



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103789280 A

(43) 申请公布日 2014.05.14

(21) 申请号 201410083065.7

(22) 申请日 2014.03.07

(71) 申请人 深圳北京大学香港科技大学医学中心

地址 518036 广东省深圳市福田区莲花路
1120 号北大医院科研教学楼

(72) 发明人 魏准 杨旸 董小林 张伟

(51) Int. Cl.

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表1页 附图3页

(54) 发明名称

肿瘤特异性抗原人天冬氨酸 β 羟化酶 (HAAH) 羧基末端蛋白制备工艺及其在癌症诊断中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种人类肿瘤早期诊断方法。该方法是通过天冬氨酸 β 羟化酶 (HAAH) 抗体和人体细胞或体液中的天冬氨酸 β 羟化酶结合的抗原抗体反应来诊断早期癌症。本发明亦包括产生 HAAH 羧基末端重组蛋白和制备 HAAH 特异性单克隆抗体的方法。

1. 一种制备人天冬氨酸 β 羟化酶(HAAH)羧基末端蛋白的工艺,其特征在于,它通过克隆人HAAH蛋白对应的编码核酸序列,利用特定的蛋白表达系统,大量的表达HAAH蛋白羧基末端559-758蛋白片段,并采用相关的技术手段予以纯化。

2. 以上所述蛋白表达系统包括大肠杆菌蛋白表达系统。

3. 以上所述蛋白表达系统包括酵母蛋白表达系统。

4. 以上所述蛋白表达系统包括昆虫细胞蛋白表达系统。

5. 一种诊断人体内肿瘤的方法,其特征在于,它通过具有可检查标记的HAAH抗体,特异性的和人体内组织或体液的HAAH蛋白结合,同正常的组织或体液向比较,其增加的结合水平的组织或体液表示有肿瘤存在。

6. 人天冬氨酸 β 羟化酶(HAAH)羧基末端(559-758)重组蛋白可以作为用于检测血液中天冬氨酸 β 羟化酶自身抗体水平的捕获抗原。

7. 人天冬氨酸 β 羟化酶(HAAH)羧基末端(559-758)重组蛋白可以作为用于定量检测血液中天冬氨酸 β 羟化酶蛋白水平的免疫检测试剂盒中的标准品。

肿瘤特异性抗原人天冬氨酸 β 羟化酶(HAAH)羧基末端蛋白制备工艺及其在癌症诊断中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学领域,具体涉及人天冬氨酸 β 羟化酶(HAAH)羧基末端(562-758)蛋白和单克隆抗体的制备以及通过抗体结合哺乳动物组织或体液中 HAAH 蛋白来早期诊断癌症的方法。

背景技术

[0002] 癌症在我国已经成为城市人口的第一大死因,农村人口的第二大死因。自上世纪 70 年代以来,我国癌症死亡率一直呈持续增长趋势,70 年代、90 年代和 21 世纪初每年死于癌症的人数分别为 70 万、117 万和 150 万。目前,每四到五个死亡的中国人中就有一人死于癌症。由此可见,中国瘤防治的任务是非常艰巨。

[0003] 与之相对应的是我国的癌症患者的五年生存率仅为 13%,造成如此之低的生存率,主要是由于过迟的诊断和发现。以通用电气公布的乳腺癌 5 年生存率为例,1 期乳腺癌的 5 年生存率高达 95% 以上,而 4 期乳腺癌的 5 年生存率仅为 16%。因此,癌症的早期诊断意义重大。

[0004] 如今,一个明确的癌症诊断还是要依靠探查手术来完成,但是各种形式的癌症早期诊断方式已经被纳入应用,尤其是通过能够特异性识别并结合癌症细胞表面抗原的抗体来诊断和治疗恶性肿瘤的方法。例如某些黑色素瘤,生殖道恶性肿瘤等,均已发现了一些肿瘤特异性细胞表面抗原。而我们则希望能找到一个更加广泛的癌症早期诊断和治疗性靶蛋白。

