



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104215761 B

(45) 授权公告日 2016.04.20

(21) 申请号 201410427185.4

(22) 申请日 2014.08.27

(73) 专利权人 广西医科大学

地址 530021 广西壮族自治区南宁市双拥路 22 号

(72) 发明人 周素芳 薛冰滢

(74) 专利代理机构 成都九鼎天元知识产权代理有限公司 51214

代理人 吴彦峰

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

(56) 对比文件

WO 2005026687 A2, 2005.03.24,

WO 2008060394 A2, 2008.05.22,

CN 101735319 A, 2010.06.16,

CN 101988926 A, 2011.03.23,

CN 103499692 A, 2014.01.08,

WO 2014144355 A2, 2014.09.18,

Xiangyi Liu et al. Evaluation of a magnetic particles-based chemiluminescence

enzyme immunoassay for Golgi protein 73 in human serum. 《Clinica Chemica Acta》.2015, 第 445 卷

袁明生等. ELISA 法检测高尔基蛋白 73 诊断原发性肝癌的方法学评价. 《中国实验诊断学》.2013, 第 17 卷 (第 06 期),

Raleigh D. Kladney et al. GP73, a novel Golgi-localized protein upregulated by viral infection. 《Gene》.2000, 第 249 卷 (第 1-2 期), 53-65.

None. Homo sapiens golgi membrane protein GP73 mRNA, complete cds.

《Genbank》. 2000, AF236056. 1.

周云等. 高尔基蛋白 73 (GP73) ELISA 定量检测方法的建立及临床应用. 《江苏医药》. 2013, 第 39 卷 (第 9 期),

审查员 李进进

权利要求书 2 页 说明书 7 页

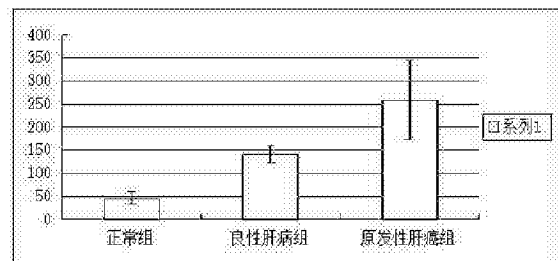
序列表 2 页 附图 2 页

(54) 发明名称

检测血清中抗 GP73 抗体的试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种检测血清中抗 GP73 抗体的试剂盒,属于医药生物技术领域。所述试剂盒包括 GP73 蛋白抗原、封闭液、酶标的 GP73 蛋白抗原、兔抗人 GP73 多克隆抗体标准品、包被缓冲液、显色液、洗涤液、终止液、稀释液,其中,所述 GP73 蛋白抗原具有序列表 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列。本发明可以准确计算出患者血清内的抗 GP73 抗体的浓度,真实反应出血清中抗 GP73 抗体的存在水平,可以应用于临床对原发性肝癌进行诊断,通过对抗 GP73 抗体水平进行检测,还能反映肿瘤自身分子变化的过程,从而判断患病机体的自身免疫反应能力。本发明的试剂盒还具有特异性良好,灵敏度、准确性和精密度高的优点。



1. 检测血清中抗 GP73 抗体的试剂盒,其特征在于:包括 GP73 蛋白抗原、封闭液、酶标的 GP73 蛋白抗原、兔抗人 GP73 多克隆抗体标准品、包被缓冲液、显色液、洗涤液、终止液、稀释液,其中,所述 GP73 蛋白抗原具有序列 SEQIDNO:1 所示的氨基酸序列。

2. 根据权利要求 1 所述的检测血清中抗 GP73 抗体的试剂盒,其特征在于所述 GP73 蛋白抗原的制备步骤如下:

(1) 根据 GP73 蛋白抗原基因设计引物,包括上游引物 5'-GGAACGGTACCCACCATCATCATCATCATCAGGCTGCCCTGTCAGTGAGCCAGGAAAA-3',下游引物 5'-GGAACGTCGACTCAGAGTGTATGATTC CGCTTTTCACGCTGATCAAGTAAATT-3', RT-PCR 扩增 GP73 基因,步骤是:取无菌 PCR 管,依次加入 2×TaqMasterMix 25 μl,上游引物和下游引物各 2 μl, HepG2 细胞总 RNA 的逆转录产物 1 μl, ddH₂O 补足至 50 μl;将加好的各 PCR 管轻微离心混匀,放至 PCR 仪进行反应,目的片段大小为 330bp;反应条件:95℃ 预变性 5min,94℃ 变性 30s,60℃ 退火 30s,72℃ 延伸 45s,30 个循环,72℃ 终延伸 5min,反应完毕,取 3 μl PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分离鉴定;

(2) 将扩增的 GP73 基因和表达质粒 pColdIII 经过限制性内切酶后,用 T4DNA 连接酶构建重组质粒;

(3) 重组质粒筛选与鉴定:重组质粒用蓝白斑筛选、菌落 PCR、双酶切鉴定、测序后与 GenBank 中序列比对确认基因序列是否正确;

(4) GP73 目的蛋白表达及鉴定:将 pColdIII-GP73 重组质粒转化 E. coli. BL21,诱导表达条件为 37℃ 过夜培养菌液,OD600 达到 0.4-0.5 时,冷却到 15℃ 并放置 45min,加入终浓度 0.5mM 的 IPTG,15℃ 诱导 24h;SDS-PAGE 鉴定 GP73 蛋白是否成功表达;

