



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109239357 A

(43)申请公布日 2019.01.18

(21)申请号 201811060677.9

G01N 33/532(2006.01)

(22)申请日 2018.09.12

G01N 21/76(2006.01)

(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 张旭东 鲁海冰 高威 孙成艳
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 于晓庆

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/553(2006.01)

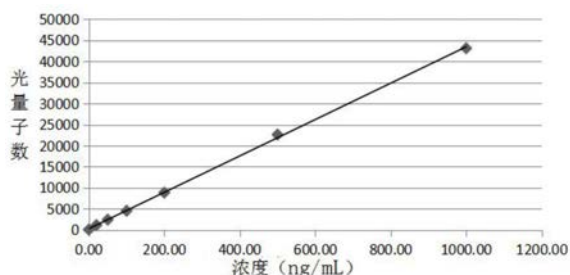
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法 and 检测方法

(57)摘要

IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和检测方法,属于体外检测领域,解决了现有IV型胶原的检测方法存在的步骤繁琐、费时、出现假阳性率较高、灵敏度低、无法精确定量的问题。该试剂盒包括链霉亲和素磁颗粒;化学发光标记物标记的IV型胶原单克隆抗体;偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体;清洗缓冲液;化学发光预激发液;校准品。检测方法包括:向样品中依次加入偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体、化学发光标记物标记的IV型胶原单克隆抗体和链霉亲和素磁颗粒,加入清洗缓冲液、酸性激发液和碱性激发液,根据样品的光量子数计算出IV型胶原的浓度。本发明操作简单、省时省力、假阳性率低、灵敏度高、测量精度高。



1. IV型胶原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IV型胶原单克隆抗体;偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体;清洗缓冲液;化学发光预激发液;校准品。

2. 根据权利要求1所述的IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述校准品的浓度分别为0.00ng/mL、20.0ng/mL、50.0ng/mL、100.0ng/mL、200.0ng/mL、500.0ng/mL和1000.0ng/mL。

3. 根据权利要求1所述的IV型胶原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中,磁颗粒的浓度为0.01~1%,磁颗粒的粒径为0.05~3 μ m。

4. 根据权利要求1所述的IV型胶原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吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺或三联吡啶钌;所述偶联标记物为生物素或抗原。

5. 根据权利要求1所述的IV型胶原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IV型胶原单克隆抗体中,IV型胶原单克隆抗体与化学发光标记物的质量比为1:(3~20)。

6. 根据权利要求1所述的IV型胶原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IV型胶原单克隆抗体中,IV型胶原单克隆抗体与偶联标记物的质量比为1:(5~20)。

7. 根据权利要求1所述的IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述化学发光预激发液包括酸性激发液和碱性激发液,所述酸性激发液为硝酸溶液,所述碱性激发液为氢氧化钠溶液;所述清洗缓冲液为PB缓冲液。

8. 制备权利要求1至7中任意一项所述的IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒的方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤一、链霉亲和素磁颗粒

取浓度为50~100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液0.5~1mL,加入5~10mL的TBST溶液混匀后,置于磁分离器上分离磁颗粒,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒;重复清洗3次后,加入缓冲液A配制成磁颗粒浓度为0.01~1%的固相试剂,即得链霉亲和素磁颗粒,2~8℃保存备用;

步骤二、化学发光标记物标记IV型胶原单克隆抗体

将500 μ g IV型胶原单克隆抗体放入离心管中,保证IV型胶原单克隆抗体位于离心管底部,室温条件下离心20~30s后加入碳酸缓冲溶液,混匀后加入0.75~5 μ L、浓度为2mg/mL的化学发光标记物溶液,室温条件下离心0.5~1min;将离心管密封后放入避光暗盒中,然后将其放入气浴恒温振荡器中,23~25℃条件下混匀3~4h后,加入0.5~1mL、浓度为20~30%的赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器中,23~25℃条件下中速混匀,封闭时间为1~2h;将封闭好的IV型胶原单克隆抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集;将纯化后的IV型胶原单克隆抗体浓溶液用缓冲液A稀释至终浓度为0.1 μ g/mL,即得化学发光标记物标记的IV型胶原单克隆抗体,2~8℃保存备用;

