



(21)申请号 201911088542.8

(22)申请日 2019.11.08

(71)申请人 江苏大学

地址 212013 江苏省镇江市京口区学府路  
301号

(72)发明人 屠志刚 孙丹琳 谢旺旺 刘晗青

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

G01N 33/541(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

权利要求书1页 说明书12页  
序列表3页 附图2页

(54)发明名称

一种BRCA2蛋白酶联免疫双抗夹心试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种BRCA2蛋白酶联免疫双抗夹心试剂盒及其应用。发明通过蛋白酶联免疫双抗体夹心法试剂盒检测组织样本中的BRCA2表达量,检测的灵敏度、准确度高,精密度好,批间变异系数为6.22%,其最低检测浓度为0.1 pg/ $\mu$ l。本发明试剂盒中以BRCA2(348~473AA)肽段和BRCA2(1137~1255AA)肽段为免疫原制备单克隆抗体,特异性结合BRCA2蛋白;本发明所涉及的检测方法简单,易操作,检测成本低,对操作者要求低。

1. 一种BRCA2蛋白酶联免疫双抗夹心试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含特异性结合BRCA2蛋白第348~473AA肽段的包被酶标板抗体和特异性结合BRCA2蛋白第1137~1255AA肽段的检测抗体。

2. 根据权利要求1所述的BRCA2蛋白酶联免疫双抗夹心试剂盒,其特征在于,所述包被酶标板抗体的重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,其轻链可变区序列氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

3. 根据权利要求1所述的BRCA2蛋白酶联免疫双抗夹心试剂盒,其特征在于,所述检测抗体的重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,其轻链可变区序列氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。

4. 根据权利要求1所述的BRCA2蛋白酶联免疫双抗夹心试剂盒,其特征在于,所述酶标板抗体的浓度为1~2 $\mu$ g/mL。

5. 根据权利要求1所述的BRCA2蛋白酶联免疫双抗夹心试剂盒,其特征在于,所述检测抗体的浓度为1~2 $\mu$ g/mL。

6. 权利要求1~5任意一项所述的BRCA2蛋白酶联免疫双抗夹心试剂盒在BRCA2抗原的免疫检测中的应用。

7. 一种检测BRCA2蛋白的单克隆抗体,其特征在于,特异性结合BRCA2蛋白第348~473AA肽段,其重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,其轻链可变区序列氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

8. 一种检测BRCA2蛋白的单克隆抗体,其特征在于,特异性结合BRCA2蛋白第1137~1255AA肽段,其重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,其轻链可变区序列氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。

## 一种BRCA2蛋白酶联免疫双抗夹心试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种BRCA2蛋白酶联免疫双抗夹心试剂盒及其应用。

### 背景技术

[0002] 卵巢癌是最致命的一种妇科癌症,患者五年生存率仅有30%。由于卵巢癌异质性强,病理学机制复杂,常规化疗药物仅能使部分患者的病情较好缓解,且停药后多数患者会经历复发,长期化疗可使癌细胞产生耐药性。因此,寻找新的卵巢癌治疗方法和策略尤为重要。在中国,随着经济的发展和人民生活水平的提高,卵巢癌的发病率正呈上升趋势,因此如何进行卵巢癌的早期预防、早期诊断、早期治疗已经成为卵巢肿瘤研究中的重要研究方向。

[0003] 大量研究显示卵巢癌的发生是环境因素和遗传因素共同作用的结果,部分卵巢癌的发生有一定的家族遗传倾向。有些卵巢癌是因为患者自身携带有显性遗传并且是高外显率的卵巢癌易感基因突变所致,这些易感基因主要包括BRCA2 (GenBank:675)、BRCA1、p53、PTEN、ATM等,其中BRCA2和BRCA1基因的突变最为常见,携带者两个基因致病性突变的女性发生卵巢癌的风险较普通人群明显升高。携带BRCA2基因致病性突变的女性的卵巢癌风险要高得多。

[0004] 随着人们对卵巢癌认知的不断加深,以及预防手段不断改进,来自卵巢癌高危家庭的女性越来越多地被推荐进行易感基因的检测,以此来评估其患卵巢癌的风险,对其准确、快速的检测对卵巢癌的早期诊断、早期预防的意义十分关键,故急需建立一种简便、高效、可用于对常见样本如血清、体液、组织液等的高通量快速检测的试剂盒和方法。

### 发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明为解决现有技术中存在的问题,提供了一种BRCA2蛋白酶联免疫双抗夹心试剂盒及其应用。本发明所述的BRCA2蛋白酶联免疫双抗夹心试剂盒简便快捷、安全、经济。

[0006] 为实现上述目的,本发明具体技术方案如下:

[0007] 在某一具体实施方式中,本发明提供了一种BRCA2蛋白酶联免疫双抗夹心试剂盒,所述试剂盒包含特异性结合BRCA2蛋白第348~473AA肽段的包被酶标板抗体和特异性结合BRCA2蛋白第1137~1255AA肽段的检测抗体。所述包被酶标板抗体的重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,其轻链可变区序列氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示;所述检测抗体的重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,其轻链可变区序列氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。

[0008] 所述包被酶标板抗体的浓度为1~2 $\mu$ g/mL,优选1 $\mu$ g/mL,所述检测抗体的浓度为1~2 $\mu$ g/mL,优选1 $\mu$ g/mL。

