



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107703303 A

(43)申请公布日 2018.02.16

(21)申请号 201710724133.7

(22)申请日 2017.08.22

(71)申请人 广州恒泰生物科技有限公司

地址 510000 广东省广州市广州高新技术  
产业开发区科学城开源大道11号A4栋  
第六层602、603单元

(72)发明人 余跃飞

(74)专利代理机构 北京万贝专利代理事务所  
(特殊普通合伙) 11520

代理人 陈领

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

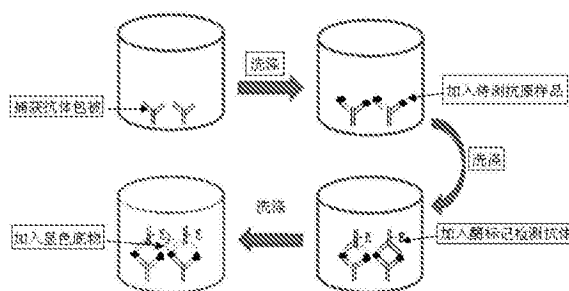
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

### (54)发明名称

用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒

### (57)摘要

本发明公开了一种用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒,肿瘤标记物组分为:半乳糖凝集素、糖链抗原15-3和人类天冬胺酰基B-羟化酶;包括肿瘤标记物标准品、肿瘤标记物单克隆捕获抗体包被的微孔板、辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记的肿瘤标记物单克隆检测抗体、化学发光底物液、浓缩洗涤液。本发明的有益效果如下:具有灵敏度高准确性强的特点,其灵敏度及准确性均达到90%以上,另外可以有效降低检测成本、减少操作步骤和降低检测误差。



1. 用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒,其特征在於,肿瘤标记物组分为:半乳糖凝集素、糖链抗原15-3和人类天冬胺酰基 B-羧化酶。

2. 根据权利要求1所述的用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒,其特征在於,所述试剂盒包括肿瘤标记物标准品、肿瘤标记物单克隆捕获抗体包被的微孔板、辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记的肿瘤标记物单克隆检测抗体、化学发光底物液和浓缩洗涤液。

3. 根据权利要求2所述的用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒,其特征在於,所述辣根过氧化物酶化学发光底物液包含A液和B液,其中A液/B液使用时需要1:1混合。

4. 根据权利要求3所述的用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒,其特征在於,碱性磷酸酶化学发光底物液为金刚烷及其增强剂。

5. 根据权利要求3所述的用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒,其特征在於,所述肿瘤标记物分别制得的单克隆抗体作为捕获抗体;

所述捕获抗体的制备方法包括的步骤如下:

(1) 抗原的制备:把半乳糖凝集素、糖链抗原15-3和人类天冬胺酰基 B-羧化酶基因克隆到原核或真核表达载体,实现蛋白的表达纯化后得到抗原;是为肿瘤标记物校准品;

(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。

6. 根据权利要求3所述的用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒,其特征在於,所述肿瘤标记物分别制得的制得的HRP标记后的多克隆抗体作为检测抗体,

所述检测抗体的制备方法包括的步骤如下:

(1) 抗原的制备:把半乳糖凝集素、糖链抗原15-3和人类天冬胺酰基 B-羧化酶基因克隆到原核或真核表达载体,实现蛋白的表达纯化后得到抗原;是为肿瘤标记物校准品;

(2) 检测抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物,得到相应的单克隆抗体,再经辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记为检测抗体。

7. 根据权利要求6所述的用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒,其特征在於,所述辣根过氧化物酶化学发光底物液包含A液和B液,其中,化学发光底物液A液,包括13mM鲁米诺、0.6mM 4-羟基联苯、0.1mM 4-碘苯硼酸。B液为5mM过氧化脲。

8. 根据权利要求6所述的用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒的制备方法,其特征在於,生物素-链亲和素系统包被抗体,包括以下包被步骤:

A、制备链霉亲和素微孔板:0.05mol/L, pH9.6碳酸盐缓冲液稀释链霉亲和素至15mg/mL,按100uL/孔加入微孔板中,4℃过夜包被;次日取出用0.01mol/L, pH7.4,含0.05%吐温20PBS洗板3次;然后用牛血清白蛋白封闭液室温封闭2小时;

