



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108872586 A

(43)申请公布日 2018.11.23

(21)申请号 201810543389.2

(22)申请日 2018.05.31

(71)申请人 佛山普文森生物科技有限公司

地址 523000 广东省佛山市三水区乐平镇
西乐大道创业中心

(72)发明人 杨明 宗立伟 邹卫 张国辉

(74)专利代理机构 深圳市君胜知识产权代理事
务所(普通合伙) 44268

代理人 王永文 刘文求

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

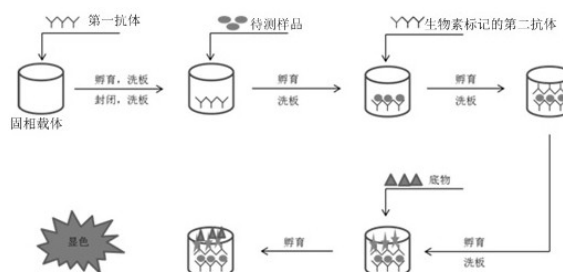
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

一种定量检测SRF的酶联免疫分析方法

(57)摘要

本发明公开一种定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,包括步骤:用与SRF第一位点特异性结合的第一抗体稀释液包被酶标板,洗板,封闭,洗板;向所述酶标板孔中加待测样品孵育,弃去孔内液体,再加入用生物素标记的第二抗体稀释液孵育,弃去孔内液体,甩干,洗板;向所述酶标板孔中加入加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液,覆上新的板贴,孵育后,弃去孔内液体,甩干,洗板;向所述酶标板孔中加入底物溶液,避光反应后,再加入反应终止溶液;在反应终止后用酶标仪测量酶标板各孔的光密度值,并根据预先制作的SRF标准曲线计算出样品中SRF的含量。本发明所提供的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,具有高的灵敏性,提高试验结果的精密度和准确度。



1. 一种定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,其特征在于,包括步骤:

A、用与SRF-N端第一位点特异性结合的第一抗体稀释液包被酶标板,过夜,封闭,洗板;

B、向所述酶标板孔中加待测样品孵育第一预定时间后,弃去孔内液体,洗板,再加入与SRF-C端第二位点特异性结合的用生物素标记的第二抗体稀释液孵育第二预定时间,弃去孔内液体,甩干,洗板;

C、向所述酶标板孔中加入加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液,覆上新的板贴,孵育第三预定时间后,弃去孔内液体,甩干,洗板;

D、向所述酶标板孔中加入底物溶液,避光反应第四预定时间后,再加入反应终止溶液,终止反应;

E、在反应终止后用酶标仪测量酶标板各孔的光密度值,并根据预先制作的SRF标准曲线计算出样品中SRF的含量。

2. 根据权利要求1所述的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,其特征在于,所述第一抗体的氨基酸序列缩写为:TDLTYQVSESDSSGETKDTLKPFTVTNLPGTTSTIQ TAPSTSTTMQVSSGPSFPITNYLAPVSASVSPSAVSSANGTVLKSTGSGPV。

3. 根据权利要求1所述的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,其特征在于,所述用生物素标记的第二抗体的氨基酸序列缩写为:HMMYPSHAVMYAPTSGLDGSLTVLNAFSQAPSTMQVSHSQVQEPGGVPQVFLTASSGTQIPVSAVQLHQMAVIG QQAGSSSNLTELQVVNLDTAHSTKSE。

4. 根据权利要求1所述的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,其特征在于,所述步骤A之前还包括:

采用包被液将所述第一抗体稀释至5ug/ml,所述缓冲液为碳酸盐缓冲液,第二抗体浓度为0.25ug/ml,所述缓冲液为pH =7的磷酸盐缓冲液。

5. 根据权利要求1所述的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,其特征在于,所述步骤A中的封闭过程中所采用的封闭液为PBST溶液与质量浓度为1% 的BSA的混合液。

6. 根据权利要求1所述的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,其特征在于,所述洗板过程中所采用的洗板液为PBS溶液与质量浓度为0.05%的吐温20的混合液。

7. 根据权利要求1所述的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,其特征在于,所述步骤D中所用的底物溶液为四甲基联苯胺溶液。

8. 根据权利要求1所述的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,其特征在于,所述孵育时温度为25℃。

9. 根据权利要求1所述的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,其特征在于,所述步骤D中所用的终止液为2mol/L的硫酸溶液。

10. 根据权利要求1所述的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,其特征在于,所述第一预定时间为2h,第二预定时间为1h。

