

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102062780 A

(43) 申请公布日 2011. 05. 18

(21) 申请号 201010561173. 2

(22) 申请日 2010. 11. 23

(71) 申请人 北京正旦国际科技有限责任公司  
地址 102206 北京市昌平区科学园路 33 号

(72) 发明人 魏开华 原剑 孙云波 周晓明  
杨保安 甄蓓 张拓 张馨月  
王东茂

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002  
代理人 王加岭 张庆敏

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 27/62 (2006. 01)

C07K 7/08 (2006. 01)

C07K 16/18 (2006. 01)

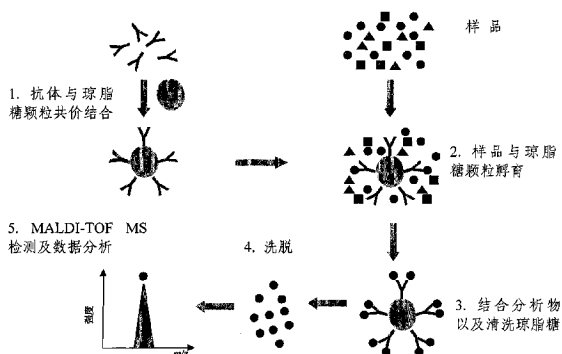
权利要求书 2 页 说明书 6 页 序列表 1 页  
附图 2 页

(54) 发明名称

一种多肽免疫试剂盒及其检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种多肽免疫检测试剂盒,所述试剂盒包括:作为固相载体的包被蛋白 G 或蛋白 A 的琼脂糖颗粒、纯化的血清多肽抗体、PBS 缓冲液。本发明还涉及一种多肽免疫质谱检测方法。所述方法包括如下步骤:将纯化后的血清多肽抗体与适宜的固相载体偶联,然后与多肽标志物抗原发生特异性结合,用洗脱液从载体上分离出抗原,最后用高通量的基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOFMS) 检测洗脱液中多肽抗原,由此建立完整的免疫质谱检测方法。



1. 一种用于检测多肽标志物抗原的多肽免疫检测试剂盒,其特征在于,包括血清多肽抗体和缓冲液,所述抗体固定在固相载体上,所述固相载体为包被蛋白 G 或蛋白 A 的琼脂糖颗粒。

2. 根据权利要求 1 所述的多肽免疫检测试剂盒,其特征在于,所述血清多肽抗体为抗合成肽 5 抗体,所述合成多肽 5 的全长序列为:Asn-Leu-Gly-His-Gly-His-Lys-His-Glu-Arg-Asp-Gln-Gly-His-Gly-His-Gln。

3. 根据权利要求 2 所述的多肽免疫检测试剂盒,其特征在于,所述抗合成肽 5 抗体按照如下步骤制备:

1) 采用偶联载体蛋白 KLH 的合成多肽 5 作为免疫原免疫 BALB/C 小鼠;

2) 2-3 周后检测尾血滴度,取 BALB/C 小鼠脾细胞与 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞在 PEG 作用下进行融合;

3) 通过 ELISA 方法进行筛选,用有限稀释法对分泌抗体阳性的杂交瘤细胞进行克隆纯化;

4) 选出针对偶联载体蛋白 KLH 的多肽杂交瘤细胞,扩增细胞系,制备并纯化单抗腹水,检测单抗的滴度、特异性、敏感性及亚型鉴定,得到抗合成肽 5 抗体。

4. 权利要求 1-3 任一项所述的多肽免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:将纯化后的所述血清多肽抗体与所述固相载体按比例混合,所得浓度为  $0.15 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ - $1.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,在  $4^{\circ}\text{C}$  旋转孵育 15 分钟-2 小时,放置 1-5min 沉淀,过滤,用  $0.01\text{mol/L}$ 、 $\text{pH}7.4$  的 PBS 缓冲液  $100$ - $200 \mu\text{L}$  清洗所述固相载体 2-5 次,得到所述多肽免疫检测试剂盒。

5. 一种多肽免疫质谱检测方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:用权利要求 1-3 任一项所述的试剂盒从血清样品中分离多肽标志物抗原,用高通量的 MALDI-TOF MS 检测洗脱液中的所述多肽标志物抗原,由此建立完整的多肽免疫质谱检测方法。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于,所述分离方法为将所述试剂盒中的抗体与血清样品中的多肽标志物抗原发生特异性结合,用洗脱液从所述固相载体上分离出所述多肽标志物抗原。

7. 根据权利要求 6 所述的方法,其特征在于,所述血清多肽抗体为抗合成肽 5 抗体,所述多肽标志物抗原为合成肽 5,所述固相载体为包被蛋白 G 或蛋白 A 的琼脂糖颗粒。

8. 根据权利要求 5-7 任一项所述的方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 取  $15$ - $25 \mu\text{L}$  固相载体,置于 Eppendorf 管中,加入  $1.56 \mu\text{g}$ - $31.1 \mu\text{g}$  抗体, $4^{\circ}\text{C}$  旋转混合 15 分钟-2 小时,放置 1-5min,移出上清液,用  $0.01\text{M}$ 、 $\text{pH}7.4$  PBS 缓冲液  $100$ - $200 \mu\text{L}$  清洗所得固相载体沉淀 2-5 次;

