



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109187973 A

(43)申请公布日 2019.01.11

(21)申请号 201810940202.2

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2018.08.17

G01N 33/58(2006.01)

(71)申请人 迪瑞医疗科技股份有限公司

地址 130000 吉林省长春市高新区宜居路
3333号

(72)发明人 孟令敏 李磊 王凯 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 李外

(51)Int.Cl.

G01N 33/573(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

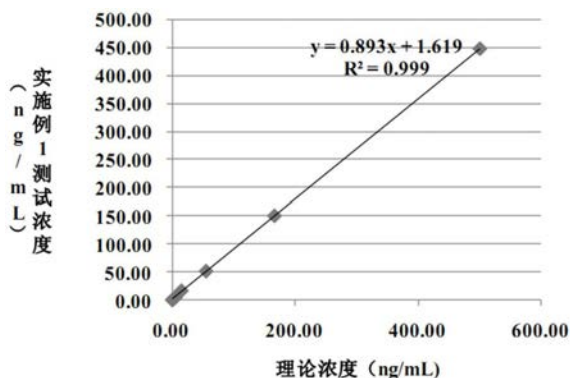
权利要求书2页 说明书24页 附图2页

(54)发明名称

用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发
光免疫试剂盒

(57)摘要

本发明提供一种用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒,属于体外诊断技术领域。该试剂盒A包括:校准品、磁颗粒反应液R_a1、示踪结合物反应液R_a2和捕获抗体反应液R_a3。该试剂盒B包括:校准品、磁颗粒反应液R_b1、示踪结合物反应液R_b2和项目稀释反应液R_b3。该试剂盒C包括:校准品、磁颗粒反应液R_c1和示踪结合物反应液R_c2。本发明的试剂盒检测线性范围宽、灵敏度高、特异性好,该试剂盒为全自动化学发光仪器配套试剂,适用于血清和血浆中NSE的定量测定,本发明通过添加适量的Mg²⁺离子,实现血清和EDTA血浆样本的一致性测定,血清与血浆测值相关系数r>0.975。



1. 一种用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒,其特征在于,命名为试剂盒A,该试剂盒A包括:

校准品、磁颗粒反应液R_{a1}、示踪结合物反应液R_{a2}和捕获抗体反应液R_{a3};

所述的磁颗粒反应液R_{a1}包含链酶亲和素磁珠、缓冲液和防腐剂;

所述的示踪结合物反应液R_{a2}包含吡啶酯标记的NSE抗体、NaCl、氯化镁、缓冲液、防腐剂、阻断剂、蛋白稳定剂和表面活性剂;

所述的捕获抗体反应液R_{a3}包含生物素标记的NSE抗体、NaCl、氯化镁、缓冲液、防腐剂、蛋白稳定剂和表面活性剂。

2. 一种用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒,其特征在于,命名为试剂盒B,该试剂盒B包括:

校准品、磁颗粒反应液R_{b1}、示踪结合物反应液R_{b2}和项目稀释反应液R_{b3};

所述的磁颗粒反应液R_{b1}包含NSE抗体包被的磁珠、缓冲液、防腐剂、蛋白稳定剂和表面活性剂,所述的磁珠为羧基磁珠或对甲苯磺酰磁珠;

所述的示踪结合物反应液R_{b2}包含吡啶酯标记的NSE抗体、NaCl、MgCl₂、缓冲液、防腐剂、蛋白稳定剂和表面活性剂;

所述的项目稀释反应液R_{b3}包含缓冲液NaCl、MgCl₂、防腐剂、阻断剂、蛋白稳定剂和表面活性剂。

3. 一种用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒,其特征在于,命名为试剂盒C,该试剂盒C包括:

校准品、磁颗粒反应液R_{c1}和示踪结合物反应液R_{c2};

所述的磁颗粒反应液R_{c1}包含NSE抗体包被的磁珠、缓冲液、防腐剂、阻断剂、蛋白稳定剂和表面活性剂,所述的磁珠为羧基磁珠或对甲苯磺酰磁珠;

所述的示踪结合物反应液R_{c2}包含吡啶酯标记的NSE抗体、NaCl、MgCl₂、缓冲液、防腐剂、蛋白稳定剂和表面活性剂。

4. 根据权利要求1-3任何一项所述的一种用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒A、试剂盒B、试剂盒C中,所述的校准品浓度为0, 2, 10, 25, 100, 250, 500ng/mL,校准品基质配方为pH7.4的磷酸缓冲液,0.15mol/L氯化钠,质量浓度为5%的牛血清白蛋白。

5. 根据权利要求1-3任何一项所述的一种用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒A、试剂盒B、试剂盒C中,所述的防腐剂为NaN₃、Proclin 300或Proclin 950,所述的防腐剂的质量浓度为0.01%-1%。

6. 根据权利要求1-3任何一项所述的一种用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒A、试剂盒B、试剂盒C中,所述的蛋白稳定剂为BSA、酪蛋白或BGG中的一种或几种,所述的蛋白稳定剂的质量浓度为0.1%-10%。

7. 根据权利要求1-3任何一项所述的一种用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒A、试剂盒B、试剂盒C中,所述的表面活性剂为吐温、聚乙二醇或者曲拉通,所述的表面活性剂的质量浓度为0.01%-1%。

8. 根据权利要求1-3任何一项所述的一种用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒A、试剂盒B、试剂盒C中,吡啶酯标记的NSE抗体的制

备方法,包括:

在避光条件下,取NSE抗体和吖啶酯溶液按照摩尔浓度1:(1-20)的比例进行标记,标记缓冲液为pH7.4PB,标记时间1-12小时。

9.根据权利要求1所述的一种用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒A中,生物素标记的NSE抗体的制备方法,包括:

在避光条件下,取NSE抗体和生物素溶液按照摩尔浓度1:(1-50)的比例进行标记,标记缓冲液为pH7.4PB,标记时间2-24h。

10.根据权利要求2-3任何一项所述的一种用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒B、试剂盒C中,NSE抗体包被的磁珠的制备方法,包括:

当磁珠为羧基磁珠时,取羧基磁珠用缓冲液清洗,然后重悬至缓冲液中,加入NSE抗体和碳二亚胺盐酸盐混匀,NSE抗体用量为磁珠质量的0.1%-10%,在室温下活化悬混反应2-18小时,得到NSE抗体包被的磁珠;

当磁珠为对甲苯磺酰磁珠时,取对甲苯磺酰磁珠用缓冲液清洗,然后重悬至缓冲液中,同时加入NSE抗体和硫酸铵混匀,NSE抗体用量为磁珠质量的0.1%-10%,硫酸铵反应浓度为1.2mol/L,在37℃条件下活化悬混反应10-36小时,得到NSE抗体包被的磁珠。

用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于体外诊断技术领域,涉及一种用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 神经元特异性烯醇化酶(NSE)是烯醇化酶中的一种,在糖酵解过程中参与催化2-磷酸甘油酸转变成磷酸烯醇式丙酮酸,分子量为78KD,等电点为pH4.7,是一种酸性蛋白酶。烯醇化酶同工酶是由 α 、 β 、 γ 三种亚基以二聚体的形式组合而成,存在 $\alpha\alpha$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\beta\beta$ 、 $\alpha\gamma$ 、 $\gamma\gamma$ 五种形式,其中 α 亚基主要存在于肝、肾等组织,二聚体 $\alpha\alpha$ 被称为非神经元特异性烯醇化酶, β 亚基为骨骼肌和心肌所特有, γ 亚基为神经组织和神经内分泌组织所特有,二聚体 $\gamma\gamma$ 在神经元中表达,二聚体 $\alpha\gamma$ 在小胶质细胞、少突胶质细胞和星形胶质细胞中表达,因此二聚体 $\alpha\gamma$ 、 $\gamma\gamma$ 被称为NSE。NSE同时发挥炎症作用和神经营养活性作用,在神经元的生长、分化、存活和死亡过程中起着重要的调节作用。因大脑灰质含有大量的神经元,所以NSE在脑组织中的含量最高,占脑神经组织全部可溶性蛋白的1.5%-3%,占人脑皮质烯醇化酶的40%-60%,正常情况下,血清及脑脊液中含有微量的NSE,NSE异常增高与脑损伤、其它神经系统疾病以及肿瘤疾病相关,如脑出血、脑缺血、脑外伤、阿尔茨海默病、神经母细胞瘤、神经内分泌疾病(嗜铬细胞瘤、胰岛细胞瘤、甲状腺髓样癌、黑色素瘤等)和小细胞肺癌等。临床上,NSE主要应用于小细胞肺癌(SCLC)的诊断,它是SCLC最敏感、最特异的肿瘤标志物,NSE在SCLC患者血清中的水平明显高于非小细胞肺癌的患者(肺腺癌、肺鳞癌、大细胞肺癌等),也可用于鉴别诊断。此外NSE也用于神经母瘤的诊断,它与S-100蛋白联合检测也被用于黑色素瘤的诊断。NSE在上述疾病的早期诊断和预后观察领域具有重要的临床价值。

[0003] 目前,市场上检验NSE的试剂盒主要分为酶联免疫法、化学发光免疫法和时间分辨荧光法等。传统的酶联免疫法自动化程度不高,受人为因素影响较大,不利于高通量的全自动化检测,特异性和灵敏度有待提高,未来会被自动化程度高的化学发光方法取代。目前进口主流NSE试剂是罗氏的产品,为电化学发光,其检测样本类型单一,只适用于血清样本的检测,血浆和血清样本测值存在较大的差异,所以提供一种血清和血浆样本通用的试剂即可以满足临床多种样本类型的需求,也可以减少病人的二次采样痛苦,另一方面也可以节约时间和经济成本。

