



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106568968 A

(43)申请公布日 2017. 04. 19

(21)申请号 201610890745.9

(22)申请日 2016.10.12

(71)申请人 南京健安医疗科技有限公司

地址 210000 江苏省南京市浦口高新区生
物医药谷研发楼新锦湖路3-1号中丹
楼18层

(72)发明人 陆上苏 徐恒 孙旭 李孟
陶艳茹 赵灿

(74)专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限
公司 32224

代理人 薛海霞 董建林

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

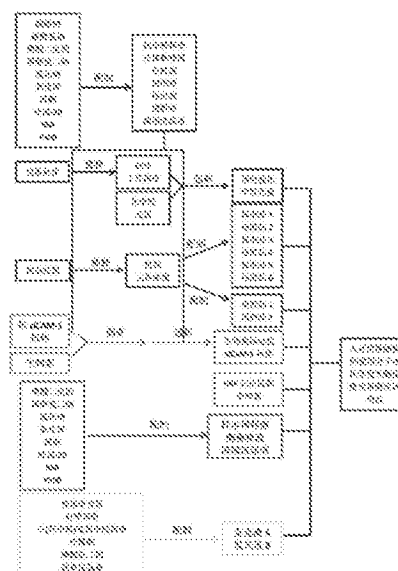
权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

人可溶性细胞间黏附分子-1化学发光酶免
疫定量测定试剂盒及制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种人可溶性细胞间黏附分子-1化学发光酶免疫定量测定试剂盒及制备方法,属于免疫学检测领域,包括盒体,设在盒体内的化学发光板和设在盒体内的试剂,其特征在于,所述化学发光板的各孔包被有抗sICAM-1抗体;所述试剂包括:sICAM-1系列标准品溶液,sICAM-1系列质控品,生物素标记抗sICAM-1抗体,链霉亲和素-HRP,样本稀释液,酶稀释液,化学发光底物 A、B液,浓缩洗涤液,浓缩复溶液。本发明的化学发光酶联免疫检测试剂盒具有高灵敏度、简便快速、准确度高的特点,与传统的ELISA法比较,操作时间大幅度减少。该试剂盒可用于心血管疾病、冠心病、脑中卒的辅助诊断。



1. 人可溶性细胞间黏附分子-1化学发光酶免疫定量测定试剂盒,包括盒体、设置在盒体内的化学发光板和设置在盒体内的试剂,其特征在于:化学发光板的各孔包被有抗sICAM-1的抗体,抗体包被浓度为 $5.0\ \mu\text{g/mL}$;试剂包括:sICAM-1系列标准品溶液,sICAM-1系列质控品溶液,样本稀释液,生物素标记抗sICAM-1抗体,链霉亲和素-HRP溶液,酶稀释液,化学发光底物A、B液,浓缩洗涤液;化学发光底物A液:鲁米诺含量为 0.01M 、对甲苯酚含量为 0.001M $\text{pH}=8.8$ 的三(羟甲基)氨基甲烷溶液;化学发光底物B液:每 $100\ \text{mL}$ 溶液含柠檬酸 2.1g ,无水 Na_2HPO_4 2.82g , 0.75% 的过氧化氢脲 0.64mL 的水溶液,所述百分比为质量百分比。

2. 根据权利要求1所述的人可溶性细胞间黏附分子-1化学发光酶免疫定量测定试剂盒,其特征在于:样本稀释液为 $0.05\ \text{mol/L}$ 磷酸盐缓冲液, $\text{pH}=7.4$,为每升含有 $16\ \text{g}\ \text{NaCl}$, $0.4\ \text{g}\ \text{KCl}$, $0.4\ \text{g}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$, $5.8\ \text{g}\ \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 的水溶液。

3. 根据权利要求2所述的人可溶性细胞间黏附分子-1化学发光酶免疫定量测定试剂盒,其特征在于:酶稀释液为含有蔗糖的 $0.05\ \text{mol/L}$ 磷酸盐缓冲液, $\text{pH}=7.4$,是每升含有 $50\ \text{g}$ 蔗糖, $8\ \text{g}\ \text{NaCl}$, $0.2\ \text{g}\ \text{KCl}$, $0.24\ \text{g}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$, $1.44\ \text{g}\ \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 的水溶液。

4. 根据权利要求3所述的人可溶性细胞间黏附分子-1化学发光酶免疫定量测定试剂盒,其特征在于:所述的浓缩洗涤液是20倍浓缩的洗涤液,洗涤时所用洗涤液为 $1\times$ 洗涤液; $20\times$ 洗涤液:体积分数 1% 吐温-20的 $\text{pH}7.4$, $0.2\ \text{mol/L}$ 的磷酸盐缓冲液; $1\times$ 洗涤液:体积分数 0.05% 吐温-20的 $\text{pH}7.4$, $0.01\ \text{mol/L}$ 的磷酸盐缓冲液。

5. 根据权利要求3所述的人可溶性细胞间黏附分子-1化学发光酶免疫定量测定试剂盒,其特征在于:所述的化学发光板为乳白色不透明聚苯乙烯96孔化学发光板;试剂盒的检测样本为人血清或血浆样本。

6. 根据权利要求3所述的人可溶性细胞间黏附分子-1化学发光酶免疫定量测定试剂盒,其特征在于:sICAM-1系列标准品溶液浓度分别为: 0ng/mL 、 50ng/mL 、 100ng/mL 、 200ng/mL 、 400ng/mL 、 $800\ \text{ng/mL}$;sICAM-1系列质控品溶液浓度分别为: $400\pm 80\text{ng/mL}$ 、 $200\pm 40\text{ng/mL}$ 。

