



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110275014 A

(43)申请公布日 2019.09.24

(21)申请号 201910663876.7

(22)申请日 2019.07.23

(71)申请人 江苏省原子医学研究所

地址 214000 江苏省无锡市钱荣路20号

(72)发明人 邹贤 周彬 李文新 施龙顺

包建东 朱国华 高芸 王国瑞

李秀龙 杨克勤

(74)专利代理机构 北京天盾知识产权代理有限公司

公司 11421

代理人 曹静 葛宏

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页

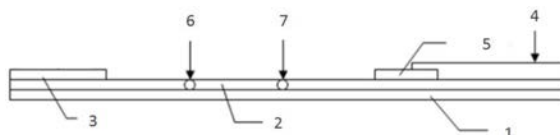
序列表10页 附图1页

(54)发明名称

一种术中快速鉴别甲状腺乳头状癌颈淋巴结转移的方法

(57)摘要

本发明公开一种快速检测人甲状腺球蛋白(Tg)从而快速鉴别甲状腺乳头状癌颈淋巴结转移的荧光免疫层析试纸,该试纸通过双抗体夹心法和荧光免疫层析技术检测人Tg,所述抗体是利用特定的抗原表位肽制备获得。本发明能够快速准确地检测待测物中的人Tg,操作简便、快速,检测范围宽、特异性高、灵敏度好。



1. 一种快速检测人甲状腺球蛋白 (Tg) 从而快速鉴别甲状腺乳头状癌颈淋巴结转移的荧光免疫层析试纸, 该试纸通过双抗体夹心法和荧光免疫层析技术检测待测样品中的人Tg从而判断是否发生了甲状腺乳头状癌颈淋巴结转移, 其中:

所述试纸具有底板, 并且在该底板上沿使用时的层析方向依次以接触方式设置有: 样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水纸, 该试纸通过双抗体夹心法和荧光免疫层析技术检测人Tg, 其中:

所述双抗体夹心法采用标记有荧光微球的第一Tg单克隆抗体作为检测抗体, 所述第一Tg单克隆抗体利用人Tg抗原表位肽 (1) 和 (2) 中的一个作为抗原制备获得; 并且

所述双抗体夹心法采用第二Tg单克隆抗体作为捕获抗体, 所述第二单克隆抗体利用人Tg抗原表位肽 (1) 和 (2) 中的另一个作为抗原制备获得;

所述人Tg抗原表位肽 (1) 和 (2) 分别为:

(1) PKRCPRSCEIRNRLLHGV (SEQ ID NO:2)

(2) AERRFQAPEPLNWTGSDASKPRA (SEQ ID NO:3)。

2. 根据权利要求1所述的荧光免疫层析试纸, 其特征在于, 所述结合垫设置有所述标记有荧光微球的第一Tg单克隆抗体。

3. 根据权利要求1或2所述的荧光免疫层析试纸, 其特征在于, 所述硝酸纤维素膜包括检测带和质控带, 所述检测带固定有所述第二Tg单克隆抗体, 所述质控带包被有能与所述标记有荧光微球的第一Tg单克隆抗体特异性结合的抗抗体, 所述检测带和质控带间隔3mm至8mm。

4. 根据权利要求1或2所述的荧光免疫层析试纸, 其特征在于, 其中所述荧光微球上的荧光物质为稀土离子铕, 或所述荧光微球的微球材料为聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯的共聚物。

5. 根据权利要求1或2所述的荧光免疫层析试纸, 其特征在于, 其中所述抗抗体为羊抗鼠IgG多克隆抗体或兔抗鼠IgG多克隆抗体。

6. 一种制备根据权利要求1至5中任意一项所述的荧光免疫层析试纸的方法, 其包括以下步骤:

1) 提供标记有荧光微球的第一Tg单克隆抗体;

2) 提供结合垫, 其中在所述结合垫上结合有所述标记荧光微球的第一Tg单克隆抗体;

3) 提供硝酸纤维素膜, 其中在所述硝酸纤维素膜上沿使用时的层析方向间隔固定第二Tg单克隆抗体和抗抗体, 以分别形成检测区和质控区;

4) 在底板上沿使用时的层析方向依次以接触方式设置样品垫、所述结合垫、所述硝酸纤维素膜、吸水纸, 从而制成所述荧光免疫层析试纸。

7. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述步骤1) 包括:

使用pH7.2-7.6的MES活化缓冲液洗涤荧光微球, 加入碳二亚胺 (EDC) 和N-羧基琥珀酰亚胺 (NHS), 室温反应一定时间, 洗涤荧光微球, 用0.05M pH7.2-7.6的磷酸盐缓冲液复溶后加入标记抗体, 室温反应2小时, 加入含有10%BSA的0.05M pH7.2-7.6的磷酸盐缓冲液, 室温反应30分钟, 洗涤荧光微球, 用含有1%BSA, 0.1%Tween-20, 0.05M pH7.2-7.6的磷酸盐缓冲液复溶至原体积, 定量喷涂于结合垫上, 避光35-38℃烘干1小时, 加入干燥剂封存备用。

8. 根据权利要求6或7所述的方法, 其中在所述步骤3) 中, 所述检测区和质控区间隔3mm至8mm, 所述第二TG单克隆抗体和所述抗抗体的包被浓度分别为0.5~2mg/ml。

9. 权利要求1至5中任意一项所述的荧光免疫层析试纸在制备快速鉴别甲状腺乳头状癌颈淋巴结转移的试剂中的用途。

10. 一种非诊断目的的快速鉴别甲状腺乳头状癌颈淋巴结转移的方法, 包括利用权利要求1至5中任意一项所述的荧光免疫层析试纸对淋巴结穿刺液进行检测, 当检测到淋巴结穿刺液中的Tg为阳性时, 说明发生了甲状腺乳头状癌颈淋巴结转移。

一种术中快速鉴别甲状腺乳头状癌颈淋巴结转移的方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测领域,具体涉及人甲状腺球蛋白(Tg)抗原表位肽、用该抗原表位肽制备的Tg特异性抗原和相应的单克隆抗体或多克隆抗体、所述抗体在制备人甲状腺乳头状癌颈淋巴结转移体外诊断试剂盒上的用途,相关体外诊断试剂盒,以及一种用于术中快速鉴别甲状腺乳头状癌颈淋巴结转移的荧光免疫层析试纸及其制备方法。

背景技术

[0002] 甲状腺癌作为内分泌肿瘤和头颈肿瘤中最常见的恶性肿瘤,发病率是近20多年来增长最快的实体恶性肿瘤。甲状腺癌发病率迅速增长主要归因于分化型甲状腺癌特别是甲状腺乳头癌率的迅速增加。约50%的PTC患者在早期或术后随访中都可能发生颈部淋巴结转移。

[0003] 对于PTC颈淋巴结转移,需行颈淋巴结清扫,手术范围较广,对机体损伤较大,在《2015美国甲状腺学会成人甲状腺结节与分化型甲状腺癌诊治指南》及《2012中国甲状腺结节和分化型甲状腺癌指南》建议对于有明确颈淋巴结转移病理学依据的患者进行颈淋巴结清扫。对于PTC患者颈淋巴结转移的判断,在术前主要结合临床症状、体征、B超、CT等影像学检查和淋巴结穿刺细胞学检测。术前无法明确颈淋巴结转移,则需要行术中颈淋巴结冰冻病理学检查。术中淋巴结冰冻病理学检查,依赖于大型的病理学检测设备、专业的病理学医生以及约30分钟的等待时间。

[0004] Tg是甲状腺滤泡上皮细胞分泌的大分子糖蛋白,由甲状腺细胞合成并释放进入甲状腺滤泡的腔中。Tg也被认为是甲状腺体形完整性的特殊标志物。在先天性甲状腺功能低下患者,检测Tg可鉴别甲状腺完全缺损、甲状腺发育不全。甲状腺癌多起源于甲状腺滤泡上皮细胞,临床上常见的多为已分化之甲状腺癌,这些已分化的甲状腺癌仍然保有甲状腺滤泡上皮细胞的特性(如摄碘、合成Tg、合成甲状腺过氧化酶等),其转移也会将上述特性带至转移灶。因此,可以通过检测Tg这一甲状腺特有蛋白的方式来判定甲状腺癌的淋巴结转移情况,进而为外科医师手术时确定淋巴结清扫范围提供有益的指引和帮助。

[0005] 免疫层析技术是出现于80年代初期的一种独特的免疫分析方式,它通常以条状纤维层析材料为固相,通过毛细作用使样品溶液在层析条上泳动,并同时使样品中的待测物与层析材料上针对待测物的受体(如抗体或抗原)发生高特异高亲和性的免疫反应,层析过程中免疫复合物被富集或截留在层析材料的一定区域(检测带),通过酶反应或直接运用可目测的标记物(如胶体金)而得到直观的实验结果(如显示出不同的颜色)。而游离标记物则越过检测带,达到与结合标记物自动分离之目的。免疫层析技术常见的示踪标记粒子有胶体金、乳胶、胶体硒、明胶等,其中运用最成功的标记物为胶体金。但是,胶体金免疫层析试纸条存在以下缺陷:

[0006] (1) 胶体金标记过程是静电吸附过程,是一种物理吸附,故在液相中稳定性较差,往往造成已标记上的蛋白分子又再次脱落。

[0007] (2) 检测结果通过显示单一的紫红色条带来判断,颜色单一,难以实现多检和联

检。

[0008] (3) 只有当金颗粒集聚到一定量时,人肉眼才能观察到紫红的条带,且该颜色条带与背景对比度不大,从而限制了检测灵敏度。

[0009] (4) 不同的材料基质效应明显,背景干扰非常大。

[0010] (5) 检测灵敏度较低。

[0011] (6) 无法实现定量检测。

[0012] 目前也出现了利用量子点标记快速免疫层析试纸条的检测方法,但是此方法并不能实现对检测物的定量检测。

[0013] 此外,在检测Tg水平的免疫测定方法中,尚缺乏能够在双抗体夹心测定中可高灵敏、高特异性检测的组合,寻找更为合适的具有免疫原性的Tg抗原表位肽、制备特异性的Tg抗原及抗体也是需要解决的重点。本申请基于生物信息学、化学合成等技术,获得用于抗体制备的Tg蛋白抗原肽。随后利用该抗原肽制备了单克隆抗体和多克隆抗体,验证了抗体的特异性。结果显示筛选出的抗原肽可以有效地用于针对Tg蛋白的抗体的制备,为Tg水平的免疫测定和快速鉴别甲状腺乳头状癌颈淋巴结转移提供了重要的工具。

发明内容

[0014] 本发明要解决的技术问题是克服现有技术存在的上述不足,提供一种高灵敏度和高特异性,批内、批间误差小、操作简单、成本低的快速检测Tg从而在术中快速鉴别甲状腺乳头状癌颈淋巴结转移的试纸及其应用。

[0015] 具体地,提供一种用于定量检测待测物中人甲状腺球蛋白(Tg)的荧光免疫层析试纸,其中所述试纸具有底板,并且在该底板上沿使用时的层析方向依次以接触方式设置有:样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水纸,该试纸通过双抗体夹心法和荧光免疫层析技术检测人Tg,其中:

[0016] 所述双抗体夹心法采用标记有荧光微球的第一TG单克隆抗体作为检测抗体,所述第一Tg单克隆抗体利用人Tg抗原表位肽(1)和(2)中的一个作为抗原制备获得;并且

[0017] 所述双抗体夹心法采用第二Tg单克隆抗体作为捕获抗体,所述第二单克隆抗体利用人Tg抗原表位肽(1)和(2)中的另一个作为抗原制备获得;

[0018] 所述人Tg抗原表位肽(1)和(2)分别为:

[0019] (1) PKRCPRSCEIRNRLLHGV (SEQ ID NO:2)

[0020] (2) AERRFQAPEPLNWTGSDASKPRA (SEQ ID NO:3)。

[0021] 优选地,所述结合垫设置有所述标记有荧光微球的第一Tg单克隆抗体。

[0022] 优选地,所述硝酸纤维素膜包括检测带和质控带,所述检测带固定有所述第二Tg单克隆抗体,所述质控带包被有能与所述标记有荧光微球的第一Tg单克隆抗体特异性结合的抗体,所述检测带和质控带间隔3mm至8mm。

[0023] 优选地,所述单克隆抗体是由Tg抗原表位肽与载体蛋白偶联制备而成的抗原制备而得。

[0024] 优选地,所述荧光微球上的荧光物质为稀土离子铕。

[0025] 优选地,所述荧光微球的微球材料为聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯的共聚物。

[0026] 优选地,所述底板不具有荧光性质。

[0027] 优选地,所述抗抗体为羊抗鼠IgG单克隆抗体或兔抗鼠IgG单克隆抗体。

[0028] 进一步地,提供一种制备本发明所述荧光免疫层析试纸的方法,其包括以下步骤:

[0029] 1) 提供标记有荧光微球的第一Tg单克隆抗体;

[0030] 2) 提供结合垫,其中在所述结合垫上结合有所述标记荧光微球的第一TG单克隆抗体;

[0031] 3) 提供硝酸纤维素膜,其中在所述硝酸纤维素膜上沿使用时的层析方向间隔固定第二Tg单克隆抗体和抗抗体,以分别形成检测区和质控区;

[0032] 4) 在底板上沿使用时的层析方向依次以接触方式设置样品垫、所述结合垫、所述硝酸纤维素膜、吸水纸,从而制成所述荧光免疫层析试纸。

[0033] 其中所述步骤1) 包括:

[0034] 使用pH7.2-7.6的MES活化缓冲液洗涤荧光微球,加入碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温反应一定时间,洗涤荧光微球,用0.05M pH7.2-7.6的磷酸盐缓冲液复溶后加入标记抗体,室温反应2小时,加入含有10%BSA的0.05M pH7.2-7.6的磷酸盐缓冲液,室温反应30分钟,洗涤荧光微球,用含有1%BSA,0.1%Tween-20, 0.05M pH7.2-7.6的磷酸盐缓冲液复溶至原体积,定量喷涂于聚酯膜上,避光35-38℃烘干1小时,加入干燥剂封存备用。

[0035] 其中在所述步骤3) 中,所述检测区和质控区间隔3mm至8mm,所述第二TG单克隆抗体和所述抗抗体的包被浓度分别为0.5~2mg/ml。

[0036] 本发明与现有技术相比具有以下积极效果:

[0037] (1) 本发明的人Tg抗原表位肽具有良好的抗原性,用其制备的抗原免疫动物能够产生高度特异性的单克隆抗体和多克隆抗体。所述抗体能够高度特异地与样本中的Tg结合。

[0038] (2) 本发明将荧光分析技术与快速层析免疫技术相结合,提供了一种用于术中快速鉴别甲状腺乳头状癌颈淋巴结转移的荧光免疫层析试纸,用该试纸检测待测物中的人Tg,操作简便、快速,在5分钟内快速检测穿刺组织液中的Tg,并且检测范围宽、特异性高、灵敏度好,为外科医师提供快速、准确、可在手术床旁实施的甲状腺癌淋巴结转移的鉴别诊断方法,以便术中更好地确定淋巴结清扫范围,降低患者术后甲状旁腺功能减退的发生率,缩短住院时间,减少医疗费用。

[0039] (3) 本发明在制备所述人Tg的荧光免疫层析试纸的过程中,通过大量的试验摸索,优化了各方面的制备条件,使得用本发明的荧光免疫层析试纸进行检测时,荧光信背比大大提高,从而提高了检测灵敏度和结果可信度;此外,本发明还通过试纸的检测带与质控带的荧光强度比值的变化来反应样品中Tg的含量,这与传统的层析技术只考查检测带的绝对荧光强度相比,最大程度上减少了外界条件和背景等的影响,进一步提高了检测结果可信度。

[0040] (4) 目前常用的Tg检测方法主要CLIA,CLIA法精确度和灵敏度都比较高,但对设备及操作人员的要求太高,试剂成本也较贵。我们研制的荧光免疫层析试纸条具有较高的灵敏度和特异性,批内、批间误差小,与CLIA法检测所得结果没有显著差异,完全符合临床应用要求,但是操作简单,体积小、便于携带,易于保存。采用该荧光免疫层析试纸条可实

现快速、单人份定量检测,更适合临床检验的需要,同时实现检测仪器和试剂的产业化,达到较好的社会效益和经济效益,值得临床推广应用。

附图说明

[0041] 图1为荧光免疫层析试纸沿长度方向的剖面示意图;

[0042] 图2为荧光免疫层析试纸平面示意图。

[0043] 图中附图标记表示为:1-底板,2-硝酸纤维素膜,3-吸水纸,4-样品垫,5-结合垫,6-质控带,7-检测带。

具体实施方式

[0044] 下面结合附图对本发明做进一步的详细说明,以令本领域技术人员参照说明书文字能够据以实施。

[0045] 实施例1:人Tg抗原肽的筛选

[0046] 本申请中所述的Tg是本领域已知的,完整的Tg是含有2768个氨基酸的单个多肽链构成,分子量约为660000道尔顿。其氨基酸序列是本领域已知的,可以在NCBI等专业数据库中查到,具体序列如下:

[0047] 人类Tg (1-2768):

