



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103091499 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 08

(21) 申请号 201310025418. 3

(22) 申请日 2013. 01. 23

(73) 专利权人 三峡大学

地址 443002 湖北省宜昌市大学路 8 号

(72) 发明人 刘朝奇 吴薇 杨建林 汪龚泽

(74) 专利代理机构 宜昌市三峡专利事务所

42103

代理人 成钢

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

EP 1502602 A2, 2005. 02. 02,

WO 0065058 A1, 2000. 11. 02,

CN 101045673 A, 2007. 10. 03,

CN 101105498 A, 2008. 01. 16,

CN 101315368 A, 2008. 12. 03,

CN 101852807 A, 2010. 10. 06,

CN 102128929 A, 2011. 07. 20,

许瑞环 等. 钙网蛋白的 ELISA 检测方法的建立及其在膀胱癌诊断中的应用研究. 《国际检验医学杂志》. 2011, 第 32 卷 (第 20 期), 2323-2327.

许瑞环 等. 钙网蛋白的 ELISA 检测方法的建立及其在膀胱癌诊断中的应用研究. 《国际检验医学杂志》. 2011, 第 32 卷 (第 20 期), 2323-2327.

汪龚泽 等. 小鼠钙网蛋白的原核表达和多克隆抗体的制备. 《现代免疫学》. 2011, 第 31 卷 (第 4 期), 291-294.

汪龚泽 等. 鼠钙网蛋白单克隆抗体的制备. 《中国药理通讯》. 2011, 第 28 卷 (第 2 期), 36-37.

Rongrong Liu et al.. Calreticulin as a potential diagnostic biomarker for lung cancer. 《Cancer Immunol Immunother》. 2011, 第 61 卷第 855-864 页.

唐晓磊 等. 兔抗重组人钙网蛋白抗体的制备及其特性鉴定. 《细胞与分子免疫学杂志》. 2011, 第 27 卷 (第 6 期), 641-643.

审查员 周洋

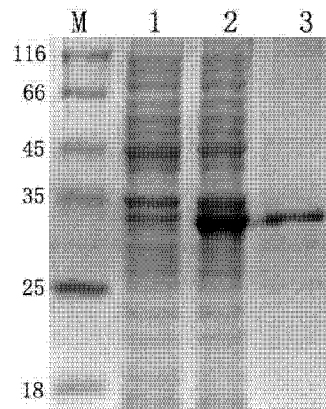
权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54) 发明名称

一种肿瘤标志物钙网蛋白检测试剂盒的制备及应用

(57) 摘要

一种肿瘤标志物钙网蛋白检测试剂盒的制备及应用,属于基因工程和临床诊断领域。本发明应用重组 CRT 蛋白免疫 BALB/c 小鼠和新西兰大白兔制备了 CRT 的单克隆抗体、多克隆抗体,并建立了检测 CRT 最低量为 0. 3125ng/ml,检测限为 40-0. 3125ng/ml 的高特异性和敏感性的 ELISA 试剂盒。通过制备的 ELISA 试剂盒,对收集的临床样品进行检测,结果发现肺癌病人血清中的 CRT 明显高于正常对照血清,统计学有显著差异 (P<0. 01),为临床肺癌病人的诊断提供实验方法。



1. 一种诊断癌症或评价癌症风险的酶联免疫吸附试剂盒,其包含:钙网蛋白(CRT)的特异性抗体,所述特异性抗体为通过以钙网蛋白为免疫原得到的单克隆抗体和/或多克隆抗体,所述钙网蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,所诊断或评价风险的癌症为肺癌。

2. 权利要求1所述的试剂盒,其中所述单克隆抗体为鼠源单克隆抗体,其制备方法如下:使用纯化的钙网蛋白作为免疫原对Ba1b/c小鼠进行免疫;经效价检测达标后,进行细胞融合;经筛选克隆获得分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞,经杂交瘤细胞株分泌,得单克隆抗体。

3. 权利要求1所述的试剂盒,其中:所述多克隆抗体为兔源多克隆抗体。

4. 权利要求1-3任一所述的试剂盒,其还包含:酶标抗体,包被有所述单克隆抗体的微孔板,HRP标记的羊抗兔酶标抗体,标准阳性对照钙网蛋白,标准阴性对照大肠杆菌BL-21菌体蛋白,封闭液,样品稀释液,洗涤液,终止液,底物显色液。

5. 权利要求4所述的试剂盒,其中所述的封闭液,样品稀释液,洗涤液,终止液,底物显色液的组分及配比如下:

1) 封闭液由1% BSA液和1%山羊血清液组成,山羊血清在封闭时加入,使之浓度为封闭液的1%即可;

2) 样品稀释液为1×PBS;

3) 洗涤液为含浓度为0.05% Tween-20的PBS;

4) 终止液为2M的硫酸;

5) 底物显色液包括A液和B液,A液的制备过程为:过氧化脲1g,磷酸氢二钠35.8g,柠檬酸10.2g,Tween-20 100 μl,将前三者加ddH<sub>2</sub>O避光溶解后加入Tween-20定容至1L,4℃避光保存;B液的制备过程为TMB 0.7g,柠檬酸10.3g,DMSO 40ml,先用DMSO避光溶解TMB和柠檬酸后,加入ddH<sub>2</sub>O定容至1L,4℃避光保存;使用前等体积混合A液和B液,避光显色。