[0005] 人天冬氨酸 β 羟化酶(HAAH)是一种正常定位在内质网的蛋白,但当细胞发生癌变时,HAAH 将会转移至细胞质膜表面,并出现在病人的血液中。现已发现多种癌症,如肺癌,肝癌,直肠癌,乳腺癌,胰腺癌,前列腺癌等癌症均发生了 HAAH 蛋白的过量表达。鉴于 HAAH 蛋白在肿瘤细胞中的特异性高表达以及其表达定位的特异性改变,我们考虑将其作为癌症早期诊断试剂盒的检测目标。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种简单快捷的非手术癌症检测手段,使得高效、准确的癌症早期诊断成为可能,同时亦能够在组织层面上检测癌变情况。

[0007] 本发明上述目的通过以下技术方案予以实现:

首先,用 PCR 将 HAAH 蛋白羧基末端的区域(562-758)(如 SEQ ID NO. 1 所示)所对应的基因序列扩增,再通过基因工程的手段由大肠杆菌表达 HAAH 蛋白羧基末端的区域(562-758)(如 SEQ ID NO. 2 所示)。用纯化到的重组 HAAH 蛋白片段(562-758)免疫 BALB/c 小鼠,产生抗体,并用杂交瘤技术制成单抗。通过 ELISA 抗原夹心法,使样品血清中的抗原,与我们的单抗形成抗体-抗原-抗体-酶的复合物,而后酶与底物反应显示后测出吸光度,由标准曲线计算出样本血清中的 HAAH 抗原浓度,由于癌症患者血清中 HAAH 蛋白量远高于正常人,故

而可以判断其是否为癌症患者。亦可通过免疫组化,将所产抗体作为一抗,检测组织癌变情况。

[0008] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

本发明将癌症的检测大幅简化,仅仅通过血清即可检查癌症,大幅减轻了患者的检测痛苦,降低了癌症检测的成本,使癌症检测的日常化成为了可能。另外,此项发明的检测对象覆盖了大多数种类癌症,使之可能成为健康体检筛查的重要标志物。

附图说明

[0009] 图 1 为天冬氨酸 β 羟化酶(HAAH)羧基末端 559-758 蛋白表达纯化后再 SDS-PAGE 上考马斯亮蓝染色结果;

图 2 为使用天冬氨酸 β 羟化酶(HAAH)羧基末端 559-758 蛋白作为标准品做出的标准曲线,其中所获得的标准品和样品的发光值的平均值除以第一个标准(0 标准)的发光值作为纵坐标,HAAH 蛋白浓度作为横坐标作标准曲线;

图 3 为 20 例肺癌患者和 20 例正常人血清中天冬氨酸 β 羟化酶(HAAH)检测结果;

图 4 为 20 例肝癌患者和 20 例正常人血清中天冬氨酸 β 羟化酶(HAAH)检测结果;

图 5 为 20 例结肠癌患者和 20 例正常人血清中天冬氨酸 β 羟化酶(HAAH)检测结果;

图 6 为 20 例乳腺癌患者和 20 例正常人血清中天冬氨酸 β 羟化酶(HAAH)检测结果;

图 7 为使用本专利所产单克隆抗体作为一抗,进行免疫组化的实验结果;

图 8 为使用本专利所产单克隆抗体作为一抗,进行免疫印记的实验结果,其中从左往右分别为正常组织,乳腺癌组织,肺癌组织,结肠癌组织。

具体实施方式

[0010] 以下结合实施例来进一步解释本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。

[0011] (1) HAAH 抗原的制备

通过 PCR (Polymerase Chain Reaction) 方法扩增得到人天冬氨酸 β 羟化酶(HAAH)羧基末端 559-758 的编码区 DNA 序列,将 PCR 产物纯化,并用 DNA 限制性内切酶 BamHI 和 EcoRI 消化,酶切产物经纯化,克隆到原核表达载体 pETM3C (该载体改造自 Novagen pET 系列质粒)当中。经 PCR 验证的阳性克隆送交测序,将测序正确的质粒经 CaCl_2 法转化表达菌株大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3)。

[0012] 从 LB 氨苄青霉素抗性平板上挑取单克隆菌落接种到 10ml LB 培养基中,37° C 过夜培养。将过夜培养菌液接种于 1L 培养基中 37° C 培养至 OD_{600} 0.6-0.8,以浓度为 0.2mM 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside, IPTG) 低温诱导蛋白表达 16 到 20 小时。离心收获细菌,弃掉上清,菌体保存于 -80° C 待用。

