



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106397583 A

(43)申请公布日 2017.02.15

(21)申请号 201611107990.4

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2016.12.06

(71)申请人 亳州市新健康科技有限公司

地址 236800 安徽省亳州市现代中药产业
创业基地B区10#B座

(72)发明人 熊良钟 邓正辉 熊清爵 王梓光

(74)专利代理机构 北京律恒立业知识产权代理
事务所(特殊普通合伙)
11416

代理人 庞立岩 陈轶兰

(51)Int.Cl.

C07K 16/08(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

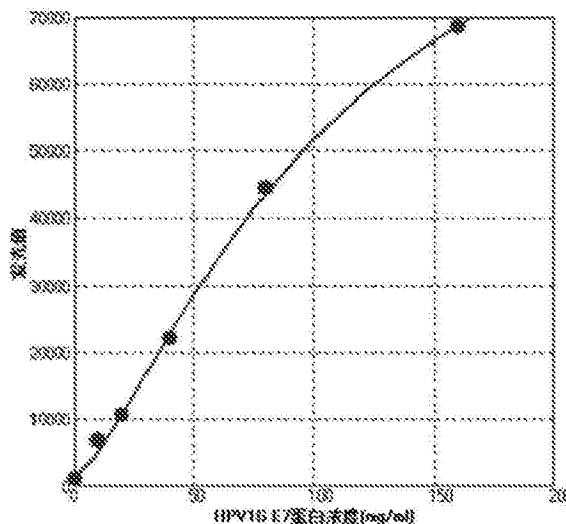
权利要求书2页 说明书13页
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

一种HPV16型E7蛋白的POCT荧光定量检测试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种包被有HPV16型E7抗体的免疫层析试纸条,包括底板,加样区,样本垫,结合垫,吸收垫,结合垫与吸收垫之间为硝酸纤维素膜垫;硝酸纤维素膜上包含抗HPV16型E7蛋白单克隆抗体;结合垫喷涂荧光微球标记抗体。本发明还提供了一种包含免疫层析试纸条的HPV16型E7蛋白的POCT荧光定量检测试剂盒,所述试剂盒还包括人体宫颈脱落细胞裂解液。本发明还提供了一种抗HPV16型E7蛋白单克隆抗体,所述抗HPV16型E7蛋白单克隆抗体与HPV16型E7蛋白结合位点分别是:1号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第30-36氨基酸;2号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第36-43氨基酸;3号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第62-73氨基酸;4号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第73-77氨基酸。



1. 一种包被有HPV16型E7抗体的免疫层析试纸条,包括底板,加样区,样本垫,结合垫,吸收垫,

结合垫与吸收垫之间为硝酸纤维素膜垫;

硝酸纤维素膜上包含抗HPV16型E7蛋白单克隆抗体;

结合垫喷涂荧光微球标记抗体。

2. 根据权利要求1所述的试纸条,其中所述HPV16型E7蛋白的氨基酸序列为SEQ ID NO.1:

Met His GIy Asp Thr Pro Thr Leu His GIu 10
Tyr Met Leu Asp Leu GIn Pro GIu Thr Thr 20
Asp Leu Tyr Cys Tyr GIu GIn Leu Asn Asp 30
Ser Ser GIu GIu GIu Asp GIu IIe Asp GIy 40
Pro AIa GIy GIn AIa GIu Pro Asp Arg AIa 50
His Tyr Asn IIe VaI Thr Phe Cys Cys Lys 60
Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys VaI GIn 70
Ser Thr His VaI Asp IIe Arg Thr Leu GIu 80
Asp Leu Leu Met GIy Thr Leu GIy IIe VaI 90
Cys Pro IIe Cys Ser GIn Lys Pro。

3. 根据权利要求2所述的试纸条,其中所述抗HPV16型E7蛋白单克隆抗体与HPV16型E7蛋白结合位点分别是:

1号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第30-36氨基酸;

2号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第36-43氨基酸;

3号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第62-73氨基酸;

4号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第73-77氨基酸。

4. 根据权利要求1或2所述的试纸条,其中所述硝酸纤维素膜上抗体的包被量为0.05~0.5 μ g,结合垫上荧光微球标记抗体的包被量为0.05~0.5 μ g。

5. 根据权利要求1所述的试纸条,其中所述荧光微球标记抗体为抗HPV16型E7蛋白单克隆抗体。

6. 一种包含权利要求1所述的免疫层析试纸条的HPV16型E7蛋白的POCT荧光定量检测试剂盒,其中所述试剂盒还包括人体宫颈脱落细胞裂解液。

7. 根据权利要求6所述的荧光定量检测试剂盒,其中所述的人体宫颈脱落细胞裂解液包括:0.05%~1%表面活性剂;10mM~1M缓冲液;1mM~10mM蛋白酶抑制剂。

8. 根据权利要求7所述的荧光定量检测试剂盒,其中所述表面活性剂为Tween 20, Triton-100或十二烷基磺酸钠中的一种或两种以上;所述的缓冲液为phosphate-buffered saline, Tris-HCL或碳酸盐溶液;所述的蛋白酶抑制剂为cystatin, PMSF或Antipain中的一种或两种以上。

