



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104142399 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 12

(21) 申请号 201310166881. X

G01N 33/558 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 05. 08

(71) 申请人 北京美康生物技术研究中心有限责
任公司

地址 100070 北京市丰台区南四环西路 188
号总部基地 15 区 5 号楼 8 层

(72) 发明人 金鑫 曾滨

(74) 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理
有限责任公司 11139

代理人 孙皓晨

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书13页 附图2页

(54) 发明名称

一种利用胶体金免疫层析技术定量检测血清
胃蛋白酶原的试纸条及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种利用胶体金免疫层析技术定量检测血清胃蛋白酶原的试纸条及其制备方法和应用。本发明的试剂盒包括分别用于胃蛋白酶原 I 以及用于胃蛋白酶原 II 检测的试纸条,所述的试纸条按照连接顺序依次包括样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜以及吸水垫,还包括位于下方的塑料底衬,其中塑料底衬的作用是提供组装平台,硝酸纤维素膜上具有胃蛋白酶原 I 或 II 喷涂的质控线,以及胃蛋白酶原 I 或胃蛋白酶原 II 的二抗喷涂的检测线,金标垫上涂覆有胶体金颗粒标记的胃蛋白酶原 I 或胃蛋白酶原 II 的单克隆抗体,样品垫提供了待测样品加入的位置。本发明试剂盒可以直接定量检测胃蛋白酶原,不需专业培训,操作方便,快速,适合在基层医院和体检中心推广和运用。

1. 一种利用胶体金免疫层析技术定量检测血清胃蛋白酶原的试剂盒,其特征在于所述试剂盒包括分别用于胃蛋白酶原 I 以及用于胃蛋白酶原 II 检测的试纸条,所述的试纸条按照连接顺序依次包括样品垫(4)、金标垫(3)、硝酸纤维素膜(2)以及吸水垫(5),还包括位于下方的塑料底衬(1)、其中塑料底衬(1)的作用是提供组装平台,硝酸纤维素膜(2)上具有胃蛋白酶原 I 或胃蛋白酶原 II 喷涂的质控线,以及胃蛋白酶原 I 或胃蛋白酶原 II 的二抗喷涂的检测线,金标垫(3)上涂覆有胶体金颗粒标记的胃蛋白酶原 I 或胃蛋白酶原 II 的单克隆抗体,样品垫(4)提供了待测样品加入的位置。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述的胃蛋白酶原 I 或胃蛋白酶原 II 为人胃蛋白酶原 I 或蛋白酶原 II 的天然蛋白。

3. 如权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于所述的胃蛋白酶原 I 或胃蛋白酶原 II 是按照以下方法制备得到的:

(1) 收集外科手术切除的正常人胃组织,用磷酸盐缓冲液漂洗,分离胃粘膜,吸干,称重,加入磷酸盐缓冲液,捣碎匀浆,离心,收集上清,沉淀用磷酸盐缓冲液重悬,再次离心,合并上清液,得到胃蛋白酶原粗提液;

(2) 将胃蛋白酶原粗提液加入已经平衡的 DEAE-52 层析柱,用 PBS 缓冲液洗脱层析柱至在 280nm 处,吸光值为 0,继续用 PBS 缓冲液洗脱层析柱,合并洗脱峰,得到含有活性的胃蛋白酶原;

(3) 取活性胃蛋白酶原峰,上样于凝胶层析柱,用 50-80mM 的含 0.05-0.1mol/L Na_2SO_4 的 PBS 洗脱,流速 3.0-5.0ml/min,压力为 8Kpa,洗脱曲线为显示 4 个蛋白洗脱峰,第三个蛋白峰即为胃蛋白酶原 I,第四个蛋白峰为胃蛋白酶原 I 及胃蛋白酶原 II 的混合物;

(4) 采用 Q-2 阴离子交换层析柱分离胃蛋白酶原 I 和胃蛋白酶原 II 的混合物,凝胶层析后的第四个洗脱峰先用 0.05-0.1mol/L This-HCL, pH7.0 透析后上样阴离子层析柱,用浓度为 0-0.5mol/L NaCl 梯度洗脱,流速为 1ml/min;出现三个蛋白峰,其中第 1,2 个峰为胃蛋白酶原 I,第三峰为胃蛋白酶原 II。

4. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述的胶体金颗粒标记的胃蛋白酶原 I 或胃蛋白酶原 II 的单克隆抗体是按照以下方法制备得到的:

(1) 胶体金的制备

先将 100ml 的 0.01% 氯金酸溶液加热至沸腾,迅速加入 1ml 的 1% 柠檬酸三钠溶液,煮沸 7-10min 出现透明的酒红色,最后加蒸馏水至 100ml,然后用电镜镜检,制备的金颗粒大小一致,均匀,颗粒直径为 40nm;

(2) 单克隆抗体的标记

待标记的抗体蛋白用 0.005-0.1mol/L 的氯化钠溶液透析 48 小时除盐,然后用制备好的颗粒直径为 40nm 的胶体金来标记单克隆抗体蛋白,具体步骤为:

① 向搅拌中的胶体金溶液里迅速加入抗体蛋白,25℃ 室温孵育 15-30min;

② 用 0.1-0.5mol/L 的 K_2CO_3 调节胶体金溶液的 pH 为 7.0-7.6,然后加入 1-10%BSA 封闭,反应 15-20min;

③ 10000rpm 离心 20-30min,弃上清,再用 pH 为 7.5-8.0 的含 1-10%BSA 的 2-6mM 的硼酸盐缓冲液洗涤,共洗涤 3 次;

④ 最后加入 pH7.4 的含 4-10%蔗糖、6-10%海藻糖、0.05-1%BSA 和 2mM 硼酸盐缓冲液中,

4℃储存备用。

5. 如权利要求 4 所述的试剂盒,其特征在于步骤(2)单克隆抗体的标记是按照以下方法制备得到的:

待标记的单克隆抗体蛋白用 0.1mol/L 的氯化钠溶液透析 48 小时除盐,然后用制备好的颗粒直径为 40nm 的胶体金来标记单克隆抗体蛋白,具体步骤为:

①向搅拌中的胶体金溶液里迅速加入单克隆抗体蛋白,25℃室温孵育 25min;

②用 0.1mol/L 的 K_2CO_3 调节金溶液的 pH 为 7.0,然后加入 5%BSA 封闭,反应 20min;

③ 10000rpm 离心 20min,弃上清,再用 pH 为 7.5 的含 5%BSA 的 4mM 的硼酸盐缓冲液洗涤,共洗涤 3 次;

