



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104198694 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201410479314. 4

(22) 申请日 2014. 09. 18

(71) 申请人 复旦大学附属华山医院
地址 200431 上海市静安区乌鲁木齐中路
12 号

(72) 发明人 邵凌云 高岩 张文宏 吴晶
陈嘉臻

(74) 专利代理机构 上海申新律师事务所 31272
代理人 竺路玲

(51) Int. Cl.
G01N 33/53 (2006. 01)
G01N 33/574 (2006. 01)

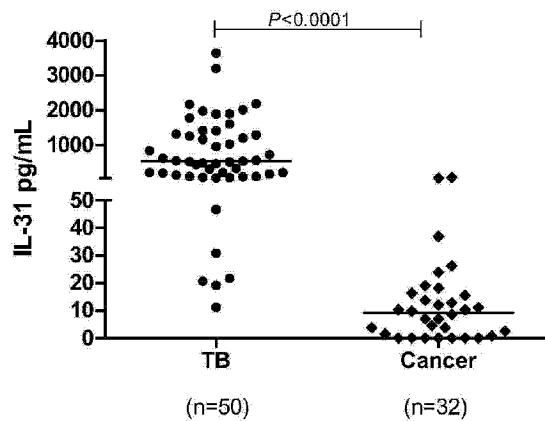
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种诊断试剂盒和使用该试剂盒鉴别结核病与肿瘤的方法

(57) 摘要

本发明提供一种利用 IL-31 鉴别结核病与肿瘤的诊断试剂盒,所述诊断试剂盒包括 IL-31 抗体,通过双抗体夹心酶联免疫吸附法 (ELISA 法) 检测样本中 IL-31 含量鉴别结核病和肿瘤。本发明还提供一种使用上述诊断试剂盒鉴别结核病与肿瘤的方法。采用本发明检测体内积液患者积液中 IL-31 的含量,可快速准确地鉴别结核病与肿瘤,具有较高的敏感性和准确度,可提高鉴别效率。



1. 一种鉴别结核病与肿瘤的诊断试剂盒,其特征在于,该诊断试剂盒包括 IL-31 抗体,通过双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA 法)检测样本中 IL-31 含量鉴别结核病和肿瘤。
2. 根据权利要求 1 所述的诊断试剂盒,其特征在于,所述样本为胸腔积液、腹腔积液等体内积液中的任意一种或多种。
3. 根据权利要求 1 所述的诊断试剂盒,其特征在于,所述诊断试剂盒包括 IL-31 捕获抗体和检测抗体,稀释液、标准品、显色液、终止液、底物、包被缓冲液、洗涤缓冲液中的一种或几种。
4. 一种诊断试剂盒用于鉴别结核病与肿瘤的新用途,其特征在于,该诊断试剂盒包括 IL-31 抗体,通过双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA 法)检测样本中 IL-31 含量鉴别结核病和肿瘤。
5. 根据权利要求 4 所述的新用途,其特征在于,所述样本为胸腔积液、腹腔积液等体内积液中的任意一种或多种。
6. 一种使用诊断试剂盒鉴别结核病与肿瘤的方法,其特征在于,使用权利要求 1-3 所述诊断试剂盒,通过双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA 法)检测样本中 IL-31 含量鉴别结核病和肿瘤。
7. 根据权利要求 6 所述的方法,其特征在于,所述样本为胸腔积液、腹腔积液等体内积液中的任意一种或多种。
8. 根据权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述检测样本中 IL-31 检测值大于等于判定阈值时,则判断为结核病;所述检测样本中 IL-31 检测值小于判定阈值,则判断为肿瘤。
9. 根据权利要求 8 所述的方法,其特征在于,所述判定阈值为 28.59-84.3pg/mL。
10. 根据权利要求 9 所述的方法,其特征在于,所述判定阈值为 67.5pg/mL。