发明内容

[0004] 本发明的目的是为了解决现有的检验NSE的试剂盒线性区间窄,且对血清和血浆样本的测值存在显著差异的问题,提供一种用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒。

[0005] 本发明提供一种用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒A,该试剂盒A包括:

[0006] 校准品、磁颗粒反应液R_{a1}、示踪结合物反应液R_{a2}和捕获抗体反应液R_{a3};

- [0007] 所述的磁颗粒反应液R_{a1}包含链酶亲和素磁珠、缓冲液和防腐剂；
- [0008] 所述的示踪结合物反应液R_{a2}包含吡啶酯标记的NSE抗体、NaCl、氯化镁、缓冲液、防腐剂、阻断剂、蛋白稳定剂和表面活性剂；
- [0009] 所述的捕获抗体反应液R_{a3}包含生物素标记的NSE抗体、NaCl、氯化镁、缓冲液、防腐剂、蛋白稳定剂和表面活性剂。
- [0010] 本发明还提供一种用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒B,该试剂盒B包括：
- [0011] 校准品、磁颗粒反应液R_{b1}、示踪结合物反应液R_{b2}和项目稀释反应液R_{b3}；
- [0012] 所述的磁颗粒反应液R_{b1}包含NSE抗体包被的磁珠、缓冲液、防腐剂、蛋白稳定剂和表面活性剂,所述的磁珠为羧基磁珠或对甲苯磺酰磁珠；
- [0013] 所述的示踪结合物反应液R_{b2}包含吡啶酯标记的NSE抗体、NaCl、MgCl₂、缓冲液、防腐剂、蛋白稳定剂和表面活性剂；
- [0014] 所述的项目稀释反应液R_{b3}包含缓冲液NaCl、MgCl₂、防腐剂、阻断剂、蛋白稳定剂和表面活性剂。
- [0015] 本发明还提供一种用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒C,该试剂盒C包括：
- [0016] 校准品、磁颗粒反应液R_{c1}和示踪结合物反应液R_{c2}；
- [0017] 所述的磁颗粒反应液R_{c1}包含NSE抗体包被的磁珠、缓冲液、防腐剂、阻断剂、蛋白稳定剂和表面活性剂,所述的磁珠为羧基磁珠或对甲苯磺酰磁珠；
- [0018] 所述的示踪结合物反应液R_{c2}包含吡啶酯标记的NSE抗体、NaCl、MgCl₂、缓冲液、防腐剂、蛋白稳定剂和表面活性剂。
- [0019] 优选的是,所述的试剂盒A、试剂盒B、试剂盒C中,所述的校准品浓度为0,2,10,25,100,250,500ng/mL,校准品基质配方为pH7.4的磷酸缓冲液(PB),0.15mol/L氯化钠(NaCl),质量浓度为5%的牛血清白蛋白(BSA)。
- [0020] 优选的是,所述的试剂盒A、试剂盒B、试剂盒C中,所述的防腐剂为NaN₃、Proclin 300或Proclin 950,所述的防腐剂的质量浓度为0.01%–1%。
- [0021] 优选的是,所述的试剂盒A、试剂盒B、试剂盒C中,所述的蛋白稳定剂为BSA、酪蛋白或BGG中的一种或几种,所述的蛋白稳定剂的质量浓度为0.1%–10%。
- [0022] 优选的是,所述的试剂盒A、试剂盒B、试剂盒C中,所述的表面活性剂为吐温、聚乙二醇或者曲拉通,所述的表面活性剂的质量浓度为0.01%–1%。
- [0023] 优选的是,所述的试剂盒A、试剂盒B、试剂盒C中,吡啶酯标记的NSE抗体的制备方法,包括：
- [0024] 在避光条件下,取NSE抗体和吡啶酯溶液按照摩尔浓度1:(1–20)的比例进行标记,标记缓冲液为pH7.4PB,标记时间1–12小时。
- [0025] 优选的是,所述的试剂盒A中,生物素标记的NSE抗体的制备方法,包括：
- [0026] 在避光条件下,取NSE抗体和生物素溶液按照摩尔浓度1:(1–50)的比例进行标记,标记缓冲液为pH7.4PB,标记时间2–24h。
- [0027] 优选的是,所述的试剂盒B、试剂盒C中,NSE抗体包被的磁珠的制备方法,包括：
- [0028] 当磁珠为羧基磁珠时,取羧基磁珠用缓冲液清洗,然后重悬至缓冲液中,加入NSE

抗体和碳二亚胺盐酸盐混匀,NSE抗体用量为磁珠质量的0.1%-10%,在室温下活化悬混反应2-18小时,得到NSE抗体包被的磁珠;

[0029] 当磁珠为对甲苯磺酰磁珠时,取对甲苯磺酰磁珠用缓冲液清洗,然后重悬至缓冲液中,同时加入NSE抗体和硫酸铵混匀,NSE抗体用量为磁珠质量的0.1%-10%,硫酸铵反应浓度为1.2mol/L,在37℃条件下活化悬混反应10-36小时,得到NSE抗体包被的磁珠。

[0030] 本发明的原理

[0031] 因为NSE分子 γ 亚基的三维结构包括大约300个氨基酸组成8个 α/β 桶状结构,其中 β 折叠位于桶状结构的核心部位,为NSE的活性位点所在,周围环绕 α 螺旋。酶活性中心主要由以下三种碱性氨基酸组成:组氨酸-189、精氨酸-371和赖氨酸-393。NSE所有抗原决定簇都分布在48~96、188~293、399~433氨基酸序列区,位于其三维结构表面,在免疫反应中可刺激机体产生NSE的单克隆抗体。人类的NSE二聚体是不对称的复合物,其中一个亚基含有硫酸根离子和两个镁离子是闭合的构象,可观察到该亚基结合有酶底物或其类似物。而另一个亚基没有结合任何底物或类似物呈开放的构象。EDTA血浆样本因样本管中添加了EDTA,EDTA与镁离子的结合能力强,从而会破坏NSE分子与 Mg^{2+} 离子的结合,进而影响NSE分子构象,直接或间接的影响抗原结合位点,影响免疫反应。所以本发明在配方中添加过量的 Mg^{2+} 离子,与EDTA过饱和结合,从而不影响NSE抗原分子的构象,保证了血清与血浆样本测值的一致性。

[0032] 本发明的有益效果

[0033] 本发明提供一种用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒,本发明的试剂盒检测线性范围宽、灵敏度高、特异性好,试剂盒的测试原理采用双抗体夹心法,NSE浓度与相对发光强度(RLU)成正相关,根据NSE浓度标准曲线即可得到被测样本中NSE的含量。同时该试剂盒为全自动化学发光仪器配套试剂,适用于血清和血浆中NSE的定量测定,本发明通过添加适量的 Mg^{2+} 离子,实现血清和EDTA血浆样本的一致性测定,血清与血浆测值相关系数 $r>0.975$ 。

附图说明

[0034] 图1为本发明实施例1试剂盒的定标曲线;

[0035] 图2为对比例1不含 Mg^{2+} 试剂盒的定标曲线;

[0036] 图3为本发明实施例1的线性曲线。

具体实施方式

[0037] 本发明提供一种用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒A,该试剂盒A包括:

[0038] 校准品,所述的校准品优选浓度为0,2,10,25,100,250,500ng/mL,校准品基质配方为pH7.4的磷酸缓冲液(PB),0.15mol/L氯化钠(NaCl),质量浓度为5%的牛血清白蛋白(BSA);

[0039] 磁颗粒反应液 R_a1 ,所述的磁颗粒反应液 R_a1 包含链酶亲和素磁珠、缓冲液和防腐剂;所述的磁颗粒反应液 R_a1 中,链酶亲和素磁珠的质量浓度优选为0.03%-0.1%;所述的链酶亲和素磁珠的粒径优选为1-3 μm ;

[0040] 示踪结合物反应液 R_{a2} ,所述的示踪结合物反应液 R_{a2} 包含吡啶酯标记的NSE抗体、NaCl、氯化镁、缓冲液、防腐剂、阻断剂、蛋白稳定剂和表面活性剂;所述的示踪结合物反应液 R_{a2} 中,吡啶酯标记的NSE抗体的浓度优选为0.1-3ug/mL,NaCl的浓度优选为0.15mol/L,氯化镁($MgCl_2$)的浓度优选为0-50mmol/L;

[0041] 捕获抗体反应液 R_{a3} ,所述的捕获抗体反应液 R_{a3} 包含生物素标记的NSE抗体、NaCl、氯化镁、缓冲液、防腐剂、蛋白稳定剂和表面活性剂,所述的捕获抗体反应液 R_{a3} 中,生物素标记的NSE抗体的浓度优选为0.5-8ug/mL,NaCl的浓度优选为0.15mol/L,氯化镁的浓度优选为0-50mmol/L;

[0042] 按照本发明,所述的 R_{a1} 、 R_{a2} 和 R_{a3} 反应液中的缓冲液缓冲范围优选pH6.0-8.0,更优选pH6.0-7.4,作为缓冲盐可以使用2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)、哌嗪-NN-双(2-乙磺酸)(PIPES)、3-(N-吗啡基)-2-羟基丙磺酸钠(MOPS0)、Tris-盐酸。缓冲盐的浓度优选为10-600mmol/L,更优选为25-400mmol/L。

[0043] 按照本发明,所述的 R_{a1} 、 R_{a2} 和 R_{a3} 反应液中的防腐剂优选为叠氮钠(NaN_3)、Proclin 300或者Proclin 950,防腐剂的质量浓度优选为0.01%-1%。

[0044] 按照本发明,所述的 R_{a2} 反应液中的阻断剂可以使用鼠IGG、或者罗氏、Scantibody商品化的阻断剂,阻断剂使用浓度范围优选为10-500ug/mL,更优选为50-200ug/mL。

