



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109991409 A  
(43)申请公布日 2019.07.09

(21)申请号 201811462911.0

(22)申请日 2018.12.03

(71)申请人 浙江聚康生物工程有限公司  
地址 315000 浙江省宁波市杭州湾新区滨海二路77号

(72)发明人 邓川 郭亚楠 张守涛 陶新博  
杨永芳

(74)专利代理机构 北京国翰知识产权代理事务所(普通合伙) 11696  
代理人 徐佳晶

(51)Int.Cl.  
G01N 33/533(2006.01)  
G01N 33/573(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页  
序列表3页 附图1页

(54)发明名称

胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒

(57)摘要

本发明提供胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒,属于医学免疫学中荧光免疫层析技术领域,其为荧光定量免疫层析法的检测试剂盒,包括检测卡,其特征在于:检测卡由下至上依次设有:PVC板、样品垫、结合垫、层析膜和吸水纸;层析膜包括检测区和质控区,检测区包被抗PG I单克隆抗体和PG II单克隆抗体的检测区,质控区包被羊抗鼠IgG抗体。本发明试剂盒的测试样本为人的血清、血浆或全血样本,具备良好的检测特异性、较高的灵敏度、操作的简便性以及稳定的荧光标记物保证了检测的准确性。

|        |   |        |
|--------|---|--------|
| *****  | 1 | *****  |
| ////// | 2 | ////// |
|        | 3 |        |
| .....  | 4 | .....  |
| #####  | 5 | #####  |

1. 胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒,其为荧光定量免疫层析法的检测试剂盒,包括检测卡,其特征在于:所述检测卡由下至上依次设有:PVC板、样品垫、结合垫、层析膜和吸水纸;

所述层析膜包括检测区和质控区,所述检测区包被抗PG I单克隆抗体和PG II单克隆抗体的检测区,所述质控区包被羊抗鼠IgG抗体。

2. 根据权利要求1所述的胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒,其特征在于:所述抗PG I单克隆抗体通过对人抗PG I进行免疫而得到,具有如SEQ ID NO.1的序列。

3. 根据权利要求1所述的胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒,其特征在于:所述抗PG II单克隆抗体通过对人抗PG II进行免疫而得到,具有如SEQ ID NO.2的序列。

4. 根据权利要求1所述的胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒,其特征在于:所述层析膜为硝酸纤维素膜。

5. 根据权利要求1或2或3所述的胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒,其特征在于:所述结合垫上吸附有稀土荧光微球标记的抗PG I单克隆抗体和PG II单克隆抗体-微球偶联复合物。

6. 根据权利要求5所述的胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒,其特征在于:所述荧光微球的直径为100-250nm,所述荧光微球为稀土荧光微球,其含稀土镧系元素的一种或几种;所述单克隆抗体为纯化后混合的单克隆抗体。

7. 根据权利要求1或2或3所述的胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括IC卡以及稀释液。

8. 根据权利要求1或2或3所述的胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒的测试样本为人的血清、血浆或全血。

9. 权利要求1-8任一项所述的胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒的用途,其特征在于:在体外定量检测人血清、血浆或全血样本中胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的含量的用途。

10. 权利要求1-8任一项所述的胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒的使用方法,其特征在于:吸取全血150 $\mu$ L样本加一滴稀释液或血清、血浆100 $\mu$ L样本加入到测试卡的加样孔中,10分钟后将检测卡插入适用仪器的卡槽内,进行定量判读结果;正常参考区间为:PGI >70ng/mL;PGII <20ng/mL。

## 胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于医学免疫学中荧光免疫层析技术领域,具体涉及胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 胃蛋白酶原(pepsinogen,PG)是胃分泌的一种消化酶前体,是胃液中胃蛋白酶的无活性前体,根据分布和免疫原性不同,可分为PG I、PG II两种亚型。PG I和PG II是幽门螺旋杆菌(HP)感染和萎缩性胃炎的良好诊断指标,其含量能反映胃粘膜的分泌功能。PG I主要反应的是胃底和胃体的黏膜状态,胃酸分泌增多、胃炎及消化性溃疡PG I升高,胃酸分泌减少或胃黏膜腺体萎缩PG I降低;当发生萎缩性胃炎时会导致胃黏膜主细胞丢失,胃黏膜分泌能力下降,PG I水平明显下降;PG II与胃底黏膜病变的相关性较大(相对于胃窦粘膜),其升高与胃底腺管萎缩、肠上皮化生或假幽门腺化生、异型增生有关;而且PG II是幽门螺旋杆菌(HP)感染最敏感的指标,PG II升高幅度较PG I明显,PG I/PG II比值降低;故PG I、PG II及PG I/PG II检测结果可作为胃部疾病的诊断和鉴别的指标。

