



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107167588 A

(43)申请公布日 2017.09.15

(21)申请号 201710191366.5

(72)发明人 马杰 吴云

(22)申请日 2017.03.28

(74)专利代理机构 北京海虹嘉诚知识产权代理有限公司 11129

(83)生物保藏信息

代理人 吴泳历

CGMCC NO:13582 2016.12.29

CGMCC NO:13584 2016.12.29

CGMCC NO:13815 2017.03.21

CGMCC NO:13588 2016.12.29

CGMCC NO:13585 2016.12.29

CGMCC NO:13583 2016.12.29

CGMCC NO:13814 2017.03.21

CGMCC NO:13587 2016.12.29

CGMCC NO:13586 2016.12.29

CGMCC NO:13581 2016.12.29

(51)Int.Cl.

G01N 33/536(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

(71)申请人 马杰

地址 100102 北京市朝阳区望京科技园505A

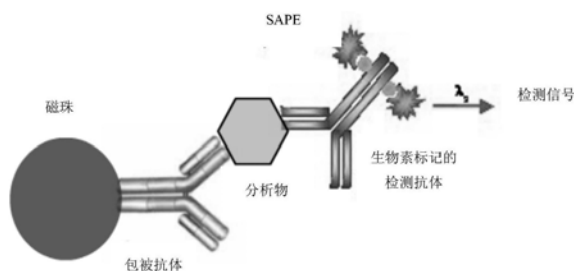
权利要求书1页 说明书18页
序列表5页 附图6页

(54)发明名称

用于检测血清中血管内皮生长因子的抗体及试剂盒

(57)摘要

本发明涉及血清抗原检测技术,具体涉及一种用于检测血清中血管内皮生长因子的抗体及试剂盒。提供用于检测待测血清中肝癌标志物血管内皮生长因子的抗体对,其特征在于,由第一抗体和第二抗体组成;所述第一抗体作为包被抗体,由保藏编号为CGMCC NO:13585的杂交瘤细胞分泌;所述第二抗体作为检测抗体,由保藏编号为CGMCC NO:13586的杂交瘤细胞分泌。所述抗体对特异性强,可以同时与其他标志物抗体联合使用,不受干扰地检测出血清中VEGF;灵敏度高,可检测到浓度低至250pg/ml的VEGF,能够准确定量血清中的VEGF蛋白。



1. 用于制备抗血管内皮生长因子的抗体的抗原蛋白, 其特征在于, 其氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示。

2. 编码权利要求1所述的抗原蛋白的基因, 其特征在于, 其核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示。

3. 用于检测待测血清中肝癌标志物血管内皮生长因子的单克隆抗体, 其特征在于, 由保藏编号为CGMCC NO:13586的杂交瘤细胞分泌。

4. 分泌权利要求3所述的单克隆抗体的杂交瘤细胞, 其特征在于, 其保藏编号为CGMCC NO:13586。

5. 用于检测待测血清中肝癌标志物血管内皮生长因子的抗体对, 其特征在于, 由第一抗体和第二抗体组成; 所述第一抗体作为包被抗体, 由保藏编号为CGMCC NO:13585的杂交瘤细胞分泌; 所述第二抗体作为检测抗体, 由保藏编号为CGMCC NO:13586的杂交瘤细胞分泌。

6. 用于肝癌早期诊断的试剂盒, 其特征在于, 包括权利要求3所述的单克隆抗体或权利要求5所述的抗体对, 以及用于免疫检测的通用试剂。

7. 根据权利要求6所述的试剂盒, 其特征在于, 包括权利要求3所述的抗体对, 所述第一抗体与磁珠偶联, 所述第二抗体用生物素标记, 所述用于免疫检测的通用试剂为链霉亲和素-藻红蛋白。

8. 根据权利要求6所述的试剂盒, 其特征在于, 还包括血管内皮生长因子的标准品和/或以所述血管内皮生长因子的标准品制作的标准曲线或直线回归方程说明书。

9. 根据权利要求6-8任一所述的试剂盒, 其特征在于, 还包括抗甲胎蛋白的抗体、抗高尔基糖蛋白73的抗体、抗 α -L-岩藻糖苷酶的抗体和/或抗细胞外基质金属蛋白酶诱导因子CD147的抗体, 及其相应的免疫检测试剂。

10. 根据权利要求9所述的试剂盒, 其特征在于, 还包括甲胎蛋白、高尔基糖蛋白73、 α -L-岩藻糖苷酶和/或细胞外基质金属蛋白酶诱导因子CD147的标准品, 和/或以甲胎蛋白、高尔基糖蛋白73、 α -L-岩藻糖苷酶和/或细胞外基质金属蛋白酶诱导因子CD147的标准品制作的标准曲线或直线回归方程说明书。

用于检测血清中血管内皮生长因子的抗体及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及血清抗原检测技术,具体涉及一种用于检测血清中血管内皮生长因子的抗体及试剂盒。

背景技术

[0002] 癌症在全球的发病率呈上升趋势。2014年2月3日,世界卫生组织发表的《全球癌症报告2014》显示,中国新增癌症病例高居世界第一位,其中肝癌的新增病例和死亡人数均居世界首位。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球最常见的恶性肿瘤之一,我国是乙肝大国,肝癌发病率占全球总数的55%。临床上肝癌的诊断主要是通过血清检测甲胎蛋白(Alpha-fetoprotein, AFP), B超发现肝脏结节,然后CT和MRI检查。然而AFP阳性率约60~70%,并非所有肝细胞癌都分泌大量的AFP,约40%早期原发性肝癌及15%~20%晚期原发性肝癌患者的血清AFP水平是正常的,故仅靠AFP诊断肝癌尚有漏诊的可能,导致临床80%患者确诊时已属中晚期。中晚期肝癌基本无有效治疗方法,对乙肝、肝硬化等高危人群进行肝癌肿瘤标志物的筛查和早期诊断是解决肝癌高死亡率的最有效措施。

[0003] 血管内皮生长因子(VEGF),也称血管通透性因子或促血管素,最初是由多种培养的肿瘤细胞系中发现的一种新型的生长因子,该因子特异性地作用于血管内皮细胞并促进血管内皮细胞的增殖。大量研究结果表明,许多肿瘤组织都有VEGF的较高表达,在肿瘤病人血清中也可检测到VEGF。肝癌患者血清中VEGF的表达水平显著高于良性肝病患者和健康人,且VEGF含量与TNM分期呈正相关,术前检测VEGF水平对预测肝癌的侵袭、转移有重要意义。鉴于VEGF可在肝癌出现前显著升高,且其分布状态随肝癌发展而显著改变,因此VEGF也是早期预测肝癌的一项重要指标,但需要与其他标志物共同使用。

[0004] Luminex悬浮芯片技术是美国Luminex公司在20世纪90年代中期开发的一种多功能的液相芯片分析平台,也称为液体芯片。它有机地整合了有色微球、激光技术、最新的高速数字信号处理和计算机技术,应用的荧光编码微球带有针对不同目标分子的特异性抗体,不同的微球可以自由组合,可以在一个25~50微升的样品内同时检测最多达100种不同的检测项目,具有重复性与稳定性好、高通量、检测指标可灵活选择,以及高灵敏度和高信噪比等诸多优点,适用于血浆中抗原类蛋白的分析以及重大疾病抗原标志物的定量分析,是一项具有重大意义的医学辅助检测手段。与传统的固相芯片相比,克服了固相芯片在大分子检测时受表面张力、空间效应等对反应动力学的干扰,使检测结果的稳定性和重复性得到很大的提高。

[0005] 因此,获得VEGF特异性抗体,利用Luminex悬浮芯片技术对血清中VEGF含量进行检测,将有助于提高早期肝癌的检出率。

发明内容

[0006] 为了提高早期肝癌的检出率,本发明提供用于检测血清中血管内皮生长因子的抗体及试剂盒,其特异性强、灵敏度高,能够准确检测出血清中血管内皮生长因子的含量。

[0007] 请求保护的技术方案如下：

[0008] 用于制备抗血管内皮生长因子的抗体的抗原蛋白，其特征在于，其氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示。

[0009] 编码权利要求所述抗原蛋白的基因，其特征在于，其核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示。

[0010] 用于检测待测血清中肝癌标志物血管内皮生长因子的单克隆抗体，其特征在于，由保藏编号为CGMCC NO:13586的杂交瘤细胞分泌。

[0011] 分泌所述单克隆抗体的杂交瘤细胞，其特征在于，其保藏编号为CGMCC NO:13586。

[0012] 用于检测待测血清中肝癌标志物血管内皮生长因子的抗体对，其特征在于，由第一抗体和第二抗体组成；所述第一抗体作为包被抗体，由保藏编号为CGMCC NO:13585的杂交瘤细胞分泌；所述第二抗体作为检测抗体，由保藏编号为CGMCC NO:13586的杂交瘤细胞分泌。

[0013] 用于肝癌早期诊断的试剂盒，其特征在于，包括所述单克隆抗体或所述抗体对，以及用于免疫检测的通用试剂。

[0014] 所述试剂盒，其特征在于，包括所述抗体对，所述第一抗体与磁珠偶联，所述第二抗体用生物素标记，所述用于免疫检测的通用试剂为链霉亲和素-藻红蛋白。

[0015] 所述试剂盒，其特征在于，还包括血管内皮生长因子的标准品和/或以所述血管内皮生长因子的标准品制作的标准曲线或直线回归方程说明书。

[0016] 任一所述的试剂盒，其特征在于，还包括抗甲胎蛋白的抗体、抗高尔基糖蛋白73的抗体、抗 α -L-岩藻糖苷酶的抗体和/或抗细胞外基质金属蛋白酶诱导因子CD147的抗体，及其相应的免疫检测试剂。

[0017] 所述试剂盒，其特征在于，还包括甲胎蛋白、高尔基糖蛋白73、 α -L-岩藻糖苷酶和/或细胞外基质金属蛋白酶诱导因子CD147的标准品，和/或以甲胎蛋白、高尔基糖蛋白73、 α -L-岩藻糖苷酶和/或细胞外基质金属蛋白酶诱导因子CD147的标准品制作的标准曲线或直线回归方程说明书。

