



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106556705 A

(43)申请公布日 2017.04.05

(21)申请号 201611077983.4

(22)申请日 2016.11.30

(71)申请人 天津康尔克生物科技有限公司

地址 301706 天津市武清区大碱厂镇兰家庄村西

(72)发明人 兰成杰 单存海 陶剑

(74)专利代理机构 北京东方灵盾知识产权代理有限公司 11506

代理人 苏向银

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

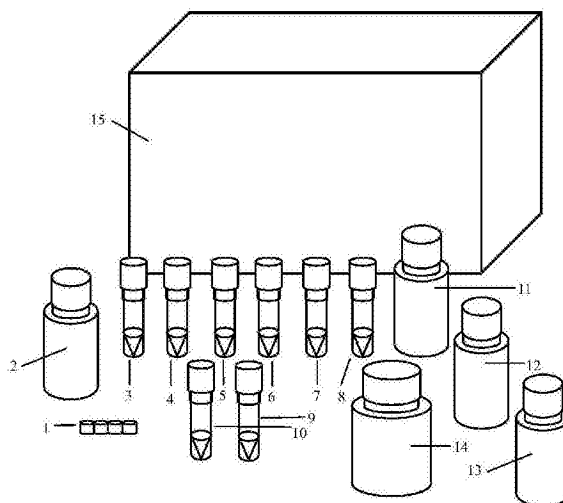
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

## (54)发明名称

一种可溶性ST2的酶联免疫检测试剂盒及其制备方法

## (57)摘要

本发明公开了一种可溶性ST2酶联免疫检测试剂盒,检测试剂盒包含有样本稀释液、洗涤液、显色液及终止液、酶标记物,所述酶标记物为辣根过氧化物酶标记的可溶性ST2单克隆抗体,所述检测试剂盒还包括:多个不同浓度的可溶性ST2标准品、可溶性ST2质控品、以及微孔反应板,所述微孔反应板包被可溶性ST2单克隆抗体。本发明的可溶性ST2酶联免疫检测试剂盒,试剂盒中的多种不同浓度的可溶性ST2标准品无需进行稀释处理可以直接使用,简化了操作步骤,缩短了检测时间,实现了高效、快速检测,同时可溶性ST2质控品可以鉴定检测结果是否准确,多个不同浓度的可溶性ST2标准品可以得到不同规格的检测试剂盒,适应不同客户的使用需求。



1. 一种可溶性ST2酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述检测试剂盒包含有样本稀释液、洗涤液、显色液及终止液、酶标记物,所述酶标记物为辣根过氧化物酶标记的可溶性ST2单克隆抗体,所述检测试剂盒还包括:多个不同浓度的可溶性ST2标准品、可溶性ST2质控品、以及微孔反应板,所述微孔反应板包被可溶性ST2单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述可溶性ST2酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述多个不同浓度的可溶性ST2标准品为6个不同浓度的人可溶性ST2标准品。

3. 根据权利要求2所述可溶性ST2酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述6个不同浓度的可溶性ST2标准品的浓度依次为0ng/ml、6.4ng/ml、16ng/ml、40ng/ml、100ng/ml、200ng/ml。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述可溶性ST2酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述可溶性ST2标准品的制备方法为:以胎牛血清处理基质对人可溶性ST2重组抗原进行稀释,配制得到可溶性ST2标准品。

5. 根据权利要求4所述可溶性ST2酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述可溶性ST2质控品包括低值范围质控品和高值范围质控品,所述低值范围质控品浓度为24~36ng/ml,所述高值范围质控品浓度为48~72ng/ml。

6. 根据权利要求5所述可溶性ST2酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述低值范围质控品浓度为30ng/ml,所述高值范围质控品浓度为60ng/ml。

7. 根据权利要求5-6中任一所述可溶性ST2酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述质控品的制备方法为:以胎牛血清处理基质对人可溶性ST2重组抗原进行稀释,配制得到可溶性ST2质控品。

8. 根据权利要求7所述可溶性ST2酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述胎牛血清处理基质的制备方法为:取适量研细后的硫酸铵于室温(18-25℃)下边搅拌边加入胎牛血清中,使其终浓度为100~300g/L,4℃放置18~22小时;10,000转离心20~40分钟,取上清液滤纸过滤;将滤后上清液装透析袋,于4℃下在10倍体积的生理盐水中透析,每隔3~5小时更换一次透析液,一共三次;转入10体积的0.05mol/L硼酸溶液中进行透析,每隔3~5小时更换一次透析液,一共四次;将透析后的液体放入干净容器内,于56℃热灭活1~2小时;加入0.05~0.15%的Proclin300和0.05~0.15%的庆大霉素,混合均匀后用0.22μm滤膜过滤除菌得到胎牛血清处理基质,于-20℃下保存待用。

9. 根据权利要求1-8中任一所述可溶性ST2酶联免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:1) 制备可溶性ST2标准品和可溶性ST2质控品:使用胎牛血清处理基质将人可溶性ST2重组抗原稀释得到六个浓度的可溶性ST2标准品,同时使用胎牛血清处理基质将人可溶性ST2重组抗原稀释得到低值范围质控品和高值范围质控品;

2) 制备可溶性ST2单克隆抗体包被的微孔反应板:吸取适量可溶性ST2单克隆抗体,加入0.01mol/L, pH=7.2的磷酸盐溶液中进行稀释,使其终浓度为2~6μg/mL,4℃储存备用;取微孔板,每孔加入100μL稀释后的可溶性ST2单克隆抗体,覆膜后置于4℃包被18~22小时;甩去孔内液体,每孔加入200μL内含1~3%牛血清白蛋白、3~5%蔗糖、0.05~0.15% Priclin300的0.01mol/L, pH=7.4的磷酸盐溶液,覆膜后置于4℃封闭18~22小时;甩去孔内液体,并在吸水纸上拍干,室温(18-25℃)下干燥2~4天后真空密封包装,得到可溶性ST2单克隆抗体包被的微孔反应板,所述微孔反应板保存于4℃。

