

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/534 G01N 33/60

G01N 33/74



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02154619.3

[43] 公开日 2004 年 6 月 9 日

[11] 公开号 CN 1502992A

[22] 申请日 2002.11.26 [21] 申请号 02154619.3

[71] 申请人 华侨大学

地址 362011 福建省泉州市华侨大学科研处

[72] 发明人 贺淹才

权利要求书 1 页 说明书 7 页

[54] 发明名称 生长激素结合蛋白活性测定试剂盒及其配制与测定方法

[57] 摘要

本发明公开了一种用于人和动物血清中的生长激素结合蛋白活性测定试剂盒及其配制与测定方法。其特征是：试剂盒由标记生长激素、未标记生长激素、葡聚糖包膜炭、通用缓冲液和分析缓冲液等 5 种配制的溶剂和一份使用说明书组成。测定血清中生长激素结合蛋白活性的方法，除设置 4~8 个总“非特异性结合”(NSB)测定管外，每个测定血样另外特地设置 2 个对应的“非特异性结合(NSB)”测定管，使测定结果更精确。葡聚糖包膜炭的配制方法与要求及其质量也是测定准确的必要条件。该试剂盒能够在具有放射性计数仪器的医院或实验室，比较方便地测定人和动物血清中的生长激素结合蛋白相对结合活性。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种用于人和动物生长激素结合蛋白活性测定试剂盒，其特征在于，试剂盒构成包括 5 种配制的溶剂和一份使用说明书，5 种特定配制的溶剂是：(1) 标记生长激素，(2) 未标记生长激素，(3) 葡聚糖包膜活性炭，(4) 分析缓冲液，(5) 通用缓冲液。

2. 一种用本权利要求 1 所述的试剂盒测定人和动物生长激素结合蛋白活性的方法，其特征在于：除设置 4~8 个总“非特异性结合”(NSB)测定管外，每个测定血样另外特地设置 2 个对应的“非特异性结合(NSB)”测定管。

3. 一种对本权利要求 1 所述的试剂盒中试剂的配制方法，其特征在于：“葡聚糖包膜活性炭”溶剂的配制，先将 2%葡聚糖(Dextran)在 30~70°C 条件下搅拌溶解，待葡聚糖溶解后，加入活性炭(charcoal, 50~100 目)，室温下搅拌 1~5 小时。

4. 根据本权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：试剂盒也可由 3 份溶剂和一份使用说明书构成。其溶剂分别是：标记生长激素、未标记生长激素、葡聚糖包膜炭；而通用缓冲液和分析缓冲液则以使用说明书中列出配方由用户自己配制。

生长激素结合蛋白活性测定试剂盒及其配制与测定方法

一、技术领域

本发明是一种测定人和动物血清中的生长激素结合蛋白活性的医学指标测定试剂盒及其配制与测定方法。

二、背景技术

人和动物血清中的生长激素结合蛋白 (growth hormone binding protein, GHBP) 对生长激素的分布、代谢和生理活动具有重要作用。GHBP 是一个由 238~246 个氨基酸组成的单链蛋白, 分子量约 61 kDa, 属于酸性蛋白质, 等电点约 5.0。GHBP 的主要生理作用是结合垂体产生的生长激素在血中将生长激素运输到全身组织细胞, 能使生长激素有效储存并延长生长激素活性, GHBP 还能通过与生长激素以及与生长激素受体结合的增减来调节生长激素的生理功能。GHBP 可以作为肝生长激素受体活性的外周监测指标。人血中 GHBP 的来源与生长激素受体密切相关, GHBP 的氨基酸序列与生长激素受体的胞外结构域部分是完全一样的。测定血清的 GHBP 活性可以间接反映生长激素功能的发挥情况, 并且反映身体内组织器官的生长激素受体的活性在不同生理、病理条件下的变化情况。(测定生长激素受体的活性很复杂, 并且取组织器官标本损伤身体; 而测定 GHBP 活性只要取少量血相对无损伤)。

目前 GHBP 测定方法中, 早先有的利用凝胶层析法分离 GHBP 复合物再测定, 此法比较费时烦琐; 现在多利用放射免疫分析法, 特别是利用利用放射免疫分析法和活性炭吸收方法结合起来测定 GHBP 活性。由于测定 GHBP 活性的方法比较复杂, 所以国内有关测定 GHBP 活性的报道很少, 经过检索文献只有几篇相关的报道。这些报道中, 张宇瑾、王德芬、史爱生、曹畿生: 血清生长激素结合蛋白测定方法及其临床意义, 中华内分泌代谢杂志, 1994 第 3 期,

