

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/535 G01N 33/573

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02110343.7

[43] 公开日 2002 年 11 月 20 日

[11] 公开号 CN 1380550A

[22] 申请日 2002.5.9 [21] 申请号 02110343.7

[71] 申请人 山东省医药生物技术研究中心

地址 250062 山东省济南市经十路 89 号

[72] 发明人 朱有名 韩金祥

尤瑞·巴克拉克

[74] 专利代理机构 山东济南齐鲁科技专利事务所有限公司

代理人 宁莲青

权利要求书 4 页 说明书 9 页 附图 0 页

[54] 发明名称 用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的试剂盒及其测定方法

[57] 摘要

一种用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的试剂盒及其测定方法,试剂盒装有下列各种试剂:抗鸟氨酸脱羧酶抗体包被的预包被板;生物素标记的抗鸟氨酸脱羧酶抗体;辣根过氧化物酶标记的亲合素;鸟氨酸脱羧酶标准品;样品稀释液;洗涤液;显色剂 A、B;终止液。它利用标记免疫测定技术通过对鸟氨酸脱羧酶抗原含量的测定来间接反映鸟氨酸脱羧酶的活性,它解决了现有技术通过检测¹⁴CO₂ 或腐胺的量来反映鸟氨酸脱羧酶的活性而存在的操作复杂、费时费力、有放射性污染、灵敏度较低的缺点。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的试剂盒，它有试剂盒，其特征在于：试剂盒装有下列各种试剂：

- (1) 抗鸟氨酸脱羧酶抗体包被的预包被板；
- (2) 生物素标记的抗鸟氨酸脱羧酶抗体；
- (3) 辣根过氧化物酶标记的亲合素；
- (4) 鸟氨酸脱羧酶标准品；
- (5) 样品稀释液；
- (6) 洗涤液；
- (7) 显色剂 A、B；
- (8) 终止液。

2、一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的试剂盒，它有试剂盒，其特征在于：试剂盒装有下列各种试剂：

- (1) 生物素标记的抗鸟氨酸脱羧酶抗体；
- (2) 辣根过氧化物酶标记的亲合素；
- (3) 鸟氨酸脱羧酶标准品；
- (4) 洗涤液；
- (5) 显色剂 A、B；
- (6) 终止液。

3、一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的试剂盒，它有试剂盒，

其特征在于：试剂盒装有下列各种试剂：

- (1) 抗鸟氨酸脱羧酶抗体；
- (2) 荧光标记的二抗；
- (3) 洗涤液。

4、一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的方法，其特征在于：对于组织提取液、血浆、血清中鸟氨酸脱羧酶的测定，取抗鸟氨酸脱羧酶抗体，用 PH9.6 碳酸盐缓冲液配制 10-100ug/ml 于微孔板微孔内，每孔加 100ul，37°C 1-2 小时或 2-8°C 过夜，洗板 5 次后，常规封闭，干燥；取组织提取液或血清或血浆 50 ul 加入各孔中，每孔加生物素标记的抗鸟氨酸脱羧酶抗体 50 ul，同时做 5 个浓度的标准孔和阴性对照孔；置 37°C 1 小时，洗涤 5 次，每孔加辣根过氧化物酶标记的亲合素 100 ul，37°C 1 小时，洗涤 5 次，每孔加显色剂 A、B 各 50 ul，37°C 避光 10 分钟，于酶标仪 450nm 处测各孔 OD 值；同时作标准品，以各标准孔浓度为横坐标、OD 值为纵坐标绘制标准曲线，待测样品的鸟氨酸脱羧酶含量即可根据其 OD 值从标准曲线上查得。

5、一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的方法，其特征在于：对于细胞中鸟氨酸脱羧酶的测定，先将细胞计数并调至一定数量后，分配于微孔培养板中，然后置 5%CO₂ 培养箱中培养 18-24 小时，待细胞贴壁（不贴壁生长的细胞需离心）后，洗涤 3 次，常规固定，封闭，然后每孔加生物素标记的抗鸟氨酸脱羧酶抗体 100 ul，37°C 1-3 小时后，洗涤 5 次，每孔加辣根过氧化物酶标记的亲合素 100 ul，37°C 1 小时，洗涤 5 次，每孔加显色剂 A、B 各 50 ul，37°C 避光 10 分钟，于酶标仪 450nm 处测各孔 OD 值；同时作标准品，以各标准孔浓度为横坐标、OD 值为纵坐标

