



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106093397 A

(43)申请公布日 2016.11.09

(21)申请号 201610412928.X

(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 陈婉明 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 33/574(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

以谷胱甘肽过氧化物酶 3为标志物的乳腺
癌诊断试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种以谷胱甘肽过氧化物酶3为
标志物的乳腺癌诊断试剂盒，属于蛋白检测领
域。所述试剂盒的特点是以谷胱甘肽过氧化物酶
3为标志物。本发明还提供一种用于诊断乳腺癌
的试剂盒，其包括可结合、吸附和/或偶联谷胱甘
肽过氧化物酶3的抗体。以GSH-Px3为标志物和/
或采用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、灵敏度高、准确性好等优
点。

1. 用于乳腺癌诊断的试剂盒,其特征在于,以谷胱甘肽过氧化物酶3为所述诊断的标志物。
2. 用于乳腺癌诊断的试剂盒,其特征在于,包括可结合、吸附和/或偶联谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体。
3. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,所述抗体包括:一抗:谷胱甘肽过氧化物酶3小鼠单克隆抗体;二抗:过氧化物酶羊抗鼠 IgG多克隆抗体。
4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述一抗的工作浓度范围:0.2 μ g/ml-0.5 μ g/ml,二抗的工作浓度范围:0.01 μ g/ml-0.02 μ g/ml。
5. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,还包括用于蛋白免疫印迹检测的常规试剂。
6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述蛋白免疫印迹检测的常规试剂包括:12%聚丙烯酰胺凝胶,用于分离蛋白;还包括吐温-20、TEMED、2*SDS上样缓冲液、 β -巯基乙醇、封闭液、洗涤液、转膜液和ECL发光液等。
7. 谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体在制备乳腺癌诊断试剂盒方面的应用。
8. 权利要求1-6任一所述试剂盒的制备方法,其特征在于,所述试剂盒内装有检测谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体;和/或
在标有乳腺癌诊断用途的包装盒内放置有检测谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体。
9. 根据权利要求8所述的制备方法,其特征在于,所述试剂盒内还装有用于蛋白免疫印迹检测的常规试剂。
10. 根据权利要求9所述的制备方法,其特征在于,所述抗体包括:浓度范围为0.2 μ g/ml-0.5 μ g/ml的谷胱甘肽过氧化物酶3小鼠单克隆抗体,用作一抗;浓度范围为0.01 μ g/ml -0.02 μ g/ml的过氧化物酶羊抗鼠 IgG多克隆抗体,用作二抗。

以谷胱甘肽过氧化物酶 3为标志物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,具体涉及一种以谷胱甘肽过氧化物酶3为标志物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一位,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] 谷胱甘肽过氧化物酶 3(Glutathione peroxidase3, GSH-Px3)属于硒蛋白家族,是人们在哺乳动物体内寻找到的第一个含硒酶。GSH-Px存在于所有真核细胞当中,可催化谷胱甘肽还原活性氧自由基,减少过氧化物对机体的损伤。从人或动物的组织和细胞中提纯的GSH-Px,分子质量为76~95 KDa,为水溶性四聚体。至今,研究发现4种重要的GSH-Px同工酶,分别是磷脂氢GSH-Px (PHGPx)、细胞内GSH-Px (cGPx)、血浆GSH-Px3 (pGPx) 和胃肠道GSH-Px (giGPx)。

[0004] 血浆GSH-Px3是一种糖基化的硒蛋白,主要在细胞外发挥抗氧化功能,不仅参与有机氢过氧化、还原氢过氧化物的反应,还可作用于磷脂氢过氧化物和胆固醇氢过氧化物,通过调节细胞外过氧化物的浓度,调控机体防御反应^[1~5]。近期发现一个GSH-Px3的可能机制:表观遗传学会抑制GSH-Px3在癌细胞中的表达。在大量子宫内膜癌、食道癌和前列腺癌患者中,发现GSH-Px3启动子甲基化。

[0005] 现有技术中常用的乳腺癌诊断标志物有CEA(癌胚抗原)、ER(雌激素受体)、PR(孕激素受体)、HER2(人类表皮生长因子2)、p53、CA 15.3、BR 27.29、MCA、CA 549-MUC-1家庭等,用这些现有的标志物进行诊断时,都缺乏足够的灵敏度和特异性。因此本领域亟需开发出新的标志物来完善乳腺癌诊断技术。

