



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105974105 A

(43)申请公布日 2016.09.28

(21)申请号 201610321019.5

(22)申请日 2016.05.16

(71)申请人 河北艾驰生物科技有限公司

地址 064400 河北省唐山市迁安市聚鑫街
789号

(72)发明人 张伟林 黄龙梅 王鑫

(74)专利代理机构 北京精金石专利代理事务所
(普通合伙) 11470

代理人 刘晔

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

基质金属蛋白酶-3(MMP3)检测试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种基质金属蛋白酶-3(MMP3)测定试剂盒及其测定方法,属于医学生物检测技术领域。该试剂盒包括试剂1、试剂2、校准品及质控品,试剂1包含Tris-HCl、叠氮钠、PEG-6000,试剂2包含Tris-HCl、包被了抗人基质金属蛋白酶-3抗体胶乳颗粒、叠氮钠和尼泊金甲酯,校准品包含基质金属蛋白酶-3抗原、叠氮钠,质控品包含基质金属蛋白酶-3抗原、叠氮钠。本发明提供了一种基质金属蛋白酶-3(MMP3)测定试剂盒及其测定方法,采用胶乳免疫比浊技术,具有分析灵敏度高、结果准确、操作简单、成本适合等优点,便于推广。

1. 一种基质金属蛋白酶-3(MMP3)检测试剂盒,它包括:试剂1、试剂2、校准品及质控品。
2. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,试剂1的组成为:Tris 100mM,叠氮钠5g/L,PEG-6000 4g/L,PH值为8.1;余量为水。
3. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,试剂2的组成为:Tris 100mM,叠氮钠2g/L,尼泊金甲酯1g/L,抗人基质金属蛋白酶-3抗体胶乳颗粒1g/L,PH值为6.0;余量为水。
4. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,校准品为:水平1含基质金属蛋白酶-3抗原37.5ng/ml,叠氮钠5g/L;水平2含基质金属蛋白酶-3抗原75ng/ml,叠氮钠5g/L;水平3含基质金属蛋白酶-3抗原150ng/ml,叠氮钠5g/L;水平4含基质金属蛋白酶-3抗原300ng/ml,叠氮钠5g/L。
5. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,质控品为:基质金属蛋白酶-3抗原50ng/ml,叠氮钠5g/L。

基质金属蛋白酶-3(MMP3)检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属医学生物检测技术领域,具体涉及一种基质金属蛋白酶-3(MMP3)检测试剂盒。

背景技术

[0002] 基质金属蛋白酶是一个大家族,因其需要 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 等金属离子作为辅助因子而得名。其家族成员具有相似的结构,一般由5个功能不同的结构域组成:(1)疏水信号肽序列;(2)前肽区,主要作用是保持酶原的稳定。当该区域被外源性酶切断后,MMPs酶原被激活;(3)催化活性区,有锌离子结合位点,对酶催化作用的发挥至关重要;(4)富含脯氨酸的铰链区;(5)羧基末端区,与酶的底物特异性有关。其中酶催化活性区和前肽区具有高度保守性。MMPs成员上述结构的基础上各有特点。各种MMP间具有一定的底物特异性,但不是绝对的。同一种MMP可降解多种细胞外基质成份,而某一种细胞外基质成分又可被多种MMP降解,但不同酶的降解效率可不同。

[0003] MMPs几乎能降解ECM中的各种蛋白成分,破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障,在肿瘤侵袭转移中起关键性作用,从而在肿瘤浸润转移中的作用日益受到重视,被认为是该过程中主要的蛋白水解酶。MMPs家族已分离鉴别出26个成员,编号分别为MMP1~26。根据作用底物以及片断同源性,将MMPs分为6类,为胶原酶、明胶酶、基质降解素、基质溶解素、furin活化的MMP和其他分泌型MMP。

[0004] IV型胶原酶为其中重要的一类,它主要有两种形式,一种被糖化,分子量为92kD,命名为MMP-9;另一种非糖化,分子量为72kD,被称为MMP-2。当前对MMP-2,MMP-9的研究较深入。

