



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112578123 B

(45) 授权公告日 2022.10.25

(21) 申请号 202011037337.1
 (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 112578123 A
 (43) 申请公布日 2021.03.30
 (66) 本国优先权数据
 201910937485.X 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 王通 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)
 (56) 对比文件
 CN 110488025 A, 2019.11.22
 CN 101334410 A, 2008.12.31
 CN 103103264 A, 2013.05.15
 CN 110042156 A, 2019.07.23
 CN 104114686 A, 2014.10.22
 AU 2004303448 A1, 2005.07.07
 US 2012021442 A1, 2012.01.26

CA 3101184 A1, 2019.11.28
 EP 2382466 A1, 2011.11.02
 US 2011129860 A1, 2011.06.02
 蒋秋林 等. S100A8/A9在炎症和肿瘤中的应用及作用机制研究进展.《中国现代医药杂志》. 2011, 第13卷(第09期), 第125-127页.
 李启佳 等. “右归丸鼠血清恢复冻融小鼠卵巢的功能”.《中成药》. 2015, 第37卷(第01期),
 Fatemeh Nemati Nikoo 等. “Plasma calprotectin concentrations in women with endometrial carcinoma”.《Biotech Health Sci.》. 2014, 第1卷(第3期),
 刘丹 等. “非感染性炎症与妊娠并发症”.《中华产科急救电子杂志》. 2017, 第6卷(第04期),
 Li Feng 等. “Comparison of the different kinds of feeding on the level of fecal calprotectin”.《EARLY HUMAN DEVELOPMENT》. 2014, 第90卷(第9期),
 Günther A. Rezniczek 等. “Calprotectin in pregnancy and pregnancy-associated diseases: a systematic review and prospective cohort study”.《Archives of Gynecology and Obstetrics》. 2019, 第299卷

审查员 石维平

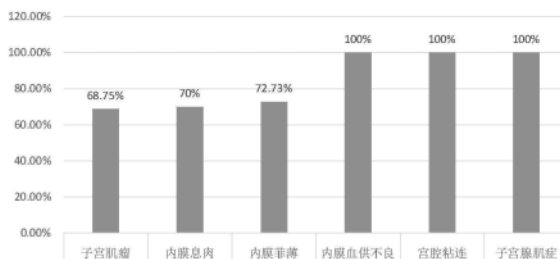
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

检测粪钙卫蛋白含量的试剂在制备子宫病变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子宫病变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,发现该含量与子宫病变关联显著,借助该原理开发出试剂盒,能够对子宫病变进行快速、无创的筛查,应用前景良好。



CN 112578123 B

1. 检测粪便中的钙卫蛋白的试剂在制备子宫病变筛查试剂盒中的用途, 其特征在于, 所述子宫病变为子宫肌瘤、内膜息肉、黄体中期内膜菲薄、黄体中期内膜血供不良、宫腔粘连和/或子宫腺肌症。

2. 如权利要求1所述的用途, 其特征在于, 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, 其特征在于: 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, 其特征在于, 若所述试剂盒检测到女性被检者粪便中钙卫蛋白含量高于正常女性, 则女性被检者患子宫病变的风险高。

检测粪钙卫蛋白含量的试剂在制备子宫病变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] 但目前未见子宫病变与钙卫蛋白的关系,更未见子宫病变与粪便中钙卫蛋白的关系。

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子宫病变筛查试剂盒中的用途,以及一种新的子宫病变筛查试剂盒。

[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子宫病变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,所述子宫病变为子宫肌瘤、内膜息肉、黄体中期内膜菲薄、黄体中期内膜血供不良、宫腔粘连和/或子宫腺肌症。

