

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510106613.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2006年5月3日

[11] 公开号 CN 1766634A

[22] 申请日 2005.9.20

[21] 申请号 200510106613.4

[30] 优先权

[32] 2005.6.13 [33] CN [31] 200510026703.2

[71] 申请人 上海晶泰生物技术有限公司

地址 200233 上海市桂箐路 69 号 25 号楼 6 楼

[72] 发明人 初培国

[74] 专利代理机构 上海东亚专利商标代理有限公司

代理人 董梅

权利要求书 3 页 说明书 19 页

[54] 发明名称

一种检测乳腺球蛋白的方法及其试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及生物化学领域，具体涉及一种检测乳腺球蛋白的方法及其试剂盒。本发明一种乳胶凝集抑制法检测乳腺球蛋白的方法，该方法包括下述步骤：a) 将抗乳腺球蛋白抗体标记的乳胶颗粒与待测样本混合，和 b) 根据是否出现凝集反应判定检测结果，其中，所述抗乳腺球蛋白抗体标记的乳胶颗粒是用抗乳腺球蛋白抗体 R028 或 R048 标记乳胶颗粒，该乳胶颗粒的直径为 2 - 10 μm ，并将标记的乳胶颗粒保存在 HEPES 缓冲液内，pH 8.2。同时还公开了用抗乳腺球蛋白单克隆抗体和生物素标记抗乳腺球蛋白单克隆抗体通过双夹心酶联免疫吸附法定量检测乳腺球蛋白的方法。另外还公开了一种 RT-PCR 检测乳腺球蛋白表达的方法，也提供了用于检测乳腺球蛋白的试剂盒。本发明的方法和试剂盒可用于乳腺癌形成性细胞存在的早期检测。

1. 一种乳胶凝集抑制法检测乳腺球蛋白的方法，其特征在于，该方法包括下述步骤：a)将抗乳腺球蛋白抗体标记的乳胶颗粒与待测样本混合,和 b)根据是否出现凝集反应判定检测结果，其中，所述抗乳腺球蛋白抗体标记的乳胶颗粒是用抗乳腺球蛋白抗体 R028 或 R048 标记乳胶颗粒，该乳胶颗粒的直径为 2-10 μm ，并将标记的乳胶颗粒保存在 HEPES 缓冲液内，pH 8.2。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，以乳腺球蛋白抗原为阳性对照，正常健康女性血清为阴性对照。

3. 一种乳胶凝集抑制法检测乳腺球蛋白的试剂盒，该试剂盒包含包装于容器中的抗乳腺球蛋白抗体、乳腺球蛋白抗原、正常健康女性血清阴性对照和乳胶颗粒，其特征在于，所述的抗乳腺球蛋白抗体为 R028 或 R048，乳胶颗粒的直径为 2-10 μm ，其中，所述的试剂盒包括包装于容器中的 HEPES 缓冲液、包装于容器中的 PBS 缓冲液和具有小池的试验板。

4. 一种双夹心酶联免疫吸附法检测乳腺球蛋白的方法，其特征在于，该方法包括如下步骤：

a) 使包被抗体抗乳腺球蛋白抗体与固相载体结合形成固相抗乳腺球蛋白抗体；

b) 去除未结合抗乳腺球蛋白抗体及其它杂质；

c) 封闭固相抗体；

d) 向每份固相抗体加入等体积乳腺球蛋白抗原标准品和待测样本，反应；

e) 去除未结合部分；

f) 加入标记的酶标抗体抗天然乳腺球蛋白抗体，反应；

- g) 洗去未结合的部分;
- h) 加入标记的辣根过氧化酶, 反应;
- i) 洗去未结合的部分;
- j) 加入显色底物, 反应, 用 50mmol 硫酸终止; 和
- k) 读数。

5. 如权利要求 4 所述双夹心酶联免疫吸附法检测乳腺球蛋白的方法, 其特征在于, 包被抗体是特异性抗乳腺球蛋白单克隆抗体 RO48。

6. 如权利要求 5 所述双夹心酶联免疫吸附法检测乳腺球蛋白的方法, 其特征在于, 酶标抗体是生物素标记的特异性抗乳腺球蛋白单克隆抗体抗体 RO28, 标记的辣根过氧化酶是链霉素抗生物素蛋白标记的辣根过氧化酶。

7. 如权利要求 4 至 6 任一所述双夹心酶联免疫吸附法检测乳腺球蛋白的方法, 其特征在于, 乳腺球蛋白抗原标准品以浓度梯度序列加入固相抗体。

8. 一种双夹心酶联免疫吸附法检测乳腺球蛋白的试剂盒, 该试剂盒包含包括于容器中的包被抗体、酶标抗体、乳腺球蛋白标准品和正常健康女性血清, 其特征在于, 包被抗体是特异性抗乳腺球蛋白单克隆抗体 RO48、酶标抗体是生物素标记的特异性抗乳腺球蛋白单克隆抗体抗体 RO28。

