学校编码：10384　　分类号＿＿＿密级＿＿＿

学号：32620141150588　　UDC＿＿＿＿＿

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

肿瘤标志物 HE4 与 CA19-9 单克隆抗体的研制及诊断应用

Establishment and Diagnostic Application of Monoclonal Antibodies against Tumor Markers HE4 and CA19-9

王英雪

指导教师姓名：　陈毅歆副教授

专 业 名 称：　转化医学

论文提交日期：　2017 年 4 月

论文答辩日期：　2017 年 5 月

学位授予日期：　2017 年 6 月

答辩委员会主席：＿＿＿＿＿＿

评　　阅　　人：＿＿＿＿＿＿

2017 年 5 月

厦门大学博硕士论文摘要库

肿瘤标志物 HE4 与 CA19-9 单克隆抗体的研制及诊断应用

王英雪

指导教师　陈毅歆　副教授

厦门大学

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（厦门大学公共卫生学院陈毅歆副教授）课题（组）的研究成果，获得（陈毅歆副教授）课题（组）经费或实验室的资助，在（厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：王英雪

2017年05月24日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（　　）1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于　　年　　月　　日解密，解密后适用上述授权。

（　√　）2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：王英雪

2017 年 05 月 24 日

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

摘 要.....VII
Abstract.....IX
缩略词.....XI
第一章 前言.....1
1.1 肿瘤早期诊断意义及方法.....1
1.2 肿瘤标志物诊断方法.....2
1.3 肿瘤标志物诊断试剂研发现状.....3
1.4 肿瘤标志物 HE4 的概述.....4
1.4.1 HE4 结构及功能.....4
1.4.2 HE4 诊断价值.....5
1.5 肿瘤标志物 CA19-9 的概述.....6
1.5.1 CA19-9 结构功能.....6
1.5.2 CA19-9 诊断价值.....6
1.6 研究目的、意义及内容.....7
第二章 材料与方法.....8
2.1 主要仪器.....8
2.2 主要耗材.....9
2.3 主要试剂和材料.....9
2.3.1 主要试剂.....9
2.3.2 E.Coli 菌株.....9
2.3.3 质粒载体.....10
2.3.4 细胞株.....10
2.3.5 实验动物.....10
2.3.6 抗原及对照抗体.....10
2.4 常用溶液及培养基的配制.....10
2.4.1 大肠杆培养相关试剂.....10
2.4.2 PBS（pH 7.45）.....11
2.4.3 核酸电泳相关试剂.....11

厦门大学博硕士论文摘要库

2.4.4 蛋白电泳相关试剂.....11
2.4.5 Western Blot 相关试剂.....12
2.4.6 镍柱纯化相关试剂.....12
2.4.7 单抗筛选相关试剂：.....12
2.4.8 ELISA 使相关用试剂.....13
2.4.9 化学发光微粒子免疫检测试剂.....13
2.5 实验方法.....13
2.5.1 分子克隆实验方法.....13
2.5.2 单克隆抗体相关技术.....21
2.5.3 ELISA 相关实验.....24
2.5.4 抗体纯化及标酶.....26
2.5.5 化学发光微粒子相关实验.....29
第三章 结果与分析.....32
第一部分 HE4 单克隆抗体的制备及化学发光检测方法的建立.....32
3.1 HE4-Fe 重组抗原制备及鉴定.....32
3.2 HE4 抗原的分段表达及表位鉴定.....32
3.2.1 HE4 分段表达重组抗原的表达质粒构建.....32
3.2.2 HE4 分段表达重组蛋白的表达纯化及鉴定.....35
3.2.3 外购商品化单克隆抗体识别表位鉴定.....35
3.3 小鼠免疫多抗血清效价检测.....36
3.4 HE4 单克隆抗体制备.....38
3.5 HE4 抗体 ELISA 水平反应性评估.....38
3.5.1 HE4 抗体与重组抗原反应性检测.....38
3.5.2 HE4 天然抗原反应性检测.....39
3.5.3 HE4 抗体与天然抗原反应性检测.....41
3.6 HE4 抗体在 CMIA 平台的评估.....42
3.7 第一部分小结：.....44
第二部分 CA19-9 单克隆抗体的制备及化学发光检测方法的建立.....45
3.8 CA19-9 天然抗原的获得.....45
3.9 CA19-9 免疫条件摸索.....46
3.10 CA19-9 单克隆抗体筛选.....48
3.10.1 单抗制备.....48

