



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106405111 A

(43)申请公布日 2017.02.15

(21)申请号 201610814364.2

(22)申请日 2016.09.10

(71)申请人 天津大学

地址 300072 天津市南开区卫津路92号天津大学

(72)发明人 常津 武玉东 宫晓群

(74)专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代理事务所 12201

代理人 王丽

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

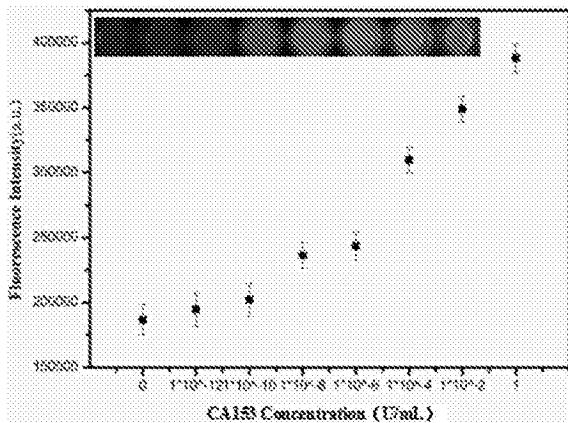
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

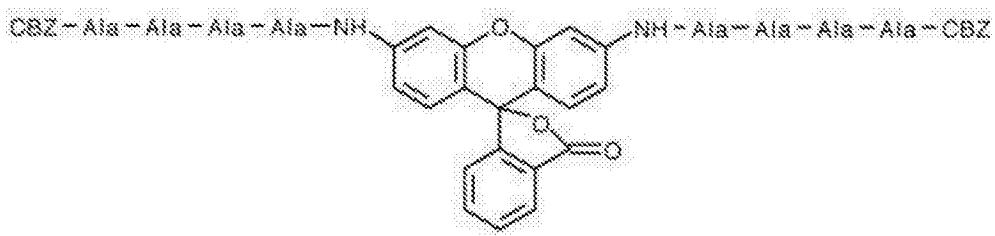
基于弹性蛋白酶荧光底物检测乳腺癌肿瘤标志物CA153的酶联免疫试剂盒制备方法

(57)摘要

本发明涉及基于弹性蛋白酶荧光底物检测乳腺癌肿瘤标志物CA153的酶联免疫试剂盒制备方法；将结合酶联免疫检测和荧光检测两种技术，利用弹性蛋白酶和肿瘤标志物相应抗体Ab₂制得检测探针。探针、肿瘤标志物和包埋在酶联免疫ELISA试剂盒的另一种肿瘤标志物抗体Ab₁通过抗体抗原之间的作用，形成一种夹心的结构，最后通过酶和荧光底物的作用产生荧光，对CA153这种乳腺癌相关肿瘤标志物进行定性定量的检测，建立蛋白标志物检测的方法。本发明整个制备过程简单，适合于产业化生产；根据荧光底物的荧光特性，以及与酶的作用，可定性定量检测蛋白标志物，且特异性良好；整个检测过程，建立了一种蛋白标志物检测的新方法。



1. 一种基于弹性蛋白酶荧光底物检测乳腺癌肿瘤标志物CA153的酶联免疫试剂盒制备方法, 其特征是选用弹性蛋白酶荧光底物(CBZ-Ala-Ala-Ala-Ala)₂-R110特异性降解产生的荧光对乳腺癌肿瘤标志物CA153进行定量检测, 其结构式如下:



2. 权利要求1的基于弹性蛋白酶荧光底物检测乳腺癌肿瘤标志物CA153的酶联免疫试剂盒制备方法, 其特征在于步骤如下:

1) 将新配制的高碘酸钠NaIO₄溶液加入到弹性蛋白酶Elastase溶液中, 室温下避光搅拌后, 用醋酸盐缓冲液透析过夜处理, 通过加入碳酸盐缓冲液使体系pH达到9.0~9.3, 立即加入CA153标记抗体Ab₂, 室温下避光搅拌后加入少量硼氢化钠NaBH₄充分反应后用PBS缓冲液透析过夜, 得到酶联检测探针Elastase-Ab₂;

