



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104569415 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201510032770. 9

(22) 申请日 2015. 01. 23

(71) 申请人 河南美凯生物科技有限公司

地址 462000 河南省漯河市沙澧产业集聚区
湘江西路与经五路交叉口

(72) 发明人 赵焕朝 俞宁 胡锰鸽 翟秋菊
张喜娟

(74) 专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务
所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

一种胃蛋白酶原 II 化学发光定量检测试剂盒
及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及免疫检测领域,具体地涉及一种胃蛋白酶原 II 化学发光定量检测试剂盒及其方法。本发明所述胃蛋白酶原 II 化学发光定量检测试剂盒,包括:1) 胃蛋白酶原 II 抗体包被微孔板;2) HRP 标记胃蛋白酶原 II 抗体;3) 校准品稀释液稀释后的系列胃蛋白酶原 II 校准品;4) 发光底物 A;5) 发光底物 B;6) 固体洗液。本发明的试剂盒可以检测出血清中胃蛋白酶原 II 的含量,血清中胃蛋白酶原 II 水平与萎缩性胃炎、消化性溃疡呈正相关;在幽门螺杆菌的治疗中,通过监测除菌后的胃蛋白酶原变化能够判定治疗效果。它具有无创、检测方法简单快速、灵敏度高、检测范围宽等优点。

1. 一种胃蛋白酶原 II 化学发光定量检测试剂盒, 包括: 1) 胃蛋白酶原 II 抗体包被微孔板; 2) HRP 标记胃蛋白酶原 II 抗体; 3) 校准品稀释液稀释后的系列胃蛋白酶原 II 校准品; 4) 发光底物 A; 5) 发光底物 B; 6) 固体洗液;

所述胃蛋白酶原 II 抗体为鼠源或兔源人胃蛋白酶原 II 单克隆抗体;

所述包被的微孔板为 48 孔或 96 孔的微孔板条;

所述校准品稀释液的配方为:

去离子水	1L
三羟甲基氨基甲烷	6.06g
NaH ₂ PO ₄	0.2g
NaCl	8.2g
复合蛋白保护剂 PHD	0.5g
5% 酪蛋白	10g
Tween-20	10mL
0.1% 叠氮钠	1mL

所述发光底物 A 为鲁米诺和氢氧化钠溶液;

所述发光底物 B 为过氧化氢和对碘苯酚溶液;

所述固体洗液为磷酸盐吐温缓冲液 (PBST), PBST 固体洗液配方为

KH ₂ PO ₄	4.8g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	28.8g
NaCl	155g
Tween-20	10mL。

2. 权利要求 1 所述胃蛋白酶原 II 化学发光定量检测试剂盒的制备方法, 包括以下步骤: 1) 配制 PBST 固体洗液及其稀释液; 2) 胃蛋白酶原 II 抗体包被微孔板的制备; 3) HRP 标记胃蛋白酶原 II 抗体的制备; 4) 胃蛋白酶原 II 校准品的制备; 5) 配制发光底物 A、发光底物 B; 6) 分装固体洗液、酶标抗体、校准品、发光底物 A 和发光底物 B 并组装为成品; 其中:

1) 所述配制 PBST 固体洗液及其稀释液的步骤为: 混合均匀后的 PBST 固体洗液在气压 500Pa、温度 10℃、湿度 30% 状态下减压低温干燥, 1h 后用铝箔袋分装, 使用时每 5g 的 PBST 固体洗液溶解在 500mL 去离子水中混匀;

2) 所述制备胃蛋白酶原 II 抗体包被微孔板的步骤为: 采用包被缓冲液将胃蛋白酶原 II 单克隆抗体稀释至浓度为 0.5~3 μg/mL, 将其吸附于微孔板上, 再用固体洗液稀释液洗板两次, 采用封闭液对包被后的微孔板进行封闭和保护;

