



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101260153 B

(45) 授权公告日 2010. 11. 03

(21) 申请号 200710064199. 4

(22) 申请日 2007. 03. 06

(73) 专利权人 北京美康生物技术研究中心
地址 100085 北京市海淀区东北旺北京中关村软件园孵化器 1 号楼 C 座 1324

(72) 发明人 金鑫 王文雅 戴路 杜军

(74) 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理有限公司 11139

代理人 孙皓晨

(56) 对比文件

杨淑华. 乳腺癌相关抗原基因的 cDNA 文库筛选、鉴定及性质分析. 天津医科大学硕士论文. 2006, 全文.

审查员 唐慧

(51) Int. Cl.

C07K 14/47(2006. 01)

C12N 15/12(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

G01N 33/536(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 20 页 附图 2 页

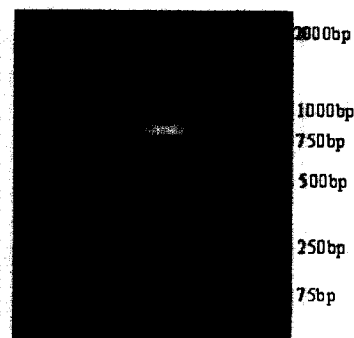
(54) 发明名称

人乳腺癌组织抗原及其编码基因、其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种用于乳腺癌早期诊断的癌抗原 (Human Galactophore tissue antigen, hGTA) 及其编码基因, 含有该编码基因的重组质粒和含有该重组质粒的宿主细胞。本发明还公开了该重组抗原的制备和纯化方法以及该重组抗原在乳腺癌早期诊断中的应用。hGTA 是一种只在乳腺组织表达, 在原发性乳腺癌及乳腺癌细胞系中表达显著增加的蛋白, 其 cDNA 编码大约 36kD 的分泌性糖蛋白。hGTA 乳腺组织特异性和分泌性蛋白的特点, 使其在乳腺癌临床早期诊断上具有潜在的应用价值, 其肿瘤相关抗原的特性, 使其可作为肿瘤疫苗设计的靶点应用于乳腺癌免疫治疗。

1 2 M



1. 一种人乳腺癌组织抗原,其特征在于:其氨基酸序列为 SEQ ID NO:2 所示。
2. 一种编码权利要求 1 所述人乳腺癌组织抗原的基因,其特征在于:其核苷酸序列是以下 (a)、(b) 或 (c) 中的任意一种:
 - (a) SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列;或
 - (b) 在严谨条件下能与 (a) 所示的核苷酸序列的互补序列杂交的核苷酸序列,该核苷酸序列编码具有该抗原活性的蛋白;或
 - (c) 编码 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的核苷酸序列。
3. 按照权利要求 2 的基因,其特征在于:其核苷酸序列是 SEQ ID NO:1 所示。
4. 含有权利要求 2 或 3 所述基因的重组表达质粒。
5. 按照权利要求 4 的重组表达质粒,其特征是所述的重组表达质粒是 pQE-hGTA;其中, hGTA 的核苷酸序列为 SEQ ID NO:1 所示。
6. 含有权利要求 4 或 5 所述重组表达质粒的重组菌株。
7. 一种制备权利要求 1 人乳腺癌组织抗原的方法,包括以下步骤:

构建含有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列的重组表达质粒;培养用该重组表达质粒所转化的宿主细胞,得重组菌株;培养重组菌株,诱导重组乳腺癌组织特异蛋白的表达,回收并纯化所表达的重组蛋白。
8. 按照权利要求 7 的方法,其特征是所述的重组表达质粒是 pQE-hGTA;其中, hGTA 的核苷酸序列为 SEQ ID NO:1 所示;所述的宿主细胞是大肠杆菌 M15[pREP4]。
9. 按照权利要求 7 的方法,其特征是所述的回收并纯化重组蛋白的方法包括以下步骤:冰浴超声破菌法裂解表达重组质粒 pQE-hGTA 的大肠杆菌 M15[pREP4];收集包涵体并将其溶解,收集变性蛋白;用 Ni^{2+} 螯合亲和层析纯化变性蛋白;复性纯化后的变性蛋白离子,得粗复性蛋白;将粗复性蛋白用阴离子交换层析纯化,即得;其中, hGTA 的核苷酸序列为 SEQ ID NO:1 所示。
10. 权利要求 1 的人乳腺癌组织抗原在制备诊断或治疗乳腺癌药物中的用途。

人乳腺癌组织抗原及其编码基因、其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种肿瘤相关抗原,尤其涉及人乳腺癌组织抗原及其编码基因,本发明还涉及表达该人乳腺癌组织抗原的重组表达载体、含有该重组表达载体的宿主细胞和重组抗原的分离和纯化方法、该重组抗原在早期诊断或治疗乳腺癌中的应用,属于分子生物学和细胞免疫学领域

背景技术

[0002] 乳腺癌是女性最常见恶性肿瘤之一,其死亡率仅次于肺癌而位居第二位,且发病率呈直线上升趋势。在我国沿海经济较发达地区,尤其在京、津、沪三大城市的部分地区中,乳腺癌发病率已居于女性恶性肿瘤的首位;西欧和北美经济发达地区的妇女中,乳腺癌是一种主要的死亡原因。

[0003] 乳腺癌的自然病程以临床前期最长,约占疾病全程的2/3。早期癌中多数尚未出现明显包块或肿块较小,此时治疗效果较好。有研究表明,乳腺癌原发灶越小,预后越好。T4、T3、T2、T1期乳腺癌的10年生存率分别为19.7%、46.0%、62.6%、87.8%。直径小于1cm的微小癌,其10年总体生存率在90%~99%。由此可见,早期诊断和早期治疗是降低乳腺癌死亡率的关键。

[0004] 目前临床常用的早期诊断乳腺癌的方法主要有乳房钼靶X射线摄影、超声诊断、近红外线扫描、CT及MRI等。这些常规影像学方法只能发现直径 $\geq 1\text{cm}$ 的结节(约1g),相当于 10^9 个肿瘤细胞。乳腺癌从单细胞发展到临床能检出的1cm小肿块,其生长期一般已逾3年,此时常常已出现其它系统或器官的转移。既往研究业已证明生物化学标志物最低检测限为 10^8 个肿瘤细胞,因此能在亚临床期较早的发现乳腺癌,从而更加有利于早期诊断及早期治疗乳腺癌,降低其死亡率。目前常用的检测乳腺癌的标志物有CEA、MUC-1、CK-19等,但这些指标均缺乏特异性,因而缺乏诊断价值,限制了它们的临床应用。因此,研究和发现乳腺癌的特异性标志物,建立经济、更适合早期诊断乳腺癌的检测方法,对乳腺癌防治工作无疑将起到极大促进作用。

发明内容

[0005] 本发明首先所要解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种新的特异性高的人乳腺癌组织抗原(Human Galactophore tissue antigen,hGTA),该抗原可准确的诊断或检测出早期乳腺癌。

[0006] 本发明首先所要解决的技术问题是通过以下技术途径来实现的:

[0007] 一种人乳腺癌组织抗原(hGTA),其是以下(a)或(b)的氨基酸序列:

[0008] (a)SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列;或

[0009] (b)将SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列通过一个或多个氨基酸残基的替换、缺失或插入而获得的仍具有所述抗原活性的蛋白衍生物。

[0010] 优选的,本发明人乳腺癌组织抗原(hGTA)为SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

[0011] 本发明所要解决的第二个技术问题是提供一种编码上述人乳腺癌组织抗原的基因。

[0012] 本发明所要解决的第二个技术问题是以下技术途径来实现的：

[0013] 一种编码人乳腺癌组织抗原的基因，该基因是以下 (a)、(b)、(c) 或 (d) 的核苷酸序列：

[0014] (a) 是 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列；或

[0015] (b) 在严谨条件下能与 (a) 所示的核苷酸序列的互补序列杂交的核苷酸序列，且该核苷酸序列编码具有所述人乳腺癌组织抗原活性的蛋白；或

[0016] (c) 编码 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的核苷酸序列；或

[0017] (d) 编码具有所述人乳腺癌组织抗原功能的蛋白衍生物的核苷酸序列，该蛋白衍生物通过将 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的一个或多个氨基酸残基替换、缺失或插入而获得。

[0018] 优选的，本发明编码人乳腺癌组织抗原的基因 (hGTA) 是 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列，该基因编码大约 36kD 的分泌性糖蛋白，定位于染色体 11q12.8 密集基因簇内，该基因仅在乳腺癌中表达，是继乳腺珠蛋白之后发现的另一个具有乳腺器官特异性的肿瘤标志物，在一系列的临床试验中发现，该抗原在乳腺癌的早期诊断、治疗、监测病程转移及判断预后等方面都具有重要意义。在 49% 原发性的 I 期乳腺癌肿瘤中，hGTA 过度表达。这表明 hGTA 基因的失调多发于乳腺癌的早期。

[0019] 所述的“多个”通常意味着 2~60 个，优选为 2~15 个，这些取决于乳腺癌组织特异蛋白的三维结构中氨基酸残基的位置或氨基酸的种类；所述的“替换”是指分别用不同的氨基酸残基取代一个或多个氨基酸残基；所述的“缺失”是指氨基酸序列的改变，其中分别缺少一个或多个氨基酸残基；所述的“插入”是指氨基酸序列的改变，相对天然分子而言，所述改变导致添加一个或多个氨基酸残基。

[0020] 所述的“严谨杂交条件”意指在所属领域中已知的低离子强度和高温的条件。通常，在严谨条件下，探针将杂交到核酸的复合混合物中的其目标子序列上，但并不杂交到复合混合物中的其它序列上。严谨条件是序列依赖性的并且在不同环境中将有所不同。

