



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105462966 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 06

(21) 申请号 201510809761. 6

(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 马丽 滕宇 张丽娜

顾勳 王玥

(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.

C12N 15/11(2006. 01)

C12N 15/70(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

权利要求书2页 说明书11页

序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

引物对、制备细胞周期因子 Y 的方法及其应用

(57) 摘要

本发明公开了引物对、制备细胞周期因子 Y 的方法以及用于检测细胞周期因子 Y 抗体的试剂盒和方法,其中,引物对具有 SEQ ID NO :1 和 2 所示的核苷酸序列。利用本发明的引物对扩增细胞周期因子 Y 的编码基因,进而合成细胞周期因子 Y,并利用细胞周期因子 Y 包被试剂板得到固相载体,制备检测血清中细胞周期因子 Y 抗体试剂盒,或检测血清中细胞周期因子 Y 抗体。本发明的试剂盒和检测方法,灵敏度高、准确性好、成本低,操作简单,可应用于血清和血浆中细胞周期因子 Y 抗体的检测。

1. 一种引物对,其特征在于,所述引物对具有SEQ ID NO:1和2所示的核苷酸序列。
2. 一种制备细胞周期因子Y的方法,其特征在于,包括:
采用权利要求1所述的引物对,扩增细胞周期因子Y编码基因;
将所得到的细胞周期因子Y编码基因亚克隆至质粒中,以便获得重组质粒;
利用所述重组质粒转化大肠杆菌,并对所得到的转化后的大肠杆菌进行培养,其中,在所述培养过程中通过添加IPTG诱导所述细胞周期因子Y的表达;以及
纯化所述细胞周期因子Y。
3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,包括以下步骤:
利用PCR扩增细胞周期因子Y编码基因,其中,反应体系:A549肺腺癌细胞的cDNA 2 μ l, 2U/ μ l pfuDNA聚合酶1 μ l,10mM dNTP 1 μ l、10mM上游引物和下游引物各1 μ l,10 \times PCR buffer 5 μ l,补水至50 μ l;反应条件:热启动95 $^{\circ}$ C5min;循环参数为:变性94 $^{\circ}$ C30s、退火温度62.5 $^{\circ}$ C45s、延伸72 $^{\circ}$ C1min共30个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min,4 $^{\circ}$ C终止反应,以便得到扩增后的细胞周期因子Y编码基因;
利用NcoI/XhoI酶切体系将所述扩增后的细胞周期因子Y编码基因双酶切后克隆至pET30a(+)质粒中,得到重组质粒;
利用所述重组质粒转化入E.coli BL21大肠杆菌,并对转化后的大肠杆菌进行培养,当所述转化后的大肠杆菌的培养液的OD600为0.6时,向所述转化后的大肠杆菌培养液中加入IPTG,其中,IPTG的浓度为0.4mM/L,以便得到所述细胞周期因子Y,其中,所述细胞周期因子Y是以组氨酸-细胞周期因子Y重组蛋白的形式存在;以及
利用镍离子亲和层析柱纯化所述细胞周期因子Y。
4. 一种用于检测所述细胞周期因子Y抗体的试剂盒,其特征在于,包括:
固相载体,所述固相载体上携带有权利要求2或3所述的方法制备的所述细胞周期因子;
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;以及
终止液。
5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,进一步包括:
标准品,所述标准品为识别所述细胞周期因子Y的多克隆抗体;和
标准品稀释液,所述标准品稀释液的成份为:基于20ml所述标准品稀释液,含有0.08-0.12g的NaCl,0.002-0.008g的KCl,0.002-0.008g的KH₂PO₄和0.02-0.5g的Na₂HPO₄。
6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述多克隆抗体为兔源性多克隆抗体。
7. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述辣根酶标记抗体的成份:0.2 μ g/ml辣根酶标记的羊抗人免疫球蛋白G溶液和0.2 μ g/ml辣根酶标记的羊抗兔免疫球蛋白G溶液;
所述辣根酶标记抗体稀释液的成份:基于20ml所述辣根酶标记抗体稀释液,含有0.05-0.15g的NaCl,0.002-0.008g的KCl,0.002-0.008g的KH₂PO₄和0.02-0.05g的Na₂HPO₄;
所述洗涤浓缩液的成份:基于20ml所述洗涤浓缩液,含有1-3g的NaCl,0.05-0.15g的KCl,0.05-0.15g的KH₂PO₄,0.5-1.0g的Na₂HPO₄和200-600 μ l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:基于5ml所述底物显色液A,含有0.10-0.15g的醋酸钠,0.01-0.02g的柠檬酸和1-5 μ l体积百分浓度为30%的H₂O₂;所述底物显色液B的成份:基于5ml所述底物显色液B,含有0.001-0.003g的EDTA-钠,0.005-0.015g的柠檬酸,0.3-0.8ml的丙三醇和0.001-0.003g的四甲基联苯胺;以及

所述终止液的成份:1-3mol/L H₂SO₄溶液。

8.一种用于检测所述细胞周期因子Y抗体的方法,其特征在于,包括:

(1)包被所述细胞周期因子Y至试剂板,4°C过夜后洗板,以便得到包被所述细胞周期因子Y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°C封闭过夜后洗板,以便得到封闭后的固相载体;

(3)将识别所述细胞周期因子Y的多克隆抗体和待检测的血清进行梯度稀释,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辣根酶标记抗体,孵育后洗板;

(5)向步骤(4)得到的固相载体中加入底物显色液;以及

(6)向步骤(5)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,判断血清中所述细胞周期因子Y抗体浓度。

