



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103728456 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 16

(21) 申请号 201310436392. 1

(22) 申请日 2013. 09. 16

(71) 申请人 湖南能润医学诊断技术股份有限公司

地址 410013 湖南省长沙市高新开发区火炬城 M3 组团三楼

(72) 发明人 张万明 易银沙 曹蓬荣 刘彩云  
袁炳秋 吴小宁

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

胸腺嘧啶核苷激酶的 ELISA 诊断试剂盒

(57) 摘要

胸腺嘧啶核苷激酶的 ELISA 诊断试剂盒, 试剂盒内设有样品检测液、阴性对照和阳性对照; 所述样品检测液为特异性抗原多肽。本发明公开了乳腺癌诊断分子特异性抗原多肽的制备方法, 通过乳腺癌诊断新颖分子胸腺嘧啶核苷激酶 TK1 (1-205) 特异性抗原多肽, 含该多肽的融合蛋白, 其编码 DNA, 携带该 DNA 的重组载体, 含该重组载体的转化子, 产生抗体的方法, 检测或测定抗体的方法和试剂, 诊断乳腺癌的方法和试剂。本发明可用于重组抗原的表达、医乳腺癌以及其它一些恶性肿瘤诊断, 特别是体外乳腺癌早期诊断试剂的开发。

1. 胸腺嘧啶核苷激酶的 ELISA 诊断试剂盒,其特征是,试剂盒内设有样品检测液、阴性对照和阳性对照;所述样品检测液为特异性抗原多肽。

2. 根据权利要求 1 所述的胸腺嘧啶核苷激酶的 ELISA 诊断试剂盒,其特征是,所述用于样品检测的特异性抗原多肽的制备方法,包括以下步骤:

(1) 抗原片段的获得:利用生物信息学方法,在开始的生物信息资源数据库上收集胸腺嘧啶核苷激酶家族同源蛋白质序列,运用多序列比对程序 clustalw 进行多序列比对分析,胸腺嘧啶核苷激酶多种同源蛋白,寻找胸腺嘧啶核苷激酶最特异性的片段,随后进行抗原表位分析,寻找到了优势特异性 TK1 的蛋白表达区段 Met1-Gln205,并进一步做原核载体的构建与表达纯化;

(2) 抗原蛋白的获得:从 TK1 编码基因调取相对应的基因核酸片段,总长度为 702bp,并利用其进行亚克隆构建到原核表达重组质粒 pGEX-4T-2a 或其它原核表达载体中,通过调整诱导表达条件,诱导表达后可以收集菌体,并通过蛋白质纯化,得到高纯度的重组蛋白质,此蛋白质为 N 端谷胱转移酶融合蛋白,其重组蛋白通过 SDS-PAGE 鉴定纯度;

(3) 特异性抗体制备:将原核表达纯化得到的纯度在 95% 以上的重组蛋白除去内毒素,再进行动物免疫,通过三次腹腔注射重组蛋白使小鼠对其产生免疫反应,取小鼠腹水纯化得到抗血清,经过进一步的纯化与分离得到多克隆抗体,将 TK1 (1-205) 特异性抗原免疫小鼠后,取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞进行细胞融合,经多次筛选获得阳性的单克隆细胞株,并进行腹水生产和单克隆抗体制备;

(4) 效价和特异性的评价:采用 ELISA 技术和 Western blot 技术对制备的单克隆抗体和多克隆抗体进行效价以及特异性的评价;

(5) 包装:运用 TK1 的 ELISA 试剂盒将获得的特异性抗原多肽按照标准包装形式统一规格。

## 胸腺嘧啶核苷激酶的 ELISA 诊断试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医学领域,具体为胸腺嘧啶核苷激酶的 ELISA 诊断试剂盒及相关特异性抗原多肽的制备方法。

### 背景技术

[0002] 胸腺嘧啶核苷激酶 (Thymidine kinase, TK) 于 1960 年前后被发现,参与胸腺嘧啶核苷 (简称为胸苷) 合成代谢,是一种 DNA 合成的关键酶。随后的研究发现,TK 拥有两种同工酶,其一为细胞质 TK (cytosolic TK1) 和线粒体 TK (mitochondrial TK2)。而其中 TK1 与细胞分裂密切相关,在细胞分裂 G1 期含量比较低,而到 S 期后逐渐升高,至 G2 期达到最高。因此编码 TK1 的 mRNA 及其表达的蛋白质也就成为细胞增生的标志物。

