



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104422775 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 18

(21) 申请号 201310370383. 7

(22) 申请日 2013. 08. 22

(71) 申请人 朱建安

地址 518054 广东省深圳市南山区南油天安
工业区 6 栋 4 楼 A 座

(72) 发明人 朱建安

(74) 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理
有限公司 11112

代理人 丁业平 张天舒

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

权利要求书2页 说明书25页
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

联合检测人 PGI 蛋白和人 PGII 蛋白的荧光免疫层析试纸及制法

(57) 摘要

本发明涉及联合检测人 PGI 蛋白和人 PGII 蛋白的荧光免疫层析试纸及制法。所述试纸通过双抗体夹心法检测人 PGI 蛋白和人 PGII 蛋白,所述双抗体夹心法所采用的捕获抗体分别为来源于序列表序列 1 和序列 2 中的一者的第一 PGI 单克隆抗体和来源于序列表序列 3 和序列 4 序列中的一者的第一 PGII 单克隆抗体;并且所述双抗体夹心法所采用的检测抗体分别为来源于序列表序列 1 和序列 2 中的另一者的第二 PGI 单克隆抗体和来源于序列表序列 3 和序列 4 中的另一者的第二 PGII 单克隆抗体。本发明的荧光免疫层析试纸操作简便、快速、检测范围宽、特异性高、灵敏度好。

1. 一种用于联合定量检测待测物中人 PGI 蛋白和人 PGII 蛋白的荧光免疫层析试纸, 该试纸通过双抗体夹心法分别检测所述人 PGI 蛋白和所述人 PGII 蛋白, 其中:

(a) 针对所述人 PGI 蛋白, 所述双抗体夹心法采用标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体作为捕获抗体, 所述第一 PGI 单克隆抗体来源于人 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 中的一者; 并且

所述双抗体夹心法采用第二 PGI 单克隆抗体作为检测抗体, 所述第二 PGI 单克隆抗体来源于人 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 中的另一者;

所述人 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 分别为:

(1) Tyr-Lys-Val-Pro-Leu-Ile-Arg-Lys-Lys-Ser-Leu-Arg-Arg;

(2) Tyr-Lys-Asn-Phe-Thr-Val-Phe-Asp-Arg-Ala-Asn-Asn-Gln; 并且

(b) 针对所述人 PGII 蛋白, 所述双抗体夹心法采用标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体作为捕获抗体, 所述第一 PGII 单克隆抗体来源于人 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 中的一者; 并且

所述双抗体夹心法采用第二 PGII 单克隆抗体作为检测抗体, 所述第二 PGII 单克隆抗体来源于人 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 中的另一者;

所述人 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 分别为:

(3) Lys-Lys-Phe-Lys-Ser-Ile-Arg-Glu-Thr-Tyr;

(4) Tyr-Thr-Pro-Ser-Arg-Ala-Ala-Pro-Pro-Ser-Ser-Thr-Leu-Gln-Leu-Pro-Glu-Ly

s。

2. 根据权利要求 1 所述的荧光免疫层析试纸, 其中所述第一 PGI 单克隆抗体是由第一 PGI 抗原制备而成的, 该第一 PGI 抗原是通过使所述人 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 中的一者与载体蛋白偶联制备而成的; 并且

所述第二 PGI 单克隆抗体是由第二 PGI 抗原制备而成的, 该第二 PGI 抗原是通过使所述人 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 中的另一者与载体蛋白偶联制备而成的。

3. 根据权利要求 1 所述的荧光免疫层析试纸, 其中所述第一 PGII 单克隆抗体是由第一 PGII 抗原制备而成的, 该第一 PGII 抗原是通过使所述人 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 中的一者与载体蛋白偶联制备而成的; 并且

所述第二 PGII 单克隆抗体是由第二 PGII 抗原制备而成的, 该第二 PGII 抗原是通过使所述人 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 中的另一者与载体蛋白偶联制备而成的。

4. 根据权利要求 1 所述的荧光免疫层析试纸, 其中所述荧光微球的粒径为 320nm 至 400nm。

5. 根据权利要求 1 所述的荧光免疫层析试纸, 其中所述荧光微球上的荧光物质为异硫氰酸荧光素、四乙基罗丹明、四甲基异硫氰酸罗丹明或 X-罗丹明, 其中优选为 X-罗丹明; 所述荧光微球的微球材料为聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯的共聚物。

6. 根据权利要求 1 所述的荧光免疫层析试纸, 其中所述荧光微球的激发波长为 350 ~ 600nm, 优选为 390nm; 发射波长为 500 ~ 700nm, 优选为 615nm。

7. 根据权利要求 1 所述的荧光免疫层析试纸, 其中所述试纸具有底板, 并且在该底板上沿使用时的层析方向依次以接触方式设置有: 样品垫、结合垫、反应膜、吸水滤纸, 所述结合垫包被有所述的标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体和所述的标记有荧光微球的第

一 PGII 单克隆抗体,所述反应膜包括第一检测区、第二检测区和质控区,所述第一检测区包被有所述第二 PGI 单克隆抗体和所述第二 PGII 单克隆抗体中的一者,所述第二检测区包被有所述第二 PGI 单克隆抗体和所述第二 PGII 单克隆抗体中的另一者,所述质控区包被有能与所述的标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体和所述的标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体均特异性结合的抗抗体。

8. 根据权利要求 7 所述的荧光免疫层析试纸,其中所述反应膜为在大于 550nm 的波长下基本上不发荧光的硝酸纤维素膜。

9. 根据权利要求 7 所述的荧光免疫层析试纸,其中所述底板基本上不具有荧光性质。

10. 根据权利要求 7 所述的荧光免疫层析试纸,其中所述抗抗体为羊抗鼠 IgG 单克隆抗体或兔抗鼠 IgG 单克隆抗体,其中优选为羊抗鼠 IgG 单克隆抗体。

11. 一种制备根据权利要求 1 至 10 中任意一项所述的荧光免疫层析试纸的方法,其包括以下步骤:

1) 提供标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体和标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体;

2) 提供结合垫,其中在所述结合垫上包被所述的标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体和所述的标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体;

3) 提供反应膜,其中在所述反应膜上沿使用时的层析方向间隔设置第一检测区、第二检测区和质控区,所述第一检测区固定有第二 PGI 单克隆抗体和第二 PGII 单克隆抗体中的一者,所述第二检测区固定有第二 PGI 单克隆抗体和第二 PGII 单克隆抗体中的另一者,所述质控区固定有抗抗体;和

4) 在底板上沿使用时的层析方向依次以接触方式设置样品垫、所述结合垫、所述反应膜、吸水滤纸,从而制成所述荧光免疫层析试纸。

12. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述步骤 1) 包括:

a) 用碳二亚胺活化荧光微球,优选地,将荧光微球的水分散液或 MES 缓冲液分散液经超声波处理并与碳二亚胺混合,从而活化所述荧光微球;

b) 洗涤步骤 a) 所获得的活化的荧光微球,优选地,将步骤 a) 所获得的活化的荧光微球用 N- 羟基琥珀酰亚胺 - 柠檬酸缓冲液洗涤、分散,并经超声波处理;

c) 用步骤 b) 所获得的荧光微球分别标记第一 PGI 单克隆抗体和第一 PGII 单克隆抗体,优选地,将步骤 b) 所获得的荧光微球分别与第一 PGI 单克隆抗体和第一 PGII 单克隆抗体混合,用 BSA- 乙醇胺缓冲液封闭,离心,用 BSA- 吐温水溶液分散,经超声波处理,从而分别得到标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体和标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体。

13. 根据权利要求 11 所述的方法,其中在所述步骤 2) 中,所述的标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体和所述的标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体的包被浓度分别为 0.5 ~ 2mg/ml。

14. 根据权利要求 11 所述的方法,其中在所述步骤 3) 中,所述第一检测区与所述第二检测区之间的间隔为 3mm,所述第二检测区与所述质控区之间的间隔为 5mm,所述第二 PGI 单克隆抗体、所述第二 PGII 单克隆抗体和所述抗抗体的包被浓度分别为 0.5 ~ 2mg/ml。

联合检测人 PGI 蛋白和人 PGII 蛋白的荧光免疫层析试纸及 制法

技术领域

[0001] 本发明属于多肽化学和免疫学领域,具体涉及人胃蛋白酶原 I (PGI)抗原表位肽、用该抗原表位肽制备的 PGI 特异性抗原和相应的单克隆抗体或多克隆抗体、所述抗体在制备人 PGI 体外诊断试剂盒上的用途、人 PGI 体外诊断试剂盒、以及人胃蛋白酶原 II (PGII) 抗原表位肽、用该抗原表位肽制备的 PGII 特异性抗原和相应的单克隆抗体或多克隆抗体、所述抗体在制备人 PGII 体外诊断试剂盒上的用途、人 PGII 体外诊断试剂盒,本发明还涉及用于联合定量检测待测物中人 PGI 蛋白和人 PGII 蛋白的荧光免疫层析试纸及其制备方法。

背景技术

[0002] 胃蛋白酶原(PG)是胃液中胃蛋白酶的无活性前体。人胃蛋白酶原按其电泳迁移率由快至慢,可分为 PG1 至 PG7 七种同工酶原,并且根据其生化性质、免疫原性、细胞来源以及组织内分布可分为 PGI 和 PGII 两个亚群。七种同工酶原中的 PG1 至 PG5 免疫原性近似,称为胃蛋白酶原 I (PGI),其主要由胃腺的主细胞和黏液颈细胞分泌;PG6 至 PG7 被称为胃蛋白酶原 II (PGII),除了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。血清 PGI 和 PGII 反映了胃粘膜不同部位的分泌功能。合成后的 PG 大部分进入胃腔,在酸性胃液作用下活化成胃蛋白酶,只有少量 PG (约 1%) 透过胃黏膜毛。因此,血清 PG 浓度可以反映其分泌水平。正常人血清中的 PGI 是 PGII 的 6 倍,当胃黏膜发生病理变化时,血清 PG 含量也随之发生改变。

[0003] 血清 PG 含量与幽门螺杆菌(HP)感染、慢性胃炎、胃癌等相关。在不同胃部疾病中,血清 PGI、PGII 和 PGI/PGII 的值发生相应变化,其升高、降低还是不变并不一致,作为诊断或治疗结果指标的灵敏度和特异度也各不相同。因此,对于不同胃部疾病,血清 PGI、PGII 和 PGI/PGII 的值也有不同的判断标准。

[0004] PGI 是检测胃泌酸腺(胃底腺)细胞功能的指针,胃酸分泌增多,则 PGI 升高;胃酸分泌减少或胃粘膜腺体萎缩,则 PGI 降低。例如,在胃酸分泌过多的浅表性胃炎和幽门螺杆菌(HP)感染的胃炎中,PGI 的分泌会增加;而在慢性严重萎缩性胃炎中,当主细胞减少时 PGI 含量下降。高浓度的 PGI 还作为十二指肠溃疡及并发症危险性的亚临床指征,并且还可以作为观察 HP 感染(幽门螺杆菌)根除治疗疗效的一个指标。

[0005] 胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一,其病死率居各种恶性肿瘤之首,其早期诊断、早期治疗成为提高患者生存质量、降低病死率的唯一途径。国内外学者对胃癌患者血清 PG 变化作了大量的研究发现:当患胃癌时,血清 PGI 水平降低,PGII 水平基本保持正常或升高,进而,测定血清 PGI 的水平 and PGI/PGII 的比值有助于胃癌的鉴别诊断,过低的 PGI 和 PGI/PGII 应警惕早期胃癌。由于血清 PG 的含量直接反映胃黏膜的功能,因此胃癌患者血清 PGI 水平明显下降,表明胃癌患者胃黏膜分泌能力下降。80% 以上的胃癌伴有萎缩性胃炎,而萎缩性胃炎可导致胃黏膜主细胞丢失,从而影响其分泌功能;胃癌患者血清 PGI 水平明显下

降与胃癌患者胃黏膜萎缩、肠化从而分泌降低有关。因此血清 PGI 及 PGI/PGII 明显下降对监测早期胃癌具有重要的临床意义,可有效应用于胃癌高发区人群的初步筛查。PG 检测作为非侵入性方法,可降低胃病患者或胃癌高危人群检查的痛苦,并且简便、经济,具有重大意义。

[0006] 检测血清中的 PGI 和 PGII 水平的最理想的方法是免疫测定。因此,寻找合适的具有免疫原性的 PGI 抗原表位肽、制备特异性的 PGI 抗原及抗体、以及寻找合适的具有免疫原性的 PGII 抗原表位肽、制备特异性的 PGII 抗原及抗体即成为了重点。