## 一种肿瘤标志物钙网蛋白检测试剂盒的制备及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于基因工程和临床诊断领域,涉及一种肿瘤标志物钙网蛋白检测试剂盒的制备及应用。

### 背景技术

[0002] 钙网蛋白(Calreticulin,CRT)为 46KD 大小的具有多种生物学功能的内质网分子伴侣蛋白,除了分布在内质网,细胞核、核膜、细胞膜表面以及细胞外基质中均有表达,能发挥多种生化生理效应。在肿瘤发生时,分泌性的 CRT 在肝癌病人的血清以及膀胱癌患者的尿液中都有上升趋势,除此之外,对妇科肿瘤如乳腺癌、宫颈癌的研究也显示相比健康对照 CRT 的表达量有所增加;用免疫组化染色研究胃癌时发现 CRT 阳性的患者往往伴有远处淋巴结的转移、肿瘤微血管聚集以及五年存活率低下的症状。然而,由于肿瘤发生发展的机制至今尚未阐明,因此肿瘤的早期发现也变得越来越重要。

[0003] 在肿瘤的研究和临床实践中,早期发现、早期诊断、早期治疗是关键。肿瘤标志物(Tumor Marker, TM)在肿瘤普查、诊断、判断预后和转归、评价治疗疗效和高危人群随访观察等方面都具有较大的实用价值。随着单克隆抗体技术的不断成熟,出现了大量的抗肿瘤标志物的单克隆抗体,并与特异敏感的免疫学检测技术(RIA、IRMA、ELISA、CLIA、IFA、TRFIA 等)相结合,发展了众多的肿瘤标志物检测项目并不断地应用于临床,已成为肿瘤患者的一个重要检查指标。基于以上研究结果,本发明将选择 CRT 作为肿瘤标志物进行方法学的建立及临床试验。本发明应用一对特异性的单抗和多抗建立高敏感性的 ELISA 试剂盒,用于临床肿瘤病人及健康对照血清 CRT 检测。我们发现,肿瘤病人血清中的 CRT 水平明显高于正常对照。因此,我们首次报道成功的建立了针对于肿瘤诊断的 CRT 检测的 ELISA 试剂盒。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种诊断癌症或评价癌症风险的酶联免疫吸附试剂盒,所述试剂盒包含:钙网蛋白(CRT)的特异性抗体,所述特异性抗体为通过以钙网蛋白为免疫原得到的单克隆抗体和/或多克隆抗体。

[0005] 其中所述单克隆抗体为鼠源单克隆抗体,其制备方法如下:使用纯化的钙网蛋白作为免疫原对 Balb/c 小鼠进行免疫;经效价检测达标后,进行细胞融合;经筛选克隆获得分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞,经杂交瘤细胞株分泌,得单克隆抗体。其中,优选使用纯化的小鼠重组钙网蛋白(即 CRT 抗原)作为免疫原,应用构建的重组质粒通过原核表达系统制备小鼠重组 CRT 蛋白(其氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示)。

[0006] 优选的制备单抗的步骤为:免疫 Balb/c 小鼠前,先获得大约 100  $\mu$ l 的血清 -20 $^{\circ}$ C 保存,后以 50  $\mu$ g 纯化的 CRT 抗原与弗氏完全佐剂混合制成乳剂,经皮内背部多点注射进行免疫。1 个月后,用 25  $\mu$ g 的抗原加弗氏不完全佐剂经皮内注射进行加强免疫共 3 次,每次间隔 2 周。经效价检测达标后,将免疫获得的小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行细胞融合,饲养层细胞为小鼠腹腔巨噬细胞,融合试剂为 50% 的 PEG4000,脾细胞和骨髓瘤细胞的

比例为 5 : 1,置于 5% CO<sub>2</sub>饱和湿度的 37℃温箱中培育,第 3、6、9、10 日换入含 HAT 的完全 1640 培养液,用有限稀释法将克隆分别稀释于 5 块 96 孔板中,至杂交瘤细胞长成后吸取上清,用 ELISA 检测上清抗体效价,筛选出阳性杂交瘤细胞(即分泌单克隆抗体多,且细胞生长状态好的杂交瘤细胞)。再经筛选获得的杂交瘤细胞株分泌,纯化后得单克隆抗体。

[0007] 所述试剂盒中的多克隆抗体为兔源多克隆抗体;其制备方法如下:先取得 5ml 左右注射抗原前免疫新西兰大白兔血清,后以 500 μg CRT 抗原与弗氏完全佐剂混合制成乳剂,经皮内背部多点注射进行免疫。1 个月后,用 250 μg 的抗原加弗氏不完全佐剂经皮内注射进行加强免疫共 3 次,每次间隔 2 周。测定效价后,颈动脉取血离心后收集血清经饱和硫酸铵沉淀法纯化后加等体积的甘油 -20℃保存。

[0008] 所述试剂盒还包含:酶标抗体,包被有所述单克隆抗体的微孔板,HRP 标记的羊抗兔酶标抗体,标准阳性对照钙网蛋白,标准阴性对照大肠杆菌 BL-21 菌体蛋白,封闭液,样品稀释液,洗涤液,终止液,底物显色液。

[0009] 封闭液由 1% BSA 液和 1% 山羊血清液组成,BSA 液制备方法如下:氯化钠 8g,氯化钾 0.2g,磷酸氢二钠 1.44g,磷酸二氢钾 0.27g,10g BSA 粉末溶于 ddH<sub>2</sub>O 中,调 pH 为 7.4,定容至 1L,即为 1% BSA,过滤分装保存于 -20℃。在封闭时加入山羊血清,使之浓度为封闭液的 1%即可。

