



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104614536 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 13

(21) 申请号 201510069296. 7

(22) 申请日 2015. 02. 10

(71) 申请人 深圳市新产业生物医学工程股份有限公司

地址 518122 广东省深圳市坪山新区金沙社区金辉路 16 号

(72) 发明人 饶微 孙普 李昀轩 刘望
杨雅丽 袁锦云 李婷华

(74) 专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限公司 11372

代理人 钟日红 刘烽

(51) Int. Cl.

G01N 33/74(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

权利要求书2页 说明书16页

(54) 发明名称

一种用于检测胃泌素 -17 的试剂盒及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种用于检测胃泌素 -17 的试剂盒及其制备方法,所述试剂盒包括组分 A 和组分 B,其中组分 A 为标记有示踪标记物或包被磁球的第一抗胃泌素 -17 抗体,组分 B 为包被磁球或标记有示踪标记物的第二抗胃泌素 -17 抗体或胃泌素 -17;并且组分 A 和组分 B 中的任意一种标记有示踪标记物,另一种则包被磁球;所述第一抗胃泌素 -17 抗体和第二抗胃泌素 -17 抗体与胃泌素 -17 的结合位点不同。本发明提供了一种检测胃泌素 -17 的方法,利用本发明提供的试剂盒,根据双抗体夹心法原理或竞争法原理,准确、灵敏地测定样本中的胃泌素 -17 含量。

1. 一种用于检测胃泌素-17的试剂盒,所述试剂盒包括组分A和组分B,其中组分A为标记有示踪标记物或包被磁球的第一抗胃泌素-17抗体,组分B为包被磁球或标记有示踪标记物的第二抗胃泌素-17抗体或胃泌素-17;并且,组分A和组分B中的任意一种标记有示踪标记物,另一种则包被磁球;所述第一抗胃泌素-17抗体和第二抗胃泌素-17抗体与胃泌素-17的结合位点不同。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述示踪标记物为金刚烷、鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物、吡啶酯、碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶中的至少一种。

3. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,所述示踪标记物为N-(4-氨基)-N-乙基异鲁米诺。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述磁球为 Fe_2O_3 或 Fe_3O_4 磁性纳米粒子与有机高分子材料的复合体,并具有0.1-5 μm 的粒径;并且,所述磁球任选地通过表面改性而带有一种或多种活性功能基团。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述组分B为包被磁球或标记有示踪标记物的第二抗胃泌素-17抗体。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,

所述示踪标记物直接或间接地标记第一抗胃泌素-17抗体或第二抗胃泌素-17抗体,并且间接标记的方式包括通过异硫氰酸荧光素与抗异硫氰酸荧光素抗体体系或通过链霉亲和素与生物素体系进行间接标记;

所述第一抗胃泌素-17抗体或第二抗胃泌素-17抗体直接或间接地包被磁球,并且间接包被磁球的方式包括通过异硫氰酸荧光素与抗异硫氰酸荧光素抗体体系或通过链霉亲和素与生物素体系进行间接包被。

7. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述组分B为包被磁球或标记有示踪标记物的胃泌素-17。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,

所述示踪标记物直接或间接地标记第一抗胃泌素-17抗体或胃泌素-17,并且间接标记的方式包括通过异硫氰酸荧光素与抗异硫氰酸荧光素抗体体系或通过链霉亲和素与生物素体系进行间接标记;

所述第一抗胃泌素-17抗体或胃泌素-17直接或间接地包被磁球,并且间接包被磁球的方式包括通过异硫氰酸荧光素与抗异硫氰酸荧光素抗体体系或通过链霉亲和素与生物素体系进行间接包被。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒,其特征在于,所述组分A为标记有示踪标记物的第一抗胃泌素-17抗体,所述组分B为包被磁球的胃泌素-17。

10. 根据权利要求1-9中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括胃泌素-17的低点校准品和高点校准品,并任选地包括缓冲液。

11. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,在所述试剂盒中,第一抗胃泌素-17抗体的浓度为10-200 $\mu g/L$,第二抗胃泌素-17抗体或胃泌素-17的浓度为10-200 $\mu g/L$,示踪标记物的浓度为0.1-1mg/L,磁球的浓度为0.1-5mg/ml。

12. 一种用于制备如权利要求1-6中任意一项所述的试剂盒的方法,所述方法包括:将第一抗胃泌素-17抗体和第二抗胃泌素-17抗体中的任意一种直接或间接标记示踪标记

物,将另一种直接或间接包被磁球。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其特征在于,

所述间接标记包括将示踪标记物通过异硫氰酸荧光素与抗异硫氰酸荧光素抗体体系或通过链霉亲和素与生物素体系标记所述第一抗胃泌素 -17 抗体或第二抗胃泌素 -17 抗体;

所述间接包被包括将所述第一抗胃泌素 -17 抗体或第二抗胃泌素 -17 抗体通过异硫氰酸荧光素与抗异硫氰酸荧光素抗体体系或通过链霉亲和素与生物素体系间接包被磁球。

14. 一种用于制备如权利要求 1-4、7-8 中任意一项所述的试剂盒的方法,所述方法包括:将第一抗胃泌素 -17 抗体和胃泌素 -17 中的任意一种直接或间接标记示踪标记物,将另一种直接或间接包被磁球。

15. 根据权利要求 14 所述的方法,其特征在于,

所述间接标记包括将示踪标记物通过异硫氰酸荧光素与抗异硫氰酸荧光素抗体体系或通过链霉亲和素与生物素体系标记所述第一抗胃泌素 -17 抗体或胃泌素 -17;

所述间接包被包括将所述第一抗胃泌素 -17 抗体或胃泌素 -17 通过异硫氰酸荧光素与抗异硫氰酸荧光素抗体体系或通过链霉亲和素与生物素体系间接包被磁球。

16. 一种检测胃泌素 -17 的方法,其特征在于,所述方法包括使用如权利要求 1-11 中任意一项所述的试剂盒,通过化学发光免疫法检测待测样品中的胃泌素 -17 浓度。

17. 根据权利要求 16 所述的方法,其特征在于,所述方法包括:将所述试剂盒的组分 A 和组分 B 与待测样品混合,温育,经磁分离,向沉淀物中加入发光底物,检测光信号强度;以同样方法测定胃泌素 -17 的低点校准品和高点校准品的光信号强度,并获得胃泌素 -17 的浓度与光信号强度之间的标准曲线;将检测得到的待测样品的光信号强度与标准曲线对照,获得待测样品中的胃泌素 -17 浓度。

一种用于检测胃泌素 -17 的试剂盒及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物物质检测的技术领域,具体涉及一种用于检测胃泌素 -17 的试剂盒及其制备方法,以及应用该试剂盒检测胃泌素 -17 的方法。

背景技术

[0002] 胃泌素是一种重要胃肠激素,由存在于胃幽门部粘膜的 G 细胞 (gastrin containing cell) 分泌,然后进入血中再作用于胃,进而促进胃液分泌。G 细胞主要分布在胃窦部,并在肾脏代谢,肾功能不全时血清胃泌素升高。胃的幽门窦受到食物等的机械性刺激,幽门部的 pH 偏碱性时就进行胃泌素的分泌。其结果是胃液、特别是盐酸的分泌变得旺盛。当胃内部的 pH 降低时,盐酸和胃泌素的分泌就停止。此外,胃泌素也具有促进胃蛋白酶、胰液、胆汁、胰岛素等分泌的作用,可是这些作用并不强。

[0003] 由于胃泌素原的细胞转译成熟,窦中的 G 细胞在循环中开始释放一些不同种类的、由酸刺激产生的胃泌素及其他前体的混合物质。这个混合物质由胃泌素 -71、-52、-34、-17、-14、-6 组成,其中在健康人血清 / 血浆中主要存在形式为胃泌素 -34 和胃泌素 -17。胃泌素 -17 (G-17) 是健康窦粘膜中最主要有效形式,基本完全由 G 细胞产出。胃泌素 -17 系由 17 个氨基酸残基组成的多肽,有两种:酪氨酸残基上为硫酸基取代的和未被取代的(胃泌素 I 和 II),但是这两种形式在生理活性上并没有差异。仅在相当于 C 末端部分的四肽 (Tyr-Met-Asp-Phe-NH₂) 发现胃泌素的活性,称为四肽胃泌素。对各种哺乳类动物的胃泌素的一级结构的研究表明,胃泌素 -17 均为 17 个氨基酸组成,仅从氨末端的第 5 位和第 10 位的氨基酸因动物而异。另外,所有 12 位的酪氨酸结合着 -SO₃H 是胃泌素 -17 的重要特征之一。