2) 将CA153包被抗体Ab₁加入96孔酶标板, 静置过夜处理后用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板, 加入BSA封闭处理后再次用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板, 之后加入标准CA153抗原或病人样本缓慢摇晃孵育, 用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板, 加入上述酶联检测探针Elastase-Ab₁, 用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板, 最后加入胰蛋白酶荧光底物(CBZ-Ala-Ala-Ala-Ala)₂-R110, 用荧光酶标仪读取96孔酶标板荧光强度值。

3. 如权利要求2所述的方法, 其特征是醋酸盐缓冲液是0.01M pH4.4的缓冲液; 碳酸盐缓冲液是0.2M pH9.5的缓冲液; PBS缓冲液是0.15M pH7.4的缓冲液。

4. 如权利要求2所述的方法, 其特征是弹性蛋白酶:高碘酸钠质量比为1:0.8~1.2; 弹性蛋白酶:CA153标记抗体质量比为1:1~5; 弹性蛋白酶:硼氢化钠质量比为15:1。

5. 如权利要求2所述的方法, 其特征是CA153包被抗体Ab₁浓度为10~50μg/mL。

6. 如权利要求2所述的方法, 其特征是洗涤缓冲液是含有0.05~0.5% Tween-20的0.01M pH7.4的PBS缓冲液。

7. 如权利要求2所述的方法, 其特征是根据弹性蛋白酶荧光底物(CBZ-Ala-Ala-Ala-Ala)₂-R110降解产生的荧光强度值和CA153标准抗原浓度之间的关系建立标准曲线, 定性定量检测卵巢癌肿瘤标志物CA125。

基于弹性蛋白酶荧光底物检测乳腺癌肿瘤标志物CA153的酶联免疫试剂盒制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及疾病检测技术领域,更具体的是涉及一种基于弹性蛋白酶荧光底物检测乳腺癌肿瘤标志物CA153的酶联免疫试剂盒制备方法。

背景技术

[0002] 目前乳腺癌已成为威胁女性身心健康的常见肿瘤。全球乳腺癌发病率自20世纪70年代末开始一直呈上升趋势。美国8名妇女一生中就会有1人患乳腺癌。据国家癌症中心和卫生部疾病预防控制局2012年公布的2009年乳腺癌发病数据显示:全国肿瘤登记地区乳腺癌发病率位居女性恶性肿瘤的第1位,女性乳腺癌发病率(粗率)全国合计为42.55/10万,城市为51.91/10万,农村为23.12/10万。乳腺癌已成为当前社会的重大公共卫生问题。自20世纪90年代全球乳腺癌死亡率呈现出下降趋势;究其原因,一是乳腺癌筛查工作的开展,使早期病例的比例增加;二是乳腺癌综合治疗的开展,提高了疗效。CA15-3是乳腺癌的最重要的特异性标志物。30%-50%的乳腺癌患者的CA15-3明显升高,其含量的变化与治疗效果密切相关,是乳腺癌患者诊断和监测术后复发、观察疗效的最佳指标。CA15-3动态测定有助于11期和111期乳腺癌病人治疗后复发的早期发现;当CA15-3大于100U/ml时,可认为有转移性病变。

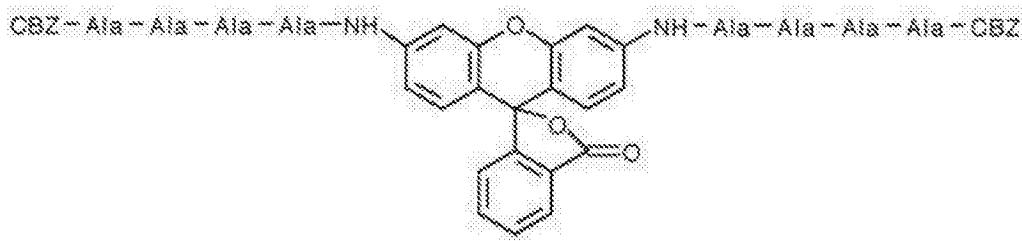
[0003] 免疫荧光技术(Immunofluorescence technique)又称荧光抗体技术,是标记免疫技术中发展最早的一种。它是在免疫学、生物化学和显微镜技术的基础上建立起来的一项技术。很早以来就有一些学者试图将抗体分子与一些示踪物质结合,利用抗原抗体反应进行组织或细胞内抗原物质的定位。由于抗原抗体反应具有高度的特异性,所以当抗原抗体发生反应时,只要知道其中的一个因素,就可以查出另一个因素。免疫荧光技术就是将不影响抗原抗体活性的荧光色素标记在抗体(或抗原)上,与其相应的抗原(或抗体)结合后,在荧光显微镜下呈现一种特异性荧光反应。

