



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112578122 B

(45) 授权公告日 2022.08.02

(21) 申请号 202011037290.9

(22) 申请日 2020.09.27

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112578122 A

(43) 申请公布日 2021.03.30

(66) 本国优先权数据
201910932036.6 2019.09.27 CN

(73) 专利权人 成都中医药大学
地址 610000 四川省成都市温江区柳台大道1166号

(72) 发明人 陆华 张琦 刘芊辰 廖睿

(74) 专利代理机构 成都高远知识产权代理事务所(普通合伙) 51222
专利代理师 李高峡 张娟

(51) Int.Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101213454 A, 2008.07.02

WO 2010062663 A1, 2010.06.03

CN 110208544 A, 2019.09.06

CN 103207274 A, 2013.07.17

CN 102639710 A, 2012.08.15

CN 105842459 A, 2016.08.10

陈琛等. 绵羊生殖道提取物生物活性物质检测.《中国抗生素杂志》.2010,(第02期),

审查员 李若琳

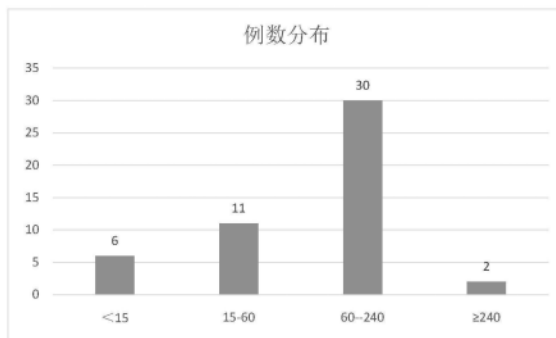
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

检测粪钙卫蛋白含量的试剂在制备畸形精子症筛查试剂盒中的用途

(57) 摘要

本发明提供了检测粪便中钙卫蛋白(粪钙卫蛋白)中含量的试剂在制备畸形精子症筛查试剂盒中的用途,属于疾病检测试剂盒领域。本发明通过对不同人群粪钙卫蛋白的含量的检测,发现该含量与畸形精子症关联显著,借助该原理开发出试剂盒,能够对畸形精子症进行快速、无创的筛查,应用前景良好。



1. 检测粪便中的钙卫蛋白的试剂在制备畸形精子症筛查试剂盒中的用途。
2. 如权利要求1所述的用途,其特征在於,所述检测粪便中的钙卫蛋白的试剂为:免疫组化检测方法用试剂、Western Blot检测方法用试剂、胶体金方法用试剂或ELISA检测方法用试剂。
3. 如权利要求1所述的用途,其特征在於:所述试剂还包括蛋白纯化试剂。
4. 如权利要求1-3任一所述的用途,其特征在於,若所述试剂盒检测到男性被检者粪便中钙卫蛋白含量大于正常男性,则该男性被检者患畸形精子症风险高。

检测粪钙卫蛋白含量的试剂在制备畸形精子症筛查试剂盒中的用途

技术领域

[0001] 本发明属于疾病筛查试剂盒领域。

背景技术

[0002] 钙卫蛋白最早由Fagerhol于1980年从中性粒细胞分离,并命名为L1蛋白,后因发现其结构中含有钙并有抗微生物的特性而命名,截至今日已有39年历史。1988年Wilkinson等根据此种抗原特征又命名为钙粒蛋白,Dorin和Freemont等进一步证实这些蛋白质具有S-100蛋白质的结构特征,后来将此种具有保护性的多种功能的与钙结合蛋白质命名为钙卫蛋白。

[0003] 钙卫蛋白是由S100钙结合蛋白家族中的S100A8和S100A9组成的异二聚体复合物,来源于中性细胞和巨噬细胞的钙-锌结合蛋白质,可在血清、体液或粪便中检测,已被确定为炎症性肠病IBD的标志物,目前可在炎症、肿瘤细胞和癌症人群中检测到钙卫蛋白(S100A8/S100A9)水平升高。