9. 根据权利要求6所述的荧光定量检测试剂盒,所述试剂盒用于检测高危型人乳头瘤病毒或人宫颈脱落细胞中HPV16E7蛋白。

10. 一种抗HPV16型E7蛋白单克隆抗体,所述抗HPV16型E7蛋白单克隆抗体与HPV16型E7蛋白结合位点分别是:

- 1号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第30-36氨基酸;
- 2号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第36-43氨基酸;
- 3号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第62-73氨基酸;
- 4号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第73-77氨基酸。

一种HPV16型E7蛋白的POCT荧光定量检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及宫颈癌检测领域,尤其涉及一种HPV16型E7蛋白的POCT荧光定量检测试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 宫颈癌是在女性中第二常见的癌症诊断,并且在99.7%的情况下与高危人乳头瘤病毒感染相关,全世界每年有约520000例宫颈癌,近260000人死亡。HPV有超过100种不同的分离株,已根据它们与宫颈癌或与良性宫颈病变或非典型增生的关联性被宽泛地再分成高危和低危亚型。低危险型HPV包括HPV6、11、42、43、44等,常引起外生殖器湿疣等良性病变包括宫颈上皮内低度病变(CIN I),高危型HPV包括HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68,CP8304等亚型,与宫颈癌及宫颈上皮内高度病变(CIN II/III)的发生相关,尤其是HPV16和18型,其中HPV16占50%以上。

[0003] 人乳头瘤病毒(Human Papillomavirus,HPV)是一种嗜上皮性病毒,共有3个基因区组成,包括早期区(Early Region,E区)、晚期区(Late Region,L区)与非编码区(Uncoding Region,UCR)或上游调控区(URR)。E区按顺序为E6、E7、E1、E2、E3、E4和E5共7个基因,参与病毒DNA的复制、转录、编码病毒蛋白、维持细胞内病毒的高拷贝数的基因,其中E6和E7是HPV的主要致癌基因,与病毒细胞转化功能及致癌性有关。E6和E7蛋白使肿瘤抑制蛋白p53和pRB钝化,分别解除细胞周期控制和抑制细胞凋亡。因此,用于测定肿瘤中的HPV状态的最佳方法是测量肿瘤细胞中的E6/E7蛋白。

[0004] 高危型人乳头瘤病毒(HPV)已被确认为导致宫颈癌的诱因,但90%以上的HPV感染是一过性的,在2年内会被免疫系统清除。当HPV病毒发生持续性感染后,特别是HPV的DNA和人类宫颈上皮细胞的DNA发生整合后,E6,E7基因会大量表达一种称为mRNA的物质,从而大量产生致癌蛋白,使人类细胞逐渐发生癌变。

[0005] 目前HPV感染的检测方法有3类:

[0006] 1.传统的形态学方法检测HPV

[0007] 包括巴氏涂片细胞病理学检测、阴道镜检查、宫颈活检组织病理学检查等。宫颈细胞学筛查特异性高,但是灵敏度较低,同时花费很高。细胞出现病变前已经有HPV感染,所以必须结合其他方法。

[0008] 2.HPV DNA的检测

[0009] 以上已经提到高危型HPV的持续感染时宫颈癌的直接病因,在细胞学筛查正常前,HPV DNA的检测很重要。目前应用最多的是PCR,其次是杂交捕获技术。PCR灵敏度高,可以同时诊断多个亚型,但会出现假阳性,特异性低;杂交捕获技术没有假阳性,但需要专业设备、专业人才,目前不能推广使之受到限制。

[0010] 3.血清学方法和免疫学方法

[0011] 主要是检测患者血清中的L1抗体或是用抗体检测抗原。但L1抗体在HPV清除后几个月到1年后都有较高的效价,所以血清中的L1抗体的检测不能知道是现在感染或是过去

感染。用ELISA检测血清中的HPV E6、E7特异性抗体,目前在HPV16阳性的口腔癌患者血清中可以检测到E6、E7特异性抗体,在其他HPV相关癌症中没有研究过。用抗体检测抗原的方法主要指免疫组化法,因为该方法的时间很长,操作繁琐。所以血清学和免疫学方法检测的应用受到限制。

[0012] 以上检测HPV的方法在宫颈癌及癌前病变筛查和癌前预报中发挥了重要作用。但是有一个共同的局限性:操作程序复杂、需要专业的仪器设备、成本高,不易推广。因此建立一种简单快速灵敏特异的检测方法迫在眉睫。

发明内容

[0013] 本发明的目的在于克服现有检测方法的不足,提供了用于检测高危型人乳头瘤病毒(HPV)16亚型E7致癌蛋白的POCT荧光定量检测试剂盒。宫颈脱落细胞裂解后加样,直接检测高危型HPV相关致癌蛋白的表达与否以及表达量,从而对于高危型HPV的感染程度有了明确的判断,方便了后续的治疗。