[0004] 弹性蛋白酶(Elastase)荧光底物(CBZ-Ala-Ala-Ala-Ala)₂-R110是一种双酰胺衍生物的罗丹明110(Rhodamine110)分子探针,是一个敏感的和有选择性的测定蛋白酶在溶液中或在活细胞内底物。这些荧光底物含有一种氨基酸或肽共价连接到每个Rhodamine110的氨基,酶裂解后,非荧光双酰胺底物首先转化为弱荧光单酰胺,然后转化为强荧光的Rhodamine110,荧光会进一步增加。由于Rhodamine110具有较大的消光系数,所以实验的信噪比很高。此外,相比于普通的荧光素而言,Rhodamine110的荧光在pH3-9之间会保持稳定。目前荧光检测因具有优异的光学性质已经被广泛应用于示踪、成像以及标记等方面,而ELISA则因为它的灵敏度高、特异性强等优点在检测领域处于特殊重要的地位。所以本文拟研制基于弹性蛋白酶荧光底物检测乳腺癌肿瘤标志物CA153的酶联免疫试剂盒,对乳腺癌肿瘤标志物CA153进行检测。

发明内容

[0005] 鉴于蛋白标志物在肿瘤检测中的重要地位、荧光检测独特的光学性质以及酶联免疫检测技术的优势。我们将结合酶联免疫检测和荧光检测两种技术,利用弹性蛋白酶和肿瘤标志物相应抗体Ab₂制得检测探针。探针、肿瘤标志物和包埋在酶联免疫ELISA试剂盒的另一种肿瘤标志物抗体Ab₁通过抗体抗原之间的作用,形成一种类似夹心的结构,最后通过酶和荧光底物的作用产生荧光,对CA153这种乳腺癌相关肿瘤标志物进行定性定量的检测,建立蛋白标志物检测的新方法,极大程度提高了检测灵敏度。

[0006] 本发明制备的基于弹性蛋白酶荧光底物检测乳腺癌肿瘤标志物CA153的酶联免疫试剂盒,其特征是选用弹性蛋白酶荧光底物(CBZ-Ala-Ala-Ala-Ala)₂-R110特异性降解产生的荧光对乳腺癌肿瘤标志物CA153进行定量检测,其结构式如下:



[0008] 本发明的技术方案如下:

[0009] 一种基于弹性蛋白酶荧光底物检测乳腺癌肿瘤标志物CA153的酶联免疫试剂盒;其步骤如下:

[0010] 1)将新配制的高碘酸钠Na10₄溶液加入到弹性蛋白酶Elastase溶液中,室温下避光搅拌后,用醋酸盐缓冲液透析过夜处理,通过加入碳酸盐缓冲液使体系pH达到9.0~9.3,立即加入CA153标记抗体Ab₂,室温下避光搅拌后加入少量硼氢化钠NaBH₄充分反应后用PBS缓冲液透析过夜,得到酶联检测探针Elastase-Ab₂;

[0011] 2)将CA153包被抗体Ab₁加入96孔酶标板,静置过夜处理后用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,加入BSA封闭处理后再次用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,之后加入标准CA153抗原或病人样本缓慢摇晃孵育,用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,加入上述酶联检测探针Elastase-Ab₁,用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,最后加入胰蛋白酶荧光底物(CBZ-Ala-Ala-Ala-Ala)₂-R110,用荧光酶标仪读取96孔酶标板荧光强度值。

