



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108982827 A

(43)申请公布日 2018.12.11

(21)申请号 201810666798.1

(22)申请日 2018.06.26

(71)申请人 浙江卓运生物科技有限公司

地址 315175 浙江省宁波市海曙区高桥镇
新庄路191号(浙江卓运生物科技有限
公司)

(72)发明人 梅义武 刘兴 叶佳颖

(74)专利代理机构 宁波市鄞州金源通汇专利事
务所(普通合伙) 33236

代理人 龚丹宇

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

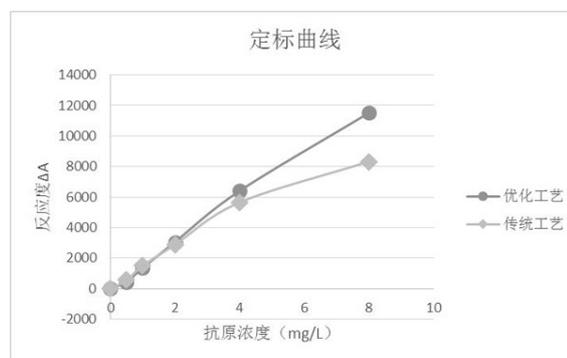
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种胶乳免疫比浊试剂

(57)摘要

本发明公开了一种胶乳免疫比浊试剂,包括反应试剂R1和反应试剂R2,所述反应试剂R2的生产步骤是先将质量分数为10%固含量的胶乳微球1ml,加入Buffer A 0.5-1mL混匀;然后加入10mg/ml的EDC 250-500 μ L进行活化反应,震荡10-30min;再加入Buffer B 10-20mL灭活EDC 0.5min得到胶乳液;接着将0.3-1ml抗体用Buffer B稀释,缓慢滴加至上述胶乳液中,震荡反应2-5h;封闭液封闭5-30min;最后加入Buffer B至终体积50mL,搅拌均匀即为反应试剂R2。本发明得到的胶乳免疫比浊试剂,其采用特殊的胶乳-抗体偶联工艺,不需要离心、超滤、透析分离纯化过程,具有非常高的偶联效率。



1. 一种胶乳免疫比浊试剂,其特征在于:包括反应试剂R1和反应试剂R2,所述反应试剂R1为磷酸盐缓冲液、HEPES缓冲液、Tris-HCl缓冲液、甘氨酸缓冲液中的一种或几种,其中盐离子浓度为50-200 mmol/L,pH为7.0-8.0,同时还含有质量分数为0.01-0.05%的防腐剂以及1-5%的增浊剂;

所述反应试剂R2的生产步骤是先将质量分数为10%固含量的胶乳微球1ml,加入Buffer A 0.5-1mL混匀;然后加入10mg/mL的EDC 250-500 μ L进行活化反应,震荡10-30min;再加入Buffer B 10-20mL灭活EDC 0.5min得到胶乳液;

接着将0.3-1ml抗体用Buffer B 稀释,缓慢滴加至上述胶乳液中,震荡反应2-5h,再封闭液封闭5-30min;最后加入Buffer B 至终体积为50mL,搅拌均匀即为反应试剂R2。

2. 根据权利要求1所述的胶乳免疫比浊试剂,其特征在于:所述Buffer A是pH为5-6,盐离子浓度为1-10%,含有MES或者HEPES的反应缓冲溶液。

3. 根据权利要求1所述的胶乳免疫比浊试剂,其特征在于:所述Buffer B是pH为6-8,盐离子浓度为1-10%,含有MES、HEPES、PBS或者Tris的保存缓冲溶液,同时还含有质量分数为0.1-0.5%的稳定性物质以及0.01-0.05%的防腐成分,其中稳定性物质为牛血清白蛋白、蔗糖、海藻糖或者甘油的一种或几种,防腐成分为Proclin300或者叠氮钠。