一种诊断试剂盒和使用该诊断试剂盒鉴别结核病与肿瘤的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医疗领域,尤其涉及一种 IL-31 诊断试剂盒和使用该 IL-31 诊断试剂盒鉴别结核病与肿瘤的方法。

背景技术

[0002] 胸腔积液可由多种疾病引起,胸腔积液常见的原因主要包括肿瘤性胸膜转移和结核性胸膜炎及肺部炎症所致。胸腔积液的病因诊断对胸腔积液治疗方法的选择具有极其重要的指导意义。

[0003] 良恶性胸腔积液鉴别一直是临床上的一个难点,恶性胸腔积液与结核性胸腔腹水的鉴别尤为困难,胸腔积液细胞学检查找到肿瘤细胞对恶性胸腔积液有确诊价值,但有时肿瘤细胞与炎性间皮细胞、巨噬细胞等难以鉴别,同时还受诊断者水平和样本采集等因素的影响,其敏感性仅 40% -60%,结核性胸膜炎的诊断主要包括胸水生化检查、结核菌素皮试 (TST)、胸腔积液细菌学检查 (抗酸染色涂片和结核分枝杆菌培养)、胸膜组织病理活检等。但上述检查方法由于其特异性和敏感性均较低,不能满足临床工作需要,因此开发新的快速诊断技术非常必要。

[0004] 中国专利 CN102230903A 公开了一种用于诊断癌性胸腔积液的小分子标记物及其应用,结合核磁共振技术和逐步判别函数分析法筛选出 11 个小分子标记物,尤其乳酸盐、乙酰乙酸盐、氧化三甲胺、甜菜碱和 α -葡萄糖这 5 个小分子标记物,然而这些小分子标记物是通过筛选方法确定,可能会存在漏检、准确率不高等问题,而且无法对结核性胸膜炎进行诊断。

[0005] 结核性胸膜炎伴胸腔积液是临床上最常见的肺外结核,结核分枝杆菌对胸膜的侵犯与迟发型变态反应是结核性胸膜炎发病机制中的两个重要环节。炎症过程使胸膜血管通透性增加,富含蛋白质和特异的淋巴细胞的液体聚集在胸膜腔中,在这一过程中多种 T 细胞亚群参与了结核性胸膜炎的免疫应答反应,包括 Th1、Th2、Th9、Th17、Th22 等,其分泌的 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17、IL-22 等参与结核的免疫应答反应。

[0006] 白介素 31 (interleukin-31, IL-31) 是 2004 年 Dillon 等新近发现的细胞因子。初步研究证实,IL-31 及其受体通过调节免疫、调节细胞增殖等作用发挥其功能。目前研究认为,IL-31 是具有 4 个螺旋结构的单链分子,主要由 CD4+Th2 细胞产生,在生理状态下表达水平较低。IL-31 是通过 IL-31RA 受体——GPL(gp130-like receptor) 与 OSMR 形成的异二聚体进行信号转导的。GPL 属于 I 型细胞因子家族,有研究报道在髓系单核细胞、皮肤、肺与前列的上皮细胞及激活的 CD4+T 细胞,均有 IL-31RA 表达。IL-31 激活同时表达 IL-31RA 和 OSMR 的细胞;IL-31 与 IL-31RA 结合后主要通过 JAK-STAT 通路、MPAK 通路和 PI3-kinase/AKT 来进行信号转导发挥效应。IL-31 受体主要分布在上皮细胞和淋巴细胞,在皮肤及支气管等组织中表达水平较高。在小鼠模型中发现,IL-31 可负向调控 CD4+Th2 细胞因子的分泌。近年来研究发现,IL-31 参与搔痒、秃发症、皮肤损伤、气道超敏反应、特应性皮炎、炎症