[0006] 以GSH-Px3做为乳腺癌诊断标志物,本领域尚未见此类报道。

发明内容

[0007] 本发明基于本领域的上述需求和空白,提供一种全新的用于诊断乳腺癌的试剂盒,它是基于谷胱甘肽过氧化物酶3(GSH-Px3)为诊断标志物的。本发明所述的试剂盒能够方便快捷、较为准确地诊断出乳腺癌。

[0008] 本发明的技术方案如下:

用于乳腺癌诊断的试剂盒,其特征在于,以谷胱甘肽过氧化物酶3为所述诊断的标志物。

[0009] 用于乳腺癌诊断的试剂盒,其特征在于,包括可结合、吸附和/或偶联谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体。

[0010] 所述抗体包括:一抗:谷胱甘肽过氧化物酶3小鼠单克隆抗体;
二抗:过氧化物酶羊抗鼠 IgG多克隆抗体。

[0011] 所述一抗的工作浓度范围:0.2 μ g/mI-0.5 μ g/mI,二抗的工作浓度范围:0.01 μ g/mI-0.02 μ g/mI。

[0012] 所述试剂盒还包括用于蛋白免疫印迹检测的常规试剂。

[0013] 所述蛋白免疫印迹检测的常规试剂包括:12%聚丙烯酰胺凝胶,用于分离蛋白;还包括吐温-20、TEMED、2*SDS上样缓冲液、 β -巯基乙醇、封闭液、洗涤液、转膜液和ECL发光液等。

[0014] 谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体在制备乳腺癌诊断试剂盒方面的应用。

[0015] 所述试剂盒的制备方法,其特征在于,所述试剂盒内装有检测谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体;和/或

在标有乳腺癌诊断用途的包装盒内放置有检测谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体。

[0016] 所述试剂盒内还装有用于蛋白免疫印迹检测的常规试剂。

[0017] 所述抗体包括:浓度范围为0.2 μ g/mI-0.5 μ g/mI的谷胱甘肽过氧化物酶3小鼠单克隆抗体,用作一抗;浓度范围为0.01 μ g/mI -0.02 μ g/mI的过氧化物酶羊抗鼠 IgG多克隆抗体,用作二抗。

[0018] 本发明提供一种用于乳腺癌诊断的试剂盒,其特征在于,以谷胱甘肽过氧化物酶3(GSH-Px3)为所述诊断的标志物。本申请的发明核心在于创新地采用GSH-Px3为乳腺癌诊断标志物。本发明通过检测临床收集的乳腺癌患者血样和健康人群血样中的GSH-Px3蛋白表达程度,证实了GSH-Px3蛋白的过表达与乳腺癌的发生呈显著相关;此外,本发明还通过对GSH-Px3标志物与现有常用标志物CEA在诊断乳腺癌方面的数据,发现本发明的GSH-Px3标志物在乳腺癌临床诊断方面的准确率高达89.9%。在本发明的启发下,只要是围绕GSH-Px3展开的任何试剂的组合,且该组合是用来进行乳腺癌诊断的,那么所述任何试剂的组合即落入本发明请求保护的范围。

[0019] 本发明还提供一种具体的用于乳腺癌诊断的试剂盒,它包括可结合、吸附和/或偶联谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体。在本发明的一些实施例中采用的western blot,而本领域还可用其它常规方法检测GSH-Px3蛋白在血液中的表达程度或浓度,例如,酶联免疫吸附法,该方法中所用到的吸附GSH-Px3的抗体也落入本发明请求保护的范围。

[0020] 在本发明一些具体的实施例中,所述抗体包括:谷胱甘肽过氧化物酶3一抗,具体是谷胱甘肽过氧化物酶3小鼠单克隆抗体,用它做一抗的好处是:灵敏度高、特异性好,可检测人体血清中的谷胱甘肽过氧化物酶3,所述抗体还包括:识别一抗的二抗,具体是过氧化物酶羊抗鼠 IgG多克隆抗体;好处是灵敏度高、特异性好,可结合谷胱甘肽过氧化物酶3一抗。

[0021] 在本发明优选的实施例中,上述一抗的工作浓度范围:0.2 μ g/mI-0.5 μ g/mI;二抗的工作浓度范围:0.01 μ g/mI-0.02 μ g/mI。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GSH-Px3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,本发明摸索了GSH-Px3一抗和二抗的工作浓度,发现采用上述浓度范围的一抗和二抗结合效率最高,检测结果更为可靠和准确。