[0004] 粪钙卫蛋白(faecal calprotectin,FC)即粪便中的钙卫蛋白,有研究表明,检测粪便中粪钙卫蛋白含量可用于诊断溃疡性结肠炎和克罗恩病。

[0005] 但目前未见畸形精子症与钙卫蛋白的关系,更未见畸形精子症与粪便中钙卫蛋白(粪钙卫蛋白,faecal calprotectin,FC)的关系。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供检测粪钙卫蛋白含量的试剂在制备畸形精子症筛查试剂盒中的用途,以及一种新的畸形精子症筛查试剂盒。

[0007] 本发明的技术方案包括:

[0008] 检测粪便中的钙卫蛋白的试剂在制备畸形精子症筛查试剂盒中的用途。

[0009] 如前述的用途,所述检测粪便中的钙卫蛋白的试剂为:免疫组化检测方法用试剂、Western Blot检测方法用试剂、胶体金方法用试剂或ELISA检测方法用试剂。

[0010] 如前述的用途,所述试剂还包括蛋白纯化试剂。

[0011] 如前述的用途,若所述试剂盒检测到男性被检者粪便中钙卫蛋白含量大于正常男性,则该男性被检者患畸形精子症风险高。

[0012] 一种畸形精子症筛查试剂盒,所述试剂盒包括检测粪便中钙卫蛋白的试剂。

[0013] 如前述的试剂盒,所述检测粪便中的钙卫蛋白的试剂为:免疫组化检测方法用试剂、Western Blot检测方法用试剂、胶体金方法用试剂或ELISA检测方法用试剂。

[0014] 如前述的试剂盒,它还包括蛋白纯化试剂。

[0015] 如前述的试剂盒,所述试剂盒检测到男性被检者粪便中钙卫蛋白含量大于正常男性,则该男性被检者患畸形精子症风险高。

[0016] 本发明通过对不同人群粪钙卫蛋白的含量的检测,发现该含量与畸形精子症关联

显著,借助该原理开发出试剂盒,能够对畸形精子症进行快速、无创的筛查,应用前景良好。

[0017] 显然,根据本发明的上述内容,按照本领域的普通技术知识和惯用手段,在不脱离本发明上述基本技术思想前提下,还可以做出其它多种形式的修改、替换或变更。

[0018] 以下通过实施例形式的具体实施方式,对本发明的上述内容再作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

附图说明

[0019] 图1:各类畸形精子症的患者中粪钙卫蛋白含量分布区间统计。

[0020] 附图中,FC指粪钙卫蛋白。

具体实施方式

[0021] 实施例1本发明筛查试剂盒(ELISA)

[0022] 1. 组成

[0023] (1) 预包被板:孔内壁及底部包被了抗人钙卫蛋白兔IgG抗体的九十六孔板。

[0024] (2) 酶标抗体:(30倍浓缩)HRP标记抗人钙卫蛋白兔IgG抗体。

[0025] (3) 标准品:钙卫蛋白。

[0026] (4) 缓冲液:含1%BSA、0.05%吐温20的PBS。

[0027] (5) 显色剂:TMB底物液。

[0028] (6) 终止液:1N硫酸。

[0029] 2. 样本制备

[0030] (1) 使用样本采样专用粘附器采集标本,将大便排在展开的粘附器中央,注意大便不能沾到尿液、血液、厕水、厕纸等污染物;

[0031] (2) 用取样棒插进粪便样本,然后将取样棒放回装有样本稀释液的粪便采样管内,旋紧、摇匀,以上动作重复3次;

[0032] (3) 每次在同一粪便样本的多个不同部点进行取样,总取样量约50mg(近似火柴头大小);

[0033] (4) 旋紧取样管,摇匀待用;

[0034] (5) 若腹泻患者,用一次性吸管吸取稀薄粪便,采集约100uL(3滴)至粪便采样管中,充分摇匀待用,尽快进行检测。

[0035] 3. 使用

[0036] (1) 将样本(标准品)0.1mL加入预包被板孔内,37℃孵育30min,倒掉孔内液体,拍打3次,减少液体附着;