3) 所述 HRP 标记的胃蛋白酶原 II 抗体的制备的步骤为: 配制酶标抗体稀释液, 用过碘酸盐法将 HRP 标记在单克隆抗体上, 经试验证明, 胃蛋白酶原 II 酶标抗体工作浓度范围为 50ng/mL 以上;

4) 所述胃蛋白酶原 II 校准品的制备的步骤为: 配制胃蛋白酶原 II 抗原校准品稀释液, 将人工合成的胃蛋白酶原 II 抗原用校准品稀释液稀释成含量分别为 2 μg/mL、10 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL 的系列浓度, 建立定量校准品。

3. 权利要求 2 所述胃蛋白酶原 II 化学发光定量检测试剂盒的制备方法, 其特征在于所述 HRP 标记胃蛋白酶原 II 抗体所用的酶标抗体稀释液的配方为:

去离子水	1L
Na_2HPO_4	2.9g
NaH_2PO_4	0.2g
NaCl	8.2g
25%BSA	10g
酶稳定剂	1g
0.1% 叠氮钠	1mL。

4. 权利要求 2 所述胃蛋白酶原 II 化学发光定量检测试剂盒的制备方法, 其特征在于所述包被缓冲液为碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液或 Tris-HCl 缓冲液。

一种胃蛋白酶原 II 化学发光定量检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测领域,具体涉及一种胃蛋白酶原 II 化学发光定量检测试剂盒及其制备方法。

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,为一个由 375 个氨基酸组成的蛋白多肽链,平均相对分子质量为 42,000,人胃粘膜中有 7 组胃蛋白同工酶原。PG 在核糖体上合成,由高尔基体分泌出细胞,被盐酸激活后变成胃蛋白酶。根据生化性质、免疫原性、细胞来源及组织内分布可分成 PG I、PG II 两个亚群,其中 6~7 组分免疫原性近似,称为 PG II,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 PG II,胃粘膜合成的 PG II 约为总量的 25%。

[0003] 胃蛋白酶原 II 是胃蛋白酶原的一种,主要由胃底主细胞所分泌。亦有研究认为 PG 可由胃粘膜颈部粘液细胞或幽门腺粘液细胞所分泌,被盐酸激活后变成小分子的胃蛋白酶。胃蛋白酶只在酸性环境中发挥作用,pH>6 即失去活性,pH=2 时优先作用于天然蛋白质,pH=4 时能消化某些特异性的肽。在体外,胃蛋白酶的持续作用可使蛋白分子的肽键约有 30% 分裂。胃蛋白酶不作用于角蛋白和黏蛋白,亦不作用于低相对分子质量的蛋白衍生物。在复合维生素与蛋白质结合和释放上,胃蛋白酶亦起主要作用。

[0004] 血清 PG 浓度可作为胃酸分泌的检测指标,在幽门螺杆菌阳性体内,PG I 水平和 PG I /PG II 比值与胃酸分泌量显著相关,其中后者与胃酸分泌量相关性更强。在幽门螺杆菌阴性体内,PG I 的水平与胃酸分泌量显著相关,但 PG I /PG II 比值与胃酸分泌量无相关性。通过血清 PG 浓度估计胃酸分泌量具有临床实用价值。

[0005] PG 含量与良、恶性胃溃疡的鉴别有关,血清 PG I 水平与萎缩性胃炎和消化性溃疡呈正相关,血清 PG I 水平升高者,应注意其是否存在溃疡的可能性,对于临床上无症状溃疡的鉴别具有意义。血清 PG I 与胃泌酸腺细胞功能相关,PG II 与胃底粘膜病变的相关性较大,血清 PG 反映胃总体分泌 PG 水平。胃酸分泌过多引起的浅表性胃炎和幽门螺杆菌感染引起的萎缩性胃炎都会导致 PG I 和 PG II 的分泌增加;慢性严重萎缩性胃炎当主细胞减少时 PG I 含量下降;萎缩性胃炎当伴有肠化、胃窦假幽门腺化生时,PG II 含量会随之增高。