[0010] 样品稀释液为 1×PBS,其制备方法为:氯化钠 8g,氯化钾 0.2g,磷酸氢二钠 1.44g,磷酸二氢钾 0.27g,溶于 ddH<sub>2</sub>O 中,调 pH 为 7.4,定容至 1L,过滤,4℃保存。

[0011] 洗涤液为含浓度为 0.05% Tween-20 的 PBS,制备方法为:在 1L1×PBS 中加入 Tween-20500 μl,4℃保存。

[0012] 终止液为 2M 的浓硫酸,将 178.3ml 的蒸馏水逐滴加入 21.7ml 的浓硫酸(98%)即可。

[0013] 底物显色液包括 A 液和 B 液,其中 A 液的制备过程为:过氧化脲 1g,磷酸氢二钠 35.8g,柠檬酸 10.2g, Tween-20100 μl,将前三者加 ddH<sub>2</sub>O 避光溶解后加入 Tween-20 定容至 1L,4℃避光保存;B 液的制备过程为 TMB0.7g,柠檬酸 10.3g,DMSO40ml,先用 DMSO 避光溶解前两者后加 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1L,4℃避光保存;使用前等体积混合 A 液和 B 液,避光显色。

[0014] 通过方阵滴定法的测定,当 CRT 浓度为 5ng/ml、OD 值为 1.0 时的单克隆抗体包被浓度及多抗结合浓度、羊抗兔-辣根过氧化物酶二抗浓度为最佳浓度。分别为单克隆抗体 800 倍稀释,多克隆抗体 4500 倍稀释,羊抗兔-HRP 二抗(即 HRP 标记的羊抗兔酶标抗体)3000 倍稀释,阴性对照 0.108。

[0015] 本发明所述的试剂盒,可用于检测癌症,优选为肺癌。

[0016] 本发明还提供一种钙网蛋白的 ELISA 检测方法,其步骤包括:

[0017] 1) 用碳酸盐缓冲液(0.05M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>, pH9.6)包被 1 : 800 梯度稀释的通过上述制备方法制备获得的 CRT 单抗,每孔 100 μl,4℃包被 16h,PBST 洗涤液洗涤 ELISA 板 1 次;

[0018] 2) 加入 200 μl 封闭液(1% BSA 和 1% 山羊血清 PBS) 37℃封闭 1h,洗涤 1 次;

[0019] 3) 加入 100 μl 1% BSA 稀释的 CRT 抗原(0.5 μg/ml,100 μl/孔)37℃ 1h,由 PBST 洗涤液洗涤 3 次;

[0020] 4) 加入 100 μl CRT 多抗(4500×),37℃孵育 1h 后用 PBST 洗涤液洗涤 3 次;

- [0021] 5) 加入 100  $\mu$ l HRP 标记的羊抗兔酶标抗体(3000 $\times$ ) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 用 PBST 洗涤液洗涤 3 次;
- [0022] 6) 100  $\mu$ l/ 孔底物显色液 A+B 液室温避光显色 15min;
- [0023] 7) 加入 50  $\mu$ l/ 孔的 2mol/L  $H_2SO_4$  (终止液) 终止反应;
- [0024] 8) 在 450nm 波长酶标仪上测定吸光度值。

### 附图说明

[0025] 图 1 所示为 pET28a(+)-CRT 在 BL21 (DE3) 菌中的表达及 CRT 蛋白的纯化, 其中 :M 为 Unstained Protein Molecular Weight Marker (SM0431); 1 为诱导前 pET28a(+)-CRT 转化的 BL21 (DE3) 菌, 2 为 IPTG 诱导后 pET28a(+)-CRT 转化的 BL21 (DE3) 菌, 3 为纯化的 CRT 蛋白。

[0026] 图 2 所示为 ELISA 法测定 CRT 抗体效价结果, A 图所示为 : 制备的 CRT 单克隆抗体进行梯度稀释后, 与包被的 CRT 结合, 读取吸光度值 (OD450); B 图所示为 : 制备的 CRT 多克隆抗体进行梯度稀释后, 与包被的 CRT 结合, 读取吸光度值 (OD450)。

[0027] 图 3 所示为 Western blot 鉴定单抗特异性; 上图 : 应用单克隆抗体对真核细胞 Cos-7 和 A549 内源性的 CRT 进行测定; 下图 : 将重组截短的 CRT (rCRT) 转染细胞, 应用单克隆抗体进行测定 CRT 的表达。

[0028] 图 4 所示为 Western blot 鉴定多抗特异性的结果, 其中 : 1, 纯化的 CRT 蛋白; 2, IPTG 诱导的 CRT 蛋白表达; 3, 诱导前的对照。

[0029] 图 5 所示为建立的 ELISA 测定 CRT 的标准曲线。

[0030] 图 6 所示为测定临床血清样品中 CRT 蛋白含量的结果。

### 具体实施方式

[0031] 以下的实施例便于更好地理解本发明, 但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法, 如无特殊说明, 均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料, 如无特殊说明, 均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验, 均设置三次或以上重复实验, 结果取平均值。

[0032] 主要材料和试剂

[0033] 1、材料

[0034] 培养瓶、板, ELISA 检测板 (Costar, 美国); 实验仪器 : Gel Logic-200 凝胶成像系统 (美国 Kodak 公司), Mini 型垂直式蛋白质电泳系统、蛋白质转印系统 (美国 Bio-Rad 公司), TS100 型倒置荧光显微镜 (日本尼康公司), 多功能荧光酶标仪 (瑞士 Tecan 公司), 2MX-988B 全自动洗板机 (北京市天石医疗用品制作所), CR21GII 系列高速冷冻离心机 (日本日立公司)。

