



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104502592 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 08

(21) 申请号 201410629665. 9

(22) 申请日 2014. 11. 10

(71) 申请人 江苏宏泰格尔生物医学工程有限公司

地址 213022 江苏省常州市新北区河海路
106 号

(72) 发明人 张鹏 张翼飞 廖平璋 张华

(74) 专利代理机构 苏州市中南伟业知识产权代
理事务所(普通合伙) 32257

代理人 王倩

(51) Int. Cl.

G01N 33/573(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

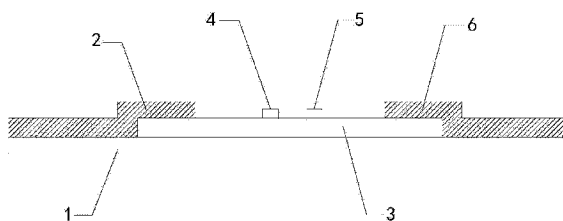
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

一种胃蛋白酶原 II 的检测方法及试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种胃蛋白酶原 II 的检测方法及试剂盒,尤其涉及一种胃蛋白酶原 II 的双波长荧光免疫层析检测方法及其检测试剂盒。包括以下步骤:1) 免疫层析试纸条制备;2) 冻干探针制备;3) 样品稀释液制备;4) 样品检验;本发明的胃蛋白酶原 II 的检测方法及试剂盒,灵敏度高、准确度高、操作简单、成本低。



1. 一种胃蛋白酶原 II 的双波长荧光免疫层析检测方法, 其特征在于: 包括以下步骤:

1) 免疫层析试纸条制备: 将胃蛋白酶原 II 单克隆抗体和鸡 IgY 分别包被在层析试纸的检测线和控制线上, 经干燥、切割后得到免疫层析试纸条;

2) 冻干探针制备: 将两种不同发射光波长的荧光胶乳微粒溶液按比例混合, 混合均匀后加入活化剂反应一段时间, 离心、洗涤后得到活化荧光胶乳微粒;

将胃蛋白酶原 II 单克隆抗体和羊抗鸡 IgY 分别按比例与活化荧光胶乳微粒偶联反应一段时间, 得到胃蛋白酶原 II 单克隆抗体荧光胶乳微粒、以及羊抗鸡 IgY 荧光胶乳微粒;

随后将胃蛋白酶原 II 单克隆抗体荧光胶乳微粒与羊抗鸡 IgY 荧光胶乳微粒按一定比例混合得到混合荧光胶乳微粒, 随后加入硅藻糖水溶液稀释, 冻干后保存为冻干探针;

3) 样品稀释液制备: 样品稀释液为含有牛血清白蛋白、蛋白保护剂、表面活性剂和防腐剂的缓冲液;

4) 样品检验: 将血清样品与冻干探针混合分散一段时间后, 取出一定量加入样品稀释液中, 待混合均匀后滴加至免疫层析试纸条上进行免疫层析反应; 随后在荧光检测器下采用与两种荧光胶乳微粒相对应的两种发射光波长进行荧光检测。

2. 根据权利要求 1 所述的胃蛋白酶原 II 的双波长荧光免疫层析检测方法, 其特征在于: 所述冻干探针制备步骤中, 将两种不同发射光波长的荧光胶乳微粒溶液按 1:5 ~ 5:1 比例混合, 混合均匀后加入活化剂 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐室温下反应 0.5 ~ 2h, 其中, 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与荧光胶乳微粒的重量比为 0.5:100 ~ 5:100。

3. 根据权利要求 1 所述的胃蛋白酶原 II 的双波长荧光免疫层析检测方法, 其特征在于: 所述冻干探针制备步骤中, 所述两种荧光胶乳微粒的发射光波长分别为 500 ~ 590nm 和 600 ~ 740nm。

4. 根据权利要求 1 所述的胃蛋白酶原 II 的双波长荧光免疫层析检测方法, 其特征在于: 所述冻干探针制备步骤中, 胃蛋白酶原 II 单克隆抗体与活化荧光胶乳微粒的混合比例为 0.01:100 ~ 0.05:100, 混合后室温下偶联反应 2 ~ 5h; 羊抗鸡 IgY 与活化荧光胶乳微粒的混合比例为 0.01:100 ~ 0.05:100, 混合后室温下偶联反应 2 ~ 5h。

5. 根据权利要求 1 所述的胃蛋白酶原 II 的双波长荧光免疫层析检测方法, 其特征在于: 所述冻干探针制备步骤中, 按 3:1 ~ 6:1 的比例混合胃蛋白酶原 II 单克隆抗体荧光胶乳微粒和羊抗鸡 IgY 荧光胶乳微粒, 得到混合荧光胶乳微粒, 将混合荧光胶乳微粒用含糖量 5 ~ 30% 的硅藻糖水溶液稀释 10 ~ 50 倍, 在 -80℃ 下冷冻 2h, 取出后在 -30 ~ -50℃ 冷阱温度下冷冻干燥 10 ~ 20h, 密封保存于 4℃。

6. 根据权利要求 1 所述的胃蛋白酶原 II 的双波长荧光免疫层析检测方法, 其特征在于: 所述样品稀释液制备步骤中, 所述缓冲液包括 PBS 缓冲液、Tris 缓冲液、甘氨酸缓冲液、MES 缓冲液、HEPES 缓冲液中的一种或几种, 所述表面活性剂为吐温 20、吐温 80、曲拉通 X-100 或聚乙二醇, 所述防腐剂为叠氮钠或 proclin。

7. 一种胃蛋白酶原 II 的双波长荧光免疫层析检测试剂盒, 其特征在于: 包括试剂盒体、冻存管、以及稀释液瓶, 所述试剂盒体包括塑料衬板以及固定在塑料衬板上的样品垫、免疫层析试纸条和吸水纸, 所述样品垫和吸水纸分别搭接在所述免疫层析试纸条的两侧, 所述免疫层析试纸条上设置有检测线和控制线, 所述检测线和控制线内分别包被有胃蛋白

