



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106093432 A

(43)申请公布日 2016. 11. 09

(21)申请号 201610412943.4

(22)申请日 2016.06.13

(71)申请人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明南路422号

(72)发明人 王团老 胡修永 洪万进

(74)专利代理机构 长沙星耀专利事务所 43205

代理人 许伯严

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

基于联合检测FGF1、FGF10和IL6的乳腺癌诊断试剂盒

(57)摘要

本发明提供一种基于联合检测成纤维细胞生长因子FGF1、FGF10和白介素IL6的乳腺癌诊断试剂盒,属于蛋白质检测领域。所述乳腺癌诊断试剂盒包括定量检测FGF1、FGF10和白介素IL6的试剂。本发明还请求保护所述试剂盒的制备方法。采用本发明所述的试剂盒进行乳腺癌临床诊断,具有操作方便、成本较低、特异性和准确性好等优点。

1. 一种乳腺癌诊断试剂盒,其特征在于,包括定量联合检测FGF1、FGF10和IL6的试剂。
2. 根据权利要求1所述的乳腺癌诊断试剂盒,其特征在于,所述试剂指,FGF1、FGF10和IL6的抗体。
3. 根据权利要求2所述的乳腺癌诊断试剂盒,其特征在于,所述抗体为FGF1、FGF10和IL6的鼠单克隆抗体或兔多克隆抗体。
4. 根据权利要求3所述的乳腺癌诊断试剂盒,其特征在于,所述抗体的工作浓度范围:0.1 μ g/ml-1.0 μ g/ml。
5. 根据权利要求1-4所述的乳腺癌诊断试剂盒,其特征在于,还包括酶联免疫吸附试验所用的常规试剂。
6. FGF1、FGF10和IL6的抗体在制备乳腺癌诊断试剂盒方面的用途。
7. 一种乳腺癌诊断试剂盒的制备方法,其特征在于,组装所述试剂盒的试剂中包括FGF1、FGF10和IL6的抗体;和/或在标有乳腺癌诊断用途的包装盒内放置有FGF1、FGF10和IL6的抗体。
8. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,所述抗体为FGF1、FGF10和IL6鼠单克隆抗体或兔多克隆抗体。
9. 根据权利要求8所述的制备方法,其特征在于,所述抗体的浓度范围:0.1 μ g/ml-1.0 μ g/ml。
10. 根据权利要求7-9任一所述的制备方法,其特征在于,组装所述试剂盒的试剂中还包包括酶联免疫吸附试验所用的常规试剂;和/或在标有乳腺癌诊断用途的包装盒内还放置有酶联免疫吸附试验所用的常规试剂。

基于联合检测FGF1、FGF10和IL6的乳腺癌诊断试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于蛋白检测领域,具体涉及一种基于联合检测FGF1、FGF10和IL6的乳腺癌诊断试剂盒。

背景技术

[0002] 女性乳腺是由皮肤、纤维组织、乳腺腺体和脂肪组成的,乳腺癌是发生在乳腺腺上皮组织的恶性肿瘤。全球乳腺癌发病率自20世纪70年代末开始一直呈上升趋势。美国8名妇女一生中就会有1人患乳腺癌。中国不是乳腺癌的高发国家,但不宜乐观,近年我国乳腺癌发病率的增长速度却高出高发国家1~2个百分点。据国家癌症中心和卫生部疾病预防控制局2012年公布的2009年乳腺癌发病数据显示:全国肿瘤登记地区乳腺癌发病率位居女性恶性肿瘤的第1位,女性乳腺癌发病率(粗率)全国合计为42.55/10万,城市为51.91/10万,农村为23.12/10万。乳腺癌已成为当前社会的重大公共卫生问题。

[0003] 成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor 1,FGF1)是一个16.0KD的蛋白,FGF1与FGFs家族中其他成员不同,是在应激条件下分泌的。它的生物学功能相当广泛,在肿瘤的发生、血管生成、组织和器官发育、伤口愈合和血细胞生成等方面都有着重要的作用。在细胞的层次上,可以调控细胞的分化、生长、迁移、增殖和不同细胞的存活率。而且FGF1不只是可以通过细胞表面的受体传递信号进细胞内,还可以透过细胞膜进入细胞内发挥作用。

