



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106996971 A

(43)申请公布日 2017.08.01

(21)申请号 201710293234.3

(22)申请日 2017.04.28

(71)申请人 江南大学

地址 214000 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号

(72)发明人 马鑫 陆扬帆 黄飏 金坚
杜梦繁 张艺 张珏

(74)专利代理机构 深圳市韦恩肯知识产权代理有限公司 44375

代理人 李玉平

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

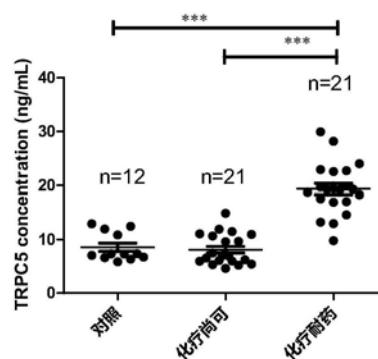
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

检测人外周血EVs-TRPC5含量的试剂盒及方法

(57)摘要

本发明提供了一种检测人外周血中TRPC5含量的时间分辨荧光免疫检测试剂盒及检测方法：包被有TRPC5多肽的多孔包被板加入测试样品到各自的微孔中，再加入抗TRPC5抗体，振荡反应，游离样品中的TRPC5与微孔板上的TRPC5多肽竞争抗TRPC5抗体，洗涤液洗涤；加入Eu3+-羊抗兔抗体，进行标记免疫反应，再用洗涤液洗涤；加增强液振荡后，在紫外灯的激发下发射很强的荧光，用时间分辨荧光仪测定其荧光强度cps，荧光强度与样品中的浓度成反比，对照标准曲线即可确定样品中TRPC5的量。本发明根据血液EVs中TRPC5的表达的高低，可显示出肿瘤细胞耐药转变的情况，具有检测方法简单、速度快、灵敏度高、成本低的优点。



1. 一种检测TRPC5含量的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,其特征在于:包括MUC1包被的NHS磁珠、多孔包被板、缓冲液、TRPC5多肽标准品、TRPC5的抗体、铕标记的羊抗兔抗体、洗涤液及增强液。

2. 一种利用权利要求1所述的试剂盒检测TRPC5含量的时间分辨荧光免疫分析方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 合成TRPC5多肽;

(2) 用步骤(1)合成的所述TRPC5多肽作为包被原包被固相载体;

(3) 用步骤(1)合成的所述TRPC5多肽通过偶联剂与KLH偶联得到免疫原;

(4) 用步骤(3)得到的所述免疫原制备抗TRPC5的多克隆抗体;

(5) 用促凝血清管采集新鲜血液,1000-2000r/min离心5-20min后收集上清液,用MUC1抗体包被的免疫磁珠与所述上清液混合后,经25-37℃震荡孵育0.5-2h或经2-8℃反应过夜,磁力架吸附磁珠,用缓冲液冲洗并重悬,得到待测样品;

(6) 将步骤(5)所述待测样品进行竞争抑制检测分析,测量荧光强度,对照标准曲线计算样品中的TRPC5含量。

3. 根据权利要求2所述的一种检测TRPC5含量的时间分辨荧光免疫分析方法,其特征在于:步骤(3)所述偶联剂为Sulfo-SMCC。

4. 根据权利要求2所述的一种检测TRPC5含量的时间分辨荧光免疫分析方法,其特征在于:步骤(3)所述的免疫原免疫新西兰白兔,通过皮下多点注射制备抗体,使用抗原亲和柱进行纯化,获得步骤(4)所述的抗TRPC5的多克隆抗体。

