



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110196332 A

(43)申请公布日 2019.09.03

(21)申请号 201910430877.7

(22)申请日 2019.05.22

(71)申请人 艾托金生物医药(苏州)有限公司

地址 215001 江苏省苏州市工业园区星湖
街218号生物纳米科技园B3-401室

(72)发明人 常小迦 施丽君 郑雅婷 时成龙

(74)专利代理机构 北京精金石知识产权代理有
限公司 11470

代理人 张黎

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

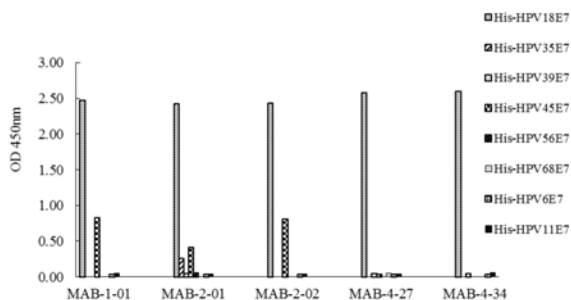
权利要求书2页 说明书8页
序列表8页 附图2页

(54)发明名称

一种检测多亚型HPV E7蛋白的方法及其应
用

(57)摘要

本发明公开了一种检测多亚型HPV E7蛋白的方法及其应用,涉及蛋白检测领域。该检测方法将2种兔源单克隆抗体混合作为第一抗体,筛选能够与兔源单抗成功配对并识别多种亚型HPV E7蛋白的鼠源单克隆抗体作为第二抗体,可识别HPV18、HPV35、HPV39、HPV45、HPV56、HPV58、HPV68中的一种或多种亚型。本发明制备得到的鼠源单克隆抗体效价高,特异性好,利用本发明提供的检测方法、检测卡和免疫检测试剂盒检测样品中HPV E7蛋白含量,灵敏度显著提高、操作简单、方便。



1. 一种采用抗体检测HPV E7蛋白抗原的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将固定化的第一抗体与样品中的HPV E7蛋白接触,形成第一复合物;

(2) 将(1)中的第一复合物与第二抗体接触形成第二复合物;

(3) 检测(2)中的第二复合物;

所述第一抗体为针对HPV E7蛋白的兔源单克隆抗体;

所述第二抗体为带有检测标记的针对HPV E7蛋白的鼠源单克隆抗体;

所述检测标记为生物素标记、胶体金标记、辣根过氧化物标记、放射性核素标记、荧光素标记或纳米粒子标记。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的HPV是HPV18、HPV35、HPV39、HPV45、HPV56、HPV58、HPV68中的一种或多种亚型。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的第一抗体为包含2种针对HPV E7蛋白不同抗原表位的兔源单克隆抗体;

所述的兔源单克隆抗体包括克隆号为RAB-139和RAB-034的兔源单克隆抗体。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的鼠源单克隆抗体能够与兔源单克隆抗体成功配对并识别多种亚型HPV E7蛋白的鼠源单克隆抗体。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的鼠源单克隆抗体的制备方法包括以下步骤:

(A1) 动物免疫:免疫原为GST-HPV18E7重组蛋白以完全弗氏佐剂乳化,皮下或腹腔注射方式免疫小鼠,免疫剂量为50 μ g/只,免疫三次后测定血清效价,选取抗体效价最高的小鼠作为免疫小鼠;

(A2) 细胞融合与培养:收集(A1)获得的免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞进行融合,融合比率为脾细胞:骨髓瘤细胞=5:1,HAT培养基选择性培养,采用His-HPV18E7包被的酶标板进行ELISA检测,得到阳性融合细胞;

(A3) 筛选和克隆:取(A2)获得的阳性融合细胞利用有限稀释法进行亚克隆,得到稳定的阳性细胞株,以His-HPV18E7、His-HPV16E7、His-HPV45E7、His-HPV39/59E7混合蛋白和His-HPV6/11E7混合蛋白为抗原,筛选阳性细胞株,获得结合HPV E7蛋白的杂交瘤细胞;

(A4) 单克隆抗体的制备:用液体石蜡致敏小鼠,腹腔注射(A3)得到的杂交瘤细胞的悬液,细胞用量为 1×10^6 /只,一周后抽取小鼠腹水,腹水经去除纤维蛋白处理、纯化、透析,检测抗体蛋白浓度、纯度、抗体效价,得到鼠源单克隆抗体;

所述的GST-HPV18E7重组蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示;

所述的His-HPV16E7的重组蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示;

所述的His-HPV18E7的重组蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示;

所述的His-HPV39E7的重组蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示;

所述的His-HPV45E7的重组蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示;

所述的His-HPV59E7的重组蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示;

所述的His-HPV6E7的重组蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示;

所述的His-HPV11E7的重组蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的样品为人或动物组织样品、肿瘤切除样品、宫颈脱落细胞、液基细胞样本。

7. 一种用于检测HPV E7蛋白的检测板,其特征在于,所述检测板为酶标板或侧流式检测板。

8. 根据权利要求7所述的检测板,其特征在于,所述的酶标板中包被有权利要求1所述的第一抗体;

所述的侧流式检测板包括基片和测试条,测试条粘贴在基片上,测试条由滤样纸、层析材料、硝酸纤维素膜和吸水纸依次搭接组成;

所述的滤样纸为抗原加样区,所述的层析材料为权利要求1所述的第二抗体结合区,所述的硝酸纤维素膜上可固定权利要求1所述的第一抗体。

9. 一种用于检测HPV E7蛋白的试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒包括权利要求7所述的检测板、权利要求1所述的第一抗体、权利要求1所述的第二抗体。

10. 根据权利要求8所述的试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒还包括缓冲液和细胞裂解试剂。

一种检测多亚型HPV E7蛋白的方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白检测领域,尤其涉及到一种检测多亚型HPV E7蛋白的方法及其应用。

背景技术

[0002] 人乳头瘤病毒(Human papillomavirus,HPV)是一种小DNA病毒,具有很强的嗜鳞状上皮的特性,主要侵犯鳞状上皮的基底层细胞和位于宫颈转化区的化生细胞。由3个基因区组成,包括早期区(Early Region,E区)、晚期区(Late Region,L区)区和与非编码区(Uncoding Region,UCR)或上游调控区(URR)。E区按顺序为E6、E7、E1、E2、E3、E4和E5共7个基因,其中E6和E7是HPV的主要致癌基因,与病毒细胞转化功能及致癌性有关。目前已知HPV的有一百多个型别,根据致癌性,分为高危型HPV和低危型HPV两类。高危HPV感染(如16和18型)导致大多数宫颈、阴茎、会阴部、阴道、肛门及口咽部癌和癌前病变;而非致癌性、低危型的HPV感染(如6和11型)会导致生殖器疣和复发性呼吸道乳头瘤样增生。与人类肿瘤相关的高危型HPV有四十几种,其中常见的主要包括HPV16,18,31,33,35,39,45,52,56,58,59,68等型别。

