周期因子Y的编码基因,制备His-CCNY重组蛋白的操作步骤如下:

[0107] (1)将实施例1获得扩增后的CCNY的编码基因,经NcoI/XhoI酶切体系双酶切后连入质粒pET30a(+).

[0108] (2)将重组质粒转化大肠杆菌E.coli BL21(DE3),振荡培养,当大肠杆菌培养液的OD₆₀₀为0.6时,加入IPTG至终浓度为0.4mM/L,诱导表达3h,收集菌体,超声破碎,收集上清。

[0109] (3)将收集的上清按照GE公司HISTrap纯化试剂盒操作说明进行纯化,纯化条件为:2ml亲和层析柱,亲和层析柱平衡液12ml,上样速度为0.5ml/min,亲和层析柱50mM/L咪唑洗涤液20ml,上样速度为0.5ml/min,亲和层析柱200mM/L咪唑洗脱液10ml,上样速度为0.5ml/min。根据OD₂₈₀分光光度值,将收集200mM/L咪唑洗脱液的峰值取50μl进行SDS-PAGE

胶进行纯度的验证。

[0110] (4)将200mM/L咪唑洗脱液OD₂₈₀的峰值装入透析袋中,pH7.4的PBS液中透析过夜,期间换液3次。

[0111] (5)将透析袋中的液体分装入冷冻干燥管中,每管中的总蛋白量为0.1μg,冷冻成粉末,放入-80℃冻存备用。

[0112] (6)SDS-PAGE胶蛋白纯度验证的方法如下:将收集200mM/L咪唑洗脱液的峰值取40μl,加入10μl的5×上样缓冲液,100℃加热10min,12000转/min离心,取上清15μl上样,12% SDS-PAGE胶,80伏恒压10min,120伏恒压60min,考马斯亮蓝染色,脱色,胶图分析,结果显示:蛋白纯度≥95%。

[0113] 实施例4

[0114] 利用实施例1获得的CCNY鼠源性单克隆抗体包被酶标板,得到固化CCNY单克隆抗体的酶标板,具体步骤如下:

[0115] (1)取实施例1获得的CCNY鼠源性单克隆抗体,用包被缓冲液稀释成1μg/ml,得到
[0116] 包被液,4℃保存,备用。

[0117] (2)将包被液加入至96孔平底聚苯乙烯试剂板,每孔加100μl,4℃过夜。

[0118] (3)洗板三次,拍干板中液体,每孔加入200μl 5%胎牛血清封闭液,4℃封闭过夜。

[0119] (4)洗板三次,拍干板中液体,得到包被CCNY的酶标板,4℃保存备用。

[0120] 实施例5

[0121] 本实施例的试剂盒为细胞周期因子Y双抗夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒,该试剂盒包括:实施例4得到的固化细胞周期因子Y单克隆抗体的酶标板1块、细胞周期因子Y标准品2瓶,检测抗体1×10μl,辣根过氧化物酶标抗体1×10μl/管,标准品稀释液1×20ml,浓洗涤缓冲液(20×)1×20ml,抗体稀释液1×20ml,底物显色液A 1×5ml,底物显色液B 1×5ml,终止液1×6ml。具体说明如下:

[0122] (1)细胞周期因子Y标准品(冻干品)

[0123] 实施例3得到的细胞周期因子Y,2ng,每瓶标准品加入标准品稀释液1ml,盖好后室温静置大约10分钟,同时反复颠倒以助溶解,浓度为2ng/ml。

[0124] (2)检测抗体

[0125] 兔源性细胞周期因子Y多克隆抗体(购自Sigma,货号:HPA036290),体积10μl,浓度为200μg/ml。

[0126] (3)辣根过氧化物酶标抗体

[0127] 山羊抗兔辣根过氧化物酶标抗体,体积10μl,浓度为0.2μg/ml。使用时,用辣根过氧化物酶标抗体稀释液将10μl抗体稀释成20ml,进行2000倍稀释。

[0128] (4)标准品稀释液

[0129] 组成为:每20ml含有NaCl 0.1g,KCl 0.005g,KH₂PO₄0.005g,Na₂HPO₄0.036g,余量为去离子水。

[0130] (5)辣根过氧化物酶标抗体稀释液

[0131] 组成为:每20ml含有NaCl 0.1g,KCl 0.005g,KH₂PO₄0.005g,Na₂HPO₄0.036g,余量为去离子水。

[0132] (6)洗涤浓缩缓冲液

[0133] 组成为:每20ml含有NaCl 2g,KCl 0.1g,KH₂PO₄0.1g,Na₂HPO₄0.72g,吐温-20400μl,余量为去离子水。使用时,用380ml蒸馏水或去离子水将20ml浓洗涤液稀释至400ml,进行20倍稀释。