步骤三、偶联标记物标记IV型胶原单克隆抗体

取250~500 μ g IV型胶原单克隆抗体,用pH为6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入5~20倍摩尔比的偶联标记物,2~8℃条件下反应1~3h,再转入室温继续反应10~30min,最后加入100倍摩尔比的赖氨酸反应10~30min,反应液用脱盐柱纯化,加入等体积的甘油和防腐剂,

即得偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体,所述防腐剂为0.1%的NaN₃或0.1%的Proclin300。

9.根据权利要求8所述的制备方法,其特征在于,步骤一和步骤二中,所述缓冲液A由浓度为50mM的MES溶液、0.05%吐温-20和0.05%Proclin300组成,pH为6.5。

10.如权利要求1至7中任意一项所述的IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤一、向样品中依次加入偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体、化学发光标记物标记的IV型胶原单克隆抗体和链霉亲和素磁颗粒,样品中的IV型胶原与偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体、化学发光标记物标记的IV型胶原单克隆抗体发生免疫反应,形成偶联标记物-IV型胶原单克隆抗体-IV型胶原单克隆抗原-IV型胶原单克隆抗体-化学发光标记物复合物;

步骤二、链霉亲和素磁颗粒与偶联标记物相结合,形成磁珠-链霉亲和素-偶联标记物-IV型胶原单克隆抗体-IV型胶原单克隆抗原-IV型胶原单克隆抗体-化学发光标记物体系;

步骤三、加入清洗缓冲液,将杂质清洗去除;

步骤四、加入酸性激发液,使化学发光标记物游离;

步骤五、加入碱性激发液,使化学发光标记物发射光子;

步骤六、根据样品的光量子数计算出IV型胶原的浓度。

IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于体外检测技术领域,具体涉及一种IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和检测方法。

背景技术

[0002] IV型胶原(Collagen IV,C IV)主要分布在细胞外基质,为结缔组织的主要物质基础,C IV属于非原纤维胶原蛋白,它具有独特的异源三聚体螺旋链结构,由 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 和 $\alpha 6$ 六型 α -肽链组成。

[0003] 目前,IV型胶原的检测方法主要有胶体金分析法和酶免疫分析(EIA)等。但它们在应用中都存在着一些缺点:胶体金分析法步骤繁琐、费时,出现假阳性率较高;酶免疫分析法中,EIA酶的活性容易失活,导致酶免疫分析的灵敏度不高,难以实现精确定量。

发明内容

[0004] 为了解决现有IV型胶原的检测方法存在的步骤繁琐、费时、出现假阳性率较高、灵敏度低、无法精确定量的问题,本发明提供一种IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和检测方法。

[0005] 本发明为解决技术问题所采用的技术方案如下:

[0006] 本发明的IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒,包括:链霉亲和素磁颗粒;化学发光标记物标记的IV型胶原单克隆抗体;偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体;清洗缓冲液;化学发光预激发液;校准品。

[0007] 作为优选的实施方式,所述校准品的浓度分别为0.00ng/mL、20.0ng/mL、50.0ng/mL、100.0ng/mL、200.0ng/mL、500.0ng/mL和1000.0ng/mL。

[0008] 作为优选的实施方式,所述链霉亲和素磁颗粒中,磁颗粒的浓度为0.01~1%,磁颗粒的粒径为0.05~3 μ m。

[0009] 作为优选的实施方式,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钌;所述偶联标记物为生物素或抗原。

[0010] 作为优选的实施方式,所述化学发光标记物标记的IV型胶原单克隆抗体中,IV型胶原单克隆抗体与化学发光标记物的质量比为1:(3~20)。

[0011] 作为优选的实施方式,所述偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体中,IV型胶原单克隆抗体与偶联标记物的质量比为1:(5~20)。

[0012] 作为优选的实施方式,所述化学发光预激发液包括酸性激发液和碱性激发液,所述酸性激发液为硝酸溶液,所述碱性激发液为氢氧化钠溶液;所述清洗缓冲液为PB缓冲液。

[0013] 本发明的IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0014] 步骤一、链霉亲和素磁颗粒

[0015] 取浓度为50~100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液0.5~1mL,加入5~10mL的TBST溶液混匀后,置于磁分离器上分离磁颗粒,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒;重复清洗

