

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[21] 申请号 200810031281.1

[43] 公开日 2008年10月1日

[11] 公开号 CN 101275954A

[22] 申请日 2008.5.9

[21] 申请号 200810031281.1

[71] 申请人 丁克祥

地址 510515 广东省广州市白云区广州大道
北 1838 号南方医科大学东院 B 栋 A 门
0406 室

[72] 发明人 丁克祥 刘卫国 费定宇 刘 莉
丁 宇

[74] 专利代理机构 岳阳市科明专利事务所
代理人 彭乃恩

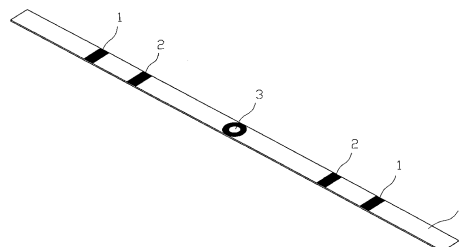
权利要求书 3 页 说明书 29 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种简便快速测定人类 I 型胸苷激酶基因蛋白
的乳癌预警芯片

[57] 摘要

本发明涉及一种简便快速测定 I 型胸苷激酶基因蛋白(hTK1)的乳癌预警芯片。本发明的特点在于所述的乳癌预警芯片 4 是由一端包被真核表达制备的一抗 hTK1 单克隆抗体(代号为 2A6 - McAb)和另一端则包被兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的条状纤维层析固相载体 NC 膜、滤样纸、吸水玻璃纤维纸、及标记有胶体金和二抗 hTK1 单克隆抗体(代号为 3E8 - McAb)结合物的聚酯膜片等依此粘贴于白色 PVC 塑料片所组成。本发明具有微量、快速、灵敏、准确、简便、稳定性好、重复性高、特异性强、无须特殊设备或仪器、检测成本低、可单份或多份标本分别测定、且携带方便、易于现场或野外普查或体检等特点和优势。



1、一种简便快速测定人类 I 型胸苷激酶基因蛋白的乳癌预警芯片，其特征在于：所述的乳癌预警芯片 4 是由一端包被真核表达制备的一抗 hTK1 单克隆抗体（代号为 2A₆-McAb）和另一端则包被兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的条状纤维层析固相载体 NC 膜、滤样纸、吸水玻璃纤维纸、及标记有胶体金和二抗 hTK1 单克隆抗体（代号为 3E₈-McAb）结合物的聚酯膜片等依此粘贴于白色 PVC 塑料片所组成。

2、根据权利要求 1 所述的一种简便快速测定人类 I 型胸苷激酶基因蛋白的乳癌预警芯片的制备方法，其特征在于包括以下步骤：

一、制备含有一抗 hTK1 单克隆抗体 2A₆-McAb 和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的硝酸纤维微孔滤膜片：

1) 将一抗 hTK1 单克隆抗体 2A₆-McAb 和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体分别用 10-20mmol/L, pH7.2-7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释成 0.8-1.6g/L；

2) 用抗体包被机将它们分别包被于硝酸纤维微孔滤膜上；

3) 将包被有一抗 hTK1 单克隆抗体 2A₆-McAb 和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的硝酸纤维微孔滤膜上置于 10-20mmol/L, pH7.2-7.4 的磷酸盐缓冲液 (1-2% BSA) 中，于 37℃ 恒温浸泡 60min；

4) 再用 10-20mmol/L, pH7.2-7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤，最后置于室温或真空干燥后备用。

二、进行 hTK1 基因蛋白乳癌预警芯片的组装：

以膜片正中点的加样孔 3 为起点标志，左边和右边分别用热龙胶依次将滤样纸、吸水玻璃纤维纸、聚酯膜片 (胶体金-二抗 hTK1 单克隆抗体 3E₈-McAb 结合物)、包被有一抗 hTK1 单克隆抗体 2A₆-McAb 和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的硝酸纤维微孔滤膜和吸水滤纸粘贴于白色的 PVC 塑料片上，并在此膜片上覆盖一层有效的保护膜；完成贴膜后即可进行真空干燥；最后，将全部贴好的条板在专用切割机上切成一定规格的条状膜片，装入塑料盒中，加入干燥剂密封保存，即成乳癌基因蛋白预警芯片 4。

3、根据权利要求 1 所述的一种简便快速测定人类 I 型胸苷激酶基因蛋白的乳癌预警芯

片,其特征在於:该纳米级的胶体金源于氯金酸(HAuCl_4)还原剂柠檬酸三钠(枸橼酸三钠)的作用,其静电作用使其聚合成为一种稳定的胶体状态、且是特定大小、均匀一致的纳米金颗粒;而且,由于其在弱碱环境下带负电荷,可与蛋白质分子正电荷基团通过静电牢固结合,并不会影响基因蛋白抗原和单克隆抗体蛋白质的生物特性。

4、根据权利要求1所述的一种简便快速测定人类I型胸苷激酶基因蛋白的乳癌预警芯片,其特征在於:该乳癌预警芯片4中条状纤维层析固相载体NC膜上所包被的一抗hTK1单克隆抗体(代号为 $2A_6\text{-McAb}$)来源于真核所表达制备的人类I型胸苷激酶(hTK1);且聚酯膜片上标记的胶体金和二抗hTK1单克隆抗体(代号为 $3E_8\text{-McAb}$)结合物中的二抗hTK1单克隆抗体(代号为 $3E_8\text{-McAb}$)同样来源于真核所表达制备的人类I型胸苷激酶(hTK1),但其来源于不同于一抗hTK1单克隆抗体(代号为 $2A_6\text{-McAb}$)的另一阳性克隆株。

5、根据权利要求4所述的一种简便快速测定人类I型胸苷激酶基因蛋白的乳癌预警芯片,其特征在於:这两种hTK1单克隆抗体虽然同属于人类I型胸苷激酶(hTK1)单克隆抗体,对于其相对应的抗原均具有同样的专一性及特异性免疫反应,但两者却具有不同的结合位点、亲和力及亲和常数。

6、根据权利要求5所述的一种简便快速测定人类I型胸苷激酶基因蛋白的乳癌预警芯片,其特征在於:这两种hTK1单克隆抗体均能与人类I型胸苷激酶(hTK1)基因蛋白抗原发生专一性及特异性免疫反应,即可形成一抗hTK1单克隆抗体(代号为 $2A_6\text{-McAb}$)²和二抗hTK1单克隆抗体(代号为 $3E_8\text{-McAb}$)同时与与人类I型胸苷激酶(hTK1)基因蛋白抗原结合的双抗夹心免疫复合物结构(Ab1-Ag-Ab2)或者说 $2A_6\text{-McAb--hTK1 Ag--}3E_8\text{-McAb}$ 双抗夹心免疫复合物结构。

7、根据权利要求6所述的一种简便快速测定人类I型胸苷激酶基因蛋白的乳癌预警芯片,其特征在於:通过检测标本自然层析过程中的毛细作用和双抗夹心抗原的免疫反应原理,使被检测标本中所含相对应的乳癌基因蛋白--hTK1抗原同时与一抗hTK1单克隆抗体(代号为 $2A_6\text{-McAb}$)和二抗hTK1单克隆抗体(代号为 $3E_8\text{-McAb}$)发生高度特异性、高度亲和性的免疫结合反应,其双抗夹心免疫复合物结构(Ab1-Ag-Ab2)或 $2A_6\text{-McAb--hTK1 Ag--}3E_8\text{-McAb}$ 不断富集或截留,并通过所标记胶体金的颜色逐渐形成一条清晰可见的有色检测带(即阳性结果)。

8、根据权利要求 7 所述的一种简便快速测定人类 I 型胸苷激酶基因蛋白的乳癌预警芯片，其特征在于：被检测标本中所含有的乳癌基因蛋白-hTK1 抗原能被其相对应的一抗 hTK1 单克隆抗体（代号为 2A₆-McAb）和二抗 hTK1 单克隆抗体（代号为 3E₈-McAb）所识别、并迅速发生高特异性、高亲和性免疫结合反应，证实该被检测标本中已有乳癌基因蛋白-hTK1 表达。

9、根据权利要求 8 所述的一种简便快速测定人类 I 型胸苷激酶基因蛋白的乳癌预警芯片，其特征在于：该乳癌基因蛋白-hTK1 抗原作为一种激酶是胸苷参与 DNA 合成的关键酶，它能可逆性催化胸腺嘧啶脱氧核苷与磷酸脱氧核苷之间的转化，真实而客观地反映着乳腺细胞的增殖和癌变状况。

10、根据权利要求 9 所述的一种简便快速测定人类 I 型胸苷激酶基因蛋白的乳癌预警芯片，其特征在于：hTK1 在乳腺细胞异常增殖或癌变时不仅加快表达，而且大量表达使其含量或活性也明显增高，特别是在乳腺细胞增殖异常旺盛的乳癌患者的体液或血液中更是显著增高，且 hTK1 水平的高低与恶性肿瘤的切除和复发呈降低和升高的趋势。

11、根据权利要求 10 所述的一种简便快速测定人类 I 型胸苷激酶基因蛋白的乳癌预警芯片，其特征在于：乳癌基因蛋白-hTK1 在乳癌细胞表达量明显增多，hTK1 的活性在乳癌细胞大于总量的 95%，而在乳腺良性肿瘤和正常健康人的体液或血液中检测极低或基本检测不出。

12、根据权利要求 11 所述的一种简便快速测定人类 I 型胸苷激酶基因蛋白的乳癌预警芯片，其特征在于：一旦被检测标本中证实有大量乳癌基因蛋白-hTK1 表达，则提示该被检测者有乳癌发生的高度风险或者乳腺已患有乳癌病灶。

13、根据权利要求 12 所述的一种简便快速测定人类 I 型胸苷激酶基因蛋白的乳癌预警芯片，其特征在于：将基因工程技术、胶体金标记显色技术、特异性免疫检测技术和纸层析分析技术等多种方法有机结合在一起的固相标记及双抗体夹心免疫层析检测技术。

14、根据权利要求 13 所述的一种简便快速测定人类 I 型胸苷激酶基因蛋白的乳癌预警芯片，其特征在于：如检测标本中未含有相对应的乳癌基因蛋白-hTK1 抗原，则此检测标本移动到包被有一抗 hTK1 单克隆抗体（代号为 2A₆-McAb）位置，均不会发生高特异性、高亲和性的免疫结合反应，即在靠近加样点左右两条检测线的位置上不会形成有色检测带（即阴性结果）。

一种简便快速测定人类 I 型胸苷激酶基因蛋白的乳癌预警芯片

技术领域

本发明涉及一种简便快速测定 I 型胸苷激酶基因蛋白(hTK1)的乳癌预警芯片,采用基因工程方法和分子免疫学技术等交叉科学技术研制,主要用于女性乳癌发生或发展的风险性预警,同时,也可用于女性健康保护性提示和早期乳癌临床诊断性的一种保健新法。

背景技术

关于乳腺癌及其诊断技术背景:乳腺癌是人类常见和多发的恶性肿瘤,是一种上皮来源的恶性肿瘤,也是一种全身性的复杂疾病。早期最常见的临床体征和表现主要包括乳房和腋窝的无痛性肿块、乳房形状或大小改变、乳头内陷、乳头溢液、乳房皮肤“酒窝样”凹陷或表皮呈“桔皮样”改变、乳头周围湿疹样渗出等临床体征,约有 10%的患者可有不同程度的隐痛,其发病年龄以 40~60 岁女性居多。它的发生发展是体内多种因素共调控的结果,特别是与激素变化和过于紧张的生活带来的精神心理因素及妇女既往乳腺疾病史等是易患乳癌作用最强的危险因素。而雌激素暴露时间延长,如少女月经初潮提前,中年妇女绝经延后,育龄妇女生育哺乳时间的推迟或减少则增加乳癌发生风险。另外,西方的生活方式和绝经后妇女长时间应用激素替代方法,饮食中脂肪及高蛋白质摄入增加等均可引起雌激素水平提高,从而增加患乳癌的危险性,且环境因素对乳癌发病的影响甚至超过遗传因素的影响。

乳腺疾病的发病率逐年上升,在美国,乳腺癌发病率占 100 人/10 万人,我国为 20 人/10 万人,沿海地区高达 30-40 人/10 万人。回顾乳腺癌的诊断历史,手触式自查乳腺癌为其最初手段,但这种方法阳性率低,目前临床检查已很少采信;70 年代出现的 X 摄影检查乳腺癌的方法除同样存在着阳性率低的问题外,副作用大是其致命缺陷;液晶式和热像仪是利用人体热量原理诊断乳腺癌,因受室温的影响,且不易保存,效果不能令医生满意;80 年代初推出的冷光源透照仪由于不能显示和记录图像等缺点,而不便于早期确诊乳腺癌;80 年代末 90 年代初出现的红外乳腺诊断仪是用红外光透照乳腺组织,以观察被血红蛋白吸收的多少而在图象中