[0007] 荧光免疫层析方法测血液中的待测物操作简便、快速,只需 10 分钟就能完成样品检测,并且检测范围宽,灵敏度好,能够迅速及时地帮助诊断病情,监测预后。中国专利申请 No. 200910117820.8 公开了一种荧光微球免疫层析试纸条的制备方法及其定量检测方法;中国专利申请 No. 200910047352.1 公开了一种荧光免疫层析试纸及其制备方法和应用。然而,目前还没有联合检测人 PGI 蛋白和人 PGII 蛋白的荧光免疫层析试纸。

发明内容

[0008] 为解决上述现有技术中所存在的问题,本发明提供了一种用于联合检测人 PGI 蛋白和人 PGII 蛋白的荧光免疫层析试纸及制法。

[0009] 具体而言,本发明提供了:

[0010] 一种用于联合定量检测待测物中人 PGI 蛋白和人 PGII 蛋白的荧光免疫层析试纸,该试纸通过双抗体夹心法分别检测所述人 PGI 蛋白和所述人 PGII 蛋白,其中:

[0011] (a) 针对所述人 PGI 蛋白,所述双抗体夹心法采用标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体作为捕获抗体,所述第一 PGI 单克隆抗体来源于人 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 中的一者;并且

[0012] 所述双抗体夹心法采用第二 PGI 单克隆抗体作为检测抗体,所述第二 PGI 单克隆抗体来源于人 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 中的另一者;

[0013] 所述人 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 分别为:

[0014] (1) Tyr-Lys-Val-Pro-Leu-Ile-Arg-Lys-Lys-Ser-Leu-Arg-Arg;

[0015] (2) Tyr-Lys-Asn-Phe-Thr-Val-Phe-Asp-Arg-Ala-Asn-Asn-Gln; 并且

[0016] (b) 针对所述人 PGII 蛋白,所述双抗体夹心法采用标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体作为捕获抗体,所述第一 PGII 单克隆抗体来源于人 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 中的一者;并且

[0017] 所述双抗体夹心法采用第二 PGII 单克隆抗体作为检测抗体,所述第二 PGII 单克隆抗体来源于人 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 中的另一者;

[0018] 所述人 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 分别为:

[0019] (3) Lys-Lys-Phe-Lys-Ser-Ile-Arg-Glu-Thr-Tyr;

[0020] (4) Tyr-Thr-Pro-Ser-Arg-Ala-Ala-Pro-Pro-Ser-Ser-Thr-Leu-Gln-Leu-Pro-Glu-Lys。

[0021] 优选地,所述第一 PGI 单克隆抗体是由第一 PGI 抗原制备而成的,该第一 PGI 抗原是通过使所述人 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 中的一者与载体蛋白偶联制备而成的;并且

[0022] 所述第二 PGI 单克隆抗体是由第二 PGI 抗原制备而成的,该第二 PGI 抗原是通过

使所述人 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 中的另一者与载体蛋白偶联制备而成的。

[0023] 优选地,所述第一 PGII 单克隆抗体是由第一 PGII 抗原制备而成的,该第一 PGII 抗原是通过使所述人 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 中的一者与载体蛋白偶联制备而成的;并且

[0024] 所述第二 PGII 单克隆抗体是由第二 PGII 抗原制备而成的,该第二 PGII 抗原是通过使所述人 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 中的另一者与载体蛋白偶联制备而成的。

[0025] 优选地,所述荧光微球的粒径为 320nm 至 400nm。

[0026] 优选地,所述荧光微球上的荧光物质为异硫氰酸荧光素、四乙基罗丹明、四甲基异硫氰酸罗丹明或 X- 罗丹明,其中优选为 X- 罗丹明;所述荧光微球的微球材料为聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯的共聚物。

[0027] 优选地,所述荧光微球的激发波长为 350 ~ 600nm,优选为 390nm;发射波长为 500 ~ 700nm,优选为 615nm。

[0028] 优选地,所述试纸具有底板,并且在该底板上沿使用时的层析方向依次以接触方式设置有:样品垫、结合垫、反应膜、吸水滤纸,所述结合垫包被有所述的标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体和所述的标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体,所述反应膜包括第一检测区、第二检测区和质控区,所述第一检测区包被有所述第二 PGI 单克隆抗体和所述第二 PGII 单克隆抗体中的一者,所述第二检测区包被有所述第二 PGI 单克隆抗体和所述第二 PGII 单克隆抗体中的另一者,所述质控区包被有能与所述的标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体和所述的标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体均特异性结合的抗抗体。

[0029] 优选地,所述反应膜为在大于 550nm 的波长下基本上不发荧光的硝酸纤维素膜。

[0030] 优选地,所述底板基本上不具有荧光性质。

[0031] 优选地,所述抗抗体为羊抗鼠 IgG 单克隆抗体或兔抗鼠 IgG 单克隆抗体,其中优选为羊抗鼠 IgG 单克隆抗体。

[0032] 本发明还提供了一种制备所述的用于联合定量检测待测物中人 PGI 蛋白和人 PGII 蛋白的荧光免疫层析试纸的方法,其包括以下步骤:

[0033] 1) 提供标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体和标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体;

[0034] 2) 提供结合垫,其中在所述结合垫上包被所述的标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体和所述的标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体;

[0035] 3) 提供反应膜,其中在所述反应膜上沿使用时的层析方向间隔设置第一检测区、第二检测区和质控区,所述第一检测区固定有第二 PGI 单克隆抗体和第二 PGII 单克隆抗体中的一者,所述第二检测区固定有第二 PGI 单克隆抗体和第二 PGII 单克隆抗体中的另一者,所述质控区固定有抗抗体;和

[0036] 4) 在底板上沿使用时的层析方向依次以接触方式设置样品垫、所述结合垫、所述反应膜、吸水滤纸,从而制成所述荧光免疫层析试纸。

[0037] 优选地,所述步骤 1) 包括:

[0038] a) 用碳二亚胺活化荧光微球,优选地,将荧光微球的水分散液或 MES 缓冲液分散液经超声波处理并与碳二亚胺混合,从而活化所述荧光微球;

[0039] b) 洗涤步骤 a) 所获得的活化的荧光微球,优选地,将步骤 a) 所获得的活化的荧光

微球用 N- 羟基琥珀酰亚胺 - 柠檬酸缓冲液洗涤、分散, 并经超声波处理;

[0040] c) 用步骤 b) 所获得的荧光微球分别标记第一 PGI 单克隆抗体和第一 PGII 单克隆抗体, 优选地, 将步骤 b) 所获得的荧光微球分别与第一 PGI 单克隆抗体和第一 PGII 单克隆抗体混合, 用 BSA- 乙醇胺缓冲液封闭, 离心, 用 BSA- 吐温水溶液分散, 经超声波处理, 从而分别得到标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体和标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体。

[0041] 优选地, 在所述步骤 2) 中, 所述的标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体和所述的标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体的包被浓度分别为 0.5 ~ 2mg/ml。

[0042] 优选地, 在所述步骤 3) 中, 所述第一检测区与所述第二检测区之间的间隔为 3mm, 所述第二检测区与所述质控区之间的间隔为 5mm, 所述第二 PGI 单克隆抗体、所述第二 PGII 单克隆抗体和所述抗抗体的包被浓度分别为 0.5 ~ 2mg/ml。

[0043] 本发明与现有技术相比具有以下优点和积极效果:

[0044] 1. 本发明的人 PGI 抗原表位肽具有良好的抗原性, 用其制备的抗原(免疫原)免疫动物能够产生高度特异性的单克隆抗体和多克隆抗体。

[0045] 2. 用本发明制备的 PGI 单克隆抗体和多克隆抗体能够高度特异地与血液样本中的 PGI 结合。

[0046] 3. 本发明的人 PGI 体外诊断试剂盒可以有效地监测血清中的 PGI 的水平。

[0047] 4. 本发明的人 PGII 抗原表位肽具有良好的抗原性, 用其制备的抗原(免疫原)免疫动物能够产生高度特异性的单克隆抗体和多克隆抗体。

[0048] 5. 用本发明制备的 PGII 单克隆抗体和多克隆抗体能够高度特异地与血液样本中的 PGII 结合。

[0049] 6. 本发明的人 PGII 体外诊断试剂盒可以有效地监测血清中的 PGII 的水平。

[0050] 7. 本发明将荧光分析技术与快速层析免疫技术相结合, 提供了一种用于联合定量检测待测物中人 PGI 蛋白和人 PGII 蛋白的荧光免疫层析试纸, 用该试纸检测待测物中的人 PGI 蛋白和人 PGII 蛋白, 操作简便、快速, 只需 10 分钟就能完成样品检测, 并且检测范围宽、特异性高、灵敏度好, 能够迅速及时地帮助诊断病情, 监测预后。

[0051] 8. 本发明在制备所述联合检测人 PGI 蛋白和人 PGII 蛋白的荧光免疫层析试纸的过程中, 通过大量的试验摸索, 优化了各方面的制备条件, 使得用本发明的荧光免疫层析试纸进行检测时, 荧光信背比大大提高, 从而提高了检测灵敏度和结果可信度; 此外, 本发明还通过试纸的检测区与质控区的荧光强度比值的变化来反应样品中 PGI 和 PGII 的含量, 这与传统的层析技术只考查检测区的绝对荧光强度相比, 最大程度上减少了外界条件和背景等的影响, 进一步提高了检测结果可信度。

附图说明

[0052] 图 1 示意性示出本发明的一个实施方案的荧光免疫层析试纸的结构示意图。

[0053] 图 2 为示出本发明的人 PGI 体外诊断试剂盒的检测结果与已知的检测 PGI 的 ELISA 试剂盒的检测结果的相关性的图, 其中横坐标为用已知试剂盒测得的样品中 PGI 浓度的值, 单位为 ng/ml, 纵坐标为用本发明试剂盒测得的样品中 PGI 浓度的值, 单位为 ng/ml。

[0054] 图 3 为示出本发明的人 PGI₂ 体外诊断试剂盒的检测结果与已知的检测 PGI₂ 的 ELISA 试剂盒的检测结果的相关性的图,其中横坐标为用已知试剂盒测得的样品中 PGI₂ 浓度的值,单位为 ng/ml,纵坐标为用本发明试剂盒测得的样品中 PGI₂ 浓度的值,单位为 ng/ml。

具体实施方式

[0055] 以下通过具体实施方式的描述并参照附图对本发明作进一步说明,但这并非是对本发明的限制,本领域技术人员根据本发明的基本思想,可以做出各种修改或改进,但是只要不脱离本发明的基本思想,均在本发明的范围之内。

[0056] 一、人 PGI 抗原表位肽

[0057] 本文中所述的人 PGI 蛋白是本领域已知的,其氨基酸序列是本领域已知的,可以在 NCBI 等专业数据库中查到。

[0058] 本发明提供了一种人 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2),其氨基酸序列分别如序列 SEQ ID No. 1 和 SEQ ID No. 2 所示,为:

[0059] (1)Y-K-V-P-L-I-R-K-K-S-L-R-R;和

[0060] (2)Y-K-N-F-T-V-F-D-R-A-N-N-Q。

[0061] 本发明的发明人经过大量的理论研究和实验摸索,筛选得到两个具有良好的抗原性的抗原表位肽。

[0062] PGI 抗原表位肽 (1) 以人 PGI 蛋白(PG3)N 端第 19 至 30 位的一段含 12 个氨基酸残基的肽段作为抗原决定簇,并且在其 N 端添加有 Y。在 N 端加 Y 是为了使该抗原表位肽通过 BDB (Bis-diazotizedbenzidine dichloride)交联到载体蛋白(例如血蓝蛋白(KLH))上,从而作为抗原来制备抗体。PGI 抗原表位肽 (1) 具有亲水性高、抗原性强并且易于合成的特点。

[0063] PGI 抗原表位肽 (2) 以人 PGI 蛋白(PG3)C 端第 372 至 381 位的一段含 10 个氨基酸残基的肽段作为抗原决定簇,并且在其 N 端添加有 3 个氨基酸残基:Y、K、N。这样构成的 PGI 抗原表位肽 (2) 也具有亲水性高、抗原性强并且易于合成的特点。

[0064] 目前,本发明研究发现,本发明的 PGI 抗原表位肽具有如下功能:

[0065] 1. 具有抗原性;2. 与载体蛋白连接后作为免疫原刺激动物产生特异性的抗体;3. 用抗原表位肽制备的抗体可特异性地与人 PGI 结合。

[0066] 本发明的 PGI 抗原表位肽的制备方法可用化学合成法:利用美国 ABI431A 型多肽自动合成仪,通过固相法合成抗原表位肽。本发明的抗原表位肽 (1) 和 (2) 的分子量分别为 1657.24 和 1616.93,可用质谱进行确定,并通过多肽序列测定鉴定所合成的抗原表位肽序列。肽段的纯度用薄层色谱和高效液相色谱进行评定,并测定抗原表位肽的浓度。

