



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107462706 A

(43)申请公布日 2017.12.12

(21)申请号 201710647826.0

(22)申请日 2017.08.01

(71)申请人 广西中医药大学附属瑞康医院(广
西中西医结合医院)

地址 530011 广西壮族自治区南宁市兴宁
区华东路10号

(72)发明人 邓鑫

(74)专利代理机构 北京天盾知识产权代理有限
公司 11421

代理人 易晓钰

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

一种肿瘤试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种肿瘤试剂盒,包括肿瘤蛋白P185单克隆抗体、酶标板、阳性对照品、阴性对照品、洗涤液、终止液、钙网蛋白(CRT)的特异性抗体、辣根过氧化物酶-链亲和素及其显色底物,所述的肿瘤蛋白P185单克隆抗体包括包被在酶标板上的肿瘤蛋白P185单克隆抗体和生物素标记的肿瘤蛋白P185单克隆抗体。本发明能够简便、高通量且高灵敏度地检测人体血清中的肿瘤蛋白P185水平。

1. 一种肿瘤试剂盒,其特征在于,包括肿瘤蛋白P185单克隆抗体、酶标板、阳性对照品、阴性对照品、洗涤液、终止液、钙网蛋白(CRT)的特异性抗体、辣根过氧化物酶-链亲和素及其显色底物,所述的肿瘤蛋白P185单克隆抗体包括包被在酶标板上的肿瘤蛋白P185单克隆抗体和生物素标记的肿瘤蛋白P185单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的肿瘤试剂盒,其特征在于,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。

3. 根据权利要求1所述的肿瘤试剂盒,其特征在于,所述的包被在酶标板上的肿瘤蛋白P185单克隆抗体为肿瘤蛋白P185单克隆抗体2D11,所述的生物素标记的肿瘤蛋白P185单克隆抗体为肿瘤蛋白P185单克隆抗体3F9,肿瘤蛋白P185单克隆抗体2D11、3F9的制备步骤如下:a)以N1H/3T3细胞i.p免疫第一批6~8周的Ba1b/C雌鼠,得到雌鼠的抗N1H/3T3血清;b)收集长至汇合的T6-17细胞,用PBS缓冲液洗1次,将上述制备的抗N1H/3T3血清用PBS缓冲液以1:200稀释,然后取1ml加入T6-17细胞中,在8℃条件下温育过夜,期间晃动盛放T6-17细胞的试管5~6次,然后再用PBS缓冲液洗1次,得到悬浮于PBS缓冲液中的T6-17细胞;c)用上述悬浮于PBS缓冲液中的T6-17细胞i.p免疫第二批6-8周的BaLb/C雌鼠,然后取雌鼠的脾细胞制成细胞悬液;d)用ELISA法从上述细胞悬液中筛选出分泌肿瘤蛋白P185单克隆抗体的杂交瘤细胞,并对杂交瘤细胞进行克隆化,从而得到两株具有稳定分泌肿瘤蛋白P185单克隆抗体能力的杂交瘤细胞株,分别命名为杂交瘤细胞株2D11、杂交瘤细胞株3F9;e)将杂交瘤细胞株2D11、3F9分别注入不同的雌鼠体内,收集腹水,将腹水中的抗体纯化,即得肿瘤蛋白P185单克隆抗体2D11、3F9。

4. 根据权利要求1所述的肿瘤试剂盒,其特征在于,所述的洗涤液是由10g的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、50g的 NaCl 、5g的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 加入纯化水溶解定容至5000ml所得。

一种肿瘤试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种试剂盒,具体是一种肿瘤试剂盒。

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。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 (TumorMarker, 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。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种肿瘤试剂盒,以解决上述背景技术中提出的问题。

[0004] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0005] 一种肿瘤试剂盒,包括肿瘤蛋白P185单克隆抗体、酶标板、阳性对照品、阴性对照品、洗涤液、终止液、钙网蛋白 (CRT) 的特异性抗体、辣根过氧化物酶-链亲和素及其显色底物,所述的肿瘤蛋白P185单克隆抗体包括包被在酶标板上的肿瘤蛋白P185单克隆抗体和生物素标记的肿瘤蛋白P185单克隆抗体。

[0006] 作为本发明进一步的方案: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。

[0007] 作为本发明进一步的方案:所述的包被在酶标板上的肿瘤蛋白P185单克隆抗体为肿瘤蛋白P185单克隆抗体2D11,所述的生物素标记的肿瘤蛋白P185单克隆抗体为肿瘤蛋白P185单克隆抗体3F9,肿瘤蛋白P185单克隆抗体2D11、3F9的制备步骤如下:a) 以N1H/3T3细胞i.p免疫第一批6~8周的Balb/C雌鼠,得到雌鼠的抗N1H/3T3血清;b) 收集长至汇合的T6-17细胞,用PBS缓冲液洗1次,将上述制备的抗N1H/3T3抗血清用PBS缓冲液以1:200稀释,然后取1ml加入T6-17细胞中,在8℃条件下温育过夜,期间晃动盛放T6-17细胞的试管5~6次,然后再用PBS缓冲液洗1次,得到悬浮于PBS缓冲液中的T6-17细胞;c) 用上述悬浮于PBS缓冲

