



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101625360 B

(45) 授权公告日 2013.08.21

(21) 申请号 200910047173.8

CN 101358976 A, 2009.02.04, 全文.

(22) 申请日 2009.03.06

赵晋风. 肺癌噬菌体展示肽的构建及肺癌早期检测分子标志筛选. 《第二军医大学学报》. 2008, 第 29 卷 (第 10 期), 全文.

(73) 专利权人 中国人民解放军第二军医大学
地址 200433 上海市杨浦区翔殷路 800 号

审查员 杨光

(72) 发明人 曹广文 吴玲玲 赵晋丰 常文军

(74) 专利代理机构 上海新天专利代理有限公司
31213

代理人 王巍

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 5/113 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1873417 A, 2006.12.06, 全文.

权利要求书1页 说明书6页

序列表4页 附图7页

(54) 发明名称

一种肺癌早期特异性自身抗体酶联免疫检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供一种肺癌特异性自身抗体酶联免疫检测试剂盒。由固相载体和包被在其表面的含有肺癌抗原肽 I、肺癌抗原肽 II、肺癌抗原肽 III、肺癌抗原肽 IV、肺癌抗原肽 V 和肺癌抗原肽 VI 的六个重组噬菌体液各 100-200 μ l, 等量分别包被到固相载体上不同的酶标孔中所组成。所述重组肺癌特异抗原肽是利用 T7 噬菌体将肺癌 cDNA 文库展示到噬菌体表面, 并经亲和筛选和血清学分析从中筛选出的, 它具有检测肺癌病人血清中由于肿瘤刺激所产生的自身抗体的能力, 为早期肺癌患者提供了有效的检测手段, 有较大的临床应用价值。

1. 一种肺癌特异性自身抗体酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括在不同的酶标孔中包被了六个重组肺癌特异性抗原肽的固相载体;所述六个重组肺癌特异性抗原肽的序列分别为SEQ ID NO. 1-6;所述固相载体通过下列方法制得:滴度为 10^8 -- 10^{15} pfu/L的六个重组肺癌特异性抗原肽的重组噬菌体液各100-200 μ l,分别用0.5%-2% BSA按1:2-1:8稀释,于2°C-6°C摇床培养2h-4h,等量分别包被到固相载体上。

一种肺癌早期特异性自身抗体酶联免疫检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医用检测试剂技术领域,具体涉及一种肺癌早期特异性自身抗体酶联免疫检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 肺癌是常见的恶性肿瘤,也是威胁人类生命健康最为严重的恶性肿瘤,不同种族发病率有所不同,根据中国国家卫生局卫生信息中心数据表明,2004年-2005年肺癌病死率为30.61/10万,均居男女恶性肿瘤的第1位。肺癌早期诊断和及时治疗是延长5年存活期的关键,但由于早期症状不明显,超过50%的肺癌在明确诊断时已经处于中晚期,甚至发生转移,失去了手术机会,因此探索肺癌早期诊断和筛查方法非常重要。目前用于肺癌早期诊断的方法主要依靠影像学检查,如X线检查、CT、支气管镜等方法,但是这些方法只能在肺癌组织足够大的情况下,依赖于相应设备完成,成本高,且给患者造成痛苦,难以用于普查。应用血清学进行肺癌检测的方法主要还依靠癌胚抗原(CEA)、NSE、CA199, CA125等单一指标,缺乏敏感性和特异性,不能对多种组织类型肺癌进行早期诊断。因此寻找新的流行病学早期筛查生物学标志,建立能适应多种组织类型肺癌的高通量特异检查方法是当务之急。

[0003] 当肿瘤发生后,肿瘤细胞表面或分泌的特征抗原刺激机体产生抗体,而自身抗体存在于尚无症状的早期肿瘤患者血清中。通过寻找肺癌特征抗原,利用它来检测患者血清中的特异性自身抗体,从而做为分子标志,可以早期发现肺癌,与现行的其他方法相比,具有微创、简单、经济、敏感度及特异度高等特点,方便用于社区人群的筛查,从而达到早期检测肺癌的目的。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于通过寻找肺癌特征抗原,利用它来检测患者血清中的特异性自身抗体,可以早期发现肺癌。

[0005] 本发明提供一种肺癌特异性自身抗体酶联免疫检测试剂盒。

[0006] 本发明的肺癌特异性自身抗体酶联免疫检测试剂盒,由固相载体和含有肺癌抗原肽 I (SMMU-EPI I)、肺癌抗原肽 II (SMMU-EPI II)、肺癌抗原肽 III (SMMU-EPI III)、肺癌抗原肽 IV (SMMU-EPI IV)、肺癌抗原肽 V (SMMU-EPI V) 和肺癌抗原肽 VI (SMMU-EPI VI) 的六个重组噬菌体液各 100-200 μ l (滴度为 10^8 - 10^{15} pfu/L,用 0.5% -2% BSA 按 1 : 2-1 : 8 稀释), 2 $^{\circ}$ C --6 $^{\circ}$ C 摇床 2h-4h, 等量分别包被到固相载体上不同的酶标孔中所组成。

[0007] 所述重组肺癌特异抗原肽是利用 T7 噬菌体将肺癌 cDNA 文库展示到噬菌体表面,并经亲和筛选和血清学分析从中筛选出的,它具有检测肺癌病人血清中由于肿瘤刺激所产生的自身抗体的能力。将筛选出的多个抗原肽经过并联,从而达到早期检测和筛选肺癌病人的目的。

[0008] 所述特异性抗原肽为：肺癌抗原肽 I (SMMU-EPI I)、肺癌抗原肽 II (SMMU-EPI II)、肺癌抗原肽 III (SMMU-EPI III)、肺癌抗原肽 IV (SMMU-EPI IV)、肺癌抗原肽 V (SMMU-EPI V) 和肺癌抗原肽 VI (SMMU-EPI VI)，它们的编码核苷酸序列和氨基酸序列分别见本发明说明书的核苷酸及其对应氨基酸序列表。