性肠病及自身免疫相关性疾病的发病过程。但 IL-31 在结核性胸膜炎免疫发病机制中作用及表达情况目前国内外无相关研究。

发明内容

[0007] 本发明为解决现有技术中的上述问题提出的,其目的是提供一种利用 IL-31 诊断试剂盒鉴别结核病与肿瘤的方法。

[0008] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0009] 本发明的第一个方面是提供一种鉴别结核病与肿瘤的诊断试剂盒,该诊断试剂盒包括 IL-31 抗体,通过双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA 法)检测样本中 IL-31 含量鉴别结核病和肿瘤。

[0010] 优选地,所述样本为胸腔积液、腹腔积液等体内积液中的任意一种或多种,更优选为胸腔积液。

[0011] 优选地,所述诊断试剂盒包括 IL-31 捕获抗体和检测抗体,稀释液、标准品、显色液、终止液、底物、包被缓冲液、洗涤缓冲液中的一种或几种。

[0012] 优选地,所述稀释液包括牛血清白蛋白、冷害鱼皮胶、硫柳汞、磷酸缓冲液中的一种或几种。

[0013] 优选地,所述显色液为辣根过氧化物酶。

[0014] 优选地,所述终止液为稀硫酸溶液。

[0015] 优选地,所述底物包括四甲基联苯胺、磷酸枣柠檬酸、双氧水、蒸馏水中的一种或几种;所述包被缓冲液为磷酸盐、碳酸盐溶液中的一种或几种;所述洗涤缓冲液包括磷酸盐、氯化钠、氯化钾、吐温-20、蒸馏水中的一种或几种。

[0016] 优选地,所述诊断试剂盒还包括固体载体、封板膜。

[0017] 优选地,所述固体载体为 96 孔平底板。

[0018] 本发明的第二个方面是提供一种诊断试剂盒用于鉴别结核病与肿瘤的新用途,该诊断试剂盒包括 IL-31 抗体,通过双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA 法)检测样本中 IL-31 含量鉴别结核病和肿瘤。

[0019] 优选地,所述样本为胸腔积液、腹腔积液等体内积液中的任意一种或多种,更优选为胸腔积液。

[0020] 本发明的第三个方面是提供一种使用上述诊断试剂盒鉴别结核病与肿瘤的方法,通过双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA 法)检测样本中 IL-31 含量鉴别结核病和肿瘤。

[0021] 优选地,所述样本为胸腔积液、腹腔积液等体内积液中的任意一种或多种,更优选为胸腔积液。

[0022] 优选地,所述方法中,所述检测样本中 IL-31 检测值大于等于判定阈值时,则判断为结核病;所述检测样本中 IL-31 检测值小于判定阈值,则判断为肿瘤。其中,所述判定阈值优选为 28.59-84.3pg/mL,更优选为 67.5pg/mL。

[0023] 一种使用 IL-31 诊断试剂盒鉴别结核病与肿瘤的方法,该方法包括以下步骤:

[0024] 步骤(1)、采集例如胸腔积液的体内积液;无菌条件下采集胸腔积液,然后离心分离 5-15 分钟,弃上清,冻存于 -80℃ 备用;

[0025] 步骤(2)、胸腔积液中 IL-31 检测:用如上述的 IL-31 捕获抗体和检测抗体、双抗

体夹心酶联免疫吸附法 (ELISA 法) 检测胸腔积液中 IL-31 含量。

[0026] 优选地,所述步骤 (2) 中包括以下步骤:

[0027] 步骤 (2.1)、IL-31 捕获抗体制备:用包被缓冲液溶解 IL-31 抗体至工作浓度 $0.8 \mu\text{g/mL}$;

[0028] IL-31 检测抗体制备:用稀释液溶解 IL-31 抗体至工作浓度 $0.4 \mu\text{g/mL}$;

[0029] 标准品制备:用稀释液溶解标准品至数个梯度浓度;

