



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109752547 A

(43)申请公布日 2019.05.14

(21)申请号 201811546055.7

C12N 15/70(2006.01)

(22)申请日 2018.12.17

C07K 19/00(2006.01)

(71)申请人 杭州京北生物科技有限公司

地址 311305 浙江省杭州市临安区青山湖  
科技城创业街178号

(72)发明人 唐东起 周扬 陈政鑫

(74)专利代理机构 杭州杭诚专利事务所有限公  
司 33109

代理人 尉伟敏

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页

序列表1页

(54)发明名称

一种乳腺癌自身免疫抗体检测试剂盒及其  
制备方法与应用

(57)摘要

本发明的试剂盒采用基因重组Renilla-多  
抗原融合蛋白来检测血清中的乳腺癌相关自身  
免疫抗体,具有较高灵敏度与特异性,为乳腺癌  
的诊断提供依据,为进一步病理学诊断提供筛选  
条件。检测快速方便,检测结果准确,对患者无伤  
害且无放射免疫的污染,可以满足临床诊断的需  
要,尤其是基层医疗机构和社区全科医生的需  
求,市场前景广阔。

1. 一种乳腺癌自身免疫抗体检测试剂盒，其特征在于，所述试剂盒含有融合蛋白、缓存液1、酶底物、缓存液2、阴性对照品、阳性对照品与96孔板。

2. 根据权利要求1所述的一种乳腺癌自身免疫抗体检测试剂盒，其特征在于，所述融合蛋白由以下方法制备：选取荧光素酶基因和多抗原基因的目的序列HER2抗原基因序列、MUC1抗原基因序列，进行PCR扩增，在kpn1位点GGTACC引入限制性内切酶，获得目的片段，做凝胶电泳进行鉴定；

根据HER2基因序列Genebank:NC\_000017.11设计引物，

正向引物5'CGGGGTACCCCGATGCCCGG3'，

反向引物5'TGCTCTAGATCACACTGG3'，以健康人血清为模板，PCR扩增基因；

根据MUC1基因序列Genebank:NC\_000001.11设计引物，

正向引物5'CGGGGTACCCCGATGACACCG3'，

反向引物5'TGCTCTAGACTACAAGTT3'，以健康人血清为模板，PCR扩增基因；

将获得的目的片段与PA0815载体质粒分别进行kpn1和xba1双酶切，并使用T4连接酶将目的基因与载体基因连接得到重组质粒；

质粒转化与扩繁提取：

将重组质粒转化到感受态大肠杆菌中，进行大肠杆菌菌种扩繁，提取重组质粒；

融合蛋白的获取：

将293改良细胞复苏后37℃，5%二氧化碳培养箱，DMEM培养基培养40-60h，进行细胞传代继续培养40-60h后使用重组质粒进行细胞转染实验，继续在相同条件下培养48h后，使用0.01~0.02mol/L, pH7.0~8.0PBS缓冲液收集细胞；

重组融合蛋白的纯化：

将收集的细胞用硫酸铵沉淀法进行分级沉淀，沉淀物经0.05~0.08mol/L Tris-HCl缓冲液冲洗2~3次，后冻干备用；

所得融合蛋白用0.01~0.02mol/L, pH7.0~8.0PBS磷酸盐缓冲液进行一定倍数的梯度稀释得融合蛋白稀释液，要求融合蛋白稀释液每10微升中有107个荧光单位。

3. 根据权利要求2所述的一种乳腺癌自身免疫抗体检测试剂盒，其特征在于，所述荧光素酶基因为Ranilla荧光素酶基因。

4. 根据权利要求2所述的一种乳腺癌自身免疫抗体检测试剂盒，其特征在于，细胞转染实验的方法为磷酸钙转染方法。

5. 一种如权利要求1所述的乳腺癌自身免疫抗体检测试剂盒的制备方法，其特征在于，所述制备方法为：

荧光素酶基因与抗原基因的融合载体的构建：

选取荧光素酶基因和多抗原基因的目的序列HER2抗原基因序列、MUC1抗原基因序列，进行PCR扩增，在kpn1位点GGTACC引入限制性内切酶，获得目的片段，做凝胶电泳进行鉴定；