[0012] 所述醋酸盐缓冲液是0.01M pH4.4的缓冲液;碳酸盐缓冲液是0.2M pH9.5的缓冲液;PBS缓冲液是0.15M pH7.4的缓冲液。

[0013] 所述弹性蛋白酶:高碘酸钠质量比为1:0.8~1.2;弹性蛋白酶:CA153标记抗体质量比为1:1~5;弹性蛋白酶:硼氢化钠质量比为15:1。

[0014] 所述CA153包被抗体Ab₁浓度为10~50μg/mL。

[0015] 所述洗涤缓冲液是含有0.05~0.5%Tween-20的0.01M pH7.4的PBS缓冲液。

[0016] 所述检测原理是根据胰蛋白酶荧光底物(CBZ-Ala-Ala-Ala-Ala)₂-R110降解产生的荧光强度值和CA153标准抗原浓度之间的关系建立标准曲线,定性定量检测卵巢癌肿瘤标志物CA125。

[0017] 通过高碘酸钠Na10₄作用将CA153记抗体Ab₂和弹性蛋白酶Elastase连接,得到酶联检测探针Elastase-Ab₂。将CA153包被抗体Ab₁加入96孔酶标板,4℃过夜后用洗涤缓冲液洗涤96孔酶标板,加入BSA 37℃封闭处理后用洗涤缓冲液洗涤96孔酶标板,在96孔酶标板加

入待检样品37℃下反应后用洗涤缓冲液洗涤96孔酶标板,加入上述Elastase-Ab₂检测探针37℃下反应后用洗涤缓冲液洗涤96孔酶标板,加入弹性蛋白酶荧光底物(CBZ-Ala-Ala-Ala-Ala)2-R110,最后用荧光酶标仪读数。如果检测样品有CA153抗原Ag存在,探针Elastase-Ab₂、CA153抗原Ag和包埋在96孔酶标板上的CA153包被抗体Ab₁通过抗体抗原之间的作用,形成一种类似夹心的结构Elastase-Ab₂-Ag-Ab₁,此时弹性蛋白酶荧光底物(CBZ-Ala-Ala-Ala-Ala)2-R110在酶的作用下降解产生荧光;如果检测样品没有CA153抗原Ag存在,则96孔酶标板的检测探针Elastase-Ab₂将被洗涤缓冲液清洗,此时弹性蛋白酶荧光底物(CBZ-Ala-Ala-Ala-Ala)2-R110不会降解,没有荧光出现。在96孔酶标板上加入不同浓度的标准CA153抗原,建立标准曲线,定性定量检测乳腺癌肿瘤标志物CA153。

[0018] 本发明制备的基于弹性蛋白酶荧光底物检测乳腺癌肿瘤标志物CA153的酶联免疫试剂盒优势在于:

[0019] 1.采用弹性蛋白酶荧光底物(CBZ-Ala-Ala-Ala-Ala)2-R110这种具有优异的光学性质的双酰胺衍生物的罗丹明110(R110)分子探针,由于Rhodamine110具有较大的消光系数,所以实验的信噪比很高。此外,相比于普通的荧光素而言,Rhodamine110的荧光在pH3-9之间会保持稳定。

[0020] 2.采用酶联免疫检测ELISA这种具有灵敏度高、特异性强等优点的传统检测技术,有利于提高检测效率。

[0021] 3.采用高碘酸钠NaIO₄作用将CA153记抗体Ab₂和弹性蛋白酶Elastase连接得到酶联检测探针Elastase-Ab₂,夹心结构降解荧光底物产生的荧光强度,定性定量检测乳腺癌肿瘤标志物CA153,有效地降低了检测荧光背景。

[0022] 如图1所示,弹性蛋白酶荧光底物(CBZ-Ala-Ala-Ala-Ala)2-R110酶裂解后,非荧光双酰胺底物率先转化为一对弱荧光的单酰胺,然后转化为强荧光的Rhodamine110,荧光进一步增加,实现超灵敏检测。如图2所示,根据加入不同浓度标准CA153抗原所得荧光强度,建立标准曲线可知本发明制备的弹性蛋白酶荧光底物检测乳腺癌肿瘤标志物CA153的酶联免疫试剂盒检测灵敏度较高,达到 $1*10^{-10}$ U/mL;图3根据加入不同抗原,可知本发明制备的弹性蛋白酶荧光底物检测乳腺癌肿瘤标志物CA153的酶联免疫试剂盒特异性很好。

