



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103926413 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 16

(21) 申请号 201410174349. 7

(22) 申请日 2014. 04. 28

(71) 申请人 刘红莉

地址 710000 陕西省西安市雁塔区含光路南
段 129 号一附院 2 号楼 1 单元 401 号

(72) 发明人 刘红莉

(74) 专利代理机构 北京市金栋律师事务所
11425

代理人 邢江峰

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

C07K 16/18(2006. 01)

C07K 14/47(2006. 01)

C12N 15/12(2006. 01)

C12N 15/70(2006. 01)

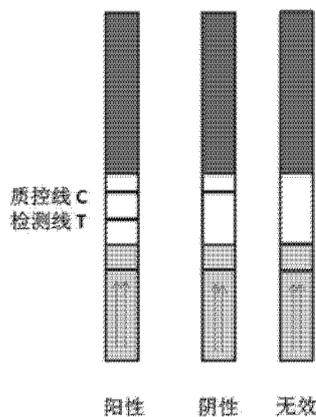
权利要求书3页 说明书15页 附图3页

(54) 发明名称

一种用尿液进行癌症快速检测的试剂条的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及医药领域, 尤其涉及一种用尿液进行癌症快速检测的试剂条的制备方法。本发明首先制备针对人 LRG1 蛋白的单克隆抗体, 筛选出与相应 LRG1 蛋白抗原具有高特异性结合的抗体; 然后利用免疫胶体金技术, 通过对尿液中 LRG1 分子的检测, 从而建立一种快速、简便、灵敏、特异的肝癌或其它恶性肿瘤检测试剂, 以期达到对肿瘤进行早期筛查的目的。



1. 人尿液中的 LRG1 在检测癌症中的用途。

2. 一种用于癌症快检试剂的单抗,其特征在于,用如下步骤制备而成:
利用基因重组技术,建立人 LRG1 蛋白表达系统;
提取重组 LRG1 蛋白,进行纯化;
用纯化的 LRG1 蛋白抗原免疫小鼠,利用杂交瘤技术筛选高表达 LRG1 抗体的细胞株;
高表达 LRG1 克隆细胞株经体外培养、小鼠腹腔注射克隆细胞株产生腹水,生产抗 LRG1 单克隆抗体;

对生产抗体进行纯化、效价检测及筛选。

3. 如权利要求 2 所述的一种用于癌症快检单抗,其特征在於,所述表达 LRG1 (leucine-rich-2-glycoprotein-1) 的基因序列为:GeneBank accession number:NP_443204。

4. 如权利要求 2 所述的一种用于癌症快检的单抗,其特征在於,所述产生和用于筛选单克隆抗体的氨基酸序列为:

SEQ ID NO. 1:

MSSWSRQRPKSPGGIQPHVSRTLFLLLLLLAASAWGVTLSPKDCQVFRSDHGSSISCPPEAIPGYLPADTVHL
AVEFFNLTHLPANLLQGASKLQELHLSSNGLESLSPEFLRPVQLRVLDLTRNALTG LPPGLFQASATLDTLV;

SEQ ID NO. 2:

LKENQLEVLEVSWLHGLKALGHLDLSGNRLRKLPPGLLANFTLLRDLGENQLETLPDLLRGPLQLERLHL
EGNKLQVLGKDLLLPQPDRLRYLFLNGNKLARVAAGAFQGLRQLDMLDLSNNSLASVPEGLWASLGQPNWD;

SEQ ID NO. 3:

MRDGFDISGNPWICDQNLSDLYRWLQAQKDKMFSQNDTRCAGPEAVKGGQTLAVAKSQ。

5. 一种癌症快速检测试剂条,其特征在於,用如下步骤制备而成:

(1) 人 LRG1 单克隆抗体的制备:

1) 构建人重组 LRG1 基因表达系统,建立人 LRG1 蛋白高表达系统,具体步骤如下:

①针对 LRG1 基因序列 (36-346aa),设计一对引物:

上游引物:CGGGATCCGTCACCCTGAGCCCCAAAGACTGC;

下游引物 CCGCTCGAGCTGGGACTTGGCCACTGCCAGGAGC;

②利用上述引物,进行 PCR 扩增,PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 (BPI);

③回收片段及载体 (pET-30a-GST BPI) 酶切 (BamH I, Xho I) 后,进行连接转化 BL21 感受态细胞;

④目的蛋白的小量表达:挑选转化的克隆细胞,利用 IPTG (0.5mM) 诱导蛋白表达,表达蛋白进行电泳 (12% SDS-PAGE) 检测;

⑤测序:选取小量表达分子量正确的克隆进行测序,LRG1 (36-347aa)-1 测序,结果显示氨基酸序列正确;

⑥LRG1 目的蛋白大量表达:挑选测序正确的菌株,进行大量培养,利用 IPTG (0.5mM) 诱导后收获细菌,超声破菌,电泳确定表达;

2) 抗原的制备:提取人重组表达 LRG1 的蛋白,按照以下方法进行纯化:

① 20 ~ 30ml 10mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液重悬超声离心得到的沉淀,静置 10min;

② 12000rpm,离心 10min,上清转入另一管中保存;

③ 20 ~ 30ml 10mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液重悬沉淀, 静置 10min;

④ 12000rpm, 离心 10min, 弃上清;

⑤ 重复 (3)、(4) 一次;

⑥ 先加入少量的 10mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液重悬沉淀, 再加 5 ~ 10ml 含 8M 尿素的 10mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液溶解蛋白;

⑦ 12000rpm, 离心 10min, 收集上清, 取 50 μ l 电泳;

3) 单克隆抗体的制备: 纯化的 LRG1 蛋白抗原免疫 SPF 级小鼠; 分离小鼠脾细胞, 与骨髓瘤细胞 (myeloma cells) 融合, 产生杂交瘤细胞 (hybridoma cells), 筛选高表达 LRG1 抗体的克隆细胞株; 用高表达 LRG1 克隆细胞株体外培养、小鼠腹腔注射克隆细胞产生腹水 (ascites) 生产单克隆抗体;

4) 抗体纯化、检测及筛选: 利用 Protein A/G 亲和层析纯化抗体, 步骤如下:

① 样品预处理: 用相应的偶联缓冲液以 1:3 稀释腹水, 10000rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 20min, 0.22 μ m 滤膜过滤;

② 平衡: 用 5-10 倍柱体积的相应偶联缓冲液平衡预装亲和柱, 保持流速为 4s;

③ 上样: 用注射器把样品注入柱子上端接口, 收集流出液于 50ml 离心管中, 保持流速为 5s/滴;

④ 洗杂: 用 5 倍柱体积的偶联缓冲液过柱, 保持流速为 4s/滴;

⑤ 中和: 根据中和液调试结果, 按量分别加入中和液;

⑥ 洗脱: 用 5 倍柱体积洗脱缓冲液洗脱抗体, 收集于 EP 管中;

5) 抗体纯化后, 用 ELISA 和 western blot 法检测单克隆抗体的效价、抗体的特异性、抗体亚型; 筛选出与重组蛋白具有高特异性结合的单克隆抗体, 进一步用做包被抗体及标记抗体。

6. 一种癌症快速检测单克隆抗体试剂条的制备方法, 其特征在于, 制备方法包含如下步骤:

(1) 人 LRG1 单克隆抗体的制备: 利用基因重组技术, 建立人 LRG1 蛋白表达系统; 提取重组 LRG1 蛋白, 进行纯化; 用纯化的 LRG1 蛋白抗原免疫小鼠, 利用杂交瘤技术筛选高表达 LRG1 抗体的细胞株; 高表达 LRG1 克隆细胞株体外培养、小鼠腹腔注射克隆细胞株产生腹水, 生产单克隆抗体; 对生产抗体进行纯化、效价检测及与抗原特异性结合的筛选;