[0009] 本发明的另一目的在于提供上述肺癌特异性自身抗体酶联免疫检测试剂盒的制备方法。

[0010] 一、制备重组肺癌特异抗原肽：

[0011] 1) 构建肺癌噬菌体展示肽库

[0012] 抽提 30 例新鲜肺癌组织总 RNA，等量混合成 1mg 后抽提 mRNA，应用随机引物反转录为 cDNA，将 cDNA 末端进行平齐，加 EcoI I/Hind III 接头，用 EcoI I 和 Hind III 两种限制性内切酶依次进行酶切反应后，去除小片断，接入 T7 噬菌体双臂，进行体外包装，从而构建成肺癌噬菌体展示肽库（见图一），并测定构建的噬菌体展示肽库库容量为 3×10^6 pfu，重组率为 60%，符合筛选后期试验要求；

[0013] 2) 亲和筛选肺癌特异抗原肽

[0014] 为了富集可以和肺癌自身抗体结合的特异展示肽，进行了正反向的 5 轮亲和筛选（见图 2），取 $10 \mu\text{l}$ A/G 的琼脂糖珠于一 1.5ml 离心管中，PBS (PH7.4) $500 \mu\text{l}$ 洗 2 次，1% BSA 4°C 封闭 1h。琼脂糖珠分别与 $15 \mu\text{l}$ 肺癌患者及对照患者的血浆 4°C 孵育过夜。PBS $500 \mu\text{l}$ 洗涤 3 次后，用 $10 \mu\text{l}$ PBS 溶解富集到的抗体。10 管肺癌的抗体及 10 管非肺癌的抗体各自合并成一管。取噬菌体库扩增液 $20 \mu\text{l}$ ，先与 $20 \mu\text{l}$ 的非肺癌抗体孵育 1h，未结合的上清再与 $20 \mu\text{l}$ 肺癌抗体结合，保留结合到琼脂糖珠上的噬菌体，并 100 μl 1% SDS 洗脱，将其转染细菌至扩增，此为一轮筛选，如此反复 5 轮；

[0015] 3) 血清学筛选肺癌早期检测分子标志

[0016] ①混合血样初筛

[0017] 筛选后的肽库用 LB 液体培养基 $1 : 10^8$ 稀释后，取 $100 \mu\text{l}$ 噬菌体液、 $250 \mu\text{l}$ 新摇好的 BLT5403 细菌，3ml 保温 55°C 的顶层琼脂，混匀后立刻倒入铺有 LB 的平皿中，冷却后， 37°C 温箱孵育 4 小时。可见有单个的噬菌体形成。每 1 个 1.5ml 离心管中，加入新摇好的细菌 BLT5403 1ml，用消毒的牙签随机挑取 1 个单个的、边界清晰的噬菌体于 1 个 1.5ml 离心管中，并按顺序编号。挑好的噬菌体置 37°C 恒温振荡器摇 4 小时以上，直至每一管液体均变澄清为止。共随机挑选噬菌体 5000 个，挑选好的噬菌体置 4°C 保存。用 T7 引物进行 PGR 反应，扩增所挑选噬菌体的插入片段，挑取扩增片段 200bp 以上的噬菌体进行 ELISA 实验进一步筛选（见图三），

[0018] 将 T7 tailer fiber 抗体 (NOVAGEN)，用 PBS (PH7.4) 按 $1 : 1000$ 来稀释，取 $100 \mu\text{l}$ 包被于 96 孔酶标板， 4°C 摇床轻摇过夜。用洗涤液（上海科华生物技术公司）洗板，每孔 $150 \mu\text{l}$ ，洗四次，每次约 1 分钟，拍干。200 μl 12% BSA/PBS 室温 (24°C) 封闭 2 小时。) 洗板同前，加入用 1% BSA $1 : 5$ 稀释的噬菌体 $100 \mu\text{l}$ ，每个标本加 4 孔。每次试验均加入没有插入片段的 50 号空噬菌体作为阴性对照 4 孔和空白对照 2 孔。室温孵育 2 小时。弃去孔内液体，拍干。每个噬菌体标本加入 $100 \mu\text{l}$ 11% BSA $1 : 500$ 稀释的肺癌组混合血浆、对照组混合血浆各 2 孔。所用肺癌组、对照组的混合血浆的患者信息同亲和筛选所用的患者。例如：某待测的噬菌体包被六孔，其中两孔加肺癌患者混合血清，两孔加对照混合血清，两

孔不加任何血清作空白对照。同时包被空噬菌体四孔,每两孔分别加肺癌患者混合血清和对照混合血清,作前面四孔相应的阴性对照。室温孵育 1 小时。洗板后每孔加入 1 : 10000 稀释的 HRP(辣根过氧化物酶)耦联的山羊抗人 IgG,室温孵育 1 小时,洗板后每孔加入温度至室温的显色剂 A 和显色剂 B(上海科华生物技术公司)各 1 滴,混匀后,37℃孵育 20 分钟,加入终止液 25 μ l,

[0019] 立刻用酶标仪检测,取波长 450nm,先用空白对照调零,然后读取各孔的 OD 值,并记录结果。每次进行 ELISA 按下列公式计算并判断结果:用空白孔调零后,样品平均 OD 值 / 阴性对照平均 OD 值,比值 ≥ 2.0 ,判断为阳性结果;样品 OD 值 / 阴性对照平均 OD 值,比值 < 2.0 ,判断为阴性结果。找出与肺癌混合血清反应为阳性,而与对照混合血清反应为阴性的噬菌体,作为可能有筛选意义的克隆进行后续研究,共筛选出 22 个有意义克隆,其 PCR 产物经天根公司进行测序,得到了其核酸序列,其中有相同序列,共 13 个不同克隆,将其 13 个序列与 NCBI 库进行比对。

