



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110196336 A

(43)申请公布日 2019.09.03

(21)申请号 201910479870.4

(22)申请日 2019.06.04

(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 李磊 李冬梅 孙成艳 高威  
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 周蕾

(51)Int.Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

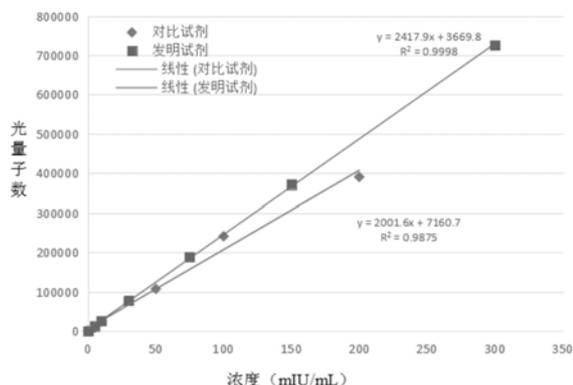
权利要求书2页 说明书11页 附图1页

## (54)发明名称

促红细胞生成素化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法

## (57)摘要

本发明涉及一种促红细胞生成素化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。所述试剂盒包括：链霉亲和素磁颗粒；化学发光标记物标记的EPO单克隆抗体；偶联标记物标记的EPO单克隆抗体。本发明的试剂盒以链霉亲和素磁颗粒作为固相载体，双抗体夹心原理进行检测，结合发光强度和灵敏度都较高的化学发光物质对EPO进行标记，采用过氧化氢化学发光体系，以双抗体夹心法实现对EPO的定量检测，该试剂盒选择吡啶酯为化学发光免疫分析系统的标记材料，该材料有激发态回到基态时产生的能量跃迁为直接化学发光，不需要酶的参与，节约时间及成本；采用链霉亲和素磁珠与生物素标记的类似物可以牢牢的结合在一起，减少非特异性吸附，提高测试样本的准确度，抗干扰能力强。



1. 一种促红细胞生成素化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,包括:  
链霉亲和素磁颗粒;  
化学发光标记物标记的促红细胞生成素单克隆抗体;  
偶联标记物标记的促红细胞生成素单克隆抗体。
2. 根据权利要求1所述的促红细胞生成素化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述链霉亲和素磁颗粒质量百分比为0.01%~1%。
3. 根据权利要求2所述的促红细胞生成素化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述链霉亲和素磁颗粒的粒径是0.05~3 $\mu$ m。
4. 根据权利要求1所述的促红细胞生成素化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述化学发光标记物标记的促红细胞生成素单克隆抗体中促红细胞生成素单克隆抗体与化学发光标记物的摩尔比为1:1~1:20,化学发光标记物标记的促红细胞生成素单克隆抗体的浓度为 $\geq 0.1\mu$ g/mL。
5. 根据权利要求4所述的促红细胞生成素化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述化学发光标记物为吡啶酯、鲁米诺、异鲁米诺或三联吡啶钼。
6. 根据权利要求1所述的促红细胞生成素化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述偶联标记物标记的促红细胞生成素单克隆抗体中促红细胞生成素单克隆抗体与偶联标记物的摩尔比为1:1~1:20,偶联标记物标记的促红细胞生成素单克隆抗体的浓度为 $\geq 0.7\mu$ g/mL。
7. 根据权利要求6所述的促红细胞生成素化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述偶联标记物为生物素。
8. 根据权利要求1所述的促红细胞生成素化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,还包括化学发光底物液,所述化学发光底物液包括A液和B液;所述A液为过氧化氢和硝酸溶液,B液为氢氧化钠溶液。
9. 根据权利要求1所述的促红细胞生成素化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,还包括促红细胞生成素校准品;所述校准品是将促红细胞生成素纯品用标准品稀释液配制成浓度分别为0.00mIU/mL、5mIU/mL、10mIU/mL、50mIU/mL、100mIU/mL和200mIU/mL的促红细胞生成素标准溶液。
10. 一种权利要求1-7任意一项所述的促红细胞生成素化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:  
步骤一:链霉亲和素磁颗粒的制备  
将链霉亲和素磁颗粒溶液和TBST溶液混匀后,放置在磁分离器上,直至上清液无混浊,弃上清,留取磁颗粒,清洗后在缓冲液中配成固相试剂;  
步骤二:化学发光标记物标记的促红细胞生成素单克隆抗体的制备  
将促红细胞生成素单克隆抗体放入离心管中离心,然后加入碳酸缓冲液,混匀后加入化学发光标记物溶液离心,将离心管密封后放入避光暗盒中,然后将暗盒放入气浴恒温振荡器中混匀,加入封闭液,放入气浴恒温振荡器中混匀,将封闭好的抗体经过纯化、收集,然后放入缓冲液中稀释,保存;  
步骤三:偶联标记物标记的促红细胞生成素单克隆抗体的制备  
将促红细胞生成素单克隆抗体放入离心管中离心,然后加入TRIS缓冲液,混匀后加入