[0048] MALVLEIFTLLASICWVSANIFEYQVDAQPLRPCELQRETAFLKQADYVPQCAED GSFQTVQCQNDG
RSCWCVGANGSEVLGSRQGRPVACL SFCQLQKQQILLSGYINSTDT SYLPQCQDSGDYAPVQCDVQQVQCWCVD
AEGMEVYGTRQLGRPKRCPRSCEIRNRLLH GVGDKSPQCSAEGEFMPVQCKFVNTTDMIFDLVHSYNRFPDA
FVTFFSSQRRFPEVS GYCHCADSQGRELAETGLELLLLDEIYDTIFAGLDLPSTFTETTLYRILQRRFLAVQSVI
SGRFRCP TKCEVERFTATSFGHPYVPSRRNGDYQAVQCQTEGPCWCVD AQGKEMHGTR QQGEPPSCAEGQSCAS
ERQQALSRLYFGTSGYFSQHDLFSSPEKRWASPRVARFATSCP PTIKELFVDSGLLRPMVEGQSQQFSVSENLLK
EAIRAIFPSRGLARLALQFTTNPKRLQ QNLFGGKFLVNVGQFNLSGALGTRGTFNFSQFFQQLGLASFLNGGRQE
DLAKPLSVGLD SNSSTGTPEAAKKDGT MNKPTVGSFGFEINLQENQNALKFLASLLELPEFLLFLQHAIS VPED
VARDLGDVMETVLSSQTCEQTPERL FVPSC TTEGSYEDVQCFSGECWCVNSWGKE LPGSRVRGGQPRCPTDCEKQ
RARMQSLMGSQPAGSTL FVPACTSEGHFLPVQCFNSECY CVDAEGQAIPGTRSAIGKPKKCPTPCQLQSEQAFLR
TVQALLSNSSMLPTLSDTYIPQC STDGQWRQVQCNGPPEQVFELYQRWEAQNKGQDLTPAKLLVKIMSYREAASG
NFSLFIQ SLYEAGQQDVFPVLSQYPSLQDVPLAALEGKRPQPRENILLEPYLFWQILNGQLSQYPG SYSDFSTP
LAHFDLRNCWCVD EAGQELEGMRSEPSKLPTCPGSCEEAKLRVLQFIRETE EIVSASNSSRFPLGESFLVAKGIR
LRNEDLGLPPLFPFPREAF AEQFLRGSDYAIRLAAQ STLSFYQRRRFSPDDSAGASALLRSGPYMPQCDAFGSWEP
VQCHAGTGHCWCVD EKGGF IPGSLTARSLQIPQCPTTCEKSRTSGLLSSWKQARSQENPSPKDLFVPACLETGEY
ARL QASGAGTWCVD PASGEELRPGSSSSAQCPSLCNVLKSGVLSRRVSPGYVPACRAEDGGF SPVQCDQAQGSC
WCVMDSGEEVPGTRVTGGQPACESPRCLPFNASEVVGTTILCETIS GPTGSAMQQCQLLCRQGSWSVFPPGPLI
CSLESGRWESQLPQPRACQRPQLWQTIQTQG HFQLQLPPGKMCSADYAGLLQTFQVFILDEL TARGFCQIQVKTF
GTLVSIPVCNNSSVQ VGCLTRERLGVNVTWKSRLIEDIPVASLPDLHDIERALVGKDLLGRFTDLIQSGSFQLHL
DSKTFPAETIRFLQGDHFGTSPRTWFGCSEGFYQVLTSEASQDGLGCVKCPEGSYSQDE ECIPCPVGFYQEAGS
LACVPCPVGRTTISAGAFSQTHCVTDCQRNEAGLQCDQNGQYR ASQKDRGSGKAFCVDGEGRRLPWWETEAPLED
SQCLMMQKFEKVPESKVIFDANAPVAV RSKVPDSEFPVMQCLTDCTEDEACSFFTVSTTEPEISCDFYAWTSDNV

ACMTSDQKRDA LGNSKATSFGLRCQVKVRSHGQDSPAVYLKKGQGSTTTLQKRFEPTGFQNMLSGLYNP IVFS
ASGANLTD AHLFCLLACDRDLCCDGFVLTQVQGGAI ICGLLSSPSVLLCNVKDWM DPSEAWANATCPGVTYDQE
SHQVILRLGDQEFIKSLTPLEGTQDTFTNFQQVYLWKDSD MGSRPESMGCRKNTVPRPASPT EAGLTTELFSPVD
LNQVIVNGNQSLSQKHWLFKHLF SAQQANLWCLSRCVQEH SFCQLAEITESASLYFTCTLYPEAQVCDDIMESN
AQGCRLIL PQMPKALFRKKVILEDKVKNFYTRLPFQKLMGISIRNKVPMSEKSISNGFFECERRCDA DPCTGF
GFLNVSQ LKGGEVTCLTLNSLGIQMCSEENGAWRILDCGSPDIEVHTYFPG WYQKPIAQNNAPSFCPLVVLPSL
TEKVS LDSWQSLALSSVVVDPSIRHFDVAHVSTAAT SNFSAVRDLCLSECSQHEACLITTLQTQPGAVRCMFYAD
TQSC THSLQGQNCRLLLREE ATHIYRKPGISLLSYEASVPSVPISTHGRLLGRSQAIQVGT SWKQVDQFLGVPYA
APPL AERRFQAPEPLNWTG SWDASKPRASCWQPGTRTSTSPGVSEDCLYLNVFIPQNVAPNAS VL VFFHNTMDR
EESEGWPAIDGSFLAAVGNLIVVTASYRVGVFGFLSSGSGEVSGNWGL LDQVAALTWVQTHIRGFGGDPRRVSLA
ADRG GADVASIHLLTARATNSQLFRRAVLMGG SALSPAAVISHERAQQQAIALAKEVSCPMSSSQEVVSLRQKP
ANVLNDAQTKLLAVSG PFHYWGPVIDGHFLREPPARALKRSLRVEVDLLIGSSQDDGLINRAKAVKQFEESQGR T
SSKTAFYQALQNSLGGEDSDARVEAAATWYYSLEHSTDDYASFSRALENATRDYFIICP IIDMASAWAKRARGNV
FMYHAPENYGHGSLELLADVQFALGLPFYPAYEGQFSLEEKSL SLKIMQYFSHFIRSGNP NYPYEF SRKVPTFAT
PWPDFVPRAGGENYKEFSELLPNRQGL KKADCSFW SKYISSLKTSADGAKGGQSAESEEELTAGSGLREDLLSL
QEPGSKTYSK (SEQ ID NO:1)

[0049] 本申请发明人经过大量的理论研究和实验摸索,最终筛选得到两种具有良好的抗原性的抗原表位肽。

[0050] Tg抗原表位肽(1)包含人Tg多肽近N端第157位至175位的肽段,从而构成含19个氨基酸的抗原表位肽(1):PKRCPRSCEIRNRLLHGV (SEQ ID NO:2)。

[0051] Tg抗原表位肽(2)包含人Tg多肽近C端第2239位至2262位的肽段,从而构成含24个氨基酸的抗原表位肽(2):AERRFQAPEPLNWTG SWDASKPRA (SEQ ID NO:3)

[0052] 抗原表位肽的制备利用多肽自动合成仪,通过固相法合成,并通过多肽序列测定鉴定所合成的抗原表位肽序列。

[0053] 实施例2:Tg抗体的制备

[0054] 分别将实施例1所得的TG抗原表位肽(1)和(2)与载体蛋白连接以制备免疫用抗原(1)和(2),利用所得抗原(1)和(2)分别免疫动物,从而利用抗原(1)制备特异性的单克隆抗体和多克隆抗体,并且利用抗原(2)制备特异性的单克隆抗体和多克隆抗体。

[0055] 1.抗原的制备:将Tg肽段分别与载体蛋白BSA连接制备成TG抗原。取本申请所述的两种抗原肽各5.0mg,溶于1mL DMF中,滴加 5mg EDC(溶于50μL H₂O),搅拌20min后,将该反应液滴加至5mg BSA(溶于1mL PBS缓冲液)中,立即加入5mg NHS,室温搅拌过夜。将反应液装入处理后的透析袋中,置于4℃冰箱内用PBS透析 3d,每天换3次透析液,冷冻干燥得Tg肽-BSA粉末,-20℃备用。

[0056] 2.免疫动物制备单克隆抗体:

[0057] 2.1.将100μg上述制备的Tg抗原(免疫原)与等体积的弗氏完全佐剂混合乳化后腹部皮下多点注射6周龄BALB/c雌性小鼠4只。接下来将100μg的纯化病毒与等体积的弗氏不完全佐剂混合乳化后分别进行二免、三免,每次免疫间隔14d。三免后第10天每只小鼠尾静脉采集血液,分离血清。间接ELISA测定抗体效价,将抗体效价在1:10000以上的小鼠经腹腔注射纯化病毒100μg进行加强免疫,加强免疫后第3天选取抗体效价最高的小鼠脾细胞与