[0003] 宫颈癌是目前病因唯一明确的肿瘤,它是HPV持续感染的结果。癌症发生过程中HPV DNA整合入人体细胞基因组内,转化型细胞内开始持续表达HPV E6和E7蛋白。HPV E6蛋白通过E6-AP(E6 associated protein)的介导,结合并降解抑癌蛋白p53;HPV E7蛋白与抑癌蛋白pRb结合,使pRb释放核转录因子E2F,致使细胞过度增殖,细胞周期调控失控,导致细胞的永生化和促进宫颈癌的发生。在基于HPV E7氨基酸序列类似性比较的系统进化树中,存在两大序列高度同源的种群:HPV16种系包括HPV31和HPV35;HPV18种系包括HPV45和HPV59。

[0004] Arbor Vita公司的AV Advantage™ HPV E6 Test是一种快速测试高危型HPV16、18、45的E6癌蛋白的快速检测技术。利用宫颈拭子标本中提取细胞裂解产物,通过毛细管作用力吸至检测条带上,从而检测样本中的E6蛋白。该技术采用的是抗体配对的原理,其核心是特异性结合E6蛋白的单克隆对抗体的选择。中国专利CN105866420B提出了配对检测HPV18 E7的鼠源单克隆抗体对。中国专利CN108218983A公开了一种抗HPV18型E7蛋白的单克隆抗体、检测试纸和检测试剂盒。现有的HPV检测技术中,大多只能检测单一的HPV亚型,在同时检测多种亚型时需要多种单克隆抗体联合使用,且区分亚型的效果并不理想,实际操作复杂、成本较高。

[0005] 由于HPV高危亚型较多,现有的技术在同时检测多种亚型时存在一定的缺陷,因此,亟需开发一种能够同时识别多种亚型,且特异性强、灵敏度高的检测技术。

发明内容

[0006] 本发明针对现有技术存在的问题,提供一种能够同时检测多种亚型HPV E7蛋白,且特异性强、灵敏度高的检测方法。

- [0007] 本发明一方面提供了一种采用抗体检测HPV E7蛋白抗原的方法,包括以下步骤:
- [0008] (1) 将固定化的第一抗体与样品中的HPV E7蛋白接触,形成第一复合物;
- [0009] (2) 将(1)中的第一复合物与第二抗体接触形成第二复合物;
- [0010] (3) 检测(2)中的第二复合物;
- [0011] 所述第一抗体为针对HPV E7蛋白的兔源单克隆抗体;
- [0012] 所述第二抗体为带有检测标记的针对HPV E7蛋白的鼠源单克隆抗体;
- [0013] 所述检测标记为生物素标记、胶体金标记、辣根过氧化物标记、放射性核素标记、荧光素标记或纳米粒子标记;优选地,所述检测标记为辣根过氧化物标记。
- [0014] 优选地,所述的HPV是HPV18、HPV35、HPV39、HPV45、HPV56、HPV58、HPV68中的一种或多种亚型。
- [0015] 优选地,所述的第一抗体为包含2种针对HPV E7蛋白不同抗原表位的兔源单克隆抗体;所述的兔源单克隆抗体包括克隆号为RAB-139和RAB-034的兔源单克隆抗体,分别选自中国专利申请号为CN2016108593095和申请号为CN2015104314074中披露的单克隆抗体;克隆号为RAB-139和RAB-034的兔源单克隆抗体的重量比为1:1。
- [0016] 优选地,所述的鼠源单克隆抗体能够与兔源单克隆抗体成功配对并识别多种亚型HPV E7蛋白的鼠源单克隆抗体。
- [0017] 所述的鼠源单克隆抗体是克隆号为MAB-1-01、MAB-1-03、MAB-2-01、MAB-2-02、MAB-4-03、MAB-4-04、MAB-4-05、MAB-4-25、MAB-4-26、MAB-4-27、MAB-4-28、MAB-4-29和MAB-4-34的鼠源单克隆抗体中的一种;优选为MAB-2-01。
- [0018] 优选地,所述的鼠源单克隆抗体的制备方法包括以下步骤:
- [0019] (A1) 动物免疫:免疫原为GST-HPV18E7重组蛋白以完全弗氏佐剂乳化,皮下或腹腔注射方式免疫小鼠,免疫剂量为50 μ g/只,免疫三次后测定血清效价,选取抗体效价最高的小鼠作为免疫小鼠;
- [0020] (A2) 细胞融合与培养:收集(A1)获得的免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞进行融合,融合比率为脾细胞:骨髓瘤细胞=5:1,HAT培养基选择性培养,采用His-HPV18E7包被的酶标板进行ELISA检测,得到阳性融合细胞;
- [0021] (A3) 筛选和克隆:取(A2)获得的阳性融合细胞利用有限稀释法进行亚克隆,得到稳定的阳性细胞株,以His-HPV18 E7、His-HPV16 E7、His-HPV45 E7、His-HPV39/59 E7混合蛋白和His-HPV6/11 E7混合蛋白为抗原,筛选阳性细胞株,获得结合HPV E7蛋白的杂交瘤细胞;
- [0022] (A4) 单克隆抗体的制备:用液体石蜡致敏小鼠,腹腔注射(A3)得到的杂交瘤细胞的悬液,细胞用量为1 $\times 10^6$ /只,一周后抽取小鼠腹水,腹水经去除纤维蛋白处理、纯化、透析,检测抗体蛋白浓度、纯度、抗体效价,得到鼠源单克隆抗体;
- [0023] 所述的GST-HPV18 E7重组蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示;
- [0024] 所述的His-HPV16 E7的重组蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示;
- [0025] 所述的His-HPV18 E7的重组蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示;
- [0026] 所述的His-HPV39 E7的重组蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示;
- [0027] 所述的His-HPV45 E7的重组蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示;
- [0028] 所述的His-HPV59 E7的重组蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示;

[0029] 所述的His-HPV6 E7的重组蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示;

[0030] 所述的His-HPV11 E7的重组蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示。

[0031] 具体地,所述的鼠源单克隆抗体的制备方法包括以下步骤:

[0032] (A1) 动物免疫:取4-6周雌性BALB/C小鼠进行免疫,免疫原为GST-HPV18E7蛋白以完全弗氏佐剂乳化,皮下或腹腔注射方式免疫,免疫剂量为50 μ g/只,免疫三次后取尾血,采用His-HPV18 E7重组蛋白(5 μ g/mL)作为检测抗原包被ELISA法梯度稀释测定血清效价,根据结果确定是否加强免疫,选取抗体效价最高的小鼠作为免疫小鼠;

[0033] (A2) 细胞融合与培养:按常规方法收集(A1)获得的免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/0进行融合,融合比率为脾细胞:骨髓瘤细胞SP2/0=5:1,HAT培养基选择性培养,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂恒温培养箱中培养,用HAT培养基全换液3次,待融合细胞长满一个显微镜视野时,采用His-HPV18E7包被的酶标板进行ELISA检测,得到阳性融合细胞;

