



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109085362 A

(43)申请公布日 2018.12.25

(21)申请号 201810814426.9

(22)申请日 2018.07.23

(71)申请人 中国石油大学(华东)

地址 266000 山东省青岛市黄岛区长江西
路66号中国石油大学(华东)

申请人 青岛蓝谷未来海洋科技有限公司

(72)发明人 葛保胜 王祥法 黄方 迟海霞

(74)专利代理机构 北京慕达星云知识产权代理
事务所(特殊普通合伙)
11465

代理人 李冉

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

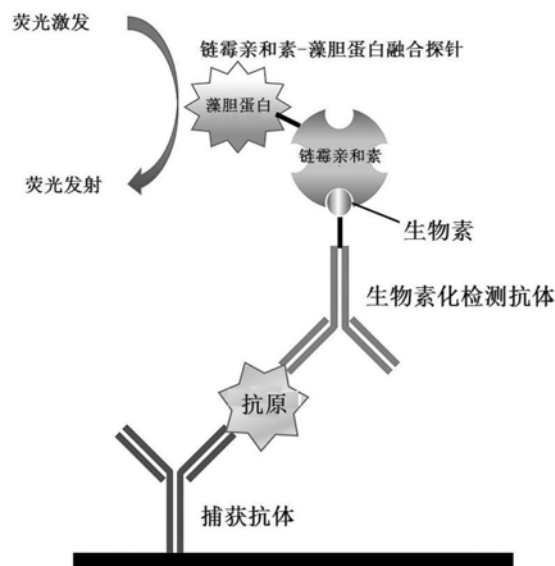
权利要求书2页 说明书6页
序列表3页 附图7页

(54)发明名称

一种用于肝癌早期检测的试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于肝癌早期检测的试剂盒及其制备方法,试剂盒包括荧光酶标板、样品稀释液、洗涤液、阴性对照、阳性对照、抗肝癌标志物的单克隆抗体、生物素标记的抗肝癌标志物的单克隆抗体和链霉亲和素-藻胆蛋白荧光探针。本发明用于肝癌早期检测的试剂盒,减少了加入化学底物显色的步骤,操作步骤简单;灵敏度高,副产物少;本发明通过多基因组合表达方式,在大肠杆菌内实现“体内一步法”合成链霉亲和素/藻胆蛋白类融合荧光蛋白,在完成藻胆蛋白标记的同时,保证了融合分子具有稳定的荧光性质,同时该融合蛋白还具有良好的针对生物素化物质的靶向性,从而增强了藻胆蛋白在免疫检测中的应用能力。



1. 一种用于肝癌早期检测的试剂盒,其特征在于,包括荧光酶标板、样品稀释液、洗涤液、阴性对照、阳性对照、抗肝癌标志物的单克隆抗体、生物素标记的抗肝癌标志物的单克隆抗体和链霉亲和素-藻胆蛋白荧光探针。

2. 根据权利要求1所述的一种用于肝癌早期检测的试剂盒,其特征在于,所述样品稀释液为PBST溶液;洗涤液为PBST溶液;阴性对照为PBST溶液;阳性对照为肝癌标志物。

3. 根据权利要求1或2所述的一种用于肝癌早期检测的试剂盒,其特征在于,所述肝癌标志物为AFP或CEA。

4. 根据权利要求1所述的一种用于肝癌早期检测的试剂盒,其特征在于,所述抗肝癌标志物的单克隆抗体为鼠抗AFP的单克隆抗体或鼠抗CEA的单克隆抗体。

5. 根据权利要求1所述的一种用于肝癌早期检测的试剂盒,其特征在于,所述生物素标记的抗肝癌标志物的单克隆抗体为生物素化的鼠抗AFP的单克隆抗体或生物素化的鼠抗CEA的单克隆抗体。

6. 一种用于肝癌早期检测的试剂盒的制备方法,其特征在于,具体步骤如下:

(1) 在荧光酶标板的每孔加入100 μ L 5 μ g/mL的抗肝癌标志物的单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C过夜吸附;

(2) 用洗涤液150~200r/min振荡洗涤3~5min,重复3~5次;

(3) 每孔加入200 μ L封闭液,37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中孵育100~150min;

(4) 用洗涤液150~200r/min振荡洗涤3~5min,重复3~5次;

(5) 在反应孔内分别加入稀释液梯度稀释的待测样品、阴性对照和阳性对照各100 μ L,每孔重复3次,盖上荧光酶标板盖;

(6) 用洗涤液150~200r/min振荡洗涤3~5min,甩去孔内液体,用吸水纸拍干,重复此操作3次;

(7) 每孔加入100 μ L稀释液稀释的终浓度为5 μ g/mL的生物素标记的抗肝癌标志物的单克隆抗体,37 $^{\circ}$ C恒温振荡器上150~200r/min震荡孵育50~80min;

(8) 用洗涤液150~200r/min振荡洗涤3~5min,重复此操作3~5次;

(9) 每孔加入稀释液稀释的链霉亲和素-藻胆蛋白荧光探针100 μ L,在37 $^{\circ}$ C避光条件下150~200r/min振荡反应50~80min;

(10) 用洗涤液150~200r/min振荡洗涤3~5min,重复此操作3~5次;

(11) 用特定波长激发,测定各孔的荧光值。

7. 根据权利要求6所述的一种用于肝癌早期检测的试剂盒的制备方法,其特征在于,所述的链霉亲和素-藻胆蛋白荧光探针的制备方法如下:

(1) 将藻胆蛋白脱辅基蛋白亚基基因cpcA与链霉亲和素基因sa利用重叠PCR技术进行基因融合构建,将融合片段sa-cpcA与藻胆蛋白裂合异构酶E和F编码基因或其同源基因克隆至多表达质粒的同一启动子下;将血红素加氧酶1基因hox1或其同源基因、藻胆色素合成酶基因pcyA或pebS或其同源基因置于多表达质粒的另外一启动子下,构建出重组表达质粒PEBS或PCBS;

