



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108267598 A

(43)申请公布日 2018.07.10

(21)申请号 201810114701.6

(22)申请日 2018.02.06

(71)申请人 河北省健海生物芯片技术有限责任公司

地址 050000 河北省石家庄市高新区黄河
大道136号12层

(72)发明人 阴建友 钟理 刘薇 沈磊
方闪闪

(74)专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务
所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

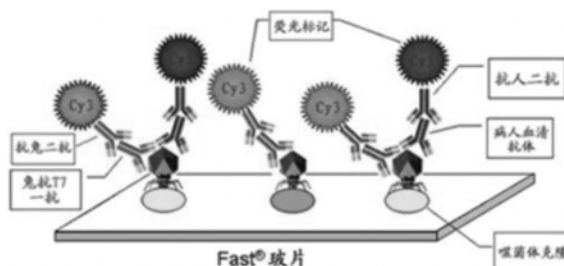
权利要求书2页 说明书9页 附图4页

(54)发明名称

一种用于肺癌筛查的蛋白芯片的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于筛查肺癌的蛋白芯片的制备方法,通过构建吸烟者肺癌组织T7噬菌体展示cDNA文库,将文库中的cDNA片段插入到T7噬菌体载体中,使插入片段以融合蛋白形式展示在噬菌体外壳蛋白上,将外源蛋白或多肽基因与噬菌体特定蛋白基因在其表面进行融合表达,通过生物淘洗和噬菌体展示技术制备了蛋白芯片,将病人的异常基因融合表达为异常蛋白,并借助蛋白芯片的高通量筛选和抗原抗体特异性结合的原理来确定肿瘤标志物,本发明的方法可在早期发现或筛查原发肿瘤,筛查肿瘤高危人群,鉴别肿瘤的良恶性,判断肿瘤的发展过程,观察肿瘤的治疗效果,预测肿瘤的复发和预后中发挥重要作用。



1. 一种用于肺癌筛查的蛋白芯片的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1) 建立癌组织cDNA噬菌体展示文库:

选择病理资料齐全的若干份癌组织,包括一半的I期及一半的II期癌组织,提取得到总RNA,然后分离得到mRNA;

将mRNA作为模板,制备得到两端分别有EcoRI和Hind III粘性末端的双链cDNA;

将上述获得的双链cDNA与噬菌体混合,在连接酶的作用下,取连接产物与包装蛋白混合,得到大量具有感染性的噬菌体颗粒,扩增,形成癌组织cDNA噬菌体文库;

(2) 生物淘洗:

通过亲和选择获得靶功能的蛋白或者多肽,进而作为标志物进行开发应用,即从上述文库中获得噬菌体展示文库;

2.1G蛋白珠封闭:

取两个离心管,分别加入G蛋白琼脂糖珠,用BSA封闭,标记1、2号管;

2.2血清包被:

将若干份正常人血清混合,稀释后,用其包被1号管,4℃放置1h,将若干份癌病人血清混合,稀释后,包被2号管,4℃放置1h;之后用PBS清洗,离心去上清;

2.3生物淘洗:

向1号管中加入上述构建的噬菌体文库,将其混合均匀,离心,收集悬浮液,备用,2h后用PBS洗2号管G蛋白琼脂糖珠3次,离心,去上清,将之前步骤收集的悬浮液加入2号管中,混合均匀,4℃放置,然后离心去上清,再用PBS洗脱,离心,收集悬浮液,即为免疫原性噬菌体;

2.4淘洗后的富集

将淘洗后得到的免疫原性噬菌体加入到BLT5615中,混合均匀,37℃倒置培养,长出噬菌斑;加入噬菌斑提取液,过夜,收集噬菌斑提取液,离心,保存上清;

重复进行多轮淘洗、扩增,将最后一轮扩增后的噬菌体-80℃储存,备用。

2.5cDNA文库的稀释铺板;

将最后一轮淘洗后的文库一系列梯度稀释,稀释多个梯度,取稀释后的多个文库分别与备用的宿主菌混合,铺板,37℃倒置培养,直到长出清晰的噬菌斑后,4℃保存;

(3) 芯片构建与高通量筛选:

3.1芯片的构建:

在孔板中加入BLT 5615菌液,用灭菌牙签挑取单克隆到孔板中,置于摇床培养,离心,分别从每孔中取上清于一新的孔板,用于点样,使用自动点样仪,设置矩阵和间距后进行取样、点样,得若干张蛋白芯片。

2.根据权利要求1所示的用于肺癌筛查的蛋白芯片的制备方法,其特征在于:使用PolyATtract mRNAIsolation SystemIII分离得到mRNA。

3.根据权利要求1或2所示的一种用于肺癌筛查的蛋白芯片的制备方法,其特征在于:分别构建了正常人群与吸烟肺癌相关的cDNA文库。

4.根据权利要求1所示的用于肺癌筛查的蛋白芯片的制备方法,其特征在于:通过生物淘洗获得了具有吸烟肺癌免疫原性的噬菌体文库。

5.根据权利要求1所示的用于肺癌筛查的蛋白芯片的制备方法,其特征在于:所述芯片的构建过程中使用的芯片为硝酸纤维素膜玻片。

6. 根据权利要求1所示的用于肺癌筛查的蛋白芯片的制备方法, 其特征在于: 所述蛋白芯片由自动点样仪点制, 是由多个亚阵列组成的微阵列芯片。

7. 根据权利要求1所示的用于肺癌筛查的蛋白芯片的制备方法, 其特征在于: 所述蛋白芯片的检测肿瘤标志物的技术为双荧光检测体系。

一种用于肺癌筛查的蛋白芯片的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于肺癌筛查的蛋白芯片的制备方法。

