



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110196334 A

(43)申请公布日 2019.09.03

(21)申请号 201910475000.X

(22)申请日 2019.06.03

(71)申请人 迪瑞医疗科技股份有限公司

地址 130103 吉林省长春市高新区宜居路
3333号

(72)发明人 高智玲 翟涛 高威 孙成艳
何浩会

(74)专利代理机构 长春众邦菁华知识产权代理
有限公司 22214

代理人 王莹

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

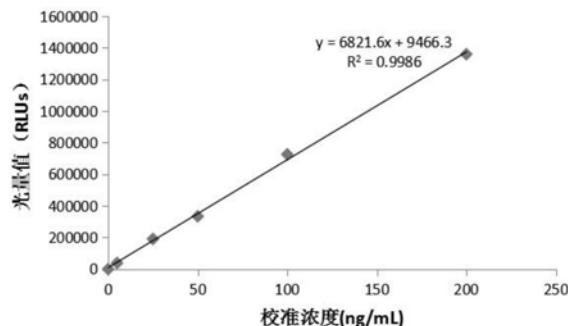
权利要求书2页 说明书14页 附图2页

(54)发明名称

血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂
盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种血栓调节蛋白化学发光免
疫定量检测试剂盒及其制备方法，属于免疫诊断
技术领域。解决了现有技术中血栓调节蛋白的方
法或是精准度底，或是操作复杂、测试结果不稳
定的技术问题。本发明的血栓调节蛋白化学发光
免疫定量检测试剂盒，包括R1试剂、R2试剂和R3
试剂；其中，R1试剂包括链霉亲和素磁颗粒和缓
冲液I，R2试剂包括化学发光标记物标记的血栓
调节蛋白单克隆抗体和缓冲液I，R3试剂包括偶
联标记的血栓调节蛋白单克隆抗体和缓冲液I。
该试剂盒采用化学发光免疫分析法对血栓调节
蛋白进行检测，具有检测灵敏度高，定量检测准
确，操作简单，无放射性风险及检测时间短，并且
可以对抗原、抗体类目标物质进行检测的优点。



1. 血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒，其特征在于，包括R1试剂、R2试剂和R3试剂；

所述R1试剂包括链霉亲和素磁颗粒和缓冲液I，R1试剂中链霉亲和素磁颗粒的浓度为0.007%～1%；

所述R2试剂包括化学发光标记物标记的血栓调节蛋白单克隆抗体和缓冲液I，R2试剂中化学发光标记物标记的血栓调节蛋白单克隆抗体的浓度为0.1～2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；

所述R3试剂包括偶联标记的血栓调节蛋白单克隆抗体和缓冲液I，R3试剂中偶联标记的血栓调节蛋白单克隆抗体的浓度为0.7～4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2. 根据权利要求1所述的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒，其特征在于，所述链霉亲和素磁颗粒的粒径是0.05～1 μm 。

3. 根据权利要求1所述的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒，其特征在于，所述化学发光标记物标记的血栓调节蛋白单克隆抗体中，血栓调节蛋白单克隆抗体与化学发光标记物的标记的摩尔比为1:(3～20)；化学发光标记物为鲁米诺、异鲁米诺、三联吡啶钌或吖啶酯。

4. 根据权利要求1所述的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒，其特征在于，所述偶联标记的血栓调节蛋白单克隆抗体中，血栓调节蛋白单克隆抗体与偶联标记物的标记摩尔比为1:(5～20)；偶联标记物为生物素。

5. 根据权利要求1所述的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒，其特征在于，所述缓冲液I为含有50～200mM的吗啉乙磺酸(MES)、bistris丙烷、柠檬酸或磷酸盐，0.05%～0.1%的稳定剂和0.01～0.1%的防腐剂的pH为6.0～6.5的缓冲液。

6. 根据权利要求5所述的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒，其特征在于，所述稳定剂为吐温；所述防腐剂为NaN₃或ProClin300。

7. 根据权利要求1所述的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒，其特征在于，该试剂盒中还包括血栓调节蛋白校准品；所述血栓调节蛋白校准品包括浓度分别为0ng/mL、5ng/mL、25ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL的血栓调节蛋白溶液。

8. 根据权利要求1所述的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒，其特征在于，该试剂盒中还包括化学发光预激发液A和化学发光激发液B；所述化学发光激发液A为过氧化氢和硝酸溶液；所述化学发光激发液B为氢氧化钠溶液。

9. 根据权利要求1所述的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒，其特征在于，该试剂盒中还包括清洗液；所述清洗液为磷酸缓冲液。