[0006] 胃蛋白酶原对胃部疾病的发展历程,一般可表述为:浅表性胃炎→胃粘膜糜烂溃疡→萎缩性胃炎,及其它疾病具有良好的诊断和筛选作用。胃蛋白酶原 I / II 检测试剂盒用于检测血清中的胃蛋白酶原 I / II 的含量,具有简便、快速的优势,避免了 X-射线对人体的侵害和胃镜的不便。

[0007] 20 世纪 70 年代中期 Arakawa 首次报道用发光信号进行分析检测,即利用发光的化学反应(chemiluminescence, CL)和生物反应(bioluminescence, BL)分析超微量物质,特别是用于临床免疫分析中检验超微量活性物质。这一方法从实验室的稀有技

术过渡到临床医学的常规检测手段,近十年来获得了很大的发展。化学发光免疫分析(chemiluminescence immunoassay, CLIA)灵敏度高(10~18mol)、快速(几秒钟内产生化学发光信号,有的情况下信号可持续几小时)、简便、测试中不使用有害试剂,因此成为非放射性免疫分析法中最有前途的方法之一。

[0008] 我公司采用的化学发光免疫分析方法,是利用酶催化发光底物使其发生化学反应并释放出大量的能量,产生激发态中间体。这种激发态中间体,当其回到稳定的基态时,可同时发射出光子,利用发光信号测量仪器即可测量光量子产额,该光量子产额与样品中的待测物质的量成比例,由此可以建立标准曲线并计算样品中待测物质的含量。与几种传统的免疫学检测方法对比而言,无论从最低检测限、检测时间、线性范围、试剂的稳定性、有无环境污染等方面对比,化学发光法的优势都显得极为突出。

发明内容

[0009] 本发明的目的是提供一种胃蛋白酶原 II 化学发光定量检测试剂盒及其制备方法。

[0010] 本发明所述的胃蛋白酶原 II 化学发光定量检测试剂盒,包括:1) 胃蛋白酶原 II 抗体包被微孔板;2) HRP 标记胃蛋白酶原 II 抗体;3) 校准品稀释液稀释后的系列胃蛋白酶原 II 校准品;4) 发光底物 A;5) 发光底物 B;6) 固体洗液。

[0011] 所述胃蛋白酶原 II 抗体为鼠源或兔源人胃蛋白酶原 II 单克隆抗体。

[0012] 所述包被的微孔板为 48 孔或 96 孔的微孔板条。

[0013] 所述校准品稀释液的配方为:

去离子水	1L
三羟甲基氨基甲烷	6.06g
NaH ₂ PO ₄	0.2g
NaCl	8.2g
复合蛋白保护剂 PHD	0.5g
5% 酪蛋白	10g
Tween-20	10mL
0.1% 叠氮钠	1mL

调节胃蛋白酶原 II 校准品的稀释液 pH 为 7.4。

[0014] 所述发光底物 A 为鲁米诺和氢氧化钠溶液。

[0015] 所述发光底物 B 为过氧化氢和对碘苯酚溶液。

[0016] 所述固体洗液为 PBST, PBST 固体洗液配方为

KH ₂ PO ₄	4.8g
Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O	28.8g
NaCl	155g
Tween-20	10mL。

[0017] 本发明的胃蛋白酶原 II 化学发光定量检测试剂盒制备方法,包括以下步骤:1) 配制 PBST 固体洗液及其稀释液;2) 胃蛋白酶原 II 抗体包被微孔板的制备;3) HRP 标记胃蛋白酶原 II 抗体的制备;4) 胃蛋白酶原 II 校准品的制备;5) 配制发光底物 A、发光底物 B;6) 分装固体洗液、酶标抗体、校准品、发光底物 A 和发光底物 B 并组装为成品。其中:

所述配制 PBST 固体洗液及其稀释液的步骤为：混合均匀后的 PBST 固体洗液在气压 500Pa、温度 10℃、湿度 30% 状态下减压低温干燥，1h 后用铝箔袋分装，使用时每 5g 的 PBST 固体洗液溶解在 500mL 去离子水中混匀。