背景技术

[0002] 一直以来,吸烟被认为是诱发肺癌的首要危险因素,因此,研究人员一直在探索吸烟诱发肺癌的机理,并试图寻找可以作为吸烟人群肺癌风险预测的标志物,早在上世纪末,研究者们就对吸烟人群中的分子变化进行了研究,结果显示,在吸烟以及曾经吸烟但并未诊断出肺癌的人群中,p53基因变异以及甲基化已呈现出明显趋势,变化程度分别可达到70%和100%,Church等也在2009年首次利用血清中烟草特异性致癌物对吸烟人群的肺癌患病风险性进行了研究,结果显示,NNAL(烟草甲基亚硝胺)是所有检测指标中唯一一个与肺癌危险性相关的标志物,并且还可以明显区分腺癌与非腺癌患者,另外,对吸烟正常人与非吸烟正常人之间对比发现,24h的尿液中尼古丁和NNAL两种标志物的检测浓度在吸烟样本中显示明显的特异性,表明这两种标志物具有区分吸烟与非吸烟人群的特性。

[0003] 近年来,为了探索汉族人群中肺癌风险相关基因,我国科研人员通过全基因组关联研究(GWAS),在中国汉族人群中鉴定出了与肺癌相关的4个新位点,在此研究中,研究人员对上万例样本进行检测,鉴定出了4个与肺癌相关联的风险位点,其中13q12.12和22q12.2为汉族人群中的新发风险位点,这项研究结果表明肺癌易感人群在基因水平上的差异性,为本研究在蛋白抗体水平寻找易感人群的差异提供了理论依据。

[0004] 自身免疫抗体作为免疫监视原理的产物,具有早期检测癌症发生与发展过程的能力,是近年癌症早期诊断标志物的研究方向,1998年,Mitsudomi T等人对NSCLC患者血清中p53蛋白的自身免疫抗体水平进行了研究,提出p53蛋白AAb可能具有一定的诊断价值,此后对于肿瘤AAb的研究得到了更广泛的认识,Pereira-Faca等对早期肺癌细胞系中PGP9.5、膜连蛋白I和14-3-3theta三者进行联合检测发现敏感性提高到55%,而特异性为95%,这些研究体现出了AAb联合筛查在早期肺癌检测中的优势,Rom等人在2010年报道了运用自身免疫抗体对肺癌患者、肺部有磨玻璃状阴影吸烟者、良性固体结节吸烟者、CT正常吸烟者以及正常非吸烟者血清进行了比对检测,结果表明,c-myc,CyclinA,Cyclin B1,Cyclin D1,CDK2和Survivin自身抗体组合能够明显区分肺癌中的吸烟人群与非吸烟人群,敏感性为81%,特异性为97%,但该组合尚不具备对吸烟人群中肺癌发生风险预测的能力,也没能用于肺癌早期筛查的功能。

[0005] 随着对蛋白质组学研究的不断深入,高通量蛋白芯片技术、电离质谱、qRT-PCR等技术已经发展为肿瘤标志物开发及癌症早期筛查中的重要实验手段,本课题组利用蛋白芯片与cDNA噬菌体展示相结合的技术,筛选出由5个NSCLCAAb所组成的标志物组合,其对早期NSCLC的诊断敏感性和特异性都达到91.3%,且ROC(Receiver Operating Characteristics)曲线下面积达到0.99,甚至可以对潜伏期NSCLC实现83%的检测准确率,利用电离质谱技术,Yildiz等筛选出7个蛋白标志物组合模型,特异性达86%,但敏感性只有58%,最新的研究结果显示,MicroRNA作为血清检测指标在肺癌早期筛查中的效果相对

较理想,Chen等利用qRT-PCR方法对10个miRNA标签进行检测,诊断敏感性为93%,特异性为90%,而Wu及其研究小组对血清中自身免疫抗体的检测结果显示,6种自身免疫抗体对早期肺癌的诊断敏感性和特异性都达到92%。

[0006] 综上所述,肺癌的早期发现、早期干预是有效治疗肺癌的关键,虽然近些年大量的研究已取得了一些突破性的进展,但目前还没有一种可以用于对高风险吸烟人群肺癌发病预测的检测物。人体血清中肿瘤特异性的自身免疫抗体展示出了对癌症发展过程的监测能力,是一种较为理想的肿瘤标志物,因此,筛选鉴定自身免疫抗体图谱用于对高风险发病预测的标志物,从而实现早诊、早治,降低NSCLC的发病率及死亡率。

发明内容

[0007] 为了解决上述技术问题,本发明的目的是提供一种用于肺癌筛查的蛋白芯片的制备方法,用肿瘤相关蛋白检测血清中的相应抗体,此种检测方式将抗原抗体反应与蛋白芯片技术很好的结合,满足高通量筛选和多种标志物联合检测的需要。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明采用如下技术方案:

[0009] 一种用于筛查肺癌的蛋白芯片的制备方法,包括如下步骤:

[0010] (1) 建立癌组织cDNA噬菌体展示文库:

[0011] 选择病理资料齐全的若干份癌组织,包括一半的I期及一半的II期癌组织,提取得到总RNA,然后分离得到mRNA;

[0012] 将mRNA作为模板,制备得到两端分别有EcoRI和Hind III粘性末端的双链cDNA;

[0013] 将上述获得的双链cDNA与噬菌体混合,在连接酶的作用下,取连接产物与包装蛋白混合,得到大量具有感染性的噬菌体颗粒,扩增,形成癌组织cDNA噬菌体文库;

[0014] (2) 生物淘洗:

[0015] 通过亲和选择获得靶功能的蛋白或者多肽,进而作为标志物进行开发应用,即从上述文库中获得噬菌体展示文库;

[0016] 2.1G蛋白珠封闭:

[0017] 取两个离心管,分别加入G蛋白琼脂糖珠,离心,弃去上清,用含1%BSA的1×PBS封闭G蛋白琼脂糖珠,4℃封闭1h,然后4℃,离心,弃去上清,分别标记1、2号管;

[0018] 2.2血清包被:

[0019] 将若干份正常人血清混合均匀,然后稀释,用其包被1号管,4℃放置1h,将若干份癌病人血清混合均匀,然后稀释,用其包被2号管,4℃放置2h;1h后用1×PBS洗1号管,离心1min,去上清;

[0020] 2.3生物淘洗:

[0021] 向1号管中加入上述构建的噬菌体文库,将其混合均匀,离心,收集悬浮液,备用,2h后用1×PBS洗2号管G蛋白琼脂糖珠3次,离心,去上清,将之前步骤收集的悬浮液加入2号管中,混合均匀,4℃放置1h,然后离心去上清,再用1×PBS洗3次,离心,用含1%SDS的1×PBS对2号管进行洗脱,室温培养,然后离心,收集悬浮液,即为免疫原性噬菌体;

[0022] 2.4淘洗后的富集

[0023] 取过夜培养的免疫原性噬菌体于LB液体培养基中培养,备用;

[0024] 将淘洗后得到的免疫原性噬菌体加入到BLT5615中,混合均匀,然后再取其混合物

上层培养基混合均匀,铺板,37℃倒置培养3-4h,长出噬菌斑;每板加入适量噬菌斑提取液,过夜,次日收集平板上的噬菌斑提取液,离心,保存上清于4℃。

[0025] 重复进行多轮淘洗、扩增,向最后一轮扩增后的噬菌体中加入1/10体积的80%甘油,-80℃储存,备用;

[0026] 2.5cDNA文库的稀释铺板;

[0027] 将最后一轮淘洗后的文库一系列梯度稀释,稀释多个梯度,取稀释后的多个文库分别与备用的宿主菌混合,铺板,37℃倒置培养3-4h,直到长出清晰的噬菌斑后,4℃保存;

[0028] 3、芯片构建与高通量筛选:

[0029] 3.1芯片的构建:

[0030] 在孔板中提前加入备用的BLT 5615菌液,用灭菌牙签挑取保存的铺板中的单克隆到孔板中,置于摇床中37℃共培养3h,然后对其进行离心,分别从每孔中取适量上清于一新的孔板所对应的孔中,将原先的孔板封闭,-80℃保存,新孔板用来点样,使用自动点样仪,设置阵列为若干个亚矩阵,每个亚矩阵中为多个反应点,设置好矩阵和间距后进行取样、点样,得若干张蛋白芯片,双荧光检测系统处理蛋白芯片。

[0031] 进一步的,使用PolyATtract mRNA Isolation System III分离得到mRNA。

[0032] 进一步的,分离得到mRNA之前还包括通过甲醛变性凝胶电泳检测总RNA质量以及用微量紫外分光光度计检测总RNA浓度及纯度的步骤。

[0033] 进一步的,所述芯片的构建过程中使用的芯片为硝酸纤维素膜玻片。

[0034] 进一步的,所述蛋白芯片的检测肿瘤标志物的技术为双荧光检测体系。

[0035] 与现有技术相比,本发明的有益技术效果:

[0036] 通过生物淘洗和噬菌体展示技术制备了蛋白芯片,用该蛋白芯片对样本血清中的相应抗体进行联合检测,为双荧光检测体系,此方法的敏感性和特异性均较高,自动点样仪和蛋白芯片技术的应用,使得标志物的筛选及样本检测过程连续化集成化微型化,并且具有可重复性,从而使得此法更具实用价值,可在早期发现或筛查原发肿瘤,筛查肿瘤高危人群,鉴别肿瘤的良恶性,判断肿瘤的发展过程,观察肿瘤的治疗效果,预测肿瘤的复发和预后中发挥重要作用。

附图说明

[0037] 下面结合附图说明对本发明作进一步说明,

[0038] 图1为吸烟者肺癌总RNA电泳结果图;

[0039] 图2为mRNA电泳结果图;

[0040] 图3为cDNA文库随机克隆的PCR结果;

[0041] 图4为生物淘洗过程流程图示意图;

[0042] 图5为稀释噬菌体铺板形成噬菌斑;

[0043] 图6为高通量筛选时的双荧光免疫标记示意图;

[0044] 图7为正常人和NSCLC血清的NSCLC肿瘤标志物筛选结果图;

[0045] 图8为I期NSCLC患者血清和高危险性人血清作为对照组集成训练集所得到的五种AAb的数据分析结果图。

具体实施方式

[0046] 噬菌体展示技术是一种将外源蛋白或多肽基因与噬菌体特定蛋白基因在其表面进行融合表达的新技术,利用这一技术将病人的异常因融合表达为异常蛋白,并借助蛋白芯片的高通量筛选和抗原抗体特异性结合的原理来确定肿瘤标志物,噬菌体展示与蛋白质芯片相结合的技术已经在肿瘤标志物筛选方面取得了很大的成功,为了筛选吸烟人群中早期肺癌标志物,我们构建了吸烟者肺癌组织T7噬菌体展示cDNA文库,其实质是将文库中的cDNA片段插入到T7噬菌体载体中,使插入片段以融合蛋白形式展示在噬菌体外壳蛋白上。

[0047] 一种肿瘤标志物的检测方法,具体步骤如下:

[0048] 1.肺癌组织cDNA T7噬菌体展示文库的构建

[0049] 1.1总RNA的提取和mRNA分离纯化:

[0050] 选择病理资料齐全的16份吸烟型非小细胞肺癌组织(8份I期,8份II期吸烟型NSCLC肺癌组织),将以上冻存的肺癌组织样本分别剪取小于30mg的小块于研钵中,加液氮研磨,之后Trizol法进行提取分别得到总RNA,通过甲醛变性凝胶电泳检测总RNA质量,并用微量紫外分光光度计检测总RNA浓度及纯度,使用PolyATtract mRNA Isolation System III分离得到mRNA,琼脂糖凝胶电泳鉴定mRNA质量;

[0051] 对总RNA紫外分光光度计检测量为390 μ g,如图1和2所示,电泳结果显示28S和18S条带明亮、清晰、条带锐利,切28S的亮度在18S条带的两倍以上,总RNA无明显降解,分离纯化的mRNA产量为5.1 μ g,收率为1.31%,OD_{260/280}=2.1,电泳结果可看出mRNA呈弥散状,分布均匀,表明分离的mRNA质量较高,可以进行cDNA的合成;