2) 取  $0.48 \mu\text{g}$ - $24 \mu\text{g}$  多肽标准品、 $10$ - $50 \mu\text{L}$  PBS,与步骤 1) 清洗后的所述固相载体混合, $4^{\circ}\text{C}$  旋转混合 8-12h;

3) 放置 1-5min,移出上清液,用  $100$ - $200 \mu\text{L}$  PBS 清洗沉淀 2-5 次;最后一次清洗时将其悬浮液移至另一干净 Eppendorf 管中;

4) 加入  $5$ - $10 \mu\text{L}$  洗脱液,吸排混合 1-5min;

5) 离心,取上清液,用 MALDI-TOF-MS 检测,得到多肽标准品质谱;

6) 用  $40$ - $60 \mu\text{L}$  血清样品替代步骤 2) 的多肽标准品,重复步骤 2)-5),用 MALDI-TOF-MS 检测,测定血清样品中的多肽标志物抗原。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其特征在于,所述洗脱液为 pH2.7 的 0.1mol/l 甘氨酸-HCl 溶液,优选地为 5%乙酸,更优选地为含 0.1% TFA 的 50% ACN 的混合液,更优选地为含 0.1% TFA 的 70% ACN 的混合液。

10. 根据权利要求 8 或 9 所述的方法,其特征在于,步骤 5) 所述检测条件为正离子检测模式,离子源加速电压为 20kV, N<sub>2</sub> 激光器,激光波长 337nm,能量 2000,离子延迟提取时间 390ns,质谱信号单次扫描累加 2000 次,使用 peptide II standard kit 离子峰校正,质量扫描范围 500-5000Da。

## 一种多肽免疫试剂盒及其检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种多肽免疫试剂盒及其检测方法。

### 背景技术

[0002] 随着肝癌外科的成熟和发展,肝癌的治疗方法和手段日渐丰富,而不再局限于单一的手术治疗。肝切除术和肝移植仍然是肝癌患者治疗的主要方法,但微创治疗、经皮肝动脉化疗栓塞等技术方法,作为手术治疗的重要补充,也得到了较广泛的应用,它们在为患者创造手术治疗机会、降低或减少肿瘤的复发和转移等方面都起到了一定的作用,延长了患者的生存时间。虽然如此,肝癌患者发病隐匿、无明显症状、多数患者就诊时已失去手术根治的机会。因此,“早期发现、早期诊断、早期治疗”是降低癌症死亡率的重要措施。筛选和建立用于癌症早期诊断的、高敏感、高特异的血清学诊断技术,提供癌症早期预警普查,具有重大意义和巨大市场前景。

[0003] 目前国内外广泛采用检测血清中甲胎蛋白 (AFP) 来确诊肝癌 (HCC),尽管这种方法提高了 HCC 的检测水平,但仍有显著数量患者的甲胎蛋白并未升高,尤其对肿瘤直径小于 3CM 的小肝癌患者,其敏感性及特异性更低。近年来,标志物联检在肿瘤诊断中的应用的研究得到很大的重视。如通过联检甲胎蛋白 (AFP)、癌胚抗原 (CEA)、血清铁蛋白 (SF)、 $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶 (AFU) 可显著提高肝癌诊断的阳性率。AFP、CEA、SF、CA 等四标志物联检原发性肝癌的实验也获得不错的结果。但由于诊断特异性或成本效益方面的原因,很难在肝癌普查中广泛应用。

[0004] 血清中丰富的多肽资源在目前重大疾病诊断中扮演重要的角色。采用目前常规的临床手段进行多肽检测逐渐引起学术界和医药界的高度重视,基于多肽的肿瘤诊断技术正开始向临床应用高速发展,肿瘤的早期预警技术也在开发之中,一些多肽的联合应用有可能为肿瘤等重大疾病的预警提供革新性的突破。血清中多肽同血清中蛋白不同,其分子量低于 10000Da,结构简单,变化多样。是否能够采用目前常规的临床手段进行检测仍在探索。

[0005] 目前,检测血清中多肽进行临床诊断还没有先例。血清多肽能否用于诊断或早期诊断肝癌可以从三个方面来判断。1、血清多肽是血清蛋白的降解产物或基因直接编码产物。当生理状态发生变化时尤其向肿瘤转化时,蛋白的代谢发生变化,导致多肽相应变化,从而建立了多肽——疾病的相关关系,因此,多肽可以像蛋白一样进行疾病诊断。2、实践上已经有一些疾病的诊断采用多肽标志物,1985 年以来,利用合成多肽检测艾滋病病毒 (P24)、风疹病毒、人巨细胞病毒及类风湿等已应用到临床。3、文献表明,多肽可以用于临床诊断,如, *Clinical Chemistry* 51:10,1933-1945(2005) 和 *Clinical Chemistry* 53:61, 067-1074(2007) 认为血清多肽标志物能更精确的区分蛋白标志物不能区分的肿瘤。 *Nat Methods*. 2008Jan ;5(1) :57-9 认为质谱诊断肿瘤甚至比 MRI 还好。质谱技术给生命科学带来的促进作用举世公认,近十年来,质谱在新生二筛查、基因突变检测方面取得一系列重要进展,并出现了单核苷酸多态性 (SNP) 分析专业质谱仪器,显示了质谱在临床诊断方面的价值。

