



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108414742 A

(43)申请公布日 2018.08.17

(21)申请号 201810123351.X

(22)申请日 2018.02.07

(71)申请人 上海铭源数康生物芯片有限公司

地址 201403 上海市奉贤区现代农业园区
汇丰北路699号

(72)发明人 李亨芬 季海鹏 施晓燕 唐博
柳飞舟

(74)专利代理机构 上海天翔知识产权代理有限公司 31224

代理人 吕伴

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

权利要求书4页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II联合检测试剂盒及其制备方法和检测方法

(57)摘要

本发明公开了胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II联合检测试剂盒及其制备方法和检测方法,本发明在酶免疫分析基础上结合高灵敏度的化学发光检测技术,可在一个测试循环中同时完成PG I和PG II两项指标的检测,较单项指标逐一检测相比,即缩短了临床获得PG I/PG II检测结果的时间,而且整个反应检测过程采用通用试剂,大大的降低了检测成本,其次配套使用Hamilton全自动检测分析仪器,从加样到结果分析完全实现全自动化,极大的避免了人为操作因素的干扰,缩短了加样等系列操作时间和误差,可重复性强,使得检测更快速、结果更加稳定可靠。

1. 一种胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒,其特征在于,包含:

(1)同时包被有抗PG I和抗PG II单克隆抗体的酶联板;(2)标记有另一株抗PG I和另一株抗PG II单克隆抗体的酶结合物;(3)PG复合校准品;(4)PG复合质控品;(5)必要的清洗液;(6)HRP底物液。

2.如权利要求1所述的一种胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒,其特征在于,所述同时包被有抗PG I和抗PG II单克隆抗体的酶联板是将PG I和PG II单克隆抗体按照点样方式分别以斑点状有序的包被固定在板孔中。

3.如权利要求2所述的一种胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒,其特征在于,所述将PG I和PG II单克隆抗体按照点样方式分别以斑点状有序的包被固定在板孔中所使用的点样缓冲液为0.01M的PBS缓冲液,所述0.01M的PBS缓冲液的pH值为6.0-8.0。

4.如权利要求3所述的一种胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒,其特征在于,所述0.01M的PBS缓冲液的pH值为7.4。

5.如权利要求2所述的一种胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒,其特征在于,所述将PG I和PG II单克隆抗体按照点样方式分别以斑点状有序的包被固定在板孔中所使用的PG I单克隆抗体的浓度为0.1-1.0mg/mL,PG II单克隆抗体的浓度为0.1-1.0mg/mL,点样时,所述PG I单克隆抗体上样量为2-10nL/点,所述PG II单克隆抗体上样量为2-10nL/点。

6.如权利要求2所述的一种胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒,其特征在于,所述将PG I和PG II单克隆抗体按照点样方式分别以斑点状有序的包被固定在板孔中所使用的点样后封闭缓冲液为含有保护蛋白的0.01M PBS缓冲液,所述含有保护蛋白的0.01M PBS缓冲液的pH值为6.0-8.0。

7.如权利要求6所述的一种胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒,其特征在于,所述含有保护蛋白的0.01M PBS缓冲液的pH值为7.4。

8.如权利要求6或7所述的一种胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒,其特征在于,所述保护蛋白为BSA、脱脂奶粉、明胶、酪蛋白中的一种活着任意两者以上的混合。

9.如权利要求1所述的一种胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒,其特征在于,所述标记有另一株抗PG I和另一株抗PG II单克隆抗体的酶结合物中使用的酶为辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶中的一种或两种的混合。

10.如权利要求9所述的一种胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒,其特征在于,所述标记有另一株抗PG I和另一株抗PG II单克隆抗体的酶结合物中使用的酶标记抗体稀释液由以下原料配制而成:0.05M Tris-HCl缓冲液,0.1-3%BSA,0.9-3%NaCl,0.01-1%蛋白酶保护剂AES,0.05-1%Tween-20,0.02-0.2%ProClin-300。

11.如权利要求1所述的一种胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒,其特征在于,所述PG复合校准品由PG I抗原和PG II抗原以及保护蛋白溶液配制而成。

12.如权利要求11所述的一种胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒,其特征在于,所述保护蛋白溶液中的保护蛋白为牛血清白蛋白、酪蛋白、动物血清中的一种或任意两种的混合。

13.如权利要求11所述的一种胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒,其特征在于,所述保护蛋白溶液的质量浓度为0.5-50%。

14.如权利要求1所述的一种胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒,其特征在于,所述PG复合校准品中的PG I抗原的工作浓度范围为0.5-200ng/mL;PG II抗原的工作浓度范围为

0.5-100ng/mL。

15. 如权利要求1所述的一种胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒,其特征在于,所述PG复合质控品中的PG I的浓度范围12.385-16.988ng/mL,PG II的浓度范围8.459-11.024ng/mL。

16. 如权利要求1所述的一种胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒,其特征在于,所述PG复合质控品中的PG I的浓度范围120.187-146.988ng/mL,PG II的浓度范围52.982-67.595ng/mL。

17. 权利要求1至16任一项权利要求所述的一种胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

- (1) 同时包被有抗PG I和抗PG II单克隆抗体的酶联板的制备步骤;
- (2) 标记有另一株抗PG I和另一株抗PG II单克隆抗体的酶结合物的制备步骤;
- (3) PG复合校准品制备步骤;
- (4) PG复合质控品制备步骤;
- (5) 胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒组装步骤。

18. 如权利要求17所述的制备方法,其特征在于,所述同时包被有抗PG I和抗PG II单克隆抗体的酶联板的制备步骤,包括如下步骤:

(1.1) 点样:用点样缓冲液分别调整PG I单克隆抗体和PG II单克隆抗体至0.1-1.0mg/mL,经GeSim Nano-Plotter™芯片点样系统分别吸取PG I抗体和PG II抗体溶液加至酶联板同一孔中,PG I和PG II各点三个重复点,每点上样量为2-10nL,按照斑点状有序排列;