9. 如权利要求 8 所述的试剂盒, 其特征在于, 该试剂盒还包括包含于容器中的链霉素抗生物素蛋白标记的辣根过氧化酶。

10. 如权利要求 8 或 9 所述的试剂盒, 其特征在于, 该试剂盒还包括乳腺球蛋白标准品、健康女性血清、96 孔板和显色底物。

11. 一种 RT-PCR 检测乳腺球蛋白表达的方法, 包括 如下步骤:

- a) 用常规方法提取样本中 mRNA，反转录成 cDNA；
- b) 提供两段 PCR 引物，该引物所包含的寡聚核苷酸位于编码乳腺球蛋白的 cDNA 的两测或位于其中；
- c) 用 PCR 扩增编码乳腺球蛋白的 cDNA；和
- d) 检测扩增产物，

其特征在于，该两段 PCR 引物所包含的寡聚核苷酸是 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2。

12. 如权利要求13所述的方法，产物经琼脂糖电泳，然后用标记探针杂交，其特征在于，该探针核苷酸序列为 SEQ ID NO: 3。

13. 如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，将标记探针用包被液点样于平均孔径 2—10 μm 的高分子聚合物膜上，然后干燥之；再将该检测膜与上述 RT—PCR 产物接触，检测 RT—PCR 产物是否与探针反应。

14. 一种 RT—PCR 检测乳腺球蛋白表达的试剂盒，该试剂盒包括包装于容器中的两段 PCR 引物，它们包含的寡聚核苷酸位于编码乳腺球蛋白的 cDNA 的两测或位于其中，其特征在于，该两段引物包含核苷酸序列 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2，该试剂盒包括包装于容器中的检测扩增产物的杂交探针，该探针包含核苷酸序列 SEQ ID NO: 3。

15. 如权利要求 14 所述的试剂盒，其特征在于，该试剂盒包括检测膜，该检测膜为平均孔径 2—8 μm 的高分子聚合物膜。

16. 如权利要求 15 所述的试剂盒，其特征在于，该检测膜为平均孔径 2—8 μm 的高分子聚合物膜，在该检测膜上已预先固定了探针。

一种检测乳腺球蛋白的方法及其试剂盒

技术领域

本发明涉及一种检测乳腺球蛋白的方法及其试剂盒。系一种用抗乳腺球蛋白单克隆抗体标记的乳胶颗粒通过乳胶凝集抑制法检测乳腺球蛋白的方法。

背景技术

乳腺癌是妇女常见的恶性肿瘤，占有女性恶性肿瘤的 22%。全世界每年约有 120 万妇女患乳腺癌，50 万人死于乳腺癌。在西欧、北美等发达国家，乳腺癌发病率占女性恶性肿瘤首位。乳腺癌在发达国家的发病率是贫穷国家的两倍。据 1992-1996 年统计，在美国乳腺癌的发病率是 110.6/10 万人。虽然亚洲是乳腺癌低发区，但是，我国乳腺癌的发病率也正在逐年上升。用世界标准人口调整计算的发病率 1982 年到 1984 年时，上海仅为 10 万分之 19，而 1988 年到 1992 年已升至 10 万分之 25.6。目前抽样调查到的天津、北京、哈尔滨、武汉等地的发病率都占到当地女性恶性肿瘤的第一或第二位；而死亡率都为女性恶性肿瘤的第四或第五位。我国乳腺癌特点，除发病率逐年增长外，在发病年龄上，与西方国家有明显差别。从 30 岁以后就开始增加，发病年龄高峰在 40-49 岁，比西方妇女早 10-15 年，以中年人居多，这个时期妇女处于最佳工作年龄状态，因此乳腺癌发病率的增加无疑会对社会及家庭产生巨大影响。由于经济文化发展的限制，我国乳腺癌病人就诊时的病期相对偏晚，术前偏晚的 III、IV 期病人的比例约为 30%，而同期美国约为 15%。病期越晚，治疗越加困难。

降低乳腺癌死亡率的根本途径在于临床早期诊断。传统的乳腺癌早期诊断

包括：乳房检查、X 线检查、CT 检查、活体组织检查及血清乳腺癌肿瘤标志物检查。前三种方法或者阳性率低，检查方法繁琐，费用昂贵；或者对病人有侵入性。早期、简单、便宜，及非侵入的乳腺癌血清肿瘤标志物检查不失为最佳方法，特别是在中国这样的发展中国家，人们还负担不起昂贵的乳癌检测费用。