偶联标记物溶液离心,反应后加入赖氨酸继续反应,最后将反应液用脱盐柱纯化、收集后放入缓冲液中稀释,保存。

## 促红细胞生成素化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于体外检测技术领域,具体涉及一种促红细胞生成素化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 促红细胞生成素(EPO)又称红细胞刺激因子,它是一种人体内源性糖蛋白激素,是一种集落刺激因子,生理功能主要是与红系祖细胞的表面受体结合,促进骨髓内红系定向干细胞分化为红系母细胞、有核红细胞的血红蛋白合成以及骨髓内网织红细胞和红细胞的释放。

[0003] 天然EPO是一种含唾液酸的酸性糖蛋白,分子量为34000,在胚胎早期,EPO由肝脏产生,出生以后主要转由肾脏产生。编码EPO的基因位于7号染色体,由165个氨基酸残基组成。EPO通过与EPO受体(EPOR)结合而产生生物学活性。研究发现EPO和EPOR可以在人、鼠以及其他成年动物的缺血、缺氧组织的组织细胞中表达。EPO的产生受组织氧合状态的调节,组织氧的降低可刺激肾脏和肝脏中EPO的产生并使其受体表达增高。EPO不仅可以改善肾病等患者的贫血症状,且可结合不同受体与发挥不同的生物学效应相关,从而表现出多种的生物学作用。

[0004] 定量检测血清或肝素血浆中的EPO,对贫血和红细胞增多症的诊断起辅助作用。目前我国获准上市的临床上使用的检测EPO试剂盒,其检测原理主要以酶联免疫法(ELISA)和辣根过氧化物酶联合鲁米诺类化合物化学发光。传统的酶联免疫法不仅操作繁琐,自动化程度低,受人为因素影响大,不利于在基层医院推及,而且特异性及灵敏性都有待提高。

### 发明内容

[0005] 本发明要解决现有技术中的技术问题,提供一种促红细胞生成素化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明的技术方案具体如下:

[0007] 本发明提供一种促红细胞生成素化学发光免疫检测试剂盒,包括:

[0008] 链霉亲和素磁颗粒;

[0009] 化学发光标记物标记的促红细胞生成素单克隆抗体;

[0010] 偶联标记物标记的促红细胞生成素单克隆抗体。

[0011] 在上述技术方案中,优选的是,链霉亲和素磁颗粒质量百分比为0.01%~1%。

[0012] 在上述技术方案中,优选的是,所述链霉亲和素磁颗粒的粒径是0.05~3 $\mu\text{m}$ 。

[0013] 在上述技术方案中,优选的是,所述化学发光标记物标记的促红细胞生成素单克隆抗体中促红细胞生成素单克隆抗体与化学发光标记物的摩尔比为1:1~1:20,化学发光标记物标记的促红细胞生成素单克隆抗体的浓度为 $\geq 0.1\mu\text{g/mL}$ 。

[0014] 在上述技术方案中,优选的是,所述化学发光标记物为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺或三联吡啶钡。

[0015] 在上述技术方案中,优选的是,所述偶联标记物标记的促红细胞生成素单克隆抗体中促红细胞生成素单克隆抗体与偶联标记物的摩尔比为1:1~1:20,偶联标记物标记的促红细胞生成素单克隆抗体的浓度为 $\geq 0.7\mu\text{g/mL}$ 。

[0016] 在上述技术方案中,优选的是,所述偶联标记物为生物素。

[0017] 在上述技术方案中,优选的是,所述的试剂盒还包括化学发光底物液,所述化学发光底物液包括A液和B液;所述A液为过氧化氢和硝酸溶液,B液为氢氧化钠溶液。

[0018] 在上述技术方案中,优选的是,所述的试剂盒还包括促红细胞生成素校准品;所述校准品是将促红细胞生成素纯品用标准品稀释液配制成浓度分别为0.00mIU/mL、5mIU/mL、10mIU/mL、50mIU/mL、100mIU/mL和200mIU/mL的促红细胞生成素标准溶液。

[0019] 本发明还提供一种促红细胞生成素化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0020] 步骤一:链霉亲和素磁颗粒的制备

[0021] 将链霉亲和素磁颗粒溶液和TBST溶液混匀后,放置在磁分离器上,直至上清液无混浊,弃上清,留取磁颗粒,清洗后在缓冲液中配成固相试剂;