厦门大学博硕士论文摘要库

3.10.2 CA19-9 抗体 ELISA 水平反应性评估 48
3.10.3 CA19-9 抗体在 CMIA 平台的评估 50
3.11 第二部分小结：.....52
第四章 讨论 53
4.1 HE4 片段免疫有助于筛选识别不同表位的抗体 53
4.2 HE4 构象型表位抗体的筛选方法.....53
4.3 CA19-9 免疫策略的尝试 53
4.4 CA19-9 抗原的免疫耐受 54
4.5 HE4 及 CA19-9 CMIA 诊断试剂的建立 54
第五章 结论 56
参 考 文 献 58
致 谢.....64
附 录.....65

厦门大学博硕士论文摘要库

Table of Contents

Abstract in Chinese……..……VII

Abstract in English……IX

Acronym…… XI

Chapter 1. Preface……1

1.1 The significance and method of early diagnosis of tumor.……1

1.2 The methods of tumor markers diagnosis……2

1.3 Development of Diagnostic Agents for Tumor Markers……...3

1.4 Introduction of tumor markers HE4……4

1.4.1 The structure and function of HE4……4

1.4.2 Diagnostic value of HE4……...…….5

1.5 Introduction of tumor markers CA19-9……6

1.5.1 The structure and function of CA19-9……..…...……..6

1.5.2 Diagnostic value of CA19-9…….……6

1.6 Research purposes, meanings and main contents of this project……7

Chapter 2. Materials and Methods……..8

2.1 Instruments……8

2.2 Materials……..9

2.3 Main reagents and materials……9

2.3.1 Reagents……..…….……..9

2.3.2 E.Coli strains…….……9

2.3.3 Plasimid vectors……..……10

2.3.4 Cell lines……..10

2.3.5 Animals……....10

2.3.6 antigen and antibody……....10

2.4 Methods of preparation of solution and medium……10

2.4.1 E. coli cμLture related reagents……..……10

2.4.2 PBS（pH 7.45）……11

2.4.3 Nucleic Acid Eletrophoresis Chemicals……...11

2.4.4 Protein electrophoresis related reagents……...11

2.4.5 Western Blot related reagents……...12

2.4.6 Ni-chelating affinity chromatography related reagents……12

厦门大学博硕士论文摘要库

2.4.7 Monoclonal antibody screening related reagens……...12
2.4.8 ELISA assay related reagens……...13
2.4.9 Chemiluminescent microparticle immunoassay related reagens……..13
2.5 Methods……13
2.5.1 MolecμLar cloning experiment method……13
2.5.2 Monoclonal antibody technology……21
2.5.3 ELISA assay……24
2.5.4 Antibody purification and enzyme labeling……26
2.5.5 Chemiluminescent microparticle immunoassay……29
Chapter 3. Results……...32
Part I Preparation of monoclonal antibody against HE4 and establishment of detection method on CMIA Level……32
3.1 HE4-Fe recombinant antigen preparation and identification……..32
3.2 HE4 fragment antigen expression and antibody epitope identification……32
3.2.1 Construction of HE4 recombinant fragment antigen plasmids……32
3.2.2 Purification and identification of HE4 recombinant fragment antigen…….35
3.2.3 Epitope identification of outsourcing antibodies……35
3.3 The mice immune serum titer test results……36
3.4 HE4 Monoclonal antibody screening……...38
3.5 HE4 antibody reactivity assessment on ELISA……..……39
3.5.1 Reactivity detection between HE4 antibody and recombinant antigen……39
3.5.2 HE4 natural antigen activity detection……41
3.5.3 Reactivity detection between HE4 antibody and HE4-N……41
3.6 HE4 antibody reactivity assessment on CMIA ……...42
3.7 Summery of Part I……44
Part II Preparation of monoclonal antibody against CA19-9 and establishment of detection method on CMIA Level……...45
3.8 The extraction of CA19-9 natural antigen…….……45
3.9 The immune condition of CA19-9 antigen……..46
3.10 CA19-9 Monoclonal antibody screening……...48
3.10.1 CA19-9 Monoclonal Antibody Preparation……..…….48
3.10.2 CA19-9 antibody reactivity assessment on ELISA…….……..49