[0018] 所述制备胃蛋白酶原 II 抗体包被微孔板的步骤为：采用包被缓冲液将胃蛋白酶原 II 单克隆抗体稀释至浓度为 0.5~3 $\mu\text{g/mL}$ ，将其吸附于微孔板上，再用固体洗液稀释液洗板两次，采用封闭液对包被后的微孔板进行封闭和保护。

[0019] 所述包被缓冲液为碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液或 Tris-HCl 缓冲液。

[0020] 所述 HRP 标记的胃蛋白酶原 II 抗体的制备的步骤为：配制酶标抗体稀释液，用过碘酸盐法将 HRP 标记在单克隆抗体上，经试验证明，胃蛋白酶原 II 酶标抗体的工作浓度范围为 50ng/mL 以上。

[0021] 所述胃蛋白酶原 II 校准品的制备的步骤为：配制胃蛋白酶原 II 校准品稀释液，将人工合成的胃蛋白酶原 II 用校准品稀释液稀释成含量分别为 2 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 的系列浓度，建立定量校准品。

[0022] 所述 HRP 标记胃蛋白酶原 II 抗体所用的酶标抗体稀释液的配方为：

去离子水	1L
Na_2HPO_4	2.9g
NaH_2PO_4	0.2g
NaCl	8.2g
25%BSA	10g
酶稳定剂	1g
0.1% 叠氮钠	1mL。

[0023] 本发明的技术方案：一种血清胃蛋白酶原 II 化学发光定量检测方法，基于化学发光免疫分析法。胃蛋白酶原 II 单克隆抗体包被化学发光微孔板，形成固相抗体。检测时向包被微孔中加入血清样品或胃蛋白酶原 II 校准品，再加入 HRP 标记的胃蛋白酶原 II 单克隆抗体进行反应，形成抗体-抗原-抗体-HRP 复合物。反应后用固体洗液稀释液洗去未结合的 HRP-胃蛋白酶原 II 单克隆抗体，然后加入发光底物，检测发光信号的强度。

[0024] 根据本发明的试剂盒，HRP 标记的胃蛋白酶原 II 单克隆抗体与固相载体上包被的抗体同被测样品中的胃蛋白酶原 II 形成“包被抗体-抗原-酶标抗体”的夹心复合物结构，因此本发明采用的“双抗体夹心法”反应模式，既有效地利用抗原-抗体反应的高特异性，又结合了化学发光免疫分析技术的高灵敏度，可为临床诊断提供更为特异、快速、可靠的依据。

[0025] 根据本发明的试剂盒，反应模式为：微孔内先加入 20 μL 胃蛋白酶原 II 校准品或者血清，然后加入 50 μL 的 HRP 标记的胃蛋白酶原 II 单克隆抗体，在微量振荡器上混合 30s，37℃ 温育 1h，然后用固体洗液稀释液洗板 5 次，在吸水纸上轻轻拍干，加入发光底物 A 和 B 各 50 μL 混匀 5s，室温避光放置 5 分钟，用化学发光免疫分析仪检测发光值。

[0026] 根据本发明的试剂盒，对读取的发光值采取线性拟合方式进行处理，可选对对数和四参数两种拟合方式计算样本中胃蛋白酶原 II 的含量。

[0027] 本发明的胃蛋白酶原 II (PG II) 化学发光定量检测试剂盒可以检测出血清中的胃蛋白酶原 II (PG II) 含量。血清浓度 PG 可作为胃酸分泌的检测指标，在幽门螺杆菌阳性体

