



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107664696 B

(45)授权公告日 2019.12.06

(21)申请号 201710750912.4

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2017.08.28

G01N 33/574(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107664696 A

(56)对比文件

CN 105734159 A, 2016.07.06,

CN 101514989 A, 2009.08.26,

CN 1255860 A, 2000.06.07,

(43)申请公布日 2018.02.06

(73)专利权人 广东医科大学

地址 524023 广东省湛江市霞山区文明东路2号

审查员 赵晓明

(72)发明人 罗辉 朱萧 罗海清 杨晓红

黄永梅 詹静婷 雷金丽

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司

公司 44102

代理人 张月光

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

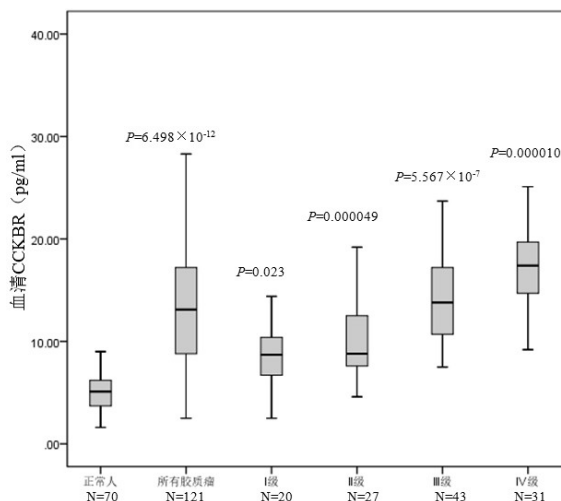
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种用于成人神经胶质瘤诊断的双抗体夹心法ELISA试剂盒

(57)摘要

本发明公开了血清CCKBR在作为神经胶质瘤诊断标志物方面的应用,以及一种神经胶质瘤的双抗体夹心法ELISA诊断试剂盒。本发明公开了一种新的诊断神经胶质瘤的生物标记物,尤其是对于神经胶质瘤的早期预警和早期诊断,具有特别重要的作用和临床应用价值。同时,还建立了一种基于双抗体夹心原理的酶联免疫诊断系统,并开发成神经胶质瘤诊断试剂盒,可以快速准确地进行CCKBR的检测,可以对各期(特别是早期)原发性神经胶质瘤作出快速的辅助诊断,具有重要的临床应用价值。而且该试剂盒具有操作简单、试剂稳定、重复性好、特异性强、敏感性高等优势,易于大范围推广应用的广阔市场前景。



1. 血清CCKBR的检测试剂在制备神经胶质瘤诊断试剂盒方面的应用。
2. 血清CCKBR的检测试剂在制备神经胶质瘤早期预警和/或早期诊断试剂盒方面的应用。
3. 根据权利要求1或2所述应用,其特征在于,所述检测试剂包括人CCKBR重组单克隆抗体。
4. 根据权利要求3所述应用,其特征在于,所述检测试剂还包括如下组分:
  - (1) 包被在固相96孔酶标板上的人CCKBR重组单克隆抗体;
  - (2) 酶结合物工作液:辣根过氧化物酶标记的人CCKBR重组单克隆抗体反应液;
  - (3) 显色液ABTS底物:ABTS+0.1M pH5.0柠檬酸缓冲液+3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;
  - (4) 洗涤液:0.05% Tween20-PBS;
  - (5) 结合物稀释液:0.1% BSA-PBS;
  - (6) 终止液:1~2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。
5. 根据权利要求4所述应用,其特征在于,所述检测试剂还包括如下组分:
  - (7) 阳性对照:人CCKBR标准蛋白;
  - (8) 阴性对照:标准阴性血清。

## 一种用于成人神经胶质瘤诊断的双抗体夹心法ELISA试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域。更具体地,涉及一种用于成人神经胶质瘤诊断的双抗体夹心法ELISA检测方法及其试剂盒。

