

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 32620141150571

UDC _____

廈門大學

硕士学位论文

基于管式化学发光的血清 SCCAg 检测方法的建立

Establishment of a method for detection of serum SCCAg
based on Chemiluminescence

陈春野

指导教师姓名: 夏宁邵 教授

专业名称: 转化医学

论文提交日期: 2017 年 4 月

论文答辩时间: 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夏宁邵教授）课题（组）的研究成果，获得（夏宁邵教授）课题（组）经费或实验室的资助，在（厦门大学分子疫苗学和分子诊断学国家重点）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）：

年 月 日

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）：

年 月 日

基于管式化学发光的血清SCa₂₅检测方法的建立

陈春野

指导教师

夏宁邵
教授

厦门大学

目 录

摘 要	V
Abstract.....	V
缩略词	IX
前 言	1
1. 全球癌症的疾病负担	1
2. 鳞状上皮细胞癌概述	1
2.1 宫颈癌简介	2
2.2 肺癌简介	3
2.3 结直肠癌简介	4
2.4 食道癌简介	6
2.5 唇口腔癌简介	7
2.6 鼻咽癌简介	8
3. SCCAg 的性质与功能	10
3.1 SCCAg 的分子生物学性质	10
3.2 SCCAg 的生物学功能	12
4. SCCAg 的临床意义	14
4.1 SCCAg 在鳞状上皮细胞癌中的应用	14
4.2 SCCAg 在其它疾病中的应用	15
5. SCCAg 试剂发展	16
5.1 竞争放射性免疫检测方法	16
5.2 双抗夹心放射性免疫检测方法	16
5.3 酶联免疫分析法	17
5.4 管式化学发光分析	18
6. 研究内容和意义	19
材料与方 法	21

1.1 主要仪器	21
1.2 主要耗材	22
1.3 主要试剂与实验动物	22
1.4 常规分子细胞生物学实验试剂	23
1.5 常用溶液和培养液的配制	24
1.6 实验方法	28
结果与分析	39
1. 重组人 SCCAg 的制备及活性鉴定	39
1.1 人 SCCAg 基因的获取	39
1.2 重组 SCCAg 质粒的构建及鉴定	39
1.3 SCCAg 的基因、氨基酸以及引物序列	41
1.4 重组 SCCAg 的表达	43
1.5 重组 SCCAg 的纯化	43
2. 重组 SCCAg 的活性评价	44
2.1 ELISA 方法检测重组 SCCAg 活性	44
2.2 化学发光法检测重组 SCCAg 活性	45
3. SCCAg 单克隆抗体的筛选和制备	47
4. 人 SCCAg 检测单克隆抗体配对的筛选	51
4.1 单克隆抗体的反应性评价	51
4.2 单克隆抗体配对的初步筛选	53
4.3 单克隆抗体配对的第二轮筛选	54
4.4 单克隆抗体配对的第三轮筛选	56
5. SCCAg 检测单克隆抗体配对的性能评估	58
5.1 检测灵敏度分析	58
5.2 与对照试剂的相关性分析	59
讨论	61
1. 重组 SCCAg 的原核表达以及纯化	61
2. 特异性单克隆抗体的制备	62
3. 血清 SCCAg 检测单克隆抗体配对的筛选	62
4. 管式化学发光的前景	63
5. 后续工作展望	64

小结.....	65
参考文献	66
致谢.....	79

厦门大学博硕士论文摘要库

Concents

Abstract in Chinese.....	V
Abstract.....	VI
Abbreviation.....	IX
Preface.....	1
1. Global cancer burden.....	1
2. The sketch of squamous cell carcinoma	1
2.1 Cervical cancer.....	2
2.2 Lung cancer.....	3
2.3 Colorectal cancer	4
2.4 Esophageal cancer.....	6
2.5 Cancer of lip and oral.....	7
2.6 Nasopharyngeal carcinoma.....	8
3. Properties and functions of SCCAg.....	10
3.1 Molecular biological properties of SCCAg	10
3.2 Biological function of SCCAg.....	12
4. Clinical significance of SCCAg	14
4.1 Application of SCCAg in squamous cell carcinoma.....	14
4.2 Application of SCCAg in other diseases.....	15
5. Development of SCCAg reagent.....	16
5.1 Competitive radioimmunoassay.....	16
5.2 Double anti sandwich radioimmunoassay	16
5.3 Enzyme linked immunosorbent assay.....	17
5.4 Tubular chemiluminescence analysis.....	18
6. Research content and significance	19
Materials and methods	21