[0022] 步骤二:化学发光标记物标记的促红细胞生成素单克隆抗体的制备

[0023] 将促红细胞生成素单克隆抗体放入离心管中离心,然后加入碳酸缓冲液,混匀后加入化学发光标记物溶液离心,将离心管密封后放入避光暗盒中,然后将暗盒放入气浴恒温振荡器中混匀,加入封闭液,放入气浴恒温振荡器中混匀,将封闭好的抗体经过纯化、收集,然后放入缓冲液中稀释,保存;

[0024] 步骤三:偶联标记物标记的促红细胞生成素单克隆抗体的制备

[0025] 将促红细胞生成素单克隆抗体放入离心管中离心,然后加入TRIS缓冲液,混匀后加入偶联标记物溶液离心,反应后加入赖氨酸继续反应,最后将反应液用脱盐柱纯化、收集后放入缓冲液中稀释,保存。

[0026] 本发明的有益效果是:

[0027] 本发明提供的促红细胞生成素化学发光免疫检测试剂盒,该试剂盒以链霉亲和素磁颗粒作为固相载体,双抗体夹心原理进行检测,结合发光强度和灵敏度都较高的化学发光物质对EPO进行标记,采用过氧化氢化学发光体系,以双抗体夹心法实现对EPO的定量检测,该试剂盒选择吖啶酯等化学发光标记物为化学发光免疫分析系统的标记材料,该材料有激发态回到基态时产生的能量跃迁为直接化学发光,不需要酶的参与,节约时间及成本;采用链霉亲和素磁珠与生物素标记的类似物可以牢牢的结合在一起,减少非特异性吸附,提高测试样本的准确度,抗干扰能力强。本发明的促红细胞生成素(EPO)化学发光免疫检测试剂盒为全自动的测量样本,并直接给出数值,减少人为操作误差,并且实现无人值守,缩短了临床检测所需的时间,同时检测精度较高,试剂与仪器组成封闭系统,系统误差小。

## 附图说明

[0028] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细说明。

[0029] 图1为实施例5得到的EPO标准曲线图与进口试剂比对示意图。

## 具体实施方式

[0030] 本发明的发明思想为：化学发光免疫测定 (CLIA) 是继酶免技术、放免技术、荧光免疫技术和时间分辨荧光免疫技术之后发展的一项新兴免疫测定技术。由于它既具有免疫反应的高度特异性，又具有发光反应的高敏感性，近年来已被国内外临床实验室及科研单位广泛应用于各种激素、特种蛋白及药物的监测和分析。该方法具有灵敏度高、特异性强、线性范围宽、操作简便、试剂稳定性好、操作简便、容易实现自动化的优点，是理想的临床微量生化检验分析手段。

[0031] 常见的化学发光体系有多种，最主要的有：HRP-鲁米诺系统、吖啶酯系统、电化学发光体系等。吖啶酯发光体系相对于其他体系而言具有其特殊的优点：首先吖啶酯标记工艺简单，标记物发光稳定，试剂盒有效期长，成本相对较低；且发光为闪光型，发光快速集中且强大，方便实现快速检测，检测的灵敏度和精密度都很高，对于仪器的要求简单，便于实现全自动化操作；其次，吖啶酯发光系统较为简单，碱性-过氧化氢就可以直接发光，不需要增强剂或者催化剂，干扰因素少，本底极低，信噪比很高。

[0032] 目前我国获准上市的临床检测促红细胞生成素 (EPO) 试剂盒检测原理主要以酶联免疫法 (ELISA) 和辣根过氧化物酶联合鲁米诺类化合物化学发光。传统的酶联免疫法不仅操作繁琐，自动化程度低，受人为因素影响大，不利于在基层医院推及，而且特异性及灵敏性都有待提高。目前 CLIA 发展迅速有取代 ELISA 而成为主流产品的趋势。但存在着国外的检测系统价格昂贵难以普及，国内的虽然价格便宜但灵敏度和检测的可靠性得不到保证之不足。

[0033] 基于以上情况，研制开发高特异性、高灵敏度的吖啶酯类促红细胞生成素 (EPO) 化学发光免疫分析试剂盒，定量检测血清或肝素血浆中的促红细胞生成激素 (EPO)，对贫血和红细胞增多症的诊断起辅助作用，从理论与实际意义上讲是切实可行，并有广泛市场前景。因此本发明提供一种促红细胞生成素化学发光免疫检测试剂盒。

[0034] 为了使本发明的优点、目的和方法更加详实易懂，下面结合附图和具体实施例对本发明的具体实施方式做详细的说明。在下面的描述中阐述了诸多细节以便于理解，但本发明可以以不同与描述的方式来实施。

