



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106645734 A

(43) 申请公布日 2017.05.10

(21) 申请号 201510724855.3

(22) 申请日 2015.11.02

(71) 申请人 博格·孙杨

地址 北京市海淀区上地信息路12号中关村
发展大厦D207室

(72) 发明人 博格·孙杨 李峰 王静 周宇璠

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种基于酶联免疫法的 Septin9 检测试剂盒

(57) 摘要

本发明提供一种基于酶联免疫法的 Septin9 检测试剂盒。一种人 septin9 酶联免疫检测试剂盒,主要包括:包被有 septin9 特异性抗体的酶标板;酶标记物(为酶标记的 septin9 特异性抗体);Septin9 标准品溶液;底物显色液;终止液;浓缩洗涤液。本发明提供的 septin9 酶联免疫检测试剂盒,包括包被有 septin9 特异性抗体 I 的酶标板,酶标记物(为酶标记的 septin9 特异性抗体 II)。所述 septin9 特异性 I 和特异性抗体 II 可以为多克隆抗体或单克隆抗体。所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶(HRP)或碱性磷酸酯酶(ALP),其中优选 HRP;酶标记的 septin9 特异性抗体 II 采用戊二醛法或过碘酸钠法将标记酶与抗体偶联得到。所述试剂盒还包括 septin9 标准品溶液、底物显色液、终止液和浓缩洗涤液。该试剂盒具有检测灵敏度高,特异性强,操作简单,稳定性好,无污染,重复性好的特点。

1. 一种基于酶联免疫法的 Septin9 检测试剂盒,主要包括:

- (1) 包被有 septin9 特异性抗体的酶标板;
- (2) 酶标记物(为酶标记的 septin9 特异性抗体);
- (3) Septin9 标准品溶液;
- (4) 底物显色液;
- (5) 终止液;
- (6) 浓缩洗涤液。

2. 如权利 1 所述的试剂盒,包括包被有 septin9 特异性抗体 I 的酶标板,酶标记物(为酶标记的 septin9 特异性抗体 II),所述 septin9 特异性 I 和特异性抗体 II 可以为多克隆抗体或单克隆抗体。

3. 权利 1 所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶(HRP)或碱性磷酸酯酶(ALP),其中优选 HRP;酶标记的 septin9 特异性抗体 II 采用戊二醛法或过碘酸钠法将标记酶与抗体偶联得到。

4. 权利 1 所述试剂盒还包括 septin9 标准品溶液、底物显色液、终止液和浓缩洗涤液,所述底物显色液,当标记酶为 HRP 时,底物显色液由显色液 A 和显色液 B 组成,显色液 A 为过氧化氢或过氧化脲,显色液 B 为邻苯二胺或四甲基联苯胺(TMB),所述终止液为 1-2mol/L 硫酸。当标记酶为 ALP 时,底物显色液为对硝基苯磷酸酯缓冲液,所述终止液为 1-2mol/L 氢氧化钠。

5. 本发明还提供一种 septin9 酶标板的制备过程:用包被缓冲液将 septin9 特异性抗体 I 稀释成 0.05-0.1 μ g/ml,每孔加入 100 μ l,用封板膜封闭,4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,倒掉包被液,用洗涤液洗 2 次,拍干,然后每孔中加入 150-200 μ l 封闭液,37 $^{\circ}$ C 孵育 1-2h,倒掉封闭液拍干,37 $^{\circ}$ C 烘箱干燥 2h,铝箔真空密封保存。

6. 所述权利 5 酶标板制备过程中所用的包被缓冲液为 pH9.6,0.05M 碳酸盐缓冲液;所用封闭液为含有 BSA 1%,小牛血清 20%,叠氮钠 0.05%的 pH 7.4 0.1M 磷酸盐缓冲液。

一种基于酶联免疫法的 Septin9 检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明专利是涉及医学临床诊断技术领域,特别是涉及一种基于酶联免疫法的 Septin9 检测试剂盒。

背景技术

[0002] Septin 是一个广泛存在于除植物以外所有真核生物中的基因家族。最初认为 septin 家族是与酵母细胞胞质分裂相关的基因家族,然而随着研究的深入,人们发现这类基因编码的蛋白在许多生物体内出现了较大的功能分化,尤其是在哺乳动物中,他们不仅成员众多,而且参与了细胞分裂、细胞极化、囊泡运输及胞膜重构等多个过程。更引起研究人员重视的是:最近有大量的数据表明,这一家族的一些成员与肿瘤发生、神经功能障碍和病原微生物感染的过程直接相关。

