



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102565406 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 11

(21) 申请号 201110254237. 9

(22) 申请日 2011. 08. 31

(71) 申请人 程澎

地址 110000 辽宁省沈阳市铁西区锦工街 7
号 4-5-1

申请人 孙琦

(72) 发明人 贾世哲 程澎 孙琦

(74) 专利代理机构 沈阳智龙专利事务所(普通
合伙) 21115

代理人 宋铁军 周智博

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 6 页

(54) 发明名称

检测 CW9 基因中的 CpG 甲基化片段的方法

(57) 摘要

本发明提供一种检测人体 CW9 基因中的 CpG 甲基化片段的方法,其特征在于:该方法通过单克隆抗体和化学发光试剂联用的方法进行检测 CW9 基因中的 CpG 甲基化片段,然后利用传统的 RT-PCR 基因扩增技术,对上述 CW9 甲基化非阴性产品的样品进行检验,然后根据化学发光免疫技术及 RT-PCR 的检验结果对患者是否有早期直肠癌进行综合性的评定,以及进行各种的癌症筛查与检验。

1. 一种检测 CW9 基因中的 CpG 甲基化片段的方法,其特征在于:该方法通过单克隆抗体和化学发光试剂联用的方法进行检测 CW9 基因中的 CpG 甲基化片段。

2. 根据权利要求 1 所述的检测 CW9 基因中的 CpG 甲基化片段的方法,其特征在于:单克隆抗体和化学发光试剂联用的方法的具体步骤如下:

(1)、制备单克隆抗体:

单克隆抗体利用下列试剂:

抗原: CW9 基因 CpG 岛甲基化片段为阳性抗原, CW9 基因 CpG 岛非甲基化片段为阴性抗原,非特异性抗原为:MGMT 基因 CpG 岛甲基化片段, P16 基因 CpG 岛甲基化片段, HPP1 基因 CpG 岛甲基化片段;

其它特殊试剂:弗氏完全佐剂与弗氏不完全佐剂, L- 谷氨酰胺聚乙二醇-1000, 14- 四甲基 15 烷, 邻苯二胺, TRIS, HEPES 缓冲剂, 辣根过氧化氢酶标兔抗 BALB/c 鼠检验试剂盒其他常规化学试剂均为分析纯试剂;

免疫动物: 8 周龄 BALB/c 雄性小鼠用阳性抗原甲基化 CW9/CpG 进行二次免疫;每只小鼠基础免疫剂量为 100 μ g, 腹腔注射;24d 后加强免疫,剂量为每只小鼠 100 μ g, 尾静脉注射,4d 后取脾融合;

细胞融合:免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 Sp-2 / 0 以 10:1 混合;用 50% 分子量为 1000 聚乙二醇作融合剂,融合细胞用含 20% 小牛血清的 HAT 选择性培养基悬浮后,接种于以小鼠腹腔巨噬细胞作饲养层的 96 孔培养板中,于 5%CO₂, 37°C 条件下培养,7d 后,每培养孔更换 2/3HT 培养液;9d 后,开始对镜检有杂交瘤克隆生长的培养孔,取上清液进行筛选,对检测结果呈阳性的细胞立即用有限稀释法进行克隆化;

腹水抗体纯化:用硫酸铵盐析法纯化腹水抗体;

(2)、CW9 甲基化片段免疫化学发光法测定:

a. 化学发光系统的优化由 SapphireII 不同浓度的增强剂和成底物工作液,进行化学发光值测定,进行底物工作液的优化;

b. 固相化抗体微孔板的制备:将上述制备的抗 CW9 甲基化片段单克隆抗体用 0.05 mol/L、pH 为 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释成 1.0, 2.0, 5.0, 7.0, 10.0, 15.0 μ g/mL 的包被浓度,按 100 μ L/ 孔的量加入包被板中,37°C 包被 2 h,再用含 10 g/L 酪蛋白的 0.01 mol/L、pH 为 7.4 的 PBS 37°C 封闭 2 h 后晾干备用,确定包被选择最佳包被抗体工作浓度;

c. 以正常人游离 DNA 作为参考,确定用优化好的 HRP 化学发光定量试剂对 100 份健康人标本进行浓度测定,进行统计学分析,确定正常游离 DNA, CW9 甲基化片段参考范围;

d. 化学发光免疫检测样品或标准品于相应孔分别加 25 μ L 后,每孔再各加第二抗体 75 μ L,在震荡器上混匀 1 min,置 37°C 恒温反应 60 min. 洗掉游离成分,加入底物工作液 50 μ L,催化底物,第 10 min 后测定各加样品孔的发光值 RLU,并将数据用化学发光检测仪定量软件 Luminoskan Ascent version 2.4.1 软件进行定量分析。

