

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610093966. X

[51] Int. Cl.
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 1 月 2 日

[11] 公开号 CN 101097217A

[22] 申请日 2006.6.29

[21] 申请号 200610093966. X

[71] 申请人 王珊珊

地址 515663 广东省广州市海珠区东晓路雅
敦街 2 号 1503 房

[72] 发明人 王珊珊

权利要求书 1 页 说明书 3 页

[54] 发明名称

一种提高血清特异性生长因子免疫学测定灵敏度的技术

[57] 摘要

本发明技术介绍了一种采用酸性解离方法对待测样品进行预处理，提高血清特异性生长因子 (SGF) 免疫学测定灵敏度的技术。其主要内容是采用酸性甘氨酸缓冲液破坏生长因子的二聚体结构及其与分泌性受体的复合体结构，使之变成游离单体，利于与检测抗体结合，提高血清特异性生长因子免疫学测定的灵敏度。此技术及试剂配方可作为生长因子免疫学检测试剂盒的组成成分，用于临床和科学研究对 SGF 的检测，适用于恶性肿瘤的诊断、预后及疗效评判。

1. 本发明技术涉及一种采用酸性解离方法对待测样品进行预处理，提高血清特异性生长因子（SGF）免疫学测定灵敏度的技术。其主要特征是采用酸性缓冲液破坏SGF的二聚体结构及其与分泌性受体的复合体结构，使其变成游离单体，利于与检测抗体结合，提高检测的灵敏度。本项技术可作为免疫学检测试剂盒的组成成分，用于SGF的检测，适用于恶性肿瘤的诊断、预后及疗效评判。
2. 权利要求1所述的发明技术，其特征是酸性缓冲液的化学成分可以是甘氨酸，或柠檬酸、乙酸等各种酸性化学物质，都可以达到预期的破坏SGF的二聚体及配体、受体复合体结构，提高血清特异性生长因子免疫学测定灵敏度效果。
3. 权利要求1所述的发明技术，其特征是酸性缓冲液在低盐的条件下破坏生长因子的二聚体结构及其与分泌性受体的复合体结构，使其变成游离单体，利于与检测抗体结合。
4. 权利要求1所述的发明技术，其特征是酸性缓冲液样品预处理技术同样适用于科学研究对SGF的免疫学测定。
5. 权利要求1所述的发明技术，其特征是酸性缓冲液样品预处理技术方法同样适用于其他存在聚合体或复合体结构的蛋白质的免疫学测定，应用于临床诊断及科研检测。

一种提高血清特异性生长因子免疫学测定灵敏度的技术

技术领域：免疫学诊断技术

技术背景：

肿瘤可以通过自分泌和旁分泌的方式产生一系列生长因子，包括表皮生长因子（EGF）、碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）、血管内皮生长因子（VEGF）、血小板衍生生长因子（PDGF）、肿瘤生长因子 α （TGF- α ）和促血管生成素（angiopoietin, ANG）等许多因子。这些生长因子，可以进入血液循环，成为血清特异性生长因子（specific growth factors, SGF），能不断刺激肿瘤生长、转移和血管生成，加快了肿瘤的发展。而不断增大的肿瘤组织又进一步分泌更多的生长因子，进一步刺激肿瘤生长和转移，形成恶性循环。因此，体内血清特异性生长因子的表达水平与肿瘤的生长转移和恶性程度密切相关。定量检测血液或体液中血清特异性生长因子可用于恶性肿瘤的早期诊断，判断肿瘤转移与否及治疗效果。

VEGF、PDGF、ANG 等许多生长因子通常以同源二聚体或三聚体形式存在。这种结构往往会干扰只能识别生长因子某个表位的单克隆抗体与抗原分子的结合，影响免疫检测的灵敏度。此外，肿瘤患者体内还存在一定浓度的，能与相应生长因子结合的分泌性受体。这些分泌性受体也能与相应的生长因子结合，阻碍生长因子与抗体的结合，也在一定程度上影响到生长因子免疫检测的灵敏度。如果对待测样品进行适当的预处理，破坏生长因子的二聚体结构及其与分泌性受体复合体结构，使之变成游离单体，利于与检测抗体结合。然后再用相应的抗体通过免疫学方法检测生长因子，则能够显著提高生长因子的免疫检测灵敏度。

在蛋白质亲和层析纯化技术中，常采用酸性缓冲液（多为甘氨酸缓冲液）破坏抗体与抗原、抗体与 A 蛋白、G 蛋白、配体与受体之间的结合，从固相层析介质中分离洗脱目的蛋白。酸性甘氨酸缓冲液化学性质温和，只破坏抗体与抗原、配体与受体的结合，不会使目的蛋白变性，用碱性缓冲液中和 PH 后，不影响目的蛋白的免疫学活性和生物学活性。

发明内容：

本发明专利描述了一种利用酸性解离方法对待测样品进行预处理，破坏生长因子的二聚体结构及其与分泌性受体复合体结构，使之变成游离单体，利于与检测抗体结合。然后再用特异性抗体通过酶联免疫吸附法（ELISA）、免疫荧光测定法或免疫比浊法检测血液和体液中的血清特异性生长因子，提高血清特异性生长因子免疫检测的灵敏度。下面以免疫比浊法检测血清促血管生成素（ANG）为例，介绍样品预处理的具体方法和检测步骤：