液中的T6-17细胞i.p免疫第二批6-8周的BaLb/C雌鼠,然后取雌鼠的脾细胞制成细胞悬液;d)用ELISA法从上述细胞悬液中筛选出分泌肿瘤蛋白P185单克隆抗体的杂交瘤细胞,并对杂交瘤细胞进行克隆化,从而得到两株具有稳定分泌肿瘤蛋白P185单克隆抗体能力的杂交瘤细胞株,分别命名为杂交瘤细胞株2D11、杂交瘤细胞株3F9;e)将杂交瘤细胞株2D11、3F9分别注入不同的雌鼠体内,收集腹水,将腹水中的抗体纯化,即得肿瘤蛋白P185单克隆抗体2D11、3F9。

[0008] 作为本发明再进一步的方案:所述的洗涤液是由10g的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、50g的 NaCl 、5g的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 加入纯化水溶解定容至5000ml所得。

[0009] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:本发明能够简便、高通量且高灵敏度地检测人体血清中的肿瘤蛋白P185水平。

具体实施方式

[0010] 下面对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0011] 本发明实施例中,一种肿瘤试剂盒,包括肿瘤蛋白P185单克隆抗体、酶标板、阳性对照品、阴性对照品、洗涤液、终止液、钙网蛋白(CRT)的特异性抗体、辣根过氧化物酶-链亲和素及其显色底物,所述的肿瘤蛋白P185单克隆抗体包括包被在酶标板上的肿瘤蛋白P185单克隆抗体和生物素标记的肿瘤蛋白P185单克隆抗体。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。所述的包被在酶标板上的肿瘤蛋白P185单克隆抗体为肿瘤蛋白P185单克隆抗体2D11,所述的生物素标记的肿瘤蛋白P185单克隆抗体为肿瘤蛋白P185单克隆抗体3F9,肿瘤蛋白P185单克隆抗体2D11、3F9的制备步骤如下:a)以N1H/3T3细胞i.p免疫第一批6~8周的BaLb/C雌鼠,得到雌鼠的抗N1H/3T3血清;b)收集长至汇合的T6-17细胞,用PBS缓冲液洗1次,将上述制备的抗N1H/3T3血清用PBS缓冲液以1:200稀释,然后取1ml加入T6-17细胞中,在8℃条件下温育过夜,期间晃动盛放T6-17细胞的试管5~6次,然后再用PBS缓冲液洗1次,得到悬浮于PBS缓冲液中的T6-17细胞;c)用上述悬浮于PBS缓冲液中的T6-17细胞i.p免疫第二批6-8周的BaLb/C雌鼠,然后取雌鼠的脾细胞制成细胞悬液;d)用ELISA法从上述细胞悬液中筛选出分泌肿瘤蛋白P185单克隆抗体的杂交瘤细胞,并对杂交瘤细胞进行克隆化,从而得到两株具有稳定分泌肿瘤蛋白P185单克隆抗体能力的杂交瘤细胞株,分别命名为杂交瘤细胞株2D11、杂交瘤细胞株3F9;e)将杂交瘤细胞株2D11、3F9分别注入不同的雌鼠体内,收集腹水,将腹水中的抗体纯化,即得肿瘤蛋白P185单克隆抗体2D11、3F9。所述的洗涤液是由10g的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、50g的 NaCl 、5g的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 加入纯化水溶解定容至5000ml所得。

[0012] 实施例1:一种肿瘤试剂盒,包括肿瘤蛋白P185单克隆抗体、酶标板、阳性对照品、阴性对照品、洗涤液、终止液、钙网蛋白(CRT)的特异性抗体、辣根过氧化物酶-链亲和素及其显色底物,所述的肿瘤蛋白P185单克隆抗体包括包被在酶标板上的肿瘤蛋白P185单克隆抗体和生物素标记的肿瘤蛋白P185单克隆抗体。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。所述的包被在酶标板上的肿瘤蛋白P185单克隆抗