### 背景技术

[0002] 术语“神经胶质瘤”是指起源于神经胶质细胞的肿瘤,包括星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、寡星状细胞瘤和室管膜瘤等。神经胶质瘤是最常见的原发性颅内肿瘤,WHO中枢神经系统肿瘤分类将胶质瘤分为I~IV级,其中I、II级为低级别胶质瘤,III、IV级为高级别胶质瘤。胶质瘤可以按肿瘤发生部位、细胞形态、排列方式、分化特征、免疫表型、超微结构和分子遗传学改变进行病理诊断和分类。

[0003] 组织形态观察仍然是病理诊断的基础,但对胶质瘤进行分子生物学标记是现代诊断病理学的重要进展。2016年最新版《WHO中枢神经系统肿瘤分类》颠覆性地改变了胶质瘤传统形态学分型方法,并第一次以分子分型作为肿瘤分型的核心依据,基因型结合表观型的新分型方法增加了诊断准确性,可以更好判断患者预后,精准指导治疗。当然,我们同时必须清楚现有生物学标志物并不是特异或专门针对某一种类肿瘤,随着科学技术发展一定会有更多生物学标志物,因此在临床诊断时,应使用多种生物学标志物进行综合评估。

[0004] 另外,目前神经胶质瘤的诊断多依赖于影像学技术,无法实现早期预警。

### 发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服现有神经胶质瘤诊断技术的缺陷和不足,提供了一种新的神经胶质瘤诊断标志物,即人类胆囊收缩素B受体(cholecystokinin B receptor,CCKBR)。本发明研究发现,血清CCKBR水平是神经胶质瘤一个较好的检测指标,可以作为神经胶质瘤临床辅助诊断手段,特别是对于神经胶质瘤的早期(I级神经胶质)发病预警和早期诊断,也具有特别重要的作用和临床应用价值。

[0006] 本发明的目的是提供血清CCKBR在作为神经胶质瘤诊断标志物方面的应用。

[0007] 本发明另一目的是提供一种血清CCKBR的双抗体夹心法ELISA检测方法及其试剂盒。

[0008] 本发明上述目的通过以下技术方案实现:

[0009] 人类胆囊收缩素B受体(CCKBR)位于染色体11p15.4,全长12454bp,mRNA长度2206bp,有5个外显子和4个内含子。该受体主要存在于中枢神经系统和消化系统,调节多巴胺并影响大脑神经递质的传递,调节精神焦虑、运动和摄食。本发明人通过检测正常人和神经胶质瘤患者血清中CCKBR的含量,通过统计学分析CCKBR含量与神经胶质瘤的相关性发现,血清CCKBR水平是神经胶质瘤一个较好的检测指标,特别是对于神经胶质瘤的早期预警和早期诊断,为该疾病的临床血清学早期诊断找到了一种新的生物标记物。

[0010] 因此,血清CCKBR在作为神经胶质瘤诊断标志物方面的应用,以及血清CCKBR在作为神经胶质瘤发病早期预警和/或早期诊断标志物方面的应用,均应在本发明的保护范围

之内。

[0011] 本发明提供了一种神经胶质瘤诊断试剂盒,包含人CCKBR重组单克隆抗体。

[0012] 优选地,所述试剂盒包含有如下组分:

[0013] (1)包被在固相96孔酶标板上的人CCKBR重组单克隆抗体;

[0014] (2)酶结合物工作液:辣根过氧化物酶(HRP)标记的人CCKBR重组单克隆抗体反应液;

[0015] (3)显色液ABTS底物:ABTS 1mg+0.1M pH5.0柠檬酸缓冲液 2ml+3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (临用时现配);

[0016] (4)洗涤液(0.05% Tween20-PBS);

[0017] (5)结合物稀释液:0.1% BSA-PBS;

[0018] (6)终止液:1~2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。

[0019] 更优选地,所述试剂盒还包含有:

[0020] (7)阳性对照:人CCKBR标准蛋白;

