



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102435735 A

(43) 申请公布日 2012.05.02

(21) 申请号 201110301990.9

(22) 申请日 2011.10.09

(71) 申请人 武汉康迈生物技术有限公司

地址 430075 湖北省武汉市东湖开发区高新
大道 666 号

(72) 发明人 董晨 童攢

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 王敏锋

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种结直肠癌的免疫组织化学染色检测试剂盒及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种结直肠癌的免疫组织化学染色检测试剂盒及应用,该试剂盒含有:a)兔来源的抗人 Interleukin-17F (IL-17F) 的抗体,b)生物素标记的羊抗兔 IgG;c)亲和素标记的 HRP;d)正常山羊血清封闭液;e)3% 体积比 H₂O₂;f)DAB 显色液;g)苏木素。该检测具有高灵敏性,高特异性和高准确性的特点,不仅可以区分癌变组织和正常组织,还可以区分癌变组织中癌变的细胞和正常的细胞。IL-17F 在正常结肠组织上皮细胞中呈阳性表达染色,而在癌变细胞上皮中呈阴性表达。有效地区分结直肠癌变的上皮细胞和正常细胞,为临床的诊断和治疗提供参考依据。

1. 一种结直肠癌的免疫组织化学染色检测试剂盒,该试剂盒含有:

- a) 兔来源的抗人 Interleukin-17F 的抗体;
- b) 生物素标记的的羊抗兔 IgG;
- c) 亲和素标记的 HRP;
- d) 正常山羊血清封闭液;
- e) 3% 体积比 H_2O_2 ;
- f) DAB 显色液;
- g) 苏木素。

2. 权利要求 1 所述的一种结直肠癌的免疫组织化学染色检测试剂盒,其特征在于:所述的兔来源的抗人 Interleukin-17F 的抗体制备方法如下:

A) 构建 IL-17F 表达载体,将人的免疫球蛋白 IgG1 的 Fc 片段标签克隆至试剂盒中 pMT/BiP/V5-HisA 表达质粒中,获得果蝇表达体系-免疫球蛋白融合质粒 DES-Ig,通过 PCR 的方法扩增人 IL-17F 的 cDNA 序列,克隆入 DES-Ig 质粒;

B) 建立稳定转染 IL-17F 表达载体的果蝇细胞系 S2,硫酸铜诱导蛋白分泌表达并纯化 IL-17F,将构建成功的载体和试剂盒中提供的 pCoHygro 质粒共转染果蝇细胞系 S2,筛选获得稳定细胞系;并用硫酸铜诱导蛋白的分泌表达,收集上清,用蛋白 A-琼脂糖柱子富集纯化 IL-17F-Ig 融合蛋白;

C) 免疫兔子获得 IL-17F 的多克隆抗体并鉴定,常规方法免疫兔子,收集血清,取 200ug 免疫原即 IL-17F-Ig 融合蛋白与弗氏完全佐剂进行 1:1 混合形成乳剂,注射入兔子双肩皮下和后大腿肌肉;间隔 2 周加强免疫,免疫原量减半,用弗氏不完全佐剂混合成乳剂注射;再间隔 2 周加强免疫;注射后的第 7 天取血,吸取血清,离心,分装,冻存。

3. 一种用于结直肠癌的免疫组织化学染色检测试剂盒,其包含有:

- a) 兔来源的抗人 Interleukin-17F 的抗体;
- b) 生物素标记的的羊抗兔 IgG;
- c) 亲和素标记的 HRP;
- d) 正常山羊血清封闭液;
- e) 3% 体积比 H_2O_2 ;
- f) DAB 显色液;
- g) 苏木素。

一种结直肠癌的免疫组织化学染色检测试剂盒及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,更具体涉及一种结直肠癌的免疫组织化学染色检测试剂盒,同时还涉及一种用于结直肠癌的免疫组织化学染色检测试剂盒的用途。