附图说明

[0023] 图1本发明制备的基于弹性蛋白酶荧光底物检测乳腺癌肿瘤标志物CA153的酶联免疫试剂盒底物降解示意图。

[0024] 图2本发明制备的基于弹性蛋白酶荧光底物检测乳腺癌肿瘤标志物CA153的酶联免疫试剂盒标准曲线及紫外照片。

[0025] 图3本发明制备的基于弹性蛋白酶荧光底物检测乳腺癌肿瘤标志物CA153的酶联免疫试剂盒特异性曲线及紫外照片。

具体实施方式

[0026] 下面的实施案例中将对本发明作进一步的阐述,但本发明不限于此。

[0027] 实施案例1:

[0028] 1) 将新配制的0.2mL高碘酸钠NaIO₄溶液(21.39mg/mL)加入到1mL弹性蛋白酶

Elastase溶液(5mg/mL)中,室温下避光搅拌20min后,用1mM PH4.4醋酸盐缓冲液透析过夜处理,通过加入20μL 0.2M PH9.5碳酸盐缓冲液使体系pH达到9.0~9.3,立即加入10mg CA153标记抗体Ab₂,室温下避光搅拌2h后加入0.1mL硼氢化钠NaBH₄(4mg/mL)充分反应后用0.15M PH7.4PBS缓冲液透析过夜,得到酶联检测探针Elastase-Ab₂;

[0029] 2) 将100μL CA153包被抗体Ab₁(24μg/mL)加入96孔酶标板,4℃静置过夜处理后用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,加入300μL BSA(10mg/mL)37℃封闭1h处理后再次用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,之后加入100μL CA153标准抗原缓慢摇晃孵育,用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,加入100μL上述酶联检测探针Elastase-Ab₂稀释液,用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,最后加入100μL弹性蛋白酶荧光底物(CBZ-Ala-Ala-Ala-Ala)₂-R110,用荧光酶标仪读取96孔酶标板荧光强度值。

[0030] 实施案例2:

[0031] 2) 将新配制的0.2mL高碘酸钠Na10₄溶液(20mg/mL)加入到1mL弹性蛋白酶Elastase溶液(5mg/mL)中,室温下避光搅拌20min后,用1mM PH4.4醋酸盐缓冲液透析过夜处理,通过加入20μL 0.2M PH9.5碳酸盐缓冲液使体系pH达到9.0~9.3,立即加入10mg CA153标记抗体Ab₂,室温下避光搅拌2h后加入0.1mL硼氢化钠NaBH₄(4mg/mL)充分反应后用0.15M PH7.4PBS缓冲液透析过夜,得到酶联检测探针Elastase-Ab₂;

[0032] 2) 将100μL CA153包被抗体Ab₁(24μg/mL)加入96孔酶标板,4℃静置过夜处理后用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,加入300μL BSA(10mg/mL)37℃封闭1h处理后再次用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,之后加入100μL CA153标准抗原缓慢摇晃孵育,用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,加入100μL上述酶联检测探针Elastase-Ab₂稀释液,用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,最后加入100μL弹性蛋白酶荧光底物(CBZ-Ala-Ala-Ala-Ala)₂-R110,用荧光酶标仪读取96孔酶标板荧光强度值。

[0033] 实施案例3:

[0034] 3) 将新配制的0.2mL高碘酸钠Na10₄溶液(30mg/mL)加入到1mL弹性蛋白酶Elastase溶液(5mg/mL)中,室温下避光搅拌20min后,用1mM PH4.4醋酸盐缓冲液透析过夜处理,通过加入20μL 0.2M PH9.5碳酸盐缓冲液使体系pH达到9.0~9.3,立即加入10mg CA153标记抗体Ab₂,室温下避光搅拌2h后加入0.1mL硼氢化钠NaBH₄(4mg/mL)充分反应后用0.15M PH7.4PBS缓冲液透析过夜,得到酶联检测探针Elastase-Ab₂;