[0018] 本发明使用DNA Star序列分析软件对肝癌血清标志物血管内皮生长因子(VEGF)的氨基酸序列(NCBI序列号:NP_001020539.2)进行分析，根据商业化的抗体所选择表达的部位，及各变体的不同作用，选择第207-371aa的165个氨基酸的肽段作为抗原，其氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示，基因编码序列如SEQ ID NO.6所示。

[0019] 通过蛋白原核表达的方法获得抗原蛋白并免疫小鼠，筛选出能够特异结合VEGF的单克隆抗体，并通过ELISA双抗夹心实验对获得的单克隆抗体进行配对，筛选到了能够用于血清VEGF定量检测的抗体对，由第一抗体(包被抗体)和第二抗体(检测抗体)组成，其杂交瘤细胞保藏号分别是CGMCC NO:13585和CGMCC NO:13586。所述抗体对特异性强(可以同时与其他标志物抗体联合使用，不受干扰地检测出血清中VEGF，见实施例4记载)、灵敏度高(可检测到浓度低至250pg/ml的VEGF，见实施例4所记载)，能够准确定量血清中的VEGF蛋白。

[0020] 本发明的试剂盒，还可以包括除甲胎蛋白、高尔基糖蛋白73、 α -L-岩藻糖苷酶、血管内皮生长因子和细胞外基质金属蛋白酶诱导因子CD147之外的其它肿瘤标志物的特异性抗体，及其相应的免疫检测试剂。

[0021] 采用本发明的抗体对或试剂盒,结合Luminex技术、双抗夹心的免疫学技术以及标准曲线来实现血清中VEGF的定量检测。该方法的检测原理是:将偶联了第一抗体的磁珠与稀释后的待测血清样品4℃孵育过夜,形成抗原-特异性抗体复合物,用洗涤缓冲液洗去未结合的抗原;加入生物素标记的第二抗体,室温孵育,形成特异性抗体-抗原-抗体复合物,用洗涤缓冲液洗去未结合的抗体;加入链霉亲和素-藻红蛋白(SAPE),室温孵育,形成抗体-抗原-抗体-生物素-SAPE复合物,用洗涤缓冲液洗去未结合的SAPE;加入测定缓冲液后置于液相悬浮芯片系统中读取MFI值;最后将MFI值代入标准曲线的方程式中计算出样品中VEGF 的浓度,乘以血清样品的稀释倍数得出VEGF的实际浓度。

[0022] 与常规检测方法ELISA相比,本发明的方法具有快速、灵敏的优点,并且可以在一个反应体系中同时检测其它肝癌相关肿瘤标志物,如AFP,AFP-L3,GP73,AFU,CD147等。利用Luminex液态芯片技术,根据诊断的实际需要,对偶联有不同肿瘤标志物特异性抗体的荧光编码微球进行自由组合,一次实验可以同时完成多种肝癌相关肿瘤标志物的定量分析,具有以下优势:(1)一次检测血浆用量最低10u1,可以同时检测6种血浆蛋白,大大减少了血浆用量,省时省力,检测成本低;(2)液相芯片技术反应体系在液相环境下,有利于保持生物大分子的活性,使得反应体系更加稳定,检测结果更加可靠准确;(3)血浆样品中的肝癌相关肿瘤标志物AFP,AFP-L3,GP73,AFU,VEGF,CD147蛋白联合检测使多种肿瘤标志物之间相关性的分析更加准确,可以提高肝癌早期的诊断率,以便及时制定治疗方案,延长患者生命。

[0023] 生物保藏信息

[0024]

抗原	生物材料编号	分类命名	保藏日期	保藏编号
GP73	8F10D1	<u>抗高尔基糖蛋白 73 (GP73) 单克隆抗体细胞株</u>	<u>2017 年 3 月 21 日</u>	CGMCC NO. 13814
	10B9F11	<u>抗高尔基糖蛋白 73 (GP73) 单克隆抗体细胞株</u>	<u>2017 年 3 月 21 日</u>	CGMCC NO. 13815
AFU	3F12D8	<u>α-L-岩藻糖苷酶单克隆抗体细胞株</u>	<u>2016 年 12 月 29 日</u>	CGMCC NO. 13583
	10F10G10	<u>α-L-岩藻糖苷酶单克隆抗体细胞株</u>	<u>2016 年 12 月 29 日</u>	CGMCC NO. 13584
VEGF	7A11D4	<u>血管内皮生长因子单克隆抗体细胞株</u>	<u>2016 年 12 月 29 日</u>	CGMCC NO. 13585
	8E10D8	<u>血管内皮生长因子单克隆抗体细胞株</u>	<u>2016 年 12 月 29 日</u>	CGMCC NO. 13586
CD147	4A4C3	<u>细胞外基质金属蛋白酶</u>	<u>2016 年 12 月 29 日</u>	CGMCC NO. 13587

		<u>诱导因子单</u> <u>克隆抗体细</u> <u>胞株</u>		
	6B7F12	<u>细胞外基质</u> <u>金属蛋白酶</u> <u>诱导因子单</u> <u>克隆抗体细</u> <u>胞株</u>	<u>2016 年 12 月</u> <u>29 日</u>	CGMCC NO. 13588
AFP	3B11H5	<u>甲胎蛋白单</u> <u>克隆抗体细</u> <u>胞株</u>	<u>2016 年 12 月</u> <u>29 日</u>	CGMCC NO. 13581
	2G5E8	<u>甲胎蛋白单</u> <u>克隆抗体细</u> <u>胞株</u>	<u>2016 年 12 月</u> <u>29 日</u>	CGMCC NO. 13582

[0025] 保藏机构:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心

[0026] 地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所

附图说明

[0027] 图1.luminex液相芯片检测原理示意图;

[0028] 图2.GP73单因子标准品检测结果;

[0029] 图3.AFU单因子标准品检测结果;

[0030] 图4.VEGF单因子标准品检测结果;

[0031] 图5.CD147单因子标准品检测结果;

[0032] 图6.AFP单因子标准品检测结果;

[0033] 图7.CD147,VEGF双因子标准品检测结果;

[0034] CD147和VEGF双因子在同一个体系中反应,抗体之间没有发生交叉反应,各因子的反应性能没有明显变化。

[0035] 图8.CD147,VEGF,AFP三因子标准品检测结果;

[0036] CD147,VEGF和AFP三因子在同一个体系中反应,抗体之间没有发生交叉反应,各因子的反应性能没有明显变化。

[0037] 图9.CD147,VEGF,AFP,AFU四因子标准品检测结果;

[0038] CD147,VEGF,AFP和AFU四因子在同一个体系中反应,抗体之间没有发生交叉反应,各因子的反应性能没有明显变化。

[0039] 图10.CD147,VEGF,AFP,AFU,GP73五因子标准品检测结果;

[0040] CD147,VEGF,AFP,AFU和GP73五因子在同一个体系中反应,抗体之间没有发生交叉反应,各因子的反应性能没有明显变化。

[0041] 其中,横坐标为标准品的浓度,纵坐标为荧光强度。

具体实施方式

[0042] 下面通过具体实施例对本发明进行详细说明,需要理解的是,下述实施例作为解释和说明,不以任何形式限制本发明的范围。

[0043] 生物材料

[0044] BALB/c小鼠,购自杰思捷实验动物有限公司;

[0045] Hela细胞,购自广州赛库生物技术有限公司;

[0046] 骨髓瘤细胞,北京青元盛康生物医药科技有限公司培养和保存;

[0047] E.coli DH5 α 感受态细胞,E.coliBL21感受态细胞,为本实验室保存,可通过商购获得。

[0048] 实验试剂

[0049] 限制性内切酶EcoR I和Xho I,购买自Takara公司,货号D1040A,D1094A;

[0050] 载体pET32a,购买自Novagen公司,货号VYN0176;

[0051] T4DNA连接酶,购买自Takara公司,货号D2011A;

[0052] 质粒提取试剂盒,购买自takara公司,货号9760;

[0053] HyClone改良型RPMI-1640培养基,购自Hyclone公司,货号AB10113944;

[0054] 无支原体新生牛血清(超级),购自浙江天杭生物科技有限公司,货号22012-8612;

[0055] 双抗(100X),购自北京雷根生物技术有限公司,货号CA0075;

[0056] L-谷氨酰胺(100X),购自Amresco公司,货号Amresco 0374;

[0057] PEG(50%w/v聚乙二醇1,500),购自Hampton公司,货号HR2-525;

[0058] HAT培养基添加剂(50X),购自gibco公司,货号21060-017;

[0059] 羊抗鼠IgG,购自碧云天生物,货号A0286;

[0060] 醋酸钠,购自北京化学试剂公司,货号10018892;

[0061] 辛酸,购自北京金龙化学试剂有限公司;

[0062] Streptavin-HRP(链霉亲和素-辣根过氧化物酶),购自碧云天,货号A0303;

[0063] sulfo-NHS(N-羟基琥珀酰亚胺),购自SIGMA公司,货号56485;

[0064] EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐),购自SIGMA公司,货号22980;

[0065] MES(2-(N-吗啡啉)乙磺酸),购自SIGMA公司,货号M2933;

[0066] PBS-TBN(封闭/储存缓冲液),PBS,含0.1%BSA(BSA购自康源生物),0.02%TWEEN 20(TWEEN 20购自Amresco 0777),0.05%Azide(Azide购自SIGMA S8032);

[0067] assay buffer(测定缓冲液),PBS,含1%BSA(BSA购自康源生物)pH7.4;

[0068] wash buffer(洗涤缓冲液),PBS,含0.02%TWEEN 20(TWEEN 20购自Amresco 0777),pH7.4;

[0069] SAPE(链霉亲和素-藻红蛋白),购自ebioscience公司,货号12-4317;

[0070] 生物素,购自sigma公司,货号H1759;

[0071] 甲胎蛋白标准品,购自中国药品生物制品检定所,产品编号150542-1。

[0072] 仪器与耗材

[0073] 磁珠,购自LUMINEX公司,货号MC10030-01,MC10034-01,MC10036-01,MC10038-01,

MC10044-01;

[0074] 磁性分离器,购自Biorad公司;

[0075] luminex200,购自BioRad公司,型号LUMINEX-200。

[0076] 下述实施例中,未特别说明的生物化学试剂均为本领域常规试剂,可按照常规方法配制而得或商购获得,规格为实验室纯级即可;未特别说明的实验器材均为本领域常规实验器材,可商购获得。

