



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109765370 A

(43)申请公布日 2019.05.17

(21)申请号 201811546042.X

(22)申请日 2018.12.17

(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)

权利要求书2页 说明书5页
序列表2页

(54)发明名称

一种前列腺癌诊断试剂盒及制备方法与应
用

(57)摘要

本发明的试剂盒用于诊断NPM1抗体,将海肾荧光素酶基因与NPM1抗原基因重组为融合载体,利用细胞转化技术,将融合载体导入哺乳细胞系统中,进行荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白表达;裂解基因重组细胞,获得荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白,将NPM1抗原包被在96酶标板中,加入待测血清。血清中的抗体会与板上的抗原结合附在板上;加入荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白,通过免疫沉淀反应,使得荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白与患者血清中的NPM1抗体发生结合反应并吸附在板上,最终加入荧光素酶底物,检测荧光强度。根据荧光强度即可反映出NPM1抗体的含量,为前列腺癌的诊断提供参考。该方法快速简便、高灵敏度。

1. 一种前列腺癌诊断试剂盒,其特征在于,所述试剂盒含有:

1. 荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白;
2. 缓冲液I;
3. NPM1抗原包被板;
4. 海肾荧光素酶底物;
5. 底物缓冲液;
6. NPM1抗体阳性对照品;
7. NPM1抗体阴性对照品。

2. 根据权利要求1所述的一种前列腺癌诊断试剂盒,其特征在于,所述的荧光素酶-抗体融合蛋白制备方法为:

重组质粒构建:根据NPM1抗原序列,设计并合成引物,

上游引物5' CGGGGTACCCCG ATGGAAGATTCGATGGACATGGACA 3'

下游引物5' TGCTCTAGAGCA TCAATGCGCTTTTCTATACTTGCT 3';

以前列腺癌患者血清为模板,扩增得到抗NPM1基因;利用kpn1和xba1在哺乳动物海肾荧光素酶表达载体pRL-null的多克隆位点上进行酶切,利用T4连接酶,将抗HCV-cAg基因连接到此位置;将重组载体转移至大肠杆菌中,通过扩繁和质粒抽提,获得重组质粒;

重组蛋白表达:将10 μ g转染级别的重组质粒用脂质体转染试剂导入真核细胞中,37 $^{\circ}$ C 5%二氧化碳浓度下培养24-36小时后,利用细胞刮刀收集细胞,利用冻融破碎法裂解细胞,通过离心收获上层清液,得到荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白。

3. 根据权利要求1所述的一种前列腺癌诊断试剂盒,其特征在于,所述缓冲液I为100mM NaCl,5mM MgCl₂,50mM Tris,0.05%Tween-20pH 7.5。

4. 根据权利要求1所述的一种前列腺癌诊断试剂盒,其特征在于,所述的NPM1抗原包被板制作方法为:先用PBS缓冲液溶解NPM1抗原,使得其终浓度为1 μ g/ml,在酶标版每孔中加入200 μ l NPM1抗原溶液,4 $^{\circ}$ C包被过夜,弃包被液,加入300 μ l含1%BSA的PBS溶液,室温封闭2小时;用200 μ l含0.1%Tween的PBS缓冲液洗涤3次,甩干板内液体。

5. 一种如权利要求1所述的前列腺癌诊断试剂盒的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括以下步骤:荧光素酶-抗体融合蛋白制备

重组质粒构建:根据NPM1抗原序列,设计并合成引物,

上游引物5' CGGGGTACCCCG ATGGAAGATTCGATGGACATGGACA 3',

下游引物5' TGCTCTAGAGCA TCAATGCGCTTTTCTATACTTGCT 3';

以前列腺癌患者血清为模板,扩增得到抗NPM1基因,利用kpn1和xba1在哺乳动物海肾荧光素酶表达载体pRL-null的多克隆位点上进行酶切,利用T4连接酶,将抗HCV-cAg基因连接到此位置;将重组载体转移至大肠杆菌中,通过扩繁和质粒抽提,获得大量重组质粒;

重组蛋白表达:将10 μ g转染级别的重组质粒用脂质体转染试剂导入真核细胞中,37 $^{\circ}$ C 5%二氧化碳浓度下培养24-36小时后,利用细胞刮刀收集细胞,利用冻融破碎法裂解细胞,通过离心收获上层清液,得到荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白;