10. 权利要求1～9任何一项所述的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

步骤一、制备R1试剂

将链霉亲和素磁颗粒溶液加入TBST溶液中，充分混匀后，放置于磁分离器上，直至上清无混浊，弃上清，留取磁颗粒，使用缓冲液I清洗磁颗粒后，再用缓冲液I配成磁颗粒浓度为0.007%～1%的固相试剂，即为R1试剂；

步骤二、制备R2试剂

先将血栓调节蛋白单克隆抗体放入离心管中，保证血栓调节蛋白单克隆抗体位于离心管底部位置后加入碳酸缓冲液，充分混匀，混匀后加入化学发光标记物的N,N-二甲基甲酰

胺(DMF)溶液,用离心机室温条件下离心;

然后将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,将暗盒放入气浴恒温振荡器中混匀,加入赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器中混匀,封闭0.5~1h;

再将封闭好的血栓调节蛋白单克隆抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用磷酸缓冲液洗脱,分别收集;

最后将收集好的血栓调节蛋白单克隆抗体溶液用缓冲液I稀释至终浓度为0.1~2.0 μ g/mL,即为R2试剂;

步骤三、制备R3试剂

取血栓调节蛋白单克隆抗体,用pH为6.0~6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入已活化的长链碘化生物素,2~8℃反应1~2h,再转入室温继续反应30~40min,最后加入赖氨酸反应30~40min,反应液脱盐柱纯化,加入缓冲液I稀释至终浓度为0.7~4.0 μ g/ml,即为R3试剂。

血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫诊断技术领域,具体涉及一种血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 血栓调节蛋白 (Thrombomodulin, TM) 是一种单链糖蛋白,相对分子质量75000,降解二硫键后相对分子质量为105000。由巨核细胞和内皮细胞合成,广泛分布于血管内皮细胞表面,亦存在于胎盘滋养层细胞、血小板、巨核细胞、单核细胞、中性粒细胞、滑液层细胞、角化细胞、脑膜细胞、平滑肌细胞、肿瘤细胞。TM是凝血酶活化蛋白C的辅助因子。与凝血酶结合后可降低凝血酶的凝血活性,而加强其激活蛋白C的活性。由于被激活的蛋白C具有抗凝作用,因此,TM是使凝血酶由促凝转向抗凝的重要的血管内凝血抑制因子。

[0003] TM在调节血栓形成过程中作用是极其复杂的,它在不同水平通过不同机制调节机体凝血与抗凝血的平衡,并可作为细胞黏附分子的一员,参与调控肿瘤细胞的增生和侵袭。测定血栓调节蛋白活性对某些疾病的诊断治疗有一定的意义,升高:见于糖尿病、弥散性血管内凝血、系统性红斑狼疮、急性心肌梗死、原发性血小板减少性紫癜、脑血栓等。糖尿病酮症酸中毒患者血浆TM大幅度升高,除血管内皮损伤外,还可能与肾功能异常,中性粒细胞增高及其释放产物影响内皮细胞有关。

[0004] 现有技术中,测定血栓调节蛋白的方法主要是联免酶疫吸附法(EIA) 和放射免疫分析法(RIA)。但二者在实际应用中都均存在一些固有缺陷,其中,酶联免疫吸附法操作繁琐,且酶容易失活,结果受人为因素影响结果较大,难以精确定量。放射免疫分析法则有放射性污染,标记物的货架期短、操作复杂、测试结果不稳定,且所需仪器较昂贵。

[0005] 有鉴于此,有必要提供一种操作简单、精准定量、无污染、灵敏度高的血栓调节蛋白的方法。

发明内容

[0006] 本发明的目的是解决现有技术中血栓调节蛋白的方法或是精准度底,或是操作复杂、测试结果不稳定的技术问题,提供一种血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法。

[0007] 本发明解决上述技术问题采取的技术方案如下:

[0008] 本发明提供的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒,包括R1试剂、R2试剂和R3试剂;

[0009] 所述R1试剂包括链霉亲和素磁颗粒和缓冲液I,R1试剂中链霉亲和素磁颗粒的浓度为0.007%~1%;

[0010] 所述R2试剂包括化学发光标记物标记的血栓调节蛋白单克隆抗体和缓冲液I,R2试剂中化学发光标记物标记的血栓调节蛋白单克隆抗体的浓度为0.1~2.0 μ g/mL;

[0011] 所述R3试剂包括偶联标记的血栓调节蛋白单克隆抗体和缓冲液I,R3试剂中偶联

标记的血栓调节蛋白单克隆抗体的浓度为0.7~4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0012] 优选的是,所述链霉亲和素磁颗粒的粒径是0.05~1 μm 。