3) 制备辣根过氧化物酶标记的可溶性ST2单克隆抗体:称取辣根过氧化物酶2mg,溶解于1mL去离子水中,加入1~2mL浓度为0.05mol/L的过碘酸钠溶液,4℃缓慢摇动30~60min;②用浓度为0.001mol/L,pH=4.4的醋酸钠溶液透析18~22小时;③加入2mg可溶性ST2单克隆抗体,4℃避光振荡18~22小时;④加入400μL浓度为0.2mol/L的NaBH<sub>4</sub>溶液,用浓度为0.02mol/L,pH=7.4的磷酸缓冲液透析18~22小时;⑤用HPLC二次纯化,收集蛋白峰,加入等体积甘油,得到辣根过氧化物酶标记的可溶性ST2单克隆抗体,于-20℃保存。

4) 制备样本稀释液:取磷酸二氢钠1.409g、磷酸氢二钠4.372g、氯化钠8.5g、牛血清白蛋白5g、吐温-20 0.5mL、加水定容至1L,用氢氧化钠调pH至7.4±0.1;

5) 制备洗涤液:取磷酸二氢钠28.18g、磷酸氢二钠87.44g、氯化钠170g、吐温-20 10mL,加水定容至1L,使用时用水稀释20倍;

6) 制备显色液:(1)称取100g TMB,用10mL DMSO和10mL无水乙醇配成的混合液溶解,4℃避光保存备用;

(2)配制0.1mol/L pH4.0~5.0的柠檬酸溶液;

(3)向1000mL所述步骤(2)配制的柠檬酸溶液中加入100~200mg过氧化氢尿素;

(4)溶解充分后,加入PVP,使其终浓度为0.2~0.6%,4℃放置18~22小时;

(5)加入所述步骤(1)事先溶解的TMB混合液,并加入2~4%聚乙二醇,加水定容至1000mL,4℃避光保存;

7) 制备终止液:量取50mL浓硫酸沿烧杯壁缓慢地注入870mL水中,混匀,使其被稀释18.4倍,4℃保存;或选用浓度为1mol/L的盐酸作为终止液。

10. 根据权利要求9所述可溶性ST2酶联免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述六个浓度点的可溶性ST2标准品浓度依次为0ng/ml、6.4ng/ml、16ng/ml、40ng/ml、100ng/ml、200ng/ml;所述低值范围质控品和高值范围质控品的浓度分别为30ng/ml、60ng/ml。

## 一种可溶性ST2的酶联免疫检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析医学技术领域,具体涉及一种可溶性ST2的酶联免疫检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 心力衰竭(heart failure, HF)是指各种心脏结构或功能性疾病导致心室充盈及(或)射血能力受损从而引起一系列临床症状的综合征。据世界卫生组织统计,目前全球范围内,慢性心衰患者人数高达2200多万,每年新增患者200多万,死亡100多万。中国最新的流行病学调查结果提示,我国城乡居民心衰患病率约为0.9%,女性患病率高于男性。心力衰竭在临床上起病急,病情重,症状和体征常不典型,可发生在多种心血管疾病中,如扩张性心肌病、瓣膜性心脏病、缺血性心肌病等,是上述疾病晚期的共同结局,在多种有害因素的作用下而发生心室重塑。心室重塑的存在进一步损伤心肌,最终导致心功能的恶化。随着研究的深入,1L-33/ST2信号传导途径被发现,成为诊治心力衰竭的新途径。

[0003] 生长刺激表达基因2蛋白,即ST2,又被称为1L1RL1或1L-1R,是白介素1受体家族成员之一,有跨膜型(ST2L)和可溶性(sST2)两种形式。ST2L与功能配体1L-33结合对心脏具有保护作用。研究表明,心力衰竭患者血液中sST2含量明显升高,并能够竞争性结合1L-33,阻断1L-33/ST2L信号通路,抑制1L-33抗心肌细胞肥大和纤维化的作用,诱发心脏发生病变。如导致不受抑制的心肌肥厚、房室扩张以及心脏射血分数下降等类似于急性心肌梗死(AMI)或严重心力衰竭后心肌重构的表现。在疾病进展过程中,血液中可溶性ST2水平的升高往往早于临床症状,且不受年龄和肾功能的影响,通过检测其含量,能够反映心力衰竭的严重程度和心脏功能的损害程度,从而为心力衰竭的早期筛查和预后诊断提供参考依据

[0004] Weinberg等对PRAISE-2HF试验中的患者(NYHA分级III-IV级;终点:死亡或心脏移植)研究后发现,可溶性ST2水平与基础脑钠肽(BNP)、心房利钠肽(ANP)、去甲肾上腺素水平均相关。在包括BNP、ANP的多变量模型中sST2是严重心衰患者死亡和心脏移植的独立预测因素。Shimpo等研究证实,sST2是一种可为急性心肌梗塞患者提供预后信息的新标志物,且独立于其他的临床预测因子(如BNP、NT-proBNP、CRP)。另有文献报道,sST2还可用于急性冠状动脉综合征(ACS)的危险分层和预后评估,并对鉴别急诊呼吸困难患者的病因是否为心源性方面具有相当高的敏感度。