[0034] (A3) 筛选和克隆:取(A2)获得的阳性融合细胞利用有限稀释法进行亚克隆,取一块96孔细胞培养板,每孔中加入150 μ l HAT培养液,对需亚克隆的阳性融合细胞轻轻吹打悬浮,吸取100 μ l细胞悬液加到96孔细胞板中,从第一孔开始倍比稀释;细胞计数选取孔中约有100个细胞的孔并加入到含有6mL HAT培养液的加样槽中,按100 μ l/孔加到铺饲养层的细胞板中,加前三列;再补加HAT培养基3mL,100 μ l/孔加到铺饲养层的细胞板中,加中三列;再补加HAT培养基5mL,100 μ l/孔加到铺饲养层的细胞板中,加后六列。计算每块板的阳性率达到100%时,得到稳定的阳性细胞株,以His-HPV18 E7、His-HPV16 E7、His-HPV45 E7、His-HPV39/59 E7混合蛋白和His-HPV6/11 E7混合蛋白为抗原,筛选阳性细胞株,获得结合HPV E7蛋白的杂交瘤细胞;

[0035] (A4) 单克隆抗体的制备:大量培养(A3)得到的杂交瘤细胞,8-10周龄的BALB/雌性小鼠预先用液体石蜡致敏,腹腔注射杂交瘤细胞悬液,细胞用量为1 $\times 10^6$ /只,一周后抽取小鼠腹水,腹水经去除纤维蛋白处理后,以ProteinA/G亲和柱层析法纯化,收集蛋白峰流出液,用磷酸盐缓冲液(PBS)透析,用紫外分光光度计OD260,280测定抗体蛋白浓度,SDS-PAGE检测纯度,间接ELISA检测抗体效价,得到鼠源单克隆抗体。

[0036] 优选地,所述的样品包括但不限于人或动物组织样品、肿瘤切除样品、宫颈脱落细胞、液基细胞样本;其中肿瘤包括宫颈、阴茎、会阴部、阴道、肛门及口咽部癌和癌前病变等相关肿瘤。

[0037] 本发明另一方面提供了一种用于检测HPV E7蛋白的检测板,所述检测板为酶标板或侧流式检测板。

[0038] 优选地,所述的酶标板中包被有上述的第一抗体;第一抗体的包被浓度为1 μ g/mL。

[0039] 所述的侧流式检测板包括基片和测试条,测试条粘贴在基片上,测试条由滤样纸、层析材料、硝酸纤维素膜和吸水纸依次搭接组成;

[0040] 所述的滤样纸为抗原加样区,所述的层析材料为上述的第二抗体结合区,所述的硝酸纤维素膜上可固定上述的第一抗体;所述第一抗体固定于所述测试条,所述第二抗体可流动的设置为所述测试条;所述“固定”是指进行检测时所述第一检测抗体不会随液体在所述检测板上流动,所述“可流动”是指,进行检测时所述第二抗体可以随液体在所述检测板上流动。第一抗体的使用浓度为1 μ g/mL,第二抗体使用浓度为1 μ g/mL。本发明另一方面还提供了一种用于检测HPV E7蛋白的试剂盒,所述的试剂盒包括上述的检测板、上述的第一

抗体、上述的第二抗体。

[0041] 优选地,所述的试剂盒还包括缓冲液和细胞裂解试剂,

[0042] 所述的缓冲液包括但不限于Tris-HCl缓冲液、PBS缓冲液等,所述的缓冲液和细胞裂解试剂均可由市场购得。

[0043] 本发明另一方面还提供了上述的试剂盒在非诊断目的的肿瘤细胞HPV E7蛋白检测中的应用。

[0044] 与现有技术相比,本发明的积极和有益效果在于:

[0045] 本发明提供了一种能够同时检测多种亚型HPV E7蛋白的方法、鼠源单克隆抗体及其在检测卡和免疫检测试剂盒中的应用。本发明制备得到的鼠源单克隆抗体效价高,能够特异性的与HPV18、HPV35、HPV39、HPV45、HPV56、HPV58、HPV68多种亚型的E7蛋白进行结合;本发明使用了能够分别识别多亚型的兔源单克隆抗体和鼠源单抗,这些亚型包括低危HPV和高危HPV亚型,当兔源和鼠源抗体配对成功后仅识别高危HPV亚型而不识别低危HPV亚型,在保证检测方法特异性的基础上,显著提高了检测的灵敏度;另一方面,利用本发明提供的检测方法、检测卡和免疫检测试剂盒检测样品中HPV E7蛋白含量,操作简单、方便。

附图说明

[0046] 图1是实施例1中杂交瘤细胞株的ELISA检测结果。

[0047] 图2是实施例2中鼠源单克隆抗体和兔源单克隆抗体的配对ELISA检测结果。

[0048] 图3是实施例3中单克隆抗体识别高危HPV E7蛋白的ELISA检测结果。

[0049] 图4是双抗夹心ELISA结合的HPV E7蛋白亚型分析检测结果。

具体实施方式

[0050] 以下非限制性实施例可以使本领域的普通技术人员更全面的理解本发明,但不以任何方式限制本发明。本领域的技术人员可以明白,根据本申请公开的内容结合本领域技术常识,本申请公开的氨基酸序列可以按照本领域常用的其他方法合成,例如通过化学合成的方法得到本申请公开的序列。下述内容仅仅是对本申请要求保护的范围的示例性说明,本领域技术人员可以根据所公开的内容对本申请的发明作出多种改变和修饰,而其也应当属于本申请要求保护的范围之内。

[0051] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常为本领域常规技术手段,或按照常规条件如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0052] 本发明所用的ELISA检测方法具体如下:

[0053] (1) 包被抗原,100 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C过夜;

[0054] (2) 1 $\times$ PBST (1 $\times$ PBS配方为:氯化钠(NaCl) 5g,氯化钾(KCl), 0.125g磷酸二氢钾(KH₂PO₄) 0.125g,磷酸氢二钠(Na₂HPO₄ · 12H₂O) 1.81g,蒸馏水加至1000mL;用1M HCl调pH至7.2,配制成1 $\times$ PBS。使用前加入1mL的Tween-20到1000mL 1 $\times$ PBS中,搅拌混匀,为1 $\times$ PBST洗液。)洗涤一次,拍干;

[0055] (3) 加入5%脱脂奶粉/PBS封闭,300 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C, 2h, 1 $\times$ PBST洗涤三次,拍干;

[0056] (4) 每孔分别加入100 μ l浓度为1 μ g/ml的抗体或有抗体效应的溶液(血清、杂交瘤细胞制备的溶液或单克隆抗体等),37 $^{\circ}$ C孵育1h,1 $\times$ PBST洗涤三次,拍干;

[0057] (5) 每孔加入羊抗鼠IgG-HRP二抗(购自:Sigma公司,货号:A2554),采用5%BSA/PBS 1:10000进行稀释,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h,1 $\times$ PBST洗涤三次,拍干;

