



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110261609 A

(43)申请公布日 2019.09.20

(21)申请号 201910516515.X

(22)申请日 2019.06.14

(71)申请人 上海四核生物科技有限公司

地址 200030 上海市徐汇区虹桥路333号3
幢465室

(72)发明人 王靖方 庞世超 徐泓淋 杨俊晨

(74)专利代理机构 上海段和段律师事务所

31334

代理人 李慧 郭国中

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页

(54)发明名称

ZBTB5蛋白作为胃癌血清生物标志物的应用
及其试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种ZBTB5蛋白作为胃癌血清生物标志物的应用及其试剂盒，所述试剂盒包括：包被于酶标板上的ZBTB5蛋白、0U/ml的标准血清1、100U/mL的标准血清2、酶标试剂、酶底物溶液、封闭液、样品稀释液、洗涤液、终止液。本发明提供的抗ZBTB5的免疫球蛋白G抗体作为胃癌血清生物标志物具有高特异性；该试剂盒检测灵敏、安全、操作简单，可以用来定量测定人血清中蛋白质ZBTB5的免疫球蛋白G抗体水平，反映出ZBTB5蛋白的水平，从而用于胃癌诊断。

1. 一种ZBTB5蛋白作为胃癌血清生物标志物的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用，其特征在于，所述ZBTB5蛋白是从经由基因工程改造过的酿酒酵母经半乳糖诱导过量表达，再经琼脂糖亲和介质谷胱甘肽分离纯化而得到。
3. 一种胃癌血清生物标志物，其特征在于，包括ZBTB5蛋白。
4. 一种胃癌血清标志物检测试剂盒，其特征在于，包括：包被于酶标板上的ZBTB5蛋白、0U/ml的标准血清1、100U/ml的标准血清2、酶标试剂、酶底物溶液、封闭液、样品稀释液、洗涤液、终止液。
 5. 根据权利要求4所述的胃癌血清标志物检测试剂盒，其特征在于，所述酶底物溶液为TMB应用液，包括显色剂A和显色剂B；
所述显色剂A以每500mL计，包括以下各组分：醋酸钠10.7-14.2g，柠檬酸0.3-1.9g，30%双氧水0.2-0.6mL；
所述显色剂B以每500mL计，包括以下各组分：TMB 200-650mg，DMSO 5-30mL，柠檬酸3.2-7.9g。
 6. 根据权利要求4所述的胃癌血清标志物检测试剂盒，其特征在于，所述包被于酶标板上的ZBTB5蛋白的制备中，采用的包被缓冲液为0.05M碳酸盐缓冲液；所述碳酸盐缓冲液包括以下组分：碳酸钠1.59g/L，碳酸氢钠2.93g/L；所述碳酸盐缓冲液的pH值为7.4。
 7. 根据权利要求4所述的胃癌血清标志物检测试剂盒，其特征在于，所述封闭液为含有0.5%牛血清白蛋白的、浓度为0.01mol/L的PBS缓冲液，具体包括：牛血清蛋白BSA 5g/L，氯化钠8g/L、氯化钾0.2g/L、磷酸氢二钾0.2g/L、十二水合磷酸氢钠2.9g/L，pH值为7.4。
 8. 根据权利要求4所述的胃癌血清标志物检测试剂盒，其特征在于，所述样品稀释液为0.01mol/L的PBS缓冲液，具体包括：氯化钾0.2g/L，氯化钠8g/L，磷酸氢二钠0.2g/L，十二水合磷酸氢钠2.9g/L，pH值为7.4。
 9. 根据权利要求4所述的胃癌血清标志物检测试剂盒，其特征在于，所述洗涤液为0.01mol/L的PBST磷酸盐缓冲液，具体包括：氯化钾0.2g/L、氯化钠8g/L、磷酸氢二钾0.2g/L、十二水合磷酸氢钠2.9g/L、Tween-20 0.5mL/L，pH值为7.4；
所述终止液为2mol/L硫酸溶液；
所述酶标记物为辣根过氧化物酶标记的人免疫球蛋白G抗体。
 10. 一种基于权利要求4所述试剂盒测定血清中蛋白质ZBTB5的免疫球蛋白G抗体浓度的方法，其特征在于，包括以下步骤：
 - (1) 包被：将纯化的人蛋白质ZBTB5用包被缓冲液稀释至1μg/mL后加入到孔酶标板中，于37℃包被2小时，然后洗涤3次，甩干；
 - (2) 封闭：加入封闭液200μL，室温放置2小时，洗涤3次，甩干；
 - (3) 加样：将0U/ml标准血清1、100U/ml标准血清2与待测血清样品各按1:100稀释至100μL后加入到各抗原测定孔板中，晃匀后加盖或覆膜；
 - (4) 温育：酶标板置于37℃反应120分钟后甩净孔中液体，不用洗涤；
 - (5) 加酶标记：每孔加辣根过氧化物酶标记的人免疫球蛋白G抗体100μL，于37℃放置60分钟后甩净孔中液体，洗板5次后拍干。
 - (6) 显色：拍干后各孔滴先后加入显色剂A和显色剂B各50μL，震荡混匀，于37℃避光放置显色15分钟后，加入终止液50μL，终止反应。