7. 根据权利要求3所述的人可溶性细胞间黏附分子-1化学发光酶免疫定量测定试剂盒,其特征在于:生物素标记抗sICAM-1抗体为由sICAM-1抗体与生物素偶联制成的偶联物,再经过抗体稀释液 $1:2000$ 倍稀释;生物素标记抗sICAM-1抗体作为检测抗体。

8. 人可溶性细胞间黏附分子-1化学发光酶免疫定量测定试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

a. 预包被化学发光板的制备:将抗sICAM-1抗体置于设定的包被溶液中,以设定的浓度,在 37°C 恒温箱中反应2小时包被;抗体包被浓度为 $5.0\ \mu\text{g/mL}$,包被溶液为 $\text{pH}=9.5$ 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液;微孔板中所包被的抗sICAM-1抗体在碱性环境下结合在微孔板塑料表面上;包被好的微孔板用封闭溶液封闭,在 37°C 恒温箱中反应2小时封闭;

b. sICAM-1系列标准品溶液的制备:将sICAM-1抗原溶液用抗原稀释液稀释成 $1:1000$ 的工作浓度,而后按照倍比稀释的方法稀释抗原至终浓度为 0ng/mL 、 50ng/mL 、 100ng/mL 、 200ng/mL 、 400ng/mL 、 $800\ \text{ng/mL}$ 的系列标准品溶液;

c. sICAM-1系列质控品溶液的制备:将sICAM-1抗原纯品溶液用抗原稀释液稀释成 $1:1000$ 的工作浓度,而后稀释至终浓度为 400ng/mL 、 $200\ \text{ng/mL}$ 的质控品溶液;

d. 生物素标记抗sICAM-1抗体溶液的制备:10 μ I抗sICAM-1抗体加1 μ I溶解后的生物素,用标记液稀释至100 μ I,37 $^{\circ}$ C水浴锅中反应1小时,而后转移至准备好的透析袋中,置于透析液中,置在磁力搅拌器上进行透析,透析液需4~6h更换一次,更换若干次后即可收抗体;用抗体稀释液稀释成1:2000 的工作浓度作为检测抗体。

9. 根据权利要求8所述的人可溶性细胞间黏附分子-1化学发光酶免疫定量测定试剂盒的制备方法,其特征在于,还包括:

a. 抗原稀释液:为含有BSA,蔗糖的0.05 mol/L磷酸盐缓冲液,pH=7.4,是每升含有20 g BSA,50 g蔗糖,8 g NaCl,0.2 g KCl,0.24 g KH₂PO₄,1.44 g Na₂HPO₄的水溶液;

b. 抗体稀释液:为含有蔗糖的0.05 mol/L磷酸盐缓冲液,pH=7.4,是每升含有50 g蔗糖,8 g NaCl,0.2 g KCl,0.24 g KH₂PO₄,1.44 g Na₂HPO₄的水溶液;

c. 样本稀释液:为含有BSA的0.05 mol/L磷酸盐缓冲液,pH=7.4,是每升含有20 g BSA,8 g NaCl,0.2 g KCl,0.24 g KH₂PO₄,1.44 g Na₂HPO₄的水溶液;

d. 酶稀释液:为含有蔗糖的0.05 mol/L磷酸盐缓冲液,pH=7.4,是每升含有50 g蔗糖,8 g NaCl,0.2 g KCl,0.24 g KH₂PO₄,1.44 g Na₂HPO₄的水溶液;

e. 化学发光溶液:A液为鲁米诺含量为 0.01M、对甲苯酚含量为 0.001M,pH=8.8的三(羟甲基)氨基甲烷溶液;B液为每100mL溶液含柠檬酸2.1g,无水Na₂HPO₄ 2.82g,0.75%的过氧化氢脲 0.64mL 的水溶液;

f. 浓缩洗涤液:为20倍浓缩的洗涤液,20 $\times$ 洗涤液:体积分数1%吐温-20的pH7.4,0.2 mol/L的磷酸盐缓冲液;

g. 包被溶液:1.59 g 碳酸钠和 2.53 g 碳酸氢钠溶于1 L水中,调节pH=9.5;

h. 封闭溶液:10 g BSA 溶于 1L 洗涤溶液中,再加入重量比为 5‰的P300防腐剂;

i. 标记液:1.59 g 碳酸钠和 2.53 g 碳酸氢钠溶于1 L水中,调节pH=9.5;

j. 透析液:0.24 g磷酸二氢钠、1.44g磷酸氢二钠、8g氯化钠、0.2g氯化钾溶于1L水中,调节PH=7.4。

人可溶性细胞间黏附分子-1化学发光酶免疫定量测定试剂盒 及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测人可溶性细胞间黏附分子-1 (sICAM-1) 的化学发光酶免疫检测试剂盒,用于心血管疾病、冠心病、脑中卒的病人血清或血浆中的ICAM-1蛋白的浓度的定量检测。该试剂盒可用于心血管疾病、冠心病、脑中卒的辅助诊断。属于免疫学检测领域。

技术背景

[0002] ICAM-1是RotheIin等在1986年在研究淋巴细胞黏附中发现的一种淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1) 的配体,克隆号CD54,故ICAM-1又名CD54,属于黏附分子免疫球蛋白基因超家族成员。它是一种跨膜单链糖蛋白,相对分子量为80~110KDa,细胞外区有5个免疫球蛋白样结构区。sICAM-1是ICAM-1的可溶形式,由蛋白酶裂解使ICAM-1细胞外成分脱落而来,其在血清或血浆中升高程度反映细胞上ICAM-1的表达状况,可作为炎症反应的标志。