[0004] 幽门螺杆菌感染继发萎缩性胃炎的患者一般有着异常低的胃泌素 -17 水平,相对应地,其胃癌和消化性溃疡疾病的风险增加到普通人的 18 倍和 25 倍。胃泌素 -17 在胃十二指肠溃疡的发病机制中起到基本或重要的作用。对于这类患者,在基础状态下,血清胃泌素偏高,平均水平大约为 160pg/ml,与正常范围可有一定重叠;但在进食及其他刺激胃泌素分泌的情况下则明显增高。高胃泌素是胃溃疡的重要发病机制之一。另外,异常高的胃泌素 -17 水平可以视作胃酸缺乏症的标志。胃泌素 -17 检测也可以作为病人的术后监测指标,做过成功的胃窦切除手术后,胃泌素 -17 分泌水平基本接近于 0。在胃泌素瘤即卓林格 - 艾里森 (Zollinger-Ellison) 综合症患者的血液中,胃泌素 -17 浓度偏高。胃泌素瘤是胰腺最常见的内分泌肿瘤,是胰岛中分泌胃泌素的 D 细胞增生而发病,其分泌大量胃泌素,使壁细胞急剧增加。胃泌素瘤其次发生在胃和十二指肠。卓 - 艾综合征具下列三联症:高胃泌素血症,可高达 1000pg/ml;高胃酸排出量,基础胃酸 > 15mmol/h,可达正常人的 6 倍;伴有反复发作的胃、十二指肠多处溃疡,且多为难治性溃疡,伴慢性腹泻。

[0005] 目前胃泌素 -17 的检验在临床上使用越来越广泛,市场上主要使用的检测方法为酶联免疫吸附试验法 (ELISA)。

[0006] 酶联免疫吸附试验法是指将可溶性的抗原或抗体结合到聚苯乙烯等固相载体上,

利用抗原抗体结合专一性进行免疫反应的定性和定量检测方法。主要检测原理为免疫夹心法：其中一株胃泌素-17 特异性捕捉抗体吸附于包板上，另一株检测抗体则标记辣根过氧化物酶 (HRP)。通过 HRP 连单抗与胃泌素-17 结合到固相载体上，温育清洗，后加入底物，HRP 催化底物发生显色反应，最终通过酶标仪测定其吸光度，从而计算样本胃泌素-17 的浓度。

[0007] 酶联免疫吸附试验法检测时间长，至少需要 6 个小时，甚至过夜反应才能完成测试；同时主要依靠纯手工加样等系列操作，效率低，容易导致实验结果误差大；由于酶促反应不够彻底，且易受外部干扰因素影响，如温度、时间及材料浓度影响，因此检测时特异性低，灵敏度差。并且，酶联免疫吸附试验法的固相载体为固态，均匀涂布于酶标板反应孔内，在测试前需将待测样本预稀释，增加了实验难度，进一步降低了试剂的灵敏度和准确性。

[0008] 另外，目前市场上也有检测胃泌素全片段的方法，主要为放射免疫分析法 (RIA)、化学发光免疫分析法 (CLIA)。虽然检测胃泌素全片段能够在检测临床胃泌素含量时防止漏检，但是胃泌素成份过于复杂，并不是每一个成份都能用于临床疾病的检验及诊断；并且在检测胃泌素全片段时使用的多抗会严重降低试剂的特异性及灵敏度，造成检测结果的不准确。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供一种检测胃泌素-17 的试剂盒及其制备方法，利用胃泌素-17 与胃泌素-17 抗体的特异性结合，结合示踪标记物的发光性能和磁球的磁性，该试剂盒能够准确地测定样本中的胃泌素-17 含量。

[0010] 本发明的目的还在于提供一种检测胃泌素-17 的方法，利用本发明提供的试剂盒，根据双抗体夹心法原理或竞争法原理，准确地测定样本中的胃泌素-17 含量。尤其是采用该试剂盒，通过全自动化学发光法检测胃泌素-17，能够减少操作时间，降低人为操作误差。

[0011] 根据本发明，提供了一种用于检测胃泌素-17 的试剂盒，所述试剂盒包括组分 A 和组分 B，其中组分 A 为标记有示踪标记物或包被磁球的第一抗胃泌素-17 抗体，组分 B 为包被磁球或标记有示踪标记物的第二抗胃泌素-17 抗体或（包被磁球或标记有示踪标记物的）胃泌素-17；并且，组分 A 和组分 B 中的任意一种标记有示踪标记物，另一种则包被磁球；所述第一抗胃泌素-17 抗体和第二抗胃泌素-17 抗体与胃泌素-17 的结合位点不同。

[0012] 在本发明中，所述第一抗胃泌素-17 抗体和第二抗胃泌素-17 抗体的区别在于它们与胃泌素-17 的位点结合不同。在本发明的试剂盒中，例如当所述第一抗胃泌素-17 抗体包被磁球时，其用以结合待测样品中的胃泌素-17，那么标记有示踪标记物的第二抗胃泌素-17 抗体用以与胃泌素-17 上不同于其与第一抗胃泌素-17 抗体的结合区域的另一区域相结合。

[0013] 应理解，在本发明所提供的试剂盒中，所述第一抗胃泌素-17 抗体可以为一个或多个抗胃泌素-17 抗体，第二抗胃泌素-17 抗体可以为一个或多个抗胃泌素-17 抗体，只要构成所述第一抗胃泌素-17 抗体的一个或多个抗胃泌素-17 抗体与构成第二抗胃泌素-17 抗体的一个或多个抗胃泌素-17 抗体分别能够与胃泌素-17 上的不同结合区域结合。

[0014] 根据本发明，所述第一抗胃泌素-17 抗体和第二抗胃泌素-17 抗体可以是抗胃泌

素-17 单克隆抗体和 / 或抗胃泌素-17 多克隆抗体。

[0015] 人体中,95%以上有生物活性的胃泌素是 d- 酰胺化胃泌素,其中 80% -90% 是胃泌素-17。单纯的检测胃泌素-17 时使用特异性极高的单克隆抗体能够拥有更好的特异性及灵敏度,并且检测方法简单。因此,本发明提供了测定体内胃泌素-17 含量的试剂盒,通过试剂盒测定胃泌素-17 含量来反映临床上不同病症的发生。

[0016] 根据本发明,所述示踪标记物可以选自本领域中常用于标记抗原或抗体的示踪标记物,例如金刚烷、鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物、吡啶酯、碱性磷酸酶 (ALP) 或辣根过氧化物酶 (HRP),尤其优选为 N-(4- 氨基丁基)-N- 乙基异鲁米诺 (ABEI)。

[0017] 适用于本发明的磁球也称为磁珠,可以是本领域中常用的磁性微球。优选的是,本发明使用的磁球,是将纳米级的 Fe_2O_3 或 Fe_3O_4 磁性粒子和有机高分子材料进行复合,形成具有超顺磁性和极大蛋白吸附容量的微米级的固相微球,具有在外加磁场作用下可迅速被磁化,在撤走磁场后剩磁为零的属性。其中,所述有机高分子材料的种类没有特别限制,可以根据需要进行选择。

[0018] 本发明所使用的磁性微球应能满足直径为 0.1-5 μm ,磁性微球还可以通过表面改性而带有多种活性功能基团,包括但不限于 -OH、-COOH、-NH₂。

[0019] 在一个具体实施例中,所述磁球为 Fe_2O_3 或 Fe_3O_4 磁性纳米粒子与有机高分子材料的复合体,并具有 0.1-5 μm 的粒径;并且,所述磁球任选地通过表面改性而带有一种或多种活性功能基团。

[0020] 根据本发明,在所述试剂盒中,第一抗胃泌素-17 抗体的浓度为 10-200 $\mu\text{g/L}$,第二抗胃泌素-17 抗体或胃泌素-17 的浓度为 10-200 $\mu\text{g/L}$,示踪标记物的浓度为 0.1-1mg/L,磁球的浓度为 0.1-5mg/ml。上述各成分的浓度基于包含该成分的各独立的试剂盒组分的量计。

[0021] 根据本发明,所述试剂盒还包括胃泌素-17 的低点校准品和高点校准品,并任选地包括缓冲液。本发明所述低点校准品与高点校准品是两者相对而言,其中“低点校准品”,是指将胃泌素-17 用 50% 牛血清制品稀释成浓度为 10-30ng/ml 得到的校准品;而“高点校准品”是指将胃泌素-17 用 50% 牛血清制品稀释成浓度为 500-700ng/ml 得到的校准品。低点校准品和高点校准品分别任选地含有牛血清白蛋白 (BSA) 和 / 或防腐剂。所述 BSA 的浓度优选为 0.01-0.5g/ml。

