

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810030668.5

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

C12N 5/18 (2006.01)

[43] 公开日 2008年7月30日

[11] 公开号 CN 101231292A

[22] 申请日 2008.2.25

[21] 申请号 200810030668.5

[71] 申请人 中南大学

地址 410083 湖南省长沙市麓山南路1号

[72] 发明人 李桂源 熊 炜 曾朝阳 周艳宏  
张文玲 李小玲 周厚德 范松青  
肖 岚 周 鸣 沈守荣

[74] 专利代理机构 中南大学专利中心  
代理人 龚灿凡

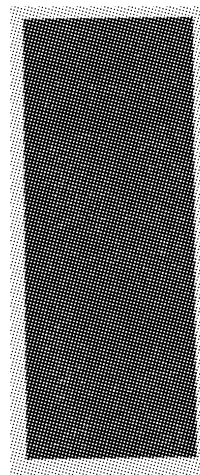
权利要求书1页 说明书9页 附图1页

## [54] 发明名称

人乳转铁蛋白及其检测试剂盒在鼻咽癌诊断中的应用

## [57] 摘要

本发明公开了人乳转铁蛋白 LTF 及其 ELISA 检测试剂盒在鼻咽癌诊断中的应用。本发明通过研究证实人乳转铁蛋白 LTF 基因在鼻咽癌组织中特异表达下调,从而提出乳转铁蛋白 LTF 用于鼻咽癌诊断、筛查和患病风险预测的用途。并制备出抗人 LTF 的抗体,进一步经双抗夹心法制备出用于鼻咽癌诊断的 LTF 蛋白 ELISA 检测试剂盒,从鼻咽部取分泌物进行 ELISA 检测,可以定量检测各人群鼻咽分泌物中 LTF 蛋白表达量,从而预测鼻咽癌的患病风险,筛查易感者,并对鼻咽癌患者做出早期、快速的无创性诊断。



1. 人乳转铁蛋白在鼻咽癌诊断中的用途，其特征在于所述应用方法为：取待测鼻咽分泌物，检测鼻咽分泌物中 LTF 蛋白浓度，当鼻咽分泌物中 LTF 蛋白浓度小于 10ug/ml 时判断为鼻咽癌阳性。
2. 一种鼻咽癌检测的乳转铁蛋白检测试剂盒，包括包被有抗体的酶标板，检测抗体，酶标二抗，通用试剂 Tween-20 和显色底物，其特征在于：所述酶标板孔内为经包被的兔抗人 LTF 融合蛋白抗体，所述检测抗体为鼠抗人 LTF 单克隆抗体，所述酶标二抗为 HRP 标记的抗鼠免疫球蛋白二抗。
3. 如权利要求 2 所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒酶标板孔内的兔抗人 LTF 融合蛋白抗体的浓度为 2ug/ml。
4. 一种如权利要求 2 或 3 所述的试剂盒的制备方法，包括鼠抗人 LTF 多肽单克隆抗体的制备，兔抗人 LTF 融合蛋白抗体的制备，其特征在于所述制备鼠抗人 LTF 多肽抗体的过程是：根据人 LTF 的氨基酸序列，合成氨基酸序列为  
Asn-Tyr-Lys-Ser-Gln-Gln-Ser-Ser-Asp-Pro-Asp-Pro-Asn-Cys-Val-Asp-Arg-Pro-Val-Glu-Gly 的多肽，免疫小鼠，用鼠脾脏 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合，选择性培养，克隆选择，筛选出能产生特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞，体外培养，得到鼠抗人 LTF 单克隆抗体；所述制备兔抗人的 LTF 融合蛋白抗体过程为 PCR 扩增 LTF 基因的开放阅读框序列，将其克隆至带 GST 靶标志的原核表达载体 PGEX 中，转化大肠杆菌 JM109，异丙基-B-D-硫代半乳糖苷诱导 LTF-GST 融合蛋白的表达，纯化；用 LTF-GST 融合蛋白免疫兔，制备兔抗人 LTF 融合蛋白的抗体。
5. 如权利要求 2 或 3 所述的乳转铁蛋白检测试剂盒作为鼻咽癌早期诊断、筛查和患病风险预测检测装置的用途，其特征在于：取待测鼻咽分泌物，用所述试剂盒检测鼻咽分泌物中 LTF 蛋白浓度是否小于 10ug/ml。