3. 根据权利要求 2 所述的检测 CW9 基因中的 CpG 甲基化片段的方法,其特征在于:将制备的单克隆抗体进行杂交瘤筛选及抗体检测,具体步骤如下:

杂交瘤筛选用固相抗原间接竞争性 ELISA 法进行:包被阳性抗原:甲基化 CW9/CpG 的浓度为 25 μ g/ml,每孔加量 150 μ l;每孔所含抗体抗原反应物由 80 μ l 培养上清液+2 μ l 经紫外分光光度计标定浓度的 15 μ g/ml 的甲基化 CW9/CpG 组成;检测对照孔中的抗原部分

则用 20 μ l、20%MeOH-PBS 的抗原稀释液代替 ;酶底物用邻苯二胺 ;其它按标准方法进行。

检测 CW9 基因中的 CpG 甲基化片段的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检验领域,尤其设计一种检测 CW9 基因中的 CpG 甲基化片段的方法。

背景技术

[0002] 我国肿瘤的诊断主要依靠影像学手段,其缺点是不能早期诊断。一旦发现影像学异常,多数病例已错过手术治疗甚至化学药物和放射治疗的时机。因此,借助免疫检测肿瘤标志物进行早期诊断始终是肿瘤防治研究的重要课题。但现有试剂盒检测结果与疾病的符合率还不理想。对许多病例不能做出准确早期诊断。目前市场上用于免疫检测肿瘤标志物的主要有放射免疫和酶免疫两大类试剂盒。虽然它们都通过定量分析病人体内的肿瘤标志物表现提出诊断信息,但是存在以下几方面的问题:

a. 定量标准混乱,不同厂家生产的试剂盒定量一个特定样品的结果有时会相差数倍,导致特定标志物表达的信息无法准确传递出来,与疾病的符合程度下降;

b. 定量范围不合理。普遍表现为定量范围窄,在实际应用中给定量的准确性带来影响。因而,新型检测技术精确定量分析肿瘤标志物,可以准确区别个体分度和疾病状态下肿瘤标志物水平的差异及浓度变化。而化学发光免疫诊断技术由于灵敏度高,线性范围宽,从而在有种于确定合理的定量和定量范围。

[0003] 结肠镜检查是目前临床使用的最精确的结肠癌筛检方法,但是,高额的费用和患者不愿承受这种侵入性治疗方法限制了它的使用。结肠癌发生时,关联相关基因 *CW9* 出现甲基化,然后利用 RT-PCR 技术进行片段扩增,基因检测,或者而采用其他的方法进行检测,但对于在片段扩增前的基因 *CW9* 甲基化的早期检测方法效果并不理想。

发明内容

[0004] 发明目的:本发明提供一种检测 CW9 基因中的 CpG 甲基化片段的方法,其目的是解决以往的检测方法效果不理想的问题。

[0005] 技术方案:本发明是通过以下技术方案来实现的:

一种检测 CW9 基因中的 CpG 甲基化片段的方法,其特征在于:该方法通过单克隆抗体和化学发光试剂联用的方法进行检测 CW9 基因中的 CpG 甲基化片段。

[0006] 单克隆抗体和化学发光试剂联用的方法的具体步骤如下:

(1)、制备单克隆抗体:

单克隆抗体利用下列试剂:

抗原: CW9 基因 CpG 岛甲基化片段为阳性抗原, CW9 基因 CpG 岛非甲基化片段为阴性抗原,非特异性抗原为:MGMT 基因 CpG 岛甲基化片段, P16 基因 CpG 岛甲基化片段, HPP1 基因 CpG 岛甲基化片段;