[0035] 2、试剂

[0036] 构建的重组质粒 pET-28a(+)-CRT 为本课题组所有; 应用构建的重组质粒通过原核表达系统制备小鼠 CRT 重组蛋白 (其氨基酸序列如 SEQ ID NO : 1 所示) (图 1 所示); 通过本发明所述制备方法, 免疫小鼠和兔, 分别制备了鼠源 CRT 单克隆抗体和兔源 CRT 多克隆抗体。

[0037] Streptavidin-HRP 和底物 TMB(Sigma, St Louis, MO, 美国); RPMI-1640 培养液 (Invitrogen 公司); 牛血清蛋白(BSA, 北京华美公司); 10×PBS 溶液(NaCl 80.0g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14.2g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.72g, KCl 2.0g 加双蒸水溶解并定容到 1000ml, 使用时稀释至 1×PBS, 调 pH 为 7.4); 山羊血清(Gibco 公司); 脱脂奶粉(内蒙古伊利实业集团股份有限公司); PEG4000(Amresco 公司)。

[0038] 试剂配制:

[0039] 封闭液为 1% BSA 液 +1% 山羊血清液; 制备方法: 氯化钠 8g, 氯化钾 0.2g, 磷酸氢二钠 1.44g, 磷酸二氢钾 0.27g, 10g BSA 粉末溶于 ddH<sub>2</sub>O 中, 调 pH 值为 7.4, 定容至 1L, 即为 1% BSA, 过滤分装保存于 -20℃。在封闭时加入山羊血清, 使之在封闭液的 1% 即可。

[0040] 样品稀释液为 1×PBS, 制备方法: 氯化钠 8g, 氯化钾 0.2g, 磷酸氢二钠 1.44g, 磷酸二氢钾 0.27g, 溶于 ddH<sub>2</sub>O 中, 调 pH 值为 7.4, 定容至 1L, 过滤, 4℃ 保存。

[0041] 洗涤液(PBST) 为含浓度为 0.05% 的 Tween-20 的 PBS, 制备方法为: 在 1L 1×PBS 中加入 Tween-20 500 μl, 4℃ 保存。

[0042] 终止液为 2M 的浓硫酸, 将 178.3ml 的蒸馏水逐滴加入 21.7ml 的浓硫酸(98%) 中。

[0043] 底物显色液包括 A 液和 B 液, 其中 A 液的制备过程为: 过氧化脲 1g, 磷酸氢二钠 35.8g, 柠檬酸 10.2g, Tween-20 100 μl, 将前三者加 ddH<sub>2</sub>O 避光溶解后加入 Tween-20 定容至 1L, 4℃ 避光保存; B 液的制备过程为 TMB 0.7g, 柠檬酸 10.3g, DMSO 40ml, 先用 DMSO 避光溶解前两者后加 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1L, 4℃ 避光保存; 使用前等体积混合 A 液和 B 液, 避光显色。

[0044] 实施例 1、CRT 单抗的制备与鉴定

[0045] 1、单抗的制备

[0046] 免疫 Balb/c 小鼠前, 先获得大约 100 μl 的血清 -20 度保存, 后以 50 μg 纯化的 CRT 抗原与弗氏完全佐剂混合制成乳剂, 经皮内背部多点注射进行免疫。1 个月后, 用 25 μg 的抗原加弗氏不完全佐剂经皮内注射进行加强免疫共 3 次, 每次间隔 2 周。经效价检测达标后, 将免疫获得的小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行细胞融合, 饲养层细胞为小鼠腹腔巨噬细胞, 融合试剂为 50% 的 PEG4000, 脾细胞和骨髓瘤细胞的比例为 5 : 1, 置于 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的 37℃ 温箱中培育, 第 3、6、9、10 日换入含 HAT 的完全 1640 培养液, 用有限稀释法将克隆分别稀释于 5 块 96 孔板中, 至杂交瘤细胞长好后吸取上清, 用 ELISA 检测上清抗体效价, 筛选出阳性杂交瘤细胞(即分泌单克隆抗体多, 且细胞生长状态好的杂交瘤细胞)。

[0047] 然后, 筛选出分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞。再经筛选获得的杂交瘤细胞株分泌, 纯化后得单克隆抗体。

[0048] 2、ELISA 法测定抗体效价

[0049] 使用碳酸盐缓冲液包被 CRT 抗原(浓度为 1 μg/ml、每孔 100 μl) 4℃ 包被 16h;

[0050] 使用 PBST 洗涤液洗涤 ELISA 板 1 次, 200 μl 封闭液(1% BSA 和 1% 山羊血清 PBS) 37℃ 封闭 1h;

[0051] CRT 抗体以 1/100、1/500、1/2500、1/12500、1/62500、1/312500、1/1562500 的五倍梯度稀释抗体作为一抗, 100 μl 加入 ELISA 板, 其中以 PBST 代替 CRT 抗体作为阴性对照。37℃ 孵育 1h 后, 使用 PBST 洗涤液洗涤 ELISA 板 3 次;

[0052] 加入 100 μl HRP 标记的羊抗鼠 IgG(1 : 3000) 作为二抗, 37℃ 孵育 1h 后, 同样洗

涤 3 次；

[0053] 100  $\mu$ l TMB 避光显色 15min；

[0054] 50  $\mu$ l 2mol/L  $H_2SO_4$  终止反应，在 450nm 波长酶标仪上测定吸光度值。

[0055] 将纯化的 CRT 蛋白包被 ELISA 板，纯化后单克隆抗体进行梯度稀释，经 ELISA 检测抗体具有很高的效价，单克隆抗体最高可达到 1 : 31 万倍，具有良好的量效关系（图 2A）。阴性对照孔 A 值为 0.116。