根据HER2基因序列Genebank:NC\_000017.11设计引物，

正向引物5'CGGGGTACCCCGATGCCCGG3'，

反向引物5'TGCTCTAGATCACACTGG3'，以健康人血清为模板，PCR扩增基因；

根据MUC1基因序列Genebank:NC\_000001.11设计引物，

正向引物5'CGGGGTACCCCGATGACACCG3'，

反向引物5' TGCTCTAGACTACAAGTT3', 以健康人血清为模板, PCR扩增基因;

将获得的目的片段与PA0815载体质粒分别进行kpn1和xba1双酶切, 并使用T4连接酶将目的基因与载体基因连接得到重组质粒;

质粒转化与扩繁提取:

将重组质粒转化到感受态大肠杆菌中, 进行大肠杆菌菌种扩繁, 提取重组质粒;

融合蛋白的获取:

将293改良细胞复苏后37℃, 5%二氧化碳培养箱, DMEM培养基培养40~60h, 进行细胞传代继续培养40~60h后使用重组质粒进行细胞转染实验, 继续在相同条件下培养48h后, 使用0.01~0.02mol/L, pH7.0~8.0PBS缓冲液收集细胞;

重组融合蛋白的纯化:

将收集的细胞用硫酸铵沉淀法进行分级沉淀, 沉淀物经0.05~0.08mol/L Tris-HCl缓冲液冲洗2~3次, 后冻干备用;

所得融合蛋白用0.01~0.02mol/L, pH7.0~8.0PBS磷酸盐缓冲液进行一定倍数的梯度稀释得融合蛋白稀释液, 要求融合蛋白稀释液每10微升中有107个荧光单位。

6. 一种如权利要求1所述的乳腺癌自身免疫抗体检测试剂盒的应用, 其特征在于, 反应体系的组成:融合蛋白、PBS缓冲液、荧光素酶底物、标准品、检测样品;

1. 融合蛋白准备:用2ml ddH2O复溶融合蛋白冻干粉, 吸打混匀并转移至2mlEP管中, 12000rpm离心1min, 转移上清至另一新的离心管中, 4℃保存备用;

2. 试剂用量及孵育:在酶标板中, 分别加入检测样品与阴性对照品, 加入孵育缓冲液, 采用一步法进行孵育;

3. 孵育:在微孔中加入10ul样品, 20ul融合蛋白, 70ul孵育缓冲液的混合液100ul/孔, 置全自动荧光测定仪中30℃, 300rpm振荡孵育60min;

4. 洗涤:孵育结束后弃上清, 每孔加入200ul PBS, 弃上清, 扣干, 再重复四次, 共五次;

5. 检测:加入70ulPBS, 再加入现配的30ul 1×底物, 立即检测。

## 一种乳腺癌自身免疫抗体检测试剂盒及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及试剂盒，尤其涉及一种检测快速方便，检测结果准确，对患者无伤害且无放射免疫的污染，可以满足临床诊断的需要的乳腺癌自身免疫抗体检测试剂盒及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 目前市场上检测乳腺癌相关的检测试剂盒一般检测的肿瘤标志物一般为抗原、易感基因与抑癌基因以及表皮生长因子受体-2(Her-2)等，具体如下：

癌胚抗原(CEA)、铁蛋白、单克隆抗体CA(CA153、CA549)、表皮生长因子受体-2(Her-2)、雌激素，孕激素，雌激素受体和孕激素受体(ER、PR)、上皮生长因子受体(EGFR)、抑癌基因P53、易感基因BRCA1、BRCA2、自身抗体MMP-7以及IGBR、CD117、BCL-2、PCNA等。

[0003] 关于自身免疫抗体的检测试剂盒较少。已有的较少的试剂盒一般采用酶联免疫法(ELISA)，或者胶体金的方法。

[0004] ELISA：将抗原重组蛋白包被在酶标板上，使用惰性蛋白封闭后使用。在酶标孔中加入标准品或样品进行孵育，再加入联有辣根过氧化物酶的抗人IgG的抗体后继续反应，加入底物反应，终止反应后测得OD450nm的吸光度值，即可反应样本中目标抗体的含量。