2NPM1抗原包被板制作

先用PBS缓冲液溶解NPM1抗原,使得其终浓度为1 μ g/ml,在酶标版每孔中加入200 μ l NPM1抗原溶液,4 $^{\circ}$ C包被过夜,弃包被液,加入300 μ l含1%BSA的PBS溶液,室温封闭2小时;用

200u1含0.1%Tween的PBS缓冲液洗涤3次,甩干板内液体。

6.一种如权利要求1所述的前列腺癌诊断试剂盒的应用,其特征在于,在包被板微孔中分别加入10u1样品血清及NPM1抗体阴性对照品与NPM1抗体阳性对照品,加入10u1的荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白,预先条件浓度至 1×10^7 RLU/10u1,90u1缓冲液I混合,30℃300rpm震荡孵育1小时;形成NPM1抗原-NPM1抗体-荧光素酶NPM1抗原融合蛋白的复合物固定在酶标板底部;

弃去孔内的液体,用200u1的PBS缓冲液洗涤5遍,甩干;洗去未结合的重组抗体融合蛋白;用底物缓冲液以1:100稀释荧光素酶底物;在每孔中加入50u1的PBS缓冲液,50u1荧光素酶底物稀释液,立即用荧光检测仪检测荧光强度,对阴阳对照品的结果进行对比判断样品中是否含有NPM1抗体及含量。

一种前列腺癌诊断试剂盒及制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种试剂盒,具体涉及一种提前列腺癌的诊断准确性、快速简便、高灵敏度的前列腺癌诊断试剂盒及制备方法与应用。

背景技术

[0002] 前列腺癌是发生于男性前列腺组织中的恶性肿瘤,在全球范围内已经成为男性第二大类常见肿瘤,位于癌症相关死亡率第六位。

[0003] 目前前列腺癌的临床诊断方式目前主要有前列腺直肠指检(DRE)、血清前列腺特异性抗原(PSA)检测、直肠超声波检测、活组织病理检查等。

[0004] 直肠指检是前列腺癌诊断的经典技术,主要通过医生的食指触摸前列腺,以判断前列腺结节的大小和形状,从而判断是否患有前列腺癌。活组织病理检查是前列腺癌的金标准,一般与其他方法技术连用。目前对前列腺癌的筛查诊断主要依靠血清PSA(prostate specific antigen,前列腺特异性抗原)检测和前列腺穿刺病理活检相结合的方法。

[0005] 血清PSA检测目前主要采用ELISA双抗夹心法检测来筛查前列腺癌。将PSA抗体包被于酶标板上,加入待测样品,孵育洗板后加入酶标记的PSA抗体。再次孵育洗板后加入酶显色剂显色。加入显色终止剂后放入酶标仪检测,根据OD值判定样品中是否含有HCV抗体的存在。

[0006] 直肠指检是经典技术,但其局限性很强:(1)患者前列腺肿块不大时,易漏诊;(2)部分患者前列腺癌重大不明显,但已属于晚期;(3)患者直肠有疾患时不能使用此检测;(4)医生经验不足时可能有漏诊或者误诊的可能。前列腺超声波检测虽然操作简单直观、无损伤,但该方法容易与前列腺炎和前列腺肥大混同,已不再用于前列腺癌分期诊断。活组织病理检查因其创伤性、复杂性不能作为初筛的手段,一般与其他方法连用。

[0007] 而目前主流的ELISA双抗夹心法检测技术同样存在弊端。PSA(prostate specific antigen,前列腺特异性抗原)具有前列腺组织特异性的特点。前列腺癌发生时,血-上皮之间的屏障受到破坏,且癌细胞分泌的PSA增加,最终使得血清中的PSA升高。但对于前列腺癌诊断的特异性较低,前列腺肿大、前列腺炎、前列腺缺血等良性前列腺疾病亦可使血清中的PSA升高。容易造成误诊和漏诊。

[0008] NPM1是一种核仁磷酸化蛋白质,主要分布在核仁区域,参与核糖体的生物合成,控制中心体复制。NPM1基因作为调控中心体复制起始的关键基因,在调节细胞生长、分化和转移等方面具有重要作用。研究发现,在软巢癌、前列腺癌、结肠癌、膀胱癌等不同肿瘤中,NPM1都呈现过表达水平,其还与细胞分裂次数和增值率密切相关。这些都表明,NPM1的过表达引发肿瘤的发生。

