



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110596370 A

(43)申请公布日 2019.12.20

(21)申请号 201910877244.0

(22)申请日 2019.09.17

(71)申请人 广州医科大学附属第五医院

地址 510000 广东省广州市黄埔区港湾路
621号

(72)发明人 彭亮 江先汉 蓝子权 曾李婷
肖仪

(74)专利代理机构 深圳市智胜联合知识产权代
理有限公司 44368

代理人 齐文剑

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

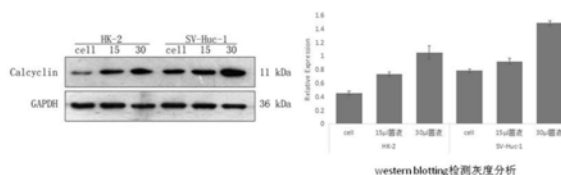
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种检测细菌尿路感染的酶联免疫吸附试
剂盒及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种用于检测细菌尿路感染的酶联免疫吸附试剂盒及其应用。本发明试剂盒通过检测尿液标本S100A6蛋白,可反映个体是否具有细菌尿路感染可能性或尿路感染倾向性,具有实用性强、灵敏度高等优点。



1. 一种检测细菌尿路感染的酶联免疫吸附试剂盒,其特征在于,该试剂盒包含S100A6蛋白抗体或S100A6蛋白抗体片段。
2. 权利要求1所述试剂盒在检测个体是否具有细菌尿路感染可能性的应用。
3. 根据权利要求2所述试剂盒的应用,其特征在于,所述尿路感染为细菌引起的尿路感染。

一种检测细菌尿路感染的酶联免疫吸附试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属蛋白检测技术领域,更具体地说,本发明涉及一种用于检测尿液S100A6蛋白的试剂盒及该试剂盒的应用。

背景技术

[0002] S100A6是钙调蛋白S100家族一员,最早是被Kuźnicki和Filipek发现,他们从腹水肿瘤细胞中分离并纯化一种新的钙结合蛋白,分子量为10.5KD,命名为CaBP (Kuznicki, J. and A. Filipek, Purification and properties of a novel Ca^{2+} -binding protein (10.5kDa) from Ehrlich-ascites-tumour cells. *Biochem J*, 1987. 247 (3) : p. 663-7.). 随后Kuźnicki检测S100A6在人体不同器官的表达情况,发现该蛋白主要分布在人体的成纤维细胞及上皮细胞中 (Kuźnicki, J., et al., Calcyclin as a marker of human epithelial cells and fibroblasts. *Experimental cell research*, 1992. 200 (2) : p. 425.). 事实上, S100A6还在兔、鸡、鼠、猪等都被证实存在,而且物种不同,分子量大小不同。随研究深入, S100A6证实为EF-手结构,通过结合钙离子来改变分子构象,暴露隐藏的疏水区域,与蛋白配体结合后发挥生物调节作用 (Filipek, A. and W. Lesniak, Current view on cellular function of S100A6 and its ligands, CacyBP/SIP and Sgt1. *Postepy Biochem*, 2018. 64 (3) : p. 242-252.)。

[0003] S100A6是一种钙离子结合蛋白,不但调节人体细胞正常的生理活动,而且在病理过程也起着重要作用,所以与疾病关系密切相关。近年来已证实, S100A6能调节细胞分裂周期,从而参与细胞增殖过程; S100A6调节细胞骨架的微丝蛋白,导致细胞骨架重组,参与细胞运动,也有研究指出S100A6能与中心体蛋白结合,调节纤毛功能或形成,但具体机制尚未清楚 (Sakane K, N. M. D. M., Identification and characterization of a centrosomal protein, FOR20 as a novel S100A6 target. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017.). 越来越多研究证实, S100A6与许多肿瘤密切相关,其中包括胃肠、肝胆、乳腺、子宫、卵巢、骨及泌尿系肿瘤等 (Zhang, H., et al., Identification of differentially expressed proteins in the gastric mucosal atypical hyperplasia tissue microenvironment. *Oncology letters*, 2018. 16 (2) : p. 2355-2365.), S100A6差异性表达考虑为与肿瘤细胞增殖和侵袭有关,因此S100A6有望成为检测肿瘤的一种新生标志物。