(2) 基于胶体金技术的癌症检测试剂条的制备: 胶体金溶液的制备和抗体标记: 利用氯金酸-还原法制备胶体金颗粒, 进行抗体标记; 胶体金层析检测试剂条的制备: 筛选 NC 硝酸纤维膜及辅料, 包括上样垫、胶体金垫、吸样垫; 进行胶体金垫的制备、抗体包被与 NC 膜的处理; 将 NC 膜、胶体金垫、上样垫和吸样垫粘贴于专用的 PVC 胶板上, 进行检测试剂条的组装、质量的初步鉴定; 然后将合格半成品进行切割、包装。

7. 如权利要求 6 所述的一种癌症快速检测单克隆抗体试剂条的制备方法, 其特征在于, 所述步骤基于胶体金技术的肿瘤检测试剂条的制备是指:

(1) 胶体金的制备和抗体标记:

1) 胶体金溶液的制备: 胶体金溶液按照氯金酸-还原法制备; 要求胶体金颗粒为 30 ~ 40nm, 纯度大于 95% 以上; 用 0.1mol/L K_2CO_3 或 0.1mol/L HCl 调节胶体金溶液的 pH 值至 8.2;

2) 胶体金与待标记抗体比例的确定 :将待标记抗体用 0.05mol/L, pH9.0 硼酸盐缓冲液系列稀释为 5 ~ 50mg/ml, 分别加入胶体金溶液中 ;5min 后, 分别加入 0.1ml10% NaCl 溶液, 混匀静置 2h, 观察结果 ;其中含蛋白质最低的试管即为稳定胶体金所需的抗体质量, 在此基础上再加 10% -20%, 即为待标记抗体的实际用量 ;

3) 标记胶体金结合抗体 :分别取所需量的胶体金和相应的抗体蛋白, 用 0.1mol/L K_2CO_3 调节 pH 值至 9.0 ;搅拌下将胶体金溶液和抗体蛋白液混合 ;10min 后, 加入 5% BSA 使其终浓度为 1% 以防止抗体蛋白和胶体金的聚合和发生沉淀 ;胶体金 - 蛋白质应用液的 OD520nm 值应为 0.2-0.4 ;

(2) 胶体金层析试剂条的制备

1) NC 硝酸纤维膜及辅料的筛选 :制备不同厂家的 NC 膜小样, 进行筛选 ;并选择合适的上样垫、胶体金垫、吸样垫辅料 ;

2) 胶体金垫制备 :将标记好的胶体金用胶体稀释液配成 5% ~ 20% 的溶液, 滴加或用专用的喷金仪喷到胶体金垫上, 干燥后保存备用 ;

3) 抗体包被与 NC 膜的处理 :用专用的喷膜仪将抗体蛋白喷到 NC 膜上, 干燥, 使抗原牢固结合在 NC 膜上 ;用含有 BSA、酪蛋白封闭剂的溶液进行封闭, 再干燥保存备用 ;抗体的包被浓度约为 0.5 ~ 2mg/ml, 包被稀释液采用 PBS 或其他低浓度的缓冲液, 需加入乙醇、糖或 BSA, 以调节抗体在膜上的扩散性和稳定性 ;

4) 试剂组装 :将 NC 膜、胶体金垫、上样垫和吸样垫粘贴于专用的 PVC 胶板上, 制成母卡, 进行半成品质量检定 ;半成品检定合格后, 将母卡切割成试剂条, 进行成品质量检定, 然后将试条装入专用塑料盒内, 密封包装, 形成成品 (见图 1-2)。

8. 一种癌症快速检测单克隆抗体试剂条, 其特征在于, 包含 PVC 胶板, 所述 PVC 胶板依次分布着 :滴样区、胶体金垫检测区、NC 膜显示区、吸样垫区。

胶体金垫检测区包含所述胶体金结合抗体, 其制备方法如下 :

1) 胶体金溶液的制备 :胶体金溶液按照氯金酸 - 还原法制备 ;要求胶体金颗粒为 30 ~ 40nm, 纯度大于 95% 以上 ;用 0.1mol/L K_2CO_3 或 0.1mol/L HCl 调节胶体金溶液的 pH 值至 8.2 ;

2) 胶体金与待标记抗体比例的确定 :将待标记抗体用 0.05mol/L, pH9.0 硼酸盐缓冲液系列稀释为 5 ~ 50mg/ml, 分别加入胶体金溶液中 ;5min 后, 分别加入 0.1ml10% NaCl 溶液, 混匀静置 2h, 观察结果 ;其中含蛋白质最低的试管即为稳定胶体金所需的抗体质量, 在此基础上再加 10% -20%, 即为待标记抗体的实际用量 ;

3) 标记胶体金结合抗体 :分别取所需量的胶体金和相应的抗体蛋白, 用 0.1mol/L K_2CO_3 调节 pH 值至 9.0 ;搅拌下将胶体金溶液和抗体蛋白液混合 ;10min 后, 加入 5% BSA 使其终浓度为 1% 以防止抗体蛋白和胶体金的聚合和发生沉淀 ;胶体金 - 蛋白质应用液的 OD520nm 值应为 0.2-0.4。

一种用尿液进行癌症快速检测的试剂条的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医药领域,尤其涉及一种用尿液进行癌症快速检测的试剂条的制备方法。

背景技术

[0002] 本发明属于临床肿瘤诊断技术领域,具体涉及到一种新的用于肝癌或其他肿瘤检测的尿液分子及其快速检测方法。

[0003] 随着全球城市化、工业化、老龄化进程的加剧,加之生存环境的污染、各种不良生活方式、职业暴露、生物物理和遗传因素的影响,全世界恶性肿瘤的发病率和死亡率呈逐年上升的趋势,我国也不例外,恶性肿瘤已成为严重危害人类生命健康的重要疾病之一。流行病学调查数据显示,我国恶性肿瘤死亡率属于世界较高水平,我国恶性肿瘤死亡率已上升为居民死因顺位的第一位,而且与生态环境、生活方式相关的肿瘤呈现持续性增长势头。目前关于肿瘤发生的原因并未完全阐明,故而缺乏有效的预防手段。因此,如能在肿瘤发生的早期进行检测和诊断,其治疗的成功率则会大大提高。

[0004] 目前,肿瘤的临床诊断主要依据于患者的临床表现、各种影像学检查和实验室检测技术。但是,临床上很多癌症患者在早期并无明显的症状,发现时往往已到了晚期,比如肝癌和卵巢癌,在早期基本上无任何症状。各种影像学检测技术,如 X 线、B 超、CT、磁共振,作为重要的肿瘤辅助诊断手段,通常也不能发现较小的早期肿瘤,而且需要特殊昂贵的仪器投入,因而在应用上存在一定的局限性,尤其是不适用于大范围的肿瘤筛查以及在基层单位或者经济不发达的偏远地区使用。

[0005] 由于肿瘤细胞在异常的生长增殖过程中,可能分泌或脱落一些特殊的物质到体液或组织中,或者宿主对体内新生物反应而产生一些物质进入到体液或组织中,这些物质即可能成为肿瘤标志物(tumor marker)。人们可通过在临床实验室检测这些物质的存在或含量的变化,用于肿瘤的辅助诊断、治疗指导、肿瘤复发或转移的监测、疗效和预后的判断。这些实验室检测,包括对血液/体液肿瘤标志物的检测以及病理学检测技术。但是,目前肿瘤的实验室检测技术还存在各种各样的缺陷和操作上的困难,因而在实际应用中还达不到早期筛查、早期检测以及早期治疗肿瘤的目的。肿瘤组织的病理学检查,是确诊肿瘤的可靠方法,但需要进行组织穿刺或组织活检,属于“侵入式”检查且临床操作较为复杂,显然不适用于大范围的肿瘤早期筛查。对大多数肿瘤而言,目前还缺乏特异性好、敏感度高的血液/体液肿瘤诊断标志物用于肿瘤的实验室检测、早期筛查或临床诊断,比如原发性肝细胞癌(肝癌,HCC)。