5. 根据权利要求2所述的一种检测TRPC5含量的时间分辨荧光免疫分析方法,其特征在于:步骤(2)所述固相载体为96孔微孔板。

6. 根据权利要求2所述的一种检测TRPC5含量的时间分辨荧光免疫分析方法,其特征在于:步骤(5)所述缓冲液为磷酸盐缓冲液。

7. 根据权利要求2所述的一种检测TRPC5含量的时间分辨荧光免疫分析方法,其特征在于:步骤(5)所述免疫磁珠为NHS磁珠。

8. 根据权利要求7所述的一种检测TRPC5含量的时间分辨荧光免疫分析方法,其特征在于:所述NHS磁珠购自苏州Beaver公司。

9. 根据权利要求2所述的一种检测TRPC5含量的时间分辨荧光免疫分析方法,其特征在于:步骤(6)所述标准曲线为步骤(1)合成的所述TRPC5多肽作为标准品,稀释成为0ng/mL, 5ng/mL, 10ng/mL, 20ng/mL, 40ng/mL, 50ng/mL, 80ng/mL, 100ng/mL, 200ng/mL, 400ng/mL, 500ng/mL, 800ng/mL, 1000ng/mL系列浓度,稀释液为0.1mol/L pH7.5磷酸盐缓冲液,进行竞争抑制检测分析,将检测结果荧光值与标准品浓度取对数即 $\log_{10}$,线性拟合,作为标准曲线。

10. 根据权利要求2~9所述的一种检测TRPC5含量的时间分辨荧光免疫分析方法,其特征在于,所述MUC1抗体包被的免疫磁珠制备方法为:

a. 蛋白溶液配制:取50-100 μ g MUC1蛋白通过透析或者脱盐的方法彻底除去原有buffer里含伯胺基的物质,然后再用Coupling Buffer配成浓度为3.0-5.0mg/mL的蛋白溶液,将配制好的蛋白溶液于2-8℃保存备用;

b. 取200-500 μ L 20%的磁珠悬浮液于EP管中;

- c. 将EP管置于磁性分离架内,富集磁珠,去除上清液;
- d. 加1mL 2-8℃的Washing Buffer A于离心管中,涡旋15-30s,使磁珠混合均匀;
- e. 将EP管置于磁性分离架内,富集磁珠,去除上清液;
- f. 加200-500μL蛋白溶液于EP管中,涡旋15-30s,使其混合均匀;
- g. 将EP管涡旋15-30s,置于垂直混合仪上,2-8℃反应过夜;
- h. 采用磁性分离架富集磁珠,保存流穿液;
- i. 加0.5-1mL Blocking Buffer于EP管中,涡旋15-30s,将EP管置于磁性分离架内,富集磁珠,弃上清液;
- j. 加0.5-1mL Blocking Buffer于EP管中,涡旋15-30s,将EP管置于垂直混合仪中室温反应2-4h;
- k. 将EP管置于磁性分离架内,富集磁珠,弃上清液;
- l. 加0.5-1mL超纯水于EP管中,充分混合,用磁力架富集磁珠,弃上清液;
- m. 加0.5-1mL Storage Buffer于EP管中,充分混合,用磁力架富集磁珠,弃上清液;重复该操作2次;
- n. 加入0.5-1mL Storage Buffer于EP管中,充分混合,2-8℃保存备用。

检测人外周血EVs-TRPC5含量的试剂盒及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及检测人外周血EVs-TRPC5含量的试剂盒及方法。

背景技术

[0002] 癌症(Cancer),亦称恶性肿瘤(Malignant neoplasm),为由控制细胞生长增殖机制失常而引起的疾病。癌细胞除了生长失控外,还会局部侵入周遭正常组织甚至经由体内循环系统或淋巴系统转移到身体其他部分。在各种疾病中,癌症可谓是“头号杀手”。世界卫生组织报告显示,2008年全世界约有1270万癌症新增患者,760万死于癌症,尤其在发展中国家,癌症新增例数达56%,据推测到2020年前,全球每年将新增1500万癌症患者。

[0003] 乳腺癌是女性常见的癌症,严重威胁女性身心健康。中国抗癌协会公布的最新统计数字显示,从20世纪90年代以来,乳腺癌发病率和死亡率均持续稳定上升,发病率以每年4.476%的速度增长,死亡率以每年3%的速度增长。化学药物治疗是乳腺癌的主要治疗手段之一,目前临床常用药物有:(i) 蒽环类,紫杉类,抗代谢类,抗微管类,烷化剂,杂类等;(ii) 抗雌激素,芳香化酶抑制剂等;(iii) 曲妥珠单抗(抗Her-2)、贝伐单抗(抗VEGF)。

[0004] 但是,据美国癌症协会报道,90%以上肿瘤患者死于不同程度的化疗耐药。对化疗药物产生耐药已经成为肿瘤治疗的一大难题。经过近几十年的研究,目前发现的耐药机制有(1) 细胞膜ABC药物转运蛋白表达增强,减少药物摄入及增加药物排出,P-糖蛋白(P-glycoprotein,P-gp)是目前研究最多也是最为重要的ABC药物转运蛋白,由多药耐药基因mdr1编码;(2) 通过使药物发生异化降低药物活性,常见的酶有GST、CYP450等;(3) 药物作用靶点突变或表达水平变化等;(4) 肿瘤异质性;(5) 肿瘤干细胞耐药等。