酶原 II 单克隆抗体和鸡 IgY ;所述冻存管中存放有冻干探针,所述冻干探针为由胃蛋白酶原 II 单克隆抗体和羊抗鸡 IgY 与两种不同发射光波长的荧光胶乳微粒反应制得的冻干探针,所述稀释液瓶中存放有样品稀释液。

8. 根据权利要求 7 所述的胃蛋白酶原 II 的双波长荧光免疫层析检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒体还包括壳体,所述壳体上设置有加样孔、检测窗口和把手,所述加样孔设置在所述样品垫处,所述检测窗口设置在所述检测线和控制线处,所述把手设置在所述壳体上位于靠近吸水纸的一侧。

9. 根据权利要求 7 所述的胃蛋白酶原 II 的双波长荧光免疫层析检测试剂盒,其特征在于:所述免疫层析试纸条为硝酸纤维素膜材质。

一种胃蛋白酶原 II 的检测方法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种胃蛋白酶原 II 的检测方法及试剂盒,尤其涉及一种胃蛋白酶原 II 的双波长荧光免疫层析检测方法及其检测试剂盒。

背景技术

[0002] 胃蛋白酶原 (PG) 是胃蛋白酶的前体,是分子量为 42000Da 的单链多态,依据其生化性质和免疫原性将其分成两个亚群。组分 1-5 的免疫原性相同称 PG I,主要由胃腺的主细胞和黏液颈细胞分泌,大部分进入胃腔;组分 6-7 称 PG II,由胃体的胃底黏膜的泌酸腺的主细胞、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 腺分泌。正常情况下约 1% 的 PG 进入血液循环,进入的量十分稳定,因此血清中 PG 含量可以反映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。当胃黏膜发生病理变化时,血清 PG 含量也随之改变,被称为胃黏膜的“血清学活检”。

[0003] 其中,胃蛋白酶原 II (简称 PG II) 来源于全胃腺和远端十二指肠 Brunner 氏腺,其含量的变化可以直接反映胃粘膜和十二指肠状态和细胞数量的变化。国内外临床研究指出,当萎缩性胃炎伴有肠化、胃窦腺假幽门腺化生,PG II 含量会随之升高。通过 PG II 的血清检测,有助于检测出与幽门螺旋杆菌感染、胃溃疡、十二指肠溃疡以及胃窦部有关的疾病。血清检测作为非侵入式方法,能够减轻患者的痛苦,而且检测方便、经济,适用于一般的体检。

[0004] 目前 PG II 的主要检测方法有酶联免疫吸附法 (ELISA) 和化学发光免疫测定 (CLIA)。ELISA 法检测精确、能准确定量,具有很高的敏感性,但是检测样品需要加样、温浴、洗涤、显色、终止等步骤,操作程序繁琐,耗时长,样品从处理到得出结论需要至少 40min,不适于大规模的体检筛查;样品检测需要洗板机和酶标仪,携带不便,因而不能在病人家庭或急救车上进行检测;另外其敏感性、特异性不够高,对低浓度样品检测的准确度不高。而化学发光免疫测定,虽然精确度高、检测速度快,但检测需要昂贵的化学发光免疫分析仪,要求特定的分析室,另外其试剂成本也较高,无法广泛用于较基层的医院和医疗机构中。

[0005] 中国专利公布号为 CN102654501A 的发明专利,虽然公布了一种光激发化学发光检测胃蛋白酶原 II 的方法,利用单线态离子氧的产生和传递,将能量传递给发光微粒产生荧光,通过检测荧光强度获得数据。然而采用该专利技术检测样品时需要的操作较多,需要配套设备,检测复杂,对操作人员的要求较高;而且该专利中的试剂盒制作成本较高,程序较复杂。中国专利公布号为 CN103713140A 的发明专利,虽然公布了一种消除乳糜干扰的胶乳免疫比浊法检测胃蛋白酶原 II 的试剂盒,通过胶乳凝集作用放大样本中待测物质与特异性抗体的结合反应,添加乳糜消除剂处理产生浑浊的物质,消除其干扰。然而该专利只能消除一些浑浊类物质的干扰作用,并未消除一些非特异性结合,检测结果可能会高于实际浓度。中国专利公布号为 CN102426236A 的发明专利,虽然公布了一种将化学发光技术与免疫磁微粒结合的方法检测胃蛋白酶原 II,在本质上还是一种酶联免疫检测技术,操作过程复杂,检测时间长。

[0006] 有鉴于上述的缺陷,本设计人,积极加以研究创新,以期创设一种灵敏度高、准确度高、操作简单、成本低的检测方法及试剂盒,使其更具有产业上的利用价值。

发明内容

[0007] 为解决上述技术问题,本发明的目的是提供一种灵敏度高、准确度高、操作简单、成本低的胃蛋白酶原 II 的检测方法及试剂盒。

[0008] 本发明的胃蛋白酶原 II 的双波长荧光免疫层析检测方法,包括以下步骤:

[0009] 1) 免疫层析试纸条制备:将胃蛋白酶原 II 单克隆抗体和鸡 IgY 分别包被在层析试纸条的检测线和控制线上,经干燥、切割后得到免疫层析试纸条;

[0010] 2) 冻干探针制备:将两种不同发射光波长的荧光胶乳微粒溶液按比例混合,混合均匀后加入活化剂反应一段时间,离心、洗涤后得到活化荧光胶乳微粒;

[0011] 将胃蛋白酶原 II 单克隆抗体和羊抗鸡 IgY 分别按比例与活化荧光胶乳微粒偶联反应一段时间,得到胃蛋白酶原 II 单克隆抗体荧光胶乳微粒、以及羊抗鸡 IgY 荧光胶乳微粒;

[0012] 随后将胃蛋白酶原 II 单克隆抗体荧光胶乳微粒与羊抗鸡 IgY 荧光胶乳微粒按一定比例混合得到混合荧光胶乳微粒,随后加入海藻糖水溶液稀释,冻干后保存为冻干探针;