厦门大学博硕士论文摘要库

3.10.3 CA19-9 antibody reactivity assessment on CMIA……..……...50

3.11 Summery of Part II……..……...52

Chapter 4. Discussion……..53

4.1 HE4 Fragment antigen immune helps screen antibody……53

4.2 HE4 conformation type antibody screening method…….53

4.3 CA19-9 Immunization strategy……53

4.4 CA19-9 Antigen immune tolerance……..…54

4.5 Establishment of diagnostic reagents for HE4 and CA19-9 CMIA…….54

Chapter 5. Summery……...56

Reference……58

Acknowlegement……64

Appendices…….65

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

恶性肿瘤严重威胁人类健康，早期肿瘤的治疗预后显著优于晚期肿瘤。检测血清肿瘤标志物是肿瘤早期筛查的一种有效方式，通过检测血清中肿瘤标志物的存在或量变可以反映体内肿瘤的发生和发展程度，在肿瘤的诊断、分类、分期、监测、预后及指导治疗中发挥重要作用。目前，我国的肿瘤标志物诊断试剂及其诊断试剂研发所需的抗原和抗体原料基本依赖进口，供货受制于人和价格昂贵等因素严重制约了我国肿瘤标志物早期筛查的推广普及。因此，研制国产化肿瘤标志物抗原和抗体，并建立相应的肿瘤标志物诊断试剂显得十分必要。

由于肿瘤标志物的关键诊断表位较为复杂，使得研制高特异性、高灵敏度的诊断用活性抗体原料成为研发肿瘤标志物诊断试剂的一个难题。本研究通过对蛋白质类肿瘤标志物人附睾蛋白 4（human epididymis protein 4，HE4）和糖类肿瘤标志物 CA19-9（carbohydrate antigen19-9，CA19-9）进行抗原和抗体的研发，并探索其用于诊断试剂研发的可行性。

针对 HE4 肿瘤标志物，首先是采用原核表达系统，构建并表达了具有天然构象的 rHE4-Fe 重组蛋白和 8 个分节段的重组抗原，利用重组抗原对外购的 HE4 抗体识别表位进行鉴定；然后利用 rHE4-Fe 和 rHE4-0164-32a 重组蛋白免疫 Balb/C 小鼠，通过 ELISA 平台对抗体进行表位鉴定以及与 HE4-N 结合能力的检测，获得一对与外购试剂识别表位相似的包被抗体 60G1 和标记抗体 6B9，在化学发光微粒子免疫检测平台上，对 MB*60G1-6B9*AE 进行评价，其检测范围为 5-3000 pmol/L，临床血清检测相关性 R^2=0.9931，与 Roche 试剂的相关性较好。

针对 CA19-9 肿瘤标志物，首先，利用生化提取方式制备了满足免疫需求的多糖类天然抗原 C1A9-9；然后尝试不同的免疫策略，在小鼠体内刺激出血清滴度达 10^4 的抗体应答；然后，利用天然抗原结合竞争筛选的方式，获得 42 株单克隆抗体，经 ELISA 平台评估，获得 5 组配对，9H7-17A12、8D11-5E7、2G4-14G2、17H11-14G2、13A12-15E8，配对的 P/N 比及线性相关性（R^2>0.9）均能达到外购试剂标准，在化学发光微粒子免疫检测平台（CA19-9 CMIA）对抗体配对进行进一步评估，结果显示，MB*2G4-14G2*AE 与 Roche 试剂的具有一定相关性，R^2=0.7919。

厦门大学博硕士论文摘要库

综上，本研究成功制备了 HE4 单克隆抗体，并初步建立了 HE4 CMIA 免疫检测方法，成功获得了糖抗原 CA19-9 的单克隆抗体，建立了 CA19-9 在 ELISA 水平的检测方法，在 CA19-9 CMIA 诊断试剂建立上取得一定进展，该方法的建立，有利于我国卵巢癌及胰腺癌的临床诊断及筛查。

关键词：肿瘤标志物　HE4　CA19-9　单克隆抗体　化学发光微粒子免疫检测

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Malignant tumors are a serious threat to human health, and the prognosis of early tumors is significantly better than advanced tumors. Detection of serum tumor markers is a routine way of early screening of tumors. By detecting the presence and quantitative change of tumor markers in serum can reflect the occurrence and development of tumors in vivo. And play an important role in the diagnosis, classification, staging, monitoring, prognosis and guiding treatment of the tumor. At present, our tumor markers diagnostic reagents and diagnostic reagents required for the development of antigen and antibody are basically dependent on imports. Raw materials are controlled by foreign markets, and expensive price of the kit and other factors seriously restricted the popμLarity of tumor marker early screening in China. Therefore, the development of home-reagents is very necessary.