(1.2) 固定:用覆板膜将酶联板孔覆盖,依次置于37℃3小时,-20℃过夜,再置于-80℃2小时进行抗体固定;

(1.3) 封闭:按照每孔200μL的量加入封闭液,4℃封闭过夜后控干,酶联板覆膜后,于4℃保存备用。

19. 如权利要求17所述的制备方法,其特征在于,所述标记有另一株抗PG I和另一株抗PG II单克隆抗体的酶结合物的制备步骤,包括如下步骤:

(2.1) 称取0.4mg的辣根过氧化物酶(HRP)溶于0.2M,pH5.6的醋酸盐缓冲液80μL,至酶浓度为5mg/mL;

(2.2) 加入22.4μL 0.1M的高碘酸钠,此时溶液由原棕色变为墨绿色,于4℃中避光反应25分钟;

(2.3) 加入2.5%的乙二醇溶液16μL,涡旋混匀,于4℃避光1小时终止反应;

(2.4) 取相应的抗体,按照HRP酶与抗体以1~3:1的质量比加入抗体溶液,用0.2M pH9.5的碳酸盐缓冲液调pH值至9.0~9.5,然后经0.01M碳酸盐缓冲液于4℃避光透析过夜;

(2.5) 向抗体-酶复合物溶液中加入24μL新鲜配置5mg/mL的NaBH₄溶液,涡旋混匀,室温避光反应3小时;

(2.6) 向抗体-酶复合物溶液中缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液,4℃静置2小时;

(2.7) 于冷冻离心机中8000rpm 4℃离心30分钟;

(2.8) 轻轻去除上清液,沉淀加少量0.01M pH7.4PBS溶解,于0.01M pH7.4PBS中透析过夜;

(2.9) 取出透析后的抗体-酶复合物溶液,于冷冻离心机中8000rpm 4℃离心5分钟,轻

轻取出上清液即为抗体-酶结合物,加入等体积甘油,涡旋混匀。

(2.10) 采用棋盘滴定法分别确定酶标记PG I抗体和酶标记PG II抗体的最佳工作浓度,用酶标抗体稀释液同时进行稀释,混匀即得到所述标记有另一株抗PG I和另一株抗PG II单克隆抗体的酶结合物,置于2-8℃保存。

20. 如权利要求17所述的制备方法,其特征在于,所述PG复合校准品制备步骤包括如下步骤:

(3.1) 用校准品稀释液稀释PG I和PG II纯品成为复合校准品,至PG I的工作浓度范围为0.5-200ng/mL;PG II的工作浓度范围为0.5-100ng/mL;

(3.2) 配置成PG复合校准品S0,S1~S7,其各复合校准品浓度设定参照下表1;

表1PG复合校准品浓度设定

复合校准品	PG I (ng/mL)	PG II (ng/mL)
S0	0	0
S1	0.996	0.49
S2	3.785	2.22
S3	8.59	5.41
S4	17.89	11.67
S5	46.663	24.87
S6	92.239	51.24
S7	180.077	101.52

21. 如权利要求17所述的制备方法,其特征在于,所述PG复合质控品制备步骤包括如下步骤:

(4.1) 用校准品稀释液稀释PG纯品,配制PG复合质控品,质控品测定值应在范围之内,PG复合质控品1中PG I的浓度范围12.385-16.988ng/mL,PG II的浓度范围8.459-11.024ng/mL;PG复合质控品2中PG I的浓度范围120.187-146.988ng/mL,PG II的浓度范围52.982-67.595ng/mL。

22. 利用权利要求1至16任一项权利要求所述的一种胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒对胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II进行联合检测的方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 在同时包被有抗PG I和抗PG II单克隆抗体的酶联板孔中加入50μL待测样品、50μLPG复合校准品和50μLPG复合质控品,37℃震荡混合反应10分钟;

2) 按照200μL/孔加入清洗液洗板,重复清洗四次;

3) 加入标记有另一株抗PG I和另一株抗PG II单克隆抗体的酶结合物,37℃震荡混合反应10分钟;

4) 按照200μL/孔加入清洗液洗板,重复清洗四次;

5) 加入HRP底物液显色,加入终止液后,1分钟内采用上海铭源数康生物芯片阅读仪进行CCD成像并采集光信号计数,分别绘制PG I和PG II标准曲线,根据标准曲线计算待测样

本中PG I和PG II具体含量,并同时获得PG I/PG II比值。

胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II联合检测试剂盒及其制备方法和检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于体外诊断试剂技术领域,具体涉及一种胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II联合检测方法及其试剂盒,尤其涉及该试剂盒的制备及测定方法。

背景技术

[0002] 胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,全世界胃癌死亡率高居常见恶性肿瘤死亡率的第二位。中国是胃癌的高发区,其发病率和病死率居各种恶性肿瘤之首。早发现、早诊断、早治疗是降低胃癌病死率的关键措施之一。目前胃癌和其他胃部疾病的诊断仍依靠胃镜和组织病理学来确诊,但胃镜检查有一定痛苦,往往不为患者所接受,容易导致延误诊断和治疗。近年来,血清胃蛋白酶原I (PGI) 和胃蛋白酶原II (PGII) 含量变化及其比值 (PGI/PGII) 与胃部疾病的关系以及其在胃癌早期诊断中的作用越来越引起人们的关注。

