



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106596939 A

(43)申请公布日 2017. 04. 26

(21)申请号 201611116236.7

(22)申请日 2016.12.07

(71)申请人 江西三惠生物科技有限公司

地址 330029 江西省南昌市天祥北大道989号

(72)发明人 余跃飞 李其云 万以叶

(74)专利代理机构 江西省专利事务所 36100

代理人 黄新平

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

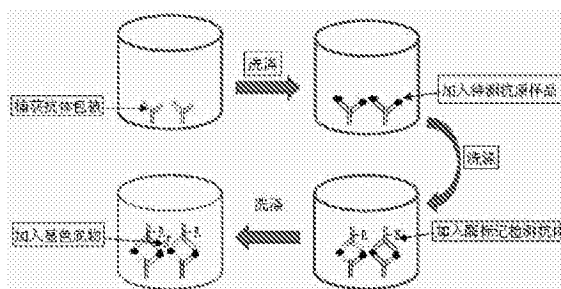
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

用于肝癌体外诊断试剂盒及其检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于肝癌体外诊断试剂盒,包括捕获抗体,所述捕获抗体是脯氨酸胺酶(PLD)制得的单克隆抗体;所述试剂盒还包括检测抗体,所述检测抗体为脯氨酸胺酶制得的多克隆抗体。本发明的有益效果如下:具有灵敏度高准确性强的特点,其灵敏度及准确性均达到70%以上。



1. 一种用于肝癌体外诊断试剂盒,包括捕获抗体,其特征在于:所述捕获抗体是脯氨酸胺酶制得的单克隆抗体,所述试剂盒还包括检测抗体,所述检测抗体为脯氨酸胺酶制得的多克隆抗体;

其制备方法包括如下步骤:

(1) 抗原的制备:将脯氨酸胺酶的基因克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到所需的抗原,其中,所述抗原作为标准品用;

(2) 捕获抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物得到相应的单克隆抗体,所述单克隆抗体作为本试剂盒的捕获抗体;

(3) 检测抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物得到相应的多克隆抗体,所述多克隆抗体作为本试剂盒的检测抗体;

(4) 捕获抗体包被:

①. 用碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液将浓度为 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的捕获抗体包被 微量滴定板的孔;
②. 封盖微量滴定板并在 4°C 下孵育过夜;③. 弃去包被液,并用洗涤液洗涤微量滴定板两次,每次在微孔中加入 $200\mu\text{l}$ PBST,在水槽上方轻轻甩动微量滴定板,除去洗涤液,在纸巾上轻拍微量滴定板,除去剩余的液滴,晾干放于 4°C 环境中备用;

(5) 封闭和加样:每孔添加 $200\mu\text{l}$ 封闭缓冲液,封闭包被孔中剩余的蛋白质结合位点。

用于肝癌体外诊断试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及癌症诊断检测用的试剂盒领域,具体为一种用于肝癌体外诊断试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 2015年世卫组织报告指出,中国肝癌发病率高居全球之首。肝癌全球有78.2万新发病例,74.5万死亡病例。其中,中国的新发病例数及死亡病例数均占了约50%左右;也就是说我国每年有40万新发肝癌患者有待于诊断。另外,还有大量的肝硬化病人要做肝癌的鉴别诊断。目前,中国慢性乙型肝炎病人约为2000万人,其中近25%~30%慢性乙肝病人可发展为肝硬化,由此可估算出大概有600万肝硬化病人要做鉴别诊断。

[0003] 临床治疗发现,肝癌的早期诊断及治疗非常重要。肿瘤标志物(tumor markers, TM)是指在肿瘤发生和增殖过程中,由肿瘤细胞本身合成、释放,或由机体对肿瘤细胞反应而产生的标志肿瘤存在和生长的一类物质。这些物质在正常成人中不存在或者是在癌症患者中出现的水平显著高于正常人。目前肿瘤标志物检测技术被认为是早期发现无症状微灶肿瘤的唯一途径,这一检测技术可先于X光片、超声、CT、MRI或PET-CT等物理检查发现肿瘤。可用于高危人群恶性肿瘤的筛查,肿瘤诊断与鉴别诊断,评估治疗的效果,预测或监视肿瘤复发或转移。目前,医院出现的肝癌诊断试剂都是检测一些常见的肿瘤标记物,灵敏性及准确性都偏低。市场上还没有针对肝癌的快速高效诊断试剂盒问世,严重影响到肝癌早期发现及治疗。