170~174；这篇论文全文只有一句话简介他们的测定方法，没有所用试剂的配制和测定步骤等详细具体内容。邱宁岩、张静馨、李慧萍、包荫堂：人血清生长激素结合蛋白活性的快速测定法及其初步临床应用，标记免疫分析与临床，1998年第2期，93~96；该论文全文有一句话交代“温育缓冲液”的配方，另一句话介绍“分离剂”的配方，此外没有有关所用试剂的配制和测定步骤等详细具体内容。这些少数论文提到的测定 GHBP 活性的方法给一般医院和研究单位测定 GHBP 活性有指导和参考意义，但参考这些方法对具体实施测定操作尚有困难。总之，高级的检测技术人员对测定 GHBP 活性的技术有所了解，而实施检测还需要做不少实验摸索，一般的检测技术人员无法根据所检索到的文献技术内容予以利用或者直接进行检测。此外，其他少数文献中提到测定人 GHBP 的内容，但没有介绍具体方法，一般是采用国外试剂或国外测定 GHBP 的试剂盒。经过检索国内一些生物技术公司有测定生长激素结合蛋白的试剂盒供应均为国外产品，没有测定生长激素结合蛋白活性的试剂盒。

本发明目的是提供一种医学指标测定试剂盒包括其配制与测定方法，能够在具有放射性计数仪器的医院或实验室，比较方便测定人和动物血清中的生长激素结合蛋白相对结合活性。

三、发明内容

生长激素结合蛋白活性放射免疫分析试剂盒及其配制与测定方法，试剂盒由 5 份溶剂和一份使用说明书构成。其溶剂分别是：标记生长激素 (^{125}I -hGH)，未标记生长激素 (hGH)，葡聚糖包膜炭 (Dextran charcoal)，通用缓冲液 (general buffer)，分析缓冲液 (test buffer)。试剂盒也可由 3 份溶剂和一份使用说明书构成，其溶剂分别是：标记生长激素 (^{125}I -hGH)，未标记生长激素 (hGH)，葡聚糖包膜炭 (Dextran charcoal)；而通用缓冲液和分析缓冲液则以使用说明书中列出配方由用户自己配制。

试剂盒的规格一般以可测定 50 个血清样本为一个包装，也可以将测定 100~200 个样本

的规格为一个包装。

原理是血清样品与标记生长激素 (^{125}I -hGH) 在室温下共同孵育一段时间, 分离出与 GHBP 结合的 ^{125}I -hGH 和没有结合的 ^{125}I -hGH。结合的 ^{125}I -hGH 与总 ^{125}I -hGH 放射性强度比即可反映 GHBP 的相对值。

5 瓶试剂的制造方法如下:

(1) 标记生长激素 (^{125}I -hGH):

标记方法: 因氯胺 T 方法(可参照有关文献如 Davis S. L. Plasma levels of prolactin, growth hormone and insulin in sheep following the infusion of arginine, leucine and phenylalanine. *Endocrinology*. 1972, 91:773~780) 以 ^{125}I 标记人重组生长激素约 15 秒, 特异活性范围在从 90 至 120 $\mu\text{Ci} / \mu\text{g}$ 。

纯化方法: 采用 Biorad AG1 \times 8 树脂(50~100 目)层析, 除去游离 ^{125}I 。再以 1 \times 50cm Biogel P100 层析过柱, 以 PBS (含 0.5% BSA) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下洗脱, 除去凝聚的 ^{125}I -hGH, 得到单体 ^{125}I -hGH。标记生长激素 (^{125}I -hGH) 可直接向美国杜邦公司购买, 国内有关公司也有供应。一般要求保证送到用户使用 ^{125}I -hGH 的比放射性约有 60 $\mu\text{Ci} / \mu\text{g}$ 。

(2) 未标记生长激素 (hGH): 没有标记过的重组人生长激素。技术要求是该未标记生长激素以通用缓冲液稀释后分加到每个非特异性结合 (NSB) 试管中时, 保持 hGH 在试管孵育反应溶液中浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。一般每个非特异性结合试管中孵育反应溶液总体积为 500 μl , 因此加入每个非特异性结合试管中为 1 μg 的 hGH。

(3) 葡聚糖包膜炭 (Dextran charcoal): 2%葡聚糖和 2%活性炭溶于 PBS。制法: 先将 2%葡聚糖 (Dextran) 在 40~70 $^{\circ}\text{C}$ 温度条件下搅拌溶解, 待葡聚糖溶解后, 加入活性炭 (charcoal, 50~200 目), 室温下搅拌 1~5 小时。葡聚糖包膜炭的配制的方法、要求与质量也是分析准确的必要条件。

(4) 通用缓冲液 (general buffer): PBS (pH 7~7.5)