显示出肿块的不同灰度,血管影变化的原理检测乳腺良恶性肿瘤,但因检查只有在有肿瘤存在的情形之下才能显示,而一旦显示乳癌已到晚期失去了早期治疗的时机;90年代以后临床上陆续出现各种检查乳癌的方法,如改进的X线钼靶摄影、彩色B超、热图诊断、计算机体层扫描、核磁共振、透照检查、脱落细胞学诊断、肿瘤标志物检查等对乳腺癌的早期发现确实起到重大作用,但也存在不同方面和不同程度的不足。

通过对乳癌诊断技术背景的描述,可从中发现乳癌现有早期诊断及仪器的相对不足,归纳起来主要表现为:①手触式乳腺自我检查影响因素很多,方法漏洞很大,自我评价很难,乳癌早期诊断的阳性率很低;即使是有经验的医生,直径<1cm乳腺肿块也很难被发现,易出现漏诊或误诊,无法实现真正意义上的乳癌早期诊断;②乳腺X线摄影法除存在阳性率较低外,其放射污染和损伤等副作用是其严重缺陷,且早期诊断的准确率较低;改进的X线钼靶摄影诊断的敏感性仍不够高,尤其对一些致密型乳腺显影欠佳;全视野数字化乳腺摄影机的复查率及活检率仍较低;干板摄影成像每次检查仍使乳腺受剂量过大,且影响图像质量易造成复检;③液晶式和热像仪是利用人体热量原理进行乳腺癌诊断,易受周围环境及室温影响,临床误差较大;冷光源透照仪因不能显示和记录图像等缺点,不便于乳癌早期确诊;④超声技术对<1.0cm乳腺肿块诊断特异性差,无法做到全乳腺显像,诊断准确性受操作者影响较大;且B超不能显示微小钙化灶,对直径<0.5cm病灶确诊率仅44%,即使是改进后的多阵元超声换能器技术、数字超声扫描转换技术、超声多普勒检测技术、数字声束成形技术等也很难实现早期发现;⑤纤维乳管内视镜技术在形成癌病灶后才被发现,很难早期诊断;乳头溢液涂片细胞学检查阳性率较低;计算机辅助三维立体定位和导丝引导切除活检技术因该设备昂贵,技术要求甚高,很难普及应用;细针穿刺抽吸细胞学检查因穿刺不准易漏诊而延误病情,有时仍需追加组织学活检证实其结论,且很难区分浸润性癌与原位癌,对某些细胞形态异常但尚未达到癌标准病灶,无法作出明确诊断;⑥CT设备昂贵,且扫描费用较高,X线量较大,不便作为常规检查方法;乳腺核磁共振检查空间分辨率低,肿物细节不如X线摄影清晰,不能显示微小钙化,只有增强扫描有助于提高诊断和鉴别诊断的准确性,加上价格昂贵,仅能作为辅助检查方法。PET-CT价格昂贵得惊人,且操作繁琐,机制复杂,结果判断必须有经验的专科医生,检测只能在超大型综合医院

才能进行,一般医院和卫生机构根本无法应用;⑦现有些肿瘤标志物或肿瘤相关物质及基因蛋白等在作为乳癌筛查时也存在不同程度的问题和疑点,如癌胚抗原(CEA)并非乳癌早期诊断的特异性标志物;乳癌相关抗原 225 的阳性率, I II 期乳癌仅为 8-22%, 早期诊断价值不大; CA15-3 对乳腺癌的阳性率 I 期仅为 0-25%, II 期也只有 8-42%, 且 20-30% 转移性乳腺癌并不升高, 故不能单独作为监测乳癌的指标; CA27-29 在某些良性肿瘤或生理情况下(如孕前 3 个月)也升高, 因此检测很难确诊, 早期诊断也很难实现。NCC-ST-439 阳性除见于乳腺癌外, 胰腺癌、肝癌、胆管癌、大肠癌、肺癌、宫颈癌等也可能呈阳性, 且胰腺炎、慢性肝炎、闭经前也可升高, 其在乳腺癌的阳性率为 I、II 期仅为 25-30%, III、IV 期也只有 40-42%, 且复发病例为 55%, 特异性较低; 组织多肽特异性抗原(TPA)多出现在癌转移之后, 在乳腺癌早期诊断方面有一定局限性。乳癌 p53 基因突变表达的阳性率仅为 20-60%, 特别是目前对于 p53 的预后价值还存在争议; 尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)主要是判断乳腺癌预后的指标, 而对乳腺癌早期诊断价值有限; 组织蛋白酶 D 是乳腺癌转移的标志之一, 其升高多提示乳腺癌患者预后差, 亦为复发的先兆, 也是乳腺癌预后因素, 而在乳腺癌的早期诊断方面, 其价值仍然有限。端粒酶在其它恶性肿瘤均有阳性表达, 没有明显特异性。总之, 目前发现的乳腺癌相关肿瘤标志物中的任何一种单独应用敏感性均较低, I、II 期阳性率均 < 30%, 早期患者易漏检。⑧直接 DNA 序列测定, 变性梯度凝胶电泳法, 异源双链分析, 荧光标记的错配分析以及蛋白截断分析, 实时荧光 PCR 技术等, 单链构象多态性分析, 多重异源双链分析及测序和荧光双链探针法等大多被专利保护, 且因有些方法技术难度大, 设备要求高, 操作步骤烦琐, 特异性差, 费用昂贵, 容易污染造成假阳性的特点, 一般医院实验室很难应用, 也不适用于大规模的筛查。⑨在癌症预警仪器研制方面, 虽有腕式癌症预警仪、掌上型癌细胞检测仪、乳房肿瘤检测仪、双波长组织血氧检测技术(简称 TBO)——乳腺肿瘤检测仪、电脑红外乳腺检测仪等, 但阳性检出率、早期诊断率、特异性、购买价格等均不尽人意。⑩TSGF 肿瘤相关物质联合检测试剂盒(原名恶性肿瘤特异性生长因子快速检测试剂盒)能联合检测几种相关的肿瘤标志物以提高肿瘤检测灵敏度, 但各种标志物测定的步骤、方法不同, 测定仪器复杂, 操作烦琐、品种繁多、费时费事, 费用昂贵。

关于 hTK1 及其检测技术背景: 人胸腺嘧啶脱氧核苷激酶 I 型, 中文简称胸苷激酶 I 型

(Human thymidine kinase, hTK1)是与细胞增殖、分化和细胞周期密切相关的激酶,被认为是合成 DNA 的关键酶,其主要有两种同工酶, hTK1 和 hTK2。hTK1 主要存在于细胞质中,而 hTK2 则主要存在于亚细胞结构的线粒体中。而其中与细胞增殖关系最为密切相关的是 hTK1。正是由于 hTK1 与细胞分裂密切相关,在细胞分裂 G1 期含量较低,到 S 期后逐渐升高,至 G2 期达到最高,因此,编码 hTK1 的 mRNA 及其所表达的蛋白质也就成为细胞增生的标志物。

hTK1 作为一种激酶是胸苷参与 DNA 合成的关键酶,它能可逆性催化胸腺嘧啶脱氧核苷与磷酸脱氧核苷之间的转化,它能真实而客观地反映着细胞的增殖状况。已有文献表明,TK1 的活性在肿瘤细胞大于总量的 95%,而 TK2 低于 5%,在正常健康人的血清中检测很低或不可以检测,因此采用检测血清 TK 活性将评估肿瘤增殖的恶性程度。hTK1 在细胞异常增生时含量或活性增高,特别是在细胞增生旺盛的早期恶性肿瘤患者的体液或血液中更是显著增高,且 hTK1 水平的高低与恶性肿瘤的切除和复发呈降低和升高的趋势。有学者曾采用 12 种人癌组织进行免疫组化分析,发现 TK1 均呈现阳性结果,这初步证明了癌症患者与 TK1 活力或含量增高有关,且进一步试验也证明,随着肿瘤细胞增殖速度明显提高,TK1 活力增强,DNA 合成速度加快,从而促进了肿瘤细胞的进一步增殖,形成一个病情不断加重的恶性循环。因此,国外有学者依据正常人的 TK1 水平是极微量低或几乎不可能检测、而恶性肿瘤患者异常增高的实验多次提出,采用血清 TK1 活性检测方法和 TK1 抗体免疫检测方法适合于人群普查,用于早期肿瘤预检测。大量临床试验证实, hTK1 不仅可以作为恶性肿瘤的一种标志物,而且还可以通过检测 hTK1 的水平,判断恶性肿瘤的发生和发展规律、或疗效、转归及预后的判断。美国有一专利就专门介绍过 TK1 的抗癌活性。不仅如此,国内外一些权威杂志和著名专家学者及本发明专利的申报者们在最近五年的专题科学研究中还惊喜地发现,在常见的一些恶性肿瘤中, hTK1 含量或活性的变化与乳腺癌和肝癌密切相关,即 hTK1 在乳腺癌和肝癌中的表达最多,表现也更为明显,而且研究还发现,当乳腺癌或肝癌细胞数量有限的早期,其癌变组织、甚至是血液之中同样存在有 hTK1 基因蛋白的表达和含量的改变。

正常人细胞中 hTK1 的含量极低,只是在细胞过度异常增生的情况下才会出现高的水平。有学者的研究结果表明,乳腺癌患者血清中 hTK1 水平明显高于乳腺良性肿瘤患者,且明显高

于健康对照人群，而乳腺良性肿瘤患者血清中的 hTK1 水平与体检健康者无明显差别 ($P>0.05$)。还有学者从 1692 个乳腺癌病人组织中提取细胞的细胞质组分, TK1 的活性检测显示, 高 TK1 活性与肿瘤增殖度密切相关, 且高 TK1 活性预示内分泌药物治疗患者预后差和生存时间短; 而增殖低的乳头状突甲状腺瘤组织细胞中 TK1 活性与正常组织比较, 仅升高 2-4 倍。本发明者曾采用免疫传感器方法研究过目前常见八种恶性肿瘤血清中 hTK1 的活性和含量, 发现乳腺癌患者 hTK1 水平较其他恶性肿瘤明显增高。还有研究表明, 乳腺癌血清 TK1 的半衰期为 30 天左右。关于乳腺癌患者血清中 hTK1 的来源, 有学者分析, 这很可能是肿瘤细胞分泌或肿瘤细胞异常增殖导致溶解释放胸苷激酶的聚合物。而对于淋巴结未转移的乳腺癌患者, 手术后血清中 hTK1 水平呈明显下降的趋势。乳腺癌全切除手术后未转移的患者血清中 hTK1 水平在手术后一个月下降到 50%, 手术后 3 个月 (90 天) 将下降至正常人的水平。因此, 血清中 hTK1 水平不仅可以作为乳腺癌诊断的一个敏感性指标, 而且也有利于乳腺癌的疗效观察。为此, 将 hTK1 作为女性早期乳腺癌诊断的预警指标具有一定的理论和实验依据, 在临床普查和早期诊断方面也具有积极的意义。

在过去的临床和科研工作中, 用于检测或监测 hTK1 含量或活性的方法主要有: 放射免疫法 (RIA)、酶联免疫法、化学发光法、免疫组化法、western blotting 法、点免疫印迹化学发光法、ELISA 法、免疫增强化学发光法、压电石英晶片免疫传感器法等。虽然, 目前这些实验室的检测方法均能较为准确的测定出癌变组织或体液及血液 (血清或血浆) 中 hTK1 的含量或活性, 但过去主要采用的放射免疫法 (RIA) 检测血清 hTK1 的酶活性, 即可以通过放射性同位素标记的 ^3H 胸苷的方法检测血清中总量 TK 活性来表示血清 TK1 (简称 STK1) 的活性, 但这方法的灵敏度不高, 不适应于临床血清中 TK1 的检测; 以后又发展了胸苷类似物- ^{125}I -5-碘-2-脱氧尿苷作为底物, 建立一种灵敏度较高的血清 TK1 (STK) 放射性同位素检测方法, 应用于人血清学肿瘤细胞增殖标记物检测。其方法简述如下: 加入 20 微升血清样品到清洁微量管中, 同时分别加入含有 20 微升含有 40、10、5 和 2.5 U/L 的 TK-REA 标准到一清洁微量管。每管补加 500 微升由试剂供应商提供的放射性同位素 ^{125}I -5-碘-2-脱氧尿苷底物, 于 37 度反应 4 小时反应完成以后, 为了使反应产物与过度底物分离, 还要加入固相分离片剂吸附产物, 震荡