发明内容

[0004] 本发明的目的是针对以上述现有肝癌诊断存在的不足,提供一种灵敏度高、准确性强且使用方便高效的用于肝癌体外诊断试剂盒。

[0005] 本发明另一目的是提供一种用于肝癌体外诊断试剂盒的检测方法。

[0006] 为了实现本发明目的,本发明采取的技术方案是:用于肝癌体外诊断试剂盒,包括捕获抗体,所述捕获抗体是脯氨酸胺酶制得的单克隆抗体。

[0007] 所述试剂盒还包括检测抗体,所述检测抗体为脯氨酸胺酶制得的多克隆抗体。

[0008] 所述捕获抗体为将脯氨酸胺酶克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到相应的抗原,将所述抗原免疫哺乳动物得到的相应单克隆抗体。

[0009] 所述捕获抗体的制备方法包括如下步骤:

(1) 抗原的制备:把脯氨酸胺酶的基因克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到抗原,此抗原也可作为标准品用;

(2) 捕获抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物,得到相应的单克隆抗体为捕获抗体。

[0010] 所述检测抗体为将脯氨酸胺酶的基因克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到相应的抗原,将所述抗原免疫哺乳动物得到的相应多克隆抗体。

[0011] 所述检测抗体的制备方法包括如下步骤:

(1) 抗原的制备:把脯氨酸肽酶的基因克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到抗原,此抗原也可作为标准品用;

(2) 检测抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物,得到相应的多克隆抗体为检测抗体。

[0012] 所述捕获抗体预先包被于微量滴定板的孔内,可以简化步骤,提高检测效率。

[0013] 用于肝癌体外诊断试剂盒的制备方法,其包括以下步骤:

(1) 抗原的制备:将脯氨酸肽酶的基因克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到所需的抗原,其中,所述抗原也可作为标准品用;

(2) 捕获抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物得到相应的单克隆抗体,所述单克隆抗体作为本试剂盒的捕获抗体;

(3) 检测抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物得到相应的多克隆抗体,所述多克隆抗体作为本试剂盒的检测抗体;

(4) 捕获抗体包被:

①.用碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液 (pH9.6) 将浓度为 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的捕获抗体包被微量滴定板的孔;②. 封盖微量滴定板并在 4°C 下孵育过夜;③. 弃去包被液(碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液稀释的捕获抗体),并用洗涤液洗涤微量滴定板两次,每次在微孔中加入 $200\ \mu\text{l}$ PBST(磷酸盐吐温缓冲液),在水槽上方轻轻甩动微量滴定板,除去洗涤液,在纸巾上轻拍微量滴定板,除去剩余的液滴,晾干放于 4°C 环境中备用;

(5) 封闭和加样:每孔添加 $200\mu\text{l}$ 封闭缓冲液(1.2%BSA/PBS),封闭包被孔中剩余的蛋白质结合位点。

[0014] 用于肝癌体外诊断试剂盒的检测方法,其包括以下步骤:

(1) 抗原的制备:将脯氨酸肽酶的基因克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到所需的抗原;

(2) 捕获抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物得到相应的单克隆抗体,所述单克隆抗体作为本试剂盒的捕获抗体;

(3) 检测抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物得到相应的多克隆抗体,所述多克隆抗体作为本试剂盒的检测抗体;

(4) 捕获抗体包被:

①.用碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液 (pH9.6) 将浓度为 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的捕获抗体包被微量滴定板的孔;

②.封盖微量滴定板并在 4°C 下孵育过夜;

③. 弃去包被液(碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液稀释的捕获抗体),并用洗涤液洗涤微量滴定板两次,每次在微孔中加入 $200\ \mu\text{l}$ PBST(磷酸盐吐温缓冲液),在水槽上方轻轻甩动微量滴定板,除去洗涤液,在纸巾上轻拍微量滴定板,除去剩余的液滴,晾干放于 4°C 环境中备用;

(5) 封闭

①.在微量滴定板的每个孔添加 $200\mu\text{l}$ 封闭缓冲液(1.2%BSA/PBS),封闭包被孔中剩余的蛋白质结合位点;

②.封盖微量滴定板并在 37°C 孵育1小时;

(6) 加样

①. 将 100 μl 的样品添加到每个孔, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 分钟; 要得到准确的定量结果, 通常做法是比较未知样品与标准曲线的信号。每个酶标板都必须测定标准品 (两重测定或三重测定) 和空白样, 以确保准确性;

②. 弃去样品, 并洗涤微量滴定板三次, 每次在微孔中加入 200 μl PBST (磷酸盐吐温缓冲液);

③. 将 100 μl 浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的检测抗体添加到每个孔;