[0003] ICAM-1可广泛分布于血管内皮细胞、外周血淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞等表面,参与白细胞与白细胞、白细胞与血管内皮细胞、白细胞与上皮细胞间的相互作用。另外,ICAM-1除了介导细胞与细胞间的黏附,还可通过纤维蛋白原和透明质酸结合诱导,参与细胞的增生与迁移。目前研究发现,ICAM-1等黏附分子通过黏附等作用发挥多种免疫生物学功能,包括参与调节炎症反应、细胞和组织的分化和发育、免疫应答等。

[0004] 冠心病的病理基础是冠状动脉粥样硬化及血栓形成,表现为内膜增厚,出现泡沫细胞,形成动脉粥样斑块。粥样斑块形成使血管狭窄,斑块破裂可诱发血栓形成,堵塞血管。ICAM-1主要功能是促进细胞间以及细胞与基质间黏附,对循环中白细胞黏附游出以及浸润起关键作用,在ICAM-1的介导下,炎症细胞沿血管内皮细胞滚动、黏附,并渗透到内皮细胞下,释放各种细胞活性物质,引起血管平滑肌细胞增生,泡沫细胞形成,最终导致动脉粥样斑块形成。Shyu等在人的动脉粥样斑块内发现有大量ICAM-1表达,从而提示ICAM-1参与了动脉粥样硬化形成。随着病程的发展,ICAM-1增加白细胞黏附,促进斑块不稳定,使纤维帽变薄,最后斑块破裂血栓形成,引起心肌细胞缺血坏死。

[0005] 原发性高血压的发病机制尚未明确,随着研究深入,越来越多的资料显示,中性粒细胞和单核细胞黏附至血管内皮细胞,继之激活白细胞释放血管活性物质,产生氧自由基,损害血管内皮,促使血栓形成,引起血管痉挛,可能是高血压导致器官损害的共同机制。Komatusu等在动物试验表明动脉血压升高可促进ICAM-1表达。最近临床研究也表明ICAM-1表达增加参与高血压发生。表达量依赖血压,与血压昼夜节律相关,非杓型血压患者表达量高于杓型患者,进一步证明了ICAM-1不仅参与了高血压发生,而且与其严重程度有关。高血压患者颈动脉粥样硬化斑块与ICAM-1表达有显著正相关。ICAM-1量在高血压并左心室肥厚和向心性肥厚患者高,说明内皮功能参与了左心室肥厚形成。高血压患者ICAM-1表达增加机制目前仍不明确,在体外实验研究表明表达上调是高血压的作用,与循环中的肾素-血管紧张素系统无关。

[0006] 鉴于此,建立一种有效、快速、简单、灵敏的定量检测ICAM-1的方法具有重要意义。

发明内容

[0007] 本发明提供了一种人可溶性细胞间黏附分子-1化学发光酶免疫定量测定试剂盒。该试剂盒具有检测灵敏度高、应用灵活、方便的特点,用于心血管疾病、冠心病、脑中卒的病人血清中的sICAM-1蛋白的定量检测。

[0008] 本发明采用了化学发光酶联免疫分析法,该方法是化学发光法和酶联免疫分析法结合的产物,因此同时具有化学发光法的高灵敏性和免疫分析法的高特异性。其主要原理是将包被抗体包被于微孔板中形成固相抗体,在包被后的微孔中加入标准品、质控品、样品反应后,弃上清洗液,再加入生物素标记的抗sICAM-1的检测抗体反应,弃上清洗液,再加入HRP-链霉亲和素反应,最终形成固相抗体+抗原+生物素标记抗sICAM-1检测抗体+HRP-链霉亲和素复合物,加入发光液A液、B液,立刻读数获得RLU值。在整个反应过程中,样品中sICAM-1含量越高,反应体系中发光强度越强RLU值越高;反之,样品中sICAM-1含量越少,发光强度越弱RLU值越低。

[0009] 本发明提供了sICAM-1的化学发光酶免疫(CLEIA)测定方法及其检测试剂盒,包括盒体,设在盒体内的化学发光板和设在盒体内的试剂,包括:

[0010] 1.化学发光板。为白色不透明96孔可拆卸或不可拆卸的聚苯乙烯化学发光板,各孔包被有抗sICAM-1的抗体,抗体包被浓度为 $5.0\mu\text{g/mL}$ 。

[0011] 2. sICAM-1系列标准品溶液。浓度分别为: 0ng/mL 、 50ng/mL 、 100ng/mL 、 200ng/mL 、 400ng/mL 、 800ng/mL 。

[0012] 3. sICAM-1系列质控品溶液。浓度分别为: $400\pm 80\text{ng/mL}$ 、 $200\pm 40\text{ng/mL}$ 。

[0013] 4.生物素标记抗sICAM-1抗体溶液。由抗sICAM-1抗体与生物素偶合制成的偶联物,再经过抗原稀释液1:1000倍稀释,作为检测抗体。

[0014] 5.链霉亲和素-HRP溶液。为辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉亲和素溶液,其浓度为 1mg/mL 。

[0015] 6.样本稀释液。为 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液, $\text{pH}=7.4$,是每升含有 8g NaCl , 0.2g KCl , $0.24\text{g KH}_2\text{PO}_4$, $1.44\text{g Na}_2\text{HPO}_4$ 的水溶液。

[0016] 7.酶稀释液:为含有蔗糖的 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液, $\text{pH}=7.4$,是每升含有 50g 蔗糖, 8g NaCl , 0.2g KCl , $0.24\text{g KH}_2\text{PO}_4$, $1.44\text{g Na}_2\text{HPO}_4$ 的水溶液。