[0020] 这些噬菌体克隆表面所展示的抗原具有诊断肺癌的潜能,后将应用其对肺癌病人和对照血清进行 ELISA 试验筛选,以确定其在临床中检测早期肺癌的可行性。

[0021] ②独立血样筛选

[0022] 将初筛后的有意义噬菌体应用 30 例肺癌病人血清单独进行 ELISA,方法同前,不同在于筛选所有的血清为独立的,而不是混合血清。实验方法为,包被某待测噬菌体四孔,两孔加入某例肺癌病人的血清,两孔不加血清作空白对照,另包被空噬菌体两孔,同样加前肺癌病人血清作阴性对照,其他实验方法同上。用空白孔调零后,样品平均 OD 值 / 阴性对照平均 OD 值,比值 ≥ 2.0 ,判断为阳性;统计这 13 个噬菌体将肺癌患者血清正确判断为阳性的能力,见下表。

[0023] 表一噬菌体筛选阳性率汇总表

	噬菌体编号	阳性率
	42/1079	9
	72	16
	91	17
	96	16
	151/365/378	12
[0024]	252	16
	286/306	20
	289	12
	290/354/379/2065	17
	310/318/369	13
	322	8
	336	13
	357	14

[0025] 从中挑选出 7 个阳性率偏高的噬菌体:72、91、96、252、286/306、290/354/379/2065、357 来进行血清学验证。

[0026] ③血清学验证

[0027] 将这七个噬菌体分别与 49 例肺癌患者血清和 35 例对照血清进行反应,方法同独

立样本筛选。根据得出的样品孔 OD 值 / 对应的阴性对照 OD 值的比值, 绘制 ROC 曲线。由于 357 号噬菌体 ROC 曲线图中, 曲线下面积较小, 为 0.690 筛选效果不佳, 将其舍去。为使整个试剂盒具有较高的敏感度和特异度, 在确定单个克隆恰当的 cut-off 值时保证特异度高于 80%, 而适当放低敏感度, 再通过不同克隆并联检测, 提高敏感度。确定的 cut-off 值见下表, 其 ROC 曲线 (见图四 - 图九)。

[0028] 表二检测用噬菌体 cut-off 值汇总表

[0029]

噬菌体编号	名称	cut-off 值	ROC 曲线下面积
72	SMMU-EPI I	1.4	0.806
91	SMMU-EPI II	1.53	0.799
96	SMMU-EPI III	1.43	0.793
252	SMMU-EPI IV	1.76	0.726
286/306	SMMU-EPI V	1.56	0.85
290/354/379/2065	SMMU-EPI VI	1.4	0.746

[0030] 二、制备试剂盒

[0031] 应用筛选出的带有肺癌抗原肽 I (SMMU-EPI I)、肺癌抗原肽 II (SMMU-EPI II)、肺癌抗原肽 III (SMMU-EPI III)、肺癌抗原肽 IV (SMMU-EPI IV)、肺癌抗原肽 V (SMMU-EPI V) 和肺癌抗原肽 VI (SMMU-EPI VI) 的六个重组噬菌体液各 100-200 μ l (滴度为 10^8 -- 10^{15} pfu/L, 用 0.5% -2% BSA 按 1 : 2--1 : 8 稀释), 2 $^{\circ}$ C --6 $^{\circ}$ C 摇床 2h-4h, 等量分别包被到固相载体上不同的酶标孔中。

[0032] 所述固相载体为 96 孔聚苯乙烯酶标板。

[0033] 所述肺癌抗原肽 I (SMMU-EPI I)、肺癌抗原肽 II (SMMU-EPI II)、肺癌抗原肽 III (SMMU-EPI III)、肺癌抗原肽 IV (SMMU-EPI IV)、肺癌抗原肽 V (SMMU-EPI V) 和肺癌抗原肽 VI (SMMU-EPI VI) 这六个重组噬菌体根据其 cut-off 值来并联检测, 只要一种一个噬菌体判断为阳性, 则该结果为阳性。从而判断 49 例肺癌患者血清和 35 例对照血清结果汇总如下:

[0034] ELISA 检测结果汇总表

	ELISA		合计
	阳性	阴性	
[0035] 肺癌	42	7	49
对照	7	28	35

[0036]

合计	49	35	84
----	----	----	----

[0037] 由此计算该ELISA检测方法的敏感度为85.7%、特异度为80%、正确率为83.3%，Kappa指数为65.7%，这6个噬菌体克隆并联检测肺癌患者血清为早期肺癌患者提供了有效的检测手段。

附图说明

- [0038] 图一：肺癌噬菌体展示肽库原始库。
 [0039] 图二：亲和筛选的原理。
 [0040] 图三：随机挑选噬菌斑 PCR 扩增。
 [0041] 图四：SMMU-EPI I 噬菌体 ROC 曲线图。
 [0042] 图五：SMMU-EPI II 噬菌体 ROC 曲线图。
 [0043] 图六：SMMU-EPIIII 噬菌体 ROC 曲线图。
 [0044] 图七：SMMU-EPIIV 噬菌体 ROC 曲线图。
 [0045] 图八：SMMU-EPIV 噬菌体 ROC 曲线图。
 [0046] 图九：SMMU-EPIVI 噬菌体 ROC 曲线图。

具体实施方式

[0047] 试剂盒的组成：

[0048] 实施例 1

[0049] 将 T7tail fiber 抗体，按 1：1000 稀释度，每孔用 100 μ l PBS (PH7.4) 包被于 96 孔酶标板，4 $^{\circ}$ C 摇床轻摇过夜。每孔 150 μ l 洗液，洗四次，每次约 1 分钟，拍干。2% BSA/PBS200 μ l 室温 (24 $^{\circ}$ C) 封闭 2 小时。)