④. 封盖微量滴定板并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时;

⑤. 用 PBST 洗涤微量滴定板四次;

⑥. 添加 100 μl 标记二抗;

⑦. 封盖微量滴定板并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时;

⑧. 用 PBST 洗涤微量滴定板四次;

(7) 检测

①. 将 TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺) 溶液添加到每个孔, 孵育 15-30 分钟, 添加等体积的终止液, 然后在 450 nm 处读取光密度。

[0015] ②. 由系列稀释液得到的数据绘制标准曲线, 浓度标在 X 轴 (对数标度) 上, 而吸光度标在 Y 轴 (线性标度) 上; 通过内插法在此标准曲线上得出样品浓度。

[0016] 本发明从众多的肿瘤标记物中, 筛选出脯氨酸胺酶 (PLD) 组成肝癌快速诊断试剂盒。脯氨酸胺酶是一种广泛存在于人体各组织和细胞的亚氨基胺酶, 它催化含有 C-末端脯氨酸或羟脯氨酸 2 肽的水解, 对胶原合成和细胞生长过程中脯氨酸的再循环起重要作用。其血中水平变化与肝损害程度及肝病慢性化密切相关。研究表明脯氨酸胺酶在肿瘤细胞表面的高表达, 是一种新型恶性肿瘤高特异性的分子标记物。最近的研究也证实脯氨酸胺酶是肝癌的理想标记物。

与现有技术相比, 本发明的有益效果如下: 具有灵敏度高准确性强的特点, 其灵敏度及准确性均达到 70% 以上。

附图说明

[0017] 图 1 是本发明用于肝癌体外诊断试剂盒的原理图;

图 2 是本发明用于肝癌体外诊断试剂盒的检测抗体最佳工作浓度的选择对比图;

图 3 是本发明用于肝癌体外诊断试剂盒的对临床血清标本的诊断及鉴别诊断对比说明图;

图 4 是本发明用于肝癌体外诊断试剂盒敏感性的检测对比图;

图 5 是本发明用于肝癌诊断试剂盒特异性的检测对比图;

图 6 是本发明用于肝癌体外诊断试剂盒在肝癌治疗前后血中检测到脯氨酸胺酶的变化对比图。

具体实施方式

[0018] 以下结合附图和具体实施例对本发明用于肝癌体外诊断试剂盒进行详细的描述说明。

[0019] 用于肝癌体外诊断试剂盒,包括捕获抗体、捕获抗体封闭缓冲液、标准品、标记抗体、洗涤液及显色液,所述标记抗体选用HRP标记二抗;所述捕获抗体是脯氨酸胺酶制得的单克隆抗体;其灵敏度及准确性均达到70%以上。

[0020] 所述捕获抗体为将脯氨酸胺酶克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到相应的抗原,将所述抗原免疫哺乳动物得到的相应单克隆抗体。

[0021] 所述捕获抗体的制备方法包括如下步骤:

(1) 抗原的制备:通过分子克隆的方法把脯氨酸胺酶基因克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到抗原,此抗原也可作为标准品用;所述抗原的制备也可以使用现有常规方法制备,在此不再累赘。

[0022] (2) 捕获抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物,得到相应的单克隆抗体为捕获抗体。所述哺乳动物是小鼠及兔子,优选小鼠。所述捕获抗体的制备也可以使用现有常规方法制备,在此不再累赘。

[0023] 所述检测抗体包括脯氨酸胺酶制得的多克隆抗体。

[0024] 所述捕检测抗体为将脯氨酸胺酶的基因克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到相应的抗原,将所述抗原免疫哺乳动物得到的相应多克隆抗体。所述检测抗体的制备方法包括的步骤如下:

(1) 抗原的制备:通过分子克隆的方法把脯氨酸胺酶基因克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到抗原,此抗原也可作为标准品用;

(2) 检测抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物,得到相应的多克隆抗体为检测抗体。所述哺乳动物是小鼠及兔子,优选兔子;

其中,所述捕获抗体可以预先包被于 PVC 材质的微量滴定板的孔内,可以简化步骤,提高检测效率。

[0025] 用于肝癌体外诊断试剂盒的制备方法,其包括以下步骤:

(1) 抗原的制备:通过分子克隆的方法将脯氨酸胺酶基因克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到所需的抗原,其中,所述抗原也可作为标准品用;

(2) 捕获抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物得到相应的单克隆抗体,所述单克隆抗体作为本试剂盒的捕获抗体;

(3) 检测抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物得到相应的多克隆抗体,所述多克隆抗体作为本试剂盒的检测抗体;

