



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103954761 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 30

(21) 申请号 201410162945. 3

(22) 申请日 2014. 04. 22

(71) 申请人 广州恒泰生物科技有限公司

地址 510663 广东省广州市广州经济技术开发区科学城掬泉路3号广州国际企业孵化器D区401号

(72) 发明人 余跃飞 罗喜平 王晓娟

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

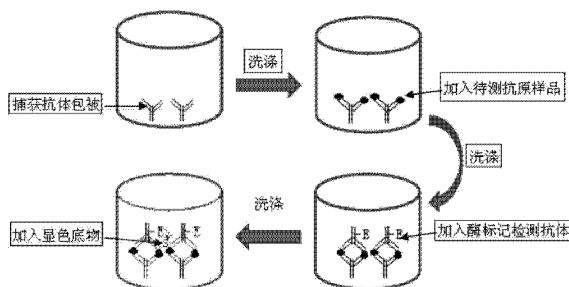
权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54) 发明名称

用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒及其检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒,包括半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白、癌抗原-125和人附睾蛋白4分别制得的单克隆抗体;所述试剂盒还包括检测抗体,所述检测抗体包括半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白、癌抗原-125和人附睾蛋白4分别制得的多克隆抗体。本发明的有益效果如下:最全面的检测卵巢癌,能够更好的判断绝经前或绝经后盆腔肿块的良好性,更好地对妇科良性卵巢肿块和囊肿与卵巢癌进行鉴别诊断,具有灵敏度高准确性强的特点,其灵敏度及准确性均达到96%以上。



1. 用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒,包括捕获抗体,其特征在于,所述捕获抗体包括半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白和癌抗原-125 分别制得的单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒,其特征在于,所述捕获抗体还包括人附睾蛋白4 制得的单克隆抗体。

3. 根据权利要求2所述的用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括检测抗体,所述检测抗体包括半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白、癌抗原-125 和人附睾蛋白4 分别制得的多克隆抗体。

4. 根据权利要求3所述的用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 抗原的制备:将半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白、癌抗原-125 和人附睾蛋白4 基因克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到所需的抗原;

(2) 捕获抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物得到相应的单克隆抗体,所述单克隆抗体作为本试剂盒的捕获抗体;

(3) 检测抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物得到相应的多克隆抗体,所述多克隆抗体作为本试剂盒的检测抗体;

(4) 捕获抗体包被:

①. 用碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液将浓度为 $1\mu\text{g/ml}$ 的捕获抗体包被微量滴定板的孔内;

②. 封盖微量滴定板并在 4°C 下孵育过夜;

③. 弃去包被液,并用洗涤液洗涤微量滴定板两次,每次在微孔中加入 $200\mu\text{l}$ PBST,除去剩余的液滴,晾干放于 4°C 环境中;

(5) 封闭

①. 在微量滴定板的每个孔添加 $200\mu\text{l}$ 封闭缓冲液,封闭包被孔中剩余的蛋白质结合位点;

②. 封盖微量滴定板并在 37°C 下孵育至少1小时;

(6) 加样

①. 将 $100\mu\text{l}$ 的样品添加到每个孔,在 37°C 下孵育60分钟;

②. 弃去样品,并洗涤微量滴定板三次,每次在微孔中加入 $200\mu\text{l}$ PBST;

③. 将 $100\mu\text{l}$ 浓度为 $0.5\mu\text{g/ml}$ 的检测抗体添加到每个孔;

④. 封盖微量滴定板并在 37°C 下孵育1小时;

⑤. 用 PBST 洗涤微量滴定板四次;

⑥. 添加 $100\mu\text{l}$ 标记二抗;

⑦. 封盖微量滴定板并在 37°C 下孵育1小时;

⑧. 用 PBST 洗涤微量滴定板四次。

(7) 检测

①. 将 TMB 溶液添加到每个孔,孵育15-30分钟,添加等体积的终止液,然后在 450nm 处读取光密度。

用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒及其检测方法

技术领域：

[0001] 本发明涉及癌症诊断检测用的试剂盒领域，具体为一种用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒及其检测方法。

背景技术：

[0002] 卵巢恶性肿瘤是女性生殖器官常见的恶性肿瘤之一，是指生长在卵巢上的恶性肿瘤，其中 90%~95% 为卵巢原发性的癌。就诊时 60%~70% 已为晚期，而晚期病例又疗效不佳。因此，虽然卵巢癌的发病率低于宫颈癌和子宫内膜癌居妇科恶性肿瘤的第三位，但死亡率却超过宫颈癌及子宫内膜癌之和，高居妇科癌症首位，是严重威胁妇女健康的最大疾患。

[0003] 由于卵巢的胚胎发育、组织解剖及内分泌功能较复杂，早期症状不典型，术前鉴别卵巢肿瘤的组织类型及良恶性相当困难，所以卵巢癌无论在诊断和治疗上确是一大难题。到目前为止，就国内外临床资料统计，其五年生存率仅 25% 左右。但是如果发现得早，90% 的病人都能活下来；卵巢癌 5 年内的复发率可高达 80%，且复发时间主要集中在治疗期的 3 年内。在女性的一生中，每五位女性就会有一位出现盆腔肿块，需要接受检查来排除恶性肿瘤的可能性。目前，卵巢癌的诊断主要依据两种检测手段。一种是经阴道超声检查 (TUV)。这种成像方法可用于检查女性的生殖器官，包括子宫、卵巢、宫颈及阴道。尽管其应用较为普遍，但是这种方法并不能准确检测出该肿块是良性还是恶性。此外，该方法还需要经验丰富的临床技师对检测结果进行解读。另一种常规检测方法是检测肿瘤标志物 CA125，这种方法被视为卵巢癌诊断的“金标准”。但是，CA125 的特异性及敏感度较低，容易出现假阴性或假阳性。大约 50% 的卵巢癌 I 期患者并没有 CA125 水平升高的现象，也就是说有一半的卵巢癌患者可能被漏诊。某些良性卵巢疾病也会导致 CA125 水平升高，造成假阳性。因此，在临床诊断上亟需一种更好的诊断工具以尽早诊断卵巢癌。