④最后加入 pH7.4 含 7%蔗糖、8%海藻糖、0.5%BSA 的 2mM 硼酸盐缓冲液中,4℃储存备用。

6. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述的金标垫是通过将浓度为 0.2mg/ml 的胶体金颗粒标记的胃蛋白酶原 I 或胃蛋白酶原 II 的单克隆抗体以 $30 \mu l/cm^2$ 喷涂在金标垫上后得到的,所述的检测线是将浓度为 1mg/ml 的胃蛋白酶原二抗溶液以 $1 \mu l/cm$, 10cm/秒的速度喷涂到硝酸纤维膜上得到的,所述的质控线是将浓度为 1mg/ml 的胃蛋白酶原抗原溶液以 $1 \mu l/cm$, 10cm/秒的速度喷涂到硝酸纤维膜上得到的,检测线与质控线的距离为 0.5cm。

7. 权利要求 1-6 任一项所述的试剂盒在制备定量检测血清胃蛋白酶原试剂中的应用。

一种利用胶体金免疫层析技术定量检测血清胃蛋白酶原的 试纸条及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种筛查胃部疾病的试剂,尤其涉及一种利用胶体金免疫层析技术并通过定量检测人血清胃蛋白酶原 I 及胃蛋白酶原 II 的含量来筛查及疗效评估的胃相关疾病及早期胃癌的试纸条,属于胃病或早期胃癌的快速筛查及疗效评估领域。

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,血清胃蛋白酶原检测可以作为胃癌筛查“二步法”中的初筛方法。联合测定胃蛋白酶原 I (PG I) 和胃蛋白酶原 II (PG II) 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] 人胃黏膜可分泌两种胃蛋白酶原(PG),即 PG I 和 PG II,它们都是胃蛋白酶的前体。通常情况下,大部分进入胃腔内,在酸性条件下水解为胃蛋白酶参与蛋白的分解;约有 1%PG 通过胃粘膜毛细管进入血循环,进入血循环的 PG 在血液中非常稳定,血清 PG 水平可反映不同部位胃粘膜的形态和功能。血清 PGI 和 PGII 检测在胃部疾病或早期胃癌的筛查、胃部疾病疗效的评价及健康人群胃功能动态检测方面都具有重要意义。

[0004] 目前临床胃部疾病及胃癌的检测方法主要包括内窥镜、B 超、放射学检测(X 线)、肿瘤标志物等。X 线作为传统的胃癌检测手段,对进展期胃癌或弥散型胃癌更有诊断价值,但此法存在射线暴露,检查费用较高等问题,因而对早期胃癌的判定显得无能为力;内窥镜费用较高,对操作人员的技术要求高,而且下胃镜又令患者很痛苦,结果使不少患者望而却步,对亚临床症状患者尚不能作为普查手段;与胃癌有关的肿瘤标志物对于普通胃病及早期胃癌的诊断价值不大。

[0005] 相比与其他胃部检测手段,血清 PGI/PGII 联合检测具有无创伤、简便、可靠和费用低廉等优点,目前已建立多种检测方法,如酶联免疫法、化学发光法、免疫比浊法、时间分辨等,并且已在医院和体检中心广泛使用,但是往往需要昂贵的仪器和试剂,或检测结果不能立等可取以及不适于单人份测试。

[0006] 免疫金标记技术(Immunogold labeling technique)是出现于 80 年代初期的一种独特的免疫分析方式,主要利用了金颗粒具有高电子密度的特征,当这些标记物在相应的配体处大量聚集时,肉眼可见红色或粉红色斑点,因而用于定性或半定量的快速免疫检测方法中,这种方法由于快速、简便、准确和无污染等优点,在检测抗原、抗体中得到广泛使用。

[0007] 目前,在国内销售的免疫金标记技术的产品已有很多,但利用此检测方法定量检测血清胃蛋白酶原的产品尚属空白。

发明内容

[0008] 本发明所要解决的技术问题之一是克服常规胃蛋白酶原检测方法不适合单人份测试、检测时间较长、检测成本高等缺点,提供一种快速、简便、准确、价格低廉的定量检测 PG 的方法。

[0009] 该方法所基于的免疫学原理是双抗体夹心法。样品加入样品吸收垫,样品中的液体首先溶解胶体金垫中含有的胶体金标记的鼠源性单克隆抗体。其次样品中待测抗原(PG)与胶体金颗粒标记的鼠源性单克隆抗体结合,形成抗原-抗体*胶体金复合物,并靠毛细作用向检测线移动。在硝酸纤维薄膜的检测线上固定有另一鼠源性单克隆二抗。当样品层析至检测线时,可以进一步形成抗体-抗原-抗体*胶体金双抗体夹心复合物,并在检测线(T线)上聚积显现出一条可见的显色反应。胶体金的量反应了待测抗原的量。从加样垫中泳动过来的过量胶体金标记的单克隆抗体,均可被固定于标准的胃蛋白酶原抗原(质控线,C线)所捕获,形成显色反应,这种显色反应,既代表了整个反应体系是正确的,同时T线显色反应的深浅,与检测区中被测抗原的量呈对应关系。胶体金颗粒在特定波长下,对光的吸收和散射与胶体金颗粒的量相关,通过光电感应器检测胶体金颗粒对光的吸收和散射,它与样本中的胃蛋白酶原的含量呈正比。

[0010] 为了达到以上所述的目的,本发明所采用的技术手段为:

[0011] 本发明的一种利用胶体金免疫层析技术定量检测血清胃蛋白酶原的试剂盒,其特征在于所述试剂盒包括分别用于胃蛋白酶原 I 以及用于胃蛋白酶原 II 检测的试纸条,所述的试纸条按照连接顺序依次包括样品垫(4)、金标垫(3)、硝酸纤维素膜(2)以及吸水垫(5),还包括位于下方的塑料底衬(1)、其中塑料底衬(1)的作用是提供组装平台,硝酸纤维素膜(2)上具有胃蛋白酶原 I 或胃蛋白酶原 II 喷涂的质控线,以及胃蛋白酶原 I 或胃蛋白酶原 II 的二抗喷涂的检测线,金标垫(3)上涂覆有胶体金颗粒标记的胃蛋白酶原 I 或胃蛋白酶原 II 的单克隆抗体,样品垫(4)提供了待测样品加入的位置。

[0012] 在本发明中,优选的,所述的胃蛋白酶原 I 或胃蛋白酶原 II 为人胃蛋白酶原 I 或蛋白酶原 II 的天然蛋白,其是按照以下方法制备得到的:

[0013] (1) 收集外科手术切除的正常人胃组织,用磷酸盐缓冲液漂洗,分离胃粘膜,吸干,称重,加入磷酸盐缓冲液,捣碎匀浆,离心,收集上清,沉淀用磷酸盐缓冲液重悬,再次离心,合并上清液,得到胃蛋白酶原粗提液;

[0014] (2) 将胃蛋白酶原粗提液加入已经平衡的 DEAE-52 层析柱,用 PBS 缓冲液洗脱层析柱至在 280nm 处,吸光值为 0,继续用 PBS 缓冲液洗脱层析柱,合并洗脱峰,得到含有活性的胃蛋白酶原;

[0015] (3) 取活性胃蛋白酶原峰,上样于凝胶层析柱,用 50-80mM 的含 0.05-0.1mol/L Na_2SO_4 的 PBS 洗脱,流速 3.0-5.0ml/min,压力为 8Kpa,洗脱曲线为显示 4 个蛋白洗脱峰,第三个蛋白峰即为胃蛋白酶原 I,第四个蛋白峰为胃蛋白酶原 I 及胃蛋白酶原 II 的混合物;

[0016] (4) 采用 Q-2 阴离子交换层析柱分离胃蛋白酶原 I 和胃蛋白酶原 II 的混合物,凝胶层析后的第四个洗脱峰先用 0.05-0.1mol/L This-HCL, pH7.0 透析后上样阴离子层析柱,

用浓度为 0-0.5mol/L NaCl 梯度洗脱,流速为 1ml/min;出现三个蛋白峰,其中第 1,2 个峰为胃蛋白酶原 I,第三峰为胃蛋白酶原 II。

[0017] 在本发明中,优选的,所述的胶体金颗粒标记的胃蛋白酶原 I 或胃蛋白酶原 II 的单克隆抗体是按照以下方法制备得到的:

[0018] (1) 胶体金的制备

[0019] 先将 100ml 的 0.01% 氯金酸溶液加热至沸腾,迅速加入 1ml 的 1% 柠檬酸三钠溶液,煮沸 7-10min 出现透明的酒红色,最后加蒸馏水至 100ml,然后用电镜镜检,制备的金颗粒大小一致,均匀,颗粒直径为 40nm;

[0020] (2) 单克隆抗体的标记

[0021] 待标记的抗体蛋白用 0.005-0.1mol/L 的氯化钠溶液透析 48 小时除盐,然后用制备好的颗粒直径为 40nm 的胶体金来标记单克隆抗体蛋白,具体步骤为:

[0022] ①向搅拌中的胶体金溶液里迅速加入抗体蛋白,25℃室温孵育 15-30min;

[0023] ②用 0.1-0.5mol/L 的 K_2CO_3 调节胶体金溶液的 pH 为 7.0-7.6,然后加入 1-10%BSA 封闭,反应 15-20min;

[0024] ③ 10000rpm 离心 20-30min,弃上清,再用 pH 为 7.5-8.0 含 1-10%BSA 的 2-6mM 的硼酸盐缓冲液洗涤,共洗涤 3 次;

[0025] ④最后加入 pH7.4 的含 4-10% 蔗糖、6-10% 海藻糖、BSA 和 0.05-1% 的 2mM 硼酸盐缓冲液中,4℃储存备用。

[0026] 更优选的,步骤(2)单克隆抗体的标记是按照以下方法制备得到的:

[0027] 待标记的单克隆抗体蛋白用 0.1mol/L 的氯化钠溶液透析 48 小时除盐,然后用制备好的颗粒直径为 40nm 的胶体金来标记单克隆抗体蛋白,具体步骤为:

[0028] ①向搅拌中的胶体金溶液里迅速加入单克隆抗体蛋白,25℃室温孵育 25min;

[0029] ②用 0.1mol/L 的 K_2CO_3 调节金溶液的 pH 为 7.0,然后加入 5%BSA 封闭,反应 20min;

[0030] ③ 10000rpm 离心 20min,弃上清,再用 pH 为 7.5 的含 5%BSA 的 4mM 的硼酸盐缓冲液洗涤,共洗涤 3 次;

[0031] ④最后加入 pH7.4 含 5% 蔗糖、8% 海藻糖、0.5%BSA 的 2mM 硼酸盐缓冲液中,4℃储存备用。

[0032] 在本发明中,优选的,所述的金标垫是通过将浓度为 0.2mg/ml 的胶体金颗粒标记的胃蛋白酶原 I 或胃蛋白酶原 II 的单克隆抗体(作为一抗)以 $30 \mu l/cm^2$ 喷涂在金标垫上后得到的,所述的检测线是将浓度为 1mg/ml 的胃蛋白酶原二抗溶液以 $1 \mu l/cm$,10cm/秒的速度喷涂到硝酸纤维膜上得到的,所述的质控线是将浓度为 1mg/ml 的胃蛋白酶原抗原溶液以 $1 \mu l/cm$,10cm/秒的速度喷涂到硝酸纤维膜上得到的,检测线与质控线的距离为 0.5cm。

[0033] 此外,本发明还提出了所述的试剂盒在制备定量检测血清胃蛋白酶原试剂中的应用。

[0034] 将本发明的胃蛋白酶原胶体金免疫层析法与采用现有的酶联免疫法、以及免疫比浊法同时进行 213 例随机样本的临床比对实验,PGI、PGII 浓度与其他两个方法学的产品临床符合率 100%。

[0035] 由此可见,本方法可以直接定量检测胃蛋白酶原,不需专业培训,操作方便,快速,20min 即可获得结果,适合在基层医院和体检中心推广和运用。

附图说明

[0036] 图 1 为利用胶体金免疫层析技术定量检测血清胃蛋白酶原 I、II 的试纸条的生产流程图（带 * 号为关键工序）；

[0037] 图 2 为利用胶体金免疫层析技术定量检测血清胃蛋白酶原的试纸条的结构示意图；

[0038] 图 3 为利用胶体金免疫层析技术定量检测血清胃蛋白酶原的试纸条上检测线、质控线以及样品槽的相对位置及显色深浅的示意图。

具体实施方式

[0039] 本发明公开了一种利用胶体金免疫层析技术定量检测血清胃蛋白酶原的试纸条及其制备方法和应用，本领域技术人员可以借鉴本文内容，通过适当改进工艺参数而实现。特别需要指出的是，所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的，它们都被视为包括在本发明所要求保护的技术方案之内。本发明的产品及应用已经通过较佳实施例进行了描述，相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合，来实现和应用本发明技术。

[0040] 为使本发明更加容易理解，下面结合具体实施例，进一步阐述本发明，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。