[0003] SEPT9 定位于染色体 17q25.3,该染色体区段是散发性卵巢癌和乳腺癌的常见杂合性丢失部位。在卵巢癌,约 70% 的 17q 等位基因丢失为 17q25。KaIikin 等以 17 个微卫星标记确定了卵巢癌 17q 的最小缺失区,并克隆到了一个候选肿瘤抑制基因,命名为, arian/breast (Ov/Br) septin 蛋白 (即 SEPT9)。但是,新近研究又支持 SEPT9 为潜在原癌基因。在 PyV-mT 过渡表达所致的乳腺癌,SKY 和 CGH 检测发现 17q25.3 区有扩增,RT-PCR 证实有 SEPT9 基因表达上调,9 个乳腺癌细胞系中表达也上调。SEPT9 表达上调的乳腺癌细胞系 Thsp-1 和 Bax 下调,细胞凋亡受抑制。siRNA 抑制 septin 9 表达后,细胞凋亡抑制效应解除。7287 例人新鲜组织和 292 个人细胞系的 Affymetrix HG_U133 基因芯片检测结果的分析表明,SEPT9 在乳腺、中枢神经系统、子宫内膜、肾脏、肝、肺、淋巴、食管、卵巢、胰腺、软组织、皮肤、甲状腺等来源的肿瘤中高表达,RT-PCR 与免疫组织化学染色的结果大致与芯片结果一致。最近前列腺癌细胞系体内外实验研究发现,MSF-(SEPT9-vIa) 可以通过抑制缺氧诱导因子 1a (hypo-xia-inducible factor-, HIF1a) 的泛素化降解途径,从而促进 HIF1a 的表达,并促进肿瘤血管形成。该研究为 septin 家族在肿瘤发生、发展中的作用提供了直接证据。

[0004] Septin9 蛋白是一个潜在的重要的肿瘤标志物,但是目前检测 septin9 蛋白的方法复杂且昂贵,因此,需要一种准确快速定量的检测方法满足科学研究已经临床的需要。本发明提供的人 septin9 酶联免疫试剂盒,可以快速准确的检测人血液、组织液等体液中的 septin9 的含量。

发明内容

[0005] 本发明提供一种基于酶联免疫法的 Septin9 检测试剂盒。该试剂盒具有检测灵敏度高,特异性强,操作简单,稳定性好,无污染,重复性好的特点。

[0006] 一种人 septin9 酶联免疫检测试剂盒,主要包括:

[0007] (1) 包被有 septin9 特异性抗体的酶标板;

[0008] (2) 酶标记物 (为酶标记的 septin9 特异性抗体);

[0009] (3)Septin9 标准品溶液；

[0010] (4) 底物显色液；

[0011] (5) 终止液；

[0012] (6) 浓缩洗涤液。

[0013] 本发明提供的 septin9 酶联免疫检测试剂盒,包括包被有 septin9 特异性抗体 I 的酶标板,酶标记物(为酶标记的 septin9 特异性抗体 II)。所述 septin9 特异性 I 和特异性抗体 II 可以为多克隆抗体或单克隆抗体。

[0014] 所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶(HRP)或碱性磷酸酯酶(ALP),其中优选 HRP;酶标记的 septin9 特异性抗体 II 采用戊二醛法或过碘酸钠法将标记酶与抗体偶联得到。

[0015] 所述试剂盒还包括 septin9 标准品溶液、底物显色液、终止液和浓缩洗涤液。

[0016] 所述底物显色液,当标记酶为 HRP 时,底物显色液由显色液 A 和显色液 B 组成,显色液 A 为过氧化氢或过氧化脲,显色液 B 为邻苯二胺或四甲基联苯胺(TMB),所述终止液为 1-2moI/L 硫酸。当标记酶为 ALP 时,底物显色液为对硝基苯磷酸酯缓冲液,所述终止液为 1-2moI/L 氢氧化钠。

[0017] 本发明所述试剂盒中 septin9 标准品溶液 6 瓶,0ng/mL,0.3ng/mL,0.9ng/mL,2.7ng/mL,8.1ng/mL,24.3ng/mL,1mL/瓶。

