



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107345965 A

(43)申请公布日 2017. 11. 14

(21)申请号 201610293692.2

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2016.05.04

G01N 21/64(2006.01)

(71)申请人 广州优迪生物科技有限公司

地址 510663 广东省广州市高新技术产业
开发区科学城掬泉路3号广州国际企
业孵化器D区D502号

(72)发明人 李来庆 陈翠翠 刘晓柱 王珊霞
李康燕 梁焕坤 钟树海 程承武
刘细潘

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

代理人 胡辉

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

一种同时检测N-MID和 β -CTX的双标记时间
分辨荧光免疫分析方法

(57)摘要

本发明公开了一种同时检测N-MID和 β -CTX
的双标记时间分辨荧光免疫分析方法。本发明首
次利用TRFIA方法同时检测骨钙素N端中分子片
段N-MID和 β 胶原降解产物 β -CTX。 β -CTX可以判断
骨丢失率和骨破坏水平,是判断骨质疏松症有用
的筛选参数;联合检测N-MID,可以提高诊断的敏
感性和准确性。本发明方法较酶联免疫法更敏
感,更特异,同时针对两个标记物进行检测,可以
更好地检测骨质疏松。本发明的试剂盒可以同时
检测N-MID和 β -CTX,敏感性高、快速、简便、易于
临床推广。

1. 一种同时检测N-MID和 β -CTX的双标记时间分辨荧光免疫分析方法,其特征在于,包括下列步骤:

1)固相抗原的制备:分别将N-MID和 β -CTX的偶联抗原用包被缓冲液稀释至1~5 μ g/mL,包被酶联板,并用封闭液封闭;

2)镧系元素离子标记抗体的制备:分别采用不同的镧系元素离子标记N-MID或 β -CTX抗体,分离纯化;

3)测定方法:在步骤1)制备的含有两种偶联抗原的酶联板上,每孔依次加入N-MID和 β -CTX的标准品或者待测样品,补加分析缓冲液,室温震荡反应,洗涤液洗涤后,加入以分析缓冲液稀释的步骤2)制备的不同的镧系元素离子标记的N-MID或 β -CTX抗体,室温震荡反应后,洗涤液洗涤,最后加入增强液进行荧光检测。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤1)中N-MID抗原为人工合成骨钙素中部肽段,其氨基酸序列为 SEQ ID NO:1所示。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤1) β -CTX抗原为人工合成I型胶原 α 1链C末端肽段,其氨基酸序列为 SEQ ID NO:2所示。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤1)中所述的包被缓冲液为50mmol/L、pH 9.6的碳酸盐缓冲液;封闭液为1%的OVA溶液。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤1)中利用鸡卵白蛋白OVA作为载体蛋白偶联N-MID或 β -CTX抗原。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤2)中的N-MID或 β -CTX抗体是通过合成N-MID或 β -CTX,应用碳化二亚胺法将N-MID或 β -CTX与BSA偶联后作为免疫原,进行小鼠免疫,制备和筛选单克隆抗体。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤3)中所述的分析缓冲液为50mmol/L pH 7.8 Tris-HCl,每升含0.09% NaCl,0.02% BSA,0.05% Tween-20,0.05% Na₂CO₃。

8. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤3)中所述的洗涤液为含0.9% NaCl的50mmol/L的Tris-HCl浓缩液,按照1:25倍稀释使用。

9. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤3)中所述的标准品系列浓度为N-MID:0,0.01,0.1,1,10,100ng/mL ; β -CTX:0,0.1,1,10,100,1000 pg/mL。

10. 一种同时检测N-MID和 β -CTX的双标记时间分辨荧光免疫分析试剂盒,由以下成分组成:包被有两种偶联抗原的固相酶联板、洗涤液、分析缓冲液、增强液、不同的镧系元素离子标记的N-MID和 β -CTX抗体以及N-MID和 β -CTX参考标准品,上述组分如权利要求1-9任一项所述。

一种同时检测N-MID和 β -CTX的双标记时间分辨荧光免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明具体涉及一种同时检测N-MID和 β -CTX的双标记时间分辨荧光免疫分析方法。