[0067] 二、PGI 抗原

[0068] 本发明还提供了一种 PGI 抗原,其通过使本发明的人 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 中的一者与载体蛋白偶联制备而成。具体而言,本发明提供了 PGI 抗原 (1) 和 (2),所述 PGI 抗原 (1) 通过使本发明的人 PGI 抗原表位肽 (1) 与载体蛋白偶联制备而成;所述 PGI 抗原 (2) 通过使本发明的人 PGI 抗原表位肽 (2) 与载体蛋白偶联制备而成。本发明的 PGI 抗原具有免疫原性和特异性,是一种免疫原,可用来免疫动物从而制备特异性的 PGI 抗体。在本

发明中,可用的载体蛋白的例子包括 KLH (钥孔血蓝蛋白)、牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白 OVA 等。由于 KLH (钥孔血蓝蛋白) 免疫原性强,结合位点多,免疫效果较好,并且与免疫动物亲缘关系较远,用其作为载体蛋白不易引起交叉反应,因此是优选的。

[0069] 三、PGI 单克隆抗体、PGI 多克隆抗体和人 PGI 体外诊断试剂盒

[0070] 本发明还提供了人 PGI 单克隆抗体和人 PGI 多克隆抗体,所述抗体可以分别利用本发明的 PGI 抗原 (1) 和 (2) (免疫原) 免疫动物制备而得。制备方法可采用本领域的常规技术,具体可参见实施例 2。

[0071] 本发明的 PGI 单克隆抗体和多克隆抗体可以用于制备人 PGI 体外诊断试剂盒,该试剂盒可以基于免疫方法对血液标本中的 PGI 进行检测。

[0072] 因此,本发明提供了一种人 PGI 体外诊断试剂盒,其包含本发明的人 PGI 单克隆抗体或多克隆抗体。

[0073] 目前已知可用于临床检验的免疫实验方法主要包括以下几种:ELISA 法、化学发光法、荧光层析法、胶体金免疫测定法等。

[0074] 而 ELISA 法包括以下几种类型:双抗体夹心法检测抗原、双抗原夹心法检测抗体、间接法测抗体、竞争法测抗体、竞争法测抗原、捕获包被法测抗体等。

[0075] 本发明的人 PGI 体外诊断试剂盒优选采用 ELISA 双抗体夹心法来检测 PGI 蛋白。该试剂盒可以包含包被抗体、结合抗体、酶标记的第二抗体和 / 或必要的工具和试剂等。

[0076] 优选的是,所述人 PGI 体外诊断试剂盒采用本发明的人 PGI 单克隆抗体作为包被抗体。在此,术语“包被抗体”是指包被于固相的酶标板上的抗体。此外,所述人 PGI 体外诊断试剂盒还优选包含人 PGI 多克隆抗体以作为结合抗体,其中,当所述结合抗体来源于本发明的人 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 中的一者时,所述包被抗体来源于所述抗原表位肽 (1) 和 (2) 中的另一者。在此,术语“结合抗体”是指试剂盒中可与待测抗原及酶标记第二抗体结合的特异性抗体。所述试剂盒还可以包含酶标记的第二抗体,该第二抗体可以为羊抗兔 IgG 抗体,所述酶标记可以为辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等。

[0077] 在本发明的试剂盒中,还可以包含检测所需的任何试剂或工具,例如预包被板、洗涤液、显色剂、终止液等。

[0078] 四、人 PGII 抗原表位肽

[0079] 本文中所述的人 PGII 蛋白是本领域已知的,其氨基酸序列是本领域已知的,可以在 NCBI 等专业数据库中查到。

[0080] 本发明提供了一种人 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4),其氨基酸序列分别如序列 SEQ ID No. 3 和 SEQ ID No. 4 所示,为:

[0081] (3)K-K-F-K-S-I-R-E-T-Y;和

[0082] (4)Y-T-P-S-R-A-A-P-P-S-S-T-L-Q-L-P-E-K。

[0083] 本发明的发明人经过大量的理论研究和实验摸索,最终筛选得到两种具有良好的抗原性的抗原表位肽。

[0084] PGII 抗原表位肽 (3) 以人 PGII 蛋白(NCBI 序列号(NCBI Reference Sequence)):NP_001159896.1) N 端第 24 至 32 位的一段含 9 个氨基酸残基的肽段作为抗原决定簇,并且在其 C 端添加有 Y。在 C 端添加 Y 是为了使该抗原表位肽通过 BDB (Bis-diazotizedbenzidine dichloride) 交联到载体蛋白(例如血蓝蛋白(KLH))上,从而

作为抗原来制备抗体。PGII 抗原表位肽 (3) 具有亲水性高、抗原性强并且易于合成的特点。

[0085] PGII 抗原表位肽 (4) 以人 PGII 蛋白 (NCBI 序列号 (NCBI Reference Sequence): NP_001159896.1) C 端第 229 至 245 位的一段含 17 个氨基酸残基的肽段作为抗原决定簇, 并且在 N 端添加有 Y。在 N 端加 Y 是为了使该抗原表位肽通过 BDB (Bis-diazotized benzidine dichloride) 交联到载体蛋白 (例如血蓝蛋白 (KLH)) 上, 从而作为抗原来制备抗体。PGII 抗原表位肽 (4) 也具有亲水性高、抗原性强并且易于合成的特点。

[0086] 目前, 本发明研究发现, 本发明的 PGII 抗原表位肽具有如下功能:

[0087] 1. 具有抗原性; 2. 与载体蛋白连接后作为免疫原刺激动物产生特异性的抗体; 3. 用抗原表位肽制备的抗体可特异性地与人 PGII 结合。

[0088] 本发明的 PGII 抗原表位肽的制备方法可用化学合成法: 利用美国 ABI431A 型多肽自动合成仪, 通过固相法合成抗原表位肽。本发明的抗原表位肽 (3) 和 (4) 的分子量分别为 1299.66 和 1943.41, 可用质谱进行确定, 并通过多肽序列测定鉴定所合成的抗原表位肽序列。肽段的纯度用薄层色谱和高效液相色谱进行评定, 并测定抗原表位肽的浓度。

[0089] 五、PGII 抗原

[0090] 本发明还提供了一种 PGII 抗原, 其通过使本发明的人 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 中的一者与载体蛋白偶联制备而成。具体而言, 本发明提供了 PGII 抗原 (3) 和 (4), 所述 PGII 抗原 (3) 通过使本发明的人 PGII 抗原表位肽 (3) 与载体蛋白偶联制备而成; 所述 PGII 抗原 (4) 通过使本发明的人 PGII 抗原表位肽 (4) 与载体蛋白偶联制备而成。本发明的 PGII 抗原具有免疫原性和特异性, 是一种免疫原, 可用来免疫动物从而制备特异性的 PGII 抗体。在本发明中, 可用的载体蛋白的例子包括 KLH (钥孔血蓝蛋白)、牛血清白蛋白 (BSA)、卵清蛋白 OVA 等。由于 KLH (钥孔血蓝蛋白) 免疫原性强, 结合位点多, 免疫效果较好, 并且与免疫动物亲缘关系较远, 用其作为载体蛋白不易引起交叉反应, 因此是优选的。

[0091] 六、PGII 单克隆抗体、PGII 多克隆抗体和人 PGII 体外诊断试剂盒

[0092] 本发明还提供了人 PGII 单克隆抗体和人 PGII 多克隆抗体, 所述抗体可以分别利用本发明的 PGII 抗原 (3) 和 (4) (免疫原) 免疫动物制备而得。制备方法可采用本领域的常规技术, 具体可参见实施例 2。

[0093] 本发明的 PGII 单克隆抗体和多克隆抗体可以用于制备人 PGII 体外诊断试剂盒, 该试剂盒可以基于免疫方法对人血液标本中的 PGII 进行检测。

[0094] 因此, 本发明提供了一种人 PGII 体外诊断试剂盒, 其包含本发明的人 PGII 单克隆抗体或多克隆抗体。

[0095] 目前已知可用于临床检验的免疫实验方法主要包括以下几种: ELISA 法、化学发光法、荧光层析法、胶体金免疫测定法等。

[0096] 而 ELISA 法包括以下几种类型: 双抗体夹心法检测抗原、双抗原夹心法检测抗体、间接法测抗体、竞争法测抗体、竞争法测抗原、捕获包被法测抗体等。

[0097] 本发明的人 PGII 体外诊断试剂盒优选采用 ELISA 双抗体夹心法来检测 PGII 蛋白。该试剂盒可以包含包被抗体、结合抗体、酶标记的第二抗体和 / 或必要的工具和试剂等。

[0098] 优选的是, 所述人 PGII 体外诊断试剂盒采用本发明的人 PGII 单克隆抗体作为包被抗体。在此, 术语“包被抗体”是指包被于固相的酶标板上的抗体。此外, 所述人 PGII 体

外诊断试剂盒还优选包含人 PGII 多克隆抗体以作为结合抗体,其中,当所述结合抗体来源于本发明的人 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 中的一者时,所述包被抗体来源于所述抗原表位肽 (3) 和 (4) 中的另一者。在此,术语“结合抗体”是指试剂盒中可与待测抗原及酶标记第二抗体结合的特异性抗体。所述试剂盒还可以包含酶标记的第二抗体,该第二抗体可以为羊抗兔 IgG 抗体,所述酶标记可以为辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等。

[0099] 在本发明的试剂盒中,还可以包含检测所需的任何试剂或工具,例如预包被板、洗涤液、显色剂、终止液等。

[0100] 七、用于联合定量检测人 PGI 蛋白和人 PGII 蛋白的荧光免疫层析试纸

[0101] 本发明还提供了一种用于联合定量检测待测物中人 PGI 蛋白和人 PGII 蛋白的荧光免疫层析试纸,该试纸通过双抗体夹心法分别检测所述人 PGI 蛋白和所述人 PGII 蛋白,其中:

[0102] (a) 针对所述人 PGI 蛋白,所述双抗体夹心法采用标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体作为捕获抗体,所述第一 PGI 单克隆抗体来源于人 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 中的一者;并且

[0103] 所述双抗体夹心法还采用第二 PGI 单克隆抗体作为检测抗体,所述第二 PGI 单克隆抗体来源于人 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 中的另一者;

[0104] 所述人 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 分别为:

[0105] (1) Tyr-Lys-Val-Pro-Leu-Ile-Arg-Lys-Lys-Ser-Leu-Arg-Arg;

[0106] (2) Tyr-Lys-Asn-Phe-Thr-Val-Phe-Asp-Arg-Ala-Asn-Asn-Gln; 并且

[0107] (b) 针对所述人 PGII 蛋白,所述双抗体夹心法还采用标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体作为捕获抗体,所述第一 PGII 单克隆抗体来源于人 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 中的一者;并且

[0108] 所述双抗体夹心法采用第二 PGII 单克隆抗体作为检测抗体,所述第二 PGII 单克隆抗体来源于人 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 中的另一者;

[0109] 所述人 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 分别为:

[0110] (3) Lys-Lys-Phe-Lys-Ser-Ile-Arg-Glu-Thr-Tyr;

[0111] (4) Tyr-Thr-Pro-Ser-Arg-Ala-Ala-Pro-Pro-Ser-Ser-Thr-Leu-Gln-Leu-Pro-Glu-Lys。

[0112] 在本发明中,在双抗体夹心法荧光免疫层析试纸中,“捕获抗体”是指能够首先特异性识别待测抗原的抗体,其通常包被在结合垫上;“检测抗体”是指另一种能够特异性识别待测抗原的抗体,其与捕获抗体分别识别待测抗原分子上的不同的抗原表位,其通常固定在反应膜的检测区上。

[0113] 在本发明中,所述第一 PGI 单克隆抗体可以由第一 PGI 抗原制备而成,该第一 PGI 抗原可以通过使所述人 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 中的一者与载体蛋白偶联制备而成;并且所述第二 PGI 单克隆抗体可以由第二 PGI 抗原制备而成,该第二 PGI 抗原可以通过使所述人 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 中的另一者与载体蛋白偶联制备而成。

[0114] 在本发明中,所述第一 PGII 单克隆抗体可以由第一 PGII 抗原制备而成,该第一 PGII 抗原可以通过使所述人 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 中的一者与载体蛋白偶联制备而成;并且所述第二 PGII 单克隆抗体可以由第二 PGII 抗原制备而成,该第二 PGII 抗原可以

通过使所述人 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 中的另一者与载体蛋白偶联制备而成。

[0115] 在本发明中, 可用的载体蛋白的例子包括 KLH (钥孔血蓝蛋白)、牛血清白蛋白 (BSA)、卵清蛋白 OVA 等。由于 KLH (钥孔血蓝蛋白) 免疫原性强, 结合位点多, 免疫效果较好, 并且与免疫动物亲缘关系较远, 用其作为载体蛋白不易引起交叉反应, 因此是优选的。