[0005] 心力衰竭传统的检测手段主要包括:心电图、超声心动图、X线及有创血流动力学等,而近几年针对早期诊断出现了BNP和NT-proBNP等心脏标志物,但这些检测易受其他因素影响,故其对心衰的诊断存在局限性,且影响患者预后。目前心衰的治疗虽可以改善症状和预后,提高患者生存率,但心力衰竭的机理和预测仍不能满足临床的需求。因此,探索新的诊断方法,以提高心衰诊断的灵敏度和特异度,判断病情严重程度及评估疾病预后具有重要的意义。

[0006] 美国Critical Diagnostics公司研制的IVD产品Presage<sup>®</sup> ST2 Assay Kit利用双抗体夹心酶联免疫法在96孔板上定量检测血清中可溶性ST2的浓度。其将纯化后的鼠抗人

ST2单克隆抗体包被在反应板的检测微孔内,ST2抗原与包被抗体结合。生物素标记的鼠抗人ST2单克隆抗体再与反应板内抗原抗体复合物结合,后加入链霉亲和素-辣根过氧化物酶联物(Streptavidin-HRP),反应结束后用底物四甲基联苯胺(TMB)显色,后终止反应并用酶标仪在450nm波长下测定吸光值(OD)。该产品检测时间长,实验样本需要事先两步稀释处理;内置高浓度校准品,检测时需要事先复融并逐级稀释至各标准品点,过程相对繁琐并且容易引入操作误差;链霉亲和素-辣根过氧化物酶联物同样需要稀释处理。该试剂盒不配备质控品,实验操作人员对检测系统进行质量控制时需要额外购买校准物质,增加检测成本。此外,该产品只提供96人份包装规格,且校准品复融后效期仅为7天,不利于国内中、小医疗机构对该项目开展初期可能面临的较少的临床样本进行检测。

## 发明内容

[0007] 本发明旨在一定程度上解决上述技术问题。

[0008] 有鉴于此,本发明提供一种可溶性ST2的酶联免疫检测试剂盒及其制备方法,该试剂盒具有操作简单、检测时间短、准确度高、灵敏度好、分析性能稳定等特点。

[0009] 为解决上述技术问题,本发明提供一种可溶性ST2酶联免疫检测试剂盒,所述检测试剂盒包含有样本稀释液、洗涤液、显色液及终止液、酶标记物,所述酶标记物为辣根过氧化物酶标记的可溶性ST2单克隆抗体,所述检测试剂盒还包括:多个不同浓度的可溶性ST2标准品、可溶性ST2质控品、以及微孔反应板,所述微孔反应板包被可溶性ST2单克隆抗体。

[0010] 优选的,所述多个不同浓度的可溶性ST2标准品为6个不同浓度的人可溶性ST2标准品。

[0011] 优选的,所述6个不同浓度的可溶性ST2标准品的浓度依次为0ng/ml、6.4ng/ml、16ng/ml、40ng/ml、100ng/ml、200ng/ml。

[0012] 优选的,所述可溶性ST2标准品的制备方法为:以胎牛血清处理基质对人可溶性ST2重组抗原进行稀释,配制得到可溶性ST2标准品。

[0013] 优选的,所述可溶性ST2质控品包括低值范围质控品和高值范围质控品,所述低值范围质控品浓度为24~36ng/ml,所述高值范围质控品浓度为48~72ng/ml。

[0014] 优选的,所述低值范围质控品浓度为30ng/ml,所述高值范围质控品浓度为60ng/ml。

[0015] 优选的,所述质控品的制备方法为:以胎牛血清处理基质对人可溶性ST2重组抗原进行稀释,配制得到可溶性ST2质控品。

[0016] 优选的,所述胎牛血清处理基质的制备方法为:取适量研细后的硫酸铵于室温(18-25℃)下边搅拌边加入胎牛血清中,使其终浓度为100~300g/L,4℃放置18~22小时;10,000转离心20~40分钟,取上清液滤纸过滤;将滤后上清液装透析袋,于4℃下在10倍体积的生理盐水中透析,每隔3~5小时更换一次透析液,一共三次;转入10体积的0.05mol/L硼酸溶液中进行透析,每隔3~5小时更换一次透析液,一共四次;将透析后的液体放入干净容器内,于56℃热灭活1~2小时;加入0.05~0.15%的Proclin300和0.05~0.15%的庆大霉素,混合均匀后用0.22μm滤膜过滤除菌得到胎牛血清,于-20℃下保存待用。

[0017] 本发明提供一种可溶性ST2酶联免疫检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:1)制备可溶性ST2标准品和可溶性ST2质控品:使用胎牛血清处理基质将人可溶性ST2重组抗原

稀释得到六个浓度的可溶性ST2标准品,同时使用胎牛血清处理基质将人可溶性ST2重组抗原稀释得到低值范围质控品和高值范围质控品;

[0018] 2) 制备可溶性ST2单克隆抗体包被的微孔反应板:吸取适量可溶性ST2单克隆抗体,加入0.01mol/L, pH=7.2的磷酸盐溶液中进行稀释,使其终浓度为2~6 $\mu$ g/mL, 4 $^{\circ}$ C储存备用;取微孔板,每孔加入100 $\mu$ L稀释后的可溶性ST2单克隆抗体,覆膜后置于4 $^{\circ}$ C包被18~22小时;甩去孔内液体,每孔加入200 $\mu$ L内含1~3%牛血清白蛋白、3~5%蔗糖、0.05~0.15% Priclin300的0.01mol/L, pH=7.4的磷酸盐溶液,覆膜后置于4 $^{\circ}$ C封闭18~22小时;甩去孔内液体,并在吸水纸上拍干,室温(18-25 $^{\circ}$ C)下干燥2~4天后真空密封包装,得到可溶性ST2单克隆抗体包被的微孔反应板,所述微孔反应板保存于4 $^{\circ}$ C。