背景技术

[0002] 结直肠癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一,占胃肠道肿瘤的第3位。我国的发病率与死亡率,随着人民生活水平的提高,饮食结构的改变,呈逐年上升的趋势。结直肠癌已经成为威胁人类生命和健康不容忽视的疾病。结直肠癌起病隐匿,早期症状不明显,许多患者在确诊时已经处于晚期。大约25%的患者初次就诊时就已经发生转移,另外,40% -50%新诊断患者将继续发展出现转移。仅仅少于5%的患者能存活5年以上。因此,深入对结直肠癌的基础研究和提高结直肠癌的诊断率,对提高结直肠癌患者的生存率、降低其病死率具有相当重要的临床意义。

[0003] 目前用于结直肠癌的诊断的方法包括大便潜血试验、内窥镜检查、影像学检查、分子生物学检查以及病理组织学检查。目前在结直肠癌诊断技术中,不同的检查手段是从不同侧面不同程度反映了区别于正常组织的肿瘤形态。单一的检查手段并不能明确病情,需要结合实际情况,选择多种检查手段才能做出判断。

[0004] 其中病理诊断也是结直肠癌诊断中最可靠的诊断,是明确诊断以拟定治疗方案所必需的依据。常规的病理形态学检查包括脱落细胞学检查和活体组织检查。由于结直肠癌中脱落细胞常有不同程度的变性,阴性结果并不能否定肿瘤的存在,临床上结直肠癌脱落细胞学检查应用范围非常有限,主要依靠组织病理学检查明确诊断。

[0005] 免疫组化是最近10多年来迅速发展起来的一门新兴技术。它已被广泛运用肿瘤研究和诊断,其原理是利用抗原与抗体的特异性结合反应来检测组织中的未知抗原或者抗体,主要是肿瘤相关抗原(肿瘤分化抗原和肿瘤胚胎抗原),借以判断肿瘤的来源和分化程度,协助肿瘤的病理诊断和鉴别诊断。目前常用的染色方法有过氧化物酶-抗过氧化物酶法,即PAP法(peroxidaseantiperoxidase technique)和卵白素-生物素-过氧化物酶复合物法,即ABC法(avidin-biotin-peroxidase complex technique)。利用免疫组织化学方法已经可以对许多常规方法难以判断其来源的肿瘤加以鉴别。例如检测细胞骨架的中间丝(intermediate filament),其直径平均为10nm,介于微管和微丝之间。中间丝有五类:即神经原纤维、胶质原纤维酸性蛋白、结蛋白(desmin)、波形蛋白(vimentin)和角蛋白(keratin)。它们各有生物化学和免疫学特性,并分别存在于不同类型的细胞中,故具有相对的特异性,可用来协助诊断相应的神经细胞、神经胶质细胞、横纹肌和平滑肌、间叶组织和上皮细胞来源的肿瘤。目前能用于肿瘤辅助诊断和鉴别诊断的抗体已不胜枚举。

发明内容

[0006] 本发明的目的是在于提供了一种结直肠癌的免疫组织化学染色检测试剂盒,该抗体检测具有高灵敏性,高特异性和高准确性的特点,不仅可以区分癌变组织和正常组织,还

可以区分癌变组织中癌变的细胞和正常的细胞。IL-17F 在正常结肠组织上皮细胞中呈阳性表达染色,而在癌变细胞上皮中呈阴性表达。

[0007] 本发明的另一个目的是在于提供了一种用于结直肠癌的免疫组织化学染色检测试剂盒在临床流行病学调查中的应用,有效地区分结直肠癌变的上皮细胞和正常细胞,为临床的诊断和治疗提供参考依据。

[0008] 为了实现上述目的,本发明采用以下技术措施:

[0009] 一种结直肠癌的免疫组织化学染色检测试剂盒,该免疫组织化学染色试剂盒含有:a)兔来源的抗人 Interleukin-17F(IL-17F)的抗体,b)生物素标记的的羊抗兔 IgG;c)亲和素标记的 HRP;d)正常山羊血清封闭液;e)3%(体积比)H₂O₂;f)DAB 显色液;g)苏木素。本试剂盒将 IL-17F 这一在结直肠癌患者的癌变组织中特异性低表达的细胞因子作为用于检测的参考指标。

[0010] 在本发明中关键是兔来源的抗人 Interleukin-17F(IL-17F)的抗体制备,其方法包括下列步骤:

[0011] A)构建 IL-17F 表达载体。试剂盒 DES®-Inducible/Secreted Kit with pCoHygro 购自 invitrogen 公司。将人的免疫球蛋白 IgG1 的 Fc 片段(华盛顿大学 Edward A. Clark 博士友情赠送)标签克隆至试剂盒中提供的 pMT/BiP/V5-HisA 表达质粒中,获得果蝇表达体系-免疫球蛋白融合质粒(DES-Ig)。通过 PCR 的方法扩增人 IL-17F 的 cDNA 序列,克隆入 DES-Ig 质粒。

[0012] B)建立稳定转染 IL-17F 表达载体的果蝇细胞系 S2(试剂盒中提供的细胞),硫酸铜诱导蛋白分泌表达并纯化 IL-17F。按照试剂盒说明书,将上述构建成功的载体和试剂盒中提供的 pCoHygro 质粒共转染果蝇细胞系 S2,筛选获得稳定细胞系;并用硫酸铜诱导蛋白的分泌表达。收集上清,用蛋白 A-琼脂糖(Protein A-Sepharose)柱子购自 sigma 公司富集纯化 IL-17F-Ig 融合蛋白。

[0013] C)免疫兔子获得 IL-17F 的多克隆抗体并鉴定。具体步骤是取 200ug 免疫原即 IL-17F-Ig 融合蛋白与弗氏完全佐剂进行 1:1 混合形成乳剂,注射入兔子双肩皮下和后大腿肌肉;间隔 2 周加强免疫,免疫原量减半,用弗氏不完全佐剂混合成乳剂注射临近部位;再间隔 2 周加强免疫;注射后的第 7 天取血。吸取血清,离心,分装,冻存。检测抗体效价。

[0014] 利用本发明中的抗 IL-17F 特异性的多克隆抗体,联合免疫组织化学染色常规试剂(生物素标记的的羊抗兔 IgG;亲和素标记的 HRP;正常山羊血清封闭液;3% H₂O₂;DAB 显色液;苏木素),方便、高效、特异的辅助结直肠癌的病理检测,可作为判断患者预后的一个指标,对结直肠癌的检测,基础研究和检测提供参考,具有临床实用性和科学研究性。

[0015] 一种用于结直肠癌的免疫组织化学染色检测(查)试剂盒在临床流行病学调查中的应用,该试剂盒由以下物质组成:

[0016] a)兔来源的抗人 Interleukin-17F(IL-17F)的抗体。

[0017] b)生物素标记的的羊抗兔 IgG;

[0018] c)亲和素标记的 HRP;

[0019] d)正常山羊血清封闭液;

[0020] e)3%(体积比)H₂O₂;

[0021] f)DAB 显色液;

[0022] g) 苏木素；

[0023] 其检查步骤是：

[0024] 1. 组织用石蜡包埋，切片，石蜡切片置于 58-62℃ 烤箱中 1 小时后，脱蜡至水，用 PBS (pH7.4) 冲洗 2-4 次，每次 4-6 分钟。

[0025] 2. 抗原微波修复：10mM pH 5.8-6.2 枸橼酸钠缓冲液倒入微波修复盒内将切片放入修复液内，微波炉高火 3min → 中火 7min → 低火 3min。自然冷却后至室温 (20-25℃)，PBS 冲洗 2-4 次，每次 4-6 分钟。