背景技术

[0002] 骨质疏松是指骨量减少和骨的微结构的改变,导致骨的脆性增加,易发生骨折的代谢性疾病,骨骼疼痛、易于骨折为特征。骨质疏松症是一种年龄相关性疾病,人口老龄化程度越高,患病人数越多。我国至少7000万人口患有骨质疏松症,2.1亿人骨量低于正常标准,多发于处于生长发育期的青少年、妊娠期妇女、绝经期妇女和老年人中。因此,对骨质疏松患者的骨密度和骨代谢的生化指标进行研究,对全面了解骨骼代谢状态,预测骨折发生的危险性,指导临床治疗有十分重要的意义。

[0003] 骨代谢生化指标包括反映成骨细胞活性的骨形成指标和反映破骨细胞活性的骨吸收指标。骨钙素(BGP)属于 γ -羧谷氨酸包含蛋白类,此蛋白类为维生素K依赖性,主要由成骨细胞产生和分泌,其生理功能是维持骨的正常矿化速度,可直接反映骨形成的状况。血液标本放在室温下1小时后,骨钙素即会大量降解,其降解产物骨钙素N端中分子片段(N-MID)因其良好的稳定性和重复性,可代替骨钙素反应骨形成的状态。在骨基质的有机成分中,I型胶原的含量超过90%,受骨基质合成和分解的调控。在骨代谢的过程中成熟的I型胶原被降解成小分子片段进入血循环,并通过肾脏进行排泄。通过检测骨吸收指标,可了解骨转换的程度。 β 胶原降解产物(β -CTX)是反映I型胶原分解的特异性指标,当I型胶原结构、含量及稳定性发生异常,导致骨转换加快,I型胶原降解短肽片段进入血液循环, β -CTX明显升高,是世界上公认的代表骨吸收的标志物,检测血清 β -CTX适用于监测骨质疏松症或其它骨疾病的抗吸收治疗。

[0004] X射线骨密度测量仪测量骨密度因其无创伤性、敏感性和客观性成为骨质疏松症诊断的金标准,但其不能反应短时间内骨吸收和转移的改变而具有一定的局限性。生化检测具有简便、快捷、无创伤性等优点,在流行病学、长期跟踪随访及其预防性诊断方面具有明显优势。针对骨钙素的定量检测,市场上有酶联免疫吸附法和化学发光法为原理的定量检测试剂盒,但因骨钙素在血液中的不稳定性,使其检测的意义大打折扣;I型胶原作为骨基质的主要有机成分,只有降解后才能进入血液循环,故而没有针对I型胶原的生化检测方法。而针对单一成分N-MID和 β -CTX的检测产品,市场上只有广州菲康生物技术有限公司生产的“骨钙素N端中分子片段检测试剂盒(酶联免疫法)”和“血清 β -胶原降解产物检测试剂盒(酶联免疫法)”。只检测一种组分的方法以及试剂盒虽然从技术上来说更简单而且成本更低,但是其精确性和特异性等方面存在一定风险。

[0005] 目前市面上还没有针对两种成分N-MID和 β -CTX同时检测的产品。

发明内容

[0006] 本发明的目的是建立一种敏感性高、快速、简便、易于临床推广的、以同时检测N-MID和 β -CTX水平的双标记TRFIA-ELISA定量检测试剂盒及其制备方法。

[0007] 本发明所采取的技术方案是：

一种同时检测N-MID和 β -CTX的双标记时间分辨荧光免疫分析方法，包括下列步骤：

1)固相抗原的制备：分别将N-MID和 β -CTX的偶联抗原用包被缓冲液稀释至1~5 μ g/mL，包被酶联板，并用封闭液封闭；

2)镧系元素离子标记抗体的制备：分别采用不同的镧系元素离子标记N-MID或 β -CTX抗体，分离纯化；

3)测定方法：在步骤1)制备的含有两种偶联抗原的酶联板上，每孔依次加入N-MID和 β -CTX的标准品或者待测样品，补加分析缓冲液，室温震荡反应，洗涤液洗涤后，加入以分析缓冲液稀释的步骤2)制备的不同的镧系元素离子标记的N-MID或 β -CTX抗体，室温震荡反应后，洗涤液洗涤，最后加入增强液进行荧光检测。