[0005] 首先目前市场上存在的自身免疫抗体检测试剂盒较少，其他类别肿瘤标志物对于疾病诊断结果的判断依据不如自身免疫抗体的指标精确。

[0006] 其次酶联免疫法(ELISA)的方法检测耗时长，结果测定不准确，特异性与灵敏度不高，影响结果准确性的干扰因素较多。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的在于为了解决现有乳腺癌相关的检测试剂盒较少，检测耗时长，结果测定不准确，特异性与灵敏度不高，影响结果准确性的干扰因素较多的缺陷而提供一种检测快速方便，检测结果准确，对患者无伤害且无放射免疫的污染，可以满足临床诊断的需要的乳腺癌自身免疫抗体检测试剂盒。

[0008] 本发明另一个目的是为了提供该试剂盒的制备方法与应用。

[0009] 为了实现上述目的，本发明采用以下技术方案：

一种乳腺癌自身免疫抗体检测试剂盒，所述试剂盒含有融合蛋白、缓存液1、酶底物、缓存液2、阴性对照品、阳性对照品与96孔板。

[0010] 在本技术方案中，本发明的试剂盒，使用化学发光免疫的方法，使用荧光素酶与抗原连接的融合蛋白进行目的抗体的筛选，加入底物后通过测定荧光检测值的大小来定量的判定样本中目的抗体的含量，通过综合数据分析后，为临床早期筛选与诊断癌症时期提供有效的依据。该试剂盒采用基因重组Renilla-多抗原融合蛋白来检测血清中的乳腺癌相关自身免疫抗体，具有较高灵敏度与特异性，为乳腺癌的诊断提供依据，为进一步病理学诊断提供筛选条件。检测快速方便，检测结果准确，对患者无伤害且无放射免疫的污染，可以满

足临床诊断的需要,尤其是基层医疗机构和社区全科医生的需求,市场前景广阔。

[0011] 作为优选,所述融合蛋白由以下方法制备:选取荧光素酶基因和多抗原基因的目的序列HER2抗原基因序列、MUC1抗原基因序列,进行PCR扩增,在kpn1位点GGTACC引入限制性内切酶,获得目的片段,做凝胶电泳进行鉴定;

根据HER2基因序列Genebank:NC\_000017.11设计引物,

正向引物5'CGGGGTACCCCGATGCCCGG3',

反向引物5'TGCTCTAGATCACACTGG3',以健康人血清为模板,PCR扩增基因;

根据MUC1基因序列Genebank:NC\_000001.11设计引物,

正向引物5'CGGGGTACCCCGATGACACCG3',

反向引物5'TGCTCTAGACTACAAGTT3',以健康人血清为模板,PCR扩增基因;

将获得的目的片段与PA0815载体质粒分别进行kpn1和xba1双酶切,并使用T4连接酶将目的基因与载体基因连接得到重组质粒;

质粒转化与扩繁提取:

将重组质粒转化到感受态大肠杆菌中,进行大肠杆菌菌种扩繁,提取重组质粒;

融合蛋白的获取:

将293改良细胞复苏后37℃,5%二氧化碳培养箱,DMEM培养基培养40~60h,进行细胞传代继续培养40~60h后使用重组质粒进行细胞转染实验,继续在相同条件下培养48h后,使用0.01~0.02mol/L,pH7.0~8.0PBS缓冲液收集细胞;

重组融合蛋白的纯化:

将收集的细胞用硫酸铵沉淀法进行分级沉淀,沉淀物经0.05~0.08mol/L Tris-HCl缓冲液冲洗2~3次,后冻干备用;

所得融合蛋白用0.01~0.02mol/L,pH7.0~8.0PBS磷酸盐缓冲液进行一定倍数的梯度稀释得融合蛋白稀释液,要求融合蛋白稀释液每10微升中有107个荧光单位。

[0012] 作为优选,所述荧光素酶基因为Ranilla荧光素酶基因。

[0013] 作为优选,细胞转染实验的方法为磷酸钙转染方法。

[0014] 一种乳腺癌自身免疫抗体检测试剂盒的制备方法,所述制备方法为:

荧光素酶基因与抗原基因的融合载体的构建:

选取荧光素酶基因和多抗原基因的目的序列HER2抗原基因序列、MUC1抗原基因序列,进行PCR扩增,在kpn1位点GGTACC引入限制性内切酶,获得目的片段,做凝胶电泳进行鉴定;

根据HER2基因序列Genebank:NC\_000017.11设计引物,

正向引物5'CGGGGTACCCCGATGCCCGG3',

反向引物5'TGCTCTAGATCACACTGG3',以健康人血清为模板,PCR扩增基因;