[0026] 3. 切片放入 3% (体积比) H₂O₂ 溶液，室温下孵育 15 分钟，以阻断内源性过氧化物酶。PBS 冲洗 2-4 次，每次 4-6 分钟。

[0027] 4. 甩去 PBS 液，滴加 5% BSA 室温 28-32 分钟。

[0028] 5. 甩去 BSA，第一抗体按 1 : 100 的浓度稀释。每张切片加入 100 μl 稀释液覆盖组织，4℃ 过夜。PBS 冲洗 2-4 次，每次 4-6 分钟。

[0029] 6. 甩去 PBS 液，每张切片加 100 μl 第二抗体，室温下孵育 45 分钟。PBS 冲洗 2-4 次，每次 4-6 分钟。

[0030] 7. 甩去 PBS 液，每张切片加 50-100 μl 新鲜配制的 DAB 溶液，室温 (20-25℃，上下相同) 下孵育 4-6 分钟，显微镜控制显色 (约 1min)。

[0031] 8. 显色完全后，蒸馏水或自来水冲洗，苏木素复染 1-3min，自来水洗。

[0032] 9. 切片经过梯度酒精 (70-100%) 脱水干燥，二甲苯透明，中性树胶封固。结果的观察：

[0033] IL-17F 蛋白阳性产物主要定位于细胞浆，表现为胞浆内有棕黄色颗粒。在正常肠上皮细胞中表达，而在癌变的肠上皮细胞中不表达或低表达。免疫组织化学染色结果采用以下判断标准。将染色程度评分：无色记 0 分、淡黄色记 1 分、棕黄色记 2 分和棕褐色记 3 分；再将阳性细胞所占的百分比评分：0 分为阴性、阳性细胞数 ≤ 10% 记 1 分、11% ~ 50% 记 2 分、51% ~ 75% 记 3 分、> 75% 记 4 分，然后计算两者的乘积。乘积 < 3 分为阴性，≥ 3 分为阳性。

[0034] 本发明与现有技术相比具有以下优点和效果：

[0035] 该抗体检测具有高灵敏性，高特异性和高准确性的特点，不仅可以区分癌变组织和正常组织，还可以区分癌变组织中癌变的细胞和正常的细胞。IL-17F 在正常结肠组织上皮细胞中呈阳性染色，而在癌变细胞上皮中呈阴性。

[0036] 申请人通过实时定量 PCR 技术和蛋白印迹技术分析 IL-17F 在结直肠癌病人手术切除标本中的表达水平。发现 20 例病人手术标本中，癌变组织 IL-17F 的 mRNA 水平显著低于正常组织 (p < 0.05)。4 例病人手术标本中，癌变组织 IL-17F 的蛋白水平显著低于正常组织 (p < 0.05)。

附图说明

[0037] 图 1 为一种免疫组织化学染色图；

[0038] AC 为正常的结肠组织 (即病人手术切除标本的末端、远离病灶区的正常组织) 的染色图。BD 为癌变病灶区结肠组织 (即病人手术切除标本的中间、病灶中心区的癌变组织) 的染色图。AB 为组织切片用 IL-17F 抗体进行免疫组织化学染色图，CD 为空白对照染色即

组织切片进行免疫组织化学染色,不加 IL-17F 抗体。4 个图中,仅 A 图中的上皮细胞呈阳性染色(箭头指示),其余的图中细胞均呈阴性染色;

[0039] 图 2 为一种免疫组织化学染色图;

[0040] 图 2 为一种病人手术切除标本中病灶区域的癌变组织免疫组织化学染色图。图中 A 位置为从细胞核变化观察相对正常的结肠上皮, B 位置为从细胞核变化观察已发生癌变的结肠上皮。A 位置的细胞呈阳性染色, B 位置的细胞呈阴性染色。