[0003] 胃蛋白酶原 (PG) 是胃液中胃蛋白酶 (蛋白水解酶) 的无活性前体,为一由375个氨基酸组成的蛋白多肽链,平均相对分子质量为42000,人胃黏膜中有7组胃蛋白酶同工酶原。根据生化性质、免疫原性、细胞来源及组织内分布可分为PGI、PG II 两个亚群,1-5组分免疫原性近似,称为PGI (PGA),主要由胃腺的主细胞的黏液颈细胞分泌;组分6-7被称为PG II (PGC),除由胃体和胃底粘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PG II,胃黏膜合成的PG II 约为总量的25%。胃几乎是PG的惟一来源,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原,只有少量PG (约1%) 透过胃黏膜毛细血管进入血液循环,故血清PGI和PG II 反映了胃黏膜不同部位的分泌功能。当胃黏膜发生病理变化时,血清PG含量也随之发生改变。胃液和血清PG水平与活组织病理变化结果常一致,因此,监测血清中PG的浓度可以作为监测胃黏膜状态的手段。胃底腺黏膜萎缩的过程中,分泌PGI的主细胞间减少,幽门腺细胞增多,从而造成PGI/PG II 的比值降低。因此PGI/PG II 可以作为胃底腺黏膜萎缩的指征,免疫学方法检测PGI和PG II 水平并结合PGI/PG II 可用于筛查胃底腺黏膜萎缩性疾病。如胃炎、胃癌等等有关。

[0004] 传统的PGI和PG II 的检测方法主要有化学发光法 (进口品牌有雅培公司,国产品牌有山东威海威高公司,河南美凯公司)、酶联免疫法 (进口的有芬兰必欧瀚公司)、免疫比浊法 (日本富士) 等。但是进口试剂比较昂贵,为患者造成一定经济负担;而国内传统的化学发光法主要检测方式为单一人份单一指标检测,获得PGI/PG II 检测结果时间长,也增加了检测成本;常规的酶联免疫法主要是依赖于纯手工加样检测,存在操作步骤繁琐、人为干扰因素较大,检测时间较长,检测结果误差大,费时费力等弊端。

[0005] 专利申请号201510091154.0公开了一种胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒,其特征在于包含已包被抗PGI和PG II 抗体的酶联板,酶标抗体稀释液、酶标抗体,还公开了该试剂盒的制备方法,其能够将PGI和PG II 两个项目整合到一个检测试剂盒,操作简单,检测快速,便于临床使用,与目前市场上同类产品相比,检测时间短,样本需求量少。

[0006] 专利申请号201610330619.8公开了一种胃蛋白酶原I或II测定试剂盒及其制备方法,其特征在于包含测包被了PGI/II单克隆抗体的PGI/II磁微粒及磁微粒保存液,标记有PGI/II抗体的示踪结合物以及示踪物稀释液,以及PGI/II校准品,其还公开了该试剂盒的制备方法。该试剂盒将化学发光技术于免疫磁微粒相结合,提供了一种接近均相的反应体系,与现有技术相比,该试剂盒具有更高的检测灵敏度,使用全自动仪器及配套试剂,使提高了方法的稳定性和结果的重复性,同时也使得批内差异与批间差异都较小。

[0007] 专利申请号201710471110.X公开了一种胃蛋白酶原、抗幽门螺杆菌抗体和胃泌素17检测方法及其试剂盒,其特征在于包含包被有荧光微球标记的PGI抗体、荧光微球标记的PGII抗体、荧光微球标记的第一幽门螺杆菌抗原以及荧光微球标记的胃泌素17抗体的第一包被膜和第二包被膜,其具有灵敏度高、特异性强、快速、简便、可客观化检测等优点。

发明内容

[0008] 本发明需要解决的技术问题之一在于提供一种胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II联合检测试剂盒。本发明在酶免疫分析基础上结合高灵敏度的化学发光检测技术,可在一个测试循环中同时完成PGI和PGII两项指标的检测,较单项指标逐一检测相比,缩短了临床获得PGI/PGII比值结果的时间,同时也大大的降低了检测成本,其次配套使用全自动分析仪器,极大的避免了人为操作因素的干扰,缩短了加样等系列操作时间和误差,可重复性强,使得检测更快速、结果更加稳定可靠。

[0009] 本发明需解决的技术问题之二在于提供上述胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II联合检测试剂盒的制备方法。

[0010] 本发明需解决的技术问题之三在于提供利用上述胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II联合检测试剂盒对胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II进行联合检测的方法。

[0011] 作为本发明第一方面的一种胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒,包含:(1)同时包被有抗PGI和抗PGII单克隆抗体的酶联板;(2)标记有另一株抗PGI和另一株抗PGII单克隆抗体的酶结合物;(3)PG复合校准品;(4)PG复合质控品;(5)必要的清洗液;(6)HRP底物液。

[0012] 在本发明的一个优选实施例中,所述同时包被有抗PGI和抗PGII单克隆抗体的酶联板是将PGI和PGII单克隆抗体按照点样方式分别以斑点状有序的包被固定在板孔中。

[0013] 在本发明的一个优选实施例中,所述将PGI和PGII单克隆抗体按照点样方式分别以斑点状有序的包被固定在板孔中所使用的点样缓冲液为0.01M的PBS缓冲液,所述0.01M的PBS缓冲液的pH值为6.0-8.0。

[0014] 在本发明的一个优选实施例中,所述0.01M的PBS缓冲液的pH值为7.4。

[0015] 在本发明的一个优选实施例中,所述将PGI和PGII单克隆抗体按照点样方式分别以斑点状有序的包被固定在板孔中所使用的PGI单克隆抗体的浓度为0.1-1.0mg/mL,PGII单克隆抗体的浓度为0.1-1.0mg/mL,点样时,所述PGI单克隆抗体上样量为2-10nL/点,所述PGII单克隆抗体上样量为2-10nL/点。

[0016] 在本发明的一个优选实施例中,所述将PGI和PGII单克隆抗体按照点样方式分别以斑点状有序的包被固定在板孔中所使用的点样后封闭缓冲液为含有保护蛋白的0.01M PBS缓冲液,所述含有保护蛋白的0.01M PBS缓冲液的pH值为6.0-8.0。