## 人乳转铁蛋白及其检测试剂盒在鼻咽癌诊断中的应用

### 技术领域

本发明涉及乳转铁蛋白在鼻咽癌早期诊断中的应用以及一种用于鼻咽癌早期诊断的乳转铁蛋白检测试剂盒。

### 背景技术

鼻咽癌(Nasopharyngeal Carcinoma, NPC)是我国南方常见的恶性肿瘤,为鼻咽粘膜上皮发生的癌肿,大多数为低分化鳞状细胞癌,其恶性程度高,发病部位隐蔽,特别是在咽隐窝和鼻咽顶部者,早期症状不明显,因而难以早期发现,误诊误治率较高。鼻咽癌的五年生存率近年来一直徘徊在 50~60%左右,而鼻咽癌早期确诊病人五年生存率可达 90%以上,因此对鼻咽癌进行高危人群筛查和早期诊断,以便进行早期治疗,可显著提高患者生存率,这一直是 NPC 临床研究的重要课题。

目前鼻咽癌的早期检测方法有多种,包括 EB 病毒血清学标记物、鼻咽癌相关肿瘤标记物如白细胞介素、肿瘤坏死因子、细胞间黏附分子以及端粒酶等的检测。虽然这些指标的单独或联合应用为鼻咽癌的诊断提供了有用的信息,但它们均缺乏足够的灵敏度和特异性。比如 EB 病毒不但与鼻咽癌的发生有关,而且与 Burkitt 淋巴瘤、上呼吸道的感染等密切相关,近来也有报导在各种 T 细胞淋巴瘤中检测到 EB 病毒 DNA,而且并非所有鼻咽癌的发生均与 EB 病毒相关,90%以上的人群在成年前都感染过 EBV,在 NPC 患者血清中检测到 EBV 也并不能证明 EBV 直接与 NPC 有关,鼻咽癌患者 EB 病毒抗体与病理诊断相比阳性符合率仅为 72.6%~77.3%。因此,虽然 EB 病毒相关抗体滴度与鼻咽癌的发生发展有很高的相关性,其检测方法也有优越性,但仍然只能作为一种相关指标而起提示作用,不能用来作为鼻咽癌的确诊指标。如果缺少病理诊断,即使 EB 病毒相关抗体滴度再高,也难以作为实施放疗和化疗的依据。除了对晚期鼻咽癌的病理诊断外,目前尚没有其他的早期、无创性检查方法;即使是病理性诊断,也难以一次性取到病变组织,无法避免对微小病灶的多次有创性取样。鼻咽癌非典型病灶型或粘膜下型的病例虽经多次活检,常因无病理切片阳性结果而延误治疗;对于放疗后的病例,当其鼻咽癌组织表现不典型时,在判断其病变是复发还是放疗反应上,也左右为难,

尤其是某些放疗后出现颅脑症状的患者，各项检查(包括病理检查)都很难准确判断到底是放射性脑病还是病灶向颅内发展，极大的影响治疗决策。因此，如果能建立一种能对鼻咽癌患者进行筛查、诊断的无创性检查方法，则对鼻咽癌的早期筛查、诊断、预防及治疗均具有极其重大的意义。

### 发明内容

本发明的目的在于通过研究证实人乳转铁蛋白 LTF 基因在鼻咽癌组织中特异表达下调，从而提出乳转铁蛋白 LTF 可用于鼻咽癌诊断、筛查和患病风险预测的用途。

本发明的另一目的在于提出人乳转铁蛋白 ELISA 检测试剂盒在鼻咽癌的早期诊断、筛查和患病风险预测的应用，以解决目前对鼻咽癌没有灵敏有效的早期、无创性检查方法的问题。