[0014] 目前对宫颈癌的筛选是对HPV16型E6蛋白的检测,由于HPV16型E6蛋白稳定性较差,在细胞裂解后容易分解,从而导致定量检测的结果不够准确。本发明人发现E7蛋白的稳定性明显好于E6蛋白,用于定量检测可以使得对于HPV 16型病毒的检测结果更准确。本发明提供的一种HPV16型E7蛋白的POCT荧光定量检测试剂盒采用免疫层析试纸条,NC膜上包被检测抗体,结合垫上喷涂荧光微球标记抗体,检测人体宫颈脱落细胞中的高危型HPV16型E7蛋白。先将宫颈脱落细胞裂解后,直接加入样本垫中,经层析作用,HPV16型E7蛋白先后与荧光微球标记抗体和检测抗体结合,最后用配套的荧光检测仪检测荧光信号。荧光信号与E7蛋白含量呈正相关,由此实现对人体宫颈脱落细胞中的HPV16型E7蛋白的定量检测。试验证明通过对HPV16型E7蛋白检测来反映患者HPV的感染程度,其准确率要高于对HPV16型E6蛋白的检测。

[0015] 本发明一方面提供了一种包被有HPV16型E7抗体的免疫层析试纸条,包括底板,加样区,样本垫,结合垫,吸收垫,结合垫与吸收垫之间为硝酸纤维素膜垫;硝酸纤维素膜上包被抗HPV16型E7蛋白单克隆抗体;结合垫喷涂荧光微球标记抗体。

[0016] 优选地,其中所述HPV16型E7蛋白的氨基酸序列为SEQ ID NO.1:

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu 10

Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr 20

Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp 30

Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly 40

[0017]

Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala 50

His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys 60

Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln 70

Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu 80

- Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val 90
- [0018] Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro。
- [0019] 优选地,所述抗HPV16型E7蛋白单克隆抗体与HPV16型E7蛋白结合位点分别是:
- [0020] 1号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第30-36氨基酸;
- [0021] 2号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第36-43氨基酸;
- [0022] 3号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第62-73氨基酸;
- [0023] 4号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第73-77氨基酸。
- [0024] 优选地,所述硝酸纤维素膜上抗体的包被量为0.05~0.5 μ g,结合垫上荧光微球标记抗体的包被量为0.05~0.5 μ g。
- [0025] 优选地,所述荧光微球标记抗体为抗HPV16型E7蛋白单克隆抗体。
- [0026] 本发明一方面提供了一种包含权利要求1所述的免疫层析试纸条的HPV16型E7蛋白的POCT荧光定量检测试剂盒,其中所述试剂盒还包括人体宫颈脱落细胞裂解液。
- [0027] 优选地,所述的人体宫颈脱落细胞裂解液包括:0.05%~1%表面活性剂;10mM~1M缓冲液;1mM~10mM蛋白酶抑制剂。
- [0028] 优选地,所述表面活性剂为Tween 20,Triton-100或十二烷基磺酸钠中的一种或两种以上;所述的缓冲液为phosphate-buffered saline,Tris-HCL或碳酸盐溶液;所述的蛋白酶抑制剂为cystatin,PMSF或Antipain中的一种或两种以上。
- [0029] 优选地,所述试剂盒用于检测高危型人乳头瘤病毒。
- [0030] 优选地,所述试剂盒用于检测人宫颈脱落细胞中HPV16 E7蛋白。
- [0031] 本发明一方面提供了一种抗HPV16型E7蛋白单克隆抗体,所述抗HPV16型E7蛋白单克隆抗体与HPV16型E7蛋白结合位点分别是:
- [0032] 1号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第30-36氨基酸;
- [0033] 2号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第36-43氨基酸;
- [0034] 3号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第62-73氨基酸;
- [0035] 4号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第73-77氨基酸。
- [0036] 应当理解,前述大体的描述和后续详尽的描述均为示例性说明和解释,并不应当用作对本发明所要求保护内容的限制。

附图说明

- [0037] 参考随附的附图,本发明更多的目的、功能和优点将通过本发明实施方式的如下描述得以阐明,其中:
- [0038] 图1为为本发明的包被有HPV16型E7抗体的免疫层析试纸条外观示意图。
- [0039] 图2为本发明的实施例4以校准品浓度为横坐标,发光值为纵坐标,采用四参数逻辑拟合法得到标准曲线。

具体实施方式

- [0040] 通过参考示范性实施例,本发明的目的和功能以及用于实现这些目的和功能的方法将得以阐明。然而,本发明并不受限于以下所公开的示范性实施例;可以通过不同形式来对其加以实现。说明书的实质仅仅是帮助相关领域技术人员综合理解本发明的具体细节。

[0041] 在下文中,将参考附图描述本发明的实施例。在附图中,相同的附图标记代表相同或类似的部件,或者相同或类似的步骤。

[0042] 本发明提供了一种用于检测高危型人乳头瘤病毒 (HPV) 16亚型E7致癌蛋白的POCT荧光定量检测试剂盒。(HPV) 16亚型E7致癌蛋白的氨基酸系列如下:

	Met	His	Gly	Asp	Thr	Pro	Thr	Leu	His	Glu	10
	Tyr	Met	Leu	Asp	Leu	Gln	Pro	Glu	Thr	Thr	20
	Asp	Leu	Tyr	Cys	Tyr	Glu	Gln	Leu	Asn	Asp	30
	Ser	Ser	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	Ile	Asp	Gly	40
[0043]	Pro	Ala	Gly	Gln	Ala	Glu	Pro	Asp	Arg	Ala	50
	His	Tyr	Asn	Ile	Val	Thr	Phe	Cys	Cys	Lys	60
	Cys	Asp	Ser	Thr	Leu	Arg	Leu	Cys	Val	Gln	70
	Ser	Thr	His	Val	Asp	Ile	Arg	Thr	Leu	Glu	80
	Asp	Leu	Leu	Met	Gly	Thr	Leu	Gly	Ile	Val	90
[0044]	Cys	Pro	Ile	Cys	Ser	Gln	Lys	Pro			100