[0009] 本发明还提供了所述的BRCA2蛋白酶联免疫双抗夹心试剂盒在BRCA2抗原的免疫

检测中的应用。

[0010] 在某一具体实施方式中,本发明提供一种检测BRCA2蛋白的单克隆抗体,其特异性结合BRCA2蛋白第348~473AA肽段,重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,其轻链可变区序列氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

[0011] 本发明还提供一种检测BRCA2蛋白的单克隆抗体,其特异性结合BRCA2蛋白第1137~1255AA肽段,其重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,其轻链可变区序列氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。

[0012] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0013] 本发明提供了一种BRCA2蛋白酶联免疫双抗夹心试剂盒,所述的试剂盒含有特异性结合BRCA2蛋白第348~473AA肽段的包被酶标板抗体和特异性结合BRCA2蛋白第1137~1255AA肽段的检测抗体。用来检测组织样本中的BRCA2表达量,检测的灵敏度、准确度高,精密密度好;制备的试剂盒批间变异系数为6.22%,其最低检测浓度为0.1pg/ $\mu$ l。所提供的试剂盒中分别将348~473AA肽段的BRCA2蛋白和1137~1255AA肽段的BRCA2蛋白为免疫原,特异性结合BRCA2蛋白;本发明所涉及的检测方法简单,易操作,检测成本低,对操作者要求低。

## 附图说明

[0014] 图1是重组BRCA2肽段的SDS-PAGE电泳图;

[0015] 图2是纯化后的BRCA2单克隆抗体的SDS-PAGE电泳图;

[0016] 图3是不同稀释度BRCA2单克隆抗体的免疫效价检测结果;

[0017] 图4是BRCA2单克隆抗体的特异性及交叉反应鉴定结果;

[0018] 图5是BRCA2蛋白酶联免疫双抗体夹心法试剂盒的检测标准曲线图。

## 具体实施方式

[0019] 本发明公开了一种BRCA2蛋白酶联免疫双抗夹心试剂盒,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。以下实施例中的方法、设备、材料,如果未进行特别说明,均为本领域常规方法、设备和材料,均可由市场购得。

[0020] 实施例1:抗BRCA2单克隆抗体的制备

[0021] (1) 重组BRCA2肽段的表达与纯化

[0022] 分别构建用来表达BRCA2 (GenBank, Gene ID:675) 多肽片段348~473AA的质粒pET-30a-BRCA2-1和用来表达BRCA2多肽片段1137~1255AA的质粒pET-30a-BRCA2-2,质粒pET-30a-BRCA2-1编码多肽片段的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,质粒pET-30a-BRCA2-2编码多肽片段的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。将质粒pET-30a-BRCA2-1和质粒pET-30a-BRCA2-2分别转化至感受态大肠杆菌BL21,诱导表达重组蛋白,用镍柱(购自Thermo Fisher)纯化蛋白,SDS-PAGE电泳检测重组蛋白的表达。图1是重组BRCA2肽段的SDS-PAGE电泳图,图中,A是BRCA2重组蛋白的348~473AA肽段,B是BRCA2重组蛋白的1137~1255AA肽

段;如图1所示,重组BRCA2片段经纯化能获得较高的纯度,收集蛋白,冻干后进行后续动物免疫。

[0023] (2) BALB/c小鼠的免疫与效价检测

[0024] 所用BALB/c小鼠购自南京大学动物模式研究所。按常规方法进行小鼠免疫。用间接ELISA法检测免疫后小鼠血清效价:

[0025] 将实施例1中纯化后348~473AA肽段的重组蛋白BRCA2片段和1137~1255AA肽段的重组蛋白BRCA2片段免疫BALB/c小鼠。pH9.6, 0.05mol/L的碳酸盐缓冲液将其稀释为1 $\mu$ g/mL后加入96孔酶标板,每孔100 $\mu$ L, 4 $^{\circ}$ C包被过夜,取出包被过夜的酶标板, TBS-T缓冲液洗涤3次后,拍干酶标板, 4 $^{\circ}$ C贮存待用。第二次免疫后1周,从小鼠尾静脉适量采血, 5000g离心15min分离血清,用样本稀释液(含有0.5%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液)将血清按1:100、1:1000、1:10000、1:100000、1:1000000梯度进行稀释,每孔100 $\mu$ L加入待检测酶标板, 37 $^{\circ}$ C, 孵育1h后,经TBS-T缓冲液洗涤3次,拍干酶标板,每孔加入100 $\mu$ L 1:5000稀释后的HRP标记的山羊抗小鼠二抗(购自Jackson ImmunoResearch公司), 37 $^{\circ}$ C孵育30min。取出酶标板,经TBS-T缓冲液洗涤5次后,每孔加入100 $\mu$ L TMB底物显示液, 37 $^{\circ}$ C避光显色10~15min,随后加入50 $\mu$ L终止液终止反应,于酶标仪450nm波长下读取吸光值。选取血清效价达到1:10<sup>5</sup>以上小鼠,进行第三次免疫。

[0026] (3) 杂交瘤细胞的融合、筛选

[0027] 制备饲养层细胞,准备SP2/0骨髓瘤细胞,免疫结束后3~4天后取小鼠脾脏细胞进行细胞融合。融合后的细胞铺板(6块96孔板),利用间接ELISA法筛选生产单克隆抗体的杂交瘤细胞,经过两轮亚克隆,筛选得到分别由重组蛋白BRCA2的348~473AA肽段的和重组蛋白BRCA2的1137~1255AA肽段免疫得到的抗体分泌性最好的杂交瘤细胞株编号为3-5-D7和4-6-C3。