(7) 用酶联仪在450nm波长依序测量各孔的光密度,然后进行计算,即得血清中抗蛋白ZBTB5的免疫球蛋白G抗体浓度。

ZBTB5蛋白作为胃癌血清生物标志物的应用及其试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物科学领域,具体涉及一种ZBTB5蛋白作为胃癌血清生物标志物的应用及其试剂盒。

背景技术

[0002] 胃癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,根据世界卫生组织(WHO)的统计,胃癌的死亡率高居第二,仅次于肺癌。根据国家癌症中心和全国肿瘤登记中心的统计,胃癌在我国的发病率约为十万分之三十。以2014年为例,我国新确诊胃癌病例数约为41万例,而胃癌死亡病例为29万例(死亡率为十万分之二十一)。其中男性胃癌的发病率要远高于女性,标化发病率约为女性的2.4倍。目前,我国胃癌总体5年生存率为43.4%,但是III和IV期胃癌患者的五年生存率只有28.01%和8.42%。那么提高胃癌的早期诊断率,将会大大提高胃癌患者的治疗效果。生物标志物可以作为影像学检查的辅助手段,两者的联合使用可以大大提高胃癌的早期诊断率。

[0003] 理想的生物标志物应符合有以下特征:(1)高特异性,即标志物在对应的组织中特异性的表达;(2)标志物的浓度和肿瘤大小、转移、恶性程度有关,可以协助肿瘤分期和判断预后;(3)半衰期短、敏感性高,可以快速反映体内的生理状况,在患病状态下快速升高,但是有效治疗后浓度很快下降;(4)易于检测。

[0004] 目前已经有一些胃癌生物标志物在临床中应用:(1)癌胚抗原(Carcinoembryonic antigen,CEA),是一种具有人类胚胎抗原特性的酸性糖蛋白,存在于胃癌及其它腺癌患者的血清中,但对早期胃癌的诊断意义较小,主要用于胃癌治疗前后的动态观察;(2)糖蛋白,如CA125、CA19-9、CA50、CA724以及CA242等,虽然这些糖蛋白抗原在部分胃癌患者中有升高现象,但其敏感性只有20~40%;(3)肿瘤基因,如DDC、c-myc、c-erb-2、p53以及nm23等对胃癌的发生、转移也有一定意义,但广泛应用于临床仍受限制。综上所述,现有生物标志物在胃癌诊断中的表现都不是很理想,因此我们需要寻找全新的胃癌生物标志物。

[0005] 人蛋白质ZBTB5(zinc finger and BTB domain-containing protein 5)是由第9号染色体9p13.2上的ZBTB5基因所编码,共含有677个氨基酸,分子量为74.29kDa,等电点为5.79。ZBTB5蛋白在N端含有一个BTB结构域,用于介导蛋白质相互作用;而其C端含有5个C2H2锌指结构域,用于介导其与DNA的结合。目前未见有将ZBTB5蛋白质作为胃癌生物标志物的报导。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种ZBTB5蛋白作为胃癌血清生物标志物的应用及其试剂盒。利用该血清标志物检测胃癌的特异性为85%,敏感性为80%,所提供的试剂盒为一种灵敏、安全、操作简单的胃癌诊断试剂盒,可以用来定性检测人血清中蛋白质ZBTB5的免疫球蛋白G抗体水平,由此反映ZBTB5蛋白的水平。

