



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106093397 A

(43)申请公布日 2016. 11. 09

(21)申请号 201610412928.X

(22)申请日 2016.06.13

(71)申请人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明南路422号

(72)发明人 王团老 陈婉明 洪万进

(74)专利代理机构 长沙星耀专利事务所 43205

代理人 许伯严

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

### (54)发明名称

以谷胱甘肽过氧化物酶 3为标志物的乳腺癌诊断试剂盒

### (57)摘要

本发明涉及一种以谷胱甘肽过氧化物酶3为标志物的乳腺癌诊断试剂盒,属于蛋白检测领域。所述试剂盒的特点是以谷胱甘肽过氧化物酶3为标志物。本发明还提供一种用于诊断乳腺癌的试剂盒,其包括可结合、吸附和/或偶联谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体。以GSH-Px3为标志物和/或采用本发明所述的试剂盒进行乳腺癌诊断,具有操作方便、成本较低、灵敏度高、准确性好等优点。

1. 用于乳腺癌诊断的试剂盒,其特征在于,以谷胱甘肽过氧化物酶3为所述诊断的标志物。
2. 用于乳腺癌诊断的试剂盒,其特征在于,包括可结合、吸附和/或偶联谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体。
3. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,所述抗体包括:一抗:谷胱甘肽过氧化物酶3小鼠单克隆抗体;二抗:过氧化物酶羊抗鼠IgG多克隆抗体。
4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述一抗的工作浓度范围:0.2 $\mu$ g/mL-0.5 $\mu$ g/mL,二抗的工作浓度范围:0.01 $\mu$ g/mL-0.02 $\mu$ g/mL。
5. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,还包括用于蛋白免疫印迹检测的常规试剂。
6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述蛋白免疫印迹检测的常规试剂包括:12%聚丙烯酰胺凝胶,用于分离蛋白;还包括吐温-20、TEMED、2\*SDS上样缓冲液、 $\beta$ -巯基乙醇、封闭液、洗涤液、转膜液和ECL发光液等。
7. 谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体在制备乳腺癌诊断试剂盒方面的应用。
8. 权利要求1-6任一所述试剂盒的制备方法,其特征在于,所述试剂盒内装有检测谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体;和/或在标有乳腺癌诊断用途的包装盒内放置有检测谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体。
9. 根据权利要求8所述的制备方法,其特征在于,所述试剂盒内还装有用于蛋白免疫印迹检测的常规试剂。
10. 根据权利要求9所述的制备方法,其特征在于,所述抗体包括:浓度范围为0.2 $\mu$ g/mL-0.5 $\mu$ g/mL的谷胱甘肽过氧化物酶3小鼠单克隆抗体,用作一抗;浓度范围为0.01 $\mu$ g/mL - 0.02 $\mu$ g/mL的过氧化物酶羊抗鼠IgG多克隆抗体,用作二抗。

## 以谷胱甘肽过氧化物酶 3 为标志物的乳腺癌诊断试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于蛋白检测领域,具体涉及一种以谷胱甘肽过氧化物酶3为标志物的乳腺癌诊断试剂盒。

### 背景技术

[0002] 女性乳腺是由皮肤、纤维组织、乳腺腺体和脂肪组成的,乳腺癌是发生在乳腺腺上皮组织的恶性肿瘤。全球乳腺癌发病率自20世纪70年代末开始一直呈上升趋势。美国8名妇女一生中就会有1人患乳腺癌。中国不是乳腺癌的高发国家,但不宜乐观,近年我国乳腺癌发病率的增长速度却高出高发国家1~2个百分点。据国家癌症中心和卫生部疾病预防控制局2012年公布的2009年乳腺癌发病数据显示:全国肿瘤登记地区乳腺癌发病率位居女性恶性肿瘤的第1位,女性乳腺癌发病率(粗率)全国合计为42.55/10万,城市为51.91/10万,农村为23.12/10万。乳腺癌已成为当前社会的重大公共卫生问题。