[0045] 按照本发明,所述的 R_{a2} 和 R_{a3} 反应液中的蛋白稳定剂优选为BSA、酪蛋白或者BGG中的一种或几种,所述的蛋白稳定剂的质量浓度为0.1%-10%。

[0046] 按照本发明,所述的 R_{a2} 和 R_{a3} 反应液中的表面活性剂优选为吐温、聚乙二醇或者曲拉通,所述的表面活性剂的质量浓度优选为0.01%-1%。

[0047] 按照本发明,所述的试剂盒A的制备方法,包括:

[0048] 步骤一: R_{a1} 反应液的制备

[0049] 将缓冲液和防腐剂混合,配制成 R_{a1} 基础缓冲液;

[0050] 取商品化的链酶亲和素磁珠(选自JSR公司,型号为MS300/Streptavidin),磁珠粒径 $3\mu m$,用pH7.2的PBS(20mmol/L PB与150mmol/L NaCl)缓冲液清洗三次,然后将磁珠重悬至 R_{a1} 基础缓冲液中,配成质量浓度0.03%-0.1%的 R_{a1} 反应液;

[0051] 步骤二: R_{a2} 反应液的制备

[0052] 将NaCl、氯化镁、缓冲液、防腐剂、阻断剂、蛋白稳定剂和表面活性剂混合,配制成 R_{a2} 基础缓冲液;

[0053] 取NSE抗体,与溶解于溶剂中的吡啶酯溶液按照摩尔浓度1:(1-20)的比例进行标记,标记缓冲液为pH7.4PB,标记时间1-12小时,反应过程需要避光,标记反应结束后,使用AKTA纯化仪(G25凝胶柱)纯化,流速为3ml/min,收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量,得到吡啶酯标记的NSE抗体;所述的溶剂优选为DMF,吡啶酯溶液的浓度优选为3mg/mL,标记缓冲液的浓度优选为20mmol/L;

[0054] 取吡啶酯标记的NSE抗体置于 R_{a2} 基础缓冲液中,配成浓度为0.05-3ug/mL的 R_{a2} 反应液;

[0055] 步骤三: R_{a3} 反应液的制备

[0056] 将NaCl、氯化镁、缓冲液、防腐剂、蛋白稳定剂和表面活性剂混合,配制成 R_{a3} 基础缓冲液;

[0057] 取NSE抗体,与溶解于溶剂中的生物素溶液按照摩尔浓度1:(1-50)的比例进行标记,标记缓冲液为pH7.4PB,标记时间2-24h,反应过程需要避光,标记反应结束后,使用AKTA纯化仪(G25凝胶柱)纯化,流速为3ml/min,收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量,得到生物素标记的NSE抗体;所述的溶剂优选为DMF,吡啶酯溶液的浓度优选为3mg/mL,标记缓冲液的浓度优选为20mmol/L;

[0058] 取生物素标记的NSE抗体置于R_a3基础缓冲液中,配成浓度0.5-8ug/mL的R_a3反应液。

[0059] 步骤四:校准品

[0060] 将高浓度抗原定量添加至含有5%BSA的PBS缓冲液中,配成理论浓度为0,2,10,25,100,250,500ng/mL的校准品,然后使用公司一级校准品赋值,赋值后的浓度即为校准品使用浓度。

[0061] 按照本发明,所述的试剂盒A的测定方法,包括:

[0062] 将样本、R_a2、R_a3反应液顺序加入反应杯中,孵育5-20分钟,在该过程中,抗体与抗原形成夹心复合物;然后在反应杯中继续加入R_a1反应液,孵育5-20分钟;加入清洗液,清洗;最后将预激发液和激发液加入到反应混合物中,激发发光反应,测量产生的光量子数,样本中NSE的含量与光量子数成正比。

[0063] 本发明还提供一种用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒B,该试剂盒B包括:

[0064] 校准品,所述的校准品优选浓度为0,2,10,25,100,250,500ng/mL,校准品基质配方为pH7.4的磷酸缓冲液(PB),0.15mol/L氯化钠(NaCl),质量浓度为5%的牛血清白蛋白(BSA);

[0065] 磁颗粒反应液R_b1,所述的磁颗粒反应液R_b1包含NSE抗体包被的磁珠、缓冲液、防腐剂、蛋白稳定剂和表面活性剂,所述的磁颗粒反应液R_b1中,NSE抗体包被的磁珠的质量浓度优选为0.03-0.1%;所述的磁珠为羧基磁珠或对甲苯磺酰磁珠;粒径优选为3μm;

[0066] 示踪结合物反应液R_b2,所述的示踪结合物反应液R_b2包含吡啶酯标记的NSE抗体、NaCl、MgCl₂、缓冲液、防腐剂、蛋白稳定剂和表面活性剂;所述的示踪结合物反应液R_b2中,吡啶酯标记的NSE抗体的浓度优选为0.1-3ug/mL,NaCl的浓度优选为0.15mol/L,氯化镁(MgCl₂)的浓度优选为0-50mmol/L;

[0067] 项目稀释反应液R_b3,所述的项目稀释反应液R_b3包含缓冲液NaCl、MgCl₂、防腐剂、阻断剂、蛋白稳定剂和表面活性剂;所述的项目稀释反应液R_b3中,NaCl的浓度优选为0.15mol/L,氯化镁(MgCl₂)的浓度优选为0-50mmol/L;

[0068] 按照本发明,所述的R_b1、R_b2和R_b3反应液中的缓冲液缓冲范围优选pH5.5-9.0,更优选pH6.0-7.4,作为缓冲盐可以使用2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)、哌嗪-NN-双(2-乙磺酸)(PIPES)、3-(N-吗啡基)-2-羟基丙磺酸钠(MOPSO)、Tris-盐酸。缓冲盐的浓度优选为10-600mmol/L,更优选为25-400mmol/L。

[0069] 按照本发明,所述的R_b1、R_b2和R_b3反应液中防腐剂优选为叠氮钠(NaN₃)、Proclin 300或者Proclin 950,防腐剂的质量浓度优选为0.01%-1%。

[0070] 按照本发明,所述的R_b3反应液中的阻断剂可以使用鼠IGG、或者罗氏、Scantibody商品化的阻断剂,阻断剂使用浓度范围优选为10-500ug/mL,更优选为50-200ug/mL。

[0071] 按照本发明,所述的R_{b1}、R_{b2}和R_{b3}反应液中的蛋白稳定剂优选为BSA、酪蛋白或者BSG中的一种或几种,所述的蛋白稳定剂的质量浓度为0.1%-10%。

[0072] 按照本发明,所述的R_{b1}、R_{b2}和R_{b3}反应液中的表面活性剂优选为吐温、聚乙二醇或者曲拉通,所述的表面活性剂的质量浓度优选为0.01%-1%。

[0073] 按照本发明,所述的试剂盒B的制备方法,包括:

[0074] 步骤一:R_{b1}反应液的制备

[0075] 将缓冲液、防腐剂、蛋白稳定剂和表面活性剂混合,配制成R_{b1}基础缓冲液;

[0076] 对于羧基磁珠,取磁珠(来源为JSR公司,型号为MS300/Carboxyl),粒径3 μ m,用缓冲液清洗,然后重悬至缓冲液中,混均匀后加入NSE抗体,NSE抗体用量为磁珠质量的0.1%-10%,继续悬混均匀,然后加入碳二亚胺盐酸盐(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基,EDC),用量为磁珠质量的10%,在室温下活化悬混反应2-18小时,反应结束后,使用磁力架集磁,弃上清液,然后使用缓冲液清洗磁珠,得到NSE抗体包被的磁珠。所述的碳二亚胺盐酸盐(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基,EDC)在加入之前优选先溶解于缓冲液中,所述的缓冲液优选为pH6.0的MES缓冲液或pH7.4的PB缓冲液,浓度优选为20mM;EDC与磁珠的质量比优选为10%,磁珠的终反应浓度不低于20mg/mL;

[0077] 对于对甲苯磺酰基官能团化的磁珠,取磁珠(选自JSR公司,型号为MS300/Tosyl),粒径3 μ m,同时加入硫酸铵和NSE抗体,NSE抗体用量为磁珠质量的0.1%-10%,磁珠的终反应浓度不低于20mg/mL,硫酸铵反应浓度为12mol/L,所述的硫酸铵在加入之前优选先溶解于缓冲液中,在37℃条件下活化悬混反应10-36小时,反应结束后,使用磁力架集磁,弃上清液,然后使用缓冲液清洗磁珠,得到NSE抗体包被的磁珠。

[0078] 将NSE抗体包被的磁珠置于R_{b1}基础缓冲液,配成磁珠浓度为0.03%-0.1%的R_{b1}反应液;

[0079] 步骤二:R_{b2}反应液的制备

[0080] 将NaCl、氯化镁、缓冲液、防腐剂蛋白稳定剂和表面活性剂混合,配制成R_{b2}基础缓冲液;

[0081] 取NSE抗体,与溶解于溶剂中的吡啶酯溶液按照摩尔浓度1:(1-20)的比例进行标记,标记缓冲液为pH7.4PB,标记时间1-12小时,反应过程需要避光,标记反应结束后,使用AKTA纯化仪(G25凝胶柱)纯化,流速为3ml/min,收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量,得到吡啶酯标记的NSE抗体;所述的溶剂优选为DMF,吡啶酯溶液的浓度优选为3mg/mL,标记缓冲液的浓度优选为20mmol/L;

[0082] 取吡啶酯标记的NSE抗体置于R_{b2}基础缓冲液中,配成浓度为0.1-3 μ g/mL的R_{b2}反应液;

[0083] 步骤三:R_{b3}反应液的制备

[0084] 将NaCl、氯化镁、缓冲液、阻断剂、防腐剂、蛋白稳定剂和表面活性剂混合,配制R_{b3}反应液;