9.根据权利要求8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,所述辣根酶标记抗体为辣根酶标记的羊抗人免疫球蛋白G和羊抗兔免疫球蛋白G混合物。

10.根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述方法是利用权利要4-7任一项所述的试剂盒进行的。

引物对、制备细胞周期因子Y的方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体地,涉及抗体检测技术领域,更具体地,涉及引物对、制备细胞周期因子Y的方法、用于检测细胞周期因子Y抗体的试剂盒和用于检测细胞周期因子Y抗体的方法。

背景技术

[0002] CCNY又称CyclinY、cyc-Y、细胞周期因子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。CCNY蛋白含有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,CCNY不仅能够促进脑胶质瘤细胞的增殖,CCNY还能促进直肠癌细胞粘附能力、细胞的迁移和侵袭能力,从而影响着直肠癌细胞的转移。

[0003] 细胞周期因子家族的其他成员例如CyclinB1,CyclinD,CyclinE等在肿瘤的相关研究中均呈现高表达的态势,并且在肿瘤患者血清中均检测出相应的抗体存在,而这些细胞周期素相应的抗体部分具有一定的辅助诊断价值,尤其是对肿瘤患者的早期辅助诊断,部分抗体具有作为肿瘤患者预后评价的重要参考意义。据最新的研究报道,CCNY抗体水平的高低可以用来预测非小细胞肺癌早期术后患者的生存期的长短;并且血清CCNY抗体水平的高低与非小细胞肺癌早期术后患者是否出现了癌症复发,转移等疾病进展存在着一定的联系。因此临床医生可以通过对血清CCNY抗体水平的监测,来预测疾病的发展进程,从而及早调整临床治疗手段和方法,提高肿瘤患者生活质量和延长肿瘤患者的生存时间。由于CCNY是新发现的周期因子,所以在其他肿瘤患者中关于血清CCNY抗体的研究还是空白。

[0004] 因此,细胞周期因子Y抗体的检测的临床应用价值有待研究。

发明内容

[0005] 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快速、简便和高效地检测细胞周期因子Y的试剂盒和方法。

[0006] 根据本发明的一个方面,本发明提供了一种引物对。根据本发明的实施例,所述引物对具有SEQ ID NO:1和2所示的核苷酸序列。由此,利用该引物对,可以高效、准确和快捷地实现对细胞周期因子Y编码基因的扩增。

[0007] 根据本发明的另一方面,本发明提供了一种制备细胞周期因子Y的方法。根据本发明的实施例,该方法包括:采用前述的引物对,扩增细胞周期因子Y编码基因;将所得到的细胞周期因子Y编码基因亚克隆至质粒中,以便获得重组质粒;利用所述重组质粒转化大肠杆菌,并对所得到的转化后的大肠杆菌进行培养,其中,在所述培养过程中通过添加IPTG诱导所述细胞周期因子Y的表达;以及纯化所述细胞周期因子Y。由此,利用本发明的前述引物进

行基因扩增,扩增的准确度高、速度快,并且细胞周期因子Y重组表达的效率。

[0008] 根据本发明的又一方面,本发明提供了一种用于检测细胞周期因子Y抗体的试剂盒,其特征在于,包括:固相载体,所述固相载体上携带有前述所制备的细胞周期因子;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;以及终止液。

[0009] 由此,利用本发明的试剂盒,可以快速,可靠和有效地对血清中CCNY抗体进行检测,与免疫组织化学相比较,本发明的方法检测的灵敏度高,成本低,所需设备简单,检测样本易获得,操作方便,易于临床推广。

[0010] 根据本发明的再一方面,本发明提供了一种用于检测细胞周期因子Y抗体的方法。该方法包括:(1)包被细胞周期因子Y至试剂板,4°C过夜后洗板,以便得到包被细胞周期因子Y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5%胎牛血清封闭液,4°C封闭过夜后洗板,以便得到封闭后的固相载体;(3)将识别细胞周期因子Y的多克隆抗体和待检测的血清进行梯度稀释,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辣根酶标记抗体,孵育后洗板;(5)向步骤(4)得到的固相载体中加入底物显色液;(6)向步骤(5)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,判断血清中细胞周期因子Y抗体浓度。

[0011] 由此,利用本发明的方法,可以快速,可靠和有效地对血清中CCNY抗体进行检测,与免疫组织化学相比较,本发明的方法检测的灵敏度高,成本低,所需设备简单,检测样本易获得,操作方便,易于临床推广。

[0012] 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

[0013] 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:

[0014] 图1显示了根据本发明一个实施例的制备细胞周期因子Y的流程示意图;

[0015] 图2显示了根据本发明一个实施例的检测血清中细胞周期因子Y抗体的方法流程图;

[0016] 图3显示了根据本发明一个实施例的试剂盒的多克隆抗体标准品的标准曲线示意图;

[0017] 图4显示了根据本发明一个实施例的凝胶电泳结果示意图。

具体实施方式

[0018] 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。

[0019] 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。

[0020] 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。

[0021] 引物对和制备细胞周期因子Y的方法

[0022] 根据本发明的一个方面,本发明提供了一种引物对。根据本发明的实施例,该引物对具有SEQ ID NO:1和2所示的核苷酸序列。由此,利用该引物对,可以高效、准确和快捷地实现对细胞周期因子Y编码基因的扩增。

[0023] 根据本发明的另一方面,本发明提供了一种制备细胞周期因子Y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:

[0024] S100:扩增细胞周期因子Y编码基因

[0025] 根据本发明的实施例,采用前述的引物对,扩增细胞周期因子Y编码基因。由此,通过该引物对,可以准确、高效地扩增细胞周期因子Y编码基因,有利于后续的转化和表达。

[0026] 根据本发明的一些实施例,利用PCR扩增细胞周期因子Y编码基因,其中,反应体系:A549肺腺癌细胞的cDNA 2 μ l,2U/ μ l pfuDNA聚合酶1 μ l,10mM dNTP 1 μ l、10mM上游引物和下游引物各1 μ l,10 \times PCR buffer 5 μ l,补水至50 μ l;反应条件:热启动95 $^{\circ}$ C5min;循环参数为:变性94 $^{\circ}$ C30s、退火温度62.5 $^{\circ}$ C45s、延伸72 $^{\circ}$ C1min共30个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min,4 $^{\circ}$ C终止反应,以便得到扩增后的细胞周期因子Y编码基因。由此,在该条件下,利用PCR进行细胞周期因子Y编码基因的扩增,扩增准确率更佳,速度更快。其中,在温度为62.5 $^{\circ}$ C条件下进行退火,即保证引物同目的序列有效退火,且非特异性结合率小,如果温度过高,引物不易同目的序列退火,而温度过低,非特异性结合率高。

[0027] S200将所得到的细胞周期因子Y编码基因亚克隆至质粒中

[0028] 根据本发明的实施例,将所得到的细胞周期因子Y编码基因亚克隆至质粒中,获得重组质粒。

[0029] 根据本发明的一些实施例,利用NcoI/XhoI酶切体系将扩增后的细胞周期因子Y编码基因双酶切后克隆至pET30a(+)质粒中,得到重组质粒,并对重组质粒进行扩增。在酶切连接到质粒后,在质粒上的终止密码子前有6个组氨酸表达的核酸序列,利用IPTG诱导启动子启动合成蛋白程序,通过起始密码子+目的基因+终止密码子,表达出蛋白。

[0030] S300利用重组质粒转化大肠杆菌

[0031] 根据本发明的实施例,利用重组质粒转化大肠杆菌,并对所得到的转化后的大肠杆菌进行培养,其中,在该培养过程中通过添加IPTG诱导细胞周期因子Y的表达。由此,IPTG诱导转化后的大肠杆菌的启动子启动合成蛋白程序,高效地表达细胞周期因子Y。

[0032] 根据本发明的具体实施例,利用重组质粒转化E.coli BL21大肠杆菌,并对转化后的大肠杆菌进行培养,当转化后的大肠杆菌的培养液的OD600为0.6时,向转化后的大肠杆菌培养液中加入IPTG,其中,IPTG的浓度为0.4mM/L,得到细胞周期因子Y,其中,该细胞周期因子Y是以组氨酸-细胞周期因子Y重组蛋白的形式存在的。由此,当转化后的大肠杆菌的培养液的OD600为0.6时,大肠杆菌处于对数生长期,用IPTG诱导表达后,更易得到蛋白产物。

[0033] S400纯化细胞周期因子Y

[0034] 根据本发明的实施例,纯化细胞周期因子Y。由此,从破壁的大肠杆菌中纯化细胞

周期因子Y,避免杂蛋白对细胞周期因子Y的影响。

[0035] 根据本发明的具体实施例,利用镍离子标记蛋白亲和层析柱纯化组氨酸-细胞周期因子Y重组蛋白。由于镍离子可以和组氨酸的咪唑环螯合,利用镍离子标记蛋白亲和层析柱可以简单、快速和高效地对组氨酸-细胞周期因子Y重组蛋白进行纯化。

[0036] 根据本发明实施例的方法,利用本发明的前述引物进行基因扩增,扩增的准确度高、速度快,并且细胞周期因子Y重组表达的效率。

[0037] 用于检测细胞周期因子Y抗体的试剂盒和方法

[0038] 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抗体的试剂盒。根据本发明的实施例,该试剂盒包括:固相载体,该固相载体上携带有前述所制备的细胞周期因子;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;以及终止液。由此,利用本发明的试剂盒,可以快速,可靠和有效地对血清中CCNY抗体进行检测,与免疫组织化学相比较,本发明的方法检测的灵敏度高,成本低,所需设备简单,检测样本易获得,操作方便,易于临床推广。

[0039] 根据本发明的一些实施例,该试剂盒进一步包括:标准品,该标准品为识别细胞周期因子Y的多克隆抗体;和标准品稀释液,该标准品稀释液的成份为:基于20ml标准品稀释液,含有0.08-0.12g的NaCl,0.002-0.008g的KCl,0.002-0.008g的KH₂PO₄和0.02-0.5g的Na₂HPO₄。

[0040] 根据本发明的一些实施例,多克隆抗体为兔源性多克隆抗体。由此,兔源性多克隆抗体与细胞周期因子Y亲和性好,便于进行定量检测。

[0041] 根据本发明的一些实施例,辣根酶标记抗体的成份:3-8 μ l辣根酶标记的羊抗人免疫球蛋白G溶液和3-8 μ l辣根酶标记的羊抗兔免疫球蛋白G溶液。由此,辣根酶标记抗体可以标记与细胞周期因子Y结合的人血清中的CCNY抗体和作为标准品的兔源性多克隆抗体,便于后续的吸光度检测,准确地确定CCNY抗体的浓度。