4. 根据权利要求1所述的胶乳免疫比浊试剂,其特征在于:所述反应试剂R1中的增浊剂为聚乙二醇6000或聚乙二醇8000,或者两种组合。

一种胶乳免疫比浊试剂

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物检测领域,特别是一种胶乳免疫比浊试剂。

背景技术

[0002] 胶乳免疫比浊法由于具有检测方法简单方便,线性范围宽,稳定性好,同时可在全自动生化仪上实现大量样品检测优点,已经越来越多的被应用于临床检测项目。胶乳免疫比浊法是通过采用物理吸附或共价键合的方式将抗体或抗原偶联到纳米微球的表面,形成微球-抗体(抗原)复合物。此复合物与样品中的抗原(抗体),通过抗体抗原反应,形成微球-抗体-抗原聚集颗粒,随着免疫反应的不断发生,聚集的颗粒不断增大,从而导致溶液在一定波长的吸光值发生显著的变化,通过测定免疫反应前后吸光度值的变化可以计算出样品中抗原(抗体)的浓度,从而达到检测和诊断疾病的目的。

[0003] 迄今,胶乳免疫比浊分析方法在临床中已经应用于检测脂蛋白a、抗链球菌溶血素“O”、类风湿因子、C-反应蛋白、 β 2-微球蛋白、 α 1-微球蛋白、D-二聚体、胱抑素C、肌钙蛋白、肌红蛋白、CK-MB、甲胎蛋白、糖化血红蛋白和前列腺特异性抗原等多种检测项目,诊断领域已涉及肿瘤、风湿、肝功能、肾功能多个领域,拥有广阔的应用前景。

[0004] 胶乳免疫比浊法一般采用双试剂,即反应试剂(R1)和反应试剂(R2),其中,R1为带有一定浓度促凝剂的缓冲溶液,R2为固定化抗体(或抗原)的胶乳微球溶液。R2是胶乳免疫比浊法的核心部分,对胶乳免疫比浊试剂的检测灵敏度、线性范围以及稳定性起决定作用。而在胶乳试剂R2的制备过程中,选择的胶乳微球以及在微球上固定化抗体(或抗原)的工艺决定了制备的胶乳试剂R2的性能。抗体(或抗原)在本质上都是蛋白质,将蛋白质偶联到胶乳微球上主要有两种方式,即物理吸附与化学偶联。物理吸附的蛋白质在长期储存过程中易从胶乳微球表面脱落,进而使检测灵敏度下降;化学偶联的蛋白质可被稳定固定在胶乳颗粒表面,目前的常规偶联方法是碳二亚胺法,但是此方法在偶联过程中易使胶乳微球聚集,不利于后续胶乳微球的处理。此外,在抗体与微球偶联后,需将残余抗体与偶联了抗体的胶乳微球分离,离心是现有报道的工艺中最常用的分离方法。但是离心分离残余抗体的方法容易导致偶联抗体的胶乳微球的聚集,需要采用超声分散方法将偶联抗体的胶乳微球重新悬浮分散。而在分散过程中容易导致抗体失活和从胶乳微球上的脱落,并且离心的方法不利于胶乳比浊试剂的放大生产。

发明内容

[0005] 本发明的目的是为了解决上述现有技术的不足而提供一种在制备过程中不需要离心、超滤、透析分离纯化过程的胶乳免疫比浊试剂。

[0006] 为了实现上述目的,本发明所设计的一种胶乳免疫比浊试剂,包括反应试剂R1和反应试剂R2,所述反应试剂R1为磷酸盐缓冲液、HEPES缓冲液、Tris-HCl缓冲液、甘氨酸缓冲液中的一种或几种,其中盐离子浓度为50-200mmol/L,pH为7.0-8.0,含质量分数为0.01-0.05%的防腐剂以及1-5%的增浊剂;

[0007] 所述反应试剂R2的生产步骤是先将质量分数为10%固含量的胶乳微球1ml,加入Buffer A 0.5-1mL混匀;然后加入10mg/ml的EDC 250-500 μ L进行活化反应,震荡10-30min;再加入Buffer B 10-20mL灭活EDC 0.5min得到胶乳液;

[0008] 接着将0.3-1ml抗体用Buffer B稀释,缓慢滴加至上述胶乳液中,震荡反应2-5h;封闭液封闭5-30min;最后加入Buffer B至终体积50mL,搅拌均匀即为反应试剂R2。