SP2/0细胞进行融合。用间接ELISA方法筛选阳性克隆,利用有限稀释法对阳性杂交瘤细胞进行3—4次亚克隆,最后得到能稳定分泌抗体的单克隆细胞株,扩大培养后液氮保存,备用。取12周龄的BALB/c雄性小鼠,每只腹腔注射0.5mL的灭菌液体石蜡,7d后腹腔注入对数生长期的阳性杂交瘤细胞(1×10^6 个/mL),7-10d后小鼠腹部明显膨大,无菌采集腹水,11000r/min离心10min,取上清液于-80℃保存,备用。

[0058] 另外,同时以Tg全长(1-2768)按照上述流程制备单克隆抗体。

[0059] 2.2.测定抗体效价:用间接ELISA方法测定利用Tg抗原(1)制备的单克隆抗体(1)的效价,结果显示单抗的效价达到1:37000以上。

[0060] 利用Tg抗原(2)制备的单克隆抗体(2)的效价也利用相同的方法进行测定,其效价也达到1:38000以上。二者均显著高于利用Tg全长制备的单克隆抗体的效价(1:27000)。

[0061] 3.免疫动物制备多克隆抗体:

[0062] 3.1.取雄性大耳白家兔2只,体重约2Kg,随机分3组,每组2只。用两种Tg多肽抗原分别免疫每组家兔,采用皮下多点微量免疫法。①基础免疫:每只家兔注射卡介苗2.5mg持续10d;②福氏完全佐剂:用2种复合免疫原分别注射每组家兔,2mg/只兔(含BSA及多肽各约1mg),纯多肽免疫原Tg(1-2768)注射1mg/只兔,持续28d;③福氏不完全佐剂免疫:2种复合免疫原分别注射每组家兔1.6mg/只兔(含BSA及多肽各约0.8mg),纯多肽免疫原Tg(1-2768)注射0.8mg/只兔,持续28d;④加强免疫:以后每周用3种免疫原制备的水剂分别加强免疫,剂量同③。

[0063] 3.2.测定抗体效价:用间接ELISA法测定利用Tg抗原(1)制备的多克隆抗体(1)的效价,结果显示抗体效价达到1:31000以上。利用Tg抗原(2)制备的多克隆抗体(2)的效价也利用相同的方法进行测定,其效价也达到1:32000以上。均显著高于利用纯多肽免疫原Tg(1-2768)获得的多克隆抗体的效价(1:20000)。

[0064] 3.3.取血及分离血清:颈动脉插管取血,分离血清。

[0065] 4.分离纯化抗体:硫酸铵沉淀后,再经Protein G(购自sigma公司)亲和纯化。

[0066] 5.抗体分装后冻干,低温保存。

[0067] 实施例3:人TG抗体(1)和(2)的特异性鉴定

[0068] 以ELISA进行检测。分别以人Tg蛋白、GAPDH蛋白、神经元特异性烯醇化酶NSE为检测抗原包被ELISA板,通过ELISA分别检测所制备的TG单克隆抗体(1)和(2)与不同蛋白的特异性反应,以正常BALB/c小鼠血清作阴性对照,PBS液作空白对照。

[0069] 结果:Tg单克隆抗体(1)和(2)分别只与Tg反应为阳性(P/N)2.1,而与GAPDH蛋白、神经元特异性烯醇化酶NSE反应为阴性,说明利用本发明的Tg表位肽(1)、(2)制备的单克隆抗体(1)和(2)均具有特异性。

[0070] 利用与上述鉴定单克隆抗体特异性相同的方法进行鉴定多克隆抗体。

[0071] 结果显示:Tg多克隆抗体(1)和(2)分别与Tg反应为阳性(P/N)2.1,而与GAPDH蛋白、神经元特异性烯醇化酶NSE反应为阴性,说明本发明的Tg表位肽制备的多克隆抗体(1)和(2)分别具有特异性。

[0072] 实施例4:用于检测待测物中人Tg的荧光免疫层析试纸的制备

[0073] 1.研究对象:标本来自江原医院60例外科手术患者,均用注射器术中穿刺甲状腺腺体、胸腺、肌肉组织、脂肪组织,取样备用。

[0074] 2. 试剂与仪器:

[0075] 免疫层析试纸分为试验组和对照组,其中试验组的荧光微球标记抗体是实施例2中利用本发明的表位肽(1)制备的单克隆抗体、检测带抗体是实施例2中利用本发明的表位肽(2)制备的单克隆抗体。而对照组1以购买的针对TG全长的2种市售抗体分别作为荧光微球标记抗体和检测带抗体,对照组2是以利用Tg表位(356-452位肽段)和Tg表位(2656-2768位肽段)制备的单克隆抗体分别作为荧光微球标记抗体和检测带抗体。

[0076] 免疫层析中的质控抗体(羊抗鼠IgG)、荧光微球、荧光检测仪来自无锡市江原实业技贸公司,硝酸纤维素膜(美国Merck-Millipore 公司),样品垫、聚酯膜、底板、吸水纸采购于上海杰一公司,CLIA 检测试剂盒,罗氏公司产品,其他试剂为国产分析纯。

[0077] 3. 制备方法:

[0078] 3.1.1 抗体标记荧光微球:使用pH7.2-7.6的MES活化缓冲液洗涤荧光微球,加入碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温反应一定时间,洗涤荧光微球,用0.05M pH7.2-7.6的磷酸盐缓冲液复溶后加入标记抗体,室温反应2小时,加入含有10%BSA的0.05M pH7.2-7.6的磷酸盐缓冲液,室温反应30分钟,洗涤荧光微球,用含有1%BSA,0.1% Tween-20,0.05M pH7.2-7.6的磷酸盐缓冲液复溶至原体积,定量喷涂于结合垫上,避光35-38℃烘干1小时,加入干燥剂封存备用;

[0079] 3.1.2 荧光免疫层析试纸条组装部件处理:(1)样品垫的处理使用含1%BSA、0.1% Triton100的0.02M pH7.4的磷酸盐缓冲液浸泡样品烘干。(2)硝酸纤维素膜的制备使用含1%蔗糖的0.02M pH7.4的磷酸盐缓冲液,分别将检测抗体和质控抗体稀释到1mg/ml,将二者以0.5cm的间隔喷于硝酸纤维素膜上,烘干后加入干燥剂封存备用;

[0080] 3.1.3 荧光免疫层析试纸条的组装:在湿度小于35%,稳定20-25℃的环境下,在PVC底板上黏贴上硝酸纤维素膜、结合了荧光微球标记的结合垫、样品垫和吸水纸形成微滤体系,切割成0.3cm宽,装入卡壳中即制成试纸条(图1-图2)。

[0081] 4. 检测方法:

[0082] 4.1 取样:用26-gauge注射器针头穿刺3次取样,将取样后的针头与1ml注射器对接。

[0083] 4.2 样品预处理:取一支含200μl PBS缓冲液的溶液管,平衡至室温,使用前确保所有液体都在管子的底部。将穿刺取样后的注射器针头伸入缓冲液中,通过反复吸打的方式充分洗涤混匀,制成待测样品。

[0084] 4.3 加样:在Tg荧光免疫层析试纸的加样区加入上述待测样品 60μl,室温放置5min。

[0085] 4.4 检测:将反应后的荧光免疫层析试纸及校准卡插入便携式荧光免疫定量分析仪的插卡口,运行仪器,仪器自动读卡给出荧光免疫层析试纸中的质控带C值和检测带T值。

[0086] 4.5 结果判断:

[0087] 当 $C < 10000$ 时,表示结果为无效检测,需要重新更换试纸检测;

[0088] 当 $T/C \geq 0.2$ 时,结果为阳性,表明穿刺物中含有Tg;

[0089] 当 $T/C < 0.2$ 时,结果为阴性,表明穿刺物不含Tg。

[0090] 5. 标准曲线的绘制:将Tg标准品制成5个不同的浓度,分别为 10、50、100、200和300μg/L,每个浓度做5个平行样。

[0091] 6. 荧光免疫层析试纸条性能测试: (1) 灵敏度: 测定10个空白样, 取平均值($\bar{x}$)和标准差(s), 计算 $\bar{x} \pm s$, 以此数值在标准曲线上查出相对应的剂量即为该方法的灵敏度。(2) 试纸条在4℃, 避光条件下保存6个月, 分别抽取同一批次和不同批次的Tg荧光免疫层析试纸条, 用100pg/mL浓度的标准品进行测试, 计算批内和批间差CV。(3) 将标准品制成与Tg标准曲线中相对应的6个浓度, 进行特异性检测。

[0092] 7. 与电化学发光法 (CLIA) 检测试剂盒比较: 严格按照CLIA检测试剂盒说明书操作要求, 与Tg荧光检测试纸分别同时对60例患者的穿刺甲状腺标本进行平行检测。

[0093] 8. 统计学处理: 用SPSS 19.0统计软件对数据进行分析, 组间用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。用配对t检验进行相关性和差异性比较。