[0056] 3、单抗特异性鉴定

[0057] 收集生长至 80% -90% 的 Cos-7、A549 以及转染了 pcDNA3.1(+)-CRT $\Delta$  的细胞，用细胞裂解液冰上裂解 30 分钟，离心后获得上清加入 5 $\times$ SDS 凝胶上样缓冲液，100 $^{\circ}$ C 煮沸 5min，冰浴 4min，室温下离心 (12000 $\times$ g) 1min，取 20  $\mu$ l 进行 SDS-PAGE 电泳。SDS-PAGE 电泳后转移硝酸纤维素膜，用 5% 脱脂奶粉封闭，分别加入的一抗为 CRT 的单抗 (1 : 3000) 和  $\beta$ -Actin 抗体 (1 : 3000)，TBST 洗涤 3 次后，分别加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1 : 3000) 室温反应 1h，同上洗涤；ECL 显色。

[0058] 收集生长至 80% -90% 的 Cos-7、A549 以及转染了 pcDNA3.1(+)-CRT $\Delta$  的细胞裂解液，SDS-PAGE 电泳后转移硝酸纤维素膜，western blot 检测内源性 CRT 及重组 CRT 的表达，结果显示在  $\beta$ -actin 一致的条件下，可以检测到 36KD 的 CRT 及 30KD 的重组 CRT (rCRT)。提示 CRT 单克隆抗体具有良好的特异性（图 3）。

[0059] 实施例 2、CRT 多抗的制备与鉴定

[0060] 1、多抗制备

[0061] 先取得 5ml 左右注射抗原前免疫新西兰大白兔血清，后以 500  $\mu$ g CRT 抗原与弗氏完全佐剂混合制成乳剂，经皮内背部多点注射进行免疫。1 个月后，用 250  $\mu$ g 的抗原加弗氏不完全佐剂经皮内注射进行加强免疫共 3 次，每次间隔 2 周。测定效价后，颈动脉取血离心后收集血清经饱和硫酸铵沉淀法纯化后加等体积的甘油 -20 $^{\circ}$ C 保存。

[0062] 2、ELISA 法测定抗体效价

[0063] 使用碳酸盐缓冲液包被 CRT 抗原（浓度为 1  $\mu$ g/ml、每孔 100  $\mu$ l）4 $^{\circ}$ C 包被 16h；

[0064] 使用 PBST 洗涤液洗涤 ELISA 板 1 次，200  $\mu$ l 封闭液（1% BSA 和 1% 山羊血清 PBS）37 $^{\circ}$ C 封闭 1h；

[0065] CRT 多克隆抗体分别以 1/100、1/500、1/2500、1/12500、1/62500、1/312500、1/1562500 的 5 倍梯度稀释抗体作为一抗，100  $\mu$ l 加入 ELISA 板，其中以 PBST 代替 CRT 抗体作为阴性对照。37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 后，使用 PBST 洗涤液洗涤 ELISA 板 3 次；

[0066] 加入 100  $\mu$ l HRP 标记的羊抗兔 IgG (1 : 3000) 作为二抗，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 后，同样洗涤；

[0067] 100  $\mu$ l TMB 避光显色 15min；

[0068] 50  $\mu$ l 2mol/L  $H_2SO_4$  终止反应，在 450nm 波长的酶标仪上测定吸光度值。

[0069] 将纯化的 CRT 蛋白包被 ELISA 板，纯化后多克隆抗体进行梯度稀释，经 ELISA 检测抗体具有较高的效价，多克隆抗体最高可达到 1 : 31 万倍，具有良好的量效关系（图 2B）。阴性对照孔 A 值为 0.116。

[0070] 3、多抗特异性检测

[0071] 从 -80 度取出已构建好的重组质粒 pET28a(+)-CRT 转化到宿主菌 BL21 (DE3) 中，

经 IPTG (终浓度 1.0mmol/L) 诱导表达,收集的细菌加入 5×SDS 凝胶上样缓冲液,100℃煮沸 5min,冰浴 4min,室温下离心 (12000×g) 1min,取 20 μl 进行 SDS-PAGE 电泳。考马斯亮蓝染色,通过凝胶成像系统测定表达产量。Western blot 检测重组 pET28a(+)-CRT 蛋白,SDS-PAGE 电泳后转移硝酸纤维素膜,用 5%脱脂奶粉封闭,加入的一抗为 CRT 的多抗(1:5000),TBST 洗涤 3 次后加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:3000) 室温反应 1h,同上洗涤;ECL 显色。

[0072] 将重组质粒 pET28a(+)-CRT 质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞内,1.0mmol/L IPTG 诱导 4~6h 后,表达蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白转印到硝基纤维膜条。以 CRT 多抗为一抗,HRP 标记的羊抗鼠抗体为二抗,可以看到诱导后的菌液和纯化的 CRT 蛋白在约 32kD 处出现特异性的蛋白,未经诱导的菌液和阴性对照均无相应条带(图 4)。

### [0073] 实施例 3、建立双抗夹心 ELISA 检测法

#### [0074] 1、双抗夹心 ELISA 检测法的基本步骤

[0075] 用碳酸盐缓冲液(0.05MNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>, pH9.6) 包被 1:800CRT 单抗,每孔 100 μl 14℃包被 16h, PBST 洗涤 1 次;