[0004] S100A6与炎症的关系也是近年的研究热点,有相关研究指出S100A6参与心肌缺血后的炎症反应 (Mofid, A., et al., Cardiac Overexpression of S100A6 Attenuates Cardiomyocyte Apoptosis and Reduces Infarct Size After Myocardial Ischemia-Reperfusion. *Journal of the American Heart Association*, 2017. 6 (2) .), 也有研究指出S100A6蛋白在免疫性疾病例如系统性红斑狼疮的血液中升高 (Turnier, J. L., et al., Urine S100 proteins as potential biomarkers of lupus nephritis activity. *Arthritis Research & Therapy*, 2017. 19 (1) .)。但目前关于S100A6与微生物感染的研究还非常少见。Yang Wang曾用呼吸综合征病毒感染猪后发现S100A6表达上调,并验证

这一过程通过NF- κ B途径去调节S100A6的表达(Zhou,X.,et al.,Molecular characterization of the porcine S100A6 gene and analysis of its expression in pigs infected with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HP-PRRSV).Journal of Applied Genetics,2015.56(3):p.355-363.)。虽然有很少数S100A6与炎症方面的研究正在开展,但研究人S100A6与尿路感染的关系目前还没有报道。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于:通过提供一种检测细菌尿路感染的酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒,可用于检测个体是否具有细菌尿路感染可能性。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明检测细菌尿路感染的酶联免疫吸附试剂盒,包括S100A6蛋白抗体或抗体片段。

[0007] 本发明试剂盒可用于检测个体是否具有尿路感染可能性。

[0008] 其中,所述尿路感染为细菌引起的尿路感染。

[0009] 相对于现有技术,本发明具有如下优点:

[0010] 本发明发明人在实验中发现,在尿路感染的体外和体内模型中,细菌感染后的细胞内S100A6蛋白表达显著上升,小鼠膀胱组织S100A6表达也上调,因此针对S100A6在尿路感染模型的表达展开了更深入的研究。通过收集正常人与细菌性尿路感染患者尿液标本进行检测,结果显示可通过对尿液标本S100A6的含量判断个体是否具有细菌性尿路感染的可能性。

附图说明

[0011] 下面结合附图和具体实施方式,对本发明技术方案以及有益效果进行详细说明。

[0012] 图1为大肠埃希菌刺激膀胱上皮细胞永生化细胞SV-Huc-1和肾小管上皮细胞HK-2两种细胞后蛋白印迹结果及灰度分析结果。

[0013] 图2为实施例1大肠埃希菌刺激膀胱上皮细胞永生化细胞SV-Huc-1后S100A6 mRNA PCR结果,琼脂糖凝胶1为对照组,2为15 μ l菌液处理后,3为30 μ l菌液处理后。

[0014] 图3为急性膀胱炎模型后膀胱组织的免疫组化结果:control为空白对照,12h为急性膀胱炎造模12小时后膀胱组织,24h为急性膀胱炎造模24小时后膀胱组织,4d为急性膀胱炎造模4天后膀胱组织。

[0015] 图4为正常人与尿路感染患者尿液标本用本发明试剂盒检测S100A6的表达水平。

[0016] 图5为本发明试剂盒所测正常人与尿路感染患者尿液标本S100A6含量值绘制的受试者工作特征(ROC)曲线图。

具体实施方式

[0017] 为了使本发明的目的、技术方案和有益技术效果更加清晰,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解的是,本说明书中描述的实施例仅仅是为了解释本发明,并非为了限定本发明,实施例的参数、比例等可因地制宜做出选择而对结果并无实质性影响。

[0018] 实施例1

[0019] 1.实验材料与方法:

[0020] 1.1细胞培养:购自广州焱善生物科技有限公司的人膀胱上皮细胞永生化细胞SV-Huc-1, F12K培养基 (Hyclone, Cat.No. SH30026.01), 10% 胎牛血清 (Hyclone, Cat.No. SH30087.01), 1% 青链霉素 (Hyclone, Cat.No. SH30010), PBS磷酸钾缓冲液 (Hyclone, Cat.No. SH30256.01B), 37℃ 含CO₂的培养箱内培养。