在癌变过程中，由肿瘤细胞产生、分泌的细胞组织成份以蛋白质、DNA 或 mRNA 的形式存在于病人的血液中，这类物质称肿瘤标志物。现在已知的与乳腺癌有关的肿瘤标志物有：(1) 癌胚抗原 (CEA)：为非特异性抗原，在许多来源于上皮肿瘤及某些非肿瘤疾病血清中都有升高，无鉴别诊断价值，可作为乳腺癌患者术前检查的一项指标，约有 20%~30% 乳癌病人血中 CEA 含量升高，晚期及转移性入癌患者中则有 50%~70% 出现 CEA 高值；(2) 铁蛋白：血清铁蛋白反映体内铁的储存状态，在很多恶性肿瘤如白血病、胰腺癌、胃肠道肿瘤、乳腺癌患者血清中都有铁蛋白的升高；(3) CA15-3：对乳腺癌诊断符合率为 33.3%~57%。它们都不是乳腺癌特异性的肿瘤标记物，因而不能用于乳腺癌的血清鉴别诊断。

美国学者于 1998 首先发现乳腺球蛋白基因 (SEQ ID NO: 4)，乳腺球蛋白基因定位于染色体 11q12.2 上。乳腺球蛋白由 93 氨基酸组成 (SEQ ID NO: 5)，分子量大约 10.5kDa，与人类克拉拉细胞 (Clara cell) 分泌的子宫球蛋白/亲脂蛋白 (uteroglobulin/lipophilin) 有关 (Watson M.A. 等, 《肿瘤基因》(Oncogene) 16: 817-824, 1998)。正常乳腺腺上皮分泌微量的乳腺球蛋白，正常女性血清乳腺球蛋白的浓度与妊娠，哺育及良性乳腺增生性疾病有关。正常西方人血清乳腺球蛋白的浓度为 0.1-0.4 $\mu\text{g/L}$ 。血清中乳腺球蛋白的浓度升高与肿瘤临床分期及肿瘤大小有关。乳腺癌组织分泌大量的乳腺球蛋白，乳腺

癌病人血清乳腺球蛋白的浓度一般高于 $1.7 \mu\text{g/L}$ 。研究表明乳腺球蛋白是迄今为止检测人类乳腺癌的最好的标志 (Zehentner BK and Carter D, 《临床化学》(Clin Chem), 37:249-57, 2004; Gillanders WE, Mikhitarian K, Hebert R 等, 《外科年鉴》(Ann Surg), 239:828-37, 2004.)。

Watson 及 Fleming 利用 RT-PCR 方法研究乳腺球蛋白在乳腺癌组织内的表达发现与正常人乳腺组织比较, 23% 乳腺癌内有 10 倍以上的乳腺球蛋白表达 (Watson M. A. and Fleming T. P. 《癌症研究》(Cancer Res), 56: 860-865, 1996)。在最近的一项研究中, Leygue 等用原位杂交方法 (FISH) 发现乳腺球蛋白只在乳腺上皮细胞内表达而不在间质细胞及炎症细胞内表达 (Leygue E. 等, 《病理学杂志》(J. Pathol.), 189: 28-33, 1999)。Nunez-Villar 等利用 RT-PCR 方法检测乳腺球蛋白 mRNA 在乳腺癌内的表达, 发现乳腺球蛋白的高表达与雌激素及孕激素在乳腺癌的表达有关。他们还发现乳腺球蛋白在乳腺癌内的表达与肿瘤的分化及愈后有关: 即分化好的乳腺癌表达高水平的乳腺球蛋白 (Nunez-Villar MJ, Martinez_arribas F, Pollan M, Lucas AR, Sanchez J, Tejerina A, 等, 《乳腺癌研究》(Breast Cancer Res), 5: 65-70, 2003)。研究人员在对 100 例原发性乳腺癌做免疫组织化学检测后发现, 81 例呈阳性反应 (81%)。当乳腺球蛋白免疫组织化学与另一乳腺癌标志 GCDFP-15 结合, 检测的阳性率可以高达 84%。因此乳腺球蛋白免疫组织化学可以作为检测原发性乳腺癌的标志 (Watson M. A. 等, 《癌症研究》(Cancer Res.), 59: 3028-3031, 1999; Fanger GR 等, 《肿瘤生物学》(Tumour Biol.), 23:212-21, 2002; Wherling RW 等, 《现代病理学》(Modern Pathology) 15(1):56A, 2002)。

研究发现乳腺球蛋白是迄今为止最好的 PCR 检测淋巴结内乳腺癌转移的标志。用乳腺球蛋白 RT-PCR 方法检测淋巴结及乳腺原发癌发现, 所有 13 例组织学淋巴结阳性的乳腺癌病人的守卫 (sentinel) 淋巴结内有乳腺球蛋白 mRNA, 而 7 例组织学阴性守卫淋巴结内没有乳腺球蛋白 mRNA 的表达。利用 RT-PCR 方法还发现 119 例组织学阴性的守卫淋巴结中有 9 例呈阳性; 247 例组织学阴性正常淋巴结有 13 例呈阳性。乳腺球蛋白免疫组织化学研究发现 11 例有乳腺癌转移的淋巴结病例中的 10 例表达乳腺球蛋白; 而阴性淋巴结内没有乳腺球蛋白的表达 (Min CJ 等, 《癌症研究》(Cancer Res.), 58: 4581-4584, 1998; Zehentner BK 等, 《临床化学》(Clin Chem.), 48:1225-31, 2002; Branagan G 等, 《英国外科杂志》(Br J Surg), 89 :86-9, 2002; Leygue E 等, 《病理学杂志》(J. Pathol.), 189: 28-33, 1999; Gillanders WE 等, 《外科年鉴》(Ann Surg) 239:828-37, 2004)。