内,PG I 水平和 PG I /PG II 比值与胃酸分泌量显著相关,其中后者与胃酸分泌量相关性更强。在幽门螺杆菌阴性体内,PG I 的水平与胃酸分泌量显著相关,但 PG I /PG II 比值与胃酸分泌量无相关性。故通过血清 PG 浓度估计胃酸分泌量具有临床实用价值。PG 含量还与良、恶性胃溃疡的鉴别有关;血清 PG I 水平与萎缩性胃炎、消化性溃疡呈正相关;在幽门螺杆菌的治疗中,通过监测除菌后的 PG 变化能够判定治疗效果。它具有无创、检测方法简单快速、灵敏度高、检测范围宽等优点。同时该胃蛋白酶原 II (PG II) 化学发光定量检测试剂盒的各项指标均已达到技术要求。

附图说明

[0028] 图 1 为实施例 1 所制备的试剂盒的校准品线性图。

具体实施方式

[0029] 实施例 1 应用碳酸盐包被缓冲液制备本发明的胃蛋白酶原 II 化学发光定量检测试剂盒

一、PBST 固体洗液及稀释液的配制:

1) PBST 固体洗液配方为

KH_2PO_4	4.8g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	28.8g
NaCl	155g
Tween-20	10mL。

[0030] 2) 混合均匀后的 PBST 固体洗液在气压 500Pa、温度 10℃、湿度 30% 状态下减压低温干燥,1h 后用铝箔袋分装,使用时每 5g 的 PBST 固体洗液溶解在 500mL 去离子水中混匀,制得 PBST 固体洗液稀释液。

[0031] 二、包被微孔板的制备:

1) 抗体的选择:采用鼠源单克隆抗体。

[0032] 2) 微孔板的包被:用 0.02mol/L 的 pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液将胃蛋白酶原 II 单克隆抗体稀释至浓度为 3 $\mu\text{g/mL}$,配制成包被液,并以 100 μL /孔将其吸附于微孔板上。所述 pH 值为 9.6 的碳酸盐包被缓冲液的配方为:

去离子水	1L
Na_2CO_3	0.636g
NaHCO_3	1.172g
溶解混匀后,调 pH 至 9.6。	

[0033] 3) 封闭保护:用固体洗液稀释液洗板两次,以 150 μL /孔加封闭液于洗涤后的微孔板上,在 21℃~25℃封闭 3h,甩掉封闭液,在吸水纸上拍干。室温除湿干燥 24h 封袋。然后贴签置 2℃~8℃保存备用。封闭液的配方为:

去离子水	1L
Na_2CO_3	1.59g
NaHCO_3	2.93g
NaCl	8g

BSA	10g
0.1% 叠氮钠	1mL
蔗糖	25g。

[0034] 三、HRP 标记胃蛋白酶原 II 抗体的制备：

用过碘酸盐法将 HRP 标记在单克隆抗体上，酶标抗体稀释液的配方为：

去离子水	1L
Na ₂ HPO ₄	2.9g
NaH ₂ PO ₄	0.2g
NaCl	8.2g
25%BSA	10g
酶稳定剂	1g
0.1% 叠氮钠	1mL。

[0035] 四、酶标抗体浓度的选定：

经试验证明，胃蛋白酶原 II 酶标抗体的工作浓度范围为 50ng/mL 以上。

[0036] 五、校准品的制备：

将人工合成的胃蛋白酶原 II 用校准品稀释液稀释成含量分别为 2 μg/mL、10 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL 的系列浓度，建立定量校准品。校准品稀释液的配方为：

去离子水	1L
三羟甲基氨基甲烷	6.06g
NaH ₂ PO ₄	0.2g
NaCl	8.2g
复合蛋白保护剂 PHD	0.5g
5% 酪蛋白	10g
Tween-20	10mL
0.1% 叠氮钠	1mL