[0021] 1.2菌种:大肠埃希菌CFT073。按1:100接种细菌液体培养基,摇床200rpm、37度培养过夜,取1mL菌液12000rpm离心2分钟,收集菌液备用。

[0022] 1.3膀胱炎模型:昆明小鼠购自广州查世瑞华生物科技有限公司,7周龄,雌性。小鼠分成四组,对照组,造模12h组,造模24h,造模4d组。麻醉成功(舒泰50),用0.5%活力碘溶液消毒小鼠尿道外口,把石蜡油润滑的24G留置针插入尿道,30s内打入10⁸cfu CFT07350ul。颈椎脱臼处死老鼠,解剖分离膀胱组织和肾组织用4%的中性多聚甲醛固定。

[0023] 1.4免疫组化分析:将4%的中性多聚甲醛固定的石蜡包埋的组织切片(4μm)固定在载玻片上,在二甲苯中脱石蜡后,用乙醇再水化并用PBS冲洗。在室温下用3%过氧化氢湿盒孵育10分钟。PBS冲洗后微波炉中中高火加热至沸腾,低火维持沸腾继续加热8min(柠檬酸抗原修复液),待水温自然降至室温,PBS冲洗后山羊血清室温湿盒封闭,一抗(Santa cruz公司Calcyclin(7D11A8),货号Sc-53950,用法1:100)过夜,二抗(Anti goat-HRP生产商:博士德货号:BA1060)室温湿盒30分钟,DAB显色,PBS洗后苏木素复染,水洗,返蓝。乙醇脱水,二甲苯透明2次,中性树胶封片。

[0024] 1.5蛋白质印迹分析:使用RIPA裂解液提取总蛋白质,使用BCA试剂盒测定蛋白质浓度。在样品加入5x样品缓冲液使其100℃加热5分钟变性,并通过12%SDS-PAGE分离,然后转移至PVDF膜。用含5%脱脂牛奶的PBS封闭印迹60分钟,然后与一抗(Santa cruz公司Calcyclin(7D11A8),货号Sc-53950,用法1:200)孵育过夜。洗涤后,将膜与抗鼠二抗一起温育。

[0025] 1.6QRT-PCR:用Trizol试剂从培养细胞中提取定量PCR总RNA,使用RNase-free的DNaseI (Promega) 去除提取液基因组。用BioPhotometerplus艾本德核酸蛋白测定仪上测定OD值来检测RNA纯度,取RNA样品1μl,1%琼脂糖凝胶电泳80V×20min,用凝胶成像系统观察总RNA的5s rRNA,18s rRNA和28s rRNA条带来检测RNA完整性。定量PCR用的SYBR Green qPCR SuperMix购自Invitrogen公司,定量PCR仪:ABI PRISM®7500Sequence Detection System进行了三次反应,以GAPDH为对照,采用比较周期阈值法(CT) 计算C_t法的相对表达量来观察表达水平。qPCR引物为:S100A6-F:CAAGAAGGAGCTGAAGGA S100A6-R:CCAGGAAGGTGACATACT。

[0026] 1.7统计方法:用SPSS软件进行统计分析。当P<0.05时,差异有统计意义。

[0027] 2.结果:

[0028] 2.1大肠埃希菌使S100A6表达上调

[0029] 考虑肿瘤细胞内S100A6表达增加可能,在选取细胞时,采用了人膀胱上皮细胞永生化细胞SV-Huc-1和正常肾小管上皮细胞HK-2来模拟细菌感染正常细胞后的情况。设置了三组:对照组、15ul菌液组和30ul菌液组,用大肠埃希菌(CF7073) 去孵育细胞3小时后,提取细胞蛋白印迹结果显示S100A6蛋白表达也上调(图2)。然后选取了SV-Huc-1细胞做了QRT-