1.1 Main instrument	21
1.2 Main consumables	22
1.3 Main reagents and laboratory animals	22
1.4 Routine experiment reagent	23
1.5 Preparation of solution and culture medium	24
1.6 Experimental method	28
Results and analysis	39
1. Preparation and characterization of recombinant human SCCAg	39
1.1 Acquisition of human SCCAg gene	39
1.2 SCCAg gene, amino acid and primer sequence	39
1.3 Construction and identification of recombinant SCCAg plasmid	41
1.4 Expression of recombinant SCCAg	43
1.5 Purification of recombinant SCCAg	43
2. Activity evaluation of recombinant SCCAg	44
2.1 Detection of recombinant SCCAg activity by ELISA method	44
2.2 Chemiluminescence detection of recombinant SCCAg activity	45
3. Screening and preparation of monoclonal antibodies against SCCAg	47
4. Screening of monoclonal antibodies against human SCCAg	51
4.1 Reactivity evaluation of monoclonal antibodies	51
4.2 Preliminary screening of monoclonal antibodies	53
4.3 Second round screening of monoclonal antibodies	54
4.4 Screening of monoclonal antibodies against the third round	56
5. Performance evaluation of SCCAg monoclonal antibody pairing	58
5.1 Detection sensitivity analysis	58
5.2 Correlation analysis with the control reagent	59
Discuss	61
1. Prokaryotic expression and purification of recombinant SCCAg	61
2. Preparation of specific monoclonal antibody	62
3. Screening of monoclonal antibodies against serum SCCAg	62
4. The prospect of tubular chemiluminescence	63
5. Future work prospects	64

Summary	65
Reference	66
Acknowledge	79

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

鳞状上皮细胞癌（鳞癌，或称表皮样癌）是一种多发生于肺部、皮肤、肛门、颈、喉、鼻和膀胱等有复层鳞状上皮组织的恶性肿瘤，发病死亡率高，危害十分严重。目前认为，发展和应用有效的肿瘤标记物诊断试剂开展早期诊断和病情监测是预防和治疗肿瘤疾病的有效措施。

鳞状上皮细胞癌抗原最早发现于子宫颈癌组织，包括两种同源分子 SCCA1 和 SCCA2，二者具有 92% 的氨基酸同源性和高度相似的抗原表位特征。研究已显示，SCCAg 是一种重要的肿瘤标记物，与多种器官的鳞状上皮细胞癌有较密切关系。血清 SCCAg 水平可用于有效辅助宫颈癌、头颈部癌、肺非小细胞肺癌、结肠直肠癌等多种鳞状上皮细胞癌的临床诊断、病情监测和预防判断。目前，临床上主流的 SCCAg 检测试剂主要为国外管式化学发光试剂，研制具有自主知识产权的 SCCAg 诊断方法对于降低医疗检测成本具有重要意义。为此，本研究开展了基于管式化学发光的血清 SCCAg 检测方法建立研究，探索建立基于大肠杆菌表达系统的高效可溶性表达重组 SCCAg 抗原的方法，筛选制备 SCCAg 特异性单克隆抗体，建立 SCCAg 管式化学发光检测方法并开展性能评价。

本研究首先建立了一种简便、高效的基于大肠杆菌表达系统制备可溶性重组 SCCAg 抗原的方法。将 SCCA1 和 SCCA2 全长基因分别克隆入 pGEX-6P-1 载体构建获得重组表达质粒 pGEX-SCCA1 和 pGEX-SCCA2，应用 *E. coli* ER2566 菌株进行抗原表达。结果显示，在不同诱导温度条件下重组 SCCA1 和 SCCA2 抗原均能够以可溶性形式存在于超声裂解上清中，表达量无显著差异。通过进一步优化 IPTG 溶度和诱导时间，本研究获得了较优的诱导可溶性表达 SCCA1 和 SCCA2 抗原的条件。进一步应用亲和层析纯化方法获得了具有较高纯度的 SCCA1 和 SCCA2 抗原。本研究应用目前临床上较主要使用的 SCCAg 检测试剂对比了获得重组抗原与人源 SCCAg 抗原的反应活性。结果显示，本研究获得的 SCCA1 抗原、SCCA2 抗原与人源 SCCAg 抗原均具有性能基本相关的反应活性，可用于后续研究。