[0012] 如前述的用途,若所述试剂盒检测到女性被检者粪便中钙卫蛋白含量高于正常女性,则女性被检者患子宫病变的风险高。

[0013] 一种子宫病变筛查试剂盒,所述试剂盒包括检测粪便中钙卫蛋白的试剂。

[0014] 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FLISA检测方法用试剂。

[0015] 如前述的试剂盒,它还包括蛋白纯化试剂。

[0016] 如前述的试剂盒,所述子宫病变为子宫肌瘤、内膜息肉、黄体中期内膜菲薄、黄体

中期内膜血供不良、宫腔粘连和/或子宫腺肌症。

[0017] 如前述的试剂盒,若所述试剂盒检测到女性被检者粪便中钙卫蛋白含量高于正常女性,则女性被检者患子宫病变的风险高。

[0018] 本发明通过对不同人群粪钙卫蛋白的含量的检测,发现该含量与子宫病变关联显著,借助该原理开发出试剂盒,能够对子宫病变进行快速、无创的筛查,应用前景良好。

[0019] 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。

[0020] 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

[0021] 图1:各类子宫病变的患者中粪钙卫蛋白大于15ug/g的比例。

[0022] 图2:各类子宫病变的患者中粪钙卫蛋白大于等于60ug/g的比例。

[0023] 图3:各类子宫病变的患者中粪钙卫蛋白含量分布区间统计。

[0024] 图4:子宫病变的患者中粪钙卫蛋白含量分布区间统计。

[0025] 附图中,FC指粪钙卫蛋白。

具体实施方式

[0026] 实施例1本发明筛查试剂盒(ELISA)

[0027] 1.组成

[0028] (1)预包被板:孔内壁及底部包被了抗人钙卫蛋白兔1gG抗体的九十六孔板。

[0029] (2)酶标抗体:(30倍浓缩)HRP标记抗人钙卫蛋白兔1gG抗体。

[0030] (3)标准品:钙卫蛋白。

[0031] (4)缓冲液:含1%BSA、0.05%吐温20的PBS。

[0032] (5)显色剂:TMB底物液。

[0033] (6)终止液:1N硫酸。

[0034] 2.样本制备

[0035] (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;

[0036] (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;

[0037] (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);

[0038] (4)旋紧取样管,摇匀待用;

[0039] (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。

[0040] 3.使用

[0041] (1)将血清样本(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;

[0042] (2) 加0.15mL缓冲液洗涤未结合到预包被板的蛋白,重复5次;

[0043] (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;

[0044] (4) 加显色剂0.1mL,37℃孵育10min;

[0045] (5) 加终止液0.05mL;

[0046] (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)。

[0047] 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。

[0048] 本发明的筛查试剂盒还可以按如下方法制备得到:

[0049] 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。

[0050] 实施例2子宫病变与粪钙卫蛋白(FC)的含量关系

[0051] 发明人于2019.06-2019.09对成都中医药大学附属医院门诊就诊的部分不孕症患者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)),其中,子宫病变的患者50例(子宫肌瘤16例,内膜息肉10例,黄体中期内膜菲薄(简称“内膜菲薄”)11例,黄体中期内膜血供不良(简称“内膜血供不良”)2例,宫腔粘连5例,子宫腺肌症6例)。同时,以健康成年女性为对照。

[0052] 检测方法如下:

[0053] 1. 患者检测前准备

[0054] (1) 第一次检测患者必须在服药、灌肠前采集检测样本;

[0055] (2) 复查患者需在停药至少24小时后采样;

[0056] (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;

[0057] (4) 采样前一晚不可熬夜(保证睡眠时长 ≥ 6 小时);

[0058] (5) 月经经期时不宜进行采样;

[0059] (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;

[0060] (7) 不能按照采样要求进行采样的患者不宜进行检测。

[0061] 2. 样本采集与检测

[0062] (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;

[0063] (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;

[0064] (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);

[0065] (4) 旋紧取样管,摇匀待用;

[0066] (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;

[0067] (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;

[0068] (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100uL (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;

[0069] (8) 在10-15min内进行结果判读,15min后检验结果无效。

[0070] 结果如下:

[0071] 以具体子宫病变类型区分:子宫病变阳性率(如图1、图2):以 $FC > 15\mu\text{g/g}$ 为阳性预测值,FC阳性的子宫内膜息肉患者7例,阳性率为70%;FC阳性的子宫肌瘤患者11例,阳性率为68.75%;FC阳性内膜菲薄患者8例,阳性率为72.73%;FC阳性的内膜血供不良患者2例,阳性率100%;FC阳性的宫腔粘连患者5例,阳性率100%;FC阳性的子宫腺肌症患者5例,阳性率100%。以 $FC \geq 60\mu\text{g/g}$ 为阳性预测值,FC阳性的子宫内膜息肉患者1例,阳性率为12.5%;FC阳性的子宫肌瘤患者3例,阳性率为18.75%;FC阳性内膜菲薄患者1例,阳性率为9.09%;FC阳性的内膜血供不良患者1例,阳性率50%;FC阳性的宫腔粘连患者4例,阳性率80%;FC阳性的子宫腺肌症患者4例,阳性率80%。

[0072] 子宫病变FC值分布区间如图3所示。23例子宫病变患者的FC值主要集中于15-60 $\mu\text{g/g}$ 区间,其FC阳性最低值15.7(子宫肌瘤),最高值613 $\mu\text{g/g}$ (内膜菲薄)。目前所收集到子宫肌瘤患者FC阳性最低值15.7 $\mu\text{g/g}$,最高值404 $\mu\text{g/g}$;内膜息肉患者FC阳性最低值15.7 $\mu\text{g/g}$,最高值193.1 $\mu\text{g/g}$;内膜菲薄患者FC阳性最低值18.1 $\mu\text{g/g}$,最高值613 $\mu\text{g/g}$;子宫腺肌病患者FC阳性最低值25 $\mu\text{g/g}$,最高值487 $\mu\text{g/g}$;内膜血供不良患者FC阳性最低值23.2 $\mu\text{g/g}$,最高值108.3 $\mu\text{g/g}$;宫腔粘连患者FC阳性最低值51 $\mu\text{g/g}$,最高值340 $\mu\text{g/g}$ 。

[0073] 如果以FC含量 $\geq 15\mu\text{g/g}$ 为阳性。40名健康女性年龄(31.272 ± 6.604)岁,其中钙卫蛋白 $FC < 15$ 的有28名, $FC \geq 15$ 的有12名,阳性FC值最高56 $\mu\text{g/g}$,阳性者FC含量(34.927 ± 9.134) $\mu\text{g/g}$;子宫病变患者45名,年龄(38.545 ± 6.105)岁, $FC < 15$ 的子宫病变患者8名,而 $FC \geq 15$ 的有37名阳性率82.22%(图4);阳性者FC含量(81.609 ± 66.3629) $\mu\text{g/g}$,两组FC阳性值差异具有统计学意义($P < 0.05$)。具体如表1和表2所示。

[0074] 表1子宫病变FC阳性率(FC含量 $\geq 15\mu\text{g/g}$)

	频率	百分比 (%)
[0075] 阳	37	82.22
阴	8	17.78
合计	45	100.0

[0076] 表2 FC阳性的子宫病变与健康女性比较

	年龄 (岁)	FC ($\mu\text{g/g}$)
[0077] 子宫病变	38.545 ± 6.105	81.609 ± 66.362
健康女性	31.272 ± 6.604	34.927 ± 9.134

[0078] 从全局考虑(包括 $FC < 15\mu\text{g/g}$ 和 $FC \geq 15\mu\text{g/g}$ 的情形),健康女性和子宫病变患者FC均值会均会因为FC阴性($FC < 15\mu\text{g/g}$)部分数据拉低。但健康女性的 $FC < 15\mu\text{g/g}$ 的比例明显

大于子宫病变患者,健康女性的FC均值会FC阴性部分数据拉得更低,健康女性和子宫病变患者FC值的差异会更大。可见,健康女性和子宫病变患者FC值从全局看,差异非常显著,可以通过FC值区分健康女性和子宫病变患者的女性。