[0003] CN 104698174B公开了一种胃蛋白酶原I和II联合检测试剂盒,包括已包被抗PGI和PG II抗体的酶联板,抗PGI抗体是将PGI抗原部分基因序列PGI-A和PGI-B分别通过基因工程克隆表达得到PGI-A和PGI-B重组蛋白,并将其免疫小鼠制备得到单克隆抗体;PGI-A的核苷酸序列参见序列表中SEQ ID No.1,PGI-B的核苷酸序列参见序列表中SEQ ID No.2;抗PG II抗体是将PG II抗原基因序列通过基因工程克隆表达得到PG II重组蛋白,并将其免疫小鼠制备得到单克隆抗体,PG II抗原的核苷酸序列参见序列表中SEQ ID No.3。上述试剂盒可同时检测PGI和PG II,操作简单,检测快速。但是该试剂盒只能用来检测血清中PGI和PG II的含量。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种测试样本为人的血清、血浆或全血样本,具备良好的检测特异性、较高的灵敏度、操作的简便性以及稳定的荧光标记物保证了检测的准确性的胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒。

[0005] 本发明为实现上述目的所采取的技术方案为:

[0006] 胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒,其为荧光定量免疫层析法的检测试剂盒,包括检测卡,检测卡由下至上依次设有:PVC板、样品垫、结合垫、层析膜和吸水纸;

[0007] 其中层析膜包括检测区和质控区;检测区包被抗PG I单克隆抗体和PG II单克隆抗体的检测区,用于捕获抗原;质控区包被羊抗鼠IgG抗体,用于信号检测的提供。

[0008] 作为优选,抗PG I单克隆抗体通过对人抗PG I进行免疫而得到,具有如SEQ ID NO.1的序列。

[0009] 作为优选,抗PG II单克隆抗体通过对人抗PG II进行免疫而得到,具有如SEQ ID NO.2的序列。

[0010] 作为优选,层析膜为硝酸纤维素膜。

[0011] 作为优选,结合垫上吸附有稀土荧光微球标记的抗PG I单克隆抗体和PG II单克隆抗体-微球偶联复合物。

[0012] 进一步优选,荧光微球的直径为100-250nm,荧光微球为稀土荧光微球,其含稀土镧系元素的一种或几种;单克隆抗体为纯化后混合的单克隆抗体。

[0013] 作为优选,试剂盒还包括IC卡以及稀释液。

[0014] 作为优选,试剂盒的测试样本为人的血清、血浆或全血。本试剂盒仅用于人血清、血浆或全血样本的检测,其它体液样本不适用,血清、血浆、全血样本按常规方法采集,抗凝剂可使用枸橼酸钠、EDTA、或肝素抗凝血浆,对于血清或血浆,分离后请于4小时内测定,血清或血浆2~8℃可保存5天,超过5天需保存在-20℃,检测前,将样本恢复至室温后1小时内完成检测,切勿反复冻融;全血样本于2~8℃可保存3天,不得冻存。

[0015] 本发明试剂盒采用免疫荧光双抗夹心法定量检测人血清、血浆或全血中胃蛋白酶原I (PG I) 和胃蛋白酶原II (PG II) 的含量。当样品滴加到检测卡加样孔后,样本中PG I和PG II与结合垫中的荧光物质标记的抗PG I单克隆抗体和PG II单克隆抗体结合形成反应复合物,反应复合物随层析作用沿着硝酸纤维素膜前移,被硝酸纤维素膜检测线上的对应单克隆抗体捕获,样本中的PG I和PG II捕获量与检测区信号强度正相关,通过荧光分析仪,定量检测样品中PG I和PG II的含量。

[0016] 本发明还提供上述胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒的用途,在体外定量检测人血清、血浆或全血样本中胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的含量的用途。主要用于为胃癌的早期筛查;胃溃疡、萎缩性胃炎、幽门螺旋杆菌(HP)感染的筛查;幽门螺旋杆菌(HP)治疗效果的评价;消化性溃疡的复发评估、疗效评价;胃癌切除术后的复发评估;个人胃粘膜功能的动态监测。