本研究进一步开展了 SCCAg 特异性单克隆抗体制备，并筛选可高效检测血

清 SCCAg 的单克隆抗体检测配对。将纯化的重组 SCCA1 和 SCCA2 抗原免疫 BALB/c 小鼠，免疫后血清反应效价检测显示，本研究获得的重组 SCCAg 抗原具有良好的免疫原性。进一步开展了单克隆抗体制备，应用间接 ELISA 方法筛选获得 80 株同时对 SCCAg 抗原具有反应活性的单克隆抗体。通过配对实验、线性检测、检测灵敏度分析、小量血清相关性检测等多轮筛选获得单克隆抗体 7F10 与 SAE 标记的单克隆抗体 4H8 的性能较好的单克隆抗体配对。本研究即以之为基础建立了 SCCAg 管式化学发光检测方法。

本研究进一步对建立的 SCCAg 管式化学发光检测方法的性能进行了初步评价。结果显示，该检测方法对人源 SCCAg 抗原的检测灵敏度为 0.15 ng/mL，达到现有临床主流 SCCAg 检测试剂水平。本研究同时应用该方法与现有临床上主要使用的对照试剂对 100 份确证阳性人血清标本进行了平行检测，结果显示，上述两种检测方法获得的检测结果具有良好的相关性 ($R^2=0.9362$)。上述结果说明，本研究建立的 SCCAg 检测方法性能较好，与对照主流试剂相当。

综上所述，本研究建立了有效的基于大肠杆菌表达系统的可溶性表达和纯化 SCCAg 的方法，制备了具有较高纯度和活性的重组 SCCAg 抗原，筛选获得了可高效检测血清 SCCAg 的单克隆抗体检测配对，初步建立了具有相当性能的血清 SCCAg 管式化学发光检测方法，可为 SCCAg 的相关基础与应用研究提供重要支持。

关键词：鳞状上皮细胞癌抗原；大肠杆菌表达系统；单克隆抗体；管式化学发光检测方法

Abstract

Squamous cell carcinoma (epidermoid carcinoma) is a malignant tumor mostly occurs in the lungs, skin, anus, neck, throat, nose and bladder, where covered with squamous epithelium tissues. Because of the high mortality, the squamous cell carcinoma is very harmful. At present, it is believed that the development and application of effective tumor markers for early diagnosis and disease monitoring is an effective measure to prevent and treat tumor diseases.

Squamous cell carcinoma antigen was first found in cervical cancer tissues, including two homologous molecules SCCA1 and SCCA2, which two have a high degree of homology of amino acid and highly similar epitope characteristics, all belong to the family of serine protease inhibitors. Studies have shown that SCCAg is an important tumor marker, and has a close relationship with squamous cell carcinoma of multiple organs. The level of serum SCCAg can be used for clinical diagnosis, disease monitoring and prevention of cervical, head and neck cancer, non-small cell lung cancer and colorectal cancer, and so on. At present, the mainstream of clinical SCCAg detection reagents are mainly foreign tubular chemiluminescence reagents, the development of the SCCAg diagnostic method with independent intellectual property rights is of great significance to reduce the cost of medical testing. Therefore, this study carried out research on the establishment of SCCAg type tube serum chemiluminescence detection method, established the method of efficient soluble expression system of *Escherichia coli* expressing recombinant SCCAg antigen, prepared SCCAg specific monoclonal antibody, established SCCAg tube type chemiluminescence detection method and carried out performance evaluation.