3次后,加入缓冲液A配制成磁颗粒浓度为0.01~1%的固相试剂,即得链霉亲和素磁颗粒,2~8℃保存备用;

[0016] 步骤二、化学发光标记物标记IV型胶原单克隆抗体

[0017] 将500μg IV型胶原单克隆抗体放入离心管中,保证IV型胶原单克隆抗体位于离心管底部,室温条件下离心20~30s后加入碳酸缓冲溶液,混匀后加入0.75~5μL、浓度为2mg/mL的化学发光标记物溶液,室温条件下离心0.5~1min;将离心管密封后放入避光暗盒中,然后将其放入气浴恒温振荡器中,23~25℃条件下混匀3~4h后,加入0.5~1mL、浓度为20~30%的赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器中,23~25℃条件下中速混匀,封闭时间为1~2h;将封闭好的IV型胶原单克隆抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集;将纯化后的IV型胶原单克隆抗体浓溶液用缓冲液A稀释至终浓度为0.1μg/mL,即得化学发光标记物标记的IV型胶原单克隆抗体,2~8℃保存备用;

[0018] 步骤三、偶联标记物标记IV型胶原单克隆抗体

[0019] 取250~500μg IV型胶原单克隆抗体,用pH为6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入5~20倍摩尔比的偶联标记物,2~8℃条件下反应1~3h,再转入室温继续反应10~30min,最后加入100倍摩尔比的赖氨酸反应10~30min,反应液用脱盐柱纯化,加入等体积的甘油和防腐剂,即得偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体,所述防腐剂为0.1%的NaN₃或0.1%的Proclin300;

[0020] 作为优选的实施方式,步骤一和步骤二中,所述缓冲液A由浓度为50mM的MES溶液、0.05%吐温-20和0.05%Proclin300组成,pH为6.5。

[0021] 本发明的IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒的检测方法,包括以下步骤:

[0022] 步骤一、向样品中依次加入偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体、化学发光标记物标记的IV型胶原单克隆抗体和链霉亲和素磁颗粒,样品中的IV型胶原与偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体、化学发光标记物标记的IV型胶原单克隆抗体发生免疫反应,形成偶联标记物-IV型胶原单克隆抗体-IV型胶原单克隆抗原-IV型胶原单克隆抗体-化学发光标记物复合物;

[0023] 步骤二、链霉亲和素磁颗粒与偶联标记物相结合,形成磁珠-链霉亲和素-偶联标记物-IV型胶原单克隆抗体-IV型胶原单克隆抗原-IV型胶原单克隆抗体-化学发光标记物体系;

[0024] 步骤三、加入清洗缓冲液,将杂质清洗去除;

[0025] 步骤四、加入酸性激发液,使化学发光标记物游离;

[0026] 步骤五、加入碱性激发液,使化学发光标记物发射光子;

[0027] 步骤六、根据样品的光量子数计算出IV型胶原的浓度。

[0028] 本发明的有益效果是:

[0029] 1、选择吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺或三联吡啶钌作为化学发光免疫分析系统的标记材料,该材料由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。

[0030] 2、采用链霉亲和素磁颗粒与偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体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。

[0031] 3、本发明相比传统的检测方法,抗原、抗体的结合是在相似的液体条件下进行,反

应更加迅速灵敏,测量的线性范围宽。

[0032] 4、本发明的IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒与化学发光免疫检测仪器组成封闭系统,试剂、样本的添加及检测任务均由仪器自动完成,并直接回算出待测物浓度,降低了人为操作的误差,提高了整个系统的灵敏度与准确度,系统误差小。

[0033] 5、本发明的IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒在准确度方面可以替代市面上时间分辨荧光法试剂盒,为客户提供更加准确的测量数据。

[0034] 6、本发明具有灵敏度高、准确定量、无放射性风险及其检测时间短,并且可以对抗原、抗体类目标物质进行检测。

附图说明

[0035] 图1本发明的IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒剂量反应标准曲线。

具体实施方式

[0036] 本发明的IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒,主要包括:链霉亲和素磁颗粒;化学发光标记物标记的IV型胶原单克隆抗体;偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体;清洗缓冲液;化学发光预激发液;校准品。