[0005] 目前,早期诊断肿瘤的最新、最有效的方法是通过验血寻找肿瘤标记物。肿瘤标志物指的是在肿瘤发生、发展的过程中,能反应细胞癌变的一些细胞内物质。临床上通过对各种肿瘤标志物的检测,可以对相应肿瘤做早期诊断、检测疗效和肿瘤复发状况。因此,在深入研究耐药机制的基础上,开发肿瘤耐药分子诊断指标、方法,实现试剂化,达到耐药早期、动态监测,在现阶段对于乳腺癌耐药的诊疗至关重要,也为优化药物结构设计、研发耐药逆转药物提供有益借鉴,因而具有重大而现实的社会价值。

[0006] MUC1是一种粘蛋白,在正常细胞表达时是一种跨膜糖蛋白,正常情况下,在乳腺、胃肠道及泌尿生殖道的上皮细胞顶端表达,糖基化完全。MUC1度正常上皮起润滑和保护作用、介导信号转导和细胞黏附。

[0007] 在乳腺癌细胞株MCF-7中通过磷酸化,MUC1能结合Rrb/SOS,参与受体酪氨酸激酶介导的信号转导,而酪氨酸磷酸化是膜受体参与信号转导的一个关键步骤。乳腺癌MUC1的表达特点包括:高表达、异常表达低;糖基化、高唾液酸化;顶端定为不清,极性混乱;细胞浆和细胞表面都有过度表达,并且这些分子会从乳腺癌细胞进入血清。有研究者检测基底样乳腺癌患者,发现高表达MUC1,大约有92%的患者能检测出过表达的MUC1。

[0008] 免疫磁珠,也称免疫磁性微球,是一种均匀、具有超顺磁性及保护性壳的球形小粒子,基本上由载体微球和免疫配基结合而成。其核心为顺磁性粒子,核心外层包裹聚合物,

最外层是免疫配基。免疫磁珠技术,是一种以特异的抗原抗体反应为基础的免疫学检测和分离技术。它是以抗体包被的磁珠为载体,通过抗体与反应介质中特异性抗原结合,形成抗原—抗体复合物,此复合物在外加磁场的作用下发生定向移动,从而达到分离抗原的目的。

[0009] TRPC5是瞬时受体电位通道(transient receptor potential channels,TRP通道)家族的一个亚型,它是细胞膜上能通透钙离子的非选择性通道,主要分布于脑、肺、睾丸和胎盘,并主要参与生长锥的形成和脑的发育。本研究室研究发现,瞬时受体电位通道TRPC5与肿瘤多药耐药密切相关,TRPC5在耐阿霉素的乳腺癌细胞(MCF-7/ADM)中发生明显上调,并能间接介导肿瘤产生多药耐药的P-gp蛋白在多药耐药肿瘤细胞(如MCF-7/ADM)中的表达水平。本申请人针对该性质申请了相关专利,专利名称为《TRPC5作为药物靶点在逆转肿瘤多药耐药中的应用》(专利号:201210318389.5)《EVs-TRPC5在检测乳腺癌耐药程度中的应用》(授权公告号:CN103954770B)。

[0010] 时间分辨荧光免疫分析(time-resolved fluoroimmunoassay,TRFIA)由于其特异性强、灵敏度高、操作简单、廉价,且特别适于大批量样品的检测等优点而越来越被人们所重视和采用。目前还没有针对TRPC5检测的时间荧光免疫分析法的专利和文献报道。

发明内容

[0011] 针对现有技术存在的上述问题,本申请人提供了一种基于时间分辨荧光免疫分析检测人外周血中TRPC5含量的试剂盒及方法,本发明的技术方案如下:

[0012] 一种检测TRPC5含量的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,包括MUC1包被的NHS磁珠、多孔包被板、缓冲液、TRPC5多肽标准品、TRPC5的抗体、铕标记的羊抗兔抗体、洗涤液及增强液。

[0013] 一种利用上述试剂盒检测TRPC5含量的时间分辨荧光免疫分析方法,包括以下步骤:

[0014] (1) 合成TRPC5多肽;

[0015] (2) 用步骤(1)合成的所述TRPC5多肽作为包被原包被固相载体;

[0016] (3) 用步骤(1)合成的所述TRPC5多肽通过偶联剂与KLH偶联得到免疫原;

[0017] (4) 用步骤(3)得到的所述免疫原制备抗TRPC5的多克隆抗体;

[0018] (5) 用促凝血清管采集新鲜血液,1000-2000r/min离心5-20min后收集上清液,用MUC1抗体包被的免疫磁珠与所述上清液混合后,经25-37℃震荡孵育0.5-2h或经2-8℃反应过夜,磁力架吸附磁珠,用缓冲液冲洗并重悬,得到待测样品;

[0019] (6) 将步骤(5)所述待测样品进行竞争抑制检测分析,测量荧光强度,对照标准曲线计算样品中的TRPC5含量。

[0020] 进一步的,步骤(3)所述偶联剂为Sulfo-SMCC。

[0021] 进一步的,步骤(3)所述的免疫原免疫新西兰白兔,通过皮下多点注射制备抗体,使用抗原亲和柱进行纯化,获得步骤(4)所述的抗TRPC5的多克隆抗体。

[0022] 进一步的,步骤(2)所述固相载体为96孔微孔板。

[0023] 进一步的,步骤(5)所述缓冲液为磷酸盐缓冲液。

[0024] 进一步的,步骤(5)所述免疫磁珠为NHS磁珠。

[0025] 进一步的,所述NHS磁珠购自苏州Beaver公司。

[0026] 进一步的,步骤(6)所述标准曲线为步骤(1)合成的所述TRPC5多肽作为标准品,稀释成为0ng/mL,5ng/mL,10ng/mL,20ng/mL,40ng/mL,50ng/mL,80ng/mL,100ng/mL,200ng/mL,400ng/mL,500ng/mL,800ng/mL,1000ng/mL系列浓度,稀释液为0.1mol/L pH7.5磷酸盐缓冲液,进行竞争抑制检测分析,将检测结果荧光值与标准品浓度取对数即 $\log_{10}$,线性拟合,作为标准曲线。

[0027] 进一步的,所述MUC1抗体包被的免疫磁珠制备方法为:

[0028] a.蛋白溶液配制:取50-100 μ g MUC1蛋白通过透析或者脱盐的方法彻底除去原有buffer里含伯胺基的物质,然后再用Coupling Buffer配成浓度为3.0-5.0mg/mL的蛋白溶液,将配制好的蛋白溶液于2-8 $^{\circ}$ C保存备用;

[0029] b.取200-500 μ L 20%的磁珠悬浮液于EP管中;

[0030] c.将EP管置于磁性分离架内,富集磁珠,去除上清液;

[0031] d.加1mL 2-8 $^{\circ}$ C的Washing Buffer A于离心管中,涡旋15-30s,使磁珠混合均匀;

[0032] e.将EP管置于磁性分离架内,富集磁珠,去除上清液;

[0033] f.加200-500 μ L蛋白溶液于EP管中,涡旋15-30s,使其混合均匀;

[0034] g.将EP管涡旋15-30s,置于垂直混合仪上,2-8 $^{\circ}$ C反应过夜;

[0035] h.采用磁性分离架富集磁珠,保存流穿液;

[0036] i.加0.5-1mL Blocking Buffer于EP管中,涡旋15-30s,将EP管置于磁性分离架内,富集磁珠,弃上清液;

[0037] j.加0.5-1mL Blocking Buffer于EP管中,涡旋15-30s,将EP管置于垂直混合仪中室温反应2-4h;

[0038] k.将EP管置于磁性分离架内,富集磁珠,弃上清液;

[0039] l.加0.5-1mL超纯水于EP管中,充分混合,用磁力架富集磁珠,弃上清液;

[0040] m.加0.5-1mL Storage Buffer于EP管中,充分混合,用磁力架富集磁珠,弃上清液;重复该操作2次;

[0041] n.加入0.5-1mL Storage Buffer于EP管中,充分混合,2-8 $^{\circ}$ C保存备用。

[0042] 本发明的有益技术效果在于:

[0043] 1、本发明不需要昂贵的仪器,检测成本低,样品前处理简单,现场即可操作检测,同时,该方法灵敏度高,准确度高,操作简便,特异性强,检测速度快,应用广泛,特别适用于大批样品的快速检测。

[0044] 2、本发明只需抽取血液样本便可检测,极大程度地减轻了肿瘤病人的痛苦;

[0045] 3、通过血液EVs中TRPC5表达的高低,可以初步检测出病人在该阶段的耐药情况,提供新的参考项目,同时可联合其它已有的肿瘤耐药诊断技术,有利于医生提出更加准确的治疗方案,以获得最佳疗效。

附图说明

[0046] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步详细说明。

[0047] 图1为样品经过MUC1磁珠预处理,后使用间接TRPC5-TRFIA方法临床检测结果示意图;

[0048] 图2为样品未经过MUC1磁珠预处理,仅使用间接TRPC5-TRFIA方法临床检测结果示

意图。

具体实施方式

[0049] 实施例中所使用的材料来源或制备方法如下：

[0050] 1、主要试剂及耗材

[0051] MUC1 antibody购自美国Abcam公司；Sulfo-SMCC、KLH、Sulfolink Resin购自美国Pierce公司，福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂购自美国Sigma公司。透析袋购自美国Viskase公司，截留分子量14kD，P-10柱购自美国BioRad公司，NHS磁珠购自苏州Beaver公司。

[0052] 2、实验仪器

[0053] 磁力搅拌器(上海梅颖浦)，旋转混合器(上海强运)，紫外/可见光分光光度计(上海奥普勒)，高速离心机(日立)。

[0054] 实施例：

[0055] 1、免疫原与包被原制备

[0056] 合成TRPC5多肽作为包被原，TRPC5多肽与KLH偶联(偶联剂为Sulfo-SMCC)作为免疫抗原，TRPC5多肽与BSA偶联(偶联剂为戊二醛)作为检测抗原，用PBS将免疫抗原分别稀释为1mg/ml，分装冻存于-20度冰箱。

[0057] 2、多克隆抗体制备

[0058] 2.1动物免疫

[0059] 第1天，每种抗原取1ml抗原加入1ml福氏完全佐剂，乳化(检验乳化程度：将一滴乳化抗原液滴入生理盐水中，若不散开，表明已达到要求)，颈背部皮下多点(至少8点)注射，每种抗原免疫2只新西兰白兔。第15天，每种抗原取1ml抗原加入1ml福氏不完全佐剂，乳化，颈背部皮下多点(至少8点)注射，每种抗原免疫2只新西兰白兔。第29天，每种抗原取1ml抗原加入1ml福氏不完全佐剂，乳化，颈背部皮下多点(至少8点)注射，每种抗原免疫2只新西兰白兔。第43天，每种抗原取1ml抗原加入1ml福氏不完全佐剂，乳化，颈背部皮下多点(至少8点)注射，每种抗原免疫2只新西兰白兔。第53天，颈动脉取血，将兔子处死，兔血在4度放置过夜，离心(4度，10000rpm) 30分钟，收集上清液。

[0060] 2.2多克隆抗体的纯化

[0061] TRPC5多肽连接到活化的Sulfolink Resin上，制备抗原亲和柱，1ml Sulfolink Resin偶联1mgTRPC5多肽，亲和柱用10倍柱体积PBS平衡，流尽溶液；兔血清经0.45um滤膜过滤，过抗原亲和柱，流尽溶液，收集流穿，10倍柱体积PBS平衡，流尽溶液。加入5ml抗体洗脱液，分管收集洗脱液，每管1ml。收集的洗脱液检测280nm处的吸光度，吸光度大于1.0的组分合并，对PBS透析，透析后的抗体鉴定(紫外吸收法检测蛋白浓度，Elisa确定抗体效价)。

[0062] 3、MUC1包被磁珠方法

[0063] a. 蛋白溶液配制：取50μg MUC1蛋白通过透析或者脱盐的方法彻底除去原有buffer里含伯胺基的物质，然后再用Coupling Buffer配成浓度为 ≥ 3.0 mg/mL的蛋白溶液，将配制好的蛋白溶液于4℃保存备用。