(4) 捕获抗体包被:

①. 用碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液 (pH9.6) 将浓度为 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的捕获抗体包被于微量滴定板的孔;

②. 用粘合塑料制品封盖微量滴定板并在 4°C 下孵育过夜;

③. 弃去包被液(碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液稀释的捕获抗体),并用洗涤液洗涤微量滴定板两次,每次在微孔中加入 $200\mu\text{l}$ PBST(磷酸盐吐温缓冲液),在水槽上方轻轻甩动微量滴定板,除去洗涤液,在纸巾上轻拍微量滴定板,除去剩余的液滴,晾干放于 4°C 环境中备用;所述洗涤液为PBS(磷酸盐缓冲液)中加入一定量的Tween 20,所述Tween 20的质量百分比浓度为0.05%;

(5) 封闭

①. 在微量滴定板的每孔添加 200 μ l 封闭缓冲液(为含1.2%BSA(牛血清白蛋白)的PBS(磷酸盐缓冲液)),用于封闭包被孔中剩余的蛋白质结合位点;

②. 用粘合塑料制品封盖微量滴定板并在37 $^{\circ}$ C孵育1小时。

[0026] 用于肝癌体外诊断试剂盒的检测方法,其包括以下步骤:

(1) 抗原的制备:通过分子克隆的方法将脯氨酸胺酶基因克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到所需的抗原,其中,所述抗原也可作为标准品用;

(2) 捕获抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物得到相应的单克隆抗体,所述单克隆抗体作为本试剂盒的捕获抗体;

(3) 检测抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物得到相应的多克隆抗体,所述多克隆抗体作为本试剂盒的检测抗体;

(4) 捕获抗体包被:

①. 用碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液 (pH9.6) 将浓度为 1 μ g/ml 的捕获抗体包被 微量滴定板的孔;

②. 用粘合塑料制品封盖微量滴定板并在 4 $^{\circ}$ C下孵育过夜;

③. 弃去包被液(碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液稀释的捕获抗体),并用洗涤液洗涤微量滴定板两次,每次在微孔中加入 200 μ l PBST(磷酸盐吐温缓冲液,可以是含0.05%吐温-20的pH7.4的磷酸盐缓冲液),在水槽上方轻轻甩动微量滴定板,除去洗涤液,在纸巾上轻拍微量滴定板,除去剩余的液滴,晾干放于4 $^{\circ}$ C环境中备用;所述洗涤液为PBS(磷酸盐缓冲液)中加入一定量的Tween 20,所述Tween 20的质量百分比浓度为0.05%;

(5) 封闭

①. 在微量滴定板的每个孔添加 200 μ l 封闭缓冲液(1.2%BSA/PBS),封闭包被孔中剩余的蛋白质结合位点;

②. 用粘合塑料制品封盖微量滴定板并在37 $^{\circ}$ C孵育1小时;

(6) 加样

①. 将 100 μ l 适当稀释(稀释20倍)的样品添加到每个孔,在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 60 分钟;要得到准确的定量结果,通常做法是比较未知样品与标准曲线的信号。每个酶标板都必须测定标准品(两重测定或三重测定)和空白样,以确保准确性;

②. 弃去样品,并洗涤微量滴定板三次,每次在微孔中加入 200 μ l PBST(磷酸盐吐温缓冲液);

③. 将 100 μ l浓度为 0.5 μ g/ml的检测抗体添加到每个孔;

④. 用粘合塑料制品封盖微量滴定板并在37 $^{\circ}$ C孵育 1小时;

⑤. 用 PBST 洗涤微量滴定板四次;

⑥. 添加 100 μ l 标记二抗,其在使用前便已在PBS中稀释10000倍(1:10000)。所述标记二抗可以为HRP标记羊抗兔;

⑦. 用粘合塑料制品封盖微量滴定板并在37 $^{\circ}$ C孵育 1小时;

⑧. 用 PBST 洗涤微量滴定板四次;

(7) 检测

①. 将 TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺) 溶液添加到每个孔, 孵育 15-30 分钟, 添加等体积的终止液 (2 M H₂SO₄), 然后用酶联免疫检测仪在 450 nm 处读取光密度;

②. 由系列稀释液得到的数据绘制标准曲线, 浓度标在 X 轴 (对数标度) 上, 而吸光度标在 Y 轴 (线性标度) 上, 通过内插法在此标准曲线上得出样品浓度。

