



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109307765 A

(43)申请公布日 2019.02.05

(21)申请号 201811446772.2

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2018.11.29

G01N 21/76(2006.01)

(71)申请人 郑州安图生物工程股份有限公司

地址 450016 河南省郑州市经济技术开发区经开第十五大街199号

(72)发明人 马雷 史小芹 渠文涛 刘雅奇  
周金龙 田会会 李晓霞 乔晓芳  
付光宇 吴学炜

(74)专利代理机构 郑州异开专利事务所(普通合伙) 41114

代理人 王霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

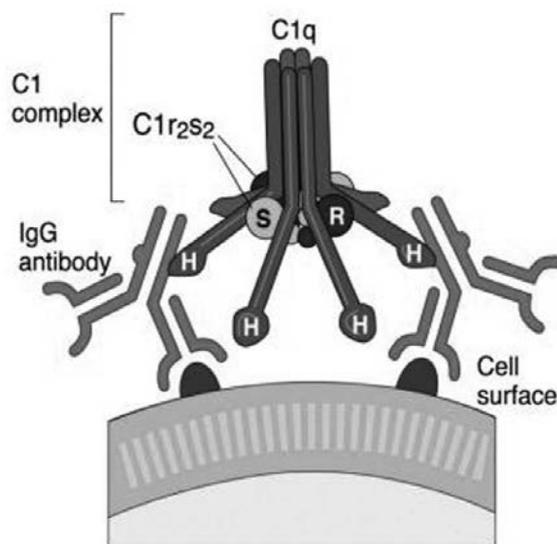
权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

胃蛋白酶原II检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种胃蛋白酶原II检测试剂盒,包括包被有胃蛋白酶原II单克隆抗体的磁微粒,含有辣根过氧化物酶(HRP)标记胃蛋白酶原II单克隆抗体的酶稀释液,含有胃蛋白酶原II抗原的校准品及样品稀释液;所述样品稀释液中含有阻断剂成分;所述阻断剂为一种或多种中和HAMA干扰的人抗鼠抗体。本发明的优点在于将高灵敏度的化学发光技术和磁微粒制备技术相结合,配套使用AutoLumo全自动检测分析仪,实现了检测全自动化;同时在样品稀释液中添加了阻断剂成分,可消除样本中嗜异性抗体,大大提高了试剂盒的抗干扰能力。



1. 一种胃蛋白酶原 II 检测试剂盒, 包括包被有胃蛋白酶原 II 单克隆抗体的磁微粒, 含有辣根过氧化物酶标记胃蛋白酶原 II 单克隆抗体的酶稀释液, 含有胃蛋白酶原 II 抗原的校准品及样品稀释液; 其特征在于: 所述样品稀释液中含有阻断剂成分; 所述阻断剂为一种或多种中和 HAMA 干扰的人抗鼠抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的胃蛋白酶原 II 检测试剂盒, 其特征在于: 所述样品稀释液的配方组成为缓冲液 0.01~0.2 mol/L, 防腐剂 0.1%~0.5%, 保护蛋白 1%~10%, EDTA 1%~10%, 阻断剂 200~500 ng/mL, 色素 0.001%。

3. 根据权利要求 2 所述的胃蛋白酶原 II 检测试剂盒, 其特征在于: 所述 EDTA 为乙二胺四乙酸二钠或/和乙二胺四乙酸二钾。

4. 根据权利要求 1 所述的胃蛋白酶原 II 检测试剂盒, 其特征在于: 所述包被有胃蛋白酶原 II 单克隆抗体的磁微粒, 含有辣根过氧化物酶标记胃蛋白酶原 II 单克隆抗体的酶稀释液, 含有胃蛋白酶原 II 抗原的校准品及样品稀释液四个组分中所用的稀释液为 PBS、MES、MOPS 中的任一种, 其 pH=6.0~8.0。

5. 根据权利要求 4 所述的胃蛋白酶原 II 检测试剂盒, 其特征在于: 所述稀释液中的保护蛋白为牛血清白蛋白、牛血清、酪蛋白中的一种或两种。

6. 根据权利要求 4 所述的胃蛋白酶原 II 检测试剂盒, 其特征在于: 所述稀释液中的防腐剂为 P300、Bro、MIT、NaN<sub>3</sub> 的任意组合。