[0085] 步骤四:校准品

[0086] 将高浓度抗原定量添加至含有5%BSA的PBS缓冲液中,配成理论浓度为0,2,10,25,100,250,500ng/mL的校准品,然后使用公司一级校准品赋值,赋值后的浓度即为校准品使用浓度。

[0087] 按照本发明,所述的试剂盒B的测定方法,包括:

[0088] 将样本、R_b3、R_b1反应液顺序加入反应杯中,孵育5-20分钟,加入清洗液,清洗;再加入R_b2,孵育5-20分钟;然后加入清洗液,清洗;最后将预激发液和激发液加入到反应混合物中,激发发光反应,测量产生的光量子数,样本中NSE的含量与光量子数成正比。

[0089] 或者,将样本、R_b3、R_b1反应液顺序加入反应杯中,孵育5-20分钟;再加入R_b2,孵育5-20分钟;然后加入清洗液,清洗;最后将预激发液和激发液加入到反应混合物中,激发发光反应,测量产生的光量子数,样本中NSE的含量与光量子数成正比。

[0090] 本发明还提供一种用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒C,该试剂盒C包括:

[0091] 校准品,所述的校准品优选浓度为0,2,10,25,100,250,500ng/mL校准品基质配方为pH7.4的磷酸缓冲液(PB),0.15mol/L氯化钠(NaCl),质量浓度为5%的牛血清白蛋白(BSA);

[0092] 磁颗粒反应液R_c1,所述的磁颗粒反应液R_c1包含NSE抗体包被的磁珠、缓冲液、防腐剂、阻断剂、蛋白稳定剂和表面活性剂,所述的磁颗粒反应液R_c1中,NSE抗体包被的磁珠的质量浓度优选为0.03%~0.1%;所述的磁珠为羧基磁珠或对甲苯磺酰磁珠;粒径优选为3μm;

[0093] 示踪结合物反应液R_c2,所述的示踪结合物反应液R_c2包含吡啶酯标记的NSE抗体、NaCl、MgCl₂、缓冲液、防腐剂、蛋白稳定剂和表面活性剂;所述的示踪结合物反应液R_c2中,吡啶酯标记的NSE抗体的浓度优选为0.1-3ug/mL,NaCl的浓度优选为0.15mol/L,氯化镁(MgCl₂)的浓度优选为0-50mmol/L;

[0094] 按照本发明,所述的R_c1和R_c2反应液中的缓冲液缓冲范围优选pH5.5-9.0,更优选pH6.0-7.4,作为缓冲盐可以使用2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)、哌嗪-NN-双(2-乙磺酸)(PIPES)、3-(N-吗啡基)-2-羟基丙磺酸钠(MOPS)、Tris-盐酸。缓冲盐的浓度优选为10-600mmol/L,更优选为50-400mmol/L。

[0095] 按照本发明,所述的R_c1和R_c2反应液中防腐剂优选为叠氮钠(NaN₃)、Proclin 300或者Proclin 950,防腐剂的质量浓度优选为0.01%-1%。

[0096] 按照本发明,所述的R_c1反应液中的阻断剂可以使用鼠IGG、或者罗氏、Scantibody商品化的阻断剂,阻断剂使用浓度范围优选为10-500ug/mL,更优选为50-200ug/mL。

[0097] 按照本发明,所述的R_c1和R_c2反应液中的蛋白稳定剂优选为BSA、酪蛋白或者BGG中的一种或几种,所述的蛋白稳定剂的质量浓度为0.1%-10%。

[0098] 按照本发明,所述的R_c1和R_c2反应液中的表面活性剂优选为吐温、聚乙二醇或者曲拉通,所述的表面活性剂的质量浓度优选为0.01%-1%。

[0099] 按照本发明,所述的试剂盒C的制备方法,包括:

[0100] 步骤一:R_c1反应液的制备

[0101] 将缓冲液、防腐剂、阻断剂、蛋白稳定剂和表面活性剂混合,配制成R_c1基础缓冲液;

[0102] 对于羧基磁珠,取磁珠(来源为JSR公司,型号为MS300/Carboxyl),粒径3μm,用缓冲液清洗,然后重悬至缓冲液中,混均匀后加入NSE抗体,NSE抗体用量为磁珠质量的0.1%-10%,继续悬混均匀,然后加入碳二亚胺盐酸盐(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基),EDC),用量为

磁珠质量的10%，在室温下活化悬混反应2-18小时，反应结束后，使用磁力架集磁，弃上清液，然后使用缓冲液清洗磁珠，得到NSE抗体包被的磁珠。所述的碳二亚胺盐酸盐(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)，EDC)在加入之前优选先溶解于缓冲液中，所述的缓冲液优选为pH6.0的MES缓冲液或pH7.4的PB缓冲液，浓度优选为20mM；EDC与磁珠的质量比优选为10%，磁珠的终反应浓度不低于20mg/mL；

[0103] 对于对甲苯磺酰基官能团化的磁珠，取磁珠(选自JSR公司，型号为MS300/Tosyl)，粒径3 μ m，同时加入硫酸铵和NSE抗体，NSE抗体用量为磁珠质量的0.1%-10%，磁珠反应浓度不低于20mg/mL，硫酸铵反应浓度为12mol/L，所述的硫酸铵在加入之前优选先溶解于缓冲液中，在37℃条件下活化悬混反应10-36小时，反应结束后，使用磁力架集磁，弃上清液，然后使用缓冲液清洗磁珠，得到NSE抗体包被的磁珠。

[0104] 将NSE抗体包被的磁珠置于R_{c1}基础缓冲液，配成浓度为0.03%~0.1%的R_{c1}反应液；

[0105] 步骤二：R_{c2}反应液的制备

[0106] 将NaCl、氯化镁、缓冲液、防腐剂、蛋白稳定剂和表面活性剂混合，配制成R_{c2}基础缓冲液；

[0107] 取NSE抗体，与溶解于溶剂中的吡啶酯溶液按照摩尔浓度1: (1-20) 的比例进行标记，标记缓冲液为pH7.4PB，标记时间1-12小时，反应过程需要避光，标记反应结束后，使用AKTA纯化仪(G25凝胶柱)纯化，流速为3ml/min，收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量，得到吡啶酯标记的NSE抗体；所述的溶剂优选为DMF，吡啶酯溶液的浓度优选为3mg/mL，标记缓冲液的浓度优选为20mmol/L；

[0108] 取吡啶酯标记的NSE抗体置于R_{c2}基础缓冲液中，配成浓度为0.05-3 μ g/mL R_{c2}反应液；

[0109] 步骤三：校准品

[0110] 将高浓度抗原定量添加至含有5%BSA的PBS缓冲液中，配成理论浓度为0, 2, 10, 25, 100, 250, 500ng/mL的校准品，然后使用公司一级校准品赋值，赋值后的浓度即为校准品使用浓度。

[0111] 按照本发明，所述的试剂盒C的测定方法，包括：

[0112] 将样本、R_{c1}反应液顺序加入反应杯中，孵育5-20分钟；然后加入清洗液清洗；再加入R_{c2}，孵育5-20分钟加入清洗液清洗；最后将预激发液和激发液加入到反应混合物中，激发发光反应，测量产生的光量子数，样本中NSE的含量与光量子数成正比。

[0113] 或者，将样本、R_{c1}反应液顺序加入反应杯中，孵育5-20分钟；再加入R_{c2}，孵育5-20分钟加入清洗液清洗；最后将预激发液和激发液加入到反应混合物中，激发发光反应，测量产生的光量子数，样本中NSE的含量与光量子数成正比。

[0114] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细的描述。

[0115] 实施例1试剂盒A

[0116] 1.1试剂盒构成

[0117]

反应液	配方
R _{a1}	链酶亲和素磁珠，质量百分比为0.1%； NaCl，摩尔浓度为0.15mol/L； Tris，50mmol/L pH7.2； Proclin 300，0.04%。
R _{a2}	吖啶酯标记的NSE鼠单克隆抗体，浓度为0.2ug/mL； BSA，质量百分比为1%； NaCl，摩尔浓度为0.15mol/L； MgCl ₂ ，摩尔浓度为2mmol/L； Tris，50mmol/L pH6.5； 小鼠IGG 200ug/mL； Scantibody阻断剂 100ug/mL； 吐温-20，质量百分比为0.01%； Proclin 300，0.04%。
R _{a3}	生物素标记的NSE鼠单克隆抗体，浓度为1.4ug/mL； BSA，质量百分比为1%； NaCl，摩尔浓度为0.15mol/L； MgCl ₂ ，摩尔浓度为2mmol/L； Tris，50mmol/L pH6.5； 吐温-20，质量百分比为0.01%； Proclin 300，0.04%。

[0118] 1.2试剂盒的制备方法

[0119] (1) R_{a1}反应液的制备

[0120] 取链酶亲和素磁珠，粒径3μm，用pH7.2的PBS缓冲液清洗三次，然后将磁珠重悬至适量的R_{a1}基础缓冲液中(除磁珠之外的其它成分)，配成质量浓度0.1%的R_{a1}反应液。

[0121] (2) R_{a2}反应液的制备

[0122] a. 制备吖啶酯标记的NSE抗体：

[0123] 取适量NSE抗体，与溶解于DMF中的吖啶酯(3mg/mL)按照摩尔浓度1:7.5的比例进行标记，标记缓冲液为pH7.4PB(20mmol/L)，标记时间4h，反应过程需要避光。标记反应结束后，使用AKTA纯化仪(G25凝胶柱)纯化，流速为3ml/min，收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量，定量浓度为245.6ug/mL。