[0077] 实施例1.肝癌相关肿瘤标志物的单克隆抗体制备

[0078] (一)抗原制备

[0079] 1.高尔基糖蛋白73(GP73)的抗原制备

[0080] 重组抗原设计及制备方法记载在:庞丽君,高尔基体蛋白的基因克隆及原核表达,医药论坛杂志,2015(9):1-2。按照文章中记载的方法制备得到高纯度的抗原GP73-F3R3,其表达菌种保藏于北京青元盛康生物医药科技有限公司。

[0081] 2. α -L-岩藻糖苷酶(AFU)的抗原制备

[0082] 2.1抗原设计

[0083] α -L-岩藻糖苷酶全长466个氨基酸,使用DNA Star序列分析软件分析 α -L-岩藻糖苷酶的氨基酸序列(NCBI序列号:NP_000138.2),获得蛋白的二级结构、亲疏水性、抗原性等信息。综合考虑蛋白序列的抗原性、特异性、蛋白表达和纯化的难易性,选取第252-441aa的肽段作为抗原AFU-F2R2,其氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,基因编码序列如SEQ ID NO. 2所示。

[0084] 2.2抗原表达

[0085] 2.2.1目的片段的获得

[0086] (1)引物设计:在正向引物的5'端引入EcoR I酶切位点,反向引物的5'端引入Xho I酶切位点,得到的引物序列如下:

[0087] AFU-F2:5'-CGGAATTCGACAGCCCTGTCAAGGATGAG-3';

[0088] AFU-R2:5'-CCGCTCGAGGAAGAGACCTTTATCTGGATC-3'。

[0089] (2)模板DNA的获得

[0090] 从HeLa细胞中提取基因组DNA:方法和步骤参见《分子克隆实验指南》。

[0091] 反转录获得cDNA:方法和步骤参见《分子克隆实验指南》。

[0092] (3)按照下列PCR体系和程序扩增目的片段:

[0093] PCR体系:20ul

10×缓冲液	2ul
--------	-----

dNTP(2.5mM)	1ul
-------------	-----

AFU-F2 (10uM)	0.5ul
---------------	-------

AFU-R2 (10uM)	0.5ul
---------------	-------

模板 DNA	0.1~2ug(0.5 ul)
--------	-----------------

Taq DNA polymease	0.2ul
-------------------	-------

dH ₂ O	15.3ul
-------------------	--------

- [0095] PCR程序：
94℃ 8min 1 个循环
94℃ 35s, 56℃ 35s, 72℃ 40s 30 个循环
- [0096] 72℃ 8min 1 个循环
4℃ 保存
- [0097] 2.2.2载体构建
- [0098] (1) 酶切反应：使用限制性内切酶EcoR I和Xho I, 分别对目的片段和表达载体pET32a 进行双酶切。
- [0099] 酶切体系(100ul)：
- [0100] EcoRI:5ul
- [0101] Xho I:5ul
- [0102] 10×缓冲液:10ul
- [0103] 质粒(8ng/ul):55ul
- [0104] H₂O:25ul
- [0105] 酶切条件:37摄氏度过夜, 获得线性化PET-32a载体和PCR酶切产物。
- [0106] (2) 连接反应：
- [0107] 连接体系(12ul)：
- [0108] 线性化PET-32a载体(EcoR I/Xho I, 8ng/ul):0.5ul
- [0109] T4DNA连接酶:1ul
- [0110] 10×缓冲液:1.2ul
- [0111] PCR酶切产物(1ng/ul):9.3ul
- [0112] 连接条件:室温连接10h, 得到连接产物。
- [0113] 2.2.3蛋白表达与纯化
- [0114] (1) 转化E.coli DH5α感受态细胞
- [0115] E.coli DH5α感受态细胞放置冰上融化后, 加入连接产物, 冰上静置30min。42℃热处理90s, 冰上静置2min。加入LB培养基600μL, 37℃, 150rpm摇床培养45min。取200μL 菌液涂布于氨苄青霉素抗性(Amp⁺)LB平板上, 37℃过夜培养。
- [0116] (2) 阳性克隆鉴定
- [0117] 挑取单菌落, 接种于LB/Amp⁺的液体培养基中, 200rpm、37℃培养8小时, 8000rpm离心5min收集菌体。使用质粒提取试剂盒, 按照说明书中的操作步骤提取质粒。按照步骤2.2.1 中的PCR体系和程序进行PCR验证。将PCR鉴定正确的重组质粒送生工生物工程有限公司测序, 比对结果正确的重组质粒作为表达载体。
- [0118] (3) 转化E.coli BL21细胞
- [0119] E.coli BL21感受态细胞放置冰上融化后, 加入表达载体, 冰上静置30min。42℃热处理90s, 冰上静置2min。加入LB培养基600μL, 37℃, 150rpm摇床培养45min。取200μL菌液涂布于Amp⁺抗性LB平板上, 37℃过夜培养。
- [0120] (4) 蛋白表达
- [0121] 挑取单菌落, 接种于5ml的Amp⁺抗性LB液体培养基中, 37℃培养过夜, 取过夜培养

物140ul加入3ml新鲜的Amp⁺抗性LB液体培养基中,37℃培养,达到OD₆₀₀为0.5左右,加入1/1000IPTG (0.8M),37℃,180rpm培养4h。跑10%的SDS-PAGE判断诱导情况。

[0122] (5) 蛋白纯化

[0123] 采用硫酸铵沉淀法纯化蛋白:将样品离心,去除沉淀,保留上清液并测量体积;一边搅拌一边慢慢的加入硫酸铵。接着,将溶液放在磁力搅拌器上搅拌 6h,或者4℃搅拌过夜,使蛋白质充分沉淀。将蛋白质溶液离心沉淀,弃上清保留沉淀。加入10-20ml的PBS-叠氮化钠溶液溶解蛋白质。蛋白沉淀溶解之后,放入透析袋中透析24-48h,每隔5h更换透析液除去硫酸铵。收集透析液,离心,测定上清中蛋白质的含量。

[0124] 3. 血管内皮生长因子(VEGF)的抗原制备

[0125] 3.1 抗原设计

[0126] 使用DNA Star序列分析软件分析人血管内皮生长因子的氨基酸序列(NCBI序列号: NP_001020539.2),根据蛋白的二级结构、亲疏水性、抗原性等信息,以及各变体的不同作用,选择第207-371aa的165个氨基酸的肽段作为抗原VEGF-FR,其氨基酸序列如SEQ ID NO.5 所示,基因编码序列如SEQ ID NO.6所示。

[0127] 3.2 抗原表达

[0128] 3.2.1 目的片段的获得

[0129] (1) 引物设计:在正向引物的5'端引入EcoR I酶切位点,反向引物的5'端引入Xho I酶切位点,得到的引物序列如下:

[0130] VEGF-F:5'-CGGAATTCGCACCCATGGCAGAAGGAGGAG-3' ;

[0131] VEGF-R:5'-CCGCTCGAGCCGCCTCGGCTTGTCACATCTG-3' 。

[0132] (2) 以2.2.1获得的cDNA为模板,按照下列PCR体系和程序扩增目的片段:

[0133] PCR体系:20ul

10×缓冲液 2ul

dNTP(2.5mM) 1.6ul

VEGF-F (10uM) 0.3ul

[0134] VEGF-R (10uM) 0.3ul

模板 DNA 0.1~2ug(1ul)

Taq DNA 聚合酶 0.1ul

dH₂O 14.7ul

[0135] PCR程序:

[0136] 94℃ 8min 1 个循环

94℃ 35s, 56℃ 35s, 72℃ 45s 30 个循环

[0137] 72℃ 8min 1 个循环

4℃ 保存

[0138] 3.2.2 载体构建

[0139] 构建方法同2.2.2。

[0140] 3.2.3蛋白表达与纯化

[0141] 宿主菌和表达纯化方法同2.2.3。

[0142] 4.细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(CD147)的抗原制备

[0143] 4.1抗原设计

[0144] 使用DNA Star序列分析软件分析人CD147的氨基酸序列(protein ID: BAC76828.1),综合考虑蛋白序列的抗原性、特异性、蛋白表达和纯化的难易性,选取第25-177aa的肽段作为抗原CD147-F3R3,其氨基酸序列如SEQ ID NO.9所示,基因编码序列如SEQ ID NO.10 所示。

[0145] 4.2抗原表达

[0146] 4.2.1目的片段的获得

[0147] (1) 引物设计:在正向引物的5'端引入EcoR I酶切位点,反向引物的5'端引入Xho I酶切位点,得到的引物序列如下:

[0148] CD147-F3:5'-CGGAATTCACAGTCTTCACTACCGTAGAAG-3' ;

[0149] CD147-R3:5'-CGCTCGAGCTCCATGTTTCAGGTTCTCAATG-3' 。

[0150] (2) 以2.2.1获得的cDNA为模板,按照下列PCR体系和程序扩增目的片段:

[0151] PCR体系:20ul

10×缓冲液 2ul

dNTP(2.5mM) 2ul

CD147-F3 (10uM) 0.3ul

[0152] CD147-R3 (10uM) 0.3ul

模板 DNA 0.1~2ug(0.5ul)

Taq DNA 聚合酶 0.3ul

dH₂O 14.6ul

[0153] PCR程序:

[0154] 94℃ 8min 1 个循环

94℃ 35s, 55℃ 35s, 72℃ 45s 30 个循环

[0155] 72℃ 8min 1 个循环

4℃ 保存

[0156] 4.2.2载体构建

[0157] 构建方法同2.2.2。

[0158] 4.2.3蛋白表达与纯化

[0159] 宿主菌和表达纯化方法同2.2.3。

[0160] (二) 抗体制备

[0161] 1. 免疫小鼠

[0162] 准备出生后8-12周BALB/c小鼠两只(每种抗原免疫两只小鼠),用高纯度的抗原按照下列方法对两只小鼠进行免疫:

[0163] 首次免疫,取100ug抗原+100ul完全佐剂乳化混匀注入小鼠足掌,约80ul/只;第二次免疫,取100ul抗原+100ul不完全佐剂乳化混匀注入小鼠足掌,约80ul/只;第三、四、五次免疫,均同第二次免疫。