[0022] 在本发明的一些实施方案中,所述组分 B 为包被磁球或标记有示踪标记物的第二抗胃泌素-17 抗体。

[0023] 在这些实施方案中,所述示踪标记物直接或间接地标记第一抗胃泌素-17 抗体或第二抗胃泌素-17 抗体。间接标记的方式包括但不限于通过异硫氰酸荧光素 (FITC) 与抗 FITC 抗体体系或通过链霉亲和素 (SA) 与生物素 (Biotin) 体系进行间接标记。直接标记是指 ABEI 直接与第一抗胃泌素-17 抗体或第二抗胃泌素-17 抗体连接进行标记;间接标记是指通过中间媒介链接体系使得 ABEI 标记第一抗胃泌素-17 抗体或第二抗胃泌素-17 抗体,所述中间媒介链接体系包括但不限于 FITC 与抗 FITC 抗体体系或链霉亲和素与生物素体系。所述抗 FITC 抗体优选为羊抗 FITC 多克隆抗体。

[0024] 在这些实施方案中,所述第一抗胃泌素-17 抗体或第二抗胃泌素-17 抗体直接或间接地包被磁球。间接包被磁球的方式包括但不限于通过 FITC 与抗 FITC 抗体体系或通过

链霉亲和素与生物素体系进行间接包被。直接包被是指利用第一抗胃泌素-17 抗体或第二抗胃泌素-17 抗体直接对磁球进行包被；间接包被是指通过中间媒介链接体系，使得第一抗胃泌素-17 抗体或第二抗胃泌素-17 抗体对磁球进行包被，所述中间媒介链接体系包括但不限于 FITC 与抗 FITC 抗体体系或链霉亲和素与生物素体系。

[0025] 在一个具体实施方案中，胃泌素-17 检测试剂盒包括如下组分：1) 标记第一抗胃泌素-17 抗体的示踪标记物溶液，第一抗胃泌素-17 抗体浓度为 10-200 $\mu\text{g}/\text{l}$ ，示踪标记物浓度为 0.1-1mg/l；2) 包被有第二抗胃泌素-17 抗体的磁球悬浮液，第二抗胃泌素-17 抗体浓度为 10-200 $\mu\text{g}/\text{l}$ ，磁球浓度为 0.1-5mg/ml；3) 含胃泌素-17 的低点校准品，胃泌素-17 浓度为 2-50ng/ml；4) 含胃泌素-17 的高点校准品，胃泌素-17 浓度为 200-1000ng/ml。

[0026] 在一个具体实施方案中，胃泌素-17 检测试剂盒包括如下组分：1) 标记第一抗胃泌素-17 抗体的示踪标记物溶液，第一抗胃泌素-17 抗体浓度为 10-200 $\mu\text{g}/\text{l}$ ，示踪标记物浓度为 0.1-1mg/l；2) 标记第二抗胃泌素-17 抗体的 FITC 溶液，第二抗胃泌素-17 抗体浓度为 10-200 $\mu\text{g}/\text{l}$ ，FITC 浓度为 0.1-1mg/l；3) 包被有羊抗 FITC 抗体的磁球悬浮液，羊抗 FITC 抗体浓度为 0.1-1mg/l，磁球浓度为 0.1-5mg/ml；4) 含胃泌素-17 的低点校准品，胃泌素-17 浓度为 2-50ng/ml；5) 含胃泌素-17 的高点校准品，胃泌素-17 浓度为 200-1000ng/ml。

[0027] 在一个具体实施方案中，胃泌素-17 检测试剂盒包括如下组分：1) 包被有链霉亲和素的磁球悬浮液，链霉亲和素浓度为 10-200 $\mu\text{g}/\text{l}$ ，磁球浓度为 0.1-5mg/ml；2) 标记第一抗胃泌素-17 抗体的示踪标记物溶液，第一抗胃泌素-17 抗体浓度为 10-200 $\mu\text{g}/\text{l}$ ，示踪标记物浓度为 0.1-1mg/l；3) 生物素化的第二抗胃泌素-17 抗体溶液，第二抗胃泌素-17 抗体浓度为 10-200 $\mu\text{g}/\text{l}$ ，生物素浓度为 0.1-1mg/l；4) 含胃泌素-17 的低点校准品，胃泌素-17 浓度为 2-50ng/ml；5) 含胃泌素-17 的高点校准品，胃泌素-17 浓度为 200-1000ng/ml。

[0028] 在一个具体实施方案中，胃泌素-17 检测试剂盒包括如下组分：1) 包被有第二抗胃泌素-17 抗体的磁球悬浮液，第二抗胃泌素-17 抗体浓度为 10-200 $\mu\text{g}/\text{l}$ ，磁球浓度为 0.1-5mg/ml；2) 生物素化的第一抗胃泌素-17 抗体溶液，第一抗胃泌素-17 抗体浓度为 10-200 $\mu\text{g}/\text{l}$ ，生物素浓度为 0.1-1mg/l；3) 标记链霉亲和素的示踪标记物溶液，链霉亲和素浓度为 10-200 $\mu\text{g}/\text{l}$ ，示踪标记物浓度为 0.1-1mg/l；4) 含胃泌素-17 的低点校准品，胃泌素-17 浓度为 2-50ng/ml；5) 含胃泌素-17 的高点校准品，胃泌素-17 浓度为 200-1000ng/ml。

[0029] 以上各具体实施方案中，试剂盒各组分均优选含有 BSA 和防腐剂；BSA 浓度优选为 0.01-0.5g/ml；防腐剂为山梨酸钾、苯甲酸钠、叠氮钠、亚硝酸钠、Proclin 系列（免疫诊断常用防腐剂之一，主要活性成分为 2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮和 5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮）中的任一种或两种以上混合物；胃泌素-17 抗体可为单抗或多抗；示踪标记物可为吖啶酯、异鲁米诺及其衍生物、鲁米诺及其衍生物、ALP 或 HRP 中的任意一种。

[0030] 在另外一些实施方案中，所述组分 B 为包被磁球或标记有示踪标记物的胃泌素-17。

[0031] 在这些实施方案中，所述示踪标记物直接或间接地标记第一抗胃泌素-17 抗体或胃泌素-17。间接标记的方式包括但不限于通过异硫氰酸荧光素 (FITC) 与抗 FITC 抗体体系或通过链霉亲和素与生物素体系进行间接标记。直接标记是指 ABEI 直接与第一抗胃泌

素-17 抗体或胃泌素-17 连接进行标记；间接标记是指通过中间媒介链接体系使得 ABEI 标记第一抗胃泌素-17 抗体或胃泌素-17，所述中间媒介链接体系包括但不限于 FITC 与抗 FITC 抗体体系或链霉亲和素与生物素体系。

[0032] 在这些实施方案中，所述第一抗胃泌素-17 抗体或胃泌素-17 直接或间接地包被磁球。间接包被磁球的方式包括但不限于通过 FITC 与抗 FITC 抗体体系或通过链霉亲和素与生物素体系进行间接包被。直接包被是指利用第一抗胃泌素-17 抗体或胃泌素-17 直接对磁球进行包被；间接包被是指通过中间媒介链接体系，使得第一抗胃泌素-17 抗体或胃泌素-17 对磁球进行包被，所述中间媒介链接体系包括但不限于 FITC 与抗 FITC 抗体体系或链霉亲和素与生物素体系。

[0033] 在一些实施方案中，所述组分 A 为标记有示踪标记物的（一个或多个）第一抗胃泌素-17 抗体，所述组分 B 为包被磁球的胃泌素-17。

[0034] 在一个具体实施方案中，胃泌素-17 检测试剂盒包括如下组分：1) 标记胃泌素-17 抗体的示踪标记物溶液，第一抗胃泌素-17 抗体浓度为 10-200 $\mu\text{g}/\text{l}$ ，示踪标记物浓度为 0.1-1mg/l；2) 包被有胃泌素-17 抗原的磁球悬浮液，胃泌素-17 抗原浓度为 10-200 $\mu\text{g}/\text{l}$ ，磁球浓度为 0.1-5mg/ml；3) 含胃泌素-17 的低点校准品，胃泌素-17 浓度为 2-50ng/ml；4) 含胃泌素-17 的高点校准品，胃泌素-17 浓度为 200-1000ng/ml。

[0035] 在一个具体实施方案中，胃泌素-17 检测试剂盒包括如下组分：1) 标记胃泌素-17 抗体的示踪标记物溶液，胃泌素-17 抗体浓度为 10-200 $\mu\text{g}/\text{l}$ ，示踪标记物浓度为 0.1-1mg/l；2) 标记胃泌素-17 抗原的 FITC 溶液，胃泌素-17 抗原浓度为 10-200 $\mu\text{g}/\text{l}$ ，FITC 浓度为 0.1-1mg/l；3) 包被有羊抗 FITC 抗体的磁球悬浮液，羊抗 FITC 抗体浓度为 0.1-1mg/l，磁球浓度为 0.1-5mg/ml；4) 含胃泌素-17 的低点校准品，胃泌素-17 浓度为 2-50ng/ml；5) 含胃泌素-17 的高点校准品，胃泌素-17 浓度为 200-1000ng/ml。