晚期乳腺癌的特徵就是癌细胞经血液转移到身体的其它部位。利用 RT-PCR 方法检测 27 例健康女性血液乳腺球蛋白的表达发现所有 27 例全是阴性; 而 114 例乳腺癌病人有 29 例检测到乳腺球蛋白 mRNA 的存在 (25%)。所有 27 例阳性病人都有血浆 CEA 水平下降。而没有乳癌转移的病人血浆 CEA 水平也下降。总之, 乳腺球蛋白对周围血乳癌细胞的特异性要高于CEA 或细胞角质蛋白 19 (两种常用的周围血乳癌细胞标志) (Zach O 等, 《临床肿瘤学杂志》(J. Clin. Oncol.), 17: 2015-2019, 1999; Carter D 等, 《临床癌症研究》(Cancer Res.) 9:749-54, 2003; Gal S 等, 《纽约科学院年鉴》(Ann NY Acad Sci.) 945:192-4, 2001; Grunewald K 等, 《》(Lab. Invest.) 80: 1071-1077, 2000;

Zehantner BK 等,《临床化学》(Clin Chem), 37:249-57, 2004)。Zehantner 等发现 77% 乳腺癌病人血清有乳腺球蛋白 mRNA 的表达。

乳腺球蛋白通常在正常乳腺组织表达很低,而在乳腺癌组织内高表达。Zehantner (2004) 研究 142 乳腺癌病人的血清乳腺球蛋白发现 100 例 (70%) 阳性 (Zehantner BK 等,《临床化学》(Clin Chem), 37:249-57, 2004)。血清的乳腺球蛋白浓度随肿瘤的大小、临床分期而变化。乳腺球蛋白在结肠癌、肺癌、卵巢癌及前列腺癌组织内均不表达。因此可以利用乳腺球蛋白发展一种高灵敏度的 ELISA 方法来早期检测乳腺癌。但是这方面的研究还是空白 (Fanger GR 等,《肿瘤生物学》(Tumour Biol.), 23:212-21, 2002; Han JH 等,《》(Arch pathol Lab Med.) 127: 1330-7, 2003)。

综上所述,乳腺球蛋白的表达具有乳腺组织特异性,其基因表达的失调对于乳腺癌的早期鉴别具有重要意义,可以作为乳腺癌的标志物。通过对外周淋巴结和外周血中乳腺球蛋白转录产物的分析,对于检测隐匿的乳腺癌转移同样具有指示性意义。

中国专利申请(申请号:CN 98809313)公开了一种用免疫印迹法检测乳腺球蛋白的方法,该方法可以用于乳腺球蛋白的定性检测,每次试验能够处理的样本数量受制于电泳印迹设备的限制,而且试验所需时间较长。目前尚缺乏快速高灵敏度的定性检测乳腺球蛋白的方法和可以全定量和/或半定量检测乳腺球蛋白的方法。

发明内容

发明人已经进行了广泛的研究,以提供一种高度灵敏的可以定量和/或半定

量的检测乳腺球蛋白的方法，该目的可以通过乳胶凝集抑制法和双夹心酶联免疫吸附法实现。进而发明人对此两种方法及其检测试剂盒进行了广泛的研究。

因而，本发明所要解决的技术问题之一是提供一种检测乳腺球蛋白的方法以克服现有技术中存在的处理样本数量少、定性检测时间长及不能定量测定乳腺球蛋白的技术缺陷。

本发明所要解决的技术问题之二是提供一种检测乳腺球蛋白的试剂盒，使上述检测乳腺球蛋白的方法更加方便实施。

本发明的构思是这样的：根据免疫学凝集抑制试验的原理，乳腺球蛋白抗原能够与结合了抗乳腺球蛋白抗体的乳胶颗粒结合，因而含有乳腺球蛋白抗原的样本就会发生凝集反应，可以用于定性或半定量测定乳腺球蛋白。双夹心酶联免疫吸附法广泛用于抗原检测，可以用于乳腺球蛋白的定量测定。另外对该乳腺球蛋白检测方法的试剂盒进行研究。