[0035] 本发明首先提供一种促红细胞生成素化学发光免疫检测试剂盒，该试剂盒包括：

[0036] 链霉亲和素磁颗粒；

[0037] 化学发光标记物标记的促红细胞生成素单克隆抗体；

[0038] 偶联标记物标记的促红细胞生成素单克隆抗体。

[0039] 按照本发明，所述的试剂盒中，链霉亲和素磁颗粒质量百分比优选为 0.01%~1%，更优选为 0.072%。

[0040] 按照本发明，所述链霉亲和素磁颗粒的粒径优选为 0.05~3 $\mu\text{m}$ ，更优选为 3 $\mu\text{m}$ 。当链霉亲和素磁颗粒的粒径低于 0.05 $\mu\text{m}$  时，抗原或者抗体与磁珠结合率低，可能导致整体光量子数偏低；当链霉亲和素磁颗粒的粒径高于 3 $\mu\text{m}$  时，非特异性结合效果明显，可能导致试剂盒灵敏度差等。

[0041] 按照本发明，所述化学发光标记物标记的促红细胞生成素 (EPO) 单克隆抗体中，促红细胞生成素 (EPO) 单克隆抗体与化学发光标记物的摩尔比优选为 1:1~1:20，更优选为 1:3~1:20；化学发光标记物标记的促红细胞生成素 (EPO) 单克隆抗体的浓度为  $\geq 0.1\mu\text{g/mL}$ 。

所述化学发光标记物优选为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺或三联吡啶钌,更优选为吖啶酯。

[0042] 按照本发明,所述偶联标记物标记的促红细胞生成素(EPO)单克隆抗体中,促红细胞生成素(EPO)单克隆抗体与偶联标记物的摩尔比优选为1:1~1:20,更优选为1:5~1:20;偶联标记物标记的促红细胞生成素(EPO)单克隆抗体的浓度为 $\geq 0.7\mu\text{g/mL}$ ,所述偶联标记物优选为生物素。

[0043] 按照本发明,所述的试剂盒还包括化学发光底物液,所述化学发光底物液包括A液和B液;所述A液为过氧化氢和硝酸溶液,B液为氢氧化钠溶液。

[0044] 按照本发明,所述的试剂盒还包括促红细胞生成素(EPO)校准品。

[0045] 所述促红细胞生成素(EPO)校准品优选为将EPO纯品用标准品稀释液配制成浓度分别为0.00mIU/mL、5mIU/mL、10mIU/mL、30mIU/mL、75mIU/mL、150mIU/mL和300mIU/mL的促红细胞生成素(EPO)标准溶液。

[0046] 本发明还提供上述的促红细胞生成素(EPO)化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0047] 步骤一:链霉亲和素磁颗粒的制备

[0048] 将链霉亲和素磁颗粒溶液和TBST溶液混匀后,放置在磁分离器上,直至上清液无混浊,弃上清,留取磁颗粒,清洗后在缓冲液中配成固相试剂;

[0049] 所述的链霉亲和素磁颗粒溶液的浓度优选为50~100mg/mL;链霉亲和素磁颗粒溶液和TBST溶液的体积比优选为(0.5~1):(5~10);所述的混匀时间优选为10~15min,所述的缓冲液为50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300的缓冲液,pH6.5;或所述缓冲液为100mM PBS、0.1%吐温-20、0.1%Proclin300的缓冲液,pH7.2;所述的固相试剂的浓度优选为0.01%~1%,更优选为0.05%;所述的链霉亲和素磁颗粒溶液的来源为商购,选自安捷伦公司,货号PL6827-1006。

[0050] 步骤二:化学发光标记物标记的促红细胞生成素(EPO)单克隆抗体的制备

[0051] 将促红细胞生成素(EPO)单克隆抗体放入离心管中离心,优选在室温下离心10s~30s,保证抗体位于离心管底部位置,然后加入磷酸缓冲液,混匀后加入化学发光标记物溶液离心,所述的离心温度优选为室温,离心时间优选为0.5min~3min;将离心管密封后放入避光暗盒中,然后将暗盒放入气浴恒温振荡器(25℃)中混匀,所述的混匀时间优选为2~4h,加入封闭液,放入气浴恒温振荡器中混匀,所述的封闭时间优选为1~2h,将封闭好的抗体经过纯化、收集,然后放入缓冲液中稀释,保存;