[0006] 基于血清多肽抗原的肿瘤早期诊断试剂盒是当前最受关注的肿瘤早期诊断技术之一。目前临床领域中单一标志物始终存在着特异性不强、阳性率较低等不足,特别是对早期肿瘤的检测率不高,多标志联合检测势在必行,但苦于没有一个很好的手段实现同时检测。2006年 Josep Villanueva 等人对 32 例前列腺癌、21 例乳腺癌和 20 例膀胱癌血清多肽研究,发现 14 个、10 个和 58 个可分别作为前列腺癌、乳腺癌和膀胱癌的肿瘤标志多肽,预测准确率为 100%。血清中存在的丰富的多肽为肿瘤预警和早期诊断提供了丰富的标志物资源,这些多肽的联合应用有可能为肿瘤等重大疾病的预警提供革新性突破。

[0007] 近几年兴起的血清多肽组学已成功应用于几种癌的诊断研究,如乳腺癌,卵巢癌,前列腺癌等,主要采用的是表面增强激光解吸离子化 (SELDI) 技术和免疫磁珠技术,但该体系存在价格昂贵,不利推广的缺点。但是,目前还没有见肝癌早期诊断用试剂盒,其主要原因是缺少合适的候选靶标和合适的检测方法,这需要强大的基础研究支持。

### 发明内容

[0008] 为了解决上述技术问题,本发明提供一种用于检测多肽标志物抗原的多肽免疫检测试剂盒,包括血清多肽抗体和缓冲液,所述抗体固定在固相载体上,所述固相载体为包被蛋白 G (Protein G) 或蛋白 A (Protein A) 的琼脂糖颗粒。

[0009] 其中,所述血清多肽抗体优选地为抗合成肽 5 抗体,所述合成多肽 5 的全长序列为:Asn-Leu-Gly-His-Gly-His-Lys-His-Glu-Arg-Asp-Gln-Gly-His-Gly-His-Gln。所述缓冲液优选地为 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 缓冲液。

[0010] 本发明选用的包被蛋白 G 或蛋白 A 的琼脂糖颗粒 (Protein G Agarose/Protein A Agarose) 是免疫沉淀的基质,与包被蛋白 G 或蛋白 A 的磁珠 (Protein G magnetic beads/Protein A magnetic beads) 相比,更具成本低的优点。本发明优选的抗合成肽 5 抗体按照如下步骤制备:

[0011] 1) 采用偶联载体蛋白 KLH (匙孔血蓝蛋白) 的合成肽 5 作为免疫原免疫 BALB/C 小鼠;

[0012] 2) 2-3 周后检测尾血滴度,达到 1 : 1000 以上后,取 BALB/C 小鼠脾细胞与 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞在 PEG 作用下进行融合;

[0013] 3) 通过 ELISA 方法进行筛选,用有限稀释法对分泌抗体阳性的杂交瘤细胞进行克隆纯化;

[0014] 4) 选出针对合成肽 5 的杂交瘤细胞,扩增细胞系,制备并纯化单抗腹水,检测单抗的滴度、特异性、敏感性、亚型鉴定等,得到抗合成肽 5 抗体。

[0015] 本发明还提供所述多肽免疫检测试剂盒的制备方法,该方法包括如下步骤:将纯化后的所述血清多肽抗体与所述固相载体按比例混合,所得浓度为 0.15 μg/μL-1.5 μg/μL,在 4℃ 旋转孵育 15 分钟-2 小时,放置 1-5min,沉淀,移出上清液,用 100-200 μL PBS 缓冲液 (0.01mol/L、pH7.4) 清洗所述固相载体 2-5 次,得到所述多肽免疫检测试剂盒。

[0016] 本发明还提供一种多肽免疫质谱检测方法,该方法包括如下步骤:所述多肽免疫检测试剂盒从血清样品中分离多肽标志物抗原,用高通量的 MALDI-TOF MS 检测洗脱液中的所述多肽标志物抗原,由此建立完整的多肽免疫质谱检测方法。

[0017] 其中,所述分离方法为将所述试剂盒中的抗体与血清样品中的多肽标志物抗原发

生特异性结合,用洗脱液从所述固相载体上分离出所述多肽标志物抗原。

[0018] 所述血清多肽抗体优选地为抗合成肽 5 抗体。

[0019] 所述多肽标志物抗原优选地为合成肽 5。该合成多肽 5 的全长序列为 :Asn-Leu-Gly-His-Gly-His-Lys-His-Glu-Arg-Asp-Gln-Gly-His-Gly-His-Gln。

[0020] 所述固相载体为包被蛋白 G 或蛋白 A 的琼脂糖颗粒。

[0021] 具体地,所述多肽免疫质谱检测方法包括如下步骤:

[0022] 1) 结合:抗体与琼脂糖颗粒以共价键相互结合;

[0023] 2) 孵育:将样品与结合了抗体的琼脂糖颗粒进行孵育;

[0024] 3) 清洗:经过孵育,使得待分析物结合到抗体上,并清洗琼脂糖,洗掉不与抗体结合的杂质;

[0025] 4) 洗脱:用洗脱液将待分析物洗脱下来;

[0026] 5) 检测:用 MALDI-TOF MS 检测,并对数据进行分析。

[0027] 优选地,所述多肽免疫质谱检测方法包括如下步骤:

[0028] 1) 取 15-25  $\mu$ l 固相载体,置于 Eppendorf 管中,加入 1.56  $\mu$ g-31.1  $\mu$ g 抗体,4 $^{\circ}$ C 旋转混合 15 分钟-2 小时,放置 1-5min,移出上清液,用 0.01M、pH7.4PBS 缓冲液 100-200  $\mu$ l 清洗所得固相载体沉淀 2-5 次;

[0029] 2) 取 0.48  $\mu$ g-24  $\mu$ g 多肽标准品、10-50  $\mu$ l PBS,与步骤 1) 清洗后的所述固相载体混合,4 $^{\circ}$ C 旋转混合 8-12h;

[0030] 3) 放置 1-5min,移出上清液,用 100-200  $\mu$ l PBS 清洗沉淀 2-5 次;最后一次清洗时将其悬浮液移至另一干净 Eppendorf 管中;以避免抗原非特异附着在管壁,降低检测本底值;

[0031] 4) 加入 5-10  $\mu$ l 洗脱液,吸排混合 1-5min;

[0032] 5) 离心,取上清液,用 MALDI-TOF-MS 检测,得到多肽标准品质谱;

[0033] 6) 用 40-60  $\mu$ l 血清样品替代步骤 2) 的多肽标准品,重复步骤 2)-5),用 MALDI-TOF-MS 检测,测定血清样品中的多肽标志物抗原。

[0034] 其中,所述洗脱液为 pH 2.7 的 0.1mol/l 甘氨酸-HCl 溶液,优选地为 5%乙酸,更优选地为含 0.1% TFA(三氟乙酸)的 50% ACN(乙腈)的混合液,更优选地为含 0.1% TFA 的 70% ACN 的混合液。

[0035] 步骤 5) 所述检测条件为正离子检测模式,离子源加速电压为 20kV, N<sub>2</sub> 激光器,激光波长 337nm,能量 2000,离子延迟提取时间(Pulse ion extraction,PIE)390ns,质谱信号单次扫描累加 2000 次,使用 peptide II standard kit(Bruker) 离子峰校正(m/z 700-m/z 3500),质量扫描范围 500-5000Da。

[0036] 本发明多肽免疫质谱检测方法操作简单,主要包括抗体固相化、多肽抗原孵育结合和质谱检测三个方面,即将包被蛋白 G 或蛋白 A 的琼脂糖颗粒与抗体混合孵育,抗体与蛋白 G 或蛋白 A 亲和结合后固相化,清洗,加入多肽抗原孵育,抗原与抗体特异性结合,清洗,洗脱液分离抗原, MALDI-TOF MS 检测。

[0037] 有益效果

[0038] 1. 本发明所涉及的抗体针对多肽标志物抗原的特异性强;

[0039] 2. 本发明选用的四种洗脱液洗脱能力均很强、利于质谱检测;

[0040] 3. 采用高通量、高灵敏度、高精确定度的 MALDI-TOF MS 质谱检测。

[0041] 4. 本发明所选多肽标志物的基础数据全部来自临床样本的结果,这就彻底避免基础研究中大量存在的生物模型与实际人群之间的巨大差异,这些差异是导致巨大假阳性的根源之一。

[0042] 5. 免疫质谱技术是肿瘤早期诊断的一种全新思路,比正电子成像 (Positron Emission Tomography and Computer Tomography, PET-CT) 和鹰眼更有优势。质谱具有高准确度、高灵敏度、低假阳性等许多优势,不仅可以诊断肿瘤,很关键的是能检测肿瘤早期极其微量的多肽标志物的变化,从而实现真正意义上的早期诊断。此外它比 PET-CT 和鹰眼价格便宜。

[0043] 本发明将血清多肽肿瘤早期诊断试剂盒与先进的质谱技术联合,可以同时检测多个生物标志群,是验证血清标志物和应用于临床检测的理想工具。

[0044] 本发明的主要创新点体现在:

[0045] 1. 基于肝癌血清多肽的免疫磁珠质谱诊断试剂盒是诊断技术的前沿之一。本发明将常规免疫测试技术和最先进的质谱测试技术有机结合起来,充分利用两技术高特异性、高通量、高准确性、高灵敏性优势,开发出混合型多靶标肿瘤血清多肽免疫制备早期诊断试剂盒,是诊断技术的最新前沿。