[0041] 2 个图结果显示正常结肠组织上皮细胞高表达 IL-17F 而癌变组织上皮细胞低/基本不表达 IL-17F。

具体实施方式

[0042] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应当理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明要求保护的的范围,下列实施例中未注明的具体实验条件和方法,通常按照常规条件如:精编分子生物学指南, F. M. 奥斯柏等主编,科学出版社,1995,分子克隆实验指南(第三版);D. L. 斯佩克特等,科学出版社,2001,细胞实验指南;吕鸿声,科学出版社,1982,或按照制造厂商所建议的条件。

[0043] 实施例 1:

[0044] 一种用于检测结直肠癌的免疫组织化学染色试剂盒,该免疫组织化学染色试剂盒包括:

[0045] a) 兔来源的抗人 Interleukin-17F(IL-17F) 的抗体;

[0046] b) 生物素标记的羊抗兔 IgG;

[0047] c) 亲和素标记的 HRP;

[0048] d) 正常山羊血清封闭液;

[0049] e) 3% (体积比) H_2O_2 ;

[0050] f) DAB 显色液;

[0051] g) 苏木素;

[0052] b-g 为武汉博士德生物工程有限公司产品。

[0053] 在本发明中关键是兔来源的抗人 Interleukin-17F(IL-17F) 的抗体制备,其方法包括下列步骤:

[0054] A) 构建 IL-17F 表达载体。试剂盒 DES® -Inducible/Secreted Kit with pCoHygro 购自 invitrogen 公司。将人的免疫球蛋白 IgG1 的 Fc 片段标签克隆至试剂盒中 pMT/BiP/V5-HisA 表达质粒中,获得果蝇表达体系 - 免疫球蛋白融合质粒 (DES-Ig)。通过 PCR 的方法扩增人 IL-17F 的 cDNA 序列,克隆入 DES-Ig 质粒。

[0055] B) 建立稳定转染 IL-17F 表达载体的果蝇细胞系 S2(试剂盒中提供的细胞),硫酸铜诱导蛋白分泌表达并纯化 IL-17F。按照试剂盒说明书 (DES® -Inducible/Secreted Kit with pCoHygro 试剂盒),将上述构建成功的载体和试剂盒中提供的 pCoHygro 质粒共转染果蝇细胞系 S2,筛选获得稳定细胞系;并用硫酸铜诱导蛋白的分泌表达。收集上清,用蛋白 A-琼脂糖 (Protein A-Sepharose) 柱子购自 sigma 公司富集纯化 IL-17F-Ig 融合蛋白。

[0056] C) 免疫兔子获得 IL-17F 的多克隆抗体并鉴定。常规方法免疫兔子,收集血清。具

体步骤是取 200ug 免疫原即 IL-17F-Ig 融合蛋白与弗氏完全佐剂进行 1 : 1 混合形成乳剂, 注射入兔子双肩皮下和后大腿肌肉; 间隔 2 周加强免疫, 免疫原量减半, 用弗氏不完全佐剂混合成乳剂注射临近部位; 再间隔 2 周加强免疫; 注射后的第 7 天取血。吸取血清, 离心, 分装, 冻存。检测抗体效价。

[0057] 利用本发明中的抗 IL-17F 特异性的多克隆抗体, 联合免疫组织化学染色常规试剂 (生物素标记的羊抗兔 IgG; 亲和素标记的 HRP; 正常山羊血清封闭液; 3% H₂O₂; DAB 显色液; 苏木素), 方便、高效、特异的辅助结直肠癌的病理检测, 可作为判断患者预后的一个指标, 对结直肠癌的检测, 基础研究和检测提供参考, 具有临床实用性和科学研究性。

[0058] 一种用于检测结直肠癌的免疫组织化学染色试剂盒在临床流行病学调查中的应用, 该试剂盒由以下物质组成:

[0059] a) 兔来源的抗人 Interleukin-17F (IL-17F) 的抗体。

[0060] b) 生物素标记的羊抗兔 IgG;