[0004] 肿瘤标志物 (tumor markers, TM) 是指在肿瘤发生和增殖过程中，由肿瘤细胞本身合成、释放，或由机体对肿瘤细胞反应而产生的标志肿瘤存在和生长的一类物质。这些物质在正常成人中不存在或者是在癌症患者中出现的水平显著高于正常人。目前肿瘤标志物检测技术被认为是早期发现无症状微灶肿瘤的唯一途径，这一检测技术可先于 X 光片、超声、CT、MRI 或 PET-CT 等物理检查发现肿瘤。可用于高危人群恶性肿瘤的筛查，肿瘤诊断与鉴别诊断，评估治疗的效果，预测或监视肿瘤复发或转移。目前，医院出现的卵巢癌诊断试剂盒是检测常见的肿瘤标记物，灵敏性及准确性都偏低，即使联检也只 70% 左右，难以满足早期快速诊断的要求。

[0005] 由于市场上还没有针对卵巢癌的快速高效诊断试剂盒问世，严重影响到卵巢癌早期发现及治疗，卵巢癌患者确诊时往往已处于癌症晚期，错过了最佳治疗时机，大大降低了患者的生存率。如果卵巢癌能被早期诊断，可以极大地提高患者的生存率。

发明内容：

[0006] 本发明的目的是针对以上述卵巢癌诊断存在的不足,提供一种灵敏度高,准确性强的用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒。

[0007] 本发明另一目的是提供一种用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒的检测方法。

[0008] 为了实现本发明目的,本发明采取的技术方案是:用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒,包括捕获抗体,所述捕获抗体包括半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白(TTR)和癌抗原-125(CA-125)分别制得的单克隆抗体。

[0009] 所述捕获抗体还包括人附睾蛋白4(HE4)制得的单克隆抗体。

[0010] 所述试剂盒还包括检测抗体,所述检测抗体包括半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白(TTR)、癌抗原-125(CA-125)和人附睾蛋白4(HE4)分别制得的多克隆抗体。

[0011] 所述捕获抗体为将半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白(TTR)、癌抗原-125(CA-125)和人附睾蛋白4(HE4)克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到相应的抗原,将所述抗原免疫哺乳动物得到的相应单克隆抗体。

[0012] 所述捕获抗体的制备方法包括的步骤如下:

[0013] (1) 抗原的制备:把半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白(TTR)、癌抗原-125(CA-125)和人附睾蛋白4(HE4)基因克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到抗原,此抗原也可作为标准品用;

[0014] (2) 捕获抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物,得到相应的单克隆抗体为捕获抗体。

[0015] 所述检测抗体为将半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白(TTR)、癌抗原-125(CA-125)和人附睾蛋白4(HE4)克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到相应的抗原,将所述抗原免疫哺乳动物得到的相应多克隆抗体。

[0016] 所述检测抗体的制备方法包括的步骤如下:

[0017] (1) 抗原的制备:把半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白(TTR)、癌抗原-125(CA-125)和人附睾蛋白4(HE4)基因克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到抗原,此抗原也可作为标准品用;

[0018] (2) 检测抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物,得到相应的多克隆抗体为检测抗体。

[0019] 所述捕获抗体预先包被于微量滴定板的孔内,可以简化步骤,提高检测效率。

[0020] 用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒的制备方法,其包括以下步骤:

[0021] (1) 抗原的制备:将半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白(TTR)、癌抗原-125(CA-125)和人附睾蛋白4(HE4)基因克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到所需的抗原,其中,所述抗原也可作为标准品用;

[0022] (2) 捕获抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物得到相应的单克隆抗体,所述单克隆抗体作为本试剂盒的捕获抗体;

[0023] (3) 检测抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物得到相应的多克隆抗体,所述多克隆抗体作为本试剂盒的检测抗体;

[0024] (4) 捕获抗体包被:

[0025] ①. 用碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液(pH9.6)将浓度为 $1\mu\text{g/ml}$ 的捕获抗体包被微量滴定板的孔;②. 封盖微量滴定板并在 4°C 下孵育过夜;③. 弃去包被液(碳酸盐/碳酸氢

盐缓冲液稀释的捕获抗体),并用洗涤液洗涤微量滴定板两次,每次在微孔中加入 200 μ l PBST(磷酸盐吐温缓冲液),在水槽上方轻轻甩动微量滴定板,除去洗涤液,在纸巾上轻拍微量滴定板,除去剩余的液滴,晾干放于 4℃环境中备用。

[0026] (5) 封闭和加样:每孔添加 200 μ l 封闭缓冲液(1.2% BSA/PBS),封闭包被孔中剩余的蛋白质结合位点。

[0027] 用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒的检测方法,其包括以下步骤:

[0028] (1) 抗原的制备:将半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白(TTR)、癌抗原-125(CA-125)和人附睾蛋白4(HE4)基因克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到所需的抗原;

[0029] (2) 捕获抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物得到相应的单克隆抗体,所述单克隆抗体作为本试剂盒的捕获抗体;

[0030] (3) 检测抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物得到相应的多克隆抗体,所述多克隆抗体作为本试剂盒的检测抗体;

[0031] (4) 捕获抗体包被:

[0032] ①. 用碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液(pH9.6)将浓度为 1 μ g/ml 的捕获抗体包被微量滴定板的孔;

[0033] ②. 封盖微量滴定板并在 4℃下孵育过夜;

[0034] ③. 弃去包被液(碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液稀释的捕获抗体),并用洗涤液洗涤微量滴定板两次,每次在微孔中加入 200 μ l PBST(磷酸盐吐温缓冲液),在水槽上方轻轻甩动微量滴定板,除去洗涤液,在纸巾上轻拍微量滴定板,除去剩余的液滴,晾干放于 4℃环境中备用。

[0035] (5) 封闭

[0036] ①. 在微量滴定板的每个孔添加 200 μ l 封闭缓冲液(1.2% BSA/PBS),封闭包被孔中剩余的蛋白质结合位点;

[0037] ②. 封盖微量滴定板并在 37℃下孵育至少 1 小时,优选的,孵育过夜;

[0038] (6) 加样

[0039] ①. 将 100 μ l 的样品添加到每个孔,在 37℃下孵育 60 分钟;要得到准确的定量结果,通常做法是比较未知样品与标准曲线的信号。每个酶标板都必须测定标准品(两重测定或三重测定)和空白样,以确保准确性;

[0040] ②. 弃去样品,并洗涤微量滴定板三次,每次在微孔中加入 200 μ l PBST(磷酸盐吐温缓冲液);

[0041] ③. 将 100 μ l 浓度为 0.5 μ g/ml 的检测抗体添加到微量滴定板的每个孔;

[0042] ④. 封盖微量滴定板并在 37℃下孵育 1 小时;

[0043] ⑤. 用 PBST 洗涤微量滴定板四次;

[0044] ⑥. 添加 100 μ l 标记二抗;

[0045] ⑦. 封盖微量滴定板并在 37℃下孵育 1 小时。

[0046] ⑧. 用 PBST 洗涤微量滴定板四次。

[0047] (7) 检测

[0048] ①. 将 TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)溶液添加到每个孔,孵育 15-30 分钟,添

加等体积的终止液,然后在 450nm 处读取光密度。

[0049] ②. 由系列稀释液得到的数据绘制标准曲线,浓度标在 X 轴(对数标度)上,而吸光度标在 Y 轴(线性标度)上。通过内插法在此标准曲线上得出样品浓度。

[0050] 本发明从众多的肿瘤标记物中,筛选出 4 个肿瘤标记物——半乳糖凝集素-3(Galectin-3),转甲状腺素蛋白(TTR),人附睾蛋白 4(HE4)及癌抗原-125(CA-125)组成卵巢癌快速诊断试剂盒。其中,转甲状腺素蛋白(TTR)又被称为前白蛋白(PA),是一种由肝脏、脉络丛和眼产生的蛋白,它与转运甲状腺素和维生素 A 代谢有关。在肝脏受到损伤的病人的血清中 TTR 的含量明显降低。肝癌中 TTR 基因转录受阻,并在基因结构上存在缺陷。而且 TTR 对肿瘤细胞的生长有明显的抑制作用,因此 TTR 基因是一种抑癌基因。由于血浆中提取 TTR 产量低、步骤繁琐,所以我们用基因工程分子克隆的方法可大量生产 TTR 研发本试剂盒。半乳糖凝集素-3(Galectin-3)是一种半乳糖结合蛋白,是 Galectin 家族中唯一具有嵌合结构的成员。半乳糖凝集素-3(Galectin-3)广泛分布于肿瘤组织中,半乳糖凝集素-3 的表达同其肿瘤的侵袭和转移密切相关。Galectin-3 可与细胞表面糖基化的 CD98 结合促使整合素在细胞表面聚集成簇,间接增强整合素与其配体的亲和力;也能直接结合整合素 $\alpha 1 \beta 1$ 和 CD11b/18,正性或负性调节整合素的活性,影响整合素与细胞外配体的结合。Galectin-3 还可以增加整合素在细胞表面的表达,并促进胶原在细胞间隔的分泌。由于半乳糖凝集素-3 对多聚糖有亲和力,它也可以直接结合糖基化的细胞外基质成分,介导细胞与基质的黏附。我们的研究显示卵巢癌患者血清中 Galectin-3 水平明显超过健康人群。人附睾蛋白 4(HE4)是一种新的肿瘤标志物。正常生理情况下,HE4 在呼吸道、生殖系统和卵巢组织中有非常低水平的表达,但在很多卵巢癌组织和患者血清中高度表达。癌抗原-125(CA-125 或糖链抗原-125),也被称为粘蛋白-16,是被 MUC16 基因所编码的蛋白质,是从上皮性卵巢癌抗原检测出可被单克隆抗体 OC125 结合的一种糖蛋白。CA-125 对卵巢癌的早期检测的潜在作用是有争议的,尚未广泛用于在无症状妇女筛选。使用 CA-125 这一生物标志物的主要问题是它缺乏敏感性,特别是在检测卵巢癌时其缺乏特异性,尤其是在绝经前妇女的早期阶段。这些限制意味着,CA-125 测试卵巢癌往往给人误报,让病人焦虑,从而做进一步不必要的筛选(有时包括手术)。此外,这些限制意味着,许多早期卵巢癌的妇女将收到来自 CA-125 检测假阴性,并没有得到自己的病情进一步治疗。美国食品药品监督管理局(FDA)批准的可用于临床的卵巢癌血清标志物包括 CA125 和 HE4,两者的联合使用对卵巢癌的总敏感性和特异性分别为 76% 和 95%,但用于卵巢癌的早期诊断缺乏足够的敏感性和特异性。