Because the key diagnostic epitopes of tumor markers are complex, it has become a difficμLt problem to develop diagnostic reagents for tumor markers with high specificity and high sensitivity. In this study, we choose two tumor markers with different structures, including human epididymis protein 4 (HE4), which is located on the protein, and CA19-9 (carbohydrate antigen19-9, CA19-9). We try to develop antigens and antibodies and explore the feasibility of their use in diagnostic reagents.

For tumor marker HE4, the recombinant antigen rHE4-Fe and eight recombinant antigen fragments were constructed by prokaryotic expression system. The recombinant epitopes of H03 and H05 were identified by using recombinant antigen. rHE4-Fe and rHE4-0164-32a recombinant protein were used to immunize Balb/C mice. The epitope of HE4 antibody was identified by ELISA platform and the binding ability with HE4-N was detected. Then, we obtained a pair of antibodies similar to the purchased reagent recognition epitope, coated antibody 60G1 and labeled antibody 6B9. The MB*60G1-6B9*AE was evaluated on the chemiluminescent microparticle immunoassay platform. The detection range was 5-3000 pmol/L, and have a good relevance with Roche reagent, the clinical serum detection correlation was 0.9931.

For tumor marker CA19-9, glycoprotein antigen CA9-9 with nature activity was obtained by the use of biochemical extraction methods, which can meet the requirement of immunity. By trying different immunization programs with different adjuvants, the results showed that Freund's adjuvant immunized mice had the highest immunological

厦门大学博硕士论文摘要库

titer of 10^4. 42 monoclonal antibodies were obtained by natural antigens and competitive screening. The antibody subtypes were mainly IgM. Assessed by ELISA platform, we obtained 5 groups, 9H7-17A12, 8D11-5E7, 2G4-14G2, 17H11-14G2 and 13A12-15E8. The antibody pairs' P/N ratio and the linear correlation (R^2> 0.9) can reach the standard of control reagent. Using the chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) technique, we We obtained the antibody pair MB*2G4-14G2*AE, which had a certain serum correlation with the Roche reagent (R^2=0.7919).

In summary, HE4 monoclonal antibody was successfμLly prepared in this study. And we established a HE4 CMIA diagnostic reagent. CA19-9 antibodies were developed, and we got some progress on the development of CA19-9 CMIA diagnostic reagents. It may be useful to the screening and early diagnosis of ovarian cancer and pancreatic cancer.

Key words : Tumor marker; HE4; CA19-9; Monoclonal antibody; CMIA

厦门大学博硕士论文摘要库

缩略词

缩写	英文全称	中文名称
TM	Tumor Marker	肿瘤标志物
HE4	human epididymis protein 4	人附睾蛋白 4
CA19-9	Carbohydrate antigen 19-9	糖类抗原 19-9
Kn^+	Kanamycin	卡那霉素
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
mRNA	Massager ribonucleic acid	信使 RNA
mAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
NBS	Newborn bovine serum	新生小牛血清
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IgM	Immunoglobulin M	免疫球蛋白 M
L	litre	升
mL	Millilitre	毫升
μL	Microlitre	微升
μg	Microgram	微克
ng	Manogram	纳克
kD	Kilo daltons	千道尔顿
d	Days	天
bp	Base pair	碱基对
aa	Amino acid	氨基酸
rpm	Revolutions per minute	每分钟转速
℃	Degree celsius	摄氏度
h	Hour	小时

厦门大学博硕士论文摘要库

min	Minute	分钟
C	Concentration	浓度
WHO	World Health Organisation	世界卫生组织
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高效液相色谱
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
CMIA	Chemiluminescent microparticle immunoassay	化学发光微粒子免疫检测
AE	Acridinium ester	吖啶酯
MB	Magnetic beads	磁性微珠

厦门大学博硕士论文摘要库

Degree papers are in the “Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database”. Full texts are available in the following ways:
1. If your library is a CALIS member libraries, please log on http://etd.calis.edu.cn/ and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库