[0030] 步骤 (2.2)、包被固体载体:将所述 IL-31 捕获抗体吸附在固体载体表面,室温孵育 12-36 个小时;然后用洗涤缓冲液清洗所述固体载体表面 3 次;再在所述固体载体表面加入稀释液,室温孵育 1-3 个小时;

[0031] 步骤 (2.3)、检测胸腔积液样本:

[0032] 先后将数个梯度浓度的标准品、步骤 (2.1) 制备的 IL-31 检测抗体、显色液、底物、终止液吸附在步骤 (2.2) 得到的固体载体表面,并获取不同标准品浓度的光密度值 (OD 值),以标准品浓度做横坐标、对应 OD 值做纵坐标,绘制标准品回归曲线;

[0033] 将胸腔积液样本用稀释液 1:1 比例稀释样本,然后先后将稀释的样本、步骤 (2.1) 制备的 IL-31 检测抗体、显色液、底物、终止液吸附在步骤 (2.2) 得到的固体载体表面,获取的 OD 值通过所述标准品回归曲线计算出样本浓度,即胸腔积液中 IL-31 的检测值;

[0034] 其中,每吸附一次,都需用洗涤缓冲液清洗所述固体载体表面 3 次,并晾干。

[0035] 以胸腔积液中 IL-31 检测值为 $28.59-84.3\text{pg/mL}$ 、优选 67.5pg/mL 为判定阈值,优选地,若 $\text{IL-31} \geq 67.5\text{pg/mL}$ 则判断为结核病,若 $\text{IL-31} < 67.5\text{pg/mL}$ 则判断为肿瘤,该判定方法的敏感性为 86%,特异性为 100%。

[0036] 本发明采用上述技术方案,与现有技术相比,具有如下技术效果:

[0037] 1) 采用本发明检测胸腔积液患者胸腔积液中 IL-31 检测值,可用于鉴别结核病和肿瘤;

[0038] 2) 采用本发明检测胸腔积液患者胸腔积液中 IL-31 检测值,结核性胸膜炎的诊断有较高的敏感性和准确度;

[0039] 3) 采用本发明检测胸腔积液患者胸腔积液中 IL-31 检测值,操作快速、合理可行,可以提高胸腔积液的诊断效率;

[0040] 4) 采用本发明检测胸腔积液患者胸腔积液中 IL-31 检测值,可用于结核性胸膜炎与肿瘤性胸膜炎的鉴别诊断。

附图说明

[0041] 图 1:用于制备标准曲线的标准品稀释至 8 个梯度浓度的示意图;

[0042] 图 2:8 个梯度浓度标准品对应 OD 值的标准品线性回归曲线;

[0043] 图 3:结核性和肿瘤性胸腔积液中 IL-31 的检测值的统计学结果图;

[0044] 图 4:以 IL-31 的表达水平作为诊断结核性胸膜炎的 ROC 曲线。

具体实施方式

[0045] 本发明提供了一种利用 IL-31 鉴别结核病与肿瘤的诊断试剂盒以及使用该诊断试剂盒鉴别结核病与肿瘤的方法。

[0046] 下面通过具体实施例对本发明进行详细和具体的介绍,以使更好的理解本发明,但是下述实施例并不限制本发明范围。

[0047] 本实施例中,提供一种鉴别结核与肿瘤的诊断试剂盒,该诊断试剂盒包括 IL-31 捕获抗体和检测抗体、稀释液、标准品、显色液、终止液、底物、包被缓冲液、洗涤缓冲液、固体载体、封板膜,其中显色液优选辣根过氧化物酶,终止液优选稀硫酸溶液,底物优选四甲基联苯胺(TMB)溶液,包被缓冲剂优选磷酸盐 PBS 缓冲剂,固体载体优选 96 孔底板。

[0048] 通过双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA 法)检测样本中 IL-31 含量鉴别结核病和肿瘤。所述样本为胸腔积液、腹腔积液等体内积液中的任意一种或多种,更优选为胸腔积液。所述检测样本中 IL-31 检测值大于等于判定阈值时,则判断为结核病;所述检测样本中 IL-31 检测值小于判定阈值,则判断为肿瘤。所述判定阈值为 28.59-84.3pg/mL,更优选为 67.5pg/mL。

