



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105044356 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 11

(21) 申请号 201510404220. 5

(22) 申请日 2015. 07. 10

(66) 本国优先权数据

201510373877. X 2015. 07. 01 CN

(71) 申请人 临沂大学

地址 276005 山东省临沂市兰山区双岭路中段临沂大学

(72) 发明人 周宏 张宁波 刘静 张书圣

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

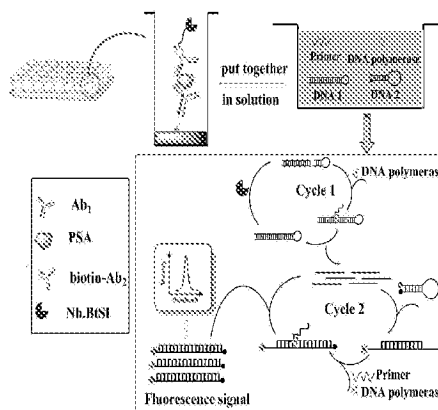
权利要求书1页 说明书4页
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

一种新型前列腺特异性抗原检测试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及免疫分析医学领域,具体地,本发明创新性地设计了一种基于二抗修饰剪切酶引发的DNA分子机器循环放大的前列腺特异性抗原检测试剂盒。本发明的试剂盒包括:anti-PSA抗体包被的固相载体、剪切酶标记的 anti-fPSA 抗体、上述剪切酶所作用的反应液(DNA 分子机器)、以及阴性和阳性对照液。本发明的试剂盒灵敏度高,与已有的光学免疫分析检测方法相比,可以提高分析的灵敏度,重现性,减少使用抗体的量。



1. 一种新型游离前列腺特异性抗原(fPSA)检测试剂盒其特征在于,所述试剂盒包括:
1) anti-PSA 抗体包被的固相载体;2) 剪切酶标记的 anti-fPSA 抗体;3) 上述剪切酶所作用的反应液(DNA 分子机器);4) 系列标准品溶液,所述系列标准品浓度分别为 0(S0), 0.2(S1), 0.8(S2), 1.6(S3), 3.2(S4), 8.6(S5), 20(S6) ng mL⁻¹。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述固相载体为微孔板、塑料珠或磁性颗粒。

3. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述标记 anti-fPSA 抗体的酶为剪切酶。

4. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述剪切酶所作用的反应液(DNA 分子机器)包含发卡 DNA 链、一条引物链、聚合酶 Klenow、dNTP 的 NEBuffer 缓冲液。

一种新型前列腺特异性抗原检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫分析医学领域,具体地,本发明是基于二抗修饰剪切酶引发的 DNA 分子机器循环放大技术对前列腺特异性抗原进行免疫分析检测的试剂盒。

背景技术

[0002] 前列腺癌(CaP)是目前男性群体中多发的癌症,如果在早期就能够被及时诊断则可以有效地应对和治疗。前列腺特异性抗原(PSA)自从几十年前被开发以来一直作为前列腺症临床诊断的主要蛋白类生物标志物。PSA 在血清中主要以游离 PSA 和结合态 PSA 存在,游离态称为 fPSA,结合态称为(tPSA)PSA, 水平在 4 ng mL^{-1} 或者更低的情况下被认为是正常值,而超过 4 ng mL^{-1} 被认为是危险值。

[0003] 传统的检测前列腺特异性抗原的方法有酶联免疫法(ELISA),放射性免疫测定(RIA),荧光法,化学发光法,电泳法,方法中多使用纳米金标记技术来获得放大信号,其操作复杂,且稳定性和重现性差。纳米材料在多次合成时很难保持结构和性能的一致,不利于检测结果的重现性。而基于各种 DNA 工具酶的 DNA 分子机器信号放大策略已经成为近几年来生物传感领域的研究热点。继聚合酶链式反应之后,恒温循环放大反应由于条件温和引起了研究者的注意。然而,虽然基于等温扩增技术的 DNA 分子机器由于 DNA 的优良可设计性和明显的放大作用被用于肿瘤疾病的检测,但是目前检测对象仅限于核酸类的肿瘤标志物或肿瘤细胞本身。核酸类肿瘤标志物基本上仅存在于肿瘤细胞内部,这就意味着在疾病检测过程中需要进行组织活检提取细胞等操作,检测过程对病人创伤比较大,不利于肿瘤疾病的早期、广泛筛查。而目前创伤比较小的血清类肿瘤标志物的检测由于检测方法的局限性,灵敏度远低于核酸类肿瘤标志物,无法满足血清中低丰度蛋白的灵敏检测。