[0021] 严谨条件通常被选择为低于特异序列在指定离子强度 pH 下的热熔点 (T_m) 约 5-10°C。 T_m 为在平衡状态下 50% 与目标互补的探针杂交到目标序列时所处的温度（在指定离子强度、pH 和核酸浓度下）。严谨条件可为以下条件：其中在 pH7.0 到 8.3 下盐浓度低于约 1.0M 钠离子浓度，通常为约 0.01 到 1.0M 钠离子浓度（或其它盐），并且温度对于短探针（包括（但不限于）10 到 50 个核苷酸）而言为至少约 30°C，而对于长探针（包括（但不限于）大于 50 个核苷酸）而言为至少约 60°C。严谨条件也可通过加入诸如甲酰胺的去稳定剂来实现。对于选择性或特异性杂交而言，正信号可为至少两倍的背景杂交，视情况为 10 倍背景杂交。

[0022] 一种例示性严谨杂交条件可如下：50% 甲酰胺，5×SSC 和 1% SDS，在 42°C 下培养；或 5×SSC，1% SDS，在 65°C 下培养，在 0.2×SSC 中洗涤和在 65°C 下于 0.1% SDS 中洗涤。所述洗涤可进行 5、15、30、60、120 分钟或更长时间。

[0023] 本发明所要解决的第三个技术问题是构建含有 SEQ ID NO.1 所示核苷酸序列的重组表达质粒及获取含有该重组表达载体的重组菌株。本发明所要解决的第三个技术问题是

通过以下技术途径来实现的：

[0024] 本发明的重组表达质粒可通过本领域的常规方法构建而成，即将 SEQ ID NO. 1 所示的核苷酸序列插入到表达载体合适的限制性酶切位点之间，使 SEQ ID NO :1 所示的核苷酸序列可操作的与表达调控序列相连接。

[0025] 作为本发明的一个最优化的实施方案，优选为将 SEQ ID NO :1 所示的核苷酸序列插入到质粒 pQE 上的 EcoR I 和 Hind III 限制性酶切位点之间，得到重组表达质粒 pQE-hGTA。本发明选择 JM109 作为扩增菌，将重组表达质粒 pQE-hGTA 转化入 JM109 中扩增，扩增后提取重组质粒，双酶切鉴定后转化入 M15[pREP4] 表达菌中，经 IPTG 诱导后，M15[pREP4] 工程菌成功表达了目的蛋白。

[0026] 本发明所要解决的又一个技术问题是提供一种制备所述的重组乳腺癌组织特异蛋白的方法。

[0027] 本发明所要解决的又一个技术问题是通过以下技术途径来实现的：

[0028] 优选的，一种制备重组乳腺癌组织特异蛋白的方法，包括以下步骤：

[0029] 构建含有 SEQ ID NO :1 所示的核苷酸序列的重组表达质粒；培养用该重组表达质粒所转化的宿主细胞，得重组菌株；培养重组菌株，诱导重组乳腺癌组织特异蛋白的表达，回收并纯化所表达的重组抗原。

[0030] 上述制备重组抗原的方法中，优选的，所述的重组表达质粒是 pQE-hGTA；所述的宿主细胞是大肠杆菌 M15[pREP4]。

[0031] 所述的回收并纯化重组乳腺癌组织特异蛋白的方法如下：冰浴超声破菌法裂解转入重组质粒 pQE-hGTA 的细菌；收集包涵体并将其溶解；收集变性蛋白，用 Ni²⁺ 螯合亲和层析纯化变性蛋白，复性纯化后的变性蛋白离子，得粗复性蛋白，用阴离子交换层析纯化复性蛋白。

[0032] 本发明最优化的整体技术方案详细描述：

[0033] 本发明主要涉及鉴定新的在乳腺癌中过度表达的基因，本发明自乳腺癌组织提取总 RNA，以其为模板，经 RT-PCR 逆转录扩增出 hGTA 的 cDNA。为了获得高质量的 RNA，本发明采用新鲜切除的乳腺癌组织，在液氮中运输，并尽快提取 RNA，避免反复冻融，提取的乳腺癌组织标本中总 RNA 用紫外核酸蛋白仪检测和琼脂糖凝胶电泳进行鉴定通过 RT-PCR 扩增 hGTA 基因编码序列，将扩增产物克隆至 pGEM-T 载体中，DNA 测序鉴定后，用限制性内切酶切下目的基因，经鉴定，所表达的蛋白是一种新的乳房特异性分泌蛋白即 hGTA，该 cDNA 是纯化及分离形式的，其核苷酸序列经鉴定为 SEQ ID No :1，基因全长 1159 个核苷酸，编码 321 个氨基酸，其编码的蛋白，即乳腺癌组织特异抗原 hGTA，是纯化及分离形式的，其氨基酸序列经鉴定为 SEQ ID NO :2。

[0034] 根据已获取的 hGTA cDNA 序列，用 primer 软件设计特异引物，并在其上下游引入不同的酶切位点和特异的保护碱基，降低载体的自连率，提高连接成功率。以乳腺癌组织 RNA 为模板扩增出的 hGTA cDNA 经 ABI3730 全自动 DNA 测序仪测序，与预期的序列完全一致，共 1159bp。该 cDNA 序列的 45bp 上游不包含其它框内甲硫氨酸或翻译终点，所编码多肽的前 36 个残基可能是一段疏水肽信号序列，残基 53-55 和 68-70 是共有的 N 糖基化位点，这说明 hGTA 蛋白是分泌糖蛋白，因此可以在外周血中检测到该标志物。

[0035] 在基因库 (Genbank) 中查找与 hGTA cDNA 相似的 DNA 序列没有发现明显同源的

DNA 序列,说明 hGTAcDNA 是一段新的、迄今未知的 DNA 序列。

[0036] 表达载体的选择要考虑多种因素,如要表达蛋白的大小、蛋白的需要量、表达蛋白是否要纯化,纯化产物是否具有有良好的生物学活性等。pQE 表达载体属于 PDS 质粒家族,是一种原核高效表达载体,具有以下几个特点:首先该表达载体含有噬菌体 TS 启动子和两个乳糖操纵序列构成的最适启动子-操纵子成分。当有诱导物 IPTG 存在时,诱导物与 Lac 阻遏蛋白结合,使阻遏蛋白失活,与 Lac O 解离,使 RNA 聚合酶能够进入结构基因,转录处于开放状态;其次,该载体有合成的核糖体结合位点 RBS II 确保高转录效率,有 β -内酰胺酶基因利于氨苄青霉素的抗性筛选;有转录终止只密码可保证转录的及时终止;此外,在多克隆位点上游还含有 6 个组氨酸的编码序列 (6×His tag)。重组质粒经诱导表达后,6×His tag-nJ- 以和外源插入片段共同表达。6×His tag 为短肽,免疫原性很弱,并且对蛋白质的表达、折叠及生物学活性均无影响,因此表达后可不必用蛋白酶切割去除而自接用于免疫动物;6×His tag 的存在对于重组蛋白的纯化也非常重要,使重组蛋白通过镍柱亲和技术得以有效纯化,从而为制备重组 hGTA 抗原及制备诊断抗体的研制奠定物质基础。

[0037] 本发明选择 JM109 作为扩增菌,将重组表达质粒 pQE-hGTA 转化入 JM109 中扩增,扩增后提取重组质粒,双酶切鉴定后转化入 M15[pREP4] 表达菌中,经 IPTG 诱导后,M15[pREP4] 工程菌表达到了目的蛋白。

[0038] 表达外源蛋白的系统有大肠杆菌、酵母、哺乳动物细胞、昆虫细胞等。其中大肠杆菌具有繁殖快、营养要求低、转化和表达效率高、遗传背景清楚、易发酵,并且易于操作并可以快速大量生产重组蛋白等特点,仍是许多外源蛋白首选的表达系统。

[0039] 本发明所选用的大肠杆菌 M15 中含有质粒 pREP4,能翻译 Lac 抑制子,并具有卡那霉素抗性,可严格调控外源重组蛋白在 IPTG 诱导后高效表达而不致产生细胞毒性。基于这些因素,本发明应用分子克隆的方法成功的构建了 pQE-hGTA 重组表达质粒,经酶切鉴定与预期的结果完全相符。通过质粒的转化,将其导入大肠杆菌 M15[pREP4] 中,实现了高效表达。

[0040] 本发明中重组质粒经 IPTG 诱导后实现了在 E. coli M15[pREP4] 中的高效融合表达,表达量最高达 27.4%。然而同大多数原核表达产物一样,其表达形式为包涵体,这可能是由于分子的二硫键不能正确配对的原因所致。

[0041] 本发明的另一目的是提供一种纯化重组 hGTA 的方法。

[0042] 本发明采用了冰浴超声破菌(表达大肠杆菌)法,镜下观察破碎后的细菌裂解完全。由于本发明表达的产物是包涵体蛋白,包涵体中主要含有重组蛋白,但也含有一些其他的杂质成分,这些杂质成分在包涵体的溶解和复性过程中会导致重组蛋白质的降解,因此,包涵体的洗涤处理非常重要,本发明中采用了 1%左右的中性去垢剂洗涤包涵体,并在洗涤剂中加入了 1%的 Triton X-100,2mol/L 的尿素,并在 pH8.2 条件下进行,通过该方法洗涤的包涵体基本上未影响蛋白质的结构。

[0043] 由于该表达质粒表达的包涵体不溶于水,本发明采用浓度 5mol/L 的尿素溶解包涵体,尽管尿素溶解包涵体较盐酸胍慢而弱,溶解度为 70%-90%,但由于用尿素溶解具有不电离,呈中性,成本低,蛋白质复性后除去不会造成大量蛋白质沉淀并可选用多种色谱法纯化等优点,因此本发明采用尿素溶解包涵体。