[0037] (2) 加0.15mL缓冲液洗涤未结合到预包被板的蛋白,重复5次;

[0038] (3) 加入酶标抗体0.1mL,37℃孵育30min,倒掉酶标抗体,加0.15mL缓冲液洗涤5次;

[0039] (4) 加显色剂0.1mL,37℃孵育10min;

[0040] (5) 加终止液0.05mL;

[0041] (6) 结果判定:肉眼观察颜色深浅,颜色越深,阳性程度越强;或测OD值(450nm)。

[0042] 可提前用梯度稀释标准品按前述步骤制备标准曲线,并在正式检测样本时调整样本浓度,使浓度落在线性区间(浓度与OD值的曲线)内。

[0043] 本发明的筛查试剂盒还可以按如下方法制备得到:

[0044] 将任意商用蛋白检测试剂盒中对应的蛋白标准品换成钙卫蛋白溶液,将抗体替换成抗钙卫蛋白抗体即可。

[0045] 实施例2畸形精子症与粪钙卫蛋白(FC)的含量关系

[0046] 发明人于2019.06-2020.09对成都中医药大学附属医院门诊就诊的49名畸形精子症患者(正常精子率 $<4\%$)进行了粪钙卫蛋白检测(使用厦门为正生物科技股份有限公司的钙卫蛋白检测试剂盒(胶体金法))。

[0047] 检测方法如下:

[0048] 1. 患者检测前准备

[0049] (1) 第一次检测患者必须在服药、灌肠前采集检测样本;

[0050] (2) 复查患者需在停药至少24小时后采样;

[0051] (3) 采样前24小时饮食最好与平日饮食相似,避免暴饮暴食或服用过多辛辣刺激类食物,禁止饮酒;

[0052] (4) 采样前一晚不可熬夜(保证睡眠时长 ≥ 6 个小时);

[0053] (5) 月经经期时不宜进行采样;

[0054] (6) 条件若允许尽量采集患者清晨第一次排便的粪便标本进行检测;

[0055] (7) 不能按照采样要求进行采样的患者不宜进行检测。

[0056] 2. 样本采集与检测

[0057] (1) 使用样本采样专用粘附器采集标本,将大便排在展开的粘附器中央,注意大便不能沾到尿液、血液、厕水、厕纸等污染物;

[0058] (2) 用取样棒插进粪便样本,然后将取样棒放回装有样本稀释液的粪便采样管内,旋紧、摇匀,以上动作重复3次;

[0059] (3) 每次在同一粪便样本的多个不同部点进行取样,总取样量约50mg(近似火柴头大小);

[0060] (4) 旋紧取样管,摇匀待用;

[0061] (5) 若腹泻患者,用一次性吸管吸取稀薄粪便,采集约100 μ L(3滴)至粪便采样管中,充分摇匀待用,尽快进行检测;

[0062] (6) 将配套的检测卡从铝箔袋中取出,做好标记并平放于水平工作台上;

[0063] (7) 将采样管帽盖旋开,弃掉头两滴稀释样本,在检测卡加样孔中心缓慢、垂直的滴加100 μ L(3滴)无气泡稀释标本,将检测卡插入粪钙卫蛋白检测仪,并开始计时;

[0064] (8) 在10-15min内进行结果判读,15min后检验结果无效。

[0065] 结果显示:以FC含量 $\geq 15\mu\text{g/g}$ 为阳性(FC阳性)。49例畸形精子症男性患者,平均年龄 38.486 ± 8.224 岁,FC $< 15\mu\text{g/g}$ 者6例,占12.24%;FC $\geq 15\mu\text{g/g}$ 者43例,占93.47%(表1), $\geq 60\mu\text{g/g}$ 者11例,占比22.448%,最高值达730 $\mu\text{g/g}$,阳性者钙卫值 $88.864 \pm 70.739\mu\text{g/g}$ (表2)。其中升高的FC值主要集中在60-240 $\mu\text{g/g}$ 区间(如图1),共30例,占比61.224%。以32例健康男性(排除了畸形精子症的男性)对照,平均年龄 35.355 ± 8.122 岁,FC $< 15\mu\text{g/g}$ 的有24个,占75%,FC $\geq 15\mu\text{g/g}$ 有8个,阳性者钙卫值(23.813 ± 8.306) $\mu\text{g/g}$ (表2),两组FC阳性值差