[0004] 成纤维细胞生长因子10(fibroblast growth factor 10,FGF10)是一种碱性蛋白,是FGF7亚家族中的一员,与FGF7具有高度的同源性,又被称作角化细胞生长因子2(KGF2)。最开始在鼠的肺间质中分离出来,被叫做源于间质的生长因子。人体的FGF10含有84-246个氨基酸残基,是细胞外区域蛋白,重组的FGF10含有170个氨基酸残基,大小在19.3KD。体内表达FGF10的地方主要有:成年肝、肠、肺等器官以及胚胎间质细胞、上皮细胞和成纤维细胞。它的作用主要是:组织器官的形成发育;组织的修复;伤口愈合;胚胎发育;血管生成等方面。有过的它与乳腺癌的关系也只是在细胞的层面上,并没有证据表明其与临床病情有关。

[0005] 白介素-6(interleukin-6,IL6)是一个30KD的多功能性的糖蛋白。主要是由T细胞,B细胞,内皮细胞,成纤维细胞,巨噬细胞和上皮细胞分泌产生。它参与到与受伤和炎症相关的急性反应调控。白介素6是免疫反应,造血系统,和急性反应的一个多功能调节因子,已经有报道其能够调节细胞增殖。IL6促进造血细胞,角质细胞,骨髓瘤/浆细胞瘤,和卡波西肉瘤细胞的增殖,然而它却抑制M1骨髓白血病细胞,早期的黑素瘤细胞和肺癌、乳腺癌细胞的增值。

[0006] 现有技术中常用的乳腺癌诊断标志物有CEA(癌胚抗原)、CA153等,这些都不是乳腺癌特异性标志物,在乳腺癌诊断中缺乏特异性。本发明基于联合检测FGF1、FGF10和白介素IL6,提高乳腺癌诊断的特异性和准确率,本领域尚未见此类报道。

[0007] 本领域尚需开发出CEA、CA153以外的,更多可用于诊断乳腺癌的标志物及试剂盒,

以丰富乳腺癌临床诊断指标,增加可选择空间。

发明内容

[0008] 基于本领域如上所述的乳腺癌诊断可用指标少的局限和不足,本发明提供一种全新的乳腺癌诊断方法:同时以FGF1、FGF10和IL6为检测标志物的乳腺癌诊断试剂盒。

[0009] 本发明的技术方案如下:

[0010] 一种乳腺癌诊断试剂盒,其特征在于,包括定量联合检测FGF1、FGF10和IL6的试剂。

[0011] 所述试剂指,FGF1、FGF10和IL6的抗体。

[0012] 所述抗体为FGF1、FGF10和IL6的鼠单克隆抗体或兔多克隆抗体。

[0013] 所述抗体的工作浓度范围:0.1 μ g/ml-1.0 μ g/ml。

[0014] 所述乳腺癌诊断试剂盒,还包括酶联免疫吸附试验所用的常规试剂。

[0015] FGF1、FGF10和IL6的抗体在制备乳腺癌诊断试剂盒方面的用途。

[0016] 一种乳腺癌诊断试剂盒的制备方法,其特征在于,组装所述试剂盒的试剂中包括FGF1、FGF10和IL6的抗体;和/或

[0017] 在标有乳腺癌诊断用途的包装盒内放置有FGF1、FGF10和IL6的抗体。

[0018] 所述抗体为FGF1、FGF10和IL6鼠单克隆抗体或兔多克隆抗体。

[0019] 所述抗体的浓度范围:0.1 μ g/ml-1.0 μ g/ml。

[0020] 组装所述试剂盒的试剂中还包括酶联免疫吸附试验所用的常规试剂;和/或

[0021] 在标有乳腺癌诊断用途的包装盒内还放置有酶联免疫吸附试验所用的常规试剂。

[0022] 本发明请求保护一种乳腺癌诊断试剂盒,其特点是,包括联合定量检测FGF1、FGF10和IL6的试剂。本发明开创性地同时以FGF1、FGF10和IL6做为乳腺癌诊断的标志物,并且通过大量临床血样检测,验证了FGF1、FGF10和IL6在血液中的浓度在表征乳腺癌发生方面的相关性,并进一步通过与现有常用标志物CEA进行对比,证实了FGF1、FGF10和IL6联用在临床诊断乳腺癌方面的准确性可高达90%。