[0116] 优选地, 本发明的荧光免疫层析试纸中所用的荧光微球的粒径为 320nm 至 400nm, 优选为 360nm, 荧光微球上的荧光物质可为异硫氰酸荧光素、四乙基罗丹明、四甲基异硫氰酸罗丹明或 X- 罗丹明等, 其中优选为 X- 罗丹明(可购自上海晶纯公司)。荧光微球的微球材料可以由聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯与其它单体共聚形成的共聚物, 其它单体的例子为苯乙烯等。荧光微球的激发波长可以为 350 ~ 600nm, 优选为 390nm; 发射波长可以为 500 ~ 700nm, 优选为 615nm。

[0117] 在本发明中, 荧光微球的最大激发波长与发射波长差值较大, 说明荧光微球有较大的斯托克斯(Stokes)位移, 这样, 荧光试纸的背景干扰较低, 以该微球做免疫层析标记物有较强的优势。

[0118] 在一个具体的实施方案中, 本发明的荧光免疫层析试纸具有底板, 并且在该底板上沿使用时的层析方向依次以接触方式设置有: 样品垫、结合垫、反应膜、吸水滤纸; 所述样品垫用于在使用时加载待测样品; 所述结合垫包被有所述的标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体和所述的标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体, 本领域技术人员可以理解的是, 所述两种抗体可以包被在结合垫的相同位置上; 所述反应膜包括第一检测区、第二检测区和质控区, 所述第一检测区包被有所述第二 PGI 单克隆抗体和所述第二 PGII 单克隆抗体中的一者, 所述第二检测区包被有所述第二 PGI 单克隆抗体和所述第二 PGII 单克隆抗体中的另一者, 所述质控区包被有能与所述的标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体和所述的标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体特异性结合的抗抗体。

[0119] 优选地, 本发明的荧光免疫层析试纸的样品垫、结合垫、反应膜、吸水滤纸可以沿使用时的层析方向依次搭接设置在底板上(参见图 1)。反应膜上间隔设置的第一检测区、第二检测区和质控区可以为, 但不限于, 线、带、块等形式。第一检测区、第二检测区和质控区可以在所述反应膜上沿使用时的层析方向间隔设置, 第一检测区与第二检测区之间的间隔优选为 3mm, 第二检测区与质控区之间的间隔优选为 5mm。本领域技术人员可以理解的是, 可以对第一检测区和第二检测区在反应膜上的位置关系进行多种改变, 只要检测时两者之间的荧光信号互不干扰即可。例如, 在使用时的层析方向上, 第一检测区和第二检测区可以分别与质控区间隔相同的距离, 同时, 在试纸平面上与使用时的层析方向正交的方向上, 第一检测区和第二检测区彼此相距一定的距离, 使得检测时两者之间的荧光信号互不干扰。

[0120] 在本发明中, 反应膜优选为在大于 550nm 的波长下基本上不发荧光的硝酸纤维素膜。此外, 底板优选基本上不具有荧光性质。

[0121] 通常, 常规的层析试纸组件(反应膜、底板等)在 550nm 波长下具有较明显的荧光背景, 这对荧光信号的检测产生很大干扰。本发明通过采用在大于 550nm 的波长下基本上不发荧光的硝酸纤维素膜和低荧光性质的底板, 从而克服了常规荧光试纸的缺陷。此外, 本发明所用的荧光物质 X- 罗丹明可产生较强的荧光信号, 从而进一步大大提高了荧光信背比, 使得能够很好地区分信号和背景, 进而提高检测灵敏度。

[0122] 在本发明中, 样品垫和结合垫的材料可采用本领域通常使用的材料, 例如, 样品垫

和结合垫可以为玻璃纤维。

[0123] 本发明所采用的能与标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体和标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体特异性结合的抗抗体可以为羊抗鼠 IgG 单克隆抗体或兔抗鼠 IgG 单克隆抗体,其中优选为羊抗鼠 IgG 单克隆抗体,与多克隆抗体相比,单克隆抗体特异性更高。

[0124] 在一个具体的实施方案中,本发明的荧光免疫层析试纸在使用时,在样品垫上滴加样品液(如含有 PGI 和 PGII 的血样),在毛细管作用下,样品液向吸水滤纸一端移动,在结合垫处,PGI 与所述的标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体形成免疫复合物 1,PGII 与所述的标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体形成免疫复合物 2,所形成的免疫复合物进一步移动,在各自的检测线上,免疫复合物 1 与所述第二 PGI 单克隆抗体结合形成双抗体夹心的免疫复合物 1,免疫复合物 2 与所述第二 PGII 单克隆抗体结合形成双抗体夹心的免疫复合物 2,而未形成免疫复合物的标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体和标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体则分别与质控线上的抗抗体结合。此过程需要 10 分钟至 15 分钟,之后,用荧光检测仪进行检测,如果质控线处未出现条带,则说明试纸失效;如果质控线处出现条带,而第一检测线或第二检测线处未出现条带,则说明样品中不含人 PGI 蛋白或人 PGII 蛋白;如果在质控线处出现条带,并在第一检测线和 / 或第二检测线上出现条带,则说明样品中含有人 PGI 蛋白和 / 或人 PGII 蛋白。

[0125] 在另一个方面,本发明提供了一种制备用于联合定量检测待测物中人 PGI 蛋白和人 PGII 蛋白的荧光免疫层析试纸的方法,其包括以下步骤:

[0126] 1) 提供标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体和标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体;

[0127] 2) 提供结合垫,其中在所述结合垫上包被所述的标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体和所述的标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体;

[0128] 3) 提供反应膜,其中在所述反应膜上沿使用时的层析方向间隔设置第一检测区、第二检测区和质控区,所述第一检测区固定有第二 PGI 单克隆抗体和第二 PGII 单克隆抗体中的一者,所述第二检测区固定有第二 PGI 单克隆抗体和第二 PGII 单克隆抗体中的另一者,所述质控区固定有抗抗体;和

[0129] 4) 在底板上沿使用时的层析方向依次以接触方式设置样品垫、所述结合垫、所述反应膜、吸水滤纸,从而制成所述荧光免疫层析试纸。

[0130] 本领域技术人员可以理解的是,可以在结合垫的相同位置上包被所述的标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体和所述的标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体。例如,可将标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体和所述的标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体分别包被在结合垫的相同位置上,或者可将标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体和所述的标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体混合再包被在结合垫上。

[0131] 此外,本领域技术人员可以理解的是,可以根据实际需要对上述步骤的顺序进行调整,例如步骤 3) 可以在步骤 1) 之前,或在步骤 1) 和 2) 之间。

[0132] 本发明的方法还可以包括将制成的荧光免疫层析试纸切割成适当宽度的步骤 5)。

[0133] 本发明的发明人通过大量的试验摸索,优化了制备本发明的用于联合检测人 PGI 蛋白和人 PGII 蛋白的荧光免疫层析试纸的方法的各个步骤的条件,从而使得本发明的荧

光免疫层析试纸能够针对人 PGI 蛋白和人 PGII 蛋白获得符合临床检测要求的结果,即,检测范围宽、特异性高、灵敏度好。

[0134] 因此,优选的是,在本发明的方法中,所述步骤 1) 包括:

[0135] a) 用碳二亚胺活化荧光微球,优选地,将荧光微球的水分散液或 MES 缓冲液分散液经超声波处理并与碳二亚胺混合,从而活化所述荧光微球;

[0136] b) 洗涤步骤 a) 所获得的活化的荧光微球,优选地,将步骤 a) 所获得的活化的荧光微球用 N- 羟基琥珀酰亚胺 - 柠檬酸缓冲液洗涤、分散,并经超声波处理;

[0137] c) 用步骤 b) 所获得的荧光微球分别标记第一 PGI 单克隆抗体和第一 PGII 单克隆抗体,优选地,将步骤 b) 所获得的荧光微球分别与第一 PGI 单克隆抗体和第一 PGII 单克隆抗体混合,用 BSA- 乙醇胺缓冲液封闭,离心,用 BSA- 吐温水溶液分散,经超声波处理,从而得到标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体。

[0138] 在本发明的一个具体的实施方案中,所述步骤 1) 包括:

[0139] a) 用碳二亚胺活化荧光微球,其中,取 1(w/v)% 的荧光微球水分散液,10000rpm 至 15000rpm 低温(例如 10℃)离心 5 至 10 分钟,去上清,将沉淀物分散到 500 μ l 的蒸馏水或初洗缓冲液(0.1M 的 MES 水溶液)中,超声波(240W)处理 1 至 2 分钟,重复以上过程三次,加入碳二亚胺 10mg 至 50mg,搅拌 10 ~ 15 分钟,从而活化所述荧光微球;

[0140] b) 洗涤步骤 a) 所获得的活化的荧光微球,其中,将步骤 a) 所获得的活化的荧光微球在 1000rpm 至 15000rpm 下离心 5 至 10 分钟,将沉淀物分散到 1ml 偶联缓冲液(20 ~ 100mM 的 N- 羟基琥珀酰亚胺 - 柠檬酸缓冲液)中,超声波(240W)处理 1 至 2 分钟,重复以上过程三次;

[0141] c) 用步骤 b) 所获得的荧光微球分别标记第一 PGI 单克隆抗体和第一 PGII 单克隆抗体,其中,分别按照 1 μ l 至 3 μ l 抗体(10mg/ml)/100 μ l 所述活化的荧光微球的比例,将步骤 b) 所获得的荧光微球分别与第一 PGI 单克隆抗体和第一 PGII 单克隆抗体混合,室温(25℃)下搅拌 1.5 ~ 3 小时(优选 2 小时),加入 1ml 封闭缓冲液(1(w/v)%BSA-0.05M 乙醇胺),继续搅拌 1 小时,在 10000rpm 至 15000rpm 下离心 5 至 10 分钟,重复离心 3 次,将沉淀物分散到 500 μ l 终洗缓冲液(0.5(w/v)%BSA-0.11(v/v)%吐温水溶液)中,超声波(240W)处理 1 至 2 分钟,用所述终洗缓冲液定容至 500 μ l。

[0142] 优选地,在本发明的方法中,所述步骤 2) 包括:分别将标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体用抗体稀释液(1%(w/v)BSA-0.01MPBS (pH7.2) 缓冲液)进行稀释,以稀释至 0.5 ~ 2mg/ml,优选为 1mg/ml,然后用微量移液器分别均匀喷涂在结合垫上,之后烘干或真空冷冻干燥。在本发明的方法的步骤 2) 中,所述的标记有荧光微球的第一 PGI 单克隆抗体和所述的标记有荧光微球的第一 PGII 单克隆抗体的包被浓度分别为 0.5 ~ 2mg/ml,优选为 1mg/ml。

[0143] 优选地,所述步骤 3) 包括:用喷金机将所述第二 PGI 单克隆抗体、所述第二 PGII 单克隆抗体和所述抗抗体划到硝酸纤维素膜(固相载体)上以作为第一检测区、第二检测区和质控区,使第一检测区与第二检测区之间的间隔为 3mm,并且使第二检测区与质控区之间的间隔为 5mm,所述第二 PGI 单克隆抗体、所述第二 PGII 单克隆抗体和所述抗抗体的浓度分别为 0.5 ~ 2mg/ml,优选为 1mg/ml。

[0144] 优选地,结果检测利用专用的荧光检测仪(可购自深圳市安群生物工程有限公司,

型号 AQ-3000) 对质控区、第一检测区和第二检测区进行检测,第一检测区与质控区荧光强度的比值和待测样品中的 PGI 的含量成正比(第一检测区包被第二 PGI 单克隆抗体的情况),第二检测区与质控区荧光强度的比值和待测样品中的 PGII 的含量成正比(第二检测区包被第二 PGII 单克隆抗体的情况)。采用检测区与质控区荧光强度的比值而不是直接采用检测区的绝对荧光值可尽可能地减少反应条件、基质等的影响,并尽量避免背景干扰。