异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

[0066] 表1 男性畸形精子症FC阳性率 (FC含量 $\geq 15\mu\text{g/g}$)

[0067]		频率	百分比 (%)
	阳	43	93.47
	阴	6	6.53
	合计	49	100.0

[0068] 表2 FC阳性的男性畸形精子症与健康男性比较

		年龄 (岁)	FC ($\mu\text{g/g}$)
[0069]	畸形精子症	38.486 ± 8.224	88.864 ± 70.739
	健康男性	35.355 ± 8.122	23.813 ± 8.306

[0070] 从全局考虑 (包括 $\text{FC} < 15\mu\text{g/g}$ 和 $\text{FC} \geq 15\mu\text{g/g}$ 的情形), 健康男性和畸形精子症患者FC均值会均会因为FC阴性 ($\text{FC} < 15\mu\text{g/g}$) 部分数据拉低。但健康男性的 $\text{FC} < 15\mu\text{g/g}$ 的比例明显大于畸形精子症患者, 健康男性的FC均值会FC阴性部分数据拉得更低, 健康男性和畸形精子症患者FC值的差异会更大。可见, 健康男性和畸形精子症患者FC值从全局看, 差异非常显著, 可以通过FC值区分健康男性和畸形精子症患者。

[0071] 本实施例表明, 畸形精子症患者FC含量显著高于健康男性, FC含量高的男性患有畸形精子症的风险较高。

[0072] 综上, 畸形精子症与粪便中钙卫蛋白相关, 本发明的试剂盒可通过对粪便样本中钙卫蛋白的检测, 快速筛查畸形精子症。

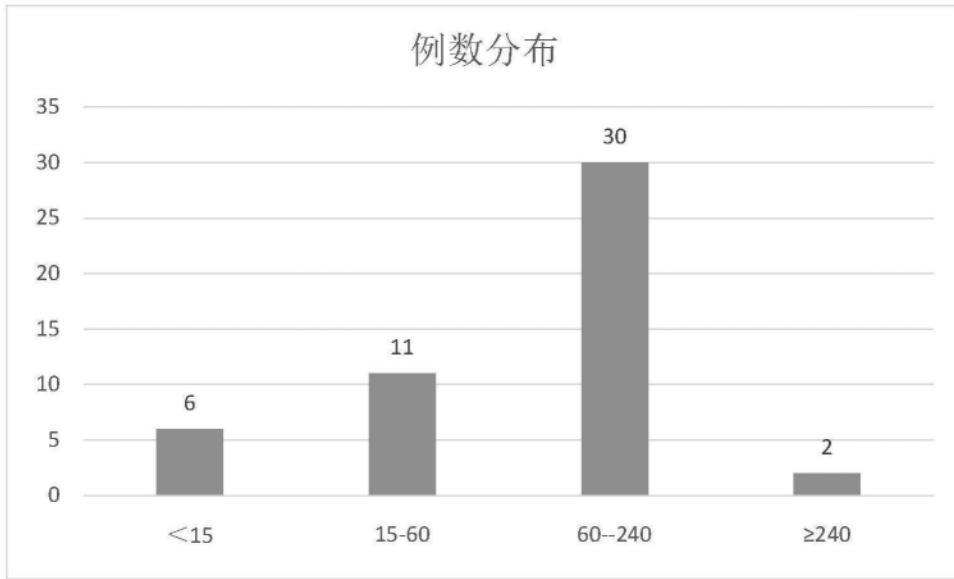


图1