[0006] 流行病学调查显示,肝癌的全球发病率呈逐年上升的趋势,死亡率接近 60 万/年,位居肿瘤相关死亡的第 3 位。我国是肝癌高发区,发病人数约占全球的 55%,死亡率为 30 万/年,在肿瘤相关死亡中仅次于肺癌。在亚洲和非洲的一些国家和地区,肝癌主要与肝炎病毒感染有关,如 HBV、HCV 的慢性感染;在肝炎发病率低的国家,肝癌主要源于其它器官肿瘤的转移,如直肠癌的肝转移。目前实验室检测和诊断肝癌的主要标志物为血清 AFP(A1pha

Fetal Protein, 甲胎蛋白), 其在临床应用中还存在很多缺陷, 如诊断不够早期; 检测特异性不高, 检测结果存在一定的假阳性, 如妊娠、恶性生殖系统的胚胎肿瘤、胆道疾病以及其他一些疾病, AFP 也会升高; 检测方法较为复杂, 如放射免疫法存在放射性污染, 化学发光免疫分析法需要特殊的仪器设备。如果能对肝癌高危人群进行及早筛查和早期确诊, 及时实施相应的治疗手段, 如放化疗、手术或者肝脏移植, 则有可能对小的、分化度较好或者生长速度较慢的肿瘤达到较好的治疗效果。但事实是几乎没有早期确诊的患者, 发现时往往已到了肝癌晚期, 对此各种治疗手段都可能无济于事。不能够早期诊断是肝癌死亡率居高不下的重要原因。因而, 研究发现更好的肝癌诊断标志物, 建立简便易行的肝癌的检测方法, 是世界范围内研究的热点和难点。

[0007] 国内外学者为寻找肝癌诊断、预后判断的标志物, 利用各种高通量的“组学”技术, 发现了一些潜在的肝癌标志物, 如磷脂酰肌醇蛋白聚糖 (glypican, GPC)、高尔基蛋白-73 (golgi protein, GP-73)、miR-151、miR-26; 或者利用标志物组合, 如 CD151 和 c-Met、细胞角蛋白 10 和 19、包含十几到几十个分子标签的组合或者 miRNA 指纹。但这些标志物多来源于各个科研机构的独立报道, 其临床应用价值尚需进一步验证, 且这些检测的技术复杂、成本较高, 需要使用组织或血液样品, 属于“侵入性”取材, 应用于临床具有一定的局限性以及有待时日。

[0008] 随着分子生物学技术的发展, 人们有可能从分子水平不断研究和发现有价值的肝癌及其他肿瘤标志物, 发展成为简便易行的检测方法, 用于肝癌或其他肿瘤的实验室早期检测、筛查、预测, 从而达到肿瘤的早发现、早治疗、以及预后改善的目的。

[0009] 理想的肿瘤标志物应具有敏感性和特异性高的特点, 能够早期检测; 作为筛查的检测试剂或方法应当具有简便易行、取样取材方便特点, 适宜于在基层医疗机构操作和用于大范围的肿瘤筛查检测。近年来, 利用体液样品对患者脱落细胞及其相关的代谢产物、分泌蛋白进行检测, 成为较为简便和可靠的肿瘤诊断方式。比如, 通过对唾液样品进行细胞病理学分析, 对分泌的生长因子和其他分子进行检测, 用于肺癌、唾液腺癌的诊断; 对粪便里的脱落细胞的遗传和表观遗传学基因改变的检测, 用于直肠、结肠癌的诊断; 对尿液里分泌的代谢产物和大分子物质的检测, 同样有可能作为前列腺癌、肾癌和膀胱癌诊断的标志物。

[0010] 肝脏作为人体重要的代谢器官, 参与糖、蛋白质、脂类、维生素的代谢以及激素的灭活; 参与胆汁生成和排泄, 具有解毒、凝血、免疫防御、调节血容量功能。肝脏病变可直接或间接影响到机体各种生物分子的代谢水平, 癌变细胞的生长增殖、黏附侵袭、血管生成相关分子的表达和代谢异常。前期研究中, 我们已经发现这种异常代谢产物可特异地存在于尿液中, 并可通过相关的免疫学检测方法检测出来。我们利用蛋白质电泳结合质谱分析技术, 筛选出肝癌患者与正常尿样差异表达分子并利用免疫分析技术对鉴定出的分子进行了验证, 发现尿液中人富含亮氨酸-糖蛋白 (leucine-rich-2-glycoprotein-1:LRG1, Gene Bank accession number:NP_443204) 的表达具有肿瘤相关分子的特性, 可作为肝癌或其他肿瘤检测、诊断或预后判断的敏感性标志分子。因此, 我们拟建立简便易行的方法, 对此分子进行检测, 达到早期检测 / 诊断肝癌的目的。

[0011] 免疫胶体金技术是上世纪 80 年代末 90 年代初发展起来的、以胶体金作为示踪标志物应用于抗原抗体反应的一种简便、快速、准确的新型免疫学检测技术。胶体金是由氯金酸 (HAuCl₄) 在还原剂如白磷、抗坏血酸、枸橼酸钠、鞣酸作用下, 聚合成为特定大小的金颗粒

粒,并由于静电作用成为一种稳定的胶体状态。胶体金在弱碱环境下带负电荷,可与蛋白质分子的正电荷基团形成牢固的结合,由于这种结合是静电结合,所以不影响蛋白质的生物特性。胶体金除了与蛋白质结合以外,还可以与许多其它生物大分子结合,如 SPA、PHA、ConA。根据胶体金的一些物理性状,如高电子密度、颗粒大小、形状及颜色反应,加上结合物的免疫和生物学特性,因而使胶体金广泛地应用于免疫学、组织学、病理学和细胞生物学领域。该技术由于操作简便,不依赖于仪器设备以及操作者的技术水平;操作步骤简捷,整个反应过程约在 5-15 分钟内就可以完成;检测需要的样品量少,检测方法更为敏感和准确,问世以来已在临床实验室广泛采用。因而,采用此技术建立肿瘤检测和临床诊断的分析方法,具有快速、简便、特异的特点,有助于肿瘤的大范围筛查检测和基层应用。

发明内容

[0012] 发明目的:在此,我们拟采用免疫胶体金技术对尿液中的 LRG1 分子进行检测,发展一种快速、简便、灵敏、特异的肝癌或其它肿瘤的检测试剂,以期达到从尿液中方便地进行肝癌或其它肿瘤筛查和检测的目的。

[0013] 为了达到如上目的,本发明采取如下技术方案:

[0014] 方案 1:

[0015] 人尿液中的 LRG1 在检测癌症中的用途。

[0016] 方案 2:

[0017] 一种用于癌症检测的单克隆抗体,其特征在於,用如下步骤制备而成:

[0018] 利用基因重组技术,建立人 LRG1 蛋白表达系统;

[0019] 提取重组 LRG1 蛋白,进行纯化;

[0020] 用纯化的 LRG1 蛋白抗原免疫小鼠,利用杂交瘤技术筛选高表达 LRG1 抗体的细胞株;

[0021] 高表达 LRG1 克隆细胞株体外培养、小鼠腹腔注射克隆细胞株产生腹水,生产单克隆抗体;

[0022] 对生产抗体进行纯化、效价检测及筛选。

[0023] 本发明进一步技术方案在于,所述表达人 LRG1 (leucine-rich-2-glycoprotein-1) 的基因序列为 GeneBank accession number:NP_443204。

[0024] 一种用于癌症快速检测的人 LRG1 单克隆抗体,其特征在於,所述产生和用于筛选单克隆抗体的氨基酸序列为:

[0025] SEQ ID NO. 1:

[0026] MSSWSRQRPKSPGGIQPHVSRTLFLLLLLAASAWGVTLSPKDCQVFRSDHGSSISQCPPAE
IPGYLPADTVHLAVEFFNLTHLPANLLQGASKLQELHLSSNGLESLSPEFLRPVPPQLRVLDLTRNALTG
LPPGLFQASATLDTLV;

[0027] SEQ ID NO. 2:

[0028] LKENQLEVLEVSWLHGLKALGHLDLSGNRLRKLPPGLLANFTLLRTLDLGENQLETLPDLLRGPLQLE
RLHLEGNKLQVLGKDLLLPQDLRYLFLNGNKLARVAAGAFQGLRQLDMLDLSNNSLASVPEGLWASLGQPNWD;