经过多年的研究，发明人发现鼻咽癌特异表达下调基因 LTF (lactotransferrin, 基因存取号 NM\_002343; GI:54607119)，并证明该基因编码一种分泌性蛋白，能在正常人鼻咽分泌物中检测出，但在鼻咽癌患者鼻咽分泌物中表达下调或缺失。发明人通过对经显微切割纯化的人正常鼻咽粘膜上皮和各个临床分期的鼻咽癌活检组织，进行全基因组基因表达谱分析，发现人乳转铁蛋白基因是在正常鼻咽上皮和鼻咽癌组织中表达差异最明显的基因( $p < 9.28 \times 10^{-11}$ )。经组织微阵列大样本验证，发现所有的正常鼻咽部腺体均能检测到 LTF 蛋白的存在，证实 LTF 蛋白在鼻咽部高表达、且为细胞分泌性蛋白，但不论在 mRNA 水平或者蛋白水平，LTF 的表达在鼻咽癌活检标本或病理切片中均显著下调或缺失。此外，LTF 蛋白的表达与鼻咽癌临床分期存在显著相关性( $p < 0.01$ )，临床 I 期和 II 期鼻咽癌中 LTF 蛋白的表达明显高于临床 III 和 IV 期。另外 LTF 还与鼻咽癌转移呈负相关( $p < 0.05$ )，提示 LTF 它与鼻咽癌的侵袭转移和临床进展有关，可作为鼻咽癌侵袭、转移和临床进展预测的分子靶标。发明人进一步的研究表明，正常人群的鼻咽分泌物中 LTF 蛋白浓度大约为 30~165ug/ml，而鼻咽癌患者的鼻咽分泌物中 LTF 蛋白浓度小于 10ug/ml。

发明人在上述研究基础上，制备了抗人 LTF 的抗体，进一步经双抗夹心法制备 LTF 蛋白的 ELISA 检测试剂盒。本发明用于鼻咽癌早期诊断的人乳转铁蛋白 ELISA 检测试剂盒包括兔抗人 LTF 多抗包被好的酶标板，鼠抗人 LTF 多肽单抗，辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记二抗，通用试剂 Tween-20 和显色底物如邻苯二胺(ortho-phenylenediamine-HCl, OPD)等。该试

试剂盒的酶标板孔内为经包被液处理和阻滞液处理的兔抗人 LTF 融合蛋白抗体；试剂盒酶标板孔内 LTF 融合蛋白抗体的浓度以 2ug/ml 最为合适。

用本发明制备的 LTF 蛋白的 ELISA 检测试剂盒，从鼻咽部取分泌物进行 ELISA 检测，可以定量检测各人群鼻咽分泌物中 LTF 蛋白表达量，从而预测鼻咽癌的患病风险，筛查易感者，并对鼻咽癌患者做出早期、快速的无创性诊断。研究结果表明：该试剂盒能检测出 0.01ug/ml LTF 蛋白的浓度，这说明本发明的试剂盒具有较高的灵敏度；该试剂盒对门诊初诊病人的诊断与病理结果一致，且检测快速，对被检者不造成损伤，病人及正常人均可接受。因而，该试剂盒不但可用于鼻咽癌的早期诊断，而且适用于鼻咽癌的早期大规模人群筛查与患病风险预测，为鼻咽癌的早期诊断与防治提供了强有力的技术支持，具有极大的经济与社会价值。另外发明人还发现 LTF 的表达量和鼻咽癌患者的临床分期及转移密切相关，因此，本发明的 ELISA 检测试剂盒还可作为鼻咽癌预后预测的指标。

#### 附图说明

图 1：免疫组织化学方法检测 LTF 在正常鼻咽上皮标本中的表达结果图；

图 2：免疫组织化学方法检测 LTF 在鼻咽癌活检标本中的表达结果图；

图 3：Western Blot 检测 LTF 在正常鼻咽分泌物和鼻咽癌患者鼻咽分泌物中的表达结果；

图 4：对本发明试剂盒特异性检测的结果。

#### 具体实施方式

前期研究中，发明人利用 18 个湖南鼻咽癌高发家系，通过连锁分析，首次发现染色体 3p21 部分区域与鼻咽癌发病紧密连锁，经单倍型分析和精细定位，将鼻咽癌易感基因区域定位于微卫星标记 D3S1289-D3S1298 之间。此结果提示：染色体 3p21 区域可能存在鼻咽癌的候选易感基因。

为了筛查与鉴定染色体 3p21 区域鼻咽癌的候选易感基因，发明人制备了两种不同的基因芯片，一种是基于鼻咽癌抑制消减杂交文库的 cDNA MicroArray，另一种是包含染色体 3p21 区域（D3S1289-D3S1298）288 个基因的专制芯片。为提高芯片筛查结果的可靠性，用两种不同的基因芯片对相同的试验样本进行研究。

