



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102072960 A

(43) 申请公布日 2011.05.25

(21) 申请号 201010136227.0

(22) 申请日 2010.03.29

(71) 申请人 武汉生之源生物科技有限公司

地址 430223 湖北省武汉市武汉东湖开发区
大学园路武大科技园创业大楼四楼西
13号

(72) 发明人 华权高 沈鹤霄

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/539 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/546 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

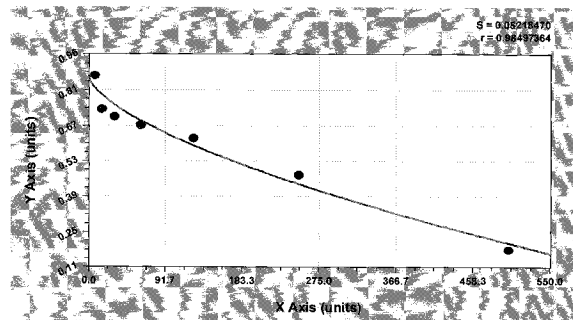
权利要求书 1 页 说明书 2 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种样本中中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种样本中中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的检测方法。该检测方法是使用抗人中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 的抗体,与待检标本的人 NGAL 反应,所形成的复合物引起浊度变化;用光投射强度或光散射强度表征这种变化;从人 NGAL 标准品的浓度与相应光散射强度或光透射强度的标准曲线查出待检标本的人 NGAL 的含量;该方法具有灵敏度高、回收率高、重复性好的优点,为测定尿液或血浆等样本中 NGAL 确定了一个简便、重现性好、适应性强、快速的检测手段。



竞争法 ELISA 检测重组人 NGAL 标准曲线

1. 一种样本中中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的检测方法。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征是,建立在抗原抗体特异性反应原理基础上,通过包括但不限于免疫比浊法以及酶联免疫 (ELISA) 法的免疫学方法检测样品中人中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 的浓度。
3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征是,包括如下步骤:
 - i) 使用相关器械收集样本包括血清、血浆和尿液,
 - ii) 样品中的 NGAL 与抗体接触反应,
 - iii) 检测样本中人 NGAL 的浓度。
4. 根据权利要求 2 所述的样品,其特征是包括但不限于人的尿液、血浆和血清。
5. 根据权利要求 3 所述的抗体,其特征在于该抗体是通过天然或重组的人 NGAL 免疫动物获得的多克隆抗体或者单克隆抗体。
6. 根据权利要求 2 所述的免疫比浊法,其特征在于:用抗人 NGAL 的抗体,与待检标本的人 NGAL 反应,所形成的复合物引起浊度变化;用光投射强度或光散射强度表征这种变化;从人 NGAL 标准品的浓度与相应光散射强度或光透射强度的标准曲线查出待检标本的人 NGAL 的含量。
7. 根据权利要求 2 所述的酶联免疫 (ELISA) 法,其特征在于:包括双抗夹心法 ELISA、竞争法 ELISA。
8. 根据权利要求 2 所述的酶联免疫 (ELISA) 法,其特征在于:人 NGAL 预先固相化,或人 NGAL 抗体预先固相化。
9. 根据权利要求 2 所述的酶联免疫 (ELISA) 法,其特征在于:检测 NGAL 含量的范围为:7.8ng/ml-500ng/ml。
10. 根据权利要求 7 所述的竞争法,如果是直接竞争法,其特征在于:预先固相化人 NGAL 抗体。
11. 根据权利要求 7 所述的竞争法,如果是间接竞争法,其特征在于:预先固相化人 NGAL。
12. 根据权利要求 8 所述的固相化,其特征在于:将人 NGAL 或人 NGAL 抗体包被到固相支持物上,该支持物可以是,例如用于酶联免疫吸附试验的聚苯乙烯或聚氯乙烯表面,或胶乳 (聚苯乙烯) 颗粒,或由压缩的聚乙烯颗粒组成的过滤玻璃棒,或多孔消化纤维素基质,或事实上是在免疫化学分析使用中任何合适的支持物。

一种样本中中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种样本中中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的检测方法。

背景技术

[0002] 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白（简称 NGAL）是 1993 年在中性粒细胞内首先被发现的，与炎症、胚胎发育、免疫应答、趋化作用、信号转导以及多种肿瘤的发生与发展等过程相关。近年来国内外的研究表明，NGAL 蛋白在多种疾病过程中具有特异性表达变化的特点，使得 NGAL 成为检测疾病的生物标志物。