[0044] 本发明所表达的目的蛋白以不溶性包涵体形式存在,尿素经洗涤后而溶解于尿素

溶液中,由于在其氨基端含有 6 个连续的组氨酸。而组氨酸具有与多种二价金属离子,如 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 等结合的能力,因此,本发明利用金属螯合层析方法纯化该包涵体。金属螯合亲和层析利用共价结合在层析载体上的二价金属离子螯合剂能与表面富含组氨酸残基的蛋白质牢固结合,使其留在层析柱上,而不带有组氨酸残基的其他蛋白质则不能结合,再以洗脱溶液洗脱就可以获得高纯度的重组蛋白,然后用较低 pH 值的洗脱缓冲液洗脱,对亲和层析纯化后的目的蛋白行 SDS-PAGE 分析显示,杂蛋白条带明显减少,说明目的蛋白已被有效的初步纯化。

[0045] 包涵体的复性是目前基因工程蛋白生产过程中的难点问题,本发明采用分步稀释,逐渐降低变性剂浓度的方法,以有效的降低蛋白质分子多聚体的产生,从而提高活性蛋白质的回收率,最终取得了较好的复性结果。

[0046] 为了获得高纯度的 hGTA 蛋白,本发明对复性的目的蛋白利用阴离子交换层析进行了再次纯化。离子交换层析纯化蛋白的效果与离子交换条件的选择及梯度的选择有密切关系。阴离子交换要求平衡液和样品的 pH 值应高于目的蛋白 pI 值 1 个单位以上,而且盐浓度最好在 20mmol-50mmol/L 之间。

[0047] 本发明中的目的蛋白 hGTA 经 DNAsis 分析其 pI 值为 5.5。因此,本发明平衡液采用 25mmol/L Tris, pH8.0 缓冲液。在此条件下,目的蛋白可以很好地与离子交换柱上的正性基团结合。梯度洗脱常用的有盐梯度和 pH 梯度或二者一并使用,由于盐梯度容易操作,且更为常用,所以本发明选择了盐梯度洗脱,洗脱液中的蛋白经 SDS-PAGE 电泳分析显示纯化效果较好,纯度在 93% 左右,最后再用截流分子量为 10000 的超滤膜进行超滤,纯化的 hGTA 蛋白浓度为 0.79mg/ml,1L 菌液所得的包涵体蛋白最终获得了 27.4mg 纯度为 98.4% 的 hGTA 肿瘤相关抗原。

[0048] 本发明获得 hGTA 重组蛋白与从乳腺组织中分离得到的 hGTA 蛋白具有完全相同的结构和功能,证明为同一种蛋白,临床试验表明,该蛋白可以用于乳腺癌的早期诊断。

附图说明

[0049] 图 1 RT-PCR 逆转录后的琼脂糖图谱;其中:M 为 DNA marker;1 为阴性对照;2 为 PCR 产物。

[0050] 图 2 pQE-hGTA 酶切鉴定结果;其中:M 为 DNA marker;1 为 pQE-hGTA 质粒;2,3 为双酶切结果。

[0051] 图 3 hGTA 基因的诱导表达结果;其中:M 为 protein marker;1 为 M15(pQE) 未诱导;2 为 M15(pQE) 诱导 6 小时;3 为 M15(pQE-hGTA) 未诱导;4,5 为 M15(pQE-hGTA) 诱导 6 小时。

[0052] 图 4 用离子交换纯化 hGTA 重组蛋白结果;其中 M 为 protein marker;1 为 M15(pQE-hGTA) 未诱导;2 为 M15(pQE-hGTA) 诱导 6 小时;3,4,5 为蛋白质洗脱峰。

[0053] 以下通过实施例来进一步描述本发明的制备方法及其有益效果,应该理解的是,这些实施例仅用于例证的目的,决不限本发明的保护范围。

具体实施方式

[0054] 实施例 1 人 hGTA cDNA 的逆转录及表达质粒的构建

[0055] ①乳腺癌细胞总 RNA 提取

[0056] 将乳腺癌细胞 MDA-MB453 (哈尔滨医科大学附属第一医院乳腺中心) 培养于完全 RPMI1640 培养基, 在 37°C, 5% CO₂、饱和湿度下培养至对数生长期, 对细胞则消化、吹打细胞, 制备细胞悬液, 计数, 2000r/min, 弃去培养液, 吸取细胞 (5-10×10⁶) 于 1mL TRIZOL Reagent 中裂解室温放置 5min, 使得核酸蛋白复合物完全分离, 12000r/min 离心 5min, 取上清, 转入一个新的无 Rnase 的离心管中, 加 0.3ml 氯仿, 剧烈振荡 20 秒, 室温放置 5min, 13000r/min 离心 5min, 样品会分成三层, 将含有 RNA 的水相转移到新管中, 进行下一步操作, 缓慢加入 1 倍体积的 70% 乙醇, 混匀, 得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱中, 10000g 离心 30 秒, 弃掉收集管中的废液, 加 0.5ml 去蛋白缓冲液, 10000g 离心 30 秒, 弃废液, 加 0.8ml 漂洗液, 10000g 离心 30 秒, 弃废液, 加 0.5ml 漂洗液, 10000g 离心 5min, 小心去除多余的液体, 将离心柱转入一个新离心管中, 加 30-50 μl 无 Rnase 水, 室温放置 3min, 10000g 离心 3min, 取适量提取的 RNA 溶液, 紫外分光光度定量, 计算 A_{260/280} 为 1.94, 说明提取的总 RNA 纯度较高。

[0057] ②人 hGTA cDNA 合成

[0058] 总 RNA 1.0 μg, Oligo(dT)₁₅ primer 1 μl 冰上结合, 70°C 5min, 立即冰浴 10min, 再加入 5×Reaction Buffer 5 μl, 10mmol/LdNTP 1.25 μl, RNA 酶抑制剂 0.55 μl, M-MLV 逆转录酶 1 μl, 加入无核酸酶的 ddH₂O 补足总体积至 25 μl, 混匀后按如下程序进行逆转录: 42°C 1.5-2hr, 95°C 变性 5min。逆转录产物一部分进行 PCR 扩增, 余下的部分 -20°C 保存。

[0059] 根据 hGTAcDNA 序列设计了一对特异引物:

[0060] 上游引物: 5' -GCTGAATTC⁺CCGGTTCGTCGGTTATCCGCGCCGCTC-3'

[0061] EcoR I

[0062] 下游引物: 5' -CGGAAGCTT⁺TCGGATGGTGGGGCTACCCACCAGCC-3'

[0063] HindIII

[0064] 逆转录得到的 cDNA 1 μl, 上下游引物各 1 μl, 10×Reaction Buffer 5 μl, 25mmol/L MgCl₂ 4 μl, 10mmol/L dNTP 2 μl, Taq DNA 聚合酶 (5U/μl, 加入无菌水至总体积 50 μl, 混匀后进行扩增, 条件为: 94°C 预变性 90s, 然后 94°C 60s, 58°C 60s, 72°C 90s, 35 个循环, 最后 72°C 延伸 7min。取扩增产物 5 μl PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶中电泳鉴定 (图 1)。

[0065] ③感受态细菌的制备

[0066] 从琼脂平板上接种一单菌落 (M15) 于 3mL 菌培养液中, 37°C 振摇培养过夜, 向 2 个内装 30mL 细菌培养液三角烧瓶中分别加入 0.2mL 与 0.5mL 过夜培养的细菌于 37°C 振摇培养 2-3 小时。无菌条件下选取生长状况良好的细菌转移到 6 个无菌一次性的以冰预冷的 5mL 离心管中, 5mL/管, 冰上置 5min, 40°C 8000r/min 离心 2-3min, 倒出培养液并倒置 1min 使尽量流尽, 移液器小心吸尽, 冰预冷 0.1mol/L CaCl₂ 3mL/管重悬, 冰浴 5min, 40°C 8000r/min 2-3min, 弃上清液, 以 0.2mL/管含 20% 甘油的 0.1mol/L CaCl₂ 溶液重悬, -20°C 保存。

[0067] ④ pQE 质粒 (上海生物工程研究所) 的转化及质粒的提取

[0068] 冷冻的感受态细菌取出后置于冰上解冻, 1ng-10ng 质粒 DNA 与复融感受态细菌混合, 轻弹管壁混匀, 冰上放置 30min, 42°C 热休克 90s, 再置冰上 2min, 加 800 μl 预置室温下的细菌培养液, 37°C 200r/min 振摇 1 小时, 分别将 50 μl、200 μl 和余下细菌 (离心收集) 涂于相应抗生素琼脂平板, 37°C 过夜培养。

[0069] 挑阳性单菌落于 20ml 培养液中, 37℃ 振荡培养过夜, 14000r/min 离心 2min 收集 3ml 菌液的沉淀, 弃上清, 加 150 μ l 质粒抽提试剂 Solutin I (10mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 50mmol/L EDTA (pH8.0), 2% Triton X-100, 8% 蔗糖), 重悬细菌, 加 300 μ l Solutin II (0.2mol/L NaOH), 颠倒混匀, 加 150 μ l Solutin III (3mol/L NaAc (pH4.8)), 颠倒混匀, 加 150 μ l Solutin IV (1mol/L Tris), 颠倒混匀。14000r/min 离心 10min, 吸取上层水相移至新管, 加 2 μ l 10mg/ml RnaseA, 55℃ 水浴育 10min, 加 400 μ l 酚和 400 μ l 氯仿, 然后 14000r/min 离心 10min, 吸取上层水相移至新管, 加 600 μ l 异丙醇, 颠倒混匀, 14000r/min 离心 10min, 弃上清, 沉淀用 70% 乙醇洗涤 2 遍, 14000r/min 离心 8min, 吸干乙醇, 室温干燥, 每管加 30 μ l 无菌纯水溶解质粒, 紫外吸收法测 DNA 浓度, 琼脂糖凝胶电泳结果, -20℃ 贮存备用。