[0050] 每孔加 150 μ l 洗液，洗四次，每次约 1 分钟，拍干。共设置 12 孔，每两孔重复，设置为副孔，第一孔和第二孔加入 1% BSA1：5 稀释的肺癌抗原肽 I (SMMU-EPI I) 100 μ l、第三孔和第四孔加入 1% BSA1：5 稀释的肺癌抗原肽 II (SMMU-EPI II) 100 μ l、肺癌抗原肽 III (SMMU-EPIIII)、肺癌抗原肽 IV (SMMU-EPIIV)、肺癌抗原肽 V (SMMU-EPIV) 和肺癌抗原肽 VI (SMMU-EPIVI) 各 100 μ l 也同理依次加入剩下 8 孔，另加入没有插入片段的 50 号噬菌体作为阴性对照和空白对照各 2 孔，共 16 孔。室温孵育 2 小时。弃去孔内液体，拍干。此时肿瘤特异抗原从而由于抗原抗体反应而成功的固定在酶标板上。

[0051] 实施例 2

[0052] 将 T7tail fiber 抗体，按 1：1000 稀释度，每孔用 100 μ l PBS (PH7.4) 包被于 96 孔酶标板，4 $^{\circ}$ C 摇床轻摇过夜，每孔加 150 μ l 洗液，洗四次，每次约 1 分钟，拍干。2% BSA/PBS200 μ l 室温 (24 $^{\circ}$ C) 封闭 2 小时。)

[0053] 每孔加 150 μ l 洗液，洗四次，每次约 1 分钟，拍干。共设置 12 孔，每两孔重复，设置为副孔，第一孔和第二孔加入 1% BSA1：4 稀释的肺癌抗原肽 I (SMMU-EPI I) 100 μ l、第三孔和第四孔加入 1% BSA1：5 稀释的肺癌抗原肽 II (SMMU-EPI II) 100 μ l、肺癌抗原肽 III (SMMU-EPIIII)、肺癌抗原肽 IV (SMMU-EPIIV)、肺癌抗原肽 V (SMMU-EPIV) 和肺癌抗原肽

VI (SMMU-EPIVI) 各 200 μ l 也同理依次加入剩下 8 孔,另加入没有插入片段的 50 号噬菌体作为阴性对照和空白对照各 2 孔,共 16 孔。室温孵育 2 小时。弃去孔内液体,拍干。此时肿瘤特异抗原从而由于抗原抗体反应而成功的固定在酶标板上。

[0054] ELISA 检测肺癌病人

[0055] 实施例 3

[0056] 每个噬菌体标本加入 100 μ l 11% BSA1 : 500 稀释的肺癌病人血浆,室温孵育 1 小时。洗液洗板,每孔 150 μ l,洗四次,每次约 1 分钟,拍干。每孔加入 100 μ l 11 : 10000 稀释的 HRP 耦联的山羊抗人 IgG,室温孵育 1 小时。洗液洗板,每孔 150 μ L,洗四次,每次约 1 分钟,拍干。每孔加入温度平衡至室温的显色剂 A、B 各 1 滴,混匀后,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 分钟,加入终止液 25 μ l。立刻用酶标仪检测,取波长 450nm,先用空白孔调零,然后读取各孔的 OD 值,并记录结果。

[0057] 结果判断

[0058] 每次进行 ELISA 按下列公式计算并判断结果 :用空白孔调零后,样品 OD 值 / 阴性对照平均 OD 值,比值 \geq cut-off 值,判断为阳性结果 ;样品 OD 值 / 阴性对照平均 OD 值,比值 $<$ 2.0,判断为阴性结果。

[0059] 6 个噬菌体中任何一个噬菌体为阳性,则将其结果判断为阳性。该试剂盒则将待测血清判断可能为肺癌早期患者血清。

[0001]

序列表

<110> 第二军医大学

<120> 一种肺癌早期特异性自身抗体酶联免疫检测试剂盒

<140> 200910047173.8

<141> 2009-03-06

<160> 6

<210> 1

<211> 46

<212> PRT

<213>肺癌抗原肽

<400> 1

Asn	Ser	Ser	Ala	Met	Cys	Arg	Arg	Lys	Ser	Ser	Gly	Gly	Lys	Gly	Gly
1				5				10						15	

Ser	Tyr	Ser	Gln	Ala	Ala	Cys	Ser	Asp	Ser	Ala	Gln	Gly	Ser	Asp	Val
			20					25						30	

Ser	Leu	Thr	Ala	Met	Gln	Asp	Phe	Phe	Thr	Pro	Pro	Leu	Lys
		35					40						45

<210> 2

<211> 67

<212> PRT

<213>肺癌抗原肽

<400> 2

Asn	Ser	Ser	Val	Pro	Ala	Thr	Arg	Glu	Ala	Glu	Ala	Gly	Glu	Trp	Cys
1				5				10						15	

Glu	Pro	Gly	Arg	Arg	Ser	Leu	Met	Gly	Gly	Arg	Tyr	Ser	Ala	Arg	Leu
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

[0002]

	20		25		30
Arg Ala Pro Leu Leu Cys Ala Pro Pro Leu Trp Gly Gly Gly Arg Lys					
	35		40		45

Gly Val Phe Phe Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gln Lys Lys Gln Gln Thr					
	50		55		60

Gln Thr Asp	
65	

<210> 3

<211> 52

<212> PRT

<213> 肺癌抗原肽

<400> 3

Asn Ser Ser Ala Met Ile Arg Gly Leu Gly Ala Glu Thr Ile Ser Thr					
1		5		10	15

Tyr Ser Gln Thr Leu Asn Gly Met Arg Val Pro Ser Gly Pro Leu Leu					
	20		25		30

Val Ser Arg Thr Gly Ala Ala Gly Lys Arg Cys Trp Leu Ile Met Glu					
	35		40		45

Val Gly Ile Arg	
50	

[0003]