[0019] 3) 制备辣根过氧化物酶标记的可溶性ST2单克隆抗体:称取辣根过氧化物酶2mg,溶解于1mL去离子水中,加入1~2mL浓度为0.05mol/L的过碘酸钠溶液,4 $^{\circ}$ C缓慢摇动30~60min;②用浓度为0.001mol/L, pH=4.4的醋酸钠溶液透析18~22小时;③加入2mg可溶性ST2单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C避光振荡18~22小时;④加入400 $\mu$ L浓度为0.2mol/L的NaBH<sub>4</sub>溶液,用浓度为0.02mol/L, pH=7.4的磷酸缓冲液透析18~22小时;⑤用HPLC二次纯化,收集蛋白峰,加入等体积甘油,得到辣根过氧化物酶标记的可溶性ST2单克隆抗体,于-20 $^{\circ}$ C保存。

[0020] 4) 制备样本稀释液:取磷酸二氢钠1.409g、磷酸氢二钠4.372g、氯化钠8.5g、牛血清白蛋白5g、吐温-20 0.5mL、加水定容至1L,用氢氧化钠调pH至7.4 $\pm$ 0.1;

[0021] 5) 制备洗涤液:取磷酸二氢钠28.18g、磷酸氢二钠87.44g、氯化钠170g、吐温-20 10mL,加水定容至1L,使用时用水稀释20倍;

[0022] 6) 制备显色液:(1)称取100g TMB,用10mL DMSO和10mL无水乙醇配成的混合液溶解,4 $^{\circ}$ C避光保存备用;

[0023] (2)配制0.1mol/L pH4.0~5.0的柠檬酸溶液;

[0024] (3)向1000mL所述步骤(2)配制的柠檬酸溶液中加入100~200mg过氧化氢尿素;

[0025] (4)溶解充分后,加入PVP,使其终浓度为0.2~0.6%,4 $^{\circ}$ C放置18~22小时;

[0026] (5)加入所述步骤(1)事先溶解的TMB混合液,并加入2~4%聚乙二醇,加水定容至1000mL,4 $^{\circ}$ C避光保存;

[0027] 7) 制备终止液:量取50mL浓硫酸沿烧杯壁缓慢地注入870mL水中,混匀,使其被稀释18.4倍,4 $^{\circ}$ C保存。

[0028] 优选的,所述六个浓度点的可溶性ST2标准品浓度依次为0ng/ml、6.4ng/ml、16ng/ml、40ng/ml、100ng/ml、200ng/ml;所述低值范围质控品和高值范围质控品的浓度分别为30ng/ml、60ng/ml。

[0029] 其中,步骤7)中的终止液可由1mol/L的盐酸代替。

[0030] 本发明的可溶性ST2酶联免疫检测试剂盒,采用双抗体夹心酶联免疫法,试剂盒中的多种不同浓度的可溶性ST2标准品无需进行稀释处理可以直接使用,简化了操作步骤,缩短了检测时间,实现了高效、快速检测,同时可溶性ST2质控品可以鉴定检测结果是否准确,多个不同浓度的可溶性ST2标准品可以得到不同规格的检测试剂盒,适应不同客户的使用需求;试剂盒中的微孔反应板使用的可溶性ST2单克隆抗体具有高度特异性,且可溶性ST2标准品可以实现对人体血清样本中的可溶性ST2蛋白分子进行专一的定量检测;提供的6个不同浓度的可溶性ST2标准品可以得到标准曲线,根据标准曲线可以得到待测样品中人可

溶性ST2的浓度；试剂盒可与全自动酶联反应分析仪相结合，可以进一步有效缩短检测时间，降低检测成本和人力花费。

### 附图说明

[0031] 图1本发明实施例试剂盒组装产品示意图；

[0032] 其中，1、微孔反应板，2、酶标记物，3、浓度为0ng/mL的可溶性ST2标准品，4、浓度为6.4ng/mL的可溶性ST2标准品，5、浓度为16ng/mL的可溶性ST2标准品，6、浓度为40ng/mL的可溶性ST2标准品，7、浓度为100ng/mL的可溶性ST2标准品，8、浓度为200ng/mL的可溶性ST2标准品，9、浓度为24-36ng/mL的可溶性ST2质控品，10、浓度为48-72ng/mL可溶性ST2质控品，11、样本稀释液，12、显色液，13、终止液，14、洗涤液，15、试剂盒外包装。

### 具体实施方式

[0033] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合具体实施方式对本发明进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施方式仅仅用以解释本发明，但并不用于限定本发明。

[0034] 如图1所示，一种可溶性ST2酶联免疫检测试剂盒，包含有微孔反应板1、酶标记物2、样本稀释液11、显色液12、终止液13、洗涤液14、可溶性ST2标准品、可溶性ST2质控品，

[0035] 其中，酶标记物2为辣根过氧化物酶标记的可溶性ST2单克隆抗体，可溶性ST2标准品是以胎牛血清处理基质对人可溶性ST2重组抗原进行稀释得到，可溶性ST2质控品是以胎牛血清处理基质对人可溶性ST2重组抗原进行稀释得到，如图1中所示的浓度为24-36ng/mL的可溶性ST2质控品9、浓度为48-72ng/mL可溶性ST2质控品10；微孔反应板1为包被可溶性ST2单克隆抗体；本试剂盒中的6个不同浓度可溶性ST2标准品可以直接使用绘制标准曲线，根据样品的OD值由标准曲线得到样品对应的浓度，可溶性ST2质控品用来鉴定检测结果是否准确，酶标记物2也无需稀释处理，操作简单，可以有效缩短检测时间，进而降低检测成本和人力花费。