[0052] 1.2cDNA合成及粘性末端形成

[0053] 将4 μ g mRNA作为模板,按照Orient Express Random Primer cDNA Synthesis Kit试剂盒说明书,加入1 μ L Hind III Random Primer在逆转录酶MMLV的作用下反转录合成cDNA第一条链,在第一条链的反应体系中加入1.6U RNase H,再加入50U DNAPolymerase I和甲基化dNTP,合成cDNA第二链,苯酚抽提反应物,异丙醇沉淀,10 μ L TE溶解,再加入1.5U T4DNA Polymerase补平双链cDNA末端,取出10 μ L,加入2 μ L Directional EcoRI/Hind III Linker,在T4DNA连接酶的作用下16 $^{\circ}$ C连接过夜,之后,分别加入EcoRI和Hind III各100U,37 $^{\circ}$ C温育2h消化接头,得到两端分别有EcoRI和Hind III粘性末端的双链cDNA;

[0054] 另外,在cDNA文库的构建中使用随机引物可以方便的控制合成cDNA分子的长度,通常使用较高浓度的引物浓度可以增加cDNA的产量,但获得的cDNA平均长度较短,降低引物浓度则可得到较高分子量的cDNA,但产量会降低;

[0055] 1.3cDNA与T7select10-3b载体连接:

[0056] 将上述获得的cDNA与T7select10-3b VectorArms按照摩尔比3:1混合,即400ng cDNA片段,加1 μ g T7select10-3b Vector,在T4DNA连接酶的作用下,16 $^{\circ}$ C连接过夜,取连接产物5 μ L与25 μ L包装蛋白混合,22 $^{\circ}$ C温育2h,加入270 μ L灭菌的LB,终止反应得到大量具有感染性的T7噬菌体颗粒,加入20微升氯仿,4 $^{\circ}$ C保存,并取少量进行噬菌斑形成实验测其滴度,由于原始文库具有不稳定性,立即进行一轮扩增,所得噬菌体扩增文库加入10%灭菌甘油,-70 $^{\circ}$ C保存;

[0057] 1.4文库滴度测定:

[0058] LB培养基37℃振荡培养BLT5403宿主菌至OD(A600)=0.8-1,用灭菌LB稀释文库 1×10^2 - 1×10^7 倍,100μL稀释包装产物与250μL宿主菌,3mL预热的上层培养基混合,铺于已加入羧苄青霉素的琼脂平板上,37℃倒置培养3-4h,待长出清晰的噬菌斑时,计算文库库容;

[0059] 经噬菌斑测定计算,扩增后文库的滴度约为 2.8×10^{10} pfu;

[0060] 1.5PCR鉴定文库重组率:

[0061] 从平板上随机挑选分离良好的单个噬菌斑,用牙签沾取少量噬菌体加入100μL (10mmol/L)的EDTA中,涡旋震荡,65℃热击10min,14000rpm离心10min去除不溶物,取1.5μL作为模板进行PCR扩增,引物为T7上下游引物(5'-GGAGCTGTCCGTATTCCAGTC-3', 5'-AACCCCTCAAGACGTTTA-3'),扩增程序如下:94℃5min,94℃50s,50℃60s,72℃70s,35个循环,72℃延伸7min,将PCR产物1%琼脂糖凝胶电泳鉴定文库重组体的片段大小并计算插入效率。

[0062] 随机挑取得30个噬菌斑进行扩增后,如图3所示,电泳观测条带情况,并计算文库重组率为96.7 (29/30),重组体中81%的插入片段长度>300bp,说明所建文库质量较高;

[0063] 2.生物淘洗:

[0064] 生物淘洗的目的是通过亲和选择获得靶功能的蛋白或者多肽,进而作为标志物进行开发应用,本文中的生物淘洗即从上述文库中获得与吸烟型NSCLC相关的特异性T7噬菌体展示文库,步骤按照Novagen公司T7Select Biopanning Kit说明书对肺癌文库进行生物淘洗,过程如图4所示;

[0065] 2.1G蛋白珠封闭:

[0066] 取两个1.5mL的离心管,每管加入150μL G蛋白琼脂糖珠,4℃,1000rpm,离心1min,弃去上清,用含1%BSA的500μL 1×PBS封闭G蛋白琼脂糖珠,4℃封闭1h,然后4℃,1000rpm离心2min,弃去上清,分别标记1、2号管;

[0067] 2.2血清包被:

[0068] 将5份正常人血清混合均匀,然后稀释(血清:1×PBS=1:20),用其包被1号管4℃放置1h,将5份吸烟肺癌病人血清混合均匀,然后稀释(血清:1×PBS=1:20),用其包被2号管,4℃放置2h,1h后用1×PBS洗1号管3次,每次1000rpm,离心1min,去上清;

[0069] 2.3生物淘洗:

[0070] 向1号管中加入500μL上述构建的吸烟者肺癌文库,将其混合均匀,4℃放置1h,然后4℃,1000rpm,离心2min,收集悬浮液,备用,2h后用1×PBS洗2号管G蛋白琼脂糖珠3次,每次1000rpm,离心1min,去上清,将之前步骤收集的悬浮液加入2号管中,混合均匀,4℃放置1h,然后离心去上清,再用1×PBS洗3次,每次1000rpm,离心2min,用100μl含1%SDS的1×PBS对2号管进行洗脱,室温培养10min,然后离心,收集悬浮液,即为免疫原性噬菌体;

[0071] 2.4淘洗后的富集

[0072] 取1mL过夜培养的BLT5615菌液于50mL LB液体培养基(含终浓度为50μg/mL Carb)中培养,37℃,220rpm培养至OD600=0.5,加IPTG至终浓度为1mmol/L,继续摇30min,然后4℃,备用;

[0073] 将淘洗后的100μL文库加入到10mL的BLT5615中,混合均匀,然后再取其混合物1mL与10mL上层培养基混合均匀,铺板,37℃倒置培养3-4h,可以看到长出噬菌斑;

[0074] 每板加入10mL噬菌斑提取液(20mM Tris-HCl,pH 8.0,100M NaCl,6mM MgSO₄

℃,过夜,次日收集平板上的噬菌斑提取液,离心,保存上清于4℃,

[0075] 重复进行4轮淘洗、扩增,向第4轮扩增后的噬菌体中加入1/10体积的80%甘油,-80℃储存,备用;