[0045] 以上是 (HPV) 16亚型E7致癌蛋白的氨基酸序列,共有98个氨基酸。目前对宫颈癌的筛选是对HPV16型E6蛋白的检测,由于HPV16型E6蛋白稳定性较差,在细胞裂解后容易分解,从而导致定量检测的结果不够准确。本发明人发现E7蛋白的稳定性明显好于E6蛋白,但是经过研究发现,E7蛋白的高级结构呈多态性,与一般的抗体特异性结合较弱,因此本发明人专门筛选E7蛋白的下列氨基酸序列作为单克隆抗体的结合位点:

[0046] 1号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第30-36氨基酸;

[0047] 2号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第36-43氨基酸;

[0048] 3号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第62-73氨基酸;

[0049] 4号抗体结合位点:HPV16型E7蛋白第73-77氨基酸。

[0050] 结合位点的选择是以该位点与其他蛋白氨基酸序列特异性为首要原则,本发明所选取的四个抗体结合点具有非常高的特异性,是E7蛋白特有的氨基酸系列,用以区别于E1, E2……E6等相似蛋白,所以基于选取的4个结合位点匹配的抗体具有很高的特异性,四个结合位点相对于一个结合位点匹配的抗体具有更高的灵敏度。

[0051] 本发明的检测试剂盒利用宫颈脱落细胞裂解后加样,直接检测高危型HPV相关致癌蛋白的表达与否以及表达量,从而对于高危型HPV的感染程度有了明确的判断,方便了后续的治疗。

[0052] 图1为本发明的包被有HPV16型E7抗体的免疫层析试纸条外观示意图。如图1所示,本发明提供的试纸100包括:底板101,加样区102,样本垫103,结合垫104,吸收垫105,结合垫104与吸收垫105之间为硝酸纤维素膜 (NC膜) 垫106。

[0053] 本发明试剂盒采用免疫层析试纸条,NC膜上包被检测抗体,包被量为0.05~0.5μg,结合垫上喷涂荧光微球标记抗体,包被量为0.05~0.5μg。检测人体宫颈脱落细胞中的高

危型HPV16型E7蛋白。先将宫颈脱落细胞裂解后,直接加入样本垫中,经层析作用,HPV16型E7蛋白先后与荧光微球标记抗体和检测抗体结合,最后用配套的荧光检测仪检测荧光信号。荧光信号与E7蛋白含量呈正相关,由此实现对人体宫颈脱落细胞中的HPV16型E7蛋白的定量检测。

[0054] 本发明的免疫层析试纸条的制备方法,包括如下步骤:采用Bio-Dot XYZ3000点膜仪,将HPV16型E7抗体及羊抗鼠二抗喷涂在NC膜上,分别作为检测线107(T线)与质控线108(C线),37℃干燥箱干燥过夜;同时将荧光微球标记HPV16型E7抗体偶联物喷在结合垫上,30℃真空干燥2h;将NC膜、结合垫、样品垫、吸水纸及PVC粘性底板组装好后,切割成试纸条,加干燥剂于4~30℃密封保存。

[0055] 本发明还提供了一种HPV16型E7蛋白的POCT荧光定量检测试剂盒,该试剂盒包括:包被有HPV16型E7抗体的免疫层析试纸条、人体宫颈脱落细胞裂解液。

[0056] 其中,人体宫颈脱落细胞裂解液包括:

[0057] 0.05%~1%(体积百分比)表面活性剂,优选地,所述的表面活性剂为Tween 20, Triton-100或十二烷基磺酸钠中的一种或两种以上;

[0058] 10mM~1M缓冲液,所述的缓冲液为phosphate-buffered saline,Tris-HCL或碳酸盐溶液;

[0059] 1mM~10mM蛋白酶抑制剂(结合多次冻融可达到更加理想的裂解效果),所述的蛋白酶抑制剂为cystatin,PMSF或Antipain中的一种或两种以上。

[0060] 人体宫颈脱落细胞裂解液由包括如下步骤的方法制备得到:用10mM~1M缓冲液配置0.05%~1%(体积百分比)表面活性剂;用之前加入终浓度为1mM~10mM蛋白酶抑制剂。优选地,人体宫颈脱落细胞裂解液由包括如下步骤的方法制备得到:用100mM Tris-HCL溶液配置1%Triton-100;用之前加入终浓度为10mM蛋白酶抑制剂PMSF。

[0061] 具体地,该试剂盒的主要组成成分如下:

[0062] ①上述包被有HPV16型E7抗体的免疫层析试纸条:NC膜上检测抗体的包被量为0.1 μg,结合垫上荧光微球标记抗体的包被量为0.1 μg;

[0063] ②HPV16型E7蛋白校准品0、1、2、3、4、5:校准品为冻干粉,分别加入1mL ddH₂O溶解,校准品溶液的线性浓度分别为0、10、20、40、80、160ng/mL;