[0028] (4) 抗BRCA2单克隆抗体的生产及纯化。

[0029] 按常规方法制备小鼠单克隆抗体腹水,用蛋白G法对腹水抗体进行纯化,抗体纯度经SDS-PAGE电泳验证。如图2所示,3-5-D7和4-6-C3抗体经洗脱后能获得较高的纯度,其中IgG重链约为55KD, IgG轻链约为25KD。

[0030] 实施例2:单克隆抗体效价测定及特异性

[0031] (1) 单克隆抗体的效价测定:

[0032] 用pH9.6, 0.05mol/L的碳酸盐缓冲液将重组蛋白BRCA2的348~473AA肽段与重组蛋白BRCA2的1137~1255AA肽段分别稀释为1 $\mu$ g/mL,包被酶标板, 100 $\mu$ L/孔, 4 $^{\circ}$ C过夜;用样本稀释液(含有0.5%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液)将上述制备的特异性结合BRCA2蛋白第348~473AA肽段的抗BRCA2单克隆抗体(3-5-D7)和特异性结合BRCA2蛋白第1137~1255AA肽段的抗BRCA2单克隆抗体(4-6-C3)分别按1:10<sup>3</sup>、1:10<sup>4</sup>、1:10<sup>5</sup>、1:10<sup>6</sup>稀释, 100 $\mu$ L/孔, 37 $^{\circ}$ C孵育1h;取出酶标板,经TBS-T洗涤3次,拍干酶标板,每孔加入100 $\mu$ L 1:5000稀释的HRP标记的山羊抗小鼠二抗, 37 $^{\circ}$ C孵育30min;经TBS-T洗涤5次后,每孔加入100 $\mu$ L加入TMB底物显示液, 37 $^{\circ}$ C避光显色10~15min,随后加入50 $\mu$ L终止液终止反应,于酶标仪450nm波长下读取吸光值,图3是不同稀释度BRCA2单克隆抗体的免疫效价检测结果图;如图3所示,纯化后的单克隆抗体的效价均达到1 $\times$ 10<sup>6</sup>。

[0033] (2) 单克隆抗体特异性结合及交叉反应鉴定:

[0034] 用碳酸盐缓冲液将HSP90 (Abcam公司)、HBEGF (PeproTech公司购买)、EGFR (PeproTech公司购买)、HGF (Thermo Fisher公司购买) 蛋白稀释为1 $\mu$ g/mL, 包被酶标板, 并设置空白对照, 空白对照组为1 $\mu$ g/mL BSA蛋白, 用BRCA2单克隆抗体进行间接法ELISA检测, 图4是BRCA2单克隆抗体的特异性及交叉反应鉴定结果; 如图4所示, 抗BRCA2单克隆抗体3-5-D7和4-6-C3与HSP90、HB-EGF、EGFR、HGF蛋白之间均无交叉反应, 表明制备的抗体的特异性较好。

[0035] 实施例3: 单克隆抗体重轻链可变区的测序

[0036] 单克隆细胞长期保存, 可能由于多次传代后不稳定及污染问题导致阳性克隆丢失, 为解决上述问题, 本发明利用分子生物学技术, 对阳性单克隆细胞株利用Mouse Ig-Primer Set试剂盒 (69831, Merck Millipore), 进行重链可变区 (mVH) 和轻链可变区 (mVL) 基因扩增, 并进行序列鉴定。

[0037] 3-5-D7杂交瘤细胞的重链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO:3, 轻链可变区序列氨基酸序列为SEQ ID NO:4; 4-6-C3杂交瘤细胞的重链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO:5, 轻链可变区序列氨基酸序列为SEQ ID NO:6。

[0038] 实施例4: BRCA2酶联免疫双抗夹心法试剂盒的制备

[0039] (1) 辣根过氧化物酶标记的抗体制备

[0040] a. 称取HRP 5mg溶解于1mL 0.2mol/L pH5.6醋酸盐缓冲液中, 加入含1% DNFB的无水乙醇溶液0.1mL, 室温下轻微搅拌1h;

[0041] b. 加入0.5mL新鲜配置的0.1mol/L NaIO<sub>4</sub>溶液, 4℃放置30min, 随后加入5~10mg抗BRCA2单克隆抗体4-6-C3, 利用碳酸盐缓冲液调整pH值至9.0~9.5, 充分混匀, 4℃放置过夜;

[0042] c. 加入0.1mL新鲜配制的4mg/ml NaBH<sub>4</sub>溶液, 混匀, 于4℃放置3h;

[0043] d. 将上述液体装入透析袋中, 于pH7.4, 0.01mol/L的PBS溶液中透析, 4℃过夜;

