



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104111335 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 22

(21) 申请号 201310571342. 4

(22) 申请日 2013. 11. 13

(71) 申请人 唐勇

地址 210000 江苏省南京市浦口高新区龙泰路 22 号裕民家园 57 栋 3 单元 505

(72) 发明人 唐勇

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

胃蛋白酶原 I / II 胶乳增强免疫比浊法测定试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种血清中胃蛋白酶原 I (PGI) 和胃蛋白酶原 II (PGII) 含量测定的试剂盒。所要解决的技术问题是提供一种适用于散射比浊仪或全自动生化分析仪使用的 PGI 和 PGII 含量测定试剂盒。检测试剂盒包括 :a、R1 :缓冲液、加速剂、表面活性剂,其余为纯化水 ;b、R2-I :缓冲液、结合有抗人 PGI 抗体的乳胶微球 ;c、R2-II :缓冲液、结合有抗人 PGII 抗体的乳胶微球 ;d、校准品 1 :缓冲液,稳定剂,防腐剂以及一定量的重组 PGI 蛋白纯品,其余为纯化水 ;e、校准品 2 :缓冲液,稳定剂,防腐剂以及一定量的重组 PGII 蛋白纯品,其余为纯化水。通过以上试剂组合,快速测定血清中 PGI 和 PGII 的含量。

1. 一种采用胶乳增强免疫比浊法检测人血清中 PGI 和 PGII 含量的试剂盒,其特征在在于,包含试剂 R1,R2 以及校准液;所述试剂 R1 为 PH 值为 7.2-8.6 的缓冲液,所述试剂 R2 为抗人 PGI 抗体胶乳试剂或抗人 PGII 抗体胶乳试剂;所述标准品为含有定量的 PGI 或 PGII 的重组蛋白或者是从人血清中提取出来的天然 PGI 或 PGII。

2. 根据权利要求 1 要求所述的试剂盒,其特征在在于,所述抗人 PGI 抗体和抗人 PGII 抗体均为本公司自己研制的多抗或几对单克隆抗体。

3. 根据权利要求 1 要求所述的试剂盒,其特征在在于,所述抗人 PGI 抗体和抗人 PGII 抗体的胶乳试剂的制备包括以下步骤。

步骤 1:将羧化的胶乳在 PH7.0 的溶液活化。

步骤 2:洗涤去掉溶液中的碳化二亚胺,加 PH7.5-9.0 的缓冲液,加入 PGI 或 PGII 抗体,在 37 度反应 4 小时。

步骤 3:将步骤 2 所得的液体用 PH7.5-9.0 的固定液固定 6 小时。

步骤 4:将步骤 3 所得的液体用 PH7.5-9.0 的封闭液体封闭 12 小时。

步骤 5:将步骤 4 所得的液体离心去上清液,取沉淀后用含有稳定剂和防腐剂的缓冲液洗涤分散即得。

4. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在在于,步骤 1 所述溶液为含有 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐或 N-羟基琥珀酰亚胺中的一种或者二种。

5. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在在于,步骤 3 所述溶液含有 6-氨基己酸,甘氨酸。

6. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在在于,步骤 2 所述的洗涤过程为高速冷冻离心机离心或者是用孔径小于 100nm 的中空纤维管状进行过滤。

7. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在在于,步骤 4 所述溶液含有的稳定剂选自甘氨酸,小牛血清,以及吐温-20、曲拉通等表面活性剂以及氯化钠、氯化镁中的一种或者几种。

8. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在在于,步骤 4 所述溶液含有的甘氨酸,小牛血清的浓度为 0.05-0.5% (质量分数),吐温-20 或者曲拉通浓度为 0.005-0.01% (体积分数),氯化镁、氯化钠的浓度为 0.05-0.15% (质量分数)。

胃蛋白酶原 I / II 胶乳增强免疫比浊法测定试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种采用乳胶增强免疫比浊法测定人血清中胃蛋白酶原 I 和胃蛋白酶原 II 含量的试剂盒。