[0017] 本发明还提供上述胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒的使用方法,吸取全血150μL样本加一滴稀释液或血清、血浆100μL样本加入到测试卡的加样孔中,10分钟后将检测卡插入适用仪器的卡槽内,进行定量判读结果;正常参考区间为:PG I>70ng/mL;PG II<20ng/mL。

[0018] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:1) 本发明试剂盒的测试样本为人的血清、血浆或全血样本,具备良好的检测特异性、较高的灵敏度、操作的简便性以及稳定的荧光标记物保证了检测的准确性;2) 本发明试剂盒能同时定量检测样本中的胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的含量,对胃部疾病的诊断和鉴别有协同互补作用,可以为胃部疾病病人提供准确可靠的诊断,危险分层和预后信息,具有更快速、更有效、更准确等优点;3) 通过本发明方法制备得到的两种单克隆抗体-微球偶联复合物,相比现有技术,荧光寿命长,Stokes位移大,激发光谱和发射光谱不重叠,不存在相互干扰现象。

[0019] 本发明采用了上述技术方案提供胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒,弥补了现有技术的不足,设计合理,操作方便。

## 附图说明

[0020] 图1是本发明中试纸卡的结构示意图。

[0021] 附图标记:1.PVC板;2.样品垫;3.结合垫;4.层析膜;5.吸水垫。

## 具体实施方式

[0022] 下面,结合具体实施例对本发明实施方式作进一步说明。下面描述的实施例是示例性的,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0023] 根据本发明的实施方式,提供了以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。另外,本发明中的术语“包被”为免疫领域的术语,包含吸附、固定之意。

[0024] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0025] 实施例1:

[0026] 如图1所示,胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒,其为荧光定量免疫层析法的检测试剂盒,包括检测卡,检测卡由下至上依次设有:PVC板1、样品垫2、结合垫3、层析膜4和吸水纸5;其中层析膜包括检测区和质控区;检测区包被抗PG I单克隆抗体和PG II单克隆抗体的检测区,用于捕获抗原;质控区包被羊抗鼠IgG抗体,用于信号检测的提供。上述层析膜4为硝酸纤维素膜,通过以下步骤制得:

[0027] 1) 采用与结合垫3上所用的抗PG I和抗PG II单克隆抗体细胞株不同的细胞株,采用标准的腹水生产工艺制备并纯化抗人心肌肌钙蛋白I抗体、抗肌红蛋白抗体和抗肌酸激酶同工酶抗体等三种鼠源单克隆抗体,得到与标记抗体配对的单克隆抗体,分装后保存于-20℃备用;

[0028] 2) 分别用包被稀释液将上述三种鼠源单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体调整浓度到1-3mg/ml,膜液量为1-3 $\mu$ l/cm,将它们分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被,检测线和质控线间隔为3-7mm,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。

[0029] 上述样品垫2通过以下步骤制得:将玻璃纤维膜浸泡于含有1.0% Triton X-100, 2.5% BSA, 0.15M Tris缓冲液, pH7.5的处理液中,于4℃浸泡4个小时,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。

[0030] 上述使用的抗PG I单克隆抗体通过对人抗PG I进行免疫而得到,具有如VDEQPLE NYLDMEYFGTIGIGTPAQDFTVVFDCTNHNRFNPEDSSTYTGSSN LWVPSVYCSSLQSTSETVSITYGTGSMTG ILGYDTVQVGGISDTNQIFGLSETE PGSFLYYPFDGILGLAYPSISSSGATPVFDNIWNQGLVSDLFSVYLSA DDQS GSVVIFGGIDSSYYTGSLNWPVTVVEGYWQITVDSITMNGEAIACAEGCQAI V DTGTSLLTGPTSPIANI QSDIGASENSDGMVSCSAISSLPDIVFTINGVQYPV PPSAYILQSEGSCISGFQGMNLPTEGELWILGDVFI RQYFTVFD RANNQVGLA PVA的序列;抗PG II单克隆抗体通过对人抗PG II进行免疫而得到,具有如MAVVKVP LKKFKSIRETMKEKGLLGEFLRTHKYDPAWKYRFGDLSVTYEPMA YMDAAYFGEISIGTPPQNF LVLFD TGSSNLWVPSVYCQS QACTSHSRFNPESS TYSTNGQTFSLQYGSGLTGFFGYD TLTVQSIQV PNQEFGLSENEPGTNFVYAQ FDGIMGLAYPALSVDEATTAMQGMVQEGALTSPVFSVYLSNQQGSSGGAVVF GVDSSLY TGQIYWAPVTQELYWQIGIEEFLIGGQASGWCSEGCQAI VDTGTS LLTVPQQYMSALLQATGAQEDEYQFLVNC NSIQNLPSLTFIINGVEFPLPPSSY ILSNNGYCTVGVEPTYLSSQNGQPLWILGDVFLRSYYSVYDLGNNRVGFA TAA GGGSLVLESSGLGPLLTPSRAAPPSTLQLPEKPLEQTWNILTPFTKTL PVS NL SRKVTSWAGVGIPVTC LPEAGSGGERRAECGLGVPTTRGPPRSQHHS GA的序列。