[0041] 实施例 1 本发明的利用胶体金免疫层析技术定量检测血清胃蛋白酶原的试纸条的制备

[0042] 制备流程图如图 1 所示。

[0043] 1、人胃蛋白酶原 I 或蛋白酶原 II 天然蛋白的制备

[0044] 收集外科手术切除的正常人胃组织，用磷酸盐缓冲液漂洗，分离胃粘膜，吸干，称重，加入磷酸盐缓冲液，捣碎匀浆，离心，收集上清，沉淀磷酸盐缓冲液重悬，再次离心，合并上清液，得到胃蛋白酶原粗提液；

[0045] 将胃蛋白酶原粗提液加入已经平衡的 DEAE-52 层析柱，用 PBS 缓冲液洗脱层析柱至在 280nm 处，吸光值为 0，继续用 PBS 缓冲液洗脱层析柱，合并洗脱峰，得到含有活性的胃蛋白酶原；

[0046] 取活性胃蛋白酶原峰，上样于凝胶层析柱，用 50mM PBS（含 0.05mol/L Na_2SO_4 ）洗脱，流速 3.0ml/min，压力为 8Kpa，洗脱曲线为显示 4 个蛋白洗脱峰，第三个蛋白峰即为胃蛋白酶原 I，第四个蛋白峰为胃蛋白酶原 I 及胃蛋白酶原 II 的混合物；

[0047] 采用 Q-2 阴离子交换层析柱分离胃蛋白酶原 I 和胃蛋白酶原 II 的混合物，凝胶层析后的第四个洗脱峰先用 0.05mol/L This-HCL, pH7.0 透析后上样阴离子层析柱，用浓度为 0.5mol/L NaCl 梯度洗脱，流速为 1ml/min；出现三个蛋白峰，其中第 1,2 个峰为 PGI，第三峰为 PGII。

[0048] 经过上述方法纯化获得的人胃蛋白酶原抗原 I 的纯度 $\geq 98\%$ ，比活性为 13.6U/mg；人胃蛋白酶原抗原 II 的纯度 $\geq 96.8\%$ ，比活性为 19.7U/mg。

[0049] 2、胃蛋白酶原 I 或胃蛋白酶原 II 单克隆抗体的来源

[0050] 胃蛋白酶原 I 的单克隆抗体为 PGI-8012 和 PGI-8016，购自 Medix 公司，胃蛋白酶

原 II 的单克隆抗体为 PGII-8105 和 PGII-8106, 购自 Medix 公司。

[0051] 3、胶体金的制备

[0052] 先将 100ml 的 0.01% 氯金酸溶液加热至沸腾, 迅速加入 1ml 的 1% 柠檬酸三钠, 煮沸 7-10min 出现透明的酒红色, 最后加蒸馏水至 100ml, 即得到 40nm 的胶体金溶液。然后用电镜镜检, 确保制备的金颗粒尽量使其大小一致, 均匀, 颗粒直径在 40nm。

[0053] 4、单克隆抗体的标记

[0054] 待标记的抗体蛋白 PGI-8016 或 PGII-8105 用 0.1mol/L 的氯化钠溶液透析 48 小时除盐, 然后用制备好的颗粒直径为 40nm 的胶体金来标记单克隆抗体蛋白。具体步骤为: ①向搅拌中的胶体金溶液里迅速加入抗体蛋白, 25℃ 室温孵育 25min; ②用 0.1mol/L 的 K_2CO_3 调节金溶液的 pH 为 7.0, 然后加入 5%BSA 封闭, 反应 20min; ③ 10000rpm 离心 20min, 弃上清, 再用含 5%BSA 的 4mM pH 为 7.5 的硼酸盐缓冲液洗涤, 共洗涤 3 次; ④最后加入含 7% 蔗糖、8% 海藻糖、0.5%BSA 的 2mM 硼酸盐缓冲液 (pH7.4) 中, 4℃ 储存备用。以上操作中应注意, 一切溶液中不应含杂质微粒, 可用高速离心或微孔滤膜预处理。

[0055] 4、胶体金试纸条的组装

[0056] 将已标记的单克隆抗体 PGI-8016 或 PGII-8105, 浓度为 0.2mg/ml, 以 $30 \mu l/cm^2$, 喷涂在金标垫上, 将另胃蛋白酶原二抗 PGI-8012 或 PGII-8106, 浓度为 1mg/ml, 以 $1 \mu l/cm$, 10cm/秒的速度喷涂到硝酸纤维膜上的 T 线, 将胃蛋白酶原抗原喷涂到硝酸纤维膜上的 C 线 (浓度为 1mg/ml, 以 $1 \mu l/cm$, 10cm/秒的速度), T 线与 C 的距离 0.5cm; 将金标垫, 喷涂后的硝酸纤维素膜, 样本垫和吸水垫组装成试纸条, 37℃ 烘箱干燥。试纸条的组装顺序如图 2 所示, 所述的试纸条按照连接顺序依次包括样品垫 4、金标垫 3、硝酸纤维素膜 2 以及吸水垫 5, 还包括位于下方的塑料底衬 1、其中塑料底衬 1 的作用是提供组装平台, 硝酸纤维素膜 2 上具有胃蛋白酶原 I 或胃蛋白酶原 II 喷涂的质控线, 以及胃蛋白酶原 I 或胃蛋白酶原 II 的二抗喷涂的检测线, 金标垫 3 上涂覆有胶体金颗粒标记的胃蛋白酶原 I 或胃蛋白酶原 II 的单克隆抗体, 样品垫 4 提供了待测样品加入的位置。

[0057] 实施例 2 本发明的胶体金试纸条的使用及结果判定

[0058] 将制备的人胃蛋白酶原 I 和人胃蛋白酶原 II 分别稀释为 22、46、63、100、200ug/L 和 2.8、4.8、11.5、25、43ug/L 溶液, 作为标准品溶液, 并同时配制空白溶液。分别取 $60 \mu l$ 标准品和待测样品 ($30 \mu l$ 样品 + $30 \mu l$ 样品稀释液) 滴入试纸条样品槽中, 20min 后将显色完成的标准品与待测样品的试纸条放入免疫层析读数仪 (北京美康生物技术研究中心有限责任公司) 中, 读取 T 线的显色值, 并记录, 显色结果示意图如图 3 所示; 将待测样品显色值带入标准曲线中, 得到胃蛋白酶原 I 或胃蛋白酶原 II 浓度结果。