[0164] 2. 细胞融合

[0165] 以下所有的操作均在超净台中完成。

[0166] (1) 从培养箱中取出骨髓瘤细胞,吹开贴壁细胞后倒入离心管中,离心5min,2000转,离心后弃上清,加入40ml冰水浴的RPMI-1640培养基(含2/1双抗)混匀待用。

[0167] (2) 准备三个培养皿,分别倒入冰水浴的RPMI-1640培养基(含2/1双抗),取小鼠大腿内侧淋巴细胞,两颗,放入第一个培养皿中,开始剪去撕掉淋巴细胞上的脂肪组织和结缔组织,移入第二个培养皿中,清洗淋巴结细胞,再移入第三个培养皿中,开始撕碎淋巴结让细胞释放出来,并用滴管来回吹打几下,更有力的释放出细胞,接着开始过滤细胞(用带有棉花的吸管过滤到离心管中)至40ml,并标记为淋巴结细胞,和骨髓瘤细胞一起离心,10min,2000转/min,离心后各弃上清30ml,开始计数,将淋巴结细胞和骨髓瘤细胞按比例(GP73 为1:3,AFU为2:3,VEGF为2:3,CD147为1:1)混匀,加入冰水浴的RPMI-1640培养基至50ml,离心5min,2000转/min,弃上清再加入冰水浴的RPMI-1640培养基至50ml,离心5min,2000转/min,弃上清,加入热的RPMI-1640培养基至50ml,离心5min,2000转/min。

[0168] (3) 开始加入PEG:取出混匀且离心后的淋巴结细胞和骨髓瘤细胞,弃上清,吸干净离心管中剩余的RPMI-1640培养基,取出约0.8ml PEG一滴一滴加入离心管中,并伴随着轻微的摩擦,摇晃,加入完毕后,放入37度水浴箱中孵育一分钟,使PEG更容易粘合。

[0169] (4) 取出水浴后的细胞,开始缓慢的加入热的RPMI-1640培养基,一滴滴加入并伴随着摇晃,直至35ml,再加至50ml,离心10min,1000转/min。

[0170] (5) 配制200ml培养液(含HAT培养基添加剂(50X),双抗(100X),L-谷氨酰胺(100X)及20%无支原体新生牛血清),含10ml饲养层细胞。

[0171] (6) 细胞离心后去上清,加入200ml培养液,混匀,铺板185ul/孔,10块板,标记1到10号,放入培养箱中。融合后第六天观看融合板,并标记细胞孔和单克隆孔,以便检测后查找。

[0172] 3. 杂交瘤细胞的筛选与检测

[0173] (1) 包被快速检测板:用抗原包被,2ug/ml,50ul/孔,共二十块板。用1xPBS稀释液混匀抗原后加至检测板中,37度孵育2小时,洗五次,拍干后加入封闭液,180ul/孔,37度孵育1小时,拍干,放入4度待用。

[0174] (2) 取出十块快速检测板并取出1到10号融合板,一块检测板对应一块融合板进行ELISA检测,从融合板中取细胞培养上清加入检测板中,50ul/孔,留取最后四孔分别作为两阴性孔和阳性孔,37度孵育1小时,取出检测板,弃上清,洗板五次,拍干,加入1:10000倍稀释的羊抗鼠二抗(稀释液PBST-BSA),50ul/孔,37度1小时,洗板五次,拍干,加入TMB显色十分钟,加入终止液,读数,标记阳性的细胞孔。

[0175] (2) 第二天取出十块新的快速检测板,对1到10号融合板再次进行ELISA检测,读数,标记阳性的细胞孔。选出两次检测都是阳性的细胞孔且读值在1以上的细胞孔,GP73为17株,AFU为12株,VEGF为10株,CD147为10株,准备克隆。

[0176] (3) 单克隆抗体的检测:配400ml培养液(含HAT培养基添加剂(50X)、双抗(100X)、

L-谷氨酰胺(100X)、20%无支原体新生牛血清),含20ml饲养层细胞。显微镜下观察每孔细胞数量,取出约80的细胞数量,平均铺板,190ul/孔,放入培养箱中,培养七天,观看克隆板,记录下单克隆孔,并进行ELISA检测,根据OD₄₅₀>0.8的筛选标准,选出单克隆抗体株。

[0177] (4)选定单克隆抗体株后,加入新的培养液(含饲养层细胞),放入培养箱中培养。经过四天后,打开克隆板观看细胞数量和培养液颜色,细胞量长满约占孔2/3,观看细胞孔中的细胞状态。

[0178] GP73定株的是:2F10A4,4D3D5,7B7B3,1C10B5,1G9C8,3D10B5,4G8D7,8F10D1,10B9F11,10C11B1,4G8E12和7E11D11。

[0179] AFU定株的是:1E1D1,3B6C3,3F12D8,1A4H4,3F12E4,10E11G10,10F10G10, 5F2C3,7B9H5,4G1H4,5E5A5,5E5G5,5F2D7。

[0180] VEGF定株的是:1D2E5,3B1D8,4C3D12,4D3E5,5C7F10,5E1C3,7A11D4,7A11E10,8E10D8。

[0181] CD147定株的是:1A2D8,3D6C6,4A4C3,5A4E9,5C9G1,6A1D4,6B7F12。

[0182] (5)包被一块快速检测板,检测24孔中的细胞。

[0183] 4.制备腹水

[0184] (1)准备二十只已生育过的小鼠,注入石蜡油,约1ml/只。

[0185] (2)将24孔中长满的细胞传入六孔,在六孔中长满后再传入小瓶中,在小瓶中长满后,将细胞注入小鼠腹中。

[0186] (3)经过十五天后观看小鼠腹部,出现大肚情况即可抽取腹水,处理腹水,离心10min, 2000转/min,留取上清,保存于零下20度备用。

[0187] 5.腹水纯化抗体

[0188] 以sorvall 50ml离心管作为反应容器,利用辛酸法从小鼠腹水中纯化单克隆抗体,实验步骤如下:

[0189] (1)将10ml腹水在室温20000rpm离心30min;

[0190] (2)取10ml上清液加入20ml 0.06M PH 4.0醋酸钠缓冲液,然后用1M NaOH调节PH至 PH 4.8;

[0191] (3)逐滴加入750ul辛酸,室温快速搅拌30min;然后室温离心混合物20000rpm, 30min;小心倾出上清液,并用枪头吸走沉淀物上面附着的上清液;

[0192] (4)用1L 0.1M PH 6.5NaPO₄,4mM EDTA透析两次,3小时换一次液,得到抗体溶液,测定蛋白浓度。

[0193] 实施例2.用于双抗夹心法检测的抗体对配对

[0194] (一)ELISA双抗夹心配对实验

[0195] 按照如下步骤,分别对实施例1纯化得到的每一种蛋白的单克隆抗体进行配对实验:

[0196] 1、包被:包被抗体(实施例1纯化得到的单抗之一)用PBS (PH=7.4) 稀释至5ug/ml。每孔100ul,37℃包被1h。

[0197] 2、洗板:PBST洗5次,拍干。

[0198] 3、封闭:封闭液(含3%BSA和4%蔗糖PBS),每孔200ul,37℃封闭1h。

[0199] 4、干燥:不洗板,拍干残液,风干30min。

[0200] 5、加入抗原：抗原(实施例1中纯化得到的抗原)用含1%BSA的PBS (PH=7.4) 稀释至2ug/ml,加入酶标板,从第1孔(2ug/ml) 倍比稀释至第11孔(0.2ng/ml),每孔100ul,第12孔加含1%BSA的PBS (PH=7.4) 作为阴性对照,37℃孵育40min。

[0201] 6、洗板：PBST洗5次,拍干。

[0202] 7、加入检测抗体：用含1%BSA的PBS (PH=7.4) 稀释生物素标记的单抗(实施例1纯化得到的单抗之一),然后加入酶标板,每孔100ul,37℃孵育40min。

[0203] 8、洗板：PBST洗5次,拍干。

[0204] 9、加入Streptavin-HRP：用含1%BSA的PBS (PH=7.4) 稀释Streptavin-HRP,每孔100ul, 37℃作用30min。

[0205] 10、洗板：PBST洗5次,拍干。

[0206] 11、显色：每孔加入四甲基联苯胺(TMB) 100ul显色。

[0207] 12、终止反应：每孔加入1M H₂SO₄ 100ul,酶标仪读值。

[0208] 结果如下表所示：

[0209] 表1.GP73双抗夹心配对实验结果

[0210]	检测抗体	包被抗体	抗原检测极限
	4G8E12-生物素	8F10D1	第 11 孔(200pg / ml)
		7E11D11	第 8 孔 (1.6ng / ml)
	7E11D11-生物素	8F10D1	第 11 孔(200pg / ml)
		10B9F11	第 11 孔(200pg / ml)
		4G8E12	第 11 孔(200pg / ml)
	10B9F11-生物素	4G8E12	第 8 孔 (1.6ng / ml)
		7E11D11	第 11 孔(200pg / ml)
		8F10D1	第 11 孔(200pg / ml)
	10B9F11-生物素	1G9C8	第 9 孔 (800pg / ml)

[0211] 表2.AFU双抗夹心配对实验结果

[0212]	检测抗体	包被抗体	抗原检测极限
	10F10G10-生物素	3F12D8	11 孔 (200pg/ml)
		5E5G5	10 孔 (400pg/ml)
		10E11G10	11 孔 (200pg/ml)

[0213]		5F2C3	6 孔 (6.4ng/ml)
		3F12E4	10 孔 (400pg/ml)
		7B9H5	6 孔 (6.4ng/ml)
	3F12E4-生物素	1A4H2	11 孔 (200pg/ml)
		1E1D1	11 孔 (200pg/ml)
		3F12D8	11 孔 (200pg/ml)
		4G1H4	11 孔 (200pg/ml)
		5F2D7	8 孔 (1.6ng/ml)
		10E11G10	11 孔 (200pg/ml)
	7B9H5-生物素	3F12D8	7 孔 (3.2ng/ml)
		4G1H4	8 孔 (1.6ng/ml)
	5F2C3-生物素	3F12D8	8 孔 (1.6ng/ml)