[0013] 3) 样品稀释液制备:样品稀释液为含有牛血清白蛋白、蛋白保护剂、表面活性剂和防腐剂的缓冲液;

[0014] 4) 样品检验:将血清样品与冻干探针混合分散一段时间后,取出一定量加入样品稀释液中,待混合均匀后滴加至免疫层析试纸条上进行免疫层析反应;随后在荧光检测器下采用与两种荧光胶乳微粒相对应的两种发射光波长进行荧光检测。

[0015] 具体的,所述冻干探针制备步骤中,将两种不同发射光波长的荧光胶乳微粒溶液按 1:5 ~ 5:1 比例混合,混合均匀后加入活化剂 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐室温下反应 0.5 ~ 2h,其中,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与荧光胶乳微粒的重量比为 0.5:100 ~ 5:100。

[0016] 具体的,所述冻干探针制备步骤中,所述两种荧光胶乳微粒的发射光波长分别为 500 ~ 590nm 和 600 ~ 740nm。

[0017] 具体的,所述冻干探针制备步骤中,胃蛋白酶原 II 单克隆抗体与活化荧光胶乳微粒的混合比例为 0.01:100 ~ 0.05:100,混合后室温下偶联反应 2 ~ 5h;羊抗鸡 IgY 与活化荧光胶乳微粒的混合比例为 0.01:100 ~ 0.05:100,混合后室温下偶联反应 2 ~ 5h。

[0018] 具体的,所述冻干探针制备步骤中,按 3:1 ~ 6:1 的比例混合胃蛋白酶原 II 单克隆抗体荧光胶乳微粒和羊抗鸡 IgY 荧光胶乳微粒,得到混合荧光胶乳微粒,将混合荧光胶乳微粒用含糖量 5 ~ 30% 的海藻糖水溶液稀释 10 ~ 50 倍,在 -80℃ 下冷冻 2h,取出后在 -30 ~ -50℃ 冷阱温度下冷冻干燥 10 ~ 20h,密封保存于 4℃。

[0019] 具体的,所述样品稀释液制备步骤中,所述缓冲液包括 PBS 缓冲液、Tris 缓冲液、甘氨酸缓冲液、MES 缓冲液、HEPES 缓冲液中的一种或几种,所述表面活性剂为吐温 20、吐温 80、曲拉通 X-100 或聚乙二醇,所述防腐剂为叠氮钠或 proclin。

[0020] 本发明的胃蛋白酶原 II 的双波长荧光免疫层析检测试剂盒,包括试剂盒体、冻存

管、以及稀释液瓶,所述试剂盒体包括塑料衬板以及固定在塑料衬板上的样品垫、免疫层析试纸条和吸水纸,所述样品垫和吸水纸分别搭接在所述免疫层析试纸条的两侧,所述免疫层析试纸条上设置有检测线和控制线,所述检测线和控制线内分别包被有胃蛋白酶原 II 单克隆抗体和鸡 IgY;所述冻存管中存放有冻干探针,所述冻干探针为由胃蛋白酶原 II 单克隆抗体和羊抗鸡 IgY 与两种不同发射光波长的荧光胶乳微粒反应制得的冻干探针,所述稀释液瓶中存放有样品稀释液。

[0021] 进一步的,所述试剂盒体还包括壳体,所述壳体上设置有加样孔、检测窗口和把手,所述加样孔设置在所述样品垫处,所述检测窗口设置在所述检测线和控制线处,所述把手设置在所述壳体上位于靠近吸水纸的一侧。

[0022] 进一步的,所述免疫层析试纸条为硝酸纤维素膜材质。

[0023] 借由上述方案,本发明至少具有以下优点:

[0024] 1) 本发明利用荧光免疫层析方法,实现胃蛋白酶原 II 的体外定量检测。

[0025] 2) 本发明荧光免疫层析方法,独创性使用独立控制线方法;检测线区域采用能与胃蛋白酶原 II 形成复合物的胃蛋白酶原 II 单克隆抗体,配套探针则使用 2 种荧光胶乳微粒标记的胃蛋白酶原 II 单克隆抗体;控制线区域包被有鸡 IgY 抗体,配套探针使用羊抗鸡 IgY 抗体标记的 2 种荧光胶乳微粒。控制线与检测线独立反应,互不影响和干扰。利用控制线信号可以准确判定冷冻探针在分散在混合液体中的质量,用来校正检测线信号。

[0026] 3) 本发明采用双波长比对校准方法。通过收集控制线在不同波长处的信号值,可以预测样品中杂质对荧光信号的影响,通过选择合适波长的发射光信号,降低杂质的影响,可以得出较可靠的数据。双波长检测核心在于使用两种不同发射波长的荧光胶乳微粒标记探针抗体,然后同时参与反应,最终在控制线和检测线上分别有两种荧光的信号。相当于是一个检测卡上对同一待测物同时平行做两次检测,在控制线上两个波长结果均正常的情况下,对检测线上两种波长信号做运算,换算出的浓度结果取平均值

[0027] 4) 本发明针对定量层析要求,独创性采用探针冻干技术,将检测体系中的探针独立冻干,并在反应前用稀释后样本进行复溶。该技术避免传统免疫层析产品技术采用喷金法制得金标垫带来的如喷不匀、切割误差等影响检测精密度的问题。另外传统层析技术所使用的金标垫,其干燥条件多采用常压条件下的加热干燥,热处理条件在一定程度上影响探针的寿命,降低了检测灵敏度,并增加检测结果的不准确性。

[0028] 5) 本发明制备的胃蛋白酶原 II 检测试剂盒,检测灵敏度高,可检测血清样本中 0.60ng/ml 的胃蛋白酶原 II;检测仪器简单,操作简单,无需专业操作人员;检测快速,10~20 分钟即可得到检测结果;试剂盒储存方便。

[0029] 上述说明仅是本发明技术方案的概述,为了能够更清楚了解本发明的技术手段,并可依照说明书的内容予以实施,以下以本发明的较佳实施例并配合附图详细说明如后。