[0018] 本发明中酶标板的制备过程为:用包被缓冲液将 septin9 特异性抗体 I 稀释成 0.05-0.1 μ g/mL,每孔加入 100uI,用封板膜封闭,4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,倒掉包被液,用洗涤液洗 2 次,拍干,然后每孔中加入 150-200uI 封闭液,37 $^{\circ}$ C 孵育 1-2h,倒掉封闭液拍干,37 $^{\circ}$ C 烘箱干燥 2h,铝箔真空密封保存。

[0019] 其中酶标板制备过程中所用的包被缓冲液为 pH9.6,0.05M 碳酸盐缓冲液;所用封闭液为含有 BSA 1%,小牛血清 20%,叠氮钠 0.05%的 pH 7.4 0.1M 磷酸盐缓冲液。

[0020] 本发明的 septin9 酶联免疫检测试剂盒采用双抗体夹心法定量检测人血清、血浆或尿液中的 septin9。将标准品和样品加入到酶标板的微孔中,再加入酶标抗体室温下孵育 30min,样本中的 septin9 与微孔中抗体及酶标抗体特异性结合,形成双抗体夹心的结构,之后冲洗。再加入显色底物液,底物在酶标抗体上 HRP 或 ALP 作用下,显色 15 分钟,加入终止液中止反应,在酶标仪下 450nm 处读取吸光度,septin9 浓度与吸光度高低呈正比。

[0021] 本发明检测结果分析过程为:以标准品浓度和吸光度值做标准曲线,以标准品浓度为 X 轴,吸光度值为 Y 轴,绘制标准曲线,相应的,根据每个样品吸光度值即可从标准曲线上读出样本中 septin9 的含量。

[0022] 本发明标准曲线绘制也可以采用双对数法,以样品浓度值的对数为 X 轴,以吸光度值的对数 Y 为轴,绘制标准曲线,相应的,根据每个样品吸光度值的对数即可从标准曲线上读出样本中 septin9 浓度值的对数,进而获得其实际浓度。

[0023] 上述 septin9 酶联免疫检测试剂盒与目前通常使用的同类检测试剂盒相比,具有明显的优势。首先,免疫反应由两步变为一步,缩短了免疫结合的时间由 1h 降低为 0.5h。其次,HRP 或 ALP 直接标记 septin9 抗体,由间接法变为直接法,省掉了二抗,降低了生产成本和操作难度。最后,采用单克隆抗体包被微孔板,提高了灵敏度,线性范围大于同类试剂盒,精密度和准确度均在试剂盒要求范围内。血清样本不需稀释,尿液样本不需处理即可直

接加样,操作方法比同类试剂盒简单,一般技术人员即可操作。

附图说明

[0024] 图 1 :septin9 的检测标准曲线。

具体实施方式

[0025] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。

[0026] 实施例 1 试剂盒制备

[0027] 1 septin9 酶标单抗制备

[0028] 采用改良过碘酸钠法。以标记 20mg 单抗为例:准确称取 HRP 40mg,加入 0.2M pH5.6 醋酸缓冲液 2mL,溶解后加入 0.06MNaIO₄溶液 2mL,室温反应 20min。加入 0.16M 乙二醇-10% NaCl 溶液 2mL,室温反应 20min,将酶液装入透析袋中,对 0.001M pH4.0 醋酸盐缓冲液透析过夜;加入 2M pH 9.6 碳酸盐缓冲液 0.8mL,加入 septin9 特异性单抗 II20mg,4℃ 搅拌反应 2h;加入新配制的 5mg/mI NaBH₄ 溶液 0.4mL,4℃ 搅拌反应 2h;滴加饱和硫酸铵溶液 9.2mL,4℃ 搅拌反应 30min,4℃ 3500rpm 离心 20min,弃上清,将沉淀溶于 2mL 0.02M pH7.4 的磷酸盐缓冲液,用 0.02M pH7.4 的磷酸盐缓冲液透析 24h,加 2mI 甘油,混匀后 -20℃ 保存。