PCR,结果显示经大肠埃希菌处理后S100A6 mRNA升高(图3),而且S100A6 mRNA和蛋白水平的升高对菌液呈现剂量依赖性。

[0030] 2.2S100A6在膀胱组织定位

[0031] S100A6在正常膀胱细胞也有表达,为了探讨在膀胱组织S100A6与感染关系。首先用昆明小鼠进行大肠埃希菌致膀胱炎模型,用7周龄雌性小鼠,从尿道注射大肠埃希菌菌液进膀胱后,经过一段时间后处死小鼠并取小鼠膀胱组织做免疫组织化学。S100A6在膀胱上皮及膀胱间质的细胞质中表达,也就是说经大肠埃希菌感染后的上皮及间质组织中,S100A6的表达上调(图4)。

[0032] 实施例2

[0033] 本发明试剂盒所含主要成分包括:包被缓冲液,洗涤缓冲液,封闭缓冲液,稀释液,底物缓冲液,TMB显色液,OPD显色液,终止液,S100A6兔抗人多克隆抗体(一抗),S100A6鼠抗人单克隆抗体(一抗),S100A6蛋白标准品,山羊抗小鼠IgG(H+L)抗体(二抗)。需要说明的是,本实施例所列举的试剂盒中,核心成分在于抗体,其余的主要成分均是检测试剂盒领域中常用的成分,可以根据试剂盒的实际需求进行调整。本实施例试剂配制、抗体来源及具体操作方法如下:

[0034] 1. 试剂配制

[0035] 1.1包被缓冲液(PH9.6±0.2,0.05M碳酸盐缓冲液):

[0036] Na₂CO₃ 1.59g

[0037] NaHCO₃ 2.93g

[0038] 加蒸馏水至 1000ml。(用时稀释成1x,加0.1%BSA)

[0039] 1.2洗涤缓冲液(PH7.4 0.15M PBST):

[0040] 0.05%Tween-20 0.5ml 加在PBS缓冲液1000ml中。

[0041] 1.3PBS缓冲液:

KH₂PO₄ 0.27g

Na₂HPO₄·12H₂O 3.58g

[0042]

NaCl 8g

KCl 0.2g 加蒸馏水至 1000ml。

[0043] 1.4封闭缓冲液:

[0044] 牛血清白蛋白(BSA) 2% 2g

[0045] (或5%脱脂奶粉)加洗涤缓冲液100ml。

[0046] 1.5稀释液

[0047] 牛血清白蛋白 0.1% 0.1g

[0048] 加PBS缓冲液100ml。

[0049] 1.6底物缓冲液(PH5.0):

[0050] 0.2M Na₂HPO₄(无水 28.4g/L,带 12 结晶水 71.7g/L) 取 25.7ml

0.1M 柠檬酸(无水 19.2g/L,带 1 结晶水 21.01g/L) 取 24.3ml

加蒸馏水至 100ml。

[0051] (或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.84g

柠檬酸 $\cdot\text{H}_2\text{O}$ 0.51g

加蒸馏水至 100ml)

[0052] 1.7TMB(四甲基联苯胺)显色液(显蓝色):HRP-TMB,1mg/ml-DMSO溶解

TMB(2mg/ml 水) 0.05ml

底物缓冲液 0.95ml

[0053]

30% H_2O_2 0.001ml

总体积 1ml

[0054] 1.9 OPD(邻苯二胺)显色液(显黄棕色)(现配避光):

OPD(干粉) 0.004g

底物缓冲液 10ml

[0055]

30% H_2O_2 0.015ml

总体积 10ml

[0056] 2.0终止液(2M H_2SO_4):

[0057] 在178.3ml水中,逐滴加入浓硫酸(18M,约98%)21.7ml,边加边摇。

[0058] 2.实验方法:

[0059] 2.1包被抗体

[0060] 用包被缓冲液稀释S100A6特异性抗体(兔抗人多抗,购自proteintech生物公司,货号10245-1-AP,1:1000稀释),每孔加0.1ml加入96孔板中,4℃过夜,或37℃水浴3小时,贮存冰箱。

[0061] 2.2洗涤

[0062] 包被结束后弃掉包被液,用PBST进行洗涤,方法为PBST加满每孔,静置5-10min,弃掉洗液,重新加满,重复洗涤3-5次,最后拍干ELISA板。

[0063] 2.3加入抗原(检测样品及标准品)