[0035] 2) 将100μL CA153包被抗体Ab₁(24μg/mL)加入96孔酶标板,4℃静置过夜处理后用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,加入300μL BSA(10mg/mL)37℃封闭1h处理后再次用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,之后加入100μL CA153标准抗原缓慢摇晃孵育,用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,加入100μL上述酶联检测探针Elastase-Ab₂稀释液,用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,最后加入100μL弹性蛋白酶荧光底物(CBZ-Ala-Ala-Ala-Ala)₂-R110,用荧光酶标仪读取96孔酶标板荧光强度值。

[0036] 实施案例4:

[0037] 4) 将新配制的0.2mL高碘酸钠Na10₄溶液(21.39mg/mL)加入到1mL弹性蛋白酶Elastase溶液(5mg/mL)中,室温下避光搅拌20min后,用1mM PH4.4醋酸盐缓冲液透析过夜处理,通过加入20μL 0.2M PH9.5碳酸盐缓冲液使体系pH达到9.0~9.3,立即加入5mg CA153标记抗体Ab₂,室温下避光搅拌2h后加入0.1mL硼氢化钠NaBH₄(4mg/mL)充分反应后用

0.15M PH7.4PBS缓冲液透析过夜,得到酶联检测探针Elastase-Ab₂;

[0038] 2) 将100μL CA153包被抗体Ab₁ (10μg/mL) 加入96孔酶标板,4℃静置过夜处理后用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,加入300μL BSA (10mg/mL) 37℃封闭1h处理后再次用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,之后加入100μL CA153标准抗原缓慢摇晃孵育,用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,加入100μL上述酶联检测探针Elastase-Ab₂稀释液,用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,最后加入100μL弹性蛋白酶荧光底物 (CBZ-Ala-Ala-Ala-Ala) ₂-R110,用荧光酶标仪读取96孔酶标板荧光强度值。

[0039] 实施案例5:

[0040] 5) 将新配制的0.2mL高碘酸钠Na104溶液 (21.39mg/mL) 加入到1mL弹性蛋白酶Elastase溶液 (5mg/mL) 中,室温下避光搅拌20min后,用1mM PH4.4醋酸盐缓冲液透析过夜处理,通过加入20μL 0.2M PH9.5碳酸盐缓冲液使体系pH达到9.0~9.3,立即加入25mg CA153标记抗体Ab₂,室温下避光搅拌2h后加入0.1mL硼氢化钠NaBH₄ (4mg/mL) 充分反应后用0.15M PH7.4PBS缓冲液透析过夜,得到酶联检测探针Elastase-Ab₂;

[0041] 2) 将100μL CA153包被抗体Ab₁ (50μg/mL) 加入96孔酶标板,4℃静置过夜处理后用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,加入300μL BSA (10mg/mL) 37℃封闭1h处理后再次用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,之后加入100μL CA153标准抗原缓慢摇晃孵育,用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,加入100μL上述酶联检测探针Elastase-Ab₂稀释液,用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,最后加入100μL弹性蛋白酶荧光底物 (CBZ-Ala-Ala-Ala-Ala) ₂-R110,用荧光酶标仪读取96孔酶标板荧光强度值。

[0042] 实施案例6:

[0043] 1) 将新配制的0.2mL高碘酸钠Na104溶液 (20mg/mL) 加入到1mL弹性蛋白酶Elastase溶液 (5mg/mL) 中,室温下避光搅拌20min后,用1mM PH4.4醋酸盐缓冲液透析过夜处理,通过加入20μL 0.2M PH9.5碳酸盐缓冲液使体系pH达到9.0~9.3,立即加入10mg CA153标记抗体Ab₂,室温下避光搅拌2h后加入0.1mL硼氢化钠NaBH₄ (4mg/mL) 充分反应后用0.15M PH7.4PBS缓冲液透析过夜,得到酶联检测探针Elastase-Ab₂;