(5) GP73 目的蛋白纯化:将 IPTG 诱导表达的基因工程菌超声破菌,离心,收集上清过 Ni-NTA 亲和层析柱,电泳鉴定目的蛋白纯度,Bradford 法测定蛋白浓度。

3. 根据权利要求 1 所述的检测血清中抗 GP73 抗体的试剂盒,其特征在于:所述酶标 GP73 蛋白抗原的制作过程如下:

(1) 将辣根过氧化物酶 (HRP) 标记试剂盒在室温条件下平衡 30 分钟,使反应启动液和反应终止液充分解冻后摇匀;

(2) 向每 10 μl 待标记 GP73 蛋白抗原溶液中加入 1 μl 反应启动液,用移液枪反复吹打若干次以充分混匀,避免产生气泡;

(3) 打开辣根过氧化物酶反应管盖,将上述已启动 GP73 蛋白抗原溶液直接加到该管中,用移液枪反复吹打若干次以充分混匀,避免产生气泡,室温放置 3 小时;

(4) 向辣根过氧化物酶反应管中加入反应终止液,比例为每 10 μl 抗原溶液加入 1ml 反应终止液,充分混匀,室温放置 1 小时;

(5) 终止完成后,加入与反应管内反应液等体积的甘油,充分混匀,置于 -20℃ 保存。

4. 根据权利要求 2 所述的检测血清中抗 GP73 抗体的试剂盒,其特征在于:所述包被缓冲液为 pH9.6、0.05mol/L 碳酸盐缓冲液。

5. 根据权利要求 2 所述的检测血清中抗 GP73 抗体的试剂盒,其特征在于:所述显色液包括 A 液和 B 液,A 液是称取 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 17.2mg,加二甲基亚砜 1ml 溶解,然后加 0.1mol/L, pH5.5 的醋酸钠缓冲液 66ml 制得,B 液是取双蒸水 100ml,加 30% H₂O₂ 17 微升制得。

6. 根据权利要求 2 所述的检测血清中抗 GP73 抗体的试剂盒,其特征在于:所述洗涤液

包含 0.02mol/L pH7.4 的 PBS, 0.05% Tween-20。

7. 根据权利要求 2 所述的检测血清中抗 GP73 抗体的试剂盒, 其特征在于: 所述稀释液为 0.01mol/L PBS。

检测血清中抗 GP73 抗体的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及医药生物技术领域,具体地说,是涉及一种检测血清中抗 GP73 抗体的试剂盒,以及使用该试剂盒检测肝癌患者血清标记物抗 GP73 抗体的检测方法。

背景技术

[0002] 肝癌发病率在全世界是位列第四位、中国位列第二的恶性肿瘤,且在世界范围内呈逐年上升趋势,现总发病率已超过 56 万。肝癌发病之初较为隐匿,临床难以检出,临床诊断检出一般多为晚期,治疗效果差,如若早期发现肝癌并且及时治疗可以提高患者的 5 年存活率,因此肝癌的早期发现具有重要的临床意义。

[0003] 目前肝癌的检测手段包括肝超声影像分析和血清学标志物检测,其中最常使用的血清学标志物是甲胎蛋白 (AFP),但是 AFP 在早期肝癌诊断中灵敏度不高,只有 50%~60% 的肝癌患者 AFP 呈阳性,并且慢性肝炎、肝硬化患者等肝癌高危人群也可引起甲胎蛋白的升高。因此临床上需要获得比甲胎蛋白 (AFP) 特异性和灵敏度更高的新血清学指标,或者能与 AFP 进行互补的指标。

[0004] 近年来,蛋白组学技术的发展使得高通量筛选新的肿瘤标志物成为可能,各种有前景的新肿瘤标志物被相继发现,其中高尔基体蛋白 GP73 最有可能成为更好的肝癌诊断,尤其是早期肝癌诊断的血清标志物。

[0005] 目前已经有多个研究组验证了 GP73 是一种新的肝癌标志物,并有用 ELISA 方法检测血清中肿瘤相关标记物 GP73 蛋白含量的报道。专利申请号为 200910041621 的中国专利还公开了一种高尔基蛋白 GP73 的夹心 ELISA 定量检测方法及其检测试剂盒,提高了检测 GP73 的灵敏度和特异性。

[0006] 虽然针对肝癌病人血清中 GP73 自身蛋白的检测已有相关报道,但当肝癌组织释放肿瘤相关标记物 GP73 蛋白到血液后,机体对该蛋白产生免疫反应产生抗体的情况如何,机体针对该蛋白产生抗体对肝癌的诊断有何作用还未见报道。检测抗体不仅反映的是肿瘤自身分子变化的过程,更重要的是反映患病机体的自身免疫反应能力,对后期的诊断和治疗都具有重要意义。

发明内容

[0007] 本发明的发明目的在于:利用 ELISA 技术建立一种检测患者血清中抗 GP73 抗体的试剂盒,通过检测抗体的水平可以了解患者自身的免疫能力,对肝癌的诊断和治疗具有重要意义,以弥补现有技术的研究空白。

[0008] 本发明实现上述目的采用的技术方案如下:

[0009] 提供一种检测血清中抗 GP73 抗体的试剂盒,包括 GP73 蛋白抗原、封闭液、酶标的 GP73 蛋白抗原、兔抗人 GP73 多克隆抗体标准品 (320ng/ml)、包被缓冲液、显色液、洗涤液、终止液、稀释液,其中,所述 GP73 蛋白抗原具有序列 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列。

[0010] 其中,上述 GP73 蛋白抗原的制作方法为:通过构建 GP73 基因工程重组载体,利用

基因工程技术表达、纯化 his-GP73 蛋白抗原片段而制得 GP73 蛋白抗原,其具体步骤如下:

[0011] (1) 根据 GP73 蛋白抗原基因设计引物,包括上游引物 5'-GGAACGGTACCCACCATCATCATCATCAGGCTGCCCTGTCAGTGAGCCAGGAAAA-3',下游引 5'-GGAACGTCGACTCAGAGTGTATGATTCCGCTTTTCACGCTGATCAAGTAAATT-3',RT-PCR 扩增 GP73 基因,步骤是:取无菌 PCR 管,依次加入 2×Taq MasterMix 25 μl,上游引物和下游引物各 2 μl,HepG2 细胞总 RNA 的逆转录产物 1 μl,ddH₂O 补足至 50 μl;将加好的各 PCR 管轻微离心混匀,放至 PCR 仪进行反应,目的片段大小为 330bp;反应条件:95℃预变性 5min,94℃变性 30s,60℃退火 30s,72℃延伸 45s,30 个循环,72℃终延伸 5min,反应完毕,取 3 μl PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳分离鉴定;

[0012] (2) 将扩增的 GP73 基因和表达质粒 pCold III 经过限制性内切酶后,用 T4 DNA 连接酶构建重组质粒;

[0013] (3) 重组子筛选与鉴定:重组子经蓝白斑筛选、菌落 PCR、双酶切鉴定、测序后,测序后与 GenBank 中序列比对确认基因序列是否正确;

[0014] (4) GP73 目的蛋白表达及鉴定:将 pCold III-GP73 重组质粒转化 E. coli. BL21,诱导表达条件为 37℃过夜培养菌液,OD600 达到 0.4-0.5 时,冷却到 15℃并放置 45min,加入终浓度 0.5mM 的 IPTG,15℃诱导 24h;SDS-PAGE 鉴定 GP73 蛋白是否成功表达;

[0015] (5) GP73 目的蛋白纯化:将 IPTG 诱导表达的基因工程菌超声破菌,离心,收集上清过 Ni-NTA 亲和层析柱,电泳鉴定目的蛋白纯度,Bradford 法测定蛋白浓度。

[0016] 进一步地,上述酶标的 GP73 蛋白抗原的制作方法具体过程如下:

[0017] (1) HRP 标记试剂盒(商品化试剂盒,武汉三鹰公司产品,-20℃贮存),室温条件下平衡 30 分钟,使反应启动液和反应终止液充分解冻后混匀;

[0018] (2) 向每 10 μl 待标记抗原溶液中加入 1 μl 反应启动液,用移液枪反复吹打若干次以充分混匀,避免产生气泡;

[0019] (3) 打开辣根过氧化酶管盖,将上述已启动抗原溶液直接加到该管中,用移液枪反复吹打若干次以充分混匀,避免产生气泡,室温放置 3 小时;

[0020] (4) 向辣根过氧化酶反应管中加入反应终止液,比例为每 10 μl 抗原溶液加入 1ml 反应终止液,充分混匀,室温放置 1 小时;

[0021] (5) 终止完成后,加入与反应管内反应液等体积的甘油,充分混匀,置于 -20℃保存。

[0022] 优选地,所述包被缓冲液为 pH9.6、0.05mol/L 碳酸盐缓冲液。

[0023] 优选地,所述显色液包括 A 液和 B 液,A 液是称取 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 17.2mg,加二甲基亚砜 1ml 溶解,然后加 0.1mol/L, pH5.5 的醋酸钠缓冲液 66ml 制得;B 液是取双蒸水 100ml,加 30% H₂O₂ 17 微升制得,显色液使用时将 A 液和 B 液等体积混匀即可。

[0024] 所述洗涤液包含 0.02mol/L pH7.4 的 PBS,0.05% Tween-20。

[0025] 所述稀释液为 0.01mol/l PBS,终止液为 2M H₂SO₄溶液。

[0026] 本发明还提供了使用上述试剂盒检测血清中抗 GP73 抗体含量的检测方法,所述方法包括以下步骤:

[0027] (1) 将兔抗人 GP73 多克隆抗体标准品(320ng/ml)用 0.01mol/l PBS 稀释液稀释成 160ng/mL、80ng/mL、40ng/mL、20ng/mL、10ng/mL 五个浓度,或将待测病人血清稀释 5

倍；

[0028] (2) 制作吸光度与抗体浓度关系标准曲线：

[0029] ①包被：用包被缓冲液 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 将 GP73 蛋白抗原稀释到 4ng/ml, 4℃包被过夜。