[0005] MMP-2基因位于人类染色体16q21,由13个外显子和12个内含子所组成,结构基因总长度为27kb,与其他金属蛋白酶不同,MMP-2基因5'旁侧序列促进子区域含有2个GC盒而不是TATA盒。活化的MMP-2定位于细胞穿透基质的突出部位,估计其在酶解细胞间基质成分及基底膜的主要成分IV型胶原中有“钻头”的作用。

[0006] 此外,已证实MMP-3和MMP-10能作用于PG、LN、FN、III型和IV型胶原及明胶。且MMP-3能够激活MMP-1和其他家族成员。MMP-7能作用于明胶和FN。MMP-1的产生范围较广,可由基质纤维母细胞、巨噬细胞、内皮细胞、上皮细胞产生。正常情况下MMP-1阳性率很低,但在各种刺激下可高表达。有研究显示恶性肿瘤中MMP-1高表达与预后相关。

[0007] MMPs的活性受到三个水平的调节,即基因转录水平,无活性酶前体经蛋白水解作用而激活以及特异性抑制因子(TIMPs)的作用。

[0008] 目前已知检测基质金属蛋白酶-3的试剂盒较少,方法也存在较大的缺陷,如测定灵敏度不足,操作繁琐,成本昂贵等,均不利于临床推广使用。

发明内容

[0009] 本发明提供一种基质金属蛋白酶-3(MMP3)检测试剂盒。

- [0010] 本发明还提供上述试剂盒的检测方法。
- [0011] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案如下:
- [0012] 一种基质金属蛋白酶-3(MMP3)检测试剂盒,它包括:试剂1、试剂2、校准品及质控品。
- [0013] 上述基质金属蛋白酶-3(MMP3)测定试剂盒,具体包括如下组分:
- [0014] (1)试剂1:Tris 100mM,叠氮钠5g/L,PEG-6000 4g/L,PH值为8.1;
- [0015] (2)试剂2:Tris 100mM,叠氮钠2g/L,尼泊金甲酯1g/L,抗人基质金属蛋白酶-3抗体胶乳颗粒1g/L,PH值为6.0;
- [0016] (3)校准品:水平1含基质金属蛋白酶-3抗原37.5ng/ml,叠氮钠5g/L;水平2含基质金属蛋白酶-3抗原75ng/ml,叠氮钠5g/L;水平3含基质金属蛋白酶-3抗原150ng/ml,叠氮钠5g/L;水平4含基质金属蛋白酶-3抗原300ng/ml,叠氮钠5g/L;
- [0017] (4)质控品:基质金属蛋白酶-3抗原50ng/ml,叠氮钠5g/L。
- [0018] 所述的试剂1、试剂2、校准品及质控品的溶剂为电导率(25℃)不大于0.1mS/m的纯净水。
- [0019] 所述的抗人基质金属蛋白酶-3抗体为兔抗人多克隆抗体。
- [0020] 所述的胶乳颗粒为粒径为80-100nm。
- [0021] 所述的PH值调节试剂为1mM的盐酸溶液。
- [0022] 所述检测试剂盒用于定量测定血清中基质金属蛋白酶-3的含量。
- [0023] 本发明第二方面提供所述测定试剂盒的检测方法,包括如下步骤:
- [0024] 1)准备编号为1、2、3、4的4支反应管;
- [0025] 2)同时第1反应管内加入试剂1 150μL,水平1校准品3μL混合均匀,在第2反应管内加入试剂1 150μL,水平2校准品3μL混合均匀,在第3反应管内加入试剂1 150μL,水平3校准品3μL混合均匀,在第4反应管内加入试剂1 150μL,水平4校准品3μL混合均匀,4支反应管均孵育5分钟;
- [0026] 3)5分钟孵育结束后,同时第1反应管内加入试剂2 50μL混合均匀,在第2反应管内加入试剂2 50μL混合均匀,在第3反应管内加入试剂2 50μL混合均匀,在第4反应管内加入试剂2 50μL混合均匀,均孵育半分钟;
- [0027] 4)半分钟孵育结束后,分别读取1、2、3、4反应管吸光度 A_{11} , A_{12} , A_{13} , A_{14} ;
- [0028] 5)继续孵育5分钟后,再次分别读取1、2、3、4反应管吸光度 A_{21} , A_{22} , A_{23} , A_{24} ;
- [0029] 6)分别以4个不同浓度水平校准品浓度为横坐标,以 $(A_{21}-A_{11})$ 、 $(A_{22}-A_{12})$ 、 $(A_{23}-A_{13})$ 、 $(A_{24}-A_{14})$ 为纵坐标作一标准曲线图;
- [0030] 7)再次准备1支反应管,在反应管内加入试剂1 150μL,检测样本3μL混合均匀并孵育5分钟;
- [0031] 8)5分钟孵育结束后,在反应管内加入试剂2 50μL混合均匀并孵育半分钟,读取吸光度 A_1 ;
- [0032] 9)继续孵育5分钟,读取吸光度 A_2 ;
- [0033] 10)计算 A_2-A_1 ,然后在标准曲线上找出对应的浓度值,即为样本中基质金属蛋白酶-3的含量。
- [0034] 所述的反应孵育温度为37℃。