一种定量检测SRF的酶联免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,尤其涉及一种定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法。

背景技术

[0002] 血清反应因子(Serum Response Factor,SRF)是一种 508 个氨基酸组成的蛋白质,包括一个包含 DNA 结合与二聚化域的中央轴、一个 C-端转录激活域及一个 可以被酪蛋白激酶 II 和核糖体 S6 激酶磷酸化的 N-端域。SRF高度保守且广泛存在的于多种生物体内的转录调控因子,它与大约1216种长度为10bp左右DNA段序列结合,也被称为 CArG-box, 通过这种结合特异性调控靶基因转录表达水平,它的调节目标包括细胞生长和结构性细胞骨架蛋白等基因,这些基因对心脏功能的正常运行起到关键作用。

[0003] 临床上,心力衰竭(heart failure),简称心衰,是指由于心脏的收缩功能和(或)舒张功能发生障碍,不能将静脉回心血量充分排出心脏,导致静脉系统血液淤积,动脉系统血液灌注不足,从而引起心脏循环障碍症候群的复杂综合症。心脏在各种因素的刺激下,凋亡酶Caspase3的活性急剧上升,而血清反应因子是凋亡酶Caspase3的靶蛋白。高活性的凋亡酶Caspase3剪切血清反应因子,使其分裂为两个部分,SRF-N和SRF-C,因而失去SRF基因表达调控功能。此外SRF-N也可以竞争性结合CArG-box,进一步影响其基因调控功能,从而加速心肌损伤及功能衰竭。SRF在心脏功能出现问题的时候含量急剧变化,是判断心脏功能的一个重要的标志物。因此通过检测SRF含量及动态监测SRF含量变化将有助于检测心衰及动态监测心衰病程进展的变化。

[0004] 目前,生物样品常用的分析方法包括色谱法和免疫法。色谱法灵敏度较低,不能达到临床和非临床试验要求;而且色谱法需要将血样进行预处理(如过C18 色谱柱),试验过程繁琐,回收率不稳定。免疫法是指以特异性抗原-抗体反应为基础的分析方法,是当前临床和非临床生物样品检测方法中最为常用的一种,多用于蛋白质多肽类物质的检测。由于SRF是蛋白大分子,适合使用双抗夹心法进行测定,但是现有用于检测SRF含量的分析方法检测灵敏度不高。

[0005] 因此,现有技术还有待于改进和发展。

发明内容

[0006] 鉴于上述现有技术的不足,本发明的目的在于提供一定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,通过动态监测SRF含量变化旨在解决目前市面上用于检测SRF含量的分析方法检测灵敏度及特异性不高的问题。

[0007] 本发明的技术方案如下:

一种定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,其中,包括步骤:

A、用与SRF第一位点特异性结合的第一抗体稀释液包被酶标板,过夜,封闭,洗板;

B、向所述酶标板孔中加待测样品孵育第一预定时间后,弃去孔内液体,洗板,再加入与SRF第二位点特异性结合的用生物素标记的第二抗体孵育第二预定时间,弃去孔内液体,用

干,洗板;

C、向所述酶标板孔中加入加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液,覆上新的板贴,孵育第三预定时间后,弃去孔内液体,甩干,洗板;

D、向所述酶标板孔中加入底物溶液,避光反应第四预定时间后,再加入反应终止溶液,终止反应;

E、在反应终止后用酶标仪测量酶标板各孔的光密度值,并根据预先制作的SRF标准曲线计算出样品中SRF的含量。

[0008] 所述的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,其中,所述第一抗体的氨基酸序列缩写为:TDLTYQVSESDSSGETKDTLKPAFTVTNLPGTTSTIQ TAPSTSTM

QVSSGPSFPITNYLAPVSASVSPSAVSSANGTVLKSTGSGPV。

[0009] 所述的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,其中,所述用生物素标记的第二抗体的氨基酸序列缩写为:HMMYPSPHAVMYAPTSGLDGSLTVLNAFSQAPSTMQVSHSQVQEPGGVPQVFLTASSGTQIPVSAVQLHQMAVIGQQAGSSSNLTELQVVNLDTAHSTKSE。

[0010] 所述的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,其中,所述步骤A之前还包括:

采用碳酸盐缓冲液将所述第一抗体稀释至5-10ug/ml,第二抗体浓度为0.25ug/ml,所述缓冲液为pH =7的磷酸盐缓冲液。

[0011] 所述的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,其中,所述步骤A中的封闭过程中所采用的封闭液为PBST溶液与质量浓度为1% 的BSA的混合液。