[0076] 2.5c DNA文库的稀释铺板;

[0077] 将第4次淘洗后的文库一系列梯度稀释,本试验中共稀释了7个梯度,分别取稀释后的 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 的文库各100μL分别与250μL备用的宿主菌混合,铺板,37℃倒置培养3-4h,直到长出清晰的噬菌斑后,如图5所示,保存于4℃;

[0078] 3.芯片构建与高通量筛选:

[0079] 3.1芯片的构建:

[0080] 在96孔板中提前加入200μL备用的BLT 5615菌液,用灭菌牙签挑取保存的 10^{-6} 、 10^{-7} 平板中的单克隆到96孔板中,置于摇床中37℃共培养3h,然后对其进行离心,4000rpm,4℃,20min,分别从每孔中取80μL上清于一新96孔板所对应的孔中,将原先的96孔板封闭,-80℃保存,新96孔板用来点样,使用Gesim Nanoploter2.1自动点样仪,设置阵列为4×6个亚矩阵,每个亚矩阵中为4×6个反应点,点间距为500μm,本实验中共挑取570个噬菌体克隆(芯片上包含6个空T7),设置好矩阵和间距后进行取样、点样,使用的芯片为Whatman FAST硝酸纤维素膜玻片。

[0081] 3.2免疫原性噬菌体克隆的高通量筛选:

[0082] 用上述制备的芯片共21张,分别检测7份吸烟型肺癌患者混合血清样本,7份非吸烟型正常人混合血清样本和7份吸烟型正常人混合血清样本。将包被好的芯片取出后,加入芯片封闭液,室温放置1h,在这期间进行血清的预吸收:将宿主菌裂解液与未用于淘洗的7份非吸烟型正常人混合血清(或吸烟型肺癌者混合血清或吸烟型正常者混合血清)混合均匀,4℃放置1h,用PBST洗涤芯片3次,每次5min,洗涤后,加入一抗,室温杂交2h,(一抗:0.5μL的兔抗T7抗体、500μL血清预吸液、2.5mL芯片封闭液)杂交结束后将芯片洗涤三次,每次5min,然后加入二抗,在暗室放置1h,(二抗:1μL Cy3标记的羊抗兔二抗、1μL Cy5标记羊抗人二抗、3.5mL芯片封闭液)1h后,用PBST清洗芯片,如上述,然后用双蒸水冲洗干净,放置在黑暗无尘处晾干,扫描芯片,并进行分析,获得检测数据,图6为高通量筛选时的双荧光免疫标记示意图,图中指示的即为展示有肿瘤相关蛋白的噬菌体克隆,不表达肿瘤相关的蛋白的噬菌体克隆只与兔抗体T7一抗结合,所以在与Cy3荧光标记的抗兔二抗结合后只表现为绿色;而表达肿瘤相关蛋白的噬菌体克隆不仅与兔抗体T7一抗结合,还与血清中的特异性抗体结合,所以还会与Cy3荧光标记的抗兔二抗结合,显示为红色或黄色,因而区别于芯片上的其它噬菌体克隆。

[0083] 3.3数据分析:

[0084] 3.3.1片间归一化:把兔抗T7抗体和人血清(吸烟肺癌者、非吸烟正常者和吸烟正常者的血清)作为一抗,与芯片上点的展示有蛋白的噬菌体克隆进行反应,再把Cy3标记的羊抗兔和Cy5标记的羊抗人作为二抗,与一抗反应,然后利用芯片扫描仪扫描芯片,再应用Gene Pix5.0软件分析扫描图像,得到扫描数据后,根据公式 $[(\text{噬菌体蛋白Cy5/Cy3}) - (\text{空T7Cy5/Cy3})] / (\text{空T7Cy5/Cy3})$ 对所得数据进行标准化处理,因为不同的芯片间会因点样的不同、片基或者其他条件造成信号差异,进行数据的标准化处理可以适当的消除误差。

[0085] 3.3.2数据分析:图7为用正常人血清和吸烟型NSCLC血清分别与芯片反应筛选

NSCLC肿瘤标志物的结果,与正常人血清反应的芯片主要表现为绿色,而且芯片上的点都集中在SD线之间,说明芯片上的这些噬菌体克隆与正常人血清没有反应或反应很弱;与NSCLC病人血清反应的芯片呈现出红色说明与病人血清抗体有特异性结合,从图7,B右侧的散点分布图也可以点远在SD线上方,具有吸烟型NSCLC特异性。

[0086] 3.3.3t检验:将7份吸烟型肺癌者混合血清作为一抗反应得出的数据标准化后的结果作为第一组,将7份非吸烟型正常者混合血清作为一抗反应得出的数据标准化后的结果作为第二组,将7份吸烟型正常者混合血清作为一抗反应得出的数据标准化后的结果作为第三组,然后,分别将第一组和第二组、第二组和第三组相对应的标准化数据使用Origin统计软件做t检验,软件设置选择独立样本分析、无效假设和被择假设均设定为mean1-mean2=0、设定 $P<0.01$ 代表差异极显著,对差异极显著的点再进行详细的分析,然后找出分别在第一组和第三组中高表达的克隆,最后找出在第一组和第三组中都高表达的噬菌体克隆,这些克隆就可以作为吸烟人群中肺癌相关噬菌体克隆,经过分析,筛选出只在吸烟型肺癌病人组中高表达的克隆,对吸烟型正常者样本和非吸烟型正常者样本的标准化数据进行t检验,与上述一样做同样的分析处理,筛选出只在吸烟型正常人组中高表达的克隆,选出两者有交集的克隆,即在吸烟型肺癌病人组和吸烟型正常人组中都高表达,而在非吸烟型正常组中低表达或不表达的噬菌体克隆,作为吸烟人群中候选肺癌相关蛋白克隆。

[0087] 3.3.4吸烟者肺癌相关蛋白的鉴定:对筛选出来的关联度较高的噬菌体克隆PCR扩增并测序后,经过对比鉴定进行PCR扩增后,进行序列测序,之后对测序结果的序列进行比对分析,使用BLAST搜索引擎将所测得的序列与GenBank数据库中的已知序列对比鉴定,同源性高的序列翻译蛋白,分析蛋白的功能意义,下表展示经BLAST比对的结果:

[0088]

序号	BLAST	功能	最大相似度
1	BAC clong RP11-434N4 form 2	未知	100%
2	Abl-interactor 1 (ABI1)	促进肿瘤转移	99%
3	Pleiotrophin(PTN)	促进肿瘤转移	92%
4	Solute carrier family 35,member E2B (SLC35E2B)	未知	98%
5	Surfacetant protein B (SFTPB)	肺癌预后相关标志物	100%
6	BAC RP11-202H2	未知	99%
7	S-phase kinase-associated protein 2 (SKP2)	调节细胞周期	99%

[0089]

8	HumanGantigen7 (GAGE7)	细胞毒性 T 细胞识别抗原	91%
9	Postmeiotic Segregation Increased 2-Like 15 (PMS2L15)	未知	90%
10	SEC15L2	未知	90%
11	Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Alpha 1 (EEF1A)	真核翻译延长因子	89%
12	BAC (RP11-499F19)	未知	89%

[0090] 通过数据统计分析,发现有五种噬菌体克隆能明显区分NSCLC病人和正常人,即GAGE7,PMS2L15,SEC15L2,EEF1A和BAC克隆RP11-499F19,在此研究的基础上,本研究小组利用相同的技术理念,在NSCLC不同分期及潜伏期血清中进行有关NSCLC的早期筛查AAb的筛选,通过数据统计分析发现除BAC克隆RP11-499F19外,另有四种不同的标志物具有NSCLC早期筛查价值,即Paxillin,SEC15L2,XRCC5,MALAT1,研究所发现的这些AAb构象不仅能检测出早期吸烟型NSCLC,还能检测潜伏期NSCLC,而且比现有的标志物检测敏感性和特异性都要高,这种将蛋白芯片与噬菌体展示相结合的方法,建立了一种高通量的肿瘤AAb标志物筛选模式,有利于特异性肿瘤标志物的发现并开展标志物的联合筛查,从而提高癌症的筛查准确率,也为癌症筛查及治疗提供了新的方法。

[0091] 3.3.5联合筛查模型构建:双荧光检测系统对蛋白芯片进行处理后,应用各种统计算法构建筛查模型,筛查模型构建思路如下:非癌症肺病血清样本为对照组,与早期NSCLC的血清样本进行比较,可筛选得到能够显著区别对照与早期NSCLC患者的AAb构象,而且只有敏感性和特异性超过80%的算法才能应用到确认集的数据处理上,对于每一个点的CY5和CY3比值,我们建立了一系列决策规则用以预测疾病状态,包括Naive Bayesian分类器、逻辑回归、分类树等一系列算法,为了使结果更为有力,我们还摸索了神经网络等其他计算方法,这些方法与ROC曲线和留一法交叉验证一起用来开发可能的联合检测模型。

[0092] 如图8所示,AUC面积(ROC曲线下的面积)表示筛查系统中阳性和阴性筛查结果分布的重叠程度,反映了筛查实验价值的大小,AUC面积越凸说明筛查价值越高,因此,可以通过比较曲线下面积的大小评价多个筛查实验,同时,根据曲线拐点,可选择理论上最适合的截割点,使实验的灵敏度和特异度达到最优,另外,ROC曲线分析还可以评价判别模型的筛查效果,将t检验中P值较小的噬菌体样本数据导入MedCalc软件,将正常人的检测数据设定为0,将吸烟人群样本的数据筛查值设定为1,软件会根据数据计算出肿瘤标志物检测的特异性和敏感性,并绘制ROC曲线,AUC面积为0.5是筛查值较差,面积超过0.5越多,证明标志物的筛查价值越大,当AUC面积达到1.0是筛查价值最高,将ROC曲线进行比对分析,选择曲线下AUC面积最高且重合较少的几个克隆进行联合ROC曲线分析,分析肿瘤标志物联合检测对筛查价值的影响,联合ROC曲线分析,面积大于0.85。

[0093] 3.3.6筛查模型验证:下表汇总了目前我们运用血清中肿瘤相关的自身免疫抗体构象对吸烟型NSCLC检测的结果,通过对300份血清样本的验证,并通过这12种标志物组合

实现对吸烟人群中肺癌发病率的预测,对于吸烟指数小于25包年的NSCLC患者,敏感性为81.7%,特异性为84.5%;对于吸烟指数大于25包年的NSCLC患者,敏感性为86.3%,特异性为89.4%。

[0094] 五种自身免疫抗体标志物对吸烟型NSCLC检测的敏感性和特异性比较

	吸 烟 指 数	
	小于 25 包年	大于 25 包年
[0095]	敏 感 性 (%)	81. 7 86. 3
[0096]	特 异 性 (%)	84. 5 89. 4

[0097] 以上所述的实施例仅是对本发明的优选方式进行描述,并非对本发明的范围进行限定,在不脱离本发明设计精神的前提下,本领域普通技术人员对本发明的技术方案做出的各种变形和改进,均应落入本发明权利要求书确定的保护范围内。