[0064] 收集临床尿培养阳性标本(包括大肠细菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、阴沟肠杆菌、肠球菌、金黄色葡萄球菌等)。按照上述准备工作配制好各种溶液。尿标本先以12000rpm的转速离心2分钟,取上清检测。每孔加入0.2ml用稀释缓冲液以1:10稀释的尿液标本,并根据待测样品数量和S100A6蛋白标准品((北京义翘神州科技有限公司,货号10939-HNAE)的数量决定所需的板条数,并增加1孔作为空白对照孔。分别将标本和不同浓

度标准品 (100 μ l/孔) 加入相应孔中 (零孔只加标准品/样本稀释液), 用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}$ C 孵箱孵育 90 分钟 (空白对照孔除外)。标准品进行 1:1 倍比稀释, 稀释至最后一个浓度为 62.5pg/mL。

[0065] 2.4 洗涤

[0066] 方法同步骤 2.2。洗板 4 次: (1) 自动洗板机: 要求注入的洗涤液为 350 μ l, 注入与吸出间隔 15-30 秒。(2) 手工洗板: 甩尽孔内液体, 每孔加洗涤液 350 μ l, 静置 30 秒后甩尽液体, 在厚迭吸水纸上拍干。

[0067] 2.5 加入一抗

[0068] 加入 0.2ml 用稀释缓冲液稀释的 S100A6 特异性抗体 (鼠抗人单抗, 购自 proteintech 生物公司, 货号 66098-1-Ig, 1:1000 稀释) 溶液, 37 $^{\circ}$ C 作用 1~2 小时或由预试实验确定作用时间。

[0069] 2.6 洗涤

[0070] 方法同步骤 2.2。

[0071] 2.7 加入生物素标记二抗

[0072] 加入生物素化抗体工作液 (山羊抗小鼠二抗, 购自康为世纪生物科技有限公司, 货号 CW0102, 1:4000 稀释) 100 μ l/孔。用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}$ C 孵箱孵育 60 分钟 (空白对照孔除外)。

[0073] 2.8 洗涤

[0074] 方法同步骤 2.2。

[0075] 2.9 加入底物液显色

[0076] 加入酶结合物工作液-底物 (100 μ l/孔)。用封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}$ C 孵箱孵育 30 分钟 (空白对照孔除外)。

[0077] 2.10 加终止剂及显色

[0078] 0.2ml 底物加 0.05ml 终止剂, 即每孔加 2M H₂SO₄ 或 2M 柠檬酸 0.05ml。加入显色剂 100 μ l/孔, 避光, 37 $^{\circ}$ C 孵箱孵育 10-20 分钟, 混匀后即刻测量 OD₄₅₀ 值 (5 分钟内)。

[0079] 2.11 观察记录结果: 目测或用酶标比色计测定 (TMD 用 450nm) OD 值。

[0080] 2.12 统计学方法: 数据分析采用 SPSS 16.0 统计软件, 用中位数 (四分位数间距) 表示, 采用非参数 Mann-Whitney 检验分析。计数资料以率 (%) 或构成比 (%) 表示, 比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义; 采用 Curve Expert 软件制作标准曲线并取 R 值最大的拟合曲线方程, 计算出样品浓度, 用 SPSS 绘制 Logistic 回归方程和 ROC 曲线检测 S100A6 在尿路感染中诊断价值。

[0081] 3. 结果:

[0082] 经 ELISA 测出两组每个尿液样品的 OD 值, 通过 Curve Expert 软件制作标准曲线并取拟合度最佳的曲线方程, 把 OD 值代入方程计算出尿液中 S100A6 的蛋白浓度, 感染组的 S100A6 蛋白浓度比正常组高, 且差异有统计意义。如表 1 和图 4。

[0083] 表 1 两组尿液中 S100A6 浓度比较

[0084]	分组	S100A6(pg/ml)
	正常组 (n=74)	16.77 (13.61 , 28.07)
	感染组 (n=57)	128.96 (39.44, 1153.3)
	Z	-7.092
	P 值	0.000