[0070] ⑤ 双酶切及酶切产物的回收

[0071] EcoR I/Hind III 分步双酶切鉴定重组质粒, 37℃ 反应 2-3h, 用胶回收试剂盒回收酶切片段。

[0072] 小心从琼脂糖凝胶上切下 DNA 片段胶条, 放入离心管中称重, 加入 3 倍体积的 Buffer, 50℃ 水浴 10min, 至胶条完全融化, 检查颜色为黄色, 加入等胶条体积的 100% 异丙醇, 颠倒几次混匀, 将柱放入 2ml 收集管中, 将全部样品移入柱内, 13000r/min 离心 1min, 倒出流过柱子的液体, 将柱放回同一收集管中, 加 500 μ l Buffer 于柱内, 13000r/min 离心 1min, 倒出流过柱子的液体, 将柱放回同一收集管中, 加 750 μ l Buffer 于柱内洗涤, 放置 5min 后, 13000r/min 离心 1min, 倒出流过柱子的液体后, 13000r/min 离心 1min, 将柱放入一个干净的离心管中, 加 10 μ l Buffer 于柱上的膜中心, 洗脱 DNA, 柱子自立 1min 后, 13000r/min 离心 1min。

[0073] ⑥ pQE-hGTA 表达载体的构建及测序

[0074] pQE 质粒的制备: 将 pQE 质粒转化感受态大肠杆菌 XL1-Blue, 常规摇菌进行质粒扩增, 提取质粒, 经电泳鉴定后 -20℃ 保存备用;

[0075] 目的片断的制备: hGTA 克隆产物 pGEM-T/hGTA 以 EcoR I/Hind III 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 回收电泳槽回收纯化 DNA 片段。

[0076] 载体的制备: 将 pQE 以 EcoR I/Hind III 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 回收电泳槽回收纯化 DNA 片段。

[0077] 连接反应: 将酶切并回收的目的片段和载体以 T₄DNA 连接酶连接, 4℃ 反应过夜。连接产物转化入感受态大肠杆菌 XL1-Blue 中, 离心收集细菌铺板, 37℃ 培养过夜后, 无菌条件下挑取单克隆菌落, 常规摇菌扩增并提取质粒, EcoR I/Hind III 双酶切对重组表达质粒进行鉴定 (图 2)。

[0078] 人乳腺癌细胞来源的 hGTA cDNA 测序结果见 SEQ ID No.: 1, 共 1159bp。

[0079] ⑦ hGTA 基因融合蛋白的诱导表达。

[0080] SDS-PAGE 结果 (图 3) 显示, 与 pQE 空质粒转化菌相比, 诱导后 pQE-hGTA 质粒转化菌在 36kDa 左右出现明显条带, 与预期的 hGTA 蛋白分子量相符。应用 DNAssist 软件对 hGTA 蛋白进行分析, 该蛋白由 321 个氨基酸组成, 其中极性氨基酸 188 个, 疏水性氨基酸 133 个。该蛋白含有 5 对二硫键, 等电点位为 5.5, 分子量为 36kDa

[0081] 实施例 2 hGTA 重组蛋白的纯化

[0082] ①转入重组质粒的细菌的裂解及表达包涵体的溶解

[0083] 取出实施例 1 所制备的冰冻菌体,称重,每克细菌加入 10ml 预冷破菌液,冰上待融,冰浴超声破菌,将菌液于 4℃,10000g,离心 25min 弃去上清,加入与破菌液等体积的包涵体洗涤液 I(0.2M NaCl,0.08% Triton-100,20mM,Tris1Murea,pH9.0),冰上搅拌 30min,4℃,10000g,离心 25min,弃上清,用包涵体洗涤液 II(0.2M NaCl,0.08% Triton-100,20mM Tris,2M urea, pH9.0)再次洗涤包涵体。加入二分之一破菌液体积的包涵体溶解液(50mM Tris,8M urea,pH9.2),冰上搅拌 1 小时,4℃,10000g,离心 25min,取上清,加入三倍包涵体溶解液体积的去离子水,补加 NaCl 至终浓度为 0.3M,混匀,用 1M HCl 调 pH 至颗粒状沉淀产生,置于 4℃过夜,使沉淀完全;4℃ 10000g,离心 25min,弃上清。

[0084] ② Ni²⁺ 螯合亲和层析纯化变性蛋白

[0085] 将经预处理的 Ni²⁺ 螯合亲和层析柱,接入 AKTA Explorer,用 Buffer A(购自南京博士德生物工程公司)平衡 200ml,将溶解后的包涵体用系统泵上样,流速 10.0ml/min,用 Buffer A 平衡至 A280 曲线呈水平,分别用 Buffer B(购自南京博士德生物工程公司), Buffer C(购自南京博士德生物工程公司)洗脱杂蛋白及目的蛋白,收集目的洗脱峰。

[0086] ③复性目的蛋白

[0087] 将经 Ni²⁺ 螯合亲和层析粗纯化的目的蛋白倒入透析袋中,放入盛有 1L 复性液 I(4mol/L Urea, GSH2mmol/L, GSSG1mmol/L, EDTA5mmol/L, Tris- 盐酸 20mmol/L, pH8.2) 的烧杯中,4℃透析过夜;次日,取出透析袋放入盛有 1L 复性液 II(3mol/L Urea, GSH2mmol/L, GSSG1mmol/L, EDTA5mmol/L, Tris- 盐酸 20mmol/L, pH8.2) 的烧杯中进行透析;每隔 4h 依次换复性液 III(2mol/L Urea, GSH2mmol/L, GSSG1mmol/L, EDTA5mmol/L, Tris- 盐酸 20mmol/L, pH8.2)、复性液 IV(1mol/L Urea, GSH2mmol/L, GSSG1mmol/L, EDTA5mmol/L, Tris- 盐酸 20mmol/L, pH8.2),换到复性液 V(EDTA5mmol/L, Tris- 盐酸 20mmol/L, pH8.2) 时 4℃透析过夜;透析结束后,4℃ 15000r/min 离心 20min,上清即为可溶性复性蛋白。

[0088] ④离子交换层析纯化复性蛋白

[0089] 将装好 DEAE Sepharose Fast Flow 填料的柱子接入 AKTA Explorer,用 Buffer D(购自南京博士德生物工程公司)平衡;将复性的蛋白用系统泵上样,流速 10.0ml/min;用 Buffer D 平衡至 A280 曲线呈水平;分别用 Buffer E(购自南京博士德生物工程公司), Buffer F(购自南京博士德生物工程公司)洗脱杂蛋白及目的蛋白,流速 200ml,流速 10.0ml/min;收集各洗脱峰。

[0090] 本发明最终从 1L 的细菌经诱导表达、超声裂解、尿素变性、Ni²⁺ 螯合亲和层析、透析复性、离子交换层析的系列过程,最终获得了 24.6mg 的 hGTA 的重组蛋白,经高效液相分析,纯度为 98.4%。

[0091] 实施例 3 抗 hGTA 单克隆抗体的制备

[0092] 一)ALB 抗原的单克隆抗体制备

[0093] 1、试验材料:

[0094] 1)、hGTA 抗原:实施例 2 所纯化的重组 hGTA 抗原。

[0095] 2)、实验动物:六周龄 BALB/c 小鼠购自哈尔滨医科大学动物实验中心;

[0096] 3)、DMEM 含糖培养基:Hyclone 公司。

[0097] 4)、其它试剂:福氏完全佐剂(购自 SIGMA 公司)。

[0098] 2、制备方法：

[0099] 1) 免疫动物：

[0100] 用人 hGTA 与福氏完全佐剂等体积混合腹腔注射免疫 8 周龄的雌性 BALB/C 小鼠，每周一次，剂量为 100ug/ 只，每只小鼠腹腔注射 0.5ml。而后间隔 1 周连续免疫 2 次，剂量及免疫方式相同，佐剂改为不完全佐剂，在融合前三天用 PBS 稀释抗原，经小鼠尾静脉注射进行冲击免疫。免疫 2-3 次后，用间接法 ELISA 检测小鼠血清效价，当效价达到 4000 以上时，便可准备分离脾细胞进行细胞融合。

[0101] 2) 细胞融合及 HT 筛选：

[0102] 将免疫后的小鼠，经眼眶放血，分离血清供检测抗体用；将经免疫的小鼠处死后，局部消毒剖腹，无菌条件下取脾，制备成脾细胞悬液，进行细胞计数和活力检测，取 10^8 个脾细胞悬液备用。融合前 2-3 天，将每瓶 Sp2/0 骨髓瘤细胞传至 4 瓶细胞，取处于对数生长期的细胞用于融合。将脾细胞和 SP2/0 细胞分别计数后，按 7:1 的比例加入 50ml 离心管中混合均匀，离心 10 分钟，倒尽上清液，使两种细胞混匀成糊状，加入 37℃ 预温的 50% PEG (分子量 4000)，边滴加边搅拌；融合后的细胞用含 20% 小牛血清的 HAT 培养液制备成细胞悬液，分划于 192 孔细胞培养板 (2 板) 中进行选择培养。在选择培养液中培养 4 天后，其他细胞逐渐消失，只有融合的杂交瘤成簇生长，形成小的细胞集落，8 天后，停止使用 HAT 培养液，改用 HT 培养液，一周后换用含 10% 牛血清的 DMEM 培养液培养。待杂交瘤细胞长满培养孔底部的 1/3 时，这时吸取培养上清进行筛选。用间接酶联吸附法 (ELISA) 进行特异性抗体检测，选择分泌抗 hGTA 抗原的杂交瘤细胞。