反应 15 分钟,再用试剂供应商提供的洗涤溶液 4 次,这含有反应产物沉淀送入 γ -闪烁仪计数 TK 的活性。按照标准比较,酶活性大于正常健康人标准阈(2.4U/L)为 TK1 活性异常值,由此可见,采用 ^{125}I 标记脱氧尿嘧啶不仅半衰期短(仅在 4 周时间),且具有放射性污染,久而久之容易造成对检测者健康损伤和环境污染,而且胸苷类似物- ^{125}I -5-碘-2-脱氧尿苷并非是 TK1 活性分析的专一性底物,并且在血清 TK 的活性测定中,对 pH 和温度非常敏感,常产生不准确结果,且需要使用贵重的检测仪器(γ 闪烁仪),这种检测需要特别的设备和熟练技术人员操作,因此,该检测技术在临床应用上有很大的局限性,也很难在临床上广泛推广使用。后来,又有学者采用酶法和夹心 ELISA 方法作血清学 TK1 鉴定,没有发现健康人血清 TK1 和癌症患者血清 TK1 之间有显著性差异,认为是夹心 ELISA 方法不灵敏所致。以后国外有报道,应用 Western Blotting 检测血清中 hTK1 的含量或活性,且能进行定量分析,在对肿瘤细胞的评估方面远远优于胸腺嘧啶掺入法,因为胸苷激酶 1 测定直接代表该肿瘤中的胸苷激酶 1 量而不受体外检测条件的干扰,也免除了影响外源性胸腺嘧啶掺入 DNA 内的影响,但在临床应用并不适用;点免疫印迹发光法虽然利用了发光技术的高灵敏性,并通过 X 线片曝光,避免了使用发光检测仪,且可长期保存实验结果,但需通过设立标准品对照,并根据斑点的深浅进行定量分析,但因这些方法操作繁琐,也难以在临床上普及应用。而增强发光-免疫点印迹法主要参考印迹法原理,其具体方法是:取空腹受检者血样,静置 1 小时以上,然后,置于离心机中,以 4000 转/分钟,离心 8-10 分钟,分离血清。将 3 微升的血清样品精确点样到硝酸纤维素膜上,同时,用不同浓度人重组 TK1(rhTK1 40.5、13.5、4.5 和 1.5 pM)做标准品点样。风干 30 分钟,用 TBS pH7.5(20 mmol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl) 震荡洗涤 3 次(10 分钟/2 次,5 分钟/1 次)。加入用 TBS 缓冲液配置的 10%脱脂奶粉,室温封锁 2/4 小时,除去封锁试剂,加入用 TBS 配置的最佳稀释浓度的 TK1 抗体,免疫反应 2 小时或于冰箱过夜。反应完成后,用 TBST(TBST 加入 0.1%吐温 20)迅速漂洗 2 次,震荡洗涤 3 次(10 分钟/2 次,5 分钟/1 次)。再加生物素化第二抗体(按最佳浓度稀释),室温下震荡反应 40 分钟。反应完成以后,同上方法洗涤以后,加入亲和素-辣根过氧化物酶。同上方法洗涤以后,用 ECL 发光试剂精确反应 1 分钟,甩干后,该膜密封于薄膜袋,放入 CCD 检测仪器,这发光信号的强弱将通过 CCD 成像系统分析仪捕获信号和扫描定量分析,或将膜放

入底片夹内与 X 光胶片夹紧, 在暗室内感光 2~5 分钟后, 立即显影、定影, 用蛋白印迹图谱分析仪, 分析印染在底片上的信号。并按照 rhTK1 的标准曲线计算这供试者的 TK1 值的 pM 浓度。按照标准比较, 当 TK1 的浓度大于正常健康人标准阈值(2.0pM)为异常值。采用这标准曲线, 虽方便计算治疗中癌症患者的 TK1 的水平变化, 与对应于患者的肿瘤细胞的增殖速度的关系, 且采用抗体免疫结合的检测方法可达到足够低的检测量, 特别是可检测不同个体健康人 TK1 的水平差异, 最低检测量可达到 0.3 pM 以下, 但我们不难看出, 该方法操作是多么复杂和繁琐, 不仅需时长, 需要有特异好和灵敏度高的抗 TK1 抗体作为探测血清或者组织中微量的 TK1 分子的探针, 而且需要大量贵重的仪器设备和经验丰富的专业操作人员, 不仅无法在基层医疗单位普及应用, 在大型综合性医院也很难临床应用。即使是本发明专利申请者不久前研究成功的压电石英晶片免疫传感器法具有较上述方法更多的优势, 但也存在着检测时间较长(40-60 分钟)、检测难度较大、特别是每次只能测定一个样品, 无法同时批量测定样品等, 这在临床上应用几乎非常困难。特别是上述所有检测 TK1 的方法, 基本上都需要较为昂贵和特殊的仪器设备及配套试剂, 加上操作过程繁琐, 检测时间较长, 技术要求高, 需要一定仪器等, 无法在基层医疗单位或家庭普及应用。但是, 如果有特异性强、亲和力好和灵敏度高的两种 TK1 抗体, 免疫夹心法仍是很有前途的方法, 这也是本发明采用扬长避短的依据之一。

综上所述, 上述任何一种乳腺癌的单一诊断方法和检测技术所得到的诊断或检测结果均难免出现片面性结果(假阴性或假阳性), 甚至可能出现与临床不相符的差错结果, 即使采用临床和实验数种方法联合应用, 相互补充和印证, 使所得诊断或检测结果较为正确可靠并有参考价值, 但一旦这种诊断结果为阳性, 已基本上已出现乳腺癌的占位性病灶, 实际上也非实质上的早期诊断, 而给以后的治疗或愈后带来挑战。现代肿瘤学研究表明, 乳腺癌从初起中一个癌细胞的分裂增殖, 到发展成临床能检出的直径约 1 cm 的小肿块, 约需 30 次倍增, 其生长期至少已逾 3 年, 给癌症转移提供了足够的时间, 所以, 即使在临床上确认的 I 期乳腺癌, 当其肿瘤直径 >1 cm 时, 就有可能发生全身的亚临床转移; 而 II 期病例中包括了有腋窝淋巴结转移的, 即使腋淋巴结阴性者, 原发肿瘤直径已超过 2cm 的亚临床转移可高达 25%-30%。所以, 从组织病理学角度看, I, II 期病人中已有相当部分并不是早期。

即使是采用目前一些最为现代先进的诊断方法和检测技术,可以给临床乳腺癌的早期诊断提供一定依据,但因这些诊断方法和检测技术需要特殊条件,需要在一些大型综合性医院才能进行,而且,这些诊断方法和检测技术,大多检测试剂专业,测定方法复杂,检测仪器繁多,操作步骤繁琐,实验室要求特殊,且费时费事费力,测定费用昂贵,使很多人、特别是一些高危人群很难经常和及时去医院进行检查或普查,因而,错过了许多对乳腺癌早期诊断,早期发现的大好时机,以至于造成终身的遗憾和痛苦。

由此可见,发明一种更加科学、先进、创新、实用、且具有灵敏度高、特异性强、稳定性好、准确度高、使用快捷、操作简便、来源方便、价廉物美、容易普及、易于随时检查、推广应用的乳腺癌检查、自查或普查方法,对于真正意义上的早期发现、早期诊断、早期治疗乳癌、或者争取获得最佳的治疗时机、寻找最佳的治疗方案、达到最佳的治疗效果,以减少患者痛苦、延长患者生命、提高患者生存质量等具有特别重要的临床价值和实际意义。

特别是通过建立这种简便、快速、易学易会、易于自查或普查或定期经常性的乳腺癌检查手段,致力于建立一个完善的乳腺癌筛查体系,致力于建立更加规范筛查乳癌、着眼早期诊断的科学意识,进而,不断提高全民规范化的主动检查或自查意识,并充分认识到通过经常性的筛查,早期发现和早期诊断乳癌是何等重要;同时,还应该具有根据自身风险接受相应筛查并发现可疑征象及时就医的意识。也只有这样,才能真正有效地减少由于轻视或不懂专业和不规范而造成的高危人群的失诊、漏诊、误诊。

发明内容

本发明的目的是针对背景技术中存在的缺点和问题加以改进、创新,提供一种简便快速测定人类 I 型胸苷激酶基因蛋白的乳癌预警芯片。

本发明的技术方案是:所述的乳癌预警芯片是由一端包被真核表达制备的一抗 hTK1 单克隆抗体(代号为 2A₆-McAb)和另一端则包被兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的条状纤维层析固相载体 NC 膜、滤样纸、吸水玻璃纤维纸、及标记有胶体金和二抗 hTK1 单克隆抗体(代号为 3E₈-McAb)结合物的聚酯膜片等依此粘贴于白色 PVC 塑料片所组成。

本发明的简便快速测定人类 I 型胸苷激酶基因蛋白的乳癌预警芯片的制备方法包括以下

步骤:

一、制备含有抗 hTK1 单克隆抗体 2A₆和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的硝酸纤维微孔滤膜片:

1) 将抗 hTK1 单克隆抗体 2A₆和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体分别用 10-20mmol/L, pH7.2-7.4 的磷酸盐(PBS)缓冲液稀释成 0.8-1.6g/L;

2) 用包被机将它们分别包被于硝酸纤维微孔滤膜上;

3) 将包被有 hTK1 单克隆抗体 2A₆和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的硝酸纤维微孔滤膜上置于 10-20mmol/L, pH7.2-7.4 的磷酸盐(PBS)缓冲液(1-2% BSA)中, 37℃恒温浸泡 60min;

4) 再用 10-20mmol/L, pH7.2-7.4 的磷酸盐(PBS)缓冲液洗涤, 置于室温或真空干燥后备用;

二、进行 hTK1 基因蛋白乳癌预警芯片的组装:

以正条中点的加样孔 3 为起点标志, 左边和右边分别用热龙胶依次将滤样纸、吸水玻璃纤维纸、聚酯膜片(胶体金-hTK1 单克隆抗体 3E₉结合物)、包被有抗 hTK1 单克隆抗体 2A₆和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的硝酸纤维微孔滤膜和吸水滤纸粘贴于白色的 PVC 塑料片上, 并在此膜片上覆盖一层有效的保护膜; 完成贴膜后即可进行真空干燥; 最后, 将全部贴好的条板在专用切割机上切成一定规格的条状膜片, 装入塑料盒中, 加入干燥剂密封保存, 即成乳癌基因蛋白预警芯片 4。

本发明的基本原理: 是一种将基因工程技术、胶体金标记显色技术、特异性免疫检测技术和纸层析分析技术等多种方法有机结合在一起的固相标记及双抗体夹心免疫层析检测技术。本发明制备的基因蛋白芯片应用的免疫胶体金技术是以胶体金作为示踪或显色的标志物应用于检测新的乳癌标志物人胸腺嘧啶脱氧核苷激酶(hTK1)抗原的一种新型的免疫标记技术。其基本原理是: 胶体金由氯金酸(HAuCl₄)在还原剂柠檬酸三钠(枸橼酸三钠)作用下, 聚合成为特定而均匀大小的金颗粒, 因其静电作用成为一种稳定的胶体状态即胶体金状态。胶体金在弱碱环境下带负电荷, 可与蛋白质分子的正电荷基团形成牢固的结合, 而这种结合是静电结合, 所以不影响蛋白质的生物特性。人胸腺嘧啶脱氧核苷激酶单克隆抗体(hTK1 McAb)其化学本质也是蛋白质(免疫球蛋白 IgG), 因此, 它完全具备与胶体金静电结合并不影响该抗体活

性的生物特性。而且,胶体金颗粒具有高电子密度的特性,在金标蛋白结合处,在显微镜下可见黑褐色颗粒,当这些胶体金标记物在相应的配体处大量聚集时,肉眼则可见红色或粉红色斑点。运用胶体金本身具有显色反应的这种特点,即可通过目测标记物胶体金的显色反应,清晰、直观而准确地判断出检测标本中是否含有乳癌标志物人胸腺嘧啶脱氧核苷激酶(hTK1)抗原的实验结果。因而,本发明可作为早期乳腺癌的定性或半定量的简便快速免疫检测方法。