背景技术

[0002] 胃蛋白酶原 (PG) 是一种门冬氨酸蛋白酶前体,是分子质量为 42kDa 的单链多肽,包括 3 个二硫键,等电点为 3.7。根据胃蛋白酶原生化性质和免疫原性将其分成 2 个亚群,1-5 组分的免疫原性相同,称为胃蛋白酶原 I (PGI),主要由胃底腺的主细胞和黏液颈细胞分泌;组分 6 和 7 被称为胃蛋白酶原 II (PGII),除由胃体和胃底黏膜的泌酸腺的主细胞分泌外,泌酸腺的黏液颈细胞、贲门腺和胃窦的幽门腺的黏液细胞以及十二指肠上段的 Brunner 腺也能产生 PGII。胃蛋白酶原 I 和胃蛋白酶原 II 的基因位点、免疫反应性及生化特性上均存在一定差异。不同种的 PG 的产生似乎与以下几种因素相关:结构基因的数量、个体等位基因的差异以及翻译后的修饰。胃蛋白酶原无活性,在胃内盐酸作用下,或在酸性条件下,通过自身催化,从 N 端水解 42 个氨基酸残基后而转变为有活性的胃蛋白酶。胃蛋白酶为内切酶,可分解大部分蛋白质为肽和胺,产生的多肽或氨基酸较少。在 PG 转变成胃蛋白酶的过程中,分子量由 42kDa 降为 35kDa,等电点由 3.7 降为 -1,主细胞中的 PG 贮存在细胞顶部的分泌颗粒中,当细胞受到刺激时,通过胞吐作用大部分释入腺腔,只有 1% 进入血液循环。在正常人血清中的 PGI 浓度是 PGII 的 6 倍。由于胃几乎是 PG 的唯一来源,并且在分泌阶段的分泌量会发生变化,因此,血清 PGI 和 PGII 不仅反映了胃黏膜腺体和细胞的数量,也间接反映了胃黏膜不同部位的分泌功能。PGI 是检测胃泌酸腺细胞功能的指针,胃酸分泌增多 PGI 升高,分泌减少或胃粘膜腺体萎缩 PGI 降低;高浓度的 PGI 还作为十二指肠溃疡及其并发症的危险性的一个亚临床指征,也可以作为观察 Hpylori 感染根除治疗疗效的一个指标。PGII 与胃底粘膜病变的相关性较大(相对于胃窦粘膜),其升高与胃底腺管萎缩、胃上皮化生或假幽门腺化生、异型增值有关。PGI / II 比值进行性降低与胃粘膜萎缩进展相关。因此,联合测定 PGI 和 PGII 比值可起到胃底腺粘膜“血清学活检”的作用。

[0003] 胃粘膜萎缩和肠上皮化生(特别是不完全型结肠化生)及异型增生是胃癌的癌前病变,对慢性萎缩性胃炎患者尤其是伴有肠化和异型增生者进行病情监测,对于早期胃癌的发现意义重大。日本和中国胃癌患者的总数几乎占到全球胃癌患者总数的一半。胃癌的筛查工作始于 60 年代胃癌高发的日本,当时采用胃肠双重对比造影-胃镜-病理检查阶梯式的筛查方法,人力物力花费较大。自 1991 年开始,日本先后以血清 PGI < 50ng / mL 并 PGI / PGII 比值 < 3.0 和 PGI < 70ng / mL 并 PGI / PGII 比值 < 3.0 作为胃癌筛查的初筛指标,历经 5 年共检测血清样本 25415 例,检出胃癌 43 例 (0.17%),其中早癌 32 例 (74%)。另以血清 PGI < 70ng / mL 并 PGI / PGII 比值 < 3.0 为胃癌筛检的 Cut-off 值,其灵敏度 84.6%,特异度 73.5%,阳性预测值 0.81%,阴性预测值 99.9%。继后十年中已有 13 万余人接受了血清 PG 法胃癌筛查,检出胃癌患者 123 人,检出率 0.13%。

[0004] 中国专家组于 1997-1999 年在中国胃癌高发区采用两轮筛选法进行胃癌筛查,以胃镜病理组织学诊断为标准比较评价了两种初筛方法:钡剂-X 线双对比造影和血清胃蛋