[0103] 3) 杂交瘤筛选及有限稀释

[0104] 以人 hGTA 为包被抗原 (包被量 0.4ug/ 孔)，用间接 ELISA 方法对杂交瘤细胞进行筛选，以免疫小鼠的血清为阳性对照，以 Sp2/0 细胞培养的上清液为空白对照，以细胞培养板中未长出克隆的培养上清为阴性对照。选取对 hGTA 抗原阳性反应的杂交瘤细胞集落，以有限稀释法进行克隆化培养，当细胞长满孔底约 1/3 时，测定各孔中培养液的特异性抗体的活性，选择抗体效价高，呈单个克隆生长，形态良好的细胞孔，继续按有限稀释法进行 2 次克隆和扩大培养。最终获 3 株能稳定分泌抗 hGTA 抗原的杂交瘤细胞株，这三株细胞的编号为 hGTA2C4, hGTA3B5, hGTA4F11。当克隆至阳性率达到 100% 时，及时将分泌抗单克隆抗体的单株细胞冻存于液氮中，留存种子细胞库。

[0105] 4) 单克隆抗体的制备及纯化

[0106] 在同系的 BALB/c (6 周龄) 腹腔注射液体石蜡，约第 8 天将克隆后分泌特异单克隆抗体的杂交瘤细胞注入腹腔 ($1-2 \times 10^6$ 细胞 / 鼠)，待小鼠腹部开始增大后，收集腹水。一只小鼠收集腹水 2-3 次后，杀死小鼠一次性取腹水，离心除去腹水中的细胞和细胞碎片，加入等体积的饱和硫酸铵到上清液中，将溶液放在磁力搅拌器上搅拌 6 小时，使蛋白质充分沉淀，将沉淀物溶于少量的 PBS 中，用 10mmol/LPBS (Ph7.4) 在 4℃ 透析 24 小时。然后通过 DEAE-Sephadex A52 层析柱，收集并合并洗脱液中含蛋白的部分，浓缩后即得抗 hGTA 单克隆抗体，将所筛选到的合格单克隆抗体保存备用。

[0107] 表 1 杂交瘤细胞染色体数目、单克隆抗体的亚型以及单克隆抗体的亲和常数

[0108]

| Cellline | Number of chromaosomes | McAb isotyping | | The affinity conatants of purified antibody |
|----------|------------------------|----------------|-------------|---|
| | | Ig sub-class | Light chain | |
| hGTA2C4 | 98 | IgG1 | κ | 2×10^9 |
| hGTA3B5 | 96 | IgG2a | κ | 5×10^{10} |
| hGTA4F11 | 99 | IgG1 | κ | 6×10^6 |

[0109] 实施例 4 抗 hGTA 单克隆抗体的酶标记

[0110] 称取 2mg HRP 溶解于 1ml 超纯水中,加入 30ul 新配的 0.1M NaIO₄ 溶液,将上述溶液装入拦截分子量为 8000 的透析袋中,对 2mM PH4.4 的醋酸钠缓冲液透析过夜;加 30 μ 10.2M PH9.5 碳酸盐缓冲液,调醛化 HRP 的 PH 升高到 9.0 ~ 9.5,立即加入 0.5ml 抗 hGTA 抗体,室温避光在脱色摇床上轻轻振摇 2 小时;加 40ul 新配的 4mg/ml NaBH₄ 液,混匀,再置 4℃ 2 小时。上述液装入分子量为 8000 的透析袋中,对 0.01M PH8.2 磷酸盐缓冲液透析过夜,用硫酸铵法纯化即得。

[0111] 实施例 4 乳腺癌早期检测标志物 hGTA 试剂盒的制备

[0112] 1、试验材料

[0113] 1)hGTA 抗原:实施例 2 所纯化的重组 hGTA 抗原

[0114] 2) 抗 hGTA 单克隆抗体 1,2:实施例 3 所制备。

[0115] 3) 所用的试剂:

[0116] 3.1 包被缓冲液:碳酸钠 0.75g,碳酸氢钠 1.45g,硫柳汞 0.1g,氯化钙,0.2g,对羟基水杨酸 0.02g,加双蒸水至 1000ml 调 PH9.6,灭菌备用。

[0117] 3.2、封闭液:

[0118] 氯化钠 4.0g,

[0119] 磷酸二氢钾 0.1g,

[0120] 磷酸氢二钠 1.45g,

[0121] 氯化钾 0.1g,

[0122] 硫柳汞 0.08g,

[0123] 去免疫球蛋白牛血清白蛋白 15g,

[0124] 加双蒸水至 500ml,调 pH7.2,高压灭菌即可。

[0125] 3.3、终止液

[0126] 20ml 硫酸

[0127] 加双蒸水至 184ml

[0128] 3.4 稀释液的配制

[0129] 氯化钠 4.0g,

[0130] 磷酸二氢钾 0.1g,

[0131] 磷酸氢二钠 1.45g,

[0132] 氯化钾 0.1g,

[0133] 硫柳汞 0.08g,

[0134] 加双蒸水至 500ml,调 PH7.2,高压灭菌即可。

[0135] 3.5 酶底物液的制备

[0136] A 液：

[0137] 磷酸氢二钠 14.60g

[0138] 以酸钠 9.33g

[0139] 0.75%过氧化氢尿素 20ml

[0140] 加双蒸水至 1000, 调 PH 值 5.0

[0141] B 液：

[0142] TMB 20mg

[0143] DMF 28ml

[0144] 双蒸水 60ml

[0145] 3.6、洗涤液的配制

[0146] 氯化钠 4.0g,

[0147] 磷酸二氢钾 0.1g

[0148] 磷酸氢二钠 1.45g

[0149] 氯化钾 0.1g

[0150] 硫柳汞 0.08g

[0151] 吐温 20 1.0ml

[0152] 加双蒸水至 1000ml,

[0153] 调 pH 值 7.2。

[0154] 表 2 试剂盒的组成：

[0155]

| | | | |
|--------|-----------|-------------|--------------|
| 酶标板 | 96 孔 | 酶标抗体 | 1 瓶 (5ml) |
| 底物 A 液 | 1 瓶 (5ml) | 标准品 | 5 支 (5ug/支) |
| 底物 B 液 | 1 瓶 (5ml) | 样品稀释液 (10x) | 1 瓶 (10ml) |
| 终止液 | 1 瓶 (5ml) | 洗涤液 (20x) | 1 瓶 (12.5ml) |

[0156] 试剂盒使用说明书一份。

[0157] 3.8、本发明试剂盒保存及有效期

[0158] 2-8℃、密闭、避光保存, 有效期 12 个月。

[0159] 3.9 操作方法：

[0160] 包被：用包被缓冲液将 hGTA 抗体稀释成 2 μg-8 μg/ml 工作浓度, 每孔加入工作浓度抗体 100 μL, 共包被 96 孔, 盖好酶标板, 置于 4℃ 冰箱中过夜；

[0161] 洗涤：弃去包被液, 用 PBS-T 洗涤液满孔洗涤 3 次, 每次 3 分钟, 最后一次扣干；

[0162] 封闭：用封闭液加满各反应孔, 去除加样时产生的贴壁气泡, 盖好酶标板, 于 37℃ 水浴箱中孵育 30 分钟。

[0163] 洗涤：弃去包被液, 用 PBS-T 洗涤液满孔洗涤 3 次, 每次 3 分钟, 最后一次拍干。

[0164] 于 37℃ 干燥 20 分钟, 然后真空包装于铝箔袋中保存备用。

[0165] 灌装：

[0166] (1) 灌装浓缩洗涤液

[0167] 调整分装器灌装量至 12.5ml, 将分装器管道中的水放掉, 使除菌过滤后洗涤液通过自动灌装机将洗涤液灌装于 15ml 白色的塑料瓶中, 随灌装进行及时旋上瓶塞。

[0168] (2) 灌装浓缩样品稀释液

[0169] 调整分装器灌装量至 10.0ml, 将分装器管道中的水放掉, 使除菌过滤后样品稀释液通过自动灌装机将样品稀释液灌装于 15ml 白色的塑料瓶中, 随灌装进行及时旋上瓶塞。

[0170] (3) 灌装酶标抗体工作液

[0171] 调整分装器灌装量至 5.0ml, 将分装器管道中的水放掉, 使除菌过滤后酶标抗体工作液通过自动灌装机将酶标抗体工作液灌装于 8.0ml 白色塑料瓶中, 随灌装进行及时旋上瓶塞。

[0172] (4) 灌装底物 A 液

[0173] 调整分装器灌装量至 5.0ml, 将分装器管道中的水放掉, 使除菌过滤后底物 A 液通过自动灌装机将底物 A 液灌装于 8.0ml 白色塑料瓶中, 随灌装进行及时旋上瓶塞。

[0174] (5) 灌装底物 B 液

[0175] 调整分装器灌装量至 5.0ml, 将分装器管道中的水放掉, 使除菌过滤后底物 A 液通过自动灌装机将底物 A 液灌装于 8.0ml 黑色塑料瓶中, 随灌装进行及时旋上瓶塞。

[0176] (6) 灌装终止液

[0177] 调整分装器灌装量至 5.0ml, 将分装器管道中的水放掉, 通过自动灌装机将终止液灌装于 8.0ml 白色塑料瓶中, 随灌装进行及时旋上瓶塞。

[0178] (7) 包装

[0179] 将每支塑料瓶插入泡沫垫各个孔中, 将泡沫垫装入中纸盒中, 在上面放上经真空包装的酶标板, 然后放上两张不干胶片, 放入一张说明书即得。

[0180] 实施例 5 本发明试剂盒的使用方法

[0181] 一、样品的采集和试剂的准备

[0182] 1) 待检样品的采集

[0183] 取病人静脉血, 离心分离得血清备用

[0184] 2)、试剂准备

[0185] 1) 将 10× 稀释液用前置于 37°C 水浴 15 分钟, 然后用蒸馏水做 10 倍稀释;

[0186] 2) 将 20× 洗涤液用前置于 37°C 水浴 15 分钟, 然后用蒸馏水做 20 倍稀释;

[0187] 3) 将 0.2ug 标准品用 500u1 稀释液准确复溶 (0.2ug/ml)。取出 200u1 用稀释液作五次倍比稀释, 得浓度: 200ng/ml、100ng/ml、50ng/ml、25ng/ml、12.5ng/ml 六个标准点。