本发明提供了乳胶凝集抑制法检测乳腺球蛋白的方法，包括如下步骤：a) 将抗乳腺球蛋白抗体标记的乳胶颗粒与待测样本混合，和 b) 根据是否出现凝集反应判定检测结果。

抗乳腺球蛋白抗体可以是单克隆抗体，也可以是多克隆抗体。制备抗乳腺球蛋白抗体的方法在本领域是已知的。例如用提纯的天然乳腺球蛋白来免疫兔或鼠产生专一性的抗乳腺球蛋白单克隆浆细胞株，单克隆浆细胞株再与骨髓瘤细胞融合，得到骨髓杂交瘤细胞。骨髓杂交瘤细胞在经过反复的筛选克隆便可以产生针对乳腺球蛋白有特异性的单克隆细胞株。培养该单克隆细胞株，用本领域技术人员熟知的技术检测培养上清中是否有抗乳腺球蛋白单克隆抗体产生。

所谓天然的意思是乳腺球蛋白可以从天然来源（如正常或病变生物体）中分离得到并未经人工改造。

优选地，本发明使用的抗乳腺球蛋白单克隆抗体为 R028 或 R048。该抗体使用权由申请人在美国的公司 (ZETA CORPORATION) 从美国 CORIXA 公司获得。

待测样本的含义指：其可以是组织活检样品或血液、血浆、血清等，根据需要也可以对其进行处理。优选地，本发明的待测样本是血清。

优选地，乳胶凝集法检测乳腺球蛋白的方法，包括如下步骤：

- a) 用抗乳腺球蛋白抗体 R028 或 R048 标记乳胶颗粒；
- b) 将标记的乳胶颗粒保存在 HEPES 缓冲液内 (pH 8.2)；
- c) 以乳腺球蛋白抗原为阳性对照，正常健康女性血清为阴性对照；
- d) 等体积的待测样本、阴性对照和阳性对照分别与同一体积的标记乳胶颗粒混合、反应；和
- e) 根据是否出现凝集反应判定检测结果。

优选地 HEPES 缓冲液含有 0.2 g/L 叠达钠。

本发明提供了用于乳胶凝集抑制法检测乳腺球蛋白的试剂盒。该试剂盒包含包装于容器中的抗乳腺球蛋白抗体、乳腺球蛋白抗原、正常健康女性血清阴性对照和乳胶颗粒。

优选地上述试剂盒所述之抗乳腺球蛋白抗体是 R028 或 R048。所述的乳腺球蛋白抗原是天然乳腺球蛋白。所述的乳胶颗粒直径为 2-10 μm ，优选地其直径为 2 μm 。优选地该试剂盒还包括具有小池的试验板，如有试验池的玻璃片。更优选地该试剂盒还包括包装于容器中的 HEPES 缓冲液和包装于容器中的 PBS 缓冲

液。

另一方面，本发明提供了一种双夹心酶联免疫吸附法检测乳腺球蛋白的方法。该方法包括如下步骤：

a) 使抗乳腺球蛋白抗体（包被抗体）与固相载体结合形成固相抗乳腺球蛋白抗体；

b) 去除未结合抗乳腺球蛋白抗体及其它杂质；

c) 封闭固相抗体；

d) 向每份固相抗体加入乳腺球蛋白抗原标准品和待测样本，反应；

e) 去除未结合部分；

f) 加入标记的抗天然乳腺球蛋白抗体（酶标抗体），反应；

g) 洗去未结合的部分；

h) 加入标记的辣根过氧化酶，反应；

i) 洗去未结合的部分；

j) 加入显色底物，反应，用 50mmol 硫酸终止；和

k) 读数。

其中，步骤 a) 中的包被抗体是特异性抗乳腺球蛋白抗体，优选地是抗乳腺球蛋白单克隆抗体，更优选地是抗体 RO48。

所述的固相载体可以是本领域技术人员所熟知的 96 孔板或其他合适的器材，如方便使用的酶标排条。

步骤 f) 中所述的酶标抗体可以是标记的特异性抗乳腺球蛋白抗体，优选地是标记的抗乳腺球蛋白抗体 RO28。标记的含义在本领域是已知的，如用生物素标记该抗体。

步骤 h)中的标记的辣根过氧化酶与 f)相应, 如用链霉素抗生物素蛋白标记辣根过氧化酶(streptoavidin-horseradish peroxidase)。

显色底物在本领域是已知的, 如可以是 N-四甲联苯胺(Tetramethylbenzidine)、ABTS 即 2,2'-连氮基-双(3-乙基苯并噻吡咯啉-6 磺酸(2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid))。