[0051] 与现有技术相比,本发明的有益效果如下:最全面的检测卵巢癌,能够更好的判断绝经前或绝经后盆腔肿块的良好性,更好地对妇科良性卵巢肿块和囊肿与卵巢癌进行鉴别诊断,具有灵敏度高准确性强的特点,其灵敏度及准确性均达到 96% 以上。

附图说明

[0052] 图 1 是本发明用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒的原理图;

[0053] 图 2 是本发明用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒在卵巢癌治疗前后血中检测到 Galectin-3 的变化对比图;

[0054] 图 3 是本发明用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒在卵巢癌治疗前后血中检测到

TTR 的变化对比图；

[0055] 图 4 是本发明用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒在卵巢癌治疗前后血中检测到 HE4 的变化对比图；

[0056] 图 5 是本发明用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒在卵巢癌治疗前后血中检测到 CA125 的变化对比图。

具体实施方式

[0057] 以下结合附图和具体实施例对本发明用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒进行详细的描述说明。

[0058] 用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒,包括捕获抗体,捕获抗体封闭缓冲液,标准品,标记抗体,洗涤液及显色液等。所述标记抗体选用 HRP 标记二抗。所述捕获抗体包括半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白 (TTR) 和癌抗原-125 (CA-125) 分别制得的单克隆抗体;通过对半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白 (TTR) 和癌抗原-125 (CA-125) 的共同快速检测,可以有效的提高检测准确率和灵敏度,有效的克服单凭检测癌抗原-125 (CA-125) 导致的不足。

[0059] 所述捕获抗体还包括和人附睾蛋白 4 (HE4) 制得的单克隆抗体,通过检测半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白 (TTR)、癌抗原-125 (CA-125) 和人附睾蛋白 4 (HE4),使其灵敏度及准确性均达到 96% 以上,这个是现有试剂盒不可比拟的,可以快速准确的诊断卵巢癌,极大地提高患者的生存率。

[0060] 所述捕获抗体为将半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白 (TTR)、癌抗原-125 (CA-125) 和人附睾蛋白 4 (HE4) 克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到相应的抗原,将所述抗原免疫哺乳动物得到的相应单克隆抗体。

[0061] 所述捕获抗体的制备方法包括的步骤如下:

[0062] (1) 抗原的制备:通过分子克隆的方法把半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白 (TTR)、癌抗原-125 (CA-125) 和人附睾蛋白 4 (HE4) 基因克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到抗原,此抗原也可作为标准品用;所述抗原的制备也可以使用现有常规方法制备,在此不再累赘。

[0063] (2) 捕获抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物,得到相应的单克隆抗体为捕获抗体。所述哺乳动物是小鼠及兔子,优选小鼠。所述捕获抗体的制备也可以使用现有常规方法制备,在此不再累赘。

[0064] 所述检测抗体包括半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白 (TTR)、癌抗原-125 (CA-125) 和人附睾蛋白 4 (HE4) 分别制得的多克隆抗体。

[0065] 所述检测抗体为将半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白 (TTR)、癌抗原-125 (CA-125) 和人附睾蛋白 4 (HE4) 克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到相应的抗原,将所述抗原免疫哺乳动物得到的相应多克隆抗体。所述检测抗体的制备方法包括的步骤如下:

[0066] (1) 抗原的制备:通过分子克隆的方法把半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白 (TTR)、癌抗原-125 (CA-125) 和人附睾蛋白 4 (HE4) 基因克隆到真核表达载体,并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达,纯化后得到抗原,此抗原也可作为标准品用;

[0067] (2) 检测抗体的制备：将上述抗原免疫哺乳动物，得到相应的多克隆抗体为检测抗体。所述哺乳动物是小鼠及兔子，优选兔子。

[0068] 其中，所述捕获抗体可以预先包被于 PVC 材质的微量滴定板的孔内，可以简化步骤，提高检测效率。

[0069] 用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒的制备方法，其包括以下步骤：

[0070] (1) 抗原的制备：通过分子克隆的方法将半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白 (TTR)、癌抗原-125 (CA-125) 和人附睾蛋白 4 (HE4) 基因克隆到真核表达载体，并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达，纯化后得到所需的抗原，其中，所述抗原也可作为标准品用；

[0071] (2) 捕获抗体的制备：将上述抗原免疫哺乳动物得到相应的单克隆抗体，所述单克隆抗体作为本试剂盒的捕获抗体；

[0072] (3) 检测抗体的制备：将上述抗原免疫哺乳动物得到相应的多克隆抗体，所述多克隆抗体作为本试剂盒的检测抗体；

[0073] (4) 捕获抗体包被：

[0074] ①. 用碳酸盐 / 碳酸氢盐缓冲液 (pH9.6) 将浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$ 的捕获抗体包被于微量滴定板的孔内；