[0044] e. 收集透析袋中液体, 3000g离心30min, 去除沉淀物, 上清液即为HRP标记的抗BRCA2单克隆抗体4-6-C3。

[0045] (2) 正交试验摸索酶联免疫试剂盒的最佳抗体组合及工作浓度

[0046] 采用正交法摸索最佳抗体使用浓度, 将抗BRCA2单克隆抗体3-5-D7稀释为2 $\mu$ g/mL、1 $\mu$ g/mL、0.5 $\mu$ g/mL和0.25 $\mu$ g/mL, HRP标记的抗BRCA2单克隆抗体4-6-C3稀释为2 $\mu$ g/mL、1 $\mu$ g/mL、0.5 $\mu$ g/mL和0.25 $\mu$ g/mL, 标准品BRCA2 (购自USBiological公司) 浓度为16pg/ $\mu$ L、4pg/ $\mu$ L、0.5pg/ $\mu$ L和0.1pg/ $\mu$ L。表1是正交试验摸索酶联免疫试剂盒的最佳抗体组合及工作浓度结果表, 如表1所示, 在不同浓度的标准蛋白组中, 抗BRCA2单克隆抗体3-5-D7浓度在1 $\mu$ g/mL后检测的吸光度值出现明显减弱趋势, HRP标记的抗BRCA2单克隆抗体4-6-C3浓度在1 $\mu$ g/mL后检测的吸光度值出现明显减弱趋势, 可以确定抗BRCA2单克隆抗体3-5-D7作为包被酶标板抗体的最佳工作浓度为1~2 $\mu$ g/mL, 优选1 $\mu$ g/mL, HRP标记的抗BRCA2单克隆抗体4-6-C3作为检测抗体的最佳工作浓度为1~2 $\mu$ g/mL, 优选1 $\mu$ g/mL。

[0047] 表1. 正交试验摸索酶联免疫试剂盒的最佳抗体组合及工作浓度结果

标准品浓度 (pg/ $\mu$ L)	BRCA2 4-6-C3 鼠 抗浓度 ( $\mu$ g/mL)	BRCA2 3-5-D7 鼠抗浓度 ( $\mu$ g/mL)			
		2	1	0.5	0.25
16.0	2	1.837	1.883	1.337	0.197
	1	1.864	1.895	1.334	0.241
	0.5	1.374	1.497	1.217	0.149
	0.25	1.389	1.412	0.124	0.159
4.0	2	0.485	0.522	0.205	0.165
	1	0.534	0.498	0.106	0.051
	0.5	0.381	0.324	0.038	0.141
	0.25	0.218	0.133	0.045	0.144
0.5	2	0.081	0.084	0.051	0.016
	1	0.091	0.087	0.023	0.035
	0.5	0.054	0.049	0.041	0.044
	0.25	0.033	0.053	0.037	0.040
0.1	2	0.022	0.021	0.016	0.011

[0049]	1	0.024	0.019	0.007	0.001
	0.5	0.005	0.006	0.016	0.015
	0.25	0.014	0.015	0.011	0.004

[0050] (3) BRCA2蛋白酶联免疫试剂盒主要参数的测定

[0051] 对试剂盒的主要参数进行测定,包括试剂盒准确度和精密度,具体方法和结果如下:

[0052] a. 试剂盒的准确度测定

[0053] 通过添加回收实验来检测试剂盒的准确度,向人卵巢组织样本(由江苏大学附属医院提供)中添加重组BRCA2蛋白,所添加的BRCA2蛋白浓度为8pg/ $\mu$ L、4pg/ $\mu$ L、2pg/ $\mu$ L、1pg/ $\mu$ L、0.5pg/ $\mu$ L和0pg/ $\mu$ L,然后用所制备试剂盒对添加后样品进行检测,根据标准曲线计算得到各个样品中的BRCA2蛋白含量,减去空白血清中的BRCA2蛋白含量即得到所测定的BRCA2蛋白含量,除以理论添加的蛋白量即为添加回收率。

[0054] 结果见表2,结果显示添加回收率为95%–103%,说明所制备试剂盒的准确度良好,血清基质对检测无明显干扰。

[0055] 表2. BRCA2蛋白试剂盒准确度测定

[0056]	添加的重组 BRCA2 浓度 (pg/ $\mu$ L)	BRCA2 浓度测定值 (pg/ $\mu$ L)	回收率 (%)
	0	0.002	
	0.5	0.477	95.40
	1.0	0.964	96.40
	2.0	2.012	100.60
	4.0	3.849	96.23
	8.0	8.207	102.59

[0057] b. 试剂盒的精密度测定

[0058] 选择5份含有不同BRCA2蛋白浓度的卵巢组织样本(由江苏大学附属医院提供),平行在5块酶标板检测,每块板上每个样品重复3次,各板分别设置标准品对照曲线,分别计算每个检测结果的变异系数C.V,  $C.V = (\text{标准偏差SD} / \text{平均值Mean}) \times 100\%$ ,见表3,平均变异系数为6.22%(当C.V>15%表明不同组别之间差异性较大),说明所制备试剂盒有很好的重复性。

[0059] 表3. BRCA2蛋白试剂盒的批内重复性试验

[0060]	样品 编号	BRCA2 蛋白含量 (pg/ $\mu$ L)					C.V.(%)
		板 1	板 2	板 3	板 4	板 5	
[0061]	1	0.79	0.72	0.77	0.65	0.71	7.55
	2	0.65	0.66	0.57	0.54	0.61	8.46
	3	0.56	0.61	0.59	0.61	0.54	5.35
	4	0.77	0.8	0.79	0.71	0.75	4.68
	5	0.91	0.87	0.94	0.89	0.99	5.09

[0062] (4) ELASA法检测样本中BRCA2蛋白含量的方法的建立

[0063] a. 抗BRCA2单克隆抗体3-5-D7用pH9.6, 0.05mol/L的碳酸盐缓冲液包被液稀释为2  $\mu$ g/mL, 包被酶标板, 4 $^{\circ}$ C放置过夜。

