



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105044353 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 11

(21) 申请号 201510380175. 4

(22) 申请日 2015. 07. 02

(71) 申请人 南通大学附属医院

地址 226000 江苏省南通市西寺路 20 号

(72) 发明人 肖明兵 倪润洲 江枫 黄华

陆翠华 倪温慨

(74) 专利代理机构 北京一格知识产权代理事务

所(普通合伙) 11316

代理人 滑春生

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

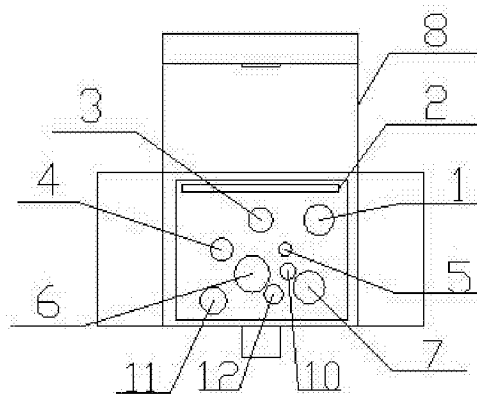
权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测 SCML2 的时间分辨免疫荧光试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种检测 SCML2 的时间分辨免疫荧光试剂盒,包括箱体,箱体中包括以下容器:包被缓冲液容器、封闭液容器、洗涤液容器、加样缓冲液容器、荧光增强液容器、检测缓冲液容器、包被抗体容器、检测抗体容器、Eu³⁺ 标记的链亲和霉素容器和标准品容器。本发明的优点在于:本发明应用时间分辨免疫荧光法能够高灵敏、高特异地检测外周血中的 SCML2 浓度;本发明还具有良好的稳定性,操作时间短,成本低的优点。



1. 一种检测 SCML2 的时间分辨免疫荧光试剂盒,其特征在于:包括盒体,所述盒体中包括以下容器:

- (1) 包被缓冲液容器;
- (2) 封闭液容器;
- (3) 洗涤液容器;
- (4) 加样缓冲液容器;
- (5) 荧光增强液容器;
- (6) 检测缓冲液容器;
- (7) 包被抗体容器;
- (8) 检测抗体容器;
- (9) Eu^{3+} 标记的链亲和霉素容器;
- (10) 标准品容器。

2. 根据权利要求 1 所述的检测 SCML2 的时间分辨免疫荧光试剂盒,其特征在于:所述盒体中容器中试剂成分包括以下组成:

(1) 包被缓冲液容器中为磷酸盐缓冲液,其成分为 140mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na_2HPO_4 和 1.8mM KH_2PO_4 ,所述磷酸盐缓冲液的 pH 值为 7.4;

(2) 封闭液容器中成分为含有 1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;

(3) 洗涤液容器中成分为含 0.05% Tween-20 的 Tris-HCl 缓冲液,所述具体成分为 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液和 0.05% Tween-20,所述 Tris-HCl 缓冲液的 PH 值为 7.8;

(4) 加样缓冲液容器的成分为含 1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;

(5) 荧光增强液容器中成分为荧光增强液;

(6) 检测缓冲液容器成分为 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液,所述 Tris-HCl 缓冲液的 PH 值为 7.8,所述 Tris-HCl 缓冲液中含有 1% 牛血清白蛋白,1% 牛球蛋白、0.05% Tween-40 和二乙烯三胺五乙酸;

(7) 包被抗体容器中为单克隆小鼠抗人 SCML2 抗体,所述单克隆小鼠抗人 SCML2 抗体的储存浓度为 $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$;

(8) 检测抗体容器中为生物素化的羊抗人 SCML2 多抗,所述生物素化的羊抗人 SCML2 多抗的储存浓度为 $50\text{ng}/\mu\text{l}$;

(9) Eu^{3+} 标记的链亲和霉素容器中为 Eu^{3+} 标记的链亲和霉素,所述 Eu^{3+} 标记的链亲和霉素的储存浓度为 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$;

(10) 标准品容器中为重组人 SCML2 蛋白,所述重组人 SCML2 蛋白的浓度为 $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