[0023] 在本发明一些具体的实施例中,所述试剂为FGF1、FGF10和IL6的抗体。本领域可用于定量检测FGF1、FGF10和IL6的方法和试剂有很多,并不仅限于本发明实施例中采用的ELISA方法及其所采用的试剂,还可以是蛋白免疫印迹法及其采用的试剂,或其它常用蛋白检测方法。在本发明的启示下,本领域技术人员可采用其它手段对血样中的FGF1、FGF10和IL6浓度进行定量检测。因此,在用于诊断乳腺癌的试剂盒中包括了任何定量检测FGF1、FGF10和IL6的试剂,均落入本发明的保护范围。

[0024] 在本发明进一步的实施例中,所述抗体为FGF1、FGF10和IL6的鼠单克隆抗体或兔多克隆抗体,均可从商业途径获得。采用该抗体的好处在于:特异性强、吸附性好,结合率高。

[0025] 在本发明一些优选的实施例中,所述抗体的工作浓度为:0.1 μ g/ml-1.0 μ g/ml。本领域技术人员熟知,抗体抗原结合时,无论是抗体还是抗原,分子的空间构象都会发生一定程度的改变,从而影响分子间的进一步结合、偶联或吸附,因此,在样品中抗原浓度稳定的情况下,控制好抗体的工作浓度显得尤为重要,抗体浓度太高,可能会造成非特异性结合;抗体浓度太低,可能会造成结合效率低下;太高或太低都会影响FGF10浓度检测结果的准确

性。为了保证抗原抗体结合的特异性、结合效率、以及检测结果的准确性,本发明特地探究了FGF10抗体的工作浓度,发现浓度处于 $0.1\mu\text{g}/\text{mI}$ - $1.0\mu\text{g}/\text{mI}$ 这个范围时,结合效率最高,结果也最准确。

[0026] 为保证试剂盒的完整度,本发明的另一些优选的实施例中的所述试剂盒还包括酶联免疫吸附试验所用的常规试剂。所述常规试剂包括:96/48孔板酶标检测板或8孔/12孔微孔板条、TMB底物显色液、洗涤液、终止液、稀释液。采用这些常规试剂,与上述浓度的抗体一起对血液样品中的FGF1、FGF10和IL6浓度进行检测,进而诊断出 样品对应的临床个体是否患有乳腺癌。

[0027] 本发明还请求保护FGF1、FGF10和IL6在制备乳腺癌诊断试剂盒方面的用途。

[0028] 在一些国家专利法允许的情形下,本发明还请求保护:FGF1、FGF10和IL6和/或所述试剂盒在乳腺癌临床诊断方面的用途。当某血样中检出的FGF1的浓度高于 $100\text{pg}/\text{mL}$,而FGF10和IL6的浓度均高于 $300\text{pg}/\text{mL}$ 时,说明该血样对应的临床个体患有乳腺癌,反之则为良性或健康。

[0029] 本发明还请求保护一种乳腺癌诊断试剂盒的制备方法,其特征在于,组装所述试剂盒的试剂中包括FGF1、FGF10和IL6的抗体;和/或,在标有乳腺癌诊断用途的包装盒内放置有FGF1、FGF10和IL6的抗体。

[0030] 进一步地,组装所述试剂盒的试剂中还包括酶联免疫吸附试验所用的常规试剂;和/或,在标有乳腺癌诊断用途的包装盒内还放置有酶联免疫吸附试验所用的常规试剂。本领域可用于定量检测FGF1、FGF10和IL6的方法和试剂有很多,并仅限于本发明实施例中采用的ELISA方法及其所采用的试剂。在本发明的启示下,本领域技术人员可采用其它手段对血样中的FGF1、FGF10和IL6浓度进行定量检测。因此,在乳腺癌诊断试剂盒制备过程中采用任何定量检测FGF1、FGF10和IL6的试剂,或在任何标有乳腺癌诊断用途的包装盒内放入任何定量检测FGF1、FGF10和IL6的试剂,均落入本发明的保护范围。