本发明的技术原理:是以条状纤维层析材料- $5\mu\text{m}$ 孔径、液体移动速度为45-50秒迁移1cm的硝酸纤维微孔滤膜(NC)和玻璃纤维作为固相载体,将其中一个特异性单克隆抗体(一抗代号为2A₆)-人胸腺嘧啶脱氧核苷激酶(hTK1)单克隆抗体(McAb)固定在硝酸纤维微孔滤膜(NC)的适当位置;而另一个特异性单克隆抗体(二抗代号为3E₈)-人胸腺嘧啶脱氧核苷激酶单克隆抗体(hTK1 McAb)则标记在均匀的纳米级胶体金颗粒上(粒径20-25nm)并固定在特定的聚酯膜上。在实际进行检测时,由于纸层析过程中的自然毛细作用,使被检测标本-血液或血清或血浆沿着此条状纤维层析材料-硝酸纤维微孔滤膜(NC)、聚酯膜和玻璃纤维向前进行性自然移动;此时,如果检测标本-血液或血清或血浆中含有相对应的待测物-hTK1抗原,则此hTK1抗原在移动到一定的位置,便与此条状纤维层析材料-硝酸纤维微孔滤膜(NC)和、聚酯膜上针对此待测物hTK1抗原的相应单克隆抗体-hTK1 McAb即发生高特异性、高亲和性的免疫结合反应。由于此特异性免疫层析过程中的抗原抗体结合的免疫复合物被不断地富集或截留在此条状纤维层析材料的某一区域、并自然形成了一条有色检测带(即阳性结果)。但是,如果检测标本-血液或血清或血浆中未含有相对应的待测物-hTK1抗原,则此检测标本-血液或血清或血浆移动到任何位置,都不会与此条状纤维层析材料-硝酸纤维微孔滤膜(NC)和、聚酯膜上针对此待测物hTK1抗原的相应单克隆抗体-hTK1 McAb发生高特异性、高亲和性的免疫结合反应。也正是由于检测标本在层析过程中无此特异性的抗原抗体免疫复合物形成,一些游离的标记物则越过此条状纤维层析材料的检测带,与结合标记物自动分离,不出现任何颜色反应,即在硝酸纤维微孔滤膜的某一区域,不会形成一条有色检测带(即阴性结果)。

本发明的主要技术构思:

本发明技术构思分为三个部分:第一部分:高特异性和高亲和力的hTK1单克隆抗体制备。

主要完成:①采用基因工程技术及分子生物学和分子免疫学技术,将与乳癌密切相关的基因-I型人胸腺嘧啶脱氧核苷激酶,亦简称为I型胸苷激酶(human thymidine kinase I,简称hTK1)基因进行克隆;②利用真核分泌型载体重组该hTK1基因;③采用基因天然免疫的方法制备高特异性和高亲和力的hTK1单克隆抗体。第二部分:胶体金的制备及标记。主要完成:①胶体金的制备:首先采用柠檬酸三钠还原法进行胶体金的制备;②胶体金-抗hTK1单克隆抗体结合物的制备:采用小牛血清白蛋白(BSA)法将另一个特异性单克隆抗体(代号为3E₆)-人胸腺嘧啶脱氧核苷激酶单克隆抗体(hTK1 McAb)标记在均匀的纳米级胶体金颗粒上(粒径20-25nm);③制备含有胶体金-hTK1单克隆抗体3E₆结合物的聚酯膜片。第三部分:I型胸苷激酶(hTK1)基因蛋白乳癌预警芯片制备。主要完成:①制备含有抗hTK1单克隆抗体2A₆和兔抗鼠IgG多克隆抗体的硝酸纤维微孔滤膜片;②进行乳癌基因蛋白预警芯片的组装。

本发明技术方案的主要思路:

第一部分:hTK1单克隆抗体制备:首先用Trizol试剂(一种从动物细胞和组织、细菌、真菌等提取总RNA的试剂盒)从500万个Hela细胞(海拉细胞是一种人宫颈癌传代细胞)提取经氨甲喋呤处理48小时的细胞总核糖核酸(RNA),纯化后用焦碳酸二乙酯(DEPC)处理水溶解沉淀所得液体30 μ l。该液体经过逆转录PCR(在体外由酶促反应合成特异DNA片段的一种方法)可扩增出hTK1 cDNA(cDNA是指以mRNA为模板,在逆转录酶的作用下形成的互补DNA);在TA克隆(即利用Taq聚合酶同时具有的末端连接酶的功能,在每条PCR扩增产物的3'端自动添加一个3'-A突出端)后即可进行DNA序列分析,以鉴定经过PCR扩增后所形成的hTK1基因序列是否正确;然后,通过亚克隆接入pSecTag2/Hygro B载体(真核分泌型载体)的HindIII(酶切位点)和XhoI(酶切位点)位点之间(pSecTag/TK1),插入片段表达的蛋白质可以从真核细胞中分泌到胞外。直接用pSecTag/TK1重组质粒脱氧核糖核酸(DNA)免疫小鼠;再用骨髓瘤细胞和脾细胞融合制备杂交瘤;从制备出的多株杂交瘤细胞株中进行筛选、配对,最后筛选出两株亲和力较高、且能产生抗TK1单克隆抗体的杂交瘤细胞株(命名为DZ1和DZ2);将所选出的这两株亲和力较高、且能产生抗hTK1单克隆抗体的杂交瘤细胞株DZ1和DZ2,分别按照数量为5 $\times 10^5$ 个杂交瘤细胞分别直接注入两组小鼠腹腔内制备含有hTK1特异性单克隆抗体的腹水;待这些受试小鼠腹腔内的腹水达到一定程度后,即可分别用

注射针头抽出这两株杂交瘤细胞所产生的亲和力高和特异性强的两种抗 TK1 单克隆抗体的小鼠腹水；将收集的这些小鼠腹水用冷冻高速离心机以大于 10000rpm/min 以上的速度离心 5-10 分钟，弃除沉淀，其上清采用正辛酸-硫酸胺法分别进行提取，并用蛋白 G 柱亲和层析纯化，可得到经过纯化的两种 TK1 的单克隆抗体 (DZ1、DZ2 杂交瘤所分泌的单克隆抗体分别是 hTK1 单克隆抗体 2A₆ 和 hTK1 单克隆抗体 3E₈)；纯化后的这两种 hTK1 单克隆抗体分别用蛋白定量试剂(BCA)定量抗体，最后，经过十二烷基磺酸钠(SDS)-PAGE(聚丙烯酰胺)凝胶电泳法检测其抗体纯度；同时，进行抗体的 IgG 类型，亚类鉴定，以及抗体的结合位点和亲和力测定等；之后，置于低温冰箱中保存，即可备为后续应用。

第二部分：首先将用纯蒸馏水配制一定浓度的氯金酸应用液 100ml，用电炉加热至沸腾后，迅速加入一定浓度的柠檬酸三钠(枸橼酸三钠)应用液 2ml，继续加热煮沸 10min 后，经过还原反应后，使其逐步冷却后，即可形成接近红色的胶体金应用液。然后，利用自动分光光度计对此胶体金应用液在可见光范围(400-600nm)内进行自动扫描，分析所制备的胶体金颗粒是否均匀。在波长为 520-521 nm 处时，该胶体金应用液可有最大吸收峰，且主峰宽度较窄，这证实所制备的胶体金颗粒完全均匀，粒度在 20-25 nm。在确定完成氯金酸还原成颗粒大小合适且大小分布均匀的胶体金应用液后，即可采用此胶体金应用液进行人胸腺嘧啶脱氧核苷激酶(hTK1)单克隆抗体(McAb)的标记，即胶体金-hTK1 单克隆抗体结合物的制备。在进行胶体金-hTK1 单克隆抗体结合物的制备时，应先将 hTK1 单克隆抗体 3E₈ 浓度调节到合适的水平(800-1600 μg/mL)；然后，取剂量为 100 mL 的胶体金溶液，并用浓度为 0.1mol/mL 的碳酸钾(K₂CO₃)将胶体金应用液调至略高于 hTK1 单克隆抗体等电点的 PH 8.2-9.0；此时，在不断快速搅拌中，缓慢加入 1mL 已调节到浓度为 800-1600 μg/mL 的 hTK1 单克隆抗体 3E₈，则其标记蛋白量为每毫升胶体金应用液中含 8-16 μg hTK1 单克隆抗体 3E₈。在继续搅拌 15min 后，加入 100-200mg 的小牛血清(BSA)；再经过 10-20min 搅拌后，置于冷冻离心机中低速离心(1000-1500rpm/min) 10-20min。小心地弃除沉淀；取其上清液再进行高速离心(10000-15000rpm/min) 20-30min 后，再小心吸去上清液，保留沉淀，此即为胶体金-抗 hTK1 单克隆抗体 3E₈ 结合物。紧接着，即可制备含有胶体金-hTK1 单克隆抗体 3E₈ 结合物的聚酯膜片。首先，可采用合适浓度的

Tris-HCl 缓冲液(1-2%BSA, pH8.2)将上述已沉淀好的胶体金-hTK1 单克隆抗体 3E₈ 结合物进行稀释至,并将其均匀分布在一定面积的聚酯膜片上,固定并进行真空干燥,即可得到含有胶体金-hTK1 单克隆抗体 3E₈ 结合物的干燥聚酯膜片。

第三部分: I 型胸苷激酶基因蛋白乳癌预警芯片制备。主要完成:①制备含有抗 hTK1 单克隆抗体 2A₆和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的硝酸纤维微孔滤膜片;②进行 hTK1 基因蛋白乳癌预警芯片的组装。首先,制备含有抗 hTK1 单克隆抗体 2A₆和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的硝酸纤维微孔滤膜片(NC),即将抗 hTK1 单克隆抗体 2A₆和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体分别用 10-20mmol/L, pH7.2-7.4 的磷酸盐(PBS)缓冲液稀释成 0.8-1.6g/L,在做好记号后,用包被机将它们分别包被于硝酸纤维微孔滤膜的适当位置上;紧接着将包被有 hTK1 单克隆抗体 2A₆和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的硝酸纤维微孔滤膜上置于 10-20mmol/L, pH7.2-7.4 的磷酸盐(PBS)缓冲液(1-2% BSA)中, 37℃恒温浸泡 60min;最后,再用 10-20mmol/L, pH7.2-7.4 的磷酸盐(PBS)缓冲液洗涤 1-2 次;随后取出,尽可能吸干水分,置于室温或真空干燥备用。在完成包被含有 hTK1 单克隆抗体 2A₆和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的硝酸纤维微孔滤膜后,即可进行 hTK1 基因蛋白乳癌预警芯片组装:正式进行芯片组装前,必须先进行膜片的预处理,然后,再进行粘贴复膜:以正条中点的加样孔 3 为起点标志,左边和右边分别用热龙胶依次将滤样纸、吸水玻璃纤维纸、聚酯膜片(胶体金-hTK1 单克隆抗体 3E₈ 结合物)、包被有抗 hTK1 单克隆抗体 2A₆和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的硝酸纤维微孔滤膜和吸水滤纸粘贴于白色的 PVC 塑料片上,并在此膜片上覆盖一层有效的保护膜。其中,滤样纸(全血分离膜)和吸水玻璃纤维纸均经缓冲液处理并贴在加样孔 3 下面,并依次与聚酯膜片(胶体金-hTK1 单克隆抗体 3E₈ 结合物)连接,而聚酯膜片(胶体金-hTK1 单克隆抗体 3E₈ 结合物)则与包被有抗 hTK1 单克隆抗体 2A₆和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的硝酸纤维微孔滤膜连接;硝酸纤维微孔滤膜尾部与吸水滤纸相连。完成贴膜后即可进行真空干燥;最后,将全部贴好的条板在专用切割机上切成一定规格的条状膜片,装入塑料盒中,加入干燥剂密封保存,即成乳癌基因蛋白预警芯片。

本发明的技术操作方法:

用此乳癌基因蛋白预警芯片,可直接插入血液或血清或血浆中,片刻后,直接放置在水平

的台面 3-5min, 即可快速而准确检测出乳癌基因蛋白 hTK1, 从而实现对早期乳癌的预警诊断; 或者将此乳癌基因蛋白预警芯片水平装配在一个特定的模型(一个与此乳癌基因蛋白预警芯片完全配套的反应槽及检测卡)内, 并用含肝素抗凝剂的微量吸管或滴管吸取 20-50 μ l 末梢血液或静脉血清或血浆样品直接滴加到此乳癌基因蛋白预警芯片的样品加入端(如血液标本过于浓稠, 则可用 PBS 缓冲液同时稀释), 可见全血样品中的血清通过层析(或毛细管)作用向前移行。在向前移行的过程中, 如血液中存在 hTK1, 则此抗原先与固定在玻璃纤维上的胶体金标记物-hTK1 单克隆抗体 3E₆的 Fab 端特异性结合, 并携带着显色标记物-胶体金继续向前移行, 不断与硝酸纤维微孔滤膜上所含有抗 hTK1 单克隆抗体 2A₆和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体发生抗原抗体结合反应而聚集, 产生肉眼可见的两条红色条带, 即为阳性结果。此检测仅需 3-20 min, 当测定 hTK1 强阳性标本时 3-5min 可出结果;测定 hTK1 弱阳性标本时可 5-10min 出结果;测定 hTK1 阴性标本时则须 15-20 min 出结果。另外, 如需进行更准确的判断, 可将 hTK1 标准抗原按照不同剂量分别加至健康抗凝静脉全血或血清或血浆样品中, 使之形成一个对照测定的浓度梯度 0.5 μ g/L, 1 μ g/L, 2 μ g/L, 3 μ g/L, 4 μ g/L, 5 μ g/L, 6 μ g/L, 然后分别滴加到此乳癌基因蛋白预警芯片上, 同样方法测试并进行结果判断。若出现小于 0.5ng/mL 则为阴性结果; 若出现接近或等于 1-2ng/mL 标准品测试线, 则可判为弱阳性; 若出现接近或等于 3-4ng/mL 标准品测试线, 则可判为阳性; 若出现接近或等于或深于 5-6ng/mL 标准品测试线, 则可判为强阳性; 若质控线 1 和测试线均不出现, 则表明此乳癌基因蛋白预警芯片测试无效。