[0042] 根据本发明的一些实施例,辣根酶标记抗体稀释液的成份:基于20ml辣根酶标记抗体稀释液,含有0.05-0.15g的NaCl,0.002-0.008g的KCl,0.002-0.008g的KH₂PO₄和0.02-0.05g的Na₂HPO₄;洗涤浓缩液的成份:基于20ml洗涤浓缩液,含有1-3g的NaCl,0.05-0.15g的KCl,0.05-0.15g的KH₂PO₄,0.5-1.0g的Na₂HPO₄和200-600 μ l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:基于5ml底物显色液A,含有0.10-0.15g的醋酸钠,0.01-0.02g的柠檬酸和1-5 μ l体积百分浓度为30%的H₂O₂;底物显色液B的成份:基于5ml底物显色液B,含有0.001-0.003g的EDTA-钠,0.005-0.015g的柠檬酸,0.3-0.8ml的丙三醇和0.001-0.003g的四甲基联苯胺;以及终止液的成份:1-3mol/L H₂SO₄溶液。由此,利用上述成份的辣根酶标记抗体稀释液对辣根酶标记抗体进行稀释,可以均匀地稀释抗体,避免抗体凝聚和沉淀;洗涤浓缩液可以充分去除未结合的抗体和多肽等物质,避免影响实验结果的准确性;底物显色液的稳定性好,显色反应的灵敏度高,显色的颜色稳定,进而,检测结果更准确。

[0043] 根据本发明的再一方面,本发明提供了一种用于检测细胞周期因子Y抗体的方法。下面参考图2,根据本发明的实施例,对该方法进行解释说明,该方法包括:

[0044] S500:包被细胞周期因子Y至试剂板

[0045] 根据本发明的实施例,包被细胞周期因子Y至试剂板,4 $^{\circ}$ C过夜后洗板,得到包被细

胞周期因子Y的固相载体。由此,细胞周期因子Y抗体可以与包被细胞周期因子Y的固相载体结合,进而检测细胞周期因子Y抗体。根据本发明的一些实施例,该试剂板为平底聚乙烯96孔板。由此,细胞周期因子Y蛋白与试剂板的亲和能力强。

[0046] S600:加入2-10%胎牛血清封闭液进行封板

[0047] 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,避免其它蛋白与试剂板结合,产生假阳性结果,影响检测的准确性。

[0048] S700:加入梯度稀释后多克隆抗体和待检测的血清

[0049] 根据本发明的实施例,将识别细胞周期因子Y的多克隆抗体和待检测的血清进行梯度稀释,加入到封闭后的固相载体中,孵育后洗板。由此,将多克隆抗体和待检测的血清中的细胞周期因子Y抗体与细胞周期因子Y结合,以便检测血清中细胞周期因子Y抗体浓度。

[0050] 根据本发明的一些实施例,多克隆抗体为兔源性细胞周期因子Y多克隆抗体。

[0051] S800:加入辣根酶标记抗体

[0052] 根据本发明的实施例,向S700得到的固相载体中加入辣根酶标记抗体,孵育后洗板。由此,辣根酶标记抗体与结合在固相载体上的多克隆抗体和血清中的细胞周期因子Y抗体进行结合,便于后续的显色检测。

[0053] 根据本发明的一些实施例,辣根酶标记抗体为辣根酶标记的羊抗人免疫球蛋白G和羊抗兔免疫球蛋白G混合物。由此,辣根酶标记抗体可以标记与细胞周期因子Y结合的人血清中的CCNY抗体和作为标准品的兔源性多克隆抗体,便于后续的吸光度检测,准确地确定CCNY抗体的浓度。

[0054] S900:加入底物显色液

[0055] 根据本发明的实施例,向S800得到的固相载体中加入底物显色液。由此,底物显色液与结合在固相载体上的辣根酶标记抗体进行显色反应,进而检测结合到细胞周期因子Y上的抗体浓度。

[0056] S1000:加入终止液,终止反应,并检测OD450的值

[0057] 根据本发明的实施例,向S900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,判断血清中细胞周期因子Y抗体浓度。由此,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。

[0058] 根据本发明的一些实施例,该方法是利用前述的试剂盒进行的。由此,操作更简单,检测结果更准确。

[0059] 根据本发明实施例的方法,可以快速,可靠和有效地对血清中CCNY抗体进行检测,与免疫组织化学相比较,本发明的方法检测的灵敏度高,成本低,所需设备简单,检测样本易获得,操作方便,易于临床推广。

[0060] 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。

[0061] 实施例1

[0062] 利用PCR法对编码CCNY的基因进行扩增,具体如下:

[0063] (1)样本DNA的获取

[0064] 以A549肺腺癌细胞为原料收集样本DNA,具体方法如下:

[0065] A、收集A549肺腺癌细胞 1×10^6 个。

[0066] B、利用TRIzol RNA抽提试剂提取A549肺腺癌细胞的RNA样本。

[0067] 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。

[0068] (2)PCR反应

[0069] 上游引物:5'-TAACCCATGGGGAACACTACCTCGTGC-3'(SEQ ID NO:1)

[0070] 下游引物:5'-AATACTCGAGCTAAG AGATG ATGGC-3'(SEQ ID NO:2)

[0071] PCR反应体系:

[0072] cDNA模板 $2 \mu\text{l}$;

[0073] $2 \text{U}/\mu\text{l}$ pfuDNA聚合酶 $1 \mu\text{l}$;

[0074] 10mM dNTP $1 \mu\text{l}$;

[0075] 10mM 上、下游引物各 $1 \mu\text{l}$;

[0076] $10 \times$ PCR buffer $5 \mu\text{l}$;

[0077] 补水至 $50 \mu\text{l}$ 。

[0078] PCR条件:

[0079] 热启动 95°C 5min

变性 94°C 30s

[0080] 退火温度 62.5°C 45s } 30个循环

延伸 72°C 1min

[0081] 72°C 延伸10min

[0082] 4°C 终止反应。

[0083] (3)扩增产物的纯化

[0084] 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。

[0085] 本实施例中,上游引物和下游引物的GC含量高,引物和DNA模板的结合能力更强,并且该上游引物和下游引物中插入了酶切位点NcoI/XhoI,方便扩增得到的CCNY的编码基因与质粒的双酶切连接。

[0086] 对比例

[0087] 按照实施例1的方法,分别以下列引物对为PCR引物对编码CCNY的基因进行扩增,其中,引物对1和引物对3是对照引物,引物对2是实施例1所采用的引物对,上述引物对的序列如下:

[0088] 引物对1:上游引物:5'-ATGGGGAACACTAC-3'(SEQ ID NO:3)

[0089] 下游引物:5'-AATTCTCTACTACC-3'(SEQ ID NO:4)

[0090] 引物对2:上游引物:5'-TAACCCATGGGGAACACTACCTCGTGC-3'(SEQ ID NO:1)

[0091] 下游引物:5'-AATACTCGAGCTAAGAGATGATGGC-3'(SEQ ID NO:2)

[0092] 引物对3:上游引物:5'-ATGGGGAACACTACCTCGTG-3'(SEQ ID NO:5)

[0093] 下游引物:5'-AATTCTCTACTACCGACCCC-3'(SEQ ID NO:6)

[0094] 利用上述3对引物对针对编码CCNY的基因进行扩增,利用凝胶电泳对3组引物的扩增结果进行检测,结果如图4所示,引物对1扩增的条带杂乱不专一,在相同的扩增体系中,引物3虽然扩增出目的条带,但扩增的CCNY基因的能力没有引物对2强,由此,以本发明的引物对SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2扩增编码CCNY的基因,特异性强,扩增效率高。

[0095] 实施例2

[0096] 利用实施例1获得扩增后的CCNY的编码基因,制备His-CCNY重组蛋白的操作步骤如下:

[0097] (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(+).

[0098] (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。

[0099] (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50 μ l进行SDS-PAGE胶进行纯度的验证。

[0100] (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。

[0101] (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0.1 μ g,冷冻成粉末,放入-80 $^{\circ}$ C冻存备用。

[0102] (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40 μ l,加入10 μ l的5 \times 上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C加热10min,12000转/min离心,取上清15 μ l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 \geq 95%。

[0103] 实施例3

[0104] 利用实施例2获得的CCNY蛋白包被的酶标板,步骤如下

[0105] (1)取实施例2获得的His-CCNY重组蛋白,用包被缓冲液稀释成1 μ g/ml,得到包被液,4 $^{\circ}$ C保存,备用。

[0107] (2)将包被液加入至96孔平底聚苯乙烯试剂板,每孔加100 μ l,4 $^{\circ}$ C过夜。

[0108] (3)洗板三次,拍干板中液体,每孔加入200 μ l 5%胎牛血清封闭液,4 $^{\circ}$ C封闭过夜。

[0109] (4)洗板三次,拍干板中液体,得到包被CCNY蛋白的酶标板,4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0110] 实施例4

[0111] 本实施例的试剂盒应用酶联免疫分析法测定标本中CCNY抗体水平。向实施例3制备的包被CCNY蛋白的酶标板中分别加入标准品或检测样本,酶标抗体,经过彻底洗涤后加入TMB底物显色。TMB在过氧化物酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的CCNY抗体的含量呈正相关。用酶标仪在450nm波长下测定吸光度(O.D.值),计算样品浓度。

[0112] 试剂盒的组成:96孔板(预包被)1块,克隆抗体标准品2瓶,辣根过氧化物酶标记的抗体1 \times 10 μ l/管,多克隆抗体标准品稀释液1 \times 20ml,浓缩洗涤缓冲液(20 \times)1 \times 20ml,辣根

过氧化物酶标记的抗体稀释液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:

[0113] (1)多克隆抗体标准品(冻干品)

[0114] 兔源性CCNY多克隆抗体(购自Sigma,货号:HPA036290),每瓶含量为50ng,使用时,其每瓶多克隆抗体标准品加入多克隆抗体标准品稀释液1ml,盖好后室温静置大约10分钟,同时反复颠倒/搓动以助溶解,其浓度为50ng/ml。同时准备7个稀释多克隆抗体标准品的EP管,每个EP管中加入500 μ L的多克隆抗体标准品稀释液,依次倍比稀释成25ng/ml,12.5ng/ml,6.25ng/ml,3.12ng/ml,1.56ng/ml,0.78ng/ml,0.39ng/ml,多克隆抗体标准品稀释液(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。

[0115] (2)辣根过氧化物酶标记的抗体

[0116] 组成为:0.2 μ g/ml辣根酶标记的羊抗人IgG和0.2 μ g/ml羊抗兔IgG。用辣根过氧化物酶标记的抗体稀释液将10 μ l辣根过氧化物酶标记的抗体稀释成20ml,进行2000倍稀释。

[0117] (3)多克隆抗体标准品稀释液

[0118] 组成为:每20ml含有NaCl 0.1g,KCl 0.005g,KH₂PO₄0.005g,Na₂HPO₄0.036g,余量为去离子水。

[0119] (4)辣根过氧化物酶标记的抗体稀释液

[0120] 组成为:每20ml含有NaCl 0.1g,KCl 0.005g,KH₂PO₄0.005g,Na₂HPO₄0.036g,余量为去离子水。

[0121] (5)浓缩洗涤缓冲液

[0122] 组成为:每20ml含有NaCl 2g,KCl 0.1g,KH₂PO₄0.1g,Na₂HPO₄0.72g,吐温-20400 μ l,余量为去离子水。使用时,用380ml蒸馏水或去离子水将20ml浓缩洗涤缓冲液稀释至400ml,进行20倍稀释。