[0052] 所述的促红细胞生成素(EPO)单克隆抗体与化学发光标记物的摩尔比优选为1:3~1:20;所述的化学发光标记物溶液的浓度优选为2~2.5mg/mL;所述的封闭液优选为赖氨酸,质量分数优选为20~25%;所述的缓冲液为50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300的缓冲液,pH6.5;或所述的缓冲液为100mM PBS、0.1%吐温-20、0.1%Proclin300的缓冲液,pH6.0;

[0053] 步骤三:偶联标记物标记的促红细胞生成素(EPO)单克隆抗体的制备

[0054] 将促红细胞生成素(EPO)单克隆抗体放入离心管中离心,确保抗体位于离心管底部位置,优选在室温下离心10s~30s,离心后加入TRIS缓冲液充分混匀,然后加入偶联标记物,用离心机室温条件下离心30s,2~8℃混匀,所述的混匀时间优选为2~4h,加入封闭液,放入气浴恒温振荡器中混匀(25℃),所述的封闭时间优选为1~2h,将封闭好的抗体经过纯化、

收集,然后放入缓冲液中稀释,保存;

[0055] 所述的促红细胞生成素 (EPO) 单克隆抗体与偶联标记物的摩尔比优选为1:5~1:20;所述的偶联标记物溶液的浓度优选为2-3mg/mL;所述的封闭液优选为赖氨酸,所述的偶联标记物的来源为商购,选自ACROBiosystems公司。所述的缓冲液为50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300的缓冲液,pH6.5;或所述的缓冲液为100mM PBS、0.1%吐温-20、0.1%Proclin300的缓冲液,pH6.0。

[0056] 本发明的促红细胞生成素 (EPO) 化学发光免疫检测试剂盒用于检测促红细胞生成素 (EPO) 时,利用全自动化学发光免疫分析仪 (CM180) 对促红细胞生成素 (EPO) 校准品进行检测,绘制标准曲线,内置于电脑软件;然后根据需求测试临床样本,根据样本的光量子数计算促红细胞生成素 (EPO) 的浓度;最后对促红细胞生成素 (EPO) 全自动化学发光免疫分析系统进行性能(灵敏度、线性、抗干扰/特异性)的评价。下面结合具体实施例对本发明做进一步详细的描述。

[0057] 实施例1:促红细胞生成素 (EPO) 化学发光免疫检测试剂盒的制备:

[0058] (1) 链霉亲和素磁颗粒悬浮液的制备:

[0059] 取浓度100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液0.5mL (50mg),加入10mL的TBST溶液充分混匀10min,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒。重复清洗3次后使用50mM MES、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液中配成磁珠浓度为0.05%的固相试剂,2~8℃保存

[0060] (2) 吡啶酯标记的促红细胞生成素 (EPO) 单克隆抗体的制备

[0061] 将250μg促红细胞生成素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PBS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5μL 2mg/mL吡啶酯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℃),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。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪上进行纯化(葡聚糖凝胶G25预装柱),用PB缓冲液洗脱,分步收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的吡啶酯标记的促红细胞生成素单克隆抗体浓溶液用50mM MES、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为0.1μg/mL,2~8℃保存。

[0062] (3) 生物素标记的促红细胞生成素 (EPO) 单克隆抗体制备工艺:

[0063] 将500μg促红细胞生成素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TRIS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入2mL 2mg/mL生物素的DMF溶液,用离心机室温条件下离心30s。2-8℃混匀3小时。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2h。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪(葡聚糖凝胶G250柱)纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的生物素标记的促红细胞生成素单克隆抗体浓溶液用50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为1.0μg/mL,2~8℃保存。

[0064] 实施例2促红细胞生成素 (EPO) 化学发光免疫检测试剂盒的制备:

[0065] (1) 链霉亲和素磁颗粒悬浮液的制备:

[0066] 取浓度是100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液0.72毫升(72mg),加入15mL的TBST溶

液充分混匀15min后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒。重复清洗3次后在100mM PBS、0.1%吐温-20、0.1%Proclin300,pH7.2的缓冲液中配成磁珠浓度为0.072%的固相试剂,2~8℃保存。

[0067] (2) 吡啶酯标记的促红细胞生成素(EPO)单克隆抗体的制备

[0068] 将500μg促红细胞生成素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30s)后加入TRIS冲溶液,充分混匀,混匀后加入15μL 2.5mg/mL吡啶酯DMF溶液,用离心机室温条件下离心45s。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(23℃),混匀3.5h。加入2mL 25%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(23℃),中速混匀,封闭时间为1.5h。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪上进行纯化(葡聚糖凝胶G25预装柱),用PB缓冲液洗脱,分步收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的吡啶酯标记的促红细胞生成素单克隆抗体浓溶液用100mM PBS、0.1%吐温-20、0.1%Proclin300,pH6.0的缓冲液稀释至终浓度为0.2μg/mL,2~8℃保存。