[0059] 将本发明的胃蛋白酶原胶体金免疫层析法与采用现有的酶联免疫法、以及免疫比浊法同时进行 213 例随机样本的临床比对实验, PGI、PGII 浓度与其他两个方法学的产品临床符合率 100%, 结果如下表 1 所示。

[0060] 由此可见, 本方法可以直接定量检测胃蛋白酶原, 不需专业培训, 操作方便, 快速, 20min 即可获得结果, 适合在基层医院和体检中心推广和运用。

[0061] 表 1

[0062]

样本 编号	胃蛋白酶原 I			胃蛋白酶原 II		
	酶联免 疫法	免疫层析胶体 金法	免疫比 浊法	酶联免 疫法	免疫层析胶体 金法	免疫比 浊法
1.	191.2	200.2	215.7	12.0	10.7	11.4
2.	129.2	114.2	121.7	7.8	7.0	7.4
3.	154.2	177.4	165.8	4.1	5.2	4.7
4.	108.6	126.0	117.3	5.2	7.7	6.4
5.	164.7	182.8	173.7	4.7	7.1	5.9
6.	57.4	58.0	52.7	17.5	17.5	17.5
7.	80.5	83.4	86.9	20.0	23.6	19.8
8.	149.1	141.0	155.1	5.0	7.2	6.1
9.	73.9	78.1	76.0	10.6	14.5	12.5
10.	171.1	184.3	182.7	7.7	8.6	8.1
11.	131.1	142.0	136.5	4.6	5.3	5.0
12.	178.9	180.7	191.3	19.6	27.6	23.6
13.	168.4	174.9	171.7	5.7	7.9	6.8
14.	151.8	167.7	159.7	4.7	6.4	5.5
15.	174.2	227.1	200.6	15.5	15.9	15.7
16.	102.2	95.8	99.0	7.7	11.9	9.8
17.	148.2	154.0	151.1	4.1	5.7	4.9
18.	51.2	55.2	58.2	7.5	10.6	9.0
19.	40.8	34.8	47.8	8.8	11.9	10.3
20.	118.2	110.2	114.2	5.5	8.3	6.9
21.	103.1	109.4	106.3	6.3	10.1	8.2
22.	180.1	181.9	185.0	8.2	12.2	10.2
23.	175.3	170.3	172.8	4.4	7.2	5.8
24.	150.6	165.2	167.9	19.3	28.2	23.7

[0063]

样本 编号	胃蛋白酶原 I			胃蛋白酶原 II		
	酶联免疫法	免疫层析胶体金法	免疫比浊法	酶联免疫法	免疫层析胶体金法	免疫比浊法
25.	160.4	177.2	178.8	8.5	13.4	11.0
26.	82.1	83.5	87.8	10.4	12.5	13.0
27.	154.3	167.8	166.1	7.6	8.7	8.1
28.	135.4	141.8	138.6	19.5	24.4	22.0
29.	163.8	158.7	161.2	16.8	17.3	17.0
30.	163.3	16.4	167.9	2.8	3.7	3.3
31.	147.7	144.0	145.8	6.9	10.3	8.6
32.	138.9	150.5	144.7	3.4	4.4	3.9
33.	109.9	108.6	109.2	8.3	11.7	10.0
34.	61.4	57.3	64.3	10.1	13.8	11.9
35.	170.1	178.8	179.5	13.1	14.4	13.7
36.	108.6	100.9	105.7	6.3	7.5	6.9
37.	110.6	104.1	107.4	36.9	51.0	44.0
38.	176.0	170.0	179.0	9.8	14.7	12.2
39.	157.7	167.1	157.4	14.8	14.1	14.9
40.	148.9	158.2	153.5	18.6	29.1	23.8
41.	153.6	161.1	167.4	23.3	36.4	29.8
42.	166.8	162.7	164.7	13.1	14.1	13.6
43.	156.5	153.7	150.1	25.1	32.3	28.7
44.	167.4	166.9	167.1	11.5	13.3	12.4
45.	184.0	196.6	195.3	5.7	7.6	6.6
46.	161.6	154.3	153.0	5.2	8.0	6.6
47.	161.7	164.0	167.9	4.5	7.1	5.8
48.	163.8	160.7	162.3	9.4	14.1	11.7
49.	165.2	166.7	165.9	7.7	13.1	10.4
50.	165.0	167.8	166.4	21.2	30.9	26.0
51.	178.7	179.5	179.1	9.8	13.1	11.5

[0064]

样本 编号	胃蛋白酶原 I			胃蛋白酶原 II		
	酶联免疫法	免疫层析胶体金法	免疫比浊法	酶联免疫法	免疫层析胶体金法	免疫比浊法
52.	182.1	189.8	186.0	13.8	14.7	14.3
53.	182.4	185.3	188.8	17.5	19.8	18.6
54.	175.9	174.4	175.2	22.2	35.8	29.0
55.	151.1	155.3	168.2	9.5	14.9	12.2
56.	172.8	170.4	171.6	26.6	37.5	32.1
57.	162.4	166.6	169.5	25.5	42.6	34.0
58.	184.2	183.2	188.7	8.5	14.1	11.3
59.	140.7	156.5	153.6	17.1	21.8	19.5
60.	143.4	143.6	158.5	21.8	33.3	27.5
61.	182.9	181.0	182.0	6.3	8.5	7.4
62.	169.2	160.9	165.1	8.0	11.7	9.8
63.	168.5	160.2	164.3	21.4	31.0	26.2
64.	202.6	222.5	212.5	3.4	5.0	4.2
65.	140.5	100.3	120.4	18.5	19.2	18.9
66.	170.6	162.7	166.6	15.7	22.3	19.0
67.	37.1	25.7	31.4	7.1	8.5	7.8
68.	176.1	177.0	176.5	4.9	7.7	6.3
69.	171.8	172.8	172.3	13.6	22.3	18.0
70.	178.0	179.7	173.8	4.3	6.8	5.5
71.	162.9	171.7	167.3	15.8	24.8	20.3
72.	193.8	194.2	194.0	5.2	9.1	7.1
73.	157.0	151.6	154.3	6.7	11.9	9.3
74.	173.9	170.1	172.0	9.0	14.5	11.7
75.	179.5	170.6	175.1	7.4	9.8	8.6
76.	144.5	149.6	142.0	15.7	15.5	15.6
77.	188.7	182.1	185.4	15.4	20.5	18.0
78.	158.7	149.7	144.2	7.5	10.2	8.9

[0065]