[0030] ②封闭：洗涤液洗板，拍干，用封闭液 0.5% 牛血清白蛋白 BSA 封闭 1h。

[0031] ③加入标准品蛋白或样品：洗涤液洗板，拍干，向包被板的微孔中加入上述不同稀释浓度的兔抗人 GP73 多克隆抗体标准品 50 μl 或稀释的病人血清 50 μl, 重复 2 孔, 用封板膜封板后置 37℃温育 30min。

[0032] ④加入酶标 GP73 抗原：洗涤液洗板，拍干，每孔加入酶标 GP73 蛋白抗原 50 μl, 空白孔除外。用封板膜封板后置 37℃温育 30min。

[0033] ⑤显色：洗涤液洗板，拍干，每孔先加入显色剂 A 50 μl, 再加入显色剂 B 50 μl, 轻轻震荡混匀, 37℃避光显色 10 分钟。

[0034] ⑥终止：每孔加终止液 50 μl, 终止反应。

[0035] ⑦测定 OD 值：以空白孔调零, 450nm 波长依序测量各孔的吸光度 (OD 值)。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

[0036] ⑧绘制浓度和吸光度标准曲线：以吸光度为横坐标, GP73 多抗浓度为纵坐标, 绘制吸光度随 GP73 多抗浓度变化的标准曲线, 将待测样品吸光度值代入标准曲线即可求出病人血清标本中的抗 GP73 抗体浓度值。

[0037] 本发明人在研究过程中, 为了确定血清中抗 GP73 抗体的水平与肝癌发病的关系, 用该试剂盒检测了 100 例正常对照组、100 例肝炎、肝硬化组 (即良性肝病组)、127 例原发性肝癌组血清的 GP73 抗体, 结果这三组抗体浓度分别为 46.36±13.18ng/ml, 140.34±18.38ng/ml, 259.23±86.72ng/ml。原发性肝癌患者血清中 GP73 抗体浓度显著高于正常组和肝炎、肝硬化组 ($P < 0.05$), 因此 GP73 抗体可以作为原发性肝癌诊断和筛查的指标, 测试 GP73 抗体水平为肝癌的诊断和筛查提供了一种新的可靠和有效的方法。

[0038] 由于采用上述技术方案, 本发明的有益效果为：

[0039] (1) 利用基因工程技术成功表达 GP73 蛋白抗原, 并成功对 GP73 抗原进行 HRP 标记, 所得 GP73 蛋白抗原与抗 His 鼠源单克隆抗体和抗 GP73 抗体都能特异性结合, 将其运用于抗 GP73 抗体的检测, 具有很高的医学价值。

[0040] (2) 提供了一种检测患者血清中抗 GP73 抗体的试剂盒, 弥补了现有技术的空白。使用本发明的抗 GP73 抗体检测试剂盒可以准确计算出患者血清内的抗 GP73 抗体的浓度, 能真实地反应出血清中抗 GP73 抗体的存在水平, 可以应用于临床对原发性肝癌进行诊断, 通过对抗 GP73 抗体水平进行检测, 还能反映肿瘤自身分子变化的过程, 从而判断患病机体的自身免疫反应能力。本发明的试剂盒特异性良好, 灵敏度达 77.4%、准确性达 84.58%, 相比于 AFP 的敏感性 50-60%, 本发明的试剂盒有显著提高。

附图说明

[0041] 本发明将通过例子并参照附图的方式说明, 其中：

[0042] 图 1 为纯化的 GP73 蛋白的 SDS-PAGE 电泳图, 其中, M 为标准蛋白; 1: 没有经柱层析纯化的样品溶液; 2: 样品上层析柱后, 未结合在层析柱上的杂蛋白流出液; 3: 用不含咪

唑的洗脱液洗脱出来的蛋白 ;4-9: 分别用含有 20mM, 40mM, 60mM, 80mM, 100mM, 150mM 咪唑的洗脱液洗脱出来的蛋白。

[0043] 图 2 为基因工程表达的 GP73 蛋白与抗 GP73 抗体结合的 Western Blot 分析结果, 其中, M: 蛋白标记物 ;

[0044] 1: pCold III-GP73 基因重组质粒转染 Transetta (DE3) 工程菌, 未经 IPTG 诱导的蛋白分析 ;

[0045] 2: pCold III-GP73 基因重组质粒转染 Transetta (DE3) 工程菌, 经 IPTG 诱导后的蛋白分析 ;

[0046] 3: pCold III-GP73 基因重组质粒转染 BL21 工程菌, 未经 IPTG 诱导目的蛋白分析 ;

[0047] 4: pCold III-GP73 基因重组质粒转染 BL21 工程菌, 经 IPTG 诱导后目的蛋白分析 ;

[0048] 5: 空质粒 pCold III 转染 Transetta (DE3) 工程菌, 未经 IPTG 诱导的蛋白分析 ;

[0049] 6: 空质粒 pCold III 转染 Transetta (DE3) 工程菌, 经 IPTG 诱导后的蛋白分析 ;

[0050] 7: 空质粒 pCold III 转染 BL21 工程菌, 未经 IPTG 诱导的蛋白分析 ;