(2) 将步骤(1)所构建的重组表达质粒PEBS或PCBS转入相应的宿主菌,分别得到不同的大肠杆菌重组工程菌株;利用发酵工程方法培养所述大肠杆菌重组工程菌株,诱导重组蛋白表达,纯化表达的重组蛋白,获得融合蛋白。

8. 根据权利要求7所述的一种用于肝癌早期检测的试剂盒的制备方法,其特征在于,所述多表达质粒为pCDFDuet-1,pETDuet-1,pRSFDuet-1或pACYCDuet-1。

9. 根据权利要求6所述的一种用于肝癌早期检测的试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤(11)所述特定检测波长如下:PEBS为568nm,PCBS为646nm。

一种用于肝癌早期检测的试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于肝癌早期检测的试剂盒及其制备方法,属于肝癌检测技术领域。

背景技术

[0002] 肝癌,尤其是原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一,位居肿瘤死亡的第二位,我国每年约有13万人死于肝癌,占全球新发肝癌人数的一半以上。大多数肝癌患者就诊时已届中、晚期,错失最佳治疗时机,早期诊断和早期治疗是防治肝癌和降低死亡率的最有效办法。目前市场所用肝癌检测试剂盒多采用化学发光法进行检测,该方法存在所需设备要求高,操作步骤复杂,实验结果容易受到血清中自发荧光物质的干扰,实验成本较高等缺点。

[0003] 藻胆蛋白(Phycobiliprotein)是一类天然优良的荧光探针分子,按照颜色可以分为两大类:藻红蛋白(Phycoerythrin,PE)和藻蓝蛋白(Phycocyanin,PC),藻红蛋白的最大吸收光谱范围在490-570nm间,而藻蓝蛋白的最大吸收光谱范围在610-665nm间。该吸收和荧光波长可以避开血清中自发荧光的干扰,因此在体内外免疫荧光检测中被广泛应用。

[0004] 常规的藻胆蛋白荧光探针的制备方法是化学交联,依赖藻胆蛋白类分子表面存在着的很多的赖氨酸残基,使用交联剂(如SPDP、戊二醛等)将赖氨酸残基侧链 ϵ -氨基酸与其他的生物大分子共价结合到一起,实现大分子之间的共价交联。通过这种交联的方法可以制成藻胆蛋白-亲和素、藻胆蛋白-单抗、藻胆蛋白-藻胆蛋白等多种交联物,而且共价交联产物仍会保留两种交联产物的本身的生物活性。采用化学交联技术将藻胆蛋白和酶标记,反应后酶的活性可能会降低,而且化学交联的前期准备工作较复杂,需要单独纯化各种交联原材料,交联副产物较多。因此,亟需一种灵敏度高、副产物少的藻胆蛋白荧光探针制备方法及其基于该方法开发可用于肝癌早期检测的试剂盒。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种灵敏度高、副产物少的用于肝癌早期检测的藻胆蛋白荧光探针试剂盒及其制备方法。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 一种用于肝癌早期检测的藻胆蛋白荧光探针试剂盒,包括荧光酶标板、样品稀释液、洗涤液、阴性对照、阳性对照、抗肝癌标志物的单克隆抗体、生物素标记的抗肝癌标志物的单克隆抗体和链霉亲和素-藻胆蛋白荧光探针。

[0008] 进一步,所述样品稀释液为PBST溶液;洗涤液为PBST溶液;阴性对照为PBST溶液;阳性对照为肝癌标志物;

[0009] 进一步,所述肝癌标志物为甲胎蛋白(AFP)或癌胚抗原(CEA)或其他肿瘤标志物。

[0010] 进一步,所述抗肝癌标志物的单克隆抗体为鼠抗AFP的单克隆抗体或鼠抗CEA的单克隆抗体或其他鼠抗肿瘤标志物抗体。

[0011] 进一步,所述生物素标记的抗肝癌标志物的单克隆抗体为生物素化的鼠抗AFP的

单克隆抗体或生物素化的鼠抗CEA的单克隆抗体。

[0012] 优选地,链霉亲和素-藻胆蛋白荧光探针的制备方法,具体步骤如下:

[0013] (1) 将藻胆蛋白脱辅基蛋白亚基基因cpcA与链霉亲和素基因sa利用重叠PCR技术进行基因融合构建,将融合片段sa-cpcA与藻胆蛋白裂合异构酶E和F编码基因或其同源基因克隆至多表达质粒的同一启动子下;将血红素加氧酶1基因hox1或其同源基因、藻胆色素合成酶基因pcyA或pebS或其同源基因置于多表达质粒的另外一启动子下,构建出重组表达质粒PEBS和PCBS;

[0014] (2) 将步骤(1)所构建的重组表达质粒PEBS或PCBS转入相应的宿主菌,分别得到不同的大肠杆菌重组工程菌株;利用发酵工程方法培养所述大肠杆菌重组工程菌株,诱导重组蛋白表达,纯化表达的重组蛋白,获得融合蛋白。

[0015] 优选地,所述多表达质粒为pCDFDuet-1,pETDuet-1,pRSFDuet-1或pACYCDuet-1。

[0016] 进一步,一种用于肝癌早期检测的试剂盒的制备方法,具体步骤如下:

[0017] (1) 在荧光酶标板的每孔加入100 μ L 5 μ g/mL的抗肝癌标志物的单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C过夜吸附;

[0018] (2) 用洗涤液150~200r/min振荡洗涤3~5min,重复3~5次;

[0019] (3) 每孔加入200 μ L封闭液,37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中孵育100~150min;

[0020] (4) 用洗涤液150~200r/min振荡洗涤3~5min,重复3~5次;

[0021] (5) 在反应孔内分别加入稀释液梯度稀释的待测样品、阴性对照和阳性对照各100 μ L,每孔重复3次,盖上荧光酶标板盖;

[0022] (6) 用洗涤液150~200r/min振荡洗涤3~5min,甩去孔内液体,用吸水纸拍干,重复此操作3次;

[0023] (7) 每孔加入100 μ L稀释液稀释的终浓度为5 μ g/mL的生物素标记的抗肝癌标志物的单克隆抗体,37 $^{\circ}$ C恒温振荡器上150~200r/min震荡孵育50~80min;