样本 编号	胃蛋白酶原 I			胃蛋白酶原 II		
	酶联免疫法	免疫层析胶体金法	免疫比浊法	酶联免疫法	免疫层析胶体金法	免疫比浊法
79.	156.5	166.2	161.4	13.3	13.6	13.4
80.	164.6	132.6	148.6	4.7	7.1	5.9
81.	188.3	188.6	183.5	7.2	10.6	8.9
82.	111.3	112.9	102.1	4.5	7.0	5.7
83.	110.6	128.0	109.3	26.1	34.0	30.1
84.	121.8	131.9	126.9	7.3	11.2	9.2
85.	158.3	151.1	154.7	25.4	34.8	30.1
86.	147.7	139.9	143.8	8.9	15.1	12.0
87.	121.7	116.1	128.9	14.8	16.6	15.7
88.	102.1	105.6	128.9	7.2	11.3	9.3
89.	121.8	111.9	131.9	7.3	11.9	9.6
90.	155.6	144.1	149.9	12.9	13.9	13.4
91.	155.3	165.4	120.4	20.4	23.9	22.2
92.	148.9	140.7	149.8	9.2	9.9	9.6
93.	134.9	110.7	115.8	31.6	40.4	36.0
94.	119.0	101.4	100.2	19.5	25.4	22.4
95.	111.3	116.0	128.7	4.5	4.7	4.6
96.	115.2	96.9	106.0	11.3	14.4	12.9
97.	112.9	98.0	105.4	4.9	2.8	3.9
98.	126.5	139.9	133.2	10.5	13.4	11.9
99.	106.2	93.6	99.9	9.2	11.7	10.5
100.	133.4	117.9	125.6	9.4	10.8	10.1
101.	85.0	71.8	83.4	25.3	26.9	26.1
102.	152.4	160.1	156.3	12.2	13.6	12.9
103.	145.9	127.2	136.6	11.2	13.7	12.4
104.	151.1	134.8	142.9	13.5	14.6	14.1
105.	99.7	79.7	89.7	6.9	8.4	7.7

[0066]

样本 编号	胃蛋白酶原 I			胃蛋白酶原 II		
	酶联免疫法	免疫层析胶体金法	免疫比浊法	酶联免疫法	免疫层析胶体金法	免疫比浊法
106.	129.6	96.9	113.2	11.1	13.8	12.4
107.	117.7	94.0	105.8	19.1	25.0	22.1
108.	151.2	156.3	153.7	6.4	6.7	6.6
109.	126.7	139.3	133.0	10.2	12.0	11.1
110.	109.5	97.9	103.7	16.1	22.7	19.4
111.	115.7	113.9	114.8	22.4	31.8	27.1
112.	97.8	90.7	98.3	11.3	13.8	12.5
113.	99.8	86.2	98.0	11.2	14.9	13.1
114.	109.0	93.7	111.3	13.7	14.8	14.3
115.	90.7	85.5	90.1	17.5	17.6	17.5
116.	97.3	84.1	95.7	6.0	6.4	6.2
117.	92.6	83.9	98.2	28.1	32.1	30.1
118.	149.9	138.2	144.0	17.7	20.8	18.7
119.	120.6	97.9	109.2	11.2	13.2	12.2
120.	143.2	100.0	121.6	18.9	23.7	21.3
121.	79.6	94.8	87.2	11.9	12.5	12.2
122.	108.3	108.7	123.5	5.1	5.8	5.4
123.	126.5	127.4	121.9	43.1	45.1	44.1
124.	132.3	116.0	124.2	12.8	14.3	13.5
125.	145.1	122.8	133.9	9.7	10.6	10.1
126.	162.2	158.7	160.5	8.1	8.8	8.5
127.	149.2	136.1	142.7	20.0	25.0	22.5
128.	131.4	139.7	135.5	18.6	26.5	22.5
129.	127.5	103.8	115.7	16.1	20.3	18.2
130.	142.9	124.6	143.8	19.4	26.0	22.7
131.	129.8	105.3	117.5	4.4	5.8	5.1
132.	116.8	99.7	113.2	28.8	34.1	31.5

[0067]

样本 编号	胃蛋白酶原 I			胃蛋白酶原 II		
	酶联免疫法	免疫层析胶体金法	免疫比浊法	酶联免疫法	免疫层析胶体金法	免疫比浊法
133.	128.6	139.8	134.2	8.7	7.4	8.0
134.	112.3	119.8	116.0	13.2	13.9	13.6
135.	167.6	161.1	164.3	5.7	5.4	5.5
136.	154.0	114.4	134.2	6.9	7.5	7.2
137.	108.6	96.8	117.7	4.7	4.6	4.6
138.	153.7	114.7	134.2	17.3	19.0	18.1
139.	101.5	119.5	120.5	20.8	25.9	22.3
140.	136.5	138.8	147.6	9.5	11.3	10.4
141.	168.1	156.8	162.5	14.4	12.7	13.5
142.	131.8	116.1	124.0	12.8	14.8	13.8
143.	128.1	103.9	116.0	8.6	9.7	9.1
144.	106.0	138.9	147.4	7.3	8.6	7.9
145.	110.8	104.5	127.6	4.8	5.1	4.9
146.	130.7	134.5	152.6	9.6	11.6	10.6
147.	148.9	132.7	140.8	7.1	8.2	7.7
148.	144.6	109.4	127.0	10.6	10.6	10.6
149.	143.1	129.7	136.4	10.0	9.9	9.9
150.	143.9	138.1	146.0	13.4	13.8	13.6
151.	138.6	126.4	132.5	9.2	9.6	9.4
152.	127.1	95.5	111.3	6.3	6.4	6.3
153.	119.8	98.9	92.4	4.6	5.0	4.8
154.	169.9	143.3	156.6	18.8	20.7	21.8
155.	117.3	115.9	116.6	7.1	8.2	7.6
156.	145.2	168.6	156.9	9.3	12.0	10.7
157.	129.4	107.3	118.4	8.0	7.7	7.8
158.	117.4	118.8	118.1	31.5	34.5	33.0
159.	106.1	143.3	124.7	9.2	8.4	8.8

[0068]