[0188] 二、操作步骤

[0189] 1、加样: 将酶标孔每孔加入标准品 100u1, 每个浓度加一个孔, 绘制回归曲线; 加入待测血清样本 100u1, 每个样本加复孔; 阴性对照血清加两个复孔, 轻轻振荡混匀, 37°C 水浴 40 分钟;

[0190] 2、洗涤: 弃去反应孔内液体, 用洗涤液注满各孔, 静置 3 分钟, 甩干, 反复 3 次后拍干;

[0191] 3、加酶标抗体: 每孔加入酶标抗体 100u1, 轻轻振荡混匀, 37°C 水浴 40 分钟;

[0192] 4、洗涤: 弃去反应孔内液体, 用洗涤液注满各孔, 静置 3 分钟, 甩干, 反复 3 次后拍干;

[0193] 5、显色: 临用前把底物 A、B 溶液按体积比 1:1 混合均匀。每孔加底物液 100u1, 37°C 水浴 15 分钟;

[0194] 6、终止比色：每孔加入 50 μ l 终止液，轻轻混匀 30 秒，在酶标仪 450nm 处，以底物空白孔调零，测各孔的吸光值。

[0195] 三、数据处理

[0196] 以 hGTA 标准品浓度 (ng/ml) 的常用对数为横坐标，吸光值为纵坐标作图，待测标本含量 (ng/ml) 可从标准曲线上算出，然后乘以稀释倍数即可。

[0197] 四、评定标准

[0198] 1) 阴性： <5.0ng/ml。

[0199] 2) 阳性： >10.0ng/ml。

[0200] 3) 临界值：5-10ng/ml，若检测结果为临界值，应进行重复实验，若仍为临界值判为阴性，重复实验以后者结果为准。

[0201] 试验例 1 本发明试剂盒临床应用观察试验

[0202] 于 2005 年 1 月 10 日到 2005 年 8 月 10 日在哈尔滨医科大学附属第一医院进行临床考核 80 例，其中阴性病人 30 例，阳性病人 50 例，以影像检测法为进标准，将考核人群分为四个组：正常，I 期乳腺癌，II 期乳腺癌，III 期乳腺癌，临床考核结果见表 3：

[0203] 表 3 本发明试剂盒临床应用观察结果

[0204]

| 序号 | 门诊号 | 临床编号 | 性别 | 年龄 | 影像法 诊断结果 | 本发明酶法诊断 MAU 值 (ug/ml) | 本发明酶法诊 断结果 |
|----|---------|----------|----|----|-------------|--------------------------|---------------|
| 1 | 6253387 | HY-F0001 | 女 | 31 | II 期乳腺癌 | 125.63 | II 期乳腺癌 |
| 2 | 8919624 | HY-F0002 | 女 | 27 | II 期乳腺癌 | 136.90 | II 期乳腺癌 |
| 3 | 8968437 | HY-F0003 | 女 | 64 | 正常 | 3.26 | 正常 |
| 4 | 8968438 | HY-F0004 | 女 | 51 | I 期乳腺癌 | 15.63 | I 期乳腺癌 |
| 5 | 8964790 | HY-F0005 | 女 | 40 | III 期乳腺癌 | 256.02 | III 期乳腺癌 |
| 6 | 8959657 | HY-F0006 | 女 | 39 | III 期乳腺癌 | 357.21 | III 期乳腺癌 |
| 7 | 9130268 | HY-F0007 | 女 | 34 | II 期乳腺癌 | 169.58 | II 期乳腺癌 |
| 8 | 8953956 | HY-F0008 | 女 | 26 | II 期乳腺癌 | 112.33 | II 期乳腺癌 |
| 9 | 8953945 | HY-F0009 | 女 | 35 | 正常 | 8.76 | 可疑 |
| 10 | 5492908 | HY-F0010 | 女 | 39 | 正常 | 1.06 | 正常 |
| 11 | 9116801 | HY-F0011 | 女 | 63 | 正常 | 2.79 | 正常 |
| 12 | 9111649 | HY-F0012 | 女 | 44 | I 期乳腺癌 | 15.33 | I 期乳腺癌 |
| 13 | 5492916 | HY-F0013 | 女 | 37 | I 期乳腺癌 | 25.96 | I 期乳腺癌 |
| 14 | 5492966 | HY-F0014 | 女 | 36 | I 期乳腺癌 | 38.59 | I 期乳腺癌 |
| 15 | 9126259 | HY-F0015 | 女 | 41 | II 期乳腺癌 | 131.85 | II 期乳腺癌 |
| 16 | 9126275 | HY-F0016 | 女 | 50 | II 期乳腺癌 | 165.42 | II 期乳腺癌 |
| 17 | 9126290 | HY-F0017 | 女 | 34 | II 期乳腺癌 | 187.96 | II 期乳腺癌 |
| 18 | 6085085 | HY-F0018 | 女 | 36 | II 期乳腺癌 | 147.56 | II 期乳腺癌 |
| 19 | 6085096 | HY-F0019 | 女 | 29 | III 期乳腺癌 | 354.21 | III 期乳腺癌 |
| 20 | 8959177 | HY-F0020 | 女 | 31 | III 期乳腺癌 | 361.25 | III 期乳腺癌 |
| 21 | 8959196 | HY-F0021 | 女 | 40 | 正常 | 1.55 | 正常 |
| 22 | 8987713 | HY-F0022 | 女 | 53 | 正常 | 2.02 | 正常 |
| 23 | 8981871 | HY-F0023 | 女 | 28 | 正常 | 1.00 | 正常 |
| 24 | 8774108 | HY-F0024 | 女 | 35 | III 期乳腺癌 | 211.47 | III 期乳腺癌 |

[0205]

| | | | | | | | |
|----|---------|----------|---|----|---------|--------|---------|
| 25 | 8987416 | HY-F0025 | 女 | 31 | III期乳腺癌 | 325.45 | III期乳腺癌 |
| 26 | 8971731 | HY-F0026 | 女 | 29 | 正常 | 5.66 | 可疑 |
| 27 | 8774117 | HY-F0027 | 女 | 36 | 正常 | 3.25 | 正常 |
| 28 | 9127134 | HY-F0028 | 女 | 35 | 正常 | 4.77 | 正常 |
| 29 | 6080780 | HY-F0029 | 女 | 34 | 正常 | 2.36 | 正常 |
| 30 | 8972096 | HY-F0030 | 女 | 37 | 正常 | 3.64 | 正常 |
| 31 | 6086117 | HY-F0031 | 女 | 29 | II期乳腺癌 | 156.25 | II期乳腺癌 |
| 32 | 6081324 | HY-F0032 | 女 | 34 | II期乳腺癌 | 153.25 | II期乳腺癌 |
| 33 | 9112722 | HY-F0033 | 女 | 26 | I期乳腺癌 | 50.24 | I期乳腺癌 |
| 34 | 9118471 | HY-F0034 | 女 | 51 | I期乳腺癌 | 52.23 | I期乳腺癌 |
| 35 | 9097809 | HY-F0035 | 女 | 45 | I期乳腺癌 | 62.58 | I期乳腺癌 |
| 36 | 8972714 | HY-F0036 | 女 | 43 | III期乳腺癌 | 358.58 | III期乳腺癌 |
| 37 | 8972709 | HY-F0037 | 女 | 38 | III期乳腺癌 | 400.12 | III期乳腺癌 |
| 38 | 8774446 | HY-F0038 | 女 | 37 | I期乳腺癌 | 10.02 | I期乳腺癌 |
| 39 | 9112902 | HY-F0039 | 女 | 60 | III期乳腺癌 | 325.25 | III期乳腺癌 |
| 40 | 6096420 | HY-F0040 | 女 | 29 | III期乳腺癌 | 365.14 | III期乳腺癌 |
| 41 | 9107493 | HY-F0041 | 女 | 34 | III期乳腺癌 | 452.58 | III期乳腺癌 |
| 42 | 6087081 | HY-F0042 | 女 | 39 | I期乳腺癌 | 25.65 | I期乳腺癌 |
| 43 | 9113265 | HY-F0043 | 女 | 41 | 正常 | 8.58 | 可疑 |
| 44 | 9107693 | HY-F0044 | 女 | 31 | 正常 | 4.65 | 正常 |
| 45 | 6082080 | HY-F0045 | 女 | 36 | 正常 | 3.25 | 正常 |
| 46 | 9136565 | HY-F0046 | 女 | 49 | I期乳腺癌 | 25.56 | I期乳腺癌 |
| 47 | 8774622 | HY-F0047 | 女 | 37 | I期乳腺癌 | 36.58 | I期乳腺癌 |
| 48 | 9098845 | HY-F0048 | 女 | 28 | I期乳腺癌 | 41.25 | I期乳腺癌 |
| 49 | 9132698 | HY-F0049 | 女 | 36 | I期乳腺癌 | 74.25 | I期乳腺癌 |
| 50 | 8774634 | HY-F0050 | 女 | 27 | II期乳腺癌 | 198.25 | II期乳腺癌 |
| 51 | 9099300 | HY-F0051 | 女 | 29 | II期乳腺癌 | 154.14 | II期乳腺癌 |
| 52 | 9113801 | HY-F0052 | 女 | 37 | I期乳腺癌 | 26.69 | I期乳腺癌 |
| 53 | 9299290 | HY-F0053 | 女 | 29 | I期乳腺癌 | 45.56 | I期乳腺癌 |
| 54 | 8973652 | HY-F0054 | 女 | 35 | 正常 | 3.59 | 正常 |
| 55 | 6083569 | HY-F0055 | 女 | 49 | 正常 | 3.68 | 正常 |