[0008] 优选的，步骤1)中N-MID抗原为人工合成骨钙素中部第20-43位氨基酸组成的肽段，其氨基酸序列为 SEQ ID NO:1所示。

[0009] 优选的，步骤1) β -CTX抗原为人工合成I型胶原 α I链C末端8个氨基酸序列的肽段，其氨基酸序列为 SEQ ID NO:2所示。

[0010] 优选的，步骤1)中所述的包被缓冲液为50mmol/L、pH 9.6的碳酸盐缓冲液；封闭液为1%的OVA溶液。所述包被缓冲液是经过研发得到的最优选择，如果选择其他的缓冲液，如市售普通缓冲液，其效果都不如本发明选择的缓冲液效果好，比如信号弱，特异性和灵敏度都稍低。

[0011] 优选的，步骤1)中利用鸡卵白蛋白OVA作为载体蛋白偶联N-MID和 β -CTX抗原。OVA蛋白作为载体蛋白是最优选择。

[0012] 优选的，步骤2)中镧系元素离子选自Eu³⁺或Sm³⁺。

[0013] 优选的，步骤2)中的N-MID或 β -CTX抗体是通过合成N-MID或 β -CTX，应用碳化二亚胺法将N-MID或 β -CTX与BSA偶联后作为免疫原，进行小鼠免疫，制备和筛选单克隆抗体。

[0014] 优选的，步骤3)中所述的分析缓冲液为50mmol/L pH 7.8 Tris-HCl，每升含0.09% NaCl，0.02% BSA，0.05% Tween-20，0.05% NaN₃。

[0015] 优选的，步骤3)中用分析缓冲液将步骤2)制备的用不同的镧系元素离子标记的N-MID或 β -CTX抗体稀释至1~5 μ g/mL，然后加入100~200 μ I/孔。

[0016] 所述分析缓冲液是经过研发得到的最优选择，如果选择其他的缓冲液，如市售普通缓冲液，其效果都不如本发明选择的缓冲液效果好，比如信号弱，特异性和灵敏度都稍低。

[0017] 优选的，步骤3)中所述的洗涤液为含0.9% NaCl的50mmol/L的Tris-HCl浓缩液，按照1:25倍稀释使用。

[0018] 优选的，步骤3)中所述的标准品系列浓度为N-MID:0,0.01,0.1,1,10,100ng/mL； β -CTX:0,0.1,1,10,100,1000 pg/mL。

[0019] 优选的，增强液购自Perkin Elmer公司，主要成份是 β -NTA,TOPO,TritonX-100和醋酸。

[0020] 一种同时检测N-MID和 β -CTX的双标记时间分辨荧光免疫分析试剂盒，由以下成分

组成:包被有两种偶联抗原的固相酶联板、洗涤液、分析缓冲液、增强液、不同的镧系元素离子标记的N-MID和 β -CTX抗体以及N-MID和 β -CTX参考标准品,上述组分如上任一项所述。

[0021] 本发明的有益效果是:

本发明首次利用时间分辨荧光免疫分析方法(TRFIA)同时检测骨钙素N端中分子片段(N-MID)和 β 胶原降解产物(β -CTX)。N-MID和 β -CTX是反映骨形成和骨吸收的简便、快速、特异的生化指标。骨质疏松患者 β -CTX 升高同时N-MID 降低,表明患者体内成骨活性明显下降,同时伴随骨重吸收升高。 β -CTX 可以判断骨丢失率和骨破坏水平,是判断骨质疏松症有用的筛选参数;联合检测N-MID,可以提高诊断的敏感性和准确性。

[0022] 本发明方法较酶联免疫法更敏感,更特异,同时针对两个标记物进行检测,可以更好地检测骨质疏松。本发明的试剂盒可以同时检测N-MID和 β -CTX,敏感性高、快速、简便、易于临床推广。

附图说明

[0023] 图1为N-MID-BSA和 β -CTX-BSA偶联产物的电泳鉴定图,泳道1为BSA,泳道2为N-MID-BSA,泳道M为Marker,泳道3为BSA,泳道4为 β -CTX-BSA;

图2为双标记N-MID/ β -CTX-TRFIA标准曲线。

具体实施方式

[0024] 本发明的主要研究思路如下:

一、抗N-MID单克隆抗体的制备

利用基因工程技术,人工合成骨钙素中部第20-43位氨基酸组成的肽段(HN-Arg-Glu-VaI-Cys-Glu-Leu-Asn-Pro-Asn-Cys-Asp-Glu-Leu-Ala-Asp-His-Ile-Gly-Phe-Gln-Asp-Ala-Tyr-Lys-COOH),其氨基酸序列为 SEQ ID NO:1所示。应用碳化二亚胺法将上述肽链与BSA偶联后作为免疫原,进行BALB/C小鼠免疫。通过细胞融合技术进行单克隆抗体制备,筛选特异性强、亲和力高的抗N-MID单克隆抗体。

[0025] 二、抗N-MID抗体的筛选及检测条件的优化

从上述制备的抗N-MID单克隆抗体中,以竞争ELISA法为原理,制备包被原N-MID-OVA包被酶联板,加入的标准品或血清样本中的N-MID与包被原竞争标记有镧系元素的抗N-MID抗体,获得能特异结合N-MID靶蛋白的抗体数个。优化竞争ELISA检测条件:确定包被原和标记抗体浓度,确定洗涤液、洗涤强度和反应条件等,从而获得与N-MID高亲和力、高特异性的抗体。

[0026] 三、抗 β -CTX单克隆抗体的制备

利用基因工程技术,人工合成I型胶原 α I链C末端8个氨基酸序列的肽链(HN-Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg-COOH),其氨基酸序列为 SEQ ID NO:2所示。应用碳化二亚胺法将上述肽链与BSA偶联后作为免疫原,进行BALB/C小鼠免疫。通过细胞融合技术进行单克隆抗体制备,筛选特异性强、亲和力高的抗 β -CTX单克隆抗体。

[0027] 四、抗 β -CTX抗体的筛选及检测条件的优化

从上述制备的抗 β -CTX单克隆抗体中,以竞争ELISA法为原理,包被原 β -CTX-OVA包被酶联板,加入的标准品或血清样本中的 β -CTX与包被原竞争标记有镧系元素的抗 β -CTX抗体,

获得能特异结合 β -CTX靶肽的抗体数个。优化竞争ELISA检测条件:确定包被原和标记抗体浓度,确定洗涤液、洗涤强度和反应条件等,从而获得与 β -CTX高亲和力、高特异性的抗体。

[0028] 五、双标记TRFIA-ELISA方法的建立及评估

分别采用稀土离子 Eu^{3+} 和 Sm^{3+} 标记抗N-MID和 β -CTX的检测抗体,纯化标记后的抗体,优化最佳的包被抗体的包被比,建立双标记时间分辨荧光免疫法反应模式,通过N-MID和 β -CTX的参考标准品绘制标准曲线、进行精密度、灵敏度、特异性、稳定性分析等。对试剂盒进行各项性能评价并进行阴阳性样本的考核试验。

[0029] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明,但并不局限于此。

[0030] 实施例1 N-MID-BSA和 β -CTX-BSA偶联产物的制备和电泳鉴定

采用碳化二亚胺法把人工合成的肽段和大分子蛋白BSA偶联,经过0.01M的PBS透析除去未结合的小分子成分后,通过SDS凝胶电泳鉴定是否偶联成功。与标准BSA蛋白比较,偶联产物的条带发生滞后现象,则表明偶联产物的分子量增大,有物质结合在BSA表面,说明偶联成功。

[0031] 鉴定结果如图1所示,从图1中可以看出与标准蛋白BSA相比,N-MID-BSA和 β -CTX-BSA均发生了滞后现象,说明偶联成功,可以用于动物免疫制备单克隆抗体。

[0032] 实施例2 一种同时检测N-MID和 β -CTX的双标记时间分辨荧光免疫检测试剂盒其制备方法如下:

1. 固相包被抗原的制备:用50mmol/L、pH 9.6的碳酸盐缓冲液将N-MID-OVA和 β -CTX-OVA的包被原稀释成 $3\mu\text{g}/\text{mL}$, $100\mu\text{I}/\text{孔}$ 同时加入到96孔板中, 4°C 过夜,倾去包被液,加入封闭液, $200\mu\text{I}/\text{孔}$,封闭过夜,倾去包被液,洗涤后拍干,真空 -20°C 冷冻保存。