首先，以 4 个鼻咽癌相关的抑制消减杂交文库（NNTDH12、TRP19 DHNE1、TNPC DNN119 和 TNN119 DNPC）为模板，利用 PCR 技术扩增点制 cDNA 芯片所需的克隆，每个文库约 300 个、总共 1200 余个克隆，克隆纯

化后点制基于鼻咽癌抑制消减杂交文库的 cDNA MicroArray。

10 例鼻咽慢性炎症组织和 19 例鼻咽癌组织标本以及 3 例鼻咽癌细胞样本与定制好的 cDNA 芯片杂交,基本数据利用 Genepix Pro 3.0(Axon Instruments)来收集和基础处理。数据分析前,去掉芯片中的污点/坏点。为降低由于低表达基因点所造成的实验偏倚,只选择 Cy5 和 Cy3 信号值皆大于 200 的基因点,并对符合条件基因点的信号值进行均一化处理。经过上述处理后,共获得 1097 个有效克隆信号值。

对上述已预处理的芯片杂交数据,挑取在所有样本中存在>85%的信号值的克隆作进一步分析,898 个(898/1097)克隆通过滤过。使用 Euclidean distance and average linkage clustering 方法,对每个样本和每个基因取平均值和均化处理,然后 Hierarchical clustering 聚类。聚类结果显示:898 个克隆能够把鼻咽慢性炎症组织和鼻咽肿瘤组织很清晰的分为两大类,T01\_F, T01\_S 作为两重复样本聚在一起,N8, N9 和 N10 样本因均为鼻咽慢性炎症上皮,聚为一小束,再与其他正常鼻咽上皮聚类;三种鼻咽癌细胞系 C1, C2 和 C3 聚在一起,再与其他鼻咽癌组织样本聚为一大类。

发明人进一步利用 Genesis 软件的 ANOVA 功能(选择  $p < 0.001$  为统计差异标准)对 898 个克隆进行了筛选,其中 105 个克隆满足要求。利用 105 个差异表达克隆进行 Hierarchical clustering 聚类。聚类结果表明:105 个克隆仍然能够很好地把鼻咽慢性炎症组织和鼻咽肿瘤组织很清晰的分为两大类,T01\_F, T01\_S 作为两重复样本聚在一起,N8, N9 和 N10 样本因均为鼻咽慢性炎症上皮,先聚为一小类,再与其他正常鼻咽上皮聚类;三种鼻咽癌细胞系 C1, C2 和 C3 聚在一起,再与其他鼻咽癌组织样本进行聚类,说明该 105 个克隆能够达到 898 个克隆相同的检验效能。

为进一步鉴定上述 105 个差异表达克隆,利用 PCR 方法扩增出相应的克隆片段,然后将 PCR 产物纯化后测序,测序结果与 NCBI 数据库进行同源性比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)。通过同源比对,筛查到包括染色体 3p21 鼻咽癌易感基因区 LTF 基因在内的 32 个鼻咽癌差异表达基因。

此外,利用包含染色体 3p21 区域 288 个基因的专制芯片对上述相同的实验样本进行了研究,发现在 3p21 区域 288 个基因中,4 个基因在鼻咽癌中表达下调,其中之一为乳转铁蛋白 LTF。

综合分析两组结果,发现 LTF 基因在两种基因芯片中得到相同的表达变化——在鼻咽癌组织中表达下调。

为了验证芯片结果的可靠性,发明人利用 real-time quantitative RT-PCR 技术,选择 LTF 基因进行验证。结果与芯片结果一致,说明芯片结果可靠。

为了在大样本中进一步验证基因芯片筛查出来的差异表达基因,发明人利用组织微阵列芯片(TMA)和免疫组织化学技术对 LTF 基因蛋白水平的表达情况在较大样本中进行了研究,发现 LTF 在鼻咽癌中表达下调(参见附图 2),在正常鼻咽组织(参见附图 1)、鼻咽癌癌旁和鼻咽慢性炎症组织中存在高表达。几乎所有的鼻咽部腺体均能检测到 LTF 蛋白的存在,证实 LTF 蛋白在腺体中高表达,为一细胞分泌性蛋白。此外,LTF 蛋白的表达与鼻咽癌转移呈负相关( $p < 0.05$ )。LTF 蛋白的表达与鼻咽癌临床分期存在显著相关性( $p < 0.01$ )。临床 I 期和 II 期鼻咽癌中 LTF 蛋白的表达明显高于临床 III 和 IV 期( $p < 0.01$ )。提示它可能与鼻咽癌的侵袭转移和临床进展有关,为鼻咽癌候选易感基因,可作为鼻咽癌侵袭、转移和临床进展预测的分子靶标。

