



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103995127 B

(45) 授权公告日 2016. 05. 25

(21) 申请号 201410191707. 5

(22) 申请日 2014. 05. 07

(66) 本国优先权数据

201320646695. 1 2013. 10. 16 CN

(73) 专利权人 江苏宜侓维盛生物技术有限公司

地址 211300 江苏省南京市高淳经济开发区
双高路 86-7 号

(72) 发明人 杨雷 刘扬 刘琴 代丽

(74) 专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权
代理有限公司 23211

代理人 耿晓岳

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

审查员 李宏悦

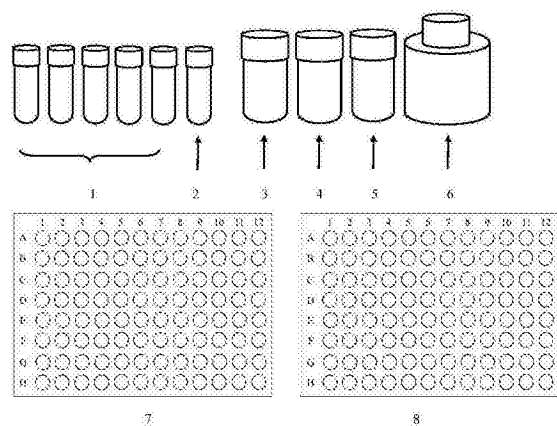
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种 PGI 和 PGII 联合检测试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种 PGI 和 PGII 联合检测试剂盒,属于体外诊断试剂领域。本发明试剂盒主要由以下部分组成:包被有抗 PGI 抗体的微孔板、包被有抗 PGII 抗体的微孔板、酶标抗体、校准品、质控品、显色剂、终止液、浓缩洗涤液。运用酶联免疫一步法快速检测技术,量程宽、样本需求量少、灵敏度高达 0.1 μg/L;并且使用高特异性的抗体和抗原使 PGI 和 PGII 的检测试剂实现整合通用,使试剂盒的整个检测时间比同类别的检测试剂缩短 45-60 分钟;最终实现操作简单和快速检测,便于临床使用。



1. 一种PGI和PGII联合检测试剂盒,其特征在于,主要由以下部分组成:包被有PGI抗体的微孔板、包被有PGII抗体的微孔板、酶标抗体、校准品、底物液、终止液、浓缩洗涤液;

所述酶标抗体为PGI和PGII抗体标记的辣根过氧化物酶;

所述分别包被有PGI抗体、PGII抗体的微孔板的制备步骤如下:

(1)包被:将包被液按100 μ l/孔加入微孔板,封板膜封闭微孔板,放置于4 $^{\circ}$ C冰箱过夜,用稀释至0.025M的浓缩洗涤液洗板5次;所述包被液包括PGI包被液和PGII包被液,PGI包被液是将PGI抗体用包被缓冲液配制成0.5 μ g/ml浓度,搅拌混匀;PGII包被液是将PGII抗体用包被缓冲液配制成0.5 μ g/ml浓度,搅拌混匀;

(2)封闭:将封闭液按300 μ l/孔加入微孔板;封板膜封闭微孔板,放置于37 $^{\circ}$ C封闭1小时;用稀释至0.025M的浓缩洗涤液洗板5次;

(3)真空包装:将经上述处理后的微孔板放置于37 $^{\circ}$ C烘箱干燥0.5小时;立即用真空包装机进行真空包装;

所述酶标抗体效价为100IU/ml,酶标抗体稀释液是含有0.5%(m/v)酪蛋白、1%(m/v)蔗糖、0.01%(m/v)叠氮钠的0.1M的磷酸盐缓冲液,pH7.4;

所述底物液的组成为:0.2mg/ml过氧化脲、0.1M柠檬酸缓冲液、0.5mg/ml3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、0.01%(v/v)二甲基亚砷,pH5.5;