[0022] 为完善本发明的便捷度,一些优选的实施例中,所述试剂盒还包括用于蛋白免疫印迹(western blot)检测的常规试剂,和/或用于2-DE LC-MS/MS蛋白质组分析的常规试剂。具体地,所述蛋白免疫印迹检测的常规试剂包括:12%聚丙烯酰胺凝胶,用于分离蛋白;还包括吐温-20、TEMED、2*SDS上样缓冲液、β-巯基乙醇、封闭液、洗涤液、转膜液和ECL发光液等。本发明还请求保护GSH-Px3在制备乳腺癌诊断试剂盒方面的应用。

[0023] 在一些国家专利法允许的情形下,本发明还请求保护:GSH-Px3和/或所述试剂盒在乳腺癌临床诊断方面的用途。具体操作步骤为:用蛋白免疫印迹法检测待测血样和健康人血样中的GSH-Px3表达,对二者的蛋白表达条带的灰度值进行T检验,看待测血样中的GSH-Px3表达灰度值是否显著高于健康人的,如果差异显著,则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。

[0024] 本发明还请求保护所述试剂盒的制备方法,其特征在于,所述试剂盒内装有检测谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体;和/或,在标有乳腺癌诊断用途的包装盒内放置有检测谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体。

[0025] 在进一步的实施例中,所述试剂盒内还装有用于蛋白免疫印迹检测的常规试剂。

[0026] 以GSH-Px3为诊断标志物和/或采用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、灵敏度高、准确性好等优点。

[0027]

附图说明

[0028] 图1是经蛋白免疫印迹法(Western blot)检测GSH-Px3 在不同人体的血清中的表达情况,其中7例恶性乳腺癌血清,4例良性乳腺癌血清和2例健康人血清。

[0029] 图2是GSH-Px3蛋白表达直方图,是图1的条带用Image J软件计算得出的灰度值,其中*p<0.05恶性vs健康;#p<0.05恶性vs良性;经统计分析,恶性vs健康P=0.0286<0.05,恶性vs良性P=0.0402<0.05,差异都具有统计学意义。

[0030]

具体实施方式

[0031] 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。

[0032]

生物材料来源

本发明实施例所用到的人血样来自于厦门大学附属第一医院。

[0033]

实施例1、GSH-Px3可用作乳腺癌诊断标志物的表达验证

采用蛋白免疫印迹法,用12%聚丙烯酰胺凝胶,每例血清样本取15ug上样,GSH-Px3的一抗采用的是:谷胱甘肽过氧化物酶3小鼠单克隆抗体,其用PBS缓冲液稀释到0.2μg/ml-0.5μg/ml,优选0.2μg/ml;二抗采用的是:过氧化物酶羊抗鼠IgG多克隆抗体,其用PBS缓冲液稀释到0.01μg/ml-0.02μg/ml,优选0.02μg/ml。从图1和图2中,发现GSH-Px3在乳腺癌患者血清中浓度与健康对照组相比,呈升高趋势,并通过健康人与乳腺癌患者之间血清中GSH-Px3的表达进行显著性分析(T-test),如果待测血样中的GSH-Px3表达量与健康人血清中的GSH-Px3表达量相比较,升高趋势差异显著的话,说明该待测血样对应的临床个体患有乳腺癌。

[0034] 同时,用2-DE LC-MS/MS蛋白质组分析进行平行验证。所述2-DE LC-MS/MS蛋白质组分析,是基于2-DE LC-MS/MS质谱技术和生物信息学分析的差异蛋白质组学技术平台,对血清双向电泳的条件进行了优化,成功分离并鉴定出乳腺癌患者与健康对照组的差异蛋白质。所用到的试剂有:水化上样缓冲液\胶条平衡缓冲液、低熔点琼脂糖封胶液、胰酶溶液、12%的聚丙烯酰胺、吐温-20、TEMED、2*SDS上样缓冲液、β-巯基乙醇、封闭液、洗涤液、转膜液和ECL发光液等;分析过程:双向电泳分离蛋白、LC-MS/MS质谱技术鉴定蛋白和生物信息学分析乳腺癌血清中的差异表达蛋白。

[0035] 采用本发明的GSH-Px3做为标志物,利用Western blot检测其表达,结果与2-DE LC-MS/MS蛋白质组分析结果一致。说明GSH-Px3蛋白可用作乳腺癌诊断标志物。