- （1）常规方法抽取肿瘤患者外周血 2ml，室温静置 30 分钟使血液凝固，2500 转/分钟（rpm）离心，吸取清亮血清，-18℃冻存备用；
- （2）取 15 μ l 缓冲液（R1）（5% 聚乙二醇 6000，20mM Tris-HCl 缓冲液，PH6.0）和 15 μ l 处理液（R2）（600mM 甘氨酸、0.2% Towen-20，PH2.5）加入到酶

- 标板的微孔中,使缓冲液的 PH 值低于 3.5, 37℃反应 20min,破坏待测血清特异性生长因子二聚体结构及与分泌性受体复合物,使形成游离型单体;
- (3) 加入 200 μ l 抗体试剂 (R3) (50mM Tris-HCl 缓冲液, 200nM NaCl 悬浮的 10 μ g/ml 聚苯乙烯微球交联的生长因子抗体, 粒径为 200nm, PH8.0,) 混匀,中和预处理样品,使反应液 PH 值达到 7.4 左右。30 秒钟内在 340nm 处测定反应液的吸光度值 (OD 值) A1, 然后 37℃再反应 20min, 30 秒钟内在 340nm 处测定反应液的吸光度值 (OD 值) A2;
 - (4) 样品吸光度值 (OD 值) $\Delta A = A2 - A1$
 - (5) 绘制标准曲线: 标准 SGF 溶液 (初始浓度 64 U/ml) 用缓冲液 R1 梯度稀释, 获得 SGF 终浓度分别为 32 U/ml、16 U/ml、8 U/ml、0.0 U/ml 的液体, 按上述 (1) - (4) 方法测得 ΔA , 以 SGF 浓度为横坐标, 以 ΔA 值为纵坐标, 绘制标准曲线;
 - (6) 结果计算: 样品中 SGF 含量根据其 ΔA 值与标准曲线中对应的 SGF 浓度计算得到。

采用酸性甘氨酸缓冲液解离方法处理血清样品, 可以破坏 SGF 的二聚体结构, 解离 SGF 与分泌性受体的复合体, 使 SGF 变成游离单体, 利于与检测抗体结合, 而不会不影响 SGF 的免疫学活性和生物学活性。用碱性缓冲液中和反应液 PH 后, 可以提高抗体与待测 SGF 的结合效率, 克服了二聚体结构和分泌性受体对 SGF 与抗体结合的干扰, 显著提高血清 SGF 免疫检测的灵敏度。我们已经进行的大量实验检测及临床试验结果也证明了此方法对于提高 SGF 检测灵敏度的有效性。具体结果以 ANG 检测为例, 见下表。

免疫比浊法检测预处理与未处理样品血清 ANG 实验结果比较表

样 品	例数	OD340 (X $\pm$ SD)	
		预处理	未处理
标准品 (32U/ml)	6	0.35 $\pm$ 0.07	0.26 $\pm$ 0.05
正常人血清	130	0.28 $\pm$ 0.16	0.18 $\pm$ 0.12
癌症患者血清	175	0.58 $\pm$ 0.23	0.36 $\pm$ 0.18

从上面实验结果可以看出, 经过预处理的标准品和血清样品, 平均 OD340 值比未处理组明显增大。已有的调查数据显示, 预处理法测定正常人血清 ANG 含量低于 32U/ml, 90% 的肝癌、肺癌和大肠癌患者, 60% 以上的鼻咽癌患者, 血清 ANG 含量增高。而如果采用未处理法检测血清 ANG, 有 25 - 30% 血清 ANG 阳性癌症患者会漏检。可见酸性甘氨酸缓冲液预处理样品后, 能显著提高肿瘤患者 SGF 免疫检测的灵敏度。

实现方式:

上述技术可配制成样品处理缓冲液, 作为各种 SGF 免疫检测试剂盒的组成成分

之一，用于恶性肿瘤的筛查、早期诊断、肿瘤转移与否及恶性程度评判、预后评判及治疗效果评价等。也可作为许多科学研究中对 SGF 的检测。比如，我们介绍的样品处理方法和缓冲液配方可作为 SGF 酶联免疫吸附检测 (ELISA) 试剂盒、免疫荧光检测 (IFA) 试剂盒、免疫比浊检测试剂盒的组成成分，用于临床及科研对 SGF 的检测。

此外，上述酸性甘氨酸缓冲液样品预处理技术方法同样适用于其他存在聚合体结构和复合体的蛋白质的免疫学检测，应用于临床诊断及科研检测。

专利名称(译)	一种提高血清特异性生长因子免疫学测定灵敏度的技术		
公开(公告)号	CN101097217A	公开(公告)日	2008-01-02
申请号	CN200610093966.X	申请日	2006-06-29
[标]申请(专利权)人(译)	王珊珊		
申请(专利权)人(译)	王珊珊		
当前申请(专利权)人(译)	王珊珊		
[标]发明人	王珊珊		
发明人	王珊珊		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明技术介绍了一种采用酸性解离方法对待测样品进行预处理，提高血清特异性生长因子(SGF)免疫学测定灵敏度的技术。其主要内容是采用酸性甘氨酸缓冲液破坏生长因子的二聚体结构及其与分泌性受体的复合体结构，使之变成游离单体，利于与检测抗体结合，提高血清特异性生长因子免疫学测定的灵敏度。此技术及试剂配方可作为生长因子免疫学检测试剂盒的组成成分，用于临床和科学研究对SGF的检测，适用于恶性肿瘤的诊断、预后及疗效评判。

样 品	例数	OD340 (X±SD)	
		预处理	未处理
标准品 (32U/ml)	6	0.35±0.07	0.26±0.05
正常人血清	130	0.28±0.16	0.18±0.12
癌症患者血清	175	0.58±0.23	0.36±0.18