[0029] SEQ ID NO. 3:

[0030] MRDGFDISGNPWICDQNLSDLYRWLQAQKDKMFSQNDTRCAGPEAVKGQTLLAVAKSQ。

- [0031] 本发明进一步技术方案在于,用如下步骤制备而成:
- [0032] 人 LRG1 单克隆抗体的制备:
- [0033] 1. 人重组 LRG1 基因表达系统的建立:构建人 LRG1 基因表达系统,建立人 LRG1 蛋白高表达系统,具体步骤如下:
- [0034] (1) 针对 LRG1 基因序列 (36-346aa),设计一对引物:
- [0035] 上游引物:CGGGATCCGTCACCCCTGAGCCCCAAAGACTGC;
- [0036] 下游引物:CCGCTCGAGCTGGGACTTGGCCACTGCCAGGAGC。
- [0037] (2) 利用上述引物,进行 PCR 扩增,PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 (BPI);
- [0038] (3) 回收片段及载体 (pET-30a-GST BPI) 酶切 (BamH I, Xho I) 后,进行连接转化 BL21 感受态细胞;
- [0039] (4) 目的蛋白的小量表达:挑选转化的克隆细胞,利用 IPTG (0.5mM) 诱导蛋白表达,表达蛋白进行电泳 (12% SDS-PAGE) 检测;
- [0040] (5) 测序:选取小量表达分子量正确的克隆进行测序,LRG1 (36-347aa)-1 测序,结果显示氨基酸序列正确;
- [0041] (6) 目的蛋白大量表达:挑选测序正确的菌株,进行大量培养,利用 IPTG (0.5mM) 诱导后收获细菌,超声破菌,电泳确定表达。
- [0042] 2. 抗原的制备:提取人重组表达 LRG1 的蛋白,按照以下方法进行纯化:
- [0043] (1) 20 ~ 30ml 10mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液重悬超声离心得到的沉淀,静置 10min;
- [0044] (2) 12000rpm,离心 10min,上清转入另一管中保存;
- [0045] (3) 20 ~ 30ml 10mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液重悬沉淀,静置 10min;
- [0046] (4) 12000rpm,离心 10min,弃上清;
- [0047] (5) 重复 (3)、(4) 一次;
- [0048] (6) 先加入少量的 10mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液重悬沉淀,再加 5 ~ 10ml 含 8M 尿素的 10mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液溶解蛋白;
- [0049] (7) 12000rpm,离心 10min,收集上清,取 50 μ l 电泳;
- [0050] 3. 单克隆抗体的制备:纯化的 LRG1 蛋白抗原免疫 SPF 级小鼠;分离小鼠脾细胞,与骨髓瘤细胞 (myeloma cells) 融合,产生杂交瘤细胞 (hybridoma cells),筛选高表达 LRG1 抗体的克隆细胞株;用高表达 LRG1 克隆细胞株体小鼠腹腔注射克隆细胞株产生腹水 (ascites) 生产单克隆抗体。
- [0051] 4. 抗体纯化、检测及筛选:利用 Protein A/G 亲和层析纯化技术纯化抗体,步骤如下:
- [0052] (1) 样品预处理:用相应的偶联缓冲液以 1:3 稀释腹水,10000rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 20min,0.22 μ m 滤膜过滤。
- [0053] (2) 平衡:用 5-10 倍柱体积的相应偶联缓冲液平衡预装亲和柱,保持流速为 4s;
- [0054] (3) 上样:用注射器把样品注入柱子上端接口,收集流出液,保持流速为 5s/滴;
- [0055] (4) 洗杂:用 5 倍柱体积的偶联缓冲液过柱,保持流速为 4s/滴;
- [0056] (5) 中和:根据中和液调试结果,按量分别加入中和液;
- [0057] (6) 洗脱:用 5 倍柱体积洗脱缓冲液洗脱抗体,收集于 EP 管中。

[0058] (7) 抗体纯化后,用 ELISA 和 western blot 方法检测单克隆抗体的效价、抗体的特异性、抗体亚型;筛选出与重组蛋白具有特异性结合的单克隆抗体,进一步用做包被抗体及标记抗体。

[0059] 方案 3:

[0060] 一种癌症快速检测单抗试剂条的制备方法,其特征在于,制备方法包含如下步骤:

[0061] 1) 人 LRG1 单克隆抗体的制备:利用基因重组技术,建立人 LRG1 蛋白表达系统;提取重组 LRG1 蛋白,进行纯化;用纯化的 LRG1 蛋白抗原免疫小鼠,利用杂交瘤技术筛选高表达 LRG1 抗体的细胞株;高表达 LRG1 克隆细胞株体外培养或小鼠腹腔注射克隆细胞株产生腹水,生产单克隆抗体;对生产抗体进行纯化、效价检测及筛选。

[0062] 2) 基于胶体金技术的肿瘤检测试剂条的制备:胶体金溶液的制备和抗体标记:利用氯金酸-还原法制备胶体金颗粒,进行抗体标记;胶体金层析检测试剂条的制备:筛选 NC 硝酸纤维膜及辅料,包括上样垫、胶体金垫、吸样垫;进行胶体金垫的制备、抗体包被与 NC 膜的处理;将 NC 膜、胶体金垫、上样垫和吸样垫粘贴于专用的 PVC 胶板上,进行检测试剂条的组装、质量的初步鉴定;然后将合格半成品进行切割、包装。

[0063] 本发明进一步技术方案在于,所述步骤基于胶体金技术的肿瘤检测试剂条的制备是主要指胶体金的制备、抗体标记以及胶体金层析试剂条的制备:

[0064] 胶体金溶液的制备:胶体金溶液按照氯金酸-还原法制备;要求胶体金颗粒为 30 ~ 40nm,纯度大于 95% 以上;用 0.1mol/L K_2CO_3 或 0.1mol/L HCl 调节胶体金溶液的 pH 值至 8.2。

[0065] 胶体金与待标记抗体比例的确定:将待标记抗体用 0.05mol/L, pH9.0 硼酸盐缓冲液系列稀释为 5 ~ 50mg/ml,分别加入胶体金溶液中;5min 后,分别加入 0.1ml10% NaCl 溶液,混匀静置 2h,观察结果;其中含蛋白质最低的试管即为稳定胶体金所需的抗体质量,在此基础上再加 10% -20%,即为待标记抗体的实际用量。

[0066] 标记胶体金结合抗体:分别取所需量的胶体金和相应的抗体蛋白,用 0.1mol/L K_2CO_3 调节 pH 值至 9.0;搅拌下将胶体金溶液和抗体蛋白液混合;10min 后,加入 5% BSA 使其终浓度为 1% 以防止抗体蛋白和胶体金的聚合和发生沉淀;胶体金-蛋白质应用液的 OD520nm 值应为 0.2-0.4。

[0067] 胶体金层析试剂条的制备

[0068] NC 硝酸纤维膜及辅料的筛选:制备不同厂家的 NC 膜,进行筛选;并选择合适的上样垫、胶体金垫、吸样垫辅料。

[0069] 胶体金垫制备:将标记好的胶体金用胶体稀释液配成 5% ~ 20% 的溶液(含有 BSA 封闭剂、表面活性剂、糖类物质等稳定剂),滴加或用专用的喷金仪喷到胶体金垫上,干燥后保存备用。

[0070] 抗体包被与 NC 膜的处理:用专用的喷膜仪将抗体蛋白喷到 NC 膜上,干燥,使抗原牢固结合在 NC 膜上;用含有 BSA、酪蛋白或其他封闭剂的溶液进行封闭,再干燥保存备用,抗体的包被浓度约为 0.5 ~ 2mg/ml,包被稀释液采用 PBS 或其他低浓度的缓冲液。

[0071] 试剂组装:将 NC 膜、胶体金垫、上样垫和吸样垫粘贴于专用的 PVC 胶板上,制成母卡,进行半成品质量检定;半成品检定合格后,将母卡切割成试剂条,进行成品质量检定,然