[0094] 结果与分析:

[0095] 1. 检测结果判读: 检测时, 由于层析作用液体向前移动。若试样中Tg的含量过少, 试样中的Tg与结合垫上标记抗体结合的荧光微球结合形成复合物C1则相应较少, 结合垫中的标记抗体与C线上的质控抗体大量结合, 由此导致T线荧光比C线荧光浅很多 (或完全检测不到荧光), 结果为阴性; 若试样中Tg的浓度较大, 则复合物C1 相应较多, 与T线处的检测抗体结合并大量形成抗体-抗原-抗体复合物C2, 而且试样中Tg越高, T线显色越深, 结果为阳性。无论是阳性还是阴性结果, 因鼠源性抗体标记的荧光微球过量包被, 因而总有未结合检测抗体的部分荧光微球与C线处的羊抗鼠IgG结合, 在C 线处出现荧光微球的聚集。如果C线没有荧光条带, 无论T线有无荧光条带, 结果均无效。

[0096] 2. 标准曲线绘制: 按照统计学方法, 以检测样品荧光值信号为纵坐标, Tg标准品浓度为横坐标 (表1为试验组的数据, 即利用本发明 所述表位的抗体), 建立方程并拟合为标准曲线。该标准曲线的 R^2 为0.9997, 线性较好, 符合定量检测的要求。而对照组1标准曲线的 R^2 为0.9113, 对照组2标准曲线的 R^2 为0.9304, 线性相对于试验组均较差。

[0097] 表1 Tg标准品检测结果

	标准品 (μ g/L)	T/C 比值	CV (%)
[0098]	10	1.31 ± 0.054	4.12
	50	2.79 ± 0.119	4.27
	100	4.08 ± 0.162	3.97
	200	5.69 ± 0.205	3.60
	300	6.81 ± 0.273	4.01

[0099] 3. Tg免疫层析荧光试纸条性能评价: (1) 灵敏度: 试验组零剂量点的T/C均值为0.18, 在标准曲线上折算为0.1 μ g/L, 该值即为试验组的灵敏度。而对照组1和2的灵敏度分别为5 μ g/L和3 μ g/L, 二者相差一个数量级。(2) 稳定性和精密度: 试验组的标准曲线各组对

应的CV值均小于5% (表1)。4℃,避光条件下保存6个月的试纸条检测时,批内和批间CV分别为4.33%和5.27%,结果表明试纸条检测稳定性和精密度较好。对照组在稳定性和精密度上与试验组相差不大。(3) 特异性:将配制好的Tg标准品与甲状腺素标准品同时用试验组的试纸条进行检测,各浓度点交叉反应率 $CR\% = \frac{\text{测定值甲状腺素}}{\text{测定值Tg}} \times 100\%$,在上述浓度范围内,与甲状腺素的交叉反应率均小于0.1%,说明两者无交叉反应,方法特异性比较好。当采用对照组试纸条时,在低浓度点与甲状腺素的交叉反应率 $>3\%$,特异性明显低于试验组。

[0100] 4. 与CLIA方法的比较:选取60例患者,穿刺其甲状腺腺体、颈淋巴结、胸腺、肌肉组织、脂肪组织,其中的Tg含量分别用CLIA 试剂盒与试验组荧光免疫层析试纸条、对照组免疫层析试纸条进行检测。结果表明,试验组免疫层析试纸条与CLIA试剂盒的相关系数为0.9957,相关性曲线为 $Y=0.9798X+1.8467$,其中Y为本发明的荧光免疫检测试纸条检测得到的Tg浓度($\mu\text{g/L}$),X为CLIA试剂盒检测得到的Tg浓度($\mu\text{g/L}$)。可见两者的相关性良好。此外,结果显示正常甲状腺组织和非甲状腺组织的Tg浓度有显著性差异(表2), $P<0.001$,相关性具有统计学意义。而对照组1、2免疫层析试纸条与CLIA试剂盒的相关系数分别为0.9096、0.9231,相关性略低于试验组。

[0101] 表2不同组织洗脱液Tg检测结果

[0102]	组织	T/C 比值	结果
	甲状腺	6.63 ± 0.395	阳性
[0103]	肌肉	<0.2	阴性
	脂肪	<0.2	阴性
	胸腺	<0.2	阴性

[0104] 实施例5本发明荧光免疫层析试纸用于诊断甲状腺乳头状癌(PTC) 淋巴结转移的应用

[0105] 研究对象:标本来自江原医院PTC外科手术患者的76个颈淋巴结,均用注射器术中穿刺,取样备用。手术病理证实的淋巴结共76 枚,其中转移性淋巴结51枚,非转移性淋巴结25枚。

[0106] 5.1取样:用26-gauge注射器针头穿刺3次取样,将取样后的针头与1ml注射器对接。

[0107] 5.2样品预处理:取一支含200 μl PBS缓冲液的溶液管,平衡至室温,使用前确保所有液体都在管子的底部。将穿刺取样后的注射器针头伸入缓冲液中,通过反复吸打的方式充分洗涤混匀,制成待测样品。

[0108] 5.3加样:在Tg荧光免疫层析试纸的加样区加入上述待测样品 60 μl ,室温放置5min。

[0109] 5.4检测:将反应后的荧光免疫层析试纸及校准卡插入便携式荧光免疫定量分析仪的插卡口,运行仪器,仪器自动读卡给出荧光免疫层析试纸中的质控带C值和检测带T值。

[0110] 5.5结果判断:

[0111] 当 $C < 10000$ 时,表示结果为无效检测,需要重新更换试纸检测;

[0112] 当 $T/C \geq 0.2$ 时,结果为阳性,表明穿刺物中含有Tg;

[0113] 当 $T/C < 0.2$ 时,结果为阴性,表明穿刺物不含Tg。

[0114] 5.6结果分析:

[0115] 表3不同淋巴结检测结果

[0116]	组织	T/C 比值	结果
	转移性淋巴结组	4.63 ± 0.215	阳性
	非转移性淋巴结组	< 0.2	阴性

[0117] 注:数值以中位数的形式表示

[0118] 结果表明转移性淋巴结组和非转移性淋巴结组之间的穿刺液Tg 有显著性差异(表3), $P < 0.001$,相关性具有统计学意义。为快速诊断PTC是否发生淋巴结转移提供了可靠便捷的检测工具。

[0119] 由以上实施例及考察结果可知,通过本发明 的两个Tg表位肽制备的单克隆抗体能特异性识别Tg,利用其制备的荧光免疫层析定量检测方法能够在短时间准确定量Tg,与CLIA法检测所得结果没有显著差异,完全符合临床应用要求,操作简单,体积小、便于携带,易于保存,值得临床推广应用。

[0120] 尽管本发明 的实施方案已公开如上,但其并不仅仅限于说明书和实施方式中所列运用,完全适用于各种适合本发明 的领域。对于熟悉本领域的人员而言,可容易地实现另外的修改。因此在不背离权利要求及等同范围所限定的一般概念下,本发明 并不限于特定的细节和这里示出与描述的图例。