所述浓缩洗涤液的组成为:0.5M磷酸盐缓冲液,2.0%(m/v)十二烷基硫酸钠,pH7.4。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括质控品、封板膜和说明书。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述PGI抗体和PGII抗体是利用PGI和PGII抗原蛋白免疫小鼠制备单克隆抗体得到,或直接购买商业化PGI抗体和PGII抗体产品;所述PGI和PGII抗原蛋白是通过基因工程克隆表达得到的蛋白。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述校准品为用校准品稀释液配制的不同浓度PGI和PGII抗原蛋白溶液,校准品浓度范围:PGI为0-180 μ g/L,PGII为0-50 μ g/L;

所述校准品稀释液是含有1 μ g/ml牛乳糖、3%(m/v)甘露醇、1%(m/v)蔗糖、1%麦芽糖(m/v)、1%山梨醇(m/v)、0.01%(m/v)叠氮钠的0.01M的磷酸盐缓冲液,pH7.4。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述终止液为2M的硫酸。

一种PGI和PGII联合检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种PGI和PGII联合检测试剂盒,尤其是通过酶联免疫一步法联合检测PGI和PGII的试剂盒,属于体外诊断试剂领域。

背景技术

[0002] 胃癌是全球高危死亡率的第二大疾病,严重威胁着人类健康。胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,死亡率居各种恶性肿瘤前列,全球每年934,000新发胃癌病例,42%(近40万)的新发病例数在我国,胃癌在我国的患病率和死亡率均是世界水平的2倍多。其早期诊断、早期治疗是提高患者生存质量、降低死亡率的唯一途径,改善胃癌患者预后的关键是作好二级预防,血清胃蛋白酶原(PG)检测可以作为胃癌筛查“二步法”中的初筛方法。联合测定PGI和PGII的水平及其比值可起到胃黏膜“血清学活检”的作用,有利于胃癌的预防干预、早期诊断以及术后复发预测。近年来,血清PG含量的变化与胃癌及其他胃部疾病的关系及其作为初筛手段在胃癌筛查中的应用已引起越来越多研究者的关注。

[0003] PG是一种门冬氨酸蛋白酶前体,是分子质量为42KDa的单链多肽。人类PG依其电泳迁移率可以分为7个组分,1-5组分的免疫原性相同,成为PGI,主要由胃腺的主细胞和黏液颈细胞分泌;组分6-7被称为PGII,除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。由于胃几乎是PG的唯一来源,并且在分泌阶段的分泌量会发生变化,因此,血清PGI和PGII不仅反映了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。

[0004] 通常情况下约有1%的PG通过胃黏膜进入血液循环,进入血液循环的PG在血液中非常稳定。血清PG水平是反映胃黏膜形态和功能的良好指标。大部分酶原进入胃腔,经酸解成具有活性的胃蛋白酶发挥其消化蛋白质的作用。但也有少量透过胃黏膜毛细血管进入血液,可从血清中检测。当胃粘膜发生病变时,血清中PG的含量也随之发生改变。血清PG含量的变化与胃癌及其他胃部疾病的关系及其作为初筛手段在胃癌筛查中的应用已引起越来越多研究者的关注。研究发现,在常规体检中大约有15%左右的人的血清PG水平异常,而进一步进行胃镜检查,其中90%以上的患者有不同程度的浅表性胃炎、糜烂性胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、萎缩性胃炎、胃癌等胃部疾病。近年来,血清PG含量的变化与胃癌及其他胃部疾病的关系及其作为初筛手段在胃癌筛查中的应用已引起越来越多研究者的关注。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种PGI和PGII联合检测试剂盒。所述试剂盒利用抗原抗体特异性反应来检测血清中PGI和PGII的含量,主要由以下部分组成:包被有PGI抗体的微孔板、包被有PGII抗体的微孔板、酶标抗体、校准品、底物液、终止液、浓缩洗涤液。

[0006] 所述试剂盒还包括质控品、封板膜和说明书。

[0007] 所述PGI抗体和PGII抗体是利用PGI和PGII抗原蛋白免疫小鼠制备单克隆抗体得到,或直接购买商业化PGI抗体和PGII抗体产品。所述PGI和PGII抗原蛋白是通过基因工程