[0013] 将菌体悬浮于 30ml QLB 裂解液(50 mM 磷酸钠, 300 mM 氯化钠, 10 mM 咪唑 pH 8.0),超声破碎细胞,18000 转离心 30 分钟,取上清。将上清用 0.2 μ m 滤膜过滤后与预先平衡的 Ni-NTA (Qiagen) 树脂于冻室(4° C)内孵育 1 小时。将未能与树脂结合的部分放出,用 QLB 溶液洗一次,最后用 QLB 洗脱液(50 mM 磷酸钠, 300 mM 氯化钠, 250 mM 咪唑 pH 8.0)将重组蛋白从树脂上面洗脱下来。用 1mg 凝血酶于 4° C 过夜消化洗脱得到的重

组 HAAH 559-758 蛋白,以除去融合于羧基末端的 6xHis 标签。所得产物为 N 末端含有 4 个额外氨基酸(Gly-Pro-Gly-Ser)的重组 HAAH 559-758 蛋白粗产物。

[0014] 将蛋白粗产物用离心浓缩管(Amicon Ultra, Millipore)将体积浓缩至 5ml,用阳离子交换树脂预装柱 MonoS HR5/5 column(GE healthcare),进一步纯化。MonoS 柱由 AKTA Q920 (GE healthcare)快速蛋白液相色谱系统驱动。将 MonoS 柱纯化出的产物经凝胶过滤层析柱 Superdex75 10/300GL(GE healthcare)进一步纯化,即得到用于抗体制备以及作为检测自身抗体的捕获抗原与免疫检测试剂盒中的标准品的 HAAH 重组蛋白。重组蛋白的正确性经过质谱验证其正确性,蛋白保存所用缓冲液为 50 mM 磷酸钠, 50 mM 氯化钠, 5% 甘油, 1mM EDTA pH 7.0 (如图 1 所示,从左到右分别为蛋白 marker 和纯化后的蛋白)。

[0015] (2) 单克隆抗体的制备

a. 常规免疫

采用鼠龄在 8-12 周的 BALB/c 小鼠作为免疫动物,采用腹腔注射的方式进行免疫,免疫分为首次免疫和加强免疫,最终加强;

首次免疫:剂量:抗原 100 μ g+ 弗氏完全佐剂(1 : 1) 0.5ml/ 鼠;

加强免疫:剂量:抗原 50 μ g+ 弗氏不完全佐剂(1 : 1) 0.5ml/ 鼠;

最终加强:剂量:抗原 50 μ g 0.5ml/ 鼠;

每次免疫之间间隔 3 周,总共免疫 5 次,每次免疫 7 天后采血,并进行 ELISA 血清效价检测,效价不足则继续加强,效价足够则进入最终免疫。最终加强 4 天后,处死动物取脾脏细胞。

[0016] b. ELISA 测定抗血清效价(血清滴度)

1. 包被:将抗原用碳酸盐缓冲液稀释至 0.1-10 μ g/mL,加入样品孔中,每孔 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 过夜或 37 $^{\circ}$ C 2 小时;

2. 洗涤:倒去样品,用 PBST 冲洗样品孔 3 次,蒸馏水冲洗一次,拍干;

3. 封闭:每孔加入 BSA-PBS 300 μ L,室温封闭 1 小时;

4. 一抗(抗血清)结合:各样品孔加入封闭液梯度稀释的抗血清 100 μ L,室温孵育 1 小时;

5. 洗涤:如步骤 2;

6. 二抗(酶标抗体)结合:每孔加入用封闭液稀释的抗小鼠辣根过氧化物酶标记的二抗,每孔 50 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时;

7. 洗涤:如步骤 2;

8. 显色:每孔加入显色液 75 μ L,37 $^{\circ}$ C 显色 15 分钟,终止反应,20min 内测定 OD 值。

[0017] (3) 细胞融合

a. 骨髓瘤细胞(SP2/0)准备

1. 融合前 2-3 天,传代一次。融合前 8 小时换液一次;

2. 骨髓瘤细胞(约 250cm 即 3 x 75cm VS 1 个小鼠脾脏)1500rpm 5 分钟,去上清;

3. 用无血清培养基重悬,1500rpm 5min 离心,去上清,如上洗骨髓瘤细胞共三次。定容 10ml 计数,并计算细胞活力,总数应 > 1x10⁷,活力应 > 95%。