序列表

<110> 江苏省原子医学研究所

<120> 一种术中快速鉴别甲状腺乳头状癌颈淋巴结转移的方法

<130> 200

<160> 3

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 2768

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Ala Leu Val Leu Glu Ile Phe Thr Leu Leu Ala Ser Ile Cys Trp
1           5           10           15
Val Ser Ala Asn Ile Phe Glu Tyr Gln Val Asp Ala Gln Pro Leu Arg
          20           25           30
Pro Cys Glu Leu Gln Arg Glu Thr Ala Phe Leu Lys Gln Ala Asp Tyr
          35           40           45
Val Pro Gln Cys Ala Glu Asp Gly Ser Phe Gln Thr Val Gln Cys Gln
          50           55           60
Asn Asp Gly Arg Ser Cys Trp Cys Val Gly Ala Asn Gly Ser Glu Val
65           70           75           80
Leu Gly Ser Arg Gln Pro Gly Arg Pro Val Ala Cys Leu Ser Phe Cys
          85           90           95
Gln Leu Gln Lys Gln Gln Ile Leu Leu Ser Gly Tyr Ile Asn Ser Thr
          100          105          110
Asp Thr Ser Tyr Leu Pro Gln Cys Gln Asp Ser Gly Asp Tyr Ala Pro
          115          120          125
Val Gln Cys Asp Val Gln Gln Val Gln Cys Trp Cys Val Asp Ala Glu
          130          135          140
Gly Met Glu Val Tyr Gly Thr Arg Gln Leu Gly Arg Pro Lys Arg Cys
145          150          155          160
Pro Arg Ser Cys Glu Ile Arg Asn Arg Arg Leu Leu His Gly Val Gly
          165          170          175
Asp Lys Ser Pro Pro Gln Cys Ser Ala Glu Gly Glu Phe Met Pro Val
          180          185          190
Gln Cys Lys Phe Val Asn Thr Thr Asp Met Met Ile Phe Asp Leu Val
          195          200          205
His Ser Tyr Asn Arg Phe Pro Asp Ala Phe Val Thr Phe Ser Ser Phe

```

210	215	220
Gln Arg Arg Phe Pro Glu Val Ser Gly Tyr Cys His Cys Ala Asp Ser		
225	230	235
Gln Gly Arg Glu Leu Ala Glu Thr Gly Leu Glu Leu Leu Leu Asp Glu		240
	245	250
Ile Tyr Asp Thr Ile Phe Ala Gly Leu Asp Leu Pro Ser Thr Phe Thr		255
	260	265
Glu Thr Thr Leu Tyr Arg Ile Leu Gln Arg Arg Phe Leu Ala Val Gln		270
	275	280
Ser Val Ile Ser Gly Arg Phe Arg Cys Pro Thr Lys Cys Glu Val Glu		285
290	295	300
Arg Phe Thr Ala Thr Ser Phe Gly His Pro Tyr Val Pro Ser Cys Arg		
305	310	315
Arg Asn Gly Asp Tyr Gln Ala Val Gln Cys Gln Thr Glu Gly Pro Cys		
	325	330
Trp Cys Val Asp Ala Gln Gly Lys Glu Met His Gly Thr Arg Gln Gln		335
	340	345
Gly Glu Pro Pro Ser Cys Ala Glu Gly Gln Ser Cys Ala Ser Glu Arg		350
	355	360
Gln Gln Ala Leu Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Thr Ser Gly Tyr Phe Ser		365
370	375	380
Gln His Asp Leu Phe Ser Ser Pro Glu Lys Arg Trp Ala Ser Pro Arg		
385	390	395
Val Ala Arg Phe Ala Thr Ser Cys Pro Pro Thr Ile Lys Glu Leu Phe		400
	405	410
Val Asp Ser Gly Leu Leu Arg Pro Met Val Glu Gly Gln Ser Gln Gln		415
	420	425
Phe Ser Val Ser Glu Asn Leu Leu Lys Glu Ala Ile Arg Ala Ile Phe		430
	435	440
Pro Ser Arg Gly Leu Ala Arg Leu Ala Leu Gln Phe Thr Thr Asn Pro		445
450	455	460
Lys Arg Leu Gln Gln Asn Leu Phe Gly Gly Lys Phe Leu Val Asn Val		
465	470	475
Gly Gln Phe Asn Leu Ser Gly Ala Leu Gly Thr Arg Gly Thr Phe Asn		480
	485	490
Phe Ser Gln Phe Phe Gln Gln Leu Gly Leu Ala Ser Phe Leu Asn Gly		495
	500	505
Gly Arg Gln Glu Asp Leu Ala Lys Pro Leu Ser Val Gly Leu Asp Ser		510
515	520	525

Asn Ser Ser Thr Gly Thr Pro Glu Ala Ala Lys Lys Asp Gly Thr Met		
530	535	540
Asn Lys Pro Thr Val Gly Ser Phe Gly Phe Glu Ile Asn Leu Gln Glu		
545	550	555 560
Asn Gln Asn Ala Leu Lys Phe Leu Ala Ser Leu Leu Glu Leu Pro Glu		
565	570	575
Phe Leu Leu Phe Leu Gln His Ala Ile Ser Val Pro Glu Asp Val Ala		
580	585	590
Arg Asp Leu Gly Asp Val Met Glu Thr Val Leu Ser Ser Gln Thr Cys		
595	600	605
Glu Gln Thr Pro Glu Arg Leu Phe Val Pro Ser Cys Thr Thr Glu Gly		
610	615	620
Ser Tyr Glu Asp Val Gln Cys Phe Ser Gly Glu Cys Trp Cys Val Asn		
625	630	635 640
Ser Trp Gly Lys Glu Leu Pro Gly Ser Arg Val Arg Gly Gly Gln Pro		
645	650	655
Arg Cys Pro Thr Asp Cys Glu Lys Gln Arg Ala Arg Met Gln Ser Leu		
660	665	670
Met Gly Ser Gln Pro Ala Gly Ser Thr Leu Phe Val Pro Ala Cys Thr		
675	680	685
Ser Glu Gly His Phe Leu Pro Val Gln Cys Phe Asn Ser Glu Cys Tyr		
690	695	700
Cys Val Asp Ala Glu Gly Gln Ala Ile Pro Gly Thr Arg Ser Ala Ile		
705	710	715 720
Gly Lys Pro Lys Lys Cys Pro Thr Pro Cys Gln Leu Gln Ser Glu Gln		
725	730	735
Ala Phe Leu Arg Thr Val Gln Ala Leu Leu Ser Asn Ser Ser Met Leu		
740	745	750
Pro Thr Leu Ser Asp Thr Tyr Ile Pro Gln Cys Ser Thr Asp Gly Gln		
755	760	765
Trp Arg Gln Val Gln Cys Asn Gly Pro Pro Glu Gln Val Phe Glu Leu		
770	775	780
Tyr Gln Arg Trp Glu Ala Gln Asn Lys Gly Gln Asp Leu Thr Pro Ala		
785	790	795 800
Lys Leu Leu Val Lys Ile Met Ser Tyr Arg Glu Ala Ala Ser Gly Asn		
805	810	815
Phe Ser Leu Phe Ile Gln Ser Leu Tyr Glu Ala Gly Gln Gln Asp Val		
820	825	830
Phe Pro Val Leu Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Gln Asp Val Pro Leu Ala		

835	840	845
Ala Leu Glu Gly Lys Arg Pro	Gln Pro Arg Glu Asn Ile Leu Leu Glu	
850	855	860
Pro Tyr Leu Phe Trp Gln Ile Leu Asn Gly Gln Leu Ser Gln Tyr Pro		
865	870	875
Gly Ser Tyr Ser Asp Phe Ser Thr Pro Leu Ala His Phe Asp Leu Arg		880
885	890	895
Asn Cys Trp Cys Val Asp Glu Ala Gly Gln Glu Leu Glu Gly Met Arg		
900	905	910
Ser Glu Pro Ser Lys Leu Pro Thr Cys Pro Gly Ser Cys Glu Glu Ala		
915	920	925