[0029] 2 酶标板制备

[0030] 将 septin9 特异性抗体 I 用 pH 9.6 0.02M 碳酸盐缓冲液稀释,终浓度为 5ug/mL。在 96 孔酶标板中每孔加入 100uI 的包被液,2-8℃ 过夜。用 PBST 洗涤液洗涤 4 次,然后每孔加入 200uI 的封闭液(含 BSA 1%,小牛血清 20%,叠氮钠 0.05%的 pH 7.4 0.1M 磷酸盐缓冲液),放入 37℃ 烘箱中 2h,甩去封闭液,干燥后装入铝箔袋 2-8℃ 保存。

[0031] 3 酶标试剂配制

[0032] 配制含有 20%小牛血清、1% BSA 的 pH 7.4 的 0.02M 磷酸盐缓冲液,即为酶标稀释液,用酶标稀释液将实施例 1 中制备的 septin9 抗体酶复合物按照 1 : 1500 稀释,分装后 2-8℃ 保存。

[0033] 4 标准品配制

[0034] 称取一定量 septin9 标准品用空白血清稀释成如下浓度 0ng/mL,0.3ng/mL,0.9ng/mL,2.7ng/mL,8.1ng/mL,24.3ng/mL,分装后 2-8℃ 保存。

[0035] 5 显色剂 A、B,终止液,20X 浓缩洗涤液

[0036] 显色液 A 为 0.05%的过氧化脲溶液。

[0037] 显色液 B 为 0.03%的 TMB 溶液。

[0038] 20X 浓缩洗涤液为 0.2M PBST 溶液。

[0039] 终止液为 2M 硫酸溶液。

[0040] 实施例 2 试剂盒检测方法

[0041] 1 准备:将试剂盒放置于室温下平衡 20min。

[0042] 2 配液:将 50mI 浓缩洗涤液(20X)用蒸馏水稀释至 1000mI 备用。

[0043] 3 加样:分别在相应孔中加入标准品和待测样品 50uI,震荡混匀,然后加入 50uI 酶

标二抗,震荡混匀。

[0044] 4 温育 :用封板膜封板,37℃温育 30min。

[0045] 5 洗涤 :温育后将封板膜揭掉,吸干孔内液体,用稀释好的洗涤液洗涤 4 次。

[0046] 6 显色 :每孔加入显色剂 A、B 液个 50uI,轻轻震荡混匀,用封板膜封板后 37℃温育避光显色 15min。

[0047] 7 终止 :每孔加入终止液 50uI,轻轻震荡混匀。

[0048] 8 测定 :设定酶标仪波长与 450/630nm 检测,测定各孔 OD 值。

[0049] 9 绘制标准曲线 :以标准品浓度为 X 轴,吸光度值为 Y 轴做标准曲线。或者以标准品浓度对数值为 X 轴,吸光度对数值为 Y 轴做标准曲线。以标准曲线 $R^2 \geq 0.98$,且浓度最高标准品吸光度值大于 1.0 为合格的标准曲线,否则重复步骤 1-8。

[0050] 实施例 3 试剂盒最低检出限

[0051] 本实施例检测本发明试剂盒的检出限。具体操作为 :抽取一盒试剂盒,按照实施例 2 的方法检测样品稀释液,重复检测 20 次,计算检测 OD 值的平均值 (M) 和标准差 (SD),计算 $M-2SD$ 的值,将 $M-2SD$ 对应的吸光度值代入标准曲线,计算所得到的浓度值即为试剂盒检出限,经过验证本试剂盒的检出限为 0.01ng/ml。

[0052] 实施例 4 试剂盒特异性

[0053] 本实施例检测本发明试剂盒的特异性。具体操作为 :抽取一盒试剂盒,按照实施例 2 的方法检测 100ng/ml NAGL、100ng/ml C 反应蛋白、100ng/ml 胱抑素 C,检测结果应小于 0.1ng/ml。

[0054] 实施例 5 试剂盒重复性

[0055] 本实施例检测本发明试剂盒的重复性。具体操作为 :抽取一盒试剂盒,按照实施例 2 的方法检测浓度为 1.0ng/ml 的标准品溶液,重复检测 10 次。计算测定结果的平均浓度 (\bar{X}) 和标准差 (S),按照公式 (1) 计算变异系数 (CV),CV 应不高于 10%。

[0056] $CV (\%) = S / \bar{X} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$

[0057]
$$S = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - 1/n(\sum x_i)^2}{n-1}}$$