附图说明

[0030] 图 1 是本发明中免疫层析试纸条的结构示意图;

[0031] 图 2 是本发明中试剂盒体的结构示意图;

[0032] 图 3 是本发明实施例六中比对试验结果示意图。

具体实施方式

[0033] 下面结合附图和实施例,对本发明的具体实施方式作进一步详细描述。以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0034] 实施例一

[0035] 本发明的胃蛋白酶原 II 的双波长荧光免疫层析检测方法,包括以下步骤:

[0036] 1) 免疫层析试纸条制备:采用划膜喷金机将胃蛋白酶原 II 单克隆抗体和鸡 IgY 分别包被在层析试纸的检测线(T线)和控制线(C线)上,干燥 1~5h 后经切条机切割得到 3~5mm 宽度的免疫层析试纸条;

[0037] 应当说明的是:a) 传统的定性免疫层析技术采用包被羊抗鼠抗体作为控制线,随着血清中胃蛋白酶原 II 或一些抗鼠源抗体阻断剂的增加,控制线上的信号随之降低,其信号值就不能用于计算,测试线的信号的准确性也没有了参考依据。本发明采用鸡 IgY 抗体和羊抗鸡抗体作为控制线配对,C 线与 T 线的反应独立进行,无交叉影响。能避免 C 线与 T 线彼此竞争探针微粒而产生的重复性偏差;b) 干燥时间小于 1h,抗体在 N 控制膜上的结合效率低,导致胃蛋白酶原 II 的检测限升高;干燥时间大于 5h,抗体容易失活,导致检测的灵敏度降低,最佳的干燥时间为 3h;c) 试纸条的宽度小于 3mm 时,切割机对试纸条的影响较大,大幅度降低检测结果的精密度,试纸条的宽度大于 5mm 时,会增加试纸条和探针的成本,最优化的试纸条宽度为 4mm。

[0038] 2) 冻干探针制备:将发射光波长分别为 500~590nm 和 600~740nm 的带有羧基或氨基的荧光胶乳微粒溶液按 1:5~5:1 比例混合,混合均匀后加入活化剂 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC) 室温下反应 0.5~2h,其中,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC) 与荧光胶乳微粒的重量比为 0.5:100~5:100,离心、洗涤后得到活化荧光胶乳微粒;

[0039] 应当说明的是:a) 发射光波长分别为 500~590nm 和 600~740nm 的荧光胶乳在市面上容易获得,因而在保证检测精度的前提下,经济性和适用性较高;b) 荧光胶乳微粒的体积比是根据实际样品检测信号进行优化的,单一胶乳微粒所占比例过少会造成灵敏度降低,过多增加检测成本,最优化比例为 1:1;c) EDC 与荧光胶乳微粒的重量比小于 0.5:100 时,胶乳微粒的活化率很低,偶联微粒上抗体的结合很少,检测时的灵敏度低;EDC 与荧光胶乳微粒的重量比大于 5:100 时,胶乳微粒的活化率随 EDC 量增加而增加的幅度有限,成本升高,最佳比例为 1:100;d) 活化时间小于 0.5h,活化的效率不高,浪费原材料;活化时间大于 2h,活化的速度小于活化物质水解的速度,降低了活化效率,最佳活化时间 1h。

[0040] 将胃蛋白酶原 II 单克隆抗体与活化荧光胶乳微粒的按比例 0.01:100~0.05:100 混合,室温下偶联反应 2~5h,得到胃蛋白酶原 II 单克隆抗体荧光胶乳微粒;将羊抗鸡 IgY 与活化荧光胶乳微粒按比例 0.01:100~0.05:100 混合,室温下偶联反应 2~5h,得到羊抗鸡 IgY 荧光胶乳微粒;

[0041] 应当说明的是:a) 抗体与荧光胶乳微粒的重量比小于 0.01:100 时,偶联效率高,但是浪费胶乳微粒,胶乳微粒的大部分活化点未结合抗体;大于 0.05:100 时,胶乳微粒的大部分活化点已被结合,继续增加抗体的量对偶联效率无明显影响,浪费抗体,最佳比例为 0.02:100;b) 反应时间与偶联率有关,时间过短小于 2 小时,则抗体与胶乳微粒的结合较少,不经济;时间过长大于 5 小时,则偶联率增加有限,浪费时间,最佳反应时间 3h。

[0042] 按 3:1 ~ 6:1 的比例混合胃蛋白酶原 II 单克隆抗体荧光胶乳微粒和羊抗鸡 IgY 荧光胶乳微粒,得到混合荧光胶乳微粒,将混合荧光胶乳微粒用含糖量 5 ~ 30% 的硅藻糖水溶液稀释 10 ~ 50 倍,每支冻存管中加入 15 ~ 30 μ l 稀释后的混合荧光胶乳微粒,在 -80 $^{\circ}$ C 下冷冻 2h,取出后在 -30 ~ -50 $^{\circ}$ C 冷阱温度下冷冻干燥 10 ~ 20h,密封保存于 4 $^{\circ}$ C。