[0017] 在本发明的一个优选实施例中,所述含有保护蛋白的0.01M PBS缓冲液的pH值为

7.4。

[0018] 在本发明的一个优选实施例中,所述保护蛋白为BSA、脱脂奶粉、明胶、酪蛋白中的一种或着任意两者以上的混合。保护蛋白可以封闭酶联板孔中的未结合位点,降低非特异性吸附,极大的提高试剂盒检测灵敏度。

[0019] 在本发明的一个优选实施例中,所述标记有另一株抗PGI和另一株抗PG II 单克隆抗体的酶结合物中使用的酶为辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶中的一种或两种的混合。

[0020] 在本发明的一个优选实施例中,所述标记有另一株抗PGI和另一株抗PG II 单克隆抗体的酶结合物中使用的酶标记抗体稀释液由以下原料配制而成:0.05M Tris-HCl缓冲液,0.1-3%BSA,0.9-3%NaCl,0.01-1%蛋白酶保护剂AES,0.05-1%Tween-20,0.02-0.2%ProClin-300。

[0021] 在本发明的一个优选实施例中,所述PG复合校准品由PGI抗原和PG II 抗原以及保护蛋白溶液配制而成。

[0022] 在本发明的一个优选实施例中,所述保护蛋白溶液中的保护蛋白为牛血清白蛋白、酪蛋白、动物血清中的一种或任意两种的混合。保护蛋白可以提供良好的稳定反应环境,使抗原/抗体保持天然构象。

[0023] 在本发明的一个优选实施例中,所述保护蛋白溶液的质量浓度为0.5-50%。

[0024] 在本发明的一个优选实施例中,所述PG复合校准品中的PGI抗原的工作浓度范围为0.5-200ng/mL;PG II 抗原的工作浓度范围为0.5-100ng/mL。

[0025] 在本发明的一个优选实施例中,所述PG复合质控品中的PGI的浓度范围12.385-16.988ng/mL,PG II 的浓度范围8.459-11.024ng/mL。

[0026] 在本发明的一个优选实施例中,所述PG复合质控品中的PGI的浓度范围120.187-146.988ng/mL,PG II 的浓度范围52.982-67.595ng/mL。

[0027] 作为本发明第二方面的一种胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0028] (1)同时包被有抗PGI和抗PG II 单克隆抗体的酶联板的制备步骤;

[0029] (2)标记有另一株抗PGI和另一株抗PG II 单克隆抗体的酶结合物的制备步骤;

[0030] (3)PG复合校准品制备步骤;

[0031] (4)PG复合质控品制备步骤;

[0032] (5)胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒组装步骤。

[0033] 在本发明的一个优选实施例中,所述同时包被有抗PGI和抗PG II 单克隆抗体的酶联板的制备步骤,包括如下步骤:

[0034] (1.1)点样:用点样缓冲液分别调整PGI单克隆抗体和PG II 单克隆抗体至0.1-1.0mg/mL,经GeSim Nano-Plotter™芯片点样系统分别吸取PGI抗体和PG II 抗体溶液加至酶联板同一孔中,PGI和PG II 各点三个重复点,每点上样量为2-10nL,按照斑点状有序排列;

[0035] (1.2)固定:用覆板膜将酶联板孔覆盖,依次置于37℃3小时,-20℃过夜,再置于-80℃2小时进行抗体固定;

[0036] (1.3)封闭:按照每孔200uL的量加入封闭液,4℃封闭过夜后控干,酶联板覆膜后,于4℃保存备用。

[0037] 在本发明的一个优选实施例中,所述标记有另一株抗PGI和另一株抗PG II 单克隆

抗体的酶结合物的制备步骤,包括如下步骤:

[0038] (2.1) 称取0.4mg的辣根过氧化物酶 (HRP) 溶于0.2M, pH5.6的醋酸盐缓冲液80 μ L, 至酶浓度为5mg/mL;

[0039] (2.2) 加入22.4 μ L 0.1M的高碘酸钠,此时溶液由原棕色变为墨绿色,于4℃中避光反应25分钟;

[0040] (2.3) 加入2.5%的乙二醇溶液16 μ L,涡旋混匀,于4℃避光1小时终止反应;

[0041] (2.4) 取相应的抗体,按照HRP酶与抗体以1~3:1的质量比加入抗体溶液,用0.2M pH9.5的碳酸盐缓冲液调pH值至9.0~9.5,然后经0.01M碳酸盐缓冲液于4℃避光透析过夜;

[0042] (2.5) 向抗体-酶复合物溶液中加入24 μ L新鲜配置5mg/mL的NaBH₄溶液,涡旋混匀,室温避光反应3小时;

[0043] (2.6) 向抗体-酶复合物溶液中缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液,4℃静置2小时;

[0044] (2.7) 于冷冻离心机中8000rpm 4℃离心30分钟;

[0045] (2.8) 轻轻去除上清液,沉淀加少量0.01M pH7.4PBS溶解,于0.01M pH7.4PBS中透析过夜;

[0046] (2.9) 取出透析后的抗体-酶复合物溶液,于冷冻离心机中8000rpm 4℃离心5分钟,轻轻取出上清液即为抗体-酶结合物,加入等体积甘油,涡旋混匀。

[0047] (2.10) 采用棋盘滴定法分别确定酶标记PGI抗体和酶标记PG II 抗体的最佳工作浓度,用酶标抗体稀释液同时进行稀释,混匀即得到所述标记有另一株抗PGI和另一株抗PG II 单克隆抗体的酶结合物,置于2-8℃保存。

[0048] 在本发明的一个优选实施例中,所述PG复合校准品制备步骤包括如下步骤:

[0049] (3.1) 用校准品稀释液稀释PGI和PG II 纯品成为复合校准品,至PGI的工作浓度范围为0.5-200ng/mL;PG II 的工作浓度范围为0.5-100ng/mL;

[0050] (3.2) 配置成PG复合校准品S0,S1~S7,其各复合校准品浓度设定参照下表1;