B、制备生物素化单克隆抗体:0.01M PBS将纯化单克隆抗体稀释至1mg/mL,然后用1.5M, pH 9.6CBS将抗体调至偏碱性;称取0.5mg BNHS以0.5mL二甲基亚砜溶解,在1mL待标记抗体种加入BNHS液10uL,室温避光,轻轻搅拌反应4h。标记产物在0.02M PBS中4℃透析过夜,收集标记抗体检测备用;

C、包被生物素化单克隆抗体:将生物素化单克隆抗体稀释至适当浓度,按100uL/孔加入链霉亲和素微孔板中,37℃孵育2小时;

D、封闭:用0.01mol/L, pH7.4,含0.05%吐温20PBS洗板3次,再用蔗糖封闭液37℃孵育30分钟,吸水纸上拍干备用。

## 用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒

### 技术领域：

[0001] 本发明涉及癌症诊断检测用的试剂盒领域，具体为一种用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒。

### 背景技术：

[0002] 乳腺癌是全世界女性最常见的癌病，世界上每年约有50万人死于乳腺癌。在欧美国家，平均每四个女性癌症患者中就有一个罹患的是乳腺癌，可见患病率是极高的。东方女性的好发病年龄多发生在 40~50岁，而西方女性的多好发病年龄在30~40岁。据统计，近年我国乳腺癌发病率的增长速度高出高发国家1~2个百分点。据国家癌症中心和卫生部疾病预防控制中心2012年公布的数据显示：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，乳腺癌已成为当前社会的重大公共卫生问题。临床治疗发现，第一期乳腺癌治疗后的存活率达百分之八十，零期乳腺癌治疗后的存活率更接近百分之百，因此早期发现及治疗非常重要。

[0003] 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，医院出现的乳腺癌诊断试剂盒都是检测一些常见的肿瘤标记物，灵敏性及准确性都偏低。因主要是选定的肿瘤标记物单项检测往往有很大的局限性，难以满足早期快速诊断的要求。

[0004] 目前，市场上还没有针对乳腺癌的快速高效诊断试剂盒问世，严重影响到乳腺癌早期发现及治疗。

### 发明内容：

[0005] 本发明的目的是针对以上述现有乳腺癌诊断存在的不足，提供一种灵敏度高、准确性强且使用方便高效的用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒。

[0006] 为了实现本发明目的，本发明采取的技术方案是：用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒，肿瘤标记物组分为：半乳糖凝集素、糖链抗原15-3和人类天冬酰胺基 B-羟化酶。

[0007] 所述试剂盒包括肿瘤标记物标准品、肿瘤标记物单克隆捕获抗体包被的微孔板、辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记的肿瘤标记物单克隆检测抗体、化学发光底物液和浓缩洗涤液。

[0008] 所述辣根过氧化物酶的化学发光底物液包含A液和B液，其中A液/B液使用时需要1:1混合。

[0009] 所述碱性磷酸酶的化学发光底物液为金刚烷及其增强剂。

[0010] 所述肿瘤标记物分别制得的单克隆抗体作为捕获抗体。

[0011] 所述肿瘤标记物分别制得的HRP标记后的多克隆抗体作为检测抗体。

[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、糖链抗原15-3和人类天冬酰胺基 B-羟化酶基因克隆到原核或真核表达载体，实现蛋白的表达纯化后得到抗原；是为肿瘤标记物校准品。

[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] 所述检测抗体的制备方法包括的步骤如下：

[0016] (1) 抗原的制备：把半乳糖凝集素、糖链抗原15-3和人类天冬酰胺基 B-羟化酶基因克隆到原核或真核表达载体，实现蛋白的表达纯化后得到抗原；是为肿瘤标记物校准品。

[0017] (2) 检测抗体的制备：将上述抗原免疫哺乳动物，得到相应的单克隆抗体，再经辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记为检测抗体。

[0018] 所述捕获抗体预先包被于微量滴定板的孔内。采用生物素-链亲合素系统包被抗体。

[0019] 所述辣根过氧化物酶化学发光底物液包含A液和B液，其中，化学发光底物液A液，包括13mM鲁米诺、0.6mM 4-羟基联苯、0.1mM 4-碘苯硼酸。B液为5mM过氧化脲。