[0058] (6) TMB显色:TMB A液(取醋酸钠(CH_3COONa) 13.6g,柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 1.6g,双氧水(H_2O_2 30%) 0.3mL,蒸馏水加至500mL)和B液(取乙二醇四乙酸二钠(EDTA-Na_2) 0.2g,柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.95g,四甲基联苯胺(TMB) 0.2g,蒸馏水加至500mL)等体积混合,100 μ l/孔,室温显色5min;

[0059] (7) 加入2M H_2SO_4 ,50 μ l/孔终止反应,用酶标仪在波长为450nm处检测OD值。

[0060] 实施例1:HPV18E7蛋白单克隆抗体的制备

[0061] (A1) 动物免疫:取九只4-6周雌性BALB/C小鼠进行免疫,免疫原为GST-HPV18E7蛋白(GST-HPV18E7重组蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示)以完全弗氏佐剂乳化,皮下或腹腔注射方式免疫,免疫剂量为50 μ g/只,免疫三次后取尾血,采用His-HPV18E7重组蛋白(5 μ g/mL)作为检测抗原包被,ELISA法梯度稀释测定血清效价,根据结果确定是否加强免疫,选取抗体效价最高的小鼠作为免疫小鼠。

[0062] (A2) 细胞融合与培养:按常规方法收集(A1)获得的免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/0进行融合,融合比率为脾细胞:骨髓瘤细胞SP2/0=5:1,HAT培养基选择性培养,置于37 $^{\circ}$ C,5% CO_2 恒温培养箱中培养,用HAT培养基全换液3次,待融合细胞长满一个显微镜视野时,采用His-HPV18E7包被的酶标板进行ELISA检测,ELISA检测结果以OD值大于1的作为阳性孔,并进行复检。经过两次连续检测为阳性后,确定该阳性孔细胞为阳性融合细胞。

[0063] (A3) 筛选和克隆:取(A2)获得的阳性融合细胞利用有限稀释法进行亚克隆,取一块96孔细胞培养板,每孔中加入150 μ l HAT培养液,对需亚克隆的阳性融合细胞轻轻吹打悬浮,吸取100 μ l细胞悬液加到96孔细胞板中,从第一孔开始倍比稀释;细胞计数,选取孔中约有100个细胞的孔并加入到含有6mLHAT培养液的加样槽中,按100 μ l/孔加到铺饲养层的细胞板中,加前三列;再补加HAT培养基3mL,100 μ l/孔加到铺饲养层的细胞板中,加中三列;再补加HAT培养基5mL,100 μ l/孔加到铺饲养层的细胞板中,加后六列。计算每块板的阳性率达到100%时,得到稳定的阳性细胞株,以His-HPV16 E7、His-HPV18 E7、His-HPV45 E7、His-HPV39/59 E7混合蛋白和His-HPV6/11 E7混合蛋白(His-HPV16 E7、His-HPV18 E7、His-HPV39 E7、His-HPV45 E7、His-HPV59 E7、His-HPV6 E7和His-HPV11 E7的重组蛋白氨基酸序列分别如SEQ ID NO:2、3、7、8、12、14和15所示)为抗原,ELISA检测,筛选阳性细胞株,ELISA检测结果如图1所示,共获得13株结合免疫原蛋白的杂交瘤细胞株1-01,1-03,2-01,2-02,4-03,4-04,4-05,4-25,4-26,4-27,4-28,4-29,4-34。转移杂交瘤细胞株到细胞培养板中,扩大培养,并冻存。

[0064] (A4) 单克隆抗体的制备:大量培养(A3)得到的杂交瘤细胞,8-10周龄的BALB/C雌性小鼠预先用液体石蜡致敏,腹腔注射杂交瘤细胞悬液,细胞用量为 1×10^6 /只,一周后观察,待小鼠腹部明显膨大到一定程度后,抽取腹水。腹水经去除纤维蛋白处理后,以ProteinA/G亲和柱层析法纯化,收集蛋白峰流出液,用磷酸盐缓冲液(PBS)透析,用紫外分光光度计OD260,280测定抗体蛋白浓度,SDS-PAGE检测纯度,间接ELISA检测抗体效价,得到鼠源单克隆抗体。对鼠源单克隆抗体的IgG亚型进行鉴定:纯化单克隆抗体采用PBS 1:

10000稀释,按照Sigma公司的亚型鉴定试剂盒说明书操作,13种鼠源单克隆抗体的亚型见表1。

[0065] 表1:鼠源单克隆抗体IgG亚型

[0066]

克隆号	亚型
MAB-1-01	IgG1
MAB-1-03	IgG1
MAB-2-01	IgG2a
MAB-2-02	IgG1
MAB-4-03	IgG2a
MAB-4-04	IgG2b
MAB-4-05	IgG2b
MAB-4-25	IgG3
MAB-4-26	IgG1
MAB-4-27	IgG2b
MAB-4-28	IgG1
MAB-4-29	IgG1
MAB-4-34	IgG2a

[0067] 实施例2:鼠源单克隆抗体和兔源单克隆抗体的配对检测

[0068] (1) 兔源单克隆抗体RAB-139 (中国专利申请号为CN201610859309披露的单克隆抗体) 和RAB-034 (中国专利申请号为CN2015104314074披露的单克隆抗体) 各1 μ g/mL混合包被,100 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C过夜;

[0069] (2) 1 $\times$ PBST洗涤一次,拍干;

[0070] (3) 加入5%脱脂奶粉/PBS封闭,300 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C,2h,1 $\times$ PBST洗涤三次,拍干;

[0071] (4) 分别加入His-HPV18 E7和His-HPV16 E7重组蛋白各1 μ g/mL,100 μ l/孔作为抗原,37 $^{\circ}$ C孵育1h,1 $\times$ PBST洗涤三次,拍干;

[0072] (5) 分别加入实施例1得到的13种单克隆抗体1 μ g/ml,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h,1 $\times$ PBST洗涤三次,拍干;

[0073] (6) 每孔加入羊抗鼠-HRP二抗(购自:Sigma公司,货号:A2554),采用5%BSA/PBS 1:10000进行稀释,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h,1 $\times$ PBST洗涤三次,拍干;

[0074] (7) TMB显色:TMB A液和B液等体积混合,100 μ l/孔,室温显色5min;

[0075] (8) 加入2M H₂SO₄,50 μ l/孔终止反应,用酶标仪在波长为450nm处检测OD值。

[0076] 检测结果如图2所示,除MAB-4-25外,其余单克隆抗体均能特异地与HPV18E7蛋白结合。

[0077] 实施例3:筛选能够识别多种亚型HPV E7蛋白的鼠源单克隆抗体

[0078] 3.1单克隆抗体识别高危HPV E7蛋白的ELISA检测结果

[0079] 根据杂交瘤结合HPV重组蛋白亚型数据,选取纯化后的单抗MAB-1-01,MAB-2-01,MAB-2-02,MAB-4-03,MAB-4-27,MAB-4-28和MAB-4-34这7种单抗进行后续实验。