[0051] 表1 PG复合校准品浓度设定

复合校准品	PG I (ng/mL)	PG II (ng/mL)
S0	0	0
S1	0.996	0.49
S2	3.785	2.22
S3	8.59	5.41
S4	17.89	11.67
S5	46.663	24.87
S6	92.239	51.24
S7	180.077	101.52

[0053] 在本发明的一个优选实施例中,所述PG复合质控品制备步骤包括如下步骤:

[0054] (4.1) 用校准品稀释液稀释PG纯品,配制PG复合质控品,质控品测定值应在范围之内,PG复合质控品1中PGI的浓度范围12.385-16.988ng/mL,PG II 的浓度范围8.459-11.024ng/mL;PG复合质控品2中PGI的浓度范围120.187-146.988ng/mL,PG II 的浓度范围52.982-67.595ng/mL。

[0055] 作为本发明第三方面的利用上述胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II联合检测试剂盒对胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II进行联合检测的方法,包括如下步骤:

[0056] 1) 在同时包被有抗PGI和抗PG II 单克隆抗体的酶联板孔中加入50μL待测样品、50μLPG复合校准品和50μLPG复合质控品,37℃震荡混合反应10分钟;

[0057] 2) 按照200μL/孔加入清洗液洗板,重复清洗四次;

[0058] 3) 加入标记有另一株抗PGI和另一株抗PG II 单克隆抗体的酶结合物,37℃震荡混合反应10分钟;

[0059] 4) 按照200μL/孔加入清洗液洗板,重复清洗四次;

[0060] 5) 加入HRP底物液显色,加入终止液后,1分钟内采用上海铭源数康生物芯片阅读仪进行CCD成像并采集光信号计数,分别绘制PGI和PG II 标准曲线,根据标准曲线计算待测样本中PGI和PG II 具体含量,并同时获得PGI/PG II 比值。

[0061] 本发明在酶免疫分析基础上结合高灵敏度的化学发光检测技术,可在一个测试循环中同时完成PGI和PG II 两项指标的检测,较单项指标逐一检测相比,即缩短了临床获得PGI/PG II 检测结果的时间,而且整个反应检测过程采用通用试剂,大大的降低了检测成本,其次配套使用Hamilton全自动检测分析仪器,从加样到结果分析完全实现全自动化,极大的避免了人为操作因素的干扰,缩短了加样等系列操作时间和误差,可重复性强,使得检测更快速、结果更加稳定可靠。

附图说明

[0062] 图1为本发明实施例提供的PG联合检测CCD成像光信号示意图。

[0063] 图2为本发明实施例提供的PGI标准曲线图。

[0064] 图3为本发明实施例提供的PG II 标准曲线图。

[0065] 图4为本发明实施例采用PGI的比对试验结果示意图。

[0066] 图5为本发明实施例采用PG II 的比对试验结果示意图。

具体实施方式

[0067] 下面结合具体实施例对本发明的技术方案进行详细描述。

[0068] 实施例1:

[0069] 同时包被有抗PGI和抗PG II 单克隆抗体的酶联板制备步骤如下:

[0070] 1) 点样:用点样缓冲液分别调整PGI单克隆抗体和PG II 单克隆抗体至0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL、0.8mg/mL、0.9mg/mL、1.0mg/mL,优选0.4mg/mL;经GeSim Nano-Plotter™芯片点样系统分别吸取PGI抗体和PG II 抗体溶液加至酶联板同一孔中,PGI和PG II 各点三个重复点,每点上样量为2nL、4nL、6nL、8nL、10nL,优选8nL,按照斑点状有序排列;

[0071] 2) 固定:用覆板膜将酶联板孔覆盖,依次置于37℃3小时,-20℃过夜,再置于-80℃

2小时进行抗体固定；

[0072] 3) 封闭：按照每孔200 μ l的量加入封闭液，4℃封闭过夜后控干，酶联板覆膜后，于4℃保存。

[0073] 实施例2

[0074] 标记有另一株抗PGI和另一株抗PG II 单克隆抗体的酶结合物的制备步骤如下 (PGI 抗体和PG II 抗体分别进行标记)：

[0075] 1) 称取0.4mg的辣根过氧化物酶 (HRP) 溶于0.2M, pH5.6的醋酸盐缓冲液80 μ L, 至酶浓度为5mg/mL；

[0076] 2) 加入22.4 μ L 0.1M的高碘酸钠, 此时溶液由原棕色变为墨绿色, 于4℃中避光反应25分钟；

[0077] 3) 加入2.5%的乙二醇溶液16 μ L, 涡旋混匀, 于4℃避光1小时终止反应；

[0078] 4) 取相应的抗体, 按照HRP酶与抗体以1:1、2:1、3:1的质量比加入抗体溶液, 优选2:1的质量比, 用0.2M pH9.5的碳酸盐缓冲液调pH值至9.0~9.5, 然后经0.01M碳酸盐缓冲液于4℃避光透析过夜；

[0079] 5) 向抗体-酶复合物溶液中加入24 μ L新鲜配置5mg/mL的NaBH₄溶液, 涡旋混匀, 室温避光反应3小时；

[0080] 6) 向抗体-酶复合物溶液中缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液, 4℃静置2小时；

[0081] 7) 于冷冻离心机中8000rpm 4℃离心30分钟；

[0082] 8) 轻轻去除上清液, 沉淀加少量0.01M pH7.4PBS溶解, 于0.01M pH7.4PBS中透析过夜；

[0083] 9) 取出透析后的抗体-酶复合物溶液, 于冷冻离心机中8000rpm 4℃离心5分钟, 轻轻取出上清液即为抗体-酶结合物, 加入等体积甘油, 涡旋混匀。

[0084] 10) 采用棋盘滴定法分别确定酶标记PGI抗体和酶标记PG II 抗体的最佳工作浓度, 用酶标抗体稀释液同时进行稀释, 最佳稀释比例都为1:2000, 混匀即得到PGI/PG II 酶标记物混合物, 置于2-8℃保存。