[0214] 表3.VEGF双抗夹心配对实验结果

[0215]	检测抗体	包被抗体	抗原检测极限
	7A11D4-生物素	5E1C3	11 孔 (200pg/ml)
	8E10D8-生物素	7A11D4	11 孔 (200pg/ml)
		5C7F10	10 孔 (400pg/ml)
		7A11E10	6 孔 (6.4ng/ml)
		8E10D8	8 孔 (1.6ng/ml)

[0216] 表4.CD147双抗夹心配对实验结果

[0217]	检测抗体	包被抗体	抗原检测极限
	6B7F12-生物素	4A4C3	11 孔 (200pg/ml)
		5A4E9	7 孔(3.2ng/ml)
		5C9G1	8 孔(1.6ng/ml)
		6A1D4	10 孔(400pg/ml)

[0218] 以甲胎蛋白标准品为抗原,按照上述ELISA双抗夹心实验步骤检测本实验室已有的抗 AFP的抗体对(包被抗体3B11H5和检测抗体2G5E8),结果表明,抗AFP抗体对的抗原检测极限为1.6ng/ml。

[0219] (二) 配对抗体对血清的检测效果验证

[0220] 按照上述ELISA双抗夹心配对实验步骤,以人血清为抗原,验证配对较好的抗体对

的检测效果,筛选出检测效果最好的抗体并送中国普通微生物菌种保藏管理中心进行保藏,结果如下:

[0221] GP73:包被抗体8F10D1,检测抗体10B9F11;

[0222] AFU:包被抗体3F12D8 (CGMCC NO:13583),检测抗体10F10G10 (CGMCC NO: 13584);

[0223] VEGF:包被抗体7A11D4 (CGMCC NO:13585),检测抗体8E10D8 (CGMCC NO: 13586);

[0224] CD147:包被抗体4A4C3 (CGMCC NO:13587),检测抗体6B7F12 (CGMCC NO:13588);

[0225] AFP:包被抗体3B11H5 (CGMCC NO:13581),检测抗体2G5E8 (CGMCC NO:13582)。

[0226] 实施例3.抗体的偶联和标记

[0227] 1、磁珠与包被抗体的偶联

[0228] (1) 清洗磁珠:悬浮未偶联的磁珠 (MC10030-01, MC10034-01, MC10036-01, MC10038-01, MC10044-01), 转移 5.0×10^6 个磁珠到离心管中, 将离心管放到磁性分离器上分离30-60s, 吸出上清, 加入100ul dH₂O涡旋重新悬浮磁珠, 磁性分离器上分离30-60s, 吸出上清。

[0229] (2) 活化磁珠:加入80ul 0.1M NaH₂PO₄ (Ph6.2), 涡旋悬浮磁珠;再加入10ul 50mg/ml sulfo-NHS (N-羟基琥珀酰亚胺) 和10ul 50mg/ml EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐), 涡旋混匀, 室温孵育20分钟以活化微球。然后用250ul 50mM Ph5.0MES (2-(N-吗啡啉) 乙磺酸) 溶液洗两次, 以除去未接合的sulfo-NHS和EDC。

[0230] (3) 抗体偶联磁珠:取100ul 50mM MES (Ph5.0) 加入活化后的磁珠中重悬磁珠, 取10-20ug 实施例2筛选得到的最佳包被抗体加入对应的磁珠中 (一种蛋白对应一种磁珠), 用MES定容至500ul, 室温下避光反应2小时。将离心管放到磁性分离器上分离30-60s, 吸出上清。

[0231] (4) 保存偶联抗体的磁珠:加入500ul PBS-TBN作为封闭缓冲液, 室温下旋转振动孵育 30分钟。将离心管放到磁性分离器上分离30-60s, 除去上清, 用1ml PBS-TBN作为清洗缓冲液洗两次, 吸出上清, 加入250-1000ul PBS-TBN 4℃保存。

[0232] (5) 抗体偶联效率的确认:用assay buffer稀释抗体偶联后的磁珠 (微球组), 使其终浓度为50磁珠/ul, 加入96孔板, 50ul/孔。将生物素标记的羊抗鼠IgG稀释成4ug/ml, 2ug/ml, 1ug/ml, 0.5ug/ml, 0.25ug/ml, 0.125ug/ml, 0.0625ug/ml, 每孔加入50ul, 空白对照加入 50ul assay buffer, 室温震荡孵育30min, wash buffer洗3次, 加入SAPE 50ul/孔, 室温振荡孵育30分钟, wash buffer洗2次, 最后加入80ul assay buffer上机 (luminex200) 检测, 结果如下表所示。

[0233] 表6肿瘤标志物抗体偶联确认结果

羊抗鼠 IgG 浓度 ng/ml	MFI				
	30-CD147	38-VEGF	34-AFP	36-AFU	44-GP73
650	24358	20180	24916	23707	25517.1
325	24267	15086	23671	18361	22234.6
162	24181	11210	19899	12987	16181.1
81	22073	7523	14578	6994.1	10020.6
40	15473	4939	9566	3377.6	5182.1
20	9451	2837	5754	1892.1	2765.1
10	5325	1711	3285	987.6	1417.6
0	13	20	17	15	15.5

[0234]

[0235] 2、检测抗体的生物素标记

[0236] 将2mg生物素(sigma)溶解于200ul溶剂DMSO中,将实施例2中筛选得到的最佳检测抗体用PH=9.6的碳酸缓冲液溶解至1mg/ml 450ul。向检测抗体溶液中加入溶解好的生物素 50ul (有机溶剂占体系10%,生物素过量),室温反应4h后加500ul纯甘油,保存于-20℃冰箱中备用。

[0237] 实施例4.标准曲线制作

[0238] 将实施例1制备得到的抗原用assay buffer进行4倍梯度稀释,得到浓度分别为1000ng/ml,250ng/ml,64ng/ml,16ng/ml,4ng/ml,1ng/ml,0.25ng/ml抗原溶液,同时以assay buffer作为空白对照。

[0239] 将实施例3中偶联好的磁珠用assay buffer稀释好后,避光96孔板中每孔加入50ul,96孔板放入磁板上,每孔加入120ul wash buffer,静置2分钟,倒掉wash buffer,加入不同浓度梯度的抗原,4℃过夜反应(15-18h),wash buffer洗三次;加入稀释好的生物素标记的检测抗体,50ul/孔,室温800转/分孵育30分钟;wash buffer洗三次;加入SAPE,50ul/孔,室温800转/分孵育30分钟,wash buffer洗两次,加入80ul assay buffer上机检测,结果如图2-6 所示,AFP,GP73,AFU,VEGF敏感度均可达到250pg/ml,CD147敏感度可达到64pg/ml。

[0240] 此外还进行了CD147/VEGF双因子,CD147/VEGF/AFP三因子,CD147/VEGF/ AFP/AFU四因子,以及CD147/VEGF/AFP/AFU/GP73五因子标准品检测。具体检测方法同上,不同之处在于:(1)将偶联了不同肿瘤标志物包被抗体的磁珠混合成一个体系;(2)抗原为不同肿瘤标志物抗原的混合液;(3)检测抗体为稀释好的生物素标记的不同肿瘤标志物检测抗体的混合液。

[0241] 结果如表7-10所示:

[0242] 表7.CD147,VEGF双因子标准品检测结果

抗原浓度 ng/ml	MFI	
	VEGF	CD147
1000	7931.0	9019.5
250	4887.5	8814.0
64	2515.0	6435.5
16	778.5	3355.0
4	197.0	801.5
1	65.5	140.0
0.25	40.0	43.0
0	27.0	19.0

[0244] 表8.CD147,VEGF,AFP三因子标准品检测结果

[0245]

抗原浓度 ng/ml	MFI		
	VEGF	CD147	AFP
1000	8197.0	7111.0	4323.5
250	6719.0	7214.0	4052.0
64	3509.5	6123.0	2393.0
16	1398.5	3949.5	1012.5
4	407.0	1386.5	300.5
1	77.0	266.0	80.5
0.25	34.0	67.0	33.0
0	23.0	16.0	18.5

[0246] 表9.CD147,VEGF,AFP,AFU四因子标准品检测结果

[0247]

抗原浓度 ng/ml	MFI			
	VEGF	CD147	AFP	AFU
1000	5519	10644.5	5944.5	2848
250	4726	8915.5	5491.5	2344
64	3389.5	8012	4094.5	1806
16	1382	5070	1798	916
4	398	1776	406.5	310.5

[0248]

1	109	439	127	108
0.25	58	126	51	44
0	24.5	36.5	23	25.5

[0249] 表10.CD147,VEGF,AFP,AFU,GP73五因子标准品检测结果

[0250]

抗原浓度 ng/ml	MFI				
	CD147	AFP	AFU	VEGF	GP73
1000	8163	5998	1922	9010	27109
250	8787	5430	1092	7653	25263
64	6979	3664	453	4342	18168
16	3463	1171	124	1422	3129
4	933	263	62	371	368
1	190	79	55	111	104
0.25	50	41	50	50	68
0	22	30	49	30	54

[0251] 多因子检测结果表明,本发明所提供的包被抗体和检测抗体具有以下优点:

[0252] (1) 特异性强:多对抗体在同一反应体系中同时检测多种蛋白时的反应性能与单独检测每种蛋白时的反应性能无明显变化,各因子抗体与其它因子之间未发生交叉反应。

[0253] (2) 准确性好:在同一反应体系中,各因子抗体之间不发生交叉反应。

[0254] (3) 灵敏度高:在同一反应体系中,检测AFP,GP73,AFU,VEGF的灵敏度均可达到250pg/ml,检测CD147的灵敏度可达到64pg/ml。

