



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110488014 A

(43)申请公布日 2019.11.22

(21)申请号 201910795791.4

(22)申请日 2019.08.27

(71)申请人 成都和同易创生物科技有限公司

地址 610041 四川省自由贸易试验区成都
高新区益州大道中段888号1栋1号3楼
1号

(72)发明人 黄灿华 黄琛 张涛

(74)专利代理机构 重庆乐泰知识产权代理事务
所(普通合伙) 50221

代理人 娄淑贤

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

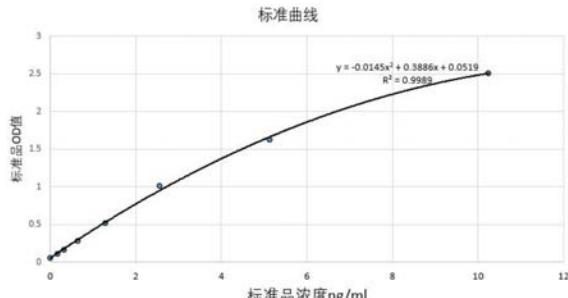
(54)发明名称

一种检测结直肠癌转移潜能的试剂盒及其
使用方法

(57)摘要

本发明涉及癌症转移的预测领域,公开了一种检测结直肠癌转移潜能的试剂盒及其使用方法。所述试剂盒包括使待测样本充分暴露抗原的预处理试剂、用于对待测样本中FGFR4蛋白表达量进行检测的检测试剂以及不同浓度的FGFR4蛋白标准品;所述检测试剂包含荧光标记的FGFR4抗体。本发明通过免疫荧光手段定量的检测血液中FGFR4蛋白的表达量,并与平均值相比,以此来判断结直肠癌转移可能性的方法。本方法对于结直肠癌患者的肿瘤是否转移具有显著的预测价值,从而能有针对性的进行早期干预,提高医疗水平,提高生活质量。

A
CN 110488014



1. 一种检测结直肠癌转移潜能的试剂盒，其特征在于，包括使待测样本充分暴露抗原的预处理试剂、用于对待测样本中FGFR4蛋白表达量进行检测的检测试剂以及不同浓度的FGFR4蛋白标准品；所述检测试剂包含荧光标记的FGFR4抗体。

2. 根据权利要求1所述的一种检测结直肠癌转移潜能的试剂盒，其特征在于，所述FGFR4抗体为人源化单克隆抗体。

3. 根据权利要求1所述的一种检测结直肠癌转移潜能的试剂盒，其特征在于，所述待测样本为血液。

4. 如权利要求3所述的一种检测结直肠癌转移潜能的试剂盒的使用方法，包括以下步骤：

(1) 处理受试者的血液样板，使得上述样本充分暴露抗原；

(2) 将FGFR4单抗与步骤(1)中暴露抗原的样本孵育；

(3) 测定步骤(2)中FGFR4抗体与暴露抗原的结合量；

(4) 将步骤(3)测得的结合量转化为FGFR4蛋白的表达量，与平均值相比，判定受试者结直肠癌的转移风险。

5. 根据权利要4所述的一种检测结直肠癌转移潜能的试剂盒的使用方法，其特征在于，所述步骤(1)中血液样本的处理方法包括以下步骤：

① 将采取的血液样品试管呈最大斜面倾斜，并置室温或37℃温箱或水浴中预温20min；

② 将血凝块从管壁徐徐剥离并继续加温，促使血清析出；

③ 待大部分血清析出后，3000转/min离心10min，分离血清；

④ 检查血清是否溶血，剔除溶血的样品，加入乙二胺四乙酸二钠。

6. 根据权利要求4所述的一种检测结直肠癌转移潜能的试剂盒的使用方法，其特征在于，所述步骤(3)包括以下具体步骤：

① 用荧光标记物标记FGFR4抗体，生成荧光标记FGFR4抗体；

② 将荧光标记FGFR4抗体加入FGFR4单抗与抗原形成的复合物溶液中；

③ 多功能酶标仪检测荧光数值。

7. 根据权利要求6所述的一种检测结直肠癌转移潜能的试剂盒的使用方法，其特征在于，所述荧光标记物为异硫氰基荧光素。

8. 根据权利要求4-7任一项所述的检测结直肠癌转移潜能的试剂盒的使用方法，其特征在于，当所测得的FGFR4蛋白的表达量超过平均值70%时，则表明受试者具有较高的结直肠癌的转移风险。