[0004] 本发明创新性地设计了一种基于二抗修饰剪切酶引发的 DNA 分子机器循环放大的新型前列腺特异性抗原检测试剂盒,通过一抗/抗原/二抗的特异性夹心结构结合,使得二抗修饰的剪切酶引发了 DNA 分子机器的剪切、杂交、替换、聚合反应实现对信号的放大,进而实现对前列腺特异性抗原高灵敏和高特异检测。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种游离前列腺特异性抗原(fPSA)荧光免疫分析诊断试剂盒,该试剂盒操作简单、灵敏度高、特异选择性好,适用于人体精液、血清中前列腺特异性抗原的快速、准确检测。

[0006] 本发明中试剂盒的组成为:

- 1) anti-PSA 抗体包被的固相载体;
- 2) 剪切酶标记的 anti-fPSA 抗体;
- 3) 上述剪切酶所作用的反应液;
- 4) 系列标准品溶液。

[0007] 其中,所述固相载体为微孔板、塑料珠、塑料管或磁性颗粒。所述酶为 Nb. BtSI 剪

切酶。剪切酶所作用的反应液为发卡 DNA 链、一条引物链、聚合酶 Klenow、dNTP 的 NEBuffer 缓冲液。

[0008] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案为:

1、96 孔或 48 孔微孔板的包被:制备含有前列腺特异性抗原第一抗体(anti-PSA)的包被液,依次滴入 96 孔或 48 孔微孔板里,使酶标板底部修饰上一层 anti-PSA。然后用缓冲液洗涤微孔板,使用牛血清白蛋白封闭经洗涤的微孔板。

[0009] 2、制备修饰有剪切酶的前列腺抗原第二抗体(anti-fPSA):首先合成修饰有生物素的前列腺第二抗体,将其与链酶亲和素特异性结合,然后继续通过亲和素和生物素的亲和反应修饰上生物素-NHS,最后将剪切酶 Nb. BtSI 固定其上,从而制备成了修饰有剪切酶的 anti-fPSA。

[0010] 3、前列腺特异性抗原的检测:把含有前列腺特异性抗原的待测液加入到微孔板的孔里,使固定于板上的前列腺抗原的第一抗体与待测抗原特异性结合;加入制备好的修饰有剪切酶 Nb. BtSI 的 anti-fPSA,构成抗体/抗原/抗体的夹心结构。加入剪切酶所作用的反应液(DNA 分子机器),即含有两条发卡 DNA 链、一条引物链、聚合酶 Klenow、dNTP 的 NEBuffer 缓冲液,引发 DNA 分子机器,打开发卡 DNA,使修饰其两端的荧光素和猝灭剂互相远离,呈现荧光信号。

[0011] 4、荧光强度测试:通过实验选择系列标准品浓度为 0,0.2,0.8,1.6,3.2,8.6,20 ng mL⁻¹。

[0012] 5、配制试剂盒其他组分:20 倍浓缩洗涤液(含有 0.05% 吐温-20 的 0.02M 磷酸盐缓冲液, pH=7.4)、样品稀释液(灭活的小牛血清)、剪切酶所作用的反应液为发卡 DNA 链、一条引物链、聚合酶 Klenow、dNTP 的 NEBuffer 缓冲液。