[0046] 2. 多靶点诊断试剂盒代表当前最新思路。本发明是一种多靶标诊断技术,制备基于多种血清多肽抗原的肿瘤诊断试剂盒,具有免疫质谱联合检测多种标志物的检测功能,切实提高诊断的特异性和灵敏度,是当前临床早期诊断的最新思路。

[0047] 3. 本发明技术是分子水平的诊断,与肿瘤影像学相比预警能力强、成本低。

#### 附图说明

[0048] 图 1 为本发明的多肽免疫质谱检测方法示意图;

[0049] 图 2 为本发明一个实施方案中检测合成肽 5 标准品的质谱图;

[0050] 图 3 为本发明另一个实施方案中检测合成肽 5 标准品的质谱图;

[0051] 图 4 为本发明另一个实施方案中检测样品中合成肽 5 的质谱图。

#### 具体实施方式

[0052] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0053] 实施例 1 抗合成肽 5 抗体的制备方法

[0054] 1) 采用偶联载体蛋白 KLH 的合成多肽 5 作为免疫原免疫 BALB/C 小鼠;其全长序列为:Asn-Leu-Gly-His-Gly-His-Lys-His-Glu-Arg-Asp-Gln-Gly-His-Gly-His-Gln。

[0055] 2) 2 周后检测尾血滴度,达到 1 : 1000 以上后,取 BALB/C 小鼠脾细胞与 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞在 PEG 作用下进行融合;

[0056] 3) 通过 ELISA 方法进行筛选,用有限稀释法对分泌抗体阳性的杂交瘤细胞进行克隆纯化;

[0057] 4) 选出针对合成肽 5 的杂交瘤细胞,扩增细胞系,制备并纯化单抗腹水,检测单抗的滴度、特异性、敏感性、亚型鉴定等,得到抗合成肽 5 抗体。

[0058] 实施例 2 多肽免疫检测试剂盒的制备方法

[0059] 取 20  $\mu$ l 包被蛋白 G 的琼脂糖颗粒 (Protein G Agarose, Santa Cruz), 置于 0.2mL Eppendorf 管中, 加入 7.78  $\mu$ g 抗合成肽 5 抗体, 4 $^{\circ}$ C 旋转 (转速 5r/min), 混合 1 小时, 放置 2 分钟, 移出上清液, 用 100  $\mu$ L PBS 缓冲液 (0.01mol/l、pH7.4) 清洗所得固相载体沉淀 3 次。

[0060] 实施例 3 多肽免疫检测试剂盒的制备方法

[0061] 取 15  $\mu$ l 包被蛋白 G 的琼脂糖颗粒 (Protein G Agarose, Santa Cruz), 置于 0.2mL Eppendorf 管中, 加入 1.56  $\mu$ g 抗合成肽 5 抗体, 4 $^{\circ}$ C 旋转 (转速 5r/min), 混合 15 分钟, 放置 1 分钟, 移出上清液, 用 100  $\mu$ L PBS 缓冲液 (0.01mol/l、pH7.4) 清洗所得固相载体沉淀 3 次。

[0062] 实施例 4 多肽免疫检测试剂盒的制备方法

[0063] 取 25  $\mu$ l 包被蛋白 A 的琼脂糖颗粒 (Protein A Agarose, Santa Cruz), 置于 0.6mL Eppendorf 管中, 加入 31.1  $\mu$ g 抗合成肽 5 抗体, 4 $^{\circ}$ C 旋转 (转速 5r/min), 混合 2 小时, 放置 5 分钟, 移出上清液, 用 100  $\mu$ L PBS 缓冲液 (0.01mol/l、pH7.4) 清洗所得固相载体沉淀 5 次。

[0064] 实施例 5 多肽免疫质谱检测方法

[0065] 本发明的多肽免疫质谱检测方法的流程如图 1 所示。具体为：

[0066] 1) 取 25  $\mu$ L 包被蛋白 G 的琼脂糖颗粒 (Protein G Agarose, Santa Cruz), 置于 0.6mL Eppendorf 管中, 加入 7.78  $\mu$ g 抗合成肽 5 抗体, 4 $^{\circ}$ C 旋转 (转速 5r/min), 混合 1 小时, 放置 3min, 移出上清液, 用 100  $\mu$ L PBS 缓冲液 (0.01mol/l、pH7.4) 清洗 Protein G Agarose 3 次；

[0067] 2) 取 24  $\mu$ g 合成肽 5 的多肽标准品 (固相化学合成, 北京中科亚光生物科技有限公司)、50  $\mu$ L PBS, 与清洗后的 Protein G Agarose 混合, 4 $^{\circ}$ C 旋转混合 8h；

[0068] 3) 放置 3min, 移出上清液, 用 200  $\mu$ L PBS 清洗 Protein G Agarose 3 次；最后一次清洗时将其悬浮液移至另一干净 Eppendorf 管中；