一种检测结直肠癌转移潜能的试剂盒及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及癌症转移的预测领域,具体地,公开了一种检测结直肠癌转移潜能的试剂盒及其使用方法。

背景技术

[0002] 转移瘤是指肿瘤细胞从原发部位侵入淋巴管,血管或其他途径被带到它处继续生长,形成与原发部位肿瘤相同类型的肿瘤,这个过程称为转移,所形成的肿瘤成为转移瘤或转移癌。转移是恶性肿瘤的特征。常见的转移途径包括淋巴道转移、血管转移,种植性转移等。一旦癌细胞侵入淋巴管,可以脱落形成栓子,或在管内增殖、形成连续性肿物,但多数是通过淋巴管进入区域淋巴结而形成淋巴结内转移。

[0003] 转移瘤之所以不同于原发癌,是因为它的形成是一个多因素、多环节的连续动态过程。转移瘤细胞具有更活跃的运动性和更强大的耐药性,特别是具备丰富的新生血管而增殖速度极大加快,而且对宿方免疫功能有更大的抗拒性。因此,任何一种肿瘤只有早期发现、早期治疗,才会取得好的效果。成都西部肿瘤研究所曾对癌症治疗后的情况做过统计:早期乳腺癌20年生存率达33.6%,甲状腺癌20年生存率达60.33%,胃癌5年生存率达52%以上,大肠癌5年生存率达57%以上,就是早期肝癌和肺癌的5年生存率也可达到50%以上。可见,就目前治疗癌症而言,越早期治疗效果越好。

[0004] 通常认为癌症的转移是发生在原位癌之后,斯坦福大学医学院Christina Curtis博士领导一项新研究表明癌症转移可能是一个非常早期的事件,甚至可能是在原位癌被发现之前数年就已经“播下了种子”,这项发表在《自然遗传学》的研究表明在80%的转移性结直肠癌(CRC)患者中,第一个肿瘤细胞克隆体在转移部位定植的时期早于临床检测到原发肿瘤之前。有些克隆体天生就是坏的。它们的恶性增殖和转移潜在在早期就被明确了。

[0005] 就结直肠癌来说,目前临床实践中,结肠癌的诊断通常包括观察排便习惯的改变、便血、腹痛等,直肠指症,实验室检查包括大便常规、大便潜血试验,影像检查、B超、CT扫描、结肠镜检查等等;常用标志物为癌胚抗原(CEA)、结直肠癌抗原(CCA)、CA19-9,但是这些抗原检测一般只能够判断是否患癌,或者癌症是否复发,对于判断或者预测结直肠癌是否转移的临床效果较差,且检测的灵敏度和特异性有待提高。从这个意义上说,发现新的,能够预测结直肠癌转移的标志物是一件非常紧迫的任务。

发明内容

[0006] 针对上述现有技术问题,本发明提供了一种检测结直肠癌转移潜能的试剂盒;另外,本发明提供了一种检测结直肠癌转移潜能的试剂盒的使用方法。该试剂盒包括FGFR4抗体,将其进行荧光标记,在结直肠癌转移潜能试剂盒中进行应用,FGFR4是成纤维细胞生长因子受体一个新成员,属于受体型蛋白酪氨酸激酶。

[0007] 下面阐述本发明的技术方案:

[0008] 一种检测结直肠癌转移潜能的试剂盒,包括:使待测样本充分暴露抗原的预处理

试剂、用于对待测样本中FGFR4蛋白表达量进行检测的检测试剂以及不同浓度的FGFR4蛋白标准品；所述检测试剂包含荧光标记的FGFR4抗体。

[0009] 进一步的，所述FGFR4抗体为人源化单克隆抗体。

[0010] 进一步的，所述待测样本为血液。

[0011] 一种检测结直肠癌转移潜能的试剂盒的使用方法，包括以下步骤：

[0012] (1) 处理受试者的血液样板，使得上述样本充分暴露抗原；

[0013] (2) 将FGFR4单抗与步骤(1)中暴露抗原的样本孵育；

[0014] (3) 测定步骤(2)中FGFR4抗体与暴露抗原的结合量；

[0015] (4) 将步骤(3)测得的结合量转化为FGFR4蛋白的表达量，与平均值相比，判定受试者结直肠癌的转移风险。

[0016] 进一步的，上述检测结直肠癌转移潜能的试剂盒的使用方法，所述步骤(1)中血液样本的处理方法包括以下步骤：

[0017] ①将采取的血液样品试管呈最大斜面倾斜，并置室温或37℃温箱或水浴中预温20min；

[0018] ②将血凝块从管壁徐徐剥离并继续加温，促使血清析出；

[0019] ③待大部分血清析出后，3000转/min离心10min，分离血清；

[0020] ④检查血清是否溶血，剔除溶血的样品，加入乙二胺四乙酸二钠。

[0021] 进一步的，上述检测结直肠癌转移潜能的试剂盒的使用方法，所述步骤(3)包括以下具体步骤：

[0022] ①用荧光标记物标记FGFR4抗体，生成荧光标记FGFR4抗体；

[0023] ②将荧光标记FGFR4抗体加入FGFR4单抗与抗原形成的复合物溶液中；

[0024] ③多功能酶标仪检测荧光数值。

[0025] 进一步的，上述检测结直肠癌转移潜能的试剂盒的使用方法，所述荧光标记物为异硫氰基荧光素。

[0026] 进一步的，上述检测结直肠癌转移潜能的试剂盒的使用方法，当所测得的结合量超过平均值70%时，则表明受试者具有较高的结直肠癌的转移风险。

[0027] 本发明具有的有益效果是：

[0028] FGFR4蛋白的检测对患者术后复发转移具有预测价值，从而可以为潜在的结直肠癌的复发转移采取预防措施；

[0029] FGFR4蛋白的检测对于结直肠癌患者总生存时间的预后具有显著的预测价值，从而有针对性的改善不良的治疗预后，提高医疗水平，提高生活质量。

附图说明

[0030] 附图1本试剂盒测定标准品所获得的标准曲线；

[0031] 附图2FGFR4蛋白的表达量与结直肠癌的转移之间的关系；

[0032] 附图3FGFR4蛋白的表达量与预后的关系。

具体实施方式

[0033] 下面通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。本领域技术人员应该明

了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制;下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法;下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0034] 本文所述预测预后是指预测患者状况的过程或结果,并不意味着能以100%的准确度预测患者状况的过程或结果。预测预后是指确定某些过程或结果的可能性是否增加,而并不意味着通过与某些过程或结果不发生的情况比较来确定发生某些过程或结果的可能性。如本发明而言,本发明中FGFR4蛋白的水平升高的患者中,与不显示该特征的人相比,更有可能观察到特定过程或结果。如本文所用,术语“抗体”,意指特异性结合至特定抗原或与特定抗原相互作用的任意抗原-结合分子或分子复合体。如本文所用,术语“抗体”还包括整个抗体分子的抗原结合片段。

[0035] 实施例1

[0036] 本发明公开的FGFR4试剂盒其检测原理类似固相夹心法酶联免疫吸附实验(ELISA),将酶标二抗替换成荧光标记的抗体FITC-FGFR4,已知待测物质浓度的标准品、未知浓度的样品加入微孔酶标板内进行检测。先将待测物质和FGFR4单抗同时温育。洗涤后,加入荧光标记标记过的FITC-FGFR4抗体,再经过温育和洗涤,去除未结合的FITC-FGFR4抗体,然后加入荧光显色增强剂,荧光强度和样品中待测物质的浓度呈比例关系。以下为具体实验步骤:

[0037] (1) 将采取的血液样品试管呈最大斜面倾斜,并置室温或37℃温箱或水浴中预温20min;

[0038] (2) 将血凝块从管壁徐徐剥离并继续加温,促使血清析出;

[0039] (3) 待大部分血清析出后,3000转/min离心10min,分离血清;

[0040] (4) 检查血清是否溶血,剔除溶血的样品,加入加入乙二胺四乙酸二钠(1mg/ml);