[0043] 应当说明的是:a) 探针不易保存在样品稀释液中,样品稀释液的成分会促进探针之间的团聚,会在硝酸纤维素膜(NC膜)与样品垫之间聚集,降低检测的灵敏度;恒温干燥和真空干燥制备的探针粘附力较强,不利于溶解,对高浓度样品的检测结果偏差较大;冷冻干燥可以很稳定的保存探针,避免探针之间的团聚,而且冻干的探针在样品中能很快复溶,能很快均匀分布在待测样品中;b) 含糖量小于 5%,稀释倍数大于 50 时,冻干的探针骨架结构中的固体含量少,含有大量的气孔,结构松散,加入样品时会产生大量的气泡,影响加样量;含糖量高于 30%,稀释倍数小于 10 时,加入样品时,冻干探针需要的溶解时间稍长,反应体系的粘稠度增加,不利于层析和加样,最佳含糖量 20%;c) 每支冻存管加入的探针溶液小于 15 μ l 时,分装时对移液器的要求加大,不适合手动分装;大于 30 μ l 时,探针溶液中的糖分含量较多,不利于层析和加样,最佳分装量为 25 μ l;d) 冷阱温度过低,需要的能耗大,也跟机器的功能有关;冷阱温度过高,对水分的凝结过慢,降低了干燥效率,最佳冷阱温度为 -45 $^{\circ}$ C;e) 冷冻时间过短,水分去除不够,室温下未冻干的固体会回潮,影响探针的质量;冷冻时间过长,水分基本去除完了,没有必要继续浪费资源;f) 胃蛋白酶原 II 单克隆抗体荧光胶乳微粒的混合比例是根据抗原在 T 线上的结合能力进行调整的,浓度过低会造成灵敏度不够,低浓度区分不够;浓度过高,成本会增加,线性的上限也可能会下降。

[0044] 3) 样品稀释液制备:样品稀释液为含有牛血清白蛋白、蛋白保护剂、表面活性剂和防腐剂的缓冲液;缓冲液包括 PBS 缓冲液、Tris 缓冲液、甘氨酸缓冲液、MES 缓冲液、HEPES 缓冲液中的一种或几种,表面活性剂为吐温 20、吐温 80、曲拉通 X-100 或聚乙二醇,防腐剂为叠氮钠或 proclin;

[0045] 应当说明的是:a) 牛血清白蛋白起着流动封闭的作用,能与血清中的杂蛋白结合,封闭探针上的空白位点,降低探针的非特异性结合,减少假阳信号;b) 蛋白保护剂用于降低一些待检抗原的分解,起着保护抗原的作用;c) 表面活性剂能够改善免疫体系中疏水物质的亲水性,使得探针在 NC 膜上的分布更均匀,避免了信号波动对信号的影响;d) 防腐剂延迟或抑制微生物的生长,避免样品稀释液的腐败;e) 缓冲液用于控制免疫反应的反应条件,降低人血清的差异对反应体系的影响

[0046] 4) 样品检验:将血清样品与冻干探针混合分散一段时间后,取出一定量加入样品稀释液中,待混合均匀后滴加至免疫层析试纸条上进行免疫层析反应;随后在荧光检测器下采用与两种荧光胶乳微粒相对应的两种发射光波长进行荧光检测。混合液体中胃蛋白酶原 II 与标记有荧光胶乳微粒的胃蛋白酶原 II 单克隆抗体碰撞结合形成复合物,渗透到样品垫上,混合液体经玻璃纤维过滤杂质后,其中的复合物继续顺着硝酸纤维素膜渗透到检测线上,与固定在检测线上的胃蛋白酶原 II 单克隆抗体形成双抗体夹心的新复合物,检测线上的胃蛋白酶原 II 单克隆抗体与探针中的胃蛋白酶原 II 单克隆抗体,其在胃蛋白酶原 II 上的表位不同;剩余的抗原-荧光标记的抗体复合物、未结合的标记有荧光胶乳微粒的胃蛋白酶原 II 单克隆抗体、以及标记有荧光胶乳微粒的羊抗鸡 IgY 继续渗透到控制线,标记有荧光胶乳微粒的羊抗鸡 IgY 会与控制线上固定的鸡 IgY 结合形成抗原-抗体复合物;荧光

检测器下荧光检测时,仅在控制线上检测到信号,才能证明检测结果是有效的。

[0047] 实施例二

[0048] 如图 1 至 2 所示,本发明的胃蛋白酶原 II 的双波长荧光免疫层析检测试剂盒,包括试剂盒体、冻存管、以及稀释液瓶,试剂盒体包括塑料衬板 1 以及固定在塑料衬板上的样品垫 2、免疫层析试纸条 3 和吸水纸 6,免疫层析试纸条为硝酸纤维素膜材质,样品垫和吸水纸分别搭接在免疫层析试纸条的两侧,免疫层析试纸条上设置有检测线 4 和控制线 5,检测线和控制线内分别包被有胃蛋白酶原 II 单克隆抗体和鸡 IgY;冻存管中存放有冻干探针,冻干探针为由胃蛋白酶原 II 单克隆抗体和羊抗鸡 IgY 与两种不同发射光波长的荧光胶乳微粒反应制得的冻干探针,稀释液瓶中存放有样品稀释液;试剂盒体还包括壳体 7,壳体上设置有加样孔 8、检测窗口 9 和把手 10,加样孔设置在样品垫处,检测窗口设置在检测线和控制线处,把手设置在壳体上位于靠近吸水纸的一侧。

[0049] 使用时,将血清样品加入到冻干探针冻存管中,探针分散后取出一定量的液体加入到样品稀释液中,混合均匀后加入到加样孔中即可;随后在荧光检测器下采用与两种荧光胶乳微粒相对应的两种发射光波长进行荧光检测。混合液体中胃蛋白酶原 II 与标记有荧光胶乳微粒的胃蛋白酶原 II 单克隆抗体碰撞结合形成复合物,渗透到样品垫上,混合液体经玻璃纤维过滤杂质后,其中的复合物继续顺着硝酸纤维素膜渗透到检测线上,与固定在检测线上的胃蛋白酶原 II 单克隆抗体形成双抗体夹心的新复合物,检测线上的胃蛋白酶原 II 单克隆抗体与探针中的胃蛋白酶原 II 单克隆抗体,其在胃蛋白酶原 II 上的表位不同;剩余的抗原-荧光标记的抗体复合物、未结合的标记有荧光胶乳微粒的胃蛋白酶原 II 单克隆抗体、以及标记有荧光胶乳微粒的羊抗鸡 IgY 继续渗透到控制线,标记有荧光胶乳微粒的羊抗鸡 IgY 会与控制线上固定的鸡 IgY 结合形成抗原-抗体复合物;荧光检测器下荧光检测时,仅在控制线上检测到信号,才能证明检测结果是有效的。