[0124] b. 制备R_{a2}反应液：

[0125] 取适量吖啶酯标记的NSE抗体原液于R_{a1}基础缓冲液中，配成NSE抗体浓度为0.2ug/mL的R_{a2}反应液。

[0126] (3) R_{a3}反应液的制备

[0127] a. 制备生物素标记的NSE抗体：

[0128] 取适量NSE抗体，与溶解于DMF中的生物素(3mg/mL)按照摩尔浓度1:20的比例进行标记，标记缓冲液为pH7.4PB(20mmol/L)，标记时间4h，反应过程需要避光。标记反应结束后，使用AKTA纯化仪(G25凝胶柱)纯化，流速为3ml/min，收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量，定量浓度为200.1ug/mL。

[0129] b.制备R_{a3}反应液:

[0130] 取适量生物素标记的NSE抗体原液于R_{a1}基础缓冲液中(除抗体外的其它成分),配成浓度为1.4ug/mL的R_{a3}反应液。

[0131] 1.3试剂盒的测试方法

[0132] 第一步,将30uL样本、60uL R_{a2}、60uL R_{a3}反应液顺序加入反应杯中,孵育15分钟,在该过程中,抗体与抗原形成夹心复合物;第二步,在反应杯中继续加入50uL R_{a1}反应液,孵育5分钟;第三步,加入清洗液,清洗五次;第四步,将预激发液和激发液加入到反应混合物中,激发发光反应,测量产生的光量子数。

[0133] 实施例2试剂盒A

[0134] 1.1试剂盒构成

[0135]

反应液	配方
R _{a1}	链酶亲和素磁珠, 质量百分比为0.07%; NaCl, 摩尔浓度为0.15mol/L; PB, 50mmol/L pH7.2; NaN ₃ , 0.05%。
R _{a2}	吖啶酯标记的NSE鼠单克隆抗体, 浓度为1ug/mL; BSA, 质量百分比为1%; NaCl, 摩尔浓度为0.15mol/L; MgCl ₂ , 摩尔浓度为25mmol/L; HEPES, 50mmol/L pH6.0; Scantibody阻断剂 100ug/mL; 曲拉通, 质量百分比为0.5%; NaN ₃ , 0.05%。
R _{a3}	生物素标记的NSE鼠单克隆抗体, 浓度为4ug/mL; BSA, 质量百分比为1%; NaCl, 摩尔浓度为0.15mol/L; MgCl ₂ , 摩尔浓度为25mmol/L; HEPES, 50mmol/L pH6.0; 曲拉通, 质量百分比为0.05%; NaN ₃ , 0.05%。

[0136] 1.2试剂盒的制备方法

[0137] (1) R_{a1}反应液的制备

[0138] 取链酶亲和素磁珠, 粒径3μm, 用pH7.2的PBS缓冲液清洗三次, 然后将磁珠重悬至适量的R_{a1}基础缓冲液中(除磁珠之外的其它成分), 配成质量浓度0.1%的R_{a1}反应液。

[0139] (2) R_{a2}反应液的制备

[0140] a.制备吖啶酯标记的NSE抗体:

[0141] 取适量NSE抗体, 与溶解于DMF中的吖啶酯(3mg/mL)按照摩尔浓度1:3的比例进行标记, 标记缓冲液为pH7.4PB(20mmol/L), 标记时间12h, 反应过程需要避光。标记反应结束后, 使用AKTA纯化仪(G25凝胶柱)纯化, 流速为3ml/min, 收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量, 定量浓度为210.3ug/mL。

[0142] b. 制备R_{a2}反应液:

[0143] 取适量吖啶酯标记的NSE抗体原液于R_{a1}基础缓冲液中,配成NSE抗体浓度为1ug/mL的R_{a2}反应液。

[0144] (3) R_{a3}反应液的制备

[0145] a. 制备生物素标记的NSE抗体:

[0146] 取适量NSE抗体,与溶解于DMF中的生物素(3mg/mL)按照摩尔浓度1:40的比例进行标记,标记缓冲液为pH7.4PB(20mmol/L),标记时间8h,反应过程需要避光。标记反应结束后,使用AKTA纯化仪(G25凝胶柱)纯化,流速为3ml/min,收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量,定量浓度为198.9ug/mL。

[0147] b. 制备R_{a3}反应液:

[0148] 取适量生物素标记的NSE抗体原液于R_{a1}基础缓冲液中(除抗体外的其它成分),配成浓度为4ug/mL的R_{a3}反应液。

[0149] 1.3试剂盒的测试方法

[0150] 第一步,将30uL样本、60uL R_{a2}、60uL R_{a3}反应液顺序加入反应杯中,孵育10分钟,在该过程中,抗体与抗原形成夹心复合物;第二步,在反应杯中继续加入50uL R_{a1}反应液,孵育10分钟;第三步,加入清洗液,清洗五次;第四步,将预激发液和激发液加入到反应混合物中,激发发光反应,测量产生的光量子数。

[0151] 实施例3试剂盒A

[0152] 1.1试剂盒构成

[0153]

反应液	配方
R _{a1}	链酶亲和素磁珠,质量百分比为0.03%; NaCl,摩尔浓度为0.15mol/L; Tris,400mmol/L pH7.2; NaN ₃ ,0.05%。
R _{a2}	吖啶酯标记的NSE鼠单克隆抗体,浓度为3ug/mL; BSA,质量百分比为5%; BGG,质量百分比为0.5%; NaCl,摩尔浓度为0.15mol/L; MgCl ₂ ,摩尔浓度为50mmol/L; HEPES,50mmol/L pH6.0; Scantibody阻断剂100ug/mL; 聚乙二醇,质量百分比为0.5%; NaN ₃ ,0.05%。
R _{a3}	生物素标记的NSE鼠单克隆抗体,浓度为4ug/mL;

[0154]

	BSA, 质量百分比为5%; BGG, 质量百分比为0.5%; NaCl, 摩尔浓度为0.15mol/L; MgCl ₂ , 摩尔浓度为50mmol/L; HEPES, 50mmol/L pH6.0; 曲拉通, 质量百分比为0.05%; NaN ₃ , 0.05%。
--	---

[0155] 1.2试剂盒的制备方法

[0156] (1) R_{a1}反应液的制备

[0157] 取链酶亲和素磁珠, 粒径1 μ m, 用pH7.2的PBS缓冲液清洗三次, 然后将磁珠重悬至适量的R_{a1}基础缓冲液中(除磁珠之外的其它成分), 配成质量浓度0.03%的R_{a1}反应液。

[0158] (2) R_{a2}反应液的制备

[0159] a. 制备吖啶酯标记的NSE抗体:

[0160] 取适量NSE抗体, 与溶解于DMF中的吖啶酯(3mg/mL)按照摩尔浓度1:20的比例进行标记, 标记缓冲液为pH7.4PB(20mmol/L), 标记时间1h, 反应过程需要避光。标记反应结束后, 使用AKTA纯化仪(G25凝胶柱)纯化, 流速为3ml/min, 收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量, 定量浓度为243.2ug/mL。

[0161] b. 制备R_{a2}反应液:

[0162] 取适量吖啶酯标记的NSE抗体原液于R_{a1}基础缓冲液中, 配成NSE抗体浓度为3ug/mL的R_{a2}反应液。

[0163] (3) R_{a3}反应液的制备

[0164] a. 制备生物素标记的NSE抗体:

[0165] 取适量NSE抗体, 与溶解于DMF中的生物素(3mg/mL)按照摩尔浓度1:50的比例进行标记, 标记缓冲液为pH7.4PB(20mmol/L), 标记时间2h, 反应过程需要避光。标记反应结束后, 使用AKTA纯化仪(G25凝胶柱)纯化, 流速为3ml/min, 收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量, 定量浓度为231.6ug/mL。

[0166] b. 制备R_{a3}反应液:

[0167] 取适量生物素标记的NSE抗体原液于R_{a1}基础缓冲液中(除抗体外的其它成分), 配成浓度为4ug/mL的R_{a3}反应液。

[0168] 1.3试剂盒的测试方法

[0169] 第一步, 将30uL样本、60uL R_{a2}、60uL R_{a3}反应液顺序加入反应杯中, 孵育20分钟, 在该过程中, 抗体与抗原形成夹心复合物; 第二步, 在反应杯中继续加入50uL R_{a1}反应液, 孵育5分钟; 第三步, 加入清洗液, 清洗五次; 第四步, 将预激发液和激发液加入到反应混合物中, 激发发光反应, 测量产生的光量子数。

[0170] 实施例4试剂盒B

[0171] 1.1试剂盒构成

[0172]

反应液	配方
R _{b1}	NSE抗体包被的羧基磁珠，质量百分比为0.03%； NaCl，摩尔浓度为0.15mol/L； BSA，质量百分比为10%； PB，100mmol/L pH7.4； 吐温-20，质量百分比为0.1%； NaN ₃ ，0.1%。
R _{b2}	吡啶酯标记的NSE鼠单克隆抗体，浓度为0.1ug/mL； BGG，质量百分比为0.5%； BSA，质量百分比为5%； NaCl，摩尔浓度为0.15mol/L； MgCl ₂ ，摩尔浓度为20mmol/L； MES，50mmol/L pH6.0； 聚乙二醇，质量百分比为0.1%； Proclin 950，0.05%。
R _{b3}	BSA，质量百分比为5%； Scantibody 阻断剂，50ug/mL； NaCl，摩尔浓度为0.15mol/L； MgCl ₂ ，摩尔浓度为20mmol/L； MES，50mmol/L pH6.0； 曲拉通，质量百分比为1%； Proclin 950，0.04%。