[0036] 如图1中所示，以试剂盒包含的浓度为0ng/mL的可溶性ST2标准品3、浓度为6.4ng/mL的可溶性ST2标准品4、浓度为16ng/mL的可溶性ST2标准品5、浓度为40ng/mL的可溶性ST2标准品6、浓度为100ng/mL的可溶性ST2标准品7、浓度为200ng/mL的可溶性ST2标准品8得到标准曲线，能够对人体血清样本中的可溶性ST2蛋白分子进行专一定量检测。

[0037] 上述胎牛血清处理基质的制备方法为：取适量研细后的硫酸铵于室温（18-25℃）下边搅拌边加入胎牛血清中，使其终浓度为100~300g/L，4℃放置18~22小时；10,000转离心20~40分钟，取上清液滤纸过滤；将滤后上清液装透析袋，于4℃下在10倍体积的生理盐水中透析，每隔3~5小时更换一次透析液，一共三次；转入10体积的0.05mol/L硼酸溶液中进行透析，每隔3~5小时更换一次透析液，一共四次；将透析后的液体放入干净容器内，于56℃热灭活1~2小时；加入0.05~0.15%的Proclin300和0.05~0.15%的庆大霉素，混合均匀后用0.22μm滤膜过滤除菌得到胎牛血清，于-20℃下保存待用。

[0038] 实施例1

[0039] 一种可溶性ST2酶联免疫检测试剂盒的制备方法，包括如下步骤：1) 制备可溶性ST2标准品和质控品：取适量研细后的硫酸铵于室温（18-25℃）下边搅拌边加入胎牛血清

中,使其终浓度为100g/L,4℃放置18小时;10,000转离心20分钟,取上清液滤纸过滤;将滤后上清液装透析袋,于4℃下在10倍体积的生理盐水中透析,每隔3小时更换一次透析液,一共三次;转入10体积的0.05mol/L硼酸溶液中进行透析,每隔3小时更换一次透析液,一共四次;将透析后的液体放入干净容器内,于56℃热灭活1小时;加入0.05%的Proclin300和0.05%的庆大霉素,混合均匀后用0.22 $\mu$ m滤膜过滤除菌得到胎牛血清处理基质,于-20℃下保存待用;使用上述制备得到的胎牛血清处理基质将人可溶性ST2重组抗原稀释得到6个不同浓度依次为0ng/ml、6.4ng/ml、16ng/ml、40ng/ml、100ng/ml、200ng/ml的可溶性ST2标准品,同时使用胎牛血清处理基质将人可溶性ST2重组抗原稀释得到浓度为30ng/ml低值范围质控品和浓度为60ng/ml高值范围质控品;

[0040] 2) 制备可溶性ST2单克隆抗体包被的微孔反应板:吸取适量可溶性ST2单克隆抗体,加入0.01mol/L, pH=7.2的磷酸盐溶液中进行稀释,使其终浓度为2 $\mu$ g/mL,4℃储存备用;取微孔板,每孔加入100 $\mu$ L稀释后的可溶性ST2单克隆抗体,覆膜后置于4℃包被18小时;甩去孔内液体,每孔加入200 $\mu$ L内含1%牛血清白蛋白、3%蔗糖、0.05%Princlin300的0.01mol/L, pH=7.4的磷酸盐溶液,覆膜后置于4℃封闭18小时;甩去孔内液体,并在吸水纸上拍干,室温(18-25℃)下干燥2天后真空密封包装,得到可溶性ST2单克隆抗体包被的微孔反应板,所述微孔反应板保存于4℃;

[0041] 3) 制备辣根过氧化物酶标记的可溶性ST2单克隆抗体:称取辣根过氧化物酶2mg,溶解于1mL去离子水中,加入1mL浓度为0.05mol/L的过碘酸钠溶液,4℃缓慢摇动30min;用浓度为0.001mol/L, pH=4.4的醋酸钠溶液透析18小时;加入2mg可溶性ST2单克隆抗体,4℃避光振荡18小时;加入400 $\mu$ L浓度为0.2mol/L的NaBH<sub>4</sub>溶液,用浓度为0.02mol/L, pH=7.4的磷酸缓冲液透析18小时;⑤用HPLC二次纯化,收集蛋白峰,加入等体积甘油,得到辣根过氧化物酶标记的可溶性单克隆抗体,于-20℃保存;

[0042] 4) 制备样本稀释液:取磷酸二氢钠1.409g、磷酸氢二钠4.372g、氯化钠8.5g、牛血清白蛋白5g、吐温-20 0.5mL、加水定容至1L,用氢氧化钠调pH至7.4 $\pm$ 0.1;

[0043] 5) 制备洗涤液:取磷酸二氢钠28.18g、磷酸氢二钠87.44g、氯化钠170g、吐温-20 10mL,加水定容至1L,使用时用水稀释20倍;

[0044] 6) 制备显色液:(1)称取100g TMB,用10mL DMSO和10mL无水乙醇配成的混合液溶解,4℃避光保存备用;

[0045] (2)配制0.1mol/L, pH=4.0的柠檬酸溶液;

[0046] (3)向1000mL所述步骤(2)配制的柠檬酸溶液中加入100mg过氧化氢尿素;

[0047] (4)溶解充分后,加入PVP,使其终浓度为0.2%,4℃放置18小时;

[0048] (5)加入所述步骤(1)事先溶解的TMB混合液,并加入2%聚乙二醇,加水定容至1000mL,4℃避光保存;