### 实施例 1: 制备 LTF 的 ELISA 试剂盒

#### (一) LTF 抗体的制备

##### 1. 制备鼠抗人 LTF 蛋白的多肽抗体

(1) 将 LTF 的氨基酸序列输入 DNASTar 软件,得到该蛋白免疫原性最强的一段 21 个氨基酸的多肽,该多肽的序列为: NYKSQQSSDPDPNCVDRPV EG,化学合成该多肽,将多肽与钥孔血蓝素(Keyhole limpet hemocyanin, KLH) 交联以增加免疫原性。

(2) 将多肽溶于磷酸盐缓冲液(PBS),注射小鼠,首次剂量为 300ug/kg,加强免疫的剂量约为首次剂量的 1/4 左右。每 2~3 周加强免疫一次,共免疫 4 次,然后取鼠脾脏 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,在 HAT 培养基中进行选择性培养,经过克隆选择,筛选出能产生特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞,继续体外培养,大量制备单克隆抗体;

##### 2. 制备兔抗人的 LTF 融合蛋白抗体

(1) PCR 扩增 LTF 基因的开放阅读框序列,将其克隆至带 GST 靶标志的原核表达载体 PGEX 中,转化大肠杆菌 JM109,于 30℃ 下用异丙基-B-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导 LTF-GST 融合蛋白的表达,用发玛西亚公司的 GST 蛋白纯化试剂盒纯化出 LTF-GST 融合蛋白,具体操作严格按说明书进行。

(2) 用该融合蛋白免疫新西兰白兔,制备兔抗人 LTF 融合蛋白的抗体,获得的抗血清用 Pierce 公司的亲和层析纯化试剂盒,具体步骤严格按 Pierce 公司的说明书进行,纯化出抗 LTF 的 IgG,并用亲和层析纯化。

### 3. LTF 抗体的效价与特异性检测

(1) 将合成的多肽用包被缓冲液(8.4 克碳酸氢钠、3.56 克碳酸钠溶于 1 升去离子水中, 调 pH 值至 9.05)溶解为 10ug/ml, 按 100ul/孔, 加到 96 孔酶标板, 4℃过夜。

(2) 取出酶标板, 倒掉包被缓冲液, 用含 0.1% Tween-20 的 PBS(PBST) 冲洗 3 遍, 加入 200ul 阻滞液(含 1%牛血清蛋白的 PBST)阻止非特异性结合位点, 37℃孵育 1 小时, PBST 洗脱 4 次。

(3) 按 1:500、1:1,000、1:10,000、1:100,000、1:1,000,000 和 1:10,000,000 共 7 个稀释度(稀释液: 在 1 升去离子水中溶解 80 克氯化钠, 11.6 克磷酸氢二钠, 2 克磷酸二氢钠, 2 克氯化钾, 调 pH 值至 7.2)稀释前面两种 LTF 抗体, 每种抗体个每稀释浓度各取 100ul 加入前述已包被 LTF 多肽的酶标板孔内。37℃孵育 1 小时, PBST 洗 4 次。

(4) 加入 HRP 标记的二抗, 37℃孵育 30 分钟, PBST 洗 4 次。

(5) 混合 6ml 邻苯二胺(ortho-phenylenediamine-Hcl, OPD)试剂 A 与 6ml OPD 试剂 B, 100ul/孔加入 96 孔板, 室温避光孵育 20 分钟, 可见抗体检测阳性的孔呈橙色, 制备的抗体的效价可达 1:1,000,000。