其它特殊试剂:弗氏完全佐计与弗氏不完全佐计, L- 谷氨酰胺聚乙二醇 -1000, 14- 四甲基 15 烷, 邻苯二胺, TRIS, HEPES 缓冲剂, 辣根过氧化氢酶标兔抗 BALB/c 鼠检验试剂盒其

他常规化学试剂均为分析纯试剂；

免疫动物：8 周龄 BALB/c 雄性小鼠用阳性抗原甲基化 CW9/CpG 进行二次免疫；每只小鼠基础免疫剂量为 100 μ g，腹腔注射；24d 后加强免疫，剂量为每只小鼠 100 μ g，尾静脉注射，4d 后取脾融合；

细胞融合：免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 Sp-2 / 0 以 10:1 混合。用 50% 分子量为 1000 聚乙二醇作融合剂，融合细胞用含 20% 小牛血清的 HAT 选择性培养基悬浮后，接种于以小鼠腹腔巨噬细胞作饲养层的 96 孔培养板中，于 5%CO₂，37℃ 条件下培养，7d 后，每培养孔更换 2/3 HT 培养液。9d 后，开始对镜检有杂交瘤克隆生长的培养孔，取上清液进行筛选，对检测结果呈阳性的细胞立即用有限稀释法进行克隆化；

腹水抗体纯化：用硫酸铵盐析法纯化腹水抗体；

(2)、CW9 甲基化片段免疫化学发光法测定：

a. 化学发光系统的优化由 SapphireII 不同浓度的增强剂和成底物工作液，进行化学发光值测定，进行底物工作液的优化；

b. 固相化抗体微孔板的制备：将上述制备的抗 CW9 甲基化片段单克隆抗体用 0.05 mol/L、pH 为 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释成 1.0, 2.0, 5.0, 7.0, 10.0, 15.0 μ g/mL 的包被浓度，按 100 μ L/孔的量加入包被板中，37℃ 包被 2 h，再用含 10 g/L 酪蛋白的 0.01 mol/L、pH 为 7.4 的 PBS 37℃ 封闭 2 h 后晾干备用，确定包被选择最佳包被抗体工作浓度；

c. 以正常人游离 DNA 作为参考，确定用优化好的 HRP 化学发光定量试剂对 100 份健康人标本进行浓度测定，进行统计学分析，确定正常游离 DNA，CW9 甲基化片段参考范围；

d. 化学发光免疫检测样品或标准品于相应孔分别加 25 μ L 后，每孔再各加第二抗体 75 μ L，在振荡器上混匀 1 min，置 37℃ 恒温反应 60 min。洗掉游离成分，加入底物工作液 50 μ L，催化底物，第 10 min 后测定各加样品孔的发光值 RLU，并将数据用化学发光检测仪定量软件 Luminoskan Ascent version 2.4.1 软件进行定量分析。

[0007] 将制备的单克隆抗体进行杂交瘤筛选及抗体检测，具体步骤如下：

杂交瘤筛选用固相抗原间接竞争性 ELISA 法进行：包被阳性抗原：甲基化 CW9/CpG 的浓度为 25 μ g/ml，每孔加量 150 μ L；每孔所含抗体抗原反应物由 80 μ L 培养上清液 + 20 μ L 经紫外分光光度计标定浓度的 15 μ g/ml 的甲基化 CW9/CpG 组成；检测对照孔中的抗原部分则用 20 μ L、20%MeOH-PBS 的抗原稀释液代替；酶底物用邻苯二胺；其它按标准方法进行。

[0008] 优点及效果：本发明提供一种检测 CW9 基因中的 CpG 甲基化片段的方法，其特征在于：该方法通过单克隆抗体和化学发光试剂联用的方法进行检测 CW9 基因中的 CpG 甲基化片段。

[0009] 本发明通过化学发光免疫技术，定性地测定特定的肿瘤基因甲基化片段。本发明的关键在于制备 CW9 甲基化单克隆抗体，该抗体可以对 CW9 甲基化片段有阳性反应，对 CW9 非甲基化有阴性反应。以上得出一个中间结果，然后利用传统的 RT-PCR 基因扩增技术，对上述 CW9 甲基化非阴性产品的样品进行检验，然后根据化学发光免疫技术及 RT-PCR 的检验结果对患者是否有早期直肠癌进行综合性的评定。