Lys Leu Arg Val Leu Gln Phe Ile Arg Glu Thr Glu Glu Ile Val Ser		
930	935	940
Ala Ser Asn Ser Ser Arg Phe Pro Leu Gly Glu Ser Phe Leu Val Ala		
945	950	955
Lys Gly Ile Arg Leu Arg Asn Glu Asp Leu Gly Leu Pro Pro Leu Phe		
965	970	975
Pro Pro Arg Glu Ala Phe Ala Glu Gln Phe Leu Arg Gly Ser Asp Tyr		
980	985	990
Ala Ile Arg Leu Ala Ala Gln Ser Thr Leu Ser Phe Tyr Gln Arg Arg		
995	1000	1005
Arg Phe Ser Pro Asp Asp Ser Ala Gly Ala Ser Ala Leu Leu Arg Ser		
1010	1015	1020
Gly Pro Tyr Met Pro Gln Cys Asp Ala Phe Gly Ser Trp Glu Pro Val		
1025	1030	1035
Gln Cys His Ala Gly Thr Gly His Cys Trp Cys Val Asp Glu Lys Gly		
1045	1050	1055
Gly Phe Ile Pro Gly Ser Leu Thr Ala Arg Ser Leu Gln Ile Pro Gln		
1060	1065	1070
Cys Pro Thr Thr Cys Glu Lys Ser Arg Thr Ser Gly Leu Leu Ser Ser		
1075	1080	1085
Trp Lys Gln Ala Arg Ser Gln Glu Asn Pro Ser Pro Lys Asp Leu Phe		
1090	1095	1100
Val Pro Ala Cys Leu Glu Thr Gly Glu Tyr Ala Arg Leu Gln Ala Ser		
1105	1110	1115
Gly Ala Gly Thr Trp Cys Val Asp Pro Ala Ser Gly Glu Glu Leu Arg		
1125	1130	1135
Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ala Gln Cys Pro Ser Leu Cys Asn Val Leu		
1140	1145	1150

Lys Ser Gly Val Leu Ser Arg Arg Val Ser Pro Gly Tyr Val Pro Ala		
1155	1160	1165
Cys Arg Ala Glu Asp Gly Gly Phe Ser Pro Val Gln Cys Asp Gln Ala		
1170	1175	1180
Gln Gly Ser Cys Trp Cys Val Met Asp Ser Gly Glu Glu Val Pro Gly		
1185	1190	1195
Thr Arg Val Thr Gly Gly Gln Pro Ala Cys Glu Ser Pro Arg Cys Pro		
	1205	1210
		1215
Leu Pro Phe Asn Ala Ser Glu Val Val Gly Gly Thr Ile Leu Cys Glu		
	1220	1225
		1230
Thr Ile Ser Gly Pro Thr Gly Ser Ala Met Gln Gln Cys Gln Leu Leu		
	1235	1240
		1245
Cys Arg Gln Gly Ser Trp Ser Val Phe Pro Pro Gly Pro Leu Ile Cys		
	1250	1255
		1260
Ser Leu Glu Ser Gly Arg Trp Glu Ser Gln Leu Pro Gln Pro Arg Ala		
	1265	1270
		1275
Cys Gln Arg Pro Gln Leu Trp Gln Thr Ile Gln Thr Gln Gly His Phe		
	1285	1290
		1295
Gln Leu Gln Leu Pro Pro Gly Lys Met Cys Ser Ala Asp Tyr Ala Gly		
	1300	1305
		1310
Leu Leu Gln Thr Phe Gln Val Phe Ile Leu Asp Glu Leu Thr Ala Arg		
	1315	1320
		1325
Gly Phe Cys Gln Ile Gln Val Lys Thr Phe Gly Thr Leu Val Ser Ile		
	1330	1335
		1340
Pro Val Cys Asn Asn Ser Ser Val Gln Val Gly Cys Leu Thr Arg Glu		
	1345	1350
		1355
Arg Leu Gly Val Asn Val Thr Trp Lys Ser Arg Leu Glu Asp Ile Pro		
	1365	1370
		1375
Val Ala Ser Leu Pro Asp Leu His Asp Ile Glu Arg Ala Leu Val Gly		
	1380	1385
		1390
Lys Asp Leu Leu Gly Arg Phe Thr Asp Leu Ile Gln Ser Gly Ser Phe		
	1395	1400
		1405
Gln Leu His Leu Asp Ser Lys Thr Phe Pro Ala Glu Thr Ile Arg Phe		
	1410	1415
		1420
Leu Gln Gly Asp His Phe Gly Thr Ser Pro Arg Thr Trp Phe Gly Cys		
	1425	1430
		1435
Ser Glu Gly Phe Tyr Gln Val Leu Thr Ser Glu Ala Ser Gln Asp Gly		
	1445	1450
		1455
Leu Gly Cys Val Lys Cys Pro Glu Gly Ser Tyr Ser Gln Asp Glu Glu		

1460	1465	1470
Cys Ile Pro Cys Pro Val Gly Phe Tyr Gln Glu Gln Ala Gly Ser Leu		
1475	1480	1485
Ala Cys Val Pro Cys Pro Val Gly Arg Thr Thr Ile Ser Ala Gly Ala		
1490	1495	1500
Phe Ser Gln Thr His Cys Val Thr Asp Cys Gln Arg Asn Glu Ala Gly		
1505	1510	1515
Leu Gln Cys Asp Gln Asn Gly Gln Tyr Arg Ala Ser Gln Lys Asp Arg		1520
	1525	1530
Gly Ser Gly Lys Ala Phe Cys Val Asp Gly Glu Gly Arg Arg Leu Pro		1535
1540	1545	1550
Trp Trp Glu Thr Glu Ala Pro Leu Glu Asp Ser Gln Cys Leu Met Met		
1555	1560	1565
Gln Lys Phe Glu Lys Val Pro Glu Ser Lys Val Ile Phe Asp Ala Asn		
1570	1575	1580
Ala Pro Val Ala Val Arg Ser Lys Val Pro Asp Ser Glu Phe Pro Val		
1585	1590	1595
Met Gln Cys Leu Thr Asp Cys Thr Glu Asp Glu Ala Cys Ser Phe Phe		
1605	1610	1615
Thr Val Ser Thr Thr Glu Pro Glu Ile Ser Cys Asp Phe Tyr Ala Trp		
1620	1625	1630
Thr Ser Asp Asn Val Ala Cys Met Thr Ser Asp Gln Lys Arg Asp Ala		
1635	1640	1645
Leu Gly Asn Ser Lys Ala Thr Ser Phe Gly Ser Leu Arg Cys Gln Val		
1650	1655	1660
Lys Val Arg Ser His Gly Gln Asp Ser Pro Ala Val Tyr Leu Lys Lys		
1665	1670	1675
Gly Gln Gly Ser Thr Thr Thr Leu Gln Lys Arg Phe Glu Pro Thr Gly		
1685	1690	1695
Phe Gln Asn Met Leu Ser Gly Leu Tyr Asn Pro Ile Val Phe Ser Ala		
1700	1705	1710
Ser Gly Ala Asn Leu Thr Asp Ala His Leu Phe Cys Leu Leu Ala Cys		
1715	1720	1725
Asp Arg Asp Leu Cys Cys Asp Gly Phe Val Leu Thr Gln Val Gln Gly		
1730	1735	1740
Gly Ala Ile Ile Cys Gly Leu Leu Ser Ser Pro Ser Val Leu Leu Cys		
1745	1750	1755
Asn Val Lys Asp Trp Met Asp Pro Ser Glu Ala Trp Ala Asn Ala Thr		1760
1765	1770	1775

Cys Pro Gly Val Thr Tyr Asp Gln Glu Ser His Gln Val Ile Leu Arg		
1780	1785	1790
Leu Gly Asp Gln Glu Phe Ile Lys Ser Leu Thr Pro Leu Glu Gly Thr		
1795	1800	1805
Gln Asp Thr Phe Thr Asn Phe Gln Gln Val Tyr Leu Trp Lys Asp Ser		
1810	1815	1820
Asp Met Gly Ser Arg Pro Glu Ser Met Gly Cys Arg Lys Asn Thr Val		
1825	1830	1835
Pro Arg Pro Ala Ser Pro Thr Glu Ala Gly Leu Thr Thr Glu Leu Phe		
1845	1850	1855
Ser Pro Val Asp Leu Asn Gln Val Ile Val Asn Gly Asn Gln Ser Leu		
1860	1865	1870
Ser Ser Gln Lys His Trp Leu Phe Lys His Leu Phe Ser Ala Gln Gln		
1875	1880	1885
Ala Asn Leu Trp Cys Leu Ser Arg Cys Val Gln Glu His Ser Phe Cys		
1890	1895	1900
Gln Leu Ala Glu Ile Thr Glu Ser Ala Ser Leu Tyr Phe Thr Cys Thr		
1905	1910	1915
Leu Tyr Pro Glu Ala Gln Val Cys Asp Asp Ile Met Glu Ser Asn Ala		
1925	1930	1935