[0012] 所述的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,其中,所述洗板过程中所采用的洗板液为PBS溶液与质量浓度为0.05%的吐温20的混合液。

[0013] 所述的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,其中,所述步骤D中所用的底物溶液为四甲基联苯胺溶液。

[0014] 所述的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,其中,所述孵育时温度为25℃。

[0015] 所述的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,其中,所述步骤D中所用的终止液为2 mol/L的硫酸溶液。

[0016] 所述的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,其中,所述第一预定时间为2h,第二预定时间为1h。

[0017] 有益效果:本发明所提供的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,用第一抗体包被酶标板,封闭后加入待检样品,然后再加入第二抗体,所述第二抗体是可以和血清应答因子SRF不一致的抗原表面位点所制备出抗SRF的抗体,由于抗体抗原结合具有很强的特异性,本发明所提供的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,具有很高的灵敏性及特异性。通过动态监测血液中SRF含量的动态变化可用于早期检测心衰及监测心衰病程进展的变化。

附图说明

[0018] 图1为本发明中双抗体夹心法示意图。

具体实施方式

[0019] 本发明提供一种定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,为使本发明的目的、技术

方案及效果更加清楚、明确，以下对本发明进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

[0020] 本发明所提供的用于定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法，是一种在酶联免疫反应分析方法，通过双抗体夹心法来检测SRF含量的酶联免疫分析方法，即用连接于固相载体上的抗体和酶标抗体，与待检抗原上两个不同的抗原决定族结合，形成固相抗体-抗原-酶标抗体复合物。由于反应系统中固相抗体和酶标抗体的量相对于待检抗原是过量的，因此所述复合物的形成量与待检抗原的含量成正比例，测定所述复合物中酶作用于加入的底物后生成的有色物质量，即可确定待检抗原含量。

[0021] 所述定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法，具体包括步骤：

S1、用与SRF第一位点特异性结合的第一抗体稀释液包被酶标板，过夜，封闭，洗板；

S2、向所述酶标板孔中加待测样品孵育第一预定时间后，弃去孔内液体，洗板，再加入与SRF第二位点特异性结合的用生物素标记的第二抗体稀释液孵育第二预定时间，弃去孔内液体，甩干，洗板；

S3、向所述酶标板孔中加入辣根过氧化物酶标记亲和素工作液，覆上新的板贴，孵育第三预定时间后，弃去孔内液体，甩干，洗板；

S4、向所述酶标板孔中加入底物溶液，避光反应第四预定时间后，再加入反应终止溶液，终止反应；

S5、在反应终止后用酶标仪测量酶标板各孔的光密度值，并根据预先制作的SRF标准曲线计算出样品中SRF的含量。

[0022] 在一个实施例中，在所述步骤S1之前还包括步骤S0采用包被液将所述第一抗体稀释至5ug/ml，第二抗体浓度为0.25ug/ml，所述缓冲液为pH =7的磷酸盐缓冲液。

[0023] 所述步骤S1中用与SRF第一位点(SRF-N端)特异性结合的第一抗体稀释液(5ug/ml)包被酶标板，将包被后的酶标板放置在4℃冰箱避光过夜。用洗板液对酶标板进行清洗，将未与酶标板结合的第一抗体清洗掉，由于所用第一抗体是过量的，可以避免因包被条件、清洗处理等因素而使抗体的包被量有所差异，影响试验结果。用封闭液对包被有第一抗体的酶标板加封闭液进行封闭，在25℃条件下孵育1h，然后用洗板液洗板。

[0024] 在一个实施例中，所述步骤S1中所述第一抗体的氨基酸序列缩写为：

TDLTQVSESDSSGETKDTLKPFTVTNLPGTTSTIQTAPSTTTMQVSSGPSFPITNYLAPVSASVSPSAVS
SANGTVLKSTGSGPV。

[0025] 在一个实施例中，所述步骤S1中所采用的封闭液为PBST溶液与质量浓度为1% 的BSA的混合液；所述洗板过程中所采用的洗板液为PBS溶液与质量浓度为0.05%的吐温20的混合液。

[0026] 在一个实施例中，所述步骤S2中将待测样品(含有SRF)加入到所述酶标板孔中，轻轻晃动摇匀，覆上板贴，在25℃条件下孵育第一预定时间(如2h)后，弃去孔内液体，甩干，再加入与SRF第二位点特异性结合的用生物素标记的第二抗体稀释液(0.25 ug/ml)，在25℃条件下孵育第二预定时间(如1h)后，弃去孔内液体，甩干，用洗板液洗板。