[0021] (8)阴性对照:标准阴性血清。

[0022] 优选地,所述试剂盒是指神经胶质瘤诊断试剂盒和早期预警诊断试剂盒。

[0023] 本发明还提供了一种血清CCKBR的双抗体夹心法ELISA检测方法,利用上述试剂盒进行双抗体夹心法ELISA检测。

[0024] 优选地,所述的血清CCKBR的双抗体夹心法ELISA检测方法步骤如下:

[0025] S1.包被:CCKBR单克隆抗体用包被缓冲液(0.05M,pH9.6 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>缓冲液)稀释至0.5~2μg/ml,加入96孔板,90~110μl/孔,0~10℃放置30~40小时;

[0026] S2.封闭:洗涤液(0.05% Tween20-PBS)冲洗96孔板数次,加结合物稀释液(0.1% BSA-PBS)180~220μl/孔,35~38℃放置1.5~2.5小时;

[0027] S3.加待检血清样品:洗涤液冲洗96孔板数次,加待检血清样品及结合物稀释液稀释的标准品(标准品即为上述的阳性对照,人CCKBR标准蛋白)90~110μl/孔,35~38℃放置1.5~2.5小时;

[0028] S4.加酶标抗体:洗涤液冲洗96孔板数次,用结合物稀释液稀释酶标抗体至1:1000,加入96孔板,90~110μl/孔,35~38℃放置1.5~2.5小时;

[0029] S5.显色:洗涤液冲洗96孔板数次,显色液ABTS底物加入96孔板,90~110μl/孔,再加终止液,室温下或35~38℃显色15~30分钟;

[0030] S6.标准曲线:根据标准品OD值绘制标准曲线,在标准曲线上查出待检标本的含量,数据统计出血清CCKBR含量。

[0031] 更优选地,作为一种优选的实施方式,所述的血清CCKBR的双抗体夹心法ELISA检测方法,步骤如下:

[0032] S1.包被:CCKBR单克隆抗体用包被缓冲液稀释至1μg/ml,加入96孔板,100μl/孔,4℃放置36小时;

[0033] S2.封闭:洗涤液冲洗96孔板5次,加结合物稀释液200μl/孔,37℃放置2小时;

[0034] S3.加待检血清样品:洗涤液冲洗96孔板5次,加待检血清样品及结合物稀释液稀释的标准品100μl/孔,37℃放置2小时;

[0035] S4.加酶标抗体:洗涤液冲洗96孔板5次,用结合物稀释液稀释酶标抗体至1:1000,

加入96孔板,100 $\mu$ l/孔,37 $^{\circ}$ C放置2小时;

[0036] S5. 显色:洗涤液冲洗96孔板5次,显色液ABTS底物加入96孔板,100 $\mu$ l/孔,再加终止液,室温下或37 $^{\circ}$ C显色15~30分钟;

[0037] S6. 标准曲线:根据标准品OD值绘制标准曲线,在标准曲线上查出待检标本的含量,数据统计出血清CCKBR含量。

[0038] 本发明具有以下有益效果:

[0039] 本发明公开了一种新的诊断神经胶质瘤的生物标记物,尤其是对于神经胶质瘤的早期预警和早期诊断,具有特别重要的作用和临床应用价值。

[0040] 同时,本发明还建立了一种基于双抗体夹心原理的酶联免疫诊断系统,并开发成神经胶质瘤诊断试剂盒,可以快速、准确地进行CCKBR的检测,而且血清样本不用稀释,灵敏度显著提高;从而可以对各期(特别是早期)原发性神经胶质瘤作出快速的辅助诊断,具有重要的临床应用价值。

[0041] 本发明的检测试剂盒具有操作简单、试剂稳定、重复性好、特异性强、敏感性高等优势,易于大范围推广应用的广阔市场前景。

#### 附图说明

[0042] 图1:正常成人(70例)、所有神经胶质瘤(121例)、I级神经胶质瘤(20例)、II级神经胶质瘤(27例)、III级神经胶质瘤(43例)、和IV级神经胶质瘤(31例)患者血清CCKBR浓度箱式图,及各分组胶质瘤患者血清CCKBR浓度值分别与正常人血清CCKBR浓度值两两独立样本T检验结果。作图和统计均由统计学软件SPSS 22.0完成。