[0018] b. 小鼠脾细胞准备

1. 引颈处死小鼠,75%酒精浸泡 10 分钟,消毒体表以及皮毛;

2. 切开腹部皮肤,暴露腹腔;
3. 剪开腹部腹膜,暴露内部组织,取出脾脏;
4. 分离出脾细胞,把脾细胞移入离心管,室温静置 5 分钟;
5. 以 1500rpm 转速,离心 5 分钟去上清液;
6. 用无血清培养基(或 D-Hank's 液)重悬洗 3 次;
7. 计数,活力测定:总数应 $1 \sim 2 \times 10^8$,活力应 $> 95\%$ 。

[0019] c. 收集饲养细胞(可在融合前一天制备,或制备好置于 CO_2 温箱 2-4 小时,常用小鼠腹腔细胞-巨噬细胞,胸腺细胞或细胞培养上清液)

1. 引颈处死小鼠(不能损伤胸腹部血管),75%酒精浸泡,消毒体表;
2. 切开腹部皮肤,向两侧剥离,暴露腹腔;
3. 在小鼠的腹膜上面剪一个小口,用一个弯嘴镊子夹起腹膜;
4. 用无菌塑料吸管吸取 2-5ml 的培养基,注射入小鼠腹腔;
5. 按摩腹壁,反复抽吸,收集细胞(抽出液变为淡黄色)。重复 3-5 次;
6. 按照细胞的浓度以及接种的培养板的数目,定容培养基;
7. $50\mu\text{l}$ /孔接种培养板, 37°C 培养箱培养一天左右,观察以备用。

[0020] d. 细胞融合(所有试剂以及培养基置于 37°C 水浴):

1. SP2/0 细胞与脾细胞 1:5 混合,以 1500rpm 转速离心 10 分钟,去上清液;
2. 用无血清的培养基重悬、洗涤混合细胞 2 次;
3. 尽量吸去上清,弹动离心管底部,使细胞成糊状;
4. 取 1ml PEG / DMSO 融合剂一滴滴沿着管壁加入细胞团中,60 秒内加完,同时不断轻轻转动离心管或用手指轻弹,静置 90 秒;
5. 滴加无血清 DMDM 培养基 2ml,终止 PEG 作用,3 分钟内加完;
6. 滴加 7ml DMDM 完全培养基,3 分钟内加完;
7. 轻轻吹打细胞,混匀,以 1000rpm 转速离心 10 分钟,去上清液。用 HAT 完全培养液重悬细胞,调整细胞浓度;
8. 根据实验要求补加 HAT 培养基,然后 $100\mu\text{l}$ /孔加到细胞培养板中,一个脾脏铺 10 块板,置于 5% CO_2 温箱内 37°C 培养;
9. 第五天更换 HAT 培养基,同时每天观察克隆的生长情况,记录克隆的状态;
10. 克隆长成后,据情况再做处理。

[0021] e. 筛选阳性克隆

1. 融合之后,待到细胞克隆长到一定的程度,在培养板上标记相应的克隆状态;
2. 先在酶标板上包被 0.1-10 μg 左右的抗原,封闭;
3. 从克隆孔中吸出 50-100 μl 细胞培养上清,直接加到酶标板中,和已经包被在酶标板上的抗原结合,以下步骤同 ELISA;
4. 根据实验的结果,挑选 OD 值较高的克隆,转入 24 孔板;
5. 用 ELISA 反复的检测克隆,直至稳定。

[0022] (4) ELISA 方法鉴定抗体

- a. 将特异性抗体包被固相载体。孵育一定时间,使形成固相抗体,洗涤除去未结合的抗体和杂质;

b. 加待检标本, 孵育, 使标本中的抗原与固相载体上的抗体充分反应, 形成固相抗原抗体复合物。洗涤除去其他未结合物质;

c. 加酶标特异性抗体, 孵育, 使形成固相抗体待测抗原酶标抗体夹心复合物。洗涤除去未结合酶标抗体;

d. 加底物显色。固相上的酶催化底物产生有色产物, 通过比色测标本中抗原的量。

[0023] (5) ELISA 结果判断

所获得的标准品和样品的发光值的平均值除以第一个标准(0 标准)的发光值作为纵坐标, HAAH 蛋白浓度作为横坐标作标准曲线, 每个样品的浓度都可以从标准曲线上读出;