[0076] 加入 200 μl 封闭液(1% BSA 和 1%山羊血清 PBS) 37℃封闭 1h,洗涤 1 次;

[0077] 加入 100 μl 11% BSA 稀释的 CRT 抗原(0.5 μg/ml, 100 μl/孔)37℃ 1h,由 PBST 洗涤 3 次;

[0078] 加入 100 μl CRT 多抗(4500×),37℃孵育 1h 后用 PBST 洗涤 3 次;

[0079] 加入 100 μl HRP 标记的羊抗兔抗体(3000×) 37℃孵育 1h,用 PBST 洗涤 3 次;

[0080] 100 μl/孔 A+B 显色液室温避光显色 15min;

[0081] 加入 50 μl/孔的 2mol/LH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应,在 450nm 波长酶标仪上测定吸光度值。

#### [0082] 2、方阵滴定法测定 CRT 蛋白含量

[0083] 本实验应用纯化的单克隆抗体作为包被抗体,多克隆抗体作为结合抗体,选择合适的 HRP-羊抗兔二抗浓度,用于测定 CRT 蛋白的含量。

[0084] 通过方阵滴定法的测定,当 CRT 浓度为 5ng/ml、OD 值为 1.0 时的单克隆抗体包被浓度及多抗结合浓度、羊抗兔-辣根过氧化物酶二抗浓度为最佳浓度。分别为单克隆抗体 800 倍稀释,多抗 4500 倍稀释,羊抗兔-HRP 二抗 3000 倍稀释,阴性对照 0.108 (见表 1)。

[0085] 表 1 方阵滴定法测定 CRT 蛋白含量

[0086]

HRP	Mab	Pab			
		500×	1500×	4500×	13500×
3000×	200×	3.031	2.169	1.643	0.596
	400×	2.887	1.779	1.181	0.603
	800×	2.813	1.869	1.025	0.556
	1600×	1.564	1.273	0.693	0.260
9000×	200×	1.703	1.066	0.606	0.324
	400×	1.611	0.989	0.658	0.339
	800×	1.533	1.000	0.607	0.319
	1600×	0.986	0.726	0.334	0.201

[0087] 3、ELISA 测定 CRT 的标准曲线建立

[0088] 将 CRT 蛋白用 1% BSA 精确稀释成 40、20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125ng/mL 的标准品,以 CRT 蛋白标准品的 OD 值为纵坐标,相应的浓度对数为横坐标,建立标准曲线(图 5),根据直线回归方程可计算出待测样品中的 CRT 蛋白含量。

[0089] 实施例 4、用本发明的试剂盒检测样品中 CRT 含量

[0090] 1、血清的收集与储存、使用

[0091] 49 例肿瘤患者血清(男 34,女 15)收集来源于三峡大学第一附属医院肿瘤科,53 例正常对照(男 33,女 20)来自于该医院体检科。肿瘤诊断标准是根据以往的临床诊断标准、放射及内窥镜检查,最后由病理检测确定,血清收集后放入 -80℃ 备用。在使用时,用 1×PBS5 倍稀释,通过 ELISA 方法测定血清中 CRT 含量。

[0092] 2、临床肿瘤病人血清 CRT 测定

[0093] 将临床样品在 4℃ 融化,用样品稀释液 5 倍稀释肺癌与正常人血清作为双抗夹心检测抗原,根据测定的 OD 值,应用标准曲线,计算各样品中 CRT 蛋白含量,乘以稀释倍数,得到样品的实际 CRT 蛋白含量(见图 6)。结果显示正常对照组血清 CRT 含量为  $7.728 \pm 1.613$ ,肺癌病人的为  $11.775 \pm 4.902$ 。采用 SPSS13.0 软件分析  $F=8.757, P=0.004$  有显著差异,具有统计学意义( $P < 0.01$ )。