[0003] 1990 年, JF Robertson 等人通过比较早期乳腺癌患者,正常以及炎症对照组等的血清 TK1 蛋白表达量发现 TK1 在早期乳腺癌患者的血清含量显著提高,而炎症与正常对照组没有明显差异。血清 TK1 含量的多寡被认为能够反应乳腺癌病理进程 (stage of disease in breast cancer),因而他提出 TK1 可以做为一个乳腺癌早期诊断依据。同时 1993 年 WG Cance, RJ Craven 等人发现,TK1 在一些乳腺癌细胞系,如 BT20, SK-BR-3, MCF7 细胞中过量表达。随后亦有多篇文献研究发现 TK1 激酶在肿瘤,特别是乳腺肿瘤患者的血清中表达升高,并认可 TK1 是一个潜在的乳腺癌诊断分子。如 2005 年 Q HE 等人发现血清 TK1 含量可以做为早期乳腺癌患者手术后,肿瘤复发几率的参考指标。

[0004] 乳腺癌患者中血清中,胸腺嘧啶核苷激酶蛋白量及酶活性显著增强,并随着肿瘤恶化程度提高而进一步升高。因此胸腺激酶被认为是一新型的肿瘤诊断标志物 (Potential Cancer Marker),分析其蛋白以及活性的数据变化能够为乳腺癌早期诊断提供有力依据。

[0005] 1) 正常人血清样本中检出 TK1 表达异常,提示存在乳腺癌潜在性;

[0006] 2) 良性乳腺肿瘤患者若检出 TK1 表达异常,提示有恶变的可能;

[0007] 3) 乳腺癌肿瘤 TK1 表达高低,能够显示出其恶化程度。

### 发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种胸腺嘧啶核苷激酶的 ELISA 诊断试剂盒及相关特异性抗原多肽的制备方法,该诊断试剂盒可用于重组抗原的表达、医学临床乳腺癌患者的诊断,特别是体外乳腺癌诊断分子诊断试剂的开发。

[0009] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0010] 胸腺嘧啶核苷激酶的 ELISA 诊断试剂盒,试剂盒内设有样品检测液、阴性对照和阳性对照;所述样品检测液为特异性抗原多肽。

[0011] 进一步,所述特异性抗原多肽的制备方法,包括以下步骤:

[0012] (1) 抗原片段的获得:利用生物信息学方法,在开始的生物信息资源数据库上收集胸腺嘧啶核苷激酶家族同源蛋白质序列,运用多序列比对程序 clustalw 进行多序列比对分析,胸腺嘧啶核苷激酶多种同源蛋白,寻找胸腺嘧啶核苷激酶最特异性的片段,随后进

行抗原表位分析,寻找到了优势特异性 TK1 的蛋白表达区段 Met1-Gln205,并进一步做原核载体的构建与表达纯化;

[0013] (2) 抗原蛋白的获得:从 TK1 编码基因调取相对应的基因核酸片段,总长度为 702bp,并利用其进行亚克隆构建到原核表达重组质粒 pGEX-4T-2 中,通过调整诱导表达条件,诱导表达后可以收集菌体,并通过蛋白质纯化,得到高纯度的重组蛋白质,此蛋白质为 N 端谷胱转移酶融合蛋白,其重组蛋白通过 SDS-PAGE 鉴定纯度;

[0014] (3) 特异性抗体制备:将原核表达纯化得到的纯度在 95% 以上的重组蛋白除去内毒素,再进行动物免疫,通过三次腹腔注射重组蛋白使小鼠对其产生免疫反应,取小鼠腹水纯化得到抗血清,经过进一步的纯化与分离得到多克隆抗体,将 TK1 (1-205) 特异性抗原免疫小鼠后,取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞进行细胞融合,经多次筛选获得阳性的单克隆细胞株,并进行腹水生产和单克隆抗体制备;

[0015] (4) 效价和特异性的评价:采用 ELISA 技术和 Western blot 技术对制备的单克隆抗体和多克隆抗体进行效价以及特异性的评价;