[0206]

| | | | | | | | |
|----|---------|----------|---|----|--------|--------|--------|
| 56 | 9099495 | HY-F0056 | 女 | 36 | 正常 | 2.13 | 正常 |
| 57 | 9099531 | HY-F0057 | 女 | 28 | 正常 | 1.35 | 正常 |
| 58 | 9099504 | HY-F0058 | 女 | 51 | 正常 | 2.36 | 正常 |
| 59 | 6084160 | HY-F0059 | 女 | 37 | 正常 | 3.45 | 正常 |
| 60 | 9119732 | HY-F0060 | 女 | 25 | II期乳腺癌 | 135.69 | II期乳腺癌 |
| 61 | 9119741 | HY-F0061 | 女 | 38 | II期乳腺癌 | 124.56 | II期乳腺癌 |
| 62 | 9119725 | HY-F0062 | 女 | 46 | 正常 | 7.25 | 可疑 |
| 63 | 6084712 | HY-F0063 | 女 | 49 | 正常 | 4.45 | 正常 |
| 64 | 9114358 | HY-F0064 | 女 | 37 | 正常 | 1.56 | 正常 |
| 65 | 5486915 | HY-F0065 | 女 | 32 | II期乳腺癌 | 135.78 | II期乳腺癌 |
| 66 | 6115740 | HY-F0066 | 女 | 26 | II期乳腺癌 | 142.48 | II期乳腺癌 |
| 67 | 6105255 | HY-F0067 | 女 | 36 | 正常 | 3.45 | 正常 |
| 68 | 6140205 | HY-F0068 | 女 | 29 | I期乳腺癌 | 23.47 | I期乳腺癌 |
| 69 | 5373805 | HY-F0069 | 女 | 34 | I期乳腺癌 | 23.58 | I期乳腺癌 |
| 70 | 9114576 | HY-F0070 | 女 | 39 | 正常 | 4.25 | 正常 |
| 71 | 6116085 | HY-F0071 | 女 | 26 | II期乳腺癌 | 26.45 | II期乳腺癌 |
| 72 | 6092254 | HY-F0072 | 女 | 34 | II期乳腺癌 | 30.25 | II期乳腺癌 |
| 73 | 9114947 | HY-F0073 | 女 | 46 | I期乳腺癌 | 44.59 | I期乳腺癌 |
| 74 | 9114970 | HY-F0074 | 女 | 37 | 正常 | 4.12 | 正常 |
| 75 | 9134052 | HY-F0075 | 女 | 31 | 正常 | 3.25 | 正常 |
| 76 | 8984117 | HY-F0076 | 女 | 36 | 正常 | 6.15 | 可疑 |
| 77 | 4414078 | HY-F0077 | 女 | 35 | 正常 | 6.48 | 可疑 |
| 78 | 9149490 | HY-F0078 | 女 | 35 | II期乳腺癌 | 164.58 | II期乳腺癌 |
| 79 | 9149805 | HY-F0079 | 女 | 42 | II期乳腺癌 | 125.48 | II期乳腺癌 |
| 80 | 6102275 | HY-F0080 | 女 | 37 | I期乳腺癌 | 66.47 | I期乳腺癌 |

[0207] 应用本发明实施例所制备的 hGTA 酶联定量检测试剂盒,对 50 例患有各期乳腺癌病人及对 30 例无乳腺癌疾患的健康人检测,结果显示在乳腺癌各期中 hGTA 阳性率为:I 期 78%,II 期 98%,III 期 100%。并且在对本法检测可疑的病人其中有 4 例最终进展为乳腺癌,说明本法诊断乳腺癌具有比影像检测更早的特点。

[0208] 试验结果表明,本发明 hGTA 酶联定量检测试剂盒对早期发现发现乳腺癌有极好的临床意义. 可适用于妇女早期乳腺癌的筛查检测。

[0209] 序列表

[0210] <110> 北京美康生物技术研究中心

[0211] <120> 人乳腺癌组织抗原及其编码基因、其制备方法和应用

| | | |
|--------|--|-------------------------|
| [0212] | <130>P088 | |
| [0213] | <160>2 | |
| [0214] | <170>PatentIn version3.3 | |
| [0215] | <210>1 | |
| [0216] | <211>1158 | |
| [0217] | <212>DNA | |
| [0218] | <213> 智人 (Homo sapiens) | |
| [0219] | <220> | |
| [0220] | <221>CDS | |
| [0221] | <222>(97).. (1059) | |
| [0222] | <400>1 | |
| [0223] | | |
| | gccaaagggtc caggctcctt gagctacaac ttccggactg cctactaacc gcaattggct | 60 |
| | caagttaacc gccttacctt cttaggctgc cctgaa ggc caa gca gcc aac ggc | 114 |
| | | Gly Gln Ala Ala Asn Gly |
| | | 1 5 |
| | cgc ggc gtg aac tgg ctg cgg gcc ctg tgc gag aac gct cag ctg ggc | 162 |
| | Arg Gly Val Asn Trp Leu Arg Ala Leu Cys Glu Asn Ala Gln Leu Gly | |
| | | 10 15 20 |
| | aga acc cgg gcc ttc gct gcc acc gct gct gac gtc aga agc ggg ccc | 210 |
| | Arg Thr Arg Ala Phe Ala Ala Thr Ala Ala Asp Val Arg Ser Gly Pro | |
| | | 25 30 35 |
| | atc atg ctg gcc gag aga tgc tca cag tgc ctg ggc tcc gac gcc tca | 258 |
| | Ile Met Leu Ala Glu Arg Cys Ser Gln Cys Leu Gly Ser Asp Ala Ser | |
| | | 40 45 50 |
| | ctg gag acg acc tgg ctg cac gag gct aag agc tgc aat acc gtc ggt | 306 |
| | Leu Glu Thr Thr Trp Leu His Glu Ala Lys Ser Cys Asn Thr Val Gly | |
| | | 55 60 65 70 |
| | aga aac cca cac gaa acc agg cct gga gct ctg gga cac ctc gcc ggc | 354 |
| | Arg Asn Pro His Glu Thr Arg Pro Gly Ala Leu Gly His Leu Ala Gly | |
| | | 75 80 85 |
| | atc ttt gac agc tcc gac ggc cgg agc cgg atc ctg gcc aac gag gcc | 402 |
| | Ile Phe Asp Ser Ser Asp Gly Arg Ser Arg Ile Leu Ala Asn Glu Ala | |
| | | 90 95 100 |
| | ccg aag gag ctg ctg act ggc aat acc gtg ccc gtc gat agc gct gtc | 450 |
| | Pro Lys Glu Leu Leu Thr Gly Asn Thr Val Pro Val Asp Ser Ala Val | |
| | | 105 110 115 |
| | atg agt agg ctt tac tcc cga att acc ctg tac ttc ctc tgt tca aag | 498 |
| | Met Ser Arg Leu Tyr Ser Arg Ile Thr Leu Tyr Phe Leu Cys Ser Lys | |
| | | 120 125 130 |
| | ttc gcc ggg agg ttc aag gtc tgc tat tgc ctg cag tac agc ctc ttt | 546 |
| | Phe Ala Gly Arg Phe Lys Val Ser Tyr Cys Leu Gln Tyr Ser Leu Phe | |
| | | 135 140 145 150 |
| | gcc ctc ccc cag ctg tgc ccc tgc cag gac ccc ctg gac gcc tat gca | 594 |
| | Ala Leu Pro Gln Leu Cys Pro Ser Gln Asp Pro Leu Asp Ala Tyr Ala | |
| | | 155 160 165 |
| | gtg gcc aca gcc ggg ctg ctg aag ctc cag ttc gcc tgg ggg ttc gcc | 642 |
| | Val Ala Thr Ala Gly Leu Leu Lys Leu Gln Phe Ala Trp Gly Phe Ala | |
| | | 170 175 180 |
| | ttg gcc tgg ccc agt ccc aca aac gag tgg gac ctg caa ctg ccc agg | 690 |
| | Leu Ala Trp Pro Ser Pro Thr Asn Glu Trp Asp Leu Gln Leu Pro Arg | |

Gly Gln Ala Ala Asn Gly Arg Gly Val Asn Trp Leu Arg Ala Leu Cys
 1 5 10 15

Glu Asn Ala Gln Leu Gly Arg Thr Arg Ala Phe Ala Ala Thr Ala Ala
 20 25 30

Asp Val Arg Ser Gly Pro Ile Met Leu Ala Glu Arg Cys Ser Gln Cys
 35 40 45

Leu Gly Ser Asp Ala Ser Leu Glu Thr Thr Trp Leu His Glu Ala Lys
 50 55 60

Ser Cys Asn Thr Val Gly Arg Asn Pro His Glu Thr Arg Pro Gly Ala
 65 70 75 80

Leu Gly His Leu Ala Gly Ile Phe Asp Ser Ser Asp Gly Arg Ser Arg
 85 90 95

Ile Leu Ala Asn Glu Ala Pro Lys Glu Leu Leu Thr Gly Asn Thr Val
 100 105 110

Pro Val Asp Ser Ala Val Met Ser Arg Leu Tyr Ser Arg Ile Thr Leu

[0231]

| 115 | 120 | 125 |
|---|---|-----|
| Tyr Phe Leu Cys Ser Lys | Phe Ala Gly Arg Phe Lys Val Ser Tyr Cys | |
| 130 | 135 | 140 |
| Leu Gln Tyr Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Leu Cys Pro Ser Gln Asp | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Pro Leu Asp Ala Tyr Ala Val Ala Thr Ala Gly Leu Leu Lys Leu Gln | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Phe Ala Trp Gly Phe Ala Leu Ala Trp Pro Ser Pro Thr Asn Glu Trp | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Asp Leu Gln Leu Pro Arg Val Pro Ser Gln Leu Asp Arg Gly Trp Thr | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Val Ala Leu Leu Ala Leu Glu Thr Pro Phe Arg Ile Glu Glu His Ala | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Glu His Leu Lys Met Met Leu Glu Leu Phe Ser Leu Gln Leu Pro Phe | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Trp Ser His Glu Phe Gln Lys Leu Gln Ala Leu Tyr Glu Phe Thr Val | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Phe Gln Leu Leu Ala Arg Tyr Lys Thr Pro Ser Thr Tyr Ile Arg Pro | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Lys Tyr Thr Asp Thr Asp Ser Phe Ala Ser Trp Lys Gln Ala Ser Trp | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Val Lys Tyr Ser Asp Val Leu Tyr Ser Gly Leu Lys Asp Arg Pro Gln | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Pro Thr Gln Ser Lys Arg Val Ser Trp Leu Val Tyr Leu Pro Thr Ile | | |
| 305 | 310 | 315 |
| 320 | | |
| Gln | | |