[0024] (8) 用洗涤液150~200r/min振荡洗涤3~5min,重复此操作3~5次;

[0025] (9) 每孔加入稀释液稀释的链霉亲和素-藻胆蛋白荧光探针100 μ L,在37 $^{\circ}$ C避光条件下150~200r/min振荡反应50~80min;

[0026] (10) 用洗涤液150~200r/min振荡洗涤3~5min,重复此操作3~5次;

[0027] (11) 用特定波长激发,测定各孔的荧光值。

[0028] 优选地,步骤(11)所述特定检测波长如下:PEBS为568nm,PCBS为646nm。

[0029] 优选地,所述PBST溶液为:1 \times PBS 999.5mL,加入Tween 20 0.5mL,充分溶解混匀,放于室温备用。

[0030] 优选地,所述封闭液为在PBST溶液中加入质量体积分数为5%的脱脂奶粉。

[0031] 本发明用于肝癌早期检测的检测原理示意图见图1。

[0032] 本发明的有益效果是:本发明用于肝癌早期检测的试剂盒,减少了加入化学底物显色的步骤,操作步骤简单;灵敏度高,副产物少;本发明通过多基因组合表达方式,在大肠杆菌内实现“体内一步法”合成链霉亲和素/藻胆蛋白类融合荧光蛋白,在完成藻胆蛋白标记的同时,保证了融合分子具有稳定的荧光性质,同时该融合蛋白还具有良好的针对生物素化物质的靶向性,从而增强了藻胆蛋白在免疫检测中的应用能力。

附图说明

[0033] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据提供的附图获得其他的附图。

[0034] 图1附图为本发明用于肝癌早期检测的检测原理示意图;

[0035] 图2附图为本发明sa和cpcA基因PCR产物1%琼脂糖凝胶电泳结果;

[0036] 图3附图为本发明sa-cpcA连接产物1%琼脂糖凝胶电泳结果;

[0037] 图4附图为本发明重组质粒pCDFDuet-sa-cpcA-cpcE/F-hox1-pebS的构建示意图;

[0038] 图5附图为本发明重组质粒pCDFDuet-sa-cpcA-cpcE/F-hox1-pcyA的构建示意图;

[0039] 图6附图为本发明pCDFDuet-cpcA-cpcE/F-hox1-pcyA质粒双酶切产物1%琼脂糖凝胶电泳结果;其中,M为Marker,1为sa-cpcA基因,2为切除sa-cpcA基因的重组载体;

[0040] 图7附图为本发明重组蛋白PCBS的SDS-PAGE和锌离子电泳分析;其中,M为Marker,1为重组蛋白的考染结果,2重组蛋白的锌离子电泳;

[0041] 图8附图为本发明重组蛋白PCBS的吸收和荧光发射光谱;

[0042] 图9附图为本发明重组蛋白PEBS的SDS-PAGE和锌离子电泳分析;其中,M为Marker,1为重组蛋白的考染结果,2重组蛋白的锌离子电泳;

[0043] 图10附图为本发明重组蛋白PEBS的吸收和荧光发射光谱;

[0044] 图11附图为本发明以PCBS为探针检测AFP;

[0045] 图12附图为本发明以PCBS为探针检测CEA;

[0046] 图13附图为本发明以PEBS为探针检测AFP;

[0047] 图14附图为本发明以PEBS为探针检测CEA。

具体实施方式

[0048] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但是应理解所述实施例仅是范例性的,不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改或替换均落入本发明的保护范围。

[0049] 实施例1表达重组蛋白PCBS或PEBS基因工程菌株的构建

[0050] 根据国际基因数据库中公开的螺旋藻基因组中藻胆蛋白生物合成途径相关基因序列,设计相关引物,克隆获得藻胆蛋白合成关键酶基因cpcA,cpcE/F,hox1,pcyA,pebS等。链霉菌亲和素基因sa根据NCBI中公开的氨基酸序列,推导出其核苷酸序列,并将其经过密码子优化后,通过化学合成法获得。链霉菌亲和素基因sa如SEQ ID NO:1所示,经密码子优化后的链霉菌亲和素基因sa如SEQ ID NO:2所示。经优化后的sa序列可以提高SA在大肠杆菌体内的可溶性表达,提高其表达量。

[0051] 本发明利用生物工程菌株稳定生产具有生物素结合能力和荧光活性的融合链霉菌亲和素的藻胆蛋白 α 亚基的方法,采用基因工程的方法,首先以PCA-F和PCA-R为引物,集胞藻6803基因组为模板扩增得到cpcA基因(cpcA基因如SEQ ID NO:3所示,扩增结果如图2所

示);并以SA-F和SA-R为引物,密码子优化的sa基因为模板,扩增得到sa基因。再分别以引物SA-F、SA-PCA-R和SA-PCA-F、PCA-R扩增sa和cpcA基因片段,PCR产物经胶回收纯化后,再共同作为模板进行第二步重叠PCR。重叠PCR以第一步扩增产物为模板,SA-F、PCA-R为引物进行重叠PCR反应,结果如图3所示;

[0052] 所需引物序列如下:

[0053] cpcA的正向引物PCA-F:

[0054] 5'-GCGGATCCGATGAAAACCCCTAAC-3';BamHI;SEQ ID NO:4;

[0055] cpcA的反向引物PCA-R:

[0056] 5'-ATGCGGCCGCTACTAGCTTAGGGCGTTGATC-3';Not I;SEQ ID NO:5;

[0057] sa的正向引物SA-F:

[0058] 5'-GCGGATCCGATGGCAGAAGCGGGTATCAC-3';BamH I;SEQ ID NO:6;

[0059] sa的反向引物SA-R:

[0060] 5'-ATGCGGCCGCTTAAGAAGCCGCGGACGGTTTTAC-3';Not I;SEQ ID NO:7;

[0061] sa-cpcA的正向连接引物SA-PCA-F:

[0062] 5'-GTAAACCGTCCGCGGCTTCTGGCGGCGGCAGCGGCGGCAGCATGAAAACCCCTAACCGAAG-3';SEQ ID NO:8;