[0020] 所述采用生物素-链亲合素系统包被抗体，包括以下包被步骤：A、制备链霉亲和素微孔板：0.05mol/L, pH9.6碳酸盐缓冲液稀释链霉亲和素至15mg/mL，按100uL/孔加入微孔板中，4℃过夜包被。次日取出用0.01mol/L, pH7.4，含0.05%吐温20PBS洗板3次。然后用牛血清白蛋白封闭液室温封闭2小时。

[0021] B、制备生物素化单克隆抗体：0.01M PBS将纯化单克隆抗体稀释至1mg/mL，然后用1.5M, pH 9.6CBS将抗体调至偏碱性。称取 0.5mg BNHS以0.5mL二甲基亚砷溶解，在1mL待标记抗体种加入 BNHS液10uL，室温避光，轻轻搅拌反应4h。标记产物在0.02M PBS 中4℃透析过夜，收集标记抗体检测备用。

[0022] C、包被生物素化单克隆抗体：将生物素化单克隆抗体稀释至适当浓度，按100uL/孔加入链霉亲和素微孔板中，37℃孵育2小时。D、封闭：用0.01mol/L, pH7.4，含0.05%吐温20PBS洗板3次，再用蔗糖封闭液37℃孵育30分钟，吸水纸上拍干备用。

[0023] 本发明从众多的肿瘤标记物中，通过各种不同的排列组合，筛选出3个肿瘤标记物（半乳糖凝集素-3，人类天冬酰胺基β-羟化酶（HAAH），糖链抗原15-315-3（CA15-3）组成乳腺癌快速诊断试剂盒。其中，人类天冬酰胺基β-羟化酶（Human Aspartyl/Asparaginylβ-hydroxylase, HAAH）是胚胎期即存在于细胞内的一种酶，属于依赖α-酮戊二酸双加氧酶家族，可催化特定蛋白中表皮生长因子（EGF）受体样结构域的天冬氨酸或天冬酰胺残基上的β-碳原子羟基化。研究表明HAAH在肿瘤细胞表面的高表达，是一种新型恶性肿瘤高特异性的分子标记物。最近的研究也证实HAAH是乳腺癌的理想标记物。半乳糖凝集素-3（Gal-3）是一种半乳糖结合蛋白，是Glectin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α1β1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。研究显示乳腺癌患者血清中Galectin-3水平明显超过健康人群。CA15-3虽然是比较经典的乳腺癌标志物,多年前已应用于临床,但其灵敏度及准确性还不到50%,显然,仅靠CA15-3检测效果并不理想。

[0024] 与现有技术相比,本发明的有益效果如下:具有灵敏度高准确性强的特点,其灵敏度及准确性均达到90%以上。

#### 附图说明

[0025] 图1是本发明用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒的原理图;

[0026] 图2是本发明用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒在乳腺癌治疗前后血中检测到HAAH的变化对比图;

[0027] 图3是本发明用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒在乳腺癌治疗前后血中检测到Galectin-3的变化对比图;

[0028] 图4是本发明用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒在乳腺癌治疗前后血中检测到CA153的变化对比图;

#### 具体实施方式

[0029] 以下结合附图和具体实施例对本发明用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒进行详细的描述说明。

[0030] 用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒,包括捕获抗体,捕获抗体封闭缓冲液,标准品,标记HRP的检测抗体,洗涤液及显色液等。其中肿瘤标记物组分为:半乳糖凝集素、糖链抗原15-3和人类天冬胺酰基B-羟化酶。捕获抗体包括3种标记物分别制得的单克隆抗体;所述试剂盒包括肿瘤标记物标准品、肿瘤标记物单克隆捕获抗体包被的微孔板、辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记的肿瘤标记物单克隆检测抗体、化学发光底物液、浓缩洗涤液。所述辣根过氧化物酶化学发光底物液包含A液和B液,其中A液/B液使用时需要1:1混合。其中,化学发光底物液A液,包括13mM鲁米诺、0.6mM 4-羟基联苯、0.1mM 4-碘苯硼酸。B液为5mM过氧化脲。所述碱性磷酸酶化学发光底物液为金刚烷及其增强剂。

[0031] 通过检测半乳糖凝集素、糖链抗原15-3和人类天冬胺酰基B-羟化酶,使其灵敏度及准确性均达到90%以上。

[0032] 所述捕获抗体为将半乳糖凝集素、糖链抗原15-3和人类天冬胺酰基B-羟化酶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。