[0085] 实施例3

[0086] PGI和PG II 校准品稀释液的配制步骤如下：

[0087] 1) 称取磷酸氢二钠8g, 磷酸二氢钠0.27g, 氯化钠8g, 氯化钾0.2g于1L的容器中, 加入适量的纯化水搅拌使其完全溶解；

[0088] 2) 用移液器移取1mL ProClin 300于10mL纯化水的烧杯中, 完全溶解后倒入上述1L的容器中, 加入纯化水至900mL并充分搅拌；

[0089] 3) 调节pH计测量溶液pH值, 调节pH值控制在7.2-7.4；

[0090] 4) 称取牛血清白蛋白30g, 蛋白保护剂GH 1g, 加入上述1L的容器中, 搅拌均匀, 使其充分溶解；

[0091] 5) 定容至1L, 用0.2 μ m滤器过滤, 过滤后贴好标签于2-8℃无菌环境下储存。

[0092] 表2校准品稀释液配方

[0093]

名称	浓度
磷酸氢二钠	8g/L
磷酸二氢钠	0.27 g/L
氯化钠	8 g/L

[0094]

氯化钾	0.2 g/L
适量纯化水溶解	
ProClin 300	1mL/L
加纯化水至 900mL, 调节 pH7.2-7.4	
牛血清白蛋白	30g/L
蛋白保护剂 GH	1g/L
纯化水	定容至 1L
0.2 μm 滤器过滤	

[0095] 实施例4:

[0096] PG复合校准品和PG复合质控品的配制步骤如下:

[0097] 1) 用校准品稀释液稀释PGI和PG II 纯品成为复合校准品,至PGI的工作浓度范围为0.5-200ng/mL;PG II 的工作浓度范围为0.5-100ng/mL;

[0098] 2) 配置成PG复合校准品S0,S1~S7,其各复合校准品浓度设定参照下表。表3PG复合校准品浓度设定

[0099]

复合校准品	PG I (ng/mL)	PG II (ng/mL)
S0	0	0
S1	0.996	0.49
S2	3.785	2.22
S3	8.59	5.41
S4	17.89	11.67
S5	46.663	24.87
S6	92.239	51.24
S7	180.077	101.52

[0100] 3) 配置成PG复合质控品1和PG复合质控品2,质控品测定值应在范围之内,PG复合

质控品1中PGI的浓度范围12.385-16.988ng/mL,PG II 的浓度范围8.459-11.024ng/mL;PG复合质控品2中PGI的浓度范围120.187-146.988ng/mL,PG II 的浓度范围52.982-67.595ng/mL。

[0101] 本发明上述各种原材料的选择要求如下:

[0102] 酶联板的选择

[0103] 通过对酶联板的外观,均一性,吸附一致性等方面进行分析,经过多次分析研究,选取白色透明的,具有高结合力的酶联板,经不同浓度的包被抗体进行点样包板,吸附一致性 $CV \leq 8\%$ 。本申请选取深圳金灿华的酶联板作为点样载体材料。

[0104] 点样用PGI和PG II 抗体的选择

[0105] 首先就抗体的外观、浓度、纯度、效价进行验证,结果抗体都为无色透明澄清液体,无肉眼可见异物,无摇不散的沉淀,用紫外吸收法检测其蛋白质含量应不低于2mg/mL,效价应不低于标示效价且不低于1:10000,SDS-PAGE检测纯度应主带清晰,无明显杂带。本申请采用medix公司提供的PGI8003抗体;PG II 8101抗体作为点样原料。

[0106] 酶标记用PGI和PG II 抗体的选择

[0107] 首先仍就抗体的外观、浓度、纯度、效价进行验证,结果抗体都为无色透明澄清液体,无肉眼可见异物,无摇不散的沉淀,用紫外吸收法检测其蛋白质含量应不低于2mg/mL,效价应不低于标示效价且不低于1:10000,SDS-PAGE检测纯度应主带清晰,无明显杂带。本申请采用medix公司提供的PGI8009抗体;PG II 8103抗体作为标记用原料。

[0108] 标记用的酶的选择

[0109] 通过对HRP酶的外观,纯度,标记比例,稳定性等方面进行分析,经过多次分析研究,将HRP酶复溶混匀,呈淡黄色澄清透明液体,无杂质,无颗粒状,将HRP酶与PG抗体采用多种方法进行标记,标记率应 $>90\%$ 。研究表明,采用国药试剂的纯度 $RZ > 3$,酶活性 $> 250U/mg$ 的HRP酶稳定性好,标记效率高,以此作为酶标记物原料。

[0110] 一、本发明试剂盒性能指标

[0111] 1.最低检出限

[0112] 用零浓度企业线性参考品作为样本进行检测,重复测定20次,得出20次测量结果的光信号值,计算器平均值(M)和标准偏差(SD),得出 $M+2SD$,根据零浓度企业线性参考品和相邻校准品之间的浓度-光信号值结果进行两点回归拟合得出一次方程,将 $M+2SD$ 的光信号值带入上述方程中,求出对应的浓度值,即为最低检出限。

[0113] 2.准确度

[0114] 将一定浓度PG样品(A)加入血清(B)中,所加入PG与血清(B)之间的体积比为1:9,个重复检测三次,取平均值,根据公式(1)计算结果。

[0115]
$$R = \frac{c \times (V_0 + V) - c_0 \times V_0}{V \times c_s} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

[0116] 式中:R—回收率;V—样品A液的体积; V_0 —样品B液的体积;c—样品B液加入A液后的检测浓度; c_0 —样品B液的浓度; c_s —样品A液的浓度。

[0117] 3.线性

[0118] 将接近线性范围上限的高值样本A用样本稀释液按一定的比例稀释为7个浓度梯度样本,及B稀释比例为A:G=1:1.5、C稀释比例为B:G=1:2、D稀释比例为C:G=1:2、E稀释