[0013] 优选的是,所述化学发光标记物标记的血栓调节蛋白单克隆抗体中,血栓调节蛋白单克隆抗体与化学发光标记物的标记的摩尔比为1:(3~20);化学发光标记物为鲁米诺、异鲁米诺、三联吡啶钌或吖啶酯,更优选为吖啶酯。

[0014] 优选的是,所述偶联标记的血栓调节蛋白单克隆抗体中,血栓调节蛋白单克隆抗体与偶联标记物的标记摩尔比为1:(5~20);偶联标记物为生物素。

[0015] 优选的是,所述缓冲液I为含有50~200mM的吗啉乙磺酸(MES)、bistris丙烷、柠檬酸或磷酸盐,0.05%~0.1%的稳定剂和0.01~0.1%的防腐剂的pH为6.0~6.5的缓冲液。

[0016] 更优选的是,所述稳定剂为吐温。

[0017] 更优选的是,所述防腐剂为NaN₃或ProClin300。

[0018] 优选的是,该试剂盒中还包括血栓调节蛋白校准品;所述血栓调节蛋白校准品包括浓度分别为0ng/mL、5ng/mL、25ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL的血栓调节蛋白溶液。

[0019] 优选的是,该试剂盒中还包括化学发光预激发液A和化学发光激发液B;所述化学发光激发液A为过氧化氢和硝酸溶液;所述化学发光激发液B为氢氧化钠溶液。

[0020] 优选的是,该试剂盒中还包括清洗液;所述清洗液为磷酸缓冲液。

[0021] 本发明还提供上述血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0022] 步骤一、制备R1试剂

[0023] 将链霉亲和素磁颗粒溶液加入TBST溶液中,充分混匀后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒,使用缓冲液I清洗磁颗粒后,再用缓冲液I配成磁颗粒浓度为0.007%~1%的固相试剂,即为R1试剂;

[0024] 步骤二、制备R2试剂

[0025] 先将血栓调节蛋白单克隆抗体放入离心管中,保证血栓调节蛋白单克隆抗体位于离心管底部位置后加入碳酸缓冲液,充分混匀,混匀后加入化学发光标记物的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶液,用离心机室温条件下离心;

[0026] 然后将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,将暗盒放入气浴恒温振荡器中混匀,加入赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器中混匀,封闭0.5~1h;

[0027] 再将封闭好的血栓调节蛋白单克隆抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用磷酸缓冲液I洗脱,分别收集;

[0028] 最后将收集好的血栓调节蛋白单克隆抗体溶液用缓冲液I稀释至终浓度为0.1~2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,即为R2试剂;

[0029] 步骤三、制备R3试剂

[0030] 取血栓调节蛋白单克隆抗体,用pH为6.0~6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入已活化的长链碘化生物素,2~8°C反应1~2h,再转入室温继续反应30~40min,最后加入赖氨酸反应30~40min,反应液脱盐柱纯化,加入缓冲液I稀释至终浓度为0.7~4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$,即为R3试剂。

[0031] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0032] 本发明的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒采用化学发光免疫分析法对血栓调节蛋白进行检测，具有检测灵敏度高，定量检测准确，操作简单，无放射性风险及检测时间短，并且可以对抗原、抗体类目标物质进行检测的优点，具体来讲：

[0033] 1、本发明的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒采用顺磁性链霉亲和素磁颗粒微粒作为固相载体，其比表面积大，提高了检测的灵敏度；

[0034] 且本发明的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒与化学发光免疫检测仪器组成封闭系统，降低了人为操作的误差，进一步提高了整个系统的灵敏度与准确度；

[0035] 2、本发明的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒与检测样品所形成的抗原抗体复合物，稳定性佳，且分别由化学发光标记物(吖啶酯)标记的抗体及偶联标记(生物素标记)的抗体进行检测，增加了发光率的同时扩大了反应级，大大提高了试剂的特异性及检测速度，经验证，该试剂盒从检测到出结果只需20min；

[0036] 3、本发明的血栓调节蛋白化学发光免疫检测试剂盒可直接用于全自动生化分析仪上，无需大型仪器设备配合，成本低，且无放射性污染，可大规模的开展和推广。

附图说明

[0037] 图1为本发明实施例1的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒剂的反应校准曲线。

[0038] 图2为本发明实施例2的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒剂的反应校准曲线。

[0039] 图3为本发明实施例3的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒剂的反应校准曲线。

具体实施方式

[0040] 为了进一步理解本发明，下面结合实施例对本发明优选实施方案进行描述，但是应当理解，这些描述只是为进一步说明本发明的特征和优点，而不是对本发明权利要求的限制。

[0041] 本发明的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒，包括R1试剂、R2试剂和R3试剂，还可以包括血栓调节蛋白校准品、化学发光预激发液A、化学发光激发液B和清洗液。