[0003] 谷胱甘肽过氧化物酶 3(Glutathione peroxidase3, GSH-Px3)属于硒蛋白家族,是人们在哺乳动物体内寻找到的第一个含硒酶。GSH-Px存在于所有真核细胞当中,可催化谷胱甘肽还原活性氧自由基,减少过氧化物对机体的损伤。从人或动物的组织和细胞中提纯的GSH-Px,分子质量为76-95 KDa,为水溶性四聚体。至今,研究发现4种重要的GSH-Px同工酶,分别是磷脂氢GSH-Px (PHGPx)、细胞内GSH-Px (cGPx)、血浆GSH-Px3 (pGPx) 和胃肠道GSH-Px (giGPx)。

[0004] 血浆GSH-Px3是一种糖基化的硒蛋白,主要在细胞外发挥抗氧化功能,不仅参与有机氢过氧化、还原氢过氧化物的反应,还可作用于磷脂氢过氧化物和胆固醇氢过氧化物,通过调节细胞外过氧化物的浓度,调控机体防御反应<sup>[105]</sup>。近期发现一个GSH-Px3的可能机制:表观遗传学会抑制GSH-Px3在癌细胞中的表达。在大量子宫内膜癌、食道癌和前列腺癌患者中,发现GSH-Px3启动子甲基化。

[0005] 现有技术中常用的乳腺癌诊断标志物有CEA(癌胚抗原)、ER(雌激素受体)、PR(孕激素受体)、HER2(人类表皮生长因子2)、p53、CA 15.3、BR 27.29、MCA、CA 549-MUC-1家庭等,用这些现有的标志物进行诊断时,都缺乏足够的灵敏度和特异性。因此本领域亟需开发出新的标志物来完善乳腺癌诊断技术。

[0006] 以GSH-Px3做为乳腺癌诊断标志物,本领域尚未见此类报道。

### 发明内容

[0007] 本发明基于本领域的上述需求和空白,提供一种全新的用于诊断乳腺癌的试剂盒,它是基于谷胱甘肽过氧化物酶3(GSH-Px3)为诊断标志物的。本发明所述的试剂盒能够方便快捷、较为准确地诊断出乳腺癌。

[0008] 本发明的技术方案如下:

用于乳腺癌诊断的试剂盒,其特征在于,以谷胱甘肽过氧化物酶3为所述诊断的标志物。

[0009] 用于乳腺癌诊断的试剂盒,其特征在于,包括可结合、吸附和/或偶联谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体。

[0010] 所述抗体包括:一抗:谷胱甘肽过氧化物酶3小鼠单克隆抗体;

二抗:过氧化物酶羊抗鼠IgG多克隆抗体。

[0011] 所述一抗的工作浓度范围:0.2 $\mu$ g/mL-0.5 $\mu$ g/mL,二抗的工作浓度范围:0.01 $\mu$ g/mL-0.02 $\mu$ g/mL。

[0012] 所述试剂盒还包括用于蛋白免疫印迹检测的常规试剂。

[0013] 所述蛋白免疫印迹检测的常规试剂包括:12%聚丙烯酰胺凝胶,用于分离蛋白;还包括吐温-20、TEMED、2\*SDS上样缓冲液、 $\beta$ -巯基乙醇、封闭液、洗涤液、转膜液和ECL发光液等。

[0014] 谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体在制备乳腺癌诊断试剂盒方面的应用。

[0015] 所述试剂盒的制备方法,其特征在于,所述试剂盒内装有检测谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体;和/或

在标有乳腺癌诊断用途的包装盒内放置有检测谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体。

[0016] 所述试剂盒内还装有用于蛋白免疫印迹检测的常规试剂。

[0017] 所述抗体包括:浓度范围为0.2 $\mu$ g/mL-0.5 $\mu$ g/mL的谷胱甘肽过氧化物酶3小鼠单克隆抗体,用作一抗;浓度范围为0.01 $\mu$ g/mL-0.02 $\mu$ g/mL的过氧化物酶羊抗鼠IgG多克隆抗体,用作二抗。