绘制标准曲线，待测样品的鸟氨酸脱羧酶含量即可根据其 OD 值从标准曲线上查得。

6、一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的方法，其特征在于：对于组织切片或细胞涂片中鸟氨酸脱羧酶的测定，将组织切片或细胞涂片常规固定后，用 5%脱脂奶粉封闭，然后加抗鸟氨酸脱羧酶抗体，37℃ 1-2 小时或 2-8℃ 过夜，洗板后，加荧光标记的二抗，37℃ 1 小时，洗板后，于荧光显微镜下检测结果。

7、一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的方法，其特征在于：对于细胞中鸟氨酸脱羧酶的测定，先将细胞计数并调至一定数量后，分配于微孔培养板中，加入不同浓度的药物，然后置 5%CO₂ 培养箱中培养 18-24 小时，待细胞贴壁（不贴壁生长的细胞需离心）后，洗涤 3 次，常规固定，封闭，然后每孔加生物素标记的抗鸟氨酸脱羧酶抗体 100 ul，37℃ 1-3 小时后，洗涤 5 次，每孔加辣根过氧化物酶标记的亲合素 100 ul，37℃ 1 小时，洗涤 5 次，每孔加显色剂 A、B 各 50 ul，37℃ 避光 10 分钟，于酶标仪 450nm 处测各孔 OD 值；同时作标准品，以各标准孔浓度为横坐标、OD 值为纵坐标绘制标准曲线，待测样品的鸟氨酸脱羧酶含量即可根据其 OD 值从标准曲线上查得；或根据各孔 OD 值，直接判定试验细胞的药敏结果。

8、一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的试剂盒，它有试剂盒，其特征在于：试剂盒装有下列各种试剂：

- (1) 抗鸟氨酸脱羧酶抗体包被的预包被板；
- (2) 抗鸟氨酸脱羧酶抗体；

- (3) 辣根过氧化物酶标记的二抗;
- (4) 鸟氨酸脱羧酶标准品;
- (5) 样品稀释液;
- (6) 洗涤液;
- (7) 显色剂 A、B;
- (8) 终止液。

9、一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的试剂盒，它有试剂盒，其特征在于：试剂盒装有下列各种试剂：

- (1) 抗鸟氨酸脱羧酶抗体;
- (2) 辣根过氧化物酶标记的二抗;
- (3) 鸟氨酸脱羧酶标准品;
- (4) 洗涤液;
- (5) 显色剂 A、B;
- (6) 终止液。

10 一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的试剂盒，它有试剂盒，其特征在于：试剂盒装有下列各种试剂：

- (1) 抗鸟氨酸脱羧酶抗体;
- (2) 辣根过氧化物酶标记的二抗;
- (3) 洗涤液;
- (4) 显色剂。

用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的试剂盒及其测定方法

技术领域

本发明涉及测定鸟氨酸脱羧酶技术领域。

背景技术

鸟氨酸脱羧酶广泛存在于动物体内，是细胞增殖的标志酶，实验证明，在许多肿瘤组织中，该酶的活性明显升高。据有关医学界统计：食道癌、胃癌、结直肠癌、肝癌组织中鸟氨酸脱羧酶活性明显升高。目前，医学界已把鸟氨酸脱羧酶看作一种肿瘤标志物，因此对其活性测定尤为重要。传统对鸟氨酸脱羧酶的测定方法是：一、标本采集后立即置于 PH7.2 的含同位素标记的 DL-1-[¹⁴C]左旋鸟氨酸的缓冲液中，然后储存于低温环境下，使鸟氨酸脱羧酶与同位素充分混合吸收，鸟氨酸脱羧酶将与标记的 L-鸟氨酸结合，释放出 ¹⁴C02，最终通过检测 ¹⁴C102 的量来反映鸟氨酸脱羧酶的活性。该方法存在操作复杂、费时费力的缺点，并且存在放射性污染因素，临床上应用难度很大。二、分光光度法是将标本与含鸟氨酸的缓冲液在 37℃ 条件下，作用 30 分钟，使鸟氨酸脱羧生成腐胺，最终通过检测腐胺的含量来反映鸟氨酸脱羧酶的活性。该方法存在操作复杂、灵敏度较低的缺点。

发明内容

本发明提供了一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的试剂盒及

其测定方法，它利用标记免疫测定技术通过对鸟氨酸脱羧酶抗原含量的测定来间接反映鸟氨酸脱羧酶的活性，它解决了现有技术通过检测¹⁴C02或腐胺的量来反映鸟氨酸脱羧酶的活性而存在的操作复杂、费时费力、有放射性污染、灵敏度较低的缺点。

