



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110031625 A

(43)申请公布日 2019.07.19

(21)申请号 201910254577.8

(22)申请日 2019.03.31

(71)申请人 苏州市立医院

地址 215000 江苏省苏州市姑苏区道前街
26号

(72)发明人 王建青 樊彩斌 孙健 蔡政
张珂 赵春春

(74)专利代理机构 上海诺衣知识产权代理事务
所(普通合伙) 31298

代理人 衣然

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

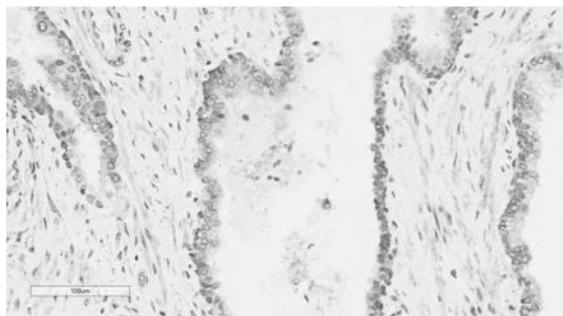
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

包含葡萄糖磷酸变位酶5抗体的检测试剂及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种包含葡萄糖磷酸变位酶5抗体的检测试剂及其应用。本发明提供了一种用于前列腺癌诊断的免疫组化检测试剂,该检测试剂是以一种对人PGM5蛋白特异的抗体作为一抗;以HRP(辣根过氧化物酶)等化学标记物标记的兔二抗作为第二抗体,通过显色等作用来检测待测样品组织细胞内目标抗原(PGM5)的表达量。利用本发明的检测试剂能有效判别组织细胞中PGM5基因在蛋白水平的表达情况,通过检测该组织中PGM5蛋白的表达数量,来判断前列腺癌的诊断,为前列腺癌的早期诊断提供新的依据。



1. 包含葡萄糖磷酸变位酶5 (PGM5) 的抗体的检测试剂。
2. 根据权利要求1所述的检测试剂, 其特征在于, 所述检测试剂包含以对人PGM5蛋白具有特异性的抗体作为一抗, 以化学标记物标记的通用兔二抗作为二抗; 优选的, 所述化学标记物为荧光素、酶、金属离子或同位素; 更优选的, 所述化学标记物为激酶或蛋白酶; 最优选的, 所述化学标记物为辣根过氧化物酶HRP或骨型碱性磷酸酶。
3. 根据权利要求2所述的检测试剂, 其特征在于, 所述人PGM5蛋白的氨基酸序列在GenBank数据库中的编号为NP_068800, 编码所述人PGM5蛋白的核苷酸序列在GenBank数据库中的编号为NM_021965。
4. 根据权利要求1-3任一项所述的检测试剂, 所述PGM5的抗体为商品化的PGM5抗体, 优选的, 所述商品化的PGM5抗体为Novus公司的NBP2-62654抗体。
5. 包含权利要求1-4任一项所述的检测试剂的试剂盒。
6. 根据权利要求5所述的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒还包括封闭液、显色液; 优选的, 所述封闭液为兔血清, 且所述封闭液以PBS按1:20-1:500比例配制, 所述显色液为DAB显色液。
7. 一种葡萄糖磷酸变位酶5 (PGM5) 的抗体在制备检测前列腺癌的免疫组化检测试剂或试剂盒中的应用。
8. 根据权利要求7所述的应用, 其特征在于, 所述葡萄糖磷酸变位酶5 (PGM5) 的抗体采用商品化的PGM5抗体, 优选的, 所述商品化的PGM5抗体为Novus公司的NBP2-62654抗体。
9. 根据权利要求7或8所述的应用, 其特征在于, 所述PGM5为人PGM5。
10. 根据权利要求9所述的应用, 其特征在于, 所述人PGM5蛋白的氨基酸序列在GenBank数据库中的编号为NP_068800, 编码所述人PGM5蛋白的核苷酸序列在GenBank数据库中的编号为NM_021965。

包含葡萄糖磷酸变位酶5抗体的检测试剂及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医学诊断领域,具体而言,涉及包含葡萄糖磷酸变位酶5的检测试剂及其应用。