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213>肺癌抗原肽

<400> 4

Asn Ser Ser Ala

1

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213>肺癌抗原肽

<400> 5

Asn Ser Ser Ala Met Leu Met Lys Asp Ser Leu Phe Asn Gln Ala

1

5

10

15

<210> 6

<211> 72

<212> PRT

<213>肺癌抗原肽

<400> 6

Asn Ser Ser Leu Asn Pro Met Glu Glu Thr Cys Ser Ala Pro Ser Pro

1

5

10

15

Val Ala Ala Ser Ala Val Leu Cys Gly His Pro Val Asn Thr Trp Ser

20

25

30

[0004]

Ala Val Gly Arg Pro Leu Cys Arg Tyr Thr Cys Pro Arg Cys Pro Gly
35 40 45

Gln Ser Cys Thr Pro Ala Ser Ser Pro Gln Gly Trp Trp Ala Ala Arg
50 55 60

Arg Cys Cys Gly Arg Asn Lys Ala
65 70

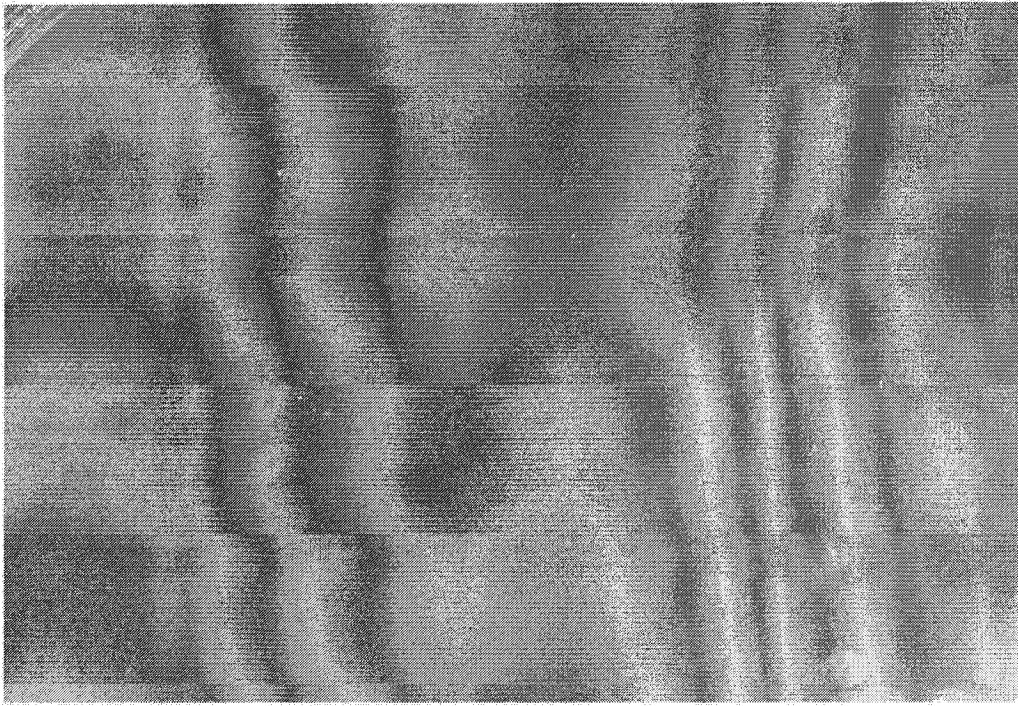


图 1

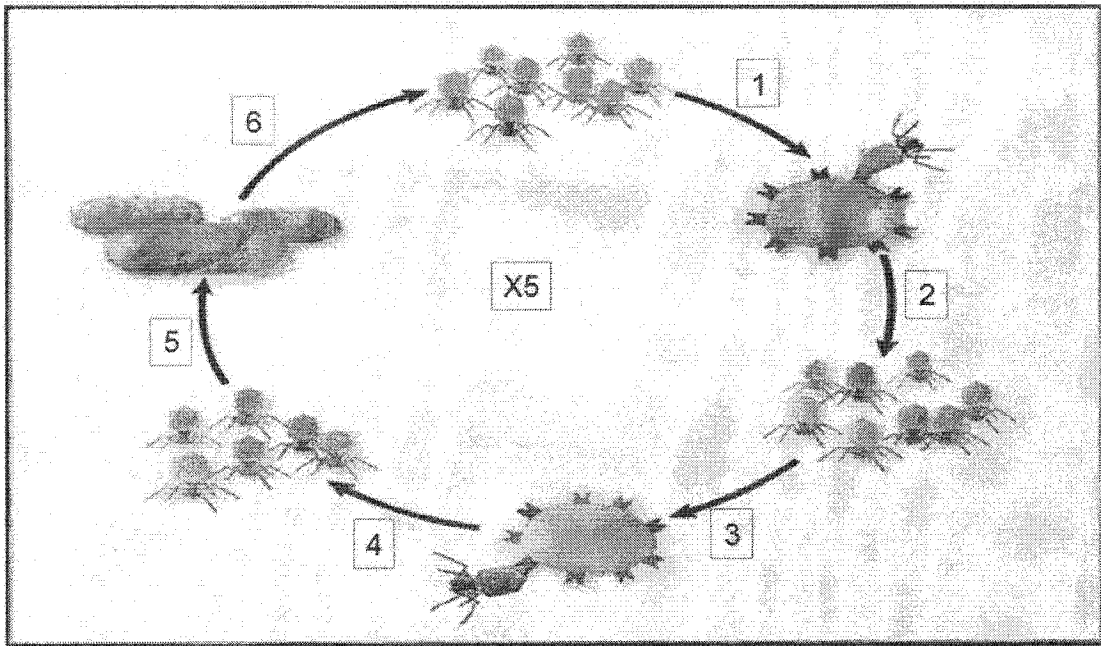


图 2

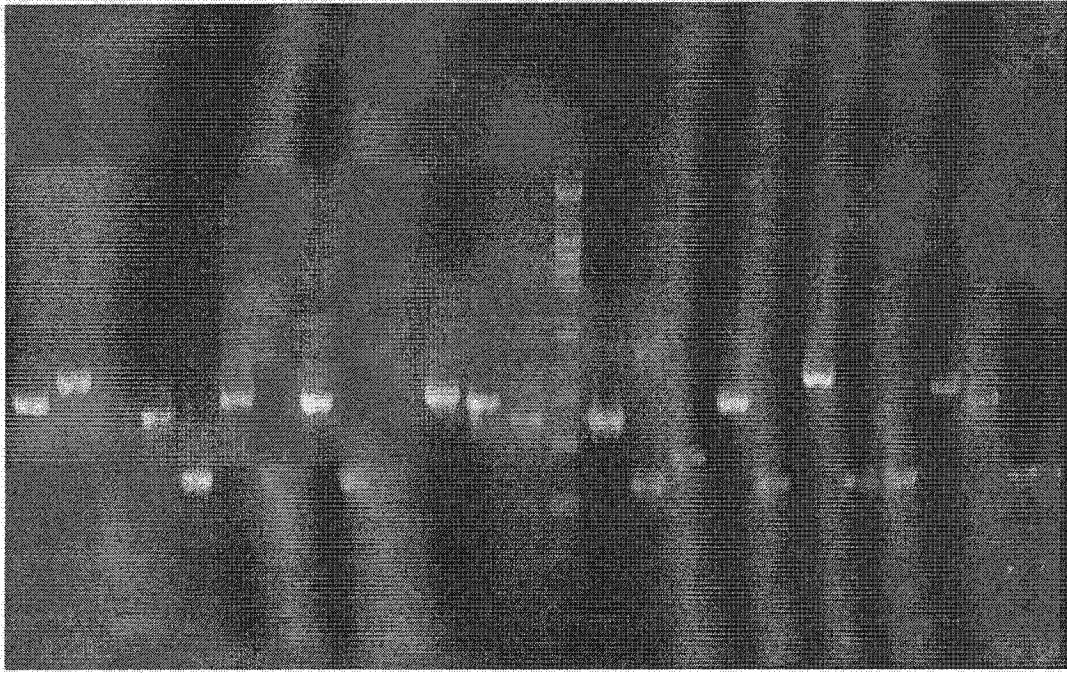


图 3

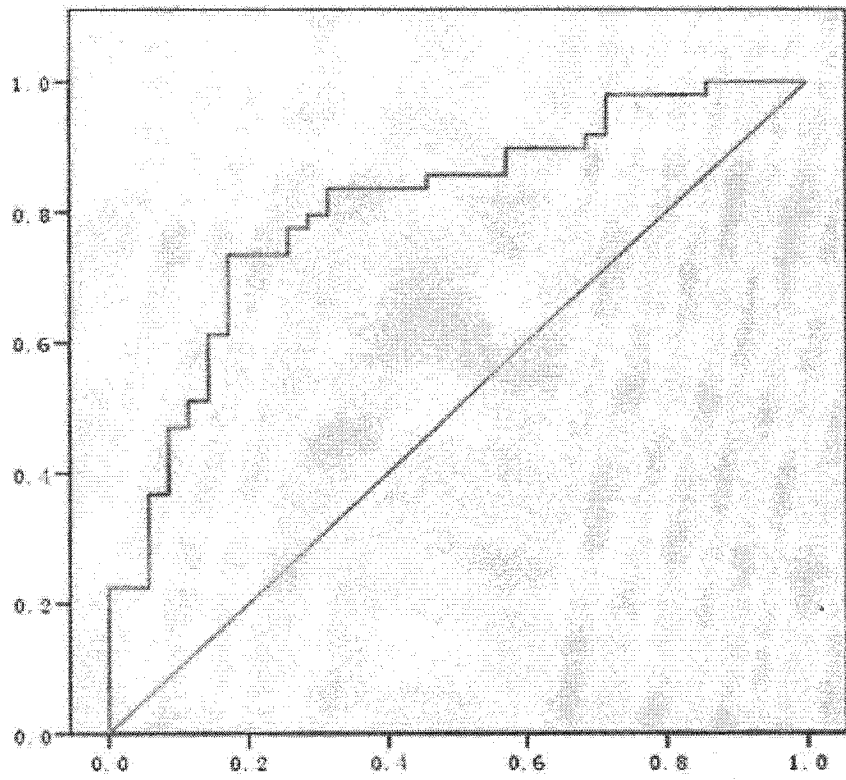


图 4

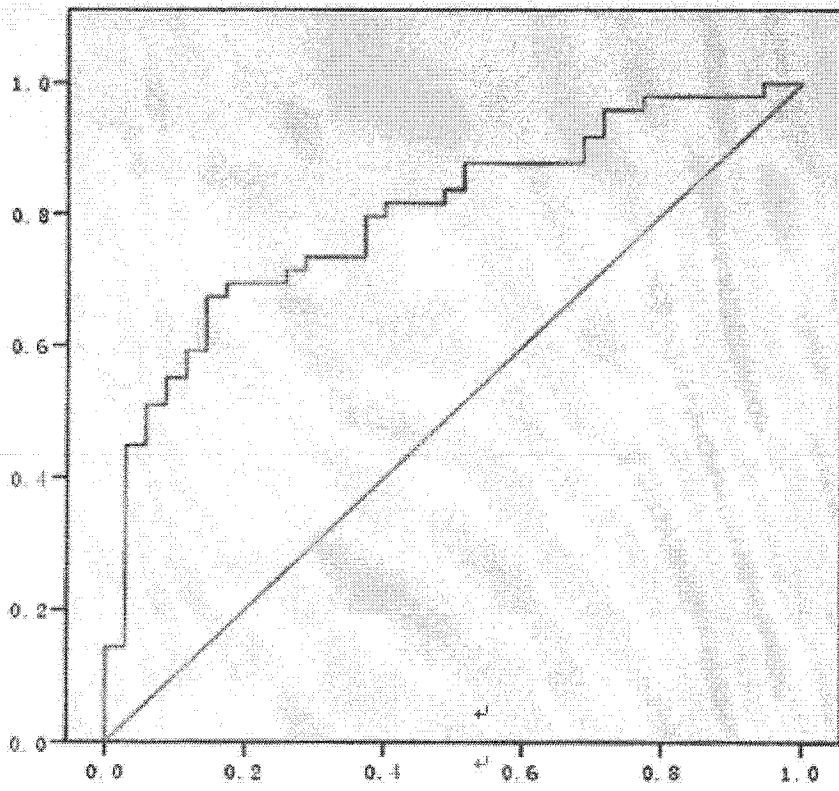


图 5

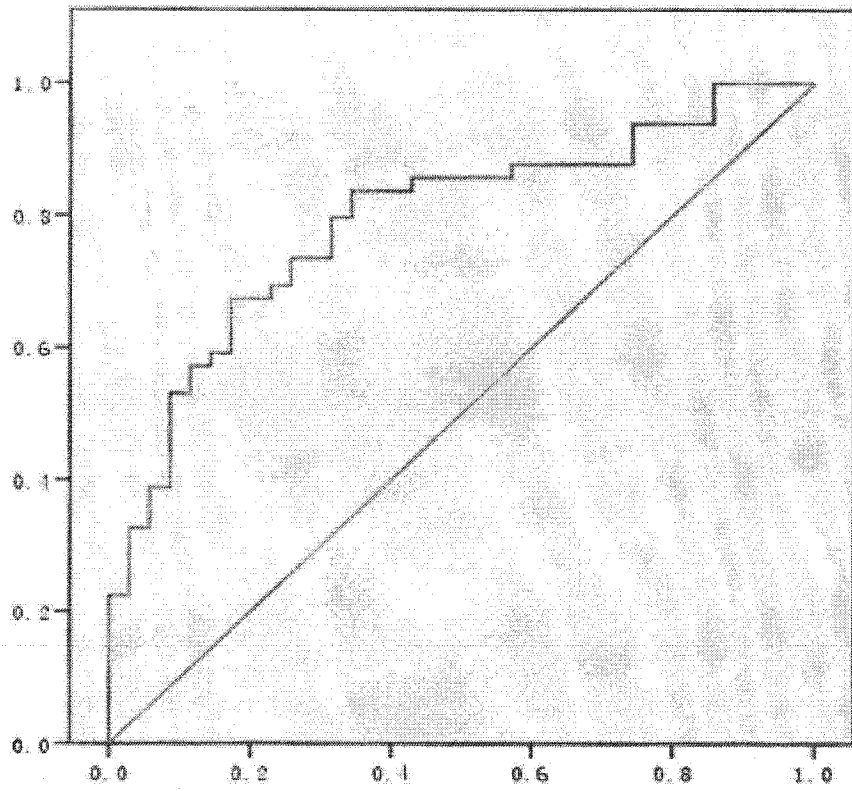


图 6