[0063] sa-cpcA的反向连接引物SA-PCA-R:

[0064] 5'-CTTCGGTTAGGGGGTTTTTCATGCTGCCGCCGCCGCTGCCGCCGCCAGAAGCCGCGGACGGTTTTAC-3';SEQ ID NO:9。

[0065] 将藻胆蛋白类脱辅基蛋白亚基基因(cpcA)与核心链霉亲和素基因(sa)通过重叠PCR引入的蛋白linker连接,将融合片段sa-cpcA(序列如SEQ ID NO:10所示)与藻蓝蛋白裂合异构酶E和F编码基因(cpcE和cpcF)克隆至同一启动子下;将血红素加氧酶1基因(hox1)、藻蓝胆素合成酶基因(pcyA或pebS)置于同一启动子下,构建出融合蛋白SA-PCA-PCB的重组表达质粒pCDFDuet-cpcA-cpcE/F-hox1-pcyA(PCBS)或融合蛋白SA-PCA-PEB的重组表达质粒pCDFDuet-cpcA-cpcE/F-hox1-pebS(PEBS),结果如图4和图5所示。以限制性内切酶BamH I、SacI对pCDFDuet-cpcA-cpcE/F-hox1-pcyA载体进行双酶切,结果如图6所示。

[0066] 实施例2重组表达质粒PCBS或PEBS的表达纯化及表征

[0067] (1) 重组表达质粒PCBS或PEBS摇瓶培养

[0068] 将所述的重组表达质粒PCBS或PEBS转入大肠杆菌BL21(DE3),得到工程菌株P1或P2。利用常规的发酵工程方法培养,优化的诱导条件进行重组蛋白的诱导表达,采用优化制备方法进行融合蛋白的纯化制备。所述的诱导条件,将过夜培养的种子液分别以1%的体积比接入1L的TB培养基中(含TB medium 900mL,TB salt 100mL),在37℃恒温摇床上170rpm培养菌体至OD₆₀₀达到1.3时,加入诱导剂IPTG、乳糖中的一种或两种,诱导剂的终浓度分别为0.5和2mmol/L,降温至18℃,170rpm继续诱导表达20-24h,目的蛋白表达量达到最高,1L培养液收集得到的菌体湿重约为6.7g或8.3g。

[0069] (2) 重组蛋白PCBS或PEBS的纯化

[0070] 重组蛋白含有组氨酸标签,使用镍亲和层析柱进行蛋白纯化;具体操作步骤为:

[0071] 将上述1L培养基收集得到的菌体分别悬浮于50mL Lysis buffer(Tris-HCl 25mM,NaCl 300mM,咪唑5mM,pH=7.5)中,并在每100mL裂解液中加入0.05g溶菌酶、10μL

DNA裂解酶及70 μ L DNAdigest buffer;高压细胞破碎仪1000–1500bar循环破碎3次;细胞破碎液8000 \times g,离心10min,去沉淀保留上清液;将上清液用0.45 μ m滤头过滤,上样到Ni²⁺亲和色谱柱;上样后以Lysis buffer冲洗色谱柱至基线平衡,分别以含不同浓度咪唑的Elution buffer (Tris-HCl 25mM, NaCl 300mM, 咪唑250mM)洗脱杂蛋白;最终以Elution buffer洗脱。

[0072] (3) 重组蛋白PCBS或PEBS的荧光性质及活性测定

[0073] 经SDS-PAGE与锌离子电泳检测,纯化得到的蛋白为PCBS目的蛋白,且重组蛋白质有多条条带,一条是目的条带,其余是目的蛋白的多聚体条带结果如图7所示,所述的融合蛋白PCBS分子量为34.4kDa,最大特征吸收 λ_{ex} 为624nm,荧光光谱仪测得最大发射峰 λ_{em} 为646nm,结果如图8所示;荧光量子产率 $\Phi_{FSA-PCA-PEB}$ 为0.1;与生物素结合活性为2.2U。以上性质表明融合蛋白PCBS具有较好的荧光性质及生物素结合活性,在荧光分子探针的开发方面具有良好的应用前景。

[0074] 经SDS-PAGE与锌离子电泳检测,纯化得到的蛋白为PEBS目的蛋白,且重组蛋白质有多条条带,一条是目的条带,其余是目的蛋白的多聚体条带结果如图9所示,所述的融合蛋白PEBS分子量为34.4kDa,最大特征吸收 λ_{ex} 为556nm,荧光光谱仪测得最大发射峰 λ_{em} 为568nm,结果如图10所示;荧光量子产率 $\Phi_{FSA-PCA-PEB}$ 为0.41;与生物素结合活性为4.1U。以上性质表明融合蛋白PEBS具有较好的荧光性质及生物素结合活性,在荧光分子探针的开发方面具有良好的应用前景。

[0075] 实施例3用于肝癌早期检测的试剂盒的制备

[0076] 一种用于肝癌早期检测的试剂盒的制备方法,具体步骤如下:

[0077] (1) 在荧光酶标板的每孔加入100 μ L 5 μ g/mL的抗肝癌标志物的单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C过夜吸附;

[0078] (2) 用洗涤液170r/min振荡洗涤3min,重复3次;

[0079] (3) 每孔加入200 μ L封闭液,37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中孵育120min;

[0080] (4) 用洗涤液170r/min振荡洗涤3min,重复3次;

[0081] (5) 在反应孔内分别加入稀释液梯度稀释的待测样品、阴性对照PBST溶液和阳性对照肝癌标志物AFP各100 μ L,每孔重复3次,盖上荧光酶标板盖;

[0082] (6) 用洗涤液170r/min振荡洗涤3min,甩去孔内液体,用吸水纸拍干,重复此操作3次;

[0083] (7) 每孔加入100 μ L稀释液稀释的终浓度为5 μ g/mL的生物素标记的抗肝癌标志物的单克隆抗体,37 $^{\circ}$ C恒温振荡器上170r/min震荡孵育60min;

[0084] (8) 用洗涤液170r/min振荡洗涤3min,重复此操作3次;

[0085] (9) 每孔加入稀释液稀释的荧光探针PCBS 100 μ L,在37 $^{\circ}$ C避光条件下170r/min振荡反应60min;