[0037] 校准品的浓度分别为0.00ng/mL、20.0ng/mL、50.0ng/mL、100.0ng/mL、200.0 ng/mL、500.0ng/mL和1000.0ng/mL。

[0038] 链霉亲和素磁颗粒中,磁颗粒的浓度为0.01~1%,磁颗粒的粒径为0.05~ 3 μ m。

[0039] 化学发光标记物为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺或三联吡啶钌。

[0040] 偶联标记物为生物素或抗原。

[0041] 化学发光标记物标记的IV型胶原单克隆抗体中,IV型胶原单克隆抗体与化学发光标记物的质量比为1:(3~20)。

[0042] 偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体中,IV型胶原单克隆抗体与偶联标记物的质量比为1:(5~20)。

[0043] 化学发光预激发液包括酸性激发液和碱性激发液,所述酸性激发液为硝酸溶液,所述碱性激发液为氢氧化钠溶液。

[0044] 清洗缓冲液为加入表面活性剂的PB缓冲液。

[0045] 本发明的IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,主要包括以下步骤:

[0046] 步骤一、链霉亲和素磁颗粒

[0047] 取浓度为50~100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液0.5~1mL,加入5~ 10mL的TBST溶液混匀后,置于磁分离器上分离磁颗粒,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒;重复清洗3次后,加入缓冲液A(缓冲液A由浓度为50mM 的MES溶液、0.05%吐温-20和0.05% Proclin300组成,pH为6.5)配制成磁颗粒浓度为0.01~1%的固相试剂,即得链霉亲和素磁颗粒,2~8℃保存备用;

[0048] 步骤二、化学发光标记物标记IV型胶原单克隆抗体

[0049] 将500 μ gIV型胶原单克隆抗体放入离心管中,保证IV型胶原单克隆抗体位于离心管底部,室温条件下离心20~30s后加入碳酸缓冲溶液,混匀后加入0.75~ 5 μ L、浓度为2mg/mL的化学发光标记物溶液,室温条件下离心0.5~1min;将离心管密封后放入避光暗盒

中,然后将其放入气浴恒温振荡器中,23~25℃条件下混匀3~4h后,加入0.5~1mL、浓度为20~30%的赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器中,23~25℃条件下中速混匀,封闭时间为1~2h;将封闭好的IV型胶原单克隆抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集;将纯化后的IV型胶原单克隆抗体浓溶液用缓冲液A(缓冲液A由浓度为50mM的MES溶液、0.05%吐温-20和0.05%Proclin300组成,pH为6.5)稀释至终浓度为0.1μg/mL,即得化学发光标记物标记的IV型胶原单克隆抗体,2~8℃保存备用;

[0050] 步骤三、偶联标记物标记IV型胶原单克隆抗体

[0051] 取250~500μgIV型胶原单克隆抗体,用pH为6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入5~20倍摩尔比的偶联标记物,2~8℃条件下反应1~3h,再转入室温继续反应10~30min,最后加入100倍摩尔比的赖氨酸反应10~30min,反应液用脱盐柱纯化,加入等体积的甘油和防腐剂,即得偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体,防腐剂为0.1%的NaN₃或0.1%的Proclin300。

[0052] 上述所制备的链霉亲和素磁颗粒可以直接使用,将化学发光标记物标记的IV型胶原单克隆抗体和偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体分别溶于含有盐、表面活性剂、防腐剂及蛋白的缓冲液中,将三相试剂灌封于试剂瓶中组成试剂盒。

[0053] 本发明的IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒的检测方法,主要包括以下步骤:

[0054] 步骤一、向样品中依次加入偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体、化学发光标记物标记的IV型胶原单克隆抗体和链霉亲和素磁颗粒,样品中的IV型胶原与偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体、化学发光标记物标记的IV型胶原单克隆抗体发生免疫反应,形成偶联标记物-IV型胶原单克隆抗体-IV型胶原单克隆抗原-IV型胶原单克隆抗体-化学发光标记物复合物;

[0055] 步骤二、链霉亲和素磁颗粒与偶联标记物相结合,形成磁珠-链霉亲和素-偶联标记物-IV型胶原单克隆抗体-IV型胶原单克隆抗原-IV型胶原单克隆抗体-化学发光标记物体系;

[0056] 步骤三、加入清洗缓冲液,将杂质清洗去除;