[0079] 本实施例表明,子宫病变患者FC含量显著高于健康女性,FC含量高的女性患有子宫病变的风险较高。

[0080] 综上,子宫病变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,快速筛查子宫病变,判断目标人群子宫病变的风险高低,若FC含量高,则风险高,若FC含量低,则风险低。

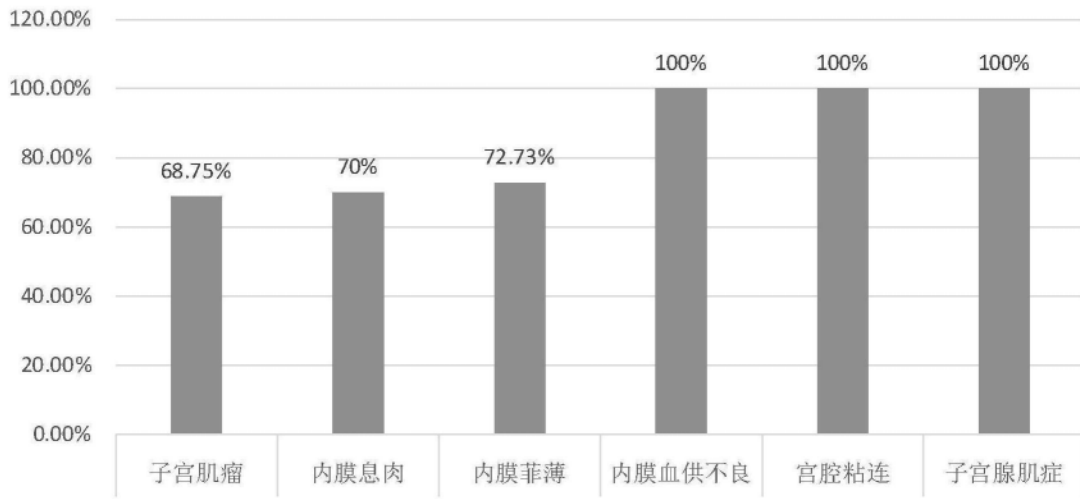


图1

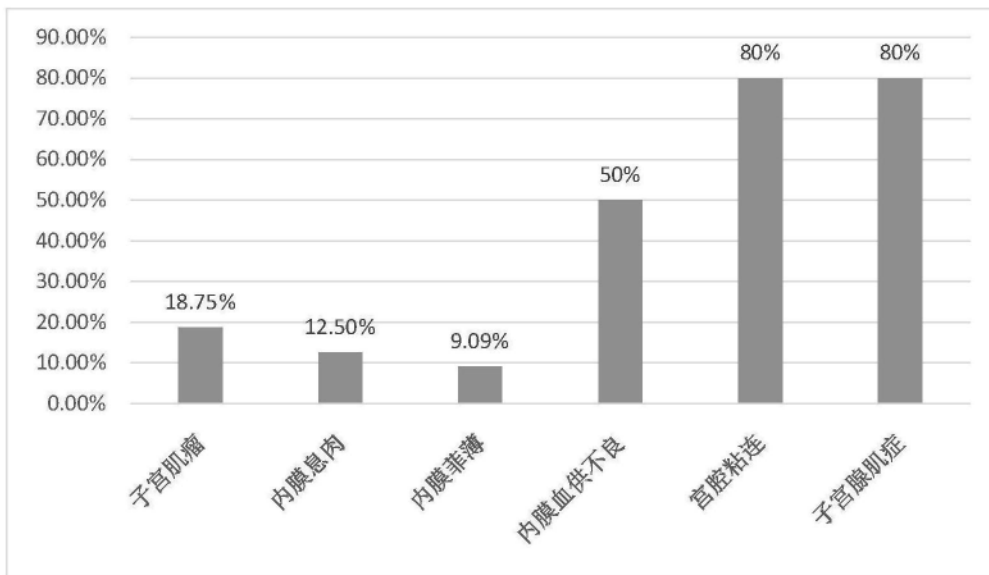


图2

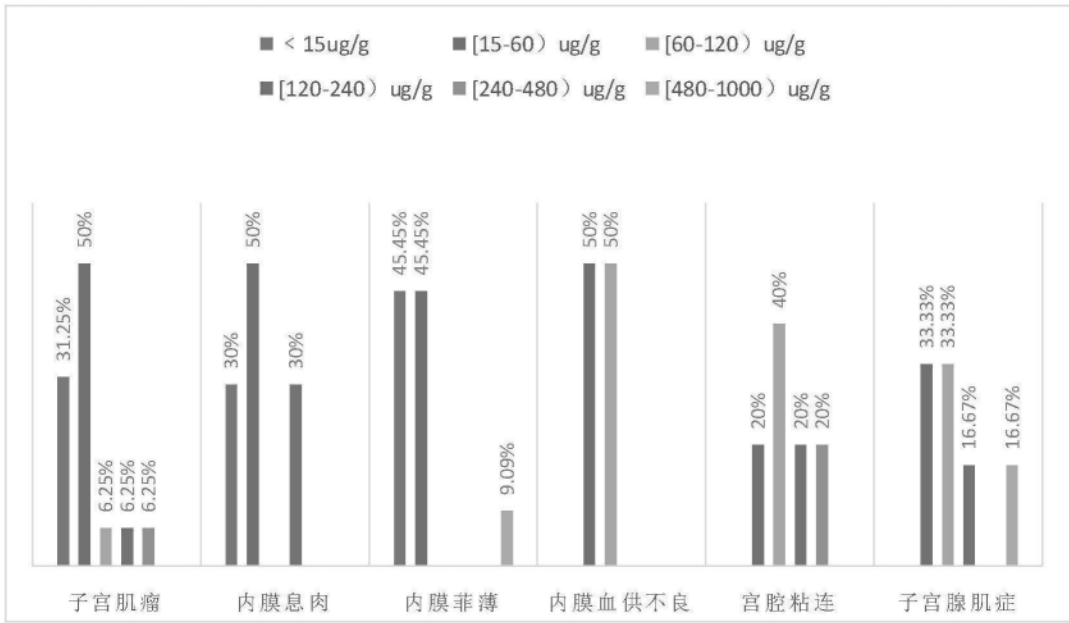


图3

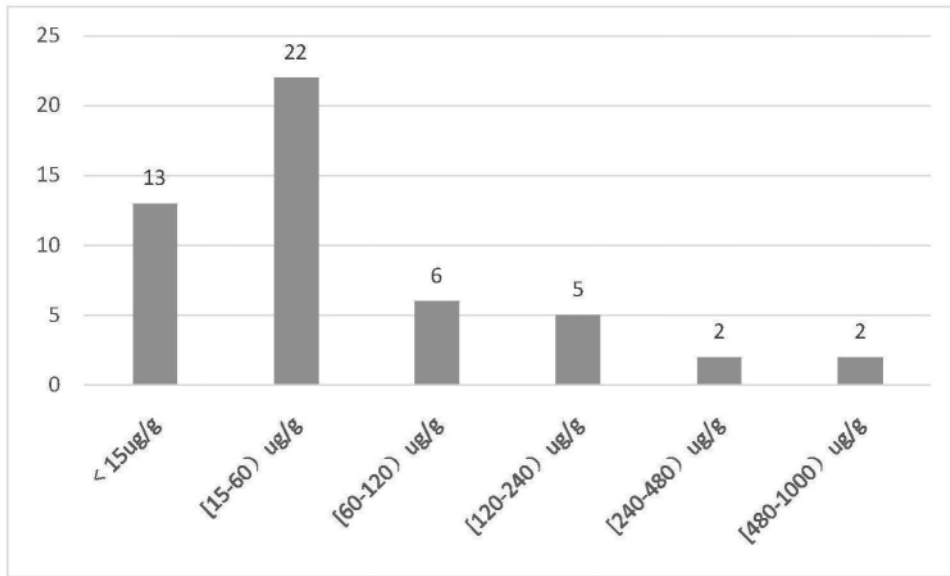


图4