[0051] 8: 空质粒 pCold III 转染 BL21 工程菌, 经 IPTG 诱导后的蛋白分析。

[0052] 图 3 为吸光度随兔抗人 GP73 多克隆抗体标准品浓度变化的标准曲线。

[0053] 图 4 为 GP73 自身抗体在正常组、良性肝病组、原发性肝癌组的表达值 (ng/ml)。

具体实施方式

[0054] 本发明提供了一种检测血清中抗 GP73 抗体的试剂盒, 包括 GP73 蛋白抗原、封闭液、酶标的 GP73 蛋白抗原、兔抗人 GP73 多克隆抗体标准品 (320ng/ml)、包被缓冲液、显色液、洗涤液、终止液、稀释液。本发明试剂盒自主创新的两个试剂是 GP73 蛋白抗原和酶标抗原。抗原是发明人通过基因工程技术表达纯化出来, 酶标抗原是自主标记。其余试剂为商品化试剂。

[0055] 本发明的一些实施方案中, 会提供 GP73 蛋白抗原的制备方法。

[0056] 酶标的 GP73 蛋白抗原是用辣根过氧化酶标记 GP73 而获得的, 在本发明的一些实施方案中, 还提供酶标的 GP73 蛋白抗原的具体制备过程。

[0057] 本发明的一些实施方案中, 还提供了利用该抗 GP73 抗体的试剂盒的来检测肝癌患者血清中抗 GP73 抗体浓度的检测方法。

[0058] 以下通过具体实施例对本发明作进一步详述。

[0059] 实施例 1 检测血清中抗 GP73 抗体的试剂盒的制备方法

[0060] 1、制作 GP73 蛋白抗原

[0061] 本发明的试剂盒中的 GP73 蛋白抗原是由人工合成, 构成 GP73 蛋白的氨基酸序列表如 SEQ ID NO:1 所示。本发明中 GP73 蛋白抗原的制备过程如下 :

[0062] (1) 根据 GP73 蛋白抗原的基因设计引物, 包括上游引物 SEQ ID NO:3 :5' -GGAACG GTACCCACCATCATCATCATCAGGCTGCCCTGTCAGTGAGCCAGGAAAA-3', 下游引物 SEQ ID NO:4 :5' -GGAACGTCGACTCAGAGTGTATGATTCCGCTTTTCACGCTGATCAAGTAAATT-3', 用 RT-PCR 扩增 GP73 基因, 具体步骤是 :取无菌 PCR 管, 依次加入 2×Taq MasterMix 25 μ l, 上游引物和下游引

物各 2 μ l, HepG2 细胞总 RNA 的逆转录产物 1 μ l, ddH₂O 补足至 50 μ l;将加好的各 PCR 管轻微离心混匀,放至 PCR 仪进行反应,目的片段大小为 330bp;反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5min, 反应完毕,取 3 μ l PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳分离鉴定;

[0063] (2) 将扩增的 GP73 基因和表达质粒 pCold III 经过限制性内切酶后,用 T4DNA 连接酶构建重组质粒;

[0064] (3) 重组子筛选与鉴定:重组子经蓝白斑筛选、菌落 PCR、双酶切鉴定、测序。测序结果表明基因提取完全正确,证实成功构建 pCold III-GP73 重组质粒;

[0065] (4) GP73 目的蛋白表达及鉴定:将 pCold III-GP73 重组质粒转化 E. coli. BL21, 最佳诱导表达条件为 37 $^{\circ}$ C 过夜培养菌液, OD600 达到 0.4-0.5 时,冷却到 15 $^{\circ}$ C 并放置 45min, 加入终浓度 0.5mM 的 IPTG, 15 $^{\circ}$ C 诱导 24h, SDS-PAGE 鉴定发现目的蛋白主要出现在上清中,说明 GP73 蛋白主要以可溶性形式表达电泳结果见图 1 所示,显示用 60mM 和 80mM 咪唑进行洗脱时目的蛋白纯度最高。

[0066] (5) GP73 目的蛋白纯化:将 IPTG 诱导表达的基因工程菌超声破菌,离心,收集上清过 Ni-NTA 亲和层析柱,电泳鉴定目的蛋白纯度可达 85%;质谱鉴定证实所获得蛋白为 His-GP73 融合蛋白;用 Bradford 法进行浓度测定测得蛋白浓度为 57ng/ μ l;

[0067] western blot 结果显示目的条带与抗 His 鼠源单克隆抗体和抗 GP73 抗体都能特异性结合(如图 2 所示),表明表达纯化的 GP73 蛋白具有抗原性,图中还可以看出, pCold III-GP73 基因重组质粒经 IPTG 诱导后,有较多目的蛋白与抗 GP73 抗体结合。

[0068] 2、制备酶标的 GP73 抗原

[0069] 本发明优选采用辣根过氧化酶标记 GP73 抗原,其制作的具体过程如下:

[0070] (1) HRP 标记试剂盒(商品化试剂盒,武汉三鹰公司产品,-20 $^{\circ}$ C 贮存),室温条件下平衡 30 分钟,使反应启动液和反应终止液充分解冻后混匀;

[0071] (2) 向每 10 μ l 待标记抗原溶液中加入 1 μ l 反应启动液,用移液枪反复吹打若干次以充分混匀,避免产生气泡;

[0072] (3) 打开辣根过氧化酶管盖,将上述已启动抗原溶液直接加到该管中,用移液枪反复吹打若干次以充分混匀,避免产生气泡,室温放置 3 小时;

[0073] (4) 向辣根过氧化酶反应管中加入反应终止液,比例为每 10 μ l 抗原溶液加入 1ml 反应终止液,充分混匀,室温放置 1 小时;