后将试条装入专用塑料盒内,密封包装,形成成品(见图 1-2)。

[0072] 方案 4:

[0073] 一种癌症快速检测单克隆抗体试剂条,其特征在于,包含 PVC 胶板,所述 PVC 胶板依次分布着:滴样区、胶体金垫检测区、NC 膜显示区、吸样垫区;胶体金垫检测区包含所述胶体金结合抗体,其制备方法如下:

[0074] 胶体金溶液的制备:胶体金溶液按照氯金酸-还原法制备;要求胶体金颗粒为 30~40nm,纯度大于 95%以上;用 0.1mol/L K_2CO_3 或 0.1mol/L HCl 调节胶体金溶液的 pH 值至 8.2;胶体金与待标记抗体比例的确定:将待标记抗体用 0.05mol/L, pH9.0 硼酸盐缓冲液系列稀释为 5~50mg/ml,分别加入胶体金溶液中;5min 后,分别加入 0.1ml10% NaCl 溶液,混匀静置 2h,观察结果;其中含蛋白质最低的试管即为稳定胶体金所需的抗体质量,在此基础上再加 10%-20%,即为待标记抗体的实际用量;标记胶体金结合抗体:分别取所需量的胶体金和相应的抗体蛋白,用 0.1mol/L K_2CO_3 调节 pH 值至 9.0;搅拌下将胶体金溶液和抗体蛋白液混合;10min 后,加入 5% BSA 使其终浓度为 1%以防止抗体蛋白和胶体金的聚合和发生沉淀;胶体金-蛋白质应用液的 OD520nm 值应为 0.2-0.4。

[0075] 采用如上数种方案的本发明,具有如下有益效果:

[0076] 该项检测方法利用我们前期的研究结果,即在肿瘤患者尿液中鉴定出的肿瘤相关分子人 LRG1 作为检测对象,通过制备、筛选相应的抗 LRG1 单克隆抗体,建立了免疫胶体金快速检测肿瘤试剂条。

[0077] 通过对照临床相关肿瘤样本的检测,检测包括了健康对照者 50 例、临床确诊肝癌患者 92 例(其中未治疗者 39 例,进行介入、手术治疗者 53 例)、其他各种肿瘤患者 271 例。收集这些被检测者的尿样,用制备的试剂条进行检测;对检测结果的重复性、检测的稳定性、灵敏度进行分析。

[0078] 检测结果发现:与健康对照相比较,该检测方法对原发性肝癌检测的敏感度可达到 85%以上,特异性可达到 90%;检测结果的重复性达到 98.9%以上;样本冷藏(4℃)保存稳定七天以上,无明显降解。所以该项检测技术可用于从尿样中进行肝癌的检测,或者用于基层肝癌的筛查。

[0079] 我们的结果还发现,该技术对于其他恶性肿瘤以及转移癌也具有一定的检出率,比如乳腺癌、肺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、食道癌、甲状腺癌、肾癌肾盂肿瘤、前列腺癌、胃癌、肠癌、卵巢癌、输卵管癌、贲门癌、胰腺癌、转移性肝癌、肺癌骨转移、脑转移癌。这些结果显示,该检测结果阳性可提示受试者可能患有上述恶性肿瘤。故而该项检测技术还可用于除肝癌外其他恶性肿瘤的检测、筛查(见附表 1)。

[0080] 此外,该项检测技术还具有以下技术优势:

[0081] 1) 检测使用尿液,不需要采血,无创伤性,易于为受试者接受。

[0082] 2) 检测简便快速,不需要特殊的仪器设备,15 分钟内可完成检测,便于在基层和现场使用(检测原理及结果判定见图 1、图 2)。

[0083] 3) 制备抗体与相应检测抗原结合性高,检测结果特异(见图 3)。

[0084] 4) 检测物质稳定,不易降解。(见图 4,稳定性实验)

[0085] 5) 胶体金检测成本低廉,适宜于大样本人群的筛查检测;检测试剂条标记物稳定,标记样品在 4℃可贮存两年以上,易于储存及运输。

附图说明

[0086] 图 1 试剂条侧面结构 :试剂条由样品垫、胶体金垫、包被抗体的 NC 膜以及吸样垫,粘贴于 PVC 胶板上 ;待检测尿液通过样品垫流入胶体金垫 ;如样品中含有检测抗原,则与胶体金垫相应中抗体结合 ;流入 NC 膜后,与 NC 包被抗体形成包被抗体 - 抗原 - 标记抗体复合物,产生肉眼可见的红色条带,即测试阳性 ;质控条带包被 aIgG,样品流动时,与胶体金标记的抗体结合,产生红色条带。

[0087] 图 2 试剂条正面检测结果示意图 :如图示当样品检测为阳性时,质控线和检测线处均呈红色条带 ;阴性结果,只在质控线位置出现单一红色条带 ;未出现任何检测条带时,则判断为检测无效。

[0088] 图 3 单克隆抗体特异性检测 :利用 Western-blot 检测重组抗原 LRG1 与相应筛选抗体的结合。结果显示 M1、M5、M8 克隆细胞株分泌的抗体能够与重组抗原特异性结合。

[0089] 图 4 待测抗原稳定性实验 :M :为蛋白 Marker ;0-7 :为尿液置于 4℃ 冰箱保存天数。结果显示,尿液样本中待检抗原稳定、一周内无降解。

[0090] 图 5 为利用设计的引物进行 LRG1 (36-347aa) 扩增的 PCR 胶图。

[0091] 图 6 为 LRG1 (36-347aa) 蛋白小量表达胶图 ;其中 :M :maker ;1 :诱导后的菌单克隆 ;2 :诱导前的菌单克隆。

[0092] 图 7 为 LRG1 (36-347aa) 蛋白大量表达胶图。

[0093] 图 8 为 LRG1 (36-347aa) 纯化胶图。

具体实施方式

[0094] 实施步骤 :

[0095] 1) 人 LRG1 单克隆抗体的制备 :

[0096] 人重组 LRG1 基因表达系统的建立 :参照《分子克隆实验指南》方法,利用基因重组技术,构建人 LRG1 基因表达系统,建立人 LRG1 蛋白高表达系统,具体步骤如下 :

[0097] (1) 针对 LRG1 基因序列 (36-346aa),设计一对引物 :

[0098] 上游引物 :CGGGATCCGTCACCCTGAGCCCCAAAGACTGC ;

[0099] 下游引物 :CCGCTCGAGCTGGGACTTGGCCACTGCCAGGAGC

[0100] (2) 利用上述引物,进行 PCR 扩增,PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 (BPI) ;见图 5。

[0101] (3) 回收片段及载体 (pET-30a-GST BPI) 酶切 (BamH I , Xho I) 后,进行连接转化 BL21 感受态细胞。

[0102] (4) 目的蛋白的小量表达 :挑选转化的克隆细胞,利用 IPTG (0.5mM) 诱导蛋白表达,表达蛋白进行电泳 (12% SDS-PAGE) 检测,结果见图 6。

[0103] (5) 测序 :选取小量表达分子量正确的克隆进行测序,LRG1 (36-347aa)-1 测序,结果显示氨基酸序列正确。

[0104] (6) 目的蛋白大量表达 :挑选测序正确的菌株,进行大量培养,利用 IPTG (0.5mM) 诱导后收获细菌,超声破菌,电泳确定表达。结果见图 7。

[0105] 抗原的制备 :提取人重组表达 LRG1 的蛋白,按照以下方法进行纯化 :