本发明的目的是通过以下技术方案来实现的：

A. 一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的试剂盒，它有试剂盒，试剂盒装有下列各种试剂：

- (1) 抗鸟氨酸脱羧酶抗体包被的预包被板；
- (2) 生物素标记的抗鸟氨酸脱羧酶抗体；
- (3) 辣根过氧化物酶标记的亲合素；
- (4) 鸟氨酸脱羧酶标准品；
- (5) 样品稀释液；
- (6) 洗涤液；
- (7) 显色剂 A、B；
- (8) 终止液。

一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的方法，对于组织提取液、血浆、血清中鸟氨酸脱羧酶的测定，取抗鸟氨酸脱羧酶抗体，用 PH9.6 碳酸盐缓冲液配制 10-100ug/ml 于微孔板微孔内，每孔加 100ul，37℃1-2 小时或 2-8℃过夜，洗板 5 次后，常规封闭，干燥；取组织提取液或血清或血浆 50 ul 加入各孔中，每孔加生物素标记的抗鸟氨酸脱羧酶抗体 50 ul，同时做 5 个浓度的标准孔和阴性对照孔；置 37℃1 小时，洗涤 5 次，每孔加辣根过氧化物酶标记的亲合素 100 ul，37℃1 小时，洗涤 5 次，

每孔加显色剂 A、B 各 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C 避光 10 分钟, 于酶标仪 450nm 处测各孔 OD 值; 同时作标准品, 以各标准孔浓度为横坐标、OD 值为纵坐标绘制标准曲线, 待测样品的鸟氨酸脱羧酶含量即可根据其 OD 值从标准曲线上查得。

B. 一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的试剂盒, 它有试剂盒, 试剂盒装有下列各种试剂:

- (1) 生物素标记的抗鸟氨酸脱羧酶抗体;
- (2) 辣根过氧化物酶标记的亲合素;
- (3) 鸟氨酸脱羧酶标准品;
- (4) 洗涤液;
- (5) 显色剂 A、B;
- (6) 终止液。

一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的方法, 对于细胞中鸟氨酸脱羧酶的测定, 先将细胞计数并调至一定数量后, 分配于微孔培养板中, 然后置 5%CO₂ 培养箱中培养 18-24 小时, 待细胞贴壁 (不贴壁生长的细胞需离心) 后, 洗涤 3 次, 常规固定, 封闭, 然后每孔加生物素标记的抗鸟氨酸脱羧酶抗体 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 1-3 小时后, 洗涤 5 次, 每孔加辣根过氧化物酶标记的亲合素 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 1 小时, 洗涤 5 次, 每孔加显色剂 A、B 各 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C 避光 10 分钟, 于酶标仪 450nm 处测各孔 OD 值; 同时作标准品, 以各标准孔浓度为横坐标、OD 值为纵坐标绘制标准曲线, 待测样品的鸟氨酸脱羧酶含量即可根据其 OD 值从标准曲线上查得。

C. 一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的试剂盒, 它有试剂盒,

试剂盒装有下列各种试剂：

- (1) 生物素标记的抗鸟氨酸脱羧酶抗体；
- (2) 辣根过氧化物酶标记的亲合素；
- (3) 鸟氨酸脱羧酶标准品；
- (4) 洗涤液；
- (5) 显色剂 A、B；
- (6) 终止液。

一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的方法，其特征在于：对于细胞中鸟氨酸脱羧酶的测定，先将细胞计数并调至一定数量后，分配于微孔培养板中，加入不同浓度的药物，然后置 5%CO₂ 培养箱中培养 18-24 小时，待细胞贴壁（不贴壁生长的细胞需离心）后，洗涤 3 次，常规固定，封闭，然后每孔加生物素标记的抗鸟氨酸脱羧酶抗体 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 1-3 小时后，洗涤 5 次，每孔加辣根过氧化物酶标记的亲合素 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 1 小时，洗涤 5 次，每孔加显色剂 A、B 各 50 μ l，37 $^{\circ}$ C 避光 10 分钟，于酶标仪 450nm 处测各孔 OD 值；同时作标准品，以各标准孔浓度为横坐标、OD 值为纵坐标绘制标准曲线，待测样品的鸟氨酸脱羧酶含量即可根据其 OD 值从标准曲线上查得；或根据各孔 OD 值，直接判定试验细胞的药敏结果。