[0017] 8.化学发光底物A、B液。A液为鲁米诺含量为 0.01M 、对甲苯酚含量为 0.001M $\text{pH}=8.8$ 的三(羟甲基)氨基甲烷溶液;B液为每 100mL 溶液含柠檬酸 2.1g ,无水 Na_2HPO_4 2.82g , 0.75% 的过氧化氢脲 0.64mL 的水溶液,所述百分比为质量百分比。

[0018] 9.浓缩洗涤液。浓缩洗涤溶液为含有吐温-20(Tween-20)缓冲液的20倍浓缩磷酸盐缓冲液,使用前用双蒸水稀释至工作浓度($1\times$ 洗涤液)后使用,用于实验过程中洗涤化学发光板。

[0019] 本发明提供的sICAM-1的化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的制备过程对本发明试剂盒检测的灵敏度以及相关性能影响很大,其制备关键步骤如下:

[0020] 1.预包被化学发光板的制备:采用将抗sICAM-1抗体置于设定的包被溶液中,以设定的浓度,在 37°C 恒温箱中反应2小时包被。采用的抗体包被浓度为 $5.0\mu\text{g/mL}$,采用的是 $\text{pH}=9.5$ 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液。微孔板中所包被的抗sICAM-1抗体在碱性环境下可以

很好的结合在微孔板塑料表面上,可以经受多次洗板。包被好的微孔板可以用封闭溶液封闭,在37℃恒温箱中反应2小时封闭。

[0021] 2. sICAM-1系列标准品溶液的制备:抗原稀释液用的不同,对于线性、稳定性、以及背景值会有影响。将sICAM-1抗原溶液可以用权利要求9中所述抗原稀释液稀释成1:1000的工作浓度,而后按照倍比稀释的方法稀释抗原至终浓度为0ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL、400ng/mL、800ng/mL的系列标准品溶液。

[0022] 3. sICAM-1系列质控溶液的制备:抗原稀释液用的不同,对于稳定性会有影响。将sICAM-1抗原纯品溶液用权利要求9中所述抗原稀释液稀释成1:1000的工作浓度,而后稀释至终浓度为400ng/mL、200ng/mL的质控溶液。

[0023] 4. 生物素标记抗sICAM-1抗体溶液的制备:10μI抗sICAM-1抗体加1μI溶解后的生物素,用标记液稀释至100μI,37℃水浴锅中反应1小时,而后转移至准备好的透析袋中,置于透析液中,置于磁力搅拌器上进行透析,透析液需4~6h更换一次,更换若干次(优选为5次)后即可收抗体,再经过抗原稀释液1:1000倍稀释。即得到生物素标记抗sICAM-1抗体溶液。

[0024] 本发明提供的sICAM-1的化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的内设以及制备过程中的试剂溶液对本发明试剂盒检测的灵敏度影响很大,所涉及相关溶液的配制方法如下:

[0025] 1. sICAM-1标准品溶液:以既定方法将sICAM-1纯品用抗原稀释液配制成浓度分别为0ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL、400ng/mL、800ng/mL的sICAM-1系列标准溶液。

[0026] 2. sICAM-1质控品溶液:以既定方法将sICAM-1纯品用抗原稀释液配制成浓度分别为400ng/mL、200ng/mL的质控品溶液。

[0027] 3. 生物素标记抗sICAM-1抗体溶液:按照既定方法将生物素与抗体进行偶联透析后获得的生物素标记抗sICAM-1抗体溶液,用抗体稀释液稀释成1:2000(体积比)的工作浓度作为检测抗体。

[0028] 4. 抗原稀释液:为含有BSA,蔗糖的0.05mol/L磷酸盐缓冲液,pH=7.4,是每升含有20g BSA,50g蔗糖,8g NaCl,0.2g KCl,0.24g KH₂PO₄,1.44g Na₂HPO₄的水溶液。

[0029] 5. 抗体稀释液:为含有蔗糖的0.05mol/L磷酸盐缓冲液,pH=7.4,是每升含有50g蔗糖,8g NaCl,0.2g KCl,0.24g KH₂PO₄,1.44g Na₂HPO₄的水溶液。

[0030] 6. 样本稀释液:为含有BSA的0.05mol/L磷酸盐缓冲液,pH=7.4,是每升含有20g BSA,8g NaCl,0.2g KCl,0.24g KH₂PO₄,1.44g Na₂HPO₄的水溶液。

[0031] 7. 酶稀释液:为含有蔗糖的0.05mol/L磷酸盐缓冲液,pH=7.4,是每升含有50g蔗糖,8g NaCl,0.2g KCl,0.24g KH₂PO₄,1.44g Na₂HPO₄的水溶液。

[0032] 8. 化学发光溶液:A液为鲁米诺含量为0.01M、对甲苯酚含量为0.001M,pH=8.8的三(羟甲基)氨基甲烷溶液,B液为每100mL溶液含柠檬酸2.1g,无水Na₂HPO₄ 2.82g,0.75%的过氧化氢脲0.64mL的水溶液。

[0033] 9. 浓缩洗涤溶液:为20倍浓缩的洗涤液,洗涤时所用洗涤液为1×洗涤液(20×洗涤液:体积分数1%吐温-20的pH7.4,0.2mol/L的磷酸盐缓冲液;1×洗涤液:体积分数0.05%吐温-20的pH7.4,0.01mol/L的磷酸盐缓冲液)。