[0009] 所述Buffer A是pH为5-6,含KCl、NaCl、CaCl₂、MgCl₂等盐离子浓度为1-10%,含有MES或者HEPES的反应缓冲溶液。其中盐离子提供一定的离子强度以促进胶乳微球的活化反应,MES或者HEPES等成份提供一定的缓冲能力。

[0010] 所述Buffer B是pH为6-8,含KCl、NaCl、CaCl₂、MgCl₂等盐离子浓度为1-10%,含有MES、HEPES、PBS或者Tris的保存缓冲溶液。其中盐离子用来提供抗体-微球偶联反应必要的离子强度,MES、HEPES、PBS或者Tris等缓冲溶液提供反应的缓冲能力。同时还含有质量分数为0.1-0.5%的稳定性物质,质量分数为0.01-0.05%的防腐成分,其中稳定性物质为牛血清白蛋白、蔗糖、海藻糖或者甘油,可以对未结合抗体的微球表面进行封闭,维持免疫胶乳的稳定;防腐成分为Proclin300或者叠氮钠,抑制细菌等繁殖。

[0011] 所述反应试剂R1中的增浊剂为聚乙二醇6000或聚乙二醇8000,或者两种组合。

[0012] 本发明得到的胶乳免疫比浊试剂,其采用特殊的胶乳-抗体偶联工艺,不需要离心、超滤、透析分离纯化过程,具有非常高的偶联效率,其中蛋白偶联率达到98%以上,明显提高抗体原材料的利用率,可以较常规工艺减少20%-50%的抗体用量,降低试剂成本,并且大大缩减工艺过程,只需要3-5小时,即可完成生产,明显提高生产效率,并且无需离心机、超滤设备昂贵的分离纯化设备,进一步降低试剂开发成本,具有非常好的技术和市场前景。该胶乳免疫比浊试剂具体可用于胱抑素C (CYSC)、C-反应蛋白 (CRP)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL)、脂蛋白 (a)、 α 1-微球蛋白、 β 2-微球蛋白、视黄醇结合蛋白 (RBP) 等产品的生产。

附图说明

[0013] 图1是实施例的胶乳免疫比浊试剂的定标曲线图;

[0014] 图2是实施例的胶乳免疫比浊试剂的临床样本比对图;

[0015] 图3是实施例的胶乳免疫比浊试剂的稳定性测试图。

具体实施方式

[0016] 下面结合实施例对本发明进一步说明。

[0017] 实施例1:

[0018] 本实施例提供的胶乳免疫比浊试剂,包括反应试剂R1和反应试剂R2,所述反应试剂R1为磷酸盐缓冲液、HEPES缓冲液、Tris-HCl缓冲液、甘氨酸缓冲液中的一种或几种,其中盐离子浓度为50-200mmol/L,pH为7.0-8.0,同时还含有质量分数为0.01-0.05%的防腐剂以及1-5%的增浊剂,所述增浊剂为聚乙二醇6000或聚乙二醇8000,或者两种组合。

[0019] 所述反应试剂R2的生产步骤是先将质量分数为10%固含量的胶乳微球1ml,加入Buffer A 0.5-1mL混匀;然后加入10mg/mL的EDC 250-500 μ L进行活化反应,震荡10-30min;再加入Buffer B 10-20mL灭活EDC 0.5min得到胶乳液;

[0020] 接着将0.3-1ml抗体用Buffer B稀释,缓慢滴加至上述胶乳液中,震荡反应2-5h,再封闭液封闭5-30min;最后加入Buffer B至终体积为50mL,搅拌均匀即为反应试剂R2。

[0021] 所述Buffer A是pH为5-6,盐离子浓度为1-10%,含有MES或者HEPES的反应缓冲溶液。

[0022] 所述Buffer B是pH为6-8,盐离子浓度为1-10%,含有MES、HEPES、PBS或者Tris的保存缓冲溶液,同时还含有质量分数为0.10.5%的稳定性物质以及0.01-0.05%的防腐成分,其中稳定性物质为牛血清白蛋白、蔗糖、海藻糖或者甘油的一种或几种,防腐成分为Proclin300或者叠氮钠。