7. 根据权利要求 1 所述的胃蛋白酶原 II 检测试剂盒, 其特征在于: 所述磁微粒为表层覆盖有高分子材料 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 或 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 的磁性粒子, 且磁微粒表面含有一种或多种活性功能基团。

## 胃蛋白酶原 II 检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术,尤其是涉及一种胃蛋白酶原 II 检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 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,为由375个氨基酸组成的蛋白多肽链,平均相对分子质量为42000 Da,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胃蛋白酶原I(PGI)、胃蛋白酶原II(PG II)两个亚群,1-5组分免疫原性近似,称为PGI,主要由胃底腺的主细胞的黏液颈细胞分泌;组分6-7被称为PG II,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的主细胞减少,幽门腺细胞增多,从而造成PGI和PG II的比值降低。因此PGI和PG II的比值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和PG II的比值可用于筛查胃底腺黏膜萎缩性疾病,如胃炎、胃癌等等有关。

[0003] 现有技术中,PG II的检测方法包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫比浊法、化学发光免疫分析法(CLIA)等。酶联免疫吸附测定方法操作过程复杂,测定时间较长,影响因素多,且不适合急诊样本的检测;免疫比浊法测定,抗原或抗体量过大时,可出现可溶性复合物,造成误差,易受脂血影响。化学发光免疫分析法虽具有反应时间短等多项优点,但抗干扰等性能较低,这是由于目前免疫检测试剂盒所用的抗体大多数来源于实验动物,嗜异性抗体可与多种动物的免疫球蛋白的Fc和Fab表位发生非特异性结合,从而干扰检测结果出现假阳或漏检。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种胃蛋白酶原 II 检测试剂盒,可大大提高其抗干扰能力。

[0005] 为实现上述目的,本发明可采取下述技术方案:

本发明所述的胃蛋白酶原 II 检测试剂盒,包括包被有胃蛋白酶原 II 单克隆抗体的磁微粒,含有辣根过氧化物酶(HRP)标记胃蛋白酶原 II 单克隆抗体的酶稀释液,含有胃蛋白酶原 II 抗原的校准品及样品稀释液;所述样品稀释液中含有阻断剂成分;所述阻断剂为一种或多种中和HAMA干扰的人抗鼠抗体。

[0006] 所述样品稀释液的配方组成为缓冲液0.01~0.2 mol/L,防腐剂0.1%~0.5%(w/v),保护蛋白1%~10%(w/v),EDTA 1%~10%(w/v),阻断剂200~500 ng/mL,色素0.001%(g/v)。

[0007] 所述EDTA为乙二胺四乙酸二钠或/和乙二胺四乙酸二钾。

[0008] 本发明中包被有胃蛋白酶原Ⅱ单克隆抗体的磁微粒,含有辣根过氧化物酶标记胃蛋白酶原Ⅱ单克隆抗体的酶稀释液,含有胃蛋白酶原Ⅱ抗原的校准品及样品稀释液四个组分中所用的稀释液为PBS、MES、MOPS中的任一种,其pH=6.0~8.0。

[0009] 所述稀释液中的保护蛋白为牛血清白蛋白、牛血清、酪蛋白中的一种或两种。所述稀释液中的防腐剂为P300、Bro、MIT、NaN<sub>3</sub>的任意组合。

[0010] 所述磁微粒为表层覆盖有高分子材料Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>或Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>的磁性粒子,且磁微粒表面含有一种或多种活性功能基团。

[0011] 本发明的优点在于将高灵敏度的化学发光技术和磁微粒制备技术相结合,配套使用AutoLumo全自动检测分析仪,实现了检测全自动化;同时在样品稀释液中添加了阻断剂成分,可消除样本中嗜异性抗体,大大提高了试剂盒的抗干扰能力,其原理如下:

EDTA又称乙二胺四乙酸,常用的为钠盐或钾盐,其在免疫检测中可以消除新鲜样本中的补体,从而避免新旧样本差异;补体引起新旧样本差异的原因是参与经典的补体激活系统,补体系统从酶原状态转化成具有酶活性状态的过程称为补体系统的激活,而其中一条由抗原-抗体复合物结合C1q启动补体激活的途径便是补体系统的经典激活途径。抗原与抗体结合后,C1q能识别抗体上的补体结合点,并与抗体的Fc段结合,从而对检测结果产生干扰,如图1所示。