[0031] 上述结合垫3上吸附有稀土荧光微球标记的抗PG I单克隆抗体和PG II单克隆抗体-微球偶联复合物,荧光微球的直径为100-250nm,荧光微球为稀土荧光微球,其含稀土镧系元素的一种或几种,在基态下稳定,在300-400nm的激发光源作用下发射出波长范围550-

650mm的荧光;单克隆抗体为纯化后混合的单克隆抗体,分别均来源于针对2-6个不同的抗PG I单克隆抗体、抗PG II单克隆抗体抗原表位的单克隆抗体细胞株。

[0032] 其中,结合垫3采用如下步骤制得:将玻璃纤维膜浸泡于150mM Tris-HCl处理液中(含1.0% Triton X-100,2.5% BSA,pH7.4),4℃浸泡2小时,然后取出37℃烘箱烘干4小时,备用。将玻璃纤维膜放在三维喷点平台上,用非接触式微量喷头将稀土荧光微球标记的抗PG I单克隆抗体和抗PG II单克隆抗体的两种偶联复合物混匀后喷到玻璃纤维膜上,37℃烘干1小时后制得。

[0033] 上述结合垫3上吸附的稀土荧光微球标记的抗PG I单克隆抗体和PG II单克隆抗体-微球偶联复合物采用如下步骤制得:

[0034] 1) 单克隆抗体细胞株的获得:分别用人抗PG I和抗PG II纯品分别免疫小鼠,采用标准的单克隆抗体制备方法制备特异性高亲和力高的单克隆抗体细胞株,对所获得的单抗细胞株进行配对筛选,根据配对结果和亲和力数据优选出用于试剂盒的单抗细胞株;

[0035] 2) 单克隆抗体的制备:采用标准的腹水生产工艺制备并纯化抗PG I和抗PG II抗体两种鼠源单克隆抗体,分装后保存于-20℃备用;

[0036] 3) 稀土荧光微球的醛基化:取5mg稀土荧光微球,用20mM,pH 9.5的碳酸盐缓冲液,采用离心法洗涤3遍,离心速度为12000rpm,时间为5分钟,最后重悬于100u1的上述碳酸盐缓冲液中,加入500u1醛基化的葡聚糖,混匀,室温下暗反应4小时,采用同样的离心法洗涤和重悬到100u1的上述碳酸盐缓冲液中,置于4℃备用;

[0037] 4) 稀土荧光微球标记的抗人抗PG I和抗PG II抗体等两种偶联复合物的制备:两种抗体-微球偶联复合物分别单独偶联,操作如下:选取来自2个不同抗原表位的单克隆细胞株的抗PG I,按照质量比1:1将2mg人抗PG II用上述碳酸盐缓冲液于4℃透析过夜,然后与上述醛基化的稀土荧光微球混合,4℃反应过夜;然后,加入硼氢化钠至终浓度5mM,4℃反应4小时;再加入等体积的封闭液(50mM Tris-HCl,pH 7.4,含2.5% BSA,5%蔗糖),4℃封闭过夜;然后用50mM Tris-HCl,pH 7.4的缓冲液采用离心法洗涤3遍,重悬于100u1的50mM Tris-HCl缓冲液中(含1.2% NaCl,0.5% BSA,0.1% Tween 20),4℃避光保存备用。

[0038] 上述试剂盒还包括1张IC卡和稀释液,其中10/25人份/盒均配稀释液1\*5mL/支,40人份/盒配稀释液2\*5mL/支。稀释液为0.05% PBS-T溶液(pH 7.2)。

