



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103116017 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 22

(21) 申请号 201310024180. 2

(22) 申请日 2013. 01. 22

(71) 申请人 上海市内分泌代谢病研究所

地址 200025 上海市黄浦区瑞金二路 197 号

(72) 发明人 宁光 刘聪 王卫庆 苏頔为

周薇薇 崔斌

(74) 专利代理机构 上海伯瑞杰知识产权代理有

限公司 31227

代理人 吴瑾瑜

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

一种血浆肾素活性的测定方法及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种血浆肾素活性的测定方法
和应用,本发明通过酶促反应-血管紧张素 I 的生成进而免疫测定,以 $B/T(\%)$ 或 $B/B_0(\%)$ 的自然对数为横坐标,以标准品的血管紧张素 I 浓度为横坐标作图。对应样品 37°C 或 4°C 各自位于横坐标的 $B/T(\%)$ 或 $B/B_0(\%)$ 自然对数值,读出纵坐标相应的血管紧张素 I 浓度。计算血浆肾素活性:血浆肾素活性是间接测定每小时体外生成血管紧张素 I 的量。由 37°C 生成的血管紧张素 I 浓度减去 4°C 的基础浓度得到。通过本发明提供的血浆肾素活性的测定方法,所得出的血浆肾素活性可以应用于计算醛固酮/肾素比值 (ARR),进而可以早期诊断高血压患病情况。

1. 一种血浆肾素活性的测定方法,其特征在于:其步骤为:

1) 准备储存液:

a、准备酶促反应抑制液:在小管内加入标注体积的去离子水,轻轻混匀,抑制液应贮存在 2-8℃;

b、贮备冲洗液:把小管内液体倒入 950ml 去离子水中,混匀,贮存在 2-8℃;

2) 酶促反应 - 血管紧张素 I 的生成:

a、在 200ul 样品血清中加入 200ul 预冷的酶促反应抑制液,轻轻混匀;

b、把每份混合液平均分成两份 200ul,分别转移到两个小管中;

c、把第一份小管液放入 4℃水浴中,振荡孵育 1 小时,用来测定血管紧张素 I 的基础浓度;

d、把第二份小管液放入 37℃水浴中,振荡孵育 1 小时,用来测定生成的血管紧张素 I 浓度;

e、孵育结束,把第二份小管液从 37℃迅速降温至 4℃;

3) 免疫测定:

在抗体包被管内依次加入 50ul 标准品、50ul 经 37℃和 4℃孵育的三份样品加入示踪剂 200ul,混匀;18-25℃振荡孵育 2 小时,振速大于 280rpm;除空白管外,终止孵育;用 2ml 冲洗液冲洗;终止两次;测定活性一分钟;

标准曲线:以 $B/T(\%)$ 或 $B/B_0(\%)$ 的自然对数为横坐标,以标准品的血管紧张素 I 浓度为横坐标作图;

样品血清:对应样品 37℃或 4℃各自位于横坐标的 $B/T(\%)$ 或 $B/B_0(\%)$ 自然对数值,读出纵坐标相应的血管紧张素 I 浓度;

计算血浆肾素活性:血浆肾素活性是间接测定每小时体外生成血管紧张素 I 的量;由 37℃生成的血管紧张素 I 浓度减去 4℃的基础浓度得到。

一种血浆肾素活性的测定方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种血浆肾素活性的测定方法及其应用,属于生物测定技术领域。