[0057] 步骤四、加入酸性激发液,使化学发光标记物游离;

[0058] 步骤五、加入碱性激发液,使化学发光标记物发射光子;

[0059] 步骤六、根据样品的光量子数计算出IV型胶原的浓度。

[0060] 本发明的IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒用于检测IV型胶原含量时,利用全自动化学发光免疫分析仪(CM180)对IV型胶原校准品进行检测,绘制标准曲线,内置于电脑软件;然后根据需求按照上述的检测方法测试临床样品,根据样品的光量子数与IV型胶原浓度成正比的关系计算出IV型胶原的浓度;最后对本发明的IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒进行性能(灵敏度、线性、抗干扰/特异性)的评价。

[0061] 本发明的IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒能够以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具,完成对IV型胶原含量的检测。本发明的IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒与仪器配套使用,缩短了临床检测所需的时间,检测精度较高。

[0062] 以下结合实施例对本发明作进一步详细说明。

[0063] 实施例1 IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0064] 1) 链霉亲和素磁颗粒

[0065] 取浓度为75mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液0.75mL,加入7.5mL的TBST 溶液混匀后,置于磁分离器上分离磁颗粒,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒;重复清洗3次后,加入缓冲液A(缓冲液A由浓度为50mM的MES溶液、0.05%吐温-20和0.05%Proclin300组成,pH为6.5)配制成磁颗粒浓度为0.01%的固相试剂,即得链霉亲和素磁颗粒,2~8℃保存备用。

[0066] 2) 化学发光标记物标记IV型胶原单克隆抗体

[0067] 将500μgIV型胶原单克隆抗体放入离心管中,保证IV型胶原单克隆抗体位于离心管底部,室温条件下离心25s后加入碳酸缓冲溶液,混匀后加入3μL、浓度为2mg/mL的吡啶酯溶液,室温条件下离心0.75min;将离心管密封后放入避光暗盒中,然后将其放入气浴恒温振荡器中,24℃条件下混匀3.5h后,加入0.75mL、浓度为25%的赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器中,24℃条件下中速混匀,封闭时间为1.5h;将封闭好的IV型胶原单克隆抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集;将纯化后的IV型胶原单克隆抗体浓溶液用缓冲液 A(缓冲液A由浓度为50mM的MES溶液、0.05%吐温-20和0.05%Proclin300 组成,pH为6.5)稀释至终浓度为0.1μg/mL,即得化学发光标记物标记的IV型胶原单克隆抗体,2~8℃保存备用。

[0068] 3) 偶联标记物标记IV型胶原单克隆抗体

[0069] 取375μgIV型胶原单克隆抗体,用pH为6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入12.5倍摩尔比的生物素,2~8℃条件下反应2h,再转入室温继续反应20min,最后加入100倍摩尔比的赖氨酸反应20min,反应液用脱盐柱纯化,加入等体积的甘油和防腐剂,即得偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体,防腐剂为0.1%的NaN₃或0.1%的Proclin300。

[0070] 实施例2 IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0071] 1) 链霉亲和素磁颗粒

[0072] 取浓度为100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液0.5mL,加入10mL的TBST 溶液混匀后,置于磁分离器上分离磁颗粒,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒;重复清洗3次后,加入缓冲液A(缓冲液A由浓度为50mM的MES溶液、0.05%吐温-20和0.05%Proclin300组成,pH为6.5)配制成磁颗粒浓度为0.05%的固相试剂,即得链霉亲和素磁颗粒,2~8℃保存备用。

[0073] 2) 化学发光标记物标记IV型胶原单克隆抗体

[0074] 将500μgIV型胶原单克隆抗体放入离心管中,保证IV型胶原单克隆抗体位于离心管底部,室温条件下离心20s后加入碳酸缓冲溶液,混匀后加入0.75μL、浓度为2mg/mL的鲁米诺溶液,室温条件下离心0.5min;将离心管密封后放入避光暗盒中,然后将其放入气浴恒温振荡器中,25℃条件下混匀3h后,加入1mL、浓度为20%的赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器中,25℃条件下中速混匀,封闭时间为1h;将封闭好的IV型胶原单克隆抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集;将纯化后的IV型胶原单克隆抗体浓溶液用缓冲液 A(缓冲液A由浓度为50mM的MES溶液、0.05%吐温-20和0.05%Proclin300 组成,pH为6.5)稀释至终浓度为0.1μg/mL,即得化学发光标记物标记的IV型胶原单克隆抗体,2~8℃保存备用。