[0049] 7) 制备终止液:量取50mL浓硫酸沿烧杯壁缓慢地注入870mL水中,混匀,使其被稀释18.4倍,4℃保存。

[0050] 实施例2

[0051] 一种可溶性ST2酶联免疫检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:1) 制备可溶性ST2标准品和质控品:取适量研细后的硫酸铵于室温(18-25℃)下边搅拌边加入胎牛血清中,使其终浓度为200g/L,4℃放置20小时;10,000转离心30分钟,取上清液滤纸过滤;将滤

后上清液装透析袋,于4℃下在10倍体积的生理盐水中透析,每隔4小时更换一次透析液,一共三次;转入10体积的0.05mol/L硼酸溶液中进行透析,每隔4小时更换一次透析液,一共四次;将透析后的液体放入干净容器内,于56℃热灭活1.5小时;加入0.1%的Proclin300和0.1%的庆大霉素,混合均匀后用0.22μm滤膜过滤除菌得到胎牛血清处理基质,于-20℃下保存待用;使用上述制备得到的胎牛血清处理基质将人可溶性ST2重组抗原稀释得到6个不同浓度依次为0ng/ml、6.4ng/ml、16ng/ml、40ng/ml、100ng/ml、200ng/ml的可溶性ST2标准品,同时使用胎牛血清处理基质将人可溶性ST2重组抗原稀释得到浓度为30ng/ml低值范围质控品和浓度为60ng/ml高值范围质控品;

[0052] 2) 制备可溶性ST2单克隆抗体包被的微孔反应板:吸取适量可溶性ST2单克隆抗体,加入0.01mol/L, pH=7.2的磷酸盐溶液中进行稀释,使其终浓度为4μg/mL, 4℃储存备用;取微孔板,每孔加入100μL稀释后的可溶性ST2单克隆抗体,覆膜后置于4℃包被20小时;甩去孔内液体,每孔加入200μL内含2%牛血清白蛋白、4%蔗糖、0.1%Proclin300的0.01mol/L, pH=7.4的磷酸盐溶液,覆膜后置于4℃封闭20小时;甩去孔内液体,并在吸水纸上拍干,室温(18-25℃)下干燥3天后真空密封包装,得到可溶性ST2单克隆抗体包被的微孔反应板,所述微孔反应板保存于4℃;

[0053] 3) 制备辣根过氧化物酶标记的可溶性ST2单克隆抗体:称取辣根过氧化物酶2mg,溶解于1mL去离子水中,加入1.5mL浓度为0.05mol/L的过碘酸钠溶液,4℃缓慢摇动45min;用浓度为0.001mol/L, pH=4.4的醋酸钠溶液透析20小时;加入2mg可溶性ST2单克隆抗体,4℃避光振荡20小时;加入400μL浓度为0.2mol/L的NaBH<sub>4</sub>溶液,用浓度为0.02mol/L, pH=7.4的磷酸缓冲液透析20小时;⑤用HPLC二次纯化,收集蛋白峰,加入等体积甘油,得到辣根过氧化物酶标记的可溶性单克隆抗体,于-20℃保存;

[0054] 4) 制备样本稀释液:取磷酸二氢钠1.409g、磷酸氢二钠4.372g、氯化钠8.5g、牛血清白蛋白5g、吐温-20 0.5mL、加水定容至1L,用氢氧化钠调pH至7.4±0.1;

[0055] 5) 制备洗涤液:取磷酸二氢钠28.18g、磷酸氢二钠87.44g、氯化钠170g、吐温-20 10mL,加水定容至1L,使用时用水稀释20倍;

[0056] 6) 制备显色液:(1)称取100g TMB,用10mL DMSO和10mL无水乙醇配成的混合液溶解,4℃避光保存备用;

[0057] (2)配制0.1mol/L, pH=4.5的柠檬酸溶液;

[0058] (3)向1000mL所述步骤(2)配制的柠檬酸溶液中加入150mg过氧化氢尿素;

[0059] (4)溶解充分后,加入PVP,使其终浓度为0.4%,4℃放置20小时;

[0060] (5)加入所述步骤(1)事先溶解的TMB混合液,并加入3%聚乙二醇,加水定容至1000mL,4℃避光保存;

[0061] 7) 制备终止液:量取50mL浓硫酸沿烧杯壁缓慢地注入870mL水中,混匀,使其被稀释18.4倍,4℃保存。

[0062] 实施例3

[0063] 一种可溶性ST2酶联免疫检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:1) 制备可溶性ST2标准品和质控品:取适量研细后的硫酸铵于室温(18-25℃)下边搅拌边加入胎牛血清中,使其终浓度为300g/L,4℃放置22小时;10,000转离心40分钟,取上清液滤纸过滤;将滤后上清液装透析袋,于4℃下在10倍体积的生理盐水中透析,每隔5小时更换一次透析液,一

共三次；转入10体积的0.05mol/L硼酸溶液中进行透析，每隔5小时更换一次透析液，一共四次；将透析后的液体放入干净容器内，于56℃热灭活2小时；加入0.15%的Proclin300和0.15%的庆大霉素，混合均匀后用0.22μm滤膜过滤除菌得到胎牛血清处理基质，于-20℃下保存待用；使用上述制备得到的胎牛血清处理基质将人可溶性ST2重组抗原稀释得到6个不同浓度依次为0ng/ml、6.4ng/ml、16ng/ml、40ng/ml、100ng/ml、200ng/ml的可溶性ST2标准品，同时使用胎牛血清处理基质将人可溶性ST2重组抗原稀释得到浓度为30ng/ml低值范围质控品和浓度为60ng/ml高值范围质控品；