克隆表达得到的蛋白。

[0008] 所述分别包被有PGI抗体、PGII抗体的微孔板的制备：

[0009] (1)包被：用包被机或移液器将包被液按100 μ I/孔加入微孔板，封板膜封闭微孔板，放置于4 $^{\circ}$ C冰箱过夜，用洗板机、稀释至0.025M的浓缩洗涤液洗板5次；所述包被液包括PGI包被液和PGII包被液，PGI包被液是将PGI抗体用包被缓冲液配制成0.5 μ g/ml浓度，搅拌均匀；PGII包被液是将PGII抗体用包被缓冲液配制成0.5 μ g/ml浓度，搅拌均匀；所述微孔板是96孔板；

[0010] (2)封闭：用包被机或移液器将封闭液按300 μ I/孔加入微孔板；封板膜封闭微孔板，放置于37 $^{\circ}$ C封闭1小时；用洗板机、稀释至0.025M的浓缩洗涤液洗板5次；

[0011] (3)真空包装：将经上述处理后的微孔板放置于37 $^{\circ}$ C烘箱干燥0.5小时；立即用真空包装机进行真空包装。

[0012] 所述酶标抗体为PGI和PGII抗体标记的辣根过氧化物酶，使用酶标抗体效价为100IU/ml，酶标抗体稀释液是含有0.5% (m/v)酪蛋白、1% (m/v)蔗糖、0.01% (m/v)叠氮钠的0.1M的磷酸盐缓冲液，pH7.4。

[0013] 所述校准品为用校准品稀释液配制的不同浓度PGI和PGII抗原蛋白溶液，校准品浓度范围：PGI为0-180 μ g/L，PGII为0-50 μ g/L；所述校准品稀释液是含有1 μ g/ml牛乳糖、3% (m/v)甘露醇、1% (m/v)蔗糖、1% 麦芽糖(m/v)、1% 山梨醇(m/v)、0.01% (m/v)叠氮钠的0.01M的磷酸盐缓冲液，pH7.4。

[0014] 所述质控品是用质控品稀释液配制的PGI：60.0 μ g/L、PGII：16.0 μ g/L，所述质控品稀释液是含有1 μ g/ml牛乳糖、3% (m/v)甘露醇、1% (m/v)蔗糖、1% (m/v)麦芽糖、1% (m/v)山梨醇、0.01% (m/v)叠氮钠的0.01M的磷酸盐缓冲液，pH7.4。

[0015] 所述底物液的组成为：0.2mg/ml过氧化脲，0.1M柠檬酸缓冲液，0.5mg/ml 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)，0.01% (v/v)二甲基亚砜(DMSO)，pH5.5。

[0016] 所述终止液为2M的硫酸。

[0017] 所述浓缩洗涤液的组成为：0.5M磷酸盐缓冲液，2.0% (m/v)十二烷基硫酸钠，pH7.4。

[0018] 应用所述试剂盒检测血清PGI和PGII浓度的方法为：将检测样本和酶标抗体在微孔板中进行酶联免疫反应，然后用洗涤液洗板，再向微孔板中加入底物液(显色剂)显色反应，最后加入终止液测定450nm吸光值，与标准曲线比较、计算得到血清PGI和PGII含量。

[0019] 所述应用方法优选以下步骤：(1)首先在微孔板反应孔中依次加入10 μ I样本和90 μ I酶标抗体，混匀；(2)37 $^{\circ}$ C孵育45分钟；(3)用稀释至0.025M的浓缩洗涤液洗板5次，扣干；(4)加入底物液100 μ I，盖上封板膜，37 $^{\circ}$ C温育避光显色15分钟；(5)加入终止液50 μ I，然后用酶标仪测定450nm吸光值；(6)以PGI和PGII校准品检测吸光度值为横坐标，以对应浓度值为纵坐标进行二次方程拟合，分别得到PGI和PGII标准曲线，然后将样本检测PGI和PGII吸光度值分别代入PGI和PGII标准曲线计算出样本PGI和PGII浓度值；(7)检测结果判定标准为：PGI正常值范围40~158 μ g/L，PGII正常值范围0~16 μ g/L。