In this study, a simple and efficient method for the preparation of soluble recombinant SCCAg antigen based on *Escherichia coli* expression system was established. The SCCA1 and SCCA2 full-length genes were cloned into pGEX-6P-1 vector to construct recombinant expression plasmid pGEX-SCCA1 and pGEX-SCCA2,

and the expression of antigen was carried out by *E. coli* ER2566. The results showed that the recombinant SCCA1 and SCCA2 antigen could be expressed in soluble form in the supernatant under different conditions. By optimizing the solubility and induction time of IPTG, the optimal conditions for inducing the expression of soluble SCCA1 and SCCA2 antigen were obtained. SCCA1 and SCCA2 antigen with high purity were obtained by affinity chromatography. In this study, we compared the activity of recombinant antigen with human SCCAg antigen by using the SCCAg detection reagent which is mainly used in clinic. The results showed that the SCCA1 antigen and SCCA2 antigen obtained in this study had the basic reactivity with human SCCAg antigen, which could be used in the follow-up study.

In this study, SCCAg specific monoclonal antibodies were prepared and screened for the detection pairing of monoclonal antibodies against SCCAg. The purified recombinant SCCA1 and SCCA2 antigen were used to immunize BALB/c mice, and the serum titer after immunization was tested. The results showed that the recombinant SCCAg antigen obtained in this study had good immunogenicity. 80 monoclonal antibodies against SCCAg antigen was prepared by indirect ELISA method. By pairing experiment, linear detection, sensitivity analysis, correlation detection, monoclonal antibodies pair 7F10/4H8-SAE was screened out. Based on this study, we established a SCCAg tube chemiluminescence detection method.

In summary, this study established an effective expression system and method for purification of soluble SCCAg expression on *Escherichia coli*. The recombinant SCCAg antigen with high purity and activity were prepared. The monoclonal antibody pairing, which can be used for detection of serum levels of SCCAg were prepared. The establishment of tube type chemical luminescence detection method with considerable performance provides important support for the basic research and application of SCCAg.

Keywords: squamous cell carcinoma antigen; *Escherichia coli* expression system; monoclonal antibody; chemiluminescence

缩略词

缩写	英文全称	中文名称
SCCAg	squamous cell carcinoma antigen	鳞状上皮细胞癌抗原
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
Kan	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
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
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
rpm	Revolutions per minute	每分钟转速
$^{\circ}\text{C}$	Degree celsius	摄氏度
h	Hour	小时
min	Minute	分钟
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
CLIA	Chemiluminescence immunoassay	化学发光免疫分析检测

前言

1. 全球癌症的疾病负担

不管是发达国家还是发展中国家，癌症都对社会造成了巨大的经济负担。近几年癌症的发病率逐年升高，一方面原因是世界人口的增长和人口老龄化的加重，另一方面原因是如吸烟、超重、缺乏体力活动、城市化的生殖模式的改变以及经济发展等疾病危险因素的日益增加^[1]。据统计，2012 年全球约有一千四百万的新型肿瘤病例发生，约八百二十万的病人死于癌症^[2]。过去的几年，癌症负担逐渐向发展中国家转移，其癌症病人约占全球的 57%，死亡病例约占全球的 65%^[3]。虽然发达国家的癌症总发病率是发展中国家的两倍，然而其癌症死亡率却仅仅高出发展中国家约 8%~15%^[3]。这种差距反应出了癌症具有明显的地域性差距，其影响因素主要有疾病危险因子、检测方法和治疗手段的可获得性。很大比例癌症的发生和死亡可以通过有效的预防措施来预防，例如烟草控制、疫苗和早期诊断等。

2. 鳞状上皮细胞癌概述

鳞状上皮细胞癌简称鳞癌，又称表皮样癌，是一种多发生于复层鳞状上皮组织的恶性肿瘤，有些也发生于像支气管粘膜这样由腺体或者柱状上皮构成的组织中。癌细胞根据不同的分化程度可以具有多种类型的角化，若角化未在表面形成而是逐渐积累与肿瘤内部则可形成角化珠；在细胞分化良好的情况下，相邻细胞之间可观察到细胞间桥的形成。在临床中较常呈现为菜花样外观，某些癌组织会坏死脱落进而形成溃疡并伴随有恶臭，某些癌组织会向深部侵袭形成浸润性生长并通过血液或者淋巴管转移至淋巴结以及其它区域。鳞状上皮细胞癌常发生于肺部、皮肤、肛门、颈、喉、鼻和膀胱等有鳞状上皮细胞覆盖的地方，常见的有宫颈癌、肺癌、结直肠癌、唇口腔癌和鼻咽癌等等。

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.

厦门大学博硕士学位论文摘要库