[0007] 本试剂盒采用酶联免疫吸附测定技术(Enzyme linked immunosorbent assay,

ELISA),应用间接法定性检测人血清中蛋白质ZBTB5的免疫球蛋白G抗体水平。用纯化的人蛋白质ZBTB5包被微孔板制成固相抗原,然后往包被抗原的微孔中依次加入待测血清与相关试剂,再与HRP标记的二抗结合,形成ZBTB5-抗体-酶标二抗复合物,最后经过彻底洗涤后加底物TMB显色。TMB在HRP酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色,其颜色深浅与测试样品中蛋白质ZBTB5的免疫球蛋白G抗体水平呈正相关。最后使用酶标仪在450nm波长下测定吸光度值(OD值)作为量化检测结果。

[0008] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

[0009] 第一方面,本发明提供了一种ZBTB5蛋白作为胃癌血清生物标志物的应用。

[0010] 优选地,所述ZBTB5蛋白是从经由基因工程改造过的酿酒酵母经半乳糖诱导过量表达,再经琼脂糖亲和介质谷胱甘肽分离纯化而得到。

[0011] 优选地,所述ZBTB5蛋白为人ZBTB5蛋白。

[0012] 第二方面,本发明提供了一种胃癌血清生物标志物,包括ZBTB5蛋白。

[0013] 第三方面,本发明提供了一种胃癌血清标志物检测试剂盒,包括:包被于酶标板上的ZBTB5蛋白、0U/ml的标准血清1、100U/ml的标准血清2、酶标试剂、酶底物溶液、封闭液、样品稀释液、洗涤液、终止液。

[0014] 优选地,所述酶底物溶液为TMB应用液,包括显色剂A和显色剂B;

[0015] 所述显色剂A以每500mL计,包括以下各组分:醋酸钠10.7-14.2g,柠檬酸0.3-1.9g,30%双氧水0.2-0.6mL;

[0016] 所述显色剂B以每500mL计,包括以下各组分:TMB 200-650mg,DMSO 5-30mL,柠檬酸3.2-7.9g。

[0017] 优选地,所述包被于酶标板上的ZBTB5蛋白的制备中,采用的包被缓冲液为0.05M碳酸盐缓冲液;所述碳酸盐缓冲液包括以下组分:碳酸钠1.59g/L,碳酸氢钠2.93g/L;所述碳酸盐缓冲液的pH值为7.4。

[0018] 优选地,所述封闭液为含有0.5%牛血清白蛋白的、浓度为0.01mol/L的PBS缓冲液,具体包括:牛血清蛋白BSA5g/L,氯化钠8g/L、氯化钾0.2g/L、磷酸氢二钾0.2g/L、十二水合磷酸氢钠2.9g/L,pH值为7.4。

[0019] 优选地,所述样品稀释液为0.01mol/L的PBS缓冲液,具体包括:氯化钾0.2g/L,氯化钠8g/L,磷酸氢二钠0.2g/L,十二水合磷酸氢钠2.9g/L,pH值为7.4。

[0020] 优选地,所述洗涤液为0.01mol/L的PBST磷酸盐缓冲液,具体包括:氯化钾0.2g/L、氯化钠8g/L、磷酸氢二钾0.2g/L、十二水合磷酸氢钠2.9g/L、Tween-20 0.5mL/L,pH值为7.4。

[0021] 优选地,所述终止液为2mol/L硫酸溶液;

[0022] 所述酶标记物为辣根过氧化物酶标记的人免疫球蛋白G抗体。

[0023] 第四方面,本发明提供了一种基于前述试剂盒测定血清中蛋白质ZBTB5的免疫球蛋白G抗体浓度的方法,包括以下步骤:

[0024] (1)包被:将纯化的人蛋白质ZBTB5用包被缓冲液稀释至1 μ g/mL后加入到孔酶标板中,于37℃包被2小时,然后洗涤3次,甩干;

[0025] (2)封闭:加入封闭液200 μ L,室温放置2小时,洗涤3次,甩干;

[0026] (3)加样:将0U/ml标准血清1、100U/ml标准血清2与待测血清样品各按1:100稀释

至100 μ L后加入到各抗原测定孔板中,晃匀后加盖或覆膜;

[0027] (4) 温育:酶标板置于37℃反应120分钟后甩净孔中液体,不用洗涤;