[0085] 把两组S100A6蛋白浓度用SPSS绘制ROC曲线,其中以1-特异度为横坐标,敏感度为纵坐标。该曲线下面积 $AUC=0.862$, $P=0.000$,95%CI:0.799-0.925,约登指数:0.628,S100A6取临界值=23.277pg/ml时,灵敏度为91.2%,特异度为71.6%,诊断阳性率达71.2%,漏诊率8.6%,提示本发明可作为细菌性尿路感染一个较好的初筛手段(如图5)。

[0086] 根据上述说明书的揭示和教导,本发明所属领域的技术人员还可以对上述实施方式进行适当的变更和修改。因此,本发明并不局限于上面揭示和描述的具体实施方式,对本发明的一些修改和变更也应当落入本发明的权利要求的保护范围内。此外,尽管本说明书中使用了一些特定的术语,但这些术语只是为了方便说明,并不对本发明构成任何限制。

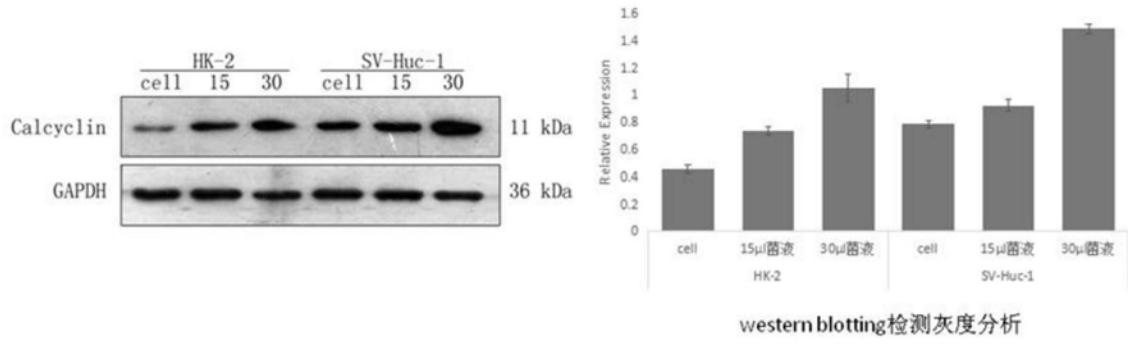


图1

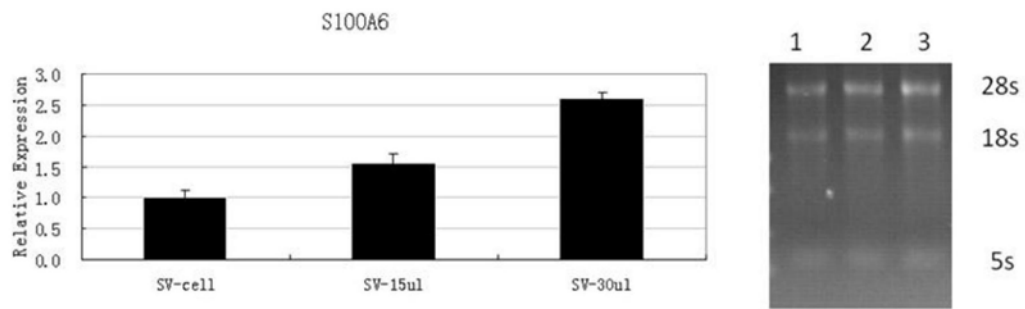


图2

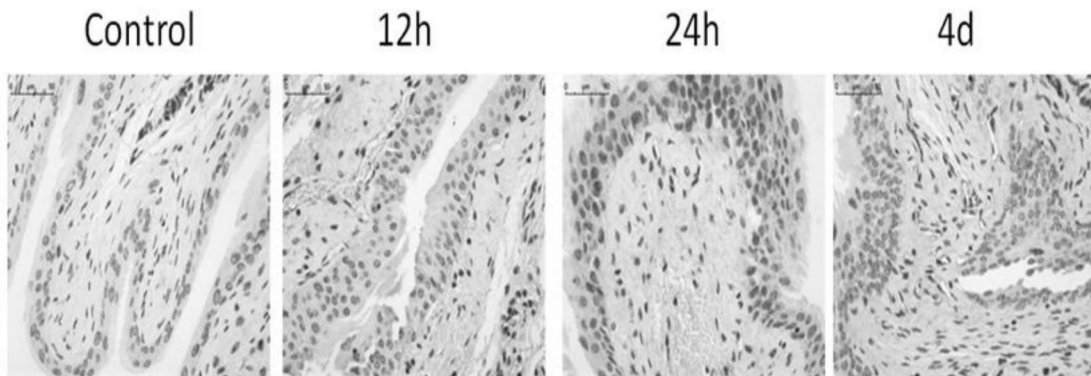


图3

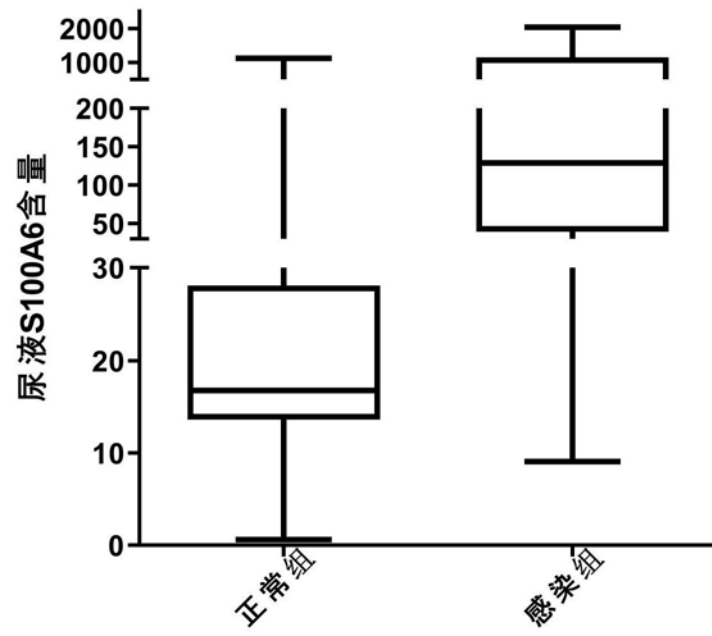