[0044] 2) 将100μL CA153包被抗体Ab₁ (24μg/mL) 加入96孔酶标板,4℃静置过夜处理后用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,加入300μL BSA (10mg/mL) 37℃封闭1h处理后再次用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,之后每孔加入100μL CA153标准抗原的浓度分别为100U/mL、10U/mL、1U/mL、0.1U/mL、0.01U/mL、0.001U/mL、0.0001U/mL、0U/mL,缓慢摇晃孵育,用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,加入100μL上述酶联检测探针Elastase-Ab₂稀释液,用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,最后加入100μL弹性蛋白酶荧光底物 (CBZ-Ala-Ala-Ala-Ala) ₂-R110,用荧光酶标仪读取96孔酶标板荧光强度值。建立标准曲线。

[0045] 实施案例7:

[0046] 1) 将新配制的0.2mL高碘酸钠Na104溶液 (20mg/mL) 加入到1mL弹性蛋白酶Elastase溶液 (5mg/mL) 中,室温下避光搅拌20min后,用1mM PH4.4醋酸盐缓冲液透析过夜处理,通过加入20μL 0.2M PH9.5碳酸盐缓冲液使体系pH达到9.0~9.3,立即加入10mg CA153标记抗体Ab₂,室温下避光搅拌2h后加入0.1mL硼氢化钠NaBH₄ (4mg/mL) 充分反应后用0.15M PH7.4PBS缓冲液透析过夜,得到酶联检测探针Elastase-Ab₂;

[0047] 2) 将100μL CA153包被抗体Ab₁ (24μg/mL) 加入96孔酶标板,4℃静置过夜处理后用

洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,加入300 μ L BSA (10mg/mL) 37℃封闭1h处理后再次用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,之后每孔分别加入100 μ L HCG、BSA、PBS、CEA、CA125、AFP、PSA、CA153抗原,缓慢摇晃孵育,用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,加入100 μ L上述酶联检测探针Elastase-Ab₂稀释液,用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板,最后加入100 μ L弹性蛋白酶荧光底物(CBZ-Ala-Ala-Ala-Ala)₂-R110,用荧光酶标仪读取96孔酶标板荧光强度值。建立非特异性吸附曲线。