[0058] $\bar{X} = \sum x_i / n$

[0059] 实施例 6 试剂盒的剂量 - 反应曲线的线性

[0060] 本实施例检测本发明试剂盒的剂量 - 反应曲线的线性。具体操作为 :抽取一盒试剂盒,按照实施例 2 的方法检测浓度为检测浓度为 0ng/ml,0.3ng/ml,0.9ng/ml,2.7ng/ml,8.1ng/ml,24.3ng/ml 的 septin9 测定样品液,每个浓度检测 2 支,记录各浓度水平的测量结果,并计算各浓度水平两次测量值的平均值 (y_i),以浓度值 (x_i) 为自变量,以测定结果均值 (y_i) 为因变量求出线性回归方程。按公式 (2) 计算线性回归的相关系数 (r),r 应 ≥ 0.975 。其中 \bar{x}_i 为 5 个浓度值的平均值 ; \bar{y}_i 为测量值的平均值。

$$[0061] \quad r = \frac{\sum [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}} \dots \dots \dots (2)$$

[0062] 实施例 7 试剂盒稳定性

[0063] 本实施例检测本发明试剂盒的稳定性。具体操作为：将试剂盒 2-8℃ 下放置 1 年，分别在第 1、2、3、6、8、12、15 个月检测，其检出限、特异性、重复性、剂量 - 反应曲线的线性应符合要求。

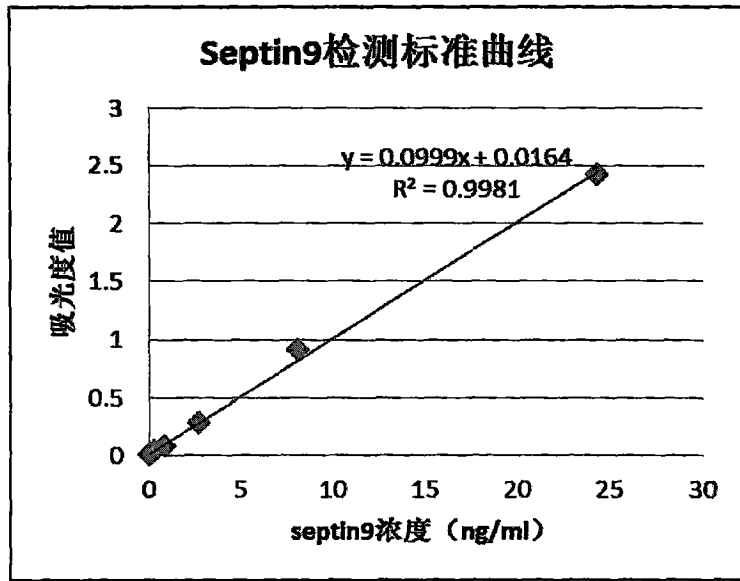


图 1

专利名称(译)	一种基于酶联免疫法的Septin9检测试剂盒		
公开(公告)号	CN106645734A	公开(公告)日	2017-05-10
申请号	CN201510724855.3	申请日	2015-11-02
申请(专利权)人(译)	博格·孙杨		
当前申请(专利权)人(译)	博格·孙杨		
[标]发明人	博格孙杨 李峰 王静 周宇璠		
发明人	博格·孙杨 李峰 王静 周宇璠		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/535 G01N33/6803		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种基于酶联免疫法的Septin9检测试剂盒。一种人septin9酶联免疫检测试剂盒，主要包括：包被有septin9特异性抗体的酶标板；酶标记物(为酶标记的septin9特异性抗体)；Septin9标准品溶液；底物显色液；终止液；浓缩洗涤液。本发明提供的septin9酶联免疫检测试剂盒，包括包被有septin9特异性抗体I的酶标板，酶标记物(为酶标记的septin9特异性抗体II)。所述septin9特异性I和特异性抗体II可以为多克隆抗体或单克隆抗体。所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶(HRP)或碱性磷酸酯酶(ALP)，其中优选HRP；酶标记的septin9特异性抗体II采用戊二醛法或过碘酸钠法将标记酶与抗体偶联得到。所述试剂盒还包括septin9标准品溶液、底物显色液、终止液和浓缩洗涤液。该试剂盒具有检测灵敏度高，特异性强，操作简单，稳定性好，无污染，重复性好的特点。