[0042] 其中，R1试剂包括链霉亲和素磁颗粒和缓冲液I，R1试剂中链霉亲和素磁颗粒的浓度为0.007%~1%，链霉亲和素磁颗粒的粒径优选为0.05~1μm；

[0043] R2试剂含有化学发光标记物标记的血栓调节蛋白单克隆抗体和缓冲液I，R2试剂中化学发光标记物标记的血栓调节蛋白单克隆抗体的浓度为0.1~2.0μg/mL；化学发光标记物标记的血栓调节蛋白单克隆抗体中，血栓调节蛋白单克隆抗体与化学发光标记物的标记的摩尔比优选为1:(3~20)；化学发光标记物优选为鲁米诺、异鲁米诺、三联吡啶钌或吖啶酯，更优选为吖啶酯；

[0044] R3试剂包括偶联标记的血栓调节蛋白单克隆抗体和缓冲液I，R3试剂中偶联标记的血栓调节蛋白单克隆抗体的浓度为0.7~4.0μg/ml；偶联标记的血栓调节蛋白单克隆抗体中，血栓调节蛋白单克隆抗体与偶联标记物的标记摩尔比优选为1:(5~20)；偶联标记物优选为生物素；

[0045] 血栓调节蛋白校准品包括浓度分别为0ng/mL、5ng/mL、25ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL的血栓调节蛋白溶液；血栓调节蛋白校准品的溶剂优选含有0.1mol/L的PB、0.15mol/L的氯化钠、1%的牛血清白蛋白及0.05%的tween-20的pH为6.5的缓冲液。

[0046] 化学发光激发液A为过氧化氢和硝酸溶液；

[0047] 化学发光激发液B为氢氧化钠溶液；

[0048] 清洗液为磷酸缓冲液。

[0049] 上述技术方案中，缓冲液I中的I没有具体含义，仅因本申请涉及缓冲液较多，为了区分子其他缓冲液，故将R1试剂、R2试剂和R3试剂中的缓冲液命名为缓冲液I。缓冲液I优选为含有50~200mM的吗啉乙磺酸、bistris丙烷、柠檬酸或磷酸盐，0.05%~0.1%的稳定剂和0.01~0.1%的防腐剂的pH为6.0~6.5的缓冲液I；稳定剂优选为吐温，防腐剂优选为NaN₃或ProClin300。

[0050] 本发明还提供上述血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

[0051] 步骤一、制备R1试剂

[0052] 将链霉亲和素磁颗粒溶液加入TBST溶液中，充分混匀后，放置于磁分离器上，直至上清无混浊，弃上清，留取磁颗粒，使用缓冲液I清洗磁颗粒后，再用缓冲液I配成磁颗粒浓度为0.007%~1%的固相试剂，即为R1试剂；

[0053] 其中，链霉亲和素磁颗粒与TBST溶液的配比优选为50mg:10mL；一般清洗需重复清洗三次；R1试剂需在2~8℃保存。

[0054] 步骤二、制备R2试剂

[0055] 先将血栓调节蛋白单克隆抗体放入离心管中，保证血栓调节蛋白单克隆抗体位于离心管底部位置后加入碳酸缓冲液，充分混匀，混匀后加入化学发光标记物的DMF溶液，用离心机室温条件下离心0.5min；

[0056] 然后将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中，将暗盒放入气浴恒温振荡器中混匀，加入赖氨酸封闭液，放入气浴恒温振荡器中混匀，封闭0.5~1h；

[0057] 再将封闭好的血栓调节蛋白单克隆抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化，用磷酸缓冲液洗脱，分别收集；

[0058] 最后将收集好的血栓调节蛋白单克隆抗体溶液用缓冲液I稀释至终浓度为0.1~2.0μg/mL，即为R2试剂；

[0059] 其中，保证血栓调节蛋白单克隆抗体位于离心管底部采取的技术手段一般是使离心机室温离心20s；血栓调节蛋白单克隆抗体与化学发光标记物的标记摩尔比优选为1:(3~20)；气浴恒温振荡器的温度优选为25℃，气浴恒温振荡器中混匀一般需要4h，速度一般采用中速；赖氨酸封闭液的浓度为20%，其加入量与血栓调节蛋白单克隆抗体的配比为：1mL:500μg；R2试剂需在2~8℃保存。

[0060] 步骤三、制备R3试剂

[0061] 取血栓调节蛋白单克隆抗体，用pH为6.0~6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入已活化的长链碘化生物素，2~8℃反应1~2h，再转入室温继续反应30~40min，最后加入赖氨酸反应30~40min，反应液脱盐柱纯化，加入缓冲液I稀释至终浓度为0.7~4.0μg/ml，即为R3试剂；