[0145] 以下通过例子的方式进一步解释或说明本发明的内容,但这些例子不应被理解为本发明的保护范围的限制。

[0146] 实施例

[0147] 除非另有说明,以下所述溶液均为水溶液,溶液中的百分数均为体积百分数。

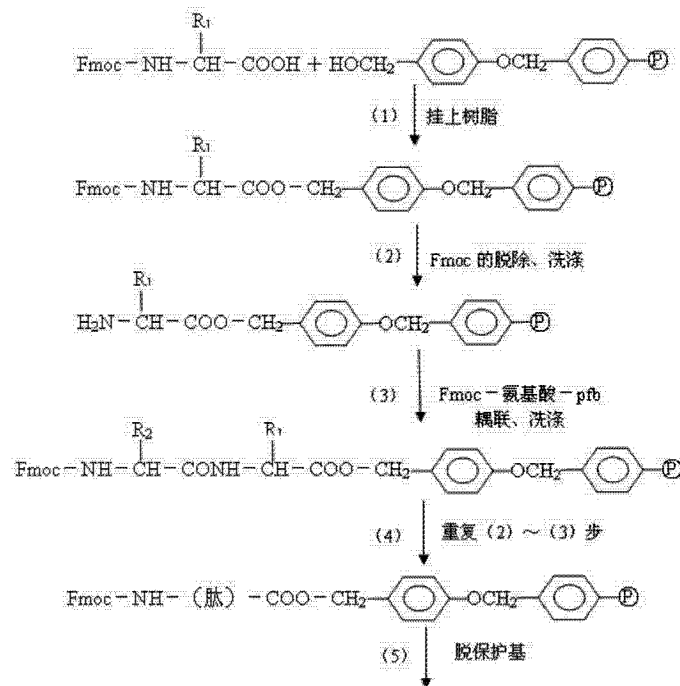
[0148] 实施例 1 :PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 以及 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 的制备。

[0149] 制备方法用化学合成法:利用美国 ABI431A 型多肽自动合成仪,通过固相法分别合成 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 以及 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4)。抗原表位肽的纯度用高效液相色谱进行评定,并测定肽段的浓度。本发明的 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 的分子量分别为 1657.24、1616.93,PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 的分子量分别为 1299.66 和 1943.41,利用质谱进行确定,通过多肽序列测定鉴定所合成的多肽序列。

[0150] 一、PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 以及 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 的合成

[0151] 上述肽段采用固相法合成。固相肽合成的主要思想是:先将所要合成肽链的羧基末端氨基酸的羧基以共价键形式同一个不溶性的高分子化合物(树脂)相连接,然后以此结合在固相载体上的氨基酸作为氨基组份,经过脱去氨基保护基并同过量的活化羧基组份反应,接长肽链。这样的步骤可以反复地多次进行下去,最后达到所需要合成的肽链的长度。这个合成过程如下所示。

[0152]



[0153] 本发明的 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 以及 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 的各自的具体制备步骤如下:

[0154] 1. 所用原料：

[0155] HMP resin(P- 羟甲基苯氧甲基多聚乙烯树脂,可购自 sigma 公司)

[0156] Fmoc-AA (9- 芴基甲氧羰酰基保护的氨基酸,可购自 Merck 公司)

[0157] NMP (氮甲基吡咯烷酮,可购自 sigma 公司)

[0158] DCM (二氯甲烷,可购自中原化工公司)

[0159] MeoH (甲醇,可购自中原化工公司)

[0160] Piperidine (哌啶,可购自 sigma 公司)

[0161] DMAP (二甲基氨基吡啶,可购自 sigma 公司)

[0162] HOBT (羟基苯并三唑,可购自 sigma 公司)

[0163] DCC (二环己基碳二亚胺,可购自 sigma 公司)

[0164] TFA (三氟乙酸,可购自 sigma 公司)

[0165] EDT (1,2- 乙二硫醇,可购自 sigma 公司)

[0166] 硫代苯甲醚,可购自广州伟伯化工有限公司

[0167] 结晶苯酚,可购自国药集团化学试剂有限公司

[0168] 乙腈,可购自国药集团化学试剂有限公司

[0169] 2. 使用仪器：

[0170] 多肽自动合成仪,型号 431A,可购自 ABI 公司

[0171] 旋转蒸发仪,型号 R - 201,可购自上海申顺公司

[0172] 高效液相色谱仪,Waters600,可购自美国 Waters 公司

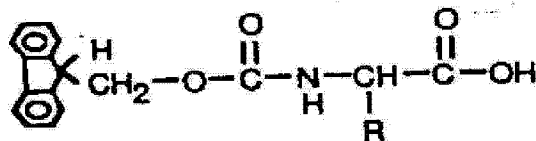
[0173] 冷冻干燥机,型号 VFD-2000,可购自北京博医康公司

[0174] 3. 合成方法和过程：

[0175] 称取 HMP 树脂 100mg,取代当量是 1.0meq,即将 0.1mmol 置于美国 ABI431A 型多肽自动合成仪的反应腔内,由合成仪自动将特定的氨基酸按不同的顺序连接起来,偶联率达 99%。反应如下：

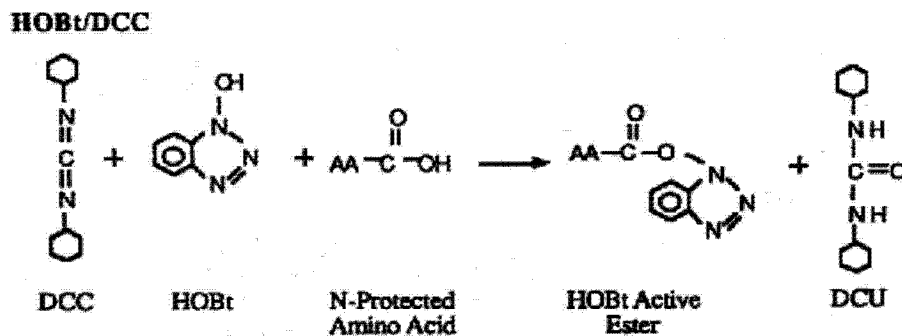
[0176] (1) 氨基酸的活化 (HOBt/DCC 法)

[0177]



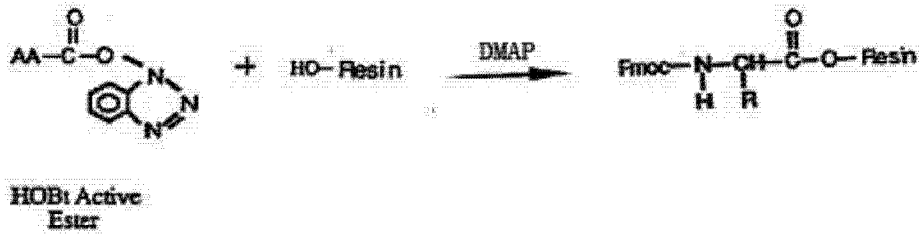
[0178] Fmoc 保护的氨基酸

[0179]



[0180] (2) 连接氨基酸到树脂上

[0181]



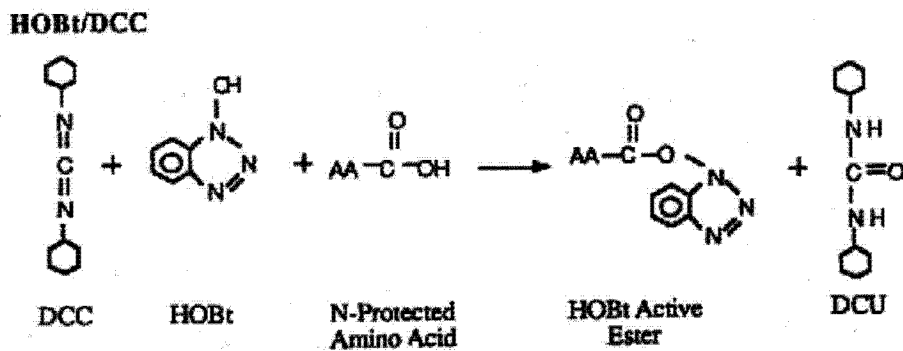
[0182] (3) 脱去氨基酸的 Fmoc 保护基

[0183]



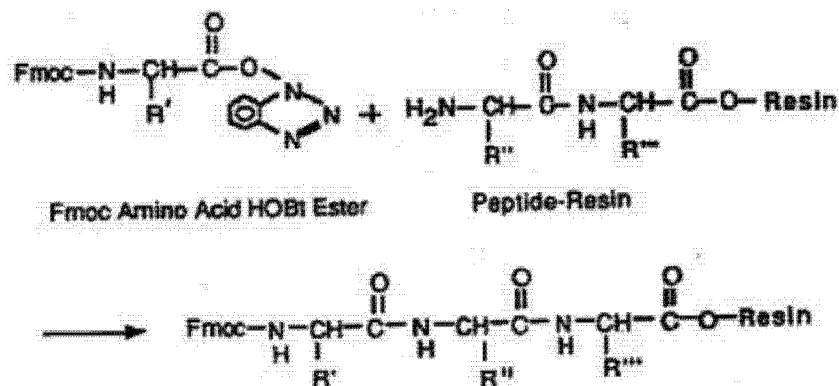
[0184] (4) 另一氨基酸的活化 (HOBt/DCC 法)

[0185]



[0186] (5) 偶联

[0187]



[0188] 新的偶联的肽-树脂

[0189] (6) 重复步骤(3)至(5)直至合成结束。

[0190] (7) 裂解肽树脂：

[0191] 将树脂转移至烧杯中，用 TFA（三氟乙酸）切割肽链，用 EDT（2.5 体积 %）、硫代苯甲醚（2.5 体积 %）作清除剂，在室温下反应 3.0 小时，除去切割试剂，再用乙醚萃取，分别得到 PGI 肽段 (1) 的粗品 124.3mg、PGI 肽段 (2) 的粗品 119.8mg、PGII 肽段 (3) 的粗品 104mg

和 PGII 肽段 (4) 的粗品 148mg。

[0192] 二、PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 以及 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 粗品的纯化：

[0193] 采用高效液相色谱分离纯化：

[0194] 条件：色谱柱：C810×100mm，可购自美国 Waters 公司

[0195] 色谱仪：Waters600，美国 Waters 公司

[0196] 流动相：A：0.1%TFA（三氟乙酸）水溶液

[0197] B：0.1%TFA（三氟乙酸）于 60% 乙腈

[0198] 检测波长：214nm

[0199] 流速：4ml/分钟

[0200] 洗脱梯度：20-60%B，30 分钟

[0201] HPLC（高效液相色谱）分析

[0202] 色谱柱：C184.6×150mm，可购自美国 Waters 公司

[0203] 流动相：A：0.1%TFA（三氟乙酸）水溶液

[0204] B：0.1%TFA（三氟乙酸）于乙腈

[0205] 检测波长：214nm

[0206] 流速：1ml/分钟

[0207] 洗脱梯度：0-60%B，30 分钟

[0208] 肽段分析结果显示本发明的 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 以及 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 的纯度均为 95% 以上。

[0209] 三、PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 以及 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 的鉴定

[0210] 1. 利用质谱分别测定纯化所得的 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 以及 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 的分子量。

[0211] (1) 试剂原料

[0212] TFA（三氟乙酸，可购自 sigma 公司）

[0213] HCCA（ α -氰基-4-羟基肉桂酸，可购自 sigma 公司）

[0214] 乙腈（可购自国药集团化学试剂有限公司）

[0215] (2) 仪器

[0216] 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪 MALDI-TOF-MS（型号：REFLEX III，德国 Bruker 公司）；

[0217] (3) 基质液：将 α -CCA 溶于含 0.1%TFA 的 50%ACN 溶液中，制成饱和溶液，离心，取上清；

[0218] (4) 仪器检测条件：反射检测方式；飞行管长 3m；氮激光器：波长 337nm，加速电压 20KV；反射电压 23KV。

[0219] (5) 操作步骤：分别取 1 μ L 上述纯化多肽 (1) 和 (2) 以及 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 的样品，各自与 1 μ L 的饱和基质上清液混合等体积混合，分别取 1 μ L 点在样品靶上，送入离子源中进行检测。

[0220] 结果，测得所得 PGI 抗原表位肽 (1) 的分子量为 1658.5，PGI 抗原表位肽 (2) 的分子量为 1618.4，与理论分子量 1657.24、1616.93 一致，并且测得 PGII 抗原表位肽 (3) 的分子量为 1301.2，PGII 抗原表位肽 (4) 的分子量为 1943.5，与理论分子量 1299.66、1943.41

一致,证明合成多肽即为目的产物。

[0221] 2. 通过多肽序列测定分别鉴定所得 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 以及 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 的序列。

[0222] (1)原理:多肽氨基酸序列分析的基本原理是 Edman 降解,是一个循环式的化学反应过程。包括三个主要的化学步骤:(1)偶联:异硫氰酸苯酯与蛋白质和多肽的 N-端残基反应,形成苯氨基硫甲酰(PTC)衍生物,即 PTC-肽。(2)环化裂解:PTC-肽环化裂解。(3)转化:噻唑啉酮苯氨(ATZ)转化为苯异硫尿氨基酸(PTH-氨基酸)。留在溶液中的减少了一个氨基酸残基的肽再重复进行上述反应过程,整个测序过程现在都是通过测序仪自动进行。