[0049] 本实施例中,使用上述诊断试剂盒鉴别结核病与肿瘤的方法,该方法包括如下步骤:

[0050] 步骤 1、采集例如胸腔积液的体内积液:

[0051] 采集包括结核性和肿瘤性胸腔积液样本:

[0052] 结核性胸胸腔积液患者入选标准:(1)胸水为渗出液,普通细菌培养阴性,结核分枝杆菌培养阳性;(2)胸膜组织病理学检查符合结核。符合上述 2 项之一者为确诊结核性胸腔积液患者;(3)符合结核性胸腔积液的临床表现:低热,盗汗,乏力,胸闷,渗出性胸腔积液等且抗结核治疗有效者,为临床诊断结核性胸腔积液患者。

[0053] 非结核性胸腔积液患者入选标准:(1)胸水为渗出液,结核分枝杆菌培养阳性,胸水脱落细胞查见肿瘤细胞;(2)胸膜组织病理学检查排除结核,明确为肿瘤胸膜转移。符合上述 2 项之一者肿瘤性胸腔积液。

[0054] 无菌条件下采集 10ml 胸腔积液,以 300g 10min 离心,留上清分装于冻存管中,冻存于 -80℃ 备用检测。样本避免反复冻融,检测时需在室温下解冻并确保样品均匀地充分解冻。

[0055] 步骤 2、胸腔积液中 IL-31 检测:

[0056] 本实施例提供的诊断试剂盒是应用双抗体夹心酶联免疫吸附方法,检测人胸腔积液中 IL-31 的含量,其它类型标本包括血浆、血清、细胞培养上清和脑脊液等并不推荐应用该试剂盒。

[0057] 步骤 2.1、检测前准备:

[0058] (a). 诊断试剂盒保存在 2-8℃,使用前室温平衡 20 分钟,将所有试剂平衡至室温;

[0059] (b). IL-31 捕获抗体制备:取浓度为 0.2mg/mL 的 IL-31 抗体,用优选地 PH 值为 7.2 的 PBS 包被缓冲液溶解至工作浓度 0.8 μg/mL;

[0060] (c). IL-31 检测抗体制备:取浓度为 0.2mg/mL 的 IL-31 抗体,用优选地 PH 值为 7.2 的 PBS 包被缓冲液溶解至工作浓度 0.4 μg/mL;

[0061] (d). 标准品制备:取浓度为 10 μg/mL 的标准品,用稀释液溶解至 100ng/mL,可参照图 1 进行操作,稀释 8 个梯度浓度制备标准曲线;检测前 15min 配置,最高标准曲线最高浓度优选 8000ng/mL。