#### 具体实施方式

[0043] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0044] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0045] 实施例1

[0046] 1、实验血清样品材料(见表1):

[0047] (1) 70份正常成人样本:经临床实验室检测没有代谢性疾病(糖尿病、肾病)、没有感染性疾病(HBV、HCV和HIV),没有任何肿瘤的正常体检人群血清样品。

[0048] (2) 121份神经胶质瘤患者血清样品:其中包括I期20份、II期27份、III期43份和IV期31份。

[0049] 表1:正常成人和神经胶质瘤患者的人口学和临床数据

变量	正常人	神经胶质瘤 (未分类)	神经胶质瘤(分类)				
			I	II	III	IV	
年龄(岁)	20-65	31-75	31-67	39-70	34-75	43-71	
平均(岁)	39.5	48.2	44.5	46.0	48.4	51.6	
性别	女	21	49	8	13	16	12
	男	49	72	12	14	27	19
吸烟者	19	44	5	8	19	12	
喝酒者	22	41	5	7	16	13	
家族遗传史	无	无	无	无	无	无	

[0051] 2、CCKBR的双抗体夹心法ELISA检测试剂盒

[0052] 试剂盒内设有:

[0053] (1) 包被在固相96孔酶标板上的人CCKBR重组单克隆抗体;

[0054] (2) 酶结合物工作液为辣根过氧化物酶(HRP)标记的人CCKBR重组单克隆抗体反应液;

[0055] (3) 阳性对照为人CCKBR标准蛋白,阴性对照为标准阴性血清;

[0056] (4) 显色液ABTS底物:ABTS 1mg+0.1M,pH5.0柠檬酸缓冲液 2ml+3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>4μl(临用时配);

[0057] (5) 洗涤液(0.05%Tween20-PBS);

[0058] (6) 结合物稀释液:0.1%BSA-PBS(用于稀释标本、标准品和结合物);

[0059] (7) 终止液(1~2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。

[0060] 3、检测方法

[0061] (1) 包被:包被缓冲液(0.05M,pH9.6 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>缓冲液)稀释CCKBR单克隆抗体粗提蛋白至1μg/ml,加入96孔板,100μl/孔,放4℃,36小时。

[0062] (2) 封闭:洗涤液冲洗96孔板5次,加结合物稀释液200μl/孔,放37℃,2小时。

[0063] (3) 加待检样品:洗涤液冲洗96孔板5次,加待检样品及结合物稀释液稀释的标准品100μl/孔,放37℃,2小时。

[0064] (4) 加酶标抗体:洗涤液冲洗96孔板5次,结合物稀释液稀释酶标抗体至1:1000,加入96孔板,100μl/孔,放37℃,2小时。

[0065] (5) 显色:洗涤液冲洗96孔板5次,显色液ABTS底物,加入96孔板,100μl/孔,加终止液室温下或37℃显色15~30分钟。

[0066] (6) 标准曲线:根据标准品OD值绘制标准曲线,在标准曲线上查出待检标本的含量。

[0067] (7) 数据统计:所有的统计均使用SPSS 22.0 软件包((Statisticat Package for the Social Sciences,Chicago,IL,USA)。数据采用均值±S表示;所有P值均取两位小数,P

$<0.05$ 被认为具有统计学意义, $P<0.01$ 被认为具有显著意义。

[0068] 4、检测结果如表2和图1。

[0069] (1)图1:正常成人(70例)、所有神经胶质瘤(121例)、I级神经胶质瘤(20例)、II级神经胶质瘤(27例)、III级神经胶质瘤(43例)、和IV级神经胶质瘤(31例)患者血清CCKBR浓度箱式图,及各分组胶质瘤患者血清CCKBR浓度值分别与正常人血清CCKBR浓度值两两独立样本T检验结果。作图和统计均由统计学软件SPSS 22.0完成。