样本 编号	胃蛋白酶原 I			胃蛋白酶原 II		
	酶联免疫法	免疫层析胶体金法	免疫比浊法	酶联免疫法	免疫层析胶体金法	免疫比浊法
160.	128.4	127.3	127.8	9.0	12.5	10.7
161.	102.3	103.7	104.5	18.7	20.9	19.8
162.	101.9	103.2	108.5	10.8	10.7	12.3
163.	123.9	124.9	139.4	7.6	9.6	8.6
164.	174.3	132.8	153.5	8.6	10.6	9.6
165.	134.5	92.3	113.4	15.0	16.5	15.7
166.	153.8	152.0	162.9	12.6	10.9	11.7
167.	163.4	166.8	165.1	6.8	6.2	6.5
168.	140.3	127.9	144.1	21.6	26.1	23.9
169.	146.4	131.2	138.8	16.6	19.6	17.6
170.	101.1	99.6	100.4	10.3	12.1	11.2
171.	117.1	97.5	102.3	4.2	3.7	3.9
172.	155.1	156.3	125.7	6.8	6.0	6.4
173.	169.7	147.7	158.7	14.5	14.8	14.7
174.	120.4	100.3	110.3	18.7	18.9	18.8
175.	140.6	121.7	131.2	15.1	15.8	15.4
176.	109.1	152.8	131.0	6.5	6.9	6.7
177.	148.0	147.8	147.9	5.4	4.9	5.2
178.	162.0	153.4	157.7	14.2	14.6	14.4
179.	83.7	87.7	70.7	6.4	6.6	6.5
180.	122.6	124.8	120.7	9.6	10.6	10.1
181.	134.0	119.6	126.8	5.7	5.2	5.5
182.	58.4	56.2	57.3	7.5	7.1	7.3
183.	128.6	117.1	122.9	4.7	4.5	4.6
184.	129.1	146.3	137.7	6.6	7.4	7.0
185.	138.4	152.4	145.4	35.4	40.6	38.0
186.	111.3	103.4	107.4	5.1	5.5	5.3

[0069]

样本 编号	胃蛋白酶原 I			胃蛋白酶原 II		
	酶联免疫法	免疫层析胶体金法	免疫比浊法	酶联免疫法	免疫层析胶体金法	免疫比浊法
187.	153.5	140.4	146.9	12.0	14.0	13.0
188.	151.2	131.2	141.2	8.9	10.0	9.4
189.	176.9	152.6	164.7	8.2	8.4	8.3
190.	109.4	152.9	131.2	13.3	14.6	13.9
191.	115.3	153.2	134.2	7.0	7.5	7.2
192.	99.8	102.9	101.4	35.1	40.2	37.7
193.	145.3	146.2	145.7	5.6	5.7	5.7
194.	144.7	147.9	146.3	19.0	22.8	20.9
195.	145.7	127.1	136.4	17.6	14.7	16.2
196.	119.3	91.4	115.3	3.5	3.2	3.3
197.	119.6	91.2	105.4	13.3	14.4	13.8
198.	142.0	108.1	125.0	5.6	5.7	5.6
199.	156.0	142.6	149.3	4.2	4.2	4.2
200.	160.6	144.4	152.5	5.2	6.0	5.6
201.	167.2	135.9	151.6	11.1	12.5	11.8
202.	167.8	170.7	169.3	5.0	5.3	5.1
203.	162.1	142.4	152.3	15.0	19.2	17.1
204.	166.4	156.4	161.4	6.6	7.4	7.0
205.	173.2	158.2	165.7	12.2	14.6	13.4
206.	124.9	113.7	119.3	20.9	23.8	22.3
207.	163.5	176.5	170.0	10.1	10.6	10.4
208.	158.0	138.5	148.2	10.0	11.4	10.7
209.	124.9	105.2	115.0	21.6	25.1	23.3
210.	151.0	119.3	135.2	3.8	3.2	3.5
211.	140.0	117.7	128.9	6.3	6.7	6.5
212.	162.7	113.1	137.9	12.4	14.9	13.7
213.	98.2	106.5	102.4	9.7	11.4	10.6