[0027] 进一步，所述用生物素标记的第二抗体的氨基酸序列缩写为：
HMMYPSHAVMYAPTSGLDGSLTVLNAFSQAPSTMQVSHSQVQEPGGVPQVFLTASSGTVQIPVSAVQLHQMavig
QQAGSSSNLTelqV

VNLDTAHSTKSE。所述第二抗体是血清应答因子SRF-C端的抗原表面位点所制备出抗SRF的抗体。

[0028] 所述步骤S3中,向所述酶标板孔中加入加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液,覆上新的板贴,在25℃条件下孵育第三预定时间(如1h)后,弃去孔内液体,甩干,用洗板液洗板4次,每次浸泡2-3min,再次甩干备用。

[0029] 进一步,所述步骤S4中,向所述酶标板孔中加入底物溶液,所述底物溶液用于显色,所用的底物溶液为四甲基联苯胺溶液。在25℃条件避光反应第四预定时间(20min)后,再加入反应终止溶液,终止反应;所述终止溶液为2 mol/L的硫酸溶液。

[0030] 进一步,所述步骤S5中,在反应终止后一定时间内(5min)用酶标仪在450nm波长,测量酶标板各孔的光密度值,并根据预先制作的SRF标准曲线计算出样品中SRF的含量。

[0031] 请参阅图1,图1为本发明中所采用的双抗夹心法示意图。如图所示:

首先将抗SRF的第一抗体吸附于固相载体表面,经过孵育、洗板操作,分别加入标品或样品,孵育后洗板,再加入生物素标记的抗SRF的第二抗体孵育后洗板,再加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(能与生物素特异性结合),孵育洗板,加入底物反应产生荧光。在荧光酶标仪下检测相对荧光单位(RFU)值。

[0032] 下面通过实施例对本发明进行详细说明。

[0033] 所用试验样品均为商用,由市场购得。标品浓度从10 ng/ml,2倍比稀释7个点,另设一空白孔。选用针对SRF-N端氨基酸(244-332)的抗体,货号:H00006722-M04 (NOVUS公司)作为第一抗体,针对SRF-C端氨基酸(406-508)的Biotin标记的抗体作为第二抗体,货号:133828-biotin,自购标品。

[0034] 实施例1

1、标准曲线的绘制

将所述用与SRF第一位点特异性结合的第一抗体用包被液(配方见上文)稀释至5ug/ml,100μL/孔包被酶标板,4℃冰箱避光过夜。用洗板液(配方见上文)洗板三次,200μL/孔,加封闭液(配方见上文)300μL/孔,25℃孵育1h。用洗板液(配方见上文)洗板三次,200μL/孔。每孔分别加入标品100μL,轻轻晃动混匀,覆上板贴,25℃孵育2小时,弃去液体,甩干。将所述用与SRF第二位点特异性结合的用生物素标记的第二抗体用缓冲液(配方见上文)稀释至0.25ug/ml,每孔加100μL覆上新的板贴,25℃孵育1小时。弃去孔内液体,甩干,用洗板液(配方见上文)洗板三次,每次2分钟,200μL/孔,甩干。每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液100μL(1:200),覆上新的板贴,25℃孵育1小时。弃去孔内液体,甩干,用洗板液(配方见上文)洗板四次。每次浸泡2分钟,200μL/孔,甩干。依序每孔加底物溶液100μL,25℃孵育显色20分钟。依序每孔加终止溶液100μL,终止反应。在反应终止后5分钟内用酶标仪在450nm波长依序测量各孔的光密度(OD值),绘制出标准曲线。

[0035] 测试结果如下:

浓度(pg/ml)	吸光值(OD450)
10000	1.0997
5000	0.6223
2500	0.3492

1250	0.2340
625	0.1735
312.5	0.1518
156.25	0.1319
0	0.1164

2、待测血清中SRF含量的测定

将上述实施例1步骤中的标品替换为待检测血清样本,将所测的OD450值代入上述标准曲线中,从而计算出待检测血清样本中SRF的含量。经过多次试验,本发明所提供的测试了检测SRF含量的酶联免疫试剂盒,其灵敏度可达到 $\leq 7\text{ng/ml}$ 。由于样品分装以及部分样品需要重复检测,本发明的发明人测试了检测SRF含量的酶联免疫分析方法的稳定性,用空白人血浆配置好 60ng/ml 、 30 ng/ml 、 10ng/ml 的质控样品,在下列三种条件下测试:

冻融一次后进行检测;