[0035] 本发明的有益效果为:

[0036] 本发明所提供的一种基质金属蛋白酶-3(MMP3)测定试剂盒,采用胶乳免疫比浊技术,并提供配套的校准品及质控品,具有测定结果准确、检测灵敏度高、方便快捷、稳定性好、特异性高、成本低廉等优点,利于临床推广使用。

具体实施方式

[0037] 根据下述实施例,可以更好地理解本发明。然而,本领域的技术人员容易理解,实施例仅用于说明本发明,而不应当也不会限制权利要求书中所详细描述的本发明。

[0038] 实施例1:抗基质金属蛋白酶-3抗体胶乳颗粒制备。

[0039] 1)配制50mM的MES缓冲液,PH值为6.0;

[0040] 2)用上述MES缓冲液稀释胶乳微球,浓度为1%(v/v);

[0041] 3)在胶乳微球悬浮液中加入EDAC,加入浓度为40mg/ml,在室温孵育40分钟;

[0042] 4)用相同体积的MES缓冲液洗涤胶乳微球,然后13000g/min离心30分钟,再次用相同体积的MES缓冲液洗涤胶乳微球,然后13000g/min离心30分钟,然后再将胶乳微球溶于MES缓冲液中;

[0043] 5)将兔抗人基质金属蛋白酶-3抗体溶于上述MES缓冲液中,浓度为1mg/mL;

[0044] 6)将抗体溶液和胶乳微球悬浮液混合,37℃搅拌反应3小时;

[0045] 7)在混合液中加入乙醇胺,加入量为2.5μL/mL,搅拌反应10分钟;

[0046] 8)除去未结合的抗体,将包被好的抗体胶乳颗粒贮存在MES缓冲液中。

[0047] 实施例2:试剂盒的制备方法。

[0048] (1)试剂1:

[0049] Tris 100mM,叠氮钠5g/L,PEG-6000 4g/L,PH值为8.1;

[0050] (2)试剂2:

[0051] Tris 100mM,叠氮钠2g/L,尼泊金甲酯1g/L,抗人基质金属蛋白酶-3抗体胶乳颗粒1g/L,PH值为6.0;

[0052] (3)校准品:

[0053] 水平1含基质金属蛋白酶-3抗原37.5ng/ml,叠氮钠5g/L;水平2含基质金属蛋白酶-3抗原75ng/ml,叠氮钠5g/L;水平3含基质金属蛋白酶-3抗原150ng/ml,叠氮钠5g/L;水平4含基质金属蛋白酶-3抗原300ng/ml,叠氮钠5g/L;

[0054] (4)质控品:

[0055] 基质金属蛋白酶-3抗原50ng/ml,叠氮钠5g/L。

[0056] 实施例3:检测方法。

[0057] 本实施例描述的基质金属蛋白酶-3测定试剂盒,在使用时采用具有双试剂功能的全自动生化分析仪,如日立7180全自动生化分析仪等,利用两点终点法进行测定。将试剂1和试剂2按3:1放于仪器试剂位上,在样本盘相应位置上放置好纯净水、校准品和样本,操作如下表:

[0058] 表1实施例2试剂检测方法

[0059]