[0075] 3) 偶联标记物标记IV型胶原单克隆抗体

[0076] 取500μgIV型胶原单克隆抗体,用pH为6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入15倍摩尔

比的生物素,2~8℃条件下反应3h,再转入室温继续反应30min,最后加入100倍摩尔比的赖氨酸反应10min,反应液用脱盐柱纯化,加入等体积的甘油和防腐剂,即得偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体,防腐剂为0.1%的NaN₃或0.1%的Proclin300。

[0077] 实施例3 IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0078] 1) 链霉亲和素磁颗粒

[0079] 取浓度为50mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液1mL,加入5mL的TBST溶液混匀后,置于磁分离器上分离磁颗粒,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒;重复清洗3次后,加入缓冲液A(缓冲液A由浓度为50mM的MES溶液、0.05%吐温-20和0.05%Proclin300组成,pH为6.5)配制成磁颗粒浓度为1%的固相试剂,即得链霉亲和素磁颗粒,2~8℃保存备用。

[0080] 2) 化学发光标记物标记IV型胶原单克隆抗体

[0081] 将500μgIV型胶原单克隆抗体放入离心管中,保证IV型胶原单克隆抗体位于离心管底部,室温条件下离心30s后加入碳酸缓冲溶液,混匀后加入5μL、浓度为2mg/mL的三联吡啶钌溶液,室温条件下离心1min;将离心管密封后放入避光暗盒中,然后将其放入气浴恒温振荡器中,23℃条件下混匀4h后,加入0.5mL、浓度为30%的赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器中,23℃条件下中速混匀,封闭时间为2h;将封闭好的IV型胶原单克隆抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集;将纯化后的IV型胶原单克隆抗体浓溶液用缓冲液A(缓冲液A由浓度为50mM的MES溶液、0.05%吐温-20和0.05%Proclin300组成,pH为6.5)稀释至终浓度为0.1μg/mL,即得化学发光标记物标记的IV型胶原单克隆抗体,2~8℃保存备用。

[0082] 3) 偶联标记物标记IV型胶原单克隆抗体

[0083] 取250μgIV型胶原单克隆抗体,用pH为6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入20倍摩尔比的生物素,2~8℃条件下反应1h,再转入室温继续反应10min,最后加入100倍摩尔比的赖氨酸反应30min,反应液用脱盐柱纯化,加入等体积的甘油和防腐剂,即得偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体,防腐剂为0.1%的NaN₃或0.1%的Proclin300。

[0084] 实施例4样品检测

[0085] 利用本发明的IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒检测IV型胶原含量时,以全自动化学发光免疫分析仪(CM180)为检测工具对IV型胶原校准品进行检测,绘制标准曲线,如图1所示,内置于电脑软件;然后根据需求按照本发明的检测方法测试临床样品,方法学模式为双抗体夹心法,具体的检测过程如下:

[0086] 取50μL样品加入仪器中,向样品中依次加入50μL偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体、50μL化学发光标记物标记的IV型胶原单克隆抗体、40μL链霉亲和素磁颗粒,反应20分钟后,进行磁分离;仪器将反应物送入暗室,一次加入清洗缓冲液,将杂质清洗去除,加入酸性激发液使化学发光标记物游离,加入碱性激发液使化学发光标记物发射光子;最后记录样品的光量子数;根据样品的光量子数与IV型胶原浓度成正比的关系计算出IV型胶原的浓度。

[0087] 实施例5 IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒性能评价

[0088] 1) 线性检测

[0089] 以校准品浓度为0.00ng/mL、20.0ng/mL、50.0ng/mL、100.0ng/mL、200.0 ng/mL、500.0ng/mL和1000.0ng/mL,根据表1中的数据绘制标准曲线,得到线性相关系数 $r =$

0.9990,线性范围为50~1000ng/mL。

[0090] 表1

[0091]

校准品浓度 (ng/mL)	光量子数
0	93

[0092]