[0069] (3) 生物素标记的促红细胞生成素(EPO)单克隆抗体制备工艺:

[0070] 将750μg促红细胞生成素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)后加入磷酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5mL 3mg/mL生物素的DMF溶液,用离心机室温条件下离心45s。4℃混匀6小时。加入3mL 25%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(23℃),中速混匀,封闭时间为2h。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪(葡聚糖凝胶G250柱)纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的生物素标记的促红细胞生成素单克隆抗体浓溶液用100mM PBS、0.1%吐温-20、0.1%Proclin300,pH6.0的缓冲液稀释至终浓度为1.2μg/mL,2~8℃保存。

[0071] 实施例3促红细胞生成素(EPO)化学发光免疫检测试剂盒的制备:

[0072] (1) 链霉亲和素磁颗粒悬浮液的制备:

[0073] 取浓度100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液0.5mL(50mg),加入10mL的TBST溶液充分混匀10min,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒。重复清洗3次后使用50mM MES、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液中配成磁珠浓度为0.05%的固相试剂,2~8℃保存。

[0074] (2) 吡啶酯标记的促红细胞生成素(EPO)单克隆抗体的制备

[0075] 将250μg促红细胞生成素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PBS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5μL 2mg/mL吡啶酯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℃),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。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪上进行纯化(葡聚糖凝胶G25预装柱),用PB缓冲液洗脱,分步收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的吡啶酯标记的促红细胞生成素单克隆抗体浓溶液用50mM MES、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为0.4μg/mL,2~8℃保存。

[0076] (3) 生物素标记的促红细胞生成素(EPO)单克隆抗体制备工艺:

[0077] 将500μg促红细胞生成素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TRIS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入2mL 2mg/mL生物素的DMF溶液,用离心机室温条件下离心30s。2~8℃混匀4小时。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。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪(葡聚糖凝胶G250柱)纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的生物素标记的促红细胞生成素单克隆抗体浓溶液用50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为1.4μg/mL,2~8℃保存。

[0078] 对实施例1~3的促红细胞生成素(EPO)化学发光免疫检测试剂盒的性能进行评价。

[0079] 检测方法:以全自动化学发光免疫分析仪(CM180)为检测工具,方法学为双抗体夹心法,仪器依次加入10μL的血清样本,50μL吡啶酯标记的促红细胞生成素(EPO)单克隆抗体,50μL生物素标记的促红细胞生成素(EPO)单克隆抗体,孵育10min,然后加入40μL链霉亲和素磁颗粒。孵育10min后,进行磁分离。仪器将反应物送入暗室,一次加入发光底物液A液(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液和HNO<sub>3</sub>溶液)和B液(NaOH溶液)进行反应,采集光信号,记录发光值。

[0080] 以下为实施例1的促红细胞生成素(EPO)化学发光免疫检测试剂盒的评价数据,实施例2~3在样本不变的情况下,检测效果接近,不再赘述。

[0081] (1)空白限

[0082] 平行测定零值一级校准品或样本稀释液20次,记录其信号值,计算均数M和标准差SD,并计算M+2SD的值,测定相邻浓度一级校准品3次,记录其信号值,取平均值。根据零值一级校准品和相邻浓度一级校准品之间的浓度-信号值结果进行两点线性回归拟合出一次方程,M+2SD所对应的信号值带入方程,所得浓度即为空白限,结果应小于0.5mIU/mL。

[0083] 表1 EPO空白限测试数据

[0084]

测定次数	一级校准品 A	一级校准品 B
Rep1	199	13752
Rep2	120	13483
Rep3	199	13887
Rep4	120	
Rep5	130	
Rep6	123	
Rep7	126	
Rep8	118	
Rep9	151	
Rep10	160	
Rep11	146	
Rep12	153	/
Rep13	172	
Rep14	218	
Rep15	257	
Rep16	132	
Rep17	122	
Rep18	126	
Rep19	151	
Rep20	127	
测定均值	123	13707
样品	一级校准品 A	一级校准品 B
浓度 (mIU/mL)	0	5
标准差 (SD)	38	/
均值+2SD	200	/
检出限 (mIU/mL)	0.0283	

[0085] (2) 线性

[0086] 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。对每一浓度的样本均重复检测3次,计算平均值,将结果平均值和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合,计算线性相关系数 $r$ ,结果应符合要求(线性范围为0.5mIU/mL~300mIU/mL,线性相关系数 $r \geq 0.9900$ )。

[0087] 由表2EPO线性测试数据及图1EPO发明试剂及进口试剂标准曲线对比图可以看出,发明试剂与进口试剂相比具有更宽的线性范围,以及更高的线性线性相关系数,并且在低值范围内具有更高的分析灵敏度,进而可以保证在检测范围内提供更准确的检验结果。