[0050] 本发明的检测用荧光检测器,包含激发检测模块、前置放大模块、控制分析模块以及软件系统。其中激发检测模块的光源为发射波长为 400 ~ 600nm 的发光二极管,前置放大模块为一前置放大电路。

[0051] 实施例三

[0052] 本发明还提供一种胃蛋白酶原 II 的双波长荧光免疫层析检测的具体实施例,依次包括以下步骤:

[0053] 第一步:冻干探针的制备

[0054] 1) 将两种发射光波长分别为 550nm 和 700nm 的荧光胶乳微粒溶液按照体积比 1:1 的比例进行混合,混合均匀后,取 500 μ l 混合荧光胶乳微粒溶液(含羧基)用 pH6.0MES 缓冲液洗涤离心分离三次后,沉淀用 pH6.0MES 缓冲液稀释,加入 10mg EDC 混匀后,在室温下反应活化 30min,离心分离后,沉淀继续用 pH6.0MES 缓冲液洗涤三遍,随后沉淀用 pH6.0MES 缓冲液稀释,加入 125 μ g 胃蛋白酶原 II 单克隆抗体,室温下反应 3h,加入 BSA 封闭,继续反应 30min,离心后沉淀用 pH7.4PBS 缓冲液洗涤四次,得到标记有荧光胶乳微粒的胃蛋白酶原 II 抗体沉淀,同理可以得到标记有荧光胶乳微粒的羊抗鸡 IgY 沉淀,将沉淀重悬在 500 μ l pH7.4PBS 缓冲液中,加入 15 μ l proclin,在 4 $^{\circ}$ C 下保存。

[0055] 2) 将偶联有胃蛋白酶原 II 单克隆抗体的胶乳微粒与偶联有羊抗鸡 IgY 的胶乳微粒按体积比 6:1 混合,混合胶乳微粒与 50 倍体积的 5% 硅藻糖水溶液漩涡混合,得到探针溶

液,取 30 μ l 探针溶液加入到 500 μ l 冻存管中,在 -80°C 冷冻 2h,取出后在 -25°C 冷冻干燥 4h,密封保存在 4°C 冰箱。

[0056] 第二步:免疫层析检测卡的制备

[0057] 在衬板上依次粘贴硝酸纤维素膜、样品垫和吸水纸,样品垫和吸水纸搭接在膜上,并且紧密相连。分别将与荧光胶乳微粒标记的胃蛋白酶原 II 单克隆抗体位于不同表位另一株胃蛋白酶原 II 单克隆抗体(包被抗体)和羊抗鸡 IgY 用包被液分别配制成 1mg/ml 和 0.5mg/ml 的抗体包被液。将胃蛋白酶原 II 单克隆抗体包被液和鸡 IgY 包被液以 1 μ l/cm 的线速包被在硝酸纤维素膜上对应的检测线和控制线上,检测线和控制线间隔 8mm,在湿度 $<30\%$ 条件下 37°C 烘干 1h 后,制成荧光免疫层析试纸板。

[0058] 用切条机将制备好的荧光免疫层析试纸板纵向切成 4mm 宽的荧光免疫层析试纸条,将其放入卡壳内经压壳机处理得到免疫层析检测卡。

[0059] 第三步:样品稀释液的配制

[0060] 取 0.01M pH7.5 的 PBS 缓冲液 1L,加入 9ml 吐温 20,15g 抗体保护剂,6.1g 牛血清白蛋白和 0.19g 叠氮钠,超声直至固体全部溶解,混匀。

[0061] 实施例四

[0062] 本发明还提供一种胃蛋白酶原 II 的双波长荧光免疫层析检测的具体实施例,依次包括以下步骤:

[0063] 第一步:冻干探针的制备

[0064] 1) 将两种发射光波长分别为 500nm 和 600nm 的荧光胶乳微粒溶液按照体积比 1:5 的比例进行混合,混合均匀后,取 500 μ l 混合荧光胶乳微粒溶液(含羧基)用 pH6.0MES 缓冲液洗涤离心分离三次后,沉淀用 pH6.0MES 缓冲液稀释,加入 2mg EDC 混匀后,在室温下反应活化 1h,离心分离后,沉淀继续用 pH6.0MES 缓冲液洗涤三遍,随后沉淀用 pH6.0MES 缓冲液稀释,加入 62.5 μ g 胃蛋白酶原 II 单克隆抗体,室温下反应 2h,加入 BSA 封闭,继续反应 30min,离心后沉淀用 pH7.4PBS 缓冲液洗涤四次,得到标记有荧光胶乳微粒的胃蛋白酶原 II 抗体沉淀,同理可以得到标记有荧光胶乳微粒的羊抗鸡 IgY 沉淀,将沉淀重悬在 500 μ l pH7.4PBS 缓冲液中,加入 15 μ l proclin,在 4°C 下保存。

[0065] 2) 将偶联有胃蛋白酶原 II 单克隆抗体的胶乳微粒与偶联有羊抗鸡 IgY 的胶乳微粒按体积比 5:1 混合,混合胶乳微粒与 30 倍体积的 5% 硅藻糖水溶液漩涡混合,得到探针溶液,取 25 μ l 探针溶液加入到 500 μ l 冻存管中,在 -80°C 冷冻 2h,取出后在 -25°C 冷冻干燥 4h,密封保存在 4°C 冰箱。

[0066] 第二步:免疫层析检测卡的制备

[0067] 与实施例三中相应步骤相同。

[0068] 第三步:样品稀释液的配制

[0069] 取 0.01M pH7.5 的 PBS 缓冲液 1L,加入 8ml 曲拉通 X-100,15g 抗体保护剂,6.1g 牛血清白蛋白和 0.19g 叠氮钠,超声直至固体全部溶解,混匀。

[0070] 实施例五

[0071] 本发明还提供一种胃蛋白酶原 II 的双波长荧光免疫层析检测的具体实施例,依次包括以下步骤:

[0072] 第一步:冻干探针的制备

[0073] 1) 将两种发射光波长分别为 590nm 和 740nm 的荧光胶乳微粒溶液按照体积比 5:1 的比例进行混合,混合均匀后,取 500 μ l 混合荧光胶乳微粒溶液(含羧基)用 pH6.0MES 缓冲液洗涤离心分离三次后,沉淀用 pH6.0MES 缓冲液稀释,加入 20mg EDC 混匀后,在室温下反应活化 1h,离心分离后,沉淀继续用 pH6.0MES 缓冲液洗涤三遍,随后沉淀用 pH6.0MES 缓冲液稀释,加入 312.5 μ g 胃蛋白酶原 II 单克隆抗体,室温下反应 5h,加入 BSA 封闭,继续反应 30min,离心后沉淀用 pH7.4PBS 缓冲液洗涤四次,得到标记有荧光胶乳微粒的胃蛋白酶原 II 抗体沉淀,同理可以得到标记有荧光胶乳微粒的羊抗鸡 IgY 沉淀,将沉淀重悬在 500 μ l pH7.4PBS 缓冲液中,加入 15 μ l proclin,在 4 $^{\circ}$ C 下保存。

[0074] 2) 将偶联有胃蛋白酶原 II 单克隆抗体的胶乳微粒与偶联有羊抗鸡 IgY 的胶乳微粒按体积比 3:1 混合,混合胶乳微粒与 10 倍体积的 5% 硅藻糖水溶液漩涡混合,得到探针溶液,取 15 μ l 探针溶液加入到 500 μ l 冻存管中,在 -80 $^{\circ}$ C 冷冻 2h,取出后在 -25 $^{\circ}$ C 冷冻干燥 4h,密封保存在 4 $^{\circ}$ C 冰箱。

[0075] 第二步:免疫层析检测卡的制备

[0076] 与实施例三中相应步骤相同。

[0077] 第三步:样品稀释液的配制

[0078] 取 0.01M pH7.5 的 PBS 缓冲液 1L,加入 10ml 聚乙二醇,15g 抗体保护剂,6.1g 牛血清白蛋白和 0.19g 叠氮钠,超声直至固体全部溶解,混匀。

[0079] 实施例六

[0080] 本发明还提供一种胃蛋白酶原 II 的双波长荧光免疫层析检测的样本检测方法,包括以下几个方面:

[0081] 1) 线性、检测限和精密度评估:

[0082] 采用阴性牛血清作为稀释液,将胃蛋白酶原 II 标准品配制成浓度为 50、45、40、35、30、25、20、15、10、5 和 0ng/ml 的标准品溶液,取标准品 100 μ l 与 100 μ l 样品稀释液加入到含有冻干探针的冻存管中,吹打 15 次后取 100 μ l 加入到加样孔中,15 分钟后采用荧光检测器检测。结果表明,500 ~ 590nm 和 600 ~ 740nm 两组发射光光,每组线性的相关系数 r^2 均大于 0.99,检测限分别为 0.50ng/ml 和 0.41ng/ml,各浓度的检测变异系数均小于 8%。

[0083] 2) 线性参数的验证:

[0084] 采用低值人血清和高值人血清,配制浓度为 50、40、30、20、10ng/ml 的胃蛋白酶原 II 人血清溶液,每个样本重复 4 次,结果表明,采用单波长会出现拟合值大于或小于实际值的情况,采用取平均值的方法,可以去除单波长带来的影响, r^2 大于 0.99,最高检测范围可达到 50ng/ml。

[0085] 3) 准确度的评估

[0086] 采用胃蛋白酶原 II 浓度为 1ng/ml 的人血清样本作为基础样本,加入同体积不同浓度的胃蛋白酶原 II 标准物人血清,配制成浓度为 50、15、3ng/ml 的胃蛋白酶原 II 人血清溶液;另一份样本加入相同体积的阴性人血清,对回收样本和基础样本进行 4 次重复检测分析,并进行计算。结果表明,单波长检测回收率在 80% -120% 范围内,采用取平均值的方法,回收率可以在 95% -105% 范围内。其中,回收率 = (回收样本浓度 - 基础样本浓度) / 加入浓度 * 100%,具体见表一。

[0087] 表一 准确度的评估

[0088]

回收率 \ 浓度	50	15	3
500-590nm 拟合值	101.7%	107.5%	124.9%
600-740nm 拟合值	99.4%	92.1%	69.6%
平均拟合值	100.6%	99.8%	97.2%

[0089] 4) 比对试验

[0090] 取不同量值的人血清进行检测,检测值与罗氏试剂检测的量值进行比对,并用所有样本双份测定值进行相关系数计算。结果如图 3 所示,采用单波长检测,相关系数 r^2 均在 0.98,检测值与罗氏试剂检测值相差较大,而采用双波长校正后,相关系数 r^2 均大于 0.99,检测值与罗氏试剂检测值符合性更好。

[0091] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,并不用于限制本发明,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明技术原理的前提下,还可以做出若干改进和变型,这些改进和变型也应视为本发明的保护范围。