背景技术

[0002] 据文献报道,继发性高血压约占高血压人群的 10-20%,其中最常见的就是原发性醛固酮增多症(简称原醛症),该病是 1955 年由 Conn 首先发现并命名的一种肾上腺疾病,其致病机制主要是肾上腺皮质肿瘤或增生的肾上腺分泌过量的醛固酮,从而导致水钠潴留、血容量增加、肾素-血管紧张素系统活性受抑制。其临床表现主要为高血压、低血钾、肌无力、多尿、碱血症。在大多数教科书中,原醛症在高血压人群中占不到 2%,但此项数据是基于小样本量的高血压调查,且其中的原醛症患者皆表现为典型的临床特点,包括低钾血症、肾素活性降低和醛固酮过量分泌。Conn 曾断言原醛症患病率可能高达 20%,因为对高血压患者尸体解剖发现,许多患者肾上腺都有结节。而随着 ARR 这一新的诊断指标的应用,在过去被认为是低肾素性原发性高血压的病例都归入原醛症的范围。越来越多证据表明,原醛症患病率在高血压人群中达到 10%,这使得原醛症比糖尿病和甲状腺疾病更为常见,同时也必将影响对这些被当做是原发性高血压患者的治疗。Nadar 等报道了目前在世界范围内认可的在未筛选的高血压患者中原醛症的患病率很低,大概在 2%,甚至小于 1%。而最近一些报道表明,高血压患者中原醛症患病率可达 10-15%。但是,文献对该患病率的报道多有不同。Gordon 等报道高血压人群中原醛的患病率是未知的,且随着地域和种族而不同。最新的来自 Mayo Clinic 的报道表明,大约 20% 的高血压最终诊断为原醛症。近年研究发现,醛固酮过多是导致心肌肥厚、心力衰竭和肾功能受损的重要危险因素,与原发性高血压患者相比,原发性醛固酮增多症患者的肾脏、肾脏等高血压靶器官的损害更为严重,脑血管病的发生率也明显增加。由于此类患者大部分可以通过手术或相应药物治疗达到良好控制,所以早期诊断、早期治疗就显得至关重要。

发明内容

[0003] 本发明的目的是为了提供一种血浆肾素活性的测定方法及其应用,通过这种测定方法,可以快速、准确测定血清醛固酮的含量,为早期诊断高血压患病情况提供依据。

[0004] 本发明的目的可以通过以下技术方案来实现:

[0005] 一种血浆肾素活性的测定方法,其步骤为:

[0006] 1) 准备储存液:

[0007] a、准备酶促反应抑制液:在小管内加入标注体积的去离子水,轻轻混匀,抑制液应贮存在 2-8℃。

[0008] b、贮备冲洗液:把小管内液体倒入 950ml 去离子水中,混匀,贮存在 2-8℃。

[0009] 2) 酶促反应-血管紧张素 I 的生成:

[0010] a、在 200u1 样品血清中加入 200u1 预冷的酶促反应抑制液,轻轻混匀。

[0011] b、把每份混合液平均分成两份 200u1,分别转移到两个小管中。

[0012] c、把第一份小管液放入 4℃水浴中(置于 4℃冰箱中),振荡孵育 1 小时,用来测定血管紧张素 I 的基础浓度。

[0013] f、把第二份小管液放入 37℃水浴中,振荡孵育 1 小时,用来测定生成的血管紧张素 I 浓度。

[0014] g、孵育结束,把第二份小管液从 37℃迅速降温至 4℃。

[0015] 3) 免疫测定:

[0016] 在抗体包被管内依次加入 50ul 标准品或 50ul 经 37℃和 4℃孵育的样品(共三份)加入示踪剂 200ul,混匀。

[0017] 18-25℃振荡孵育 2 小时,振速大于 280rpm。

[0018] 除空白管外,终止孵育。用 2ml 冲洗液冲洗。终止两次。测定活性(cpm)一分钟。

[0019] a 标准曲线:以 B/T(%) 或 B/B₀(%) 的自然对数为横坐标,以标准品的血管紧张素 I 浓度为横坐标作图。

[0020] 样品血清:对应样品 37℃或 4℃各自位于横坐标的 B/T(%) 或 B/B₀(%) 自然对数值,读出纵坐标相应的血管紧张素 I 浓度。计算血浆肾素活性:血浆肾素活性是间接测定每小时体外生成血管紧张素 I 的量。由 37℃生成的血管紧张素 I 浓度减去 4℃的基础浓度得到。

[0021] 本发明血浆肾素活性采用放射免疫方法,试剂盒购自捷克 Immunotech 公司。

[0022] 通过本发明提供的血浆肾素活性的测定方法,所得出的血浆肾素活性可以应用于计算醛固酮/肾素比值(ARR),进而可以早期诊断高血压患病情况。

具体实施方式

[0023] 下面结合具体实施例进一步阐述本发明的技术特点:

[0024] 现场收集的血液在两小时内分离、分装,根据相应的检查要求,放入-80 度冰箱保存,各临床中心通过冷链快递运输至上海市瑞金医院中心实验室,集齐一定数量检测。

[0025] 1) 准备储存液:

[0026] a、准备酶促反应抑制液:在小管内加入标注体积的去离子水,轻轻混匀,抑制液应贮存在 2-8℃。

[0027] b、贮备冲洗液:把小管内液体倒入 950ml 去离子水中,混匀,贮存在 2-8℃。

[0028] 2) 酶促反应-血管紧张素 I 的生成:

[0029] a、在 200ul 样品血清中加入 200ul 预冷的酶促反应抑制液,轻轻混匀。

[0030] b、把每份混合液平均分成两份 200ul,分别转移到两个小管中。

[0031] c、把第一份小管液放入 4℃水浴中(置于 4℃冰箱中),振荡孵育 1 小时,用来测定血管紧张素 I 的基础浓度。

[0032] d、把第二份小管液放入 37℃水浴中,振荡孵育 1 小时,用来测定生成的血管紧张素 I 浓度。

[0033] e、孵育结束,把第二份小管液从 37℃迅速降温至 4℃。

[0034] 3) 免疫测定:

[0035] 在抗体包被管内依次加入 50ul 标准品或 50ul 经 37℃和 4℃孵育的样品(共三份)加入示踪剂 200ul,混匀。

[0036] 18-25℃振荡孵育 2 小时,振速大于 280rpm。

[0037] 除空白管外,终止孵育。用 2ml 冲洗液冲洗。终止两次。测定活性(cpm)一分钟。

[0038] a 标准曲线:以表 1 数据的 B/T(%) 或 B/B₀(%) 的自然对数为横坐标,以标准品的血管紧张素 I 浓度为横坐标作图:

[0039] 表 1:

标准品	血管紧张素 I (ng/ml)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B ₀ (%)
0	0.00	28,933	24.7	100
1	0.27	24,300	20.7	84.0
2	0.90	18,918	16.1	65.4
3	2.70	12,303	10.5	42.5
4	9.00	7,041	6.00	24.3
5	27.00	4,262	3.60	14.7

[0041] 总活性:117235cpm

[0042] 样品血清:对应样品(37℃或 4℃各自位于横坐标的 B/T(%) 或 B/B₀(%) 自然对数值,读出纵坐标相应的血管紧张素 I 浓度。计算血浆肾素活性:血浆肾素活性是间接测定每小时体外生成血管紧张素 I 的量。由 37℃生成的血管紧张素 I 浓度减去 4℃的基础浓度得到。

[0043] 其公式为:

[0044]

$$2 \text{ PRA ng of A-I /mL/hr} = \frac{[A-I (37^{\circ}\text{C}) - A-I (4^{\circ}\text{C})] \times}{\text{Enzymatic incubation time (hrs)}}$$

[0045] 质量评定:检测的批次间差异为变异系数等于或低于 10.4%;批次内差异为变异系数等于或低于 10.5%。

专利名称(译)	一种血浆肾素活性的测定方法及其应用		
公开(公告)号	CN103116017A	公开(公告)日	2013-05-22
申请号	CN201310024180.2	申请日	2013-01-22
[标]申请(专利权)人(译)	上海市内分泌代谢病研究所		
申请(专利权)人(译)	上海市内分泌代谢病研究所		
当前申请(专利权)人(译)	上海市内分泌代谢病研究所		
[标]发明人	宁光 刘聪 王卫庆 苏颐为 周薇薇 崔斌		
发明人	宁光 刘聪 王卫庆 苏颐为 周薇薇 崔斌		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种血浆肾素活性的测定方法和应用，本发明通过酶促反应-血管紧张素I的生成进而免疫测定，以B/T(%)或B/B₀(%)的自然对数为横坐标，以标准品的血管紧张素I浓度为横坐标作图。对应样品37℃或4℃各自位于横坐标的B/T(%)或B/B₀(%)自然对数值，读出纵坐标相应的血管紧张素I浓度。计算血浆肾素活性：血浆肾素活性是间接测定每小时体外生成血管紧张素I的量。由37℃生成的血管紧张素I浓度减去4℃的基础浓度得到。通过本发明提供的血浆肾素活性的测定方法，所得出的血浆肾素活性可以应用于计算醛固酮/肾素比值（ARR），进而可以早期诊断高血压患病情况。

标准品	血管紧张素 I (ng/ml)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B ₀ (%)
0	0.00	28,933	24.7	100
1	0.27	24,300	20.7	84.0
2	0.90	18,918	16.1	65.4
3	2.70	12,303	10.5	42.5
4	9.00	7,041	6.00	24.3
5	27.00	4,262	3.60	14.7