[0033] 2. Eu^{3+} 和 Sm^{3+} 标记抗体的制备:将0.5mg标记抗体加入Millipore公司的带有滤膜的离心管中, $8000\text{r}/\text{min}$ 离心6min。再用标记缓冲液(50mmol/L, NaCO_3 ,pH 9.0)重复洗涤6次。将 $200\mu\text{I}$ 标记抗体和 $50\mu\text{g}$ 铕(或钐)标记试剂充分混匀,室温震荡过夜。

[0034] 3. Eu^{3+} 和 Sm^{3+} 标记抗体的纯化:标记完成后用Sephadex G-50层析柱分离纯化,洗脱液(含0.9% NaCl的50mmol/L的Tris-HCl)洗脱,同时收集流出液(1mL/管),逐管测量吸光度(A280),合并峰管,测定蛋白含量,根据 Eu^{3+} 和 Sm^{3+} 标记试剂盒说明书所提供的公式测定标记率和蛋白回收率。

[0035] 4. 参考标准品的配置:用含0.2%BSA,0.1% NaN_3 ,50mmol/L的Tris-HCl(pH 7.8)的标准品缓冲液将N-MID蛋白稀释成0,0.01,0.1,1,10,100 ng/mL系列参考标准溶液;将 β -CTX短肽稀释成0,0.1,1,10,100,1000 pg/mL系列参考标准溶液,每瓶1mL分装, 4°C 保存备用。

[0036] 5. 分析缓冲液:50mmol/L pH 7.8 Tris-HCl,每升含0.09% NaCl,0.02% BSA,0.05% Tween-20,0.05% NaN_3 。

[0037] 实施例3 一种同时检测N-MID和 β -CTX的双标记时间分辨荧光免疫分析方法

本发明采用实施例2中所述的试剂盒定量检测N-MID和 β -CTX,检测的操作步骤为:向包被酶联板上加入 $25\mu\text{I}$ N-MID/ β -CTX参考标准品或待测血清,再加入 $200\mu\text{I}$ 分析缓冲液,震荡温育1h,洗涤液洗涤4次,再加入以分析缓冲液1:50~100倍稀释的 Eu^{3+} -N-MID单克隆抗体与 Sm^{3+} - β -CTX单克隆抗体的混合物 $200\mu\text{I}/\text{孔}$,震荡温育1h,洗涤液洗涤6次,最后加入增强液 $200\mu\text{I}/\text{孔}$ 震荡5min后在时间分辨荧光检测仪上进行检测。

[0038] 下面对上述实施例中制备的试剂盒进行效果的检测。

[0039] 实施例4 双标记N-MID/ β -CTX-TRFIA标准曲线

双标记N-MID/ β -CTX-TRFIA标准曲线,见附图2,N-MID(图2A)和 β -CTX(图2B)标准曲线的相关系数分别为 $R^2=0.9977$ 和 $R^2=0.9946$ 表明线性相关性良好。以零参考标准品作为标本重复测量20次,计算其荧光均值 \bar{x} 及标准差 s , $\bar{x}+2s$ 所得的荧光值代入标准曲线方程计算得出N-MID的灵敏度为0.8 ng/mL, β -CTX的检测灵敏度为1pg/mL。

[0040] 实施例 5 特异性实验

选取几个类似的血清蛋白或者可能同时出现的蛋白,当作样品,用此试剂盒测定,结果见表1。

[0041] 表1 特异性实验

检测项目	N-MID	β -CTX	PTH	总维生素 D	P1NP	25(OH) $_2$ D $_3$
理论浓度	50	850	100	100	100	100
测定浓度	49.8	849.5	0.48	0.65	0.43	0.38

由表1可知:本试剂盒测定高浓度甲状旁腺素(PTH)、总维生素D、总I型胶原氨基端前肽(P1NP)和25-羟维生素D $_3$ (25(OH) $_2$ D $_3$)时,测定浓度均远低于理论浓度,说明该方法的特异性较好。

[0042] 实施例 6 精密度实验

采用本试剂盒对精确定量的高中低三个标准品浓度进行测定,各设置10各复孔。结果见表2。

[0043] 表2精密度实验

	N-MID				β -CTX			
	样本	平均值 (ng/ml)	标准差	变异系 数(%)	样本	平均值 (pg/ml)	标准差	变异系 数(%)
分析内 (n=10)	低	2.1	0.14	6.67	低	10.2	0.85	8.33
	中	49.3	4.42	8.97	中	485.3	35.86	7.39
	高	96.7	7.58	7.84	高	992.9	80.7	8.13
分析间 (n=10)	低	2.2	0.21	9.55	低	14.8	1.44	9.73
	中	52.7	5.12	9.72	中	511.6	49.08	9.59
	高	99.8	8.17	8.19	高	887.6	85.26	9.61