[0088] 表2 EPO线性测试数据

[0089]

理论值 (mIU/mL)	L7	L6	L5	L4	L3	L2	L1	相关系数 (r)
	0.41	1.23	3.70	11.11	33.33	100.00	300.00	
测定值 (mIU/mL)	0.42	1.24	3.69	11.20	33.86	101.10	296.10	1.0000
发明试剂光 量子数	1300	3529	10048	29597	87197	253377	716102	0.9998
对比试剂光 量子数	1479	2712	6554	22070	71662	218024	485842	0.9935

[0090] (3) 重复性

[0091] 用低、高两种不同浓度的样本各重复检测10次,计算10次测量结果的平均值(M)和标准差(SD),按公式(2)计算变异系数(CV),变异系数(CV)应≤8.0%。

[0092]  $CV = SD/M \times 100\%$ ..... (2)

[0093] 式中:CV—变异系数;

[0094] SD—测量结果的标准差;

[0095] M—测量结果的平均值。

[0096] 表3 EPO重复性测试数据

[0097]

测定次数	低值样本 (mIU/mL)	高值样本 (mIU/mL)
Rep1	7.89	75.29
Rep2	7.88	76.73
Rep3	7.87	79.76
Rep4	7.86	77.17
Rep5	7.79	77.13
Rep6	7.72	77.13
Rep7	7.72	77.79
Rep8	7.59	71.83
Rep9	7.77	78.05
Rep10	7.85	77.02
测定均值M (mIU/mL)	7.79	76.79
SD	0.10	2.07
CV	1.23%	2.70%

[0098] (4) 批间差

[0099] 用3个批号试剂盒分别检测同一份低、高两种不同浓度样本,则3个批号试剂盒之间的批间变异系数(CV)≤15.0%。

[0100] 表4 EPO批间差测试数据

[0101]

测定次数	低值样本(mIU/mL)			高值样本(mIU/mL)		
	第一批	第二批	第三批	第一批	第二批	第三批
Rep1	7.89	7.29	7.56	75.29	71.38	70.46
Rep2	7.88	7.19	7.60	76.73	71.15	70.38
Rep3	7.87	7.23	7.88	79.76	72.31	72.85
Rep4	7.86	7.16	7.69	77.17	73.99	70.17
Rep5	7.79	6.97	7.75	77.13	73.63	70.46
Rep6	7.72	7.33	7.77	77.13	74.60	70.46
Rep7	7.72	7.33	7.67	77.79	74.78	69.75
Rep8	7.59	7.31	7.62	71.83	73.15	69.81
Rep9	7.77	7.23	7.74	78.05	73.93	68.24
Rep10	7.85	7.26	7.65	77.02	71.55	69.98
测定均值 M	7.57			73.36		
标准差 (SD)	0.27			3.12		
批间变异系数 (CV)	3.53%			4.25%		

[0102] (5) 热稳定性

[0103] 试剂盒在37℃条件下放置14天,校准品及临床光量子数衰减应 $\leq \pm 15\%$ 。

[0104] 表5热稳定性测试数据

[0105]

测试样本说明	理论浓度 (mIU/mL)	EPO 高温稳定性数据								
		零时间 2-8℃		14天 2-8℃			14天 37℃			
		平均光量子数	CV	平均光量子数	CV	与零时间比光量子数衰减率	平均光量子数	CV	与零时间光量子数衰减率	与2-8℃14天光量子数衰减率
生理盐水	0	210	33.14%	204	13.49%	-3.00%	223	11.11%	6.00%	9.28%
EPO 校准-1	0	119	6.73%	124	3.60%	4.95%	131	3.45%	10.47%	5.26%
EPO 校准-2	5	14169	1.84%	13629	0.44%	-3.81%	13899	2.13%	-1.90%	1.98%
EPO 校准-3	10	26764	0.89%	27294	2.62%	1.98%	28089	1.74%	4.95%	2.91%
EPO 校准-4	30	79015	1.31%	81339	0.72%	2.94%	73593	1.28%	-6.86%	-9.52%
EPO 校准-5	75	198906	0.59%	197411	1.16%	-0.75%	189434	2.51%	-4.76%	-4.04%
EPO 校准-6	150	386491	2.83%	367910	0.35%	-4.81%	393924	2.13%	1.92%	7.07%
EPO 校准-7	300	681749	0.52%	732518	0.95%	7.45%	761528	0.69%	11.70%	3.96%
平均衰减率		校准平均衰减		-3.39%		校准平均衰减		-3.05%		-3.50%
EPO 临床-1	8.52	22666	2.43%	23673	2.92%	4.44%	21893	0.75%	-3.41%	-7.52%
EPO 临床-2	36.2	93072	1.68%	88488	2.30%	-4.93%	91656	1.68%	-1.52%	3.58%
EPO 临床-3	91.35	229579	0.71%	218762	1.57%	-4.71%	212804	0.12%	-7.31%	-2.72%
EPO 临床-4	122.24	304740	1.14%	318645	0.71%	4.56%	311693	1.44%	2.28%	-2.18%