[0023] 如图1-3所示,将本实施例所采用的胶乳免疫比浊试剂的优化工艺与传统工艺进行对比,其定标曲线数据见表1,临床样本比对数据见表2。

[0024] 可见本实施例所公开的优化工艺反应度更高,检测范围更广。与市售优质试剂具有良好的相关性,相关系数 $r^2 > 0.99$,相对偏差较小,可以满足临床检测需求。监测2-8℃冷藏储存条件下的试剂稳定性,可稳定保存14个月以上。

[0025] 表1定标曲线

抗原梯度 (mg/L)	优化工艺	传统工艺
0	12	-2
0.5	450	560
1	1354	1500
2	3056	2879
4	6400	5648
8	11508	8321

[0027] 表2临床样本比对

[0028]

样本号 N=40	自制试剂	对比试剂	样本号 N=40	自制试剂	对比试剂
1	1.20	1.21	21	0.36	0.33
2	0.86	0.83	22	0.54	0.47
3	0.65	0.59	23	1.74	1.77
4	1.08	1.10	24	3.85	3.90
5	0.67	0.66	25	0.55	0.51
6	0.88	0.92	26	0.78	0.79
7	3.10	3.18	27	0.89	0.90
8	0.93	0.92	28	2.85	2.95
9	0.51	0.50	29	0.97	0.99
10	0.95	0.93	30	1.01	1.05
11	1.08	1.09	31	0.96	0.98
12	0.93	0.98	32	1.02	1.05
13	0.76	0.67	33	0.88	0.89
14	0.83	0.83	34	0.69	0.74
15	0.92	0.89	35	4.88	4.90
16	5.44	5.60	36	0.62	0.60
17	0.79	0.73	37	1.44	1.39
18	0.90	0.84	38	0.75	0.72
19	0.98	0.90	39	0.85	0.84
20	0.88	0.83	40	0.62	0.59