由表2可知:本试剂盒的批内变异系数和批间变异系数均 $\leq 10\%$,符合试剂盒规定要求。

[0044] 实施例7精确度实验(回收实验)

按照常规方法进行回收实验。结果见表3。

[0045] 表3回收实验

样本	N-MID			β-CTX		
	原始浓度 (ng/ml)	实际测定 值 (ng/ml)	回收率 (%)	原始浓度 (pg/ml)	实际测定 值 (pg/ml)	回收率 (%)
低	1.9	1.88	98.95	12.5	12.73	101.84
中	48.5	48.95	100.93	429.7	426.44	99.24
高	97.6	98.35	100.77	993.4	996.24	100.29
平均回 收率(%)	100.21			100.46		

由表3可知:N-MID高中低三个浓度的回收率在98.95-100.93%之间,平均回收率为100.21%;β-CTX高中低三个浓度的回收率在99.24-101.84%之间,平均回收率为100.46%。

[0046] 实施例 8健全性实验

把高浓度的N-MID和β-CTX阳性样品按照1:2~64倍比稀释后用本试剂盒测定,换算后的N-MID和β-CTX浓度非常接近。用上述倍比稀释的阳性样品代替N-MID和β-CTX蛋白参考标准品绘制标准曲线,其斜率与标准品的标准曲线斜率基本一致,表明N-MID/β-CTX-TRFIA具有良好的健全性。

[0047] 实施例 9临床应用实验

取南方医科大学附属南方医院248例X射线骨密度仪确诊的骨质疏松症患者晨起空腹血清,和189例健康成人晨起空腹血清。

[0048] 具体检测步骤:将N-MID和β-CTX的包被原同时包被在酶联板上,向包被酶联板中加入25 μI N-MID/β-CTX参考标准品或待测血清,再加入200μI分析缓冲液,震荡温育1h,洗涤液洗涤4次,再加入以分析缓冲液1:50~100倍稀释的 Eu³⁺- N-MID单克隆抗体与Sm³⁺-β-CTX单克隆抗体的混合物200μI/孔,震荡温育1h,洗涤液洗涤6次,最后加入增强液200μI/孔,震荡5min后在时间分辨荧光检测仪上进行检测。

[0049] 结果显示骨质疏松症患者血清中N-MID水平为28.6±15.2 ng/ml,β-CTX水平为463.7±224.2 pg/ml;健康成人血清N-MID水平为44.6±20.5 ng/ml,β-CTX水平为142.4±22.3 pg/ml。与健康成人相比,骨质疏松症患者N-MID水平降低,β-CTX水平升高,表明患者体内成骨活性明显下降,同时伴随骨重吸收升高,表现出典型的骨质疏松症患者的生理生化活动的变化。本试剂盒可用于骨质疏松症患者临床诊断和治疗过程中的动态检测。

[0050] 对比例1

选择市售单独检测的N-MID或β-CTX ELISA 试剂盒,和本发明试剂盒进行对比。结果发现:市售N-MID和β-CTX ELISA试剂盒的线性范围为3ng/ml和3pg/ml。而本发明的试剂盒中N-MID:线性范围:0-1000ng/ml,灵敏度1ng/ml;β-CTX:线性范围:0-1000pg/ml,灵敏度1pg/ml。所以市售单独检测的N-MID或β-CTX ELISA 试剂盒,其效果远远低于本发明实施例2所获得的试剂盒检测效果,其信号弱,特异性和灵敏度都稍低。

[0051]