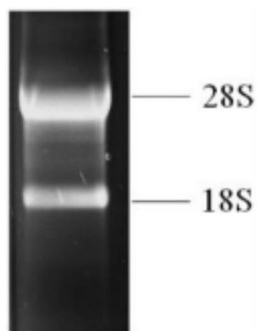


图1

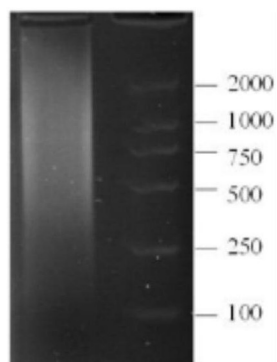


图2

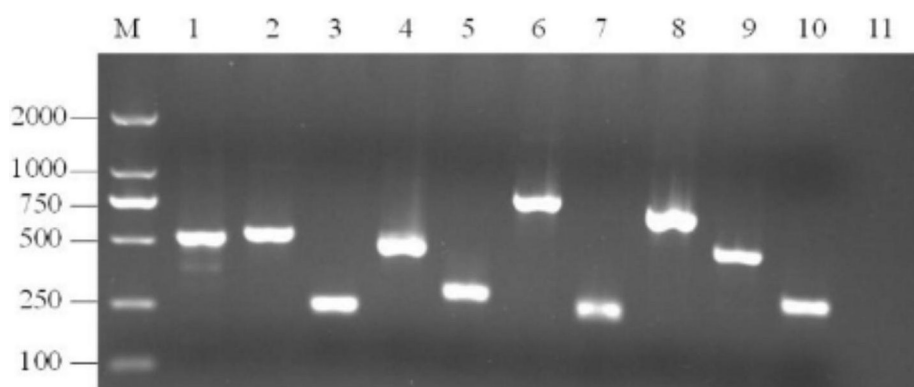


图3

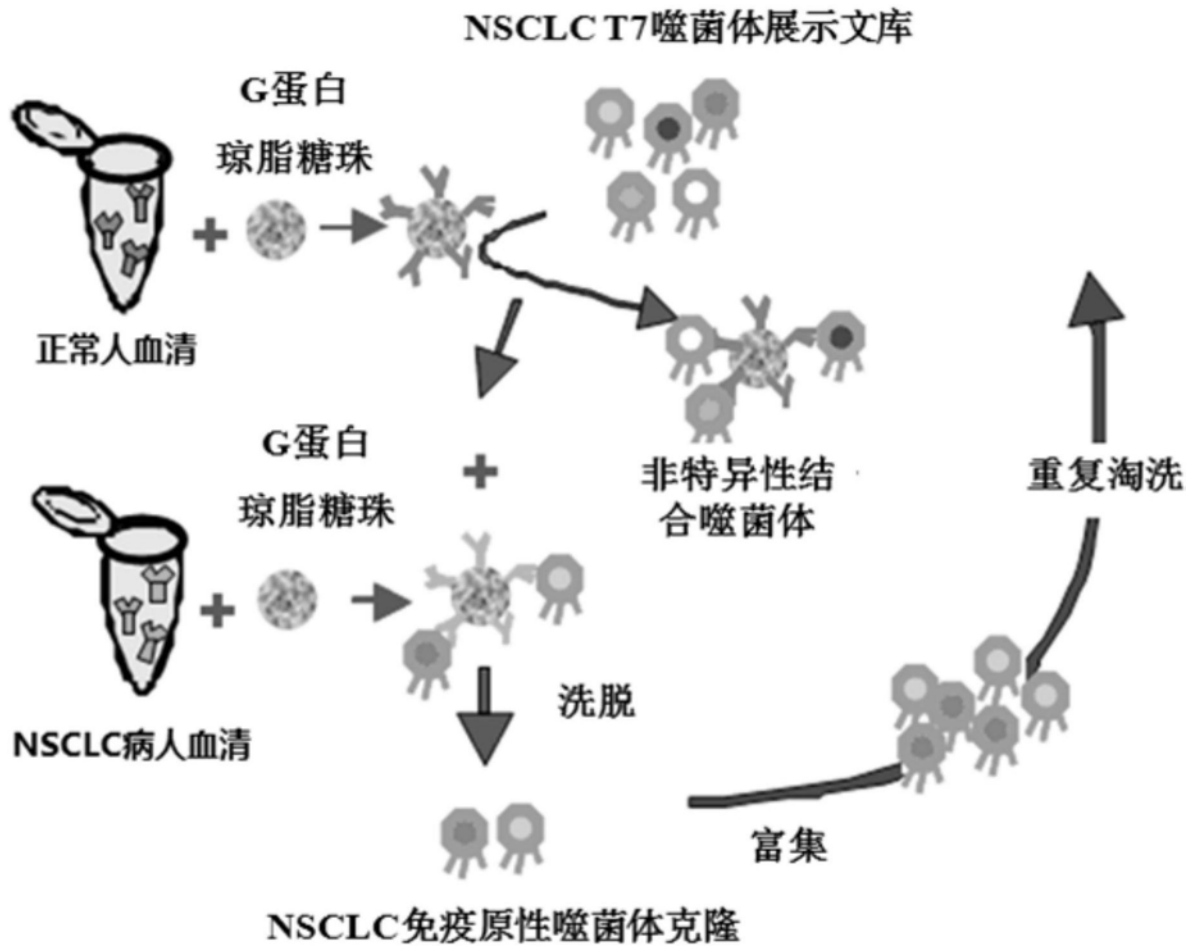


图4

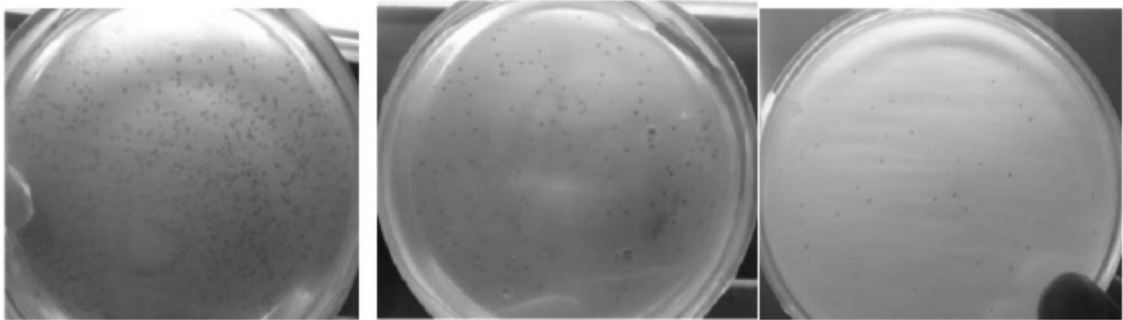


图5

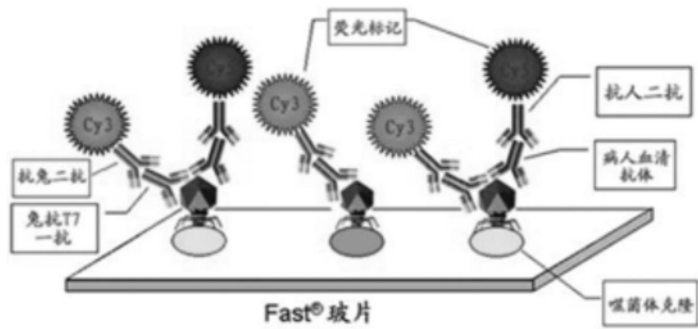


图6

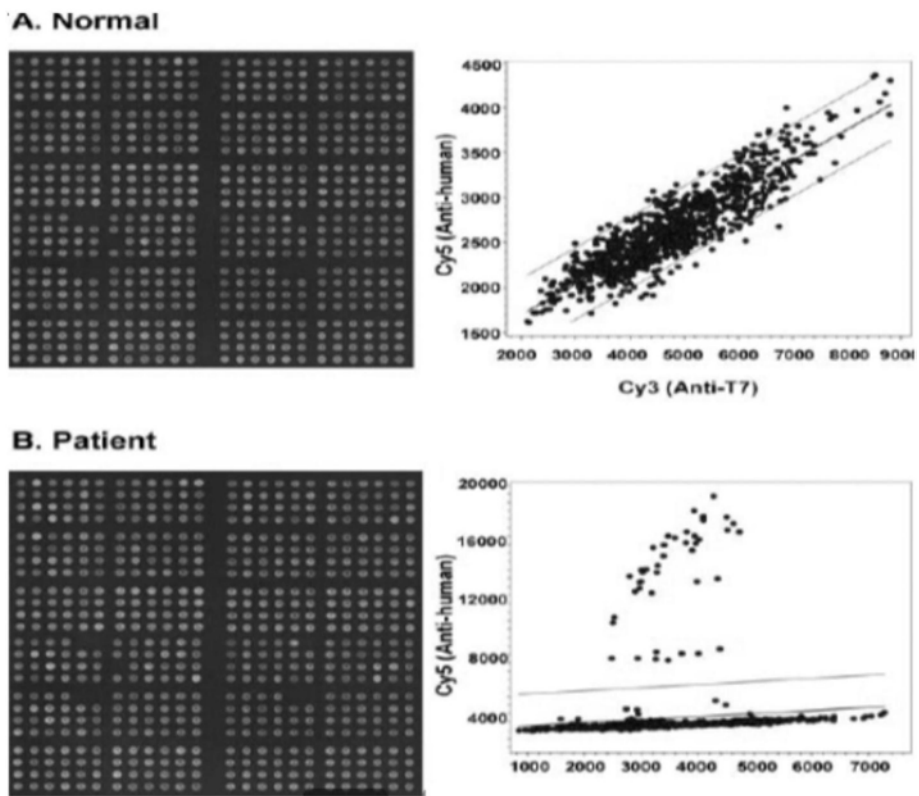


图7

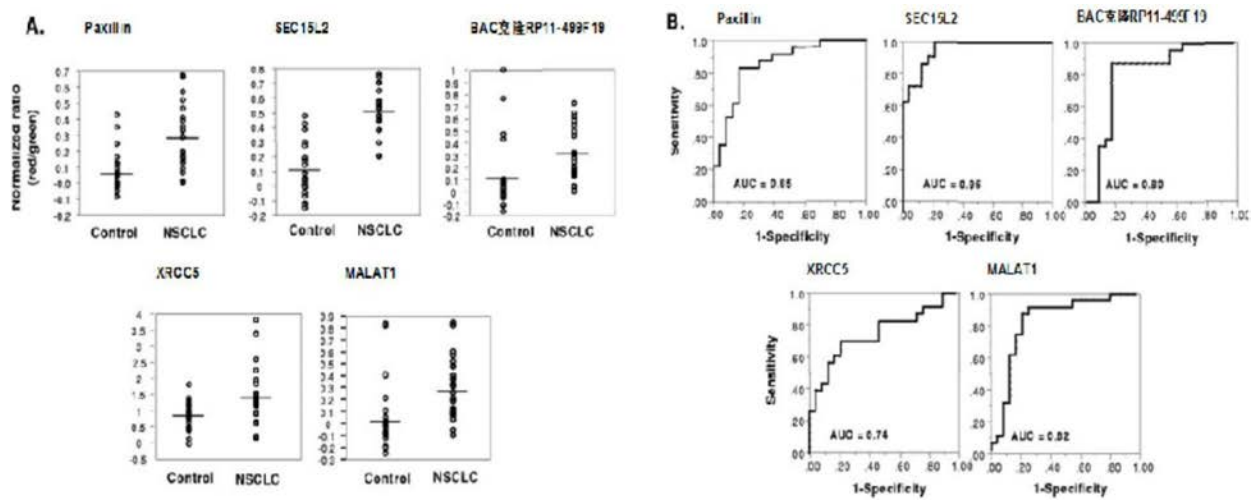


图8

专利名称(译)	一种用于肺癌筛查的蛋白芯片的制备方法		
公开(公告)号	CN108267598A	公开(公告)日	2018-07-10
申请号	CN201810114701.6	申请日	2018-02-06
[标]发明人	阴建友 钟理 刘薇 沈磊 方闪闪		
发明人	阴建友 钟理 刘薇 沈磊 方闪闪		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/574 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/57423 G01N33/6893		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于筛查肺癌的蛋白芯片的制备方法，通过构建吸烟者肺癌组织T7噬菌体展示cDNA文库，将文库中的cDNA片段插入到T7噬菌体载体中，使插入片段以融合蛋白形式展示在噬菌体外壳蛋白上，将外源蛋白或多肽基因与噬菌体特定蛋白基因在其表面进行融合表达，通过生物淘洗和噬菌体展示技术制备了蛋白芯片，将病人的异常基因融合表达为异常蛋白，并借助蛋白芯片的高通量筛选和抗原抗体特异性结合的原理来确定肿瘤标志物，本发明的方法可在早期发现或筛查原发肿瘤，筛查肿瘤高危人群，鉴别肿瘤的良恶性，判断肿瘤的发展过程，观察肿瘤的治疗效果，预测肿瘤的复发和预后中发挥重要作用。