[0010] 本发明具有如下的优点：

1、化学发光免疫检测

化学发光免疫分析方法 (chemiluminescence immunoassay, CLIA) 因其具有简便易

行、标记物制备非常容易、稳定性高、便于实现完全自动化和不污染环境等优点,特别是能在较短的时间内得到实验结果,因此深受检验医学工作者和临床医师的好评。化学发光免疫诊断试剂作为免疫诊断试剂的一种,是以化学发光免疫检测技术为基础的一类诊断试剂,理论上所有免疫反应均可以制备为化学发光诊断试剂盒。此类试剂盒通常包括免疫反应试剂及化学发光反应试剂。

[0011] 2、化学发光免疫方法的特点

作为近十年来在世界范围内发展非常迅速的非放射性免疫分析方法。基于此构建的化学发光免疫诊断试剂具有以下突出的技术特点:

①灵敏度高。以发光底物可检测出的碱性磷酸酶的浓度比显色底物要灵敏 5000 倍。这对浓度极稀的临床标志物的检测尤为有效。以当前广为关注的 HIV 诊断为例。Handa 等医用化学发光免疫分析法检测处于窗口期的 HIV-1 P24 抗原。发现化学发光法的最小检测极限在 3.1-6.3pg/ml 之间,而酶免疫法的最小检测极限在 12.5-25.0 pg/mL 之间。与酶免疫法相比,化学发光法可把 HIV 的窗口期缩短 7d。Sakai 等医用化学发光免疫技术检测 p24 抗原。其最小检测浓度达到 4.3 pg/mL,小于 Abbot 和 Coulter 酶免疫试剂盒的相应浓度。缩短了 HIV 感染的窗口期。

[0012] ②宽的线性动力学范围,发光强度在 4-6 个数量级之间与测定物质浓度间呈线性关系,这有助于检测浓度较高的临床样本。并避免弯钩效应,便如化学发光免疫分析检测癌胚抗原(CEA)时的线性范围为 0.01-1000 ng/mL,达到约 6 个数量级,不受血清非特异因素的干扰,使检测的特异性和敏感性明显提高。

[0013] ③光信号持续时间长,辉光型化学发光产生的光信号持续时间可达数小时甚至 1 天。从而简化了实验操作及测量。

[0014] ④结果稳定、误差小、样品系直接发光。不需要任何光源照射。免除了各种可能因素(光源稳定性、光散射、光波选择器等)给分析来来的影响。

[0015] ⑤环境友好。免除了使用放射性物质。到目前为止,还未发现化学发光免疫分析的危害性,试剂有效期可长达 1 年以上,放射免疫分析由于放射性同位素的衰变,一般有效期只有 1-2 个月。而酶联的底物储存性差,都无法与化学发光相比,从而有利于推广应用。

[0016] ⑥、化学发光免疫分析较其他诊断技术更容易整合最新的平台技术。由于化学发光反应的特点,尤其适合于全自动检测,所以整合了高质量的单克隆抗体和重组(或合成)蛋白质抗原、高效抗体标记方法、生物素亲和素及磁性微粒子等固相包被技术。集加样、传输、分享、洗涤和测量、数据处理于一体的全自动诊断技术平台将是化学发光诊断技术的发展方向之一。

[0017] ⑦、快速检测、携带方便。试剂盒可以随身携带、操作场地不限。

[0018] 3、化学发光免疫诊断试剂

化学发光免疫诊断试剂渐有取代放射性免疫分析与普通酶免疫诊断试剂的趋势,是未来免疫诊断试剂的重要发展方向。理论上所有免疫反应均可以制备为化学发光诊断试剂盒。检验快速,携带方便。

[0019] 4、结肠癌早期检测

经过研究论证,在连续临床病例控制中,来自于结肠癌患者和非癌症结肠疾病患者 3,000 例血浆采样健康控制,我们使 DNA 甲基化,由肿瘤流向血流充当早期敏感性特异性的

结肠癌探测生物标记。在 2006 年一项研究中,我们以甲基化 DNA 作为生物标记物在血浆中探测,结肠癌早期检测敏感性达到 90%,当测试被调整为“高敏感性”时,则敏感度也可达到 70%。