[0018] 本发明提供一种用于乳腺癌诊断的试剂盒,其特征在于,以谷胱甘肽过氧化物酶3(GSH-Px3)为所述诊断的标志物。本申请的发明核心在于创新地采用GSH-Px3为乳腺癌诊断标志物。本发明通过检测临床收集的乳腺癌患者血样和健康人群血样中的GSH-Px3蛋白表达程度,证实了GSH-Px3蛋白的过表达与乳腺癌的发生呈显著相关;此外,本发明还通过对比GSH-Px3标志物与现有常用标志物CEA在诊断乳腺癌方面的数据,发现本发明的GSH-Px3标志物在乳腺癌临床诊断方面的准确率高达89.9%。在本发明的启发下,只要是围绕GSH-Px3展开的任何试剂的组合,且该组合是用来进行乳腺癌诊断的,那么所述任何试剂的组合即落入本发明请求保护的范围。

[0019] 本发明还提供一种具体的用于乳腺癌诊断的试剂盒,它包括可结合、吸附和/或偶联谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体。在本发明的一些实施例中采用的western blot,而本领域还可使用其它常规方法检测GSH-Px3蛋白在血液中的表达程度或浓度,例如,酶联免疫吸附法,该方法中所用到的吸附GSH-Px3的抗体也落入本发明请求保护的范围。

[0020] 在本发明一些具体的实施例中,所述抗体包括:谷胱甘肽过氧化物酶3一抗,具体是谷胱甘肽过氧化物酶3小鼠单克隆抗体,用它做一抗的好处是:灵敏度高、特异性好,可检测人体血清中的谷胱甘肽过氧化物酶3,所述抗体还包括:识别一抗的二抗,具体是过氧化物酶羊抗鼠IgG多克隆抗体;好处是灵敏度高、特异性好,可结合谷胱甘肽过氧化物酶3一抗。

[0021] 在本发明优选的实施例中,上述一抗的工作浓度范围:0.2 $\mu$ g/mL-0.5 $\mu$ g/mL;二抗的工作浓度范围:0.01 $\mu$ g/mL-0.02 $\mu$ g/mL。本领域技术人员熟知,抗体抗原结合时,无论是抗体还是抗原,分子的空间构象都会发生一定程度的改变,从而影响分子间的进一步结合、偶联或吸附,因此,在样品中抗原浓度稳定的情况下,控制好抗体的工作浓度显得尤为重要,

抗体浓度太高,可能会造成非特异性结合;抗体浓度太低,可能会造成结合效率低下;太高或太低都会影响GSH-Px3浓度检测结果的准确性。为了保证抗原抗体结合的特异性、结合效率、以及检测结果的准确性,本发明摸索了GSH-Px3一抗和二抗的工作浓度,发现采用上述浓度范围的一抗和二抗结合效率最高,检测结果更为可靠和准确。

[0022] 为完善本发明的便捷度,一些优选的实施例中,所述试剂盒还包括用于蛋白免疫印迹(western blot)检测的常规试剂,和/或用于2-DE LC-MS/MS蛋白质组分析的常规试剂。具体地,所述蛋白免疫印迹检测的常规试剂包括:12%聚丙烯酰胺凝胶,用于分离蛋白;还包括吐温-20、TEMED、2\*SDS上样缓冲液、 $\beta$ -巯基乙醇、封闭液、洗涤液、转膜液和ECL发光液等。本发明还请求保护GSH-Px3在制备乳腺癌诊断试剂盒方面的应用。

[0023] 在一些国家专利法允许的情形下,本发明还请求保护:GSH-Px3和/或所述试剂盒在乳腺癌临床诊断方面的用途。具体操作步骤为:用蛋白免疫印迹法检测待测血样和健康人血样中的GSH-Px3表达,对二者的蛋白表达条带的灰度值进行T检验,看待测血样中的GSH-Px3表达灰度值是否显著高于健康人的,如果差异显著,则说明该血样对应的临床个体患有乳腺癌,反之则为良性或健康。