[0086] (10) 用洗涤液170r/min振荡洗涤3min,重复此操作3次;

[0087] (11) 用646nm波长激发,测定各孔的荧光值。

[0088] 使用荧光探针PCBS作为探针分子对早期肝癌标志物甲胎蛋白 (AFP) 和癌胚抗原 (CEA) 进行检测时,发现在0–50ng范围内具有良好的线性关系,且对AFP的最低检测限为1.01ng/mL,结果如图11所示;对CEA的检测限为1.12ng/mL,结果如图12所示。

[0089] 实施例4用于肝癌早期检测的试剂盒的制备

[0090] 一种用于肝癌早期检测的试剂盒的制备方法,具体步骤如下:

[0091] (1) 在荧光酶标板的每孔加入100 μ L 5 μ g/mL的抗肝癌标志物的单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C过夜吸附;

[0092] (2) 用洗涤液170r/min振荡洗涤3min,重复3次;

[0093] (3) 每孔加入200 μ L封闭液,37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中孵育120min;

[0094] (4) 用洗涤液170r/min振荡洗涤3min,重复3次;

[0095] (5) 在反应孔内分别加入稀释液梯度稀释的待测样品、阴性对照PBST溶液和阳性对照肝癌标志物CEA各100 μ L,每孔重复3次,盖上荧光酶标板盖;

[0096] (6) 用洗涤液170r/min振荡洗涤3min,甩去孔内液体,用吸水纸拍干,重复此操作3次;

[0097] (7) 每孔加入100 μ L稀释液稀释的终浓度为5 μ g/mL的生物素标记的抗肝癌标志物的单克隆抗体,37 $^{\circ}$ C恒温振荡器上170r/min震荡孵育60min;

[0098] (8) 用洗涤液170r/min振荡洗涤3min,重复此操作3次;

[0099] (9) 每孔加入稀释液稀释的荧光探针PEBS 100 μ L,在37 $^{\circ}$ C避光条件下170r/min振荡反应60min;

[0100] (10) 用洗涤液170r/min振荡洗涤3min,重复此操作3次;

[0101] (11) 用568nm波长激发,测定各孔的荧光值。

[0102] 使用荧光探针PEBS作为探针分子对早期肝癌标志物甲胎蛋白(AFP)和癌胚抗原(CEA)进行检测时,发现在0-50ng范围内同样具有良好的线性关系,且对AFP的最低检测限为0.25ng/mL,结果如图13所示;对CEA的检测限为0.28ng/mL,结果如图14所示。

[0103] 参考目前临床上肝癌早期检测中,当AFP指标定量 >400 ng/mL或者 >200 ng/mL,持续8周;而CEA超过20ng/mL时,可视为肝癌发病确诊。因此本方法所制备的藻胆蛋白荧光探针完全可满足现有检测标准的需要,可以对早期肝癌进行准确检测。因此,该荧光探针将在疾病检测方面具有巨大的潜力。

[0104] 本说明书中各个实施例采用递进的方式描述,每个实施例重点说明的都是与其他实施例的不同之处,各个实施例之间相同相似部分互相参见即可。对于实施例公开的装置而言,由于其与实施例公开的方法相对应,所以描述的比较简单,相关之处参见方法部分说明即可。

[0105] 对所公开的实施例的上述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

序列表

<110> 中国石油大学(华东);青岛蓝谷未来海洋科技有限公司

<120> 一种用于肝癌早期检测的试剂盒及其制备方法

<160> 10

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 387

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

```
atggccgaag ctggtatcac tggcacctgg tataaccaac tggggtcgac tttcattgtg 60
accgctggtg ctgacggagc tctgactggc acctacgaat ctgcggttgg taacgcagaa 120
tcccgctacg tactgactgg ccgttatgac tctgcacctg ccaccgatgg ctctggtacc 180
gctctgggct ggactgtggc ttggaaaaac aactatcgta atgcgcacag tgccactacg 240
tggtctggcc aatacgttgg cgggtctgag gctcgtatca acactcagtg gctgttaaca 300
tccggcacta ccgaagcgaa tgcattgaaa tcgacactag taggtcatga cacctttacc 360
aaagttaagc cttctgctgc tagctaa 387
```

<210> 2

<211> 387

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

```
atggcagaag cgggtatcac tgggtacttg tataatcaac tgggtagcac cttcattgtg 60
accgcgggcg ctgacggcgc actgactggt acctacgaaa gcgcggttgg caacgccgag 120
tcccgctatg tcctgaccgg ccgttacgat tccgcgccgg ccaccgatgg ttctggcacc 180
gctctgggct ggaccgtggc gtggaaaaac aactaccgta acgcccattc tgcaaccacc 240
tgagcggccc agtacgttgg tgggtgcagaa gctcgtatca acacgcagtg gctgctgacc 300
tctggtacta cggaagctaa cgcattgaaa tctaccctgg ttggtcacga cacttttact 360
aaggtaaaac cgtccgcggc ttcttaa 387
```

<210> 3

<211> 492

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

```
atgaaaaccc ccctaaccga agcagtttct atcgtgatt cccaaggtcg tttcctaagt 60
agcaccgaaa tccaagtagc ttttgccgt tttcgtcaag ccaaagctgg tctggaagct 120
gctaaagctt tgacctctaa agctgatagt ctgatcagt gtgctgcca agcagtgtac 180
aacaagttcc cctacaccac ccaaattgcag ggacctaaact acgcgcgaga ccaacgcggt 240
```

aaggacaaat gtgctcgtga cataggctac tacctgcgga tggtaactta ttgcctgatt 300
gctggtggaa ctggcccat ggatgagtag ctgattgccg gtattgatga aatcaaccgg 360
actttcgagc tttctccaag ctggtacatt gaagccctga aatacatcaa agctaaccac 420
ggtttgtctg gtgacgctgc tgttgaagct aactcctacc tcgactacgc gatcaacgcc 480
ctaagctagt ag 492