[0027] 本发明用于肝癌体外外诊断试剂盒把脯氨酸胺酶升高作为诊断早中期肝癌的标准, 检测原理如图 1 所示; 脯氨酸胺酶下降作为肝癌治疗效果评估的标准。可以用于临床上通过检测血中肿瘤标记物水平的高低对肝癌的治疗效果进行动态评估。另外还可以用于临床上对肝癌的复发转移及预后判断的应用; 也可用于直肠癌诊断。

[0028] 试验效果说明

双抗体夹心 ELISA 最佳实验条件的选择

包被鼠抗脯氨酸胺酶单抗最佳工作浓度的选择 : 根据方阵法确定包被浓度为 1ug/mL 时, 单克隆抗体的 OD 值为 1.05, 所以其最佳包被浓度为 1ug/mL。如图 2 所示, 兔抗脯氨酸胺酶多抗最佳工作浓度的选择: 随着单抗稀释倍数的增加, 待测肝癌病例血清和正常人血清 OD 值有递减的趋势, 当抗体浓度为 1:200 时, 阳性对照 (阳性对照 OD 值减去空白对照 OD 值) 与正常对照 (正常对照 OD 值减去空白对照 OD 值) A_{450nm} 之比 (简称 P/N 值) 较高, 故选择兔抗人抗体最佳工作浓度为 1:200。血清摸索的最佳工作浓度为 1:25。封闭液摸索最佳工作浓度为 1.2% BSA。

[0029] 临床血清标本检测

共检测了 126 份血清标本, 以医院经病理确诊为肝癌患者血清为阳性对照组 (48 例 (其中早期肝癌 20 例, 晚期肝癌 28 例)), 非肝癌患者包括肝炎、正常人群血清为阴性对照组 (78 例 (正常 48 例, 肝病 30 例)), PBST 为空白对照, 通过上述双抗夹心 ELISA 法进行定性及定量检测临床血清标本。如图 2 所示, 以 P/N 值 > 2 为双抗夹心 ELISA 阳性判定标准, 以病理诊断为标准对临床血清标本进行检测; 图 3 说明肝癌患者血清中脯氨酸胺酶的水平显著高于正常人 (P < 0.05)。早期肝癌结果检测灵敏性 (SN) 为 65% (13/20), 晚期肝癌检测灵敏性 (SN) 为 78% (22/28); 正常人检测特异性 (SP) 为 77% (37/48), 肝炎患者检测特异性 (SP) 为 67% (20/30)。见图 4-5。

[0030] 临床对肝癌的治疗效果进行动态评估

为确定本试剂盒能否用于对肝癌的治疗效果进行动态评估, 我们收集了 22 份肝癌患者治疗前后的血清。22 个患者的检测结果参见图 6, 结果显示肝癌患者治疗前后的血清中脯氨酸胺酶的水平有显著差异 (P < 0.05)。有效治疗后血清中脯氨酸胺酶的水平会大大下降, 提示本试剂盒能用于对肝癌的治疗效果进行动态评估。