比例为E:G=1:2、F稀释比例为E:G=1:4。对每一浓度的样本各重复检测3次计算其平均值，以理论浓度为横坐标，检测浓度为纵坐标绘制散点图，并计算线性相关系数r。

[0119] 4.批内精密度

[0120] 用高低浓度的样本各重复检测10次，计算10次测量结果的平均值(M)和标准偏差(SD)，根据公式(2)得出变异系数(CV)。

[0121] $CV = SD/M \times 100\%$ (2)

[0122] 式中:CV—变异系数,M—10次测量结果的平均值,SD—10次测量结果的标准偏差。

[0123] 5.批间精密度

[0124] 按照本发明所述方法制备3批次试剂盒,分别选取高低浓度的样本,分别重复测量10次,根据结果计算批间平均偏差CV%值。

[0125] 6.干扰物质

[0126] 选取一定浓度的PG血清样本,向检测样本中添加一定浓度的如下干扰物质:4mg/ml血红蛋白、30mg/ml乳糜、0.2mg/ml结合胆红素、0.2mg/ml游离胆红素、65mg/ml人血清白蛋白,要求检测结果与对照样本结果偏差 $\leq 10\%$ 。

[0127] 本发明试剂盒性能分析结果如表4。

[0128] 表4本发明试剂盒性能检测结果

[0129]

指标		PG I	PG II	结果
最低检测限		0.213ng/nL	0.149ng/mL	合格
回收率		R=95.19%	R=94.01%	合格
线性		r=0.973	r=0.961	合格
批 内 精 密度	高 值 样本	CV%=3.02%	CV%=2.85%	合格
	低 值 样本	CV%=5.46%	CV%=5.37%	合格
批 间 精 密度	高 值 样本	CV%=5.26%	CV%=7.22%	合格
	低 值 样本	CV%=7.46%	CV%=8.43%	合格
干 扰 物 质	血红蛋白	偏差=7.31%	偏差=8.34%	合格
	乳糜	偏差=3.12%	偏差=6.49%	合格
	结 合 胆 红 素	偏差=4.22%	偏差=5.27%	合格
	游 离 胆 红 素	偏差=5.39%	偏差=2.44%	合格
	人 血 清 白 蛋白	偏差=8.03%	偏差=7.51%	合格

[0130] 二、临床性能

[0131] 血清样本采自体检中心正常体检、供血者,主要筛选了100例体检结果均无其他症状疾病,无输血无手术(妇女不在妊娠期和哺乳期)的样本。将检测浓度与雅培公司试剂盒检测结果浓度进行分析对比,其中PGI的临床相关性r为0.978,PGII的临床相关性r为0.985,说明本发明试剂盒与国际知名品牌试剂盒具有良好的相关性。临床相关性结果如图4,图5。