[0033] 所述捕获抗体的制备方法包括的步骤如下:

[0034] (1) 抗原的制备:通过分子克隆的方法把半乳糖凝集素、糖链抗原15-3和人类天冬胺酰基B-羟化酶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。

[0035] (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。

[0036] 所述检测抗体包括半乳糖凝集素、糖链抗原15-3和人类天冬胺酰基 B-羟化酶分别制得的HRP标记后的多克隆抗体。

[0037] 所述检测抗体为将半乳糖凝集素、糖链抗原15-3和人类天冬胺酰基 B-羟化酶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进行HRP标记后的多克隆抗体。所述检测抗体的制备方法包括的步骤如下:

[0038] (1) 抗原的制备:通过分子克隆的方法把半乳糖凝集素、糖链抗原15-3和人类天冬胺酰基 B-羟化酶的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;

[0039] (2) 检测抗体的制备:将上述抗原免疫哺乳动物,得到相应多克隆抗体,再经辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记为检测抗体;

[0040] 所述哺乳动物是小鼠及兔子,优选兔子。对所述多克隆抗体进行 HRP标记可以使用目前常规的现有方法。

[0041] 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。

[0042] 所述捕获抗体预先包被于微量滴定板的孔内。采用生物素-链亲合素系统包被抗体。

[0043] 所述辣根过氧化物酶的化学发光底物液包含A液和B液,其中,化学发光底物液A液,包括13mM鲁米诺、0.6mM 4-羟基联苯、0.1 mM 4-碘苯硼酸。B液为5mM过氧化脲。

[0044] 所述采用生物素-链亲合素系统包被抗体,包括以下包被步骤:A、制备链霉亲和素微孔板:0.05mol/L, pH9.6碳酸盐缓冲液稀释链霉亲和素至15mg/mL,按100uL/孔加入微孔板中,4℃过夜包被。次日取出用0.01mol/L, pH7.4, 含0.05%吐温20PBS洗板3次。然后用牛血清白蛋白封闭液室温封闭2小时。B、制备生物素化单克隆抗体:0.01M PBS将纯化单克隆抗体稀释至1mg/mL,然后用1.5M, pH 9.6CBS将抗体调至偏碱性。称取0.5mg BNHS以0.5mL二甲基亚砷溶解,在1mL待标记抗体种加入BNHS液10μL,室温避光,轻轻搅拌反应4h。标记产物在0.02M PBS中4℃透析过夜,收集标记抗体检测备用。C、包被生物素化单克隆抗体:将生物素化单克隆抗体稀释至适当浓度,按100uL/孔加入链霉亲和素微孔板中,37℃孵育2小时。D、封闭:用0.01mol/L, pH7.4, 含0.05%吐温20PBS 洗板3次,再用蔗糖封闭液37℃孵育30分钟,吸水纸上拍干备用。

[0045] 本发明用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒包括半乳糖凝集素、糖链抗原15-3和人类天冬胺酰基 B-羟化酶三项指标中的两项同时升高作为诊断早中期乳腺癌的标准,检测原理如图1所示;半乳糖凝集素、糖链抗原15-3和人类天冬胺酰基 B-羟化酶三项指标中的两项同时下降作为乳腺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乳腺癌的治疗效果进行动态评估;另外还可以用于临床上对乳腺癌的复发转移及预后判断的应用。

[0046] 试验效果说明

[0047] 双抗体夹心ELISA最佳实验条件的选择

[0048] 包被鼠抗人半乳糖凝集素、糖链抗原15-3和人类天冬胺酰基 B-羟化酶单抗最佳

工作浓度的选择:根据方阵法确定包被浓度为 1 $\mu$ g/mL时,单克隆抗体的OD值为1.03,所以其最佳包被浓度为 1 $\mu$ g/mL。如图2所示,兔抗人半乳糖凝集素、糖链抗原15-3和人类天冬胺酰基 B 一羟化酶多抗最佳工作浓度的选择:随着检测抗体稀释倍数的增加,待测乳腺癌病例血清和正常人血清OD值有递减的趋势,当抗体浓度为1:200时,阳性对照(阳性对照OD值减去空白对照 OD值)与正常对照(正常对照OD值减去空白对照OD值)A450nm之比(简称P/N值)较高,故选择兔抗人抗体最佳工作浓度为1:200。血清摸索的最佳工作浓度为1:25。封闭液摸索最佳工作溶度为 1.2%BSA。