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

gcggatccga tgaaaacccc cctaac 26

<210> 5

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

atgcggccgc ctactagctt agggcgttga tc 32

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

gcggatccga tggcagaagc gggatcac 29

<210> 7

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

atgcggccgc ttaagaagcc gcggacggtt ttac 34

<210> 8

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

gtaaaaccgt ccgcggcttc tggcggcggc agcggcggcg gcagcatgaa aaccccccta 60
accgaag 67

<210> 9

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

cttcggttag gggggttttc atgctgccgc cgccgctgcc gccgccagaa gccgcggacg 60
gtttttac 67

<210> 10

<211> 900

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

atggcagaag cgggtatcac tggacttgg tataatcaac tgggtagcac cttcattgtg 60
accgcgggcg ctgacggcgc actgactggg acctacgaaa gcgcggttgg caacgccgag 120
tcccgtatg tcctgaccgg ccgttacgat tccgcgccgg ccaccgatgg ttctggcacc 180
gctctgggct ggaccgtggc gtggaaaaac aactaccgta acgcccattc tgcaaccacc 240
tggagcggcc agtacgttgg tgggtgcagaa gctcgtatca acacgcagtg gctgctgacc 300
tctggtacta cggaagctaa cgcattggaaa tctaccctgg ttggtcacga cacttttact 360
aaggtaaaac cgtccgcggc ttctggcggc ggcagcggcg gcggcagcat gaaaaccccc 420
ctaaccgaag cagtttctat cgctgattcc caaggtcggt tcctaagtag caccgaaatc 480
caagtagctt ttggccgttt tcgtcaagcc aaagctggtc tggaagctgc taaagctttg 540
acctctaaag ctgatatgtc gatcagtggt gctgcccagg cagtgtacaa caagttcccc 600
tacaccaccc aaatgcaggg acctaacctac gcggcagacc aacgcggtaa ggacaaatgt 660
gctcgtgaca taggctacta cctgcggatg gtaacttatt gcctgattgc tgggtggaact 720
ggcccatg atgagtacct gattgccggg attgatgaaa tcaaccggac tttcgagctt 780
tctccaagct ggtacattga agccctgaaa tacatcaaag ctaaccacgg tttgtctggt 840
gacgctgctg ttgaagctaa ctctacctc gactacgcga tcaacgcctt aagctagtag 900