[0080] 利用ELISA检测方法进行检测,分别用His-HPV16 E7、His-HPV18 E7、His-HPV31

E7、His-HPV33 E7、His-HPV35 E7、His-HPV39 E7、His-HPV45 E7、His-HPV52 E7、His-HPV56 E7、His-HPV58 E7、His-HPV59 E7、His-HPV68 E7、His-HPV6 E7和His-HPV11 E7重组蛋白(其重组蛋白氨基酸序列分别如SEQ ID NO:2-15所示)作为抗原,1 μ g/mL包板,4℃过夜;PBST洗涤拍干后,加入5%脱脂奶粉封闭,37℃作用2h;PBST洗涤拍干后,分别加入上述7种鼠源单克隆抗体(1 μ g/mL)和兔源单克隆抗体RAB-139和RAB-034混合液浓度为各1 μ g/mL,并设置阴性对照组(阴性对照组加入PBS缓冲液)37℃反应1h;PBST洗涤拍干后,再加入羊抗鼠IgG-HRP二抗,TMB显色和2M H₂SO₄终止反应;OD450nm处读数。检测结果如图3所示,各单克隆抗体识别HPV亚型如表2所示。

[0081] 表2:各单克隆抗体识别HPV亚型

[0082]

抗体克隆号	HPV亚型
RAB-139和RAB-034	HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV52, HPV68和HPV6
MAB-1-01	HPV18和HPV45
MAB-2-01	HPV18, HPV35, HPV39, HPV45, HPV56, HPV11
MAB-2-02	HPV18和HPV45
MAB-4-03	HPV18
MAB-4-27	HPV18E7, HPV39, HPV45和HPV68
MAB-4-28	HPV18
MAB-4-34	HPV18和HPV39

[0083] 3.2双抗夹心ELISA结合的HPV E7蛋白亚型分析

[0084] 根据3.1中的结果选取MAB-1-01, MAB-2-01, MAB-2-02, MAB-4-27和MAB-4-34这5株鼠源单克隆抗体进行后续实验。

[0085] 利用ELISA检测方法进行检测,兔源单克隆抗体RAB-139和RAB-034各1 μ g/mL混合包被,4℃过夜;PBST洗涤拍干后,加入5%脱脂奶粉封闭,37℃作用2h;PBST洗涤拍干后,分别加入上述5株鼠源单克隆抗体各自识别的重组蛋白以及低危HPV6和HPV11E7各1 μ g/mL,100 μ l/孔作为抗原,37℃反应1h;PBST洗涤拍干后,分别加入上述5株鼠源单克隆抗体(1 μ g/mL),37℃反应1h;PBST洗涤拍干后,再加入羊抗鼠-HRP二抗、TMB显色和2M H₂SO₄终止;OD450nm处读数,检测结果如图4所示。当采用兔源混合单抗包被时,各单克隆抗体识别HPV亚型如表3所示。

[0086] 表3:各单克隆抗体识别HPV亚型

[0087]

抗体克隆号	HPV亚型
MAB-1-01	HPV18和HPV45
MAB-2-01	HPV18, HPV35和HPV45
MAB-2-02	HPV18和HPV45
MAB-4-27	HPV18
MAB-4-34	HPV18

[0088] 检测结果表明,本发明提供的鼠源单克隆抗体MAB-2-01能够与兔源单克隆抗体配对成功,且能够同时有效识别多种高危HPV亚型的E7蛋白,而不识别低危HPV亚型,在保证检

测方法特异性的基础上,显著提高了检测的灵敏度。

[0089] 实施例4:一种用于检测HPV E7蛋白的检测板

[0090] 4.1酶标板

[0091] 在市售的常规酶标板中包被第一抗体(兔源单克隆抗体RAB-139和RAB-034各1 μ g/mL),100 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C过夜,1 $\times$ PBST洗涤拍干,得到包被有第一抗体的酶标板。

[0092] 4.2侧流式检测板

[0093] 侧流式检测板包括基片和测试条,测试条粘贴在基片上,测试条由滤样纸、层析材料、硝酸纤维素膜和吸水纸依次搭接组成;

[0094] 所述的滤样纸为抗原加样区,所述的层析材料为上述的第二抗体结合区,所述的硝酸纤维素膜上可固定上述的第一抗体。

[0095] 实施例5:一种用于检测HPV E7蛋白的试剂盒

[0096] 5.1含酶标板的检测试剂盒

[0097] 该试剂盒包括实施例4中4.1所述的酶标板、独立包装的第二抗体(鼠源单克隆抗体MAB-2-01)、细胞裂解试剂(50mM Tris-HCl,150mM NaCl,1%NP-40,0.5%脱氧胆酸钠,0.1%SDS)以其其它缓冲溶液(PBS缓冲液或Tris-HCl缓冲液等)。

[0098] 另外,该试剂盒还包括说明书,在说明书中记载该试剂盒的使用方法。

[0099] 5.2含侧流式检测板的检测试剂盒

[0100] 该试剂盒包括实施例4中4.2所述的侧流式检测板、独立包装的第一抗体(兔源单克隆抗体RAB-139和RAB-034,浓度比为1:1的混合液)、独立包装的第二抗体(鼠源单克隆抗体MAB-2-01)、细胞裂解试剂(50mM Tris-HCl,150mM NaCl,1%NP-40,0.5%脱氧胆酸钠,0.1%SDS)以其其它缓冲溶液(PBS缓冲液或Tris-HCl缓冲液等)。

[0101] 另外,该试剂盒还包括说明书,在说明书中记载该试剂盒的使用方法。

[0102] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

序列表

- <110> 艾托金生物医药(苏州)有限公司
 <120> 一种检测多亚型HPV E7蛋白的方法及其应用
 <130> 2019
 <160> 15
 <170> SIP0SequenceListing 1.0
 <210> 1
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> 人工合成(Artificial)
 <400> 1

```

Met Tyr Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu His Leu Glu
1           5           10           15
Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Cys His Glu Gln Leu Ser
           20           25           30
Asp Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His
           35           40           45
Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met
           50           55           60
Cys Cys Lys Cys Glu Ala Arg Ile Glu Leu Val Val Glu Ser Ser Ala
65           70           75           80
Asp Asp Leu Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Ser Thr Leu Ser Phe
           85           90           95
Val Cys Pro Trp Cys Ala Ser Gln Gln
           100          105

```

- <210> 2
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> 人工合成(Artificial)
 <400> 2

```

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
1           5           10           15
Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Ser Asp Ser Ser
           20           25           30
Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
           35           40           45
Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
           50           55           60

```

Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
 65 70 75 80
 Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
 85 90 95

Lys Pro

<210> 3

<211> 105

<212> PRT

<213> 人工合成(Artificial)

<400> 3

Met Tyr Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu His Leu Glu
 1 5 10 15
 Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Cys His Glu Gln Leu Ser
 20 25 30
 Asp Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His
 35 40 45
 Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met
 50 55 60
 Cys Cys Lys Cys Glu Ala Arg Ile Glu Leu Val Val Glu Ser Ser Ala
 65 70 75 80
 Asp Asp Leu Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Ser Thr Leu Ser Phe
 85 90 95
 Val Cys Pro Trp Cys Ala Ser Gln Gln
 100 105