D. 一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的试剂盒，它有试剂盒，试剂盒装有下列各种试剂：

- (1) 抗鸟氨酸脱羧酶抗体；
- (2) 荧光标记的二抗；

(3) 洗涤液。

一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的方法，对于组织切片或细胞涂片中鸟氨酸脱羧酶的测定，将组织切片或细胞涂片常规固定后，用5%脱脂奶粉封闭，然后加抗鸟氨酸脱羧酶抗体，37℃1-2小时或2-8℃过夜，洗板后，加荧光标记的二抗，37℃1小时，洗板后，于荧光显微镜下检测结果。

E. 一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的试剂盒，它有试剂盒，试剂盒装有下列各种试剂：

- (1) 抗鸟氨酸脱羧酶抗体包被的预包被板；
- (2) 抗鸟氨酸脱羧酶抗体；
- (3) 辣根过氧化物酶标记的二抗；
- (4) 鸟氨酸脱羧酶标准品；
- (5) 样品稀释液；
- (6) 洗涤液；
- (7) 显色剂 A、B；
- (8) 终止液。

一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的方法，对于组织提取液、血浆、血清中鸟氨酸脱羧酶的测定，取抗鸟氨酸脱羧酶抗体，用 PH9.6 碳酸盐缓冲液配制 10-100ug/ml 于微孔板微孔内，每孔加 100ul，37℃1-2 小时或 2-8℃过夜，洗板 5 次后，常规封闭，干燥；取组织提取液或血清或血浆 50 u1 加入各孔中，每孔加抗鸟氨酸脱羧酶抗体 50 u1，同时做 5 个浓度的标准孔和阴性对照孔；置 37℃1 小时，洗涤 5 次，每孔加辣根

过氧化物酶标记的二抗 100 u1, 37°C 1 小时, 洗涤 5 次, 每孔加显色剂 A、B 各 50 u1, 37°C 避光 10 分钟, 于酶标仪 450nm 处测各孔 OD 值; 同时作标准品, 以各标准孔浓度为横坐标、OD 值为纵坐标绘制标准曲线, 待测样品的鸟氨酸脱羧酶含量即可根据其 OD 值从标准曲线上查得。

F. 一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的试剂盒, 它有试剂盒, 试剂盒装有下列各种试剂:

- (1) 抗鸟氨酸脱羧酶抗体;
- (2) 辣根过氧化物酶标记的二抗;
- (3) 鸟氨酸脱羧酶标准品;
- (4) 洗涤液;
- (5) 显色剂 A、B;
- (6) 终止液。

一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的方法, 对于细胞中鸟氨酸脱羧酶的测定, 先将细胞计数并调至一定数量后, 分配于微孔培养板中, 然后置 5%CO₂ 培养箱中培养 18-24 小时, 待细胞贴壁 (不贴壁生长的细胞需离心) 后, 洗涤 3 次, 常规固定, 封闭, 然后每孔加抗鸟氨酸脱羧酶抗体 100 u1, 37°C 1-3 小时后, 洗涤 5 次, 每孔加辣根过氧化物酶标记的二抗 100 u1, 37°C 1 小时, 洗涤 5 次, 每孔加显色剂 A、B 各 50 u1, 37°C 避光 10 分钟, 于酶标仪 450nm 处测各孔 OD 值; 同时作标准品, 以各标准孔浓度为横坐标、OD 值为纵坐标绘制标准曲线, 待测样品的鸟氨酸脱羧酶含量即可根据其 OD 值从标准曲线上查得。

G. 一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的试剂盒, 它有试剂盒,

试剂盒装有下列各种试剂：

- (1) 抗鸟氨酸脱羧酶抗体；
- (2) 辣根过氧化物酶标记的二抗；
- (3) 鸟氨酸脱羧酶标准品；
- (4) 洗涤液；
- (5) 显色剂 A、B；
- (6) 终止液。

一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的方法，对于细胞中鸟氨酸脱羧酶的测定，先将细胞计数并调至一定数量后，分配于微孔培养板中，加入不同浓度的药物，然后置 5%CO₂ 培养箱中培养 18-24 小时，待细胞贴壁（不贴壁生长的细胞需离心）后，洗涤 3 次，常规固定，封闭，然后每孔加抗鸟氨酸脱羧酶抗体 100 ul，37℃1-3 小时后，洗涤 5 次，每孔加辣根过氧化物酶标记的二抗 100 ul，37℃1 小时，洗涤 5 次，每孔加显色剂 A、B 各 50 ul，37℃避光 10 分钟，于酶标仪 450nm 处测各孔 OD 值；同时作标准品，以各标准孔浓度为横坐标、OD 值为纵坐标绘制标准曲线，待测样品的鸟氨酸脱羧酶含量即可根据其 OD 值从标准曲线上查得；或根据各孔 OD 值，直接判定试验细胞的药敏结果。