[0061] c) 亲和素标记的 HRP;

[0062] d) 正常山羊血清封闭液;

[0063] e) 3% (体积比) 的 H₂O₂;

[0064] f) DAB 显色液;

[0065] g) 苏木素;

[0066] 其检测步骤是:

[0067] 1. 组织用石蜡包埋, 切片, 石蜡切片置于 60℃ 烤箱中 1 小时后, 脱蜡至水, 用 PBS (pH7.4) 冲洗三次, 每次 5 分钟。

[0068] 2. 抗原微波修复: 10mM pH 6.0±0.1 枸橼酸钠缓冲液倒入微波修复盒内将切片放入修复液内, 微波炉高火 3min → 中火 7min → 低火 3min。自然冷却至室温 (20-25℃) 后, PBS 冲洗三次, 每次 5 分钟。

[0069] 3. 切片放入 3% (体积比) 过氧化氢溶液, 室温下孵育 15 分钟, 以阻断内源性过氧化物酶。PBS 冲洗三次, 每次 5 分钟。

[0070] 4. 甩去 PBS 液, 滴加 5% BSA 室温 30 分钟。

[0071] 5. 甩去 BSA, 第一抗体按 1 : 100 的浓度稀释。每张切片加入 100 μl 稀释液覆盖组织, 4℃ 过夜。PBS 冲洗三次, 每次 5 分钟。

[0072] 6. 甩去 PBS 液, 每张切片加 100 μl 第二抗体, 室温下孵育 45 分钟。PBS 冲洗三次, 每次 5 分钟。

[0073] 7. 甩去 PBS 液, 每张切片加 50-100 μl 新鲜配制的 DAB 溶液, 室温 (20-25℃, 上下相同) 下孵育 5 分钟, 显微镜控制显色 (约 1min)。

[0074] 8. 显色完全后, 蒸馏水或自来水冲洗, 苏木素复染 2min, 自来水洗。

[0075] 9. 切片经过梯度酒精 (70-100%) 脱水干燥, 二甲苯透明, 中性树胶封固。结果的观察:

[0076] IL-17F 蛋白阳性产物主要定位于细胞浆, 表现为胞浆内有棕黄色颗粒。在正常肠上皮细胞中表达, 而在癌变的肠上皮细胞中不表达或低表达。免疫组织化学染色结果采用以下判断标准。将染色程度评分: 无色记 0 分、淡黄色记 1 分、棕黄色记 2 分和棕褐色记 3 分; 再将阳性细胞所占的百分比评分: 0 分为阴性、阳性细胞数 ≤ 10% 记 1 分、11% ~ 50%