[0031] 采用FGF1、FGF10和IL6和/或本发明所述的试剂盒进行乳腺癌诊断,具有操作方便、成本较低、准确性好等优点。同时,本发明的建立也为乳腺癌诊断领域提供了新的诊断标志物,拓宽了诊断指标的可选择空间。

附图说明

[0032] 图1血清样本中检测FGF10的浓度。

[0033] 图2血清样本中检测FGF1。

[0034] 图3血清样本中检测IL6。

具体实施方式

[0035] 下面结合具体实施例对本发明的内容做进一步的详细描述,但并不以此限制本发明的保护范围。以下实施例中所用的试剂和材料,如无特殊说明,均可 商购获得;实验步骤如无特殊说明,均为本领域常规操作。

[0036] 生物材料来源

[0037] 本发明实施例所用的人血样来自于厦门大学第一附属医院。

[0038] 实施例1、本发明所述标志物的选择与验证

[0039] FGF10的检测用到的是Uscn公司的ELISA试剂盒。从图1我们可以很明显的看出三组样本之间存在的差异,健康者的血清FGF10浓度在104-135pg/mL,良性肿瘤的血清中的浓度在158-208pg/mL之间,恶性肿瘤的血清中的浓度在318-575pg/mL。统计分析显示良性vs恶性 $P=0.004<0.05$,恶性vs健康 $P=0.0121<0.05$ 都有显著性差异。

[0040] 实施例2、本发明所述的试剂盒及其制备

[0041] 本实施例提供一种乳腺癌诊断试剂盒,其包括定量检测纤维母细胞生长因子10的试剂。

[0042] 具体地,所述试剂为纤维母细胞生长因子10的抗体。

[0043] 进一步地,所述乳腺癌诊断试剂盒还包括酶联免疫吸附试验所用的常规试剂。

[0044] 本实施例还提供一种乳腺诊断试剂盒的制备方法,包括如下步骤:将纤维母细胞生长因子10的抗体组装至所述试剂盒中;和/或

[0045] 在标有乳腺癌诊断用途的包装盒内放置有纤维母细胞生长因子10的抗体。

[0046] 所述步骤进一步包括:组装所述试剂盒的试剂中还包括酶联免疫吸附试验所用的常规试剂;和/或

[0047] 在标有乳腺癌诊断用途的包装盒内还放置有酶联免疫吸附试验所用的常规试剂。

[0048] 具体地,上面所述的抗体优选为FGF1、FGF10和IL6的鼠单克隆抗体或兔多克隆抗体。

[0049] 所述抗体的工作浓度优选采用如下范围:0.1 μ g/mL-1.0 μ g/mL。

[0050] 实施例3、采用本发明所述的试剂盒进行乳腺癌诊断

[0051] 如图1-图3所示,通过检测健康、良性、恶性三组的血清样本中IL6,IL9,IL21,FGF1,FGF10,FGF14的浓度,最终我们选取了在大部分样本中都能检测到并且在恶性患者与健康对照组之间有显著性差异的IL6,FGF1,FGF10作为诊断乳腺癌的标志物。另外我们还在血清中检测了现在已经被认可的肿瘤标志物CEA作为阳性对照,数据表明,在检测CEA被确定为乳腺癌的1号、545400号、50号、48号的样本中,其FGF1,FGF10或者IL6浓度也是相当高的。并且在CEA浓度显示为正常范围内的39号,45号,494969号,349922号样本,通过我们检测IL6,FGF1,FGF10其中的一项或两项也是高于正常人的。文章报道的乳腺癌病人中有60%的样本CEA浓度高于正常值。我们把三种分泌蛋白的检测结果中浓度值高于健康和良性组非常明显的作为阳性计算,结果显示符合率至少在73.3%以上。我们还通过对分泌蛋白IL6,FGF1和FGF10进行联合检测,比较了与CEA诊断的符合率,发现IL6,FGF1和FGF10三者联合检测,可获得更高的乳腺癌诊断的准确率,高达90%。进而也提供一种基于IL6,FGF1和FGF10三者联合检测的乳腺癌诊断方法,特征是,如果血样中FGF1的浓度高于100pg/mL,而FGF10和IL6的浓度均高于300pg/mL时,则该血样对应的临床个体可被诊断为乳腺癌,反之则为良性或健康。