[0013] 6、鉴定该方法制成试剂盒的准确度、灵敏度、精密度和稳定性合格。

[0014] 7、根据试剂盒的需要量将这些组分分装在小瓶中,组装为成品。

附图说明

[0015] 图 1 为本发明用于荧光检测前列腺特异性抗原的示意图。

[0016] 图 2 为荧光响应曲线。

[0017] 图 3 为工作曲线。

[0018] 实施例 1

以下为实施本发明的具体示例,其作用在于进一步阐明本发明的内容,使阅读者更容易理解,但不构成对本发明要求的保护范围的限定或限制。

[0019] 实验条件:

荧光分光光度计(F-4500 型,日本, Hitachi 公司)、所用脱氧核糖核苷酸序列及四种脱氧核苷酸三磷酸的混合物(dNTP)(大连宝生物工程有限公司)、前列腺特异性抗原及抗体(上海领潮生物有限公司)、生物素-NHS、牛血清白蛋白(美国西格玛试剂公司)、剪切酶 Nb. BtSI、聚合酶 Klenow 片段、NEBuffer 缓冲液(纽英伦生物技术有限公司)、碳酸钠、碳酸氢钠等基础药品(国药集团化学试剂有限公司)、10×Klenow 缓冲液的成分:100 mM Tris-HCl, 70 mM MgCl₂和 1 mM DTT, pH = 7.5、包被缓冲液的成分:50 mM 碳酸钠, 50 mM 碳酸氢钠, pH = 9.6。

[0020] 具体操作过程：

1、微孔板的包被：用 50 mM 的碳酸盐包被缓冲液 (pH 9.6) 溶解 anti-PSA 抗体，使 anti-PSA 抗体浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，加 100 μL / 孔到微孔板中，4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜。第二天弃去包被液后，用 蒸馏水 洗涤 3 次，每孔加入 150 μL 1% 牛血清白蛋白 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h。

[0021] 2、制备修饰有剪切酶的前列腺抗原第二抗体：每孔加入 100 μL 待测抗原溶液反应 90min，洗涤后加入 100 μL 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 前列腺抗原第二抗体反应 90min。洗涤后加入 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉亲和素反应 40min，然后加入 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 生物素 -NHS 100 μL 反应 40min，最后加入 100 μL 剪切酶 Nb. BtSI (1U/ μL) 到酶标板表面反应 1h，洗涤后备用。

[0022] 3、剪切酶所作用的反应液 (DNA 分子机器)：两条发卡 DNA 的浓度为 10^{-6}M ，聚合酶 klenow 的浓度为 0.1U/ μL 。dNTP 的浓度为 2.0 mM 组成 DNA 分子机器反应液，加入微孔板中反应 90 min。

[0023] 4、荧光测试：上述反应完后，将反应液放入荧光分光光度计中进行荧光测试。

[0024] 5、通过实验选择系列标准品浓度为 0, 0.2, 0.8, 1.6, 3.2, 8.6, 20 ng mL^{-1} 。

[0025] 6、配制试剂盒其他组分：20 倍浓缩洗涤液 (含有 0.05% 吐温 -20 的 0.02M 磷酸盐缓冲液，pH=7.4)、样品稀释液 (灭活的小牛血清)、剪切酶所作用的反应液为发卡 DNA 链、一条引物链、聚合酶 Klenow、dNTP 的 NEBuffer 缓冲液。

[0026] 7、鉴定该方法制成试剂盒的准确度、灵敏度、精密度和稳定性合格。

[0027] 8、根据试剂盒的需要量将这些组分分装在小瓶中，组装为成品。

[0028] 其实验结果：

如图 2 所示，随着前列腺抗原浓度的升高，荧光信号强度增加。将每条曲线在 670 nm 处的峰值荧光对浓度的对数值作图，工作曲线见图 3 所示。当前列腺抗原浓度在 0.5 ng mL^{-1} 到 100 ng mL^{-1} 的范围内，荧光响应与其呈线性关系，回归方程为 $I (\text{a. u.}) = 68.35 + 149.1 \log c (\text{PSA, ng mL}^{-1})$ ，该试剂盒对列腺抗原 (PSA) 的检测限为 0.5 ng mL^{-1} 。