[0134] (7)底物显色液A

[0135] 组成为:每5ml含有醋酸钠0.136g,柠檬酸0.016g,体积百分浓度为30%的H₂O₂3μl,余量为去离子水,避光保存。

[0136] (8)底物显色液B

[0137] 组成为:每5ml含有EDTA-Na 0.002g,柠檬酸0.0095g,丙三醇0.5ml,四甲基联苯胺0.002g,余量为去离子水,避光保存。

[0138] (9)终止液

[0139] 组成为:1-3mol/LH₂SO₄溶液。

[0140] (10)酶标板

[0141] 实施例4制备得到的细胞周期因子Y单克隆抗体包被的酶标板。

[0142] 实施例6

[0143] 检测实施例5的试剂盒的检测范围和灵敏度,具体如下:

[0144] (1)细胞周期因子Y标准品用标准品稀释液倍比稀释10次,浓度从2ng/ml至0.0039ng/ml,。

[0145] (2)加样:10个浓度的标准品溶液加入酶标板,100μl/孔,另设空白孔,加入标准品稀释液,每个样品3复孔,37℃,孵育2h。

[0146] (3)弃去步骤(2)中酶标板的液体,洗涤缓冲液300μl/孔,洗板三次,拍干。

[0147] (4)向步骤(3)得到的酶标板中,每孔加入检测抗体100μl,37℃,1h。

[0148] (5)弃去步骤(4)得到的酶标板中的液体,洗涤缓冲液300μl/孔,洗板三次,拍干。

[0149] (6)向步骤(5)得到的酶标板中,每孔加入酶标抗体100μl,37℃,1h。

[0150] (7)弃去步骤(4)得到的酶标板中的液体,洗涤缓冲液300μl/孔,洗板五次,拍干。

[0151] (8)底物显色液A和B等体积充分混合,向步骤(5)得到的酶标板中,依次加入混合液100μl/孔,37℃避光显色15-30min。

[0152] (9)向步骤(8)得到的酶标板中,依次加入终止液50μl,终止反应,用酶标仪在450nm波长读数(OD值),具体结果如下,结果表明,试剂盒的检测灵敏度为0.0078ng/ml,检测范围为0.0078ng/ml-2ng/ml。

[0153]

浓 度 (ng/ml)	2	1	0.5	0.25	0.125	0.063	0.031	0.016	0.008	0.004	空白
OD 均值	2.958	2.058	1.211	0.717	0.398	0.232	0.145	0.103	0.075	0.068	0.061

[0154] 实施例7

[0155] 测定实施例5的试剂盒的批内和批间的变异系数。

[0156] (1)批内变异系数:

[0157] 将3个浓度分别为0.25ng/ml的细胞周期因子Y标准品溶液,按照实施例6的方法,在一块酶标板上分别测定25次,具体结果如下:

[0158]

检测 批次	浓度	检测 批次	浓度	检测 批次	浓度	检测 批次	浓度	检测 批次	浓度
1	0.2340	6	0.2787	11	0.2293	16	0.2682	21	0.2719
2	0.2364	7	0.2794	12	0.2472	17	0.2719	22	0.2709
3	0.2497	8	0.2833	13	0.2463	18	0.2719	23	0.2757
4	0.2566	9	0.2833	14	0.2506	19	0.2548	24	0.2648
5	0.2610	10	0.2317	15	0.2675	20	0.2523	25	0.2655
平均浓度		0.2601		SD		0.01637			

[0159] 批内变异系数计算公式: $CV = (\text{批内标准差} / \text{平均值}) \times 100\%$ [0160] 结果:按上述批内变异系数计算公式,经计算,该试剂盒的批内变异系数 $CV = 0.01637 / 0.2601 \times 100\% = 6.28\%$; $CV < 10\%$, 符合规定。

[0161] (2)批间变异系数:

[0162] 将浓度为0.25ng/ml,的细胞周期因子Y标准品溶液,按照实施例6的方法,由4名工作人员共测定25次,具体结果如下:

[0163]