[0064] b. 取出酶标板TBST洗涤一次, 加入0.5%BSA封闭, 37 $^{\circ}$ C, 2h

[0065] c. 将BRCA蛋白标准品从16pg/ $\mu$ L、8pg/ $\mu$ L、4pg/ $\mu$ L、2pg/ $\mu$ L、1pg/ $\mu$ L、0.5pg/ $\mu$ L、0.25pg/ $\mu$ L、0.1pg/ $\mu$ L倍比稀释, 每个稀释梯度3个重复孔加入酶标板中, 37 $^{\circ}$ C, 孵育1h。

[0066] d. 取出TBST洗涤3次, 将HRP标记的抗BRCA2单克隆抗体4-6-C3抗体1:1000稀释加入酶标板孔中, 每孔100 $\mu$ L, 放入37 $^{\circ}$ C, 孵育1h。

[0067] e. 取出TBST洗涤5次, 加入TMB底物, 37 $^{\circ}$ C显色20min。取出, 加终止液, 酶标仪(波长=450nm)读取不同蛋白浓度梯度下的OD值。

[0068] f. 标准曲线的建立以BRCA2蛋白标准品的浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标建立标准曲线图5是BRCA2蛋白酶联免疫双抗体夹心法试剂盒的检测标准曲线图; 如图5所示, 方程式 $y = 0.017x + 0.014$ , 回归系数 $R^2 \geq 0.99$ , 根据标准曲线计算样品中的BRCA2蛋白含量。测定试剂盒的线性范围是0.1-16pg/ $\mu$ L。

[0069] 实施例5: BRCA2蛋白酶联免疫检测试剂盒检测人血清中BRCA2蛋白含量

[0070] BRCA2蛋白酶联免疫检测试剂盒测定人卵巢组织BRCA2蛋白含量, 本实施例采用3例正常卵巢组织样本和10例肿瘤卵巢组织样本(由江苏大学附属医院提供, 病理情况由病理医生鉴定确认)。取50mg组织, 加入1.5ml的EP管中, 随后加入1ml的预冷PBS, 加入磁珠后



匀浆机匀浆 (300Hz, 30s)。冰上静置30分钟后,然后用高速低温离心机在4℃离心 (10000g, 10min),取上清液作为检测样品。表4是人卵巢组织中BRCA2蛋白含量测定表,如表4所示,利用本发明试剂盒能定量检测出人卵巢组织中BRCA2蛋白的含量,因此,本发明涉及的ELISA试剂盒灵敏度完全能够满足基础研究和临床诊断需要,对人BRCA2蛋白含量进行准确定量测定。

[0071] 表4. 人卵巢组织中BRCA2蛋白含量测定

	样本	BRCA2 蛋白含量 (pg/ $\mu$ L)
[0072]	正常卵巢样本 1	0.97
	正常卵巢样本 2	1.67
	正常卵巢样本 3	2.33
	肿瘤卵巢样本 1	10.32
	肿瘤卵巢样本 2	6.18
	肿瘤卵巢样本 3	5.22
	肿瘤卵巢样本 4	0.45
	肿瘤卵巢样本 5	7.89
	肿瘤卵巢样本 6	18.94
	肿瘤卵巢样本 7	3.37
	肿瘤卵巢样本 8	9.54
	肿瘤卵巢样本 9	1.17
	肿瘤卵巢样本 10	5.51

[0073] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

[0074] 序列表

<110> 江苏大学

<120> 一种 BRCA2 蛋白酶联免疫双抗夹心试剂盒及其应用

<160> 6

[0075] <170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 378

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

gtgaaagaaa aatactcatt tgtatctgaa gtggaaccaa atgatactga tccattagat	60
tcaaatgtag caaatcagaa gccctttgag agtggaagtg acaaaatctc caaggaagtt	120
gtaccgtctt tggcctgtga atggtctcaa ctaacccttt caggtctaaa tggagcccag	180
atggagaaaa tacccttatt gcatatttct tcatgtgacc aaaatatttc agaaaaagac	240
ctattagaca cagagaacaa aagaaagaaa gattttctta cttcagagaa ttctttgcca	300
cgtatttcta gcctaccaa atcagagaag ccattaaatg aggaaacagt ggtaaataag	360
agagatgaag agcagcat	378

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 357

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 2

[0076]

ttgcagaaga gtacatttga agtgcctgaa aaccagatga ctatcttaaa gaccacttct	60
gaggaatgca gagatgctga tcttcattgtc ataataatg ccccatcgat tggtcaggta	120
gacagcagca agcaatttga aggtacagtt gaaattaaac ggaagtgttc tggcctgttg	180
aaaaatgact gtaacaaaag tgcttctggt tatttaacag atgaaaatga agtgggggtt	240
aggggctttt attctgctca tggcacaaaa ctgaatgttt ctactgaagc tctgcaaaaa	300
gctgtgaaac tgtttagtga tattgagaat attagtgagg aaacttctgc agaggta	357

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 123

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人(Homo sapiens)

&lt;400&gt; 3

Glu Ala Ile Gly Ala Cys Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Thr Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Ile Met Ser Leu Gly Leu Ser Cys Phe Leu Ser Ser Gly Phe Thr Phe

20	25	30	
Thr Asp Tyr Tyr His Ile Glu Gly Gly Gln Leu Pro Gly Ile Leu Leu			
35	40	45	
Ile Met Leu Gly Phe Ile Gly Asp Gly Ala Ile Tyr Val Tyr Val Glu			
50	55	60	
Tyr Ser Ala Ser Val Ile Gly Gly His Ile Glu Gln Gly Asp Thr Ser			
65	70	75	80
Gln Gly His Ile Thr Leu Gln Met Thr Thr Leu Gly Thr Glu Ile Ala			
85	90	95	
Phe Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr Leu Ile Tyr Gly Ile Leu Leu Gln Ile			
100	105	110	
Val Gly Gln Gly Thr Leu Lys Met Met Tyr Ala			
115	120		