调节胃蛋白酶原 II 校准品稀释液 pH 为 7.4。

[0037] 六、发光底物 A、发光底物 B 的制备

所述制备发光底物 A 的步骤为：10mg 鲁米诺加入 1000mL 去离子水，再用氢氧化钠调 pH 至 8.6。

[0038] 所述制备发光底物 B 的步骤为：在去离子水中加入过氧化氢和对碘苯酚，使溶液中过氧化氢终浓度为 3mmol/L，对碘苯酚终浓度为 5mg/mL。

[0039] 七、半成品及成品的组装

上述步骤所得产品分装即为半成品，随机抽取三份经过特异性、精密性、灵敏度及稳定性检测合格后组装成试剂盒。

[0040] 实施例 2 应用磷酸盐包被缓冲液制备本发明的胃蛋白酶原 II 化学发光定量检测试剂盒

包被：用 0.2mol/L 的 pH 值为 6.5 的磷酸盐包被缓冲液将胃蛋白酶原 II 单克隆抗体稀释至浓度为 2 μg/mL，配制成包被液，并以 100 μL/孔将其吸附于微孔板上，于 37℃ 条件下包被 4h。具体地，所述 pH 值为 6.5 的磷酸盐包被缓冲液的制备方法为：68.5mL 的 0.2mol/L

L 的 NaH_2PO_4 溶液和 31.5mL 的 0.2mol/L 的 Na_2HPO_4 溶液混合即可。

[0041] 抗体选用兔源人胃蛋白酶原 II 单克隆抗体,其他试剂与组分的配制方法与实施例 1 的方法一致。

[0042] 实施例 3 应用 Tris-HCl 包被缓冲液制备本发明的胃蛋白酶原 II 化学发光定量检测试剂盒

包被:用 0.05mol/L 的 pH 值为 7.4 的 Tris-HCl 包被缓冲液将胃蛋白酶原 II 单克隆抗体稀释至浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$,配制成包被液,并以 100 μL /孔将其吸附于微孔板上,于 37℃ 条件下包被 4h。具体地,所述 pH 值为 7.4 的 Tris-HCl 包被缓冲液的制备方法为:50.0mL 的 0.1mol/L 的 Tris 碱溶液和 42.0mL 的 0.1mol/L 的 HCl 溶液混合后,加水定容至 100mL。

[0043] 其他试剂与组分的配制方法与实施例 1 的方法一致。

[0044] 本发明所述试剂盒的使用方法

一、实验前准备:

- 1) 将试剂盒从冷藏环境中取出,放置室温(18℃~25℃)平衡至少 30min;
- 2) 将恒温箱或水浴锅调到 37℃,待温度稳定后使用;
- 3) 取固体洗液 5g 用 500mL 去离子水溶解后备用。

[0045] 二、样本的要求:

- 1) 采用正确医用技术收集血清样本;
- 2) 样本中的沉淀物可能会影响试验结果,应离心除去,并确定样本未变质方可使用;
- 3) 严重溶血或脂血的样本不能用于测定;
- 4) 样本在 24h 内测定,则应存放于 2℃~8℃冰箱中,如果长期使用,则应冻存于 -20℃ 以下,避免反复冻融;使用前恢复到室温,轻轻摇动混匀。

[0046] 三、检测方法:

使用实施例 1 所制胃蛋白酶原 II 化学发光定量检测试剂盒进行检测的具体操作步骤如下:

- 1) 取出一定量的包被孔,每孔分别加入 20 μL 校准品或血清样品;
- 2) 每孔分别加入酶结合物 50 μL ;
- 3) 在微型振荡器上振荡 30s 使孔内液体混合均匀,置 37℃ 温育 60min。

[0047] 4) 用固体洗液稀释液洗板 5 次,最后在吸水纸上拍干;

- 5) 每孔分别加入发光底物 A 和 B 各 50 μL ,室温(18℃~25℃)避光反应 5min;
- 6) 化学发光检测仪检测发光强度;

7) 结果计算:选择适当的曲线拟合方式,本试剂盒推荐使用线性回归拟和方程建立标准曲线,但也可根据不同情况采用其他拟和方式。以系列校准品浓度的对数值为横坐标(X 轴),以系列校准品发光强度值的对数值为纵坐标(Y 轴)建立标准曲线(log-log)(图 1),将测得的血清样品的发光强度值代入标准曲线(log-log)中,计算得出血清样品中的胃蛋白酶原 II 含量。