(6) 取正常人和鼻咽癌患者鼻咽分泌物进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转移至硝酸纤维素膜, 按常规程序进行 Western Blot 分析, ECL 显影, 常规洗片。从 Western Blot 检测结果(参见附图 3)来看, 左边为正常人鼻咽分泌物检测结果, 右边为鼻咽癌患者鼻咽分泌物检测结果, 均为 200ug 总蛋白上样, 可见鼻咽分泌物中仅有 1 条目的带, 说明制作的抗体具有高度的特异性。且正常人鼻咽分泌物种的 LTF 蛋白含量显著高于鼻咽癌患者。

#### (二) LTF 的 ELISA 检测试剂盒的制备

##### 1. 包被抗体和酶标抗体工作浓度的选择

按照 Pierce 公司的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书操作, 测定抗体及抗原的浓度。然后采用标准的棋盘测定方法, 用包被缓冲液(配方同前)将兔抗人 LTF 融合蛋白多克隆抗体稀释至浓度为 20.0 ug/ml、2.0 ug/ml 和 0.2ug/ml, 分别在 ELISA 板上包被, 每个浓度包括三个纵行, 4℃过夜, PBST 洗涤 3 次。在其中一个横行的包被孔中加入强阳性抗原液(10ug/ml 的 LTF-GST 融合蛋白), 另一横行中加入弱阳性抗原液(0.001ug/ml 的 LTF-GST 融合蛋白), 第三行加入阴性对照。37℃保温 2 小时, PBST 洗涤 4 次。加入鼠抗人 LTF 多肽单克隆抗体, 37℃保温 1 小时, PBST 洗涤 4 次。加入 HRP 标记的二抗, 37

℃保温孵育 30 分钟，PBST 洗涤 4 次，加入 OPD 底物，室温避光放置 20 分钟，加入中止液(2M 硫酸)，酶标仪上读数，从而选择包被抗体的最佳浓度为 2ug/ml。

## 2. 试剂盒的批量制备

将兔抗人 LTF 融合蛋白抗体用包被缓冲液稀释至 2ug/ml，将其加入到 96 孔酶标板，4℃包被过夜。

倒去未包被的液体，用 PBST 洗涤 3 遍，加入 200ul 阻滞液阻止非特异性结合位点，37℃孵育 1 小时，PBST 洗脱 3 次。放入 4℃保存备用。

试剂盒还分装加入鼠抗人 LTF 多肽单克隆抗体、HRP 标记的二抗，其它通用试剂如 Tween-20 和 OPD。

## 3. 试剂盒灵敏性的检测

将 LTF 重组蛋白用 PBS 稀释成 200ug/ml、100ug/ml、50ug/ml、25ug/ml、10ug/ml、2ug/ml、0.5ug/ml、0.05ug/ml、0.01ug/ml、0ug/ml，每孔 100ul 加入到上述包被好的酶标板中，37℃孵育 2 小时。用含 0.1%Tween-20 的 PBS(PBST) 冲洗 3 遍。

按 1:1000 将鼠抗 LTF 抗体稀释，每孔加入 100ul，37℃孵育 1 小时，PBST 洗 4 遍。

加入 HRP 标记二抗，37℃孵育 30 分钟，PBST 洗 4 遍。

加入 100ul OPD 底物室温放置 15 分钟，加入 2M 的硫酸，490nm 波长的酶标仪下读数。

检测最低的 LTF 的量，结果显示，该试剂能检测出 0.01ug/ml LTF 蛋白的浓度，这说明本发明的试剂盒具有较高的灵敏度。

## 实施例 2： LTF 的 ELISA 试剂盒的使用步骤及特异性、稳定性的检测

取待测鼻咽分泌物，具体方法为：用生理盐水冲洗鼻腔后，将一根细棉签在鼻视镜下插到鼻咽部（疑似肿瘤表面），放置 5~8 分钟，快速取出棉签，将棉球放入底部空心的小离心管，离心管外再套上稍大的离心收集管，在 4℃下 7500Xg 离心 1 分钟，就可获得鼻咽分泌物。该方法为无创性取材，能普遍被人接受。

纯化定量的 LTF 基因重组蛋白作为标准品，将抗原(鼻咽分泌物)按 1:10 稀释后，加入到前面已经包被好的酶标板中，37℃孵育 2 小时，用洗板液 PBST 洗去未结合的抗原，吸干残余液体。