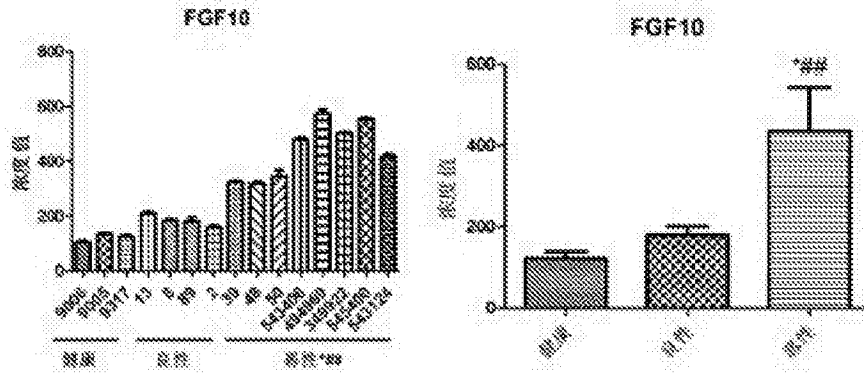


图1

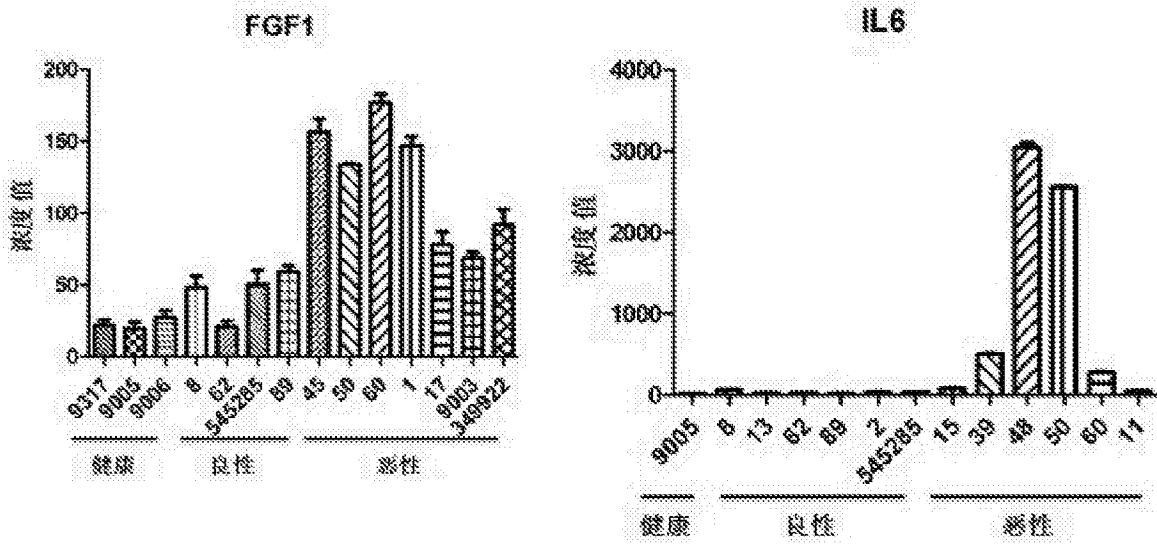


图2

图3

专利名称(译)	基于联合检测FGF1、FGF10和IL6的乳腺癌诊断试剂盒		
公开(公告)号	CN106093432A	公开(公告)日	2016-11-09
申请号	CN201610412943.4	申请日	2016-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	厦门大学		
申请(专利权)人(译)	厦门大学		
当前申请(专利权)人(译)	厦门大学		
[标]发明人	王团老 胡修永 洪万进		
发明人	王团老 胡修永 洪万进		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/574 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/6803 G01N33/531 G01N33/57484		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种基于联合检测成纤维细胞生长因子FGF1、FGF10和白介素IL6的乳腺癌诊断试剂盒，属于蛋白质检测领域。所述乳腺癌诊断试剂盒包括定量检测FGF1、FGF10和白介素IL6的试剂。本发明还请求保护所述试剂盒的制备方法。采用本发明所述的试剂盒进行乳腺癌临床诊断，具有操作方便、成本较低、特异性和准确性好等优点。