[0036] 在一个具体实施方案中，胃泌素-17 检测试剂盒包括如下组分：1) 标记胃泌素-17 抗体的示踪标记物溶液，胃泌素-17 抗体浓度为 10-200 $\mu\text{g}/\text{l}$ ，示踪标记物浓度为 0.1-1mg/l；2) 生物素化的胃泌素-17 抗原溶液，胃泌素-17 抗原浓度为 10-200 $\mu\text{g}/\text{l}$ ，生物素浓度为 0.1-1mg/l；3) 包被有链霉亲和素的磁球悬浮液，链霉亲和素浓度为 10-200 $\mu\text{g}/\text{l}$ ，磁球浓度为 0.1-5mg/ml；4) 含胃泌素-17 的低点校准品，胃泌素-17 浓度为 2-50ng/ml；5) 含胃泌素-17 的高点校准品，胃泌素-17 浓度为 200-1000ng/ml。

[0037] 在一个具体实施方案中，胃泌素-17 检测试剂盒包括如下组分：1) 包被有胃泌素-17 抗体的磁球悬浮液，第二抗胃泌素-17 抗体浓度为 10-200 $\mu\text{g}/\text{l}$ ，磁球浓度为 0.1-5mg/ml。2) 生物素化的胃泌素-17 抗原溶液，第一抗胃泌素-17 抗体浓度为 10-200 $\mu\text{g}/\text{l}$ ，生物素浓度为 0.1-1mg/l；3) 链霉亲和素标记的示踪标记物溶液，链霉亲和素浓度为 10-200 $\mu\text{g}/\text{l}$ ，示踪标记物浓度为 0.1-1mg/l；4) 含胃泌素-17 的低点校准品，胃泌素-17 浓度为 2-50ng/ml；5) 含胃泌素-17 的高点校准品，胃泌素-17 浓度为 200-1000ng/ml。

[0038] 以上各具体实施方案中，试剂盒各组分均优选含有 BSA 和防腐剂；BSA 浓度优选为 0.01-0.5mg/ml；防腐剂为山梨酸钾、苯甲酸钠、叠氮钠、亚硝酸钠、Proclin 系列中的任一种或两种以上混合物；胃泌素-17 抗体可为单抗或多抗；示踪标记物可为吡啶酯、异鲁米诺及其衍生物、鲁米诺及其衍生物、ALP 或 HRP 中的任意一种。

[0039] 本发明提供了一种用于制备如上所述的组分 B 为第二抗胃泌素 -17 抗体的试剂盒的方法,所述方法包括:将第一抗胃泌素 -17 抗体和第二抗胃泌素 -17 抗体中的任意一种直接或间接标记示踪标记物,将另一种直接或间接包被磁球。所述间接标记包括但不限于将示踪标记物通过异硫氰酸荧光素与抗异硫氰酸荧光素抗体体系或通过链霉亲和素与生物素体系标记所述第一抗胃泌素 -17 抗体或第二抗胃泌素 -17 抗体。所述间接包被包括但不限于将所述第一抗胃泌素 -17 抗体或第二抗胃泌素 -17 抗体通过异硫氰酸荧光素与抗异硫氰酸荧光素抗体体系或通过链霉亲和素与生物素体系间接包被磁球。

[0040] 本发明还提供了一种用于制备如上所述的组分 B 为胃泌素 -17 的试剂盒的方法,所述方法包括:将第一抗胃泌素 -17 抗体和胃泌素 -17 中的任意一种直接或间接标记示踪标记物,将另一种直接或间接包被磁球。所述间接标记包括将示踪标记物通过异硫氰酸荧光素与抗异硫氰酸荧光素抗体体系或通过链霉亲和素与生物素体系标记所述第一抗胃泌素 -17 抗体或胃泌素 -17。所述间接包被包括将所述第一抗胃泌素 -17 抗体或胃泌素 -17 通过异硫氰酸荧光素与抗异硫氰酸荧光素抗体体系或通过链霉亲和素与生物素体系间接包被磁球。

[0041] 根据本发明的试剂盒制备方法还可以包括低点校准品和高点校准品的配制,还可以进一步包括试剂盒的组装。

[0042] 根据本发明,还提供了一种检测胃泌素 -17 的方法,所述方法包括使用如上所述的试剂盒,通过化学发光免疫法检测待测样品中的胃泌素 -17 浓度。

[0043] 具体地,所述方法包括:将所述试剂盒的组分 A 和组分 B 与待测样品混合,温育,经磁分离,向沉淀物中加入发光底物,检测光信号强度;以同样方法测定胃泌素 -17 的低点校准品和高点校准品的光信号强度,并获得胃泌素 -17 的浓度与光信号强度之间的标准曲线;将检测得到的待测样品的光信号强度与标准曲线对照,获得待测样品中的胃泌素 -17 浓度。

[0044] 在试剂盒组分 B 为第二抗胃泌素 -17 抗体的情况中,在使用试剂盒测定胃泌素 -17 时,组分 A 和组分 B 与待测样品中的胃泌素 -17 形成第一抗胃泌素 -17 抗体 / 胃泌素 -17 / 第二抗胃泌素 -17 抗体的双抗体夹心模式,也就是,在测试过程中形成标记有示踪标记物的胃泌素 -17 抗体、被测胃泌素 -17 和包被磁球的胃泌素 -17 抗体的免疫复合物。外加磁场沉淀,去上清液,用洗液清洗沉淀复合物,加入发光激发物,测定相对光强度,对照胃泌素 -17 浓度与光强度的标准曲线,可获得样品中的胃泌素 -17 浓度。

[0045] 在一个具体实施方案中,采用双抗体夹心法测定,具体加样步骤为:a. 将 15-100 μ l 待测样本(血清 / 血浆样本)、高点校准品和低点校准品分别加入到不同的反应杯孔中;b. 加入 10-50 μ l 包被有抗胃泌素 -17 抗体的磁球悬浮液;c. 加入 40-200 μ l 标记另一株抗胃泌素 -17 抗体的示踪标记物溶液;d. 37°C 温育 15-40 分钟,置于磁环境下清洗至少 2 次;e. 加入发光底物,检测光信号强度;f. 通过校准品修正后的工作曲线,根据样本检测光强度计算出待测样本的胃泌素 -17 浓度。

[0046] 在试剂盒组分 B 为胃泌素 -17 的情况中,在使用试剂盒测定胃泌素 -17 时,组分 B 中的胃泌素 -17 与待测样品中的胃泌素 -17 竞争结合组分 A 中的第一抗胃泌素 -17 抗体,形成免疫复合物。外加磁场沉淀,去上清液,用洗液清洗沉淀复合物,加入发光激发物,测定相对光强度,对照胃泌素 -17 浓度与光强度的标准曲线,可获得样品中的胃泌素 -17 浓度。

[0047] 在一个具体实施方案中,采用竞争法测定,具体加样步骤为:a. 将 15-100 μl 待测样本(血清/血浆样本)、高点校准品和低点校准品分别加入到不同反应杯孔中;b. 加入 10-50 μl 包被有胃泌素-17 抗原的磁球悬浮液;c. 加入 40-200 μl 标记抗胃泌素-17 抗体的化学示踪标记物溶液;d. 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 15-40 分钟,置于磁环境下清洗至少 2 次;e. 加入发光底物,检测光信号强度;f. 通过校准品修正后的工作曲线,根据样本检测光强度计算出待测样本的胃泌素-17 浓度。

[0048] 在一个实施方案中,所述检测胃泌素-17 浓度的方法包括使用如上所述的试剂盒,通过化学发光免疫分析仪检测胃泌素-17 浓度。在本发明的一个优选的实施方案中,所述方法全自动地进行。根据本发明,所述化学发光免疫分析仪优选为 Maglumi 系列化学发光免疫分析仪(深圳新产业生物医学工程股份有限公司生产)。当使用化学发光免疫分析仪时,仪器可根据设定自动加样、检测和计算结果,可加快检测进程,减少人为误差。

[0049] 根据本发明提供的胃泌素-17 检测试剂盒,包含以多种标记方式标记示踪标记物或者以多种包被方式包被磁性微球的胃泌素-17 或抗胃泌素-17 抗体,利用双抗体夹心法或竞争法,可准确、灵敏、快速地测定样本中的胃泌素-17 浓度。

[0050] 使用本发明提供的试剂盒测定胃泌素-17,不需要将待测样本进行稀释处理,可以直接用于检测,从而有利于提高低值样本的检测灵敏度。其中待测样本可为空白管血清、分离胶管血清、促凝剂管血清、EDTA 血浆和肝素血浆中的任意一种。