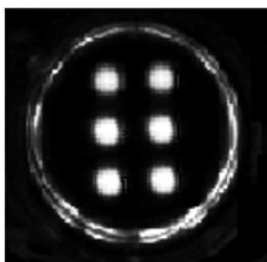


图1

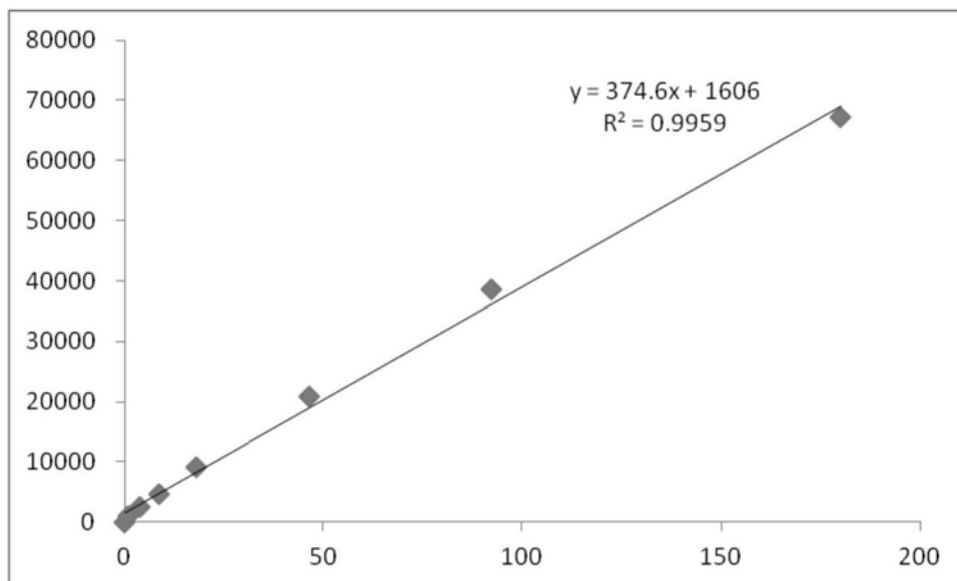


图2

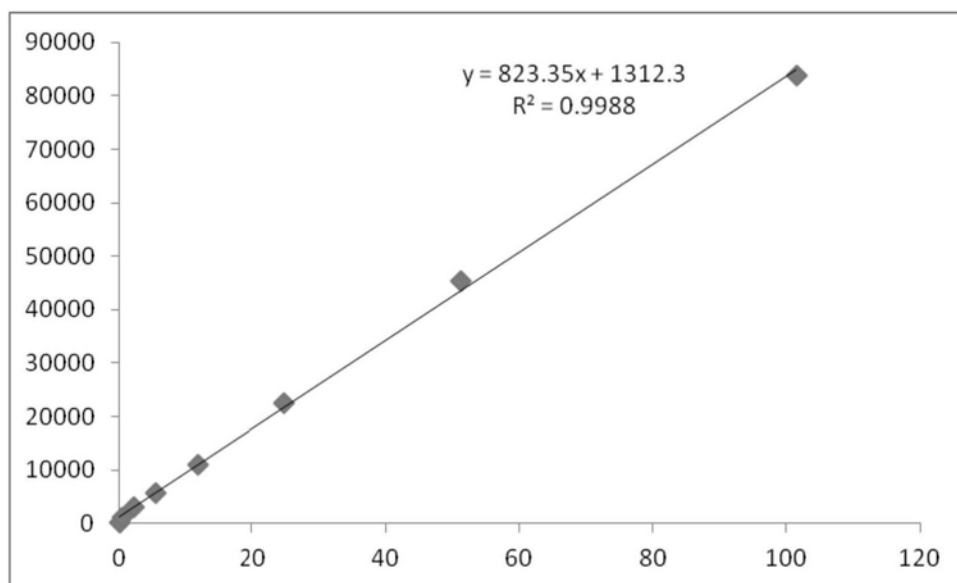


图3

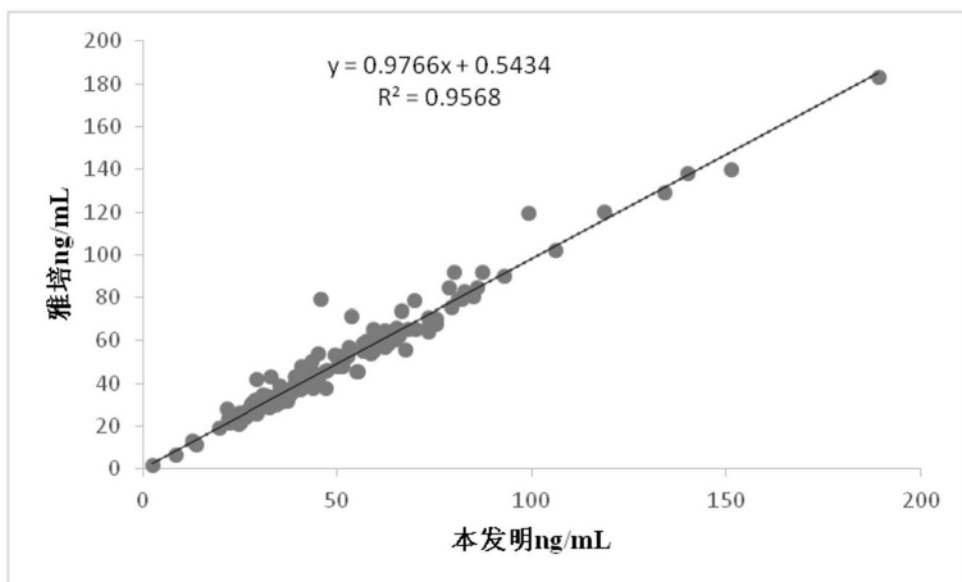


图4

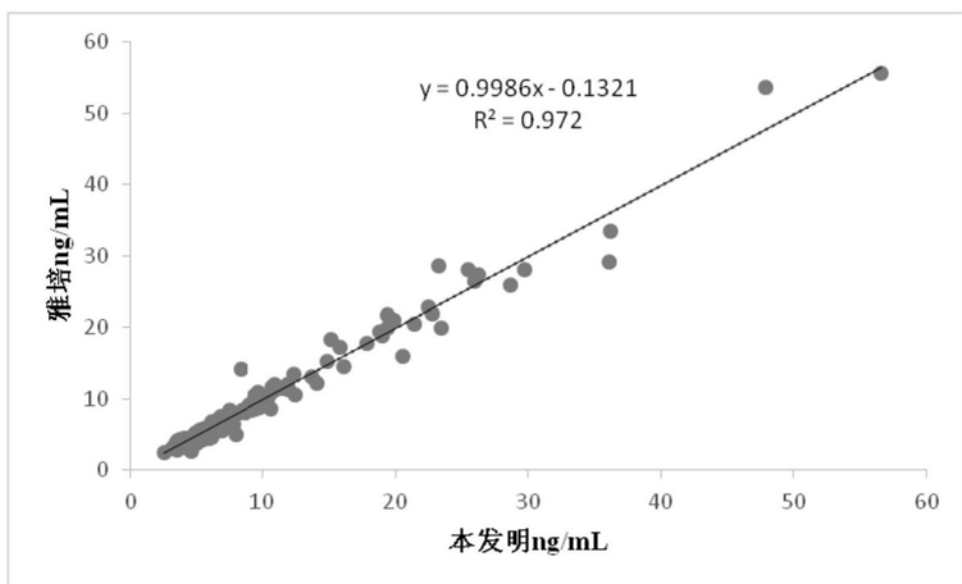


图5

专利名称(译)	胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II联合检测试剂盒及其制备方法和检测方法		
公开(公告)号	CN108414742A	公开(公告)日	2018-08-17
申请号	CN201810123351.X	申请日	2018-02-07
[标]申请(专利权)人(译)	上海铭源数康生物芯片有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海铭源数康生物芯片有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海铭源数康生物芯片有限公司		
[标]发明人	李亨芬 季海鹏 施晓燕 唐博 柳飞舟		
发明人	李亨芬 季海鹏 施晓燕 唐博 柳飞舟		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/577 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/558 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II联合检测试剂盒及其制备方法和检测方法，本发明在酶免疫分析基础上结合高灵敏度的化学发光检测技术，可在一个测试循环中同时完成PG I和PG II两项指标的检测，较单项指标逐一检测相比，即缩短了临床获得PG I/PG II检测结果的时间，而且整个反应检测过程采用通用试剂，大大的降低了检测成本，其次配套使用Hamilton全自动检测分析仪器，从加样到结果分析完全实现全自动化，极大的避免了人为操作因素的干扰，缩短了加样等系列操作时间和误差，可重复性强，使得检测更快速、结果更加稳定可靠。

复合校准品	PG I (ng/mL)	PG II (ng/mL)
S0	0	0
S1	0.996	0.49
S2	3.785	2.22
S3	8.59	5.41
S4	17.89	11.67
S5	46.663	24.87
S6	92.239	51.24
S7	180.077	101.52