[0003] 在发生缺血性和毒性肾损伤过程中，肾小管上皮细胞中的 NGAL 将显著增加，在开始的两个小时内，尿液和血液中 NGAL 水平将显著增加，因此 NGAL 是早期急性肾损伤的敏感标志物。

[0004] 急性肾功能损伤预后将发展成为急性肾功能衰竭。通用的诊断方法如测定血清肌酐或者半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C(Cystatin C)，只能在损伤后一天甚至几天内检测。有研究表明，健康志愿者尿液中 NGAL 含量检测结果分布 0.7-9.6ng/ml，平均值为 5.3ng/ml。而血浆中的含量检测结果为 37-106ng/ml，平均值为 63ng/ml。当肾损伤后，随机检测重病患者，尿液 NGAL 的浓度为 110ng/ml 到 40000ng/ml 不等。而他们 EDTA 抗凝血浆检测结果为 25ng/ml 到 3491ng/ml。根据急性肾衰竭患者检测的 90% 阳性预测值判断，尿液中 NGAL 的阳性判断值为 350ng/ml，而血浆检测的阳性判断值为 400ng/ml。

[0005] 同源性分析表明，NGAL 与小鼠的 24p3 和大鼠的 neu 相关 lipocalin (neu-related lipocalin, NRL) 具有很高的同源性。小鼠的 24p3 在肝脏中合成，炎症反应时上调，另外 24p3 也见于巨噬细胞和子宫内膜，尤其是生殖期的子宫内膜。用类固醇激素可使相应组织中的 24p3 水平升高，而一些生长因子和肿瘤促进因子也可以使其升高。猴毒 SV40、多瘤毒或其他病毒感染可以刺激培养的小鼠肾细胞 24p3mRNA 的表达增加 7-10 倍。且随着大 T 抗原的合成的增加而升高。因此 24p3 被认为是癌基因产物。这同时表明 NGAL 可能是人类的一种新的癌基因。

[0006] 实验证明，在卵巢癌细胞系、结肠肿瘤和乳腺癌等中的 NGAL 的表达明显增强。免疫组化证明在肺癌组织中的 NGAL 强阳性，而支气管肺泡细胞癌和粘液细胞癌染色最强，NGAL 在胰腺癌中会从阴性增加到强阳性。

[0007] 综上所述，建立针对样本中 NGAL 的快速检测方法为该蛋白的研究将会提供一个强有力的工具。

发明内容

[0008] 本发明提供了检测样本中 NGAL 的方法所述方法包含以下步骤：

[0009] i) 使用相关器械收集样本包括人的血清、血浆和尿液，

[0010] ii) 样本与抗体接触反应，

[0011] iii) 检测样本中 NGAL 的浓度。

[0012] 优选通过免疫化学方法来测定 NGAL 水平,这种方法的例子包括但绝不限于免疫比浊法、夹心法 ELISA、竞争法 ELISA。

[0013] 对生物样本,可以用任何提供满意的分析特异性、灵敏度和精确度的方法来进行。检测实验中,使用 NGAL 的单克隆、多克隆抗体或任何可与 NGAL 特异性结合的分子。结合分子首先固相化捕捉样品中的 NGAL 形成复合物,而另外一个标记可检测的结合分子再结合上述复合物,最后通过特定方法显示出复合物量的值从而间接反应出样品中 NGAL 的含量。另外可以直接利用游离的 NGAL 抗体或偶联乳胶颗粒以胶体形式存在的抗体与样品中的 NGAL 直接结合所形成的复合物引起浊度变化;用光投射强度或光散射强度表征这种变化;从人 NGAL 标准品的浓度与相应光散射强度或光透射强度的标准曲线查出待检标本的人 NGAL 的含量;

附图说明

图 1 是夹心法 ELISA 检测重组人 NGAL 标准曲线图;

图 2 是竞争法 ELISA 检测重组人 NGAL 标准曲线图。

具体实施方式

[0014] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0015] 实施例 1 乳胶增强免疫比浊法检测人尿液中的 NGAL 含量