[0051] 本发明提供的胃泌素-17 检测方法,通过采用更为先进的化学发光免疫分析法,试剂盒的特异性及灵敏度得到了很大的提升,更好的服务于临床诊断。

[0052] 本发明提供的胃泌素-17 检测方法,使用所提供的试剂盒,借助化学发光免疫分析仪,加样方式完全由仪器全自动操作,降低了人为因素对实验结果造成的干扰。大幅度缩短了测试时间,有利于临床上快速的得到诊断结果。

具体实施方式

[0053] 下面将通过具体实施方式和具体实施例对本发明做进一步地说明,应理解,本发明的范围并不限于此。

[0054] 以下实施例采用 Maglumi 2000plus 化学发光免疫分析仪(深圳市新产业生物医学工程股份有限公司生产)进行检测。

[0055] 胃泌素-17 酶联免疫试剂盒来源:芬兰 Biohit 公司,批号:18GC1404。

[0056] 抗胃泌素-17 抗体来源:两株抗体(第一抗胃泌素-17 抗体和第二抗胃泌素-17 抗体)均购自芬兰 Biohit 公司,其中第一抗胃泌素-17 抗体克隆号为 G52C7.1,第二抗胃泌素-17 抗体克隆号为 G55D4。

[0057] 羊抗 FITC 多克隆抗体来源:购自北京百浩生物科技有限公司。

[0058] FITC 来源:购自上海纪宁实业有限公司。

[0059] ABEI 来源:深圳市新产业生物医学工程股份有限公司提供。

[0060] 磁性微球来源:深圳市新产业生物医学股份有限公司生产,浓度为 0.6-1.2mg/ml,80%粒径分布为 1-5 μm ,磁化强度为 4000 高斯时沉淀时间为 10-15 秒,BSA 为 30mg 时蛋白吸附浓度为 0.8mg-1.2mg。

[0061] 生物素、链霉亲和素来源:均购自上海源叶生物科技有限公司。

[0062] 胃泌素 -17 标准品 :购自上海科肽生物有限公司。

[0063] 以下为试剂盒各组分的制备方法 :

[0064] 制备 1 :包被第一抗胃泌素 -17 抗体的磁球悬浮液的制备

[0065] 此制备步骤使用的免疫磁球选择 Merck 公司生产的浓度为 100mg/ml, 羟基为 95mg KOH/g 的纳米磁性微球悬浮液。

[0066] (1) 缓冲液的配制 :

[0067] 称取 2.55g 三水合乙酸钠,用 4500ml 纯化水溶解,再加入 14ml 乙酸,混匀后,即得 pH 为 3.6 的醋酸缓冲液。

[0068] (2) 磁性微球连接 (磁性微球连接 CMC 法) :

[0069] 将磁性微球中悬浮于 5 倍于包被体积的上述 pH3.6 醋酸缓冲液,使磁球浓度为 20mg/ml ;再加入 1- 环己基 -2- 吗啉乙基碳二亚胺对甲苯磺酸盐 (CMC),使其浓度为 10mg/ml ;按所得溶液与第一抗胃泌素 -17 抗体的重量比为 1mg :12 μ g 的比例加入纯化的第一抗胃泌素 -17 抗体,放入恒温震荡水浴箱中 37 $^{\circ}$ C 反应 24 小时。

[0070] (3) 磁性微球的清洗 :

[0071] 磁球清洗液的配置 :以 0.1mol/l 的 PBS 缓冲液 : 纯化水 = 1:9 的体积比配置 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液 500ml,加入 2.5g BSA 混匀溶解,即为磁珠清洗液。

[0072] 清洗 :将步骤 (2) 中温浴好的磁球倒入烧杯中,然后置于磁铁上沉淀后,倒掉上清,加入 5 倍体积的磁球清洗液搅拌清洗,然后放置在磁铁上,待上清液清亮后倒掉上清液,重复该清洗步骤四次。

[0073] (4) 磁球的悬浮 :

[0074] 将步骤 (3) 清洗后的磁球加入包被体积的混合溶液 (混合溶液主要成分 :0.2g/ml 的 KH_2PO_4 、2.9g/ml 的 NaHPO_4 、8g/ml 的 NaCl 、2g/ml 的 NaN_3 、5g/ml 的 BSA,2ml/ml 的吐温 T-20,余量为纯化水)中,得到包被体积的磁球悬浮液,悬浮浓度为 20mg/ml,即为包被第一抗胃泌素 -17 抗体的磁球悬溶液。

[0075] 上述第一抗胃泌素 -17 抗体可以用第二抗胃泌素 -17 抗体替代。

[0076] 制备 2 :包被有链霉亲和素的磁球悬浮液的制备

[0077] 此制备步骤使用的免疫磁球选择 Merck 公司生产的浓度为 100mg/ml, 羟基为 95mg KOH/g 的纳米磁性微球悬浮液。

[0078] (1) 缓冲液的配制 :

[0079] 称取 2.55g 三水合乙酸钠,用 4500ml 纯化水溶解,再加入 14ml 乙酸,混匀后,即得 pH 为 3.6 的醋酸缓冲液。

[0080] (2) 磁性微球连接 (磁性微球连接 CMC 法) :

[0081] 将磁性微球中悬浮于 5 倍于包被体积的上述 pH3.6 醋酸缓冲液,使磁球浓度为 20mg/ml ;再加入 CMC(1- 环己基 -2- 吗啉乙基碳二亚胺对甲苯磺酸盐),使其浓度为 10mg/ml ;按所得溶液与链霉亲和素的重量比为 1mg :12 μ g 的比例加入链霉亲和素,放入恒温震荡水浴箱中 37 $^{\circ}$ C 反应 24 小时。

[0082] (3) 磁性微球的清洗 :

[0083] 磁球清洗液的配置 :以 0.1mol/l 的 PBS 缓冲液 : 纯化水 = 1:9 的体积比配置 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液 500ml,加入 2.5g BSA 混匀溶解,即为磁珠清洗液。

[0084] 清洗:将步骤(2)中温浴好的磁球倒入烧杯中,然后置于磁铁上沉淀后,倒掉上清,加入5倍体积的磁球清洗液搅拌清洗,然后放置在磁铁上,待上清液清亮后倒掉上清液,重复该清洗步骤四次。(4)磁球的悬浮:

[0085] 将步骤(3)清洗后的磁球加入包被体积的混合溶液(混合溶液主要成分:0.2g/ml的 KH_2PO_4 、2.9g/ml的 NaHPO_4 、8g/ml的 NaCl 、2g/ml的 NaN_3 、5g/ml的BSA、2ml/ml的吐温T-20,余量为纯化水)中,得到包被体积的磁球悬浮液,悬浮浓度为20mg/ml,即为包被有链霉亲和素的磁球的悬浮液。

[0086] 制备3:包被有羊抗FITC多克隆抗体的磁球悬浮液的制备

[0087] 此制备步骤使用的免疫磁球选择Merck公司生产的浓度为100mg/ml,羟基为95mg KOH/g的纳米磁性微球悬浮液。

[0088] (1)缓冲液的配制:

[0089] 称取2.55g三水合乙酸钠,用4500ml纯化水溶解,再加入14ml乙酸,混匀后,即得pH为3.6的醋酸缓冲液。

[0090] (2)磁性微球连接(磁性微球连接CMC法):

[0091] 将磁性微球中悬浮于5倍于包被体积的上述pH3.6醋酸缓冲液,使磁球浓度为20mg/ml;再加入CMC(1-环己基-2-吗啉乙基碳二亚胺对甲苯磺酸盐),使其浓度为10mg/ml;按所得溶液与羊抗FITC多克隆抗体的重量比为1mg:12 μg 的比例加入羊抗FITC多克隆抗体,放入恒温震荡水浴箱中37 $^\circ\text{C}$ 反应24小时。

[0092] (3)磁性微球的清洗:

[0093] 磁球清洗液的配置:以0.1mol/l的PBS缓冲液:纯化水=1:9的体积比配置pH为7.4的PBS缓冲液500ml,加入2.5gBSA混匀溶解,即为磁珠清洗液。

[0094] 清洗:将步骤(2)中温浴好的磁球倒入烧杯中,然后置于磁铁上沉淀后,倒掉上清,加入5倍体积的磁球清洗液搅拌清洗,然后放置在磁铁上,待上清液清亮后倒掉上清液,重复该清洗步骤四次。

[0095] (4)磁球的悬浮:

[0096] 将步骤(3)清洗后的磁球加入包被体积的混合溶液(混合溶液主要成分:0.2g/ml的 KH_2PO_4 、2.9g/ml的 NaHPO_4 、8g/ml的 NaCl 、2g/ml的 NaN_3 、5g/ml的BSA、2ml/ml的吐温T-20,余量为纯化水)中,得到包被体积的磁球悬浮液,悬浮浓度为20mg/ml,即为包被有羊抗FITC多克隆抗体的磁球的悬浮液。