[0074] (5) 终止完成后,加入等体积的甘油,充分混匀,置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

[0075] 3、试剂盒其他溶剂的配制:

[0076] 兔抗人 GP73 多克隆抗体标准品:浓度为 320ng/ml,购于武汉三鹰生物技术公司;

[0077] 封闭液:0.5%牛血清白蛋白(BSA);

[0078] 包被缓冲液:0.05mol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.6);

[0079] 显色液:包括 A 液和 B 液。A 液的制备:称取 TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)17.2mg,加 DMSO(二甲基亚砷)1ml 溶解,然后加醋酸钠缓冲液(0.1mol/L, pH5.5)66ml。B 液的制备:取双蒸水 100ml,加 30% H₂O₂(双氧水)17 微升。使用时 A:B 液等体积混匀即可。

[0080] 洗涤液:0.02mol/L PBS(pH7.4),0.05% Tween-20;

[0081] 终止液 :2mol/L 硫酸溶液 ;

[0082] 稀释液 :0.01mol/l PBS。

[0083] 实施例 2 检测血清中抗 GP73 抗体的试剂盒的使用方法

[0084] 本发明还提供使用上述试剂盒检测血清中抗 GP73 抗体含量的检测方法,所述方法包括以下步骤:

[0085] (1) 将兔抗人 GP73 多克隆抗体标准品 (320ng/ml) 用 0.01mol/l PBS 稀释液稀释成 160ng/mL、80ng/mL、40ng/mL、20ng/mL、10ng/mL 五个浓度。

[0086] (2) 制作吸光度与抗体浓度关系标准曲线:

[0087] ①包被:用包被缓冲液 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA) 将 GP73 蛋白抗原稀释到 4ng/ml, 4℃包被过夜。

[0088] ②封闭:洗涤液洗板,拍干,用 0.5% BSA 封闭 1h。

[0089] ③加入标准品蛋白:洗涤液洗板,拍干,向包被板的微孔中加入上述不同稀释浓度的兔抗人 GP73 多克隆抗体标准品 50 μ l, 重复 2 孔,用封板膜封板后置 37℃温育 30min。

[0090] ④加入酶标 GP73 蛋白抗原:洗涤液洗板,拍干,每孔加入酶标 GP73 蛋白抗原 50 μ l, 空白孔除外。用封板膜封板后置 37℃温育 30min。

[0091] ⑤显色:洗涤液洗板,拍干,每孔先加入显色剂 A 50 μ l, 再加入显色剂 B 50 μ l, 轻轻震荡混匀,37℃避光显色 10 分钟。

[0092] ⑥终止:每孔加终止液 50 μ l, 终止反应。

[0093] ⑦测定 OD 值:以空白孔调零,450nm 波长依序测量各孔的吸光度 (OD 值)。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

[0094] ⑧绘制浓度和吸光度标准曲线:以吸光度为横坐标,GP73 多抗浓度为纵坐标,绘制吸光度随 GP73 多抗浓度变化的标准曲线,如图 2 所示。

[0095] 在使用试剂盒检测待测病人血清中抗 GP73 抗体时,将待测病人血清用稀释液稀释 5 倍,将上述步骤③中加入标准品蛋白换成加入待测病人血清稀释液 50 μ l 进行测试,测得吸光度值。将待测样品吸光度值代入标准曲线即可求出病人血清中抗 GP73 抗体浓度。

[0096] 实施例 3 试剂盒对正常人标本,肝炎、肝硬化标本,以及肝癌标本的检测结果

[0097] 发明人用该试剂盒检测了 100 例正常对照组,100 例肝炎、肝硬化组 (即良性肝病组),127 例原发性肝癌组血清的 GP73 抗体,结果这三组抗体浓度分别为 46.36±13.18ng/ml,140.34±18.38ng/ml,259.23±86.72ng/ml,如图 3 所示。原发性肝癌患者血清 GP73 抗体浓度显著高于正常组和肝炎、肝硬化组 ($P < 0.05$),肝炎、肝硬化患者血清 GP73 抗体浓度与正常组之间也有显著的统计学差异 ($P < 0.05$)。

[0098] 以正常组作为肝癌对照组,按照正常人平均检测值加上正负 3 个标准差 ($x \pm 3sd$) 界定异常血清临界值 (cut off 值),则 cut off 值为 85.90ng/ml;根据这一界定标准,划分出阳性血清标本,100 例良性肝病组和 127 例原发性肝癌血清中全为阳性,100 例正常人血清有 0 例阳性,其敏感性、特异性和准确度均为 100%。

[0099] 以肝炎肝硬化即肝病组作为对照组,按照肝病病人 $x \pm 3sd$ 界定肝癌血清阳性值 (cut off 值),则 cut off 值为 195.48ng/ml,根据这一界定标准,127 例肝癌有 35 例小于 195.48ng/ml,92 例大于 195.48ng/ml。即 127 例肝癌患者检出率为 92 例,其敏感性、特异性和准确度分别为 77.4%、100%、84.58%。

[0100] 本试剂盒的精密度测试：

[0101] 取标准品抗体 160ng/ml, 进行同一批次 8 次重复实验, 计算结果分别是：
161.706ng/ml、162.837ng/ml、162.278ng/ml、162.538ng/ml、163.179ng/ml、161.432ng/ml、161.789ng/ml、162.835ng/ml。