## 附图说明

[0012] 图1是本发明的检测原理图。

[0013] 图2是本发明试剂盒与对照试剂盒符合率比对。

## 具体实施方式

[0014] 下面通过具体实施例对本发明做更加详细的说明,以便于本领域技术人员的理解。

[0015] 实施例1 制备胃蛋白酶原Ⅱ检测试剂盒

### 1、制备磁微粒混悬液

将粒径1.08 μm的磁微粒原液充分混匀、洗涤后,加入10~50 mg/ml的戊二醛活化剂,混匀震荡、洗涤后,加入0.1~0.5 μg/人份的胃蛋白酶原I抗体,混匀震荡,最后用含有PBS和1%~5%牛血清白蛋白封闭液封闭,2~8℃保存。

[0016] 2、制备酶稀释液

向配制好的MES缓冲液中加入1%~5%牛血清白蛋白,混合后即为酶稀释液,将HRP标记的抗体按照1:500~1:5000的比例加入混匀,2~8℃保存。

[0017] 3、制备校准品

向配制好的MOPS缓冲液中加入1%~5%牛血清白蛋白,混合均匀即为校准品稀释液,用校准品稀释液将PGⅡ抗原稀释成6个梯度,0ng/ml、10ng/ml、25ng/ml、50 ng/ml、100 ng/ml、200 ng/ml,分装成1 ml/瓶,2~8℃保存。

[0018] 4、制备样品稀释液

其组分见下表1:

缓冲液 <sup>□</sup>	pH=6.0~8.0 <sup>□</sup>
防腐剂 <sup>□</sup>	0.1%~0.5% (w/v) <sup>□</sup>
保护蛋白 <sup>□</sup>	1%~10% (w/v) <sup>□</sup>
EDTA <sup>□</sup>	1%~10% (w/v) <sup>□</sup>
阻断剂 <sup>□</sup>	200-500 ng/mL <sup>□</sup>
色素 <sup>□</sup>	0.001% (g/v) <sup>□</sup>

#### 实施例2 样本保存条件考核

取胃蛋白酶原 II 梯度新鲜样本10例,分别在0h、8h、2d、3d、5d进行检测,各时间检测结果与0h结果进行比较,考核样本稳定性。实验期间样本在2~8℃保存。结果如下表2:

表2本发明试剂盒样本保存时间研究

保存时间	0 h	8 h	2d	3d	4d	5d
P1	8.64	8.17	8.22	8.01	7.94	8.04
P2	40.93	40.29	41.24	40.53	40.35	39.76
P3	5.33	5.81	5.77	5.72	5.26	5.49
P4	9.00	9.03	8.88	9.16	8.10	8.62
P5	4.11	4.23	4.22	4.20	3.84	3.78
P6	5.40	5.52	5.23	5.42	5.10	5.16
P7	17.71	17.52	18.02	18.30	17.10	17.02
P8	3.43	3.30	3.46	3.59	3.49	3.26
P9	11.33	11.86	11.63	11.62	11.53	11.62
P10	19.51	20.99	19.39	20.66	18.53	18.37
		8h/0h	2d/0h	3d/0h	4d/0h	5d/0h
		0.95	0.95	0.93	0.92	0.93
		0.98	1.01	0.99	0.99	0.97
		1.09	1.08	1.07	0.99	1.03
		1.00	0.99	1.02	0.90	0.96
		1.03	1.03	1.02	0.93	0.92
		1.02	0.97	1.00	0.95	0.96
		0.99	1.02	1.03	0.97	0.96
		0.96	1.01	1.05	1.02	0.95
		1.05	1.03	1.03	1.02	1.03
		1.08	0.99	1.06	0.95	0.94
		1.01	1.01	1.02	0.96	0.96