[0094] 序列表

[0095] SEQUENCE LISTING

[0096] <110> 三峡大学

[0097] <120> 一种肿瘤标志物钙网蛋白检测试剂盒的制备及应用

[0098] <130>2013

[0099] <160>1

[0100] <170>PatentIn version3.3

[0101] <210>1

[0102] <211>253

[0103] <212>PRT  
 [0104] <213> 重组小鼠钙网蛋白  
 [0105] <400>1  
 [0106] Ser Lys His Lys Ser Asp Phe Gly Lys Phe Val Leu Ser Ser Gly Lys  
 [0107] 1 5 10 15  
 [0108] Phe Tyr Gly Asp Leu Glu Lys Asp Lys Gly Leu Gln Thr Ser Gln Asp  
 [0109] 20 25 30  
 [0110] Ala Arg Phe Tyr Ala Leu Ser Ala Lys Phe Glu Pro Phe Ser Asn Lys  
 [0111] 35 40 45  
 [0112] Gly Gln Thr Leu Val Val Gln Phe Thr Val Lys His Glu Gln Asn Ile  
 [0113] 50 55 60  
 [0114] Asp Cys Gly Gly Gly Tyr Val Lys Leu Phe Pro Ser Gly Leu Asp Gln  
 [0115] 65 70 75 80  
 [0116] Lys Asp Met His Gly Asp Ser Glu Tyr Asn Ile Met Phe Gly Pro Asp  
 [0117] 85 90 95  
 [0118] Ile Cys Gly Pro Gly Thr Lys Lys Val His Val Ile Phe Asn Tyr Lys  
 [0119] 100 105 110  
 [0120] Gly Lys Asn Val Leu Ile Asn Lys Asp Ile ATg Cys Lys Asp Asp Glu  
 [0121] 115 120 125  
 [0122] Phe ThT His Leu Tyr ThT Leu Ile Val ATg Pro Asp Asn ThT Tyr Glu  
 [0123] 130 135 140  
 [0124] Val Lys Ile Asp Asn Ser Gln Val Glu Ser Gly Ser Leu Glu Asp Asp  
 [0125] 145 150 155 160  
 [0126] Trp Asp Phe Leu Pro Pro Lys Lys Ile Lys Asp Pro Asp Ala Ala Lys  
 [0127] 165 170 175  
 [0128] Pro Glu Asp Trp Asp Glu Arg Ala Lys Ile Asp Asp Pro Thr Asp Ser  
 [0129] 180 185 190  
 [0130] Lys Pro Glu Asp Trp Asp Lys Pro Glu His Ile Pro Asp Pro Asp Ala  
 [0131] 195 200 205  
 [0132] Lys Lys Pro Glu Asp Trp Asp Glu Glu Met Asp Gly Glu Trp Glu Pro  
 [0133] 210 215 220  
 [0134] Pro Val Ile Gln Asn Pro Glu Tyr Lys Gly Glu Trp Lys Pro ATg Gln  
 [0135] 225 230 235 240  
 [0136] Ile Asp Asn Pro Asp Tyr Lys Gly Thr Trp Ile His Pro  
 [0137] 245 250