根据MUC1基因序列Genebank:NC\_000001.11设计引物,

正向引物5'CGGGGTACCCCGATGACACCG3',

反向引物5'TGCTCTAGACTACAAGTT3',以健康人血清为模板,PCR扩增基因;

将获得的目的片段与PA0815载体质粒分别进行kpn1和xba1双酶切,并使用T4连接酶将目的基因与载体基因连接得到重组质粒;

质粒转化与扩繁提取:

将重组质粒转化到感受态大肠杆菌中,进行大肠杆菌菌种扩繁,提取重组质粒;

### 融合蛋白的获取：

将293改良细胞复苏后37℃,5%二氧化碳培养箱,DMEM培养基培养40-60h,进行细胞传代继续培养40-60h后使用重组质粒进行细胞转染实验,继续在相同条件下培养48h后,使用0.01~0.02mol/L,pH7.0~8.0PBS缓冲液收集细胞;

### 重组融合蛋白的纯化：

将收集的细胞用硫酸铵沉淀法进行分级沉淀,沉淀物经0.05~0.08mol/L Tris-HCl缓冲液冲洗2~3次,后冻干备用;

所得融合蛋白用0.01~0.02mol/L,pH7.0~8.0PBS磷酸盐缓冲液进行一定倍数的梯度稀释得融合蛋白稀释液,要求融合蛋白稀释液每10微升中有107个荧光单位。

[0015] 一种乳腺癌自身免疫抗体检测试剂盒的应用,,反应体系的组成:融合蛋白、PBS缓冲液、荧光素酶底物、标准品、检测样品;

1.融合蛋白准备:用2ml ddH<sub>2</sub>O复溶融合蛋白冻干粉,吸打混匀并转移至2mlEP管中,12000rpm离心1min,转移上清至另一新的离心管中,4℃保存备用;

2.试剂用量及孵育:在酶标板中,分别加入检测样品与阴性对照品,加入孵育缓冲液,采用一步法进行孵育;

3.孵育:在微孔中加入10ul样品,20ul融合蛋白,70ul孵育缓冲液的混合液100ul/孔,置全自动荧光测定仪中30℃,300rpm振荡孵育60min;

4.洗涤:孵育结束后弃上清,每孔加入200ul PBS,弃上清,扣干,再重复四次,共五次;

5.检测:加入70ulPBS,再加入现配的30ul 1×底物,立即检测。

[0016] 本发明的有益效果是本发明的试剂盒采用基因重组Renilla-多抗原融合蛋白来检测血清中的乳腺癌相关自身免疫抗体,具有较高灵敏度与特异性,为乳腺癌的诊断提供依据,为进一步病理学诊断提供筛选条件。检测快速方便,检测结果准确,对患者无伤害且无放射免疫的污染,可以满足临床诊断的需要,尤其是基层医疗机构和社区全科医生的需求,市场前景广阔。

## 具体实施方式

[0017] 以下通过具体实施例对本发明作进一步的解释:

在本发明中,其余未详细说明的试剂,方法均为本领域常规手段。

[0018] 实施例一种乳腺癌自身免疫抗体检测试剂盒,所述试剂盒含有融合蛋白、缓存液1(磷酸盐吐温缓冲液)、酶底物(海肾荧光素酶底物)、缓存液2(荧光素酶底物检测缓冲液)、阴性对照品、阳性对照品与96孔板。

[0019] 乳腺癌自身免疫抗体检测试剂盒的制备方法,所述制备方法为:

### 荧光素酶基因与抗原基因的融合载体的构建:

选取荧光素酶基因和多抗原基因的目的序列HER2抗原基因序列、MUC1抗原基因序列,进行PCR扩增,在kpn1位点ggtacc引入限制性内切酶,获得目的片段,做凝胶电泳进行鉴定;根据HER2基因序列Genebank:NC\_000017.11设计引物,

正向引物5'cggttttacccgatccccgg3',

反向引物5'tgctcttagatcacactgg3',以健康人血清为模板,PCR扩增基因;

根据MUC1基因序列Genebank:NC\_000001.11设计引物,

正向引物5'cggttacccgatgacaccg3',

反向引物5'tgctctagactacaagg3',以健康人血清为模板,PCR扩增基因;