表2结果显示,本发明试剂盒在2~8℃的样本保存时间最长为5天。

#### [0019] 实施例3 本发明试剂盒的性能评价

##### 1、灵敏度检测

LOB,准备5份接近0值的临床样本,每个样本重复3次,总共做4天,得到60个数据;LOD,准备5份浓度范围为1-4倍LOB的系列临床样本,每个样本重复3次,总共做4天,得到60个数据;FS:采用LOD实验中的数据,5个浓度样本每天测3次,总共测4天,每个样本得到12个结果,计算每个样本的均值、SD和CV%,最接近20%的浓度为功能灵敏度;两批次的检测结果如

表3所示。

[0020] 表3 本发明试剂盒灵敏度检测

灵敏度 <sup>⊕</sup>	批次 <sup>⊕</sup>	
	第 1 批 (ng/mL) <sup>⊕</sup>	第 2 批 (ng/mL) <sup>⊕</sup>
LOB <sup>⊕</sup>	0.011 <sup>⊕</sup>	0.068 <sup>⊕</sup>
LOD <sup>⊕</sup>	0.69 <sup>⊕</sup>	0.71 <sup>⊕</sup>
FS <sup>⊕</sup>	0.85 <sup>⊕</sup>	0.92 <sup>⊕</sup>

从表3结果可以看出,第一批能够准确检测出的浓度是0.85 ng/mL,第二批能够准确检测出的浓度是0.92 ng/mL,均满足要求。

#### [0021] 2、精密度检测

取两批试剂进行精密度实验,分别用配套质控品高/中/低值样本和临床高/中/低值样本,各测20次计算测定浓度的变异,测定结果如表4、表5所示。

[0022] 表4 本发明试剂盒精密性检测

质控品标本检测精密度						
样本浓度	第 1 批			第 2 批		
	(高值)	(中值)	(低值)	(高值)	(中值)	(低值)
	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL
1	65.07	13.66	6.63	59.28	13.77	6.97
2	61.07	14.19	6.09	61.50	14.45	6.20
3	64.19	13.69	6.18	61.79	14.10	6.19
4	63.27	13.56	6.90	58.84	13.74	6.91
5	63.71	14.21	6.58	60.09	13.92	7.03
6	62.54	14.34	6.76	58.00	15.07	6.76
7	61.82	14.07	6.51	60.64	15.08	6.26
8	61.88	13.91	5.81	60.67	14.97	6.23
9	62.96	13.96	6.56	55.18	13.39	6.52
10	63.15	14.15	6.29	58.54	13.99	6.43
11	62.39	14.27	6.77	59.27	13.96	6.37
12	61.78	14.81	6.24	59.52	14.46	6.53
13	62.87	14.94	6.01	60.74	13.99	6.80
14	63.13	14.17	6.61	60.31	14.74	6.84
15	61.26	14.19	6.43	59.24	13.96	6.74
16	60.81	14.33	6.09	59.52	14.16	6.95
17	61.08	13.98	6.02	61.68	13.92	6.03
18	63.00	14.69	6.27	59.72	14.76	6.71
19	60.86	13.88	6.25	56.47	14.00	6.60
20	62.39	13.89	6.57	59.38	13.43	6.59
平均值	62.46	14.14	6.38	59.52	14.19	6.58
SD	1.16	0.36	0.30	1.64	0.51	0.30
变异系数 CV%	1.85%	2.58%	4.64%	2.75%	3.57%	4.52%

表5 本发明试剂盒精密性检测

真实人血清标本检测精密度						
样本浓度	第 1 批			第 2 批		
	(高值)	(中值)	(低值)	(高值)	(中值)	(低值)
	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL
1	47.14	22.80	8.16	44.71	21.75	9.11
2	46.57	21.83	9.30	47.95	22.00	8.28
3	47.05	22.03	9.56	46.18	21.11	9.28
4	46.88	22.98	9.01	44.94	21.12	9.23
5	45.01	22.42	9.29	45.48	21.23	9.37
6	44.65	23.29	9.22	45.66	20.61	9.04
7	46.30	23.59	8.90	46.68	21.54	9.59
8	45.39	22.68	9.10	46.08	22.18	8.68
9	46.60	21.88	9.42	48.41	21.27	9.33
10	46.42	22.39	9.17	46.69	21.26	9.07
11	47.09	23.47	9.21	45.80	21.55	9.49
12	45.72	21.35	9.05	46.32	21.12	9.33
13	44.61	22.22	9.53	46.26	23.00	9.15
14	48.25	22.13	8.86	46.81	22.31	9.46
15	47.13	22.60	8.91	46.47	21.03	9.33
16	47.66	22.00	9.54	45.07	20.54	9.58
17	46.68	23.08	9.41	47.44	21.07	8.99
18	48.35	23.74	8.55	45.66	21.04	9.14
19	47.40	23.67	8.88	46.46	21.94	9.05
20	45.96	22.18	8.88	47.58	21.12	8.86
平均值	46.54	22.62	9.10	46.33	21.44	9.17
SD	1.07	0.69	0.35	0.98	0.60	0.31
变异系数 CV%	2.29%	3.05%	3.84%	2.12%	2.81%	3.42%