背景技术

[0002] 前列腺癌(prostate cancer,PCa)是男性泌尿生殖系统最常见的恶性肿瘤之一,在癌症相关死因中位于第六位,全球每年预计新发病例91.4万人,病死例数约25.8万人。前列腺癌发病率在各地区和种族间具有明显的差异性,目前,我国前列腺癌的发病率远低于欧美发达国家,但随着社会老龄化、人们生活方式的改变以及诊断新技术的应用,尤其是前列腺特异性抗原(prostate specific antigen,PSA)检测的引入,我国前列腺癌的发病率增长趋势明显,已被视为常见疾病。PSA通过前列腺导管进入血液和尿液中,在一些病例或生理情况下,进入血液中的PSA会增多,如前列腺炎症、尿潴留、前列腺感染、前列腺增生和前列腺癌等,因此通过检测血清PSA水平来预测前列腺癌具有一定的假阳性率。因此,PSA检查常常导致漏诊或过度诊断,表明通过其预测病理和临床预后的准确性仍然有限。因此,仍然迫切需要新的生物标志物来帮助泌尿科医生改进前列腺癌的检测和预测。

[0003] 葡萄糖磷酸变位酶5(Phosphoglucomutase 5,PGM5),也称为aciculin或PGMPR,是由PGM5基因编码的酶。PGM5与葡萄糖磷酸变位酶1(PGM1)高度同源,但缺乏酶活性。PGM5与肌动蛋白细胞骨架紧密相关,并且主要作为粘附蛋白进行研究。它还可作为肌肉和非肌肉细胞中细胞-基质和细胞-细胞接触的细胞骨架成分。PGM5是我们研究发现的一个新的前列腺癌相关分子,通过前期的研究发现在前列腺癌的发病过程中,PGM5极有可能对癌症的发生、浸润转移等病理过程进行密切的调节,并有可能成为肿瘤发生及临床进展判断的标志蛋白。目前尚未有专利或文章公开PGM5能够诊断前列腺癌,及其与前列腺癌的关系,更未透露其与前列腺癌早期诊断的关联。有鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0004] 发明要解决的问题

为解决背景技术中提到的问题,本发明目的在于提供一种新的可以作为前列腺癌早期诊断标志物的蛋白及其片段的免疫组化检测试剂。从而通过前列腺癌组织中PGM5的蛋白表达水平的高低指示受试者是否罹患前列腺癌,实现前列腺癌早期诊断,提高前列腺癌早期诊断的灵敏度和特异性。

[0005] 为实现本发明的上述目的,本发明采用以下技术方案:

用于解决问题的方案

本发明的目的之一在于提供一种包含葡萄糖磷酸变位酶5(PGM5)的抗体的检测试剂,所述检测试剂包含以对人PGM5蛋白具有特异性的抗体作为一抗;以化学标记物标记的通用兔二抗作为二抗;优选的,所述化学标记物为荧光素、酶、金属离子或同位素;更优选的,所述化学标记物为激酶或蛋白酶;最优选的,所述化学标记物为辣根过氧化物酶HRP或骨型碱

性磷酸酶。所述免疫组化检测试剂通过显色等作用来检测待测样品组织细胞内目标抗原(PGM5)的表达量。

[0006] 其中,所述人PGM5蛋白的氨基酸序列在GenBank数据库中的编号为NP_068800,编码所述人PGM5蛋白的核苷酸序列在GenBank数据库中的编号为NM_021965。

[0007] 在本发明具体的实施例中,所述PGM5的抗体为商品化的PGM5抗体,优选的,所述商品化的PGM5抗体为Novus公司的NBP2-62654抗体。

[0008] 本发明的另一目的在于提供一种包含上文所述的检测试剂的试剂盒,所述试剂盒还包括封闭液、显色液;优选的,所述封闭液为兔血清,且所述封闭液以PBS按1:20-1:500比例配制,所述显色液为DAB显色液。