[0028] (5) 加酶标记:每孔加辣根过氧化物酶标记的人免疫球蛋白G抗体100 μ L,于37℃放置60分钟后甩净孔中液体,洗板5次后拍干。

[0029] (6) 显色:拍干后各孔滴先后加入显色剂A和显色剂B各50 μ L,震荡混匀,于37℃避光放置显色15分钟后,加入终止液50 μ L,终止反应。

[0030] (7) 用酶联仪在450nm波长依序测量各孔的光密度,然后进行计算,即得血清中蛋白质ZBTB5的免疫球蛋白G抗体浓度。

[0031] 与现有技术相比,本发明具有如下的有益效果:

[0032] 1. 本发明提供的ZBTB5蛋白作为胃癌血清生物标志物具有高特异性;

[0033] 2. 本发明提供了一种灵敏、安全、操作简单的商品化试剂盒,可以用来定性定量测定人血清中蛋白质ZBTB5的免疫球蛋白G抗体水平,反映出ZBTB5蛋白的水平,从而用于胃癌诊断。

具体实施方式

[0034] 下面结合具体实施例对本发明进行详细说明。以下实施例将有助于本领域的技术人员进一步理解本发明,但不以任何形式限制本发明。应当指出的是,对本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变化和改进。这些都属于本发明的保护范围。

[0035] 本发明结合实施例做进一步的说明。

[0036] 实施例1

[0037] 1. 表达、纯化及鉴定ZBTB5蛋白:

[0038] 人蛋白质ZBTB5的获得是采用常规方法,从经过基因工程改造的酿酒酵母利用半乳糖诱导过量表达,再经琼脂糖亲和介质谷胱甘肽分离纯化所得,并经过Western-Blotting鉴定。

[0039] 2. 血清样品的准备:

[0040] 全血标本于室温放置2小时后离心20分钟,取上清液进行分装,并放于-80℃保存。解冻后的血清样品需再次离心后才可用于检测。

[0041] 3. ELISA法各种缓冲液及试剂的配制方法:

[0042] (1) 包被缓冲液:0.05M碳酸钠-碳酸氢钠(pH 9.6)

包被缓冲液	用量(g)
Na ₂ CO ₃	1.59
NaHCO ₃	2.93
ddH ₂ O	加至 1000 mL

[0044] (2) 样品稀释液:pH 7.4的PBS溶液

	样品稀释液	用量 (g)
[0045]	NaCl	8.0
	KH ₂ PO ₄	0.2
	Na ₂ HPO ₄ • 12H ₂ O	2.9
[0046]	KCl	0.2
	ddH ₂ O	加至 1000 mL
[0047]	(3) 洗涤液:pH 7.4的PBST溶液	
	洗涤液	用量 (g)
	NaCl	8.0
	KH ₂ PO ₄	0.2
[0048]	Na ₂ HPO ₄ • 12H ₂ O	2.9
	KCl	0.2
	Tween-20	0.5 mL
	ddH ₂ O	加至 1000 mL
[0049]	(4) 封闭液:0.5%BSA的PBS溶液(pH 7.4)	
	封闭液	用量 (g)
	BSA	5.0
	NaCl	8.0
[0050]	KH ₂ PO ₄	0.2
	Na ₂ HPO ₄ • 12H ₂ O	2.9
	KCl	0.2
	ddH ₂ O	加至 1000 mL
[0051]	(5) 酶底物溶液:显色剂A和显色剂B	
	显色剂 A	用量
	醋酸钠	10.7-14.2 g
[0052]	柠檬酸	0.3-1.9 g
	30 %双氧水	0.2-0.6 mL
	ddH ₂ O	加至 500 mL
[0053]	(现配现用)	