[0223] (2)仪器:美国 ABI 公司 491 型蛋白质/多肽 N-末端氨基酸序列分析仪

[0224] (3)试剂原料

[0225] 异硫氰酸苯酯 PITC,可购自 sigma 公司

[0226] 正庚烷,可购自国药集团化学试剂有限公司

[0227] 三甲胺 TMA 水溶液,可购自国药集团化学试剂有限公司

[0228] TFA(三氟乙酸,可购自 sigma 公司)

[0229] 乙酸乙酯,可购自国药集团化学试剂有限公司

[0230] 氯丁烷,可购自 sigma 公司

[0231] 乙腈,可购自国药集团化学试剂有限公司

[0232] (4)测定

[0233] 按仪器说明书进行。

[0234] 结果:经鉴定,所得 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 的序列分别为:

[0235] (1)Y-K-V-P-L-I-R-K-K-S-L-R-R;和

[0236] (2)Y-K-N-F-T-V-F-D-R-A-N-N-Q。

[0237] 所得 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 的序列分别为:

[0238] (3)K-K-F-K-S-I-R-E-T-Y;和

[0239] (4)Y-T-P-S-R-A-A-P-P-S-S-T-L-Q-L-P-E-K。

[0240] 该结果与目标合成肽段一致。

[0241] 实施例 2:将实施例 1 所得的 PGI 抗原表位肽 (1) 和 (2) 以及 PGII 抗原表位肽 (3) 和 (4) 分别与载体蛋白连接以制备 PGI 抗原 (1)、PGI 抗原 (2)、PGII 抗原 (3) 和 PGII 抗原 (4),利用所得抗原 (1)、(2)、(3) 和 (4) 分别免疫动物,从而分别各自利用抗原 (1)、(2)、(3) 和 (4) 制备特异性的单克隆抗体和多克隆抗体。

[0242] 1. 抗原的制备:用 BDB (Bis-diazotizedbenzidine dichloride) 法将 PGI 肽段 (1)、PGI 肽段 (2)、PGII 肽段 (3) 和 PGII 肽段 (4) 分别与载体蛋白 KLH (钥孔血蓝蛋白)连接制备成 PGI 抗原 (1)、PGI 抗原 (2)、PGII 抗原 (3) 和 PGII 抗原 (4)。

[0243] 取 PGI 肽段 (1) 或 PGI 肽段 (2) 或 PGII 肽段 (3) 或 PGII 肽段 (4) 10.0mg,用 1ml0.1M PBS 缓冲液 (pH7.4)溶解;KLH10mg,用 0.2M 硼酸盐缓冲液 (pH9.0)20ml 溶解;然后将两者混合,冷却至 0℃,取 BDBCl₂110 μ L,室温下反应 1.5h,透析过夜后分装,-20℃保存。

[0244] 在本实施例中,PBS 缓冲液的配方为:0.2mol/L 的 Na₂HPO₄81ml 加 0.2mol/L 的 NaH₂PO₄19ml 混合而成。

[0245] 硼酸盐缓冲液的配方为:0.05mol/L 硼砂 80ml,加 0.2mol/L 硼酸 20ml 混合而成。

[0246] 2. 免疫动物制备单克隆抗体：

[0247] 2. 1. 取上述制备的 PGI 抗原 (1)、PGI 抗原 (2)、PGII 抗原 (3) 和 PGII 抗原 (4) (免疫原) 分别与等体积的弗氏完全佐剂(购自上海源聚生物公司)充分混合后,分别单独免疫 Balb/c 小鼠,50 μ g 抗原 / 只,皮下多点注射。4 周后测血清效价,选择免疫反应性好的小鼠再加强免疫:取抗原与等体积的弗氏不完全佐剂充分混合后,抗原剂量 25 μ g / 只,皮下多点注射,加强免疫的次数为 6 次,融合前连续加强免疫两次,之后取脾细胞与 Sp2/0 骨髓瘤细胞按常规方法用 50%PEG (MW4000) (购自中原化工公司)介导进行融合,并用 HAT 条件培养基(购自 sigma 公司)选择培养。融合后放入 CO₂ 培养箱中 37°C 培养 9 ~ 11 天后,孔内出现较大的细胞克隆。11 天开始用间接 ELISA 进行筛选。对初筛阳性的孔利用有限稀释法进行 4 次克隆化培养(即使筛选后的细胞大量分裂繁殖),之后扩增细胞、冻存、制备腹水。

[0248] 2. 2. 将 Balb/c 小鼠用降植烷(购自 sigma 公司) 0.5ml / 只处理,一周后腹腔接种杂交瘤细胞 2×10^6 个 / 只,10 天后收集腹水。

[0249] 2. 3. 测定抗体效价:用间接 ELISA 方法测定利用 PGI 抗原 (1) 制备的单克隆抗体 (1) 的效价,结果显示单抗的效价达到 1:32000 以上。

[0250] 利用 PGI 抗原 (2) 制备的单克隆抗体 (2)、利用 PGII 抗原 (3) 制备的单克隆抗体 (3) 以及利用 PGII 抗原 (4) 制备的单克隆抗体 (4) 的效价也利用相同的方法进行测定,其效价也均达到 1:32000 以上。

[0251] 3. 免疫动物制备多克隆抗体：

[0252] 3. 1. 选用三个月龄、体重约为 2kg 左右的新西兰白兔作为免疫动物。基础免疫中,将 1-2mg 上述制备的 PGI 抗原 (1)、PGI 抗原 (2)、PGII 抗原 (3) 和 PGII 抗原 (4) (免疫原) 分别与等体积的弗氏完全佐剂混合 - 充分乳化后分别单独在兔子背部进行多点皮下注射。每隔 4 周加强免疫一次,抗原与不完全弗氏佐剂充分乳化后,以 100 μ g / 只于背部多点皮下注射。末次加强免疫后第 10 天颈动脉放血,分离血清。

[0253] 3. 2. 测定抗体效价:用间接 ELISA 法测定利用 PGI 抗原 (1) 制备的多克隆抗体 (1) 的效价,结果显示抗体效价达到 1:16000 以上。

[0254] 利用 PGI 抗原 (2) 制备的多克隆抗体 (2)、利用 PGII 抗原 (3) 制备的多克隆抗体 (3) 以及利用 PGII 抗原 (4) 制备的多克隆抗体 (4) 的效价也利用相同的方法进行测定,其效价也均达到 1:16000 以上。

[0255] 3. 3. 取血及分离血清:颈动脉插管取血,分离血清。

[0256] 4. 分离纯化抗体:硫酸铵沉淀后,再经 Protein G (购自 sigma 公司)亲和纯化。

[0257] 5. 抗体分装后冻干,低温保存。

[0258] 实施例 3:人 PGI 单克隆抗体 (1) 和 (2) 以及人 PGII 单克隆抗体 (3) 和 (4) 的特异性鉴定

[0259] 以 ELISA 进行检测。分别以人 PGI 蛋白和 PGII 蛋白(均购自上海桂康公司)为检测抗原包被 ELISA 板,通过 ELISA 分别检测所制备的 PGI 单克隆抗体 (1) 和 (2) 的特异性反应,以及所制备的 PGII 单克隆抗体 (3) 和 (4) 的特异性反应,以正常 BALB/c 小鼠血清作阴性对照,PBS 液作空白对照。

[0260] 结果:PGI 单克隆抗体 (1) 和 (2) 分别只与 PGI 反应为阳性 ($P/N > 2.1$),而与 PGII 反应为阴性,说明本发明的 PGI 单克隆抗体 (1) 和 (2) 分别具有特异性。

[0261] PGII 单克隆抗体 (3) 和 (4) 分别只与 PGII 反应为阳性 ($P/N > 2.1$), 而与 PGI 反应为阴性, 说明本发明的 PGII 单克隆抗体 (3) 和 (4) 分别具有特异性。

[0262] 实施例 4: 人 PGI 多克隆抗体 (1) 和 (2) 以及人 PGII 多克隆抗体 (3) 和 (4) 的特异性鉴定

[0263] 利用与上述鉴定单克隆抗体特异性相同的方法进行鉴定。

[0264] 结果显示: PGI 多克隆抗体 (1) 和 (2) 分别与 PGI 反应为阳性 ($P/N > 2.1$), 而与 PGII 反应为阴性, 说明本发明的 PGI 多克隆抗体 (1) 和 (2) 分别具有特异性。

[0265] PGII 多克隆抗体 (3) 和 (4) 分别与 PGII 反应为阳性 ($P/N > 2.1$), 而与 PGI 反应为阴性, 说明本发明的 PGII 多克隆抗体 (3) 和 (4) 分别具有特异性。

[0266] 实施例 5: 利用 PGI 单克隆抗体和 PGI 多克隆抗体制备 PGI 体外诊断试剂盒。

[0267] 在本实施例中, 将实施例 2 中利用 PGI 抗原表位肽 (1) 制备的单克隆抗体 (1) 作为本试剂盒中的包被抗体; 将实施例 2 中利用 PGI 抗原表位肽 (2) 制备的多克隆抗体 (2) 作为结合抗体。

[0268] PGI 体外诊断试剂盒的制备和操作如下:

[0269] 1. 各种缓冲液及试剂的配制:

[0270] A、包被缓冲液: 0.050M、pH9.6 的 CB (碳酸盐缓冲液)

[0271] Na_2CO_3 : 16.0 克

[0272] NaHCO_3 : 29.0 克

[0273] 蒸馏水溶至 1000ml

[0274] B、样品 / 洗涤缓冲液: pH7.2 的 10×PBS-Tween20

[0275] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 58 克

[0276] KH_2PO_4 : 4 克

[0277] NaCl : 100 克

[0278] KCl : 4 克

[0279] 蒸馏水溶至 1000ml

[0280] 加 Tween20: 20ml

[0281] C、酶标记物稀释液:

[0282] 10×PBS-Tween20: 10ml

[0283] FCS (小牛血清): 20ml

[0284] 蒸馏水溶至 1000ml

[0285] 酶稳定剂 (可购自上海西宝公司): 1 克

[0286] 生物防腐剂 (可购自上海西宝公司): 1ml

[0287] D、显色剂 A:

[0288] 柠檬酸: 35.5 克

[0289] 过氧化脲: 10 克

[0290] 蒸馏水溶至 1000ml

[0291] Tween20: 10ml

[0292] E、显色剂 B:

[0293] 柠檬酸: 120 克

[0294] EDTA-2Na :1 克

[0295] TMB • 2HCl :2 克

[0296] 蒸馏水溶至 1000ml

[0297] F、终止液 :2M H₂SO₄

[0298] 浓硫酸(95-98%) :22. 2ml

[0299] 蒸馏水 :177. 3ml

[0300] 配时将浓硫酸缓慢滴入蒸馏水中,边加边摇匀。

[0301] 2. 预包被板的制备 :

[0302] 将 PGI 单克隆抗体 (1) 溶于 pH=9. 6 的 0. 05M 的碳酸盐缓冲液中,制成预包被液,在酶标板(可购自深圳金灿华公司)上每孔按 0. 1 μ g/ 孔加入 100 μ l,置 4℃放置 18-24 小时,取出,甩掉包被液,洗涤,经 BSA 封闭 16 小时、过夜干燥后装入铝铂袋中抽真空密封,并置于 4℃保存。

[0303] 3. 结合抗体(PGI 多克隆抗体 (2)) 和酶联物(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体(购自北京中杉金桥公司)) 的稀释比例均由方阵滴定实验确定。

[0304] 4. 试剂盒的组成 :

[0305] 预包被板 :48/96 孔

[0306] PGI 校准品(原料购自上海桂康公司):6 个 :6×1. 0ml (浓度分别为 0ng/ml、20ng/ml、40ng/ml、80ng/ml、160ng/ml、320ng/ml)

[0307] PGI 结合抗体 :1×10ml (经 1:5000 稀释)

[0308] 酶联物 :1×10ml (经 1:5000 稀释)

[0309] 浓缩洗涤液 (25×PBS-Tween20) :1×20ml

[0310] 显色剂 A :1×6. 0ml

[0311] 显色剂 B :1×6. 0ml

[0312] 终止液 :1×6. 0ml

[0313] 5. 试剂盒的操作步骤 :

[0314] 在预包被板的各孔中分别加入待检血样以及标准品 100 μ l/ 孔,均为双孔,37℃孵育 60 分钟,用 1× 洗涤缓冲液洗涤 5 次,拍干。在各孔内加入 PGI 结合抗体 100 μ l/ 孔,37℃孵育 30 分钟,用 1× 洗涤缓冲液洗涤 5 次,拍干。再在各孔内加入酶联物 100 μ l/ 孔,37℃孵育 30 分钟,用 1× 洗涤缓冲液洗涤 5 次,拍干。加入显色剂 A、B 液,每孔各 50 μ l,混匀,37℃孵育 15 分钟。加终止液 50 μ l/ 孔终止反应,用酶联检测仪(型号 RT-6000,可购自雷杜公司)用双波长(450nm、620nm) 检测吸光度。