- [0062] 待检测样本避免反复冻融,在室温下解冻并确保样品均匀地充分解冻。
- [0063] 步骤 2.2、包被 96 孔板 :
- [0064] (a). 将所述 IL-31 捕获抗体吸附在 96 孔板表面,每孔加入 100 μ L,封板膜封板,室温孵育 12-36 个小时、优选 24 个小时 ;
- [0065] (b). 吸净每孔液体,用洗涤缓冲液 400 μ L 清洗每孔 3 次,每次清洗需彻底吸干或反扣 96 孔板于清洁的吸水纸上扣干残余液体,可替换地使用洗板机进行清洗 ;
- [0066] (c). 每孔加入 300 μ L 稀释液,室温孵育 1-3 个小时、优选 2 个小时 ;
- [0067] (d). 重复步骤 (b),抗体包被结束。
- [0068] 步骤 2.3、检测胸腔积液样本 :
- [0069] (a). 每孔加入 100 μ L、8 个浓度梯度的标准品,封板膜封板,室温孵育 1-3 个小时、优选 2 个小时,洗板两次,吸净每孔液体,用洗涤缓冲液 400 μ L 清洗每孔 3 次,每次清洗需彻底吸干或反扣 96 孔板于清洁的吸水纸上扣干残余液体,可替换地使用洗板机进行清洗 ;
- [0070] (b). 每孔加入 100 μ L 的 IL-31 检测抗体,封板膜封板,室温孵育 1-3 个小时、优选 2 个小时,洗板,吸净每孔液体,用洗涤缓冲液 400 μ L 清洗每孔 3 次,每次清洗需彻底吸干或反扣 96 孔板于清洁的吸水纸上扣干残余液体,可替换地使用洗板机进行清洗 ;
- [0071] (c). 每孔加入显色液辣根过氧化物 100 μ L,封板膜封板,室温避光孵育 20 分钟,洗板,吸净每孔液体,用洗涤缓冲液 400 μ L 清洗每孔 3 次,每次清洗需彻底吸干或反扣 96 孔板于清洁的吸水纸上扣干残余液体,可替换地使用洗板机进行清洗 ;
- [0072] (d). 每孔加入 100 μ L 底物,封板膜封板,室温避光孵育 20 分钟 ;
- [0073] (e). 每孔加入 50 μ L 终止液,轻轻震动 96 孔板,确保混合均匀 ;
- [0074] (f). 15 分钟内在酶标仪上读取每孔的光密度值 (即 OD 值) ;不同浓度的标准品对应 OD 值绘制如图 2 所示的标准品线性回归曲线。
- [0075] 将步骤 2.3(a) 中的“标准品”换成“胸腔积液样本”,对 82 例胸腔积液样本重复操作步骤 2.3 中的各个步骤,最终获取的 OD 值通过图 2 所述的标准品回归曲线计算出样本浓度,即为胸腔积液中 IL-31 的检测值。
- [0076] 步骤 3、诊断结果的判定 :
- [0077] 本实施例提供了一种独立的诊断判定方法,根据胸腔积液中 IL-31 的表达水平对胸腔积液的性质进行鉴别诊断。
- [0078] 以 IL-31 检测值为 67.5pg/mL 为判断阈值,若 IL-31 \geq 67.5pg/mL 则判断为结核性胸腔积液,若 IL-31 < 67.5pg/mL 则判断为肿瘤性胸腔积液,在本实施例的 82 例样本中,使用该判定方法判断结核性胸腔积液的敏感性为 86%,特异性为 100%。
- [0079] 本实施例的 82 例胸腔积液样本通过回归曲线计算出的 IL-31 的检查值绘制在图 3 中,所示横坐标为分组,纵坐标为 IL-31 含量 (pg/mL)。其中 TB(tuberculous) 表示结核性胸腔积液,共 50 例 ;Cancer 表示肿瘤性胸腔积液,共 32 例 ;短线代表中位数,两组比较 $P < 0.0001$,差别具有统计学意义。
- [0080] 图 4 为 IL-31 作为结核性胸膜炎诊断的 ROC 曲线,横坐标为特异性,纵坐标为敏感性, $AUC = 97.9$;其中,ROC 表示受试者工作曲线, AUC 表示曲线下面积。从图中可以看出,敏感性均达到 86% 以上,特异性达到 100%。
- [0081] 可见,采用本发明检测胸腔积液患者胸腔积液中 IL-31 的含量,可快速准确地鉴

别结核性胸膜炎与肿瘤性胸膜炎,具有较高的敏感性和准确度,可提高鉴别效率。

[0082] 以上对本发明的具体实施例进行了详细描述,但其只是作为范例,本发明并不限于以上描述的具体实施例。对于本领域技术人员而言,任何对本发明进行的等同修改和替代也都在本发明的范畴之中。因此,在不脱离本发明的精神和范围下所作的均等变换和修改,都应涵盖在本发明的范围内。