[0016] 实现本实例的技术方案:一种检测人 NGAL 的免疫比浊法,用抗 NGAL 的多克隆抗体首先与乳胶交联,然后用交联后的乳胶溶液与待检标本的 NGAL 反应,所形成的复合物引起浊度变化;用光投射强度或光散射强度表征这种变化;从 NGAL 标准品的浓度与相应光散射强度或光投射强度的标准曲线查出待检样本的 NGAL 含量;其中所用的 NGAL 的多克隆抗体效价至少为 1 : 500,不含杂抗体,具有识别 NGAL 多种抗原决定簇;待检标本用稀释剂做 1 : 200-1 : 1000 稀释;

[0017] 上述方法中,所述 NGAL 标准品是纯 NGAL,其浓度为 0.2mg/ml,先用稀释剂做 1 : 200 倍稀释,再做倍比稀释,做成系列标准品,供作标准曲线用;

[0018] 实施例 2 用夹心法 ELISA 确定人尿液 NGAL 浓度

[0019] 具体步骤是:包被 NGAL 抗体 A;配制系列 NGAL 标准品;准备人尿液;使系列标准品或待测定的人尿液加入 96 微孔板孔内,再使已标记的、结合位点不同于包被在 96 微孔板上抗体 A 的抗体 B 结合,用基质液显色 20-30 分钟后终止显色,10 分钟后测定上述系列标准品和待检测的人尿液中 NGAL 反应后的吸光度;建立系列标准品的浓度和吸光度的标准曲线并从曲线中查出待测定的人尿液的 NGAL 的浓度。

[0020] 实施例 3 用竞争法 ELISA 确定人尿液 NGAL 浓度

[0021] 具体步骤是:包被 NGAL 多克隆抗体;配制系列 NGAL 标准品;准备人尿液;使系列标准品或待测定的人尿液和已标记的 NGAL 标准品混合;用基质液显色 20-30 分钟后终止显色,10 分钟后测定上述系列标准品和待检测的人尿液中 NGAL 反应后的吸光度;建立系列标准品的浓度和吸光度的标准曲线并从曲线中查出待测定的人尿液的 NGAL 的浓度。