Gln Gly Cys Arg Leu Ile Leu Pro Gln Met Pro Lys Ala Leu Phe Arg		
1940	1945	1950
Lys Lys Val Ile Leu Glu Asp Lys Val Lys Asn Phe Tyr Thr Arg Leu		
1955	1960	1965
Pro Phe Gln Lys Leu Met Gly Ile Ser Ile Arg Asn Lys Val Pro Met		
1970	1975	1980
Ser Glu Lys Ser Ile Ser Asn Gly Phe Phe Glu Cys Glu Arg Arg Cys		
1985	1990	1995
Asp Ala Asp Pro Cys Cys Thr Gly Phe Gly Phe Leu Asn Val Ser Gln		
2005	2010	2015
Leu Lys Gly Gly Glu Val Thr Cys Leu Thr Leu Asn Ser Leu Gly Ile		
2020	2025	2030
Gln Met Cys Ser Glu Glu Asn Gly Gly Ala Trp Arg Ile Leu Asp Cys		
2035	2040	2045
Gly Ser Pro Asp Ile Glu Val His Thr Tyr Pro Phe Gly Trp Tyr Gln		
2050	2055	2060
Lys Pro Ile Ala Gln Asn Asn Ala Pro Ser Phe Cys Pro Leu Val Val		
2065	2070	2075
Leu Pro Ser Leu Thr Glu Lys Val Ser Leu Asp Ser Trp Gln Ser Leu		

2085	2090	2095
Ala Leu Ser Ser Val Val Val Asp Pro Ser Ile Arg His Phe Asp Val		
2100	2105	2110
Ala His Val Ser Thr Ala Ala Thr Ser Asn Phe Ser Ala Val Arg Asp		
2115	2120	2125
Leu Cys Leu Ser Glu Cys Ser Gln His Glu Ala Cys Leu Ile Thr Thr		
2130	2135	2140
Leu Gln Thr Gln Pro Gly Ala Val Arg Cys Met Phe Tyr Ala Asp Thr		
2145	2150	2155
Gln Ser Cys Thr His Ser Leu Gln Gly Gln Asn Cys Arg Leu Leu Leu		
2165	2170	2175
Arg Glu Glu Ala Thr His Ile Tyr Arg Lys Pro Gly Ile Ser Leu Leu		
2180	2185	2190
Ser Tyr Glu Ala Ser Val Pro Ser Val Pro Ile Ser Thr His Gly Arg		
2195	2200	2205
Leu Leu Gly Arg Ser Gln Ala Ile Gln Val Gly Thr Ser Trp Lys Gln		
2210	2215	2220
Val Asp Gln Phe Leu Gly Val Pro Tyr Ala Ala Pro Pro Leu Ala Glu		
2225	2230	2235
Arg Arg Phe Gln Ala Pro Glu Pro Leu Asn Trp Thr Gly Ser Trp Asp		
2245	2250	2255
Ala Ser Lys Pro Arg Ala Ser Cys Trp Gln Pro Gly Thr Arg Thr Ser		
2260	2265	2270
Thr Ser Pro Gly Val Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Val Phe Ile		
2275	2280	2285
Pro Gln Asn Val Ala Pro Asn Ala Ser Val Leu Val Phe Phe His Asn		
2290	2295	2300
Thr Met Asp Arg Glu Glu Ser Glu Gly Trp Pro Ala Ile Asp Gly Ser		
2305	2310	2315
Phe Leu Ala Ala Val Gly Asn Leu Ile Val Val Thr Ala Ser Tyr Arg		
2325	2330	2335
Val Gly Val Phe Gly Phe Leu Ser Ser Gly Ser Gly Glu Val Ser Gly		
2340	2345	2350
Asn Trp Gly Leu Leu Asp Gln Val Ala Ala Leu Thr Trp Val Gln Thr		
2355	2360	2365
His Ile Arg Gly Phe Gly Gly Asp Pro Arg Arg Val Ser Leu Ala Ala		
2370	2375	2380
Asp Arg Gly Gly Ala Asp Val Ala Ser Ile His Leu Leu Thr Ala Arg		
2385	2390	2395
		2400

Ala Thr Asn Ser Gln Leu Phe Arg Arg Ala Val Leu Met Gly Gly Ser		
2405	2410	2415
Ala Leu Ser Pro Ala Ala Val Ile Ser His Glu Arg Ala Gln Gln Gln		
2420	2425	2430
Ala Ile Ala Leu Ala Lys Glu Val Ser Cys Pro Met Ser Ser Ser Gln		
2435	2440	2445
Glu Val Val Ser Cys Leu Arg Gln Lys Pro Ala Asn Val Leu Asn Asp		
2450	2455	2460
Ala Gln Thr Lys Leu Leu Ala Val Ser Gly Pro Phe His Tyr Trp Gly		
2465	2470	2475
Pro Val Ile Asp Gly His Phe Leu Arg Glu Pro Pro Ala Arg Ala Leu		
2485	2490	2495
Lys Arg Ser Leu Arg Val Glu Val Asp Leu Leu Ile Gly Ser Ser Gln		
2500	2505	2510
Asp Asp Gly Leu Ile Asn Arg Ala Lys Ala Val Lys Gln Phe Glu Glu		
2515	2520	2525
Ser Gln Gly Arg Thr Ser Ser Lys Thr Ala Phe Tyr Gln Ala Leu Gln		
2530	2535	2540
Asn Ser Leu Gly Gly Glu Asp Ser Asp Ala Arg Val Glu Ala Ala Ala		
2545	2550	2555
Thr Trp Tyr Tyr Ser Leu Glu His Ser Thr Asp Asp Tyr Ala Ser Phe		
2565	2570	2575
Ser Arg Ala Leu Glu Asn Ala Thr Arg Asp Tyr Phe Ile Ile Cys Pro		
2580	2585	2590
Ile Ile Asp Met Ala Ser Ala Trp Ala Lys Arg Ala Arg Gly Asn Val		
2595	2600	2605
Phe Met Tyr His Ala Pro Glu Asn Tyr Gly His Gly Ser Leu Glu Leu		
2610	2615	2620
Leu Ala Asp Val Gln Phe Ala Leu Gly Leu Pro Phe Tyr Pro Ala Tyr		
2625	2630	2635
Glu Gly Gln Phe Ser Leu Glu Glu Lys Ser Leu Ser Leu Lys Ile Met		
2645	2650	2655
Gln Tyr Phe Ser His Phe Ile Arg Ser Gly Asn Pro Asn Tyr Pro Tyr		
2660	2665	2670
Glu Phe Ser Arg Lys Val Pro Thr Phe Ala Thr Pro Trp Pro Asp Phe		
2675	2680	2685
Val Pro Arg Ala Gly Gly Glu Asn Tyr Lys Glu Phe Ser Glu Leu Leu		
2690	2695	2700
Pro Asn Arg Gln Gly Leu Lys Lys Ala Asp Cys Ser Phe Trp Ser Lys		

2705	2710	2715	2720
Tyr Ile Ser Ser Leu Lys Thr Ser Ala Asp Gly Ala Lys Gly Gly Gln			
	2725	2730	2735
Ser Ala Glu Ser Glu Glu Glu Glu Leu Thr Ala Gly Ser Gly Leu Arg			
	2740	2745	2750
Glu Asp Leu Leu Ser Leu Gln Glu Pro Gly Ser Lys Thr Tyr Ser Lys			
	2755	2760	2765

<210> 2
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2
Pro Lys Arg Cys Pro Arg Ser Cys Glu Ile Arg Asn Arg Arg Leu Leu
1 5 10 15
His Gly Val
<210> 3
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3
Ala Glu Arg Arg Phe Gln Ala Pro Glu Pro Leu Asn Trp Thr Gly Ser
1 5 10 15
Trp Asp Ala Ser Lys Pro Arg Ala
20

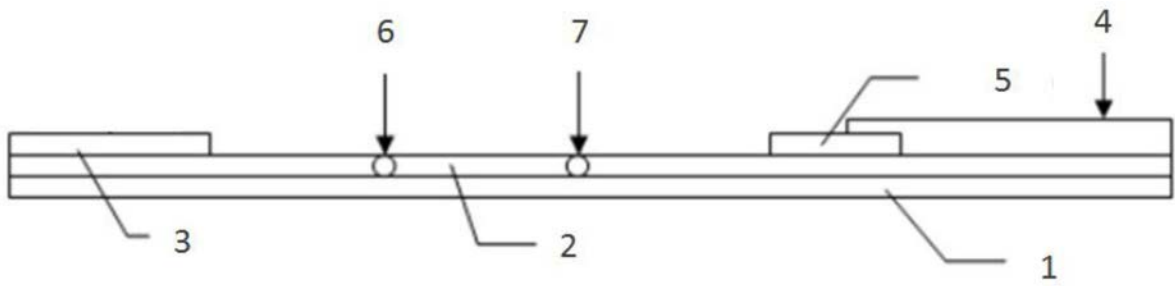


图1

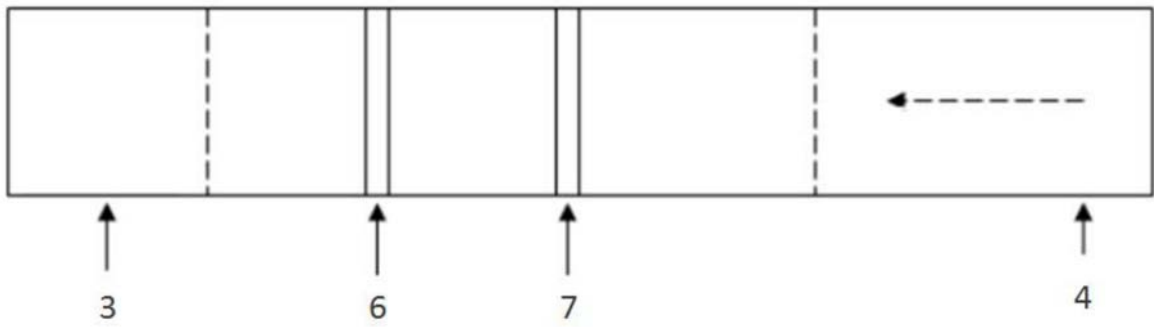


图2

专利名称(译)	一种术中快速鉴别甲状腺乳头状癌颈淋巴结转移的方法		
公开(公告)号	CN110275014A	公开(公告)日	2019-09-24
申请号	CN201910663876.7	申请日	2019-07-23
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
[标]发明人	邹贤 周彬 李文新 施龙顺 包建东 朱国华 高芸 王国瑞 李秀龙 杨克勤		
发明人	邹贤 周彬 李文新 施龙顺 包建东 朱国华 高芸 王国瑞 李秀龙 杨克勤		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/558		
代理人(译)	曹静 葛宏		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种快速检测人甲状腺球蛋白(Tg)从而快速鉴别甲状腺乳头状癌颈淋巴结转移的荧光免疫层析试纸，该试纸通过双抗体夹心法和荧光免疫层析技术检测人Tg，所述抗体是利用特定的抗原表位肽制备获得。本发明能够快速准确地检测待测物中的人Tg，操作简便、快速，检测范围宽、特异性高、灵敏度好。