本发明的主要技术特点: 本发明的这种乳癌预警方法和分析技术具有微量、快速、灵敏、准确、简便、稳定、特异性强、无须特殊设备或仪器, 且可单份测定、检测成本低等特点和优势, 适合于科研和预防单位及各级医院进行医疗、保健、体检等使用, 亦可用于个人、家庭成员及亲属进行乳腺癌的预防性普查, 以便早期发现和早期诊断。

本发明的主要技术创新点: ①采用真核分泌型表达 hTK1 及其天然免疫制备 hTK1 单克隆抗体的方法, 并将此用真核表达的 hTK1 及其天然免疫制备的两个不同亲和力、不同结合位点的 hTK1 单克隆抗体、并按照双抗体夹心法制备成乳癌基因蛋白预警芯片为本发明首创; ②在制备乳癌预警芯片的过程中, 应用天然免疫制备 hTK1 单克隆抗体的浓度或剂量及反应条件

(特别是PH值8.8)为本发明首创;③在制备乳癌预警芯片的过程中,同时应用两个高特异性和高亲和力天然免疫制备的hTK1单克隆抗体、并采用双抗体夹心法即可以测定全血(末稍血)或静脉血清或血浆中hTK1为本发明首创;④用此天然免疫制备的hTK1单克隆抗体制备乳癌预警芯片既可用于末稍血,又可检测静脉血(包括血清或血浆)hTK1,特别是设计增加了全血细胞与血浆分离膜片为从根本上解决微量末稍全血hTK1测定奠定了基础;⑤采用一滴全血或血清或血浆仅1次或一步即可同时测定两次乳癌基因蛋白hTK1的结果更为准确可靠为本发明首创;⑥为防止全血凝固或浓稠及血清不易扩散,在进行测定时设计配套使用的肝素抗凝吸管或滴管,或者根据血液粘稠度进行稀释血样后再测定为本发明首创;⑦此乳癌基因蛋白预警芯片外观设计形式和改为微缩芯片及加样孔3设计在膜片中心可使操作更加方便和简捷及实用;⑧一个新型的与此乳癌基因蛋白预警芯片完全配套的反应槽和检测卡中增加了一个放大目镜可使显色结果放大而提高观察的准确性;⑨在hTK1基因蛋白乳癌预警芯片初始端聚酯膜(上有胶体金与hTK1单克隆抗体3E₈结合物)的正下方所安装的玻璃纤维膜片和滤样纸是经过缓冲液特别处理过的,可使检测标本或液体不受PH值变化的影响并保持检测结果更加稳定为本发明特色;⑩羊抗鼠IgG多克隆抗体,hTK1单克隆抗体2A₆及hTK1单克隆抗体3E₈等最佳包被浓度的确定,及最后检测结果小于0.5ng/ml为阴性,接近1-2ng/ml为弱阳性,接近3-4ng/ml为阳性结果,接近5-6ng/ml为强阳性结果等为本发明首创。

本发明的技术优势和特点主要表现为:这种乳癌基因蛋白预警芯片及其分析方法,从hTK1的基因克隆、真核表达和单克隆抗体制备及其芯片组装等,源头技术和原料为发明人自己制备,可迅速产业化;而且,基因工程技术使这种乳癌基因蛋白预警芯片彻底解决“核芯-hTK1单克隆抗体”问题,这在今后应用起来不仅来源方便、价格便宜、且易学易懂、易于普及和推广应用。特别是本发明形成的技术方法和产品,具有微量、快速、灵敏、准确、简便、稳定性好、重复性高、特异性强、无须特殊设备或仪器、检测成本低、可单份或多份标本分别测定、且携带方便、易于现场或野外普查或体检等特点和优势,可适合于科研和预防单位及各级医院进行医疗、保健、体检等使用,亦可广泛用于个人、家庭成员及亲属进行乳腺癌的预防性自查或普查,以便早期发现和早期诊断。

具体地说, 本发明专利的技术优势和特点主要表现为:

①微 量: 采用本发明进行乳癌密切相关标志物 TK1 基因蛋白检测, 通常所需检测样品-末稍血或血清或血浆 1 滴(大约 20-50 μ l)即可), 即使检测样品(血清或血浆)只有 5-10 μ l 仍可完成检测。而其它一些可用于 hTK1 含量检测的免疫化学发光法、ELISA 法、微天平质量检测法等需要血标本至少 2 毫升左右, 标本用量超过 20 倍以上。

②快 速: 本发明具有移动速度快、反应时间短、检测迅速等特点, 从滴加检测样品、毛血作用移动、到显色反应完成、最后判断出结果在 3-20 分钟之内全部完成。有些非常典型的病例(即 hTK1 含量较高)的样品检测, 其结果判断甚至只需要 3-5 分钟即可全部; 而其它一些可用于 hTK1 含量检测的方法, 包括免疫化学发光法、ELISA 法、微天平质量检测法等虽可检测 hTK1, 但需要特殊仪器设备、且操作复杂、流程繁琐、时间较长(至少需要 1-2 小时以上)、有些甚至时间更长。

③灵 敏: 因本发明采用抗原抗体特异性结合原理设计, 可检测出 ng 级水平的乳癌密切相关标志物 TK1。如本发明技术是采用双抗体夹心法, 其灵敏度甚至可高达 1ng/ml, 即可在每毫升全血或血清或血浆样品中, 可检测出 1ng 与乳癌密切相关标志物 TK1, 可见其灵敏度之高、不失为一种高灵敏度的乳癌早期发现和预警诊断的方法之一。

④准 确: 采用本发明采用一滴全血或血清或血浆标本可同时平行测定两次, 因此准确性更高, 判断更准确。按照此方法曾对 30 份典型的乳癌患者血清标本进行测定, 其中 28 份血清均出现检测结果为阳性的预警结果, 一次性检出率大于 93%。同时, 用本发明的方法与经典的酶免疫法或最新的微天平质量法比较, 其相对吻合率、敏感性、特异性等均在 90%以上。这说明本方法不失为一种相对准确和可靠的乳癌早期预警方法。

⑤简 便: 本发明操作十分简便, 可不受条件限制随时进行, 且无需任何检测仪器和设备, 检测者只要按照说明书, 将一滴全血或血清或血浆标本加至本发明事先制备好的乳癌基因蛋白预警芯片上, 于室温水平放在一个台面, 然后等待 3-5 分钟, 最后肉眼观察结果即可。由于胶体金本身具有清晰的显色反应, 较 ELISA 省略了添加反应显示剂和终止液等步骤, 从而使操作步骤得以大大简化, 既适合于外出体检、普查或病人床边现场应用, 且特别适用于家

庭及个人使用或紧急情况下复查或辅助诊断用。

⑥安全：本发明均采用的是无毒无害、无辐射、无易燃、易爆、易腐蚀、易刺激、无致癌、致畸、致基因突变的原材料，整个反应也未添加任何放射性同位素、刺激性物质及邻苯二胺等有害物质，故在实际应用时，既不会损伤测试者或被测试者的健康，也不会污染环境。因此，本发明具有诸如放射性同位素或酶标及其它有害化学方法等检测法所无法比拟的安全性及清洁环保等特点。

⑦稳定：本发明采用抗原抗体特异性结合原理设计，反应极少受其它影响因素干扰，特别是极少受环境温度、湿度、光照、氧含量等外界因素影响不大，加上胶体金标记 hTK1 单克隆抗体是一个简单的物理反应过程，且抗体结合相对牢固，基本不会引起 hTK1 单克隆抗体生物活性的改变，所以检测方法十分稳定。

⑧重复性好：用本发明方法同一批制备的 12 条乳癌基因蛋白预警芯片测定同一标准对照样品，或者用本发明技术制备的 3 个不同批号的乳癌基因蛋白预警芯片测定同一标准对照样品各 12 次，其质控线 1 和检测线 2 的显色时间、颜色深浅和最终结果判断基本相同，说明其批内和批间重复性均较好。同时，采用本发明方法同一批制备的 12 条乳癌基因蛋白预警芯片同时测定同一份典型的乳癌患者血清标本，每次均出现检测结果为阳性的预警结果；而且，采用本发明方法同一批制备的乳癌基因蛋白预警芯片，每天 1 次、连续 12 天对同一份典型的乳癌患者血清标本进行测定，结果也表明每次均出现检测均为阳性的预警结果，这表明，采用本发明方法制备的乳癌基因蛋白预警芯片的重复性较好。

⑨特异性强：本发明采用 TK1 单克隆和多克隆抗体特异性检测乳癌患者血清或血浆中的 TK1 抗原，由于该抗原和抗体结合的高度特异性和亲和性，使本发明技术具有特异性强的特点。采用本发明检测不同浓度稀释的标准 TK1 抗原均出现结合反应；而与其它类型的癌抗原均无特异性结合反应出现。

⑩检测成本低：本发明使用的 TK1 单克隆抗体和多克隆抗体均采用分子生物学技术天然免疫动物制备而得，批量生产的实际成本很低；而且，本发明所采用的固相载体是国内外通用的硝酸纤维微孔滤膜，胶体金也是氯金酸通过柠檬酸钠还原制得，不仅质量稳定，而且价格也

都十分便宜；加上实际检测所需试剂和样本用量均很少，且可随时进行单份标本检测，这使得检测成本和应用价格大幅下降。

除此之外，用本发明方法制备的乳癌基因蛋白预警芯片的质量也较为稳定，如随机抽取12条乳癌基因蛋白预警芯片，分别加入同一份标准对照样品，从开始加样开始计时，到质控线1出现明显颜色记录时间，其标本移动速度和显色反应时间等均基本一致，说明用本发明方法制备的乳癌基因蛋白预警芯片的渗透速度和均一性较好。

附图说明

图1是本发明外观结构图

具体实施方式

(1)主要原材料：①抗hTK1单克隆抗体3E₈：其纯度为96.7%，亲和力系数为 1.8×10^9 ，此原料为发明人自制；②抗hTK1单克隆抗体3E₈：其纯度为96.1%，亲和力系数为 1.2×10^9 ，此原料为发明人自制；③hTK1标准品：此原料为发明人自制，使用时，分别稀释成 $10 \mu\text{g/L}$ 、 $5 \mu\text{g/L}$ 、 $6 \mu\text{g/L}$ 、 $3 \mu\text{g/L}$ 、 $8 \mu\text{g/L}$ 、 $4 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \mu\text{g/L}$ 、 $0.5 \mu\text{g/L}$ ，并进行标定后，冻干后备用；④氯金酸($\text{AuCl}_3 \cdot \text{HCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)：美国Sigma公司产品；⑤羊抗鼠IgG多克隆抗体：鼎国生物制品公司；⑥小牛血清：Pierce公司产品；⑦玻璃纤维：美国Sigma公司产品；⑧硝酸纤维微孔滤膜(NC膜)：美国基因公司产品，孔径为 $5 \mu\text{m}$ ，液体移动速度约50s移动1cm；⑨常用化学试剂：碳酸钾(K_2CO_3)溶液、磷酸氢二钾(K_2HPO_4)和磷酸二氢钾(KH_2PO_4)缓冲液、tris-HCl缓冲液、国产分析纯(AR)，化学试剂公司购买后按照常规方法配制；双蒸水：实验室自制。⑩聚氯乙烯(PVC)材料：上海升惠塑料制品有限公司产品。而聚酯膜、滤纸、塑料板、色卡等均为杭州艾康公司产品。

(2)主要仪器和设备：①高速冷冻离心机；②真空干燥机；③自动分光光度计；④液体快速混合器；⑤可调式电炉；⑥恒温箱；⑦专用扫描笔；⑧金标机；⑨自动点膜机和切板机；⑩冷冻干燥机。

(3)具体实施方式：

①hTK1基因进行克隆及序列分析：

1) 逆转录 PCR 扩增 TK1 cDNA: 用可从动物细胞和组织、细菌、真菌等提取总提取总核糖核酸 (RNA) 的 Trizol 试剂试剂盒从 500 万个 HeLa 细胞中提取 RNA, 经氨甲喋呤处理 48 小时, 并经纯化后再用一种高效烷化剂-焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理水溶解沉淀得 30 μ l。由于 DEPC 可破坏核糖核酸酶 (RNase) 活性, 因此可去除 RNase 的污染。