表4、表5数据结果表明：本发明试剂盒的变异系数均小于5%。

### [0023] 3、准确度测定

由于准确度目前暂无国家或国际标准品，在此采用回收试验的方法评价试剂盒的准确度。

[0024] 10份在线性范围内的血清高值，用接近0值的混合血清样本按照1:9的比例混合，求回收率。

[0025] 表6 本发明试剂盒准确度检测

第一批										
	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5	样本 6	样本 7	样本 8	样本 9	样本 10
高值	62.08	58.90	60.38	60.83	69.08	61.41	61.77	69.72	65.70	67.08
	64.82	71.30	66.92	59.16	65.99	64.26	64.62	62.12	61.91	64.40
混合	9.03	8.61	8.40	8.28	8.87	8.83	9.31	8.66	8.93	9.52
	8.81	8.74	8.48	9.36	10.02	8.48	9.26	9.55	9.45	9.73
低值	2.87	2.92	2.87	3.08	3.18	3.22	2.98	2.96	3.17	3.10
	2.98	2.78	3.21	2.72	3.20	3.08	3.14	3.09	2.85	2.87
回收	99.10%	93.85%	89.60%	103.45%	97.39%	92.62%	103.33%	96.75%	101.56%	105.52%
第二批										
高值	70.34	58.85	67.63	61.24	61.61	64.21	62.65	68.70	62.60	60.28
	63.07	69.83	61.63	58.60	61.30	59.45	61.65	61.47	58.92	69.69
混合	9.38	8.99	9.70	8.36	9.06	9.96	9.06	9.91	9.22	9.41
	9.77	8.53	9.17	8.52	9.06	8.71	9.37	9.10	8.81	9.96
低值	3.06	2.76	3.08	3.04	2.83	3.14	3.23	2.85	3.15	3.12
	2.85	3.24	2.91	3.29	3.01	2.99	3.10	2.92	3.10	3.17
回收	103.61%	94.23%	104.29%	93.35%	104.67%	106.32%	102.49%	106.13%	102.04%	105.44%

由表6可以看出,本发明试剂盒的回收率在85%~115%之间,均满足要求。

#### [0026] 4、临床性能考核

用本发明试剂盒和国外雅培试剂盒同时测定96例临床诊断胃部疾病样本,包含慢性胃炎、急性胃炎、胃溃疡等,联合PGI、PG II 及PGI和PG II 的比值结果进行阴阳符合率分析,结果如表7所示。

[0027] 表7本发明试剂盒与对照试剂盒符合率比对

	雅培试剂盒测定结果			合计
	+	+	-	
本发明试剂盒	+	18	0	18
	-	1	77	78
合计		19	77	96
阳性符合率		94.7%		
阴性符合率		100%		
总符合率		98.9%		

从表7测定结果可以看出,本发明试剂盒与雅培阳性符合率达到94.7%,阴性符合率达到100%,总符合率达到98.9%;PG II 与雅培相关性见附图2: $y=0.955x+0.0354$ , $r^2=0.9937$ ,说明本试剂盒可以用来对胃部疾病进行检测,并根据检测结果进行风险评估,可为患者下一步治疗提供方案,降低早期胃癌的发生率。