[0075] ②. 用粘合塑料制品封盖微量滴定板并在 4°C 下孵育过夜；

[0076] ③. 弃去包被液 (碳酸盐 / 碳酸氢盐缓冲液稀释的捕获抗体)，并用洗涤液洗涤微量滴定板两次，每次在微孔中加入 $200 \mu\text{l}$ PBST (磷酸盐吐温缓冲液)，在水槽上方轻轻甩动微量滴定板，除去洗涤液，在纸巾上轻拍微量滴定板，除去剩余的液滴，晾干放于 4°C 环境中备用；所述洗涤液为 PBS (磷酸盐缓冲液) 中加入一定量的 Tween20，所述 Tween20 的质量百分比浓度为 0.05%；

[0077] (5) 封闭

[0078] ①. 在微量滴定板的每孔添加 $200 \mu\text{l}$ 封闭缓冲液 (为含 1.2% BSA (牛血清白蛋白) 的 PBS (磷酸盐缓冲液))，用于封闭包被孔中剩余的蛋白质结合位点；

[0079] ②. 用粘合塑料制品封盖微量滴定板并在 37°C 下孵育至少 1 小时，优选的，孵育过夜。

[0080] 用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒的检测方法，其包括以下步骤：

[0081] (1) 抗原的制备：通过分子克隆的方法将半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白 (TTR)、癌抗原-125 (CA-125) 和人附睾蛋白 4 (HE4) 基因克隆到真核表达载体，并在哺乳动物细胞中实现蛋白的表达，纯化后得到所需的抗原，其中，所述抗原也可作为标准品用；

[0082] (2) 捕获抗体的制备：将上述抗原免疫哺乳动物得到相应的单克隆抗体，所述单克隆抗体作为本试剂盒的捕获抗体；

[0083] (3) 检测抗体的制备：将上述抗原免疫哺乳动物得到相应的多克隆抗体，所述多克隆抗体作为本试剂盒的检测抗体；

[0084] (4) 捕获抗体包被：

[0085] ①. 用碳酸盐 / 碳酸氢盐缓冲液 (pH9.6) 将浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$ 的捕获抗体包被微量滴定板的孔；

[0086] ②. 用粘合塑料制品封盖微量滴定板并在 4°C 下孵育过夜；

[0087] ③. 弃去包被液 (碳酸盐 / 碳酸氢盐缓冲液稀释的捕获抗体)，并用洗涤液洗涤

微量滴定板两次,每次在微孔中加入 200 μ l PBST(磷酸盐吐温缓冲液,可以是含 0.05%吐温-20 的 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液),在水槽上方轻轻甩动微量滴定板,除去洗涤液,在纸巾上轻拍微量滴定板,除去剩余的液滴,晾干放于 4℃环境中备用;所述洗涤液为 PBS(磷酸盐缓冲液)中加入一定量的 Tween20,所述 Tween20 的质量百分比浓度为 0.05%;

[0088] (5) 封闭

[0089] ①. 在微量滴定板的每个孔添加 200 μ l 封闭缓冲液 (1.2% BSA/PBS),封闭包被孔中剩余的蛋白质结合位点;

[0090] ②. 用粘合塑料制品封盖微量滴定板并在 37℃下孵育至少 1 小时,优选的,在 4℃下孵育过夜;

[0091] (6) 加样

[0092] ①. 将 100 μ l 适当稀释(稀释 20 倍)的样品添加到每个孔,在 37℃下孵育 60 分钟;要得到准确的定量结果,通常做法是比较未知样品与标准曲线的信号。每个酶标板都必须测定标准品(两重测定或三重测定)和空白样,以确保准确性;

[0093] ②. 弃去样品,并洗涤微量滴定板三次,每次在微孔中加入 200 μ l PBST(磷酸盐吐温缓冲液);

[0094] ③. 将 100 μ l 浓度为 0.5 μ g/ml 的检测抗体添加到微量滴定板的每个孔;

[0095] ④. 用粘合塑料制品封盖微量滴定板并在 37℃下孵育 1 小时;

[0096] ⑤. 用 PBST 洗涤微量滴定板四次;

[0097] ⑥. 添加 100 μ l 标记二抗,其在使用前便已在 PBS 中稀释 10000 倍 (1:10000)。所述标记二抗可以为 HRP 标记羊抗兔。

[0098] ⑦. 用粘合塑料制品封盖微量滴定板并在 37℃下孵育 1 小时。

[0099] ⑧. 用 PBST 洗涤微量滴定板四次。

[0100] (7) 检测

[0101] ①. 将 TMB (3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺)溶液添加到每个孔,孵育 15-30 分钟,添加等体积的终止液 (2M H₂SO₄),然后在 450nm 处读取光密度。

[0102] ②. 由系列稀释液得到的数据绘制标准曲线,浓度标在 X 轴(对数标度)上,而吸光度标在 Y 轴(线性标度)上。通过内插法在此标准曲线上得出样品浓度。