[0097] 制备4:标记有ABEI的第一抗胃泌素-17抗体溶液的制备

[0098] (1)pH9.5透析液的配置:在5000ml烧杯中加入 Na_2CO_3 14.31g, NaHCO_3 26.46g,加水定容至4500ml。将配制好的透析液置于磁力搅拌器上备用。

[0099] (2)选用截留量为14000的透析袋,量取合适的尺寸备用。取1mg胃泌素-17单抗或多抗,用上述配置的透析液溶解并调整到1ml,放入透析袋中,搅拌透析2小时。将透析好的溶液加入300 μg ABEI-半琥珀酰胺酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯(ABEI-hemisuccinimide-N-Hydroxysuccinimide),37 $^\circ\text{C}$ 反应2小时,得到标记ABEI的第一抗胃泌素-17抗体溶液。

[0100] (3)以G-25凝胶柱纯化上述反应得到的标记ABEI的第一抗胃泌素-17抗体溶液。

[0101] (4)在纯化后的标记ABEI的第一抗胃泌素-17抗体溶液中加入等体积的含5g/ml的BSA的保护液,即得。

[0102] 上述第一抗胃泌素-17 抗体可以用第二抗胃泌素-17 抗体替代。

[0103] 制备 5 :第一抗胃泌素-17 抗体标记的生物素溶液的制备

[0104] (1)pH9.5 透析液的配置 :在 5000ml 烧杯中加入 Na_2CO_3 14.31g, NaHCO_3 26.46g, 加水定容至 4500ml。将配制好的透析液置于磁力搅拌器上备用。

[0105] (2) 选用截留量为 14000 的透析袋, 量取合适的尺寸备用。取 1mg 第一抗胃泌素-17 抗体, 用上述配置的透析液溶解并调整到 1ml, 放入透析袋中, 搅拌透析 2 小时。将透析好的溶液加入 300 μg 生物素, 37 $^\circ\text{C}$ 反应 2 小时, 得到生物素化的第一抗胃泌素-17 抗体溶液。

[0106] (3) 以 G-25 凝胶柱纯化上述反应得到的生物素化的第一抗胃泌素-17 抗体溶液。

[0107] (4) 在纯化后的生物素化的第一抗胃泌素-17 抗体溶液中加入等体积的含 5g/ml 的 BSA 的保护液, 即得。

[0108] 上述第一抗胃泌素-17 抗体可以用第二抗胃泌素-17 抗体替代。

[0109] 制备 6 :第一抗胃泌素-17 抗体标记的 FITC 溶液的制备

[0110] (1)pH9.5 透析液的配置 :在 5000ml 烧杯中加入 Na_2CO_3 14.31g, NaHCO_3 26.46g, 加水定容至 4500ml。将配制好的透析液置于磁力搅拌器上备用。

[0111] (2) 选用截留量为 14000 的透析袋, 量取合适的尺寸备用。取 1mg 第一抗胃泌素-17 抗体, 用上述配置的透析液溶解并调整到 1ml, 放入透析袋中, 搅拌透析 2 小时。将透析好的溶液加入 100 μg FITC, 37 $^\circ\text{C}$ 反应 2 小时, 得到标记第一抗胃泌素-17 抗体的 FITC 溶液。

[0112] (3) 以 G-25 凝胶柱纯化上述反应得到的标记第一抗胃泌素-17 抗体的 FITC 溶液。

[0113] (4) 在纯化后的标记第一抗胃泌素-17 抗体的 FITC 溶液中加入等体积的含 5g/ml 的 BSA 的保护液, 即得。

[0114] 上述第一抗胃泌素-17 抗体可以用第二抗胃泌素-17 抗体替代。

[0115] 制备 7 :第一抗胃泌素-17 抗体标记的链霉亲和素溶液的制备

[0116] (1)pH9.5 透析液的配置 :在 5000ml 烧杯中加入 Na_2CO_3 14.31g, NaHCO_3 26.46g, 加水定容至 4500ml。将配制好的透析液置于磁力搅拌器上备用。

[0117] (2) 选用截留量为 14000 的透析袋, 量取合适的尺寸备用。取 1mg 第一抗胃泌素-17 抗体, 用上述配置的透析液溶解并调整到 1ml, 放入透析袋中, 搅拌透析 2 小时。将透析好的溶液加入 50 μg 链霉亲和素, 37 $^\circ\text{C}$ 反应 2 小时, 得到标记第一抗胃泌素-17 抗体的链霉亲和素溶液。

[0118] (3) 以 G-25 凝胶柱纯化上述反应得到的标记第一抗胃泌素-17 抗体的链霉亲和素溶液。

[0119] (4) 在纯化后的标记第一抗胃泌素-17 抗体的链霉亲和素溶液中加入等体积的含 5g/ml 的 BSA 的保护液, 即得。

[0120] 上述第一抗胃泌素-17 抗体可以用第二抗胃泌素-17 抗体替代。

[0121] 制备 8 :第一抗胃泌素-17 抗体标记的羊抗 FITC 多克隆抗体溶液的制备

[0122] (1)pH9.5 透析液的配置 :在 5000ml 烧杯中加入 Na_2CO_3 14.31g, NaHCO_3 26.46g, 加水定容至 4500ml。将配制好的透析液置于磁力搅拌器上备用。

[0123] (2) 选用截留量为 14000 的透析袋, 量取合适的尺寸备用。取 1mg 第一抗胃泌

素-17 抗体,用上述配置的透析液溶解并调整到 1ml,放入透析袋中,搅拌透析 2 小时。将透析好的溶液加入 50 μ g 羊抗 FITC 多克隆抗体,37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时,得到标记第一抗胃泌素-17 抗体的羊抗 FITC 多克隆抗体溶液。

[0124] (3) 以 G-25 凝胶柱纯化上述反应得到的标记第一抗胃泌素-17 抗体的羊抗 FITC 多克隆抗体溶液。

[0125] (4) 在纯化后的标记第一抗胃泌素-17 抗体的羊抗 FITC 多克隆抗体溶液中加入等体积的含 5g/ml 的 BSA 的保护液,即得。

[0126] 上述第一抗胃泌素-17 抗体可以用第二抗胃泌素-17 抗体替代。

[0127] 制备 9 :生物素化的 ABEI 溶液的制备

[0128] (1) pH9.5 透析液的配置 :在 5000ml 烧杯中加入 Na_2CO_3 14.31g, NaHCO_3 26.46g,加水定容至 4500ml。将配制好的透析液置于磁力搅拌器上备用。

[0129] (2) 选用截留量为 14000 的透析袋,量取合适的尺寸备用。取 1mg 生物素,用上述配置的透析液溶解并调整到 1ml,放入透析袋中,搅拌透析 2 小时。将透析好的溶液加入 300 μ g ABEI-半琥珀酰胺酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯,37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时,得到生物素化的 ABEI 溶液。

[0130] (3) 以 G-25 凝胶柱纯化上述反应得到的生物素化的 ABEI 溶液。

[0131] (4) 在纯化后的生物素化的 ABEI 溶液中加入等体积的含 5g/ml 的 BSA 的保护液,即得。

[0132] 制备 10 :标记链霉亲和素的 ABEI 溶液的制备

[0133] (1) pH9.5 透析液的配制 :在 5000ml 烧杯中加入 Na_2CO_3 14.31g, NaHCO_3 26.46g,加水定容至 4500ml。将配制好的透析液置于磁力搅拌器上备用。

[0134] (2) 选用截留量为 14000 的透析袋,量取合适的尺寸备用。取 1mg 链霉亲和素,用上述配制的透析液溶解并调整到 1ml,放入透析袋中,搅拌透析 2 小时。将透析好的溶液加入 50 μ g ABEI-半琥珀酰胺酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯,37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时,得到标记链霉亲和素的 ABEI 溶液。

[0135] (3) 以 G-25 凝胶柱纯化上述反应得到的标记链霉亲和素的 ABEI 溶液。

[0136] (4) 在纯化后的标记链霉亲和素的 ABEI 溶液中加入等体积的含 5g/ml 的 BSA 的保护液,即得。

[0137] 制备 11 :标记 FITC 的 ABEI 溶液的制备

[0138] (1) pH9.5 透析液的配制 :在 5000ml 烧杯中加入 Na_2CO_3 14.31g, NaHCO_3 26.46g,加水定容至 4500ml。将配制好的透析液置于磁力搅拌器上备用。

[0139] (2) 选用截留量为 14000 的透析袋,量取合适的尺寸备用。取 1mg FITC,用上述配制的透析液溶解并调整到 1ml,放入透析袋中,搅拌透析 2 小时。将透析好的溶液加入 50 μ g 的 ABEI-半琥珀酰胺酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯,37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时,得到标记 FITC 的 ABEI 溶液。