[0064] ③HPV16型E7蛋白质控品1、2:质控品为冻干粉,加入1mL ddH₂O溶解,浓度分别为10和80ng/mL;

[0065] ④上述人体宫颈脱落细胞裂解液;

[0066] 本发明还提供了上述试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0067] 一、制备荧光微球标记HPV16型E7抗体

[0068] 1) 用活化液替换微球原有保存液:离心—去上清—活化液超声重悬;

[0069] 2) 加入EDC和SuIfo-NHS进行活化:称取一定量的EDC和SuIfo-NHS,溶解后加入微球溶液中旋转反应15~20min;

[0070] 3) 去除未反应或残余的反应物:离心—去上清—超纯水超声重悬,重复2~3次;

[0071] 4) 用反应液超声重悬微球,然后加入一定量的待标记蛋白,避光反应1~4小时;

[0072] 5) 去除未偶联的蛋白:离心—去上清—超声重悬,重复1~2次;

[0073] 6) 封闭微球上未偶联的反应基团:用封闭液反应0.5~1小时或用封闭液重复步骤

5) ;

[0074] 7) 用保存液重悬微球至原体积, 2~8℃保存备用。

[0075] 二、制备包被有HPV16型E7抗体的免疫层析试纸条

[0076] 采用Bio-Dot XYZ3000点膜仪, 将HPV16型E7抗体及羊抗鼠二抗喷涂在NC膜上, 分别作为检测线(T线)与质控线(C线), 37℃干燥箱干燥过夜; 同时将荧光微球标记HPV16型E7抗体偶联物喷在结合垫上, 30℃真空干燥2h; 将NC膜、结合垫、样品垫、吸水纸及PVC粘性底板组装好后, 切割成试纸条, 加干燥剂于4~30℃密封保存。

[0077] 三、标准品、质控品

[0078] HPV16型E7蛋白校准品0、1、2、3、4、5: 校准品为冻干粉, 分别加入1mI ddH2O溶解, 校准品溶液的线性浓度分别为0、10、20、40、80、160ng/ml; HPV16型E7蛋白质控品1、2: 质控品为冻干粉, 加入1mI ddH2O溶解, 浓度分别为10和80ng/ml;

[0079] 四、人体宫颈脱落细胞裂解液

[0080] 用10mM~1M缓冲液配置0.05%~1% (体积百分比) 表面活性剂; 用之前加入终浓度为1mM~10mM蛋白酶抑制剂。所述的表面活性剂为Tween 20, Triton-100或十二烷基磺酸钠中的一种或两种以上。所述的缓冲液为phosphate-buffered saline, Tris-HCL或碳酸盐溶液, 所述的蛋白酶抑制剂为cystatin, PMSF或Antipain中的一种或两种以上。

[0081] 该试剂盒的检测方法, 包括如下步骤:

[0082] 获取足量的人体宫颈脱落细胞, 加入裂解液中, 涡旋震荡2~10min, 放入-20℃冰箱冻融1~3次, 再次震荡2~10min, 离心10~30min (13000rpm), 收集上清, 直接进行检测;

①取出所需免疫层析试纸条, 室温放置15min; ②每孔加入100uI校准品/质控品/样本, 置于荧光检测仪孵育仓; ③15min后, 仪器自动检测, 读取发光值。以校准品浓度为横坐标, 发光值为纵坐标, 采用四参数逻辑拟合法得到标准曲线方程, 根据标准曲线方程计算待检样本中HPV16型E7蛋白含量。表1为试剂盒的结果判读, 若宫颈脱落细胞样本中HPV16 E7蛋白含量<15.02ng/ml, 则为阴性, 若宫颈脱落细胞样本中HPV16 E7蛋白含量>15.02ng/ml, 则为阳性。

[0083] 表1试剂盒的结果判读

	宫颈脱落细胞样本中 HPV16 E7 蛋白含量水平	(ng/ml)
[0084]	阴性	<15.02
	阳性	>15.02

[0085] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明, 但不限定本发明的保护范围。

[0086] 实施例1、包被HPV16型E7抗体免疫层析试纸条的制备方法, 包括如下步骤:

[0087] 采用Bio-Dot XYZ3000点膜仪, 将HPV16型E7抗体及羊抗鼠二抗喷涂在NC膜上, 分别作为检测线(T线)与质控线(C线), 37℃干燥箱干燥过夜; 同时将荧光微球标记HPV16型E7抗体偶联物喷在结合垫上, 30℃真空干燥2h; 将NC膜、结合垫、样品垫、吸水纸及PVC粘性底板组装好后, 切割成试纸条, 加干燥剂于4~30℃密封保存。

[0088] 实施例2、配置人体宫颈脱落细胞裂解液以及裂解宫颈样本

[0089] 用100mM Tris-HCL溶液配置1% Triton-100; 用之前加入终浓度为10mM蛋白酶抑制剂PMSF。将500uI裂解液加入宫颈脱落细胞收集管中, 涡旋震荡2min, 置于-20℃冰箱