[0103] 本发明用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒包括半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白(TTR)、癌抗原-125(CA-125)和人附睾蛋白 4(HE4)四项指标中两项同时升高作为诊断早中期卵巢癌的标准,检测原理如图 1 所示;半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白(TTR)、癌抗原-125(CA-125)和人附睾蛋白 4(HE4)四项指标中两项同时下降作为卵巢癌治疗效果评估的标准。可以用于临床上通过检测血中 3 个肿瘤标记物水平的高低对卵巢癌的治疗效果进行动态评估。另外还可以用于临床上对卵巢癌的复发转移及预后判断的应用;也可用于肺癌早中期快速诊断。

[0104] 近几年本发明人一直从事半乳糖凝集素及其抑制剂与肿瘤相关的研究,取得了许多具有世界先进水平科研成果。半乳糖凝集素-3(Galectin-3)正在成为新的研究热点,世界很多实验室都开始着手这方面的研究。很显然,本发明人在这个领域的研究走在世界的前列。同时,发明人还对 TTR 与卵巢癌的相关性进行了研究,我们的研究表明 Galectin-3 对卵巢癌的敏感性和特异性分别为 78.2%和 82.6%;TTR 对卵巢癌的敏感性和特异性分别

为 65.5%和 85.2%，见下表：

[0105]

标志物	检测数 (例)	准确率 (%)	敏感性 (%)
Galectin-3	58	82.6	78.2
TTR	50	85.2	65.5

[0106] 为了能够尽早对患者进行准确的诊断，我们在此基础上发明了一种最全面的卵巢癌检测方法，使用 Galectin-3，TTR，HE4 与 CA125 联合检测，本联检法还能够更好的判断绝经前或绝经后盆腔肿块的良恶性，更好地对妇科良性卵巢肿块和囊肿与卵巢癌进行鉴别诊断，具体检测效果见下表：

[0107]

名称	检测人数	灵敏度 SN	准确性 SP
卵巢癌早期	120	92%	97%
卵巢癌晚期	135	97%	97%
正常	220	1%	
盆腔良性疾病	108	28%	

[0108] 可见，本试剂盒具有灵敏度高准确性强的特点，其灵敏度及准确性均达到 96% 以上。

[0109] 试验效果说明

[0110] 临床对卵巢癌的治疗效果进行动态评估

[0111] 为确定本试剂盒能否用于对卵巢癌的治疗效果进行动态评估，我们收集了 483 份卵巢癌患者治疗前后的血清。483 个患者的检测结果参见 2-5，结果显示卵巢癌患者治疗前后的血清中 Galectin-3，TTR，HE4 与 CA125 的水平有显著差异。有效治疗后血清中 Galectin-3，TTR，HE4 与 CA125 的水平会大大下降，提示本试剂盒能用于对卵巢癌的治疗效果进行动态评估。

[0112] 以上详细描述了本发明的较佳具体实施例，应当理解，本领域的普通技术无需创造性劳动就可以根据本发明的构思做出诸多修改和变化。因此，凡本技术领域技术人员依本发明构思在现有技术基础上通过逻辑分析、推理或者根据有限的实验可以得到的技术方案，均应该在由本权利要求书所确定的保护范围之内。