20	1153
50	2463
100	4551
200	8876
500	22633
1000	43116

[0093] 2) 灵敏度检测

[0094] 分析灵敏度的定义为:对零值校准品进行20次测定光量子数,取其平均值减去两倍的标准差,带入标准曲线所得即为分析灵敏度;计算所得IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒的灵敏度约为15ng/mL,测试数据如表2所示。

[0095] 表2

[0096]

测试次数	光量子数	测试次数	光量子数
1	851	11	848
2	845	12	857
3	846	13	855
4	854	14	848
5	845	15	846
6	865	16	852
7	841	17	857
8	846	18	859
9	846	19	852
10	849	20	854
平均值		851	
标准差		5.90	
灵敏度 (ng/mL)		14.99	

[0097] 3) 抗干扰特异性检测

[0098] 测试时加入10mg/dL胆红素、2mg/mL血红蛋白、300mg/dL甘油三酯(三酸甘油酯)观察对IV型胶原浓度的影响,检测结果发现,含高达10mg/dL胆红素、2mg/mL血红蛋白、300mg/dL甘油三酯(三酸甘油酯),不会显著影响IV型胶原的测定($\pm 10\%$)。

[0099] 由上述检测结果可知,本发明的试剂盒的检测线性相关系数 $r \geq 0.9900$,即线性检测合格,线性范围为50~1000ng/mL;灵敏度为15ng/mL;抗干扰特异性强。由此证明,本发明的试剂盒具有灵敏度高、线性范围广、稳定性好等优点。

[0100] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

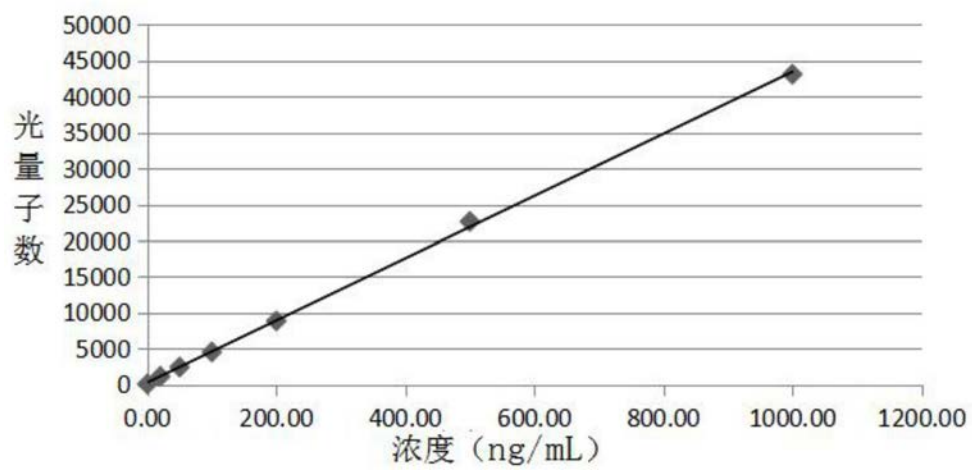


图1

专利名称(译)	IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和检测方法		
公开(公告)号	CN109239357A	公开(公告)日	2019-01-18
申请号	CN201811060677.9	申请日	2018-09-12
[标]发明人	张旭东 鲁海冰 高威 孙成艳 何浩会		
发明人	张旭东 鲁海冰 高威 孙成艳 何浩会		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/58 G01N33/543 G01N33/553 G01N33/532 G01N21/76		
代理人(译)	于晓庆		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

IV型胶原化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和检测方法，属于体外检测领域，解决了现有IV型胶原的检测方法存在的步骤繁琐、费时、出现假阳性率较高、灵敏度低、无法精确定量的问题。该试剂盒包括链霉亲和素磁颗粒；化学发光标记物标记的IV型胶原单克隆抗体；偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体；清洗缓冲液；化学发光预激发液；校准品。检测方法包括：向样品中依次加入偶联标记物标记的IV型胶原单克隆抗体、化学发光标记物标记的IV型胶原单克隆抗体和链霉亲和素磁颗粒，加入清洗缓冲液、酸性激发液和碱性激发液，根据样品的光量子数计算出IV型胶原的浓度。本发明操作简单、省时省力、假阳性率低、灵敏度高、测量精度高。