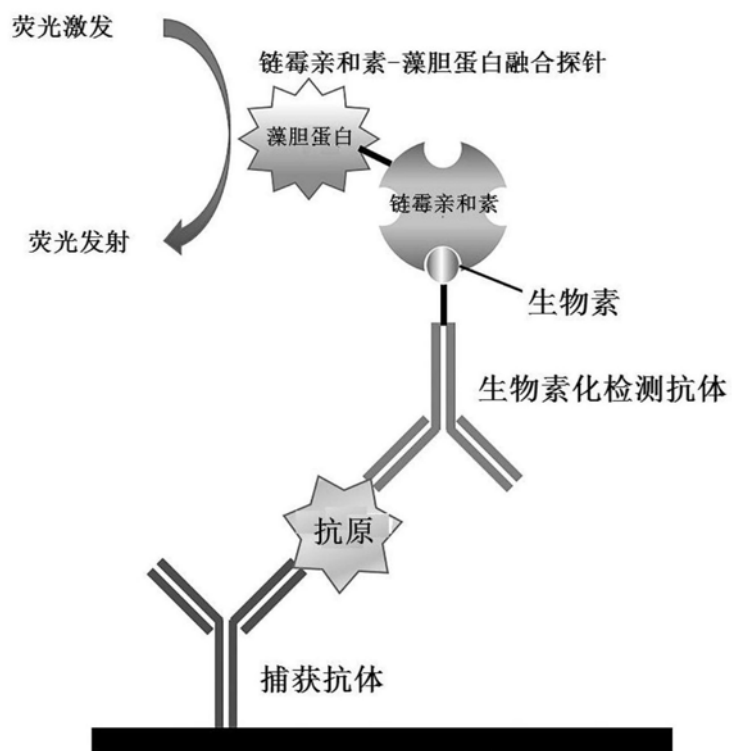


图1

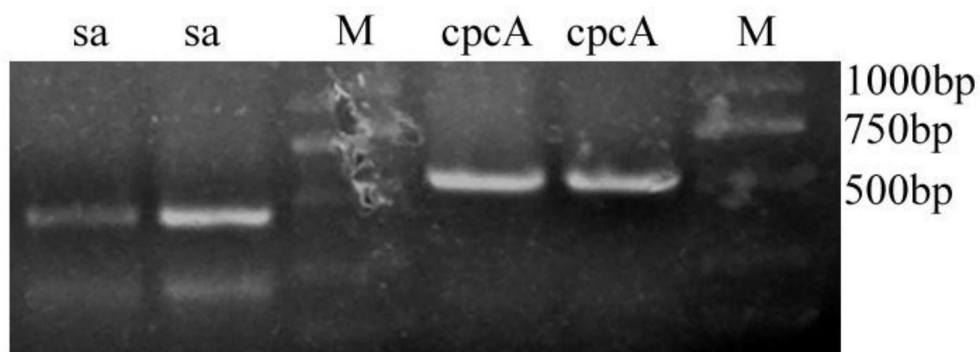


图2

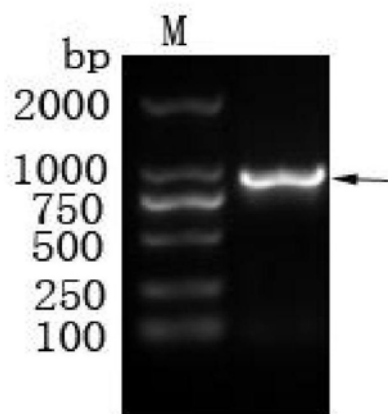


图3

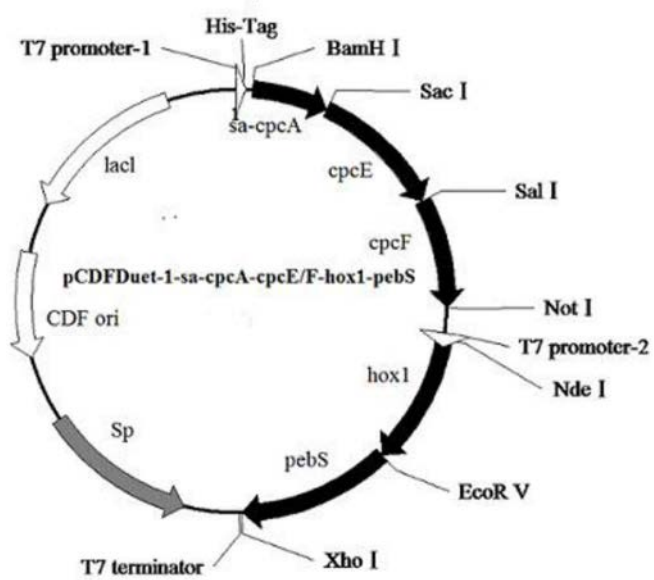


图4

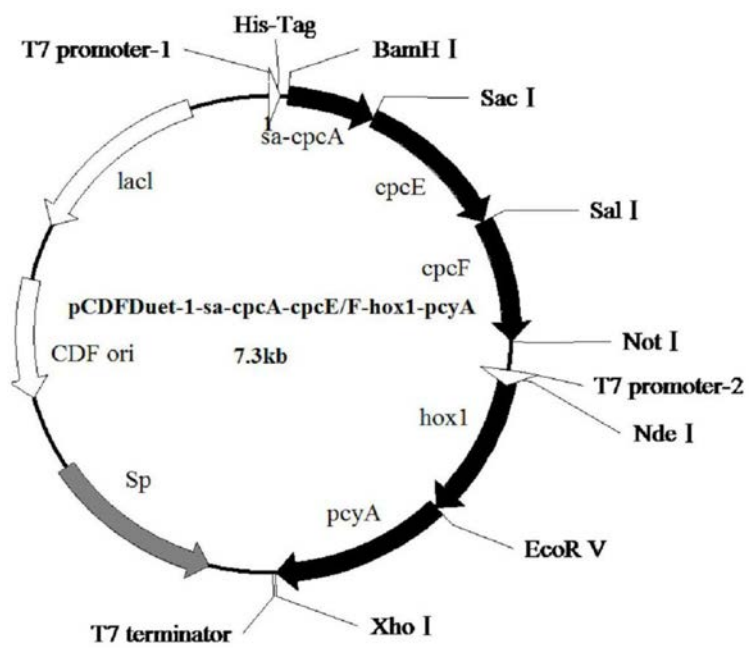


图5

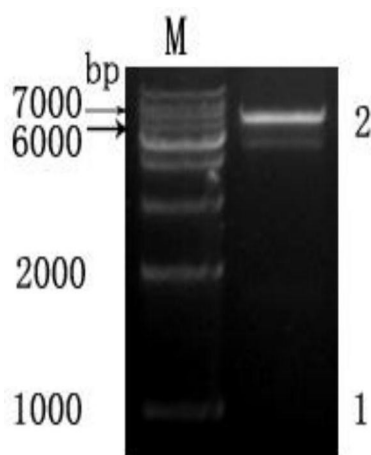


图6

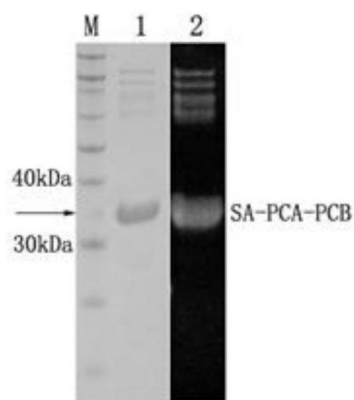


图7

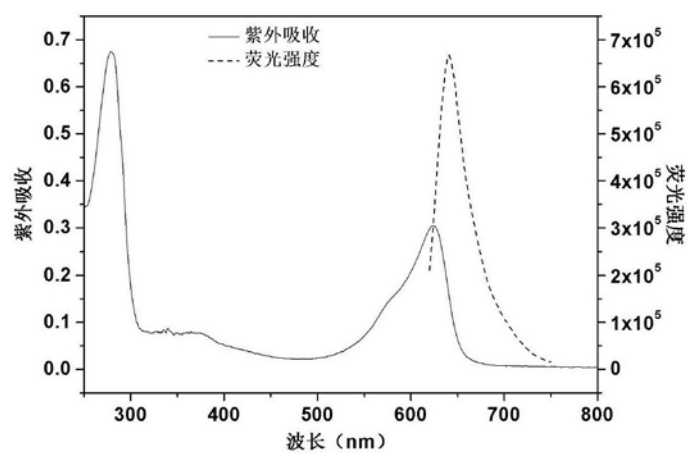


图8

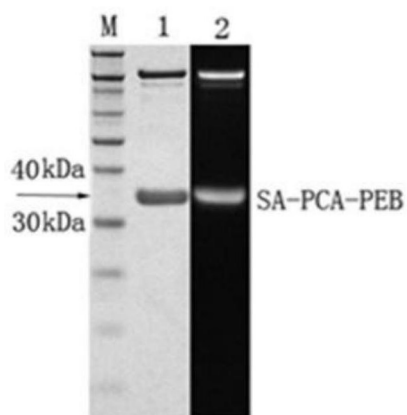


图9

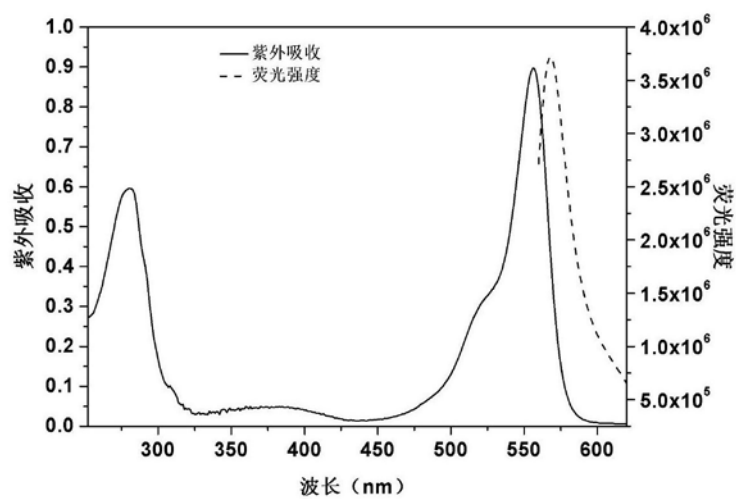


图10

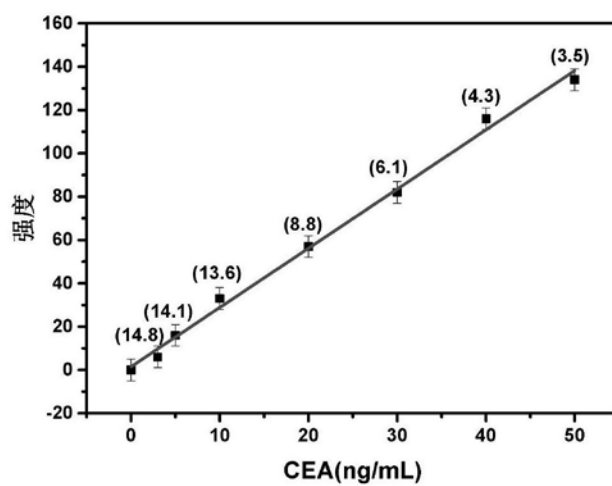


图11

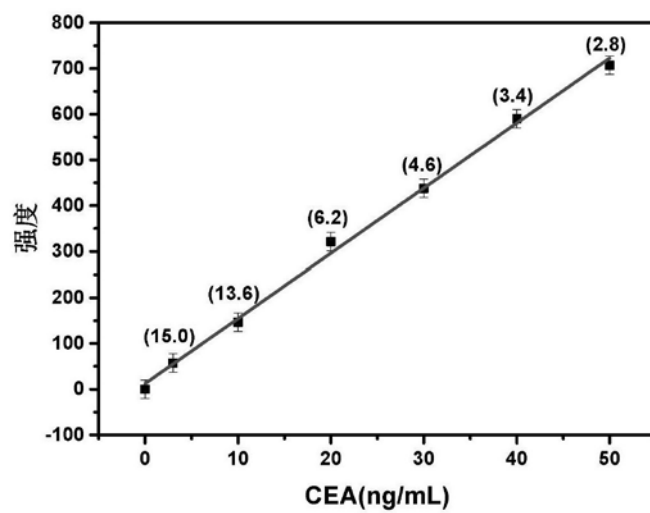


图12

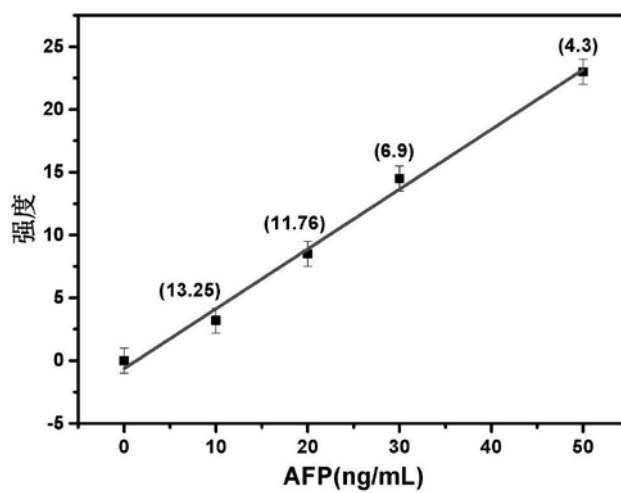


图13

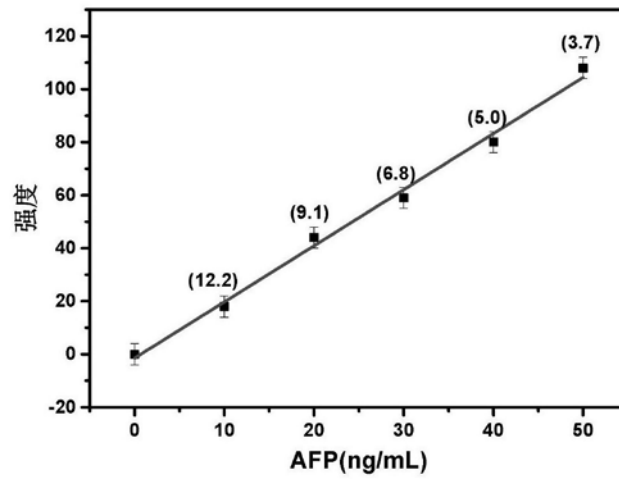


图14