封闭固相抗体的封闭液在本领域是已知的, 例如可以是脱脂牛奶或者动物白蛋白。

所说的乳腺球蛋白抗原是天然乳腺球蛋白。每一步骤所用的缓冲液、反应温度及其反应时间可以根据本领域公知的知识确定。

优选地, 本发明的双夹心酶联免疫吸附法检测乳腺球蛋白的方法在向每份固相抗体加入等体积乳腺球蛋白抗原标准品和待测样本时, 同时加入等体积正常健康女性血清。

值得一提的是, 当乳腺球蛋白抗原标准品以梯度序列加入固相抗体时, 即可以定量测定待测样本中的乳腺球蛋白, 方法是用 450nm 光谱仪(如本领域常用的酶标仪)读数, 作出标准曲线从而计算出待测样本中乳腺球蛋白的含量。而当仅有一个或两个或三个乳腺球蛋白抗原标准浓度或者尽管以梯度序列加入乳腺球蛋白抗原标准但用目视检测时, 可以半定量检测乳腺球蛋白。

本发明提供了双夹心酶联免疫吸附法检测乳腺球蛋白的方法所用的试剂盒, 该试剂盒包含包括于容器中的包被抗体、酶标抗体、乳腺球蛋白标准品和正常健康女性血清。优选地所说的包被抗体是抗乳腺球蛋白抗体 RO48, 所说的酶标抗体是标记的抗乳腺球蛋白抗体 RO28, 更优选地该酶标抗体是生物素标记的抗乳腺球蛋白抗体 RO28。

优选地，用双夹心酶联免疫吸附法检测乳腺球蛋白所用的试剂盒还包括标记的辣根过氧化酶，更优选地该标记的辣根过氧化酶是链霉素抗生物素蛋白标记辣根过氧化酶。

实施本发明提供的检测乳腺球蛋白的方法时，可以先用乳胶凝集抑制法检测样本，对呈阳性反应者再用双夹心酶联免疫吸附法定量测定样本中的乳腺球蛋白含量。

MDA-MB-415 细胞分泌高浓度的天然乳腺癌球蛋白，培养 MDA-MB-415 细胞，离心或过滤除去细胞，收集上清经过分离提取天然乳腺癌球蛋白。测定提取的天然乳腺癌球蛋白的浓度。

本发明提供的另一种检测样本中乳腺球蛋白表达的方法是通过反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测样品中的乳腺球蛋白 mRNA 实现的。该方法包括如下步骤：a) 用常规方法提取样本中 mRNA，反转录成 cDNA，b) 提供两端段 PCR 引物，该引物所包含的寡聚核苷酸位于编码乳腺球蛋白的 cDNA 的两测或位于其中，c) 用 PCR 扩增编码乳腺球蛋白的 cDNA，和 d) 检测扩增产物。由 mRNA 反转录 cDNA 的方法在本领域是公知的。优选地所提供的 PCR 引物包含核苷酸序列 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2。按照本领域已知的技术进行 PCR 扩增反应进行，检测扩增产物的方法可以是琼脂糖电泳，也可以是用标记探针杂交，优选地该标记探针包含核苷酸序列 SEQ ID NO: 3。

优选地，检测扩增产物可以这样进行：将标记探针用包被液点样于平均孔径 2—10 μm 的高分子聚合物膜上，然后干燥之；再将该检测膜与上述 RT-PCR 产物接触，检测 RT-PCR 产物是否与探针反应。包被探针和杂交试验的条件在本

领域是公知的。

在另一方面，本发明提供了 RT-PCR 检测样品中的乳腺球蛋白表达的试剂盒。该试剂盒包括包装于容器中的两段 PCR 引物，它们包含的寡聚核苷酸位于编码乳腺球蛋白的 cDNA 的两测或位于其中，该两段引物包含核苷酸序列 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO:2。优选地，该试剂盒还包括检测扩增产物的杂交探针，该探针包含核苷酸序列 SEQ ID NO: 3。优选地，该试剂盒还包括检测膜，该检测膜为平均孔径 2—8 μm 的高分子聚合物膜。更优选地该检测膜为平均孔径 2—8 μm 的高分子聚合物膜，标记探针固定在该检测膜上。

最优选地，该试剂盒还包括乳腺球蛋白 cDNA 阳性对照品，其核苷酸序列包含核苷酸序列 SEQ ID NO: 4。

乳腺球蛋白的表达具有组织特异性，是乳腺癌的特异性标记物，而且其基因表达的失调在乳腺癌的早期即已发生，因而检测乳腺球蛋白对于早期发现乳腺癌形成性细胞的存在、检测乳腺癌转移及评价愈后具有重要意义。检测乳腺球蛋白与乳房 X 照相术结合能够提高对乳腺癌预测的准确性。

本发明提供的检测乳腺球蛋白的方法，乳胶凝集抑制法和双夹心酶联免疫吸附法检测乳腺球蛋白均具有显著优点：可以同时处理大量样本，乳胶凝集抑制法检测乳腺球蛋白较之免疫印迹法，试验所需时间大大缩短；双夹心酶联免疫吸附法检测乳腺球蛋白能够定量检测样本中乳腺球蛋白的含量。例如，在实施例 3 中，当采用 96 孔板进行双夹心酶联免疫吸附法检测时，乳腺球蛋白标准梯度设定 7 个浓度，每一浓度做两个复孔，每个样品业同样做两个复孔，如此每板可同时处理 40 余个样本，由于每个样本做两个复孔，其试验结果更加准确