[0009] 早期有效检测肿瘤的发生、发展及提高抗癌药物的疗效对于癌症的治疗尤为重要,发明新型肿瘤标志物作为诊断与治疗的靶点一直是肿瘤研究的热点。NPM1与前列腺癌密切相关,它可能参与肿瘤的发生、发展和转移,所以对肿瘤的发病机制、早期诊断、个体化治疗、转移的检测和预后等可能有相应的作用。

发明内容

[0010] 本发明的目的在于为了解决现有检测前列腺癌容易造成误诊、漏诊的缺陷而提供一种提前列腺癌的诊断准确性、快速简便、高灵敏度的前列腺癌诊断试剂盒。

[0011] 本发明的另一个目的是为了提供该试剂盒的制备方法。

[0012] 本发明的另一个目的是为了提供该试剂盒的使用方法。

[0013] 为了实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

一种前列腺癌诊断试剂盒,所述试剂盒含有:

1. 荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白;
2. 缓冲液I;
3. NPM1抗原包被板;
4. 海肾荧光素酶底物;
5. 底物缓冲液;
6. NPM1抗体阳性对照品;
7. NPM1抗体阴性对照品。

[0014] 在本技术方案中,本发明的试剂盒用于诊断NPM1抗体,将海肾荧光素酶基因与NPM1抗原基因重组为融合载体,然后利用细胞转化技术,将融合载体导入哺乳细胞系统中,进行荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白的表达;裂解基因重组细胞,获得荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白,将购买的NPM1抗原包被在96酶标板中,加入待测血清。血清中的NPM1抗体会与板上的NPM1抗原结合附在板上;加入荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白,通过免疫沉淀反应,使得荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白与患者血清中的NPM1抗体发生结合反应并吸附在板上,最终加入荧光素酶底物,检测荧光强度。根据荧光强度即可反映出NPM1抗体的含量,为前列腺癌的诊断提供参考。该方法快速简便、高灵敏度。

[0015] 作为优选,所述的荧光素酶-抗体融合蛋白制备方法为:

重组质粒构建:根据NPM1抗原序列,设计并合成引物,

上游引物5'cggggtaccccg atggaagattcgatggacatggaca 3'

下游引物5'tgctctagagca tcaatgcgcgtttttctatacttgct 3';

以前列腺癌患者血清为模板,扩增得到抗NPM1基因;利用kpn1和xba1在哺乳动物海肾荧光素酶表达载体pRL-null的多克隆位点上进行酶切,利用T4连接酶,将抗HCV-cAg基因连接到此位置;将重组载体转移至大肠杆菌中,通过扩繁和质粒抽提,获得重组质粒;

重组蛋白表达:将10 μ g转染级别的重组质粒用脂质体转染试剂导入真核细胞中,37 $^{\circ}$ C 5%二氧化碳浓度下培养24-36小时后,利用细胞刮刀收集细胞,利用冻融破碎法裂解细胞,通过离心收获上层清液,得到荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白。

[0016] 作为优选,所述缓冲液I为100mM NaCl,5mM MgCl₂,50mM Tris,0.05%Tween-20 pH7.5。

[0017] 作为优选,所述的NPM1抗原包被板制作方法为:先用PBS缓冲液溶解NPM1抗原,使得其终浓度为1 μ g/ml,在酶标版每孔中加入200 μ l NPM1抗原溶液,4 $^{\circ}$ C包被过夜,弃包被液,加入300 μ l含1%BSA的PBS溶液,室温封闭2小时;用200 μ l含0.1%Tween的PBS缓冲液洗涤3次,甩干板内液体。

[0018] 一种前列腺癌诊断试剂盒的制备方法,所述制备方法包括以下步骤:荧光素酶-抗

体融合蛋白制备

重组质粒构建:根据NPM1抗原序列,设计并合成引物,

上游引物5'CGGGGTACCCCG ATGGAAGATTCGATGGACATGGACA 3',

下游引物5'TGCTCTAGAGCA TCAATGCGCTTTTCTATACTTGCT 3';

以前列腺癌患者血清为模板,扩增得到抗NPM1基因,利用kpn1和xba1在哺乳动物海肾荧光素酶表达载体pRL-null的多克隆位点上进行酶切,利用T4连接酶,将抗HCV-cAg基因连接到此位置;将重组载体转移至大肠杆菌中,通过扩繁和质粒抽提,获得大量重组质粒;