检测 批次	浓度	检测 批次	浓度	检测 批次	浓度	检测 批次	浓度	检测 批次	浓度
1	0.2392	6	0.2973	11	0.2331	16	0.2837	21	0.2885
2	0.2423	7	0.2982	12	0.2563	17	0.2885	22	0.2872
3	0.2596	8	0.3032	13	0.2552	18	0.2885	23	0.2934
4	0.2685	9	0.3032	14	0.2608	19	0.2663	24	0.2793
5	0.2744	10	0.2362	15	0.2828	20	0.2629	25	0.2802
平均浓度		0.2731		SD		0.0212			

[0164] 批间变异系数计算方法: $CV = (\text{批间标准差} / \text{平均值}) \times 100\%$ [0165] 结果:按上述批间变异系数计算公式,经计算,批间变异系数 $CV = 0.0212 / 0.2731 \times 100\% = 7.77\%$; $CV < 10\%$, 符合规定。

[0166] 通过测定血清细胞周期因子Y蛋白检测试剂盒批内和批间的变异系数均小于10%,表明该试剂盒具有很好的稳定性。

[0167] 实施例8

[0168] 实施例5的试剂盒可用于测定血清、血浆中细胞周期因子Y蛋白的含量,具体如下:

[0169] 1、标本的采集及保存:

[0170] (1)血清:将收集于血清分离管的全血标本在室温放置2小时或4℃过夜,然后离心1000g×20分钟,取上清分装,将分装好的上清置于-80℃保存,但应避免反复冻融。

[0171] (2)血浆:用EDTA或肝素作为抗凝剂采集标本,并将标本在采集后的30分钟内于4℃离心1000g×15分钟,取上清分装,将分装好的上于-80℃保存,但应避免反复冻融。

[0172] 2、试剂准备:

[0173] (1)使用前将所有的试剂和标本缓慢均衡至室温(18-25℃),试剂不能直接在37℃溶解。

[0174] (2)标准品(冻干品):每瓶标准品加入标准品稀释液1000μl,盖好后室温静置大约10分钟,同时反复颠倒/搓动以助溶解,其浓度为2ng/ml。然后准备7个稀释标准品的EP管,每个EP管中加入500μL的标准品稀释液,依次倍比稀释成1ng/ml;0.5ng/ml;0.25ng/ml;

0.125ng/ml;0.0625ng/ml;0.03125ng/ml;0.015625ng/ml,0.0078ng/ml,标准品稀释液(0ng/ml)直接作为空白孔。为保证实验结果有效性,每次实验请使用新的标准品溶液。

[0175] (3)辣根过氧化物酶标抗体:用辣根过氧化物酶标抗体稀释液将10 μ l辣根过氧化物酶标抗体稀释成20ml,进行2000倍稀释。

[0176] (4)浓缩洗涤缓冲液:用380ml蒸馏水或去离子水将20ml浓洗涤液稀释至400ml,进行20倍稀释。

[0177] 3、操作步骤:

[0178] (1)加样:分别设标准孔、待测样品孔、空白孔。设标准孔7孔,依次加入100 μ L不同浓度的标准品(见试剂准备(2)),空白孔加100 μ L(见试剂准备(2)),余孔加待测样品100 μ L,37 $^{\circ}$ C温育2小时,细胞周期因子Y将与预包被在酶标板表面的单克隆抗体相结合。

[0179] (2)弃去液体,甩干,每孔用350 μ L的洗涤液洗涤,浸泡1-2分钟,吸去(不可触及板壁)或甩掉酶标板内的液体,在实验台上铺垫几层吸水纸,酶标板朝下用力拍几次(也可轻拍将孔内液体拍干),洗板3次,最后一次洗涤后,要把孔内的洗涤液完全甩干。自动洗板机亦可。

[0180] (3)向步骤(2)得到的酶标板中,每孔加入检测抗体100 μ l,37 $^{\circ}$ C温育1小时。检测抗体与第一次孵育中被捕获的细胞周期因子Y结合。

[0181] (4)弃去步骤(3)得到酶标板中的液体,甩干,洗板5次,方法同步骤(2)。

[0182] (5)向步骤(4)得到的酶标板中,每孔加入辣根过氧化物酶标抗体100 μ l,37 $^{\circ}$ C温育1小时,辣根过氧化物酶标抗体与上一步中的检测抗体相结合,形成一个4组分的夹心形状的结合物。

[0183] (6)弃去步骤(5)得到酶标板中的液体,甩干,洗板5次,方法同步骤(2)。

[0184] (7)将底物显色液A和底物显色液B等体积充分混匀后,向步骤(6)得到的酶标板中,每孔加入90 μ l,37 $^{\circ}$ C避光显色,10-20分钟,不要超过30分钟,孔内液体在辣根过氧化物酶的催化下转化成蓝色,当标准孔的前3-4孔有明显的梯度蓝色,后3-4孔梯度不明显时,即可终止