[0123] (6)底物显色液A

[0124] 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H₂O₂3 μ l,余量为去离子水,避光保存。

[0125] (7)底物显色液B

[0126] 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。

[0127] (8)终止液

[0128] 组成为:2mol/l H₂SO₄0.6ml,余量为去离子水。

[0129] (9)酶标板

[0130] 实施例3制备得到的CCNY蛋白包被的酶标板。

[0131] 实施例5

[0132] 检测实施例4的试剂盒的检测范围和灵敏度,具体如下:

[0133] (1)将多克隆抗体标准品用多克隆抗体稀释液倍比稀释10次,浓度从100ng/ml至0.0975ng/ml。

[0134] (2)加样:将步骤(1)得到的多克隆抗体标准品的10个稀释浓度的样本加入酶标板,100 μ l/孔,3复孔,37 $^{\circ}$ C,2h。

[0135] (3)弃去液体,洗涤缓冲液300 μ l/孔,洗板三次,拍干。

[0136] (4)每孔加入酶标抗体100 μ l,37 $^{\circ}$ C,1h。

[0137] (5)弃去步骤(4)酶标板中的液体,洗涤缓冲液300 μ l/孔,洗板三次,拍干。

[0138] (6)将底物显色液A和B等体积充分混合,得到混合液,依次加入混合液100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C避光显色15-30min。

[0139] (7)依次加入终止液50 μ l,终止反应,用酶标仪在450nm波长读数(OD值),结果见下表,多克隆抗体标准品的标准曲线如图3所示,结果表明:试剂盒的检测灵敏度为0.195ng/ml,检测范围为0.39ng/ml-50ng/ml。

[0140]

| | | | | | | | | | | | | |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 浓 度 ng/ml | 100 | 50 | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.125 | 1.56 | 0.78 | 0.39 | 0.195 | 0.098 | 空白 |
| OD 均值 | 3.167 | 2.043 | 1.172 | 0.583 | 0.299 | 0.183 | 0.122 | 0.089 | 0.059 | 0.051 | 0.048 | 0.043 |

[0141] 实施例6

[0142] 测定实施例4的试剂盒的批内和批间的变异系数,具体如下:

[0143] 1、批内变异系数:

[0144] 将3个浓度分别为6.25ng/ml的细胞周期因子Y标准品溶液,按照实施例5的方法,在一块酶标板上分别测定30次,具体结果如下:

[0145]

| 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 | 6.018287 | 7 | 6.14224 | 13 | 6.229134 | 19 | 6.359775 | 25 | 6.215418 | |
| 2 | 6.071759 | 8 | 6.170491 | 14 | 6.252637 | 20 | 6.358961 | 26 | 6.170769 | |
| 3 | 5.984854 | 9 | 6.110372 | 15 | 6.387755 | 21 | 6.094935 | 27 | 6.220467 | |
| 4 | 6.007436 | 10 | 6.10959 | 16 | 6.341868 | 22 | 6.149088 | 28 | 6.249078 | |
| 5 | 6.137254 | 11 | 6.263931 | 17 | 6.392944 | 23 | 6.061077 | 29 | 6.188193 | |
| 6 | 6.093167 | 12 | 6.319585 | 18 | 6.422348 | 24 | 6.083946 | 30 | 6.187401 | |
| 平均浓度 | | 6.1931586 | | | | SD | | 0.122145 | | |

[0146] 该试剂盒的批内变异系数(CV): $CV = (\text{批内标准差}/\text{平均值}) \times 100\% = 0.122145/6.1931586 \times 100\% = 1.972\%$, $CV < 10\%$,符合规定。

[0147] 2、批间变异系数:

[0148] 将浓度为6.25ng/ml,的细胞周期因子Y抗体标准品溶液,按照实施例5的方法,由4名工作人员共测定30次,具体结果如下:

[0149]

| 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 | 6.1565 | 7 | 6.2833 | 13 | 6.428415 | 19 | 6.563235 | 25 | 6.262505 | |
| 2 | 6.2112 | 8 | 6.3122 | 14 | 6.45267 | 20 | 6.562395 | 26 | 6.217517 | |
| 3 | 6.1223 | 9 | 6.2507 | 15 | 6.59211 | 21 | 6.141109 | 27 | 6.267592 | |
| 4 | 6.1454 | 10 | 6.2499 | 16 | 6.544755 | 22 | 6.195672 | 28 | 6.29642 | |
| 5 | 6.2782 | 11 | 6.464325 | 17 | 6.597465 | 23 | 6.106994 | 29 | 6.235073 | |
| 6 | 6.2331 | 12 | 6.52176 | 18 | 6.62781 | 24 | 6.130037 | 30 | 6.234275 | |
| 平均浓度 | | 6.3228311 | | | | SD | | 0.165469 | | |

[0150] 该试剂盒的批间变异系数(CV): $CV = (\text{批间标准差}/\text{平均值}) \times 100\% = 0.165469/$

$6.3228311 \times 100\% = 2.617\%$, $CV < 10\%$, 符合规定。

[0151] 综上所述,通过测定血清细胞周期因子Y抗体检测试剂盒批内和批间的变异系数,批内变异系数为1.972%,批间变异系数为2.617%,二者均小于10%,表明该试剂盒具有很好的稳定性。