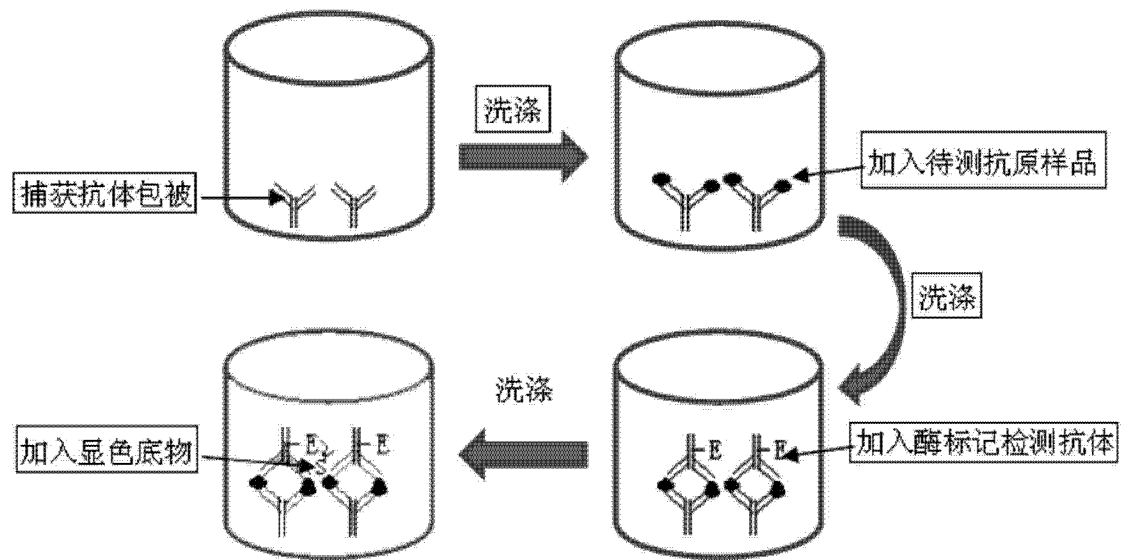


图 1

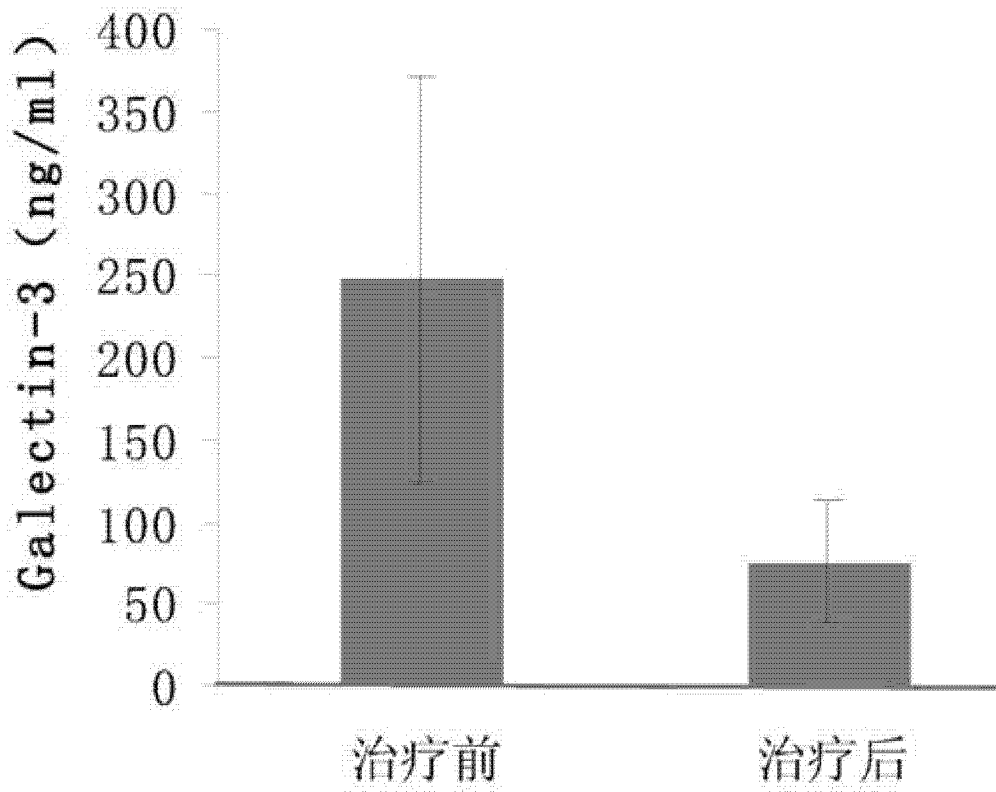


图 2

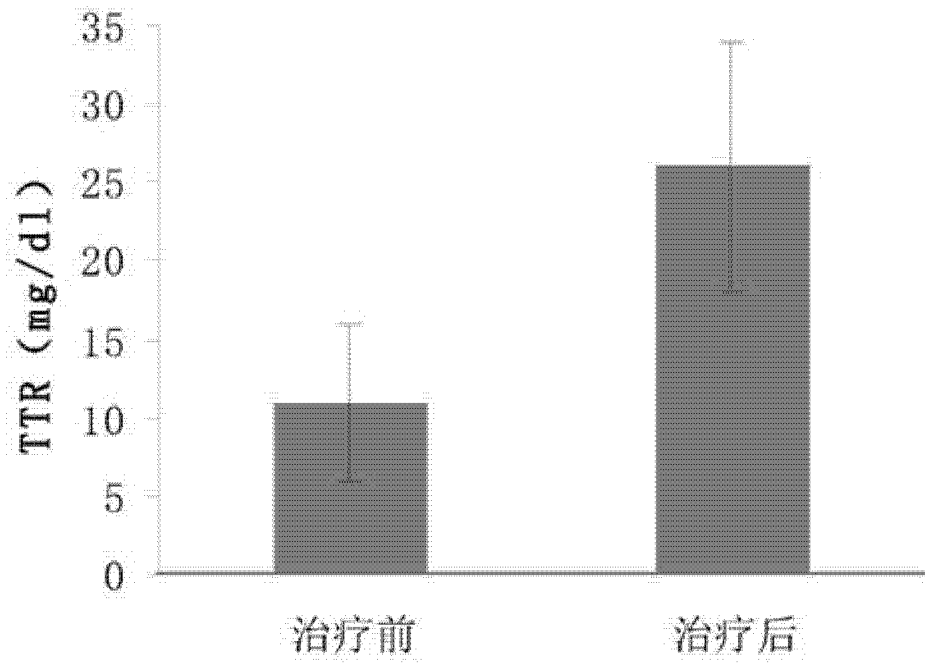


图 3

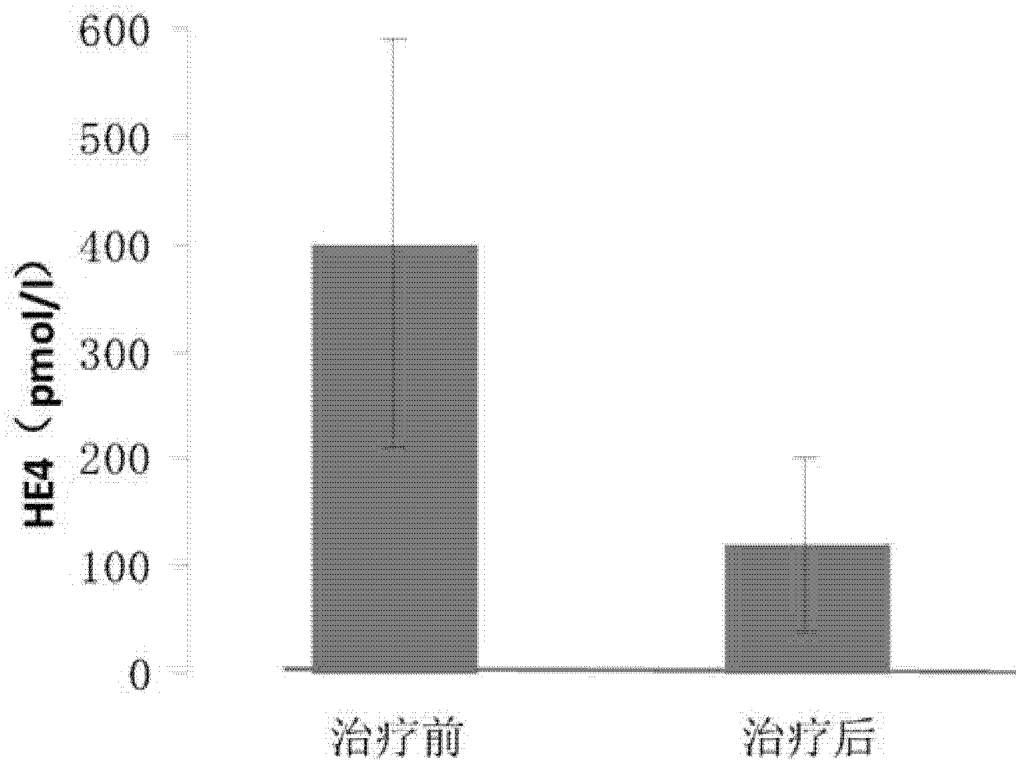


图 4

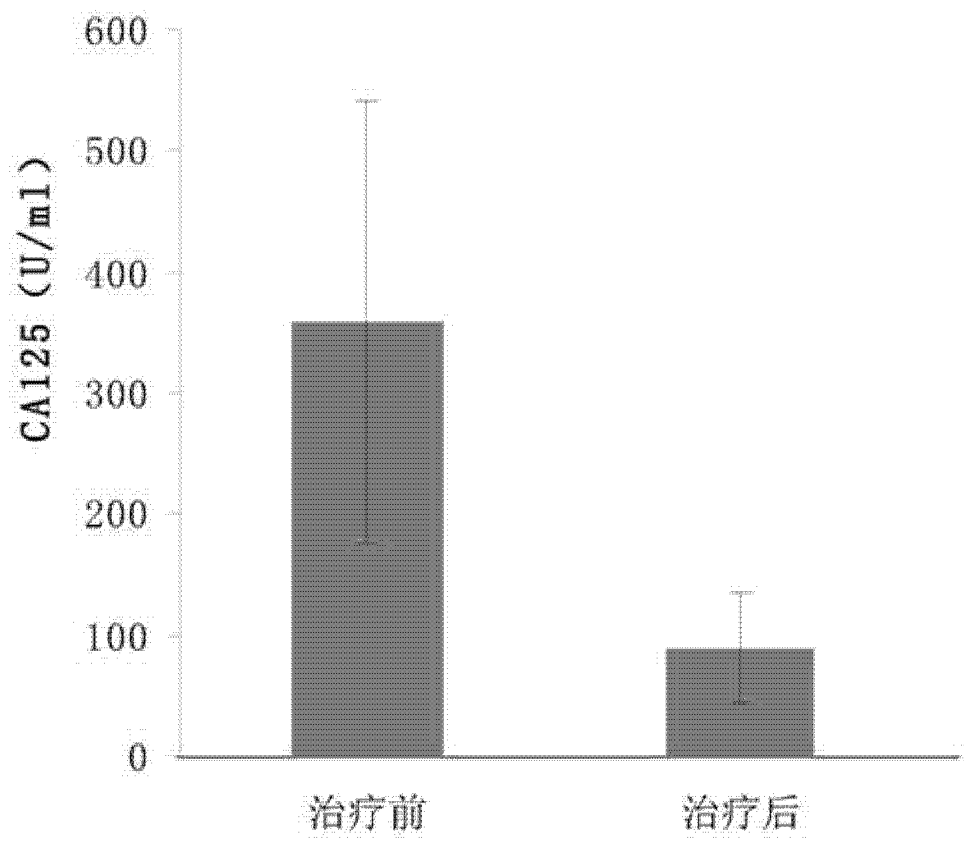


图 5

专利名称(译)	用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN103954761A	公开(公告)日	2014-07-30
申请号	CN201410162945.3	申请日	2014-04-22
[标]申请(专利权)人(译)	广州恒泰生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州恒泰生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州恒泰生物科技有限公司		
[标]发明人	余跃飞 罗喜平 王晓娟		
发明人	余跃飞 罗喜平 王晓娟		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/57449 G01N33/57484 G01N2800/36 G01N2800/52		
其他公开文献	CN103954761B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于卵巢癌早中期快速诊断试剂盒，包括半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白、癌抗原-125和人附睾蛋白4分别制得的单克隆抗体；所述试剂盒还包括检测抗体，所述检测抗体包括半乳糖凝集素-3、转甲状腺素蛋白、癌抗原-125和人附睾蛋白4分别制得的多克隆抗体。本发明的有益效果如下：最全面的检测卵巢癌，能够更好的判断绝经前或绝经后盆腔肿块的良好性，更好地对妇科良性卵巢肿块和囊肿与卵巢癌进行鉴别诊断，具有灵敏度高准确性强的特点，其灵敏度及准确性均达到96%以上。