[0039] 上述试剂盒的测试样本为人的血清、血浆或全血。本试剂盒仅用于人血清、血浆或全血样本的检测,其它体液样本不适用,血清、血浆、全血样本按常规方法采集,抗凝剂可使用枸橼酸钠、EDTA、或肝素抗凝血浆,对于血清或血浆,分离后请于4小时内测定,血清或血浆2~8℃可保存5天,超过5天需保存在-20℃,检测前,将样本恢复至室温后1小时内完成检测,切勿反复冻融;全血样本于2~8℃可保存3天,不得冻存。

[0040] 该试剂盒采用免疫荧光双抗夹心法定量检测人血清、血浆或全血中胃蛋白酶原I(PG I)和胃蛋白酶原II(PG II)的含量。当样品滴加到检测卡加样孔后,样本中PG I和PG II与结合垫中的荧光物质标记的抗PG I单克隆抗体和PG II单克隆抗体结合形成反应复合物,反应复合物随层析作用沿着硝酸纤维素膜前移,被硝酸纤维素膜检测线上的对应单克隆抗体捕获,样本中的PG I和PG II捕获量与检测区信号强度正相关,通过荧光分析仪,定量检测样品中PG I和PG II的含量。

[0041] 上述试剂盒检测卡于4~30℃保存,有效期18个月,试剂铝箔袋开封后,2小时内有

效。

[0042] 上述试剂盒使用如下仪器：威海纽普生物技术有限公司的NP007干式荧光免疫分析仪、广州蓝勃生物科技有限公司的AFS1000干式荧光免疫分析仪。每个检测试剂盒反应板均有一个内部质控的过程以确保使用时日常质控需求。该质控程序在每个病人样本测试即同时执行。一旦反应板正确插入荧光分析仪中，仪器将完全识别。不正确的之空信息将会在荧光分析仪上显示出错误信息，将需要进行重新测试。

[0043] 上述试剂盒的性能指标：

[0044] 1) 线性范围：

[0045] PGI在10.00ng/mL~160.00ng/mL范围内，线性相关系数 $r \geq 0.9900$ ；

[0046] PGII在6.25ng/mL~1000.00ng/mL范围内，线性相关系数 $r \geq 0.9900$ 。

[0047] 2) 重复性：

[0048] PGI变异系数(CV)  $\leq 15\%$ ；

[0049] PGII变异系数(CV)  $\leq 15\%$ 。

[0050] 3) 批间差：

[0051] PGI相对极差(R)  $\leq 20\%$ ；

[0052] PGII相对极差(R)  $\leq 20\%$ 。

[0053] 4) 准确度：

[0054] PGI以内部参考品为检测样本，测定值与标示值偏差应 $\leq 20\%$ ；

[0055] PGII以内部参考品为检测样本，测定值与标示值偏差应 $\leq 20\%$ 。

[0056] 5) 最低检测限：

[0057] PGI：不高于10.00ng/mL；

[0058] PGII：不高于6.25ng/mL。

[0059] 上述试剂盒的注意事项：

[0060] 1. 本品为一次性使用体外诊断试剂，请勿重复使用，请在有效期内使用。

[0061] 2. 测试卡及组件仅适用于相关的荧光分析仪。

[0062] 3. 产品在使用前请不要开封，包装明显损坏者，请勿使用。

[0063] 4. 不同批号的试剂组分不能混用，IC卡与检测卡不得混批号使用。

[0064] 5. 在收集、处置、储存、混匀样本和检测过程中应采取适当的保护措施。

[0065] 6. 铝箔袋内有干燥剂，不得食用。

[0066] 7. 应避免实验环境温度过高，低温保存的测试卡需要恢复至室温后再打开，以免吸潮。

[0067] 8. 检测卡和荧光分析仪在使用时应避免震动和电磁环境；在正常使用中仪器本身产生震动属正常现象；检测进行时请勿拔出IC卡。

[0068] 9. 建议使用新鲜样本，若样本中有明显溶血或血凝块则会干扰测试和导致错误结果，切勿使用。

[0069] 10. 本试剂的检测结果仅供临床参考，对患者的临床诊治应结合其症状、体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