[0077]

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人(Homo sapiens)

&lt;400&gt; 4

Asp Thr Leu Met Phe Gln Thr Leu Leu Glu His Ile Ala Ser Leu Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Tyr Val Ile Ala Thr Leu Glu Ile Ala

20	25	30
----	----	----

Thr Gly Thr Thr Tyr Leu His Val Tyr Leu Gln Lys Leu Gly Gln Ala

35	40	45
----	----	----

Leu Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ala Thr Arg Phe Ala Gly Val Leu

50	55	60
----	----	----

Asp Arg Phe Ala Gly Gly Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ile Ile

65	70	75	80
----	----	----	----

Ala Arg Leu Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ala Gln Ser

85

90

95

Thr His Ile Leu Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Ile Leu Glu Ile Ile

100

105

110

Arg

<210> 5

<211> 118

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 5

Glu Ile Leu Val Ala Gly Ala Gly Leu Glu Val Val Ile Leu Gly Ala

[0078]

1

5

10

15

Ala Val Ile Val Ala Cys Ile Ala Ala Gly Tyr Val Phe Thr Ala Thr

20

25

30

His Met Phe Val Val Ile Gln Ala His Ile Leu Val Ala Gly Val Ile

35

40

45

Gly Ile Ile Asp Leu Tyr Asn Gly Asp Thr Tyr Tyr Thr Gln Ile Phe

50

55

60

Ile Gly Ile Ala Thr Leu Thr Val Asp Ile Ala Ala Ala Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met His Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Glu Ala Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Gly Ala Leu Gly Ala Thr Ala Met Asp Leu Val Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Ala Val Thr Val Ala Ala

115

<210> 6

<211> 113

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 6

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Leu Leu Ala Leu Leu Val Ala Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ala Ile Ala Cys Gly Ala Ala Gln Ala Leu Leu His Ala

20 25 30

[0079] Ile Leu Val Ala Phe Leu His Val Tyr Leu Gln Gly Leu Gly Gln Ala

35 40 45

Leu Ile Leu Leu Ile Tyr Ile Val Ala Thr Arg Phe Ala Gly Val Leu

50 55 60

Asp Gly Phe Ala Gly Ala Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ile Ile

65 70 75 80

Ala Gly Val Glu Ile Leu Val Ala Gly Val Tyr Phe Cys Ala Gln Ala

85 90 95

Thr His Val Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Gly

## 序列表

&lt;110&gt; 江苏大学

&lt;120&gt;一种BRCA2蛋白酶联免疫双抗夹心试剂盒及其应用

&lt;160&gt; 6

&lt;170&gt; SIP0SequenceListing 1.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 378

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 1

```

gtgaaagaaa aatactcatt tgtatctgaa gtggaaccaa atgatactga tccattagat 60
tcaaatgtag caaatcagaa gccctttgag agtggaagtg acaaaatctc caaggaagtt 120
gtaccgtctt tggcctgtga atggtctcaa ctaacccttt caggtctaaa tggagcccag 180
atggagaaaa tacccctatt gcatatttct tcatgtgacc aaaatatttc agaaaaagac 240
ctattagaca cagagaacaa aagaaagaaa gattttctta cttcagagaa ttctttgcc 300
cgtattttcta gcctacaaaa atcagagaag ccattaaatg aggaaacagt ggtaaataag 360
agagatgaag agcagcat 378

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 357

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 2

```

ttgcagaaga gtacatttga agtgcctgaa aaccagatga ctatcttaaa gaccacttct 60
gaggaatgca gagatgctga tcttcatgtc ataatgaatg ccccatcgat tggtcaggta 120
gacagcagca agcaatttga aggtacagtt gaaattaaac ggaagtttgc tggcctgttg 180
aaaaatgact gtaacaaaag tgcttctggt tatttaacag atgaaaatga agtggggttt 240
aggggctttt attctgctca tggcacaaaa ctgaatgttt ctactgaagc tctgcaaaaa 300
gctgtgaaac tgtttagtga tattgagaat attagtgagg aaacttctgc agaggta 357

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 123

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人(Homo sapiens)

&lt;400&gt; 3

```

Glu Ala Ile Gly Ala Cys Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Thr Leu
1           5           10          15
Ile Met Ser Leu Gly Leu Ser Cys Phe Leu Ser Ser Gly Phe Thr Phe
          20          25          30
Thr Asp Tyr Tyr His Ile Glu Gly Gly Gln Leu Pro Gly Ile Leu Leu