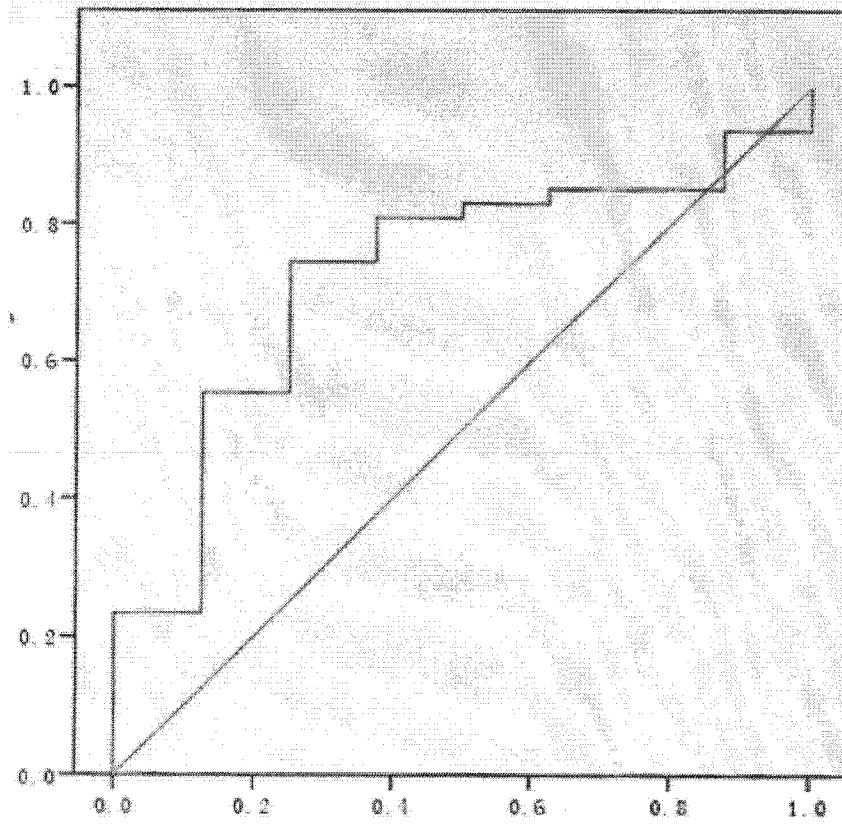


图 7

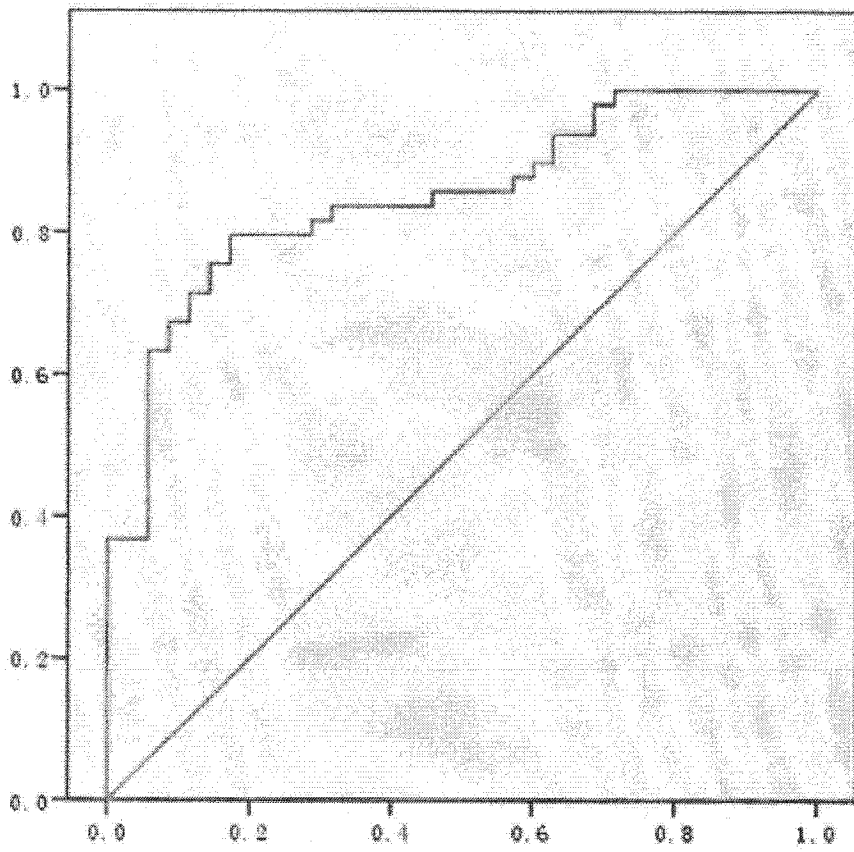


图 8

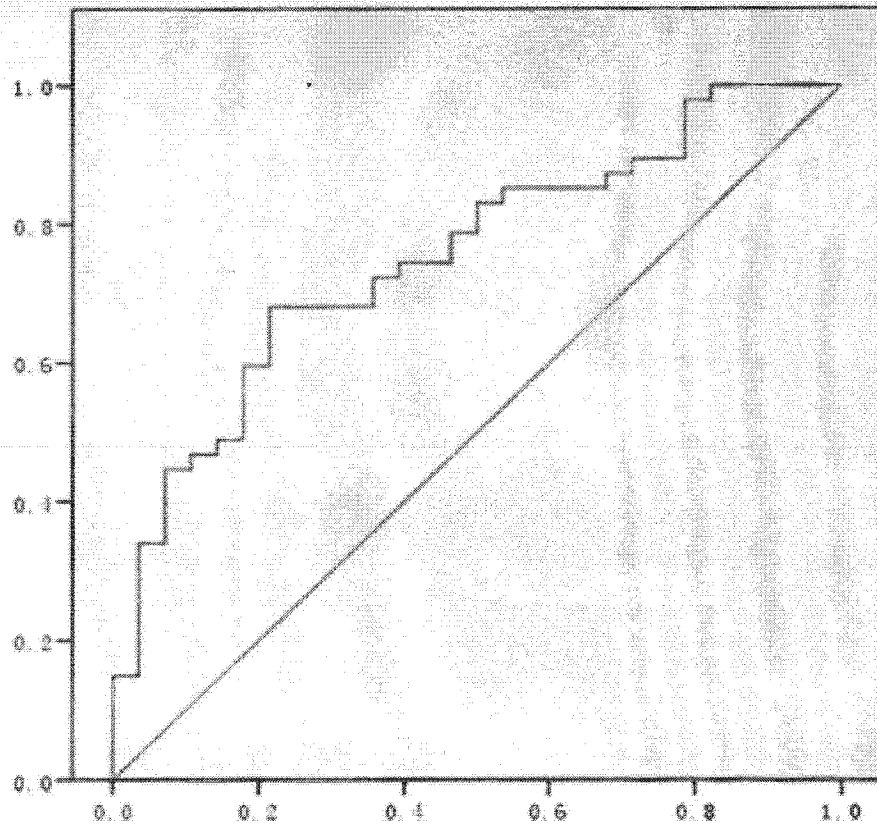


图 9

专利名称(译)	一种肺癌早期特异性自身抗体酶联免疫检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN101625360B	公开(公告)日	2013-08-21
申请号	CN200910047173.8	申请日	2009-03-06
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学		
[标]发明人	曹广文 吴玲玲 赵晋丰 常文军		
发明人	曹广文 吴玲玲 赵晋丰 常文军		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531 C07K14/435 C07K5/113 C07K7/08		
代理人(译)	王巍		
审查员(译)	杨光		
其他公开文献	CN101625360A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种肺癌特异性自身抗体酶联免疫检测试剂盒。由固相载体和包被在其表面的含有肺癌抗原肽I、肺癌抗原肽II、肺癌抗原肽III、肺癌抗原肽IV、肺癌抗原肽V和肺癌抗原肽VI的六个重组噬菌体液各100-200μl，等量分别包被到固相载体上不同的酶标孔中所组成。所述重组肺癌特异抗原肽是利用T7噬菌体将肺癌cDNA文库展示到噬菌体表面，并经亲和筛选和血清学分析从中筛选出的，它具有检测肺癌病人血清中由于肿瘤刺激所产生的自身抗体的能力，为早期肺癌患者提供了有效的检测手段，有较大的临床应用价值。

噬菌体编号	阳性率
42/1079	9
72	16
91	17
96	16
151/365/378	12
252	16
286/306	20
289	12
290/354/379/2065	17
310/318/369	13
322	8
336	13
357	14