[0173] 1.2试剂盒的制备方法

[0174] (1) R_{b1}反应液的制备

[0175] 取适量羧基磁珠，粒径3μm，用20mM pH6.0的MES缓冲液清洗三遍，然后重悬至20mMpH6.0的MES缓冲液中，磁珠质量浓度为40mg/mL，悬混均匀后加入NSE抗体，抗体用量为磁珠质量的2%，混匀后加入适量的碳二亚胺盐酸盐(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基,EDC)，在室温下活化悬混反应2小时。EDC在使用前事先溶解于20mM pH6.0的MES缓冲液中，EDC与磁珠的质量比为10%，磁珠的终反应浓度为20mg/mL。反应结束后，使用磁力架集磁，弃上清液，使用20mM PB清洗磁珠三次，最后重悬至R_{b1}基础缓冲液中，配成磁珠质量浓度为0.03%的R_{b1}反应液。

[0176] (2) R_{b2}反应液的制备

[0177] a. 制备吡啶酯标记的NSE抗体：

[0178] 取适量NSE抗体，与溶解于DMF中的吡啶酯(3mg/mL)按照摩尔浓度1:15的比例进行标记，标记缓冲液为pH7.4PB(20mmol/L)，标记时间6h，反应过程需要避光。标记反应结束后，使用AKTA纯化仪(G25凝胶柱)纯化，流速为3ml/min，收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量，定量浓度为268.1ug/mL。

[0179] b.制备R_{b2}反应液:

[0180] 取适量吡啶酯标记的NSE抗体原液于R_{b2}基础缓冲液中,配成NSE抗体浓度为0.1ug/mL的R_{a2}反应液。

[0181] (3) R_{b3}反应液的制备

[0182] 按照R_{b3}反应液配方进行配制。

[0183] 1.3试剂盒的测试方法

[0184] 第一步,将30uL样本、60uL R_{b3}、60uL R_{b1}反应液加入反应杯中,孵育10分钟;第二步,加入清洗液清洗5次;第三步,加入R_{b2}反应液,孵育10分钟;第四步,加入清洗液清洗5次;第五步,将预激发液和激发液加入到反应混合物中,激发发光反应,测量产生的光量子数。

[0185] 实施例5试剂盒B

[0186] 1.1试剂盒构成

[0187]

反应液	配方
R _{b1}	NSE抗体包被的羧基磁珠, 质量百分比为0.08%; NaCl, 摩尔浓度为0.15mol/L; BSA, 质量百分比为1%; MES, 25mmol/L pH7.2; 曲拉通, 质量百分比为0.5%; Proclin 300, 0.04%。
R _{b2}	吡啶酯标记的NSE鼠单克隆抗体, 浓度为2ug/mL; BSA, 质量百分比为5%; NaCl, 摩尔浓度为0.15mol/L; MgCl ₂ , 摩尔浓度为10mmol/L; MES, 50mmol/L pH6.0; 聚乙二醇, 质量百分比为1%; Proclin 300, 0.04%。
R _{b3}	BSA, 质量百分比为5%; 罗氏阻断剂, 100ug/mL; NaCl, 摩尔浓度为0.15mol/L; MgCl ₂ , 摩尔浓度为10mmol/L; MES, 50mmol/L pH7.2; 吐温-20, 质量百分比为0.5%; Proclin 950, 0.04%。

[0188] 1.2试剂盒的制备方法

[0189] (1) R_{b1}反应液的制备

[0190] 取适量羧基磁珠, 粒径3μm, 用20mM pH6.0的MES缓冲液清洗三遍, 然后重悬至20mMpH6.0的MES缓冲液中, 磁珠质量浓度为40mg/mL, 悬混均匀后加入NSE抗体, 抗体用量为

磁珠质量的10%，混匀后加入适量的碳二亚胺盐酸盐(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基,EDC)，在室温下活化悬混反应2小时。EDC在使用前事先溶解于20mM pH6.0的MES缓冲液中，EDC与磁珠的质量比为10%，磁珠的终反应浓度为20mg/mL。反应结束后，使用磁力架集磁，弃上清液，使用20mM PB清洗磁珠三次，最后重悬至R_{b1}基础缓冲液中，配成磁珠质量浓度为0.08%的R_{b1}反应液。

[0191] (2) R_{b2}反应液的制备

[0192] a. 制备吡啶酯标记的NSE抗体：

[0193] 取适量NSE抗体，与溶解于DMF中的吡啶酯(3mg/mL)按照摩尔浓度1:1的比例进行标记，标记缓冲液为pH7.4PB(20mmol/L)，标记时间4h，反应过程需要避光。标记反应结束后，使用AKTA纯化仪(G25凝胶柱)纯化，流速为3ml/min，收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量，定量浓度为243.8ug/mL。

[0194] b. 制备R_{b2}反应液：

[0195] 取适量吡啶酯标记的NSE抗体原液于R_{b2}基础缓冲液中，配成NSE抗体浓度为2ug/mL的R_{a2}反应液。

[0196] (3) R_{b3}反应液的制备

[0197] 按照R_{b3}反应液配方进行配制。

[0198] 1.3试剂盒的测试方法

[0199] 第一步，将30uL样本、60uL R_{b3}、60uL R_{b1}反应液加入反应杯中，孵育20分钟；第二步，加入清洗液清洗三次；第三步，加入R_{b2}反应液，孵育10分钟；第四步，加入清洗液清洗5次；第五步，将预激发液和激发液加入到反应混合物中，激发发光反应，测量产生的光量子数。

[0200] 实施例6试剂盒B

[0201] 1.1试剂盒构成

[0202]

反应液	配方
R _{b1}	NSE抗体包被的Tosyl磁珠，质量百分比为0.05%； NaCl，摩尔浓度为0.15mol/L； BSA，质量百分比为5%； MOPSO，50mmol/L pH6.5； Proclin 300，0.04%。 曲拉通，质量百分比为0.5%；
R _{b2}	吡啶酯标记的NSE鼠单克隆抗体，浓度为0.3ug/mL；

[0203]

	BGG, 质量百分比为0.1%; BSA, 质量百分比为5%; NaCl, 摩尔浓度为0.15mol/L; MgCl ₂ , 摩尔浓度为10mmol/L; MES, 50mmol/L pH6.0; 聚乙二醇, 质量百分比为0.5%; Proclin 300, 0.1%。
R _b 3	BSA, 质量百分比为5%; 罗氏阻断剂, 100ug/mL; NaCl, 摩尔浓度为0.15mol/L; MgCl ₂ , 摩尔浓度为10mmol/L; MOPSO, 50mmol/L pH6.5; 曲拉通, 质量百分比为0.5%; Proclin 950, 0.1%。

[0204] 1.2试剂盒的制备方法

[0205] (1) R_b1反应液的制备

[0206] 取适量Tosyl磁珠, 粒径3μm, 用20mM pH8.0的PB缓冲液清洗三遍, 然后重悬至20mMpH8.0的PB缓冲液中, 磁珠质量浓度为40mg/mL, 悬混均匀后加入NSE抗体, 抗体用量为磁珠质量的2%, 混匀后加入硫酸铵, 硫酸铵反应浓度为1.2mol/L, 在37℃下活化悬混反应18小时。硫酸铵事先溶解于20mM pH8.0的PB缓冲液中, 磁珠的终反应浓度为20mg/mL。反应结束后, 使用磁力架集磁, 弃上清液, 使用20mM PB pH7.2清洗磁珠三次, 最后重悬至R_b1基础缓冲液中, 配成磁珠质量浓度为0.05%的R_b1反应液。

[0207] (2) R_b2反应液的制备

[0208] a. 制备吡啶酯标记的NSE抗体:

[0209] 取适量NSE抗体, 与溶解于DMF中的吡啶酯 (3mg/mL) 按照摩尔浓度1:20的比例进行标记, 标记缓冲液为pH7.4PB (20mmol/L), 标记时间4h, 反应过程需要避光。标记反应结束后, 使用AKTA纯化仪 (G25凝胶柱) 纯化, 流速为3ml/min, 收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量, 定量浓度为213.8ug/mL。

[0210] b. 制备R_b2反应液:

[0211] 取适量吡啶酯标记的NSE抗体原液于R_b2基础缓冲液中, 配成NSE抗体浓度为0.3ug/mL的R_a2反应液。

[0212] (3) R_b3反应液的制备[0213] 按照R_b3反应液配方进行配制。

[0214] 1.3试剂盒的测试方法

[0215] 第一步, 将40uL样本、60uL R_b3、60uL R_b1反应液加入反应杯中, 孵育15分钟; 第二步, 加入R_b2反应液, 孵育10分钟; 第三步, 加入清洗液清洗5次; 第四步, 将预激发液和激发液加入到反应混合物中, 激发发光反应, 测量产生的光量子数。

[0216] 实施例7试剂盒C

[0217] 1.1试剂盒构成

[0218]

反应液	配方
R _{c1}	NSE抗体包被的对甲苯磺酰磁珠，质量百分比为0.03%； NaCl，摩尔浓度为0.15mol/L； BSA，质量百分比为0.5%； 罗氏阻断剂，100ug/mL； PIPES，100mmol/L pH7.0； 吐温-20，质量百分比为0.5%； NaN ₃ ，0.02%。
R _{c2}	吡啶酯标记的NSE鼠单克隆抗体，浓度为0.7ug/mL； BSA，质量百分比为2%； 酪蛋白，质量百分比为0.1%； NaCl，摩尔浓度为0.15mol/L； MgCl ₂ ，摩尔浓度为20mmol/L； PIPES，100mmol/L pH6.0； 聚乙二醇，质量百分比为0.5%； Proclin 950，0.05%。