[0020] 本发明提供的PGI和PGII联合检测试剂盒，运用酶联免疫一步法快速检测技术，运用特殊包被液制备的微孔板和加速抗原抗体反应的酶标抗体稀释液，量程宽，能不稀释血清样本直接检测；样本需求量少，一次上样只需要50 μ I，比目前市场上同类产品上样量减少

一倍;灵敏度高达0.1 μ g/L;并且实现了PGI和PGII的检测试剂整合通用,使试剂盒的整个检测时间比同类别的检测试剂缩短45-60分钟,克服了PGI和PGII抗体之间交叉反应的问题;此外,本发明试剂盒的96微孔板能同时检测96个样品,适合大批量检测。本发明试剂盒操作简单、检测快速,成本低,便实用。

附图说明

[0021] 图1:PGI/II联合检测试剂盒(酶联免疫一步法)的组成示意图;1,校准品1-校准品5;2,质控品;3,酶标抗体;4,终止液;5,底物液;6,浓缩洗涤液;7,胃蛋白酶原I微孔板;8,胃蛋白酶原II微孔板。

[0022] 图2:PGI/II联合检测试剂盒胃蛋白酶原I标准曲线。

[0023] 图3:PGI/II联合检测试剂盒胃蛋白酶原II标准曲线。

具体实施方式

[0024] 实施例1试剂盒的制备

[0025] 1.溶液配制

[0026] a)包被缓冲液:0.1M碳酸盐缓冲液(pH9.6);

[0027] b)封闭液:0.1M磷酸盐缓冲液,1.0%(m/v)牛血清白蛋白(BSA),0.5%(m/v)酪蛋白,pH7.4;

[0028] c)浓缩洗涤液:0.5M磷酸盐缓冲液,2.0%(m/v)十二烷基硫酸钠,pH7.4;

[0029] d)酶标抗体稀释液:0.1M Tris盐酸缓冲液,pH8.5;

[0030] e)底物液:0.2mg/ml过氧化脲,0.1M柠檬酸缓冲液,0.5mg/ml3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),0.01%(v/v)二甲基亚砷(DMSO),pH5.5;

[0031] f)终止液:2M硫酸;

[0032] g)校准品稀释液:0.1M PBS,pH7.4。

[0033] 2.微孔板制备

[0034] 2.1包被液配制

[0035] (1)PGI包被液:PGI抗体用包被缓冲液配制成0.5 μ g/ml浓度,搅拌混匀。

[0036] (2)PGII包被液:PGII抗体用包被缓冲液配制成0.5 μ g/ml浓度,搅拌混匀。

[0037] 2.2包被

[0038] (1)将PGI、PGII包被液按100 μ l/孔加入微孔板;

[0039] (2)封板膜封闭微孔板,放置于4 $^{\circ}$ C冰箱过夜(16-18小时);

[0040] (3)用20倍稀释的浓缩洗涤液洗板5次。

[0041] 2.3封闭

[0042] (1)用包被机或移液器将封闭液按300 μ l/孔加入微孔板;

[0043] (2)封板膜封闭微孔板,放置于37 $^{\circ}$ C封闭1小时;

[0044] (3)用20倍稀释的浓缩洗涤液洗板5次。

[0045] 2.4真空包装

[0046] (1)将上述处理后的微孔板放置于37 $^{\circ}$ C烘箱干燥0.5小时;

[0047] (2)立即用真空封装机进行真空包装。

[0048] 3.分装

[0049] (1)酶标抗体分装:用自动灌装机按照20.0mI/瓶,灌装于30mI白色塑料瓶中,并随灌装进行及时旋上瓶盖;

[0050] (2)底物液分装:用自动灌装机按照20.0mI/瓶,灌装于30mI棕色塑料瓶中,并随灌装进行及时旋上瓶盖;

[0051] (3)浓缩洗涤液分装:用自动灌装机按照50.0mI/瓶,灌装于50mI白色塑料瓶中,并随灌装进行及时旋上瓶盖;

[0052] (4)终止液分装:用自动灌装机按照12.0mI/瓶,灌装于15mI白色塑料瓶中,并随灌装进行及时旋上瓶盖;

