



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110261610 B

(45) 授权公告日 2021.08.06

(21) 申请号 201910516524.9

G01N 33/535 (2006.01)

(22) 申请日 2019.06.14

G01N 33/543 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110261610 A

(56) 对比文件

CN 102680706 A, 2012.09.19

(43) 申请公布日 2019.09.20

Reina Tsuda等. Monoclonal Antibody

(73) 专利权人 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

Against Citrullinated Peptides Obtained
From Rheumatoid Arthritis Patients Reacts
With Numerous Citrullinated Microbial and
Food Proteins.《ARTHRITIS & RHEUMATOLOGY》
.2015,第 67卷(第8期),

(72) 发明人 王靖方 庞世超 徐泓淋 杨俊晨

审查员 李倩

(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)

权利要求书2页 说明书6页

(54) 发明名称

ZNF74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ZNF74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ZNF74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ZNF74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ZNF74的免疫球蛋白G抗体水平,反映出ZNF74蛋白的水平,从而用于胃癌诊断。

1. 一种检测ZNF74蛋白的免疫球蛋白G抗体的试剂在制备胃癌血清标志物检测试剂盒中的应用。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述ZNF74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. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述胃癌血清标志物检测试剂盒包括:包被于酶标板上的ZNF74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;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。

4. 根据权利要求3所述的应用,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。

5. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述包被于酶标板上的ZNF74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。

6. 根据权利要求3所述的应用,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。

7. 根据权利要求3所述的应用,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。

8. 根据权利要求3所述的应用,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。

9. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述ZNF74蛋白的免疫球蛋白G抗体的浓度检测方法包括以下步骤:

(1) 包被:将纯化的人蛋白质ZNF74用包被缓冲液稀释至1 μ g/mL后加入到孔酶标板中,于37 $^{\circ}$ C包被2小时,然后洗涤3次,甩干;

(2) 封闭:加入封闭液200 μ L,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100 μ L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 $^{\circ}$ C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100 μ L,于37 $^{\circ}$ C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50 μ L,震荡混匀,于37 $^{\circ}$ C避光放置显色15分钟后,加入终止液50 μ L,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, 即得血清中抗蛋白质ZNF74的免疫球蛋白G抗体浓度。

ZNF74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ZNF74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ZNF74(zinc finger protein 74)是由第22号染色体22p11.12上的ZNF74基因所编码,共含有644个氨基酸,分子量为72.21kDa。目前未见有将ZNF74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ZNF74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84%,敏感性为82%,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ZNF74的免疫球蛋白G抗体水平,由此反映ZNF74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ZNF74的免疫球蛋白G抗体水平。用纯化的人蛋白质ZNF74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ZNF74-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ZNF74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ZNF74蛋白作为胃癌血清生物标志物的应用。

[0010] 优选地,所述ZNF74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ZNF74蛋白为人ZNF74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ZNF74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ZNF74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ZNF74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。

[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ZNF74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ZNF74用包被缓冲液稀释至1 μ g/mL后加入到孔酶标板中,于37 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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ZNF74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ZNF74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ZNF74的免疫球蛋白G抗体水平,反映出ZNF74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ZNF74蛋白:

[0038] 人蛋白质ZNF74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 $^{\circ}$ C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)
[0043]	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)
	NaCl	8.0
	KH ₂ PO ₄	0.2
[0045]	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.9
	KCl	0.2
	ddH ₂ O	加至 1000 mL
[0046]	(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
[0047]	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.9
	KCl	0.2
	Tween-20	0.5 mL
	ddH ₂ O	加至 1000 mL
[0048]	(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
[0049]	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
[0050]	(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
[0051]	柠檬酸	0.3-1.9 g
	30 %双氧水	0.2-0.6 mL
	ddH ₂ O	加至 500 mL
[0052]	(现配现用)	

	显色剂 B	用量
[0053]	TMB	200-650 mg
	DMSO	5-30 mL
	柠檬酸·H ₂ O	3.2-7.9 g
[0054]	ddH ₂ O	加至 500 mL
[0055]	(现配现用)	
[0056]	(6) 终止液: 2mol/L 硫酸溶液	
	终止液	用量
[0057]	95%-98%浓硫酸	22.2 mL
	ddH ₂ O	加至 500 mL

[0058] (配时将浓硫酸缓慢滴入蒸馏水中, 边加边混匀)

[0059] 4. ELISA法测定血清中蛋白质ZNF74的人免疫球蛋白G抗体浓度及胃癌诊断:

[0060] 具体操作步骤如下:

[0061] (1) 包被: 将纯化的人蛋白质ZNF74用包被缓冲液稀释至1 μ g/mL后加入到96孔酶标板中, 于37 $^{\circ}$ C包被2小时, 然后采用洗涤液洗涤3次, 甩干。

[0062] (2) 封闭: 加入封闭液200 μ L, 室温放置2小时, 采用洗涤液洗涤3次, 甩干。

[0063] (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100 μ L后加入到步骤(1)制备的包被蛋白质ZNF74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。

[0064] (4) 温育: 酶标板置于37 $^{\circ}$ C反应120分钟后甩净孔中液体, 不用洗涤。

[0065] (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 $^{\circ}$ C放置60分钟后甩净孔中液体, 洗板5次后拍干。

[0066] (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 $^{\circ}$ C避光放置显色15分钟后, 加入终止液50 μ L, 终止反应。

[0067] (7) 结果判定:

[0068] 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

[0069] 得到血清中抗ZNF74的免疫球蛋白G抗体的浓度 (即下述公式的单位值)。

$$\frac{(A_{450} < \text{待测血清样品} > - A_{450} < \text{标准血清 1} >)}{A_{450} < \text{标准血清 2} > - A_{450} < \text{标准血清 1} >}$$

[0070]

$$\text{单位值 (U/ml)} = \frac{(A_{450} < \text{待测血清样品} > - A_{450} < \text{标准血清 1} >)}{A_{450} < \text{标准血清 2} > - A_{450} < \text{标准血清 1} >} \times 100$$

[0071] *A₄₅₀是450nm处吸光度的缩写。

[0072] *目前ZNF74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ZNF74值的判定:

[0074]	抗ZNF74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84%，敏感性为82%。

[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。