可靠。方法简单，易操作，易为大多国内医院临床实验室所掌握。利用本发明的试剂盒，所有的检测试验将更加简单便捷。

基于如上所述该发明有及强的临床实用性，易普及，可以大大地提高我国乳腺癌的早期诊断率。同时该发明的方法的成本低，方法的使用成本要比现行的检查乳腺癌方法 (X 线，CT 断层扫描等方法) 的成本低两倍以上，因此很适合我国的国情。

具体实施方式

以下通过具体的实施例进一步说明本发明，但它们都是说明性的，不以任何形式限制本发明的范围。

实施例 1

将 2.7-4.5 ml 病人血液收集于内含 EDTA 的采集管内，混匀，移去血浆，将血浆离心 15 分钟 ($2500\times g$)，取上清冰冻。用抗乳腺球蛋白抗体 R028 标记乳胶颗粒 (直径 $2\mu m$)。将标记的乳胶颗粒保存在 ($2-8^{\circ}C$) 含有 0.2 g/L 叠达钠的 HEPES 缓冲液内 (pH 8.2)。取出所有试剂放置室温下 10 分钟。正常健康女性血清阴性对照及乳腺球蛋白阳性对照试管各加入 $200\mu l$ PBS，静置 10 分钟，然后混匀。反复混匀试管内的凝胶颗粒。使用有试验池的玻片，先向不同的池中滴入 $20\mu l$ 病人血浆及 $20\mu l$ 阴性对照和 $20\mu l$ 阳性对照，左右摇晃 1~2 分钟使之混匀，然后各加入乳胶颗粒一滴，再摇 2~3 分钟使两者充分混合，5 分钟后观察结果，出现均匀一致的凝集小颗粒者为阳性反应，无凝集者为阴性反应。

使用之前应做对照试验，出现如下结果试验方可成立，否则应重试，如重试仍不出现如下结果则停止使用：乳腺球蛋白标准液加乳腺球蛋白抗体标记的凝胶颗粒阳性凝集；正常健康女性血清加乳腺球蛋白抗体标记的凝胶颗粒呈阴性凝集。

实施例 2

用抗乳腺球蛋白抗体 R048 标记乳胶颗粒（直径 $2\ \mu\text{m}$ ），其他步骤同实施例 1。

实施例 3

双夹心酶联免疫吸附法检测乳腺球蛋白，步骤如下：

- 1) 将特异性抗乳腺球蛋白 R048 抗体稀释至 $4\ \mu\text{g/ml}$ 。将稀释的 $50\ \mu\text{l}$ R048 抗体与固相载体 96 孔板反应 ($200\ \text{ng/孔}$)， 4°C 过夜。吸去多余上清，洗去未结合的抗体及杂质；
- 2) 加入 $250\ \mu\text{l}$ 脱脂牛奶 (50g/L , PBS 缓冲液稀释) 室温下反应 2 小时；
- 3) 吸去多余上清，洗去未结合的抗体及杂质；
- 4) 标准组： 每孔加入 $30\ \mu\text{l}$ 天然乳腺球蛋白
- 5) (稀释 7 个浓度： 5ng/ml 、 2.5ng/ml 、 1.25ng/ml 、 625pg/ml 、 312pg/ml 、 156pg/ml 、 78pg/ml) 及 $10\ \mu\text{l}$ 正常女性血清；
测试样本组：每孔加入 $30\ \mu\text{l}$ 稀释液及 $10\ \mu\text{l}$ 待测乳腺癌病人血清；
标准组和测试样本组均做两个复孔；
- 6) 室温下反应 3 小时；

- 7) 洗去未结合的部分;
- 8) 将生物素化 (biotinylated) 的 R028 (1mg/L) 抗天然乳腺球蛋白抗体用稀释液稀释。将 50 μ l 的稀释后生物素化 R028 抗体加入孔内, 室温下反应 60 分钟;
- 9) 洗去未结合的部分;
- 10) 稀释链霉素抗生物素蛋白标记的辣根过氧化酶至 0.1 μ g/ml. 每孔加入 50ul 的稀释的超生物素标记的辣根过氧化酶, 室温下反应 30 分钟;
- 11) 洗去未结合的部分;
- 12) 每孔加入 50 μ l 底物 N-四甲联苯胺, 在振动器上室温下反应 2 分钟, 反应用 0.05 mol/L 硫酸终止。
- 12) 450 nm 光谱仪读数, 绘制标准曲线, 计算待测试样本中乳腺球蛋白含量。