[0062] 其中,血栓调节蛋白单克隆抗体与偶联标记物的标记摩尔比优选为1:(5~20)。

[0063] 步骤四、将R1试剂、R2试剂和R3试剂分别灌封于不同的试剂瓶,得到血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒。

[0064] 上述技术方案中,如包括校准品,还需先制备校准品,即将血栓调节蛋白用缓冲液分别配制成浓度为0ng/mL、5ng/mL、25ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL的校准品,等量分装成浓度分别为0ng/mL、5ng/mL、25ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL的6瓶校准品;

[0065] 缓冲液为含有0.1mol/L的PB、0.15mol/L的氯化钠、1%的牛血清白蛋白及0.05%的tween-20的pH为6.5的缓冲液,需2~8℃保存。

[0066] 本发明的血栓调节蛋白的化学发光免疫定量检测试剂盒的检测步骤如下:

[0067] 以全自动化学发光免疫分析仪(CM180)为检测工具,方法学为夹心法。即:先向仪器依次加入10μL的样本、50μL的R3试剂、50μL的R2试剂和40μL的R1试剂,反应20min后,进行磁分离;然后仪器将反应物送入暗室,一次性加入化学发光激发液A(HNO₃溶液)和化学发光激发液B(NaOH溶液)进行反应,最后记录光量子数。

[0068] 以下结合实施例进一步说明本发明。

[0069] 实施例1

[0070] 血栓调节蛋白的化学发光免疫定量检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0071] R1试剂制备:取浓度是100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒(粒径0.1μm)溶液0.5毫升(50mg)加入TBST溶液中,充分混匀后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒,使用缓冲液I清洗三次,清洗后,再用缓冲液I配成磁颗粒浓度为0.05%的固相试剂,即为R1试剂,2~8℃保存;

[0072] R2试剂制备:将500μg血栓调节蛋白单克隆抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入碳酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5μl 2mg/mL吖啶酯的DMF溶液,用离心机室温条件下离心0.5min;将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,之后将暗盒放入气浴恒温振荡器(25℃)中,混匀4h;加入1mL 20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封闭时间为1h。将封闭好的抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分别收集;将收集好的抗体溶液用缓冲液I稀释至终浓度为0.1μg/mL,即为R2试剂,2~8℃保存。

[0073] R3试剂制备:取0.5μg/ml血栓调节蛋白单克隆抗体,采用pH为6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入10倍摩尔比已活化的长链碘化生物素Sulfo-NHS-LC-Biotin,2~8℃反应2h,再转入室温继续反应30min,最后加入100倍摩尔比的赖氨酸反应30min,反应液用脱盐柱纯化,加入缓冲液I稀释至终浓度为0.7μg/ml。

[0074] R1、R2和R3试剂中,缓冲液I为含有50mM的吗啉乙磺酸、0.05%的吐温和0.05%的ProClin300的pH为6.5的缓冲液。

[0075] 实施例2

[0076] R1试剂制备:取浓度是100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒(粒径0.5μm)溶液0.5毫升(50mg)加入TBST溶液中,充分混匀后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒,使用缓冲液I清洗三次,清洗后,再用缓冲液I配成磁颗粒浓度为1%的固相试剂,即为R1试剂,2~8℃保存;

[0077] R2试剂制备:将500μg血栓调节蛋白单克隆抗体放入离心管中,保证抗体位于离心

管底部位置(离心机室温离心20s)后加入碳酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5 μ l 2mg/mL 叶啶酯的DMF溶液,用离心机室温条件下离心0.5min;将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,之后将暗盒放入气浴恒温振荡器(25℃)中,混匀2h;加入1mL 20% 赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封闭时间为1h。将封闭好的抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分别收集;将收集好的抗体溶液用缓冲液I稀释至终浓度为1.0 μ g/mL,即为R2试剂,2~8℃保存。

[0078] R3试剂制备:取1.5 μ g/ml血栓调节蛋白单克隆抗体,采用pH为6.0的TRIS缓冲液透析纯化后加入20倍摩尔比已活化的长链碘化生物素Sulfo-NHS-LC-Biotin,2~8℃反应2h,再转入室温继续反应30min,最后加入100倍摩尔比的赖氨酸反应30min,反应液用脱盐柱纯化,加入缓冲液I稀释至终浓度为4.0 μ g/ml,即为R3试剂。

[0079] R1、R2和R3试剂中,缓冲液I为含有100mM MES、0.05% 吐温和0.05% Proclin300的pH为6.0的缓冲液。

[0080] 实施例3

[0081] R1试剂制备:取浓度是100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒(粒径0.8 μ m)溶液0.5毫升(50mg)加入TBST溶液中,充分混匀后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒,使用缓冲液I清洗三次,清洗后,再用缓冲液I配成磁颗粒浓度为0.01%的固相试剂,即为R1试剂,2~8℃保存;