[0049] 临床血清标本检测

[0050] 共检测了400份血清标本,以医院经确诊为乳腺癌1-11期患者血清为阳性对照组(110例),其他良性病患者和正常人群血清为阴性对照组(290例(正常190例,良性病120例)),PBST为空白对照。

[0051] 临床对乳腺癌的治疗效果进行动态评估

[0052] 为确定本试剂盒能否用于对乳腺癌的治疗效果进行动态评估,我们收集了102份乳腺癌患者治疗前后的血清。102个患者的检测结果参见图3-4,结果显示乳腺癌患者治疗前后的血清中半乳糖凝集素、糖链抗原15-3和人类天冬胺酰基 B 一羟化酶的水平有显著差异 ( $P<0.05$ )。有效治疗后血清中半乳糖凝集素、糖链抗原15-3和人类天冬胺酰基 B 一羟化酶的水平会大大下降,提示本试剂盒能用于对乳腺癌的治疗效果进行动态评估。

[0053] 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。

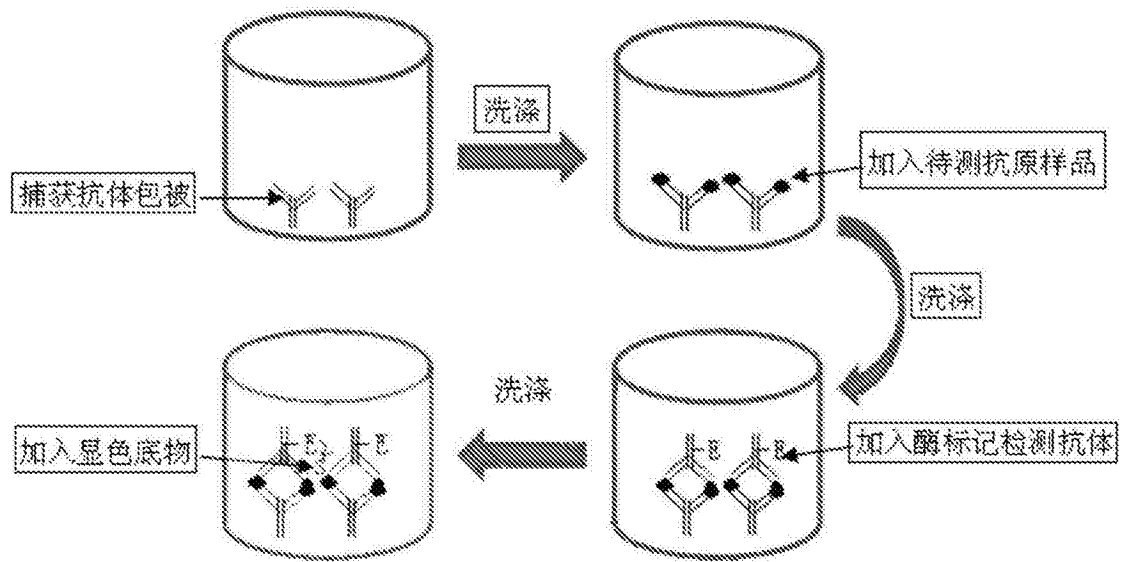


图1

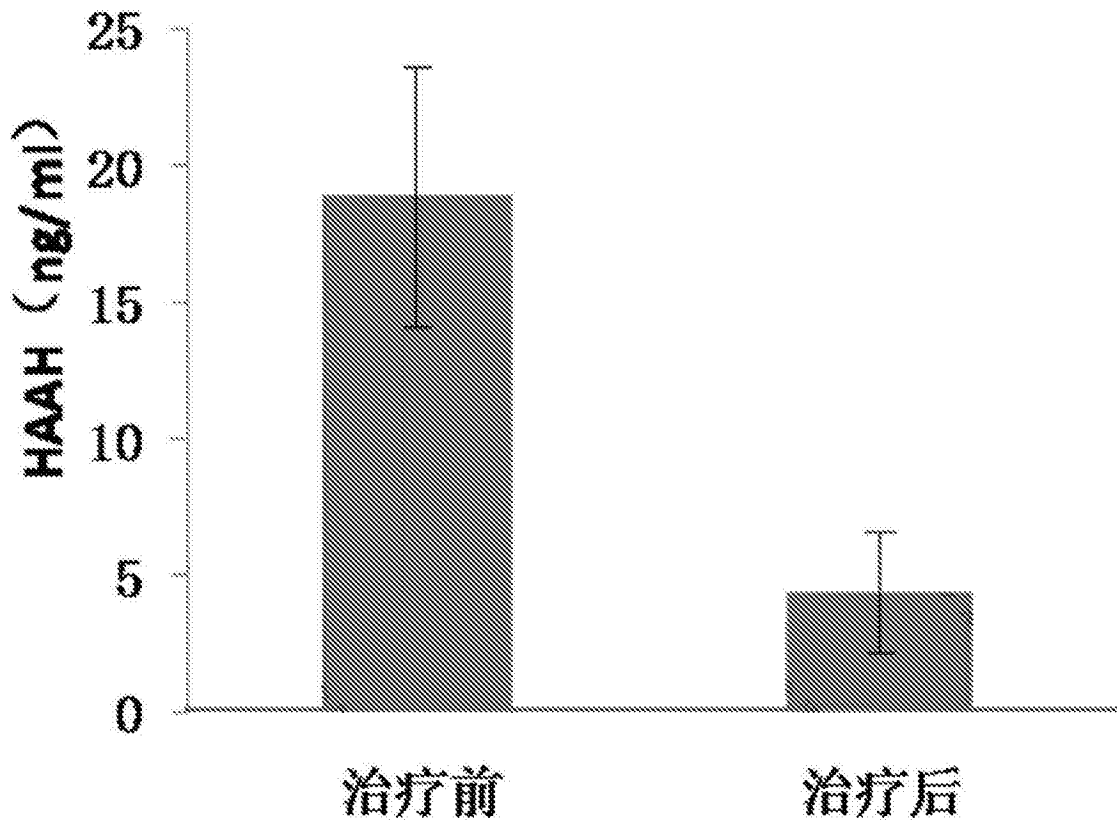


图2



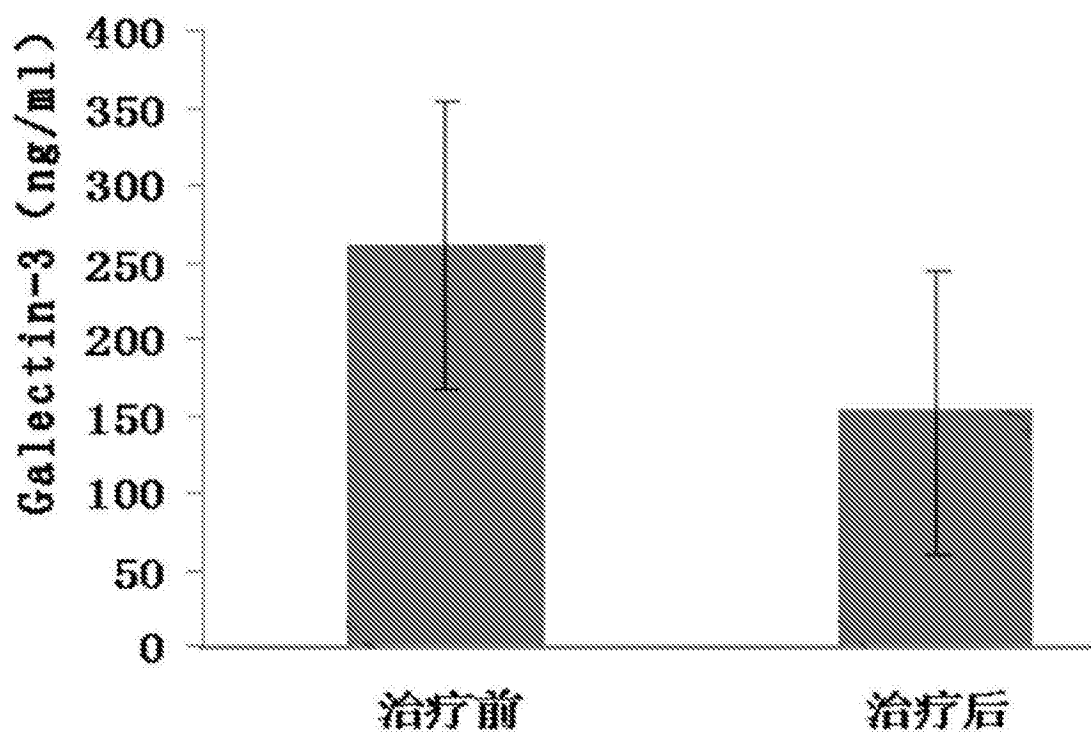


图3

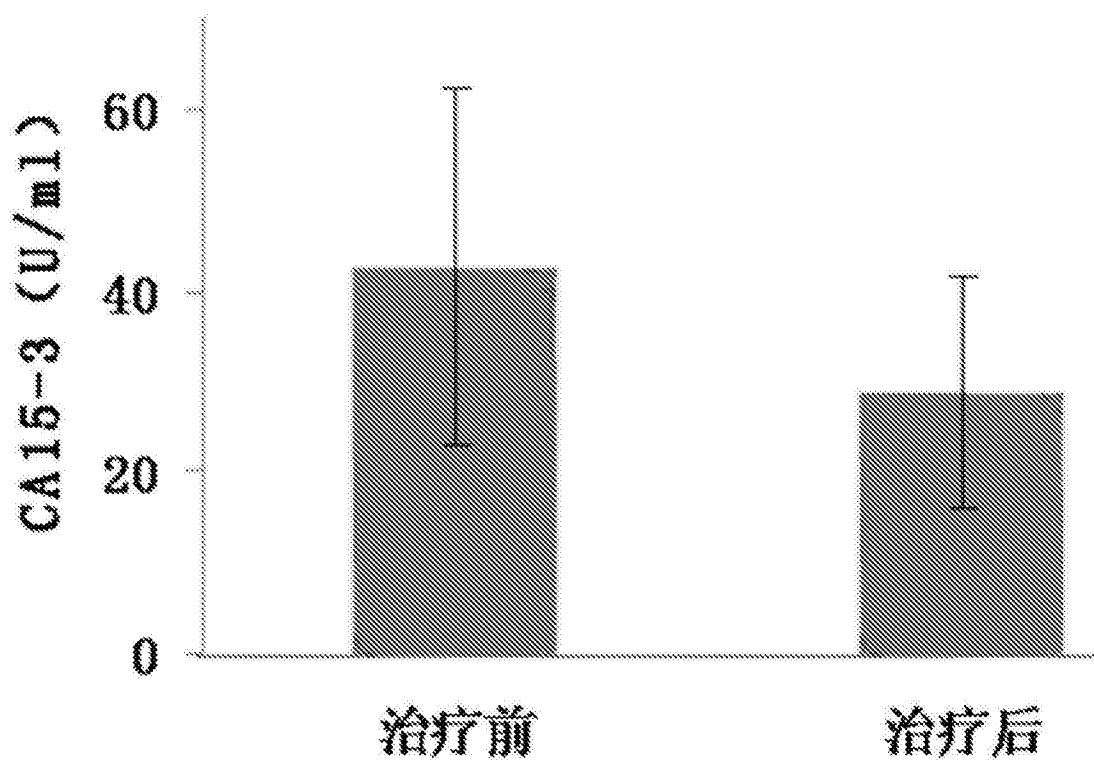


图4

专利名称(译)	用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN107703303A</a>	公开(公告)日	2018-02-16
申请号	CN2017110724133.7	申请日	2017-08-22
[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		
发明人	余跃飞		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/57415 G01N21/76 G01N33/531 G01N33/57484		
代理人(译)	陈领		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种用于乳腺癌早中期快速诊断化学发光试剂盒，肿瘤标记物组分为：半乳糖凝集素、糖链抗原15-3和人类天冬酰胺基B-羟化酶；包括肿瘤标记物标准品、肿瘤标记物单克隆捕获抗体包被的微孔板、辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记的肿瘤标记物单克隆检测抗体、化学发光底物液、浓缩洗涤液。本发明的有益效果如下：具有灵敏度高、准确性强的特点，其灵敏度及准确性均达到90%以上，另外可以有效降低检测成本、减少操作步骤和降低检测误差。