白酶原 I / II 含量检测。结果显示,在接受钡剂-X 线双对比照影检测的 2693 人中,筛出应胃镜检查者 2204 人,符合胃癌诊断 4 人,检出率 0.15%;2204 人胃镜检查,查出胃癌 30 例,钡剂-X 线双对比照影和胃镜符合率只有 12.5%。而在接受血清胃蛋白酶原 I / II (PGI / PGII) 检测的 1745 人中,使用 Cut-off 值 $PGI \leq 70$ 并 $PGI / PGII \leq 3$,筛出应胃镜检查者 399 人,符合胃癌诊断 17 人,检出率 4.2%;399 人进行胃镜检查,查出胃癌 32 例,胃蛋白酶原检查和胃镜符合率为 53.13%。据此课件,血清胃蛋白酶原 I / II (PGI / PGII) 含量检测优于双对比照影,血清 PGI 含量和 PGI / PGII 值相结合更适合于作为中国人胃癌初筛和胃部重大疾病普查标准。

发明内容

[0005] 本发明的目的是建立一种新的检测方法,通过鼠抗人的胃蛋白酶原 I 抗体或胃蛋白酶原 II 抗体与胶乳颗粒偶联,采用胶乳增强比浊法来测定人体血清中 PGI 和 PGII 的含量,运用该方法的试剂具有不需要预处理标本,操作简单,准确度高,重复性好,且能够在全自动生化分析仪或者特种蛋白仪以及分光光度计上使用的优点。

[0006] 为了解决上述的技术问题,本发明实现了以下技术:

[0007] 1、一种采用胶乳增强免疫比浊法检测人血清中 PGI 和 PGII 含量的试剂盒,其特征在于,包含试剂 R1, R2 以及校准液;所述试剂 R1 的 pH 值为 7.2-8.6 的缓冲液,所述试剂 R2 为抗人 PGI 抗体胶乳试剂或抗人 PGII 抗体胶乳试剂;所述标准品为含有定量的 PGI 或 PGII 的重组蛋白或者是从人血清中提取出来的天然 PGI 或 PGII。

[0008] 2、所述的 PGI / PGII 检测试剂盒中的 R1 试剂主要包含缓冲液,无机盐,加速剂和防腐剂。

[0009] 3、所述的 PGI / PGII 检测试剂盒中 R2 试剂主要包含稳定剂,抗人单(多)克隆抗体胶乳颗粒,缓冲液,稳定剂和防腐剂。其中乳胶微球直径为 80-200nm。

[0010] 4、试剂 R1 所述的无机盐选自氯化钠,氯化钾,硫酸钾一种或几种。缓冲液为:Tris 缓冲液, MES 缓冲液,磷酸盐缓冲液,碳酸盐缓冲液,甘氨酸-氢氧化钠缓冲液中一种或几种。加速剂为聚乙二醇 4000,聚乙二醇 6000,聚乙二醇 8000 中一种或几种。

[0011] 5、试剂 R2 所选用的抗体为鼠抗人 PGI / PGII 单克隆抗体,羊抗人 PGI / PGII 单克隆抗体,兔抗人 PGI / PGII 单克隆抗体一种或者几种混合。也可以选鼠抗人 PGI / PGII 多克隆抗体,羊抗人 PGI / PGII 多克隆抗体,兔抗人 PGI / PGII 多克隆抗体其中一种。

[0012] 6、试剂 R2 中的稳定剂选自小牛白蛋白,明胶,甘氨酸,吐温 20,曲拉通中的一种或者几种。

[0013] 7、本发明所述的试剂 R2 为抗人 PGI / PGII 抗体胶乳试剂,采用的是抗人的 PGI / PGII 抗体与胶乳颗粒相偶联。经过离心(过滤)的方法去掉未反应的偶联剂以及未反应的抗体,在含有稳定剂和防腐剂的缓冲液中分散而成。

[0014] 8、所述抗人 PGI 抗体和抗人 PGII 抗体的胶乳试剂的制备包括以下步骤。

[0015] 步骤 1:将羧化的胶乳在 pH7.0 的溶液活化。

[0016] 步骤 2:洗涤去掉溶液中的碳化二亚胺,加 pH7.5-9.0 的缓冲液,加入 PGI 或 PGII 抗体,在 37 度反应 4 小时。

[0017] 步骤 3:将步骤 2 所得的液体用 pH7.5-9.0 的固定液固定 6 小时。

[0018] 步骤4:将步骤3所得的液体用PH7.5-9.0的封闭液体封闭12小时。

[0019] 步骤5:将步骤4所得的液体离心去上清液,取沉淀后用含有稳定剂和防腐剂的缓冲液洗涤分散既得。

[0020] 9、作为优选,步骤1中所用的缓冲液为PBS缓冲液,MES缓冲液,Tris缓冲液中的任何一种缓冲液,且浓度在20-100mmol / L,PH在6.5-7.5之间。