图4

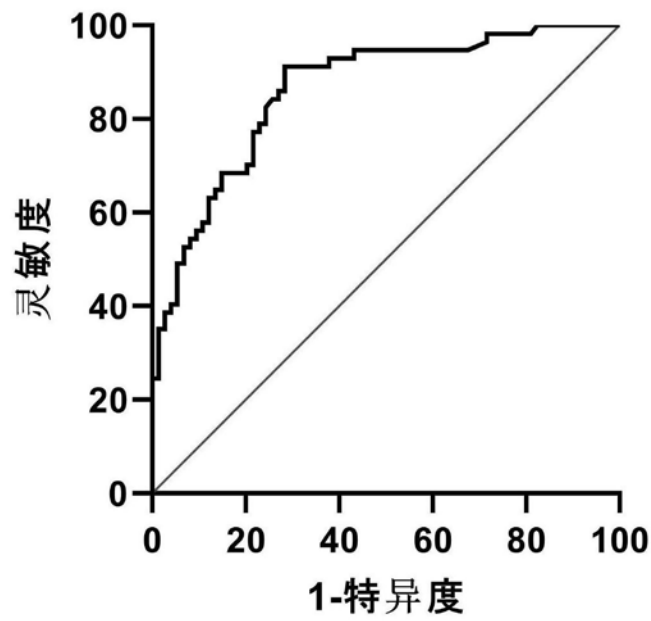


图5

专利名称(译)	一种检测细菌尿路感染的酶联免疫吸附试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN110596370A	公开(公告)日	2019-12-20
申请号	CN201910877244.0	申请日	2019-09-17
[标]申请(专利权)人(译)	广州医科大学附属第五医院		
申请(专利权)人(译)	广州医科大学附属第五医院		
当前申请(专利权)人(译)	广州医科大学附属第五医院		
[标]发明人	彭亮		
发明人	彭亮 江先汉 蓝子权 曾李婷 肖仪		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N33/56911 G01N33/581		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于检测细菌尿路感染的酶联免疫吸附试剂盒及其应用。本发明试剂盒通过检测尿液标本S100A6蛋白，可反映个体是否具有细菌尿路感染可能性或尿路感染倾向性，具有实用性强、灵敏度高等优点。