[0315] 6. 结果判定 :

[0316] 1. 利用本发明的试剂盒进行血清 PGI 检测

[0317] 表 1 :标准品浓度和对应的平均吸光度(OD) 值

[0318]

浓度 ng/ml	0	20	40	80	160	320
平均 OD 值	0. 068	0. 143	0. 320	0. 585	1. 023	1. 867

[0319] 以标准品浓度和对应吸光度绘制标准曲线,标准曲线的 R²=0. 997。

[0320] 根据标准曲线计算所检测的标本中的 PGI 浓度结果。

[0321] 对 28 例浅表性胃炎病人、30 例萎缩性胃炎病人、34 例胃癌病人和 70 例健康者按上述方式进行血清 PGI 检测,检测结果见表 2。

[0322] 表 2 :四组样本 PGI 浓度比较

	组别	人数	PGI 浓度均值(ng/ml)
	浅表性胃炎	28	243 ± 41.7
[0323]	萎缩性胃炎	30	47.6 ± 12.7
	胃癌	34	35.7 ± 11.8
	对照组	70	140 ± 54.2

[0324] 表 2 结果表明,各组间的差异有统计学意义($P < 0.01$),可与临床检测结果对应。

[0325] 2. 本发明试剂盒的检测方法与已知的检测 PGI 的 ELISA 试剂盒的检测结果的相关性分析

[0326] 利用 DRG 试剂盒(DRG® Human Pepsinogen I ELISA,购自 ALPCO Diagnostics 公司)和本发明的试剂盒分别检测同样的 50 份血样(其中包括浅表性胃炎患者血样、萎缩性胃炎患者血样和胃癌患者血样)。以 DRG 试剂盒的测定值为横坐标、以本发明试剂盒的测定值为纵坐标,建立直线方程计算相关系数。

[0327] 对两种试剂盒的结果进行配对 t 检验,判断两者定量结果是否有显著差异。

[0328] 如图 2 所示,本发明试剂盒与 DRG 试剂盒的测定值的相关系数 $R^2 = 0.997$,相关方程为 $y = 0.9968x + 0.0144$,其中 y 代表本发明试剂盒的测定值, x 代表 DRG 试剂盒的测定值。由图 2 可知,本发明试剂盒的测定值与 DRG 试剂盒的测定值的相关性良好。

[0329] 对两种试剂盒的测定值用配对 t 检验进行统计学处理,得到 $|t| = 0.996$, $v = n - 1 = 49$,查 t 界值表得 $P > 0.05$ 。该结果表明两种试剂盒的检测结果无显著差异,说明本发明试剂盒的测定值与 DRG 试剂盒的测定值的相关性良好,从而本发明的试剂盒可信度高,并且可进一步用于 PGI/PGII 联合检测。

[0330] 实施例 6 :利用 PGII 单克隆抗体和 PGII 多克隆抗体制备 PGII 体外诊断试剂盒。

[0331] 在本实施例中,将实施例 2 中利用 PGII 抗原表位肽 (3) 制备的单克隆抗体 (3) 作为本试剂盒中的包被抗体 ;将实施例 2 中利用 PGII 抗原表位肽 (4) 制备的多克隆抗体 (4) 作为结合抗体。

[0332] PGII 体外诊断试剂盒的制备和操作如下 :

[0333] 1. 各种缓冲液及试剂的配制 :

[0334] A、包被缓冲液 :0.050M、pH9.6 的 CB (碳酸盐缓冲液)

[0335] Na_2CO_3 :16.0 克

[0336] NaHCO_3 :29.0 克

[0337] 蒸馏水溶至 1000ml

[0338] B、样品 / 洗涤缓冲液 :pH7.2 的 $10 \times \text{PBS-Tween20}$

[0339] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$:58 克

[0340] KH_2PO_4 :4 克

- [0341] NaCl :100 克
- [0342] KCl :4 克
- [0343] 蒸馏水溶至 1000ml
- [0344] 加 Tween20 :20ml
- [0345] C、酶标记物稀释液 :
- [0346] 10×PBS-Tween20 :10ml
- [0347] FCS (小牛血清) :20ml
- [0348] 蒸馏水溶至 1000ml
- [0349] 酶稳定剂(可购自上海西宝公司) :1 克
- [0350] 生物防腐剂(可购自上海西宝公司) :1ml
- [0351] D、显色剂 A :
- [0352] 柠檬酸 :35.5 克
- [0353] 过氧化脲 :10 克
- [0354] 蒸馏水溶至 1000ml
- [0355] Tween20 :10ml
- [0356] E、显色剂 B :
- [0357] 柠檬酸 :120 克
- [0358] EDTA-2Na :1 克
- [0359] TMB • 2HCl :2 克
- [0360] 蒸馏水溶至 1000ml
- [0361] F、终止液 :2M H₂SO₄
- [0362] 浓硫酸(95-98%) :22.2ml
- [0363] 蒸馏水 :177.3ml
- [0364] 配时将浓硫酸缓慢滴入蒸馏水中,边加边摇匀。
- [0365] 2. 预包被板的制备 :
- [0366] 将 PGII 单克隆抗体 (3) 溶于 pH=9.6 的 0.05M 的碳酸盐缓冲液中,制成预包被液,在酶标板(可购自深圳金灿华公司)上每孔按 0.1 μg/孔加入 100 μl,置 4℃放置 18-24 小时,取出,甩掉包被液,洗涤,经 BSA 封闭 16 小时、过夜干燥后装入铝铂袋中抽真空密封,并置于 4℃保存。
- [0367] 3. 结合抗体(PGII 多克隆抗体 (4))和酶联物(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体(购自北京中杉金桥公司))的稀释比例均由方阵滴定实验确定。
- [0368] 4. 试剂盒的组成 :
- [0369] 预包被板 :48/96 孔
- [0370] PGII 校准品(原料购自上海桂康公司):6 个 :6×1.0ml (浓度分别为 0ng/ml、2ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml)
- [0371] PGII 结合抗体 :1×10ml (经 1:4000 稀释)
- [0372] 酶联物 :1×10ml (经 1:5000 稀释)
- [0373] 浓缩洗涤液(25×PBS-Tween20) :1×20ml
- [0374] 显色剂 A :1×6.0ml

[0375] 显色剂 B :1×6.0ml

[0376] 终止液 :1×6.0ml

[0377] 5. 试剂盒的操作步骤 :

[0378] 在预包被板的各孔中分别加入待检血样以及标准品 100 μ l/ 孔, 均为双孔, 37℃ 孵育 60 分钟, 用 1× 洗涤缓冲液洗涤 5 次, 拍干。在各孔内加入 PGII 结合抗体 100 μ l/ 孔, 37℃ 孵育 30 分钟, 用 1× 洗涤缓冲液洗涤 5 次, 拍干。再在各孔内加入酶联物 100 μ l/ 孔, 37℃ 孵育 30 分钟, 用 1× 洗涤缓冲液洗涤 5 次, 拍干。加入显色剂 A、B 液, 每孔各 50 μ l, 混匀, 37℃ 孵育 15 分钟。加终止液 50 μ l/ 孔终止反应, 用酶联检测仪 (型号 RT-6000, 可购自雷杜公司) 用双波长 (450nm、620nm) 检测吸光度。

[0379] 6. 结果判定 :

[0380] 1. 利用本发明的试剂盒进行血清 PGII 检测

[0381] 表 3 :标准品浓度和对应的平均吸光度 (OD) 值

[0382]

浓度 ng/ml	0	2	5	10	25	50
平均 OD 值	0.058	0.158	0.304	0.550	1.022	1.789

[0383] 以标准品浓度和对应吸光度绘制标准曲线, 标准曲线的 $R^2=0.992$ 。

[0384] 根据标准曲线计算所检测的标本中的 PGII 浓度结果。

[0385] 对 20 例胃溃疡病人、30 例萎缩性胃炎病人、34 例胃癌病人和 70 例健康者按上述方式进行血清 PGII 检测, 检测结果见表 4。

[0386] 表 4 :各组样本 PGII 浓度比较

组别	人数	PGII 浓度均值 (ng/ml)
胃溃疡	20	28.1±14.8
萎缩性胃炎	30	23.6±12.2
胃癌	34	20.4±8.7
对照组	70	22.8±9.5

[0388] 表 4 结果表明, 各组间的检测值差异不明显, 可与临床检测结果对应。

[0389] 2. 本发明试剂盒的检测方法与已知的检测 PGII 的 ELISA 试剂盒的检测结果的的相关性分析

[0390] 利用 DRG 试剂盒 (DRG® Human Pepsinogen II ELISA, 购自 ALPCO Diagnostics 公司) 和本发明的试剂盒分别检测同样的 50 份血样 (其中包括胃溃疡患者血样、萎缩性胃炎患者血样和胃癌患者血样)。以 DRG 试剂盒的测定值为横坐标、以本发明试剂盒的测定值为纵坐标, 建立直线方程计算相关系数。

[0391] 对两种试剂盒的结果进行配对 t 检验, 判断两者定量结果是否有显著差异。

[0392] 如图 3 所示, 本发明试剂盒与 DRG 试剂盒的测定值的相关系数 $R^2 = 0.997$, 相关方

程为 $y=1.0159x-0.488$, 其中 y 代表本发明试剂盒的测定值, x 代表 DRG 试剂盒的测定值。由图 3 可知, 本发明试剂盒的测定值与 DRG 试剂盒的测定值的相关性良好。

[0393] 对两种试剂盒的测定值用配对 t 检验进行统计学处理, 得到 $|t|=1.626$, $v=n-1=49$, 查 t 界值表得 $P>0.05$ 。该结果表明两种试剂盒的检测结果显示无显著差异, 说明本发明试剂盒的测定值与 DRG 试剂盒的测定值的相关性良好, 从而本发明的试剂盒可信度高, 并且可进一步用于 PGI/PGII 联合检测。

[0394] 实施例 7: 联合检测人 PGI 蛋白和人 PGII 蛋白的荧光免疫层析试纸的制备。

[0395] 一、标记有荧光微球的单克隆抗体的制备及包被结合垫

[0396] 1、标记有荧光微球的单克隆抗体的制备

[0397] 1.1、荧光微球的活化:

[0398] 取 $500\ \mu\text{l}$ 、含量 $1(\text{w/v})\%$ 的荧光微球(购自广州格瑞林公司)水分散液, 在 10°C 下, 以 12000rpm 离心 10 分钟, 去上清, 将沉淀物分散到 $500\ \mu\text{l}$ 的蒸馏水或初洗缓冲液 (0.1M 的 MES 水溶液) 中, 超声波 (240W) 处理 2 分钟, 重复以上过程三次, 加入碳二亚胺(购自上海晶纯公司) 50mg , 搅拌 15 分钟, 从而活化所述荧光微球。

[0399] 1.2、用活化好的荧光微球标记抗体:

[0400] 将活化好的荧光微球在 12000rpm 下离心 10 分钟, 去上清, 将沉淀物分散到 1ml 偶联缓冲液 (50mM 的 N -羟基琥珀酰亚胺的柠檬酸缓冲液) 中, 超声波 (240W) 处理 2 分钟, 重复以上过程三次, 获得分散有荧光微球的缓冲液 1ml 。按照 $3\ \mu\text{l}$ 抗体 ($10\text{mg}/\text{ml}$) / $100\ \mu\text{l}$ 活化好的荧光微球的比例, 向其中加入按实施例 2 制备的 PGI 单克隆抗体 (1), 在常温下搅拌 2 小时, 加入 1ml 封闭缓冲液 ($1(\text{w/v})\%$ BSA- 0.05M 乙醇胺), 继续搅拌 1 小时, 之后, 在 12000rpm 下离心 10 分钟, 重复离心 3 次, 将沉淀物分散到 $500\ \mu\text{l}$ 终洗缓冲液 ($0.5(\text{w/v})\%$ BSA- $0.11(\text{v/v})\%$ 吐温水溶液) 中, 超声波 (240W) 处理 2 分钟, 用上述终洗缓冲液定容至 $500\ \mu\text{l}$ 。

[0401] 按照相同的方法利用活化好的荧光微球标记按实施例 2 制备的 PGII 单克隆抗体 (3)。

[0402] 2、包被结合垫

[0403] 将上述制备的标记有荧光微球的 PGI 单克隆抗体 (1) 和标记有荧光微球的 PGII 单克隆抗体 (3) 分别用抗体稀释液 ($1(\text{w/v})\%$ BSA- 0.01M PBS ($\text{pH}7.2$) 缓冲液) 稀释至 $1\text{mg}/\text{ml}$, 获得工作液, 然后用微量移液器(购自 lab systems 公司)按 $4\ \mu\text{l}/\text{cm}$ 的量分别均匀喷涂在结合垫上, 之后用 37°C 烘箱烘干, 在 45% 湿度下保存备用。