[0024] 本发明还请求保护所述试剂盒的制备方法,其特征在于,所述试剂盒内装有检测谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体;和/或,在标有乳腺癌诊断用途的包装盒内放置有检测谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体。

[0025] 在进一步的实施例中,所述试剂盒内还装有用于蛋白免疫印迹检测的常规试剂。

[0026] 以GSH-Px3为诊断标志物和/或采用本发明所述的试剂盒进行乳腺癌诊断,具有操作方便、成本较低、灵敏度高、准确性好等优点。

[0027]

## 附图说明

[0028] 图1是经蛋白免疫印迹法(Western blot)检测GSH-Px3 在不同人体的血清中的表达情况,其中7例恶性乳腺癌血清,4例良性乳腺癌血清和2例健康人血清。

[0029] 图2是GSH-Px3蛋白表达直方图,是图1的条带用Image J软件计算得出的灰度值,其中 $*p<0.05$ 恶性vs健康; $\#p<0.05$ 恶性vs良性;经统计分析,恶性vs健康 $P=0.0286<0.05$ ,恶性vs良性 $P=0.0402<0.05$ ,差异都具有统计学意义。

[0030]

## 具体实施方式

[0031] 下面结合具体实施例对本发明的内容做进一步的详细描述,但并不以此限制本发明的保护范围。以下实施例中所用的试剂和材料,如无特殊说明,均可商购获得;实验步骤如无特殊说明,均为本领域常规操作。

[0032]

### 生物材料来源

本发明实施例所用到的人血样来自于厦门大学附属第一医院。

[0033]

实施例1、GSH-Px3可用作乳腺癌诊断标志物的表达验证

采用蛋白免疫印迹法,用12%聚丙烯酰胺凝胶,每例血清样本取15ug上样,GSH-Px3的一抗采用的是:谷胱甘肽过氧化物酶3小鼠单克隆抗体,其用PBS缓冲液稀释到0.2μg/mL-0.5μg/mL,优选0.2μg/mL;二抗采用的是:过氧化物酶羊抗鼠IgG多克隆抗体,其用PBS缓冲液稀释到0.01μg/mL-0.02μg/mL,优选0.02μg/mL。从图1和图2中,发现GSH-Px3在乳腺癌患者血清中浓度与健康对照组相比,呈升高趋势,并通过健康人与乳腺癌患者之间血清中GSH-Px3的表达进行显著性分析(T-text),如果待测血样中的GSH-Px3表达量与健康人血清中的GSH-Px3表达量相比较,升高趋势差异显著的话,说明该待测血样对应的临床个体患有乳腺癌。

[0034] 同时,用2-DE LC-MS/MS蛋白质组分析进行平行验证。所述2-DE LC-MS/MS蛋白质组分析,是基于2-DE LC-MS/MS质谱技术和生物信息学分析的差异蛋白质组学技术平台,对血清双向电泳的条件进行了优化,成功分离并鉴定出乳腺癌患者与健康对照组的差异蛋白质。所用到的试剂有:水化上样缓冲液\胶条平衡缓冲液、低熔点琼脂糖封胶液、胰酶溶液、12%的聚丙烯酰胺、吐温-20、TEMED、2\*SDS上样缓冲液、β-巯基乙醇、封闭液、洗涤液、转膜液和ECL发光液等;分析过程:双向电泳分离蛋白、LC-MS/MS质谱技术鉴定蛋白和生物信息学分析乳腺癌血清中的差异表达蛋白。

[0035] 采用本发明的GSH-Px3做为标志物,利用Western blot检测其表达,结果与2-DE LC-MS/MS蛋白质组分析结果一致。说明GSH-Px3蛋白可用作乳腺癌诊断标志物。

[0036]

实施例2、本发明所述的乳腺癌诊断试剂盒

本实施例提供一种用于乳腺癌诊断的试剂盒,包括可结合、吸附和/或偶联GSH-Px3的抗体。

[0037] 具体地,所述抗体包括:谷胱甘肽过氧化物酶3一抗,具体是谷胱甘肽过氧化物酶3小鼠单克隆抗体,用它做一抗的好处是:灵敏度高、特异性好,可检测人体血清中的谷胱甘肽过氧化物酶3,所述抗体还包括:识别一抗的二抗,具体是过氧化物酶羊抗鼠IgG多克隆抗体;好处是灵敏度高、特异性好,可结合谷胱甘肽过氧化物酶3一抗。