- [0106] (1) 20 ~ 30ml 10mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液重悬超声离心得到的沉淀, 静置 10min。
- [0107] (2) 12000rpm, 离心 10min, 上清转入另一管中保存。
- [0108] (3) 20 ~ 30ml 10mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液重悬沉淀, 静置 10min。
- [0109] (4) 12000rpm, 离心 10min, 弃上清。
- [0110] (5) 重复 (3)、(4) 一次。
- [0111] (6) 先加入少量的 10mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液重悬沉淀, 再加 5 ~ 10ml 含 8M 尿素的 10mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液溶解蛋白。
- [0112] (7) 12000rpm, 离心 10min, 收集上清, 取 50 μ l 电泳。
- [0113] 结果见图 8。
- [0114] 单克隆抗体的制备: 纯化的 LRG1 蛋白抗原免疫 SPF 级小鼠; 分离小鼠脾细胞, 与骨髓瘤细胞 (myeloma cells) 融合, 产生杂交瘤细胞 (hybridoma cells), 筛选高表达 LRG1 抗体的克隆细胞株; 用高表达 LRG1 克隆细胞株体外培养、小鼠腹腔注射克隆细胞株产生腹水 (ascites) 生产单克隆抗体;
- [0115] 抗体纯化、检测及筛选: 利用 Protein A/G 亲和层析纯化技术纯化抗体, 步骤如下:
- [0116] (1) 样品预处理: 用相应的偶联缓冲液以 1:3 稀释腹水, 10000rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 20min, 0.22 μ m 滤膜过滤。
- [0117] (2) 平衡: 用 5-10 倍柱体积的相应偶联缓冲液平衡预装亲和柱, 保持流速为 4s;
- [0118] (3) 上样: 用注射器把样品注入柱子上端接口, 收集流出液, 保持流速为 5s/滴;
- [0119] (4) 洗杂: 用 5 倍柱体积的偶联缓冲液过柱, 保持流速为 4s/滴;
- [0120] (5) 中和: 根据中和液调试结果, 按量分别加入中和液;
- [0121] (6) 洗脱: 用 5 倍柱体积洗脱缓冲液洗脱抗体, 收集于 EP 管中。
- [0122] 抗体纯化后, 用 ELISA 和 western blot 方法检测单克隆抗体的效价、抗体的特异性、抗体亚型; 筛选出与重组蛋白具有特异性结合的单克隆抗体, 进一步用做包被抗体及标记抗体。
- [0123] 2) 胶体金的制备和抗体标记:
- [0124] 胶体金溶液的制备: 胶体金溶液按照氯金酸 - 还原法制备; 要求胶体金颗粒为 30 ~ 40nm 左右, 纯度大于 95% 以上; 用 0.1mol/L K_2CO_3 或 0.1mol/L HCl 调节胶体金溶液的 pH 值至 8.2 左右。
- [0125] 胶体金与待标记抗体比例的确定: 将待标记抗体用 0.05mol/L, pH9.0 硼酸盐缓冲液系列稀释为 5 ~ 50mg/ml, 分别加入胶体金溶液中; 5min 后, 分别加入 0.1ml 10% NaCl 溶液, 混匀静置 2h, 观察结果; 其中含蛋白质最低的试管即为稳定胶体金所需的抗体质量, 在此基础上再加 10% - 20%, 即为待标记抗体的实际用量。
- [0126] 标记胶体金结合抗体: 分别取所需量的胶体金和相应的抗体蛋白, 用 0.1mol/L K_2CO_3 调节 pH 值至 9.0; 搅拌下将胶体金溶液和抗体蛋白液混合; 10min 后, 加入 5% BSA 使其终浓度为 1% 以防止抗体蛋白和胶体金的聚合和发生沉淀; 一般胶体金 - 蛋白质应用液的 OD_{520nm} 值应为 0.2-0.4。
- [0127] 3) 胶体金层析试剂条的制备
- [0128] NC 硝酸纤维素膜及辅料的筛选: 制备不同厂家的 NC 膜小样, 进行筛选; 并选择合适

的上样垫、胶体金垫、吸样垫辅料。

[0129] 胶体金垫制备：将标记好的胶体金用胶体稀释液配成 5%~20% 的溶液（含有 BSA 封闭剂、表面活性剂、糖类物质或其他稳定剂），滴加或用专用的喷金仪喷到胶体金垫上，干燥后保存备用。

[0130] 抗体包被与 NC 膜的处理：用专用的喷膜仪将抗体蛋白喷到 NC 膜上，干燥，使抗原牢固结合在 NC 膜上；用含有 BSA、酪蛋白或其他封闭剂的溶液进行封闭，再干燥保存备用。抗体的包被浓度约为 0.5~2mg/ml。包被稀释液采用 PBS 或其他低浓度的缓冲液，需加入乙醇、糖或 BSA，以调节抗体在膜上的扩散性和稳定性。

[0131] 试剂组装：将 NC 膜、胶体金垫、上样垫和吸样垫粘贴于专用的 PVC 胶板上，制成母卡，进行半成品质量检定；半成品检定合格后，将母卡切割成试剂条，进行成品质量检定，然后将试条装入专用塑料盒内，密封包装，形成成品（见图 1-2）。

[0132] 4) 检测试剂条的临床初步应用效果评价：

[0133] 测试对象：包括健康对照者 50 例、临床确诊肝癌患者 92 例（其中未治疗者 39 例，进行介入、手术治疗者 53 例）、其他各种肿瘤患者 271 例。

[0134] 健康对照者来源于体检正常人群，排除其它病毒感染性疾病、胆道疾病以及其它恶性肿瘤；肝癌患者及其他恶性肿瘤患者来源于临床诊断明确的住院患者，并且排除其他恶性肿瘤和肾脏炎性疾病。所有样品采集前，履行告知测试对象手续。

[0135] 尿样收集：用干净的一次性容器收集测试者的晨起、中段尿约 10mL。尿样收集后，冰上运输至实验室，进行编号登记，分装后保存于 -80℃ 低温冰箱直到检测分析。如尿样浑浊，先进行离心（1500rpm, 5min）去除沉淀物。

[0136] 尿液检测分析：将尿液滴加于制备的试剂条上，5 分钟后观察结果，记录结果；抽取各组样本各 10 份，进行 3 次重复性检测，检测结果进行初步分析。

[0137] 结果发现：与对照相比较，该方法对肝癌检测的敏感度和特异性分别为 85.7% 和 90.5%；另外对其他十余种恶性肿瘤及转移性肿瘤（乳腺癌、肺癌、宫颈癌、食道癌、子宫内膜癌、甲状腺癌、肾癌肾盂肿瘤、前列腺癌、胃癌、肠癌、贲门癌、卵巢癌、输卵管癌、贲门癌、胰腺癌、肝、肺等转移癌）也具有一定的检出率；重复性检测结果显示，该方法的重复性总体达到 98% 以上。检测结果见附表 1。

[0138] 尿液抗原稳定性实验：将分装的七份尿液置于 4℃ 冰箱，分别于 1-7 天进行利用 western-blot 法进行检测，结果发现样本于 4℃ 冰箱冷藏保存 7 天，其检测抗原稳定、无降解（见图 4）。

[0139] 总之：本发明首先制备针对人 LRG1 蛋白的单克隆抗体，筛选出与相应 LRG1 蛋白抗原具有特异性结合的单克隆抗体；然后利用免疫胶体金技术，通过对尿液中 LRG1 分子的检测，从而建立一种快速、简便、灵敏、特异的肝癌或肿瘤检测试剂，以期达到对肿瘤进行早期筛查的目的。

[0140] 附表 1 检测结果总结

	组别	例数 (人)	阴性	阳性	可疑	备注
[0141]	健康对照	50	50	0		
	肝癌患者(未治疗)	39	5	30	4	测试区有淡红色条带出现,结果不能判断
	肝癌患者(手术/介入治疗后)	53	13	24	16	
[0142]	其他肿瘤患者	271	227	35	10	
	乳腺癌			6		
	肺癌			5		
	宫颈癌			3		
	食道癌			2		
	子宫内膜癌			2		
	甲状腺癌			1		
	肾癌肾盂肿瘤			2		
	前列腺癌			2		
	胃癌			2		
	肠癌			1		
	贲门癌			1		
	卵巢癌			1		
	输卵管癌			1		
	贲门癌			1		
	胰腺癌			1		
	肝转移癌			2		
	脑转移癌			1		
	肺癌骨转移			1		