[0009] 本发明的又一目的在于提供一种葡萄糖磷酸变位酶5(PGM5)的抗体在制备检测前列腺癌的免疫组化检测试剂或试剂盒中的应用,其中,所述葡萄糖磷酸变位酶5(PGM5)的抗体采用商品化的PGM5抗体,优选的,所述商品化的PGM5抗体为Novus公司的NBP2-62654抗体。

[0010] 其中,所述PGM5为人PGM5;优选的,所述人PGM5蛋白的氨基酸序列在GenBank数据库中的编号为NP_068800,编码所述人PGM5蛋白的核苷酸序列在GenBank数据库中的编号为NM_021965。

[0011] 发明的效果

由本发明的试验结果可见,本发明的技术方案与现有技术相比,具有以下有益效果:

本发明公开了一种用于前列腺癌诊断和预后判断的免疫组化检测试剂,所述检测试剂采用对人PGM5蛋白特异的抗体作为一抗,以辣根过氧化物酶HRP标记的通用兔二抗作为第二抗体,通过显色等作用来检测待测样品组织细胞内目标抗原(PGM5)的表达量,能有效判别组织细胞中PGM5基因在蛋白水平的表达情况,通过检测该组织中PGM5蛋白的表达数量,来判断前列腺癌的诊断,为前列腺癌的早期诊断提供新的依据。

[0012] 为了让本发明的上述和其他目的、特征和优点能更明显易懂,下面特举较佳实施例,并配合说明书附图,作详细说明。

附图说明

[0013] 图1示出了PGM5在正常/癌旁前列腺组织细胞中的表达水平较高。

[0014] 图2示出了PGM5在前列腺癌组织细胞中的表达水平较低。

具体实施方式

[0015] 我们通过对239例前列腺组织芯片(包括正常/癌旁组织及前列腺癌组织)的免疫组化染色分析发现PGM5在大部分的前列腺癌组织中不表达或低表达,而在正常/癌旁组织中高表达,表明PGM5可以成为诊断前列腺癌的筛选蛋白:即在前列腺组织中表达程度越低,是前列腺癌的可能性越大(见表1)。

表 1. PGM5 表达水平与前列腺癌发生之间的关系

组织类型	例数	例数 (占组内百分比)		P Value
		低表达	高表达	
正常/癌旁组织	120	19 (15.8%)	101 (84.2%)	<0.0001
前列腺癌组织	119	102 (85.7%)	17 (14.3%)	

[0016] 在上述研究结果的基础上,我们又进行了以下验证试验:

实施例1

前列腺组织切片的制作及检测

1、取前列腺组织病理石蜡切片;

2、烘片:将组织切片放入烘箱中,温度调至63度,烘蜡一小时;

3、脱蜡:片子烘烤完成后,从烘箱内取出,放入全自动染色机中,进行脱蜡;脱蜡过程如下:

二甲苯两缸,每缸15分钟;

无水乙醇两缸,每缸7分钟;

90%酒精1缸,5分钟;

80%酒精1缸,5分钟;

70%酒精1缸,5分钟;

4、抗原修复:从染色机中取出切片,用纯水冲洗3次,每次不少于1分钟。冲洗过程中将抗原修复液放至电磁炉上开始加热;

抗原修复液(10mM pH 6.0枸橼酸钠缓冲液)的配制

(1)储备液的配制:

A液:枸橼酸三钠-2H₂O 29.41g +蒸馏水1000ml

B液:枸橼酸 21g +蒸馏水1000ml

(2)工作液的配制:A液82ml + B液18ml +蒸馏水900ml

将切片放入抗原修复液中,淹没切片,盖上锅盖,高压锅内煮沸,上汽3分钟后缓慢冷却;

5、封闭:使用正常兔血清作为封闭液,将封闭液滴在切片上,37℃,计时10-15分钟;

6、加入一抗:取出切片,用PBS缓冲液冲洗3次,一次1分钟;冰箱中取出Novus公司的NBP2-62654抗体作为一抗,放入离心机里7200转离心30秒~1分钟;取出一抗,按照1:200~1:500的稀释度用抗体稀释液稀释,滴加一抗,室温孵育,计时30分钟或4度冰箱过夜;