加入鼠抗人的 LTF 多肽单克隆抗体 37℃孵育 1 小时，PBST 洗去未结合

的抗体，吸干残余液体。

加入 HRP 标记的二抗，37℃孵育 30 分钟，PBST 洗涤 4 次，吸干残余液体。加入显色底物 OPD，室温放置 10 分钟，可见各孔显示不同深度的黄色(参附图 4)，加入 2M 硫酸中止反应，酶标仪在 490nm 波长读数，计算样本中 LTF 蛋白的含量。可得到在正常人群的鼻咽分泌物中 LTF 蛋白浓度为 30~165ug/ml，而鼻咽癌患者的鼻咽分泌物中 LTF 蛋白浓度小于 10ug/ml。

通过该方法，发明人检测了 100 例鼻咽癌患者鼻咽分泌物中 LTF 蛋白含量，仅 3 例放疗后的鼻咽癌患者鼻咽分泌物中 LTF 蛋白含量大于 10ug/ml，因而诊断鼻咽癌的准确率达到 97% 以上，具有良好的特异性。

分别取同一正常人和同一鼻咽癌患者的鼻咽分泌物，利用本方法进行了 ELISA 测定，每天测定一次，共重复 10 次，按公式变异系数(CV)=S/X ×100% (S 为标准差，X 为平均值)计算批间及批内变异系数。最终得到批内与批间变异系数分别为 4.63 和 4.98%，说明该检测方法稳定性好。

### 实施例 3: LTF 的 ELISA 试剂盒的临床应用

某一疑似鼻咽癌患者鼻咽部用生理盐水冲洗，按前述方法取患者鼻咽分泌物 40ul，同时对患者进行病理活检。将取得的鼻咽分泌物用 PBS 稀释成 400ul，开始利用本试剂盒对分泌物中的 LTF 蛋白进行定量检测；

冰箱中取出已经包被好的酶标板，室温下放置 20 分钟，同时将标准品按如下浓度稀释：12.8ug/ml、6.4ug/ml、3.2ug/ml、1.6ug/ml、0.8ug/ml、0.4ug/ml、0.2ug/ml、0ug/ml(空白对照)，将稀释后的标准品各取 100ul 按照表 2 中的顺序(下表中的 96 格即为酶标板中的 96 孔)加入到酶标板，3 次重复；

取自正常人的鼻咽分泌物 50 倍稀释液(已定量，含 LTF 蛋白 12ug/ml)加入到 4 个酶标板(标准孔)，每孔 100ul，再在另外的 4 个孔中加入病人的待测样本各 100ul。

表 2 加入稀释后的标准品的 96 孔酶标板

标准品												
0ug/ml	0ug/ml	0ug/ml	患									
0.2ug/ml	0.2ug/ml	0.2ug/ml	者									
0.4ug/ml	0.4ug/ml	0.4ug/ml	患									
0.8ug/ml	0.8ug/ml	0.8ug/ml	者									
1.6ug/ml	1.6ug/ml	1.6ug/ml	正									
3.2ug/ml	3.2ug/ml	3.2ug/ml	常									

6.4ug/ml	6.4ug/ml	6.4ug/ml	正								
12.8ug/ul	12.8ug/ul	12.8ug/ul	常								

37℃孵育 2 小时后，用洗板液 PBST 洗去未结合的抗原，吸干残余液体；  
1:1000 将鼠抗 LTF 抗体稀释，每孔加入 100ul，37℃孵育 1 小时，PBST 洗 4 遍；

加入 HRP 标记二抗，37℃孵育 30 分钟，PBST 洗 4 遍；

加入 100ul OPD 底物室温放置 20 分钟，加入 2M 硫酸(中止液)，490nm 波长酶标仪下读数。

根据测得的 LTF 蛋白浓度乘稀释倍数，得出该病人鼻咽分泌物中 LTF 蛋白含量为 4.27ug/ml。根据如实施例 1 所述的对 100 例鼻咽癌和正常人群鼻咽分泌物 LTF 蛋白浓度所测定的标准，即正常人群的鼻咽分泌物中 LTF 蛋白浓度为 30~165ug/ml，而鼻咽癌患者的鼻咽分泌物中 LTF 蛋白浓度小于 10ug/ml，即可判断该患者患有鼻咽癌。两天后，病理结果显示该患者患鼻咽低分化鳞癌。