[0143] 附表 2:肝癌患者(未治疗组)信息

[0144]

序号	姓名	性别	年龄	临床诊断	检测结果		
					阴性	阳性	可疑
1	安××	男	43	原发性肝癌		+	
2	王××	男	57	肝癌		+	
3	燕××	男	56	肝癌		+	
4	段××	男	35	原发性肝癌		+	
5	张×	男	70	原发性肝癌		+	
6	李××	男	39	肝癌		+	
7	薛××	男	76	肝癌		+	
8	冯××	男	35	肝癌			±
9	陈××	女	55	肝癌		+	
10	邵××	男	72	肝癌		+	
11	唐××	女	68	肝癌		+	
12	王××	男	54	肝癌		+	
13	董××	男	69	肝癌 IIB 期			±
14	张××	男	55	肝癌		+	
15	冯××	男	71	肝癌待排		+	
16	薛××	女	52	肝癌		+	
17	杨××	男	39	原发性肝癌		+	
18	邱××	男	43	肝癌		+	
19	程×	男	51	肝癌			±
20	魏××	男	36	肝癌		+	
21	刘××	男	61	肝癌			±
22	樊××	女	52	原发性肝癌	-		
23	陈××	男	38	肝癌		+	
24	石××	男	45	原发性肝癌	-		
25	张××	男	53	原发性肝癌	-		
26	田××	男	35	原发性肝癌		+	
27	黄××	男	47	原发性肝癌		+	
28	杨××	男	48	原发性肝癌		+	
29	王××	男	39	原发性肝癌		+	
30	张××	男	41	原发性肝癌		+	
31	雷××	男	34	原发性肝癌		+	
32	王××	男	45	原发性肝癌	-		
33	杨××	男	56	原发性肝癌		+	
34	陈××	男	65	原发性肝癌		+	
35	姬××	男	52	原发性肝癌	-		
36	邵××	男	68	原发性肝癌		+	
37	王××	男	39	原发性肝癌		+	
38	周××	女	51	原发性肝癌		+	
39	苑×	男	42	原发性肝癌		+	
合计					5	25	4

[0145]

[0146] 附表 3:肝癌(手术或介入治疗)患者信息

[0147]

序号	姓名	性别	年龄	临床诊断	检测结果		
					阴性	阳性	可疑
1	杨××	男	70	多发性肝转移癌			±
2	张××	男	48	肝癌	-		
3	王××	男	64	肝癌		+	
4	杜××	男	56	肝癌			±
5	高××	男	66	原发性肝癌		+	
6	张×	男	43	肝细胞性肝癌术后	-		
7	金××	女	55	原发性肝细胞肝癌			±
8	文××	男	80	肝癌	-		
9	侯××	男	76	肝转移癌			±
10	谢××	男	36	原发性肝细胞癌		+	
11	李××	男	55	肝内转移癌		+	
12	唐××	女	45	肝癌			±
13	孙××	男	53	原发性肝癌 III 期		+	
14	张××	女	45	原发性肝癌			±
15	解××	女	60	肝癌		+	
16	刘××	男	81	原发性肝癌		+	
17	林××	男	48	肝癌	-		
18	马××	男	50	肝癌	-		
19	雷×	男	43	肝癌		+	

[0148]

20	孙××	男	48	肝癌		+	
21	李××	男	59	原发性肝癌			士
22	车××	男	45	原发性肝癌			士
23	赵××	男	50	原发性肝癌			士
24	王×	男	39	原发性肝癌	-		
25	石××	男	37	HCC 介入术		+	
26	王××	男	56	HCC 介入术后		+	
27	张××	男	36	原发性肝癌		+	
28	崔××	男	53	HCC 介入术后		+	
29	李××	男	40	HCC 切除术后		+	
30	李××	男	53	HCC 切除术后			士
31	宋××	男	37	HCC 切除术后			士
32	魏××	男	55	HCC 介入术后 LC		+	
33	王××	女	60	小肝癌介入术后	-		
34	魏×	男	51	原发性肝癌			士
35	赵××	男	43	HCC 切除术后	-		
36	刘××	男	49	HCC 介入术后		+	
37	田××	男	36	HCC 射频术后 1 周		+	
38	史××	男	52	HCC 切除术后		+	
39	张××	女	41	HCC 介入术后	-		
40	李××	男	42	HCC 介入术后		+	
41	宁××	男	52	原发性肝癌	-		
42	段××	女	63	HCC 介入术后	-		
43	高××	男	40	HCC 介入术后	-		
44	罗××	男	55	原发性肝癌	-		
45	李××	男	32	原发性肝癌			士
46	尤××	男	48	HCC 射频术后			士
47	闫×	男	41	HCC 切除术后		+	
48	李××	男	42	HCC 介入术后			士
49	史××	男	52	HCC 切除术后		+	
50	陈××	男	65	HCC 介入术后		+	
51	刘××	女	39	HCC 切除术后		+	
52	王××	女	55	HCC 介入术后		+	
53	郭××	女	68	HCC 射频术后			士
合计					13	24	16

[0149] 注：原发性肝癌：HCC

[0150] 附表 4：检测结果为阳性的其他类型肿瘤患者信息

[0151]

序号	姓名	性别	年龄	临床诊断
1	刘××	女	51	左乳癌 (PT3NDMD)
2	牛××	女	38	右乳腺导管癌 II A 期 (PT2NOM0)

[0152]

3	李××	女	51	左乳癌术后 (PT1NDMD1 期)
4	奚××	女	63	右乳癌术后化疗
5	李××	女	46	左乳癌
6	冉××	女	56	右乳癌 (PT3N1MD)
7	姚××	男	34	右肺鳞癌IIIBCCT23MD
8	张××	男	62	右肺中央型小细胞未分化癌广泛期) 化疗
9	黄×	男	57	左肺小细胞肺癌, 肝脏多发转移, 骨转移 (广泛期)
10	胡××	女	72	左肺癌
11	杨××	女	64	右肺小细胞肺癌化疗后
12	李××	女	52	宫颈鳞癌II B 期术后放化疗后
13	翟××	女	45	宫颈鳞癌 I 8 期术后
14	蔡××	女	66	宫颈鳞癌 II 8 期 (外生型)
15	李××	男	57	食管下段癌化疗后
16	李××	男	71	食管癌膀胱癌术后
17	李××	女	47	子宫内膜癌 I 期
18	荷××	女	60	子宫内膜癌 (T1N1MDIIIc 期)
19	靖××	女	72	甲状腺未分化癌 (IV 期)
20	王××	女	67	左肾孟肿瘤 (T3N2M1)
21	王××	女	68	左肾孟肿瘤 (T3N2M1)
22	郭×	男	74	前列腺癌
23	陈××	男	72	前列腺低分化腺癌 (CT4N1M1bIV 期)
24	上××	女	24	胃癌术后肠梗阻
25	丁××	男	81	胃癌 (T1NDMD I 期)
26	周××	男	71	直肠癌术后
27	樊××	男	72	贲门癌 (鳞癌 II 级))
28	姜××	女	68	卵巢癌 (CT2CNxMD)
29	陈××	女	72	左输卵管低分化癌术后
30	张××	男	55	贲门癌术后化疗
31	张×	男	61	胰腺癌腹腔转移
32	任××	女	52	脑转移癌肝脾转移癌
33	李××	男	78	右肾孟癌根治术后骨肺肝转移
34	任××	女	52	脑转移癌, 肝脾转移癌
35	童智义	男	67	左肺癌伴骨转移化疗后 (CTXNXM1 IV 期)

[0153] <110> 刘红莉周爱民 (Aimin Zhou)