SEQUENCE LISTING

<110> 马, 杰

<120> 用于检测血清中血管内皮生长因子的抗体及试剂盒

<130> P160546/YAY

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 190

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> α -L-岩藻糖苷酶抗原的氨基酸序列

<400> 1

```

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

```

<210> 2

- <211> 570
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> α -L-岩藻糖苷酶抗原的基因编码序列
 <400> 2
 gacagccctg tcaaggatga ggtggtagta aatgaccgat ggggtcagaa ctgttcctgt 60
 caccatggag gatactataa ctgtgaagat aaattcaagc cacagagctt gccagatcac 120
 aagtgggaga tgtgcaccag cattgacaag ttttctggg gctatcgtcg tgacatggca 180
 ttgtctgatg ttacagaaga atctgaaatc atttcggaac tggttcagac agtaagtttg 240
 ggaggcaact atcttctgaa cattggacca actaaagatg gactgattgt tcccatcttc 300
 caagaaaggc ttcttgctgt tgggaaatgg ctgagcatca atggggaggc tatctatgcc 360
 tccaaaccat ggcggtgca atgggaaaag aacacaacat ctgtatggta tacctcaaag 420
 ggatcggtcg tttatgccat ttttctgcac tggccagaaa atggagtctt aaaccttgaa 480
 tccccataa ctacctcaac tacaaagata acaatgctgg gaattcaagg agatctgaag 540
 tgggtccacag atccagataa aggtctcttc 570
 <210> 3
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> α -L-岩藻糖苷酶抗原编码序列的PCR正向引物AFU-F2
 <400> 3
 cggaattcga cagccctgtc aaggatgag 29
 <210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> α -L-岩藻糖苷酶抗原编码序列的PCR反向引物AFU-R2
 <400> 4
 ccgctcgagg aagagacctt tatctggatc 30
 <210> 5
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 血管内皮生长因子抗原的氨基酸序列
 <400> 5

7

<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> 血管内皮生长因子抗原编码序列的PCR正向引物VEGF-F	
<400> 7	
cggaattcgc acccatggca gaaggaggag	30
<210> 8	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> 血管内皮生长因子抗原编码序列的PCR反向引物VEGF-R	
<400> 8	
ccgctcgagc cgcctcggct tgtcacatct g	31
<210> 9	
<211> 153	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> CD147抗原的氨基酸序列	
<400> 9	
Thr Val Phe Thr Thr Val Glu Asp Leu Gly Ser Lys Ile Leu Leu Thr	
1 5 10 15	
Cys Ser Leu Asn Asp Ser Ala Thr Glu Val Thr Gly His Arg Trp Leu	
20 25 30	
Lys Gly Gly Val Val Leu Lys Glu Asp Ala Leu Pro Gly Gln Lys Thr	
35 40 45	
Glu Phe Lys Val Asp Ser Asp Asp Gln Trp Gly Glu Tyr Ser Cys Val	
50 55 60	
Phe Leu Pro Glu Pro Met Gly Thr Ala Asn Ile Gln Leu His Gly Pro	
65 70 75 80	
Pro Arg Val Lys Ala Val Lys Ser Ser Glu His Ile Asn Glu Gly Glu	
85 90 95	
Thr Ala Met Leu Val Cys Lys Ser Glu Ser Val Pro Pro Val Thr Asp	
100 105 110	
Trp Ala Trp Tyr Lys Ile Thr Asp Ser Glu Asp Lys Ala Leu Met Asn	
115 120 125	
Gly Ser Glu Ser Arg Phe Phe Val Ser Ser Ser Gln Gly Arg Ser Glu	

130	135	140
Leu His Ile Glu Asn Leu Asn Met Glu		
145	150	
<210> 10		
<211> 459		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> 抗原的基因编码序列		
<400> 10		
acagtcttca ctaccgtaga agaccttggc tccaagatac tcctcacctg ctccttgaat	60	
gacagcgcca cagaggtcac agggcaccgc tggctgaagg ggggcgtggt gctgaaggag	120	
gacgcgtgc cgggccagaa aacggagttc aaggtggact cgcacgacca gtggggagag	180	
tactcctgcg tcttctctcc cgagcccatg ggcacggcca acatccagct ccacgggcct	240	
cccagagtga aggctgtgaa gtcgtcagaa cacatcaacg agggggagac ggccatgctg	300	
gtctgcaagt cagagtccgt gccacctgtc actgactggg cctggtacaa gatcactgac	360	
tctgaggaca aggccctcat gaacggctcc gagagcaggt tcttcgtgag ttcctcgcag	420	
ggccgggtcag agctacacat tgagaacctg aacatggag	459	
<210> 11		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> CD147抗原编码序列的PCR正向引物CD147-F3		
<400> 11		
cggaattcac agtcttcact accgtagaag	30	
<210> 12		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> CD147抗原编码序列的PCR反向引物CD147-R3		
<400> 12		
cgctcgagct ccatgttcag gttctcaatg	30	