[0038] 优选地,所述一抗的工作浓度范围:0.2μg/mL-0.5μg/mL;二抗的工作浓度范围:0.01μg/mL-0.02μg/mL。

[0039] 进一步地,所述试剂盒还包括用于Western blot检测的常规试剂。

[0040] 具体地,所述Western blot检测的常规试剂包括:12%聚丙烯酰胺凝胶,用于分离蛋白;还包括吐温-20、TEMED、2\*SDS上样缓冲液、β-巯基乙醇、封闭液、洗涤液、转膜液和ECL发光液等。

[0041]

实施例3、采用本发明所述的试剂盒进行乳腺癌诊断

在本实施例中,搜集了11份乳腺癌病人血样,采用本发明的试剂盒进行乳腺癌诊断,其中9个被诊断出患有乳腺癌,检出率88.2%;检测20份健康人血样,GSH-Px3含量均正常。

[0042] 本领域现有的乳腺癌血清学诊断方法,最常用的是以CEA为肿瘤标志物的检测方法(酶联免疫吸附法),采用该方法对上述同样的11份乳腺癌病人血样进行检测,结果发现有8个患有乳腺癌。

[0043] 本发明的试剂盒与常规方法的吻合率为89.9%。

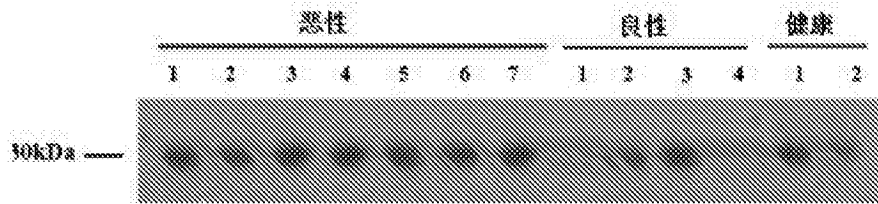


图1

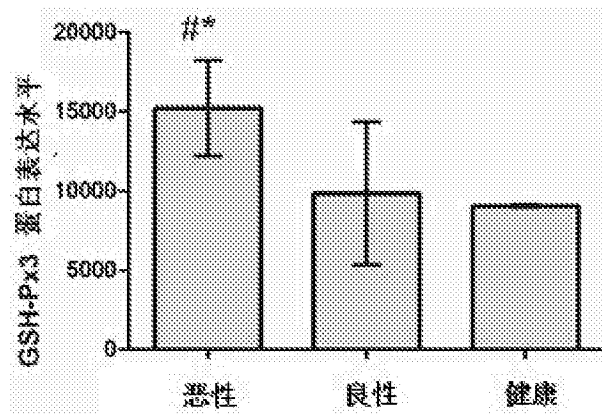


图2

专利名称(译)	以谷胱甘肽过氧化物酶 3 为标志物的乳腺癌诊断试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN106093397A</a>	公开(公告)日	2016-11-09
申请号	CN201610412928.X	申请日	2016-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	厦门大学		
申请(专利权)人(译)	厦门大学		
当前申请(专利权)人(译)	厦门大学		
[标]发明人	王团老 陈婉明 洪万进		
发明人	王团老 陈婉明 洪万进		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/57415 G01N33/531 G01N33/57488		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种以谷胱甘肽过氧化物酶3为标志物的乳腺癌诊断试剂盒，属于蛋白检测领域。所述试剂盒的特点是以谷胱甘肽过氧化物酶3为标志物。本发明还提供一种用于诊断乳腺癌的试剂盒，其包括可结合、吸附和/或偶联谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体。以GSH-Px3为标志物和/或采用本发明所述的试剂盒进行乳腺癌诊断，具有操作方便、成本较低、灵敏度高、准确性好等优点。