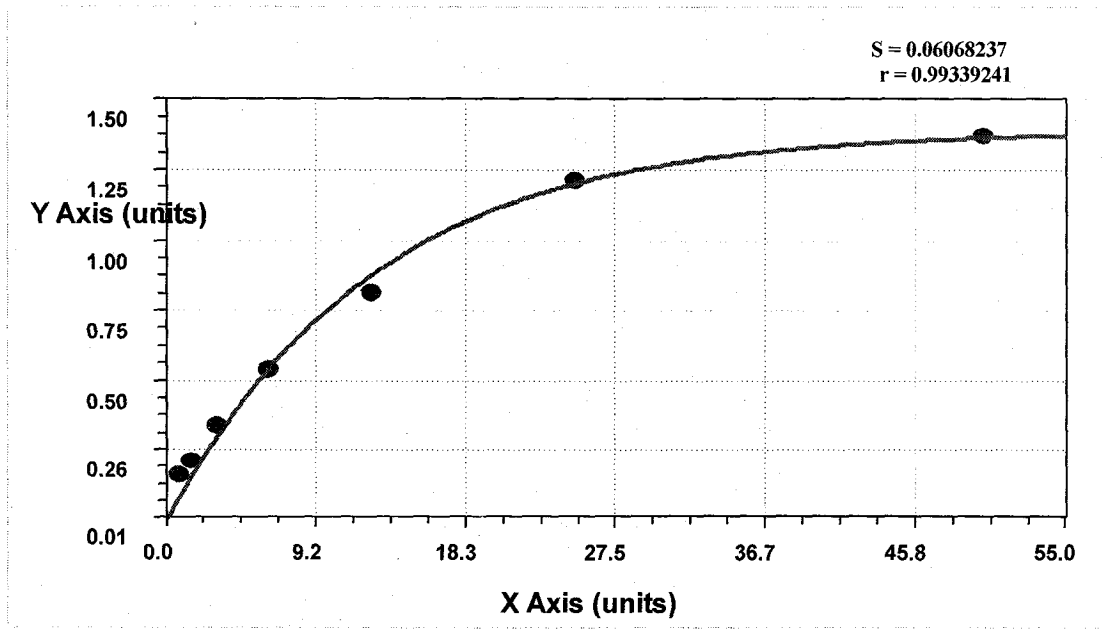


图 1

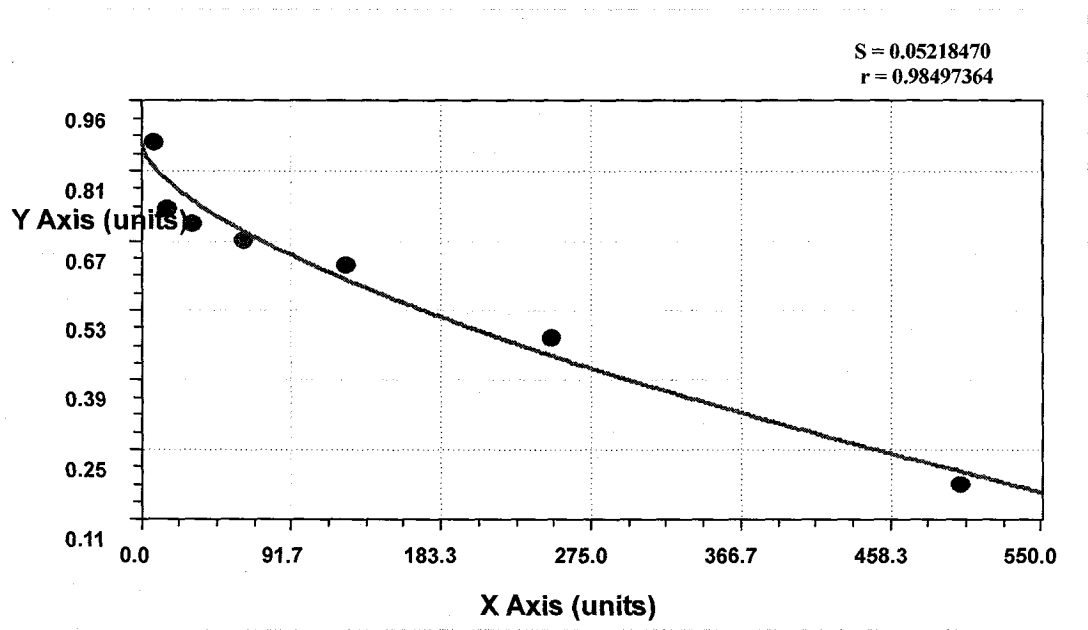
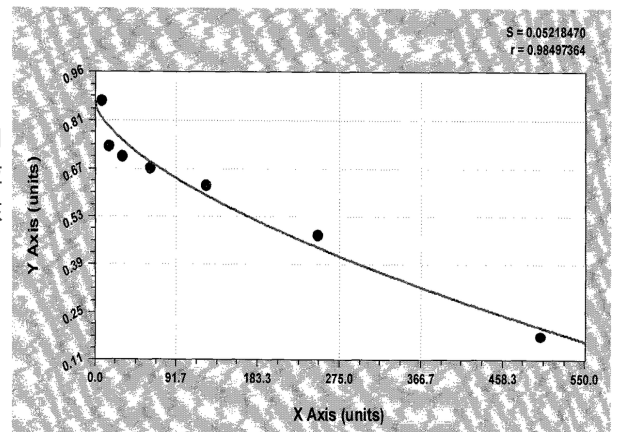


图 2

专利名称(译)	一种样本中中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的检测方法		
公开(公告)号	CN102072960A	公开(公告)日	2011-05-25
申请号	CN201010136227.0	申请日	2010-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	武汉生之源生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉生之源生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉生之源生物科技有限公司		
[标]发明人	华权高 沈鹤霄		
发明人	华权高 沈鹤霄		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/539 G01N33/577 G01N33/546 G01N21/31		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种样本中中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的检测方法。该检测方法是使用抗人中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)的抗体，与待检标本的人NGAL反应，所形成的复合物引起浊度变化；用光投射强度或光散射强度表征这种变化；从人NGAL标准品的浓度与相应光散射强度或光透射强度的标准曲线查出待检标本的人NGAL的含量；该方法具有灵敏度高、回收率高、重复性好的优点，为测定尿液或血浆等样本中NGAL确定了一个简便、重现性好、适应性强、快速的检测手段。



竞争法 ELISA 检测重组人 NGAL 标准曲线