3. 根据权利要求 1 所述的检测 SCML2 的时间分辨免疫荧光试剂盒,其特征在于:具体使用方法包括以下步骤:

(1) 用磷酸盐缓冲液稀释包被抗体—单克隆小鼠抗人 SCML2 抗体至浓度为 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$,以 $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ 加入 96 孔酶标板,进行过夜放置,所述放置温度为 4°C ;

(2) 弃去包被抗体,采用 $300 \mu\text{l}/\text{孔}$ 洗涤液洗涤三次,加入封闭液 $200 \mu\text{l}/\text{孔}$,在 37°C 条件下孵育 1h;

(3) 弃去封闭液,采用 $300 \mu\text{l}/\text{孔}$ 洗涤液洗涤三次,加入待测培养上清样品和倍比稀释的标准品 $100 \mu\text{l}/\text{孔}$,在 37°C 条件下孵育 1h;

- (4) 弃去样品和标准品,采用 300 μ l/ 孔洗涤液洗涤三次;
- (5) 用加样缓冲液稀释检测抗体—生物素化的羊抗人 SCML2 多抗至浓度为 75ng/ml,以 100 μ l/ 孔加入稀释好的检测抗体,在 37℃ 条件下孵育 1h;
- (6) 弃去检测抗体,采用 300 μ l/ 孔洗涤液洗涤三次;
- (7) 用检测缓冲液稀释 Eu^{3+} 标记的链亲和霉素,所述 Eu^{3+} 标记的链亲和霉素的最终稀释浓度为 500ng/ml,以 100 μ l/ 孔加入酶标板,在 37℃ 避光条件下孵育 1h;
- (8) 弃去 Eu^{3+} 标记的链亲和霉素,采用 300 μ l/ 孔洗涤液洗涤四次;
- (9) 加入荧光增强液 200 μ l/ 孔,室温避光缓慢水平摇动 5min;
- (10) 读板:设定激发光波长为 337nm,发射光波长为 615nm,延时 200 微秒测定 615nm 处的荧光值;
- (11) 利用统计学绘图软件根据测定的值绘制标准曲线;
- (12) 通过标准曲线和未知浓度样品的荧光值计算待测样品中的 SCML2 的浓度。

一种检测 SCML2 的时间分辨免疫荧光试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于医学生物技术领域,具体涉及一种检测 SCML2 的时间分辨免疫荧光试剂盒。

背景技术

[0002] SCML2 是 Montini 等于 1999 年首先在果蝇的 SCM 基因 Xp22 染色体被鉴定出来,总长约 15Kb,在 C 端为高度保守内含子和外显子的结构。SCML2 在哺乳动物广泛表达并且编码一个 700 个氨基酸的蛋白。SCML2 是多梳基因家族的一个成员,多梳家族基因编码一组染色体结合蛋白,研究表明它在胚胎发育过程中起到关键作用,它能抑制 trxG 蛋白对胚胎发育的活化作用。大多数的哺乳动物的多梳家族基因与果蝇同源,敲除老鼠的多梳家族基因,老鼠出现造血缺陷、神经嵴缺陷、心脏畸形。SCML2 可能与 HOX 基因转录抑制有关,而后的突变可导致发育畸形;并且 SCML2 与多梳蛋白抑制复合体的调节有关,后者与维持抑制和阻止染色体重塑有关,同时它在调控胚胎发育的同源基因中起着重要作用。近来部分临床研究资料也证实多梳家族基因与细胞增殖和肿瘤形成的调控有关,SCML2 可在急性髓细胞白血病过度表达,进一步佐证其在细胞分化和细胞周期调控中起重要作用。

[0003] 我们之前运用免疫组织化学研究发现 SCML2 在人神经内分泌肿瘤组织中呈现高表达,并且它的表达水平与神经内分泌肿瘤的病理类型、病理分级、浸润深度及分期相关;我们运用自建的 SCML2 的时间分辨免疫荧光试剂盒检测发现,正常人、消化道良性肿块和其它非神经内分泌性肿瘤外周血清中均未检测出 SCML2 蛋白,而神经内分泌肿瘤患者外周血清中的 SCML2 水平明显升高,差异有统计学意义。因此,SCML2 对神经内分泌肿瘤具有明确的诊断价值。