[0102] 标准差 $SD = 0.628722$

[0103] 平均值 $\bar{X} = 162.32425$

[0104] 变异系数 $= 0.628722/162.32425 \times 100\% = 0.38\%$

[0105] 取标准品抗体 160ng/ml, 进行 4 批次实验, 每批次计算平均值分别是：
162.271ng/ml, 162.408ng/ml, 162.908ng/ml, 162.312ng/ml, 计算其变异系数为 0.18%。

[0106] 综上所述, 本发明的试剂盒可以用于检测患者血清内的抗 GP73 抗体的浓度, 能真实地反应出血清中抗 GP73 抗体的存在水平, 可以应用于临床对原发性肝癌进行诊断, 从而判断患病机体的自身免疫反应能力, 对肝癌的治疗也有参考价值。本发明的试剂盒在测试血清中抗 GP73 抗体是, 具有特异性良好, 敏感性、准确性和精密度高的优点。

SEQUENCE LISTING

<110> 广西医科大学

<120> 检测血清中抗 GP73 抗体的试剂盒

<160> 3

<210> 1

<211> 99

<212> PRT

<213> 来源于人类的 GP73 蛋白的氨基酸序列表

<400> 1

Gln Ala Ala Leu Ser Val Ser Gln Glu Asn Pro Glu Met Glu Gly Pro
 1 5 10 15
 Glu Arg Asp Gln Leu Val Ile Pro Asp Gly Gln Glu Glu Glu Gln Glu
 20 25 30
 Ala Ala Gly Glu Gly Arg Asn Gln Gln Lys Leu Arg Gly Glu Asp Asp
 35 40 45
 Tyr Asn Met Asp Glu Asn Glu Ala Glu Ser Glu Thr Asp Lys Gln Ala
 50 55 60
 Ala Leu Ala Gly Asn Asp Arg Asn Ile Asp Val Phe Asn Val Glu Asp
 65 70 75 80
 Gln Lys Arg Asp Thr Ile Asn Leu Leu Asp Gln Arg Glu Lys Arg Asn
 85 90 95
 His Thr Leu
 99

<210> 2

<211> 297

<212> DNA

<213> 来源于人类的 GP73 蛋白的氨基酸序列表对应的核苷酸序列表

<400> 2

caggctgccc tgtcagtgag ccaggaaaat ccagagatgg agggccctga gcgagaccag 60
 cttgtcatcc ccgacggaca ggaggaggag caggaagctg ccggggaagg gagaaaccag 120
 cagaaactga gaggagaaga tgactacaac atggatgaaa atgaagcaga atctgagaca 180
 gacaagcaag cagccctggc agggaatgac agaaacatag atgtttttaa tgttgaagat 240
 cagaaaagag acaccataaa tttacttgat cagcgtgaaa agcggaatca tacactc 297

<210> 3

<211> 58

<212> 序列的类型(DNA 或 RNA)