[0070] 其中所有胶质瘤(未分组):正常人,CCKBR平均值比值, $P=6.498 \times 10^{-12}$

[0071] I级神经胶质瘤:正常人,CCKBR平均值比值, $P=0.023$

[0072] II级神经胶质瘤:正常人,CCKBR平均值比值, $P=0.000049$

[0073] III级神经胶质瘤:正常人,CCKBR平均值比值, $P=5.567 \times 10^{-7}$

[0074] IV级神经胶质瘤:正常人,CCKBR平均值比值, $P=0.000010$

[0075] 注: $P$ 值 $<0.05$ 时,表明两者均值比较具有统计学意义;

[0076]  $P$ 值 $<0.01$ 时,表明两者均值比较具有显著性统计学意义。

[0077] (2)表2:正常成人、所有神经胶质瘤、I级神经胶质瘤、II级神经胶质瘤、III级神经胶质瘤、和IV级神经胶质瘤患者血清CCKBR浓度平均值及其标准差。统计均由统计学软件SPSS 22.0完成。

[0078] 表2

变量	正常人	神经胶质瘤 (未分类)	神经胶质瘤(分类)			
			I	II	III	IV
N	70	121	20	27	43	31
CCKBR(pg/ml)	5.18	13.29	8.78	10.23	14.03	17.86
标准差	2.10	5.47	3.59	4.07	4.40	5.05

[0079] 表2

[0080] (3)结果分析

[0081] 神经胶质瘤(未分组)时,其病人血清中CCKBR平均浓度(13.29pg/ml)比正常人血清中CCKBR平均浓度(5.18pg/ml)高(表2),而且具有显著的统计学意义( $P=6.498 \times 10^{-12}$ ,图1)。

[0082] 神经胶质瘤分组之后分别与正常人组比较,均有统计学意义(图1)。其中,I级神经胶质瘤患者血清CCKBR的平均浓度(8.78pg/ml)比正常人组的平均浓度(5.18pg/ml)略高(表2),具有统计学意义( $P=0.023$ ,图1);其它组别,包括II级、III级和IV级神经胶质瘤患者,他们的血清CCKBR平均浓度均比正常人组血清CCKBR平均浓度显著增高( $P$ 值均 $<0.01$ ,表2和图1)。

[0083] 实验结果证明了,血清CCKBR水平是神经胶质瘤一个较好的检测指标;特别是对于早期患者(I级神经胶质)也有诊断的价值,发挥了早期预警的作用,有潜在的临床应用价值。