在进行逆转录时, 加入 5 倍缓冲液: 4 μ l、引物 Oligo-dT (0.5 μ g/1 μ l) 1 μ l、10mMol/L 浓度的脱氧核苷三磷酸 (dNTP): 2 μ l、RNA: 10 μ l、去离子水: 2 μ l, 充分混匀, 并置于 70 $^{\circ}$ C 恒温水浴 10 分钟; 然后, 再置于冰上 2 分钟; 加入 1 μ l 逆转录酶 (50U, Roche), 混匀, 再置于 42 $^{\circ}$ C 水浴 90 分钟, 其逆转录体积共 20 μ l。

根据人 TK1 基因序列设计一对引物:

引物 1. 5-AGCTAAGCTTAGCTGCATTAACCTGCCCCAC-3

引物 2. 5-TACTCTCGAGGTTGGCAGGGCTGCATTGCAGAATC-3

引物 1 引入 HindIII 酶切序列; 引物 2 引入 XhoI 酶切序列

再进行 PCR 扩增, 即加入 10 倍缓冲液: 5 μ l, dNTP (2.5mMol/L): 4 μ l, 引物 1: 1 μ l, 引物 2: 1 μ l, cDNA: 5 μ l, Taq 酶: 1 μ l, 去离子水: 33 μ l; PCR 扩增液体积共 50 μ l。混匀, 置 PCR 仪上扩增: 94 $^{\circ}$ C 60 秒, 55 $^{\circ}$ C 60 秒, 72 $^{\circ}$ C 120 秒, 共进行 30 个循环, 最后补加 72 $^{\circ}$ C 5 分钟。然后, 取 10 μ l PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶上电泳, 切下 700bp 位置的 DNA 条带, 用凝胶回收试剂盒回收 DNA 片段用于 TA 克隆。

2) TA 克隆和 DNA 序列分析: 纯化的 PCR 产物与 pMD-18T 载体重化大肠杆菌组, 转 JM109, 涂布于含有氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 次日挑取 10 个白色的单菌落扩大培养, 用质粒提取试剂盒纯化质粒, 双酶切 (HindIII 和 XhoI) 鉴定插入片段, 在所选的 10 个克隆中均有插入片段, 片段大小约为 700bp。TK1 重组 TA 克隆 (TA9) 用 T7 和 SP6 引物双向测序, 结果与 GenBank 的 TK1 序列比较证明本次克隆的 cDNA 是人 TK1 基因, 全长 702 个碱基。

② TK 基因亚克隆入真核分泌型表达载体

采用真核分泌型表达载体 pSecTag2/Hygro B (简称 pSecTag2), 其可以将重组基因表达的蛋白分泌到细胞外, 由于 TK1 没有信号肽, 所以选择分泌型载体是一最佳的方法。

用 HindIII 和 XhoI 分别酶切 TK1/TA 克隆质粒和 pSecTag2 质粒,用凝胶电泳和胶回收试剂分别纯化 TK1 和 pSecTag2 的 DNA 片段,然后进行连接反应。连接反应体积共 15 μ l, 即 10 倍的连接缓冲液:1.5 μ l, TK1 DNA 片段:8.0 μ l, PSecTag2 DNA:4.5 μ l, T4 DNA 连接酶 1.0 μ l。混匀,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜;加入 300 μ l 感受态的大肠杆菌 JM109,置冰浴中 1 小时,42 $^{\circ}$ C 水浴 90 秒,再于冰水浴中 5 分钟;加 LB 培养基 1ml,混匀,置 37 $^{\circ}$ C 培养 1 小时,离心收集沉淀,将沉淀的菌体涂于含氨苄青霉素 (50 μ g/ml) 的 LB 琼脂培养基上,于 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑取 10 个菌落扩大培养,用试剂盒小提质粒 DNA,再用内切酶和电泳鉴定重组质粒,所挑选的 10 个质粒均含有 TK1 基因,电泳显示可以切下大约 700bp 的 DNA 片段,同时在 TK1 片段中有一个 SfiI 酶切位点。TK1 重组质粒命名为 pSecTag/TK1。

③PSecTag/TK1 DNA 的大量制备

PSecTag/TK1 重组菌于 37 $^{\circ}$ C 活化培养过夜,然后接种于 50ml 的 LB 培养基中(含氨苄青霉素 50 μ g/ml),37 $^{\circ}$ C 振荡培养 5 小时,再转入 500mL 培养基中继续培养 5 小时,离心回收菌体;按试剂盒程序提取质粒 DNA;在最后洗脱时选用无菌蒸馏水。纯化的质粒 DNA 用紫外分光光度计检测纯度和定量。500ml 培养的菌体可以提取 400 μ g 质粒 DNA,冰箱中冻存备用。

④基因免疫制备 TK1 单克隆抗体

1)TK1 基因免疫 Balb/c 小鼠:免疫过程:取 4 周龄 Balb/c 纯系雌性小鼠 3 只(其中一只不免疫作为对照),每只鼠两侧股四头肌分别注入 50 μ g pSecTag/TK1 DNA(每侧 50 μ l);对照鼠注入等量的生理盐水;每 15 天免疫一次,总共免疫 5 次,第二次免疫后 10 天开始检测血清中抗体;于末次免疫后一周进行细胞融合。

2)TK1 基因免疫小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合:A:饲养细胞制备:Balb/C 小鼠拉颈处死,取其胸腺,置于 10ml 培养液中,在钢网上研磨分散细胞,弃大块组织,将细胞调成 5.0×10^6 /ml,96 孔培养板每孔 100 μ l。B:骨髓瘤细胞准备:小鼠骨髓瘤细胞为 NS1 细胞株,融合前细胞生长良好,细胞浓度为 5×10^6 /ml。C 细胞融合: 2×10^7 个骨髓瘤细胞与 2×10^8 个细胞混匀,离心,弃上清,轻微振荡混匀,于 37 $^{\circ}$ C 水浴中,在 90 秒内滴加 1ml 50% 的 PEG,然后滴加 20ml 无血清培养基,离心,弃上清,再洗一次,加入 15% 血清的培养基 20ml(含 HAT),混匀,每孔加入 100 μ l(原有 100 μ l 的饲养细胞),同时设有单独脾细胞和单独骨髓瘤对照孔(12 孔/每个)。4 天

后换液;吸出 100 μ l,加入 100 μ l 含 15%血清 HAT 培养基;第三次换液时为 HT 培养基;每日观察细胞生长状态,10 天左右出现克隆。

3) 杂交瘤培养上清 TK1 抗体的检测:用直接 ELISA 检测杂交瘤培养上清中的抗体,用 TK1 抗原包被 ELISA 板,加入培养上清,冲洗后加辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG,孵浴和冲洗后,加显色底物 OPD,然后测 492nm 的光密度,以高于阴性对照光密度 2 倍以上为阳性克隆。结果在融合后两周的培养上清中有 28 孔显示 TK1 抗体阳性。选择效价高的三个孔进行克隆化。

4) 克隆化和扩大培养:多克隆培养孔内的细胞采用有限稀释法进行克隆化,用含有 HAT 的培养基制备小鼠胸腺细胞作为饲养细胞,多克隆孔内的细胞进行稀释至每孔含有 100, 10 和 0 个细胞(100 μ l),培养观察,对只有一个克隆杂交瘤的培养上清进行检测。选择阳性克隆转入 24 孔培养板中进行扩大培养,每孔 1ml,培养 5 天后,加入 4ml 培养液,混匀,分入 4 个培养孔中,继续培养 5 天,然后转入培养瓶中进行扩大培养,选择抗体阳性,且效价稳定的克隆进行进一步扩大和冻存。结果得到两株结合位点不同、且稳定分泌 TK1 抗体的杂交瘤,命名为:DZ1 和 DZ2。

5) TK1 单克隆抗体大量制备和纯化:Balb/C 小鼠腹腔注入 0.5ml 液体石蜡,一周后每只小鼠腹腔注入 5×10^5 个杂交瘤细胞,然后当有明显腹水形成时,针头穿刺放腹水。收集的腹水 12000rpm 离心 5 分钟,弃沉淀,上清用蛋白 G 柱亲和层析纯化。将纯化后的 TK1 单克隆抗体用蛋白定量试剂(BCA)定量抗体,分装保存。

6) TK1 单克隆抗体的鉴定:单克隆抗体特异性的鉴定:A:直接 ELISA:TK1 包被固相,加 TK1 腹水,再抗体和酶标抗体。B:双抗体夹心 ELISA:用腹水包被固相(1:200);加入不同浓度的 TK1,然后加碱性磷酸酶标记抗 TK1 的 IgY,用碱性磷酸酶底物显色,测 570nm 的光密度。C:免疫组化:制备 HeLa 细胞涂片,分成两组:一组为 HeLa 细胞;另一组为氨基嘌呤诱导 48 小时的 HeLa 细胞,EDTA 消化培养的细胞,使其分散,用 PBS 洗一次,稀释成 5×10^5 /ml,每个细胞涂点为 30 μ l;室温干燥,丙酮固定 5 分钟,然后用 1%的双氧水处理 30 分钟;再用 3%的 BSA 封闭 30 分钟。然后加抗体(1:400 稀释,培养上清用原液),孵浴和冲洗,加酶标抗体,冲洗后加 DAB 底物显色,光镜下观察结果,同时用商品试剂盒对照进行。结果显示 DZ1、DZ2 杂交瘤分泌的抗体是 TK1

特异的单克隆抗体 2A₆和 TK1 特异的单克隆抗体 3E₈。最后, 经过十二烷基磺酸钠 (SDS) -PAGE (聚丙烯酰胺) 凝胶电泳法检测其抗体纯度; 同时, 进行抗体的 IgG 类型、亚类鉴定、以及抗体的结合位点和亲和力测定等。之后, 置于低温冰箱中保存, 即可备为后续应用。

⑤显色标记物-胶体金的制备:

1) 氯金酸应用液和柠檬酸三钠应用液的配制: 准确称取优质氯金酸 10mg, 立即置于 100ml 洁净烧杯中; 再加入 100ml 双重蒸馏水, 然后, 再开启液体快速混合器, 不断进行搅拌, 使之完全溶解, 而得到浓度为 $0.25 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ (0.01%) 的氯金酸溶液 100ml; 同时, 再准确称取柠檬酸三钠 1.0g, 置于另一个洁净 100ml 烧杯中, 再加入 100ml 双重蒸馏水; 同样, 用液体快速混合器不断搅拌溶解, 使之完全溶解, 得到浓度为 $34 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ (1%) 的柠檬酸三钠溶液 100ml。

2) 胶体金应用液的配制: 将上述已经配制好的浓度为 $0.25 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ (0.01%) 的氯金酸溶液 100ml 置于垫有隔热石棉网可调式电炉上逐步加热至沸腾后, 迅速加入已配制好的浓度为 $34 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ (1%) 的柠檬酸三钠 (枸橼酸三钠) 溶液 2ml, 继续煮沸加热 10-15min 后, 仔细观察, 直至胶体金应用液的颜色变为酒红色或紫红色后, 关闭可调式电炉, 使其逐步冷却后, 即可形成所需要的胶体金溶液, 冷却后, 置于 4℃ 冰箱保存备用。

3) 胶体金颗粒大小和均匀度鉴定: 将上述胶体金溶液用自动分光光度计在可见光范围 (400-600nm) 内进行扫描, 发现其在波长为 520-521 nm 处时, 该胶体金溶液有最大吸收峰, 且主峰宽度较窄, 证实所制备的胶体金粒度在 20-25nm, 符合后续使用的要求。

⑥胶体金-hTK1 单克隆抗体 3E₈ 结合物干燥聚酯膜片制备: 在确定完成氯金酸还原成颗粒大小分布均匀的胶体金后, 即可进行胶体金标记 hTK1 单克隆抗体 3E₈ 的制备。

1) 弱碱性胶体金滤液和 hTK1 单克隆抗体 3E₈ 应用液的制备: 取剂量为 100 mL 的胶体金溶液, 置于 250mL 的洁净烧杯之中; 然后, 用事先已配制好的浓度为 0.1mol/mL 的碳酸钾 (K₂CO₃) 溶液将此胶体金溶液的酸碱度逐步调至 PH8.8, 然后, 再用孔径为 0.45 μm 的滤膜负压过滤, 即可得到弱碱性胶体金滤液过滤液。紧接着, 取前述已纯化好的 hTK1 单克隆抗体 3E₈ 并用双重蒸馏水配制成每毫升中含有 hTK1 单克隆抗体 3E₈ 1500 μg 的溶液。