[0034] 10. 包被溶液:1.59g碳酸钠和2.53g碳酸氢钠溶于1L水中,调节pH=9.5。

[0035] 11. 封闭溶液: 取10g BSA溶于1L洗涤液中, 再加入0.5mI ProcIn300 (防腐剂), 配制成含0.05%ProcIn, 1%BSA的封闭溶液。

[0036] 12. 标记液: 1.59g碳酸钠和2.53g碳酸氢钠溶于1L水中, 调节pH=9.5。

[0037] 13. 透析液: 0.24g磷酸二氢钠、1.44g磷酸氢二钠、8g氯化钠、0.2g氯化钾溶于1L水中, 调节PH=7.4。

[0038] 以上溶液都是用于化学发光分析方法的常规溶液, 我们经过一系列研究, 确定的最佳的pH值和离子强度, 以保证试剂盒的效果最佳。

[0039] 本发明提供了sICAM-1的化学发光酶免疫 (CLEIA) 测定方法的检测步骤如下:

[0040] 1. 使用前, 将试剂盒所有组分于室温下放置20分钟, 浓缩洗涤液 (20×) 在使用前必须用纯化水稀释20倍, 得到1×洗涤液, 链霉亲和素-HRP溶液 (其为纯度95%以上的链霉亲和素-HRP液体) 用酶稀释液按照1:1000倍 (体积比) 稀释后使用, 避光存放。

[0041] 2. 化学发光板使用前每孔加200μI稀释后的清洗液, 等待30秒后甩尽清洗液, 并去除水滴 (在厚叠吸水纸上拍干)。重复此操作2次。

[0042] 3. 将校准品、质控品或血清样本各20μI分别加入化学发光板微孔中, 再加入样本稀释液80μI, 震荡混匀后, 用封板膜封板, 37℃水浴10分钟。

[0043] 4. 甩去化学发光板孔内液体, 每孔加200μI清洗液, 等待30秒后甩尽清洗液, 并去除水滴 (在厚叠吸水纸上拍干)。重复此操作5次。

[0044] 5. 加入生物素标记抗sICAM-1抗体, 每孔100μI, 用封板膜封板, 37℃水浴10分钟。

[0045] 6. 甩去化学发光板孔内液体, 每孔加200μI清洗液, 等待30秒后甩尽清洗液, 并去除水滴 (在厚叠吸水纸上拍干)。重复此操作5次。

[0046] 7. 加入稀释后的100μI的链霉亲和素-HRP, 用封板膜封板, 37℃水浴10分钟。

[0047] 8. 甩去化学发光板孔内液体, 每孔加200μI清洗液, 等待30秒后甩尽清洗液, 并去除水滴 (在厚叠吸水纸上拍干)。重复此操作5次。

[0048] 9. 加入100μI发光液A发光液B混合液 (稀释比为1:1, 即A液和B液各50μI) 立刻置于化学发光仪上读数, 获得RLU值。

[0049] 10. 根据标准品的RLU值和浓度为坐标轴, 选择合适的数学模型建立标准曲线。将样本的RLU值, 代入上述的标准曲线中, 得出样本浓度。

[0050] 本发明公开了一种人可溶性细胞间黏附分子-1化学发光法定量测定试剂盒, 试剂盒可定量测定心血管疾病、冠心病、脑中卒的病人血清中的ICAM-1蛋白。该试剂盒用于心血管疾病、冠心病、脑中卒的辅助诊断。该试剂盒的拟合标准曲线相关系数可达 $r=0.9976$, 大于0.9900; 相对偏差为5.20%, 小于10%; 检测限为31.4ng/mL; 线性考察, 浓度值拟合直线的相关系数 $r=0.9939$, 相关系数大于0.9900; 重复性结果的变异系数CV均小于10%; 在应用于临床样本的检测中能够明显的区分正常人和病人。该试剂盒展示了良好的准确性、线性、重复性、最低检测限, 具有良好的测定血清中的ICAM-1蛋白的浓度的能力, 可用于心血管疾病、冠心病、脑中卒的辅助诊断。本发明的试剂盒在2~8℃干燥避光可保存6个月, 在2~8℃条件下运输72小时可保持性能稳定。

附图说明:

[0051] 图1:sICAM-1化学发光酶免疫 (CLEIA) 检测试剂盒的原理概述图。

- [0052] 图2:sICAM-1化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的工艺流程图。
- [0053] 图3:sICAM-1化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的标准曲线示意图。
- [0054] 图4:sICAM-1化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的线性线性考察图;
- [0055] 图5:sICAM-1化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒测定病人血清与正常人的血清中sICAM-1含量对比示意图。