[0029] 实施例 2 本发明试剂盒的使用方法：

1、自 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出试剂盒，室温平衡 20 分钟，取一瓶浓缩洗液，加蒸馏水 (1 mL + 19 mL) 备用。

[0030] 2、将微孔板从密封袋中取出，将洗涤液注满各孔，静置 10-20 秒，甩掉洗涤液，重复洗板，最后在干净的吸水纸上拍干。

[0031] 3、设系列标准品浓度各 2 孔，每个样品孔 2 孔，取标准品或样品溶液各 50 μL 于相对应板孔中，微量振荡器充分振荡混匀，用不干胶片封盖反应板，然后置反应板 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 分钟。

[0032] 4、小心甩去反应液，然后洗涤五次同步步骤 2。

[0033] 5、取剪切酶标记的 anti-fPSA 抗体溶液 100 μL 于相对应板孔中，微量振荡器充分振荡混匀，用不干胶片封盖反应板，然后置反应板 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 分钟。

[0034] 6、小心甩去反应液，然后洗涤五次同步步骤 2。

[0035] 7、于相对应板孔中加入剪切酶所作用的反应液 (DNA 分子机器) 200 μL ，微量振荡器充分振荡混匀，用不干胶片封盖反应板，然后置反应板 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 60 分钟后对溶液荧光强度进行测量。