(5) 分析缓冲液 (test buffer): PBS 含 0.5% BSA 和 75 mMgCl₂。

该试剂盒要求在 4°C 条件下保存。

本试剂盒的测定方法: 设置 4~8 个总“非特异性结合”(NSB)测定管, 目的为使非特异性结合测定计数平均放射性计数准确, 并且考察加样操作的准确性; 除此总 NSB 外, 每个测定血样另外特地设置 2 个对应的“非特异性结合 (NSB)”测定管, 使测定结果更精确。

该试剂盒组成结构简单, 按照其使用说明书进行操作测定, 步骤分明, 使用方便, 测定结果准确可靠。一般具有放射性计数仪器的医院或实验室, 测定技术人员都可进行测定。

四、具体实施方式

下面结合表 1 和表 2 与实施方式对本发明作进一步详细说明, 其中表 1 是本发明实施方式步骤的示意, 表 2 是试剂盒使用说明书中必须列出的测定加样次序和数量的清单。

测定操作时先用通用 buffer 稀释 ¹²⁵I-hGH, 一边稀释一边取 100 μl 的 ¹²⁵I-hGH 到放射性计数仪上测试, 直到所稀释的 ¹²⁵I-hGH 达到每 100 μl 的计数约 20000cpm 为止。

所有各个试管中均加入 100 μl 的 ¹²⁵I-hGH。

设置 6 个总计数管, 目的为使总计数管平均放射性计数准确, 并且考察加样操作的准确性。各总计数管除加 100 μl ¹²⁵I-hGH 外, 再加 400 μl 分析 buffer, 总孵育反应溶液总体积为 500 μl。

设置 6 个总“非特异性结合”(NSB)测定管, 目的为使非特异性结合测定计数平均放射性计数准确, 并且考察加样操作的准确性; 这 6 个非特异性结合测定管各管除加 100 μl ¹²⁵I-hGH 外, 加入混合血清(即取自各测定血清等量混合物称为混合血清) 50 μl, 再加 50 μl 未标记生长激素, 加入 300 μl 通用 buffer, 总孵育反应溶液总体积为 500 μl。此外, 为确保测定的精确性, 对每个血清测定样本还设置 2 个“非特异性结合”(NSB)测定管, 这些对应血清样本的血清测定样本 NSB 各管除加 100 μl ¹²⁵I-hGH 外, 加入所测血清 50 μl, 再加

50 μ l 未标记生长激素，加入 300 μ l 通用 buffer，总孵育反应溶液总体积为 500 μ l。具体计算结合活性时，以该 2 个对应于所测血清样本的 NSB 的平均数为准。

对每个样品测定管设置为 2 个同样的试管（平行管），以减少加样和测定的误差。每测定管中除 ^{125}I -hGH 外，加入所要测定的血清 50 μ l，再加 350 μ l 分析 buffer，孵育反应溶液总体积为 500 μ l。

所有试管按照加样清单的程序加完 ^{125}I -hGH、未标记 GH、测试样本血清、通用 buffer 或分析 buffer 等试剂后，各管都要经过强烈混悬，气温高时室温下孵育 8 小时，气温低时室温下孵育过夜。

将葡聚糖包膜炭（Dextran charcoal）放置在 4°C 条件下预冷。该悬浮液极容易发生沉淀，为保证加入到各管中葡聚糖包膜炭的数量均匀，需要在其加滴到各管的过程中保持该溶液处于不停地摇荡混悬状态。各管加葡聚糖包膜炭溶液 500 μ l。

所有试管加完葡聚糖包膜炭后，经过强烈混悬，进行 2000g 和 4°C 条件下离心分离。

对各总计数管除去上清液，回收沉淀；对各样品测定管和各非特异性结合测定管回收各自的上清液，除去沉淀。

对总计数管的沉淀以及各样品测定管和各非特异性结合测定管各自的上清液进行放射性计数，每管计数 1 分钟。按照记录的各管计数 cpm，以下列公式计算各血清样本的特异性结合活性：

$$\text{SB}(\%) = [(\text{TB}-\text{NSB}) / \text{TC}] \times 100\%$$

公式中：

SB = 特异性结合活性

TB = 样品测定管的 cpm

NSB = 非特异性结合测定管的 cpm

TC = 总计数管的 cpm

表1 “生长激素结合蛋白活性放射免疫分析试剂盒”实施方式步骤原理

	总计数管 (TC)	非特异性结合测定管 (NSB)	样品测定管 (TB)
标记生长激素 (¹²⁵ I-hGH) (稀释于 通用 beffer, 每 100 μ l 约 20000)	100 μ l	100 μ l	100 μ l
待测血清		50 μ l (前特设置 NSB 管加混合血清, 各 样品测定管对应 NSB 管 加待测血清)	50 μ l
未标记生长激素 (hGH)		50 μ l	
通用 beffer		300 μ l	
分析 buffer	400 μ l		350 μ l