7、加入HRP标记的兔二抗:将切片用PBS缓冲液冲洗3次,一次1分钟;若是4度过夜的切片,在进行实验之前,切片需在室温复温30分钟以上后经PBS冲洗液冲洗;滴加二抗工作液(用PBS以1:500的比例配制),室温孵育,计时30分钟;时间到后用PBS冲洗3次,每次不少于1分钟;

8、DAB显色

从冰箱里取出罗氏公司的辣根过氧化氢酶DAB显色试剂盒,按1ml DAB稀释液+1滴DAB色

原进行配制；在切片上滴加稀释后的DAB，观察显色强度，最长显色5分钟，到时有自来水冲洗5分钟；

9、苏木素复染、封片

在切片上滴加哈氏苏木素1分钟，时间到后在0.25%的盐酸酒精中浸没不少于2秒，用自来水冲洗大于2分钟，室温晾干后封片；

镜检结果如图1所示。可见该组织切片中PGM5的表达程度较高，有明显棕黄色颗粒，为PGM5检测阳性结果，后经病理检测结果为正常/癌旁前列腺组织。

[0017] 实施例2

前列腺肿瘤组织切片的制作及检测

1、取前列腺组织病理石蜡切片；

2、烘片：将组织切片放入烘箱中，温度调至63度，烘蜡一小时；

3、脱蜡：切片烘烤完成后，从烘箱内取出，放入全自动染色机中，进行脱蜡；脱蜡过程如下：

二甲苯两缸，每缸15分钟；

无水乙醇两缸，每缸7分钟；

90%酒精1缸，5分钟；

80%酒精1缸，5分钟；

70%酒精1缸，5分钟；

4、抗原修复：从染色机中取出切片，用纯水冲洗3次，每次不少于1分钟。冲洗过程中将抗原修复液放至电磁炉上开始加热；

抗原修复液(10mM pH 6.0枸橼酸钠缓冲液)的配制

(1) 储备液的配制：

A液：枸橼酸三钠-2H₂O 29.41g +蒸馏水1000ml

B液：枸橼酸 21g +蒸馏水1000ml

(2) 工作液的配制：A液82ml + B液18ml +蒸馏水900ml

将切片放入抗原修复液中，淹没切片，盖上锅盖，高压锅内煮沸，上汽3分钟后缓慢冷却；

5、封闭：使用正常兔血清作为封闭液，将封闭液滴在切片上，37℃，计时10-15分钟；

6、加入一抗：取出切片，用PBS缓冲液冲洗3次，一次1分钟；冰箱中取出Novus公司的NBP2-62654抗体作为一抗，放入离心机里7200转离心30秒~1分钟；取出一抗，按照1:200~1:500的稀释度用抗体稀释液稀释，滴加一抗，室温孵育，计时30分钟或4度冰箱过夜；

7、加入HRP标记的兔二抗：将切片用PBS缓冲液冲洗3次，一次1分钟；若是4度过夜的切片，在进行实验之前，玻片需在室温复温30分钟以上后经PBS冲洗液冲洗；滴加二抗即用工作液(用PBS以1:500的比例配制)，室温孵育，计时30分钟；时间到后用PBS冲洗3次，每次不少于1分钟；

8、DAB显色

从冰箱里取出罗氏公司的辣根过氧化氢酶DAB显色试剂盒，按1ml DAB稀释液+1滴DAB色原进行配制；在切片上滴加稀释后的DAB，观察显色强度，最长显色5分钟，到时有自来水冲洗5分钟；