[0048] 四、参考值(参考范围):

用本试剂盒测定 1000 份正常人空腹血清样本,得到正常人空腹状态参考范围为小于 15 $\mu\text{g/L}$ 。与胃蛋白酶原 I 联合检测,正常人样本胃蛋白酶原 I 与胃蛋白酶原 II 比值的参考值大于 7.5。各实验室应根据自己实际条件及接触人群建立正常参考值范围。本试剂盒仅

作诊断的辅助手段之一,供临床医生参考。

[0049] 本发明的胃蛋白酶原 II 化学发光定量检测试剂盒在方法学上的鉴定

按照本领域中常规的制造及检定规程对实施例 1 中制造的试剂盒进行鉴定,经过大量的实验证明,本发明的试剂盒在用于胃蛋白酶原 II 浓度水平测定时,该方法学指标如下:

1)准确度:将胃蛋白酶原 II 高值样本 A 加入到低值样本 B 中,所加入样本 A 与样本 B 之间的体积比为 1:9,根据下面公式计算回收率(R)。回收率为 98%,在 85%~115% 范围内。

$$R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{C_s \times V} \times 100\%$$

[0050] 式中:

R- 回收率;

V- 加入 A 液体积;

V_0 - 血清或相应基质 B 的体积;

C- 血清样品或相应基质加入 A 液后的检测浓度;

C_0 - 血清样品或相应基质 B 的检测浓度;

C_s -A 液的浓度。

[0051] 2) 最低检测限:用零校准品或样本稀释液作为样本进行检测,重复测定 20 次,得出 20 次测量结果的 RLU 值(相对发光值),计算其平均值(M)和标准差(SD),得出 $M+2SD$,求出对应的浓度值,即为最低检测限。最低检测限为 $0.5 \mu\text{g/L}$,小于 $1 \mu\text{g/L}$ 。

[0052] 3) 线性:将接近线性范围上限的高值样本按一定比例稀释为至少 5 种浓度,其中低值样本浓度须接近线性范围的下限。每一浓度重复检测 2 次,计算平均值,将结果平均值和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合,并计算线性相关系数 r。在所规定的线性范围 ($1\sim100$) $\mu\text{g/L}$ 内,试剂盒的相关系数 r 为 0.9984, $r \geq 0.9900$ 。

[0053] 4) 重复性:用浓度分别为 $(20 \pm 5) \mu\text{g/L}$ 和 $(50 \pm 10) \mu\text{g/L}$ 的样本各重复检测 10 次,计算其浓度值,计算 10 次测量结果的平均值 M 和标准差 SD,根据公式 $CV=SD/M \times 100\%$ 得出变异系数 CV。变异系数(CV)为 7.99%,小于 15%。

[0054] 5) 特异性:用含量为 $200 \mu\text{g/L}$ 的 PG I 样本重复检测 2 次,计算其浓度值。结果为 $0.2 \mu\text{g/L}$,小于 $1 \mu\text{g/L}$ 。

[0055] 6) 批间差:用三个批号试剂盒分别检测同一份样本,浓度为 $(50 \pm 10) \mu\text{g/L}$,各重复 10 次,计算其浓度值,计算 30 次浓度值的平均值 M 和标准差 SD,根据公式 $CV=SD/M \times 100\%$ 得出变异系数 CV。三个批号试剂盒之间的批间变异系数(CV)为 10.55%,小于 15%。