[0064] b. 取500μL 20%的磁珠悬浮液于1.5mL EP管中。

[0065] c. 将EP管置于磁性分离架内，富集磁珠，去除上清液。

[0066] d. 加1mL 2~8℃的Washing Buffer A于离心管中，涡旋15s，使磁珠混合均匀。

- [0067] e. 将EP管置于磁性分离架内,富集磁珠,去除上清液。
- [0068] f. 加200 μ L蛋白溶液于EP管中,涡旋30s,使其混合均。
- [0069] g. 将EP管涡旋15s,置于垂直混合仪上,4℃反应过夜。
- [0070] h. 采用磁性分离架富集磁珠,保存流穿液。
- [0071] i. 加1mL Blocking Buffer于EP管中,涡旋30s,将EP管置于磁性分离架内,富集磁珠,弃上清液。
- [0072] j. 加1mL Blocking Buffer于EP管中,涡旋30s,将EP管置于垂直混合仪中室温反应2h。
- [0073] k. 将EP管置于磁性分离架内,富集磁珠,弃上清液。
- [0074] l. 加1mL超纯水于EP管中,充分混合,用磁力架富集磁珠,弃上清液。
- [0075] m. 加1mL Storage Buffer于EP管中,充分混合,用磁力架富集磁珠,弃上清液。重复该操作2次。
- [0076] n. 加入1mL Storage Buffer于EP管中,充分混合,4℃保存备用。
- [0077] *4、样品预处理方法(必要步骤)
- [0078] a. 用促凝血清管采集人外周血,1000r/min离心5min后收集上清液;
- [0079] b. 用包有MUC1抗体的NHS磁珠与上清液震荡孵育1h;
- [0080] c. 磁力架吸附磁珠,PBS洗一次;
- [0081] d. 用PBS重悬作为待测样品。
- [0082] 5、制备试剂盒和检测样品
- [0083] 5.1Eu³⁺-羊抗兔抗体制备
- [0084] 取溶解于50mmol/L PBS pH7.0的5g/L羊抗兔抗体1~2mL,经PD-10柱转换缓冲条件,洗脱液为含0.155mmol/L NaCl的50mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃pH8.5缓冲液。收集蛋白峰,经紫外吸收分析定量(1.46A₂₈₀-0.74A₂₆₀),用上述洗脱液稀释兔抗鼠抗体至2g/L。取500~1000 μ L稀释后的羊抗兔抗体加入含0.2~0.4mg的Eu³⁺-N₂-[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸(Eu³⁺-DTTA)的小瓶中,30℃磁力搅拌反应20小时。反应液经用80mmol/L Tris-HCl pH7.8缓冲液平衡的SephacroseCL-6B柱(1 $\times$ 40cm)层析,A₂₈₀监测收集蛋白峰,稀释分装备用。
- [0085] 5.2包被板固相抗原制备
- [0086] 将TRPC5多肽用50mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃pH9.6缓冲液稀释至0.19 μ g/L的包被液,96孔包被板各孔加100 μ L,4℃放置过夜。弃去包被液,冲洗2次,加150 μ L含3g/L BSA的上述缓冲液封闭,室温放置2h。弃去封闭液,真空抽干,板条密封后置-20℃冷冻保存。
- [0087] 5.3试剂的配制
- [0088] a. TRPC5标准品溶液配制:将TRPC5标准品,稀释成为10ng/mL,20ng/mL,40ng/mL,50ng/mL,80ng/mL,100ng/mL,200ng/mL,400ng/mL,500ng/mL,800ng/mL,1000ng/mL系列浓度,稀释液为0.1mol/L pH7.5磷酸盐缓冲液;
- [0089] b. 缓冲液:8mmol/L NaCl、0.2%OVA、50 μ mol/L二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、0.1mL/L Tween-80及0.1质量%NaN₃的50mmol/L Tris-HCl pH7.8;
- [0090] c. 洗涤液为:14.5mmol/L NaCl、0.2mL/L Tween-80及0.2质量%NaN₃的50mmol/L Tris-HCl pH7.8;

[0091] d. 增强液的配制: 由 $15\mu\text{mol}\beta$ -萘甲酰三氟丙酮、 $50\mu\text{mol}$ 三正辛基氧化膦及 1mL 曲拉通 X-100 加入 pH3.2 邻苯二甲酸氢钾缓冲液中, 再定容至 1L 配制而成。

[0092] 5.4 测定之前注意事项:

[0093] a. 使用之前将所有试剂回升至室温 ($18-30^{\circ}\text{C}$)。

[0094] b. 使用之后立即将所有试剂放回 $2-8^{\circ}\text{C}$ 。

[0095] c. 如果样品量大建议使用多通道移液器。

[0096] d. 取出需用数量的微孔板及框架, 将不用的微孔板放进原锡箔袋中并且与提供的干燥剂一起重新密封, 保存于 $2-8^{\circ}\text{C}$ 。

[0097] 5.5 具体检测步骤如下:

[0098] 取包被有包被原 (TRPC5 多肽) 的多孔包被板, 加入 $50\mu\text{L}$ 的 TRPC5 标准品或处理好的样品到各自的微孔中, 加 $50\mu\text{L}$ 以缓冲液稀释的抗 TRPC5 抗体, 25°C 振荡 1 小时, 洗涤液洗 4 次, 加以缓冲液稀释的 $100\mu\text{L}$ Eu^{3+} -羊抗兔抗体, 25°C 振荡 1 小时, 洗涤液洗 6 次, 加 $200\mu\text{L}$ 增强液振荡 5 分钟后测量荧光强度 cps, 根据标准曲线计算样品中的 TRPC5 含量。

[0099] 6 间接 TRPC5-TRFIA 方法临床应用

[0100] 收集临床血清样本, 乳腺癌化疗耐药 21 例, 化疗尚可 21 例, 正常人 12 例, 使用间接 TRPC5-TRFIA 方法检测乳腺癌来源 TRPC5 含量, 结果见图 1。对照组与化疗尚可组比较无明显差异 ($p>0.6$), 而化疗耐药组与化疗尚可组差异有统计学意义 ($p<0.0001$)。

[0101] 对比例:

[0102] 1、未进行样品预处理的间接 TRPC5-TRFIA 方法临床应用

[0103] 1.1 操作步骤

[0104] 取包被有包被原 (TRPC5 多肽) 的多孔包被板, 加入 $50\mu\text{L}$ 的 TRPC5 标准品或病人血清到各自的微孔中, 加 $50\mu\text{L}$ 以缓冲液稀释的抗 TRPC5 抗体, 25°C 振荡 1 小时, 洗涤液洗 4 次, 加以缓冲液稀释的 $100\mu\text{L}$ Eu^{3+} -羊抗兔抗体, 25°C 振荡 1 小时, 洗涤液洗 6 次, 加 $200\mu\text{L}$ 增强液振荡 5 分钟后测量荧光强度 cps, 根据标准曲线计算样品中的 TRPC5 含量。

[0105] 1.2 实验结果

[0106] 收集临床血清样本, 乳腺癌化疗耐药 21 例, 化疗尚可 21 例, 正常人 12 例, 使用间接 TRPC5-TRFIA 方法检测乳腺癌来源 TRPC5 含量, 结果见图 2。化疗耐药组与化疗尚可组比较无明显差异 ($p>0.1$)。

[0107] 2、使用 MUC1 磁珠与 TRPC5 夹心法检测

[0108] 2.1 操作步骤

[0109] 用促凝血清管采集人外周血, $1000-2000\text{r}/\text{min}$ 离心 $5-20\text{min}$ 后收集上清液; 用包有 MUC1 抗体的 NHS 磁珠与上清液震荡孵育 $1-1.5\text{h}$, 加 $50\mu\text{L}$ 以缓冲液稀释的抗 TRPC5 抗体, $25-37^{\circ}\text{C}$ 振荡 $1-1.5$ 小时, 磁性分离, 洗涤液洗 4 次, 加以缓冲液稀释的 $100\mu\text{L}$ Eu^{3+} -羊抗兔抗体, $25-37^{\circ}\text{C}$ 振荡 $1-1.5$ 小时, 磁性分离, 洗涤液洗 6 次, 加 $200\mu\text{L}$ 增强液振荡 5 分钟后测量荧光强度 cps, 根据标准曲线计算样品中的 TRPC5 含量。

[0110] 2.1 存在问题

[0111] (1) 磁珠存在非特异性吸附, 且该非特异性吸附对结果的影响不可忽略;