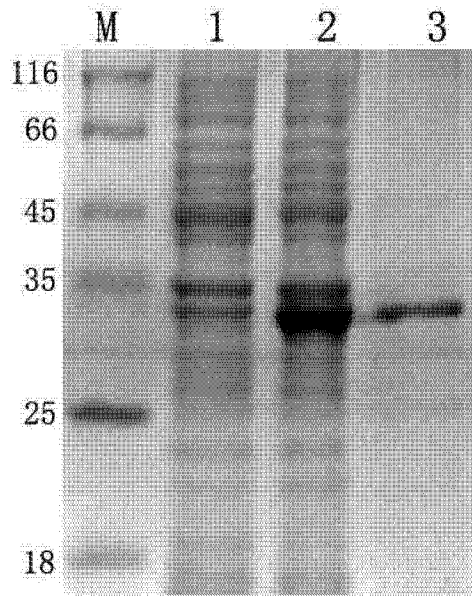


图 1

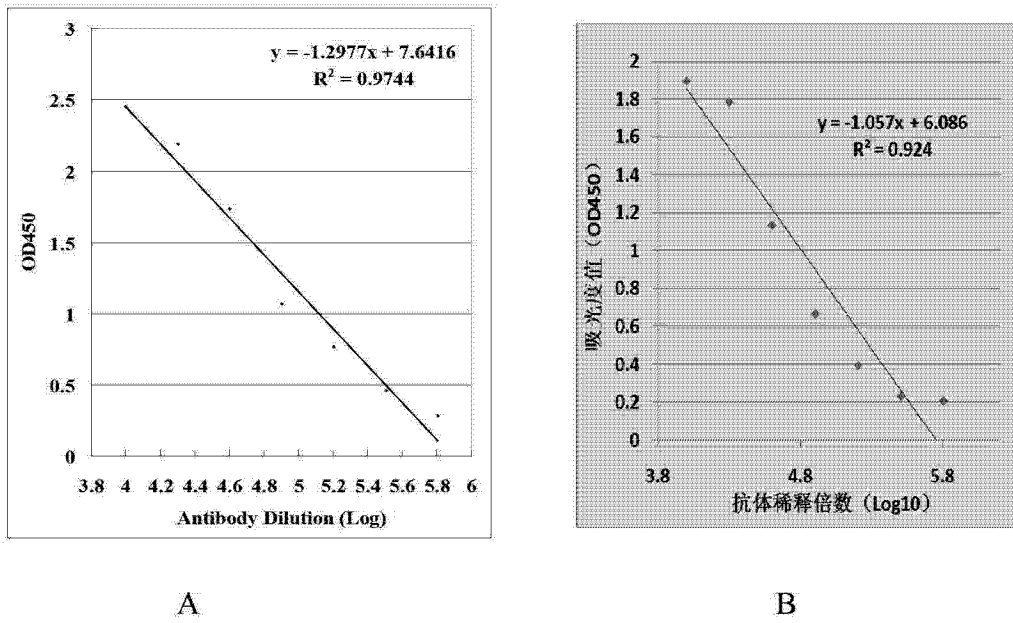


图 2

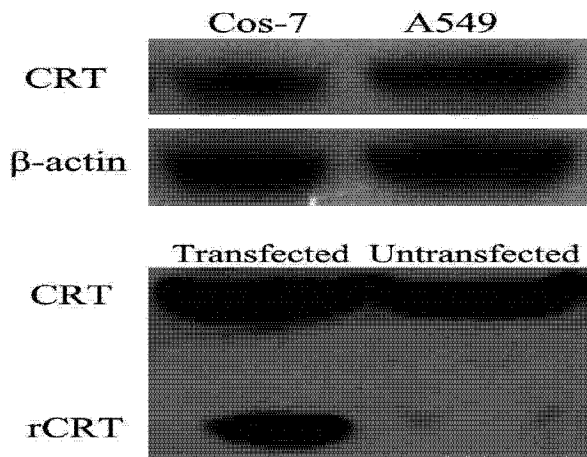


图 3

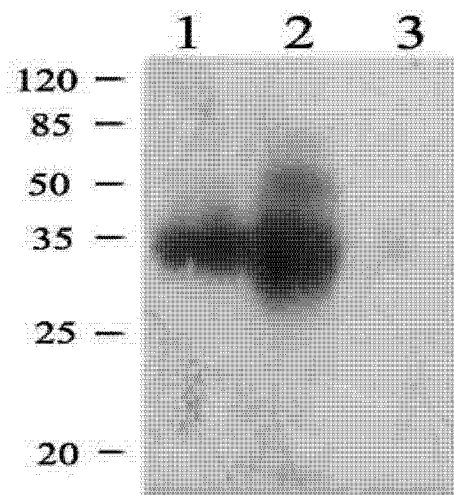


图 4

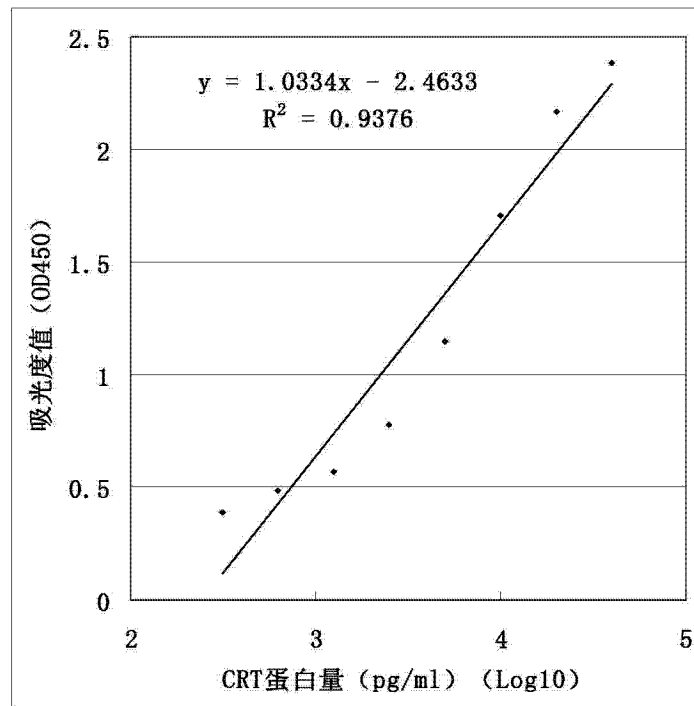


图 5

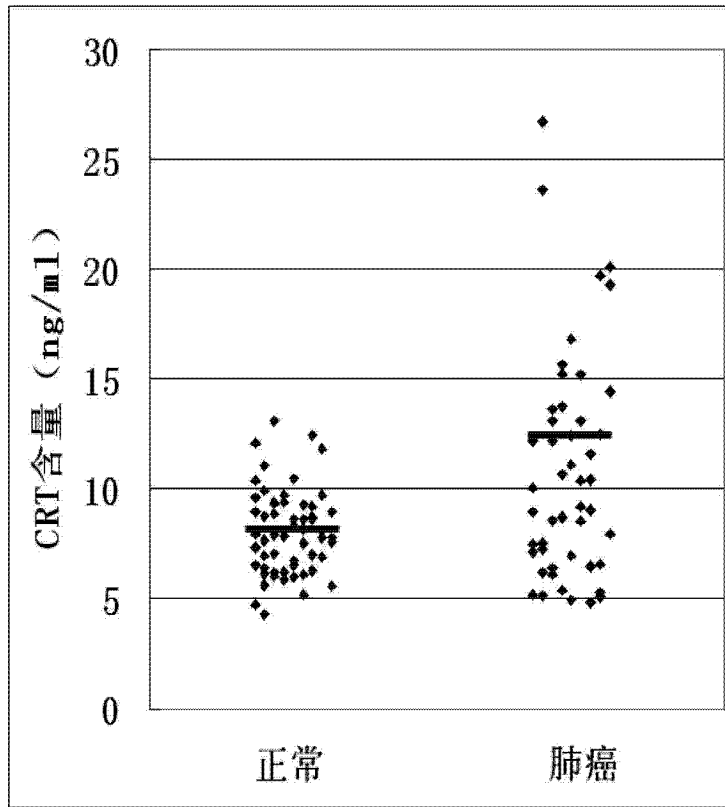


图 6

专利名称(译)	一种肿瘤标志物钙网蛋白检测试剂盒的制备及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN103091499B</a>	公开(公告)日	2015-07-08
申请号	CN201310025418.3	申请日	2013-01-23
[标]申请(专利权)人(译)	三峡大学		
申请(专利权)人(译)	三峡大学		
当前申请(专利权)人(译)	三峡大学		
[标]发明人	刘朝奇 吴薇 杨建林 汪龚泽		
发明人	刘朝奇 吴薇 杨建林 汪龚泽		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
代理人(译)	成钢		
审查员(译)	周洋		
其他公开文献	CN103091499A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

## 摘要(译)

一种肿瘤标志物钙网蛋白检测试剂盒的制备及应用，属于基因工程和临床诊断领域。本发明应用重组CRT蛋白免疫BALB/c小鼠和新西兰大白兔制备了CRT的单克隆抗体、多克隆抗体，并建立了检测CRT最低量为0.3125ng/ml，检测限为40-0.3125ng/ml的高特异性和敏感性的ELISA试剂盒。通过制备的ELISA试剂盒，对收集的临床样品进行检测，结果发现肺癌病人血清中的CRT明显高于正常对照血清，统计学有显著差异( $P < 0.01$ )，为临床肺癌病人的诊断提供实验方法。