[0036] 8、用对数坐标以荧光强度值对 fPSA 浓度对数作图，通过标准曲线对样品血清中

fPSA 实现定量分析。

[0037] 本发的有益效果：

结果特异性强、灵敏度高、稳定、方便等。本发明操作简便，所需检测仪器（荧光分光光度计）在各大医院和检测中心普遍使用。

SEQUENCE LISTING

<110>

<120>

<130> 2015

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 78

<212> DNA

<213>

<400> 1

atccagatgg tcgataacct gcagtgagat ccgtagtttt ttctacggat ctcactgcag 60

gttategacc atctggat 78

<210> 2

<211> 47

<212> DNA

<213>

<400> 2

agactcgagc ggatccagat ggtcgataac ctcagccgct cgagtct 47

<210> 3

<211> 8

<212> DNA

<213>

<400> 3

ctcgagcg 8

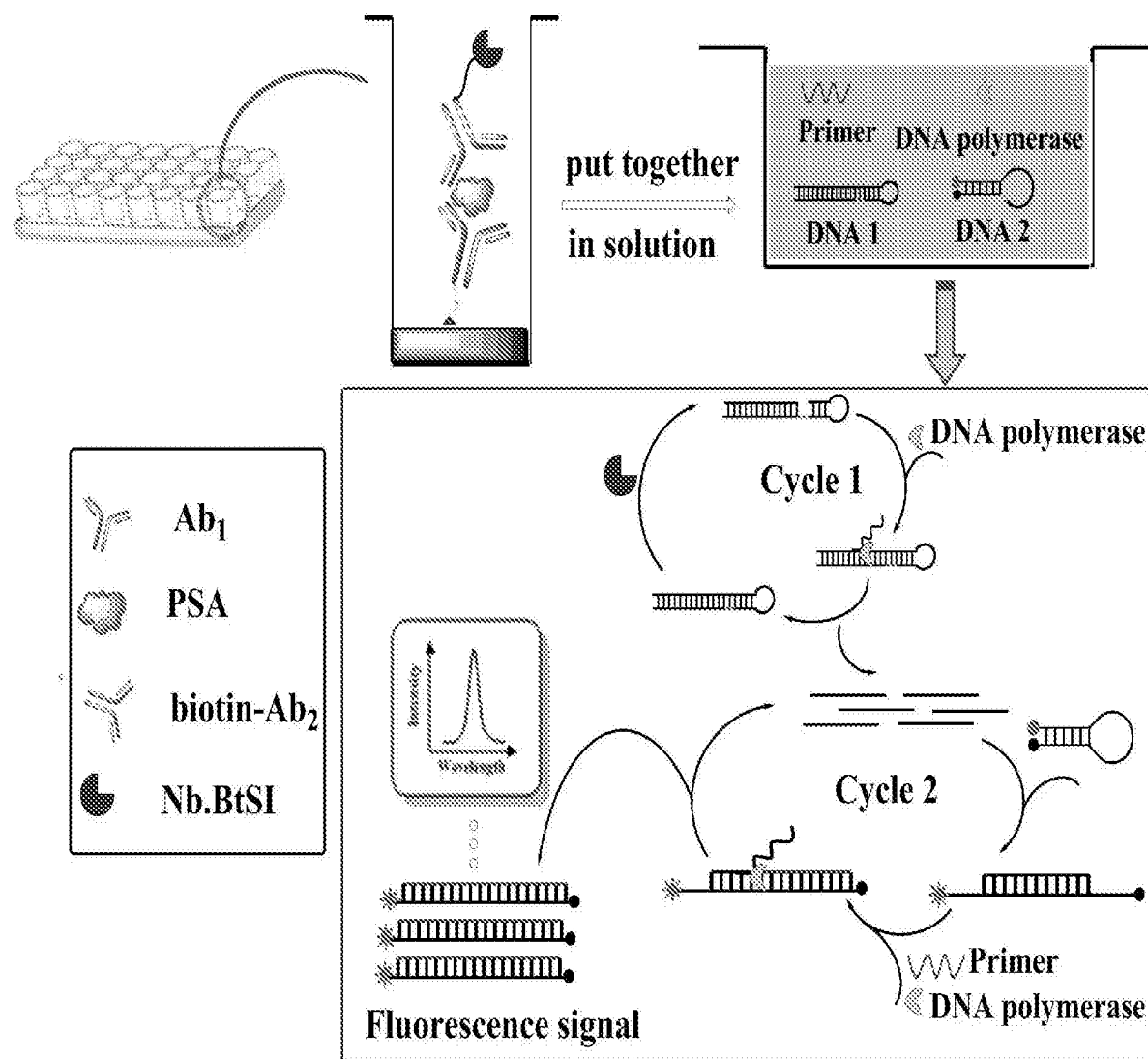


图 1

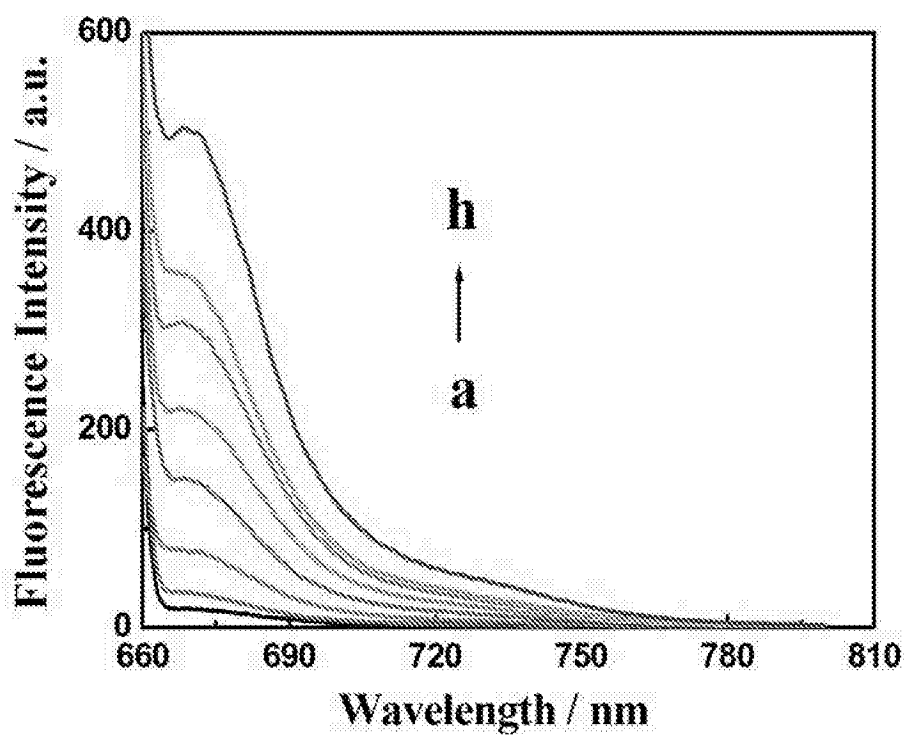


图 2

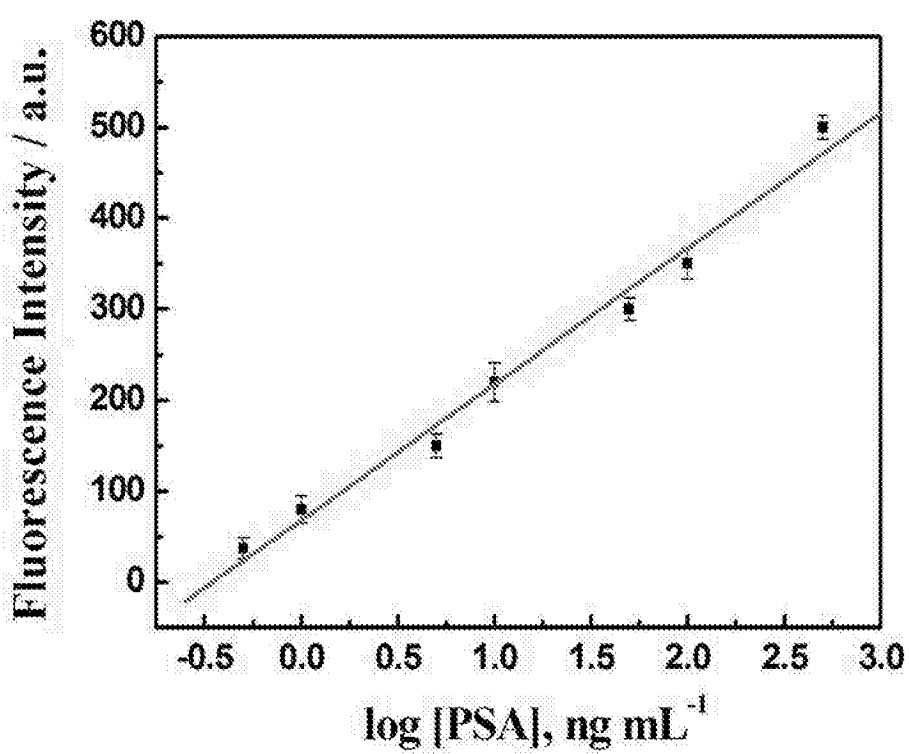


图 3

专利名称(译)	一种新型前列腺特异性抗原检测试剂盒		
公开(公告)号	CN105044356A	公开(公告)日	2015-11-11
申请号	CN201510404220.5	申请日	2015-07-10
[标]申请(专利权)人(译)	临沂大学		
申请(专利权)人(译)	临沂大学		
当前申请(专利权)人(译)	临沂大学		
[标]发明人	周宏 张宁波 刘静 张书圣		
发明人	周宏 张宁波 刘静 张书圣		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/574 G01N33/543 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/57434		
优先权	201510373877.X 2015-07-01 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及免疫分析医学领域，具体地，本发明创新性地设计了一种基于二抗修饰剪切酶引发的DNA分子机器循环放大的前列腺特异性抗原检测试剂盒。本发明的试剂盒包括：anti-PSA抗体包被的固相载体、剪切酶标记的anti-fPSA抗体、上述剪切酶所作用反应液（DNA分子机器）、以及阴性和阳性对照液。本发明的试剂盒灵敏度高，与已有的光学免疫分析检测方法相比，可以提高分析的灵敏度，重现性，减少使用抗体的量。