[0041] (5) 酶标板的处理:将FGFR4单抗用0.1M甘氨酸缓冲液,PH=9.0;稀释后加入酶标板各孔,每孔100ul,吸附过夜,用0.1M甘氨酸缓冲液洗版;用封闭液(脱脂牛奶)封闭过夜,即得FGFR4单抗包被酶标板;

[0042] (6) 加FGFR4蛋白标准品(稀释后浓度分别为0.16ng/ml,0.32ng/ml,0.64/ml,1.28ng/ml,2.56ng/ml,5.12ng/ml,10.24ng/ml)各50ul于反应孔、加入待测样品50ul于反应孔内。立即加入50ul的FITC-FGFR4抗体,盖上膜板,轻轻振荡混匀,加入显色增强剂;

[0043] (7) 488nm波长激发,在519nm波长处测定各孔的OD值。

[0044] 实验结果与数据处理:如表1所示,以吸光度OD值为纵坐标(Y),相应的标准品浓度为横坐标(X)。

[0045] 表1吸光度数值

[0046]

标准品浓度 (ng/mL)	0	0.16	0.32	0.64	1.28	2.56	5.12	10.24
标准品 OD 值	0.054	0.112	0.166	0.284	0.514	1.014	1.622	2.513

[0047] 做得相应的曲线如图1所示,样品的待测物质含量可根据其OD值由标准曲线换算出相应的浓度,标准曲线方程为 $y=-0.0145x^2+0.3886x+0.0519$, $R=0.9989>0.98$,证明本方法数据可靠,可以用于下一步的实验。

- [0048] 实施例2
- [0049] FGFR4蛋白的表达与结直肠癌转移的相关实验
- [0050] 1. 待测样本的收集
- [0051] 参照实施例1进行待测样本的制备。
- [0052] 对于50例结直肠癌原发(未转移)和50例结直肠癌转移患者的血液进行FGFR4蛋白表达量的分析,以比较原发和转移病人血液中FGFR4蛋白表达量的差异,进而确定FGFR4蛋白表达水平与肿瘤转移的相关性。
- [0053] 2. 类ELISA法测定FGFR4蛋白的表达
- [0054] (1) 将采取的血液样品试管呈最大斜面倾斜,并置室温或37℃温箱或水浴中预温20min;
- [0055] (2) 将血凝块从管壁徐徐剥离并继续加温,促使血清析出;
- [0056] (3) 待大部分血清析出后,3000转/min离心10min,分离血清;
- [0057] (4) 检查血清是否溶血,剔除溶血的样品;
- [0058] (5) 酶标板的处理:将FGFR4单抗用0.1M甘氨酸缓冲液,PH=9.0;稀释后加入酶标板各孔,每孔100ul,吸附过夜,用0.1M甘氨酸缓冲液洗版;用封闭液(脱脂牛奶)封闭过夜,即得FGFR4单抗包被酶标板。
- [0059] (6) 加FGFR4蛋白标准品(稀释后浓度分别为0.16ng/ml,0.32ng/ml,0.64ng/ml,1.28ng/ml,2.56ng/ml,5.12ng/ml,10.24ng/ml)各50ul于反应孔、加入待测样品50ul于反应孔内。立即加入50ul的FITC-FGFR4抗体,盖上膜板,轻轻振荡混匀,加入显色增强剂。
- [0060] (7) 488nm波长激发,在519nm波长处测定各孔的OD值。进行如下分析:根据荧光强度分为四个等级,1分代表阴性(0~2ng/ml),2分代表弱阳性(2~4ng/ml),3分代表中阳性(4~8ng/ml)、4分代表强阳性(大于8ng/ml)。得分由软件收集,分值为1~2的被认为是FGFR4低表达,分值为3~4的被认为是FGFR4高表达。
- [0061] 3. 实验结果
- [0062] (1) FGFR4蛋白的表达与结直肠癌发生的关系
- [0063] 采用类ELISA法测定50例结直肠癌原发(未转移)和50例结直肠癌转移患者的血液中FGFR4蛋白的表达水平。发现值得注意的是,直肠癌原发(未转移)有38%(19/50)显示中阳性或强阳性的FGFR4表达,而在50例结直肠癌转移患者中有90%(45/50)为中阳性或者强阳性,如图2所示。此数据表明,FGFR4蛋白的表达与结直肠癌的转移是正相关,当所测得的FGFR4蛋白表达量超过平均值70%时,则表明受试者具有较高的结直肠癌的转移风险。
- [0064] (2) FGFR4蛋白表达与结直肠癌临床病理指标的关系
- [0065] 另外收集接受外科手术的患者100例的血液样本(手术当天采集),根据术后病理检测,以及UICC(国际抗癌联盟)发布的第八版的恶性肿瘤的TNM分期对患者资料进行归类,详细临床信息见表2所示。采用实施例1的方法对各血液样本进行FGFR4表达的检测,将标本分为FGFR4低表达组和FGFR4高表达组,分析FGFR4蛋白表达与结直肠癌临床病理指标之间的关系。结果显示,FGFR4的高表达与淋巴结转移($P=0.002$)和远端转移($P=0.004$)显著相关。
- [0066] 表2 FGFR4蛋白表达与结直肠癌临床病理指标之间的关系