[0020] 通过参照实验测试服务提早向患者及医生们提供生物标记使用权。为高风险个人、癌症及癌症患者开发专门的诊断法,这些测试包括监督结肠癌生物标记应用及针对癌症患者的基于组织的预期癌症分子分类试验。

[0021] 5、化学发光试剂用于结肠癌早期检测

结肠癌发生时,关联相关基因 *CW9* 出现甲基化,传统方法可利用 RT-PCR 技术进行片段扩增,基因检测,本发明的新方法利用化学发光免疫方法对肿瘤发生物甲基化片段进行免疫制作成单克隆抗体,通过化学发光免疫技术进行检测,速度快,成本低,价格合理易于接受。

[0022] 具体实施方式:下面对本发明做进一步的说明:

本发明提供一种检测 *CW9* 基因中的 CpG 甲基化片段的方法,该方法通过单克隆抗体和化学发光试剂联用的方法进行检测 *CW9* 基因中的 CpG 甲基化片段。

[0023] 本发明的方法具体步骤如下:

一. 制备单克隆抗体:本发明所产生的 *CW9* 甲基化单克隆抗体利用下列试剂:

抗原: *CW9* 基因 CpG 岛(CpGisland)甲基化片段(甲基化 *CW9*/CpG)为阳性抗原, *CW9* 基因 CpG 岛(CpGisland)非甲基化片段(非甲基化 *CW9*/CpG)为阴性抗原,非特异性抗原为: *MGMT* 基因 CpG 岛(CpGisland)甲基化片段, *P16* 基因 CpG 岛(CpGisland)甲基化片段, *HPP1* 基因 CpG 岛(CpGisland)甲基化片段。

[0024] 其它特殊试剂:弗氏完全佐剂与弗氏不完全佐剂, L- 谷氨酰胺聚乙二醇-1000, 14- 四甲基 15 烷(美国 SIGMA 公司), 邻苯二胺, TRIS, HEPES 缓冲剂(美国 GIBCO 公司), 辣根过氧化物酶标(ELISA)兔抗 BALB/c 鼠检验试剂盒(美国标准试剂公司)其他常规化学试剂均为分析纯试剂。

[0025] 2. 免疫动物: 8 周龄 BALB/c 雄性小鼠(购自卫生部药检所动物繁育场)用阳性抗原甲基化 *CW9*/CpG 进行二次免疫;每只小鼠基础免疫剂量为 100 μ g, 腹腔注射;24d 后加强免疫,剂量为每只小鼠 100 μ g, 尾静脉注射,4d 后取脾融合。

[0026] 3. 细胞融合:免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 Sp-2 / 0 以 10:1 混合。用 50% 分子量为 1000 聚乙二醇作融合剂,融合细胞用含 20% 小牛血清的 HAT 选择性培养基悬浮后,接种于以小鼠腹腔巨噬细胞作饲养层的 96 孔培养板中,于 5%CO₂, 37℃ 条件下培养,7d 后,每培养孔更换 2/3HT 培养液。9d 后,开始对镜检有杂交瘤克隆生长的培养孔,取上清液进行筛选,对检测结果呈阳性的细胞立即用有限稀释法进行克隆化。

[0027] 4. 腹水抗体纯化:用硫酸铵盐析法纯化腹水抗体。

[0028] 5. 杂交瘤筛选及抗体检测:杂交瘤筛选用固相抗原间接竞争性 ELISA 法进行:包被阳性抗原:甲基化 *CW9*/CpG 的浓度为 25 μ g/ml,每孔加量 150 μ l;每孔所含抗体抗原反应物由 80 μ l 培养上清液+2 μ l 经紫外分光光度计标定浓度的甲基化 *CW9*/CpG(15 μ g/ml)组成;检测对照孔中的抗原部分则用 20 μ l 抗原稀释液(20%MeOH-PBS)代替;酶底物用邻苯二胺(OPD);其它按标准方法进行。

[0029] 6. 抗体的特性测定方法:

抗体滴度 :用固相抗原间接非竞争性 ELISA 测定,测定条件为 :包被抗原为甲基化 CW9/CpG,浓度为 $25 \mu\text{g/ml}$,每孔加量 $150 \mu\text{l}$;抗体从 100 倍开始对倍稀释,每孔加量 $130 \mu\text{l}$;抗体稀释液为 0.1%BSA-PBS ;阴性对照孔用 Sp-2 / 0 骨髓瘤细胞培养上清液 ;封闭液为 1% BSA-PBS,每孔加量 $250 \mu\text{l}$;酶底物用 OPD ;酶标板购自美国 Linbro 公司。其它按标准方法进行。

[0030] 7. 检测标准抗原灵敏度 :先用期盼滴定法筛选出包被抗原浓度和抗体工作稀释度的优化组合,以此为测试条件,用固相抗原间接竞争性 ELISA 法作出抗原甲基化 CW9/CpG 的标准抑制曲线,并对结果进行数理统计分析。其中 ELISA 测试条件为 :包被抗原甲基化 CW9/CpG 的浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$,每孔加量 $150 \mu\text{l}$;抗体工作稀释度为 1:300000 ;抗体稀释度为 0.1% BSA-PBS ;抗体抗原反应液为每孔 $65 \mu\text{l}$ 抗体 + $65 \mu\text{l}$ 相应浓度甲基化 CW9/CpG ;封闭液为 1% BSA-PBS,每孔加量 $250 \mu\text{l}$;酶底物为 OPD ;阴性对照用 Sp-2 / 0 骨髓瘤细胞培养上清液 ;酶标板用美国 Linbro 板。其它按标准方法进行。

[0031] 8. 抗体的特异性 :用固相抗原剪辑竞争性 ELISA 法测定,参试阳性抗原为甲基化才、阴性抗原非甲基化 CW9/CpG、非特异性抗原 :MGMT 基因 CpG 岛 (CpGisland) 甲基化片段, P16 基因 CpG 岛 (CpGisland) 甲基化片段, HPP1 基因 CpG 岛 (CpGisland) 甲基化片段。其它测试条件同 1。

[0032] 9. 抗体亚类分析 :用免疫双扩散法进行。

[0033] 10. 抗体亲和力 :Friguet 法。对应小鼠 IgG 标准曲线滴定出抗体 IgG 含量,再对应抗体滴度曲线求出平衡态下,抗体使抗原达到半饱和时的游离抗体克分子浓度 [Ab],带入下式求出抗体的亲和常数 $K_a (\text{L/mol})$:

$$K_a = 1/[\text{Ab}]$$

11. 本发明生产单克隆抗体取得结果如下 :

细胞融合与杂交流细胞的筛选 :细胞融合后约有 65.2% 孔长出杂交流克隆,其中对阳性抗体有反应的约为 77.5%,对阴性抗体有反应的为 46.7%。从中选择出对阳性抗体有强烈反应同时对阴性抗体无反应的孔,经过多次亚克隆建立了 3 个稳定分泌抗甲计划片段单克隆抗体的杂交流细胞株 :2B6, 3E7, 3H18。其中再经过两次亚克隆后,各个细胞株经过两次亚克隆阳性率都达到了 100%,对阴性抗原的反应率均为零。经过反复测定,选 2B6 为最佳克隆,做进一步的研究。

[0034] 抗体特性 : 抗体滴度为 7.5×10^7 ; 抗体检测灵敏度为 0.005ng/ml ;

抗体的特异性 : 阴性抗原通过固体抗原间接竞争性 ELISA 法经过测定表明抗体与阴性抗原无交叉反应,与其他非特异性抗原非甲基化片段无交叉反应,且与其他非特异性抗原甲基化片段有弱交叉反应,数值在 $0.04 \sim 0.12$ (假设阳性反应为 1)

抗体亚类分析为 IgG3

抗体的亲和力 K_a 为 $8.45 \times 10^9 \text{L/mol}$

12. 血浆样品的制备 :

使用乙二胺四乙酸一次性采血管 (紫色顶的 Becton/Dickinson) 采血。血浆必须在 4 小时内处理。对血浆 $1500 \times g$ 离心十分钟,接着在不破坏白细胞层的情况下小心地移除血浆。血浆放在 15 ml 管里并再次 $1500 \times g$ 离心 10 分钟。如果从每名患者得到了一管多的血浆,血浆合并并在 -80°C 的冷冻管里储存。

13. 人体血浆游离 DNA 抽取 : 本发明利用美国 QIAGEN 公司的 Qia AMP DNA 抽取试剂盒, 提取人体血浆游离 DNA.