[0106]

EPO 临床-5	211.56	518280	0.71%	487549	2.29%	-5.93%	503463	0.73%	-2.86%	3.26%
平均衰减率		临床平均衰减		-5.20%		临床平均衰减		-6.45%		-5.01%

[0107] (6) 抗干扰

[0108] 检测结果不受黄疸(胆红素 $< 200\text{mg/L}$ )、溶血(血红蛋白 $< 512\text{mg/dL}$ )、高脂血症(症)

(脂肪乳剂 < 3000mg/dL、类风湿因子 (1500U/mL) 和生物素 (< 50mg/mL) 的影响。

[0109] 显然,上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例,而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

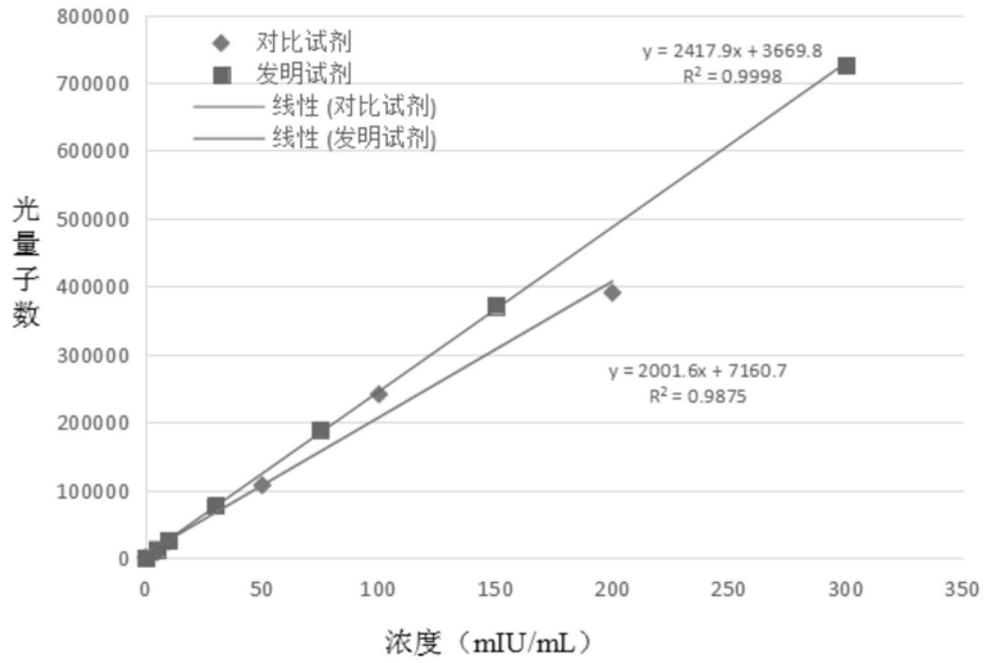


图1

专利名称(译)	促红细胞生成素化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110196336A</a>	公开(公告)日	2019-09-03
申请号	CN201910479870.4	申请日	2019-06-04
[标]发明人	李磊 李冬梅 孙成艳 高威 何浩会		
发明人	李磊 李冬梅 孙成艳 高威 何浩会		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/543 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/54326 G01N33/74		
代理人(译)	周蕾		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种促红细胞生成素化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。所述试剂盒包括：链霉亲和素磁颗粒；化学发光标记物标记的EPO单克隆抗体；偶联标记物标记的EPO单克隆抗体。本发明的试剂盒以链霉亲和素磁颗粒作为固相载体，双抗体夹心原理进行检测，结合发光强度和灵敏度都较高的化学发光物质对EPO进行标记，采用过氧化氢化学发光体系，以双抗体夹心法实现对EPO的定量检测，该试剂盒选择吡啶酯为化学发光免疫分析系统的标记材料，该材料有激发态回到基态时产生的能量跃迁为直接化学发光，不需要酶的参与，节约时间及成本；采用链霉亲和素磁珠与生物素标记的类似物可以牢牢的结合在一起，减少非特异性吸附，提高测试样本的准确度，抗干扰能力强。