标准曲线如下, 取浓度为 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8, 25.6ng/ml 的 HAAH 标准品得标准曲线如图 2 所示;

小量肺癌样本检测结果如图 3 所示, 敏感性和特异性均为 95%; 小量肝癌样本检测结果如图 4 所示, 敏感性和特异性均为 95%; 小量结肠癌样本检测结果如图 5 所示; 敏感性和特异性均为 95%; 小量乳腺癌样本检测结果如图 6 所示, 敏感性为 90% 和特异性为 95%。

[0024] (6) 免疫组化检测

1. 制备石蜡或是冰冻切片;
2. 将切片在室温平衡 15 分钟, 湿盒;
3. 用 0.3% H_2O_2 的甲醇溶液处理切片, 消除内源性过氧化酶的影响干扰;
4. 用双蒸水清洗切片 3 次, 每次 2 分钟左右;
5. 抗原修复;
6. 封闭 用 100ul 羊血清或 3% 的 BSA 封闭切片标本 30 分钟, 37°C, 湿盒;
7. 一抗 每孔加入 20ul 一抗, 37°C, 湿盒, 孵育 1h, 用 PBST 清洗 5 次;
8. 加入荧光标记二抗, 每孔 20ul, 37°C, 湿盒, 30 分钟, 用 PBST 清洗 5 次;
9. 镜检;

使用本专利所产单克隆抗体作为一抗, 进行免疫组化实验, 结果如图 7 所示。

[0025] (7) 免疫印迹反应检测

1. 抗原处理 准备抗原(蛋白或细胞裂解液), 用 Loading Buffer 稀释抗原, 沸水浴 3—5 分钟, 变性抗原;
2. 配胶 根据项目需要, 配制合适浓度的分离胶以及浓缩胶;
3. 配制电泳缓冲液以及转膜缓冲液, 同时将转移缓冲液放入 -20°C 预冷;
4. 上样 分别点上适量的样品以及相应的 Marker;
5. 电泳 恒压或是恒流电泳;
6. 固定 用含 20% 甲醇的电转缓冲液平衡、固定凝胶 30 分钟;
7. 把转膜所用的滤纸以及膜用电转缓冲液平衡;
8. 按照滤纸、膜、凝胶、滤纸的顺序将转移夹分别固定在正极以及负极;
9. 转膜 4°C, 恒流, 在转移缓冲液中间放上冰袋, 同时用磁力搅拌器搅拌。中间更换冰袋一次, 以保证缓冲液温度一直维持在 4°C 左右;
10. 封闭 用 5% 的脱脂奶粉或 3% 的 BSA-PBS 封闭膜, 室温封闭 1 小时;
11. 一抗 加入细胞培养上清、纯化抗体、腹水或稀释血清, 室温孵育 2 小时;
12. 洗膜 用 PBST 洗膜 3-5 次, 每次 10 分钟;

13. 二抗 加上合适稀释度的 HRP 或 AP 标记的二抗；
14. 洗膜 同步骤 12；
15. 加入底物,显色(或发光)；

免疫印记结果如图 8 所示,从左往右分别为正常组织,乳腺癌组织,肺癌组织,结肠癌组织。

SEQ ID NO. 1

名称 :天冬氨酸 β 羟化酶 (HAAH) 羧基末端(562-758) 核酸序列

序列 :cgctcactctacaatgtgaatggactgaaagcacagccttggtggaccccaaaagaaacgggctacac
agagttagtaaagtcttttagaaagaaactggaagttaatccgagatgaaggccttgacgtgatggataaagccaaag
gtctcttctcctgaggtgagaaacctgagggaaaaaggggactggagccagttcacgctgtggcagcaaggaaga
agaaatgaaatgcctgcaaaggagctcctaaaacctgtacctactagaaaagttccccgagacaacaggatgcag
aagaggacagatcaaataattccatcatgcacccgggactcacgtgtggccgcacacagggcccacaaactgcaggc
tccgaatgcacctgggcttggtgattcccaaggaaggctgcaagattcgatgtgccaacgagaccaagacctgggag
gaaggcaaggtgctcatctttgatgactcctttgagcacgaggtatggcaggatgcctcatctttccggctgatatt
catcgtggatgtgtggcatccggaactgacaccacagcagagacgcagccttcagcaatttag