[0070] 11. 所有标本、废液、管子等均按传染性污染物处理方式处理。检测后应将用完的检测卡丢弃在相应的生物危害品容器中，按生物危害物处理。

[0071] 12. 使用本试剂过程中如有问题或者建议, 请与厂家联系。

[0072] 上述胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒的用途, 在体外定量检测人血清、血浆或全血样本中胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的含量的用途。主要用于为胃癌的早期筛查; 胃溃疡、萎缩性胃炎、幽门螺旋杆菌 (HP) 感染的筛查; 幽门螺旋杆菌 (HP) 治疗效果的评价; 消化性溃疡的复发评估、疗效评价; 胃癌切除术后的复发评估; 个人胃粘膜功能的动态监测。

[0073] 上述胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒的使用方法, 具体为:

[0074] 1) 准备: 从铝箔包装袋中拿出检测卡, 将其置于水平、干燥的平面上 (如从冰箱中取出的检测卡, 需平衡至室温后再从密封铝箔袋中取出使用, 否则将影响实验结果);

[0075] 2) 校准: 确认IC卡与检测卡的批号相匹配, 进行IC卡校准;

[0076] 3) 加样: 吸取全血150 $\mu$ L样本加一滴稀释液或血清、血浆100 $\mu$ L样本加入到测试卡的加样孔中;

[0077] 4) 检测: 10分钟后将检测卡插入适用仪器的卡槽内, 进行定量判读结果; 正常参考区间为: PGI>70ng/mL; PGII<20ng/mL。

[0078] 实施例2:

[0079] 为了提高试剂盒的稳定性和灵敏性, 采取的优化措施还包括:

[0080] 结合垫3上吸附的稀土荧光微球标记的抗PG I单克隆抗体和PG II单克隆抗体-微球偶联复合物采用如下步骤制得:

[0081] 稀土荧光微球的醛基化步骤为: 取5mg稀土荧光微球, 用20mM, pH 9.5的碳酸盐缓冲液, 采用离心法洗涤3遍, 离心速度为12000rpm, 时间为5分钟, 最后重悬于含有1.5 $\mu$ l 巯基乙酸单乙醇胺的100 $\mu$ l的上述碳酸盐缓冲液中, 加入500 $\mu$ l 醛基化的葡聚糖、0.2 $\mu$ g 2-氨基乙磺酸, 混匀, 室温下暗反应4小时, 采用同样的离心法洗涤和重悬到100 $\mu$ l的上述碳酸盐缓冲液中, 置于4 $^{\circ}$ C备用。巯基乙酸单乙醇胺和2-氨基乙磺酸的存在能够提高稀土荧光微球的醛基化程度, 为抗PG I单克隆抗体和PG II单克隆抗体共价结合提供了偶联位点, 提高稀土荧光微球与抗PG I单克隆抗体和PG II单克隆抗体的结合力, 而且由于游离醛基的存在, 增加了水溶性, 进而增大了稀土荧光微球本身与抗PG I单克隆抗体和PG II单克隆抗体间碰撞的机会, 另一方面能够减少抗PG I单克隆抗体和PG II单克隆抗体间的交联, 减少抗体的聚集, 在最大化提高标记率和荧光强度的同时也使抗体的免疫活性相对较高, 最终提高试剂盒的稳定性和检测灵敏度。

[0082] 实施例3:

[0083] 稳定性实验

[0084] 检测卡的稳定性: 试剂盒中的检测卡通常保存在室温干燥阴凉的环境中。检测卡在50 $^{\circ}$ C烘箱中放置一个月进行加速破坏稳定性测试, 相当于检测卡常温下保存1年的有效性。将检测卡在50 $^{\circ}$ C烘箱中分别放置1周、2周、3周、4周后取出放入干燥房内, 与干燥房内常温放置的试剂卡进行对比, 样本稀释液使用4 $^{\circ}$ C保存, 检测卡的稳定性。实施例2的检测卡放在50 $^{\circ}$ C烘箱中加速破坏1周、2周、3周、4周在标准品测试的情况下的反应曲线与常温保存的检测卡基本吻合, 低中高浓度的荧光信号T/C值基本没变化, 说明荧光定量免疫层析检测卡经加速破坏测试后, 稳定性良好。而实施例1的检测卡放在50 $^{\circ}$ C烘箱中加速破坏1周、2周、3周、4周在标准品测试的情况下的反应曲线与常温保存的检测卡的吻合度差于实施例2的检

测卡,说明实施例2的检测卡的稳定性好于实施例1,进而表明巯基乙酸单乙醇胺和2-氨基乙磺酸的存在能够提高稀土荧光微球与抗PG I单克隆抗体和PG II单克隆抗体的结合力,进而提高检测卡的稳定性。