10min,之后置于37℃烘箱2min,再次震荡,离心(20min,13000rpm,4℃),收集上清进行检测。

[0090] 实施例3、一种HPV16型E7蛋白的POCT荧光定量检测试剂盒的制备方法

[0091] ①包被有HPV16型E7抗体的免疫层析试纸条,制备方法同实施例1。

[0092] ②HPV16型E7蛋白校准品0、1、2、3、4、5:校准品为冻干粉,分别加入1mI ddH2O溶解,校准品溶液的线性浓度分别为0、10、20、40、80、160ng/ml;

[0093] ③HPV16型E7蛋白质控品1、2:质控品为冻干粉,加入1mI ddH2O溶解,浓度分别为10和80ng/ml;

[0094] ④人体宫颈脱落细胞裂解液;制备方法同实施例2。

[0095] 实施例4、检测某一宫颈样本

[0096] 免疫层析试纸条的制备以及宫颈样本的裂解同实施例1~2。①取出所需免疫层析试纸条,室温放置15min;②每孔加入100uI校准品/质控品/样本,置于荧光检测仪孵育仓;③15min后,仪器自动检测,读取发光值;以校准品浓度为横坐标,发光值为纵坐标,采用四参数逻辑拟合法得到标准曲线如图2所示。根据标准曲线计算待检样本中HPV16型E7蛋白含量为109.42ng/ml(表2),按照结果判读,该样本为阳性,患者需要积极治疗。

[0097] 表2 HPV16型E7蛋白拟合标准曲线

ID	抗原浓度 (ng/ml)	发光值	根据标准曲线计算浓度 (ng/ml)
Cal0	0	1060	
Cal1	10	6912	
Cal2	20	10721	
Cal3	40	22244	
Cal4	80	44363	
Cal5	160	68556	
待检样本		55124	109.42

[0098] 用本发明试剂盒(如实施例3的检测试剂盒)检测部分健康人(200例以上,表中显示部分数据)以及病人宫颈脱落细胞,检测数据结果如下;

[0100] 表3:检测正常人宫颈脱落细胞数据结果(部分)

[0101]

样本标号	HPV 16 E7 抗原检测浓度 (ng/ml)
正常人 1 号	1.17
正常人 2 号	3.01
正常人 3 号	4.43
正常人 4 号	8.04
正常人 5 号	8.26
正常人 6 号	0.66
正常人 7 号	19.26
正常人 8 号	3.62
正常人 9 号	0.03
正常人 10 号	1.24
正常人 11 号	4.89
正常人 12 号	0.04
正常人 13 号	10.22
正常人 14 号	1.51
正常人 15 号	1.69
正常人 16 号	0.43
正常人 17 号	13.38
正常人 18 号	0.05
正常人 19 号	2.54
正常人 20 号	0.04
正常人 21 号	16.99
正常人 22 号	0.03
正常人 23 号	0.07
正常人 24 号	1.16
正常人 25 号	0.26
正常人 26 号	0.08

[0102]

正常人 27 号	0.10
正常人 28 号	9.99
正常人 29 号	0.09
正常人 30 号	0.59
正常人 31 号	1.92
正常人 32 号	0.52
正常人 33 号	13.50
正常人 34 号	14.18
正常人 35 号	4.20
正常人 36 号	3.50
正常人 37 号	0.41
正常人 38 号	1.17
正常人 39 号	0.09
正常人 40 号	0.04
正常人 41 号	0.06
正常人 42 号	0.63
正常人 43 号	1.11
正常人 44 号	3.79
正常人 45 号	23.80
正常人 46 号	0.91
正常人 47 号	21.73
正常人 48 号	9.30
正常人 49 号	6.42
正常人 50 号	17.58
正常人 51 号	0.15
正常人 52 号	2.97
正常人 53 号	12.61
正常人 54 号	0.15
正常人 55 号	2.74
正常人 56 号	5.18
正常人 57 号	0.24
正常人 58 号	0.30

[0103]

正常人 59 号	8.16
正常人 60 号	0.03
正常人 61 号	2.56
正常人 62 号	1.05
正常人 63 号	0.37
正常人 64 号	0.57
正常人 65 号	0.32
正常人 66 号	0.40
正常人 67 号	1.60
正常人 68 号	0.25
正常人 69 号	3.89
正常人 70 号	0.17
正常人 71 号	5.23
正常人 72 号	1.93
正常人 73 号	3.70
正常人 74 号	0.99
正常人 75 号	0.91
正常人 76 号	1.15
正常人 77 号	1.29
正常人 78 号	10.33
正常人 79 号	8.46
正常人 80 号	6.06
正常人 81 号	9.76
正常人 82 号	2.66
正常人 83 号	2.25
正常人 84 号	2.70
正常人 85 号	0.98
正常人 86 号	0.81
正常人 87 号	2.05
正常人 88 号	1.28
正常人 89 号	10.43
正常人 90 号	8.36

[0104]	正常人 91 号	7.16
	正常人 92 号	6.76
	正常人 93 号	2.36
	正常人 94 号	2.15
	正常人 95 号	3.28
	正常人 96 号	1.24
	正常人 97 号	7.31
	正常人 98 号	8.15
	正常人 99 号	6.03
	正常人 100 号	8.03

[0105] 表4:检测病人宫颈脱落细胞数据结果

[0106]