<213> 人工序列

<400> 3

GGAACGGTAC CCACCATCAT CATCATCATC AGGCTGCCCT GTCAGTGAGC CAGGAAAA 58

<210> 4

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

GGAACGTCGA CTCAGAGTGT ATGATTCCGC TTTTCACGCT GATCAAGTAA ATT 53

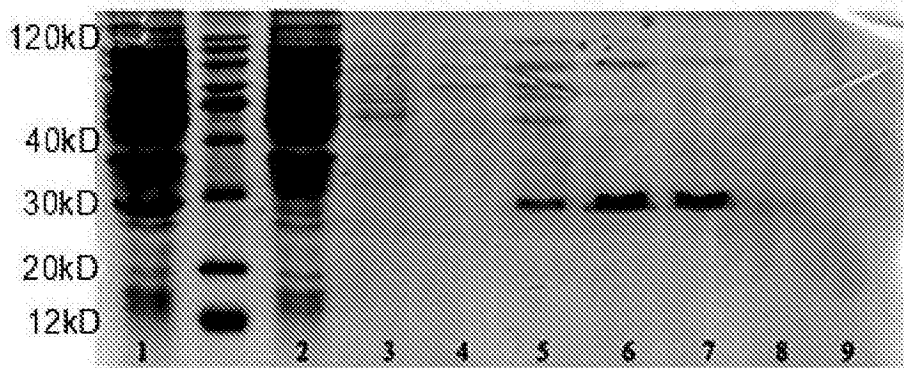


图 1

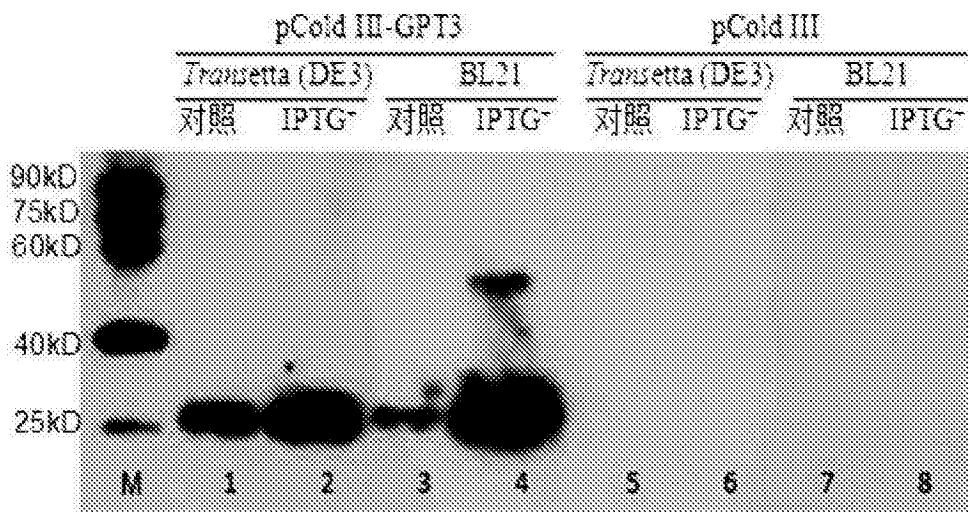


图 2

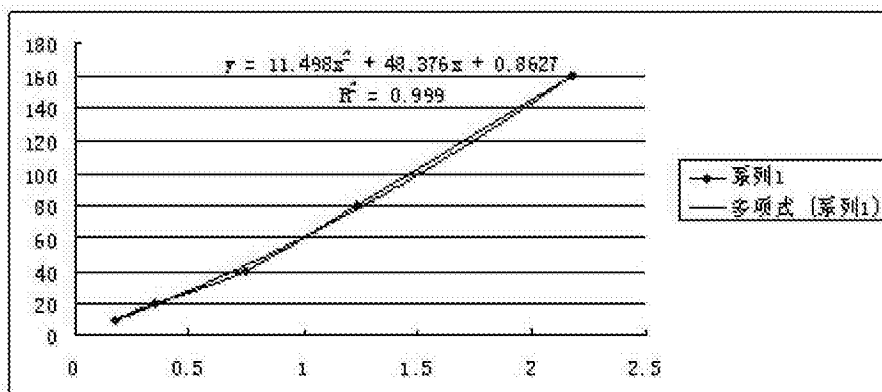


图 3

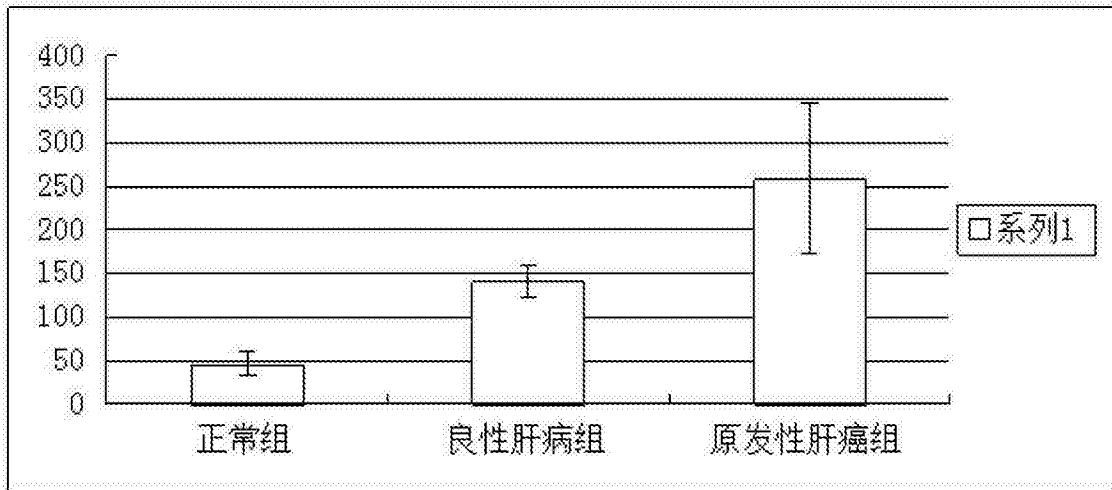


图 4

专利名称(译)	检测血清中抗GP73抗体的试剂盒		
公开(公告)号	CN104215761B	公开(公告)日	2016-04-20
申请号	CN201410427185.4	申请日	2014-08-27
[标]申请(专利权)人(译)	广西医科大学		
申请(专利权)人(译)	广西医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	广西医科大学		
[标]发明人	周素芳 薛冰滢		
发明人	周素芳 薛冰滢		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/57438		
代理人(译)	吴彦峰		
审查员(译)	李进进		
其他公开文献	CN104215761A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测血清中抗GP73抗体的试剂盒，属于医药生物技术领域。所述试剂盒包括GP73蛋白抗原、封闭液、酶标的GP73蛋白抗原、兔抗人GP73多克隆抗体标准品、包被缓冲液、显色液、洗涤液、终止液、稀释液，其中，所述GP73蛋白抗原具有序列表SEQ ? ID ? NO:1所示的氨基酸序列。本发明可以准确计算出患者血清内的抗GP73抗体的浓度，真实反应出血清中抗GP73抗体的存在水平，可以应用于临床对原发性肝癌进行诊断，通过对抗GP73抗体水平进行检测，还能反映肿瘤自身分子变化的过程，从而判断患病机体的自身免疫反应能力。本发明的试剂盒还具有特异性良好，灵敏度、准确性和精密度高的优点。