记 2 分、51%~75% 记 3 分、> 75% 记 4 分, 然后计算两者的乘积。乘积 < 3 分为阴性, ≥ 3 分为阳性。

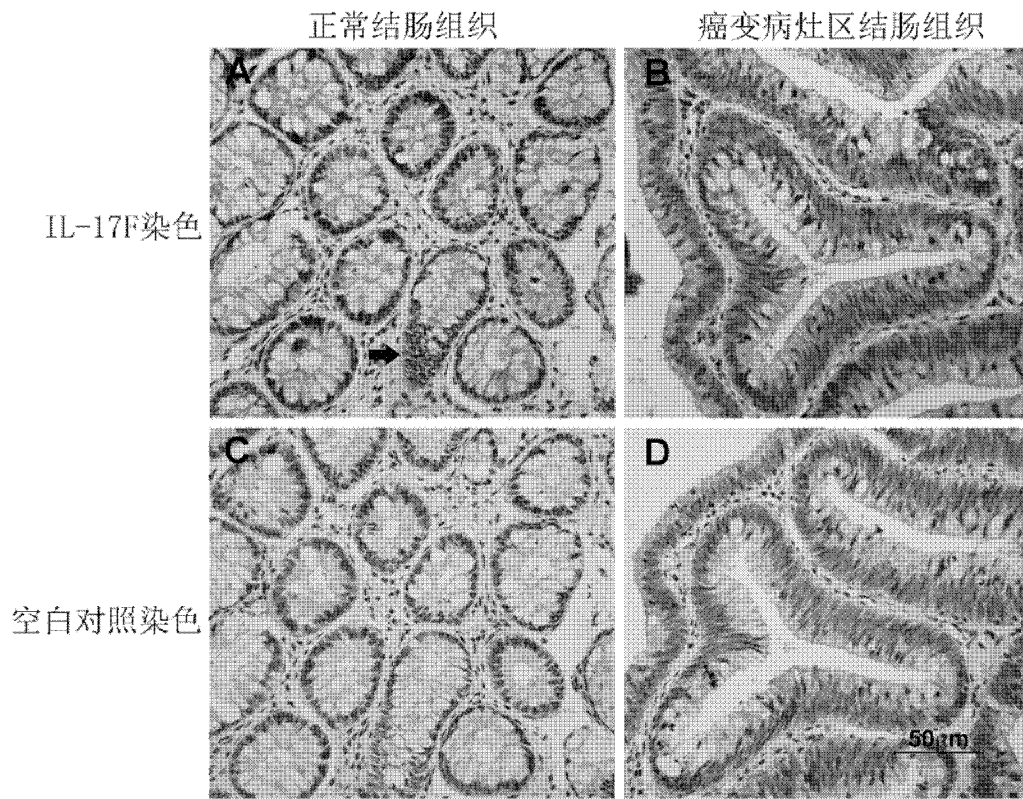


图 1

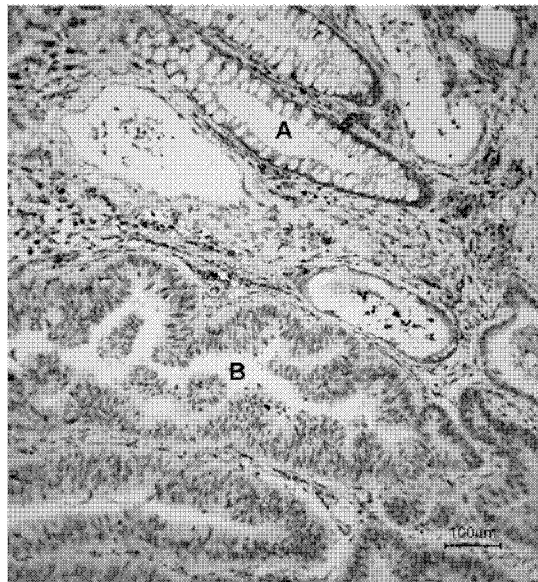


图 2

专利名称(译)	一种结直肠癌的免疫组织化学染色检测试剂盒及应用		
公开(公告)号	CN102435735A	公开(公告)日	2012-05-02
申请号	CN201110301990.9	申请日	2011-10-09
[标]发明人	董晨 童攢		
发明人	董晨 童攢		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531		
代理人(译)	王敏锋		
其他公开文献	CN102435735B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种结直肠癌的免疫组织化学染色检测试剂盒及应用，该试剂盒含有：a) 兔来源的抗人Interleukin-17F (IL-17F) 的抗体，b) 生物素标记的羊抗兔IgG；c) 亲和素标记的HRP；d) 正常山羊血清封闭液；e) 3%体积比H₂O₂；f) DAB显色液；g) 苏木素。该检测具有高灵敏度，高特异性和高准确性的特点，不仅可以区分癌变组织和正常组织，还可以区分癌变组织中癌变的细胞和正常的细胞。IL-17F在正常结肠组织上皮细胞中呈阳性表达染色，而在癌变细胞上皮中呈阴性表达。有效地区分结直肠癌变的上皮细胞和正常细胞，为临床的诊断和治疗提供参考依据。