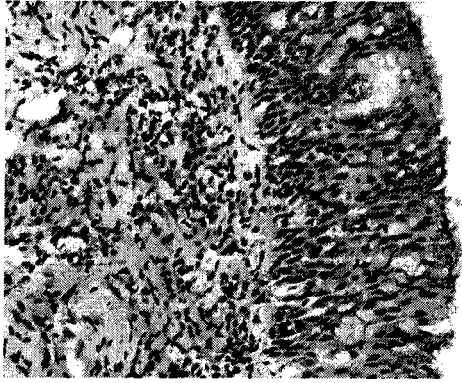


图 1

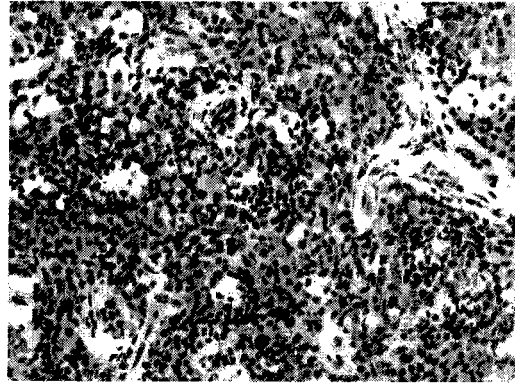


图 2



图 3

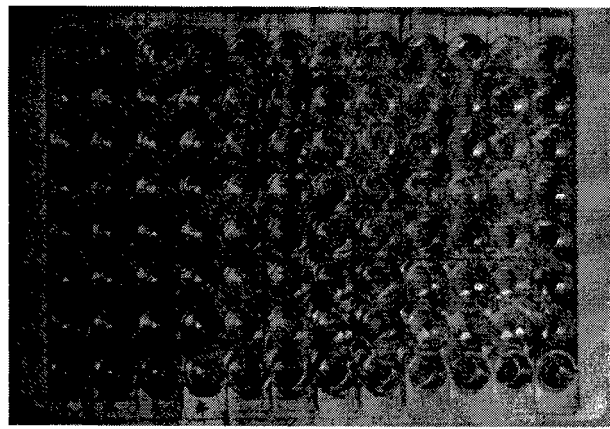


图 4

专利名称(译)	人乳转铁蛋白及其检测试剂盒在鼻咽癌诊断中的应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101231292A</a>	公开(公告)日	2008-07-30
申请号	CN200810030668.5	申请日	2008-02-25
[标]申请(专利权)人(译)	中南大学		
申请(专利权)人(译)	中南大学		
当前申请(专利权)人(译)	中南大学		
[标]发明人	李桂源 熊炜 曾朝阳 周艳宏 张文玲 李小玲 周厚德 范松青 肖岚 周鸣 沈守荣		
发明人	李桂源 熊炜 曾朝阳 周艳宏 张文玲 李小玲 周厚德 范松青 肖岚 周鸣 沈守荣		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/574 G01N33/531 C12N5/18		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了人乳转铁蛋白LTF及其ELISA检测试剂盒在鼻咽癌诊断中的应用。本发明通过研究证实人乳转铁蛋白LTF基因在鼻咽癌组织中特异表达下调，从而提出乳转铁蛋白LTF用于鼻咽癌诊断、筛查和患病风险预测的用途。并制备出抗人LTF的抗体，进一步经双抗夹心法制备出用于鼻咽癌诊断的LTF蛋白ELISA检测试剂盒，从鼻咽部取分泌物进行ELISA检测，可以定量检测各人群鼻咽分泌物中LTF蛋白表达量，从而预测鼻咽癌的患病风险，筛查易感者，并对鼻咽癌患者做出早期、快速的无创性诊断。

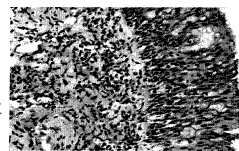


图 1

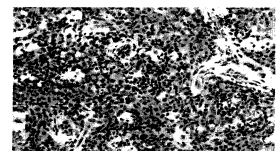


图 2



图 3

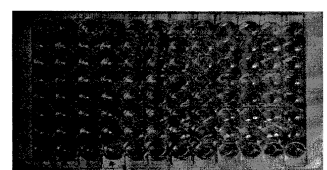


图 4