重组蛋白表达:将10ug转染级别的重组质粒用脂质体转染试剂导入真核细胞中,37℃ 5%二氧化碳浓度下培养24-36小时后,利用细胞刮刀收集细胞,利用冻融破碎法裂解细胞,通过离心收获上层清液,得到荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白;

2NPM1抗原包被板制作

先用PBS缓冲液溶解NPM1抗原,使得其终浓度为1ug/ml,在酶标版每孔中加入200ulNPM1抗原溶液,4℃包被过夜,弃包被液,加入300ul含1%BSA的PBS溶液,室温封闭2小时;用200ul含0.1%Tween的PBS缓冲液洗涤3次,甩干板内液体。

[0019] 一种前列腺癌诊断试剂盒的应用,在包被板微孔中分别加入10ul样品血清及NPM1抗体阴性对照品与NPM1抗体阳性对照品,加入10ul的荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白,预先条件浓度至 1×10^7 RLU/10ul,90ul缓冲液I混合,30℃300rpm震荡孵育1小时;形成NPM1抗原-NPM1抗体-荧光素酶NPM1抗原融合蛋白的复合物固定在酶标板底部;

弃去孔内的液体,用200ul的PBS缓冲液洗涤5遍,甩干;洗去未结合的重组抗体融合蛋白;用底物缓冲液以1:100稀释荧光素酶底物;在每孔中加入50ul的PBS缓冲液,50ul荧光素酶底物稀释液,立即用荧光检测仪检测荧光强度,对阴阳对照品的结果进行对比判断样品中是否含有NPM1抗体及含量。

[0020] 本发明的有益效果是:本发明的试剂盒利用荧光免疫沉淀技术,通过检测抗NPM1(核仁磷酸化蛋白)抗体,作为PSA的联合诊断手段,大大提前前列腺癌的诊断准确性,根据荧光强度即可反映出NPM1抗体的含量,为前列腺癌的诊断提供参考,该方法快速简便、高灵敏度。

具体实施方式

[0021] 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,NPM1抗原是从市场购得的。

[0022] 底物缓冲液为本领域常用的缓冲液,故具体成分在本发明中不做赘述。

[0023] 其余未详细说明的试剂,方法均未本领域常规手段。

[0024] 实施例

一种前列腺癌诊断试剂盒,所述试剂盒含有:

1. 荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白;
2. 缓冲液I;
3. NPM1抗原包被板;
4. 海肾荧光素酶底物;
5. 底物缓冲液;

6.NPM1抗体阳性对照品;

7.NPM1抗体阴性对照品。

[0025] 前列腺癌诊断试剂盒的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括以下步骤:荧光素酶-抗体融合蛋白制备

重组质粒构建:根据NPM1抗原序列,设计并合成引物,

上游引物5'CGGGGTACCCCG ATGGAAGATTCGATGGACATGGACA 3',

下游引物5'TGCTCTAGAGCA TCAATGCGCTTTTCTATACTTGCT 3';

以前列腺癌患者血清为模板,扩增得到抗NPM1基因,利用kpn1和xba1在哺乳动物海肾荧光素酶表达载体pRL-null的多克隆位点上进行酶切,利用T4连接酶,将抗HCV-cAg基因连接到此位置;将重组载体转移至大肠杆菌中,通过扩繁和质粒抽提,获得大量重组质粒;

重组蛋白表达:将10ug转染级别的重组质粒用脂质体转染试剂导入真核细胞中,37℃ 5%二氧化碳浓度下培养24-36小时后,利用细胞刮刀收集细胞,利用冻融破碎法裂解细胞,通过离心收获上层清液,得到荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白;脂质体转染试剂为Lipofectamine2000,真核细胞为HEK293细胞。

[0026] 2NPM1抗原包被板制作

先用PBS缓冲液溶解NPM1抗原,使得其终浓度为1ug/ml,在酶标版每孔中加入200ulNPM1抗原溶液,4℃包被过夜,弃包被液,加入300ul含1%BSA的PBS溶液,室温封闭2小时;用200ul含0.1%Tween的PBS缓冲液洗涤3次,甩干板内液体。