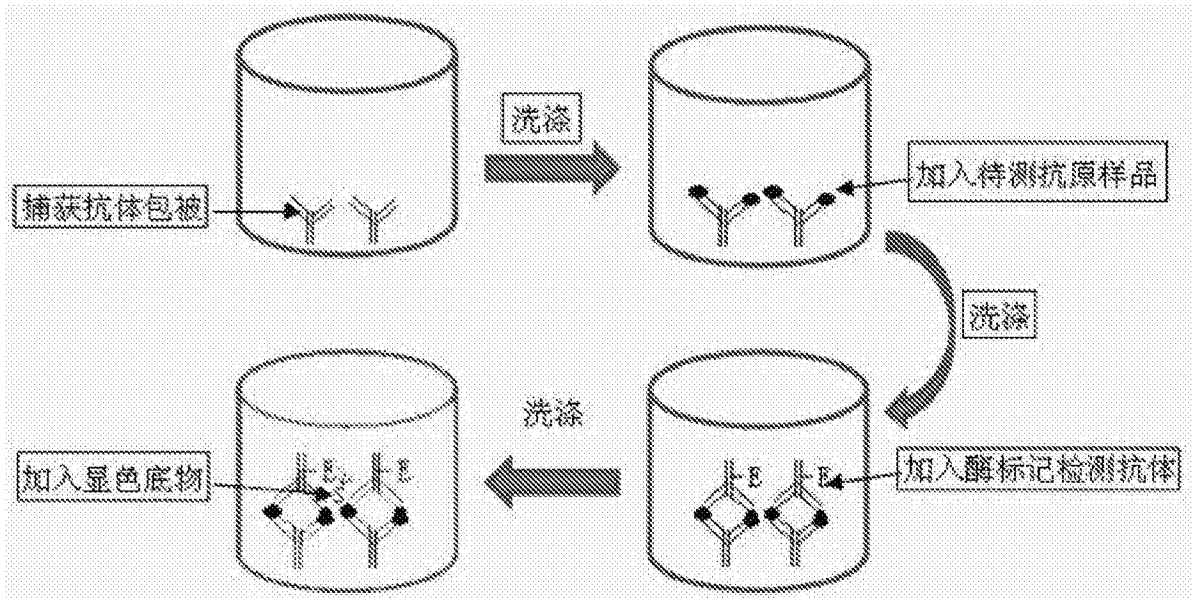


图1

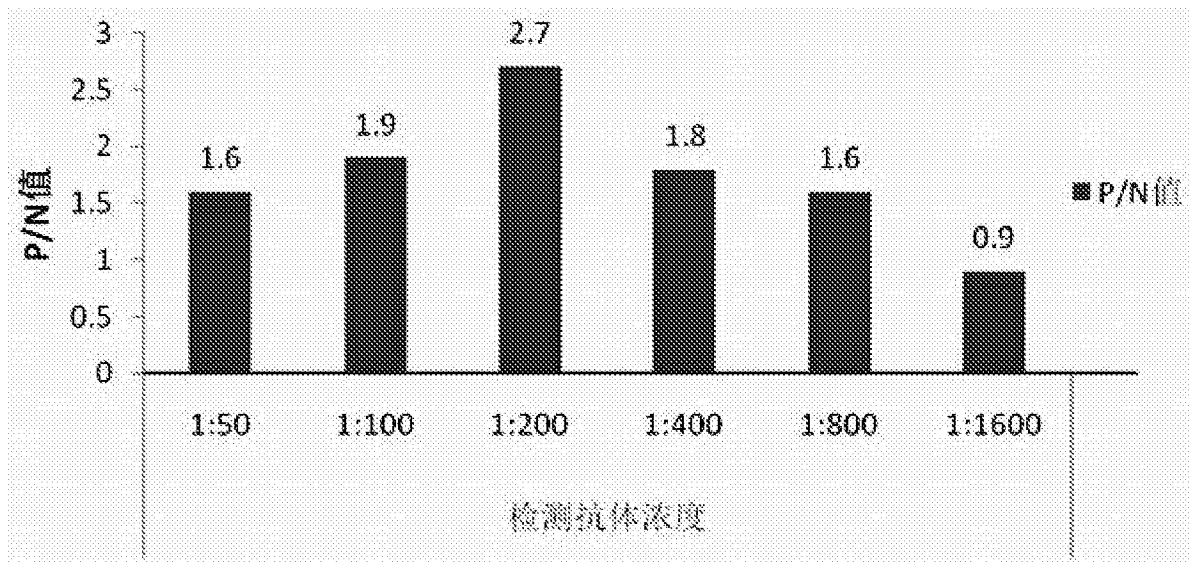


图2

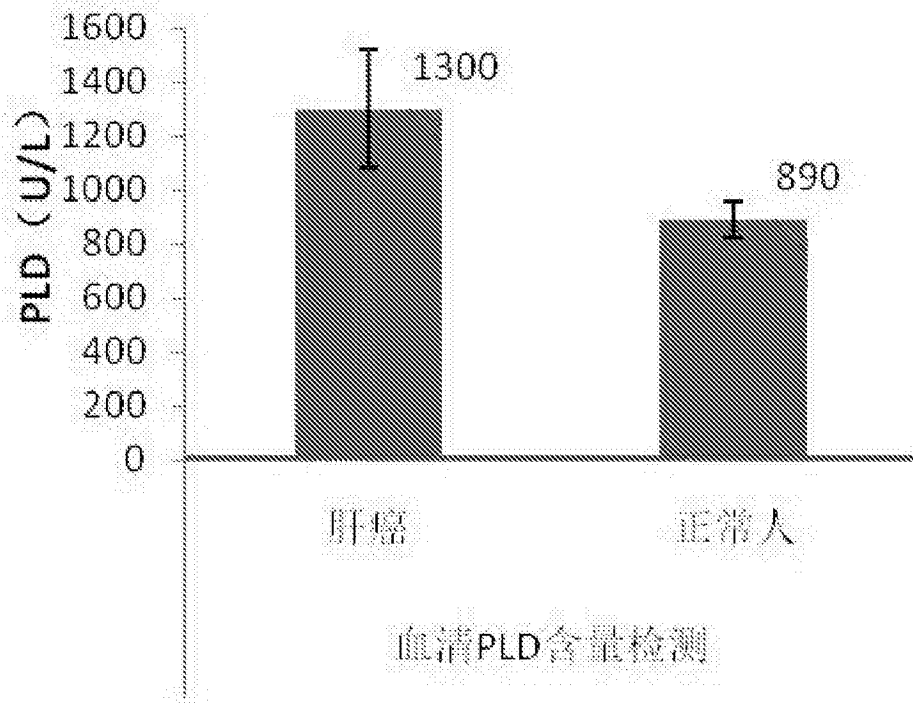


图3

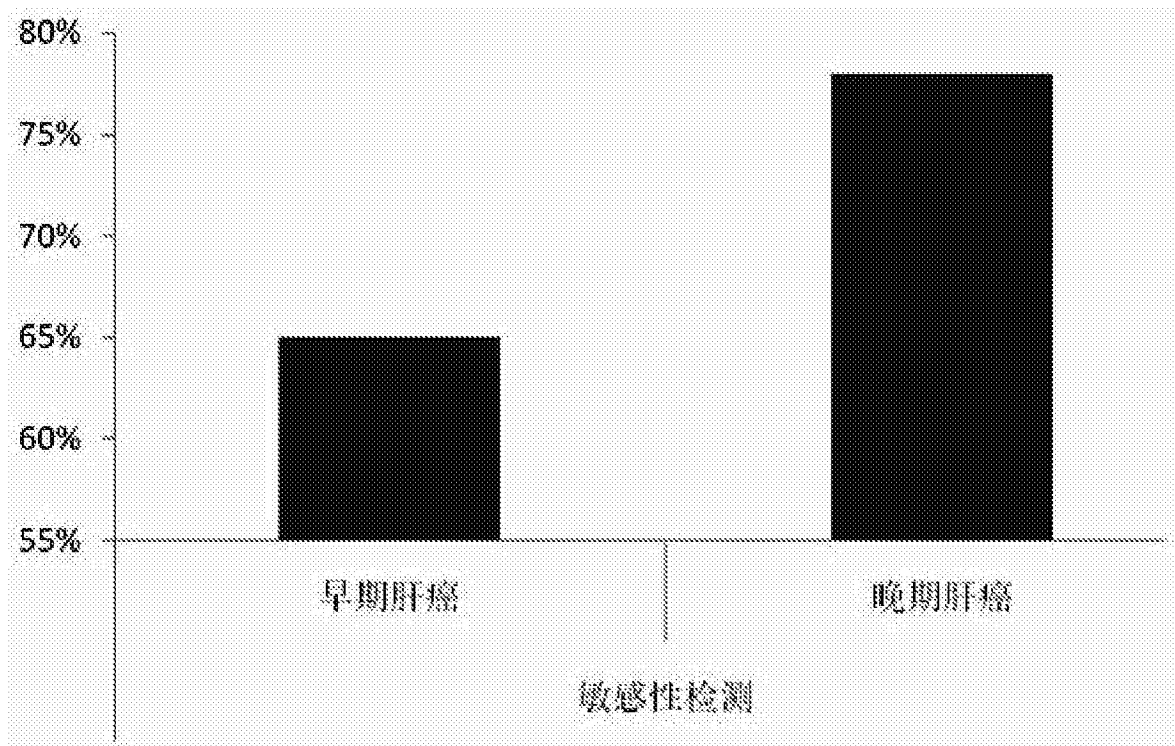


图4

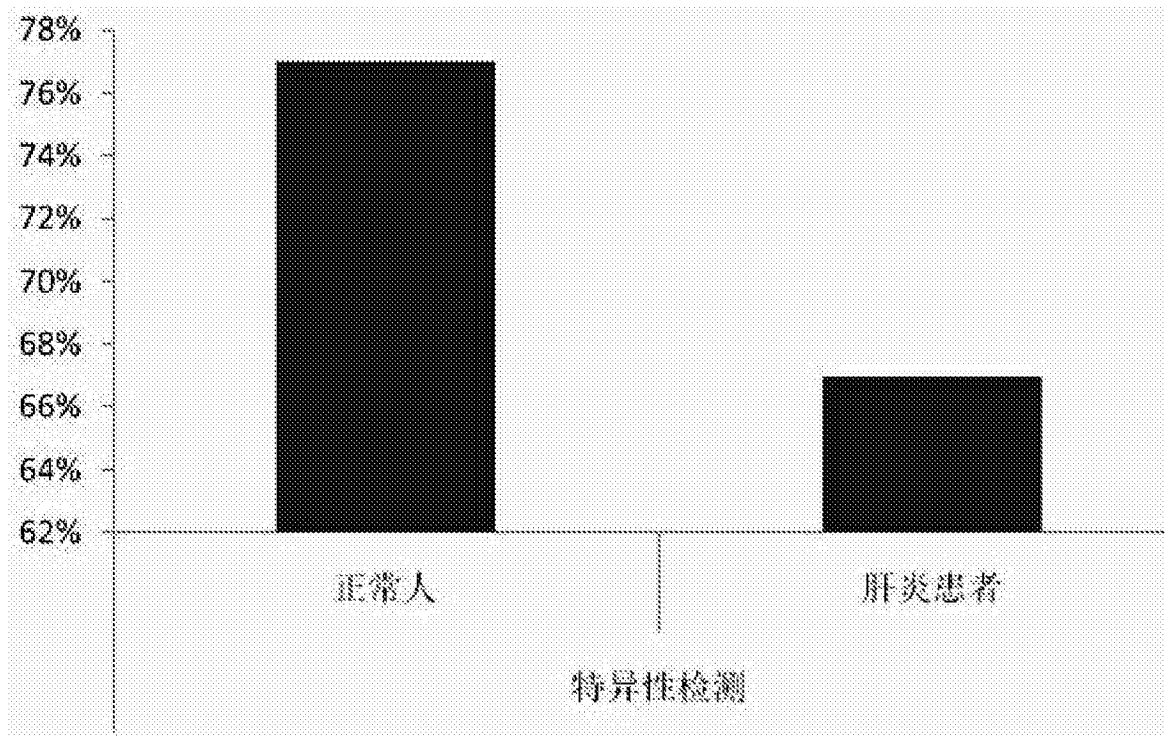


图5

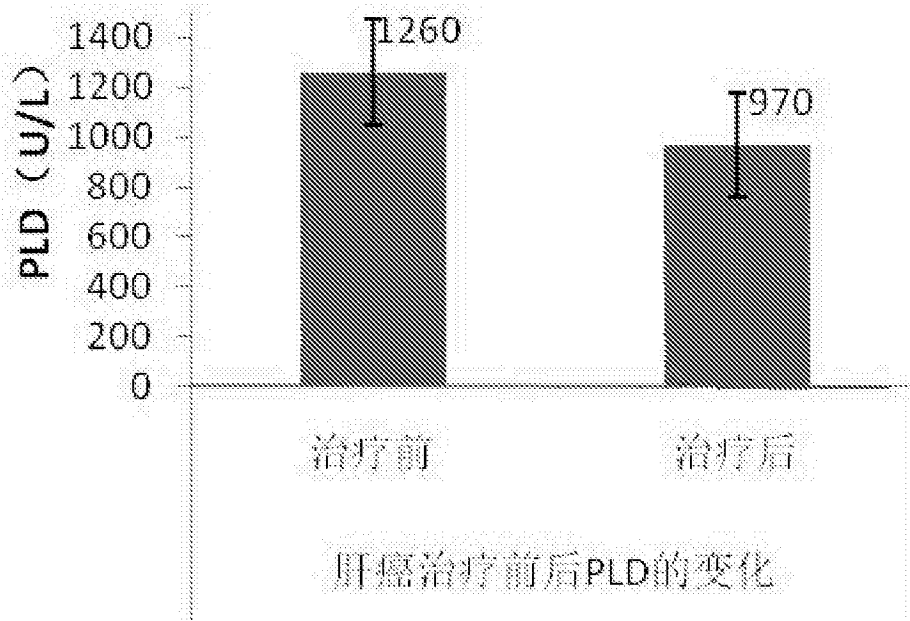


图6

专利名称(译)	用于肝癌体外诊断试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN106596939A	公开(公告)日	2017-04-26
申请号	CN201611116236.7	申请日	2016-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	江西三惠生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	江西三惠生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江西三惠生物科技有限公司		
[标]发明人	余跃飞 李其云 万以叶		
发明人	余跃飞 李其云 万以叶		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/57438		
代理人(译)	黄新平		
其他公开文献	CN106596939B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于肝癌体外诊断试剂盒，包括捕获抗体，所述捕获抗体是脯氨酸胺酶（PLD）制得的单克隆抗体；所述试剂盒还包括检测抗体，所述检测抗体为脯氨酸胺酶制得的多克隆抗体。本发明的有益效果如下：具有灵敏度高准确性强的特点，其灵敏度及准确性均达到70%以上。