[0004] 时间分辨免疫荧光检测方法是一种成熟的免疫分析方法,具有高特异、高灵敏的优点,是在临床医学和检验医学等诸多方面得到十分广泛的应用,是目前取代放射性免疫分析的一种定量检测方法;它的基本原理是利用三价稀土离子(如 Eu^{3+}) 作为示踪物,延迟检测寿命较长的特异性激发荧光以排除非特异性及背景荧光的干扰,即测定复合物中的稀土离子被激发的延迟荧光强度,从而确定待测蛋白的浓度。使用荧光增强液的 TRF 能够检测到皮克水平的蛋白,因此,本试剂盒采用 TRF 的方法来检测 SCML2 的浓度,是考虑了多方面的优点。

[0005] 目前,国际上还没有报道专门用于检测 SCML2 的时间分辨免疫荧光方法,也没有相应的试剂盒提供,因此,该试剂盒的开发和应用,是填补了这方面的空白。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于针对现有技术的不足,现提供一种灵敏、特异的检测样本中 SCML2 蛋白浓度的时间分辨免疫荧光试剂盒。

[0007] 为实现上述目的,本发明的技术方案是:一种检测 SCML2 的时间分辨免疫荧光试剂盒,其创新点在于:包括盒体,所述盒体中包括以下容器:

- (1) 包被缓冲液容器；
- (2) 封闭液容器；
- (3) 洗涤液容器；
- (4) 加样缓冲液容器；
- (5) 荧光增强液容器；
- (6) 检测缓冲液容器；
- (7) 包被抗体容器；
- (8) 检测抗体容器；
- (9) Eu^{3+} 标记的链亲和霉素容器；
- (10) 标准品容器。

[0008] 进一步的,所述盒体中容器中试剂成分包括以下组成:

- (1) 包被缓冲液容器中为磷酸盐缓冲液,其成分为 140mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na_2HPO_4 和 1.8mM KH_2PO_4 ,所述磷酸盐缓冲液的 pH 值为 7.4;
- (2) 封闭液容器中成分为含有 1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;
- (3) 洗涤液容器中成分为含 0.05% Tween-20 的 Tris-HCl 缓冲液,所述具体成分为 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液和 0.05% Tween-20,所述 Tris-HCl 缓冲液的 PH 值为 7.8;
- (4) 加样缓冲液容器的成分为含 1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;
- (5) 荧光增强液容器中成分为荧光增强液;
- (6) 检测缓冲液容器成分为 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液,所述 Tris-HCl 缓冲液的 PH 值为 7.8,所述 Tris-HCl 缓冲液中含有 1% 牛血清白蛋白,1% 牛球蛋白、0.05% Tween-40 和二乙烯三胺五乙酸;
- (7) 包被抗体容器中为单克隆小鼠抗人 SCML2 抗体,所述单克隆小鼠抗人 SCML2 抗体的储存浓度为 $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$;
- (8) 检测抗体容器中为生物素化的羊抗人 SCML2 多抗,所述生物素化的羊抗人 SCML2 多抗的储存浓度为 $50\text{ng}/\mu\text{l}$;
- (9) Eu^{3+} 标记的链亲和霉素容器中为 Eu^{3+} 标记的链亲和霉素,所述 Eu^{3+} 标记的链亲和霉素的储存浓度为 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$;
- (10) 标准品容器中为重组人 SCML2 蛋白,所述重组人 SCML2 蛋白的浓度为 $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

[0009] 进一步的,具体使用方法包括以下步骤:

- (1) 用磷酸盐缓冲液稀释包被抗体—单克隆小鼠抗人 SCML2 抗体至浓度为 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$,以 $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ 加入 96 孔酶标板,进行过夜放置,所述放置温度为 4°C ;
- (2) 弃去包被抗体,采用 $300 \mu\text{l}/\text{孔}$ 洗涤液洗涤三次,加入封闭液 $200 \mu\text{l}/\text{孔}$,在 37°C 条件下孵育 1h;
- (3) 弃去封闭液,采用 $300 \mu\text{l}/\text{孔}$ 洗涤液洗涤三次,加入待测培养上清样品和倍比稀释的标准品 $100 \mu\text{l}/\text{孔}$,在 37°C 条件下孵育 1h;
- (4) 弃去样品和标准品,采用 $300 \mu\text{l}/\text{孔}$ 洗涤液洗涤三次;
- (5) 用加样缓冲液稀释检测抗体—生物素化的羊抗人 SCML2 多抗至浓度为 $75\text{ng}/\text{ml}$,以 $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ 加入稀释好的检测抗体,在 37°C 条件下孵育 1h;
- (6) 弃去检测抗体,采用 $300 \mu\text{l}/\text{孔}$ 洗涤液洗涤三次;

(7) 用检测缓冲液稀释 Eu^{3+} 标记的链亲和霉素, 所述 Eu^{3+} 标记的链亲和霉素的最终稀释浓度为 500ng/ml, 以 100 μl /孔加入酶标板, 在 37℃ 避光条件下孵育 1h;

(8) 弃去 Eu^{3+} 标记的链亲和霉素, 采用 300 μl /孔洗涤液洗涤四次;

(9) 加入荧光增强液 200 μl /孔, 室温避光缓慢水平摇动 5min;

(10) 读板: 设定激发光波长为 337nm, 发射光波长为 615nm, 延时 200 微秒测定 615nm 处的荧光值;

(11) 利用统计学绘图软件根据测定的值绘制标准曲线;

(12) 通过标准曲线和未知浓度样品的荧光值计算待测样品中的 SCML2 的浓度。

[0010] 本发明的有益效果如下:

(1) 本发明应用时间分辨免疫荧光法能够高灵敏、高特异地检测外周血中的 SCML2 浓度。

[0011] (2) 本发明具有良好的稳定性, 操作时间短, 成本低。

附图说明

[0012] 图 1 为检测 SCML2 蛋白浓度的检测标准曲线。

[0013] 图 2 为检测 SCML2 的时间分辨免疫荧光试剂盒的结构示意图。

具体实施方式

[0014] 以下由特定的具体实施例说明本发明的实施方式, 熟悉此技术的人士可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点及功效。

[0015] 如图 2 所示为检测 SCML2 的时间分辨免疫荧光试剂盒的结构示意图, 一种检测 SCML2 的时间分辨免疫荧光试剂盒, 包括箱体 8, 箱体 8 中包括以下容器:

(1) 包被缓冲液容器 2;

(2) 封闭液容器 1;

(3) 洗涤液容器 3;

(4) 加样缓冲液容器 4;

(5) 荧光增强液容器 5;

(6) 检测缓冲液容器 6;

(7) 包被抗体容器 7;

(8) 检测抗体容器 10;

(9) Eu^{3+} 标记的链亲和霉素容器 11;

(10) 标准品容器 12。

[0016] 箱体中容器中试剂成分包括以下组成:

(1) 包被缓冲液容器 2 中为磷酸盐缓冲液, 其成分为 140mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na_2HPO_4 和 1.8mM KH_2PO_4 , 磷酸盐缓冲液的 pH 值为 7.4;

(2) 封闭液容器 1 中成分为含有 1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;

(3) 洗涤液容器 3 中成分为含 0.05% Tween-20 的 Tris-HCl 缓冲液, 具体成分为 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液和 0.05% Tween-20, Tris-HCl 缓冲液的 PH 值为 7.8;

(4) 加样缓冲液容器 4 的成分为含 1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;

(5) 荧光增强液容器 5 中成分为荧光增强液；

(6) 检测缓冲液容器 6 成分为 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液, Tris-HCl 缓冲液的 PH 值为 7.8, Tris-HCl 缓冲液中含有 1% 牛血清白蛋白, 1% 牛球蛋白、0.05% Tween-40 和二乙烯三胺五乙酸；