[0027] 前列腺癌诊断试剂盒的应用,在包被板微孔中分别加入10ul样品血清及NPM1抗体阴性对照品与NPM1抗体阳性对照品,加入10ul的荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白,预先条件浓度至 1×10^7 RLU/10ul,90ul缓冲液I混合,30℃ 300rpm震荡孵育1小时;形成NPM1抗原-NPM1抗体-荧光素酶NPM1抗原融合蛋白的复合物固定在酶标板底部;

弃去孔内的液体,用200ul的PBS缓冲液洗涤5遍,甩干;洗去未结合的重组抗体融合蛋白;用底物缓冲液以1:100稀释荧光素酶底物;在每孔中加入50ul的PBS缓冲液,50ul荧光素酶底物稀释液,立即用荧光检测仪检测荧光强度,对阴阳对照品的结果进行对比判断样品中是否含有NPM1抗体及含量。

[0028] 其中,NPM1抗原氨基酸序列如下:

MEDSMDMDSPLRPQNYLFGCELKADKDYHFVKVDNDENEHQLSLRTVSLGAGAKDELHIVEAEAMNYEGSPIK
VTLATLKMSVQPTVSLGGFEITPPVVLRLKCGSGPVHISGQHLVAVEEDAEESEDEEEEDVKLLSISGKRSAPGGGSK
VPQKKVKLAEDDDDDDEEDDDDDDDDFDDEEAEEKAPVKKSIRDTPAKNAQKSNQNGKDSKPSSTPRSKGQES
FKKQEKTPKTPKGPSSVEDIKAKMQASIEKAH

碱基序列如下:

atggaagattcgatggacatggacatgagccccctgaggccccagaactatcttttcggttgtaactaaag
gccgacaaagattatcactttaaggtggataatgatgaaaatgagcaccagttatctttaagaacggtcagtttag
gggctggtgcaaaggatgagttgcacattgttgaaagcagaggcaatgaattacgaaggcagttccaattaaagtaac
actggcaactttgaaaatgtctgtacagccaacggtttcccttgggggctttgaaataacaccaccagtggtctta
aggttgaaagtgtggttcagggccagtgcatattagtgacagcacttagtagctgtggaggaagatgcagagtcag
aagatgaagaggaggaggatgtgaaactcttaagtatatcttgaaagcggtctgccccctggaggtggttagcaaggt
tccacagaaaaaagtaaaacttgctgctgatgaagatgatgacgatgatgatgaagaggatgatgatgaagatgat

gatgatgatgattttgatgatgaggaagctgaagaaaaagcgccagtgaagaaatctatacgagatactccagcca
aaaatgcacaaaagtcaaatcagaatggaaaagactcaaaacccatcatcaacaccaagatcaaaaggacaagaatc
cttcaagaaacaggaaaaaactcctaaaacacccaaaaggacctagtctctgtagaagacattaaagcaaaaatgcaa
gcaagtatagaaaaagcgcatgga

产品性能指标

1. 试剂盒应外观清洁、无破损,标志、标签字迹清楚;各组分融化后应清澈透明,无沉淀。

[0029] 2. 检测10份阳性参考品,阳性参考品符合率应大于95%。

[0030] 3. 检测10份阴性参考品,阴性参考品符合率应大于95%。

[0031] 4. 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%。

[0032] 5. 批间误差:变异系数CV% $\leq$ 15%。

[0033] 6. 灵敏度:多次重复结果表示,最低检出量为10ng/mL。

[0034] 7. 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> 一种前列腺癌诊断试剂盒及制备方法与应用

<160> 4

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 37

<212> DNA

<213> 上游引物 (2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum)

<400> 1

cggggtaccc cgatggaaga ttcatggac atggaca 37

<210> 2

<211> 37

<212> DNA

<213> 下游引物 (2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum)

<400> 2

tgctctagag catcaatgcg ctttttctat acttgct 37

<210> 3

<211> 259

<212> PRT

<213> NPM1抗原氨基酸 (2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum)

<400> 3

Met Glu Asp Ser Met Asp Met Asp Met Ser Pro Leu Arg Pro Gln Asn

1 5 10 15

Tyr Leu Phe Gly Cys Glu Leu Lys Ala Asp Lys Asp Tyr His Phe Lys

20 25 30

Val Asp Asn Asp Glu Asn Glu His Gln Leu Ser Leu Arg Thr Val Ser

35 40 45

Leu Gly Ala Gly Ala Lys Asp Glu Leu His Ile Val Glu Ala Glu Ala

50 55 60

Met Asn Tyr Glu Gly Ser Pro Ile Lys Val Thr Leu Ala Thr Leu Lys

65 70 75 80

Met Ser Val Gln Pro Thr Val Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ile Thr Pro