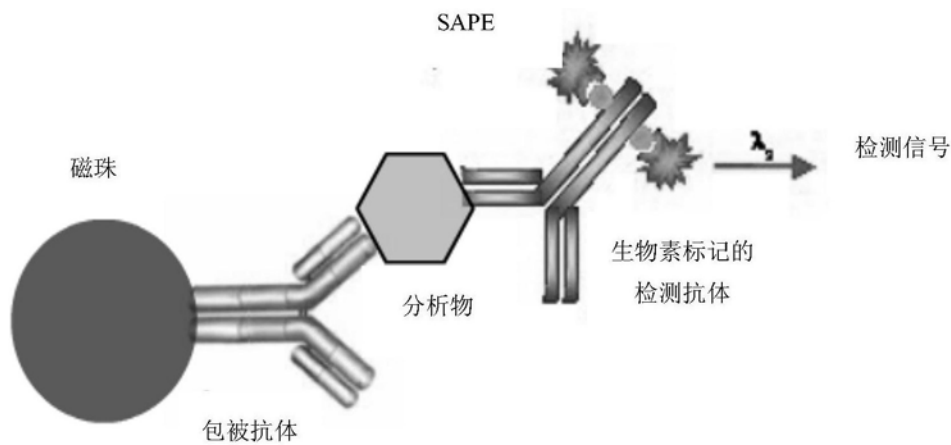


图1

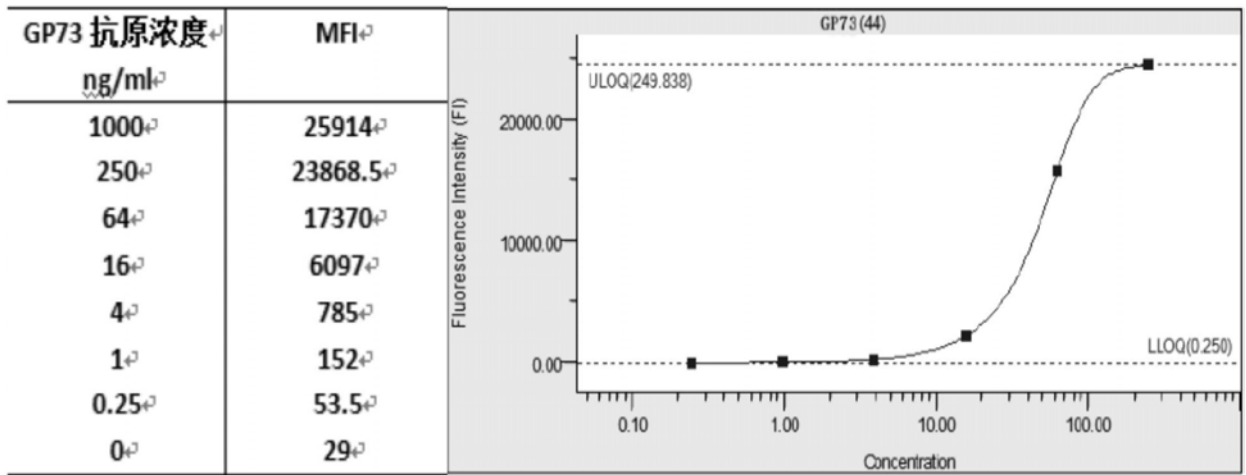


图2

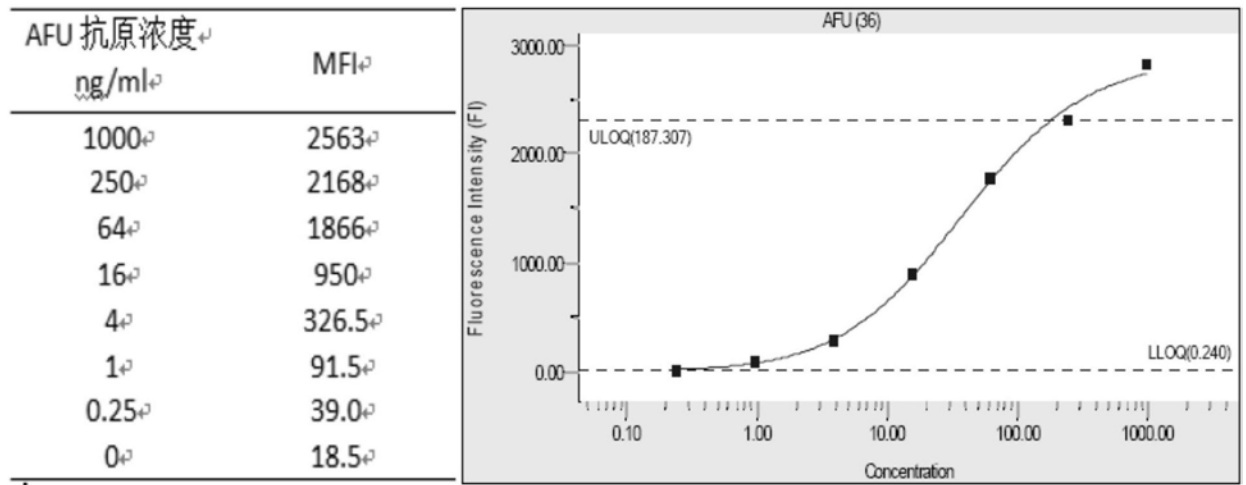


图3

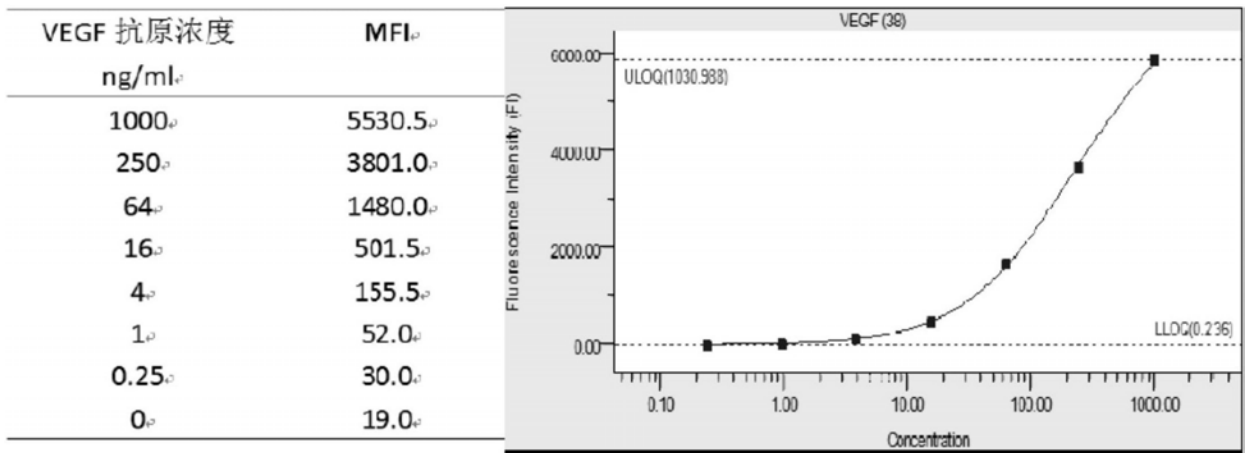


图4

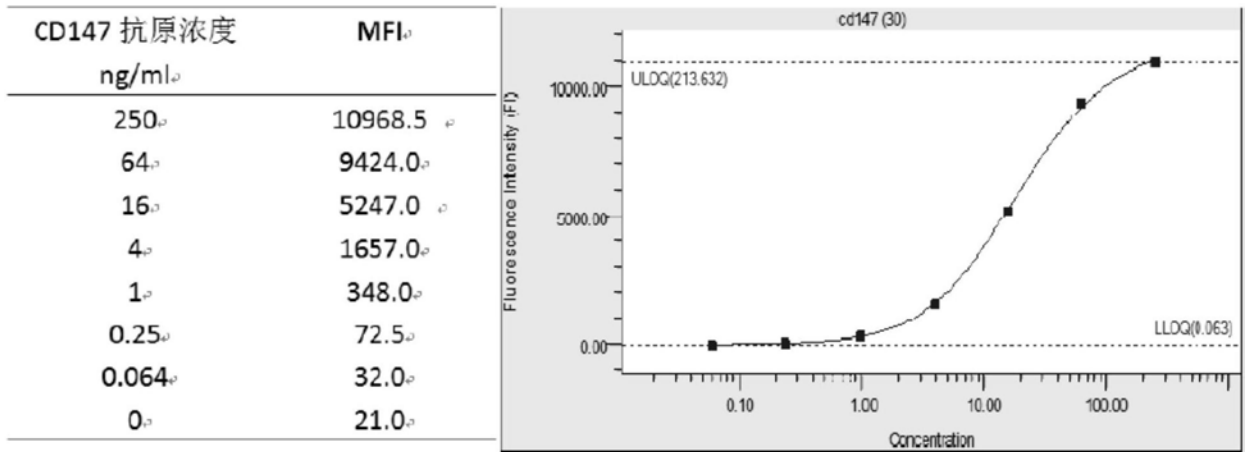


图5

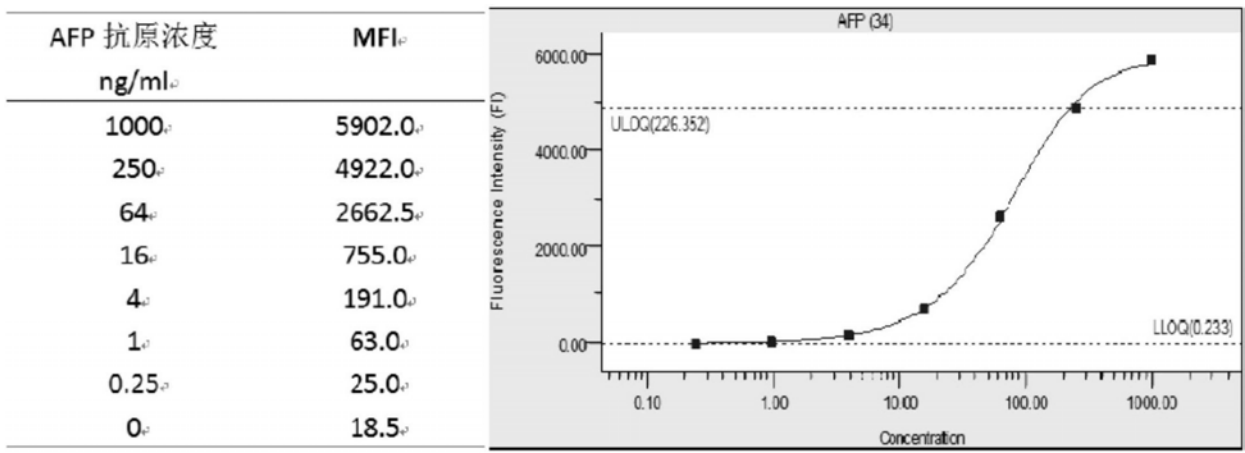


图6

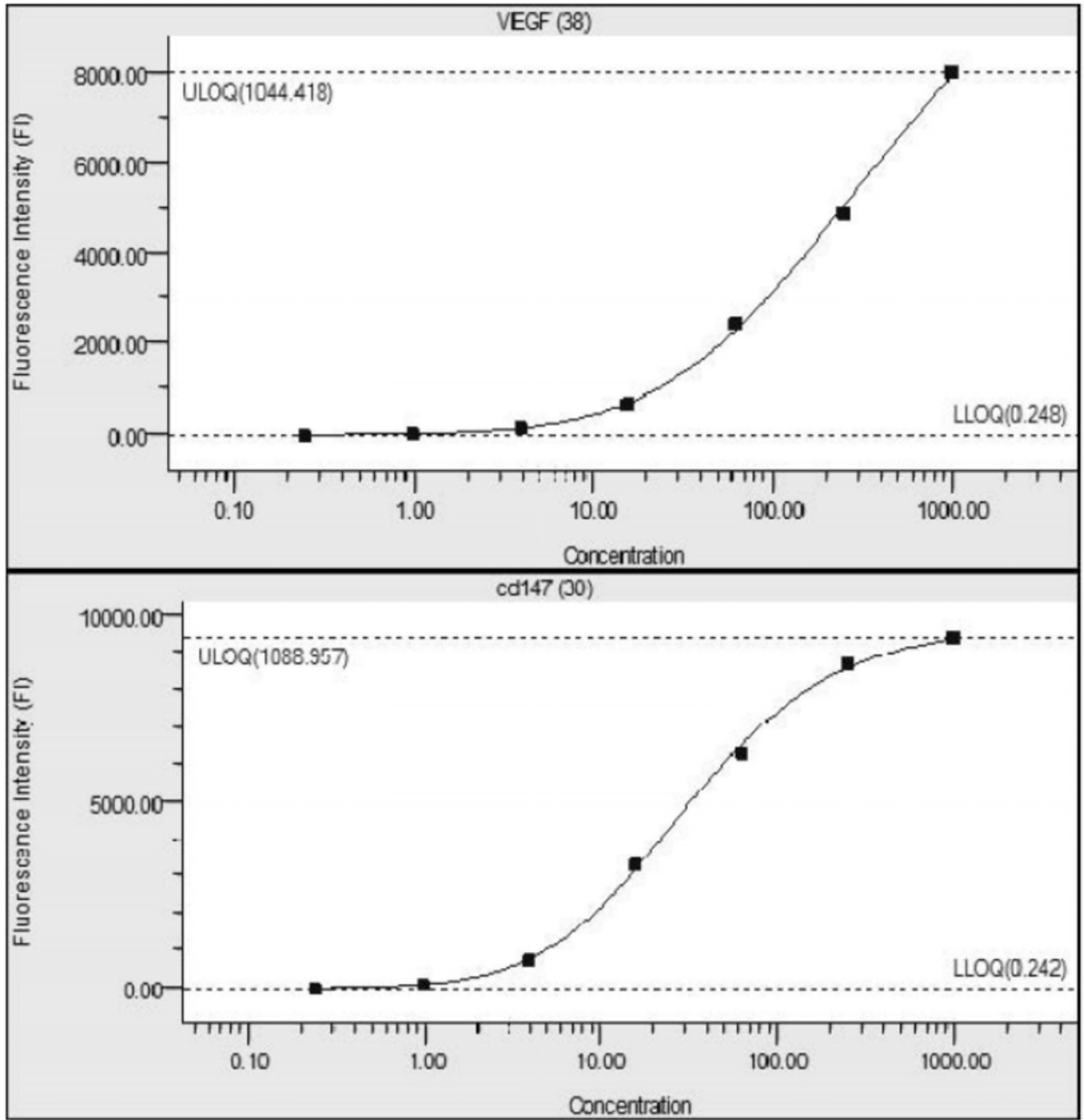


图7

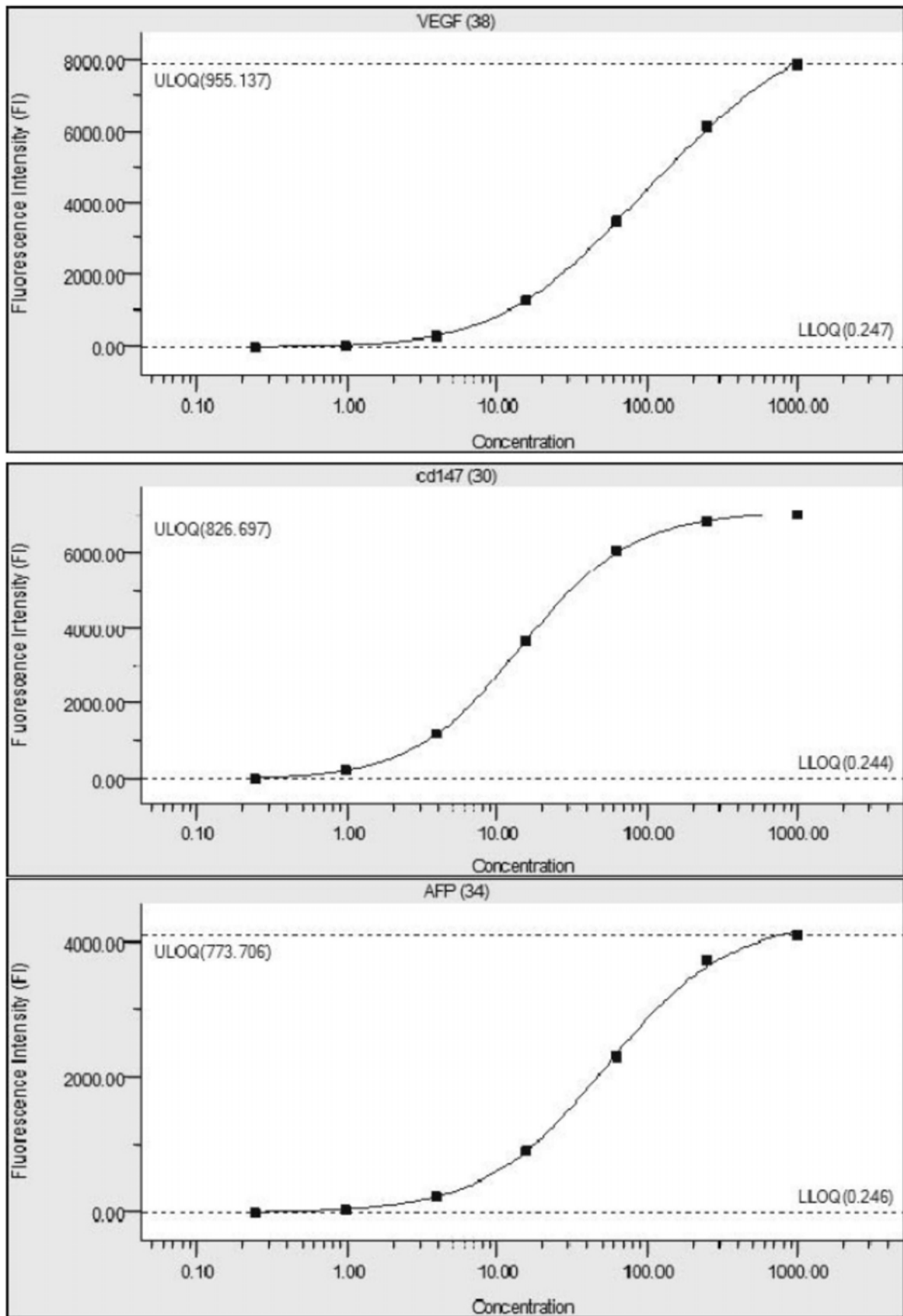


图8

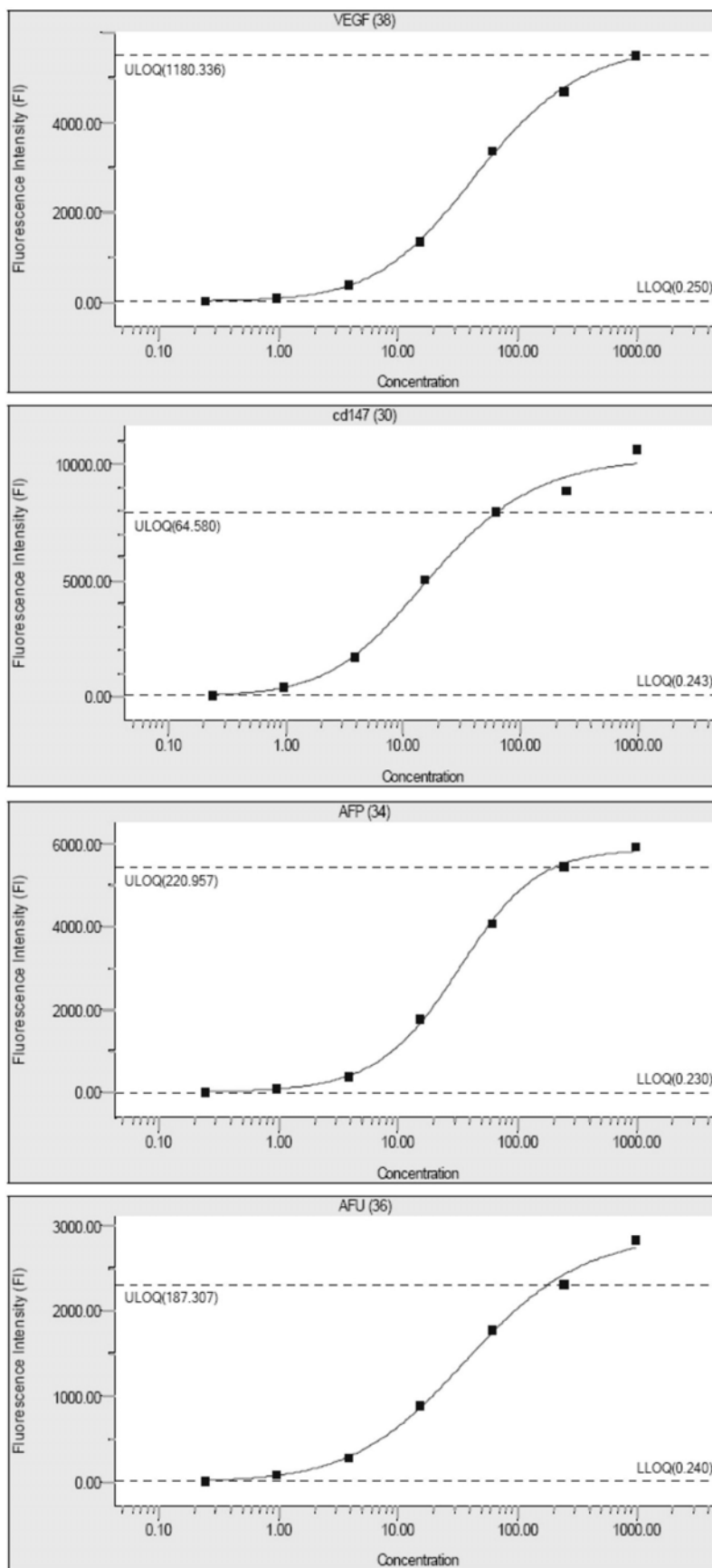


图9

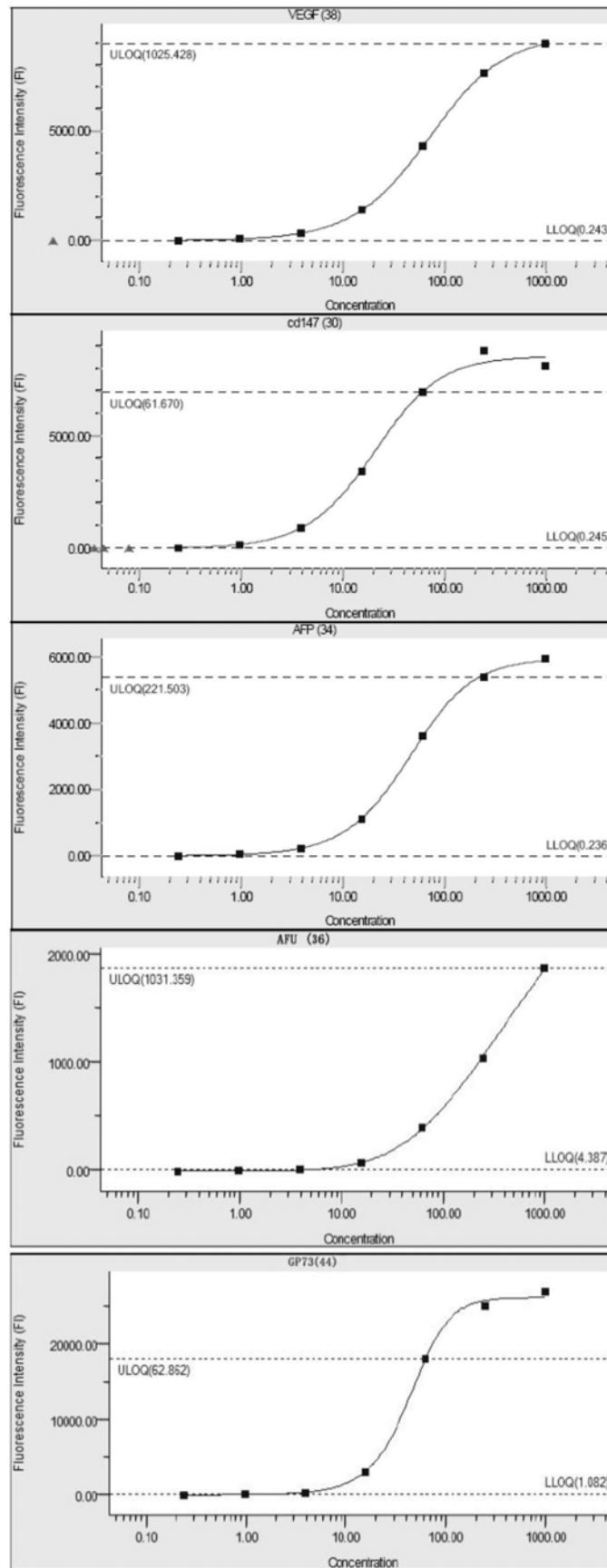


图10

专利名称(译)	用于检测血清中血管内皮生长因子的抗体及试剂盒		
公开(公告)号	CN107167588A	公开(公告)日	2017-09-15
申请号	CN201710191366.5	申请日	2017-03-28
申请(专利权)人(译)	马杰		
当前申请(专利权)人(译)	马杰		
[标]发明人	马杰 吴云		
发明人	马杰 吴云		
IPC分类号	G01N33/536 G01N33/577 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/536 G01N33/57438 G01N33/577 G01N2800/085		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及血清抗原检测技术，具体涉及一种用于检测血清中血管内皮生长因子的抗体及试剂盒。提供用于检测待测血清中肝癌标志物血管内皮生长因子的抗体对，其特征在于，由第一抗体和第二抗体组成；所述第一抗体作为包被抗体，由保藏编号为CGMCC NO：13585的杂交瘤细胞分泌；所述第二抗体作为检测抗体，由保藏编号为CGMCC NO：13586的杂交瘤细胞分泌。所述抗体对特异性强，可以同时与其他标志物抗体联合使用，不受干扰地检测出血清中VEGF；灵敏度高，可检测到浓度低至250pg/ml的VEGF，能够准确定量血清中的VEGF蛋白。