(7) 包被抗体容器 7 中为单克隆小鼠抗人 SCML2 抗体, 单克隆小鼠抗人 SCML2 抗体的储存浓度为 $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ；

(8) 检测抗体容器 10 中为生物素化的羊抗人 SCML2 多抗, 生物素化的羊抗人 SCML2 多抗的储存浓度为 $50\text{ng}/\mu\text{l}$ ；

(9) Eu^{3+} 标记的链亲和霉素容器 11 中为 Eu^{3+} 标记的链亲和霉素, Eu^{3+} 标记的链亲和霉素的储存浓度为 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ；

(10) 标准品容器 12 中为重组人 SCML2 蛋白, 重组人 SCML2 蛋白的浓度为 $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

[0017] 具体使用方法包括以下步骤：

(1) 用磷酸盐缓冲液稀释包被抗体—单克隆小鼠抗人 SCML2 抗体至浓度为 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$, 以 $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ 加入 96 孔酶标板, 进行过夜放置, 放置温度为 4°C ；

(2) 弃去包被抗体, 采用 $300 \mu\text{l}/\text{孔}$ 洗涤液洗涤三次, 加入封闭液 $200 \mu\text{l}/\text{孔}$, 在 37°C 条件下孵育 1h；

(3) 弃去封闭液, 采用 $300 \mu\text{l}/\text{孔}$ 洗涤液洗涤三次, 加入待测培养上清样品和倍比稀释的标准品 $100 \mu\text{l}/\text{孔}$, 在 37°C 条件下孵育 1h；

(4) 弃去样品和标准品, 采用 $300 \mu\text{l}/\text{孔}$ 洗涤液洗涤三次；

(5) 用加样缓冲液稀释检测抗体—生物素化的羊抗人 SCML2 多抗至浓度为 $75\text{ng}/\text{ml}$, 以 $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ 加入稀释好的检测抗体, 在 37°C 条件下孵育 1h；

(6) 弃去检测抗体, 采用 $300 \mu\text{l}/\text{孔}$ 洗涤液洗涤三次；

(7) 用检测缓冲液稀释 Eu^{3+} 标记的链亲和霉素, Eu^{3+} 标记的链亲和霉素的最终稀释浓度为 $500\text{ng}/\text{ml}$, 以 $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ 加入酶标板, 在 37°C 避光条件下孵育 1h；

(8) 弃去 Eu^{3+} 标记的链亲和霉素, 采用 $300 \mu\text{l}/\text{孔}$ 洗涤液洗涤四次；

(9) 加入荧光增强液 $200 \mu\text{l}/\text{孔}$, 室温避光缓慢水平摇动 5min；

(10) 读板：设定激发光波长为 337nm, 发射光波长为 615nm, 延时 200 微秒测定 615nm 处的荧光值；

(11) 利用统计学绘图软件根据测定的值绘制标准曲线；

(12) 通过标准曲线和未知浓度样品的荧光值计算待测样品中的 SCML2 的浓度。

[0018] 本发明应用时间分辨免疫荧光法能够高灵敏、高特异地检测外周血中的 SCML2 浓度；本发明具有良好的稳定性, 操作时间短, 成本低。

[0019] 上述实施例只是本发明的较佳实施例, 并不是对本发明技术方案的限制, 只要是不经过创造性劳动即可在上述实施例的基础上实现的技术方案, 均应视为落入本发明专利的权利保护范围内。