[0082] R2试剂制备:将500 μ g血栓调节蛋白单克隆抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入碳酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5 μ l 2mg/mL 叶啶酯的DMF溶液,用离心机室温条件下离心0.5min;将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,之后将暗盒放入气浴恒温振荡器(25℃)中,混匀3h;加入1mL 20% 赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封闭时间为1h。将封闭好的抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分别收集;将收集好的抗体溶液用缓冲液I稀释至终浓度为2.0 μ g/mL,即为R2试剂,2~8℃保存。

[0083] R3试剂制备:取2.0 μ g/ml血栓调节蛋白单克隆抗体,采用pH为6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入15倍摩尔比已活化的长链碘化生物素Sulfo-NHS-LC-Biotin,2~8℃反应2h,再转入室温继续反应30min,最后加入100倍摩尔比的赖氨酸反应30min,反应液用脱盐柱纯化,加入缓冲液I稀释至终浓度为1.0 μ g/ml。

[0084] R1、R2和R3试剂中,缓冲液I为含有200mM的吗啉乙磺酸、0.05%的吐温和0.1%的ProClin300pH为6.5的缓冲液。

[0085] 校准品制备:将血栓调节蛋白用缓冲液分别配制成浓度为0ng/mL、5ng/mL、25ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL的校准品,等量分装成浓度分别为0ng/mL、5ng/mL、25ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL的6瓶校准品;缓冲液为含有0.1mol/L的PB、0.15mol/L的氯化钠、1%的牛血清白蛋白及0.05%的tween-20的pH为6.5的缓冲液,校准品需2~8℃保存。

[0086] 对实施例1~3的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒的性能进行评价,该血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒的检测步骤如具体实施方式中所述。

[0087] 灵敏度的检测:参照《体外诊断试剂分析性能评估系列指导原则》,主校准品A为零浓度校准品,主校准品B为相邻校准品;测试主校准品A,重复20次;测试主校准品B,重复2

次,检测结果如表1所示。

[0088] 表1 实施例1的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒的灵敏度检测结果

[0089]

测定次数	主校准品 A	主校准品 B
Rep1	69	39523
Rep2	107	39723
Rep3	99	
Rep4	54	
Rep5	57	
Rep6	79	
Rep7	81	
Rep8	71	
Rep9	77	
Rep10	88	
Rep11	91	
Rep12	102	
Rep13	85	
Rep14	49	
Rep15	91	
Rep16	73	
Rep17	102	
Rep18	112	
Rep19	97	
Rep20	101	
测定均值	84.25	39623
样品	主校准品 A	主校准品 B
浓度 (ng/mL)	0.00	5.00

[0090]

标准差 (SD)	18.08	/
均值+2SD	120.41	/
最低检测限 (ng/mL)	0.005	

[0091] 表2 实施例2的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒的灵敏度检测结果

[0092]

测定次数	主校准品 A	主校准品 B
Rep1	84	39432
Rep2	69	39246
Rep3	55	
Rep4	79	
Rep5	74	
Rep6	79	
Rep7	105	
Rep8	95	
Rep9	122	
Rep10	89	
Rep11	101	
Rep12	49	
Rep13	96	
Rep14	103	
Rep15	73	
Rep16	81	
Rep17	104	
Rep18	45	
Rep19	91	
Rep20	72	
测定均值	83.3	39339
样品	样品	主校准品 A

[0093]

浓度 (ng/mL)	0	5.00
标准差 (SD)	19.87	/
均值+2SD	123.04	/
最低检测限 (ng/mL)	0.005	

[0094] 表3 实施例3的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒的灵敏度检测结果

[0095]

测定次数	主校准品 A	主校准品 B
Rep1	68	39036
Rep2	72	38071
Rep3	91	
Rep4	66	
Rep5	86	
Rep6	98	
Rep7	66	
Rep8	73	
Rep9	59	
Rep10	101	
Rep11	62	
Rep12	95	
Rep13	39	
Rep14	65	
Rep15	67	
Rep16	59	
Rep17	98	
Rep18	69	
Rep19	70	
Rep20	102	
测定均值	75.3	38553.5

[0096]

样品	主校准品 A	主校准品 B
浓度 (ng/mL)	0.00	5.00
标准差 (SD)	17.27	/
均值+2SD	109.83	/
最低检测限 (ng/mL)	0.004	