加入物	空白管	标准管	测定管
试剂 1	150μL	150μL	150μL
纯净水	3μL		
校准品		3μL	
样本			3μL
混匀, 37℃孵育 5 分钟			
试剂 2	50μL	50μL	50μL
混匀, 37℃孵育 30 秒, 570nm 记录吸光度 A1			

[0060]

继续孵育 5 分钟, 570nm 记录吸光度 A2

[0061] 计算: $\text{MMP3 含量 (ng/mL)} = \Delta A_{\text{测定}} / \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}}$

[0062] 实施例4:分析灵敏度验证实验。

[0063] 用实施例2试剂盒测定已知浓度的样本,记录吸光度差值。检测结果如表2所示。

[0064] 表2分析灵敏度实验结果

[0065]

测定浓度(ng/mL)	检测结果 ΔA
5.0	0.0021
10.0	0.0044
20.0	0.0087

[0066] 全自动生化分析仪在吸光度大于0.001时均可准确的获得检测结果,且仪器噪音对检测结果影响较少。上述结果表明本发明试剂盒的灵敏度可达5ng/ml。

[0067] 实施例5:稳定性考察

[0068] 在2-8℃储存条件下,分别在0个月、12个月和24个月对同一标准品样本(MMP3浓度为5ng/ml)进行测定,每个样本测定10次,取均值。结果表明(见表3),测值差异非常小,说明实施例2制备的检测试剂盒在2-8度储存条件下至少可以稳定24个月以上。

[0069]

	12个月测定结果(ng/mL)	24个月测定结果(ng/mL)
实施例2	5.05	4.92
对比例1	4.87	2.76
对比例2	4.96	4.14
对比例3	4.72	3.81
对比例4	4.94	3.23
对比例5	4.23	1.09
对比例6	3.91	0.64

[0070] 对比例1:试剂2中不添加尼泊金甲酯,其他组分同实施例2

[0071] 对比例2:试剂2中尼泊金甲酯浓度3g/L,其他组分同实施例2

[0072] 对比例3:试剂1的pH值为7.5,其他同实施例2

[0073] 对比例4:试剂1的pH值为8.7,其他同实施例2

[0074] 对比例5:试剂2的pH值为5.5,其他同实施例2

[0075] 对比例6:试剂1的pH值为6.5,其他同实施例2

[0076] 实施例6:特异性考察

[0077] 在同一份人血清样本(MMP3含量为27.8ng/ml)中分别加入不同含量的干扰物质MMP10至浓度为30ng/ml,然后进行测定。结果表明,本发明实施例2试剂盒检测结果为27.6ng/ml;MMP10对本发明试剂盒无干扰。另外,对血红蛋白以及乳糜微粒也进行了类似测试,结果表明,其对本发明试剂盒也不存在干扰。

专利名称(译)	基质金属蛋白酶-3 (MMP3) 检测试剂盒		
公开(公告)号	CN105974105A	公开(公告)日	2016-09-28
申请号	CN201610321019.5	申请日	2016-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	河北艾驰生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	河北艾驰生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	河北艾驰生物科技有限公司		
[标]发明人	张伟林 黄龙梅 王鑫		
发明人	张伟林 黄龙梅 王鑫		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	刘晔		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基质金属蛋白酶-3(MMP3)测定试剂盒及其测定方法，属于医学生物检测技术领域。该试剂盒包括试剂1、试剂2、校准品及质控品，试剂1包含Tris-HCl、叠氮钠、PEG-6000，试剂2包含Tris-HCl、包被了抗人基质金属蛋白酶-3抗体胶乳颗粒、叠氮钠和尼泊金甲酯，校准品包含基质金属蛋白酶-3抗原、叠氮钠，质控品包含基质金属蛋白酶-3抗原、叠氮钠。本发明提供的一种基质金属蛋白酶-3(MMP3)测定试剂盒及其测定方法，采用胶乳免疫比浊技术，具有分析灵敏度高、结果准确、操作简单、成本适合等优点，便于推广。

加入物	空白管	标准管	测定管
试剂 1	150μL	150μL	150μL
纯净水	3μL		
校准品		3μL	
样本			3μL
混匀，37℃孵育 5 分钟			
试剂 2	50μL	50μL	50μL
混匀，37℃孵育 30 秒，570nm 记录吸光度 A1			