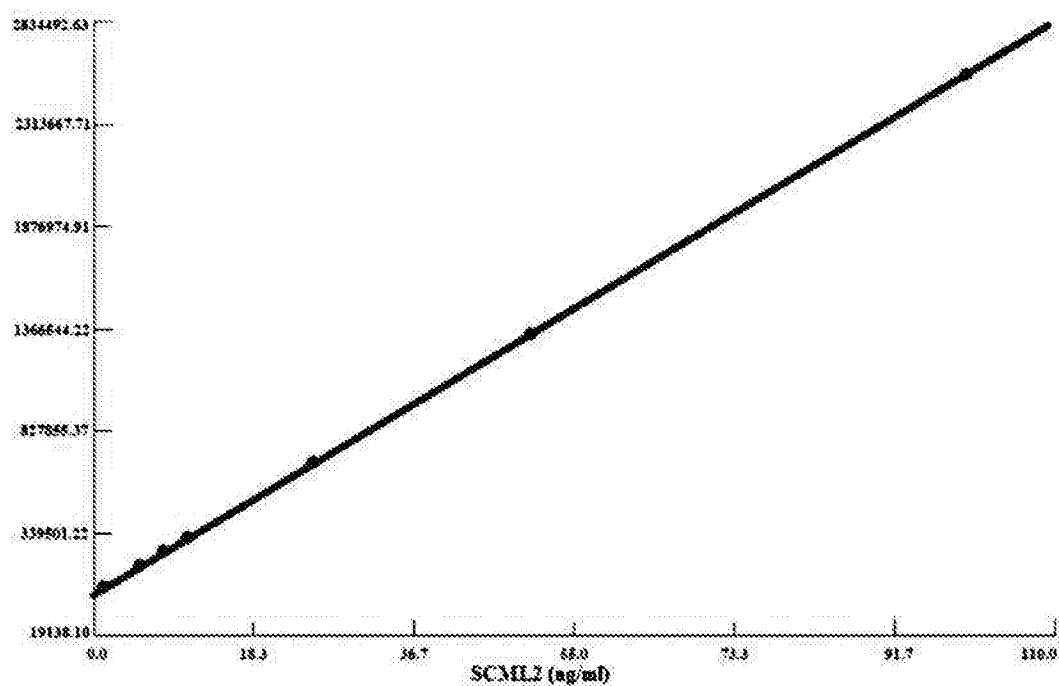


图 1

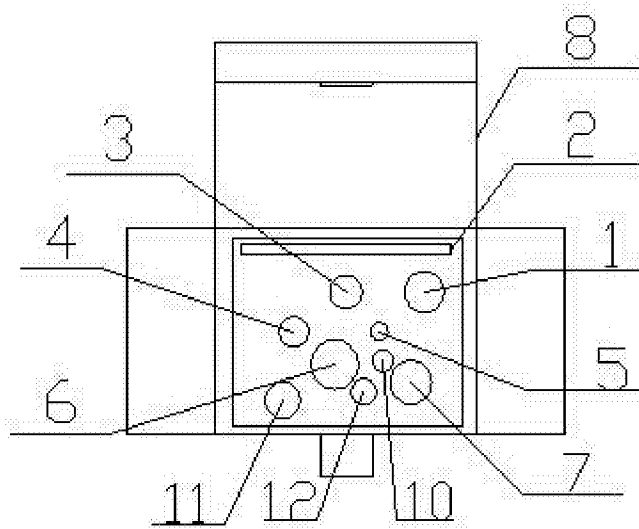


图 2

专利名称(译)	一种检测SCML2的时间分辨免疫荧光试剂盒		
公开(公告)号	CN105044353A	公开(公告)日	2015-11-11
申请号	CN201510380175.4	申请日	2015-07-02
[标]申请(专利权)人(译)	南通大学附属医院		
申请(专利权)人(译)	南通大学附属医院		
当前申请(专利权)人(译)	南通大学附属医院		
[标]发明人	肖明兵 倪润洲 江枫 黄华 陆翠华 倪温慨		
发明人	肖明兵 倪润洲 江枫 黄华 陆翠华 倪温慨		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测SCML2的时间分辨免疫荧光试剂盒，包括盒体，盒体中包括以下容器：包被缓冲液容器、封闭液容器、洗涤液容器、加样缓冲液容器、荧光增强液容器、检测缓冲液容器、包被抗体容器、检测抗体容器、Eu³⁺ + 标记的链亲和霉素容器和标准品容器。本发明的优点在于：本发明应用时间分辨免疫荧光法能够高灵敏、高特异地检测外周血中的SCML2浓度；本发明还具有良好的稳定性，操作时间短，成本低的优点。