<210> 4

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工合成(Artificial)

<400> 4

Met Arg Gly Glu Thr Pro Thr Leu Gln Asp Tyr Val Leu Asp Leu Gln
 1 5 10 15
 Pro Glu Ala Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Pro Asp Ser Ser
 20 25 30
 Asp Glu Glu Asp Val Ile Asp Ser Pro Ala Gly Gln Ala Lys Pro Asp
 35 40 45
 Thr Ser Asn Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Gln Cys Glu Ser Thr
 50 55 60
 Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr Gln Val Asp Ile Arg Ile Leu Gln
 65 70 75 80

Glu Leu Leu Met Gly Ser Phe Gly Ile Val Cys Pro Asn Cys Ser Thr
 85 90 95

Arg Leu

<210> 5

<211> 97

<212> PRT

<213> 人工合成(Artificial)

<400> 5

Met Arg Gly His Lys Pro Thr Leu Lys Glu Tyr Val Leu Asp Leu Tyr
 1 5 10 15

Pro Glu Pro Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Ser Asp Ser Ser
 20 25 30

Asp Glu Asp Glu Gly Leu Asp Arg Pro Asp Gly Gln Ala Gln Pro Ala
 35 40 45

Thr Ala Asp Tyr Tyr Ile Val Thr Cys Cys His Thr Cys Asn Thr Thr
 50 55 60

Val Arg Leu Cys Val Asn Ser Thr Ala Ser Asp Leu Arg Thr Ile Gln
 65 70 75 80

Gln Leu Leu Met Gly Thr Val Asn Ile Val Cys Pro Thr Cys Ala Gln
 85 90 95

Leu

<210> 6

<211> 99

<212> PRT

<213> 人工合成(Artificial)

<400> 6

Met His Gly Glu Ile Thr Thr Leu Gln Asp Tyr Val Leu Asp Leu Glu
 1 5 10 15

Pro Glu Ala Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Cys Asp Ser Ser
 20 25 30

Glu Glu Glu Glu Asp Thr Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Lys Pro
 35 40 45

Asp Thr Ser Asn Tyr Asn Ile Val Thr Ser Cys Cys Lys Cys Glu Ala
 50 55 60

Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Ile Asp Ile Arg Lys Leu
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Phe Gly Ile Val Cys Pro Gly Cys Ser
 85 90 95

Gln Arg Ala

<210> 7

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工合成(Artificial)

<400> 7

```

Met Arg Gly Pro Lys Pro Thr Leu Gln Glu Ile Val Leu Asp Leu Cys
1           5           10           15
Pro Tyr Asn Glu Ile Gln Pro Val Asp Leu Val Cys His Glu Gln Leu
          20           25           30
Gly Glu Ser Glu Asp Glu Ile Asp Glu Pro Asp His Ala Val Asn His
          35           40           45
Gln His Gln Leu Leu Ala Arg Arg Asp Glu Pro Gln Arg His Thr Ile
          50           55           60
Gln Cys Ser Cys Cys Lys Cys Asn Asn Thr Leu Gln Leu Val Val Glu
65           70           75           80
Ala Ser Arg Asp Thr Leu Arg Gln Leu Gln Gln Leu Phe Met Asp Ser
          85           90           95
Leu Gly Phe Val Cys Pro Trp Cys Ala Thr Ala Asn Gln
          100           105

```

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工合成(Artificial)

<400> 8

```

Met His Gly Pro Arg Ala Thr Leu Gln Glu Ile Val Leu His Leu Glu
1           5           10           15
Pro Gln Asn Glu Leu Asp Pro Val Asp Leu Leu Cys Tyr Glu Gln Leu
          20           25           30
Ser Glu Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ala Asp Gly Val Ser His Ala
          35           40           45
Gln Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Lys Ile Leu Cys
          50           55           60
Val Cys Cys Lys Cys Asp Gly Arg Ile Asp Leu Thr Val Glu Ser Ser
65           70           75           80
Ala Asp Asp Leu Arg Thr Leu Gln Gln Leu Phe Leu Ser Thr Leu Ser
          85           90           95
Phe Val Cys Pro Trp Cys Ala Thr Asn Gln
          100           105

```

<210> 9

<211> 99

<212> PRT

<213> 人工合成(Artificial)

<400> 9

```

Met Arg Gly Asp Lys Ala Thr Ile Lys Asp Tyr Ile Leu Asp Leu Gln
1           5           10           15
Pro Glu Thr Thr Asp Leu His Cys Tyr Glu Gln Leu Gly Asp Ser Ser
           20           25           30
Asp Glu Glu Asp Thr Asp Gly Val Asp Arg Pro Asp Gly Gln Ala Glu
           35           40           45
Gln Ala Thr Ser Asn Tyr Tyr Ile Val Thr Tyr Cys His Ser Cys Asp
           50           55           60
Ser Thr Leu Arg Leu Cys Ile His Ser Thr Ala Thr Asp Leu Arg Thr
65           70           75           80
Leu Gln Gln Met Leu Leu Gly Thr Leu Gln Val Val Cys Pro Gly Cys
           85           90           95

```

Ala Arg Leu

<210> 10

<211> 105

<212> PRT

<213> 人工合成(Artificial)

<400> 10

```

Met His Gly Lys Val Pro Thr Leu Gln Asp Val Val Leu Glu Leu Thr
1           5           10           15
Pro Gln Thr Glu Ile Asp Leu Gln Cys Asn Glu Gln Leu Asp Ser Ser
           20           25           30
Glu Asp Glu Asp Glu Asp Glu Val Asp His Leu Gln Glu Arg Pro Gln
           35           40           45
Gln Ala Arg Gln Ala Lys Gln His Thr Cys Tyr Leu Ile His Val Pro
           50           55           60
Cys Cys Glu Cys Lys Phe Val Val Gln Leu Asp Ile Gln Ser Thr Lys
65           70           75           80
Glu Asp Leu Arg Val Val Gln Gln Leu Leu Met Gly Ala Leu Thr Val
           85           90           95

```

Thr Cys Pro Leu Cys Ala Ser Ser Asn

100

105

<210> 11

<211> 88

<212> PRT

<213> 人工合成(Artificial)

<400> 11

```

Tyr Ile Leu Asp Leu His Pro Glu Pro Thr Asp Leu Phe Cys Tyr Glu
1           5           10           15
Gln Leu Cys Asp Ser Ser Asp Glu Asp Glu Ile Gly Leu Asp Gly Pro
          20           25           30
Asp Gly Gln Ala Gln Pro Ala Thr Ala Asn Tyr Tyr Ile Val Thr Cys
          35           40           45
Cys Tyr Thr Cys Gly Thr Thr Val Arg Leu Cys Ile Asn Ser Thr Thr
          50           55           60
Thr Asp Val Arg Thr Leu Gln Gln Leu Leu Met Gly Thr Cys Thr Ile
65           70           75           80
Val Cys Pro Ser Cys Ala Gln Gln
          85