[0185] (8)向步骤(7)得到的酶标板中,每孔加终止溶液50 μ L,终止反应,此时蓝色立转黄色。终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。如出现颜色不匀一,请轻轻晃动酶标板以使溶液混合均匀。

[0186] (9)在确保酶标板底无水滴及孔内无气泡后,立即用酶标仪在450nm波长测量各孔的光密度(O.D.值)。

[0187] 4、计算:

[0188] 各标准品及样本OD值扣除空白孔OD值后作图,如设置复孔,则应取其平均值计算。以标准品的浓度为纵坐标(或对数坐标),OD值为横坐标(或对数坐标),绘出标准曲线(最佳方程式应依回归方程计算的 R^2 值来定,以 R^2 值越趋近于1为好),标准曲线的示意图如图3所示。推荐使用专业制作曲线软件进行分析,如curve expert 1.30,根据样品OD值,由标准曲线查出相应的浓度,乘以稀释倍数,或用标准物的浓度与OD值计算出标准曲线的回归方程式,将样品的OD值代入方程式,计算出样品浓度,再乘以稀释倍数,即为样品的实际浓度。所提供的标准曲线仅供参考,实验者需要根据自己的实验建立标准曲线。

[0189] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示

例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

[0190] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,本领域的普通技术人员可以理解:在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由权利要求及其等同物限定。

SEQUENCE LISTING

<110> 北京市结核病胸部肿瘤研究所

<120> 多肽、单克隆抗体及其制备方法和应用

<130> PIDC3154716

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 多肽

<400> 1

[0001]

Glu Asn Leu His Pro Leu Ser Lys Ser Glu Val Pro Pro Asp Tyr Asp

1 5 10 15

Lys His Asn Pro Glu Gln Lys Gln Ile Tyr Arg Phe Val Arg

20 25 30

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物

<400> 2

taacccatgg ggaacactac ctcgtgc 27

<210> 3

<211> 25

	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
[0002]	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	3	
	aatactcgag ctaagagatg atggc		25