[0053] (5)校准品分装:取大小适用的5个容器,配制浓度点依次为0.0、30.0、70.0、120.0、180.0 μ g/L的校准品,用自动灌装机按照0.6mI/瓶,灌装于1.8mI白色塑料瓶中,并随灌装进行及时旋上瓶盖;

[0054] (6)质控品分装:配制PGI:60.0 μ g/L、PGII:16.0 μ g/L的质控品,用自动灌装机按照0.6mI/瓶,灌装于1.8mI白色塑料瓶中,并随灌装进行及时旋上瓶盖;

[0055] 4.试剂盒组装

[0056] 将各组按照下表的进行组合,即为PGI/II联合检测试剂盒(酶联免疫一步法)。

[0057] 表1PGI/II联合检测试剂盒(酶联免疫一步法)组成成分

[0058]

名称	规格	数量/盒	主要成分
校准品	0.6mI/瓶	5	PGI/II蛋白原料
质控品	0.6mI/瓶	1	PGI/II蛋白原料
酶标抗体	20.0mI/瓶	1	HRP
底物液	20.0mI/瓶	1	四甲基联苯胺
终止液	12.0mI/瓶	1	硫酸

[0059]

10 \times 浓缩洗涤液	50.0mI/瓶	1	磷酸盐
PGI微孔板	96孔/板	1	PGI单克隆抗体
PGII微孔板	96孔/板	1	PGII单克隆抗体
封板膜	85mm \times 140mm	3	
说明书	A4	1	

[0060] 实施例2应用试剂盒检测的步骤

[0061] (1)首先在微孔板反应孔中依次加入10 μ I样本和90 μ I酶标抗体,混匀;

[0062] (2)37 $^{\circ}$ C孵育45分钟;

[0063] (3)用稀释好的浓缩洗涤液洗板5次,扣干;

[0064] (4)加入底物液100 μ I,盖上封板膜,37 $^{\circ}$ C温育避光显色15分钟;

[0065] (5)加入终止液50 μ I,然后立即用酶标仪测定450nm吸光值。

[0066] (6)以PGI和PGII校准品检测吸光度值为横坐标,以对应浓度值为纵坐标进行二次方程拟合,分别得到PGI和PGII标准曲线(图2、3);然后将样本检测PGI和PGII吸光度值分别输入PGI和PGII标准曲线计算出样本PGI和PGII浓度值;

[0067] (7)检测结果判定标准为:PGI正常值范围40~158 $\mu\text{g/L}$,PGII正常值范围0~16 $\mu\text{g/L}$ 。

[0068] 实施例3试剂盒实际病例检测

[0069] 运用本试剂盒按照实施例2的操作步骤分析了602名正常人(体检后证实无消化道、肝、肾疾病,无胃痛史人群)及胃病组263例(经胃镜检查、病理确诊,分为4组:慢性萎缩性胃炎组58例,十二指肠球溃疡组86例,胃癌组115例,贲门癌组4例)。结果如表2:

[0070] 表2本试剂盒检测不同人群血清PGI和PGII

[0071]

组别	例数	PGI($\mu\text{g/L}$)	PGII($\mu\text{g/L}$)	PGI/PGII
正常组	602	99.3 \pm 58.9	12.3 \pm 3.8	7.6 \pm 4.3
慢性萎缩性胃炎	58	22.5 \pm 18.5	10.2 \pm 7.8	2.6 \pm 1.9
十二指肠球溃疡	86	147.3 \pm 63.8	18.7 \pm 6.3	8.2 \pm 5.7
胃癌组	115	18.5 \pm 15.1	8.4 \pm 6.9	2.1 \pm 1.5
贲门癌组	4	24.6 \pm 10.2	10.6 \pm 8.3	2.5 \pm 1.5

[0072] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明的精神和范围内,都可做各种的改动与修饰,因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