[0021] 10、作为优选,步骤1中所用的胶乳可以是羧基化的聚苯乙烯胶乳或者是氨基化的聚苯乙烯胶乳。其孔径在80nm-200nm均可。

[0022] 11、作为优选,步骤1中含有1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐或N-羟基琥珀酰亚胺中的一种或者多种。

[0023] 12、作为优选,在步骤2中,去掉溶液1中所含的未反应的物质,采用的是高速冷冻离心机或者超微孔径的过滤膜进行过滤。

[0024] 13、作为优选,在步骤5中,所用的稳定剂是小牛血清白蛋白,明胶,甘氨酸,脱脂奶粉一种或者几种相混合。

[0025] 14、本发明检测的原理是:利用抗原抗体反应,先加入试剂R1,使血清中的PGI和PGII的位点暴露,当加入抗人的PGI或PGII胶乳颗粒溶液,使溶液中的抗原抗体反应形成不溶于溶液的抗原抗体复合物,从而产生一定的浊度,在人血清中PGI或PGII的含量在一定的范围内PGI或PGII的含量与浊度成正比。再通过标准曲线进行计算,从而得到PGI或PGII的含量。

[0026] 15、本发明与现有技术相比,具有如下特点:

[0027] 1) 本发明试剂盒具有较高的检测灵敏度,PGI试剂盒最低检测能够达到3ng / ml,PGII试剂盒的最低检测能够达到2ng / ml。操作简单、快速,从检测到出结果最多只需要5分钟,甚至更短。

[0028] 2) 本发明的试剂盒R2试剂中的抗体胶乳的制备由于采用的化学偶联法,稳定性好,在2-8度至少可以保存12个月。而采用物理吸附法的胶乳抗体试剂,批间差异比较大,而且稳定性不好。

[0029] 3) 本发明试剂盒与进口试剂盒对样品中的PGI或PGII含量检测的数据经统计分析,无显著性差异,检测结果可靠,在临床上可以替代进口试剂,大幅降低成本以及检测时间。

附图说明

[0030] 图1为本发明实施例1的PGI校准曲线;

[0031] 图2为本发明实施例1的PGII校准曲线。

具体实施方式

[0032] 本发明公开了一种检测PGI / PGII含量的试剂盒,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,他们都被视为包括在本发明内。本发明的产品及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围对本文所述的方法和应用进行改动或者适当变更与组合,本实现和应用本发明技术。

[0033] 下面以具体的实施例对本发明做进一步说明。

[0034] 一、PGI / PGII 试剂 R1 即样品缓冲液的制备

[0035]

试剂	用量
磷酸二氢钠	2.86g / L
磷酸氢二钠	28.65g / L
氯化钠	6.87g / L
氯化镁	0.34g / L
聚乙二醇 6000	25.00g / L
叠氮钠	2.00g/L
纯水	1L

[0036] 二、PGI / PGII 试剂中校准品的制备

[0037] 1) 校准品稀释液制备

[0038]

试剂	用量
磷酸二氢钠	2.86g / L
磷酸氢二钠	28.65g / L
氯化钠	9.00g / L
小牛白蛋白	50.00g/L
叠氮钠	2.50g/L
稳定剂	10.00g/L

[0039] 2) 按照需要的 PGI 或 PGII 参考校准品浓度将相应的重组 PGI 或 PGII 纯品 1920ng 加入校准品稀释液 2mL 的缓冲液中, 制备得到 960ng / mL 浓度的 PGI 或 PGII 校准品在使用的时候再用缓冲液按照比例稀释成多个浓度。

[0040] 三、PGI 或 PGII 测定方法 (日立 7060 全自动生化分析仪)