[0056] 7) 热稳定性试验:取有效期内的试剂盒于 37°C 放置 7 天,检测准确度、最低检测限、线性和重复性仍符合要求。

[0057] 本试剂盒线性范围为 $(1.0\sim100.0) \mu\text{g/L}$ 。测定值超过 $100.0 \mu\text{g/L}$ 的样本,其结果是通过校准品曲线外延得出的计算结果。如果要获得其更准确的结果,需对样本进行稀释。本发明所述胃蛋白酶原 II 化学发光定量检测试剂盒所用样本量少,来源简单方便,体外检测对测试对象没有任何毒副作用。同时本发明采用的化学发光免疫分析方法,不产生放射性污染。利用本发明方法进行检测,与几种传统的免疫学检测方法对比而言,无论从最低检测限、检测时间、线性范围、试剂的稳定性、有无环境污染等方面对比,化学发光法的优势都显得极为突出。本发明的试剂盒除具有检测方法简单快速的优点之外,还具有灵敏度高、

检测范围宽等优点,因此越来越多的受到临床诊断实验室的关注,是近年来该领域的研究热点。因此本发明为临床检测血清中胃蛋白酶原 II 含量,从而筛查胃癌和评价幽门螺旋杆菌(HP)根除治疗效果,为判定消化性溃疡复发和胃癌切除术后复发提供了一种简单、快速、灵敏的方法。

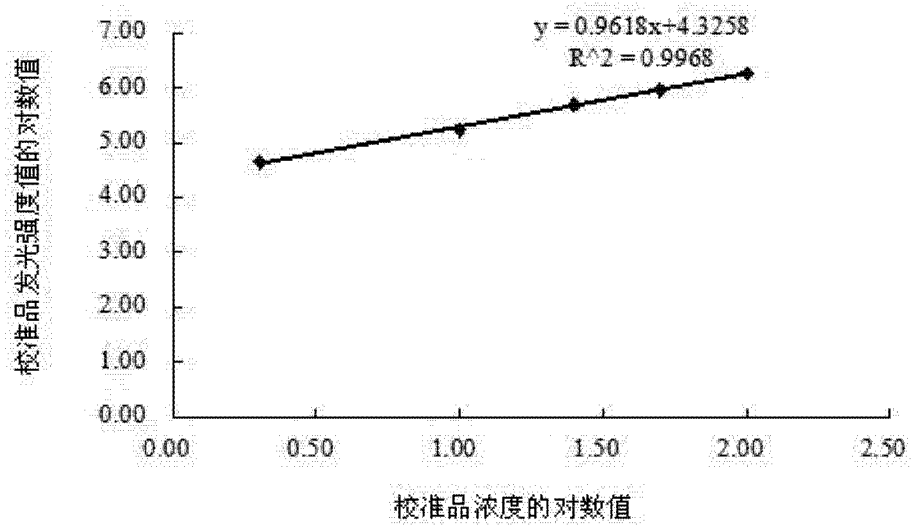


图 1

专利名称(译)	一种胃蛋白酶原II化学发光定量检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN104569415A	公开(公告)日	2015-04-29
申请号	CN201510032770.9	申请日	2015-01-23
[标]申请(专利权)人(译)	河南美凯生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	河南美凯生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	河南美凯生物科技有限公司		
[标]发明人	赵焕朝 俞宁 胡锰鸽 翟秋菊 张喜娟		
发明人	赵焕朝 俞宁 胡锰鸽 翟秋菊 张喜娟		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/577 G01N21/76 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及免疫检测领域，具体地涉及一种胃蛋白酶原II化学发光定量检测试剂盒及其方法。发明所述胃蛋白酶原II化学发光定量检测试剂盒，包括：1)胃蛋白酶原II抗体包被微孔板；2)HRP标记胃蛋白酶原II抗体；3)校准品稀释液稀释后的系列胃蛋白酶原II校准品；4)发光底物A；5)发光底物B；6)固体洗液。发明的试剂盒可以检测出血清中胃蛋白酶原II的含量，血清中胃蛋白酶原II水平与萎缩性胃炎、消化性溃疡呈正相关；在幽门螺杆菌的治疗中，通过监测除菌后的胃蛋白酶原变化能够判定治疗效果。它具有无创、检测方法简单快速、灵敏度高、检测范围宽等优点。