变量	例数	低 FGFR4 蛋白表达	高 FGFR4 蛋白表达
T-分期			
1/2/3	70	53	17
[0067]	4 (远端转移)	30	26
病理分期			
I&II	60	47	13
III&IV(转移)	40	7	33

[0068] (3) FGFR4蛋白表达与结直肠癌术后生存率的关系

[0069] 根据医院对上述100例结直肠癌患者进行术后随访的资料,进行生存期统计,所使用的生存期分析方法为Kaplan-Meier生存分析。FGFR4高表达的患者(中位生存期14.5个月),比FGFR4低表达的患者(中位生存期为34个月)具有更短的存活时间。Log-rank分析显示,FGFR4的高表达与不良预后显著相关(Log-rank=5.724,P=0.012,图3)。

[0070] 以上实施例数据表明:当所测得的FGFR4蛋白表达量超过平均值70%时,则表明受试者具有较高的结直肠癌的转移风险。FGFR4蛋白的检测对患者术后复发转移具有预测价值,从而可以为潜在的结直肠癌的复发转移采取预防措施;FGFR4蛋白的检测对于结直肠癌患者总生存时间的预后具有显著的预测价值,从而有针对性的改善不良的治疗预后,提高医疗水平,提高生活质量。

[0071] 当然,上述说明并非是对本发明的限制,本发明也并不仅限于上述举例,本技术领域的技术人员在本发明的实质范围内所做出的变化、改型、添加或替换,也应属于本发明的保护范围。