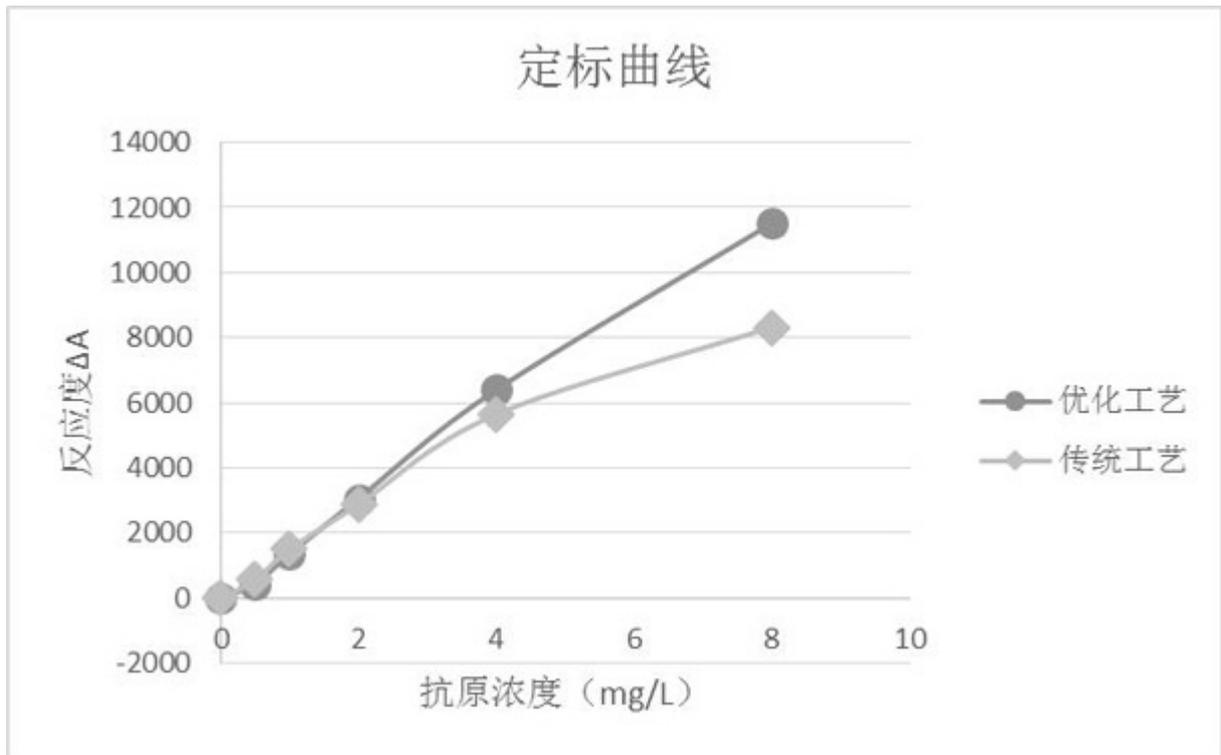


图1

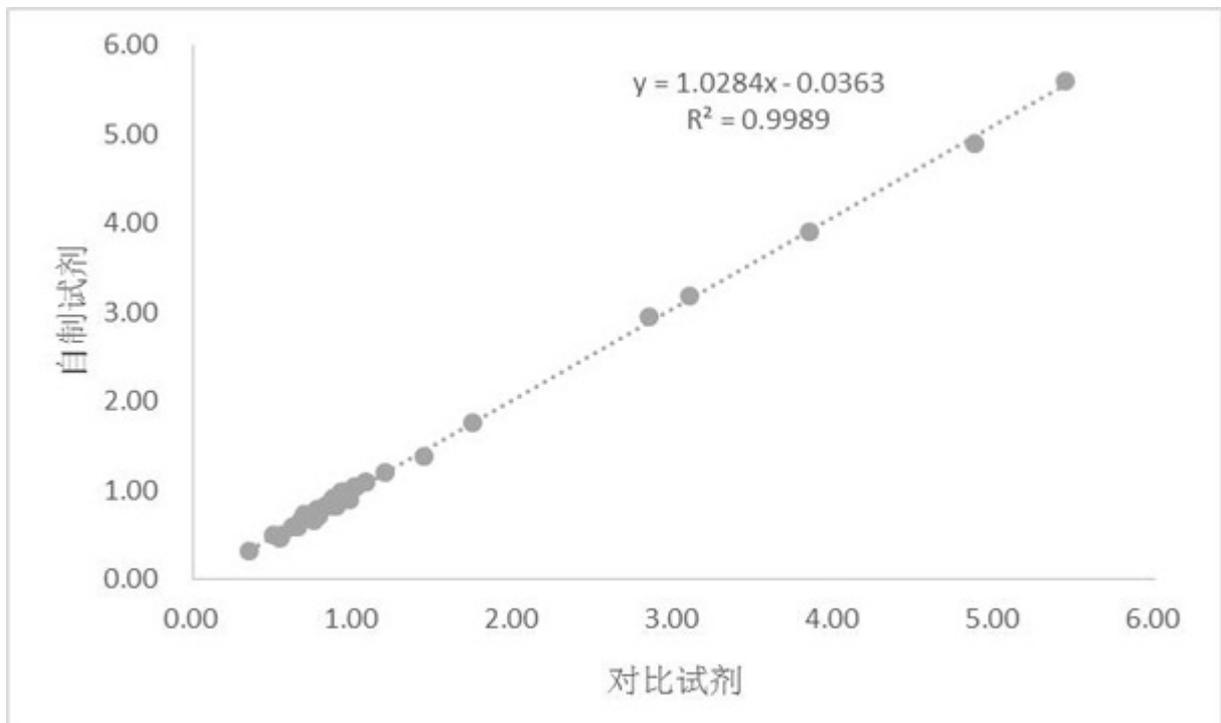


图2

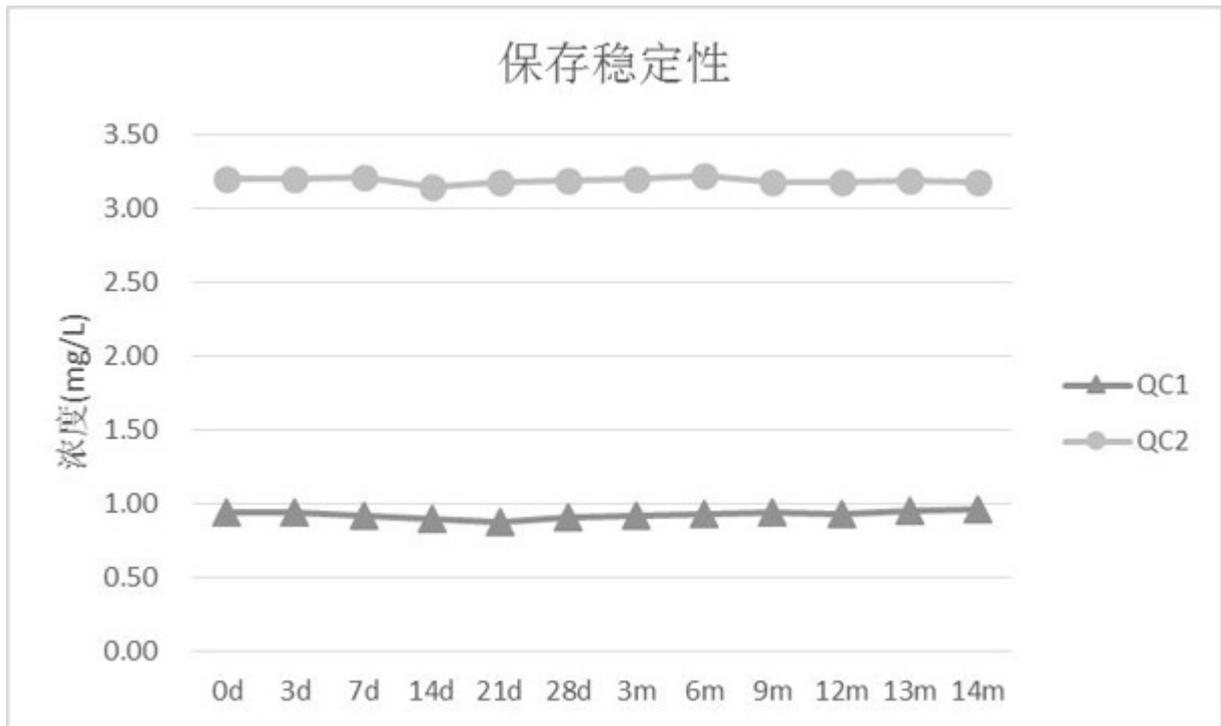


图3

专利名称(译)	一种胶乳免疫比浊试剂		
公开(公告)号	CN108982827A	公开(公告)日	2018-12-11
申请号	CN201810666798.1	申请日	2018-06-26
[标]申请(专利权)人(译)	浙江卓运生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	浙江卓运生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	浙江卓运生物科技有限公司		
[标]发明人	梅义武 刘兴 叶佳颖		
发明人	梅义武 刘兴 叶佳颖		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5302		
外部链接	Espacenet	SIPO	

摘要(译)

本发明公开了一种胶乳免疫比浊试剂，包括反应试剂R1和反应试剂R2，所述反应试剂R2的生产步骤是先将质量分数为10%固含量的胶乳微球1ml，加入Buffer A 0.5-1mL混匀；然后加入10mg/ml的EDC 250-500 μ L进行活化反应，震荡10-30min；再加入Buffer B 10-20mL灭活EDC 0.5 min得到胶乳液；接着将0.3-1ml抗体用Buffer B稀释，缓慢滴加至上述胶乳液中，震荡反应2-5h；封闭液封闭5-30min；最后加入Buffer B至终体积50mL，搅拌均匀即为反应试剂R2。本发明得到的胶乳免疫比浊试剂，其采用特殊的胶乳-抗体偶联工艺，不需要离心、超滤、透析分离纯化过程，具有非常高的偶联效率。