[0085] 上述实施例中的常规技术为本领域技术人员所知晓的现有技术,故在此不再详细赘述。

[0086] 以上实施方式仅用于说明本发明,而并非对本发明的限制,本领域的普通技术人员,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,还可以做出各种变化和变型。因此,所有等同的技术方案也属于本发明的范畴,本发明的专利保护范围应由权利要求限定。

## 序列表

<120> 胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒

<160> 2

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 326

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Asp | Glu | Gln | Pro | Leu | Glu | Asn | Tyr | Leu | Asp | Met | Glu | Tyr | Phe | Gly |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |
| Thr | Ile | Gly | Ile | Gly | Thr | Pro | Ala | Gln | Asp | Phe | Thr | Val | Val | Phe | Asp |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |
| Ala | Cys | Thr | Asn | His | Asn | Arg | Phe | Asn | Pro | Glu | Asp | Ser | Ser | Thr | Tyr |
|     |     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     |     | 45  |     |
| Thr | Gly | Ser | Ser | Asn | Leu | Trp | Val | Pro | Ser | Val | Tyr | Cys | Ser | Ser | Leu |
|     |     |     | 50  |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Gln | Ser | Thr | Ser | Glu | Thr | Val | Ser | Ile | Thr | Tyr | Gly | Thr | Gly | Ser | Met |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| Thr | Gly | Ile | Leu | Gly | Tyr | Asp | Thr | Val | Gln | Val | Gly | Gly | Ile | Ser | Asp |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Thr | Asn | Gln | Ile | Phe | Gly | Leu | Ser | Glu | Thr | Glu | Pro | Gly | Ser | Phe | Leu |
|     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |
| Tyr | Tyr | Ala | Pro | Phe | Asp | Gly | Ile | Leu | Gly | Leu | Ala | Tyr | Pro | Ser | Ile |
|     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |
| Ser | Ser | Ser | Gly | Ala | Thr | Pro | Val | Phe | Asp | Asn | Ile | Trp | Asn | Gln | Gly |
|     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |
| Leu | Val | Ser | Gln | Asp | Leu | Phe | Ser | Val | Tyr | Leu | Ser | Ala | Asp | Asp | Gln |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |
| Ser | Gly | Ser | Val | Val | Ile | Phe | Gly | Gly | Ile | Asp | Ser | Ser | Tyr | Tyr | Thr |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |     |
| Gly | Ser | Leu | Asn | Trp | Val | Pro | Val | Thr | Val | Glu | Gly | Tyr | Trp | Gln | Ile |
|     |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |
| Thr | Val | Asp | Ser | Ile | Thr | Met | Asn | Gly | Glu | Ala | Ile | Ala | Cys | Ala | Glu |
|     |     |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |
| Gly | Cys | Gln | Ala | Ile | Val | Asp | Thr | Gly | Thr | Ser | Leu | Leu | Thr | Gly | Pro |
|     |     |     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |
| Thr | Ser | Pro | Ile | Ala | Asn | Ile | Gln | Ser | Asp | Ile | Gly | Ala | Ser | Glu | Asn |







图1

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒                            |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN109991409A</a>                   | 公开(公告)日 | 2019-07-09 |
| 申请号            | CN201811462911.0                               | 申请日     | 2018-12-03 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 浙江聚康生物工程有限公司                                   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 浙江聚康生物工程有限公司                                   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 浙江聚康生物工程有限公司                                   |         |            |
| [标]发明人         | 邓川<br>郭亚楠<br>张守涛<br>陶新博<br>杨永芳                 |         |            |
| 发明人            | 邓川<br>郭亚楠<br>张守涛<br>陶新博<br>杨永芳                 |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/533 G01N33/573                          |         |            |
| 代理人(译)         | 徐佳晶  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明提供胃蛋白酶原I/胃蛋白酶原II检测试剂盒，属于医学免疫学中荧光免疫层析技术领域，其为荧光定量免疫层析法的检测试剂盒，包括检测卡，其特征在于：检测卡由下至上依次设有：PVC板、样品垫、结合垫、层析膜和吸水纸；层析膜包括检测区和质控区，检测区包被抗PG I单克隆抗体和PG II单克隆抗体的检测区，质控区包被羊抗鼠IgG抗体。本发明试剂盒的测试样本为人的血清、血浆或全血样本，具备良好的检测特异性、较高的灵敏度、操作的简便性以及稳定的荧光标记物保证了检测的准确性。