[0097] 从表1~3可以看出,本发明灵敏度最低检测线分别为0.005ng/mL、0.005ng/mL和0.004ng/mL,灵敏度均小于0.01ng/mL。

[0098] 利用实施例1~3的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒对校准品进行线性检测:即将浓度为0ng/mL、5ng/mL、25ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL的校准品进行检测,检测结果如表4~6所示。

[0099] 表4 实施例1的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒对校准品的线性检测结果

[0100]

校准点	1	2	3	4	5	6
校准浓度 (ng/mL)	0	5	25	50	100	200
光量值	98	40532	198931	319337	768198	1484232

[0101] 表5 实施例2的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒对校准品的线性检测结果

[0102]

校准点	1	2	3	4	5	6
校准浓度 (ng/mL)	0	5	25	50	100	200
光量值	84	38695	190915	333897	725791	1359627

[0103] 表6 实施例3的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒对校准品的线性检测结果

[0104]

校准点	1	2	3	4	5	6
校准浓度 (ng/mL)	0	5	25	50	100	200
光量值	69	42857	210778	294245	790728	1560787

[0105] 利用表3~6中数据作标准曲线,得到线性相关系数 $r=0.995\sim0.998$,线性范围为0.01~200ng/mL,分别如图1~3所示。

[0106] 对实施例1~3的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒进行抗干扰特异性

实验,检测结果如表7~9所示。

[0107] 表7 实施例1的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒的抗干扰特异性实验结果

[0108]

潜在干扰物质	浓度	平均回收率 (%)
胆红素	25 mg/dL	102.4
血红蛋白	500 mg/dL	99.31
甘油三酯	50000mg/dL	105.01
TNF- α	100ng/mL	95.52
IL-2	5 ng/mL	93.94
IL-1 β	10ng/mL	97.24

[0109] 表8 实施例2的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒的抗干扰特异性实验结果

[0110]

潜在干扰物质	浓度	平均回收率 (%)
胆红素	25 mg/dL	103.1
血红蛋白	500 mg/dL	95.33
甘油三酯	50000mg/dL	103.54
TNF- α	100ng/mL	94.96
IL-2	5 ng/mL	95.04
IL-1 β	10ng/mL	96.58

[0111] 表9 实施例3的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒的抗干扰特异性实验结果

[0112]

潜在干扰物质	浓度	平均回收率 (%)
胆红素	25 mg/dL	95.23
血红蛋白	500 mg/dL	101.5
甘油三酯	50000mg/dL	99.71
TNF- α	100ng/mL	96.32

[0113]

IL-2	5 ng/mL	94.91
IL-1 β	10ng/mL	95.32

[0114] 从表7~9可以看出,在胆红素25mg/dL(342 μ mol/L)、血红蛋白500mg/dL(5g/L)、甘油三酯(三酸甘油脂)50000mg/dL(56.44mmol/L)、TNF- α 100ng/mL、IL-25ng/mL以及IL-1 β 10ng/mL中的的样本,不会显著影响血栓调节蛋白的测定($\pm 10\%$)。