[0069] 4) 加入 5  $\mu$ L 含有 0.1% TFA 的 70% ACN 的洗脱液, 吸排混合 5min；

[0070] 5) 离心, 取上清液, 用 MALDI-TOF-MS 检测, 检测图谱如图 2 所示, 多肽标准品峰明显, 与理论偏差小于 0.1Da。

[0071] 其中, 检测条件为正离子检测模式, 离子源加速电压为 20kV,  $N_2$  激光器, 激光波长 337nm, 能量 2000, 离子延迟提取时间 (Pulse ion extraction, PIE) 390ns, 质谱信号单次扫描累加 2000 次, 使用 peptide II standard kit (Bruker) 离子峰校正 (m/z 700-m/z 3500), 质量扫描范围 500 ~ 5000Da。

[0072] 结果表明, 经本发明的方法检测合成肽 5 标准品, 得到的 MALDI-TOF MS 质谱图具有分辨率高、特异性强的特点。

[0073] 实施例 6 多肽免疫质谱检测方法

[0074] 本发明的多肽免疫质谱检测方法的流程如图 1 所示。具体为：

[0075] 1) 取 15  $\mu$ L 包被蛋白 G 的琼脂糖颗粒 (Protein G Agarose, Santa Cruz), 置于 0.2mL Eppendorf 管中, 加入 1.56  $\mu$ g 抗合成肽 5 抗体, 4 $^{\circ}$ C 旋转 (转速 5r/min), 混合 15 分钟, 放置 2min, 移出上清液, 用 100  $\mu$ L PBS 缓冲液 (0.01mol/l、pH7.4) 清洗 Protein G Agarose 3 次；

[0076] 2) 取 24  $\mu$ g 合成肽 5 多肽标准品 (固相化学合成, 北京中科亚光生物科技有限公

司)、50  $\mu$  L PBS,与清洗后的 Protein G Agarose 混合,4 $^{\circ}$ C 旋转混合 8h;

[0077] 3) 放置 2min,移出上清液,用 200  $\mu$  L PBS 清洗 Protein G Agarose 3 次;最后一次清洗时将其悬浮液移至另一干净 Eppendorf 管中;

[0078] 4) 加入 5  $\mu$  L 5% 乙酸洗脱液,吸排混合 3min;

[0079] 5) 离心,取上清液,用 MALDI-TOF-MS 检测,检测图谱如图 3 所示,多肽标准品峰明显,与理论偏差小于 0.1Da。

[0080] 其中,检测条件为正离子检测模式,离子源加速电压为 20kV,  $N_2$  激光器,激光波长 337nm,能量 2000,离子延迟提取时间 (Pulse ionextraction, PIE) 390ns,质谱信号单次扫描累加 2000 次,使用 peptideII standard kit (Bruker) 离子峰校正 ( $m/z$  700- $m/z$  3500),质量扫描范围 500 ~ 5000Da。

[0081] 实施例 7 多肽免疫质谱检测方法

[0082] 本发明的多肽免疫质谱检测方法的流程如图 1 所示。具体为:

[0083] 1) 取 20  $\mu$  L 包被蛋白 G 的琼脂糖颗粒 (Protein G Agarose, SantaCruz),置于 0.2mL Eppendorf 管中,加入 7.78  $\mu$  g 抗合成肽 5 抗体,4 $^{\circ}$ C 旋转 (转速 5r/min),混合 1 小时,放置 3min,移出上清液,用 100  $\mu$  L PBS 缓冲液 (0.01mol/L, pH7.4) 清洗 Protein G Agarose 3 次;

[0084] 2) 取 50  $\mu$  L 临床确诊的肝癌血清、50  $\mu$  L PBS,与清洗后的 Protein G Agarose 混合,4 $^{\circ}$ C 旋转混合 8h;

[0085] 3) 放置 3min,移出上清液,用 200  $\mu$  L PBS 清洗 Protein G Agarose 3 次;最后一次清洗时将其悬浮液移至另一干净 Eppendorf 管中;

[0086] 4) 加入 5  $\mu$  L 含有 0.1% TFA 的 70% ACN 的洗脱液,吸排混合 3min;

[0087] 5) 离心,取上清液,用 MALDI-TOF-MS 检测,检测图谱如图 4 所示,多肽标志物峰值与理论偏差小于 0.2Da。谱图中杂峰较少,显示出目标峰有较高特异性。

[0088] 6) 另取 50  $\mu$  L 临床确诊的肝癌血清 50 份,按上述同法平行操作,用 MALDI-TOF-MS 检测,所得图谱与图 4 相似,其中杂峰较少,显示出目标峰有较高特异性,说明本发明的方法特异性很强、重复性好。

[0089] 其中,检测条件为正离子检测模式,离子源加速电压为 20kV,  $N_2$  激光器,激光波长 337nm,能量 2000,离子延迟提取时间 (Pulse ionextraction, PIE) 390ns,质谱信号单次扫描累加 2000 次,使用 peptideII standard kit (Bruker) 离子峰校正 ( $m/z$  700- $m/z$  3500),质量扫描范围 500 ~ 5000Da。