[0054]	显色剂 B	用量
	TMB	200-650 mg
	DMSO	5-30 mL
[0055]	柠檬酸·H ₂ O	3.2-7.9 g
	ddH ₂ O	加至 500 mL
[0056]	(现配现用)	
[0057]	(6) 终止液: 2mol/L硫酸溶液	
	终止液	用量
[0058]	95%-98%浓硫酸	22.2 mL
	ddH ₂ O	加至 500 mL
[0059]	(配时将浓硫酸缓慢滴入蒸馏水中,边加边混匀)	
[0060]	4. ELISA法测定血清中蛋白质ZBTB5的人免疫球蛋白G抗体浓度及胃癌诊断:	
[0061]	具体操作步骤如下:	
[0062]	(1) 包被: 将纯化的人蛋白质ZBTB5用包被缓冲液稀释至1μg/mL后加入到96孔酶标板中,于37℃包被2小时,然后采用洗涤液洗涤3次,甩干。	
[0063]	(2) 封闭: 加入封闭液200μL,室温放置2小时,采用洗涤液洗涤3次,甩干。	
[0064]	(3) 加样: 将标准品(0U/ml标准血清1、100U/ml标准血清2;为直接购买)与待测血清样品(步骤2的方法所得)各按1:100稀释(采用样品稀释液)至100μL后加入到步骤(1)制备的包被人蛋白质ZBTB5的96孔酶标板中,晃匀后加盖或覆膜。标准品及待检测样品需在临用前15分钟内配制,用完即丢弃。	
[0065]	(4) 温育: 酶标板置于37℃反应120分钟后甩净孔中液体,不用洗涤。	
[0066]	(5) 加酶标记: 每孔加辣根过氧化物酶标记的人免疫球蛋白G抗体100μL,于37℃放置60分钟后甩净孔中液体,洗板5次后拍干。	
[0067]	(6) 显色: 拍干后各孔滴先后加入显色剂A和显色剂B各50μL,震荡混匀,于37℃避光放置显色15分钟后,加入终止液50μL,终止反应。	
[0068]	(7) 结果判定:	
[0069]	i. 用酶联仪在450nm波长依序测量各孔的光密度(OD值),然后通过以下公式计算得到血清中抗ZBTB5的免疫球蛋白G抗体的浓度(即下述公式的单位值)。	
[0070]	<u>(A450 <待测血清样品> - A450 <标准血清 1>)</u>	
	单位值 (U/ml) =	<u>(A450 <标准血清 2> - A450 <标准血清 1>) × 100</u>
[0071]	*A450是450nm处吸光度的缩写。	
[0072]	*目前ZBTB5抗体尚无国际通行的参考标准,因此本检测结果校准时采用了相对单位。	
[0073]	ii. 血清中抗ZBTB5值的判定:	

[0074]

抗ZBTB5值 (U/mL)	判定
大于5	胃癌
2-5	高危
小于2	健康

[0075] iii. 质量控制

[0076] 每个检测结果必须符合以下标准：

[0077] 标准血清1的A450: ≤ 0.100

[0078] 标准血清2的A450: ≥ 0.700

[0079] 如不符合上述标准，则结果视为无效，必须重新检测。

[0080] iv. 检验结果的解释

[0081] 对50例健康人血清、37例胃癌患者血清、14例高危患者血清的ROC分析确立了以上参考值。

[0082] 5. 特异性和敏感性检测：采用101份血清样品（50例健康人血清、37例胃癌患者血清、14例高危患者血清）对本发明进行了特异性和敏感性检测。本发明用于断胃癌诊断的特异性为85%，敏感性为80%。

[0083] 以上对本发明的具体实施例进行了描述。需要理解的是，本发明并不局限于上述特定实施方式，本领域技术人员可以在权利要求的范围内做出各种变化或修改，这并不影响本发明的实质内容。在不冲突的情况下，本申请的实施例和实施例中的特征可以任意相互组合。

专利名称(译)	ZBTB5蛋白作为胃癌血清生物标志物的应用及其试剂盒		
公开(公告)号	CN110261609A	公开(公告)日	2019-09-20
申请号	CN201910516515.X	申请日	2019-06-14
[标]发明人	王靖方 庞世超		
发明人	王靖方 庞世超 徐泓淋 杨俊晨		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/68 G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N33/57446 G01N33/57488 G01N33/6854 G01N33/6893 G01N2333/4746		
代理人(译)	李慧		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种ZBTB5蛋白作为胃癌血清生物标志物的应用及其试剂盒，所述试剂盒包括：包被于酶标板上的ZBTB5蛋白、0U/ml的标准血清1、100U/mL的标准血清2、酶标试剂、酶底物溶液、封闭液、样品稀释液、洗涤液、终止液。本发明提供的抗ZBTB5的免疫球蛋白G抗体作为胃癌血清生物标志物具有高特异性；该试剂盒检测灵敏、安全、操作简单，可以用来定量测定人血清中蛋白质ZBTB5的免疫球蛋白G抗体水平，反映出ZBTB5蛋白的水平，从而用于胃癌诊断。

包被缓冲液	用量(g)
Na ₂ CO ₃	1.59
NaHCO ₃	2.93
ddH ₂ O	加至1000 mL