H. 一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的试剂盒，它有试剂盒，试剂盒装有下列各种试剂：

- (1) 抗鸟氨酸脱羧酶抗体；
- (2) 辣根过氧化物酶标记的二抗；
- (3) 洗涤液；

(4) 显色剂。

一种运用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的方法，对于组织切片或细胞涂片中鸟氨酸脱羧酶的测定，将组织切片或细胞涂片常规固定后，用5%脱脂奶粉封闭，然后加抗鸟氨酸脱羧酶抗体，37℃1-2小时或2-8℃过夜，洗板后，加辣根过氧化物酶标记的二抗，37℃1小时，洗板后，加显色剂显色，于显微镜下检测结果。

本发明能够产生的有益效果：因本发明一改传统的通过检测¹⁴C₂或腐胺的量来反映鸟氨酸脱羧酶的活性而存在的操作复杂、费时费力、有放射性污染、灵敏度较低的缺点，它运用了标记免疫技术，并提供了相应的试剂盒，使用该试剂盒测定标本中鸟氨酸脱羧酶的量，它操作简便、省时省力，无任何污染、灵敏度较高。

具体实施方式

实施例 1

检测组织提取液、血浆、血清中或其他组织液中的鸟氨酸脱羧酶。取需要用量已包被有抗鸟氨酸脱羧酶抗体的微孔板条，加组织提取液50 u1，同时做标准品 0，10，20，40，100ng/ml 及阴性对照品，每孔加生物素标记的抗鸟氨酸脱羧酶抗体 50 u1，置 37℃温育 1 小时，洗涤 5 遍，每孔加辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素 100 u1，37℃温育 40 分钟，洗涤，每孔加显色剂 A、B 各 50u1，37℃避光 10-15 分钟后，每孔加终止液 50 u1，于酶标仪 450nm 处进行检测。以各标准孔的 OD 值与对应浓度绘制标准曲线，根据样品孔的 OD 值从标准曲线中查其相应浓度。

实施例 2

细胞中的鸟氨酸脱羧酶测定（药敏试验）。取病人静脉血 4ml，肝素防凝，用淋巴细胞分离液，常规分离淋巴细胞，然后计数并调节细胞数至 $10^7/\text{ml}$ ，每孔 100 μl ，同时含有 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA 及不同浓度的抗癌药物如：环磷酰胺 0, 10^{-3} , 10^{-7} , 10^{-9} ，长春新碱 0, 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} ，同时做对照孔，置 5% CO_2 培养箱中 37 $^\circ\text{C}$ 培养 18-24 小时，离心，洗涤 3 次，然后常规固定、封闭后，每孔加生物素标记的抗鸟氨酸脱羧酶抗体 100 μl ，37 $^\circ\text{C}$ 1-3 小时，洗涤 5 次，每孔加辣根过氧化物酶标记的亲合素 100 μl ，37 $^\circ\text{C}$ 30-60 分钟，洗涤 5 次，每孔加显色剂 A、B 各 50 μl ，37 $^\circ\text{C}$ 10-15 分钟，酶标仪 450nm 测 OD 值，根据 OD 值的大小即可判断被测病人对何种药物、何浓度敏感。

专利名称(译)	用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的试剂盒及其测定方法		
公开(公告)号	CN1380550A	公开(公告)日	2002-11-20
申请号	CN02110343.7	申请日	2002-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	山东省医药生物技术研究中心		
申请(专利权)人(译)	山东省医药生物技术研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	山东省医药生物技术研究中心		
[标]发明人	朱有名 韩金祥 尤瑞巴克拉克		
发明人	朱有名 韩金祥 尤瑞·巴克拉克		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/573		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种用标记免疫技术测定鸟氨酸脱羧酶的试剂盒及其测定方法,试剂盒装有下列各种试剂:抗鸟氨酸脱羧酶抗体包被的预包被板;生物素标记的抗鸟氨酸脱羧酶抗体;辣根过氧化物酶标记的亲合素;鸟氨酸脱羧酶标准品;样品稀释液;洗涤液;显色剂A、B;终止液。它利用标记免疫测定技术通过对鸟氨酸脱羧酶抗原含量的测定来间接反映鸟氨酸脱羧酶的活性,它解决了现有技术通过检测 $^{14}\text{CO}_2$ 或腐胺的量来反映鸟氨酸脱羧酶的活性而存在的操作复杂、费时费力、有放射性污染、灵敏度较低的缺点。