```

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工合成(Artificial)

<400> 12

```

Met His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Cys Asp Ile Val Leu Asp Leu Glu
1           5           10           15
Pro Gln Asn Tyr Glu Glu Val Asp Leu Val Cys Tyr Glu Gln Leu Pro
          20           25           30
Asp Ser Asp Ser Glu Asn Glu Lys Asp Glu Pro Asp Gly Val Asn His
          35           40           45
Pro Leu Leu Leu Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Asn Ile Val
          50           55           60
Cys Val Cys Cys Lys Cys Asn Asn Gln Leu Gln Leu Val Val Glu Thr
65           70           75           80
Ser Gln Asp Gly Leu Arg Ala Leu Gln Gln Leu Phe Met Asp Thr Leu
          85           90           95
Ser Phe Val Cys Pro Leu Cys Ala Ala Asn Gln
          100          105

```

<210> 13

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工合成(Artificial)

<400> 13

```

Met His Gly Pro Lys Pro Thr Val Gln Glu Ile Val Leu Glu Leu Cys

```

1	5	10	15												
Pro	Cys	Asn	Glu	Ile	Glu	Pro	Val	Asp	Leu	Val	Cys	His	Glu	Gln	Leu
	20		25		30										
Gly	Asp	Ser	Asp	Asp	Glu	Ile	Asp	Glu	Pro	Asp	His	Ala	Val	Asn	His
	35		40		45										
His	Gln	His	Gln	Leu	Leu	Ala	Arg	Arg	Asp	Glu	Gln	Gln	Arg	His	Thr
	50		55		60										
Ile	Gln	Cys	Thr	Cys	Cys	Lys	Cys	Asn	Asn	Leu	Leu	Gln	Leu	Val	Val
65			70		75										80
Glu	Ala	Ser	Arg	Glu	Asn	Leu	Arg	Lys	Leu	Gln	Leu	Leu	Phe	Met	Asp
			85		90										95
Ser	Leu	Asn	Phe	Val	Cys	Pro	Trp	Cys	Ala	Thr	Glu	Thr	Gln		
	100		105		110										

<210> 14

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工合成(Artificial)

<400> 14

Met	His	Gly	Arg	His	Val	Thr	Leu	Lys	Asp	Ile	Val	Leu	Asp	Leu	Gln
1		5		10		15									
Pro	Pro	Asp	Pro	Val	Gly	Leu	His	Cys	Tyr	Glu	Gln	Leu	Val	Asp	Ser
	20		25		30										
Ser	Glu	Asp	Glu	Val	Asp	Glu	Val	Asp	Gly	Gln	Asp	Ser	Gln	Pro	Leu
	35		40		45										
Lys	Gln	His	Phe	Gln	Ile	Val	Thr	Cys	Cys	Cys	Gly	Cys	Asp	Ser	Asn
	50		55		60										
Val	Arg	Leu	Val	Val	Gln	Cys	Thr	Glu	Thr	Asp	Ile	Arg	Glu	Val	Gln
65			70		75										80
Gln	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Leu	Asn	Ile	Val	Cys	Pro	Ile	Cys	Ala	Pro
			85		90										95

Lys Thr

<210> 15

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工合成(Artificial)

<400> 15

Met	His	Gly	Arg	Leu	Val	Thr	Leu	Lys	Asp	Ile	Val	Leu	Asp	Leu	Gln
1		5		10		15									
Pro	Pro	Asp	Pro	Val	Gly	Leu	His	Cys	Tyr	Glu	Gln	Leu	Glu	Asp	Ser

20	25	30
Ser Glu Asp Glu Val Asp Lys Val Asp Lys Gln Asp Ser Gln Pro Leu		
35	40	45
Thr Gln His Tyr Gln Ile Leu Thr Cys Cys Cys Gly Cys Asp Ser Asn		
50	55	60
Val Arg Leu Val Val Glu Cys Thr Asp Gly Asp Ile Arg Gln Leu Gln		
65	70	75
Asp Leu Leu Leu Gly Thr Leu Asn Ile Val Cys Pro Ile Cys Ala Pro		
85	90	95
Lys Pro		