[0112] (2) 磁珠为纯手工操作, 造成批内、批间差异 (CV) 较大, 影响实验结果。

[0113] 本发明测定方法: 测定的基础是标记免疫反应。包被有 TRPC5 多肽的多孔包被板,

加入测试样品到各自的微孔中,再加入抗TRPC5抗体,振荡反应,游离样品中的TRPC5与微孔板上的TRPC5多肽竞争抗TRPC5抗体,洗涤液洗涤,没有连接的TRPC5抗体在洗涤步骤中被除去。加入Eu3+-羊抗兔抗体,进行标记免疫反应,再用洗涤液洗涤,反应后没有连接的Eu3+-羊抗兔抗体在洗涤步骤中被除去。加增强液振荡后,在紫外灯的激发下发射很强的荧光,用时间分辨荧光仪测定其荧光强度cps,荧光强度与样品中的浓度成反比,对照标准曲线即可确定样品中TRPC5的量。

[0114] 应当理解的是,对本领域普通技术人员来说,可以根据上述说明加以改进或变换,而所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围。

[0115] 上面结合附图对本发明专利进行了示例性的描述,显然本发明专利的实现并不受上述方式的限制,只要采用了本发明专利的方法构思和技术方案进行的各种改进,或未经改进将本发明专利的构思和技术方案直接应用于其它场合的,均在本发明的保护范围内。

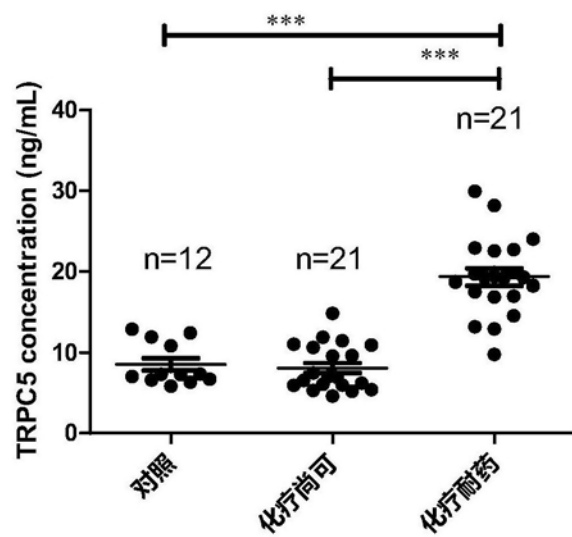


图1

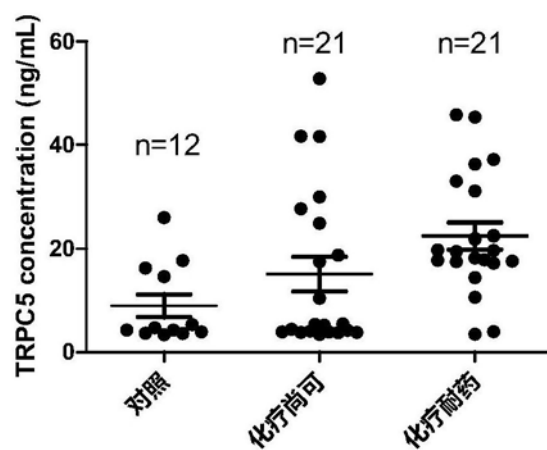


图2

专利名称(译)	检测人外周血EVs-TRPC5含量的试剂盒及方法		
公开(公告)号	CN106996971A	公开(公告)日	2017-08-01
申请号	CN201710293234.3	申请日	2017-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	马鑫 陆扬帆 黄飏 金坚 杜梦繁 张艺 张珏		
发明人	马鑫 陆扬帆 黄飏 金坚 杜梦繁 张艺 张珏		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/54326		
代理人(译)	李玉平		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测人外周血中TRPC5含量的时间分辨荧光免疫检测试剂盒及检测方法：包被有TRPC5多肽的多孔包被板加入测试样品到各自的微孔中，再加入抗TRPC5抗体，振荡反应，游离样品中的TRPC5与微孔板上的TRPC5多肽竞争抗TRPC5抗体，洗涤液洗涤；加入Eu3+-羊抗兔抗体，进行标记免疫反应，再用洗涤液洗涤；加增强液振荡后，在紫外灯的激发下发射很强的荧光，用时间分辨荧光仪测定其荧光强度cps，荧光强度与样品中的浓度成反比，对照标准曲线即可确定样品中TRPC5的量。本发明根据血液EVs中TRPC5的表达的高低，可显示出肿瘤细胞耐药转变的情况，具有检测方法简单、速度快、灵敏度高、成本低的优点。