```

35					40					45						
Ile	Met	Leu	Gly	Phe	Ile	Gly	Asp	Gly	Ala	Ile	Tyr	Val	Tyr	Val	Glu	
50					55					60						
Tyr	Ser	Ala	Ser	Val	Ile	Gly	Gly	His	Ile	Glu	Gln	Gly	Asp	Thr	Ser	
65					70					75					80	
Gln	Gly	His	Ile	Thr	Leu	Gln	Met	Thr	Thr	Leu	Gly	Thr	Glu	Ile	Ala	
85					90					95						
Phe	Leu	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ile	Leu	Leu	Gln	Ile	
100					105					110						
Val	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Lys	Met	Met	Tyr	Ala						
115					120											
<210> 4																
<211> 113																
<212> PRT																
<213> 人(Homo sapiens)																
<400> 4																
Asp	Thr	Leu	Met	Phe	Gln	Thr	Leu	Leu	Glu	His	Ile	Ala	Ser	Leu	Gly	
1				5				10				15				
Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Tyr	Val	Ile	Ala	Thr	Leu	Glu	Ile	Ala	
20					25					30						
Thr	Gly	Thr	Thr	Tyr	Leu	His	Val	Tyr	Leu	Gln	Lys	Leu	Gly	Gln	Ala	
35					40					45						
Leu	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Val	Ala	Thr	Arg	Phe	Ala	Gly	Val	Leu	
50					55					60						
Asp	Arg	Phe	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ile	Ile	
65					70					75					80	
Ala	Arg	Leu	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Gln	Ser	
85					90					95						
Thr	His	Ile	Leu	Phe	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Ile	Leu	Glu	Ile	Ile	
100					105					110						
Arg																
<210> 5																
<211> 118																
<212> PRT																
<213> 人(Homo sapiens)																
<400> 5																
Glu	Ile	Leu	Val	Ala	Gly	Ala	Gly	Leu	Glu	Val	Val	Ile	Leu	Gly	Ala	
1				5				10				15				
Ala	Val	Ile	Val	Ala	Cys	Ile	Ala	Ala	Gly	Tyr	Val	Phe	Thr	Ala	Thr	



	20		25		30
His Met Phe Val Val Ile Gln Ala His Ile Leu Val Ala Gly Val Ile					
35		40		45	
Gly Ile Ile Asp Leu Tyr Asn Gly Asp Thr Tyr Tyr Thr Gln Ile Phe					
50		55		60	
Ile Gly Ile Ala Thr Leu Thr Val Asp Ile Ala Ala Ala Thr Ala Tyr					
65		70		75	80
Met His Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Glu Ala Ala Val Tyr Tyr Cys					
85		90		95	
Ala Gly Ala Leu Gly Ala Thr Ala Met Asp Leu Val Gly Gln Gly Thr					
100		105		110	
Ala Val Thr Val Ala Ala					
115					
<210> 6					
<211> 113					
<212> PRT					
<213> 人(Homo sapiens)					
<400> 6					
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Leu Leu Ala Leu Leu Val Ala Leu Gly					
1	5		10		15
Asp Gln Ala Ala Ile Ala Cys Gly Ala Ala Gln Ala Leu Leu His Ala					
20		25		30	
Ile Leu Val Ala Phe Leu His Val Tyr Leu Gln Gly Leu Gly Gln Ala					
35		40		45	
Leu Ile Leu Leu Ile Tyr Ile Val Ala Thr Arg Phe Ala Gly Val Leu					
50		55		60	
Asp Gly Phe Ala Gly Ala Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ile Ile					
65		70		75	80
Ala Gly Val Glu Ile Leu Val Ala Gly Val Tyr Phe Cys Ala Gln Ala					
85		90		95	
Thr His Val Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
100		105		110	
Gly					