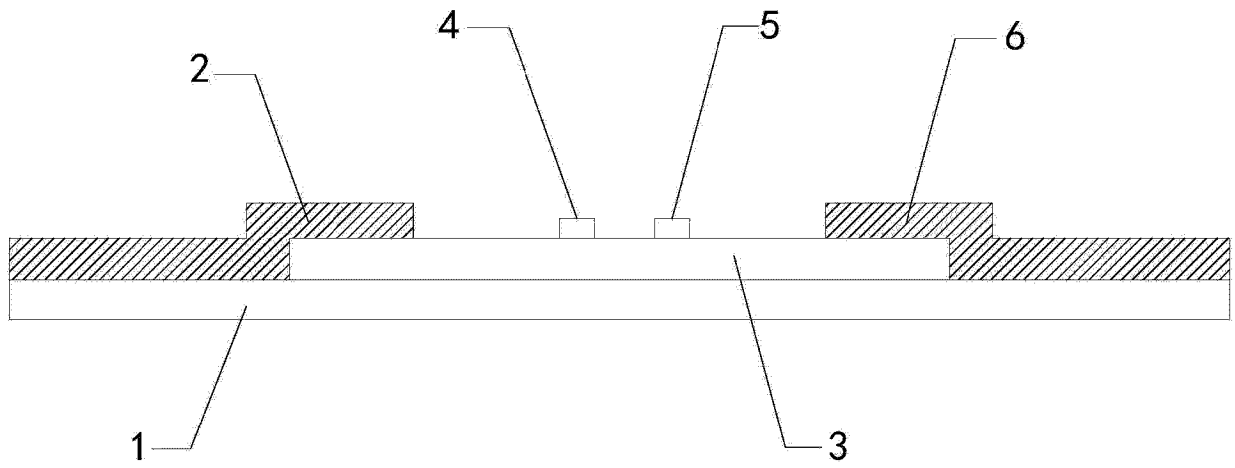


图 1

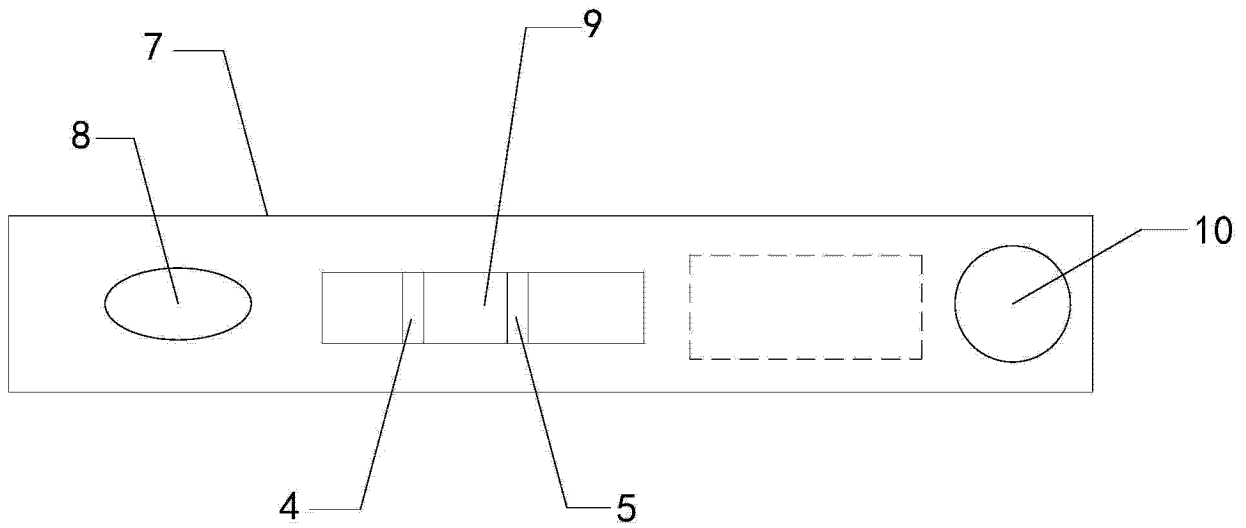


图 2

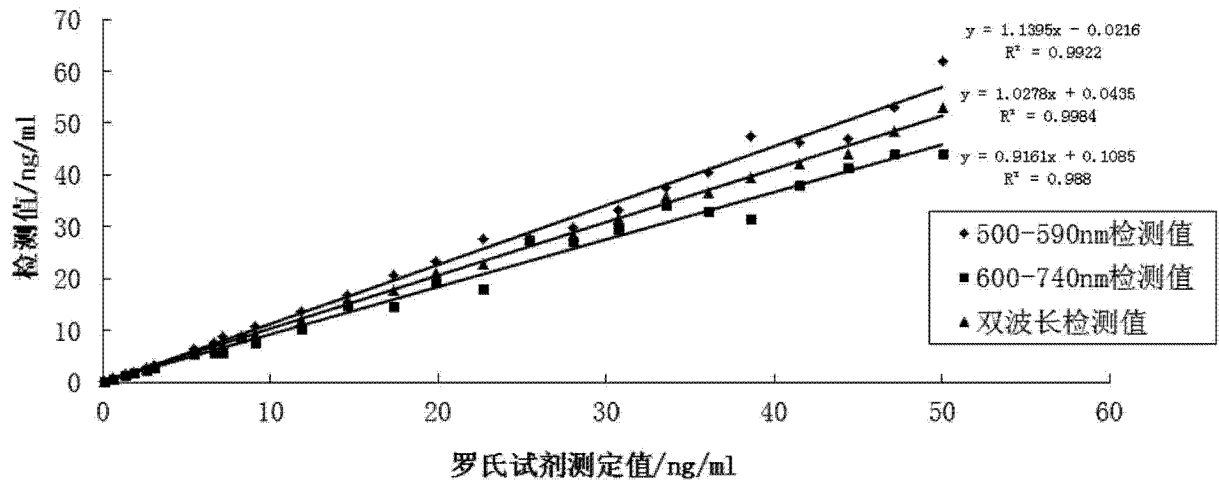


图 3

专利名称(译)	一种胃蛋白酶原II的检测方法及试剂盒		
公开(公告)号	CN104502592A	公开(公告)日	2015-04-08
申请号	CN201410629665.9	申请日	2014-11-10
[标]发明人	张鹏 张翼飞 廖平璋 张华		
发明人	张鹏 张翼飞 廖平璋 张华		
IPC分类号	G01N33/573 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/558 G01N2333/90 G01N2800/06		
代理人(译)	王倩		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种胃蛋白酶原II的检测方法及试剂盒，尤其涉及一种胃蛋白酶原II的双波长荧光免疫层析检测方法及其检测试剂盒。包括以下步骤：1)免疫层析试纸条制备；2)冻干探针制备；3)样品稀释液制备；4)样品检验；本发明的胃蛋白酶原II的检测方法及试剂盒，灵敏度高、准确度高、操作简单、成本低。