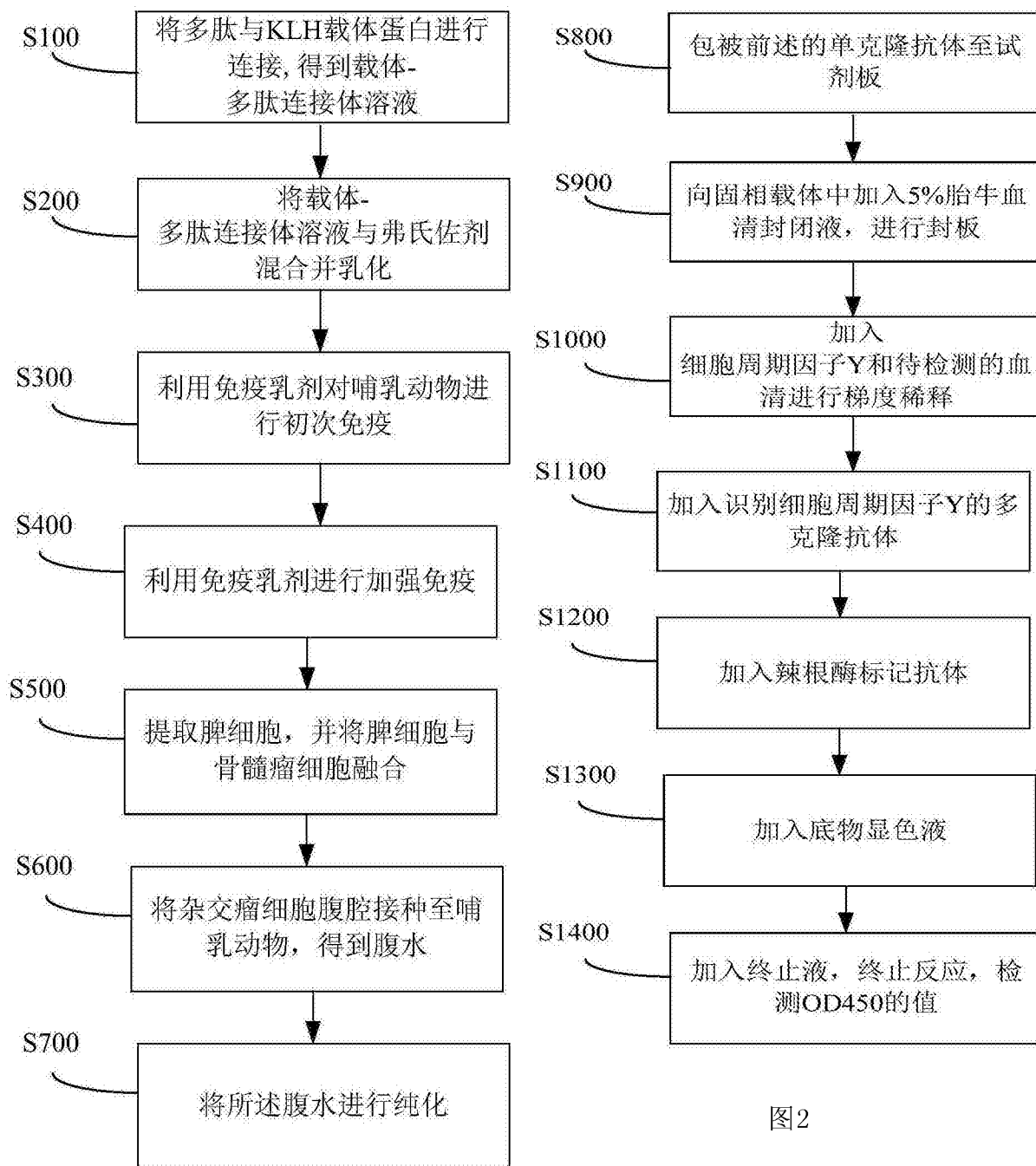


图1

图2

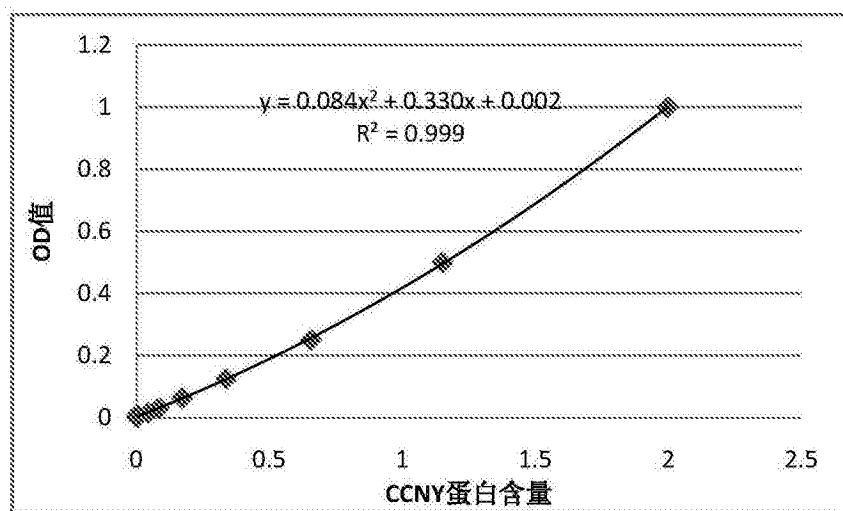


图3

专利名称(译)	多肽、单克隆抗体及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN105461793A	公开(公告)日	2016-04-06
申请号	CN201510809763.5	申请日	2015-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	首都医科大学附属北京胸科医院 北京市结核病胸部肿瘤研究所		
申请(专利权)人(译)	首都医科大学附属北京胸科医院 北京市结核病胸部肿瘤研究所		
当前申请(专利权)人(译)	首都医科大学附属北京胸科医院 北京市结核病胸部肿瘤研究所		
[标]发明人	岳文涛 滕宇 马丽 赵晓婷 江妹 王子宇		
发明人	岳文涛 滕宇 马丽 赵晓婷 江妹 王子宇		
IPC分类号	C07K14/47 C07K16/18 G01N33/68 G01N33/574 G01N33/577 G01N33/535		
CPC分类号	C07K14/4738 C07K16/18 G01N33/535 G01N33/57423 G01N33/577 G01N33/68 G01N2333/4739		
代理人(译)	李志东		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种分离的多肽、单克隆抗体及其制备方法以及用于检测血清中细胞周期因子Y的试剂盒和方法。其中，多肽具有SEQ ID NO：1所示氨基酸序列、利用该多肽制备单克隆抗体，利用该单克隆抗体包被试剂板，进而制备用于检测血清中细胞周期因子Y的试剂盒，并利用包被单克隆抗体的试剂板检测血清中细胞周期因子Y。

变性 94℃ 30s
退火温度 62.5℃ 45s
延伸 72 °C 1min

} 30 个循环