上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

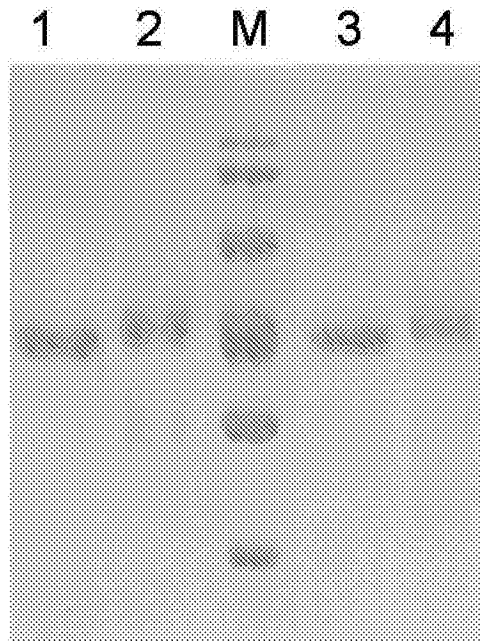


图1

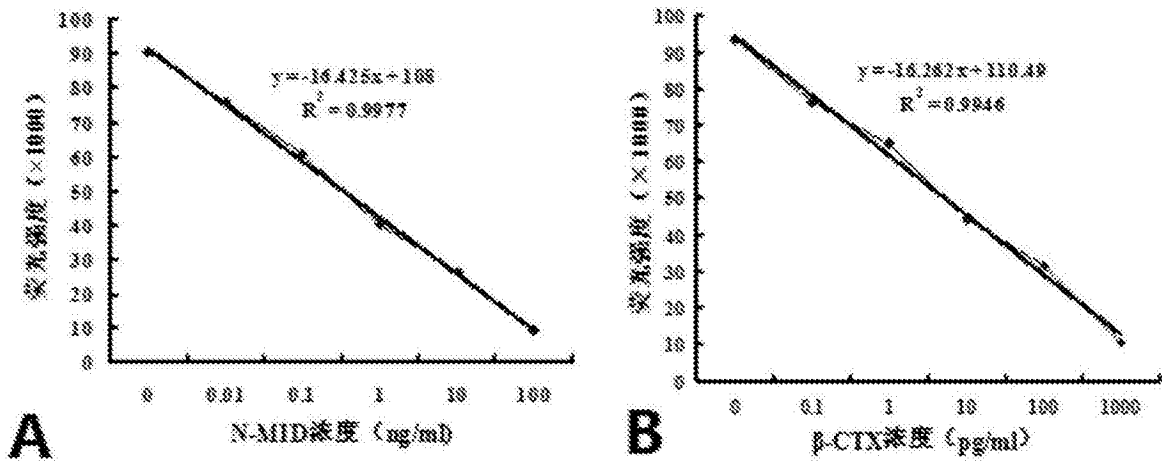


图2

专利名称(译)	一种同时检测N-MID和β-CTX的双标记时间分辨荧光免疫分析方法		
公开(公告)号	CN107345965A	公开(公告)日	2017-11-14
申请号	CN201610293692.2	申请日	2016-05-04
[标]申请(专利权)人(译)	广州优迪生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州优迪生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州优迪生物科技有限公司		
[标]发明人	李来庆 陈翠翠 刘晓柱 王珊霞 李康燕 梁焕坤 钟树海 程承武 刘细潘		
发明人	李来庆 陈翠翠 刘晓柱 王珊霞 李康燕 梁焕坤 钟树海 程承武 刘细潘		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/53 G01N33/68 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/577 G01N21/6486 G01N33/53 G01N33/6893 G01N2800/108		
代理人(译)	胡辉		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种同时检测N-MID和β-CTX的双标记时间分辨荧光免疫分析方法。本发明首次利用TRFIA方法同时检测骨钙素N端中分子片段N-MID和β胶原降解产物β-CTX。β-CTX可以判断骨丢失率和骨破坏水平，是判断骨质疏松症有用的筛选参数；联合检测N-MID，可以提高诊断的敏感性和准确性。本发明方法较酶联免疫法更敏感，更特异，同时针对两个标记物进行检测，可以更好地检测骨质疏松。本发明的试剂盒可以同时检测N-MID和β-CTX，敏感性高、快速、简便、易于临床推广。

样本	N-MID			β-CTX		
	原始浓度 (ng/ml)	实际测定 值 (ng/ml)	回收率 (%)	原始浓度 (pg/ml)	实际测定 值 (pg/ml)	回收率 (%)
低	1.9	1.88	98.95	12.5	12.73	101.84
中	48.5	48.95	100.93	429.7	426.44	99.24
高	97.6	98.35	100.77	993.4	996.24	100.29
平均回 收率(%)	100.21			100.46		