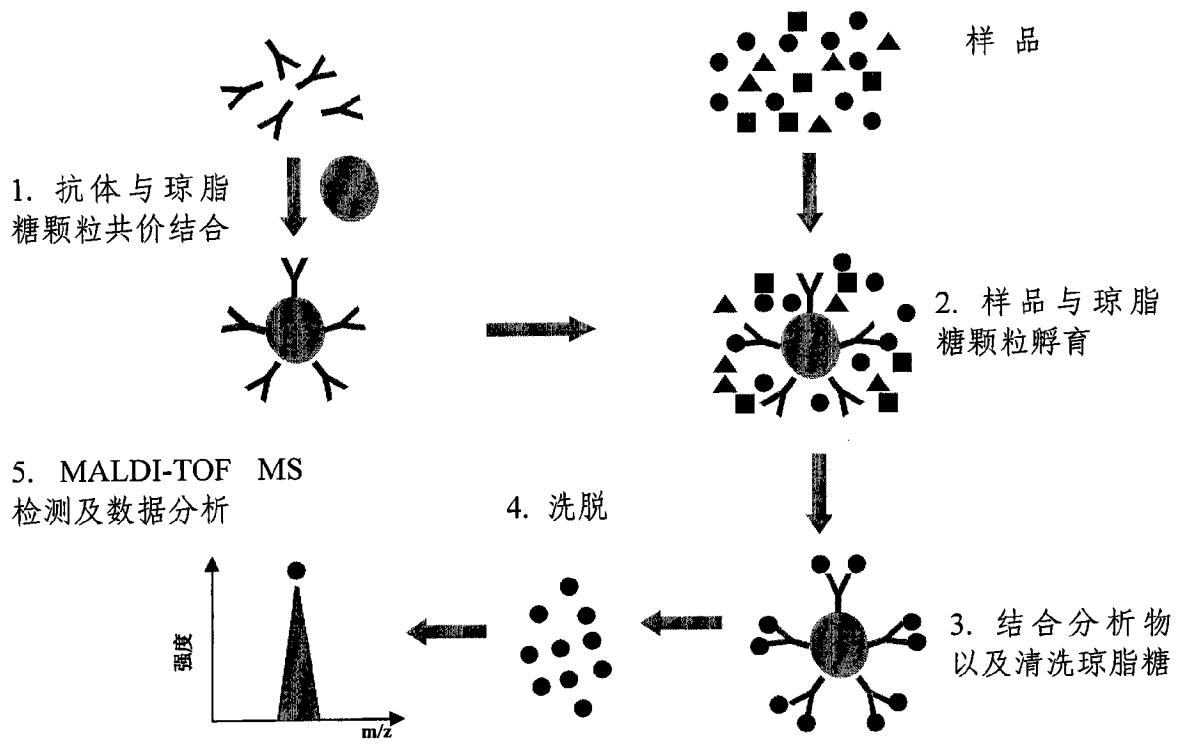


图 1

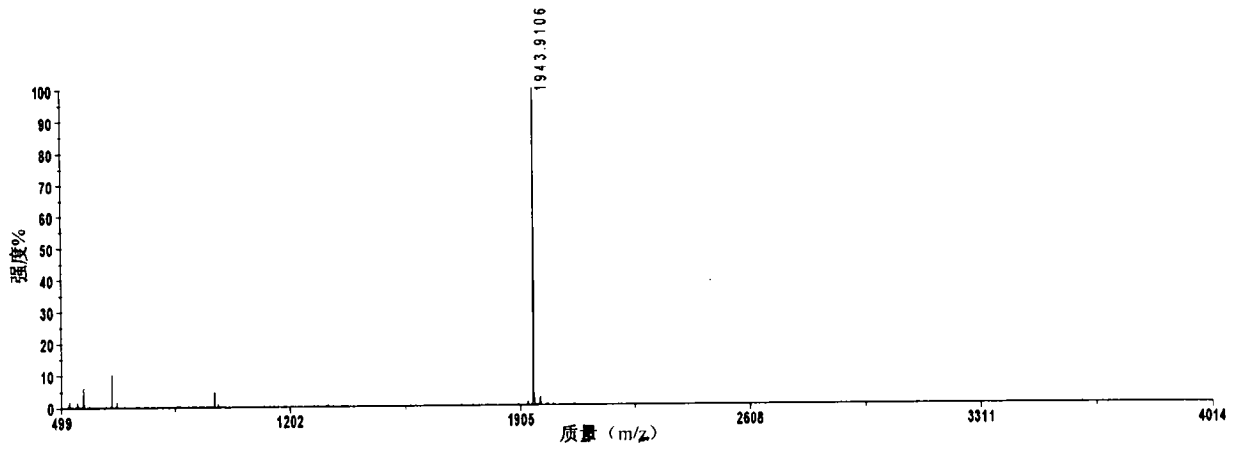


图 2

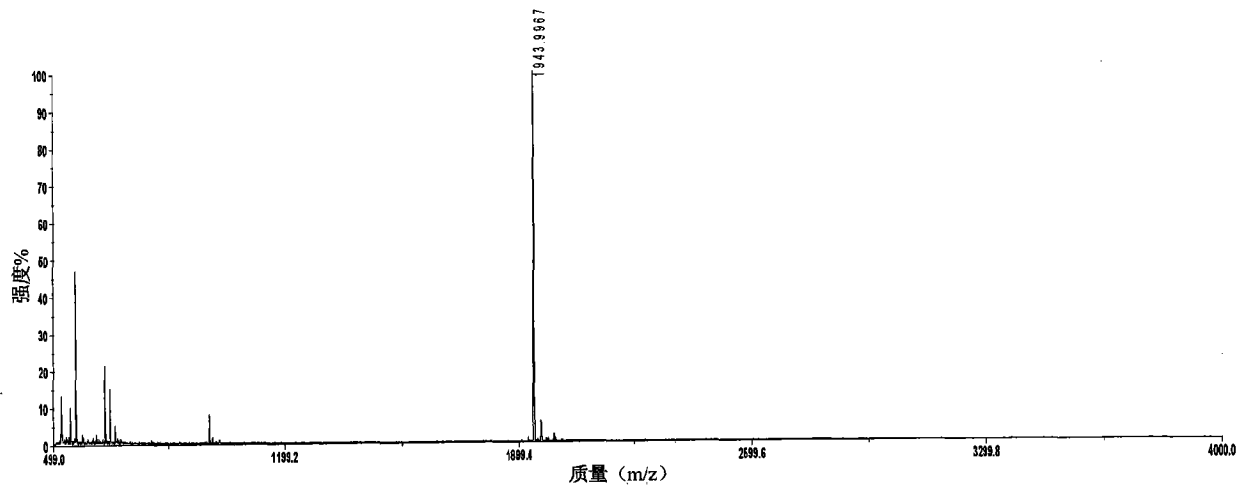


图 3

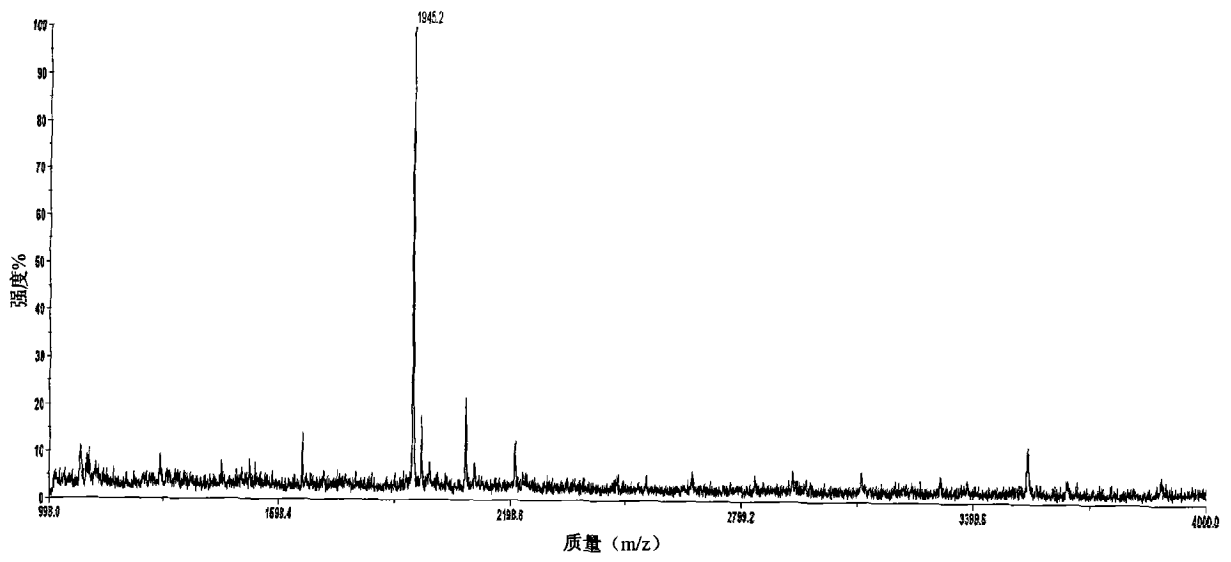


图 4

专利名称(译)	一种多肽免疫试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102062780A</a>	公开(公告)日	2011-05-18
申请号	CN201010561173.2	申请日	2010-11-23
[标]申请(专利权)人(译)	北京正旦国际科技有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	北京正旦国际科技有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京正旦国际科技有限责任公司		
[标]发明人	魏开华 原剑 孙云波 周晓明 杨保安 甄蓓 张拓 张馨月 王东茂		
发明人	魏开华 原剑 孙云波 周晓明 杨保安 甄蓓 张拓 张馨月 王东茂		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/531 G01N27/62 C07K7/08 C07K16/18		
代理人(译)	张庆敏		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种多肽免疫检测试剂盒，所述试剂盒包括：作为固相载体的包被蛋白G或蛋白A的琼脂糖颗粒、纯化的血清多肽抗体、PBS缓冲液。本发明还涉及一种多肽免疫质谱检测方法。所述方法包括如下步骤：将纯化后的血清多肽抗体与适宜的固相载体偶联，然后与多肽标志物抗原发生特异性结合，用洗脱液从载体上分离出抗原，最后用高通量的基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOFMS)检测洗脱液中多肽抗原，由此建立完整的免疫质谱检测方法。