[0152] 实施例7

[0153] 利用实施例4的试剂盒测定人血液中CCNY抗体的含量,具体方法如下:

[0154] 1、标本的采集及保存:

[0155] (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。

[0156] (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,将分装好的上清置于-80℃保存,但应避免反复冻融。

[0157] 2、试剂准备:

[0158] (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。

[0159] (2)多克隆抗体标准品(冻干品):每瓶多克隆抗体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/搓动以助溶解,其浓度为50ng/ml。同时准备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25ng/ml,12.5ng/ml,6.25ng/ml,3.12ng/ml,1.56ng/ml,0.78ng/ml,0.39ng/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。

[0160] (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10μl辣根过氧化物酶标抗体稀释成20ml,进行2000倍稀释。

[0161] (4)浓缩洗涤缓冲液:用380ml蒸馏水或去离子水将20ml浓缩洗涤缓冲液稀释至400ml,进行20倍稀释,得到洗涤液。

[0162] 3、操作步骤:

[0163] (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100μL不同浓度的标准品(见试剂准备(2)),空白孔加100μL(见试剂准备(2)),余孔加待测样品100μL,37℃温育2小时,多克隆抗体和待测样品中的CCNY抗体将于酶标板上的CCNY蛋白结合。

[0164] (2)弃去液体,甩干,每孔用350μL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。

[0165] (3)每孔加入辣根过氧化物酶标抗体100μl,37℃温育1小时,辣根过氧化物酶标抗体将与酶标板捕获的多克隆抗体和待测样品中的CCNY抗体结合。

[0166] (4)弃去孔内液体,甩干,洗板5次,方法同步骤(2)。

[0167] (5)将底物显色液A和底物显色液B等体积充分混匀后,每孔90μl,37℃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的催化下,转化为蓝色,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,

[0168] (6)每孔加终止溶液50μL,终止反应,此时蓝色立转黄色,颜色的深浅与样品中CCNY抗体的含量呈正相关。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。

[0169] (7)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(OD值)。

[0170] 4、结果计算:

[0171] 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,标准曲线可参考图3,(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)。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。

[0172] 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。

[0173] 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> 引物对、制备细胞周期因子 Y 的方法及其应用
- <130> PIDC3154715
- <160> 6
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 27
- <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- <223> 引物
- <400> 1
- [0001] taaccctatgg ggaacactac ctcgtgc 27
- <210> 2
- <211> 25
- <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- <223> 引物
- <400> 2
- aaactctgag ctaagagatg atggc 25
- <210> 3
- <211> 14
- <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- <223> 引物

| | | |
|--------|-----------------------|----|
| | <400> 3 | |
| | atggggaaca ctac | 14 |
| | <210> 4 | |
| | <211> 14 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> 引物 | |
| | <400> 4 | |
| | aattctctac tacc | 14 |
| | <210> 5 | |
| | <211> 20 | |
| [0002] | <212> DNA | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> 引物 | |
| | <400> 5 | |
| | atggggaaca ctacctgtg | 20 |
| | <210> 6 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> 引物 | |
| | <400> 6 | |
| | aattctctac taccgacccc | 20 |