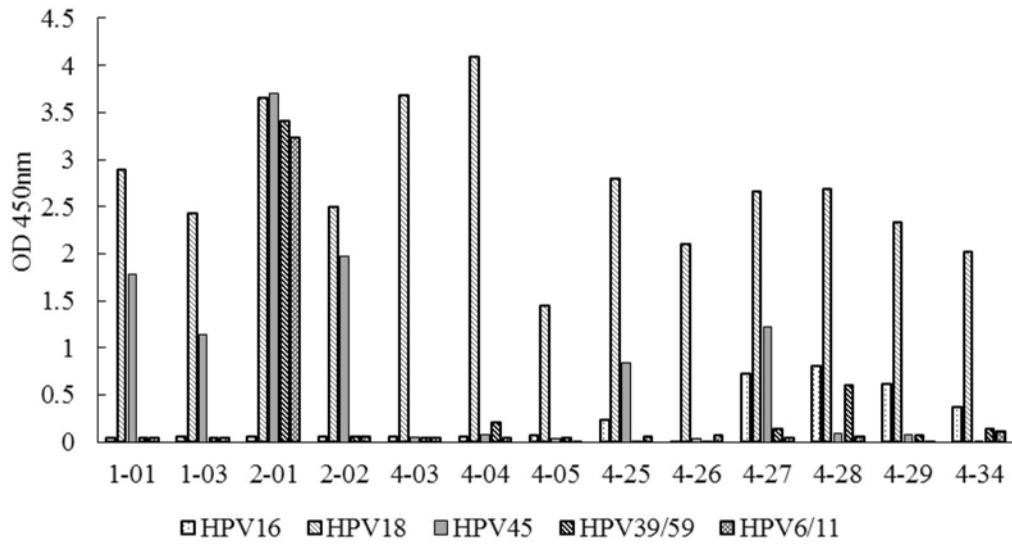


图1

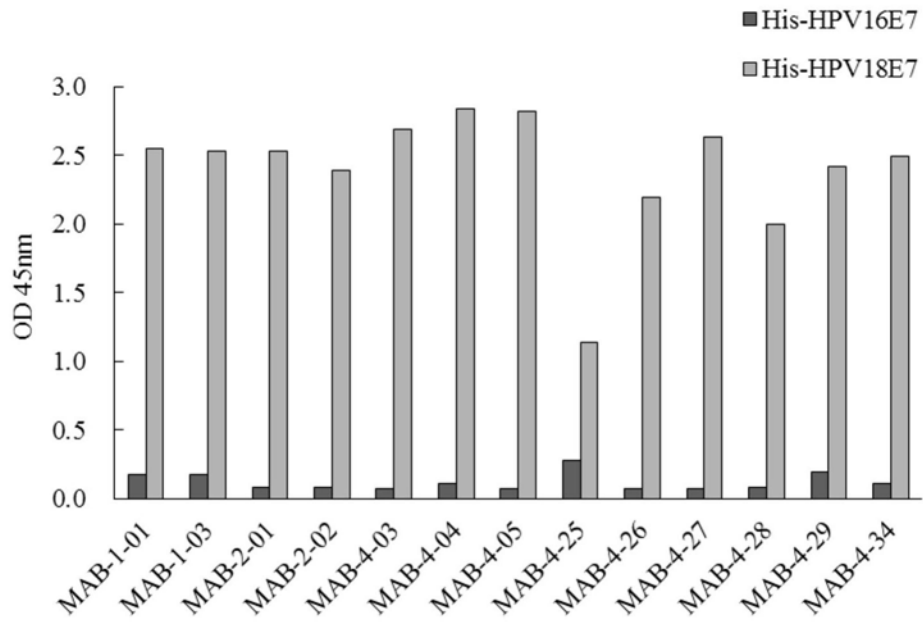


图2

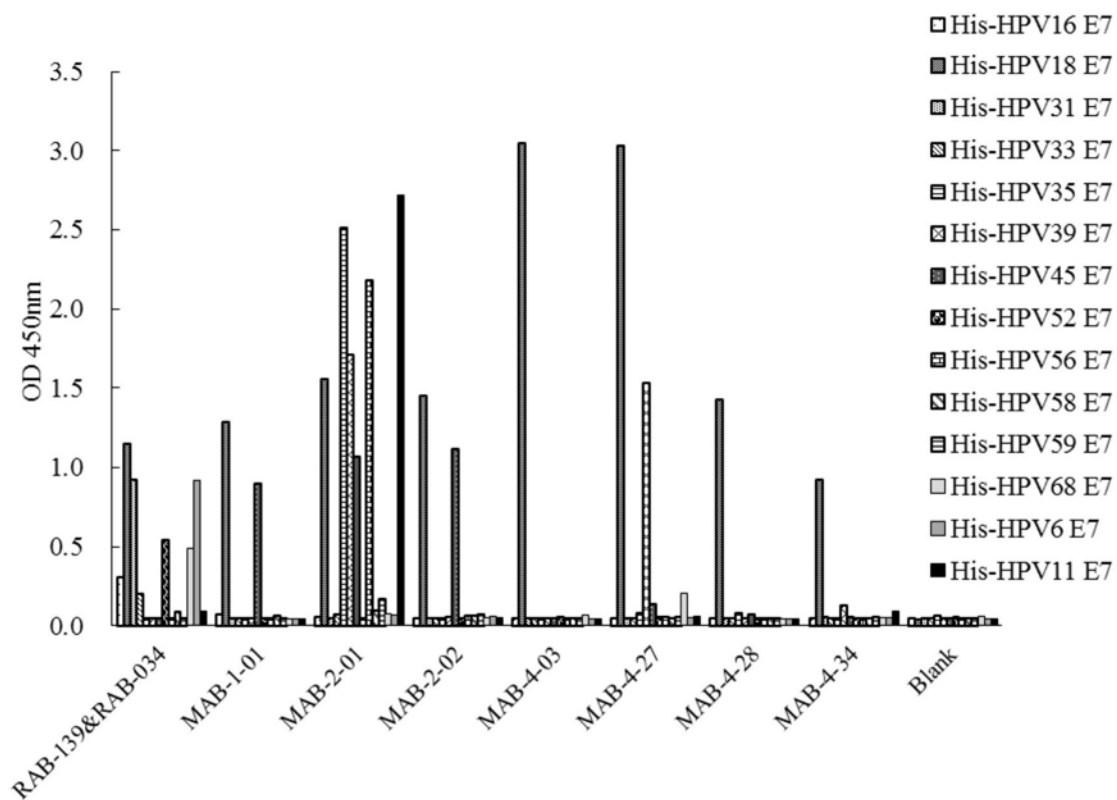


图3

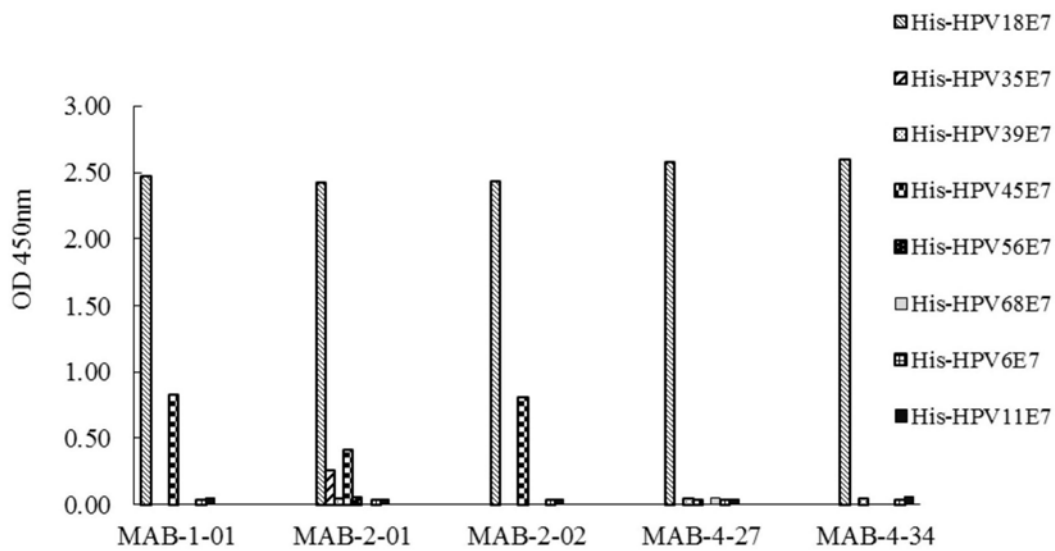


图4

专利名称(译)	一种检测多亚型HPV E7蛋白的方法及其应用		
公开(公告)号	CN110196332A	公开(公告)日	2019-09-03
申请号	CN201910430877.7	申请日	2019-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	艾托金生物医药(苏州)有限公司		
申请(专利权)人(译)	艾托金生物医药(苏州)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	艾托金生物医药(苏州)有限公司		
[标]发明人	常小迦 施丽君 郑雅婷 时成龙		
发明人	常小迦 施丽君 郑雅婷 时成龙		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/532 G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/533 G01N33/54306 G01N33/54346 G01N33/6803		
代理人(译)	张黎		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测多亚型HPV E7蛋白的方法及其应用，涉及蛋白检测领域。该检测方法将2种兔源单克隆抗体混合作为第一抗体，筛选能够与兔源单抗成功配对并识别多种亚型HPV E7蛋白的鼠源单克隆抗体作为第二抗体，可识别HPV18、HPV35、HPV39、HPV45、HPV56、HPV58、HPV68中的一种或多种亚型。本发明制备得到的鼠源单克隆抗体效价高，特异性好，利用本发明提供的检测方法、检测卡和免疫检测试剂盒检测样品中HPV E7蛋白含量，灵敏度显著提高、操作简单、方便。