室温放置8小时后检测;

在 -70°C 保存3个月;

分别进行重复测定,结果发现,浓度为 60ng/ml 与 30ng/ml 的样品精密度均小于15%,浓度为 10ng/ml 的样品精密度均小于20%。可以看出该检测SRF含量的酶联免疫分析方法的稳定性符合检验要求。

[0036] 综上所述, 本发明所提供的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,用第一抗体包被酶标板,封闭后加入待检样品,然后再加入第二抗体,所述第二抗体是从血清中筛选出与血清应答因子SRF不一致的抗原表面位点所制备出抗SRF的抗体,由于所筛选出的第二抗体具有很强的特异性,本发明所提供的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法,具有很高的灵敏性,大大提高试验结果的精密度和准确度。

[0037] 应当理解的是,本发明的应用不限于上述的举例,对本领域普通技术人员来说,可以根据上述说明加以改进或变换,所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围。

序列表

<110> 佛山普文森生物科技有限公司

<120> 一种定量检测SRF的酶联免疫分析方法

<160> 2

<210> 1

<211> 88

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

TDLT YQVSES DSSGETKDTL KPAFTVTNLP GTTSTIQTAP STSTTMQVSS GPSFPITNYL 60
APVSASVSPS AVSSANGTVL KSTGSGPV 88

<210> 2

<211> 103

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

HMMYPSPHAV MYAPTSGLGD GSLTVLNAFS QAPSTMQVSH SQVQEPGGVP QVFLTASSGT 60
VQIPVSAVQL HQMAVIGQQA GSSSNLTELQ VVNLDTAHST KSE 103

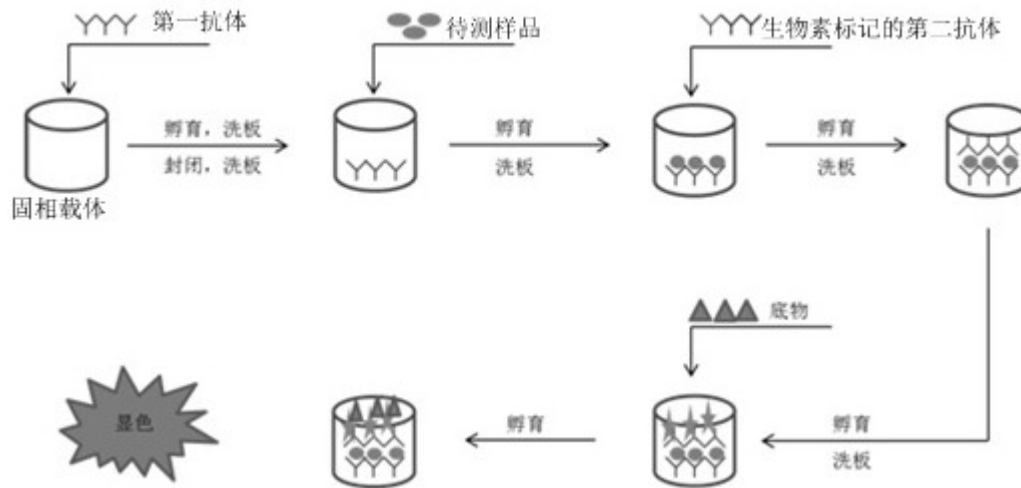


图1

专利名称(译)	一种定量检测SRF的酶联免疫分析方法		
公开(公告)号	CN108872586A	公开(公告)日	2018-11-23
申请号	CN201810543389.2	申请日	2018-05-31
[标]发明人	杨明 宗立伟 邹卫 张国辉		
发明人	杨明 宗立伟 邹卫 张国辉		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/535 G01N33/54306 G01N2800/325		
代理人(译)	王永文		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法，包括步骤：用与SRF第一位点特异性结合的第一抗体稀释液包被酶标板，洗板，封闭，洗板；向所述酶标板孔中加待测样品孵育，弃去孔内液体，再加入用生物素标记的第二抗体稀释液孵育，弃去孔内液体，甩干，洗板；向所述酶标板孔中加入加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液，覆上新的板贴，孵育后，弃去孔内液体，甩干，洗板；向所述酶标板孔中加入底物溶液，避光反应后，再加入反应终止溶液；在反应终止后用酶标仪测量酶标板各孔的光密度值，并根据预先制作的SRF标准曲线计算出样品中SRF的含量。本发明所提供的定量检测SRF含量的酶联免疫分析方法，具有高的灵敏性，提高试验结果的精密度和准确度。