专利名称(译)	一种用于肝癌早期检测的试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN109085362A	公开(公告)日	2018-12-25
申请号	CN201810814426.9	申请日	2018-07-23
[标]申请(专利权)人(译)	中国石油大学(华东)		
申请(专利权)人(译)	中国石油大学(华东)		
当前申请(专利权)人(译)	中国石油大学(华东)		
[标]发明人	葛保胜 王祥法 黄方 迟海霞		
发明人	葛保胜 王祥法 黄方 迟海霞		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/533		
代理人(译)	李冉		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于肝癌早期检测的试剂盒及其制备方法，试剂盒包括荧光酶标板、样品稀释液、洗涤液、阴性对照、阳性对照、抗肝癌标志物的单克隆抗体、生物素标记的抗肝癌标志物的单克隆抗体和链霉亲和素-藻胆蛋白荧光探针。本发明用于肝癌早期检测的试剂盒，减少了加入化学底物显色的步骤，操作步骤简单；灵敏度高，副产物少；本发明通过多基因组合表达方式，在大肠杆菌内实现“体内一步法”合成链霉亲和素/藻胆蛋白类融合荧光蛋白，在完成藻胆蛋白标记的同时，保证了融合分子具有稳定的荧光性质，同时该融合蛋白还具有良好的针对生物素化物质的靶向性，从而增强了藻胆蛋白在免疫检测中的应用能力。