[0404] 二、反应膜的制备

[0405] 按照实施例 2 制备的 PGI 单克隆抗体 (2) 和 PGII 单克隆抗体 (4)、以及羊抗鼠 IgG 单克隆抗体(购自北京中杉金桥公司)用 50mM $\text{pH}7.2$ 的 PBS 缓冲液分别稀释至 $1\text{mg}/\text{ml}$, 将喷金机(购自杭州峰杭公司)的第一检测线与第二检测线间隔参数设置为 3mm , 并且将第二检测线与质控线间隔参数设置为 5mm , 将包被量分别设置为 $1.0\ \mu\text{l}/\text{cm}$, 用喷金机在硝酸纤维素膜上划上 PGI 单克隆抗体 (2)、PGII 单克隆抗体 (4) 和羊抗鼠 IgG 单克隆抗体, 常温晾干备用。

[0406] 三、试纸的组装和切割

[0407] 在底板上依次相互搭接粘贴样品垫、结合垫、反应膜和吸水滤纸, 得到试纸板, 将

其切割成宽度为 5mm 的试纸条。

[0408] 四、PGI 荧光免疫检测卡的制备：

[0409] 将上述切割好的试纸固定在塑料底卡上，试纸表面用面卡压紧，面卡在试纸条的样品垫和反应膜的位置上开有加样孔和观察窗。检测卡组装好后装入铝箔袋中，加入干燥剂封口保存，室温干燥条件下可以保存一年以上。

[0410] 五、样品的检测

[0411] 绘制 PGI 的标准曲线：PGI 标准品(购自上海桂康公司)用样品稀释液(1%(w/v) BSA-0.01M PBS (pH7.2) 缓冲液)配制成如下系列浓度的校准品：400ng/ml、200ng/ml、100ng/ml、50ng/ml、20ng/ml、10ng/ml、0ng/ml，将 50 μ l 以上校准品分别滴加到加样孔上，10 分钟后用荧光检测仪(购自深圳市安群生物工程有限公司，型号 AQ-3000)检测，可在第一检测线和质控线位置上采集到荧光。以样品浓度为横坐标，第一检测线与质控线处的荧光强度的比值为纵坐标绘制校准曲线， R^2 为 0.996。质控线用于试纸有效性判断以及对检测线信号作相应校正，如质控线未出现条带，则说明试纸失效。

[0412] 绘制 PGII 的标准曲线：按照与上述相同的方法绘制 PGII 的标准曲线，其中，PGII 标准品(购自上海桂康公司)用样品稀释液(1%(w/v) BSA-0.01M PBS (pH7.2) 缓冲液)配制成如下系列浓度的校准品：50ng/ml、20ng/ml、10ng/ml、5ng/ml、2ng/ml、1ng/ml、0ng/ml，将 50 μ l 以上校准品分别滴加到加样孔上。以样品浓度为横坐标，第二检测线与质控线处的荧光强度的比值为纵坐标绘制校准曲线， R^2 为 0.994。

[0413] 取 50 μ l 的待检血样，滴加到加样孔上，10 分钟后用荧光检测仪检测，如果第一和第二检测线出现条带，说明样品中含 PGI 和 PGII，其浓度可依据校准曲线获得。

[0414] 六、联合检测 PGI 和 PGII 荧光免疫试纸性能评价

[0415] 1. 评价试纸性能的指标

[0416] 1) 线性范围：分别对上述 PGI 各浓度校准品和上述 PGII 各浓度校准品重复检测 3 次，分别绘制校准曲线，经数据拟合和统计分析，本发明试纸的 PGI 线性检测范围为 5ng/ml-400ng/ml；PGII 线性检测范围为 0.1ng/ml-50ng/ml。

[0417] 2) 最低检出限：分别将 PGI 零值血样(无 PGI 成分)(购自深圳中原公司)和 PGII 零值血样(无 PGII 成分)(购自深圳中原公司)分成 20 份分别进行检测，分别计算浓度平均值和 2 倍标准差之和，得本发明试纸 PGI 最低检测限为 3.1ng/ml；PGII 最低检测限为 0.05ng/ml。

[0418] 3) 精密度：

[0419] 1) 用本发明的 PGI 荧光免疫试纸分别检测 PGI 浓度分别为 300ng/ml、100ng/ml、30ng/ml 的血样，重复检测 10 次，进行批内精密度测定。每天对上述 3 个浓度的样本进行测试，1 天 1 次，连续测 20 天，进行批间精密度测定，结果如下表 5 所示：

[0420] 表 5

	批内精密度结果			批间精密度结果		
	300	100	30	300	100	30
[0421] 浓度 (ng/ml)	300	100	30	300	100	30
检测带和质控带荧光信号强度比的平均值	7.53	3.23	0.826	7.24	3.05	0.759
标准差 SD	0.34	0.12	0.06	0.43	0.15	0.5
CV (%)	4.6%	3.7%	7.2%	5.9%	4.8%	6.6%

[0422] 批内 CV (变异系数) 和批间 CV 均小于 8%, 说明该试剂精密性良好。

[0423] 此外, 由上表可知, 本试纸检测 PGI 的线性范围宽、灵敏度好。

[0424] II) 用本发明的 PGII 荧光免疫试纸分别检测 PGII 浓度分别为 40ng/ml、15ng/ml、2ng/ml 的血样, 重复检测 10 次, 进行批内精密度测定。每天对上述 3 个浓度的样本进行测定, 1 天 1 次, 连续测 20 天, 进行批间精密度测定, 结果如下表 6 所示:

[0425] 表 6

	批内精密度结果			批间精密度结果		
	40	15	2	40	15	2
[0426] 浓度 (ng/ml)	40	15	2	40	15	2
检测带和质控带荧光信号强度比的平均值	8.23	3.25	0.756	7.86	3.02	0.689
标准差 SD	0.31	0.14	0.04	0.51	0.17	0.05
CV (%)	3.8%	4.3%	5.3%	6.5%	5.6%	7.2%

[0427] 批内 CV (变异系数) 和批间 CV 均小于 8%, 说明该试剂精密性良好。

[0428] 此外, 由上表可知, 本试纸检测 PGII 的线性范围宽、灵敏度好。

[0429] 2. 试纸特异性评价

[0430] 取上述高浓度的 PGII (50ng/ml) 校准品滴加到加样孔上, 10 分钟后用荧光检测仪检测。结果仅第二检测线出现条带。

[0431] 另取上述高浓度的 PGI (400ng/ml) 校准品滴加到加样孔上, 10 分钟后用荧光检测仪检测。结果仅第一检测线出现条带。

[0432] 上述结果说明本试纸特异性良好, PGI 和 PGII 不互相干扰。

[0433] 3. 检测血液样品

[0434] 按照上文所述的样品检测方法绘制 PGI 标准曲线和 PGII 标准曲线, 然后取胃癌病人的待检血样 50 μ l 滴加到加样孔上, 10 分钟后用荧光检测仪检测。结果第一和第二检测线出现条带, 说明样品中含 PGI 和 PGII, 其浓度可依据校准曲线获得。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 朱建安

<120> 联合检测人PGI蛋白和人PGII蛋白的荧光免疫层析试纸及制法

<130> FI-131377-59:58/C

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Tyr Lys Val Pro Leu Ile Arg Lys Lys Ser Leu Arg Arg
 1 5 10

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Tyr Lys Asn Phe Thr Val Phe Asp Arg Ala Asn Asn Gln
 1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 3

Lys Lys Phe Lys Ser Ile Arg Glu Thr Tyr
 1 5 10

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 4

Tyr Thr Pro Ser Arg Ala Ala Pro Pro Ser Ser Thr Leu Gln Leu Pro
 1 5 10 15

Glu Lys

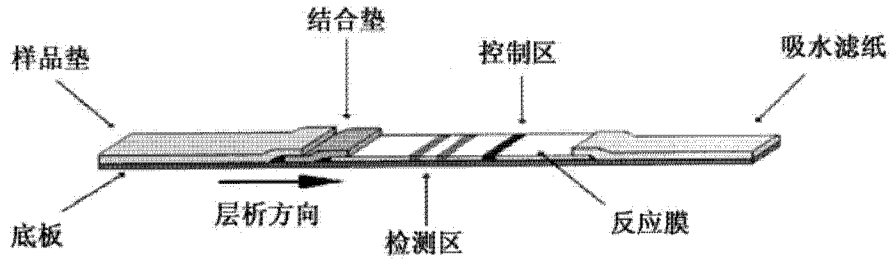


图 1

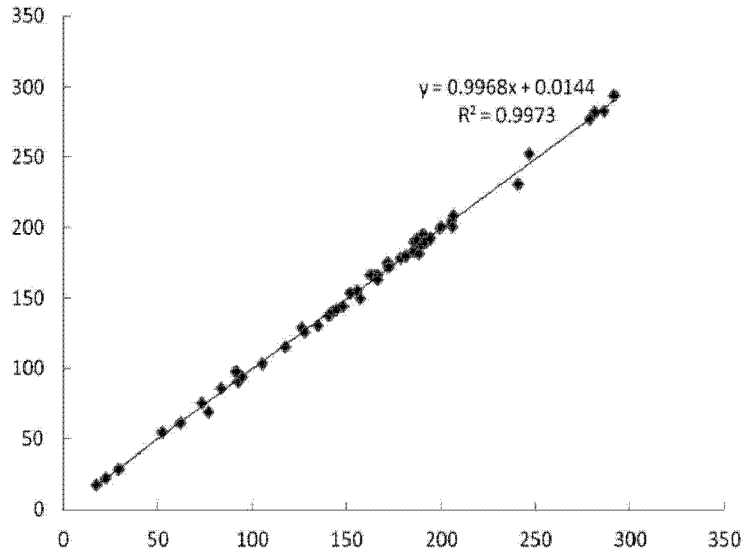


图 2

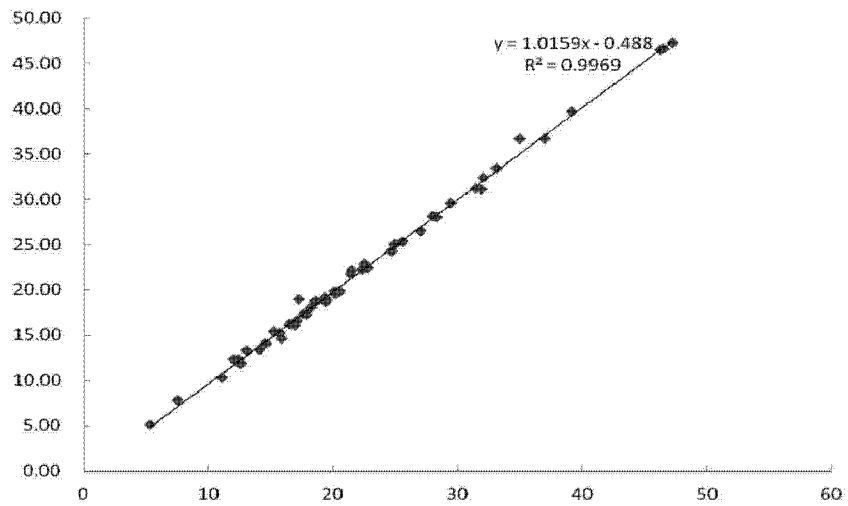


图 3

专利名称(译)	联合检测人PGI蛋白和人PGII蛋白的荧光免疫层析试纸及制法		
公开(公告)号	CN104422775A	公开(公告)日	2015-03-18
申请号	CN201310370383.7	申请日	2013-08-22
[标]申请(专利权)人(译)	朱建安		
申请(专利权)人(译)	朱建安		
当前申请(专利权)人(译)	朱建安		
[标]发明人	朱建安		
发明人	朱建安		
IPC分类号	G01N33/68 G01N21/64 G01N33/531 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/533 G01N33/57446 G01N33/68		
代理人(译)	丁业平 张天舒		
其他公开文献	CN104422775B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及联合检测人PGI蛋白和人PGII蛋白的荧光免疫层析试纸及制法。所述试纸通过双抗体夹心法检测人PGI蛋白和人PGII蛋白，所述双抗体夹心法所采用的捕获抗体分别为来源于序列列表序列1和序列2中的一者的第一PGI单克隆抗体和来源于序列列表序列3和序列4中的一者的第一PGII单克隆抗体；并且所述双抗体夹心法所采用的检测抗体分别为来源于序列列表序列1和序列2中的另一者的第二PGI单克隆抗体和来源于序列列表序列3和序列4中的另一者的第二PGII单克隆抗体。本发明的荧光免疫层析试纸操作简便、快速、检测范围宽、特异性高、灵敏度好。