[0115] 对所公开的实施例的上述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

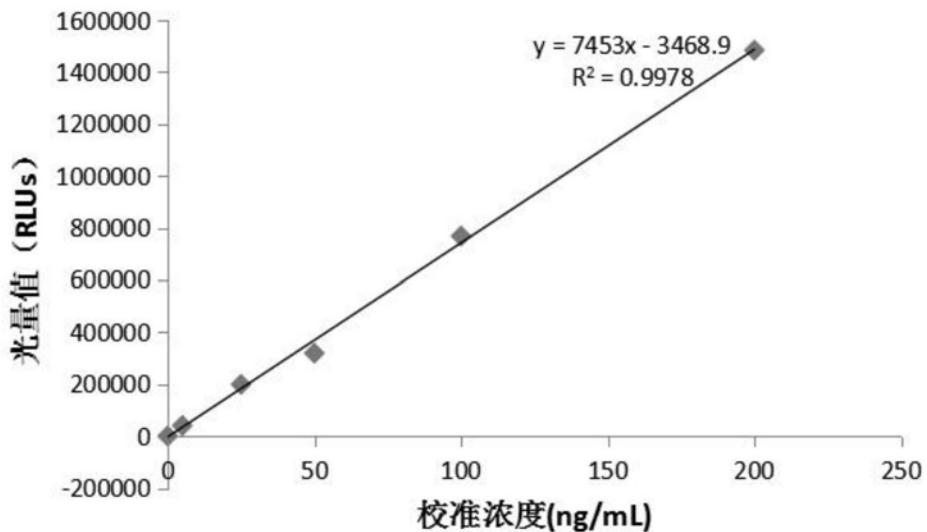


图1

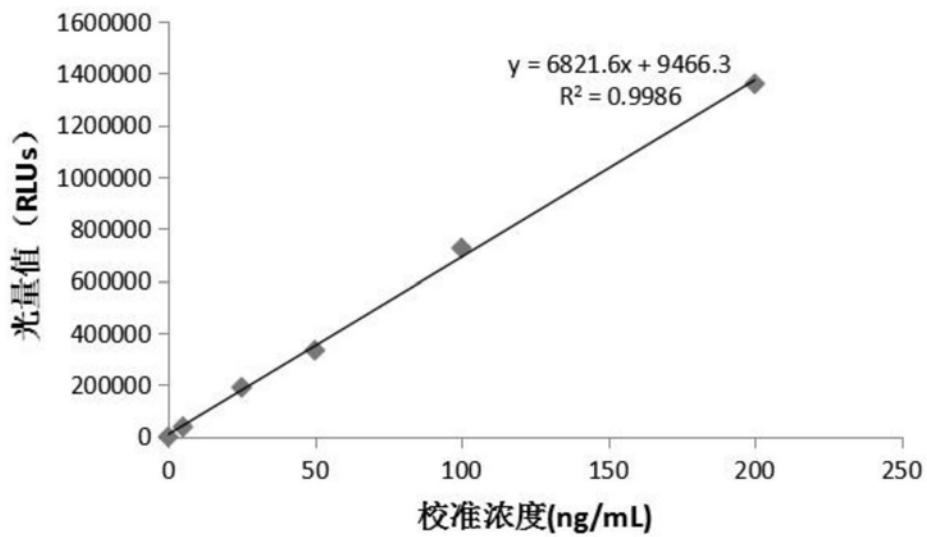


图2

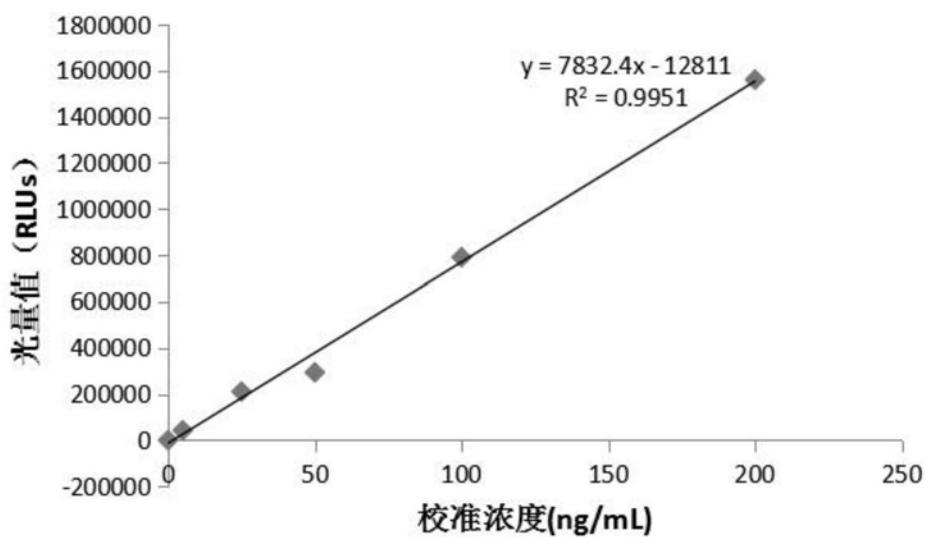


图3

专利名称(译)	血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN110196334A	公开(公告)日	2019-09-03
申请号	CN201910475000.X	申请日	2019-06-03
[标]发明人	高智玲 翟涛 高威 孙成艳 何浩会		
发明人	高智玲 翟涛 高威 孙成艳 何浩会		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/54326 G01N33/6803		
代理人(译)	王莹		
外部链接	Espacenet	Sipo	

摘要(译)

本发明涉及一种血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法，属于免疫诊断技术领域。解决了现有技术中血栓调节蛋白的方法或是精准度底，或是操作复杂、测试结果不稳定的技术问题。本发明的血栓调节蛋白化学发光免疫定量检测试剂盒，包括R1试剂、R2试剂和R3试剂；其中，R1试剂包括链霉亲和素磁颗粒和缓冲液I，R2试剂包括化学发光标记物标记的血栓调节蛋白单克隆抗体和缓冲液I，R3试剂包括偶联标记的血栓调节蛋白单克隆抗体和缓冲液I。该试剂盒采用化学发光免疫分析法对血栓调节蛋白进行检测，具有检测灵敏度高，定量检测准确，操作简单，无放射性风险及检测时间短，并且可以对抗原、抗体类目标物质进行检测的优点。