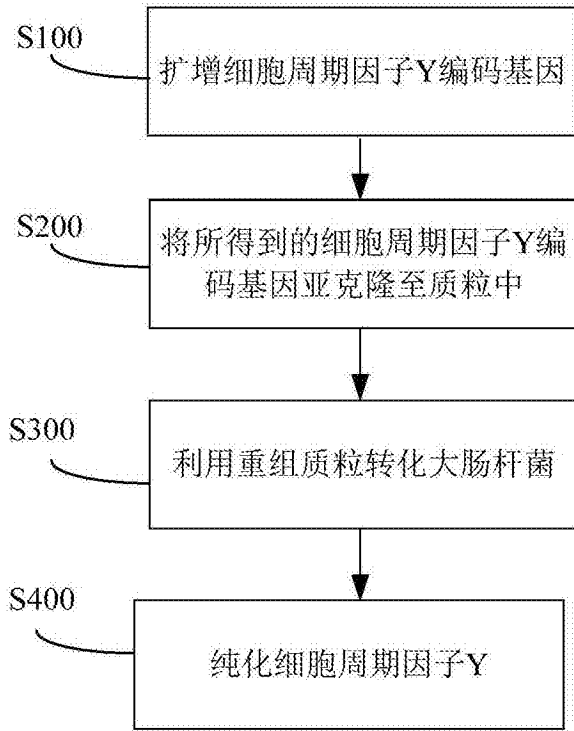


图1

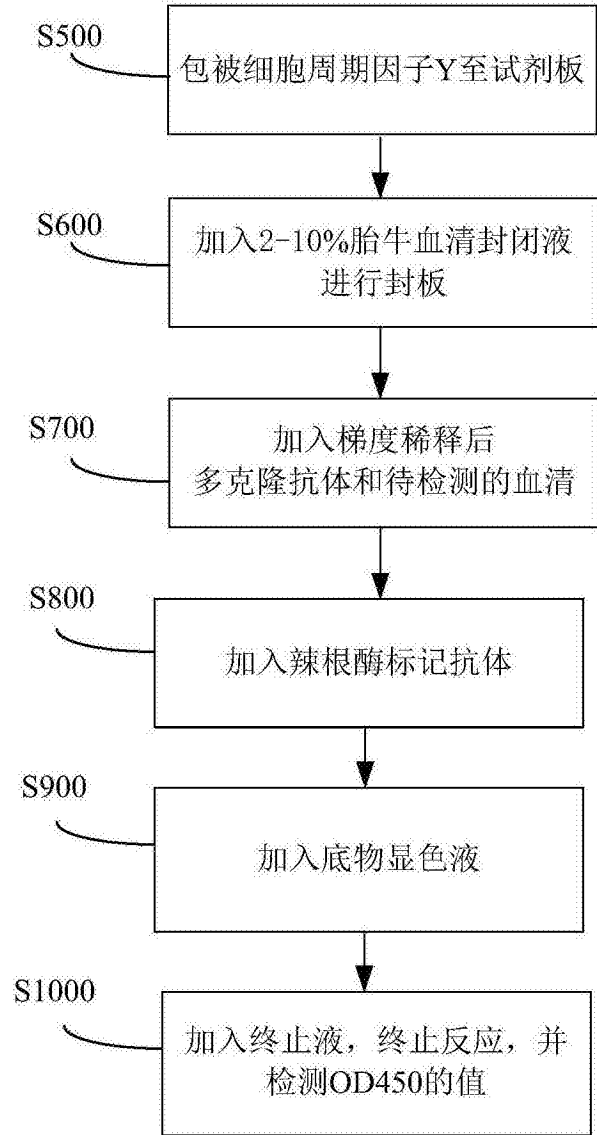


图2

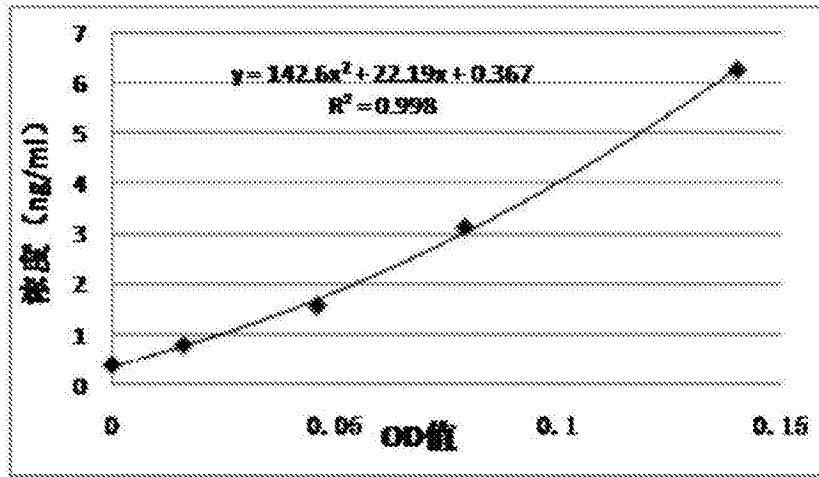


图3

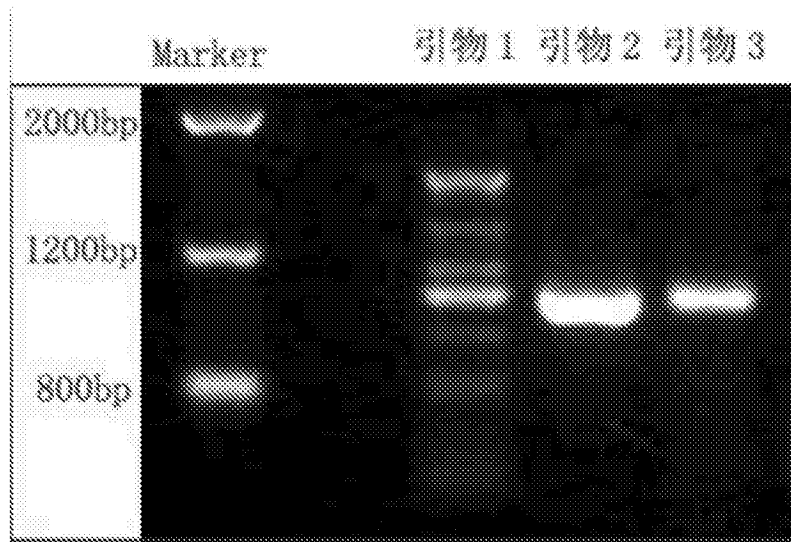


图4

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 引物对、制备细胞周期因子Y的方法及其应用 | | |
| 公开(公告)号 | CN105462966A | 公开(公告)日 | 2016-04-06 |
| 申请号 | CN201510809761.6 | 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 马丽 滕宇 张丽娜 顾勐 王玥 | | |
| 发明人 | 岳文涛 马丽 滕宇 张丽娜 顾勐 王玥 | | |
| IPC分类号 | C12N15/11 C12N15/70 G01N33/531 G01N33/68 | | |
| CPC分类号 | C07K14/4738 C12N15/11 C12N15/70 C12N2800/101 G01N33/531 G01N33/6872 G01N2333/4739 | | |
| 代理人(译) | 李志东 | | |
| 其他公开文献 | CN105462966B | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了引物对、制备细胞周期因子Y的方法以及用于检测细胞周期因子Y抗体的试剂盒和方法，其中，引物对具有SEQ ID NO：1和2所示的核苷酸序列。利用本发明的引物对扩增细胞周期因子Y的编码基因，进而合成细胞周期因子Y，并利用细胞周期因子Y包被试剂板得到固相载体，制备检测血清中细胞周期因子Y抗体试剂盒，或检测血清中细胞周期因子Y抗体。本发明的试剂盒和检测方法，灵敏度高、准确性好、成本低，操作简单，可应用于血清和血浆中细胞周期因子Y抗体的检测。