[0064] 2) 制备可溶性ST2单克隆抗体包被的微孔反应板：吸取适量可溶性ST2单克隆抗体，加入0.01mol/L，pH=7.2的磷酸盐溶液中进行稀释，使其终浓度为6μg/mL，4℃储存备用；取微孔板，每孔加入100μL稀释后的可溶性ST2单克隆抗体，覆膜后置于4℃包被22小时；甩去孔内液体，每孔加入200μL内含3%牛血清白蛋白、5%蔗糖、0.15%Princlin300的0.01mol/L，pH=7.4的磷酸盐溶液，覆膜后置于4℃封闭22小时；甩去孔内液体，并在吸水纸上拍干，室温(18-25℃)下干燥4天后真空密封包装，得到可溶性ST2单克隆抗体包被的微孔反应板，所述微孔反应板保存于4℃。

[0065] 3) 制备辣根过氧化物酶标记的可溶性ST2单克隆抗体：称取辣根过氧化物酶2mg，溶解于1mL去离子水中，加入2mL浓度为0.05mol/L的过碘酸钠溶液，4℃缓慢摇动60min；用浓度为0.001mol/L，pH=4.4的醋酸钠溶液透析22小时；加入2mg可溶性ST2单克隆抗体，4℃避光振荡22小时；加入400μL浓度为0.2mol/L的NaBH<sub>4</sub>溶液，用浓度为0.02mol/L，pH=7.4的磷酸缓冲液透析22小时；⑤用HPLC二次纯化，收集蛋白峰，加入等体积甘油，得到辣根过氧化物酶标记的可溶性单克隆抗体，于-20℃保存。

[0066] 4) 制备样本稀释液：取磷酸二氢钠1.409g、磷酸氢二钠4.372g、氯化钠8.5g、牛血清白蛋白5g、吐温-20 0.5mL、加水定容至1L，用氢氧化钠调pH至7.4±0.1；

[0067] 5) 制备洗涤液：取磷酸二氢钠28.18g、磷酸氢二钠87.44g、氯化钠170g、吐温-20 10mL，加水定容至1L，使用时稀释20倍；

[0068] 6) 制备显色液：(1)称取100g TMB，用10mL DMSO和10mL无水乙醇配成的混合液溶解，4℃避光保存备用；

[0069] (2)配制0.1mol/L pH=5.0的柠檬酸溶液；

[0070] (3)向1000mL所述步骤(2)配制的柠檬酸溶液中加入200mg过氧化氢尿素；

[0071] (4)溶解充分后，加入PVP，使其终浓度为0.6%，4℃放置22小时；

[0072] (5)加入所述步骤(1)事先溶解的TMB混合液，并加入4%聚乙二醇，加水定容至1000mL，4℃避光保存；

[0073] 7) 制备终止液：量取50mL浓硫酸沿烧杯壁缓慢地注入870mL水中，混匀，使其被稀释18.4倍，4℃保存。

[0074] 上述实施例1-3中，步骤7)中的终止液可由1mol/L的盐酸替换。

[0075] 本发明可溶性ST2酶联免疫试剂盒的检测原理为：采用双抗体夹心法测定可溶性ST2蛋白的浓度水平，用可溶性ST2单克隆抗体包被微孔反应板制成固相抗体，在微孔反应板中的不同孔中分别加入待测样本、不同浓度的可溶性ST2标准品、质控品，加入辣根过氧化物酶制成的酶标记物，温育后形成固相抗体-抗原-酶标抗体的复合物，充分洗涤后加入TMB显色液，然后加入终止液终止反应，以可溶性ST2标准品的OD值为纵坐标、浓度为横坐标

制作标准曲线,然后根据待测样本的OD值判定样本中含有的可溶性ST2的浓度。

[0076] 本发明可溶性ST2酶联免疫检测试剂盒的使用方法为:

[0077] (1)实验所需试剂及样本从冰箱中取出,在室温(18-25℃)下平衡30分钟;

[0078] (2)取一块微孔反应板,取出实验所需板条置于板架上,进行编号;

[0079] (3)取各个浓度的标准品、质控品及实验样本20 $\mu$ L分别加入相应编号的孔中;

[0080] (4)每孔加入80 $\mu$ L样本稀释液,振荡混匀30秒后覆膜并于37℃温育60分钟;

[0081] (5)除去孔内液体,每孔加入300 $\mu$ L事先20倍稀释的洗涤液,振荡30秒后除去洗液,重复4次,拍干残留液体;

[0082] (6)每孔加入100 $\mu$ L酶标记物,振荡混匀30秒后覆膜并于37℃温育30分钟;

[0083] (7)除去孔内液体,每孔加入300 $\mu$ L事先20倍稀释的洗涤液,振荡30秒后除去洗液,重复4次,拍干残留液体;

[0084] (8)每孔加入100 $\mu$ L显色液,混匀,37℃避光温育20分钟;

[0085] (9)每孔加入50 $\mu$ L终止液,振荡混匀30秒后用酶标仪在450纳米波长条件下测定各孔的OD值;

[0086] (10)以吸光度OD值为纵坐标(Y),相应的可溶性ST2标准品浓度为横坐标(X),通过四参数拟合方程做得相应的曲线,根据样本的OD值计算从标准曲线上读取样本中含有的ST2的含量。

[0087] 本发明检测试剂盒技术指标分析:

[0088] 试剂盒检测限 $\leq 2.0$ ng/mL,与同源类受体蛋白结构类似物无明显交叉反应,标准曲线满足临床标本所需的测量范围为6.4~200ng/mL。