[0219] 1.2试剂盒的制备方法

[0220] (1) R_{c1}反应液的制备

[0221] 取适量对甲苯磺酰基官能团化的磁珠，粒径3μm，用20mM pH7.4的PB缓冲液清洗三遍，然后重悬至20mM pH7.4的PB缓冲液中，悬混均匀后加入NSE抗体，抗体量为磁珠质量的4%，混匀并加入含有3M硫酸铵的20mM pH7.4的PB缓冲液，悬混均匀后将反应管置于37℃恒温箱中继续悬混反应24小时。反应结束后，使用磁力架集磁，弃上清液，然后使用20mM PB清洗磁珠三次，最后重悬至R_{c1}基础缓冲液中，配成质量百分比为0.03% R_{c1}反应液。

[0222] (2) R_{c2}反应液的制备

[0223] a. 制备吡啶酯标记的NSE抗体：

[0224] 取适量NSE抗体，与溶解于DMF中的吡啶酯(3mg/mL)按照摩尔浓度1:3的比例进行标记，标记缓冲液为pH7.4PB(20mmol/L)，标记时间8h，反应过程需要避光。标记反应结束后，使用AKTA纯化仪(G25凝胶柱)纯化，流速为3ml/min，收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量，定量浓度为235.8ug/mL。

[0225] b. 制备R_{c2}反应液：

[0226] 取适量吡啶酯标记的NSE抗体原液于R_{c1}基础缓冲液中，配成NSE抗体浓度为0.7ug/mL的R_{c2}反应液。

[0227] 1.3试剂盒的测试方法

[0228] 第一步，将10uL样本、70uL R_{c1}反应液加入反应杯中，孵育20分钟；第二步，加入清洗液清洗5次；第三步，加入70uL R_{c2}，孵育5分钟；第四步，加入清洗液清洗5次；第五步，将

预激发液和激发液加入到反应混合物中,激发发光反应,测量产生的光量子数。

[0229] 实施例8试剂盒C

[0230] 1.1试剂盒构成

[0231]

反应液	配方
R _{c1}	NSE抗体包被的对甲苯磺酰磁珠, 质量百分比为0.1%; NaCl, 摩尔浓度为0.15mol/L; BGG, 质量百分比为0.1%; Scantibody阻断剂, 100ug/mL; PIPES, 400mmol/L pH7.4; 曲拉通, 质量百分比为1%; Proclin 950, 0.05%。
R _{c2}	吡啶酯标记的NSE鼠单克隆抗体, 浓度为3ug/mL; BSA, 质量百分比为5%; 酪蛋白, 质量百分比为0.1%; NaCl, 摩尔浓度为0.15mol/L; MgCl ₂ , 摩尔浓度为50mmol/L; PIPES, 100mmol/L pH6.5; PEG400, 质量百分比为0.5%; Proclin 950, 0.05%。

[0232] 1.2试剂盒的制备方法

[0233] (1) R_{c1}反应液的制备

[0234] 取适量对甲苯磺酰基官能团化的磁珠, 粒径3μm, 用20mM pH7.4的PB缓冲液清洗三遍, 然后重悬至20mM pH7.4的PB缓冲液中, 悬混均匀后加入NSE抗体, 抗体量为磁珠质量的4%, 混匀并加入含有3M硫酸铵的20mM pH7.4的PB缓冲液, 悬混均匀后将反应管置于37℃恒温箱中继续悬混反应24小时。反应结束后, 使用磁力架集磁, 弃上清液, 然后使用20mM PB清洗磁珠三次, 最后重悬至R_{c1}基础缓冲液中, 配成质量百分比为0.1% R_{c1}反应液。

[0235] (2) R_{c2}反应液的制备

[0236] a. 制备吡啶酯标记的NSE抗体:

[0237] 取适量NSE抗体, 与溶解于DMF中的吡啶酯 (3mg/mL) 按照摩尔浓度1:10的比例进行标记, 标记缓冲液为pH7.4PB (20mmol/L), 标记时间2h, 反应过程需要避光。标记反应结束后, 使用AKTA纯化仪 (G25凝胶柱) 纯化, 流速为3ml/min, 收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量, 定量浓度为267.5ug/mL。

[0238] b. 制备R_{c2}反应液:

[0239] 取适量吡啶酯标记的NSE抗体原液于R_{c1}基础缓冲液中, 配成NSE抗体浓度为3ug/mL的R_{c2}反应液。

[0240] 1.3试剂盒的测试方法

[0241] 第一步, 将20uL样本、70uL R_{c1}反应液加入反应杯中, 孵育20分钟; 第二步, 加入清

洗液清洗5次；第三步，加入70uL R_{c2}，孵育5分钟；第四步，加入清洗液清洗5次；第五步，将预激发液和激发液加入到反应混合物中，激发发光反应，测量产生的光量子数。

[0242] 实施例9试剂盒C

[0243] 1.1试剂盒构成

[0244]

反应液	配方
R _{c1}	NSE抗体包被的羧基磁珠，质量百分比为0.1%； NaCl，摩尔浓度为0.15mol/L； BSA，质量百分比为0.1%； Scantibody阻断剂，100ug/mL； Tris，400mmol/L pH7.0； Proclin 300，1%。
R _{c2}	吡啶酯标记的NSE鼠单克隆抗体，浓度为0.2ug/mL； BSA，质量百分比为1%； BGG，质量百分比为0.5%； NaCl，摩尔浓度为0.15mol/L； MgCl ₂ ，摩尔浓度为30mmol/L； Tris，400mmol/L pH6.0； PEG400，质量百分比为1%； Proclin 950，0.05%。

[0245] 1.2试剂盒的制备方法

[0246] (1) R_{c1}反应液的制备

[0247] 取适量羧基磁珠，粒径3μm，用20mM pH6.0的MES缓冲液清洗三遍，然后重悬至20mMpH6.0的MES缓冲液中，磁珠质量浓度为40mg/mL，悬混均匀后加入NSE抗体，抗体用量为磁珠质量的2%，混匀后加入适量的碳二亚胺盐酸盐(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)EDC)，在室温下活化悬混反应4小时。EDC在使用前事先溶解于20mM pH6.0的MES缓冲液中，EDC与磁珠的质量比为10%，磁珠的终反应浓度为20mg/mL。反应结束后，使用磁力架集磁，弃上清液，使用20mM PB清洗磁珠三次，最后重悬至R_{c1}基础缓冲液中，配成磁珠质量浓度为0.1%的R_{c1}反应液。

[0248] (2) R_{c2}反应液的制备

[0249] a. 制备吡啶酯标记的NSE抗体：

[0250] 取适量NSE抗体，与溶解于DMF中的吡啶酯(3mg/mL)按照摩尔浓度1:15的比例进行标记，标记缓冲液为pH7.4PB(20mmol/L)，标记时间2h，反应过程需要避光。标记反应结束后，使用AKTA纯化仪(G25凝胶柱)纯化，流速为3ml/min，收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量，定量浓度为248.5ug/mL。

[0251] b. 制备R_{c2}反应液：

[0252] 取适量吡啶酯标记的NSE抗体原液于R_{c1}基础缓冲液中，配成NSE抗体浓度为0.2ug/mL的R_{c2}反应液。

[0253] 1.3试剂盒的测试方法

[0254] 第一步,将50uL样本、70uL R_c1 反应液加入反应杯中,孵育20分钟;第二步,加入70uL R_c2 ,孵育5分钟;第三步,加入清洗液清洗5次;第四步,将预激发液和激发液加入到反应混合物中,激发发光反应,测量产生的光量子数。

[0255] 对比例1(不添加 $MgCl_2$ 配方)

[0256] 1.1试剂盒构成

[0257]

反应液	配方
R_{a1}	链酶亲和素磁珠, 质量百分比为0.1%; NaCl, 摩尔浓度为0.15mol/L; Tris, 50mmol/L pH7.2; Proclin 300, 0.04%。
R_{a2}	吖啶酯标记的NSE鼠单克隆抗体, 浓度为0.2ug/mL; BSA, 质量百分比为1%; NaCl, 摩尔浓度为0.15mol/L; HEPES, 50mmol/L pH6.5; 小鼠IGG 200ug/mL; Scantibody阻断剂 100ug/mL; 吐温-20, 质量百分比为0.01%; Proclin 300, 0.04%。
R_{a3}	生物素标记的NSE鼠单克隆抗体, 浓度为1.4ug/mL; BSA, 质量百分比为1%; NaCl, 摩尔浓度为0.15mol/L; HEPES, 50mmol/L pH6.5; 吐温-20, 质量百分比为0.01%; Proclin 300, 0.04%。

[0258] 1.2试剂盒的制备方法同实施例1

[0259] 1.3试剂盒的测试方法同实施例1

[0260] 图1和表1为实施例1试剂盒的定标曲线和校准数据,图2和表2为对比例1不含 Mg^{2+} 试剂盒的定标曲线和校准数据,用5P拟合方法将校准品的浓度对光量子数作图,即得到试剂盒的定标曲线。将临床样本的光量子数带入定标曲线,即可得到临床样本的浓度值。

[0261] 表3为实施例1的试剂盒的血清血浆样本测试数据,表4为对比例1配方不含 Mg^{2+} 试剂盒的血清血浆样本测试数据。试剂盒线性范围达到1-500ng/mL,添加 Mg^{2+} 的配方血清与血浆测值相关性 $r>0.975$ 。

[0262] 表5为本发明实施例1的线性数据,图3为本发明实施例1的线性曲线。

[0263] 表6为本发明实施例1的灵敏度光量子数据。

[0264] 表7为本发明实施例1准确度数据。

[0265] 表1

[0266]	浓度	光量
	0.00	257
	1.70	17235
	9.29	69922
	24.79	178896
	99.04	692755
	238.80	1646650
	500.00	3375313

[0267] 表2

[0268]	浓度	光量
	0.00	363
	1.70	17621
	9.29	70634
	24.79	177395
	99.04	682376
	238.80	1674023
	500.00	3038118

[0269] 表3

[0270]