将获得的目的片段与PA0815载体质粒分别进行kpn1和xba1双酶切,并使用T4连接酶将目的基因与载体基因连接得到重组质粒;

质粒转化与扩繁提取:

将重组质粒转化到感受态大肠杆菌中,进行大肠杆菌菌种扩繁,提取重组质粒;

融合蛋白的获取:

将293改良细胞复苏后37℃,5%二氧化碳培养箱,DMEM培养基培养40~60h,进行细胞传代继续培养40~60h后使用重组质粒进行细胞转染实验,继续在相同条件下培养48h后,使用0.01~0.02mol/L,pH7.0~8.0PBS缓冲液收集细胞;

重组融合蛋白的纯化:

将收集的细胞用硫酸铵沉淀法进行分级沉淀,沉淀物经0.05~0.08mol/L Tris-HCl缓冲液冲洗2~3次,后冻干备用;

所得融合蛋白用0.01~0.02mol/L,pH7.0~8.0PBS磷酸盐缓冲液进行一定倍数的梯度稀释得融合蛋白稀释液,要求融合蛋白稀释液每10微升中有107个荧光单位。

[0020] 乳腺癌自身免疫抗体检测试剂盒的应用,反应体系的组成:融合蛋白、PBS缓冲液、荧光素酶底物、标准品、检测样品;

1.融合蛋白准备:用2ml ddH2O复溶融合蛋白冻干粉,吸打混匀并转移至2mlEP管中,12000rpm离心1min,转移上清至另一新的离心管中,4℃保存备用;

2.试剂用量及孵育:在酶标板中,分别加入检测样品与阴性对照品,加入孵育缓冲液,采用一步法进行孵育;

3.孵育:在微孔中加入10ul样品,20ul融合蛋白,70ul孵育缓冲液的混合液100ul/孔,置全自动荧光测定仪中30℃,300rpm振荡孵育60min;

4.洗涤:孵育结束后弃上清,每孔加入200ul PBS,弃上清,扣干,再重复四次,共五次;

5.检测:加入70ulPBS,再加入现配的30ul 1×底物,立即检测。

[0021] 阴性参考品符合率: $\geq 95\%$

阳性参考品符合率: $\geq 95\%$

精密性:三组已知的高、中、低浓度样品,进行二十次在同一个板块内精度评估,批内变异系数CV%小于10%。

[0022] 批间误差:变异系数CV% $\leq 15\%$ 。

[0023] 灵敏度:多次重复结果表示,最低检出量为10ng/mL。

[0024] 稳定性符合注册产品标准要求。

## 序列表

<110> 杭州京北生物科技有限公司  
<120> 一种乳腺癌自身免疫抗体检测试剂盒及其制备方法与应用  
<160> 5  
<170> SIPOSequenceListing 1.0  
<210> 1  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> HER2正向引物(2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum)  
<400> 1  
cgggtaccc cgatccccg g 21  
<210> 2  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> HER2反向引物(2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum)  
<400> 2  
tgctctagat cacactgg 18  
<210> 3  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> MUC1正向引物(2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum)  
<400> 3  
cgggtaccc cgatgacacc g 21  
<210> 4  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> MUC1反向引物(2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum)  
<400> 4  
tgctctagac tacaagtt 18  
<210> 5  
<211> 6  
<212> DNA  
<213> kpn1位点(2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum)  
<400> 5  
ggtacc 6

专利名称(译)	一种乳腺癌自身免疫检测试剂盒及其制备方法与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN109752547A</a>	公开(公告)日	2019-05-14
申请号	CN201811546055.7	申请日	2018-12-17
[标]申请(专利权)人(译)	杭州京北生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	杭州京北生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	杭州京北生物科技有限公司		
[标]发明人	唐东起 周扬 陈政鑫		
发明人	唐东起 周扬 陈政鑫		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/68 G01N33/58 G01N33/533 C12N15/62 C12N15/70 C07K19/00		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

#### 摘要(译)

本发明的试剂盒采用基因重组Renilla-多抗原融合蛋白来检测血清中的乳腺癌相关自身免疫抗体，具有较高灵敏度与特异性，为乳腺癌的诊断提供依据，为进一步病理学诊断提供筛选条件。检测快速方便，检测结果准确，对患者无伤害且无放射免疫的污染，可以满足临床诊断的需要，尤其是基层医疗机构和社区全科医生的需求，市场前景广阔。