[0089] 产品效果的研究数据:

[0090] 用本发明的检测试剂盒分别对一批经医院确诊的急性心力衰竭、慢性心力衰竭、急性冠脉综合征患者血清样本及正常人血清样本进行了测定试验,结果如下:

[0091]

| 组别       | 样本例数 | 检出阳性例数 | 阳性检出率  |
|----------|------|--------|--------|
| 急性心力衰竭组  | 54   | 54     | 100.0% |
| 慢性心力衰竭组  | 46   | 45     | 97.8%  |
| 急性冠脉综合征组 | 13   | 13     | 100.0% |
| 正常人组     | 135  | 1      | 0.7%   |

[0092] 从以上结果可以看出,本发明试剂盒对急性心力衰竭、慢性心力衰竭、急性冠脉综合征的阳性检出率分别可达100.0%、97.8%、100.0%,而对正常人检测的假阳性率为0.7%,因此本发明试剂盒对急性心力衰竭、慢性心力衰竭及急性冠脉综合征的临床辅助诊断具有十分重要的参考价值。

[0093] 本发明可溶性ST2标准品的浓度不局限于0ng/ml、6.4ng/ml、16ng/ml、40ng/ml、100ng/ml、200ng/ml六个浓度;可溶性ST2质控品的浓度范围不局限于24~36ng/ml、48~72ng/ml。通过调整可溶性ST2标准品和可溶性ST2质控品的浓度,同时按照上述方法制备微孔反应板、酶标记物、样本稀释液、洗涤液、显色液和终止液,可以制备出不同规格的检测可溶性ST2酶联免疫试剂盒。

[0094] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例

性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

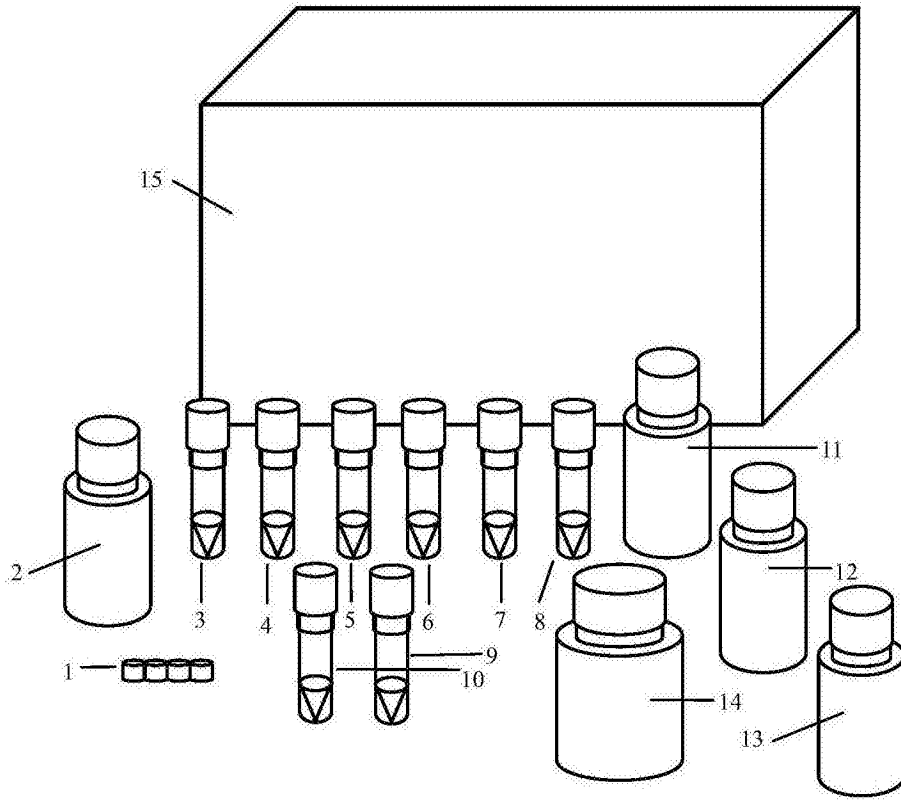


图1

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种可溶性ST2的酶联免疫检测试剂盒及其制备方法                       |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN106556705A</a>                   | 公开(公告)日 | 2017-04-05 |
| 申请号            | CN201611077983.4                               | 申请日     | 2016-11-30 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 天津康尔克生物科技有限公司                                  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 天津康尔克生物科技有限公司                                  |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 天津康尔克生物科技有限公司                                  |         |            |
| [标]发明人         | 兰成杰<br>单存海<br>陶剑                               |         |            |
| 发明人            | 兰成杰<br>单存海<br>陶剑                               |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/68 G01N33/531                           |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/531 G01N33/6893 G01N2800/325            |         |            |
| 其他公开文献         | CN106556705B                                   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明公开了一种可溶性ST2酶联免疫检测试剂盒，检测试剂盒包含有样本稀释液、洗涤液、显色液及终止液、酶标记物，所述酶标记物为辣根过氧化物酶标记的可溶性ST2单克隆抗体，所述检测试剂盒还包括：多个不同浓度的可溶性ST2标准品、可溶性ST2质控品、以及微孔反应板，所述微孔反应板包被可溶性ST2单克隆抗体。本发明的可溶性ST2酶联免疫检测试剂盒，试剂盒中的多种不同浓度的可溶性ST2标准品无需进行稀释处理可以直接使用，简化了操作步骤，缩短了检测时间，实现了高效、快速检测，同时可溶性ST2质控品可以鉴定检测结果是否准确，多个不同浓度的可溶性ST2标准品可以得到不同规格的检测试剂盒，适应不同客户的使用需求。