以上各管强烈混悬, 气温高时室温下孵育 8 小时, 气温低时室温下孵育过夜

预冷的葡聚糖包膜炭	500 μ l	500 μ l	500 μ l
-----------	---------	---------	---------

以上各管强烈混悬, 2000g 4°C 条件下离心

放射性计数	去上清, 对沉淀计数 1 分钟	回收约 1000 μ l 上 清液, 计数 1 分钟	回收约 1000 μ l 上 清液, 计数 1 分钟
-------	--------------------	-------------------------------	-------------------------------

表2 “生长激素结合蛋白活性放射免疫分析试剂盒”操作加样清单

	标 记生长 激素	血清	未标记 生长激 素	通用 buffer	分析 buffer		冷 葡聚糖 包膜炭		计 数	
总计数管 1	100 μ l				400 μ l	混 悬 ， 孵 育	500 μ l	混 悬 ， 离 心		
总计数管 2	100 μ l				400 μ l		500 μ l			
总计数管 3	100 μ l				400 μ l		500 μ l			
总计数管 4	100 μ l				400 μ l		500 μ l			
总计数管 5	100 μ l				400 μ l		500 μ l			
总计数管 6	100 μ l				400 μ l		500 μ l			
非特异性结合管 1	100 μ l	50 μ l 混	50 μ l	300 μ l			500 μ l			
非特异性结合管 2	100 μ l	50 μ l 混	50 μ l	300 μ l			500 μ l			
非特异性结合管 3	100 μ l	50 μ l 混	50 μ l	300 μ l			500 μ l			
非特异性结合管 4	100 μ l	50 μ l 混	50 μ l	300 μ l			500 μ l			
非特异性结合管 5	100 μ l	50 μ l 混	50 μ l	300 μ l			500 μ l			
非特异性结合管 6	100 μ l	50 μ l 混	50 μ l	300 μ l			500 μ l			
样品测定管 1a	100 μ l	50 μ l			350 μ l		500 μ l			
样品测定管 1b	100 μ l	50 μ l			350 μ l		500 μ l			
非特异性结合管 1a	100 μ l	50 μ l	50 μ l	300 μ l			500 μ l			
非特异性结合管 1b	100 μ l	50 μ l	50 μ l	300 μ l			500 μ l			
样品测定管 2a	100 μ l	50 μ l			350 μ l		500 μ l			
样品测定管 2b	100 μ l	50 μ l			350 μ l		500 μ l			
非特异性结合管 2a	100 μ l	50 μ l	50 μ l	300 μ l			500 μ l			
非特异性结合管 2b	100 μ l	50 μ l	50 μ l	300 μ l			500 μ l			
样品测定管 3a	100 μ l	50 μ l			350 μ l		500 μ l			
.....										

专利名称(译)	生长激素结合蛋白活性测定试剂盒及其配制与测定方法		
公开(公告)号	CN1502992A	公开(公告)日	2004-06-09
申请号	CN02154619.3	申请日	2002-11-26
申请(专利权)人(译)	华侨大学		
当前申请(专利权)人(译)	华侨大学		
[标]发明人	贺淹才		
发明人	贺淹才		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/534 G01N33/60 G01N33/74		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于人和动物血清中的生长激素结合蛋白活性测定试剂盒及其配制与测定方法。其特征是：试剂盒由标记生长激素、未标记生长激素、葡聚糖包膜炭、通用缓冲液和分析缓冲液等5种配制的溶剂和一份使用说明书组成。测定血清中生长激素结合蛋白活性的方法，除设置4~8个总“非特异性结合”(NSB)测定管外，每个测定血样另外特地设置2个对应的“非特异性结合(NSB)”测定管，使测定结果更精确。葡聚糖包膜炭的配制方法与要求及其质量也是测定准确的必要条件。该试剂盒能够在具有放射性计数仪器的医院或实验室，比较方便地测定人和动物血清中的生长激素结合蛋白相对结合活性。

	总计数管 (TC)	非特异性结合测定管 (NSB)	样品测定管 (TB)
标记生长激素 (125I-hGH) (稀释于 通用 beffer, 每 100 μ l 约 20000)	100 μ l	100 μ l	100 μ l
待测血清		50 μ l (前特设置 NSB 管加混合血清, 各 样品测定管对应 NSB 管 加待测血清)	50 μ l
未标记生长激素 (hGH)		50 μ l	
通用 beffer		300 μ l	
分析 buffer	400 μ l		350 μ l