9、苏木素复染、封片

在切片上滴加哈氏苏木素1分钟,时间到后在0.25%的盐酸酒精中浸没不少于2秒,用自来水冲洗大于2分钟,室温晾干后封片。

[0018] 镜检结果如图2所示。可见该组织切片中PGM5的表达程度较低,无明显棕黄色颗粒,为PGM5检测阴性结果,后经病理检测结果为前列腺癌。

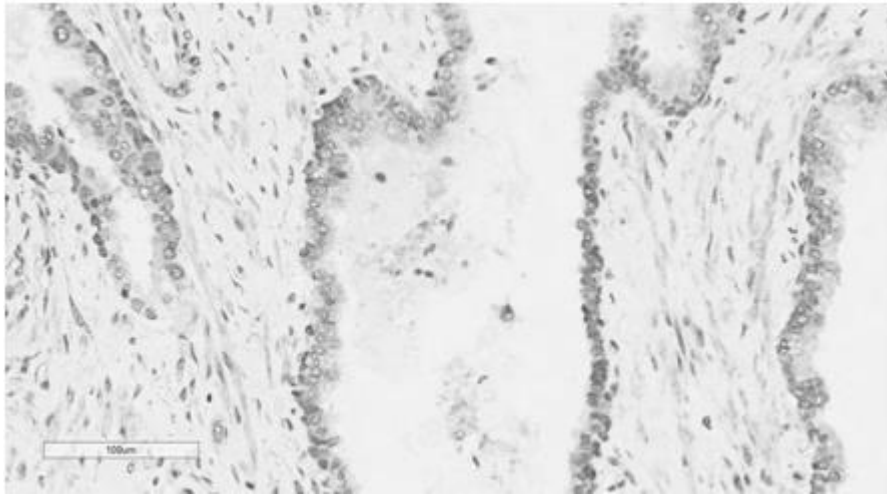


图1

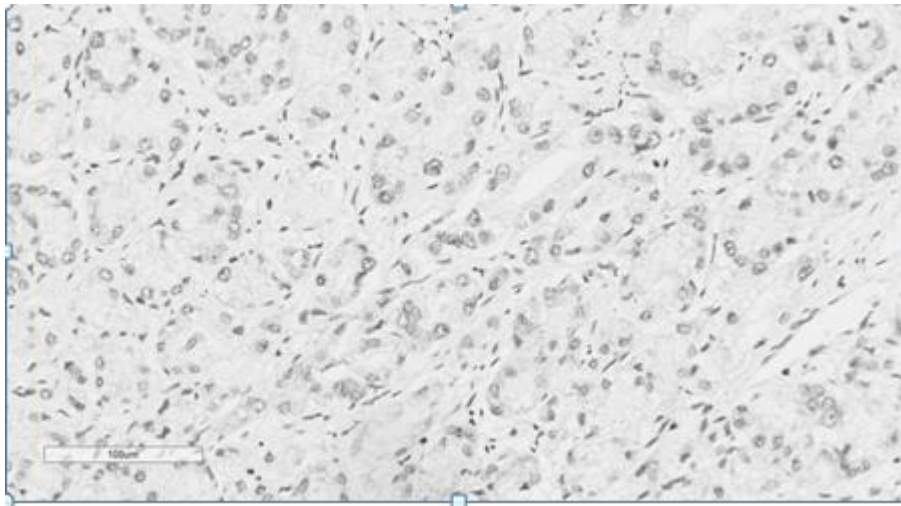


图2

专利名称(译)	包含葡萄糖磷酸变位酶5抗体的检测试剂及其应用		
公开(公告)号	CN110031625A	公开(公告)日	2019-07-19
申请号	CN201910254577.8	申请日	2019-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	苏州市立医院		
申请(专利权)人(译)	苏州市立医院		
当前申请(专利权)人(译)	苏州市立医院		
[标]发明人	王建青 孙健 蔡政 张珂 赵春春		
发明人	王建青 樊彩斌 孙健 蔡政 张珂 赵春春		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/57434		
代理人(译)	衣然		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种包含葡萄糖磷酸变位酶5抗体的检测试剂及其应用。本发明提供了一种用于前列腺癌诊断的免疫组化检测试剂，该检测试剂是以一种对人PGM5蛋白特异的抗体作为一抗；以HRP（辣根过氧化氢酶）等化学标记物标记的兔二抗作为第二抗体，通过显色等作用来检测待测样品组织细胞内目标抗原(PGM5)的表达量。利用本发明的检测试剂能有效判别组织细胞中PGM5基因在蛋白水平的表达情况，通过检测该组织中PGM5蛋白的表达数量，来判断前列腺癌的诊断，为前列腺癌的早期诊断提供新的依据。