[0154] <120> 一种用尿液进行癌症快速检测的试剂条的制备方法

[0155] <160>3

[0156] <210>1

[0157] <211>146

[0158] <212>PRT

[0159] <213> 人工序列

[0160] <400>1

[0161] MSSWSRQRPKSPGGIQPHVSRTLFLLLLLAASAWGVTLSPKDCQVFRSDHGSSISCQPPAEIPGYLPAD

TVHLAVEFFNLTHLPANLLQGASKLQELHLSSNGLESLSPEFLRPVQQLRVLDLTRNALTGLPPGLFQASATLDTLV

[0162] <210>2

[0163] <211>143

[0164] <212>PRT

[0165] <213> 人工序列

[0166] <400>2

[0167] LKENQLEVLEVSWLHGLKALGHLDLSGNRLRKLPPGLLANFTLLRDLGENQLETLPDLLRGPLQLE
RLHLEGNKLVGLGKDLLLPQDLRYLFLNGNKLARVAAGAFQGLRQLDMLDLSNNSLASVPEGLWASLGQPNWD

[0168] <210>3

[0169] <211>58

[0170] <212>PRT

[0171] <213> 人工序列

[0172] <400>3

[0173] MRDGFDISGNPWICDQNLSDLYRWLQAQKDKMFSQNDTRCAGPEAVKGGQTLAVAKSQ

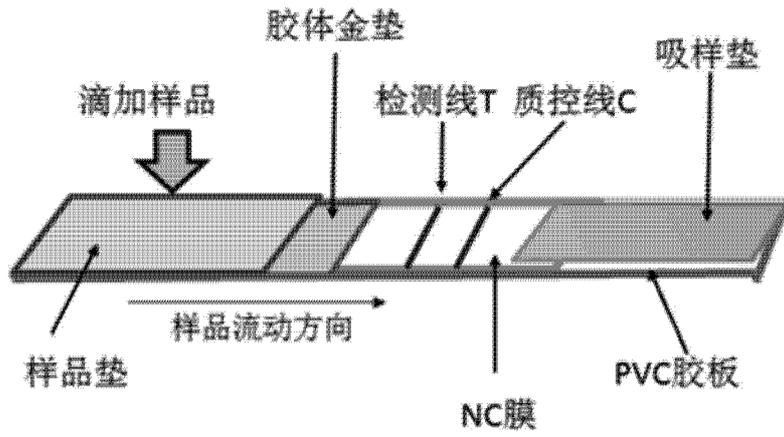


图 1

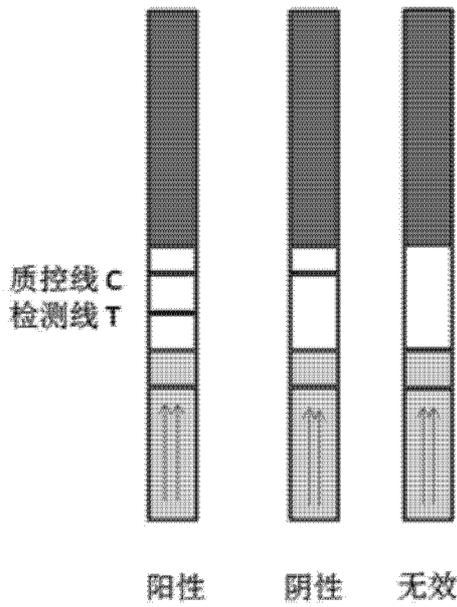


图 2

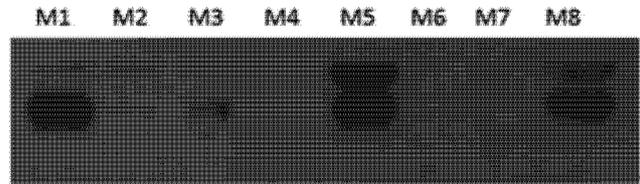


图 3

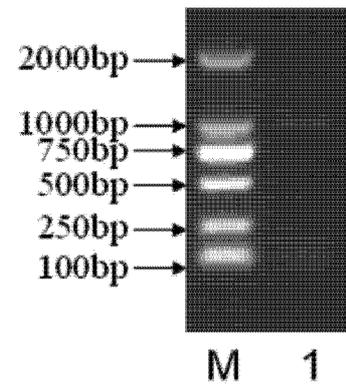
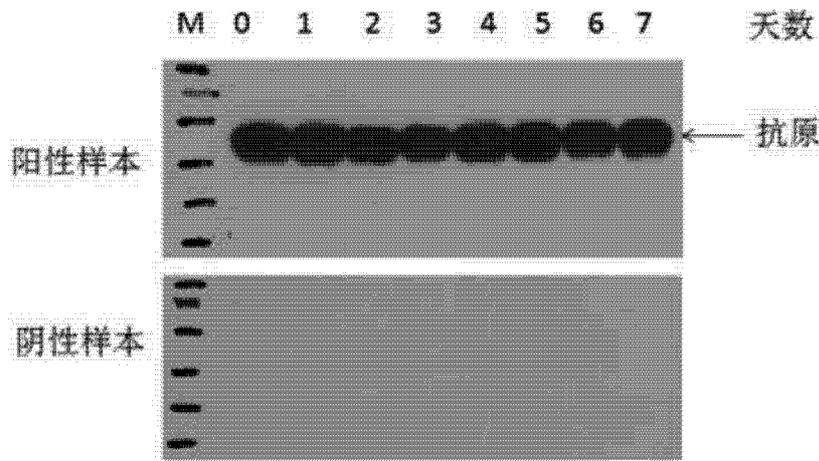
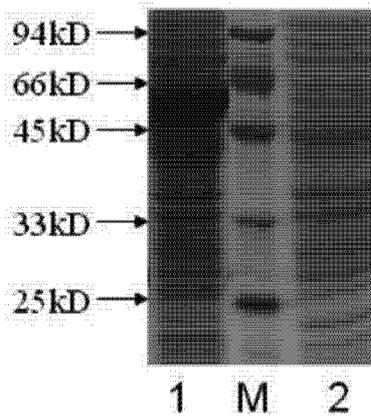


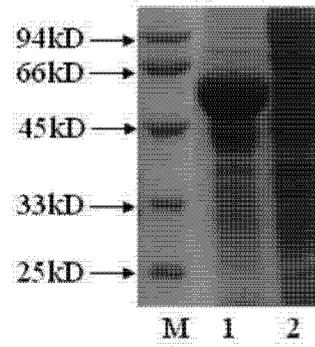
图 5

图 4



LRG1 (36-347aa) 小量表达胶图

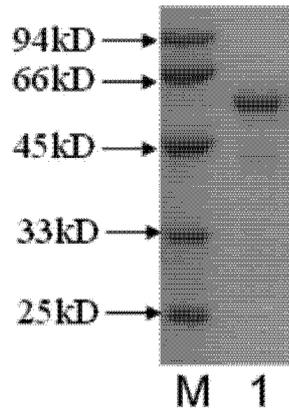
图 6



LRG1 (36-347aa) 大量表达胶图

1: 沉淀, 2: 上清;
M: 蛋白质marker。

图 7



LRG1 (36-347aa) 纯化胶图

M: maker;

1: 稀释100倍的蛋白样品。

图 8

专利名称(译)	一种用尿液进行癌症快速检测的试剂条的制备方法		
公开(公告)号	CN103926413A	公开(公告)日	2014-07-16
申请号	CN201410174349.7	申请日	2014-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	刘红莉		
申请(专利权)人(译)	刘红莉		
当前申请(专利权)人(译)	刘红莉		
[标]发明人	刘红莉		
发明人	刘红莉		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/558 G01N33/532 C07K16/18 C07K14/47 C12N15/12 C12N15/70		
CPC分类号	G01N33/57438 C07K16/18 G01N33/558 G01N33/57407 G01N2333/435		
代理人(译)	邢江峰		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及医药领域，尤其涉及一种用尿液进行癌症快速检测的试剂条的制备方法。本发明首先制备针对人LRG1蛋白的单克隆抗体，筛选出与相应LRG1蛋白抗原具有高特异性结合的抗体；然后利用免疫胶体金技术，通过对尿液中LRG1分子的检测，从而建立一种快速、简便、灵敏、特异的肝癌或其它恶性肿瘤检测试剂，以期达到对肿瘤进行早期筛查的目的。

质控线 C
检测线 T