实施例 4

乳腺癌病人血清 mRNA 用常规方法提取, 然后转录成 cDNA。将待检标本 cDNA 热变性为单股 DNA 作为模板, 加一对人工合成的模板 DNA 两端各 20 个碱基互补的引物 5' - TGCCATAGATGAATGA AGGAATG (SEQ ID NO: 1); 和 3' - TGTCATATATTAATTGCATAAACCCACCTCA (SEQ ID NO: 2), 在耐热 DNA 聚合酶作用下, 使四种脱氧核苷按模板 3' 端引物向 5' 端延伸成 DNA 链, 经 20~40 循环。用同样的方法扩增乳腺球蛋白阳性乳腺癌 DNA 及阴性对照 DNA。上述产物经琼脂糖电泳, 然后用标记探针杂交检测扩增产物, 杂交探针核苷酸序列为: TCTTAACCAAACGGATGAACTCTGAGCAATG (SEQ ID NO: 3)。

实施例 5

RT-PCR 扩增乳腺球蛋白 cDNA 的方法同实施例 4。将标记探针用包被液点样于平均孔径 $2\ \mu\text{m}$ 的高分子聚合物膜（硝酸纤维素膜）上，然后干燥之；将该检测膜与上述 RT-PCR 产物接触，检测 RT-PCR 产物是否与探针反应。

序列表

<110> 上海晶泰生物技术有限公司

<120> 一种检测乳腺球蛋白的方法及其试剂盒

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 1

tgccatagat gaatgaagga atg

23

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 2

tgtcatatat taattgcata aaccacctca

30

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 探针

<400> 3

tcttaaccaa acggatgaaa ctctgagcaa tg

32

<210> 4

<211> 503

<212> DNA

<213> 人种 (human sp.)

<220>

<221> CDS

<222> (61)..(339)

<400> 4

gacagcggct tccttgatcc ttgccaccg cgactgaaca cgcacagcag cagcctcacc 60

atg aag ttg ctg atg gtc ctc atg ctg gcg gcc ctc tcc cag cac tgc 108

Met Lys Leu Leu Met Val Leu Met Leu Ala Ala Leu Ser Gln His Cys

1 5 10 15

tac gca ggc tct ggc tgc ccc tta ttg gag aat gtg att tcc aag aca 156

Tyr Ala Gly Ser Gly Cys Pro Leu Leu Glu Asn Val Ile Ser Lys Thr

20 25 30

atc aat cca caa gtg tct aag act gaa tac aaa gaa ctt ctt caa gag 204

Ile Asn Pro Gln Val Ser Lys Thr Glu Tyr Lys Glu Leu Leu Gln Glu

35 40 45

ttc ata gac gac aat gcc act aca aat gcc ata gat gaa ttg aag gaa 252

Phe Ile Asp Asp Asn Ala Thr Thr Asn Ala Ile Asp Glu Leu Lys Glu

50 55 60

tgt ttt ctt aac caa acg gat gaa act ctg agc aat gtt gag gtg ttt 300

Phe Ile Asp Asp Asn Ala Thr Thr Asn Ala Ile Asp Glu Leu Lys Glu
50 55 60
Cys Phe Leu Asn Gln Thr Asp Glu Thr Leu Ser Asn Val Glu Val Phe
65 70 75 80
Met Gln Leu Ile Tyr Asp Ser Ser Leu Cys Asp Leu Phe
85 90

专利名称(译)	一种检测乳腺球蛋白的方法及其试剂盒		
公开(公告)号	CN1766634A	公开(公告)日	2006-05-03
申请号	CN200510106613.4	申请日	2005-09-20
申请(专利权)人(译)	上海晶泰生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海晶泰生物技术有限公司		
[标]发明人	初培国		
发明人	初培国		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/574		
代理人(译)	董梅		
优先权	200510026703.2 2005-06-13 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物化学领域，具体涉及一种检测乳腺球蛋白的方法及其试剂盒。本发明一种乳胶凝集抑制法检测乳腺球蛋白的方法，该方法包括下述步骤：a)将抗乳腺球蛋白抗体标记的乳胶颗粒与待测样本混合，和b)根据是否出现凝集反应判定检测结果，其中，所述抗乳腺球蛋白抗体标记的乳胶颗粒是用抗乳腺球蛋白抗体R028或R048标记乳胶颗粒，该乳胶颗粒的直径为2 - 10 μ m，并将标记的乳胶颗粒保存在HEPES缓冲液内，pH 8.2。同时还公开了用抗乳腺球蛋白单克隆抗体和生物素标记抗乳腺球蛋白单克隆抗体通过双夹心酶联免疫吸附法定量检测乳腺球蛋白的方法。另外还公开了一种RT - PCR检测乳腺球蛋白表达的方法，也提供了用于检测乳腺球蛋白的试剂盒。本发明的方法和试剂盒可用于乳腺癌形成性细胞存在的早期检测。