2) 胶体金-hTK1 单克隆抗体 3E₈ 结合物的制备: 取上述弱碱性胶体金滤液过滤液 100mL,

在不断快速搅拌中,缓慢加入 1mL 已调节到浓度为 1500 μ g/mL 的 hTK1 单克隆抗体 3E₈, 则其标记蛋白量为每毫升胶体金中加 15 μ g hTK1 单克隆抗体 3E₈。在继续搅拌 15-20min 后,加入用 pH8.2, 浓度为 20mmol/L tris-HCl 缓冲液配制的 20%小牛血清白蛋白(BSA) 1mL (200mg); 再经过 10-15min 搅拌后,置于冷冻离心机中进行低温(0-4 $^{\circ}$ C)低速离心(1500rpm/min) 10min。小心弃除沉淀;取上清液再进行低温(0-4 $^{\circ}$ C)高速离心(12000rpm/min) 20-30min 后,再小心吸去上清液,保留沉淀,此即为胶体金-抗 hTK1 单克隆抗体 3E₈ 结合物。

3) 胶体金-抗 hTK1 单克隆抗体 3E₈ 结合物的聚酯膜片制备:首先,配制浓度为 0.01mol/L Tris-HCl 缓冲液(1%BSA, pH8.2);然后,用此缓冲液将上述已沉淀好的胶体金-hTK1 单克隆抗体 3E₈ 结合物稀释至 10mL;最后,将此稀释好的胶体金-hTK1 单克隆抗体 3E₈ 结合物按照 0.8ml/条(0.4cm X20cm/条)的剂量用金标机将其均匀分布在聚酯膜吸膜片上、并做好标记,然后进行真空冷冻干燥,或者置于已消毒过的 37 $^{\circ}$ C 恒温干燥箱中过夜干燥,即可得到含有胶体金-抗 hTK1 单克隆抗体 3E₈ 结合物的干燥聚酯膜膜片,密封后备用。

⑦hTK1 基因蛋白乳癌预警芯片制备

1) 制备含有 hTK1 单克隆抗体 2A₆ 和羊抗鼠 IgG 多克隆抗体的硝酸纤维微孔滤膜片:分别将 hTK1 单克隆抗体 2A₆ 和羊抗鼠 IgG 多克隆抗体分别用 10mmol/L, pH 7.4 的磷酸盐(PBS)缓冲液稀释成 1500mg/L(1.5mg/ml)。其中,前者为检测线 2,后者为质量控制线(质控线 1)。将这两种抗体分别装入两支洁净的专用扫描笔中,检测线 2(含 hTK1 单克隆抗体 2A₆)和质控线 1(含羊抗鼠 IgG 多克隆抗体)的带线均宽 2mm,但两者之间相距 8mm。将程序设计好后输入自动点膜机,喷涂量为 1.0 μ L。然后,开启自动点膜机开关,即进入工作状态,此时,在位于硝酸纤维微孔滤膜(NC 膜)中部左 1/2 的位置上自动点膜机分别将这两种抗体分别包被于硝酸纤维微孔滤膜(NC 膜)上,分别做好标记,即检测线 2(含 hTK1 单克隆抗体 2A₆)和质控线 1(含羊抗鼠 IgG 多克隆抗体);同样,在位于硝酸纤维微孔滤膜(NC 膜)中部右 1/2 的位置上自动点膜机分别将这两种抗体分别包被于硝酸纤维微孔滤膜(NC 膜)上,分别做好标记,即检测线 2(含 hTK1 单克隆抗体 2A₆)和质控线 1(含羊抗鼠 IgG 多克隆抗体)。同时,在这条 NC 膜(长 100mm、宽 4mm)的正中间的中点(50 mm 和 2 mm)设计一圆形加样孔 3 并做好记号。其中,使这两条 hTK1 单克隆

抗体 2A₆ 分别位于该加样孔 3 左右两边各 25 mm 的位置;而羊抗鼠 IgG 多克隆抗体则分别位于该加样孔 3 左右两边各 33 mm 的位置。紧接着,将包被有 hTK1 单克隆抗体 2A₆ 和羊抗鼠 IgG 多克隆抗体的硝酸纤维微孔滤膜上置于 10mmol/L, pH7.4 的磷酸盐(PBS)缓冲液(含有 1% BSA)中, 37℃恒温浸泡 60min;最后,再用 10mmol/L, pH7.4 的磷酸盐(PBS)缓冲液洗涤 1-2 次;随后取出,尽可能吸干水分,置于室温或 37℃恒温箱中干燥或真空干燥,即得含有 hTK1 单克隆抗体 2A₆ 和羊抗鼠 IgG 多克隆抗体的硝酸纤维微孔滤膜片,密封,备用。

2) hTK1 基因蛋白乳癌预警芯片组装:在完成包被含有 hTK1 单克隆抗体 2A₆ 和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的硝酸纤维微孔滤膜后,即可进行乳癌预警芯片的组装。首先,进行膜片组装前的预处理:取宽度为 80mm 的白色聚氯乙烯(PVC)板,使用前,用纯净水反复洁净处理后,再用双蒸水浸泡或冲洗,并置于室温自然干燥。紧接着,进行粘贴复膜:以正条中点的加样孔 3 为起点标志,左边和右边分别用热龙胶依次将滤样纸、吸水玻璃纤维纸、聚酯膜片(胶体金-hTK1 单克隆抗体 3E₈ 结合物)、包被有抗 hTK1 单克隆抗体 2A₆ 和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的硝酸纤维微孔滤膜和吸水滤纸粘贴于白色的 PVC 塑料片上,并在此膜片上覆盖一层有效的保护膜。其中,滤样纸(全血分离膜)和吸水玻璃纤维纸均经缓冲液处理并贴在加样孔 3 下面,并依次与聚酯膜片(胶体金-hTK1 单克隆抗体 3E₈ 结合物)连接,而聚酯膜片(胶体金-hTK1 单克隆抗体 3E₈ 结合物)则与包被有抗 hTK1 单克隆抗体 2A₆ 和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的硝酸纤维微孔滤膜连接;硝酸纤维微孔滤膜尾部与吸水滤纸相连。在完成贴膜后即可进行真空干燥;最后,将全部贴好的条板在专用切割机上切成一规格为宽 4mm、长 100mm 的条状膜片,装入塑料盒中,加入干燥剂密封保存,即成乳癌基因蛋白预警芯片。

⑧hTK1 基因蛋白乳癌预警芯片的测试方法

1) 打开包装,迅速取此乳癌预警芯片一条,并将其平整而规范地装入特制配套的卡板中的相关位置,立即盖上卡板盖,直接放置在水平的台面(*注:测试使用的特制配套卡板将另申报实用新型专利)。

2) 用事先准备好的消毒酒精棉球搽拭受检者的手指或耳垂,待酒精干后,立即用已消毒过的采血三棱针刺破,轻轻挤压,使血流出;然后,用含有肝素抗凝剂的微量吸管吸入 50 μL 全血

直接加入至卡板中点标有加样孔 3 的圆形孔处。如发现末稍血较为粘稠,可用含有肝素抗凝剂的微量吸管吸入 25 μ L 全血和 25 μ L 10mmol/L, pH7.4 的磷酸盐(PBS)缓冲液,混合后,直接加入至卡板中点标有加样孔 3 的圆形孔处。

3) 此时,该抗凝血中的血浆或血液稀释液中的血浆由于毛细作用,分别向左右两侧自然移动。如血浆中含有 hTK1 基因蛋白(抗原),则该抗原先通过左右两侧的玻璃纤维的层析作用自然向各自方向前行、并与左右两侧聚酯膜片上胶体金标记的 hTK1 单克隆抗体 3E₆特异性结合形成抗原抗体复合物。

4) 同时,因毛细作用的继续,左右两侧带有胶体金标记的抗原抗体复合物继续向各自前方移行至两侧 NC 膜,并立即与包被在两侧 NC 膜上的 hTK1 单克隆抗体 2A₆发生特异性结合反应,形成双抗体夹心的抗原抗体复合物。此时,血浆中未被完全结合的 hTK1 抗原继续通过左右两侧聚酯膜片与胶体金标记的 hTK1 单克隆抗体 3E₆特异性结合形成抗原抗体复合物后继续向两侧前行,并与包被在两侧 NC 膜上的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体结合。全部试验过程大约 3-20min。

5) 由于胶体金的不断被富集,此时在左右两侧 NC 膜应各呈现出两条目测可见的红色或紫红色条带(整个卡板上应为四条)。

6) 结果判断:阴性:左右两侧的NC膜片上靠近加样点的检测带均不显色,而左右两侧的NC膜片上的质控带则显色,即左右两侧远离加样点的位置各出现1条红线(整个卡板上应为两条),表示检测标本中不含hTK1基因蛋白;阳性:左右两侧的NC膜片上的检测带和质控带均显色,即左右两侧个出现2条红线(整个卡板上应为四条),则表示检测标本中含有hTK1基因蛋白;无效:若左右两侧的NC膜片上的测试带和质控带均不显色,即整个卡板上均无红线出现,则表明测试无效,表示此乳癌预警芯片已经失效。

本发明实施的注意事项:

第一,用于制备此乳癌基因蛋白预警芯片的核心成分-hTK1 单克隆抗体必须先进行特异性的鉴定,包括采用直接 ELISA 法、双抗体夹心 ELISA 法、免疫组化法等,以确切证实所选用的杂交瘤细胞所分泌的抗体是 TK1 特异性的单克隆抗体。

第二,在确切证实所选用的杂交瘤细胞所分泌的抗体是 hTK1 单克隆抗体以后,还需要同

时对此 hTK1 单克隆抗体进行亲和力测定,以确切证实所选用的两个特异性 hTK1 单克隆抗体的亲和力系数均必须大于 1×10^6 以上,而且最好是在 1×10^9 以上。

第三,所选用的这两个特异性 hTK1 单克隆抗体(代号为 2A₆和 3E₈)在经过亲和力系数测定,并确定其具有高度的亲和力后,还必须先将含 hTK1 单克隆抗体的小鼠腹水经过抗体纯化过程,以免因为此抗体纯度不够而影响或者干扰检测的灵敏度和准确性。

第四,胶体金作为 hTK1 单克隆抗体的重要标记物,也是本发明成功制备乳癌基因蛋白预警芯片的重要因素。因此,成功制备出高质量胶体金,是完成合格的胶体金-hTK1 单克隆抗体结合物制备过程的重要环节,务必高度重视,认真操作。在进行胶体金制备时,除了氯金酸还原时需要添加合适浓度的柠檬酸三钠(枸橼酸三钠)溶液外,还需要控制好整个反应的 PH 值、时间和温度。为了确保胶体金的质量,必要时,须用自动分光光度计对此胶体金在可见光范围(400-600nm)内进行扫描,分析所制备的胶体金颗粒是否均匀。需要强调的是,如果使用竞争法,胶体金的颗粒以 20-25nm 为宜;而采用双抗体夹心法则采用的胶体金的颗粒以 25-30nm 为宜。

第五,在制备高质量胶体金时,所用的玻璃器皿必须按照规范化的操作彻底清洗;有条件时最好采用经过硅化处理的玻璃器皿;或者采用前次配制过合格胶体金的玻璃器皿,但在再次使用前,必须用双蒸水反复冲洗后才能再使用,以免影响 hTK1 单克隆抗体与胶体金颗粒结合和活化后胶体金颗粒的稳定性。

第六,胶体金颗粒的大小及其均匀性很重要,不能获得 20-40nm 的胶体金颗粒将会影响其与 hTK1 单克隆抗体结合力和稳定性。因此,要求制备胶体金时所有试剂均必须保持其纯度,即所有试剂都必须使用分析纯或优级纯,包括配制中使用的柠檬酸三钠(枸橼酸三钠)、氯金酸、碳酸钾(K₂CO₃)及配制缓冲液的试剂等。特别是所用的氯金酸质量一定要符合要求,即纯度高,杂质少,最好是进口的优级纯。同时,所使用的小牛血清白蛋白(BSA)必须新鲜、干净无任何变质及污染。配制上述试剂所用的纯净水必须去离子后才能用于配制,且在临用前将配好的试剂经过超滤或微孔滤膜(0.22 μm)过滤,以完全除去其中的聚合物和其它可能混入的杂质。有条件的话,纯净水最好是使用双重蒸馏水或三重蒸馏水。而且,在实际配制时还必须

严格按照实验室制剂配制的相关规则。如配制胶体金溶液的 pH 以中性 (pH7.2) 较好, 通常采用双重蒸馏水或三重蒸馏水配制。

第七, 实际使用时, 通常氯金酸的应用浓度为 0.01% 的水溶液, 但氯金酸水溶液浓度在 1.0% 时可在 4℃ 条件下保持数月稳定不变。为避免由于氯金酸易于潮解造成的损失, 在实际配制时, 可将开封后的氯金酸一次性溶解后配制成 1.0% 的水溶液置于 4℃ 冰箱中保存。