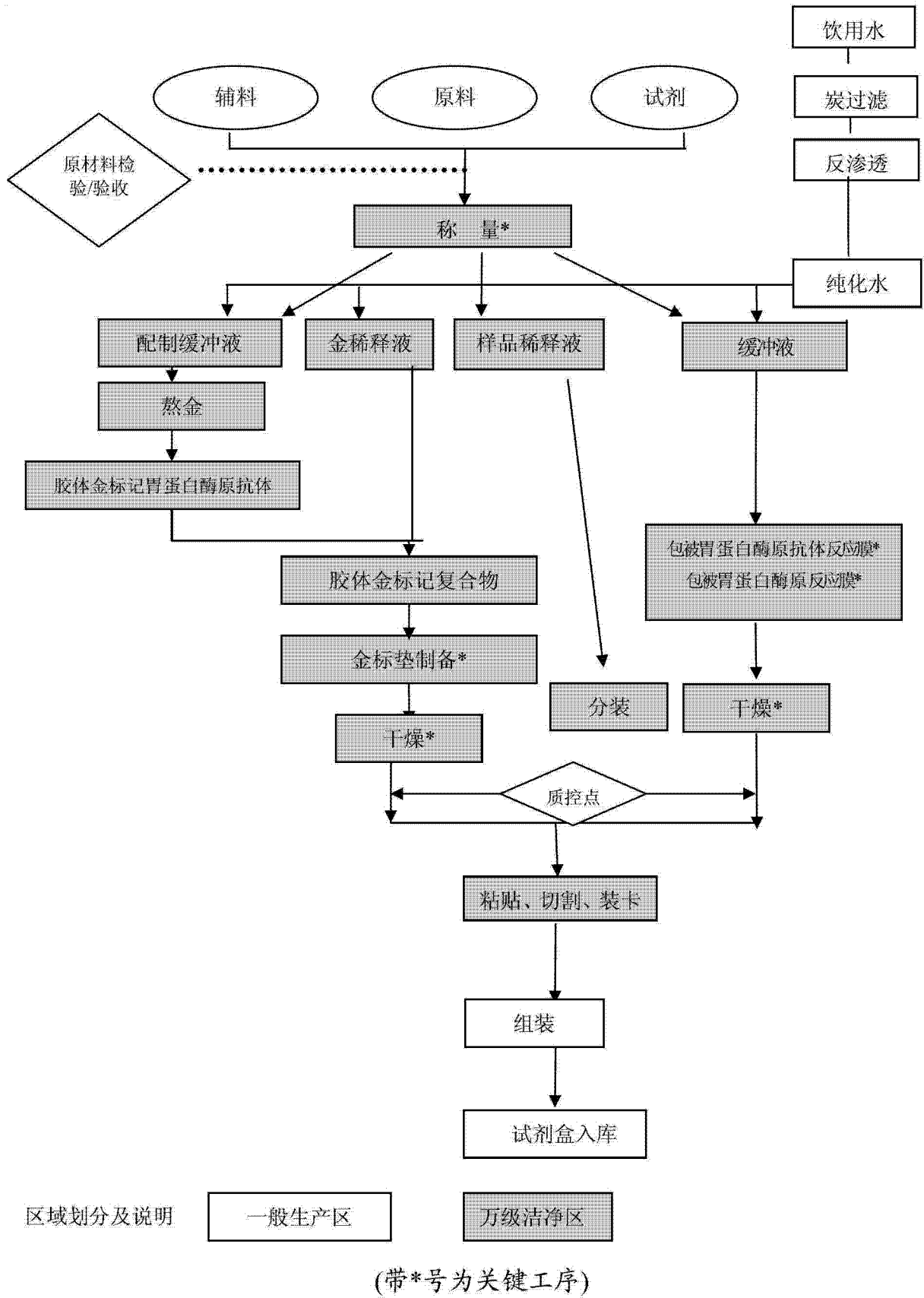


图 1

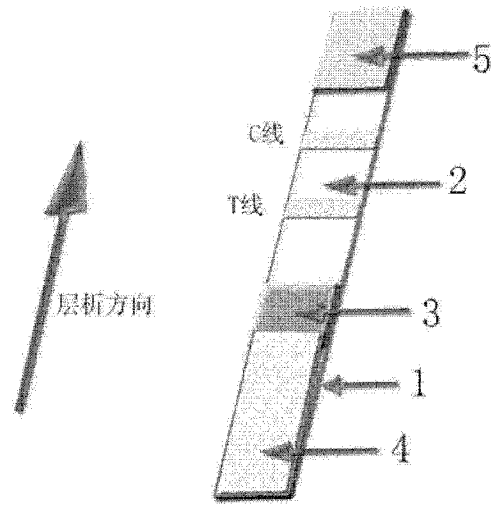


图 2

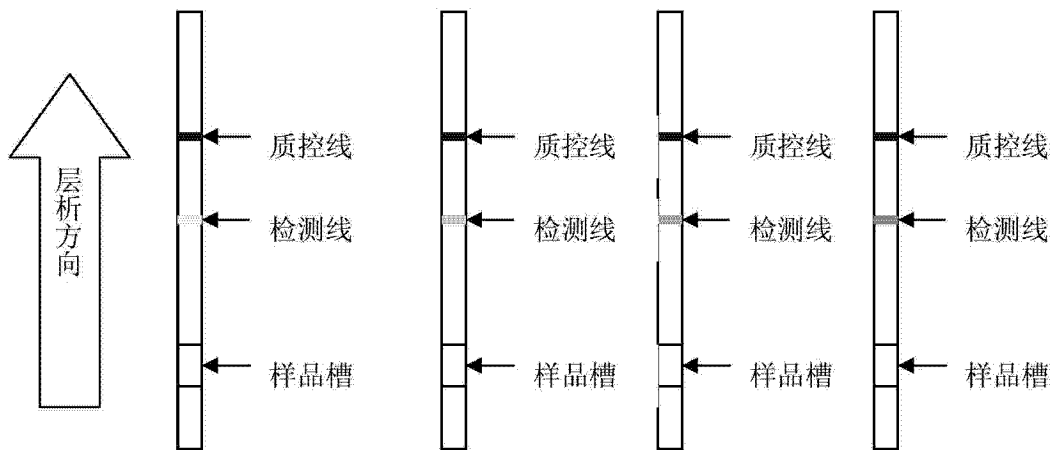


图 3

专利名称(译)	一种利用胶体金免疫层析技术定量检测血清胃蛋白酶原的试纸条及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN104142399A	公开(公告)日	2014-11-12
申请号	CN201310166881.X	申请日	2013-05-08
[标]申请(专利权)人(译)	北京美康生物技术研究中心有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	北京美康生物技术研究中心有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京美康生物技术研究中心有限责任公司		
[标]发明人	金鑫 曾滨		
发明人	金鑫 曾滨		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/573 G01N33/57446		
代理人(译)	孙皓晨		
其他公开文献	CN104142399B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种利用胶体金免疫层析技术定量检测血清胃蛋白酶原的试纸条及其制备方法和应用。本发明的试剂盒包括分别用于胃蛋白酶原I以及用于胃蛋白酶原II检测的试纸条，所述的试纸条按照连接顺序依次包括样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜以及吸水垫，还包括位于下方的塑料底衬，其中塑料底衬的作用是提供组装平台，硝酸纤维素膜上具有胃蛋白酶原I或II喷涂的质控线，以及胃蛋白酶原I或胃蛋白酶原II的二抗喷涂的检测线，金标垫上涂覆有胶体金颗粒标记的胃蛋白酶原I或胃蛋白酶原II的单克隆抗体，样品垫提供了待测样品加入的位置。本发明试剂盒可以直接定量检测胃蛋白酶原，不需专业培训，操作方便，快速，适合在基层医院和体检中心推广和运用。

样本 编号	胃蛋白酶原 I			胃蛋白酶原 II		
	酶联免 疫法	免疫层析胶体 金法	免疫比 浊法	酶联免 疫法	免疫层析胶体 金法	免疫比 浊法
	1.	191.2	200.2	215.7	12.0	10.7
2.	129.2	114.2	121.7	7.8	7.0	7.4
3.	154.2	177.4	165.8	4.1	5.2	4.7
4.	108.6	126.0	117.3	5.2	7.7	6.4
5.	164.7	182.8	173.7	4.7	7.1	5.9
6.	57.4	58.0	52.7	17.5	17.5	17.5
7.	80.5	83.4	86.9	20.0	23.6	19.8
8.	149.1	141.0	155.1	5.0	7.2	6.1
9.	73.9	78.1	76.0	10.6	14.5	12.5
10.	171.1	184.3	182.7	7.7	8.6	8.1
11.	131.1	142.0	136.5	4.6	5.3	5.0
12.	178.9	180.7	191.3	19.6	27.6	23.6
13.	168.4	174.9	171.7	5.7	7.9	6.8
14.	151.8	167.7	159.7	4.7	6.4	5.5
15.	174.2	227.1	200.6	15.5	15.9	15.7
16.	102.2	95.8	99.0	7.7	11.9	9.8
17.	148.2	154.0	151.1	4.1	5.7	4.9
18.	51.2	55.2	58.2	7.5	10.6	9.0
19.	40.8	34.8	47.8	8.8	11.9	10.3
20.	118.2	110.2	114.2	5.5	8.3	6.9
21.	103.1	109.4	106.3	6.3	10.1	8.2
22.	180.1	181.9	185.0	8.2	12.2	10.2
23.	175.3	170.3	172.8	4.4	7.2	5.8
24.	150.6	165.2	167.9	19.3	28.2	23.7