[0036]

实施例2、本发明所述的乳腺癌诊断试剂盒

本实施例提供一种用于乳腺癌诊断的试剂盒,包括可结合、吸附和/或偶联GSH-Px3的抗体。

[0037] 具体地,所述抗体包括:谷胱甘肽过氧化物酶3一抗,具体是谷胱甘肽过氧化物酶3小鼠单克隆抗体,用它做一抗的好处是:灵敏度高、特异性好,可检测人体血清中的谷胱甘肽过氧化物酶3,所述抗体还包括:识别一抗的二抗,具体是过氧化物酶羊抗鼠IgG多克隆抗体;好处是灵敏度高、特异性好,可结合谷胱甘肽过氧化物酶3一抗。

[0038] 优选地,所述一抗的工作浓度范围:0.2μg/ml-0.5μg/ml;二抗的工作浓度范围:0.01μg/ml-0.02μg/ml。

[0039] 进一步地,所述试剂盒还包括用于Western blot检测的常规试剂。

[0040] 具体地,所述Western blot检测的常规试剂包括:12%聚丙烯酰胺凝胶,用于分离蛋白;还包括吐温-20、TEMED、2*SDS上样缓冲液、β-巯基乙醇、封闭液、洗涤液、转膜液和ECL发光液等。

[0041]

实施例3、采用本发明所述的试剂盒进行乳腺癌诊断

在本实施例中,搜集了11份乳腺癌病人血样,采用本发明的试剂盒进行乳腺癌诊断,其中9个被诊断出患有乳腺癌,检出率88.2%;检测20份健康人血样,GSH-Px3含量均正常。

[0042] 本领域现有的乳腺癌血清学诊断方法,最常用的是以CEA为肿瘤标志物的检测方法(酶联免疫吸附法),采用该方法对上述同样的11份乳腺癌病人血样进行检测,结果发现有8个患有乳腺癌。

[0043] 本发明的试剂盒与常规方法的吻合率为89.9%。

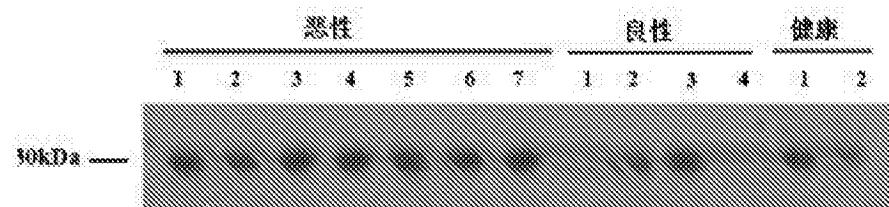


图1

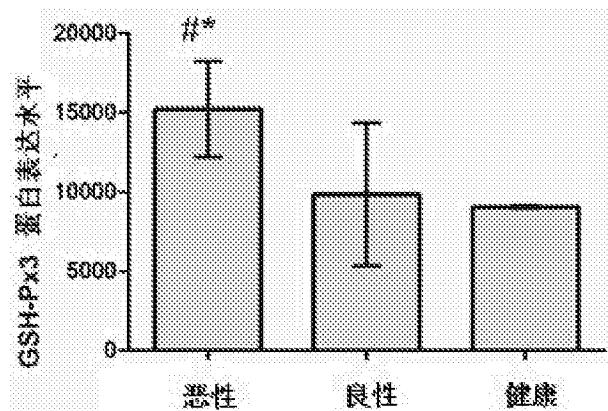


图2

专利名称(译)	以谷胱甘肽过氧化物酶 3为标志物的乳腺癌诊断试剂盒		
公开(公告)号	CN106093397A	公开(公告)日	2016-11-09
申请号	CN201610412928.X	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 陈婉明 洪万进		
发明人	王团老 陈婉明 洪万进		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/57415 G01N33/531 G01N33/57488		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及一种以谷胱甘肽过氧化物酶3为标志物的乳腺癌诊断试剂盒，属于蛋白检测领域。所述试剂盒的特点是以谷胱甘肽过氧化物酶3为标志物。本发明还提供一种用于诊断乳腺癌的试剂盒，其包括可结合、吸附和/或偶联谷胱甘肽过氧化物酶3的抗体。以GSH-Px3为标志物和/或采用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、灵敏度高、准确性好等优点。