具体实施方式

- [0056] 下面结合实施例对本发明的技术方案作进一步说明。
- [0057] 实施例一:抗体与包被抗原浓度的优选(方阵法)
- [0058] 纵向用每种包被抗体按80.0、40.0、20.0、10.0、5.0、2.5、1.25、0.625 $\mu\text{g/mL}$ 的系列稀释度包被化学发光板,100 μL /孔,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱2小时后,拍干;以150 μL /孔封闭溶液封闭,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱放置2小时,洗板一次,拍干;加入50 μL /孔一系列稀释的sICAM-1抗原(1:1000至1:512000),室温(20~25 $^{\circ}\text{C}$)孵育10分钟,洗板五次,最后一次拍干;再生物素标记抗sICAM-1抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10分钟,洗板五次,最后一次拍干;再加入链霉亲和素-HRP,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10分钟,洗板五次,最后一次拍干;分别加入50 μL /孔的化学发光A、B液,测定发光强度值RLU值。以发光强度值随包被抗原的浓度有明显梯度变化的包被抗原浓度和抗体稀释度为最佳浓度进行特异性测定。
- [0059] 根据上述对包被抗体及抗原浓度的优选实验中确定,包被抗体浓度为5.0 $\mu\text{g/mL}$,抗原标准品的最高工作浓度为1:1000,即800 ng/mL 。
- [0060] 实施例二:sICAM-1化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的标准曲线
- [0061] 根据sICAM-1化学发光酶免疫(CLEIA)测定方法的检测步骤,获得sICAM-1系列标准品的发光值RLU。根据标准品的RLU值和浓度为坐标轴,选择合适的数学模型建立标准曲线,
- [0062] 标准曲线如图3所示,其相关系数 $r=0.9976$ 。
- [0063] 实施例三:sICAM-1化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的准确度
- [0064] 根据sICAM-1化学发光酶免疫(CLEIA)测定方法的检测步骤,取定值样本进行检测。重复测量3次后,其平均结果记为M,根据公式(1)计算测量浓度的相对偏差。
- [0065] $B = (M - T) / T \times 100\%$ 公式(1)
- [0066] 式中:
- [0067] B—相对偏差;
- [0068] M—测量浓度3次结果的平均值;
- [0069] T—定值样本的浓度。
- [0070] 准确度结果如表1所示,其相对偏差为5.20%,小于10%,显示该试剂盒在检测样本时具有较好的准确度:
- [0071] 表1:试剂盒准确度的测定

[0072]

样本定值浓度 T (ng/ml)	测定值 (ng/ml)	平均值 M	相对偏差 B
400.00	423.78	420.82	5.20%
	412.73		
	425.95		

[0073] 实施例四:sICAM-1化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的最低检测限

[0074] 用零浓度样本作为样本进行检测,重复测定20次,得出20次测量结果的发光值(RLU值),计算其平均值(M)和标准差(SD),得出M+2SD所对应的RLU值,根据试剂盒所用校准品的定标曲线方程,将M+2SD所对应的RLU值带入上述方程中,求出对应的浓度值,即为检测限。

[0075] 检测限结果如表2所示,检测限为31.4ng/ml。

[0076] 表2:试剂盒最小检测限的测定

[0077]

样本浓度值 ng/ml	平均值 M RLU	标准差 (SD) RLU	M+2SD	检测限 ng/ml
0	177	9.08	195.16	31.4

[0078] 实施例五:sICAM-1化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的线性考察

[0079] 用样本稀释液将接近线性范围上限的高值样本按一定比例稀释为至少5种浓度,其中低值浓度样本须接近线性范围的下限。将每一浓度样本重复检测2次,计算其浓度的平均值,将结果平均值和稀释后的样本浓度用最小二乘法进行直线拟合,并计算线性相关系数r。

[0080] 线性考察图如图4所示,其 $r=0.9939$,相关系数大于0.9900,试剂盒线性相关性较好。

[0081] 实施例六:sICAM-1化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的重复性

[0082] 用两个浓度水平的样本各重复检测10次,计算10次测量浓度结果的平均值M和标准差SD,根据公式(2)得出变异系数CV。

[0083] $CV = SD/M \times 100\%$ 公式(2)

[0084] 式中:

[0085] CV—变异系数;

[0086] SD—10次测量结果的标准差;

[0087] M—10次测量结果的平均值。

[0088] 重复性结果如表3所示,变异系数CV均小于10%,显示该试剂盒在检测样本时具有较好的重复性:

[0089] 表3:试剂盒重复性测定

[0090]

样本定值浓度 T (ng/ml)	平均值 M (ng/ml)	标准差 SD	变异系数 CV
400	409.52	16.27	3.87%
200	214.10	15.34	7.17%

[0091] 实施例六:sICAM-1化学发光酶免疫 (CLEIA) 检测试剂盒的临床样本检测情况

[0092] 根据sICAM-1化学发光酶免疫 (CLEIA) 测定方法的检测步骤,选择了34例病人(包括临床诊断患心血管疾病、冠心病、脑中卒病人),29例正常人(临床诊断无心血管疾病、冠心病、脑中卒疾病的人群)的血清样本,进行检测,获得了血清中sICAM-1的浓度值,绘制散点图。

[0093] 测定结果图5所示,该试剂盒测定的病人和正常人的血清中sICAM-1的浓度值,具有明显差异性。

[0094] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征及优点。本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理,在不脱离本发明精神和范围的前提下,本发明还会有各种变化和改进,这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等效物界定。