样本标号	病理资料	HPV 16 E7抗原检测浓度 (ng/ml)
病人1号	宫颈鳞癌	125.03
病人2号	CIN II	82.46
病人3号	CIN III	26.85
病人4号	宫颈鳞癌	152.50
病人5号	CIN III	45.98
病人6号	CIN II	52.20
病人7号	CIN I	19.19
病人8号	CIN II	15.25
病人9号	CIN I	1.89
病人10号	CIN II	92.15
病人11号	CIN II	19.45
病人12号	CIN III	12.64
病人13号	CIN I	16.85
病人14号	宫颈鳞癌	112.05
病人15号	CIN I	2.43
病人16号	CIN II	62.20
病人17号	CIN III	102.54
病人18号	CIN III	75.25
病人19号	CIN II	8.56

[0107] 数据分析

[0108] 1、根据正常人检测值,计算出平均值,标准方差,Cut-off值。分别将83例正常人宫颈脱落细胞检测结果取平均数,并计算标准方差SD,本试剂盒在确定Cutoff值时选择正常人平均值加上两倍的标准方差作为HPV16 E7蛋白表达阴阳性的判断标准(具体见表5),结果如下:

[0109] Cut-off计算公式为:cut-off=平均值+2*SD标准方差

[0110] 表5:表3检测数据统计学结果

[0111]

平均值	4.06
SD标准方差	5.48
Cut-off	15.02ng/ml

[0112] 2、通过Cut-off值,判断待检样本HPV 16 E7蛋白表达的阴阳性,超过这个Cut-off值的即认为是阳性,即认为表达了HPV 16 E7蛋白,同时与病理资料对比。

[0113] 3、根据Cut-off值判断表6病人宫颈脱落细胞诊断结果(“+”表示检测结果阳性;“-”表示检测结果阴性)

[0114] 表6病人病理资料及宫颈脱落细胞诊断结果

[0115]

样本标号	病理资料	HPV 16 E7 抗原检测浓度 (ng/ml)	根据 Cutoff 值判断阴阳性
病人 1 号	宫颈癌	125.03	+
病人 2 号	CIN III	82.46	+
病人 3 号	CIN II	26.85	+
病人 4 号	宫颈癌	152.50	+
病人 5 号	CIN III	45.98	+
病人 6 号	CIN II	52.20	+
病人 7 号	CIN I	19.19	+
病人 8 号	CIN II	15.25	+
病人 9 号	CIN I	1.89	-
病人 10 号	CIN II	92.15	+
病人 11 号	CIN II	19.45	+
病人 12 号	CIN III	12.64	-

[0116]

病人 13 号	CIN I	16.85	+
病人 14 号	宫颈癌	112.05	+
病人 15 号	CIN I	2.43	-
病人 16 号	CIN II	62.20	+
病人 17 号	CIN III	102.54	+
病人 18 号	CIN III	75.25	+
病人 19 号	CIN II	8.56	-

[0117] 从上表中可以看到,表6实验中所检测的病人宫颈脱落细胞共计19例,该试剂盒HPV 16 E7蛋白检测结果为阳性的为15例。其中针对15例CIN II以上病例样本,该试剂盒检

测阳性结果为13例,诊断灵敏度高达80%,具体结果如下表所示。

[0118] 表7:根据表三病人宫颈脱落细胞诊断结果阴阳性制定准确率比例表

病理资料	人数	HPV 16 E7 蛋白检测	
		阳性	阴性
CIN I	4	2 (50%)	2
CIN II	7	6 (85.7%)	1
CIN III	5	4 (80%)	1
宫颈癌	3	3 (100%)	0
	19	15 (78.9%)	4

[0120] 本发明的最大创新点是将E7蛋白浓度与宫颈癌分期结合起来,市场定位于HPV基因筛查与宫颈涂片之间的空白市场,HPV基因筛查可确定HPV病毒携带,但其中90%为一过性的,不会导致宫颈癌,只有10%才会逐步导致宫颈癌,本发明试剂盒在保证较低的假阴性的基础上80%的阳性检出率是很有意义的。

[0121] 宫颈癌筛查的最佳策略是实现益处最大化和危害最小化,我们既要追求它的“益”,发现那些有可能发展为癌症的宫颈癌前病变,同时也要减少它的“害”,避免对一过性HPV病毒感染导致的良性病变的检测和过度治疗。相比传统的HPV DNA检测,检测HPV16 E7蛋白,与宫颈癌的关系更为密切,能有效减少对一过性HPV病毒的检出,从而减少受检妇女不必要的阴道镜转诊和不必要的心里压力。本发明提供的HPV16型E7蛋白的POCT荧光定量检测试剂盒,使得检测结果愈加精确,治疗方案愈加明确,患者早日康复。同时该方法简单快速,检测成本低,可作为宫颈癌筛查的首选方法。

[0122] 结合这里披露的本发明的说明和实践,本发明的其他实施例对于本领域技术人员都是易于想到和理解的。说明和实施例仅被认为是示例性的,本发明的真正范围和主旨均由权利要求所限定。