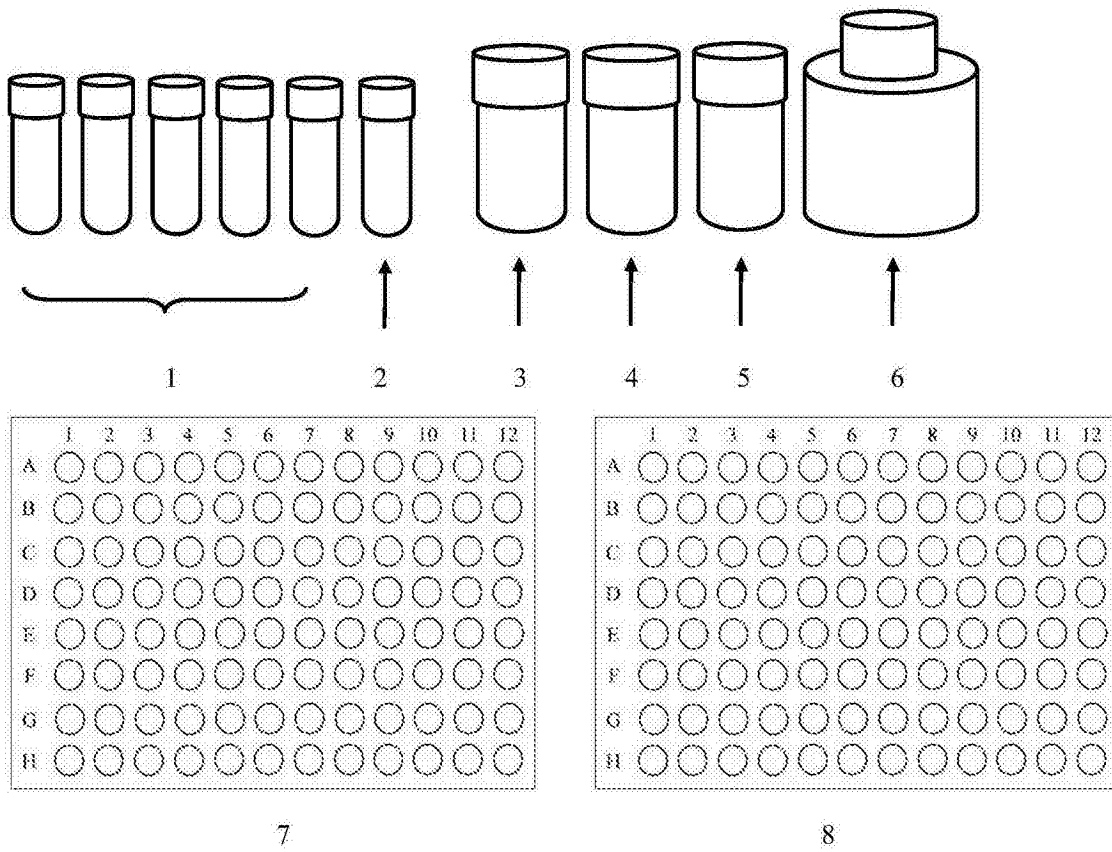


图1

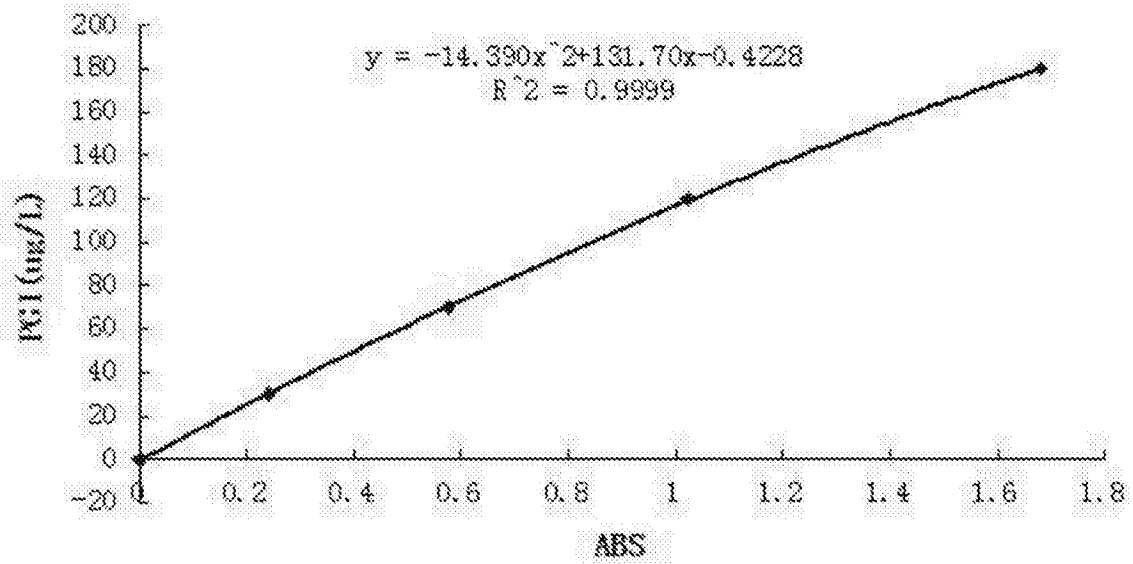


图2

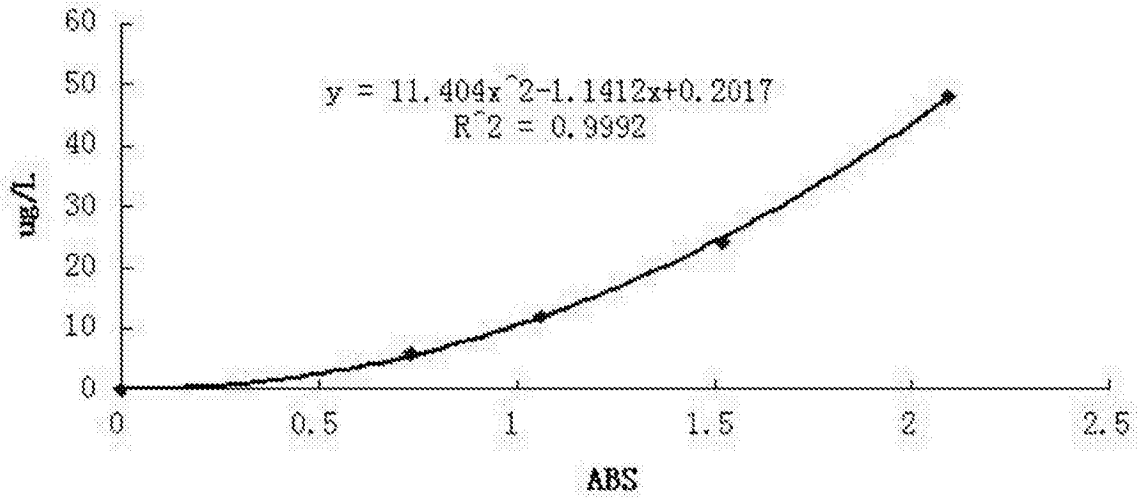


图3

专利名称(译)	一种PGI和PGII联合检测试剂盒		
公开(公告)号	CN103995127B	公开(公告)日	2016-05-25
申请号	CN201410191707.5	申请日	2014-05-07
[标]申请(专利权)人(译)	无锡宜诺维盛生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	无锡宜诺维盛生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏宜诺维盛生物技术有限公司		
[标]发明人	杨雷 刘扬 刘琴 代丽		
发明人	杨雷 刘扬 刘琴 代丽		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/57446 G01N33/581 G01N33/68		
优先权	201320646695.1 2013-10-16 CN		
其他公开文献	CN103995127A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种PGI和PGII联合检测试剂盒，属于体外诊断试剂领域。本发明试剂盒主要由以下部分组成：包被有抗PGI抗体的微孔板、包被有抗PGII抗体的微孔板、酶标抗体、校准品、质控品、显色剂、终止液、浓缩洗涤液。运用酶联免疫一步法快速检测技术，量程宽、样本需求量少、灵敏度高达0.1μg/L；并且使用高特异性的抗体和抗原使PGI和PGII的检测试剂实现整合通用，使试剂盒的整个检测时间比同类别的检测试剂缩短45-60分钟；最终实现操作简单和快速检测，便于临床使用。