SEQ ID NO. 2

名称 :天冬氨酸 β 羟化酶 (HAAH) 羧基末端(562-758) 蛋白序列

序列 :RSLYNVNLKAQPWWTPKETGYTELVKSLERNWKLIRDEGLAVMDKAKGLFLPEDENLREKGDWSQFT
LWQQGRRNENACKGAPKTCTLLEKFPETTGCRRGQIKYSIMHPGTHVWPHTGPTNCRMLHGLVIPKEGCKIRCAN
ETKTWEEGKVLIFDDSFHEVWQDASSFRLIFIVDVWHPPELTPQQRSLPAI

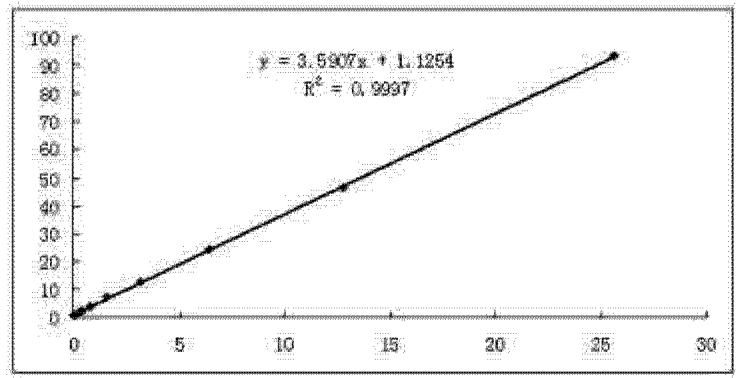
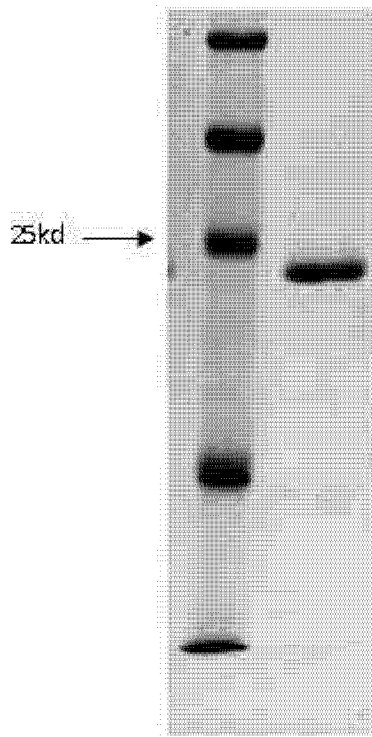