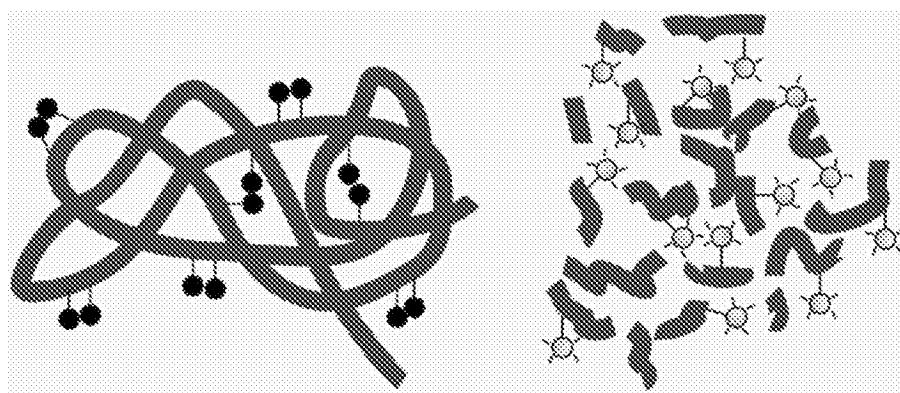


图1

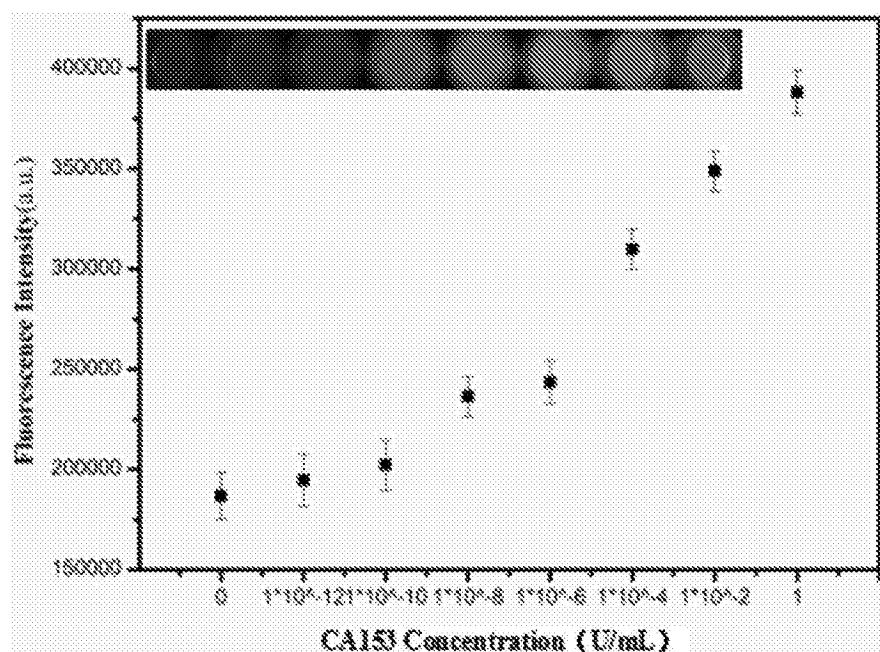


图2

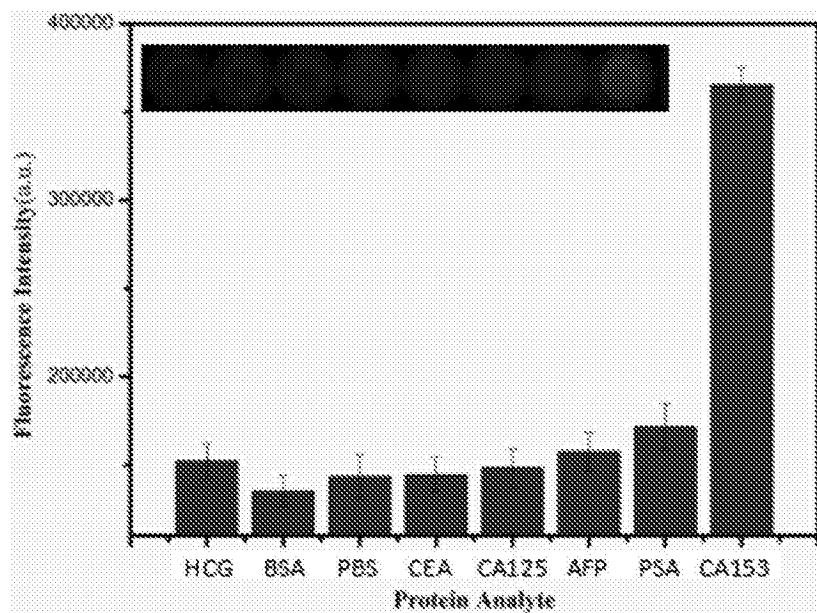


图3

专利名称(译)	基于弹性蛋白酶荧光底物检测乳腺癌肿瘤标志物CA153的酶联免疫试剂盒制备方法		
公开(公告)号	CN106405111A	公开(公告)日	2017-02-15
申请号	CN201610814364.2	申请日	2016-09-10
[标]申请(专利权)人(译)	天津大学		
申请(专利权)人(译)	天津大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津大学		
[标]发明人	常津 武玉东 宫晓群		
发明人	常津 武玉东 宫晓群		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/574 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/535 G01N33/57415 G01N33/57484 G01N2333/47		
代理人(译)	王丽		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及基于弹性蛋白酶荧光底物检测乳腺癌肿瘤标志物CA153的酶联免疫试剂盒制备方法；将结合酶联免疫检测和荧光检测两种技术，利用弹性蛋白酶和肿瘤标志物相应抗体Ab2制得检测探针。探针、肿瘤标志物和包埋在酶联免疫ELISA试剂盒的另一种肿瘤标志物抗体Ab1通过抗体抗原之间的作用，形成一种夹心的结构，最后通过酶和荧光底物的作用产生荧光，对CA153这种乳腺癌相关肿瘤标志物进行定性定量的检测，建立蛋白标志物检测的方法。本发明整个制备过程简单，适合于产业化生产；根据荧光底物的荧光特性，以及与酶的作用，可定性定量检测蛋白标志物，且特异性良好；整个检测过程，建立了一种蛋白标志物检测的新方法。