第八, 在确定完成氯金酸还原成颗粒大小分布均匀的胶体金后, 即可进行胶体金标记人胸腺嘧啶脱氧核苷激酶 (hTK1) 单克隆抗体 (McAb), 即胶体金-hTK1 McAb 结合物的制备。标记物胶体金对于被标记的 hTK1 单克隆抗体的吸附效果主要取决于 pH 值, 在接近 hTK1 单克隆抗体的等电点或稍偏碱的条件下, 胶体金和 hTK1 单克隆抗体较易形成牢固的结合物。如果实际制备时胶体金的 pH 值低于 hTK1 单克隆抗体的等电点时, 则会很快发生聚集而失去结合能力。经等电点聚焦免疫电泳检测, hTK1 等电点为 8.3-8.5, 因此, 我们确定用碳酸钾溶液调整 pH 值为 8.6-9.0 (实际采用的 pH 值为 8.8)。除此以外, 胶体金颗粒的大小、离子强度、均匀程度、以及 hTK1 单克隆抗体使用浓度和分子量等也都可能影响胶体金与其结合的能力。在此 PH 范围内, PH 偏高, 胶体金带负电荷增加, hTK1 单克隆抗体带正电荷增加, 有利于胶体金与 hTK1 单克隆抗体结合物最大限度形成且结合牢固而稳定, 但 PH 偏高, 则可能引起胶体金与 hTK1 单克隆抗体结合物的得率降低; 而 PH 偏低, 虽然有利于胶体金与 hTK1 单克隆抗体结合物的得率提高, 但 PH 过低, 则胶体金聚集的可能性增大, 不稳定性加大。因此, 最后确定的 PH 值也应严格通过实验结果确定。

第九, 在进行胶体金-hTK1 单克隆抗体 3E₈ 结合物制备时, 须先将 hTK1 单克隆抗体浓度调节到合适的水平。在向胶体金溶液中加入 hTK1 单克隆抗体 3E₈ 前, 须先用碳酸钾溶液将胶体金溶液的 PH 值调整到 8.6-9.0, 并加入小牛血清白蛋白, 这样标记的效果会更好。因为, 小牛血清可填补胶体金与 hTK1 单克隆抗体的缺陷, 起到良好的封闭效果和固定作用; 而在制备含有抗 hTK1 单克隆抗体 2A₆ 和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的硝酸纤维微孔滤膜片 (NC) 时, 则须用 pH7.2-7.4 的磷酸盐 (PBS) 缓冲液稀释, 同样含有小牛血清白蛋白, 然后用包被机将它们分别包被于硝酸纤维微孔滤膜片上, 并在 37℃ 恒温浸泡 60min, 这样, 它们的相互结合才更加牢固。

第十，抗 hTK1 单克隆抗体 2A₆和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的浓度通常在 0.8-1.6g/L 之间，其中以 1.0g/L 较常用。低于 1.0g/L, 可能影响抗原抗体结合, 造成抗原抗体结合率降低; 而高于 1.0g/L 可能造成不必要的浪费, 或者因为并非是抗原抗体结合的最佳浓度, 反而影响或干扰抗原抗体的结合。特别是不同的抗原和抗体, 其浓度没有一致的标准, 有些甚至可以用 0.5g/L. 总之, 最佳浓度的确定仍必须根据实验情况最后决定。

第十一，组装芯片时以加样孔 3 为起点，其顺序依次为：滤样纸(全血分离膜)、吸水玻璃纤维纸、聚酯膜(胶体金-抗 hTK1 单克隆抗体 3E₈ 结合物)、硝酸纤维微孔滤膜(包被有抗 hTK1 单克隆抗体 2A₆和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体)和吸水滤纸, 并直接粘贴于白色的 PVC 塑料片上, 且在此膜片上覆盖一层保护膜, 真空干燥后, 剪切, 加干燥剂密封, 置于阴凉、闭光、干燥、通风处保存。特别应该注意的是, 铺在加样孔 3 下面的滤样纸(全血分离膜)和吸水玻璃纤维纸与 NC 膜一样需要经过缓冲液处理, 以防止检测样品的 PH 变化过大而影响结果的重复和准确性。

第十二，如检测标本(全血或血清或血浆)在此乳癌基因蛋白预警芯片层析过快, hTK1 尚未来得及与 NC 膜上 hTK1 抗体发生完全的特异性结合反应, 就越过了检测线 2, 导致显色反应不明显, 而出现假阴性结果。而且, 检测标本在此乳癌基因蛋白预警芯片层析过快, 还会导致用于对照的质控线 1 很快显色, 而弱阳性标本可能还没有显色, 检测者误认为结果判断时间已到, 而出现假阴性结果。因此, 检测标本移动速度过快并非好事, 应引起高度重视, 并加以控制。

第十三，检测标本(全血或血清或血浆)过少、或者说通过乳癌基因蛋白预警芯片的检测标本不足, 导致检测标本无法达到检测线 2 和用于对照的质控线 1, 即无法使检测标本中的待测成分(hTK1)无法与 NC 膜上 hTK1 单克隆抗体或 IgG 多克隆抗体发生结合反应, 以至于造成无法判读结果、或者误以为预警芯片失效。因此, 在实际检测时, 应确保有足够的检测标本。

第十四，检测标本(全血或血清或血浆)过多, 或者检测标本(全血或血清或血浆)造成外溢, 使得乳癌基因蛋白预警芯片无法有效地阻挡血细胞, 从而导致血细胞和血清或血浆一起向检测线 2 移动, 造成检测线 2 模糊, 干扰和影响了结果判断, 使实验失败。

第十五，防止冬季使用时的温度过低现象, 因为温度过低, 不仅可使检测标本(全血或血

清或血浆)在此乳癌基因蛋白预警芯片层析减慢,而且还可使抗原抗体特异性结合的反应速度降低,有时,一些弱阳性标本的颜色反应甚至在30 min还不能完全显示出来。因此,在温度较低时,应尽可能延长反应时间和结果判断时间,以免出现假阳性结果,导致出现误诊或漏诊。

第十六,使用此乳癌基因蛋白预警芯片,应尽可能在洁净的实验室内进行,并防止灰尘落在预警芯片上。如此乳癌基因蛋白预警芯片上有灰尘落入,则会影响检测标本在此乳癌基因蛋白预警芯片上的移动或扩散速度,致使结果不能正常观察或出现结果判断失误。

第十七,使用此乳癌基因蛋白预警芯片,应尽可能将它放在水平的台面。台面不平或歪斜,也可能影响检测标本(全血或血清或血浆)在此乳癌基因蛋白预警芯片上的移动或扩散速度,致使结果不能正常观察或出现结果判断失误。

第十八,乳癌基因蛋白预警芯片平时应置于阴凉、干燥、通风处,且包装中务必要放置干燥剂、并注意随时更换,以防止预警芯片潮湿。因为,乳癌基因蛋白预警芯片不仅容易被污染和生长细菌,而且还会导致其完全失效。

第十九,实际检测中有时需要根据检测标本(全血或血清或血浆)的情况对标本进行稀释。因此,在加入检测标本后要仔细观察其移动或扩散的速度。若发现检测标本扩散速度很慢或停止,应尽快加入稀释液,以免加得太晚无法推动。另外,稀释液也不能加液太多,否则会将血细胞随之移动或扩散到检测线2,造成判断结果困难。

第十九,乳癌基因蛋白预警芯片可用于室外检测,但过强阳光容易刺眼而漏诊;室外风力较大也有可能影响标本移动速度而影响结果的正确判断。因此,检测者应特别认真和细致判断结果以免造成误判。

本发明所述的实施例仅仅是对本发明的优选实施方式进行的描述,并非对本发明构思和范围进行限定,在不脱离本发明设计思想的前题下,本领域中的学者和工程技术人员对本发明的技术方案作出的各种变型和改进,均应落入本发明的保护范围,本发明请求保护的技术内容,已经全部记载在权利要求书中。

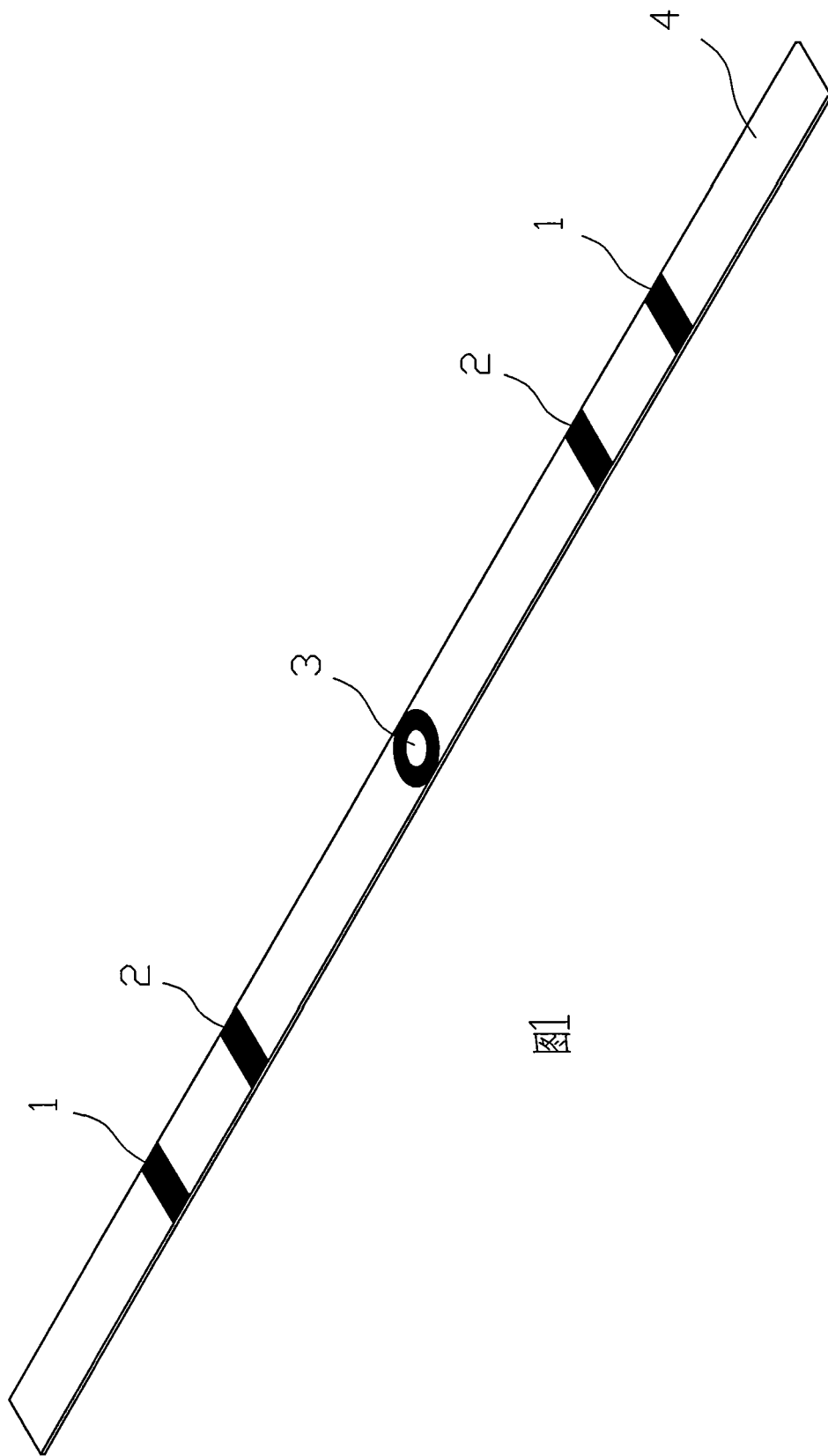


图1

专利名称(译)	一种简便快速测定人类I型胸苷激酶基因蛋白的乳癌预警芯片		
公开(公告)号	CN101275954A	公开(公告)日	2008-10-01
申请号	CN200810031281.1	申请日	2008-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	丁克祥		
申请(专利权)人(译)	丁克祥		
当前申请(专利权)人(译)	丁克祥		
[标]发明人	丁克祥 刘卫国 费定宇 刘莉 丁宇		
发明人	丁克祥 刘卫国 费定宇 刘莉 丁宇		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/532		
其他公开文献	CN101275954B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种简便快速测定I型胸苷激酶基因蛋白(hTK1)的乳癌预警芯片。本发明的特点在于所述的乳癌预警芯片4是由一端包被真核表达制备的一抗hTK1单克隆抗体(代号为2A6 - McAb)和另一端则包被兔抗鼠IgG多克隆抗体的条状纤维层析固相载体NC膜、滤样纸、吸水玻璃纤维纸、及标记有胶体金和二抗hTK1单克隆抗体(代号为3E8 - McAb)结合物的聚酯膜片等依此粘贴于白色PVC塑料片所组成。本发明具有微量、快速、灵敏、准确、简便、稳定性好、重复性高、特异性强、无须特殊设备或仪器、检测成本低、可单份或多份标本分别测定、且携带方便、易于现场或野外普查或体检等特点和优势。