[0140] (3) 以 G-25 凝胶柱纯化上述反应得到的标记 FITC 的 ABEI 溶液。

[0141] (4) 在纯化后的标记 FITC 的 ABEI 溶液中加入等体积的含 5g/ml 的 BSA 的保护液,即得。

[0142] 制备 12 :胃泌素-17 的低点校准品和高点校准品的配制

[0143] 采用胃泌素 -17 标准品,以牛血清为溶剂配制浓度分别为 4.729pmol/l 和 229.932pmol/l 高点校准品和低点校准品。

[0144] 实施例 1

[0145] 试剂盒组分的制备:

[0146] 按照上述制备 4 制备得到标记第一抗胃泌素 -17 抗体的 ABEI 溶液;

[0147] 按照上述制备 1 制备得到包被有第二抗胃泌素 -17 抗体的磁球悬浮液;

[0148] 按照上述制备 12 制备胃泌素 -17 的低点校准品和高点校准品。

[0149] 采用胃泌素 -17 标准品,以牛血清为溶剂,配制 10 份不同浓度的标准品溶液,使用本实施例制备的试剂盒组分对该 10 份溶液进行检测,检测步骤如下:

[0150] 1) 将 40 μ l 待测溶液、高点校准品和低点校准品分别加入到不同反应杯孔中;

[0151] 2) 分别加入 100 μ l 标记有第一抗胃泌素 -17 抗体的 ABEI 溶液;

[0152] 3) 分别加入 20 μ l 包被有第二抗胃泌素 -17 抗体的磁球悬浮液;

[0153] 4) 37°C 温育 30 分钟,分别置于磁环境下清洗 3 次;

[0154] 5) 分别加入发光底物,检测光信号强度;

[0155] 6) 通过校准品修正后的工作曲线,根据样检测光强度自动计算出待测溶液的胃泌素 -17 浓度。

[0156] 检测结果见表 1。

[0157] 此外,以取自南山医院(中国深圳)的 5 例已确诊为十二指肠溃疡的空腹体检血清样本作为待测样本,使用本实施例提供的试剂盒组分,按照以上测定方法对此 5 例样本进行检测,检测结果如表 2 所示。

[0158] 实施例 2

[0159] 试剂盒组分的制备:

[0160] 按照上述制备 4 制备得到标记第一抗胃泌素 -17 抗体的 ABEI 溶液;

[0161] 按照上述制备 3 制备得到包被有羊抗 FITC 多克隆抗体的磁球悬浮液;

[0162] 按照上述制备 6 制备得到第二抗胃泌素 -17 抗体标记的 FITC 溶液;

[0163] 按照上述制备 12 制备胃泌素 -17 的低点校准品和高点校准品。

[0164] 采用本实施例的检测试剂盒组分进行胃泌素 -17 化学发光免疫检测的方法,参照实施例 1 中的检测方法,对实施例 1 中的 10 份标准品溶液和 5 例确诊十二指肠溃疡患者的血清样本进行检测,检测结果分别见表 1 和表 2。

[0165] 实施例 3

[0166] 试剂盒组分的制备:

[0167] 按照上述制备 4 制备得到标记第一抗胃泌素 -17 抗体的 ABEI 溶液;

[0168] 按照上述制备 5 制备得到生物素化的第二抗胃泌素 -17 抗体溶液;

[0169] 按照上述制备 2 制备得到包被有链霉亲和素的磁球悬浮液;

[0170] 按照上述制备 12 制备胃泌素 -17 的低点校准品和高点校准品。

[0171] 采用本实施例的检测试剂盒组分进行胃泌素 -17 化学发光免疫检测的方法,参照实施例 1 中的检测方法,对实施例 1 中的 10 份标准品溶液和 5 例确诊十二指肠溃疡患者的血清样本进行检测,检测结果分别见表 1 和表 2。

[0172] 实施例 4

[0173] 试剂盒组分的制备：

[0174] 按照上述制备 5 制备得到生物素化的第一抗胃泌素 -17 抗体溶液；

[0175] 按照上述制备 10 制备得到标记链霉亲和素的 ABEI 溶液；

[0176] 按照上述制备 1 制备得到包被有第二抗胃泌素 -17 抗体的磁球悬浮液；

[0177] 按照上述制备 12 制备胃泌素 -17 的低点校准品和高点校准品。

[0178] 采用本实施例的检测试剂盒组分进行胃泌素 -17 化学发光免疫检测的方法，参照实施例 1 中的检测方法，对实施例 1 中的 10 份标准品溶液和 5 例确诊十二指肠溃疡患者的血清样本进行检测，检测结果分别见表 1 和表 2。

[0179] 实施例 5

[0180] 试剂盒组分的制备：

[0181] 按照上述制备 4 制备得到标记第一抗胃泌素 -17 抗体的 ABEI 溶液；

[0182] 按照上述制备 1 制备得到包被有胃泌素 -17 抗原的磁球悬浮液；

[0183] 按照上述制备 12 制备胃泌素 -17 的低点校准品和高点校准品。

[0184] 采用本实施例的检测试剂盒组分进行胃泌素 -17 化学发光免疫检测的方法，参照实施例 1 中的检测方法，对实施例 1 中的 10 份标准品溶液和 5 例确诊十二指肠溃疡患者的血清样本进行检测，检测结果分别见表 1 和表 2。

[0185] 实施例 6

[0186] 试剂盒组分的制备：

[0187] 按照上述制备 4 制备得到标记第一抗胃泌素 -17 抗体的 ABEI 溶液；

[0188] 按照上述制备 3 制备得到包被有羊抗 FITC 多克隆抗体的磁球悬浮液；

[0189] 按照上述制备 6 制备得到胃泌素 -17 抗原标记的 FITC 溶液；

[0190] 按照上述制备 12 制备胃泌素 -17 的低点校准品和高点校准品。

[0191] 采用本实施例的检测试剂盒组分进行胃泌素 -17 化学发光免疫检测的方法，参照实施例 1 中的检测方法，对实施例 1 中的 10 份标准品溶液和 5 例确诊十二指肠溃疡患者的血清样本进行检测，检测结果分别见表 1 和表 2。

[0192] 实施例 7

[0193] 试剂盒组分的制备：

[0194] 按照上述制备 4 制备得到标记第一抗胃泌素 -17 抗体的 ABEI 溶液；

[0195] 按照上述制备 5 制备得到生物素化的胃泌素 -17 抗原溶液；

[0196] 按照上述制备 2 制备得到包被有链霉亲和素的磁球悬浮液；

[0197] 按照上述制备 12 制备胃泌素 -17 的低点校准品和高点校准品。

[0198] 采用本实施例的检测试剂盒组分进行胃泌素 -17 化学发光免疫检测的方法，参照实施例 1 中的检测方法，对实施例 1 中的 10 份标准品溶液和 5 例确诊十二指肠溃疡患者的血清样本进行检测，检测结果分别见表 1 和表 2。

[0199] 实施例 8

[0200] 试剂盒组分的制备：

[0201] 按照上述制备 5 制备得到生物素化的第一抗胃泌素 -17 抗体溶液；

[0202] 按照上述制备 10 制备得到标记链霉亲和素的 ABEI 溶液；

[0203] 按照上述制备 1 制备得到包被有胃泌素 -17 抗原的磁球悬浮液；

[0204] 按照上述制备 12 制备胃泌素 -17 的低点校准品和高点校准品。

[0205] 采用本实施例的检测试剂盒组分进行胃泌素 -17 化学发光免疫检测的方法,参照实施例 1 中的检测方法,对实施例 1 中的 10 份标准品溶液和 5 例确诊十二指肠溃疡患者的血清样本进行检测,检测结果分别见表 1 和表 2。

[0206] 实施例 9

[0207] 试剂盒组分的制备:

[0208] 按照上述制备 7 制备得到标记有链霉亲和素的第二抗胃泌素 -17 抗体溶液;

[0209] 按照上述制备 9 制备得到生物素化的 ABEI 溶液;

[0210] 按照上述制备 1 制备得到包被有胃泌素 -17 抗原的磁球悬浮液;

[0211] 按照上述制备 12 制备胃泌素 -17 的低点校准品和高点校准品。

[0212] 采用本实施例的检测试剂盒组分进行胃泌素 -17 化学发光免疫检测的方法,参照实施例 1 中的检测方法,对实施例 1 中的 10 份标准品溶液和 5 例确诊十二指肠溃疡患者的血清样本进行检测,检测结果分别见表 1 和表 2。

[0213] 实施例 10

[0214] 试剂盒组分的制备:

[0215] 按照上述制备 8 制备得到标记第二抗胃泌素 -17 抗体的羊抗 FITC 多克隆抗体溶液;

[0216] 按照上述制备 11 制备得到标记 FITC 的 ABEI 溶液;

[0217] 按照上述制备 1 制备得到包被有胃泌素 -17 抗原的磁球悬浮液;