[0041] PGI 校准品浓度 :150ng / mL 75ng / mL 37ng / mL 18ng / mL 6ng / mL 0ng / mL

[0042] PGII 校准品浓度 :84ng / mL 42ng / mL 20ng / mL 10ng/mL 5ng/mL 0ng / mL

[0043] 测定波长 :主波长 :600nm

[0044] 试剂比例 :R1 :R2 :S=240ul : 60ul :8ul

[0045] 校准方式 :spline

[0046] 读点方式 :在试剂 R1 与样品加入, 反应 5 分钟, 读点 A1, 然后加入 R2 后, 反应 5 分钟, 再读点 A2, 计算吸光度的变化。

[0047] 校准曲线见图 1 和图 2。

[0048] 四、本发明所述试剂盒的分析性能评估

[0049] 1、灵敏度测定

[0050] 用本发明所述的试剂盒对空白样本 (含有 5% 牛血清的生理盐水) 重复测定 20 次, 最低检测限度为空白的均值浓度加上二个标准差, 得到 PGI 最低检测限度为 3ng / mL, PGII 最低检测限度为 2ng/mL。

[0051] 2、线性评估

[0052] 取浓度将近 260ng / mL PGI 的临床血清标本, 进行稀释, 至少稀释 6 个点, 每个点重复测定 3 次, 根据式 (1), (2), (3) 计算出直线方程 $y=a+bx$:

[0053]
$$b = \frac{n\sum X_i Y_i - \sum X_i \cdot \sum Y_i}{n\sum X_i^2 - (\sum X_i)^2} \dots\dots\dots (1)$$

[0054]
$$|a| = \frac{|\sum Y_i - b\sum X_i|}{n} \dots\dots\dots (2)$$

[0055]
$$r = \frac{n\sum X_i Y_i - \sum X_i \cdot \sum Y_i}{\sqrt{[n\sum X_i^2 - (\sum X_i)^2][n\sum Y_i^2 - (\sum Y_i)^2]}} \dots\dots\dots (3)$$

[0056] 式中 :b- 回归线的斜率 ;

[0057] |a|- 同归线截距的绝对值 ;

[0058] r- 回归系数 ;

[0059] Xi- 测定管溶液的浓度 ;

[0060] Yi-3 次重复测定的与测定管溶液浓度对应的吸光度均值 ;

[0061] i-1,2,3, ………, n ;

[0062] n- 测定样本数。

[0063] 经计算得出 . 在 0-130ng / mL 的范围内,本试剂盒 (PGI) 检测能达到很好的线性。

[0064] 取浓度将近 140ng / mLPGII 的临床血清标本,进行稀释,至少稀释 6 个点,每个点重复测定 3 次,根据式 (1), (2), (3) 计算出直线方程 y=a+bx :

[0065]
$$b = \frac{n\sum X_i Y_i - \sum X_i \cdot \sum Y_i}{n\sum X_i^2 - (\sum X_i)^2} \dots\dots\dots (1)$$

[0066]
$$|a| = \frac{|\sum Y_i - b\sum X_i|}{n} \dots\dots\dots (2)$$

[0067]
$$r = \frac{n\sum X_i Y_i - \sum X_i \cdot \sum Y_i}{\sqrt{[n\sum X_i^2 - (\sum X_i)^2][n\sum Y_i^2 - (\sum Y_i)^2]}} \dots\dots\dots (3)$$

[0068] 式中 :b- 回归线的斜率 ;

[0069] |a|- 回归线截距的绝对值 ;

[0070] r- 回归系数 ;

[0071] Xi- 测定管溶液的浓度 ;

[0072] Yi-3 次重复测定的与测定管溶液浓度对应的吸光度均值 ;

[0073] i-1,2,3, ………, n ;

[0074] n- 测定样本数。

[0075] 经计算得出,在 0-70ng / mL 的范围内,本试剂盒 (PGII) 检测能达到很好的线性。

[0076] 3、与酶联免疫方法的试剂盒测定结果的相关性

[0077] 通过测定 40 例标本,本试剂盒 (PGI) 与商品化的相同试剂盒的相关系数 R²=0.993,相 关方程为 :Y = 0.913X-0.0156。本试剂盒 (PGII) 与商品化的相同试剂盒的相关系数 R²=0.990,相关方程为 :Y=0.9913X-0.0231。