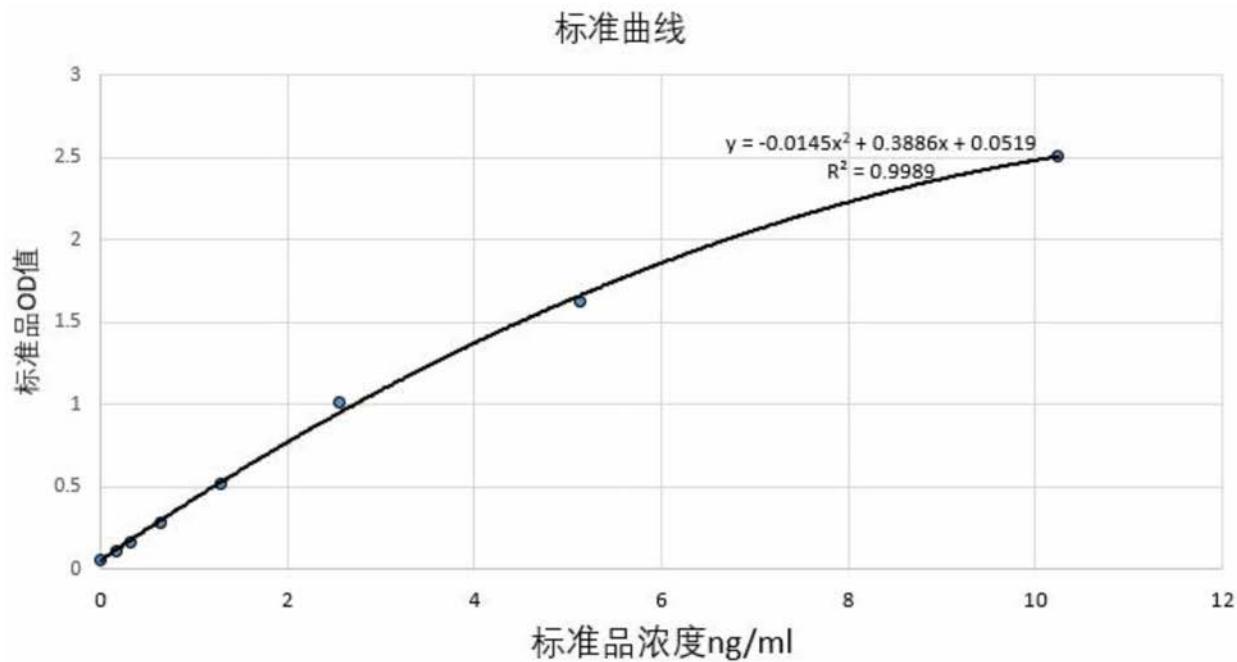


图1

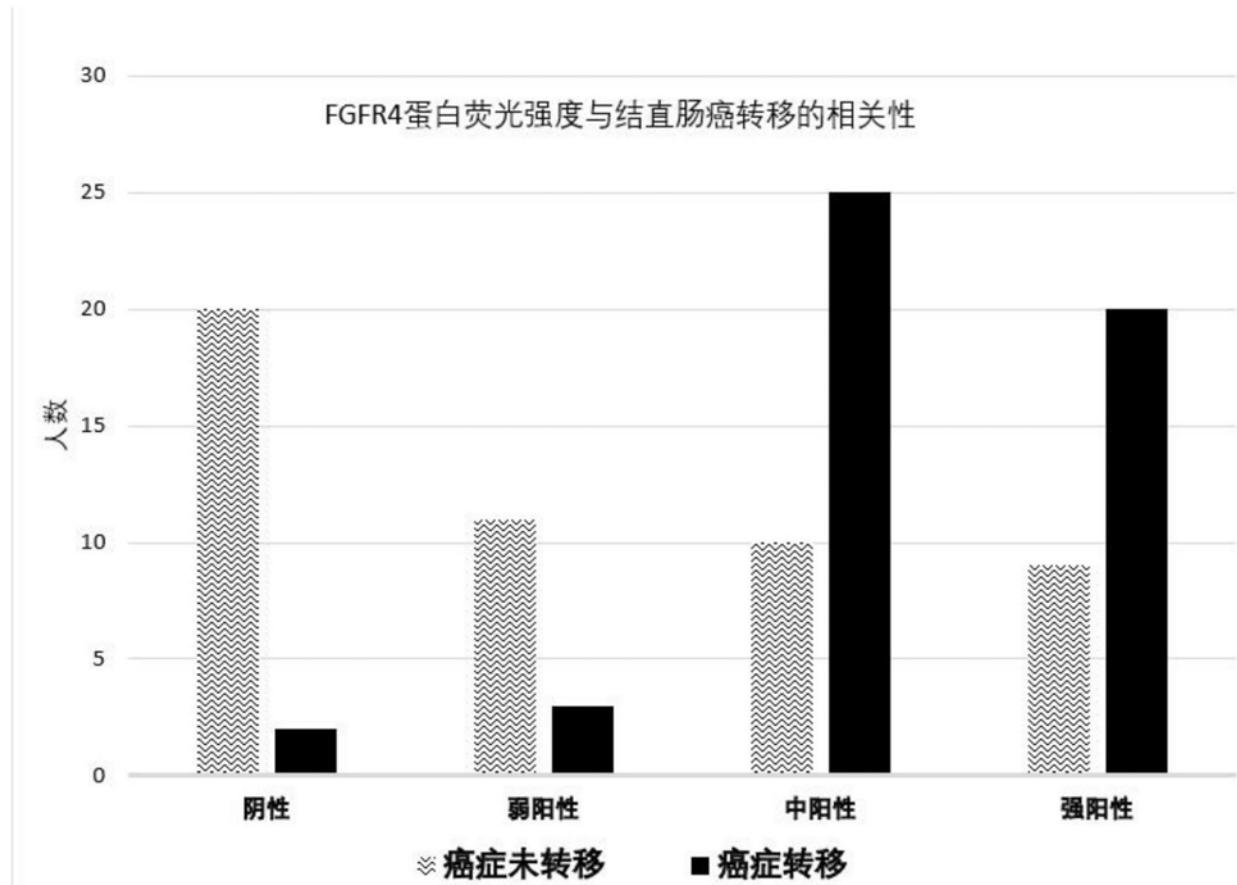


图2

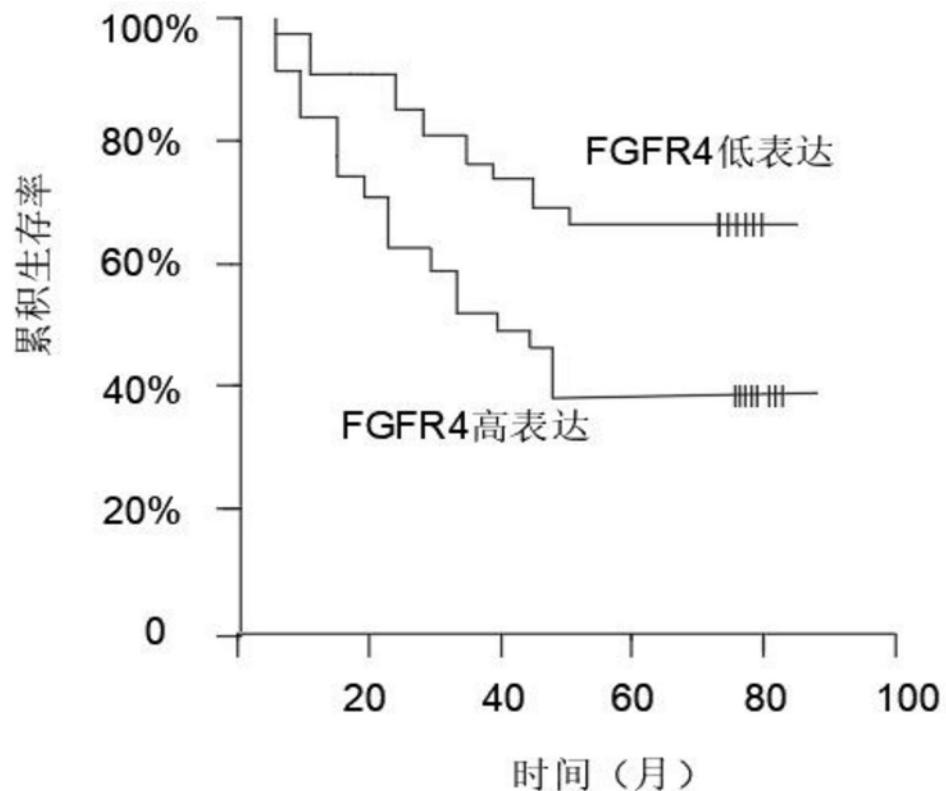


图3

专利名称(译)	一种检测结直肠癌转移潜能的试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	CN110488014A	公开(公告)日	2019-11-22
申请号	CN201910795791.4	申请日	2019-08-27
[标]发明人	黄灿华 黄琛 张涛		
发明人	黄灿华 黄琛 张涛		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/68 G01N33/58 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/57446 G01N33/582 G01N33/6893 G01N2800/065		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及癌症转移的预测领域，公开了一种检测结直肠癌转移潜能的试剂盒及其使用方法。所述试剂盒包括使待测样本充分暴露抗原的预处理试剂、用于对待测样本中FGFR4蛋白表达量进行检测的检测试剂以及不同浓度的FGFR4蛋白标准品；所述检测试剂包含荧光标记的FGFR4抗体。本发明通过免疫荧光手段定量的检测血液中FGFR4蛋白的表达量，并与平均值相比，以此来判断结直肠癌转移可能性的方法。本方法对于结直肠癌患者的肿瘤是否转移具有显著的预测价值，从而能有针对性的进行早期干预，提高医疗水平，提高生活质量。