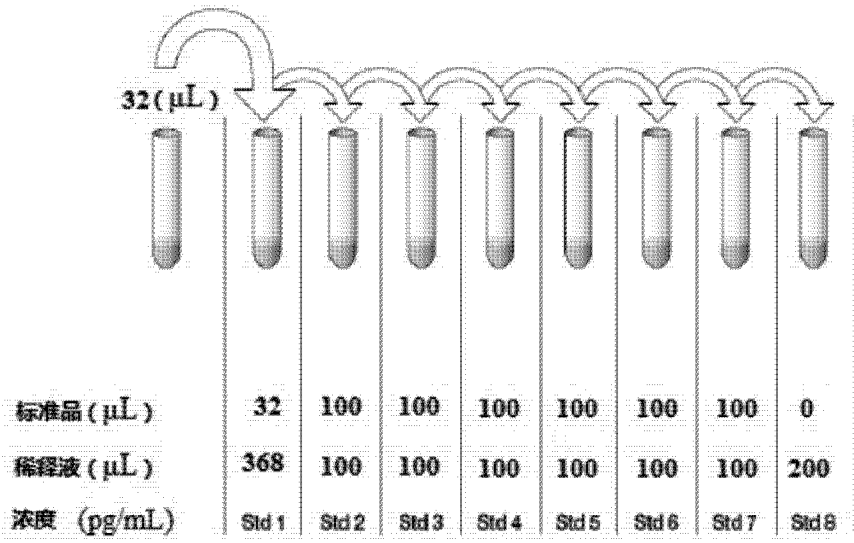


图 1

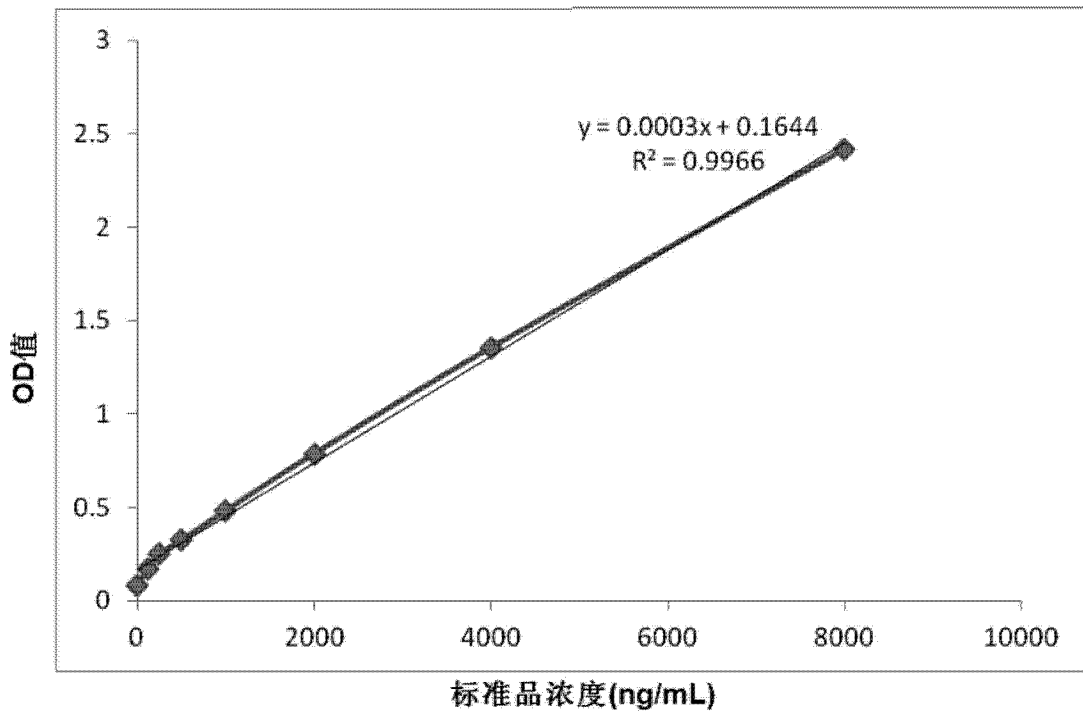


图 2

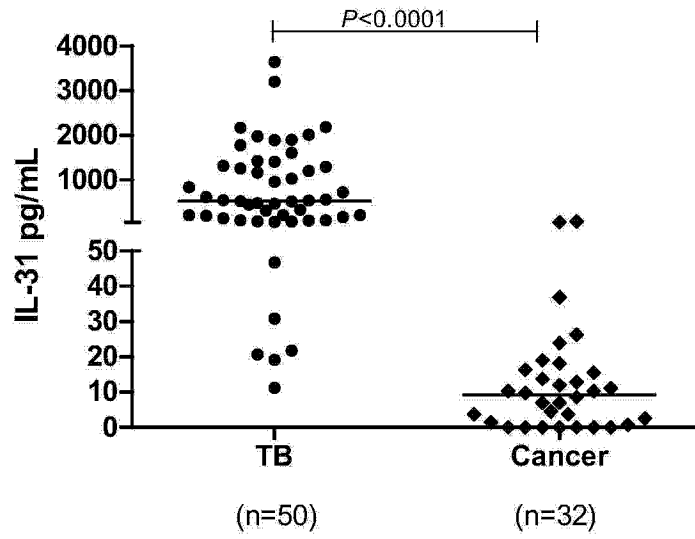


图 3

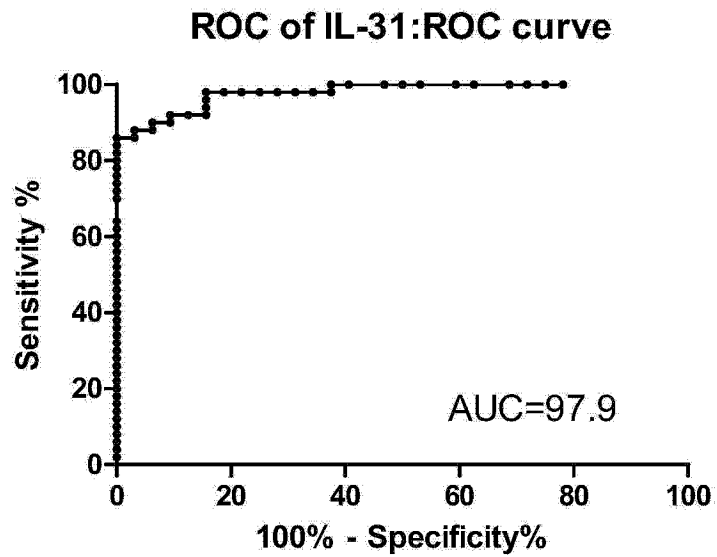


图 4

专利名称(译)	一种诊断试剂盒和使用该诊断试剂盒鉴别结核病与肿瘤的方法		
公开(公告)号	CN104198694A	公开(公告)日	2014-12-10
申请号	CN201410479314.4	申请日	2014-09-18
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院		
申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院		
[标]发明人	邵凌云 高岩 张文宏 吴晶 陈嘉臻		
发明人	邵凌云 高岩 张文宏 吴晶 陈嘉臻		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/57423		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种利用IL-31鉴别结核病与肿瘤的诊断试剂盒，所述诊断试剂盒包括IL-31抗体，通过双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA法)检测样本中IL-31含量鉴别结核病和肿瘤。本发明还提供一种使用上述诊断试剂盒鉴别结核病与肿瘤的方法。采用本发明检测体内积液患者积液中IL-31的含量，可快速准确地鉴别结核病与肿瘤，具有较高的敏感性和准确度，可提高鉴别效率。