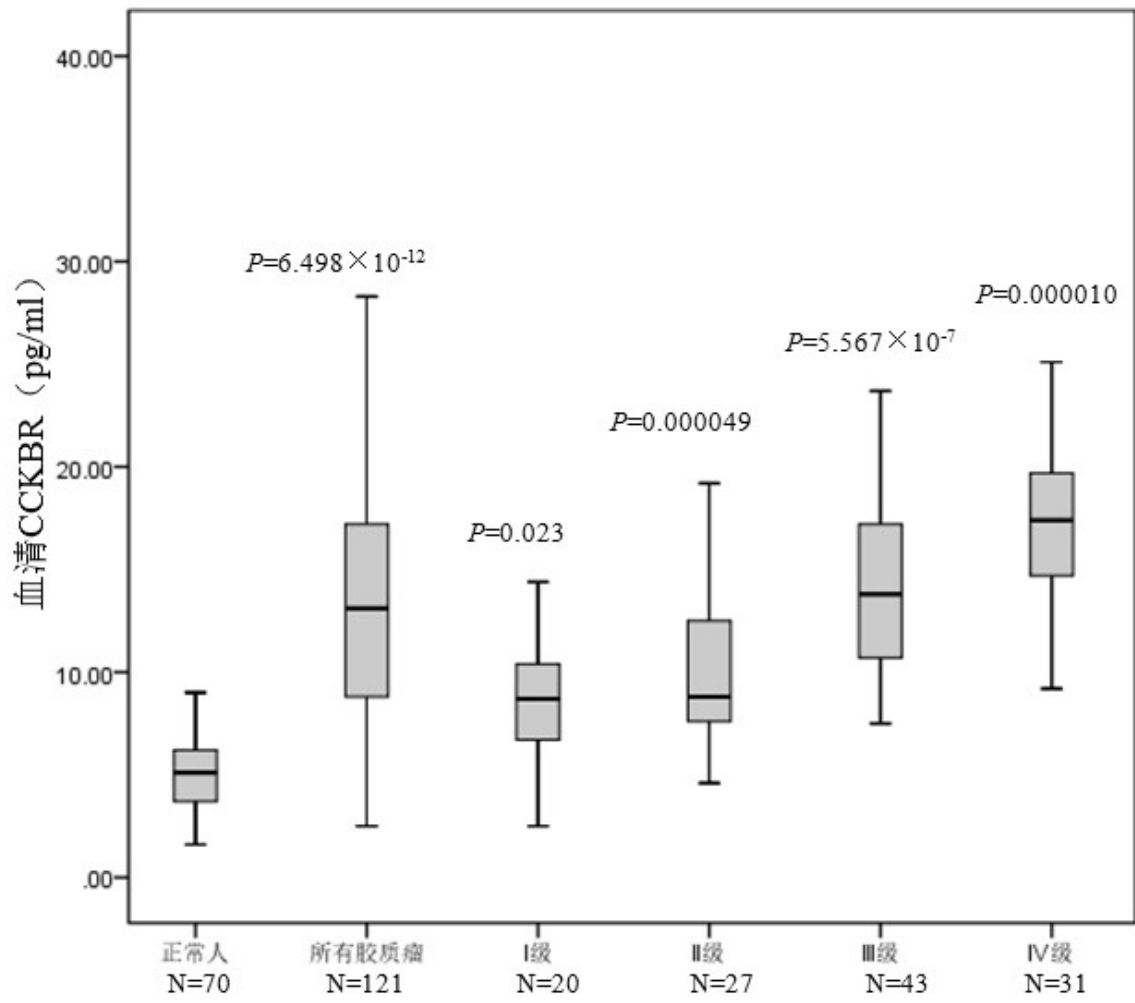


图1

专利名称(译)	一种用于成人神经胶质瘤诊断的双抗体夹心法ELISA试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN107664696B</a>	公开(公告)日	2019-12-06
申请号	CN2017110750912.4	申请日	2017-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	广东医科大学		
申请(专利权)人(译)	广东医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	广东医科大学		
[标]发明人	罗辉 朱萧 罗海清 杨晓红 黄永梅 詹静婷 雷金丽		
发明人	罗辉 朱萧 罗海清 杨晓红 黄永梅 詹静婷 雷金丽		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/577 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/574 G01N33/577		
代理人(译)	张月光		
审查员(译)	赵晓明		
其他公开文献	CN107664696A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了血清CCKBR在作为神经胶质瘤诊断标志物方面的应用，以及一种神经胶质瘤的双抗体夹心法ELISA诊断试剂盒。本发明公开了一种新的诊断神经胶质瘤的生物标记物，尤其是对于神经胶质瘤的早期预警和早期诊断，具有特别重要的作用和临床应用价值。同时，还建立了一种基于双抗体夹心原理的酶联免疫诊断系统，并开发成神经胶质瘤诊断试剂盒，可以快速准确地进行CCKBR的检测，可以对各期（特别是早期）原发性神经胶质瘤作出快速的辅助诊断，具有重要的临床应用价值。而且该试剂盒具有操作简单、试剂稳定、重复性好、特异性强、敏感性高等优势，易于大范围推广应用的广阔市场前景。