[0016] (5) 包装:运用 TK1 的 ELISA 试剂盒将获得的特异性抗原多肽按照标准包装形式统一规。

[0017] 综上所述,本发明有益效果:

[0018] 本发明可用于重组抗原的表达、医乳腺癌以及其它一些恶性肿瘤诊断,特别是体外乳腺癌早期诊断试剂的开发,它不与乳腺癌诊断之外的其它肿瘤反应,使用更方便,成本更低。

## 具体实施方式

[0019] 下面将结合本发明实施例,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。

[0020] 实施例 1

[0021] 胸腺嘧啶核苷激酶的 ELISA 诊断试剂盒,试剂盒内设有样品检测液、阴性对照和阳性对照;所述样品检测液为特异性抗原多肽。

[0022] 进一步,所述特异性抗原多肽的制备方法,包括以下步骤:

[0023] (1) 抗原片段的获得:利用生物信息学方法,在开始的生物信息资源数据库上收集胸腺嘧啶核苷激酶家族同源蛋白质序列,运用多序列比对程序 clustalw 进行多序列比对分析,胸腺嘧啶核苷激酶多种同源蛋白,寻找胸腺嘧啶核苷激酶最特异性的片段,随后进行抗原表位分析,寻找到了优势特异性 TK1 的蛋白表达区段 Met1-Gln205,并进一步做原核载体的构建与表达纯化;

[0024] (2) 抗原蛋白的获得:从 TK1 编码基因调取相对应的基因核酸片段,总长度为 702bp,并利用其进行亚克隆构建到原核表达重组质粒 pGEX-4T-2 中,通过调整诱导表达条件,确定蛋白质表达的最佳条件为:37 度 1mM IPTG 诱导表达 4 小时之后可以收集菌体,并通过蛋白质纯化,得到高纯度的重组蛋白质,此蛋白质为 N 端谷胱转移酶融合蛋白,其重组蛋白通过 SDS-PAGE 鉴定纯度;

[0025] (3) 特异性抗体制备 :将原核表达纯化得到的纯度在 95% 以上的重组蛋白除去内毒素,再进行动物免疫,通过三次腹腔注射重组蛋白使小鼠对其产生免疫反应,取小鼠腹水纯化得到抗血清,经过进一步的纯化与分离得到多克隆抗体,将 TK1(1-205) 特异性抗原免疫小鼠后,取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞进行细胞融合,经多次筛选获得阳性的单克隆细胞株,并进行腹水生产和单克隆抗体制备 ;

[0026] (4) 效价和特异性的评价 :采用 ELISA 技术和 Western blot 技术对制备的单克隆抗体和多克隆抗体进行效价以及特异性的评价 ;

[0027] (5) 包装 :运用 TK1 的 ELISA 试剂盒将获得的特异性抗原多肽按照 760g 标准包装形式,48T / 96T 统一规格。

[0028] 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。

[0029] 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)	胸腺嘧啶核苷激酶的ELISA诊断试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN103728456A</a>	公开(公告)日	2014-04-16
申请号	CN201310436392.1	申请日	2013-09-16
[标]申请(专利权)人(译)	湖南能润医学诊断技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	湖南能润医学诊断技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	湖南能润医学诊断技术股份有限公司		
[标]发明人	张万明 易银沙 曹蓬荣 刘彩云 袁炳秋 吴小宁		
发明人	张万明 易银沙 曹蓬荣 刘彩云 袁炳秋 吴小宁		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/574 G01N33/57415 G01N2800/365 G01N2800/7028		
其他公开文献	CN103728456B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

胸腺嘧啶核苷激酶的ELISA诊断试剂盒，试剂盒内设有样品检测液、阴性对照和阳性对照；所述样品检测液为特异性抗原多肽。本发明公开了乳腺癌诊断分子特异性抗原多肽的制备方法，通过乳腺癌诊断新颖分子胸腺嘧啶核苷激酶TK1(1-205)特异性抗原多肽，含该多肽的融合蛋白，其编码DNA，携带该DNA的重组载体，含该重组载体的转化子，产生抗体的方法，检测或测定抗体的方法和试剂，诊断乳腺癌的方法和试剂。本发明可用于重组抗原的表达、医乳腺癌以及其它一些恶性肿瘤诊断，特别是体外乳腺癌早期诊断试剂的开发。