85 90 95

Pro Val Val Leu Arg Leu Lys Cys Gly Ser Gly Pro Val His Ile Ser

100 105 110

Gly Gln His Leu Val Ala Val Glu Glu Asp Ala Glu Ser Glu Asp Glu

115 120 125

Glu	Glu	Glu	Asp	Val	Lys	Leu	Leu	Ser	Ile	Ser	Gly	Lys	Arg	Ser	Ala
130						135					140				
Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Lys	Val	Pro	Gln	Lys	Lys	Val	Lys	Leu	Ala	Ala
145					150					155				160	
Asp	Glu	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Glu	Glu	Asp	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp
				165					170				175		
Asp	Asp	Asp	Asp	Phe	Asp	Asp	Glu	Glu	Ala	Glu	Glu	Lys	Ala	Pro	Val
			180					185				190			
Lys	Lys	Ser	Ile	Arg	Asp	Thr	Pro	Ala	Lys	Asn	Ala	Gln	Lys	Ser	Asn
	195					200					205				
Gln	Asn	Gly	Lys	Asp	Ser	Lys	Pro	Ser	Ser	Thr	Pro	Arg	Ser	Lys	Gly
	210					215				220					
Gln	Glu	Ser	Phe	Lys	Lys	Gln	Glu	Lys	Thr	Pro	Lys	Thr	Pro	Lys	Gly
225				230					235				240		
Pro	Ser	Ser	Val	Glu	Asp	Ile	Lys	Ala	Lys	Met	Gln	Ala	Ser	Ile	Glu
			245					250				255			

Lys Ala His

<210> 4

<211> 780

<212> DNA

<213> 碱基序列(2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum)

<400> 4

```

atggaagatt cgatggacat ggacatgagc cccctgaggc ccagaacta tcttttcggt 60
tgtgaactaa aggccgacaa agattatcac ttttaaggtgg ataatgatga aaatgagcac 120
cagttatctt taagaacggt cagtttaggg gctggtgcaa aggatgagtt gcacattggt 180
gaagcagagg caatgaatta cgaaggcagt ccaattaaag taacactggc aactttgaaa 240
atgtctgtac agccaacggt ttcccttggg ggctttgaaa taacaccacc agtggcttta 300
aggttgaagt gtggttcagg gccagtgcatt attagtggac agcacttagt agctgtggag 360
gaagatgcag agtcagaaga tgaagaggag gaggatgtga aactcttaag tatatctgga 420
aagcggctctg cccctggagg tggtagcaag gttccacaga aaaaagtaaa acttgctgct 480
gatgaagatg atgacgatga tgatgaagag gatgatgatg aagatgatga tgatgatgat 540
tttgatgatg aggaagctga agaaaaagcg ccagtgaaga aatctatacg agatactcca 600
gccaaaaatg cacaaaagtc aaatcagaat ggaaaagact caaaaccatc atcaacacca 660
agatcaaaaag gacaagaatc cttcaagaaa caggaaaaaa ctctataaac accaaaagga 720
cctagttctg tagaagacat taaagcaaaa atgcaagcaa gtatagaaaa agcgcattga 780

```

专利名称(译)	一种前列腺癌诊断试剂盒及制备方法与应用		
公开(公告)号	CN109765370A	公开(公告)日	2019-05-17
申请号	CN201811546042.X	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		
发明人	唐东起 周扬 陈政鑫		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/68 G01N33/58 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的试剂盒用于诊断NPM1抗体，将海肾荧光素酶基因与NPM1抗原基因重组为融合载体，利用细胞转化技术，将融合载体导入哺乳细胞系统中，进行荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白表达；裂解基因重组细胞，获得荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白，将NPM1抗原包被在96酶标板中，加入待测血清。血清中的抗体会与板上的抗原结合附在板上；加入荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白，通过免疫沉淀反应，使得荧光素酶-NPM1抗原融合蛋白与患者血清中的NPM1抗体发生结合反应并吸附在板上，最终加入荧光素酶底物，检测荧光强度。根据荧光强度即可反映出NPM1抗体的含量，为前列腺癌的诊断提供参考。该方法快速简便、高灵敏度。