二、CW9 甲基化片段免疫化学发光法测定 :

a. 化学发光系统的优化 : 由不同浓度的增强剂和组成底物工作液, 进行化学发光值 (RLU) 测定, 进行底物工作液的优化。

[0035] b. 固相化抗体微孔板的制备 : 将 CW9 甲基化单克隆抗体用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 稀释成 1.0, 2.0, 5.0, 7.0, 10.0, 15.0 $\mu\text{g/mL}$ 的包被浓度, 按 100 μL /孔的量加入包被板中, 37°C 包被 2 h, 再用含 10 g/L 酪蛋白的 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 37°C 封闭 2 h 后晾干备用, 确定包被选择最佳包被抗体工作浓度。

c. 正常人游离 DNA 作为参考, 确定用优化好的 HRP 化学发光定量试剂对 100 份健康人标本进行浓度测定, 进行统计学分析, 确定正常游离 DNA CW9 甲基化片段参考范围。

[0036] d. 化学发光免疫检测样品或标准品于相应孔分别加 25 μL 后, 每孔再各加第二抗体 75 μL , 在震荡器上混匀 1 min, 置 37°C 恒温反应 60 min. 洗掉游离成分, 加入底物工作液 50 μL , 第 10 min 后测定各加样品孔的发光值 RLU, 并将数据用化学发光检测仪定量软件 Luminoskan Ascent version 2.4.1 软件进行定量分析。

[0037] 15. 即时 PCR 测定 CW9/CpG 岛片段的甲基化程度

把化学发光免疫阶段测定的 CW9/CpG 岛甲基化片段阳性样品 DNA 进行即时 PCR 甲基化程度测定 : 利用美国 ABI 即时 PCR 测定试剂盒, 和甲基化片段测定试剂盒进行测定。

[0038] 16. 根据甲基化程度的高低曲线来判定样品中是否含有肿瘤细胞。

[0039] 本发明具有如下实用内容 :

1. 利用本发明所涉及的单克隆抗体检测人体各种体液包括血液、唾液及其它的液体中的 CW9 基因中的 CpG 甲基化片段。

[0040] 2. 利用本发明所涉及的单克隆抗体测定 CW9 基因 CpG 甲基化片段所得的中间结果再结合以往常规的方法来判定人体各项肿瘤包括直肠癌、胃癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌等固体肿瘤以及白血病、淋巴瘤等液体肿瘤的早期检验, 以及癌症治疗跟踪等应用。

[0041] 3. 利用本发明所涉及的单克隆抗体作为对正常人进行各种癌症的早期筛查的中间指标。

[0042] 4. 利用本发明所涉及的单克隆抗体与即时 PCR 结合, 进行各种的癌症筛查与检验。

[0043] 5. 本发明所涉及的单克隆抗体可以用于化学免疫发光或和普通酶标法 (ELISA) 以及其它的生化免疫方法测定 CW9 基因中的 CpG 甲基化片段。

[0044] 6. 通过本发明涉及的单克隆抗体而测定的 CW9 基因中的 CpG 甲基化片段的結果, 除了在肿瘤检测方面应用, 也可以运用于非肿瘤邻域的应用。

专利名称(译)	检测CW9基因中的CpG甲基化片段的方法		
公开(公告)号	CN102565406A	公开(公告)日	2012-07-11
申请号	CN201110254237.9	申请日	2011-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	程澎 孙琦		
申请(专利权)人(译)	程澎 孙琦		
当前申请(专利权)人(译)	程澎 孙琦		
[标]发明人	贾世哲 程澎 孙琦		
发明人	贾世哲 程澎 孙琦		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N21/76		
代理人(译)	宋铁军 周智博		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种检测人体CW9基因中的CpG甲基化片段的方法，其特征在于：该方法通过单克隆抗体和化学发光试剂联用的方法进行检测CW9基因中的CpG甲基化片段，然后利用传统的RT-PCR基因扩增技术，对上述CW9甲基化非阴性产品的样品进行检验，然后根据化学发光免疫技术及RT-PCR的检验结果对患者是否有早期直肠癌进行综合性的评定，以及进行各种的癌症筛查与检验。