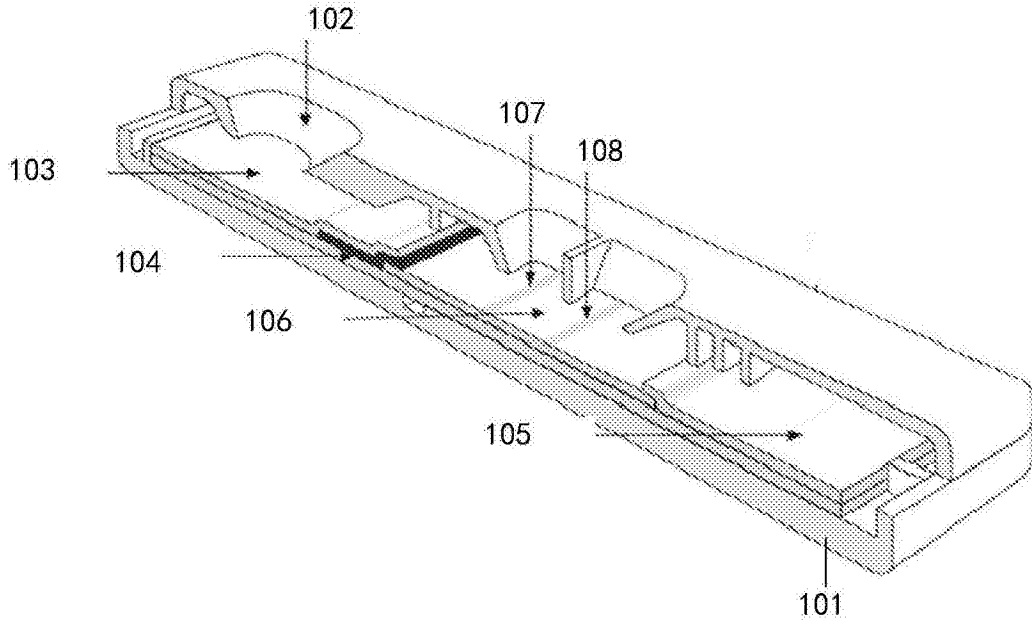


图1

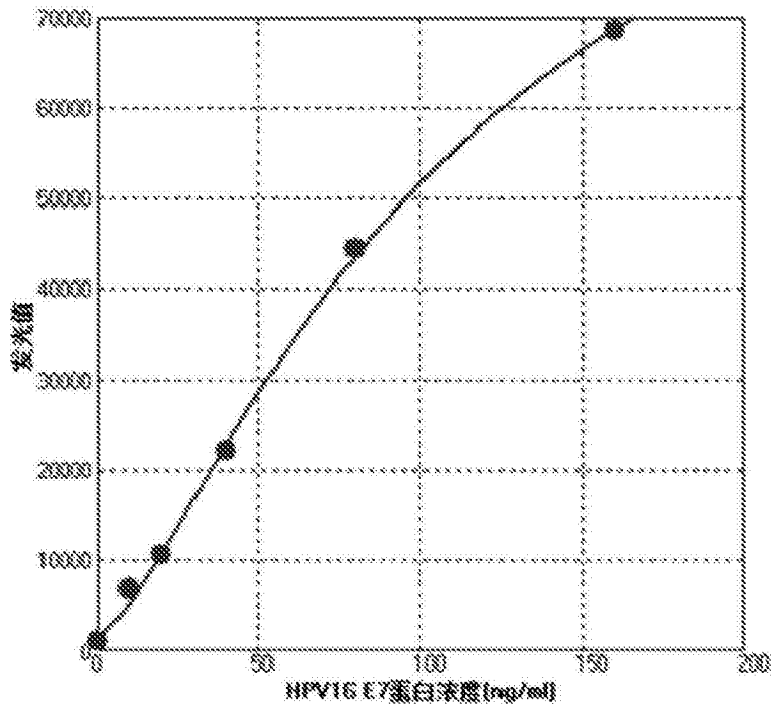


图2

专利名称(译)	一种HPV16型E7蛋白的POCT荧光定量检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN106397583A	公开(公告)日	2017-02-15
申请号	CN201611107990.4	申请日	2016-12-06
[标]申请(专利权)人(译)	亳州市新健康科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	亳州市新健康科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	亳州市新健康科技有限公司		
[标]发明人	熊良钟 邓正辉 熊清爵 王梓光		
发明人	熊良钟 邓正辉 熊清爵 王梓光		
IPC分类号	C07K16/08 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/577 C07K16/084 G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/56983		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种包被有HPV16型E7抗体的免疫层析试纸条，包括底板，加样区，样本垫，结合垫，吸收垫，结合垫与吸收垫之间为硝酸纤维素膜垫；硝酸纤维素膜上包含抗HPV16型E7蛋白单克隆抗体；结合垫喷涂荧光微球标记抗体。本发明还提供了一种包含免疫层析试纸条的HPV16型E7蛋白的POCT荧光定量检测试剂盒，所述试剂盒还包括人体宫颈脱落细胞裂解液。本发明还提供了一种抗HPV16型E7蛋白单克隆抗体，所述抗HPV16型E7蛋白单克隆抗体与HPV16型E7蛋白结合位点分别是：1号抗体结合位点：HPV16型E7蛋白第30-36氨基酸；2号抗体结合位点：HPV16型E7蛋白第36-43氨基酸；3号抗体结合位点：HPV16型E7蛋白第62-73氨基酸；4号抗体结合位点：HPV16型E7蛋白第73-77氨基酸。