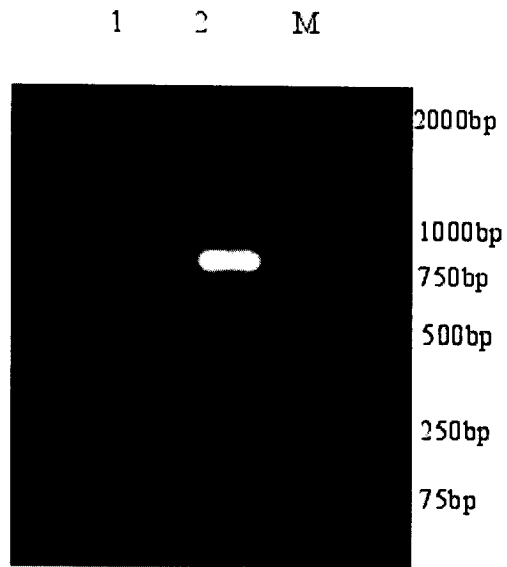


图 1

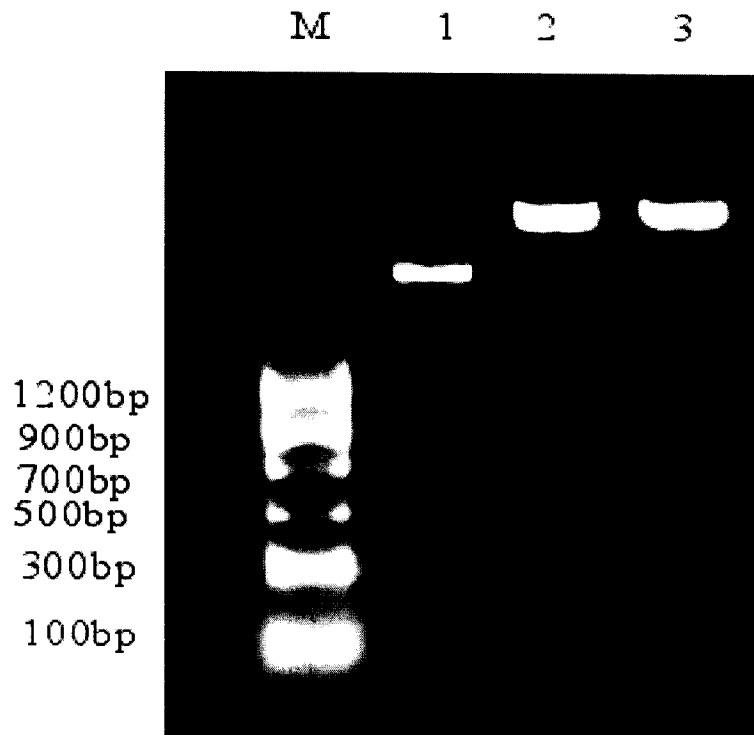


图 2

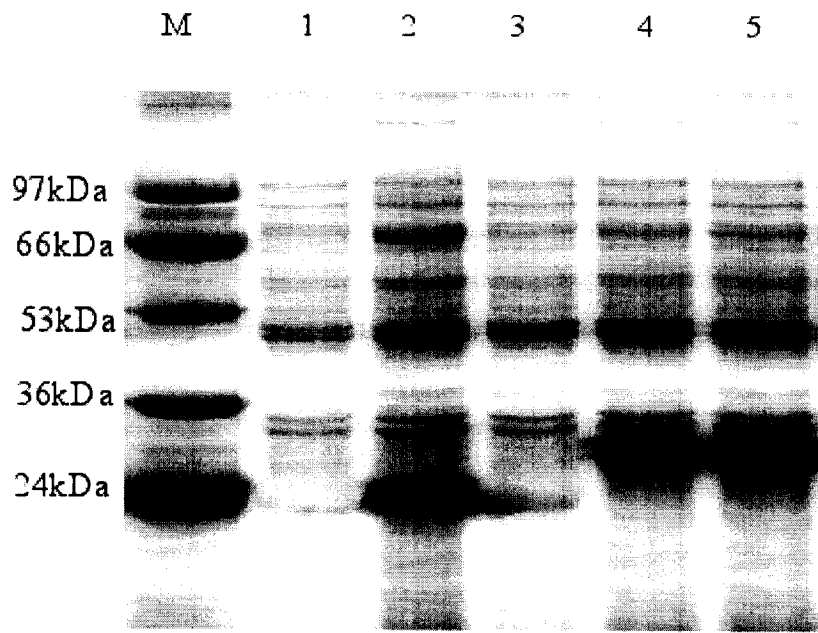


图 3

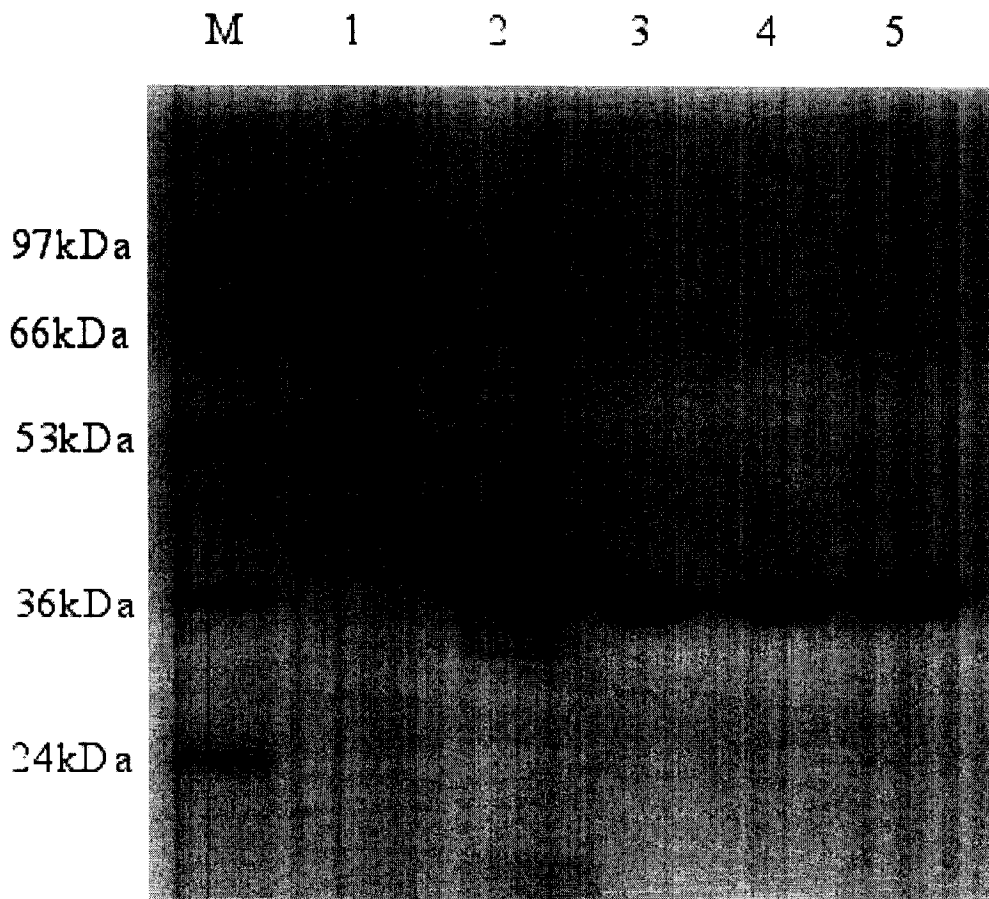


图 4

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 人乳腺癌组织抗原及其编码基因、其制备方法和应用 | | |
| 公开(公告)号 | CN101260153B | 公开(公告)日 | 2010-11-03 |
| 申请号 | CN200710064199.4 | 申请日 | 2007-03-06 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 北京美康生物技术研究中心 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 北京美康生物技术研究中心 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 北京美康基因科学股份有限公司 | | |
| [标]发明人 | 金鑫 王文雅 戴路 杜军 | | |
| 发明人 | 金鑫 王文雅 戴路 杜军 | | |
| IPC分类号 | C07K14/47 C12N15/12 C12N15/63 C12N1/21 G01N33/536 G01N33/68 A61P35/00 | | |
| 代理人(译) | 孙皓晨 | | |
| 审查员(译) | 唐慧 | | |
| 其他公开文献 | CN101260153A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种用于乳腺癌早期诊断的癌抗原(Human Galactophore tissueantigen, hGTA)及其编码基因,含有该编码基因的重组质粒和含有该重组质粒的宿主细胞。本发明还公开了该重组抗原的制备和纯化方法以及该重组抗原在乳腺癌早期诊断中的应用。hGTA是一种只在乳腺组织表达,在原发性乳腺癌及乳腺癌细胞系中表达显著增加的蛋白,其cDNA编码大约36kD的分泌性糖蛋白。hGTA乳腺组织特异性和分泌性蛋白的特点,使其在乳腺癌临床早期诊断上具有潜在的应用价值,其肿瘤相关抗原的特性,使其可作为肿瘤疫苗设计的靶点应用于乳腺癌免疫治疗。