体为肿瘤蛋白P185单克隆抗体2D11,所述的生物素标记的肿瘤蛋白P185单克隆抗体为肿瘤蛋白P185单克隆抗体3F9,肿瘤蛋白P185单克隆抗体2D11、3F9的制备步骤如下:a)以N1H/3T3细胞i.p免疫第一批6~8周的BaLb/C雌鼠,得到雌鼠的抗N1H/3T3血清;b)收集长至汇合的T6-17细胞,用PBS缓冲液洗1次,将上述制备的抗N1H/3T3抗血清用PBS缓冲液以1:200稀释,然后取1ml加入T6-17细胞中,在8℃条件下温育过夜,期间晃动盛放T6-17细胞的试管5次,然后再用PBS缓冲液洗1次,得到悬浮于PBS缓冲液中的T6-17细胞;c)用上述悬浮于PBS缓冲液中的T6-17细胞i.p免疫第二批6-8周的BaLb/C雌鼠,然后取雌鼠的脾细胞制成细胞悬液;d)用ELISA法从上述细胞悬液中筛选出分泌肿瘤蛋白P185单克隆抗体的杂交瘤细胞,并对杂交瘤细胞进行克隆化,从而得到两株具有稳定分泌肿瘤蛋白P185单克隆抗体能力的杂交瘤细胞株,分别命名为杂交瘤细胞株2D11、杂交瘤细胞株3F9;e)将杂交瘤细胞株2D11、3F9分别注入不同的雌鼠体内,收集腹水,将腹水中的抗体纯化,即得肿瘤蛋白P185单克隆抗体2D11、3F9。所述的洗涤液是由10g的Na₂HPO₄·12H₂O、50g的NaCl、5g的NaH₂PO₄·2H₂O加入纯化水溶解定容至5000ml所得。

[0013] 实施例2:一种肿瘤试剂盒,包括肿瘤蛋白P185单克隆抗体、酶标板、阳性对照品、阴性对照品、洗涤液、终止液、钙网蛋白(CRT)的特异性抗体、辣根过氧化物酶-链亲和素及其显色底物,所述的肿瘤蛋白P185单克隆抗体包括包被在酶标板上的肿瘤蛋白P185单克隆抗体和生物素标记的肿瘤蛋白P185单克隆抗体。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。所述的包被在酶标板上的肿瘤蛋白P185单克隆抗体为肿瘤蛋白P185单克隆抗体2D11,所述的生物素标记的肿瘤蛋白P185单克隆抗体为肿瘤蛋白P185单克隆抗体3F9,肿瘤蛋白P185单克隆抗体2D11、3F9的制备步骤如下:a)以N1H/3T3细胞i.p免疫第一批7周的BaLb/C雌鼠,得到雌鼠的抗N1H/3T3血清;b)收集长至汇合的T6-17细胞,用PBS缓冲液洗1次,将上述制备的抗N1H/3T3抗血清用PBS缓冲液以1:200稀释,然后取1ml加入T6-17细胞中,在8℃条件下温育过夜,期间晃动盛放T6-17细胞的试管7次,然后再用PBS缓冲液洗1次,得到悬浮于PBS缓冲液中的T6-17细胞;c)用上述悬浮于PBS缓冲液中的T6-17细胞i.p免疫第二批7周的BaLb/C雌鼠,然后取雌鼠的脾细胞制成细胞悬液;d)用ELISA法从上述细胞悬液中筛选出分泌肿瘤蛋白P185单克隆抗体的杂交瘤细胞,并对杂交瘤细胞进行克隆化,从而得到两株具有稳定分泌肿瘤蛋白P185单克隆抗体能力的杂交瘤细胞株,分别命名为杂交瘤细胞株2D11、杂交瘤细胞株3F9;e)将杂交瘤细胞株2D11、3F9分别注入不同的雌鼠体内,收集腹水,将腹水中的抗体纯化,即得肿瘤蛋白P185单克隆抗体2D11、3F9。所述的洗涤液是由10g的Na₂HPO₄·12H₂O、50g的NaCl、5g的NaH₂PO₄·2H₂O加入纯化水溶解定容至5000ml所得。

[0014] 对于本领域技术人员而言,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下,能够以其他的具体形式实现本发明。因此,无论从哪一点来看,均应将实施例看作是示范性的,而且是非限制性的,本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。此外,应当理解,虽然本说明书按照实施方式加以描述,但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案,说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见,本领域技术人员应当将说明书作为一个整体,各实施例中的技术方案也可以经适当组合,形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。

专利名称(译)	一种肿瘤试剂盒		
公开(公告)号	CN107462706A	公开(公告)日	2017-12-12
申请号	CN201710647826.0	申请日	2017-08-01
[标]发明人	邓鑫		
发明人	邓鑫		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种肿瘤试剂盒，包括肿瘤蛋白P185单克隆抗体、酶标板、阳性对照品、阴性对照品、洗涤液、终止液、钙网蛋白(CRT)的特异性抗体、辣根过氧化物酶-链亲和素及其显色底物，所述的肿瘤蛋白P185单克隆抗体包括包被在酶标板上的肿瘤蛋白P185单克隆抗体和生物素标记的肿瘤蛋白P185单克隆抗体。本发明能够简便、高通量且高灵敏度地检测人体血清中的肿瘤蛋白P185水平。