样本编号	血清样本 (ng/mL)	血浆样本 (ng/mL)
1#病人	7.27	7.09
2#病人	8.25	8.61
3#病人	9.67	8.02
4#病人	11.12	11.35
5#病人	11.89	12.49
6#病人	11.94	10.07
7#病人	12.13	11.55
8#病人	12.51	10.27
9#病人	12.87	11.63
10#病人	12.92	13.93
11#病人	13.28	13.61
12#病人	13.94	11.71
13#病人	13.97	11.08

[0271]

14#病人	14.81	12.74
15#病人	15.67	15.47
16#病人	16.20	15.37
17#病人	16.29	16.42
18#病人	16.71	16.31
19#病人	16.84	16.57
20#病人	19.66	18.90
21#病人	19.83	20.82
22#病人	20.45	21.73
23#病人	22.93	23.65
24#病人	23.69	23.25
25#病人	24.12	24.17
26#病人	25.92	25.52
27#病人	26.46	24.62
28#病人	27.12	25.85
29#病人	30.00	28.12
30#病人	32.78	31.70
31#病人	35.60	32.66
32#病人	37.30	36.68
33#病人	40.16	36.94
34#病人	40.90	40.80
35#病人	50.94	49.46
36#病人	55.73	57.17
37#病人	55.87	51.86
38#病人	59.82	66.23
39#病人	60.57	58.50
40#病人	67.34	65.02

[0272] 表4

[0273]

样本编号	血清样本 (ng/mL)	血浆样本 (ng/mL)
1#病人	5.62	7.81
2#病人	6.82	8.62
3#病人	7.37	5.83
4#病人	9.31	7.86
5#病人	10.42	14.32
6#病人	9.48	9.70
7#病人	8.98	7.95
8#病人	10.57	9.87
9#病人	10.18	7.26
10#病人	10.74	14.84
11#病人	10.04	9.37
12#病人	11.69	16.94
13#病人	10.41	9.28
14#病人	12.20	12.31
15#病人	12.37	9.46
16#病人	14.00	17.34

[0274]

17#病人	13.22	14.43
18#病人	12.28	8.72
19#病人	12.65	18.56
20#病人	15.23	21.18
21#病人	15.63	10.01
22#病人	16.44	22.45
23#病人	17.19	25.31
24#病人	17.99	22.14
25#病人	18.70	20.39
26#病人	20.45	28.83
27#病人	22.18	15.41
28#病人	22.61	22.12
29#病人	23.30	17.28
30#病人	25.74	22.74
31#病人	26.94	20.75
32#病人	31.93	25.44
33#病人	30.17	37.20
34#病人	30.20	29.45
35#病人	42.89	49.66
36#病人	45.30	42.58
37#病人	43.93	53.14
38#病人	47.70	62.95
39#病人	47.78	40.54
40#病人	53.86	36.25

[0275] 添加MgCl₂配方血清与血浆测值相关系数 $r=0.994$,不添加MgCl₂配方血清与血浆测值相关系数 $r=0.906$ 。

[0276] 表5

[0277]	理论浓度 (ng/mL)	实施例 1 测试浓度 (ng/mL)
	500.00	449.03
	166.67	151.12
	5.49	52.08
	1.83	17.36
	6.17	6.20
	2.05	2.38
	0.68	1.16
	R>0.999	

[0278] 注:线性样本为高值样本按照一定比例顺序稀释制得。

[0279] 表6

[0280]	重复测试 20 次光量子数			
	626	805	513	484
	857	691	568	1058
[0281]	728	667	1002	1053
	840	1193	755	686
	728	563	1068	648
	M+2SD	1182		
	灵敏度	0.09ng/mL		

[0282] 表7

[0283]	公司以及校准品 浓度 (ng/mL)	实施例 1 测试浓度 (ng/mL)	偏差
	150.00	155.20	3%
	30.00	30.92	3%

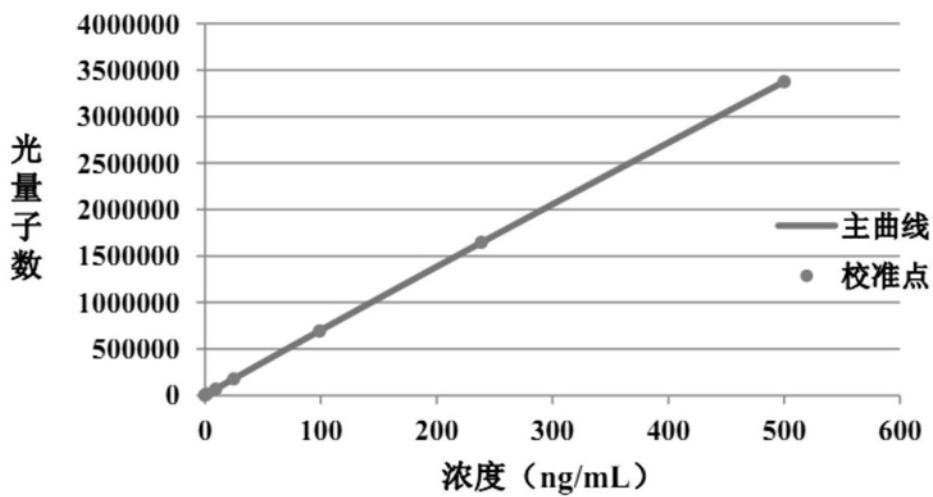


图1

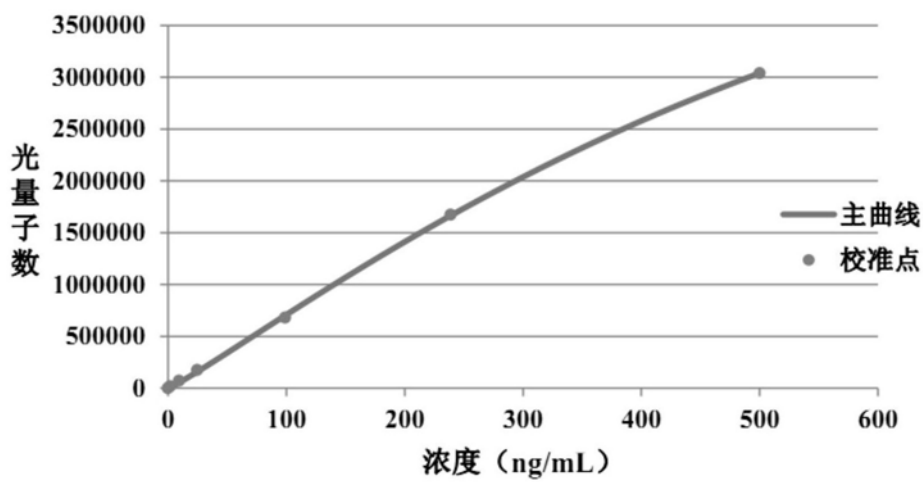


图2

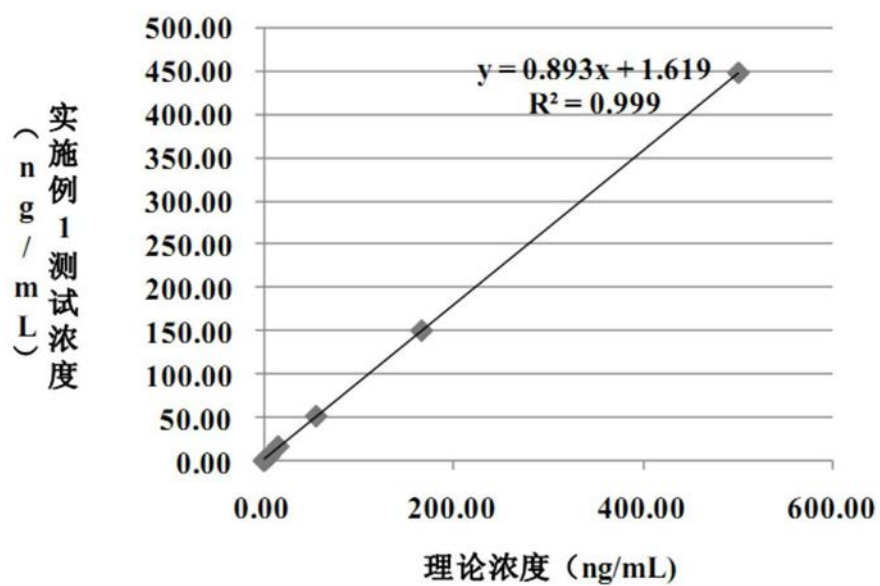


图3

专利名称(译)	用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN109187973A	公开(公告)日	2019-01-11
申请号	CN201810940202.2	申请日	2018-08-17
[标]发明人	孟令敏 李磊 王凯 孙成艳 高威 何浩会		
发明人	孟令敏 李磊 王凯 孙成艳 高威 何浩会		
IPC分类号	G01N33/573 G01N21/76 G01N33/532 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/58		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/532 G01N33/54326 G01N33/573 G01N33/577 G01N33/58 G01N2800/28 G01N2800/52		
代理人(译)	李外		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种用于检测神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫试剂盒，属于体外诊断技术领域。该试剂盒A包括：校准品、磁颗粒反应液Ra1、示踪结合物反应液Ra2和捕获抗体反应液Ra3。该试剂盒B包括：校准品、磁颗粒反应液Rb1、示踪结合物反应液Rb2和项目稀释反应液Rb3。该试剂盒C包括：校准品、磁颗粒反应液Rc1和示踪结合物反应液Rc2。本发明的试剂盒检测线性范围宽、灵敏度高、特异性好，该试剂盒为全自动化学发光仪器配套试剂，适用于血清和血浆中NSE的定量测定，本发明通过添加适量的Mg²⁺离子，实现血清和EDTA血浆样本的一致性测定，血清与血浆测值相关系数r>0.975。