[0218] 按照上述制备 12 制备胃泌素 -17 的低点校准品和高点校准品。

[0219] 采用本实施例的检测试剂盒组分进行胃泌素 -17 化学发光免疫检测的方法,参照实施例 1 中的检测方法,对实施例 1 中的 10 份标准品溶液和 5 例确诊十二指肠溃疡患者的血清样本进行检测,检测结果分别见表 1 和表 2。

[0220] 对比例 1

[0221] 使用芬兰 Biohit 公司胃泌素 -17 酶联免疫试剂盒对实施例 1 中的 10 份标准品溶液和 5 例确诊十二指肠溃疡患者的血清样本进行检测,其结果与实施例 1-10 比较,见表 1 和表 2。

[0222] 表 1

[0223]

配制浓度 (pmol/l)	实施例1 (pmol/l)	实施例2 (pmol/l)	实施例3 (pmol/l)	实施例4 (pmol/l)	实施例5 (pmol/l)	实施例6 (pmol/l)	实施例7 (pmol/l)	实施例8 (pmol/l)	实施例9 (pmol/l)	实施例10 (pmol/l)	对比例1 (pmol/l)
0	0.165	0.341	0.352	0.349	0.331	0.465	0.478	0.452	0.589	0.612	0.756
5	4.963	5.561	5.564	5.574	5.561	5.817	5.874	5.963	6.189	6.209	6.75
10	10.09	11.52	10.98	11.06	10.86	11.56	11.49	11.60	12.19	12.79	13.54
20	19.94	19.86	19.62	20.54	20.64	19.72	19.63	19.87	19.80	19.65	19.86
40	40.27	41.89	42.03	38.87	39.47	38.12	41.69	41.87	40.87	41.52	37.61
80	79.24	77.23	82.48	78.36	79.04	82.69	83.47	83.97	80.79	85.87	72.86
100	100.58	96.47	96.12	96.47	97.7	93.4	92.4	92.1	91.65	90.87	86.97
200	198.5	193.4	193.7	192.8	193.7	189.2	187.3	188.7	176.9	174.7	138.9
300	295.7	290.6	290.7	289.7	290.4	267.4	266.3	260.7	207.8	201.6	197.6
500	493.7	483.5	481.7	484.7	483.7	456.8	455.7	432.1	359.7	349.7	286.4

[0224] 从表 1 可见,采用本发明提供的试剂盒(实施例 1-10)对胃泌素-17 标准品溶液的测定结果比使用商品化酶联免疫试剂盒更加准确,尤其是低值(5pmol/l 以下)及高值(300pmol/l 以上)部分明显优于酶联免疫结果。也就是说,采用本发明试剂盒的测定结果相对于酶联免疫试剂盒测定结果更加接近胃泌素-17 校准品配制的样本理论值,尤其是高值和低值部分。

[0225] 从实施例 1-4 的检测可见,以实施例 1 的检测结果尤佳(主要体现在低值和高值部分的测定结果更接近理论值);类似地,比较实施例 5-10,以实施例 5 的检测结果较佳,说明对于本发明的胃泌素-17 检测试剂盒,抗原抗体直接标记示踪标记物或直接包被磁球,相比于通过 FITC 体系或链霉亲和素体系搭桥后标记或包被磁球,试剂盒的检测准确度和灵敏度更高。通过比较实施例 8 和 9,可知当用竞争法进行测定时,使用第一抗胃泌素-17 抗体比使用第二抗胃泌素-17 抗体效果更好,表明两种抗体中第一抗体对于胃泌素-17 抗原的亲合力更高;而比较实施例 4 和 8,可知当采用间接标记方式时,双抗体夹心法和竞争法的检测结果表明差异不大。另外,实施例 5 的测定结果与实施例 2-4 接近,比实施例 1 稍差,说明了采用如实施例 1 的双抗体夹心法比采用如实施例 5 的竞争法具有更好地特异性和灵敏度。但是,竞争法只需使用一株抗体而双抗体夹心法需两株抗体,故竞争法更加节约原料。

[0226] 表 2*

[0227]

样本编号	实施例1	实施例2	实施例3	实施例4	实施例5	实施例6	实施例7	实施例8	实施例9	实施例10	对比例1
1	34.62	32.14	32.01	32.64	33.34	31.69	31.41	31.87	31.53	31.77	28.64
2	12.97	12.14	11.97	12.03	12.04	10.87	10.93	10.78	10.81	10.72	8.891
3	45.87	43.14	43.57	43.17	43.89	42.17	42.67	42.07	42.45	42.01	37.56
4	27.61	25.74	25.41	24.69	25.03	24.58	23.96	24.09	24.21	23.89	15.86
5	65.97	63.14	64.01	62.41	63.78	60.12	59.33	60.14	59.88	59.77	54.98

[0228] *:测定浓度单位为 pmol/l,空腹体检正常值范围为 2-10pmol/l。

[0229] 从表 2 可见,因十二指肠溃疡而导致胃泌素-17 大量分泌的 5 例患者,采用酶联免疫试剂盒只检测出其中 4 例为异常,而采用本发明实施例 1-10 的试剂盒均可检测出 5 例为

异常。由此可见,本发明提供的试剂盒具有更高的准确性。可见,样本预稀释对试剂盒的检测灵敏度有显著影响,容易干扰临床诊断,也延长实验时间。因此,本发明提供的胃泌素-17试剂盒和胃泌素-17检测方法更加有利于现代临床检验需要更快速有效得到结果的需求。

[0230] 虽然本发明已作了详细描述,但对本领域技术人员来说,在本发明精神和范围内的修改将是显而易见的。此外,应当理解的是,本发明记载的各方面、不同具体实施方式各部分、和列举的各种特征可被组合或全部或部分互换。在上述的各个具体实施方式中,那些参考另一个具体实施方式的实施方式可适当地与其它实施方式组合,这是将由本领域技术人员所能理解的。此外,本领域技术人员将会理解,前面的描述仅是示例的方式,并不旨在限制本发明。

专利名称(译)	一种用于检测胃泌素-17的试剂盒及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN104614536A	公开(公告)日	2015-05-13
申请号	CN201510069296.7	申请日	2015-02-10
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市新产业生物医学工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市新产业生物医学工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市新产业生物医学工程股份有限公司		
[标]发明人	饶微 孙普 李昀轩 刘望 杨雅丽 袁锦云 李婷华		
发明人	饶微 孙普 李昀轩 刘望 杨雅丽 袁锦云 李婷华		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/532 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/74 G01N2333/595		
代理人(译)	刘烽		
其他公开文献	CN104614536B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种用于检测胃泌素-17的试剂盒及其制备方法，所述试剂盒包括组分A和组分B，其中组分A为标记有示踪标记物或包被磁球的第一抗胃泌素-17抗体，组分B为包被磁球或标记有示踪标记物的第二抗胃泌素-17抗体或胃泌素-17；并且组分A和组分B中的任意一种标记有示踪标记物，另一种则包被磁球；所述第一抗胃泌素-17抗体和第二抗胃泌素-17抗体与胃泌素-17的结合位点不同。本发明提供了一种检测胃泌素-17的方法，利用本发明提供的试剂盒，根据双抗体夹心法原理或竞争法原理，准确、灵敏地测定样本中的胃泌素-17含量。

配制浓度 (pmol/l)	实施例1 (pmol/l)	实施例2 (pmol/l)	实施例3 (pmol/l)	实施例4 (pmol/l)	实施例5 (pmol/l)	实施例6 (pmol/l)	实施例7 (pmol/l)	实施例8 (pmol/l)	实施例9 (pmol/l)	实施例10 (pmol/l)	对比例1 (pmol/l)
0	0.165	0.341	0.352	0.349	0.331	0.465	0.478	0.452	0.589	0.612	0.756
5	4.963	5.561	5.564	5.574	5.561	5.817	5.874	5.963	6.189	6.209	6.75
10	10.09	11.52	10.98	11.06	10.86	11.56	11.49	11.60	12.19	12.79	13.54
20	19.94	19.86	19.62	20.54	20.64	19.72	19.63	19.87	19.80	19.65	19.86
40	40.27	41.89	42.03	38.87	39.47	38.12	41.69	41.87	40.87	41.52	37.61
80	79.24	77.23	82.48	78.36	79.04	82.69	83.47	83.97	80.79	85.87	72.86
100	100.58	96.47	96.12	96.47	97.7	93.4	92.4	92.1	91.65	90.87	86.97
200	198.5	193.4	193.7	192.8	193.7	189.2	187.3	188.7	176.9	174.7	138.9
300	295.7	290.6	290.7	289.7	290.4	267.4	266.3	260.7	207.8	201.6	197.6
500	493.7	483.5	481.7	484.7	483.7	456.8	455.7	432.1	359.7	349.7	286.4