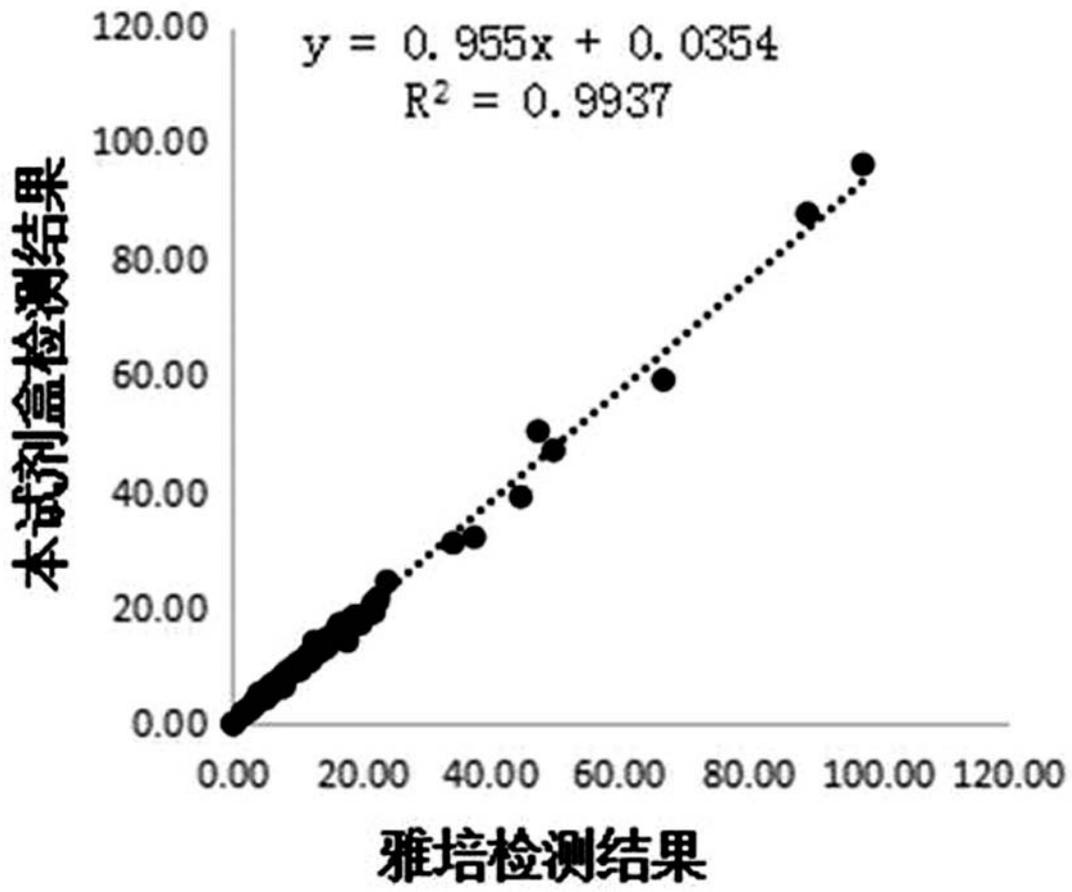


图2

专利名称(译)	胃蛋白酶原II检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN109307765A</a>	公开(公告)日	2019-02-05
申请号	CN201811446772.2	申请日	2018-11-29
[标]申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
[标]发明人	马雷 史小芹 渠文涛 刘雅奇 周金龙 田会会 李晓霞 乔晓芳 付光宇 吴学炜		
发明人	马雷 史小芹 渠文涛 刘雅奇 周金龙 田会会 李晓霞 乔晓芳 付光宇 吴学炜		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/573 G01N33/535 G01N33/68 G01N21/76		
代理人(译)	王霞		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种胃蛋白酶原II检测试剂盒，包括包被有胃蛋白酶原II单克隆抗体的磁微粒，含有辣根过氧化物酶（HRP）标记胃蛋白酶原II单克隆抗体的酶稀释液，含有胃蛋白酶原II抗原的校准品及样品稀释液；所述样品稀释液中含有阻断剂成分；所述阻断剂为一种或多种中和HAMA干扰的人抗鼠抗体。本发明的优点在于将高灵敏度的化学发光技术和磁微粒制备技术相结合，配套使用AutoLumo全自动检测分析仪，实现了检测全自动化；同时在样品稀释液中添加阻断剂成分，可消除样本中嗜异性抗体，大大提高了试剂盒的抗干扰能力。