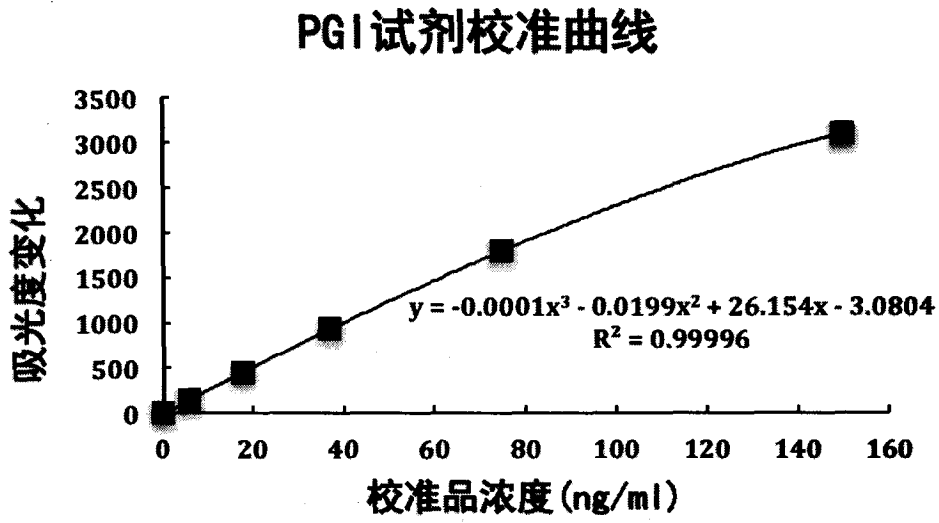


图 1

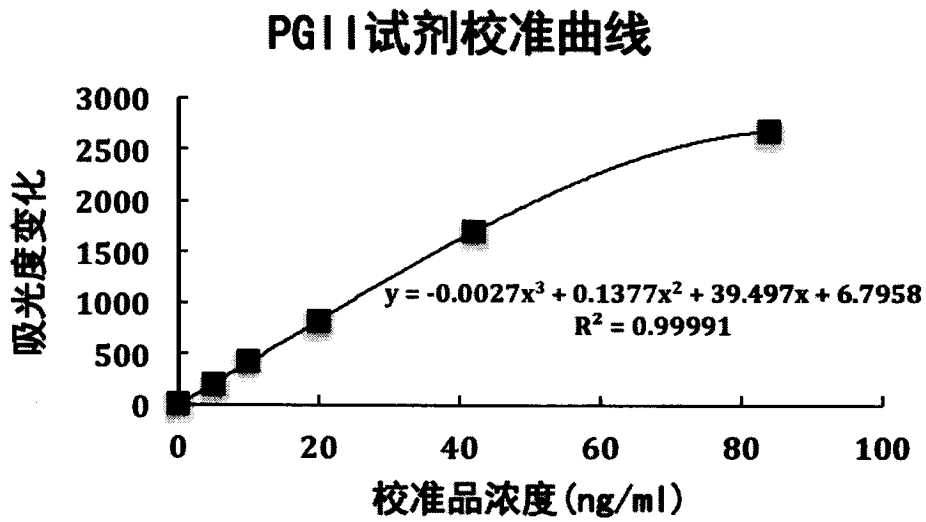


图 2

专利名称(译)	胃蛋白酶原I/II胶乳增强免疫比浊法测定试剂盒		
公开(公告)号	CN104111335A	公开(公告)日	2014-10-22
申请号	CN201310571342.4	申请日	2013-11-13
[标]申请(专利权)人(译)	唐勇		
申请(专利权)人(译)	唐勇		
当前申请(专利权)人(译)	唐勇		
[标]发明人	唐勇		
发明人	唐勇		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/573 G01N33/54393 G01N2800/06		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种血清中胃蛋白酶原I(PGI)和胃蛋白酶原II(PGII)含量测定的试剂盒。所要解决的技术问题是提供一种适用于散射比浊仪或全自动生化分析仪使用的PGI和PGII含量测定试剂盒。检测试剂盒包括：a、R1：缓冲液、加速剂、表面活性剂，其余为纯化水；b、R2-I：缓冲液、结合有抗人PGI抗体的乳胶微球；c、R2-II：缓冲液、结合有抗人PGII抗体的乳胶微球；d、校准品1：缓冲液，稳定剂，防腐剂以及一定量的重组PGI蛋白纯品，其余为纯化水；e、校准品2：缓冲液，稳定剂，防腐剂以及一定量的重组PGII蛋白纯品，其余为纯化水。通过以上试剂组合，快速测定血清中PGI和PGII的含量。