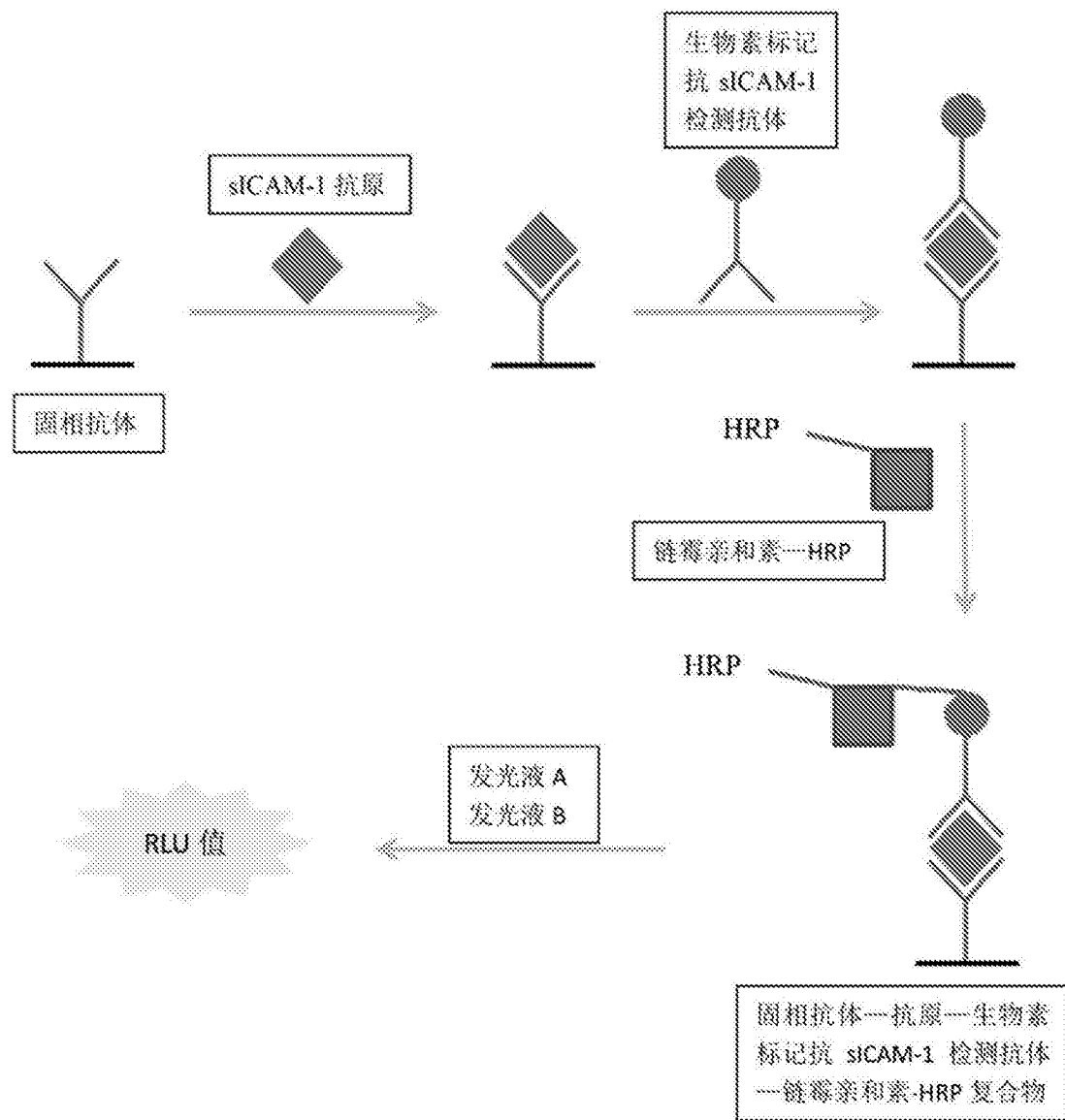


图1

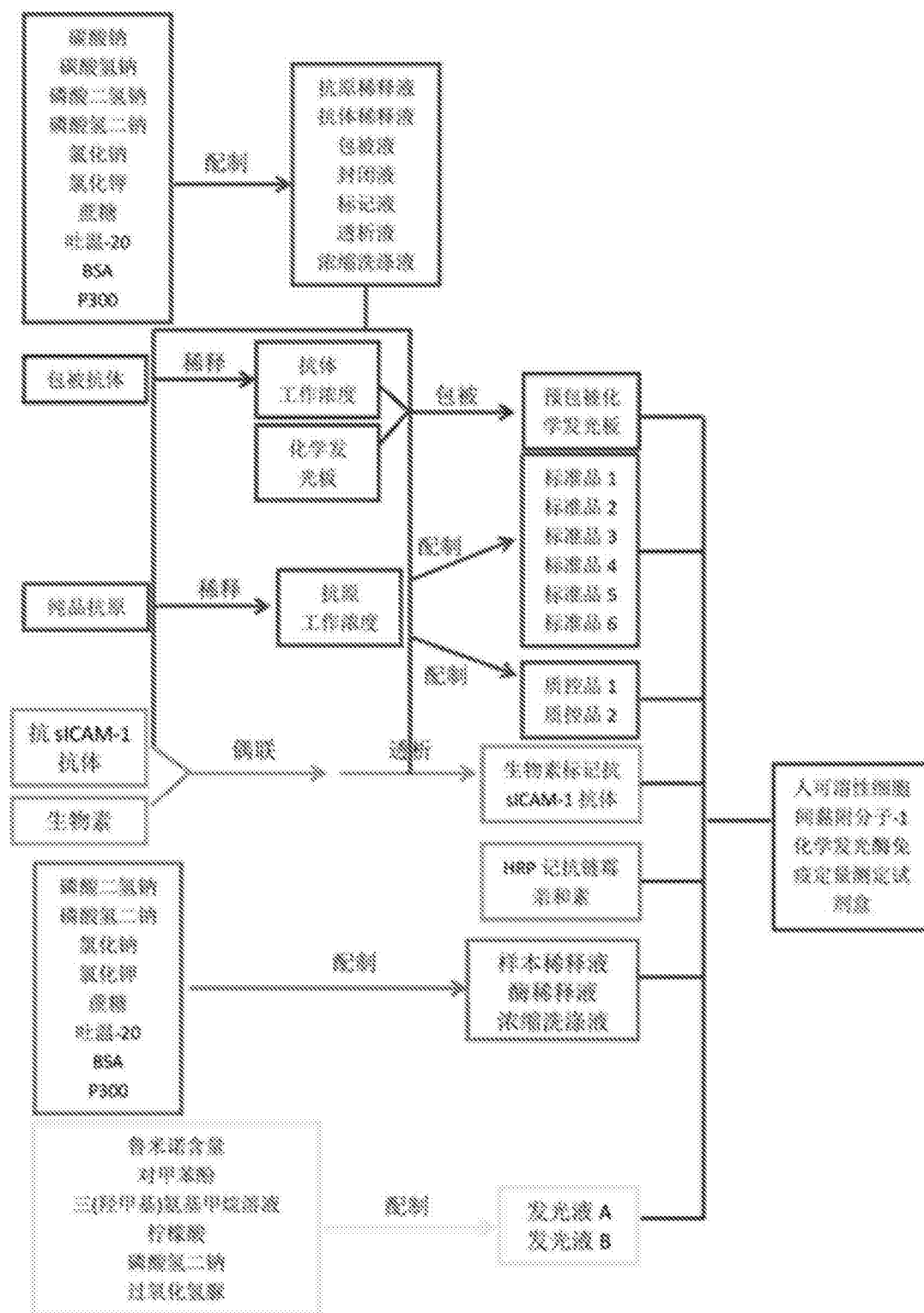


图2

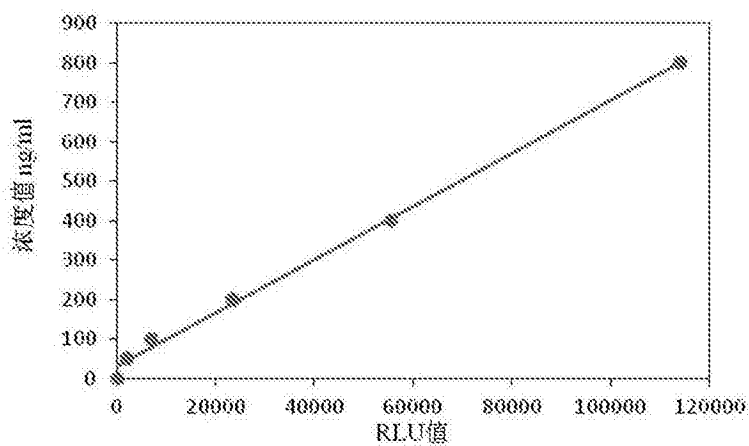


图3

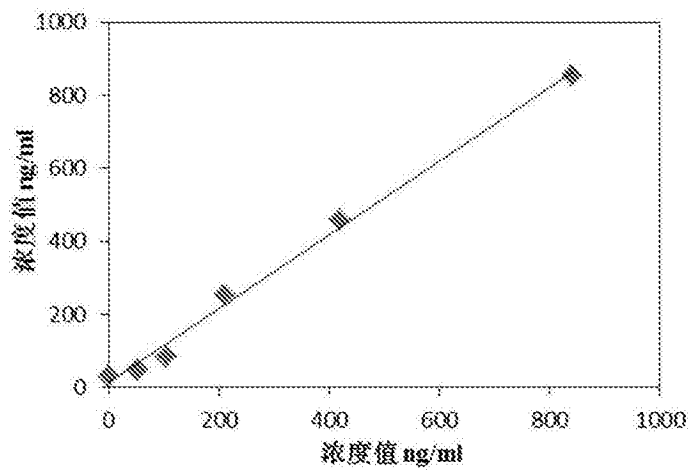


图4

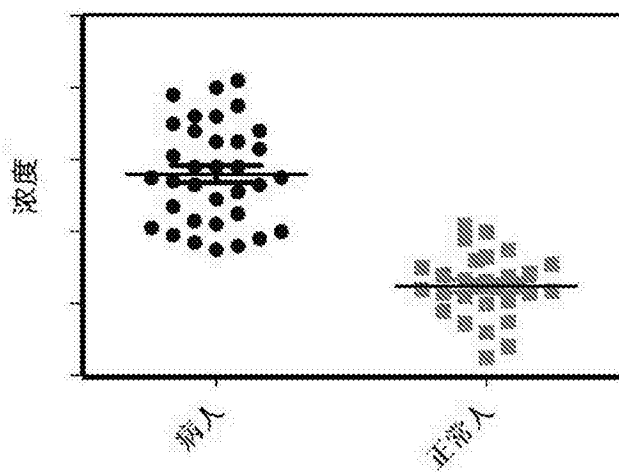


图5

专利名称(译)	人可溶性细胞间黏附分子-1化学发光酶免疫定量测定试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN106568968A	公开(公告)日	2017-04-19
申请号	CN201610890745.9	申请日	2016-10-12
[标]申请(专利权)人(译)	南京健安医疗科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京健安医疗科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京健安医疗科技有限公司		
[标]发明人	陆上苏 徐恒 孙旭 李孟 陶艳茹 赵灿		
发明人	陆上苏 徐恒 孙旭 李孟 陶艳茹 赵灿		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/532 G01N33/543 G01N2800/32		
代理人(译)	薛海霞 董建林		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种人可溶性细胞间黏附分子-1化学发光酶免疫定量测定试剂盒及制备方法，属于免疫学检测领域，包括盒体，设在盒体内的化学发光板和设在盒体内的试剂，其特征在于，所述化学发光板的各孔包被有抗sICAM-1抗体；所述试剂包括：sICAM-1系列标准品溶液，sICAM-1系列质控品，生物素标记抗sICAM-1抗体，链霉亲和素-HRP，样本稀释液，酶稀释液，化学发光底物 A、B液，浓缩洗涤液，浓缩复溶液。本发明的化学发光酶免疫检测试剂盒具有高灵敏度、简便快速、准确度高的特点，与传统的ELISA法比较，操作时间大幅度减少。该试剂盒可用于心血管疾病、冠心病、脑中卒的辅助诊断。