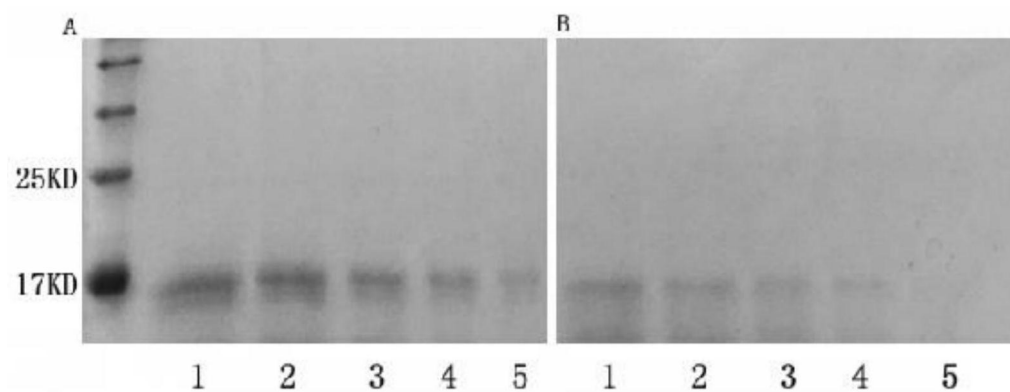


图1

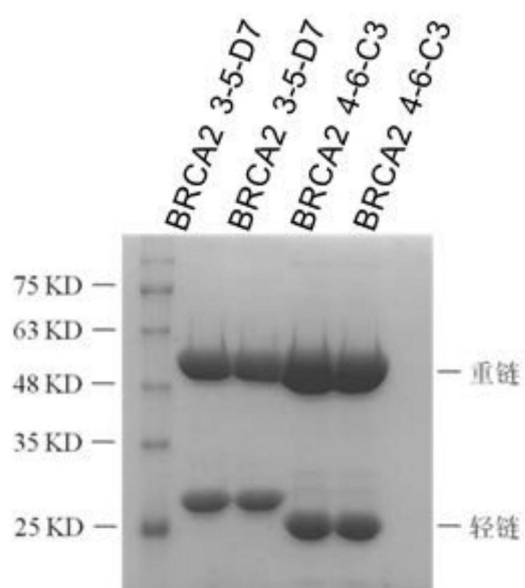


图2

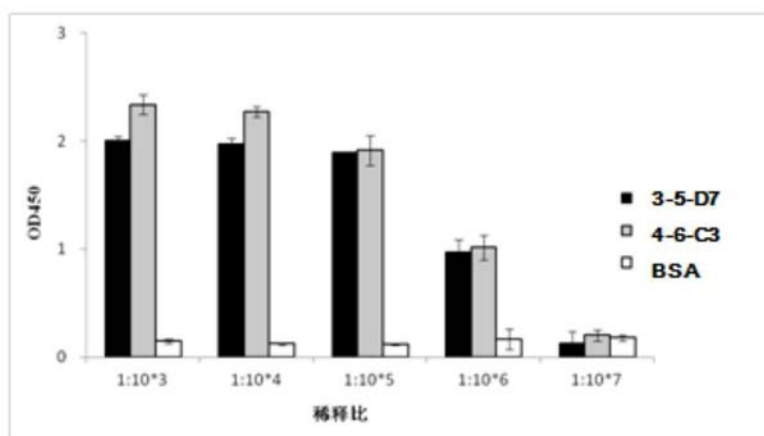


图3

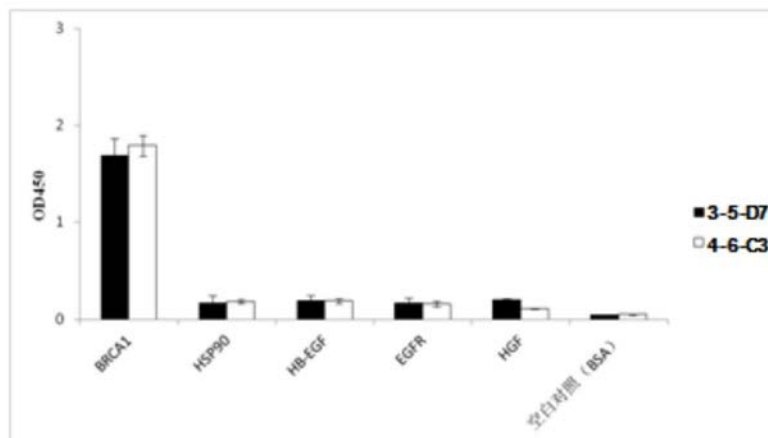


图4

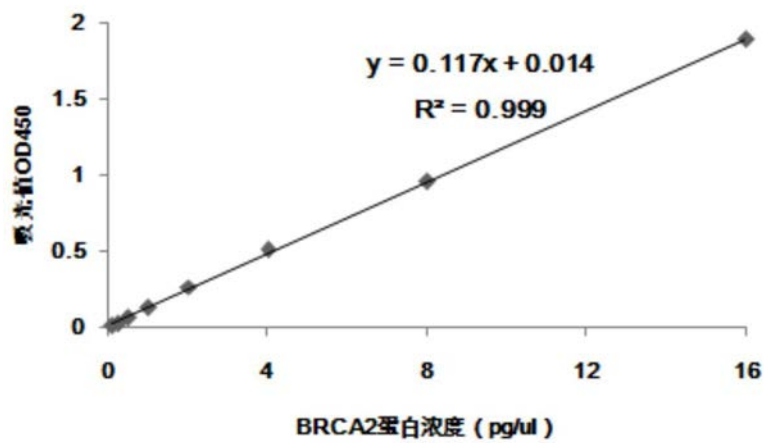


图5

专利名称(译)	一种BRCA2蛋白酶联免疫双抗夹心试剂盒及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110927387A</a>	公开(公告)日	2020-03-27
申请号	CN201911088542.8	申请日	2019-11-08
[标]申请(专利权)人(译)	江苏大学		
申请(专利权)人(译)	江苏大学		
当前申请(专利权)人(译)	江苏大学		
[标]发明人	屠志刚 刘晗青		
发明人	屠志刚 孙丹琳 谢旺旺 刘晗青		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/573 G01N33/541 G01N33/535 C07K16/18		
CPC分类号	C07K16/18 C07K2317/56 G01N33/535 G01N33/541 G01N33/573 G01N33/577 G01N33/68		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明属于生物医药技术领域，具体涉及一种BRCA2蛋白酶联免疫双抗夹心试剂盒及其应用。发明通过蛋白酶联免疫双抗体夹心法试剂盒检测组织样本中的BRCA2表达量，检测的灵敏度、准确度高，精密度好，批间变异系数为6.22%，其最低检测浓度为0.1 pg/μl。本发明试剂盒中以BRCA2 ( 348~473AA ) 肽段和BRCA2 ( 1137~1255AA ) 肽段为免疫原制备单克隆抗体，特异性结合BRCA2蛋白；本发明所涉及的检测方法简单，易操作，检测成本低，对操作者要求低。

标准品浓度 (pg/μL)	BRCA2 4-6-C3 鼠 抗浓度 (μg/mL)	BRCA2 3-5-D7 鼠抗浓度 (μg/mL)			
		2	1	0.5	0.25
16.0	2	1.837	1.883	1.337	0.197
	1	1.864	1.895	1.334	0.241
	0.5	1.374	1.497	1.217	0.149
	0.25	1.389	1.412	0.124	0.159
4.0	2	0.485	0.522	0.205	0.165
	1	0.534	0.498	0.106	0.051
	0.5	0.381	0.324	0.038	0.141
	0.25	0.218	0.133	0.045	0.144
0.5	2	0.081	0.084	0.051	0.016
	1	0.091	0.087	0.023	0.035
	0.5	0.054	0.049	0.041	0.044
	0.25	0.033	0.053	0.037	0.040
0.1	2	0.022	0.021	0.016	0.011