图 2

图 1

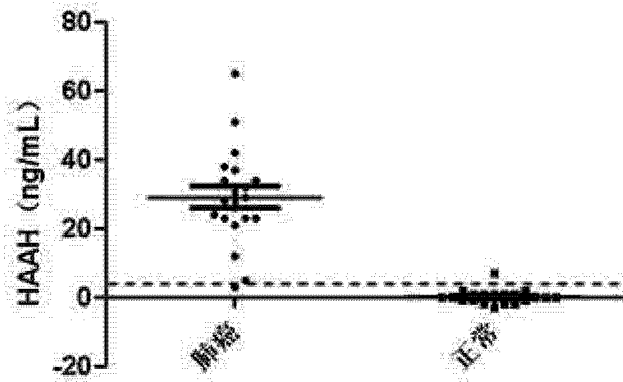


图 3

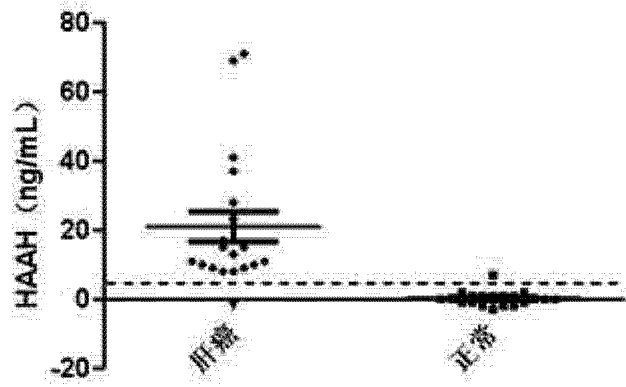


图 4

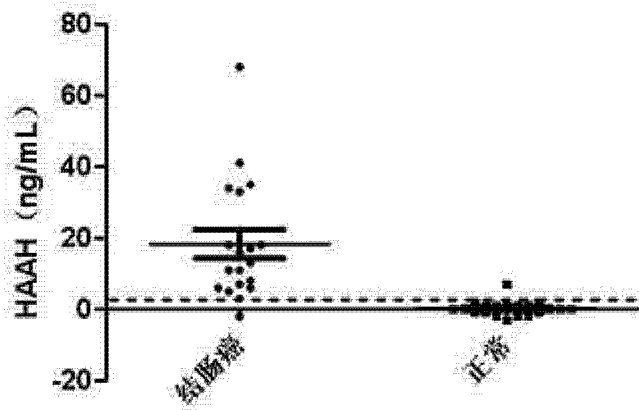


图 5

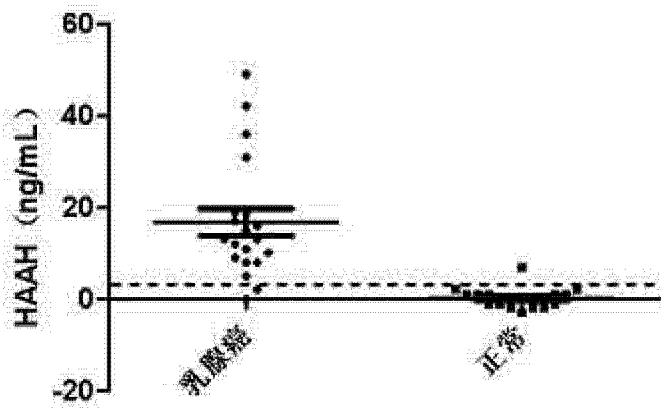


图 6

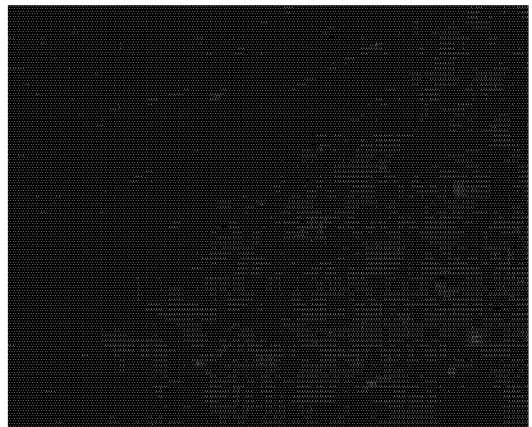


图 7

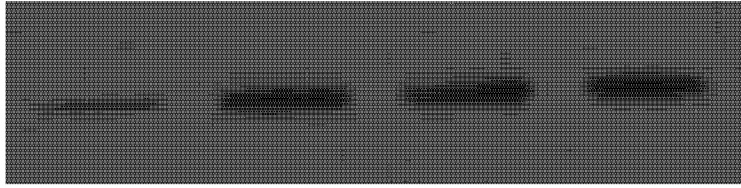


图 8

专利名称(译)	肿瘤特异性抗原人天冬氨酸β羟化酶(HAAH)羧基末端蛋白制备工艺及其在癌症诊断中的应用		
公开(公告)号	CN103789280A	公开(公告)日	2014-05-14
申请号	CN201410083065.7	申请日	2014-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	深圳北京大学香港科技大学医学中心		
申请(专利权)人(译)	深圳北京大学香港科技大学医学中心		
[标]发明人	魏准 杨旸 董小林 张伟		
发明人	魏准 杨旸 董小林 张伟		
IPC分类号	C12N9/02 C12N15/70 G01N33/574 G01N33/573 G01N33/53		
CPC分类号	C12N9/0071 C12Y114/11016 G01N33/574 G01N33/6803		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种人类肿瘤早期诊断方法。该方法是通过天冬氨酸β羟化酶 (HAAH) 抗体和人体细胞或体液中的天冬氨酸β羟化酶结合的抗原抗体反应来诊断早期癌症。本发明亦包括产生HAAH羧基末端重组蛋白和制备HAAH特异性单克隆抗体的方法。

