



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110082519 A

(43)申请公布日 2019.08.02

(21)申请号 201910308690.X

(22)申请日 2019.04.17

(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 王莹

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

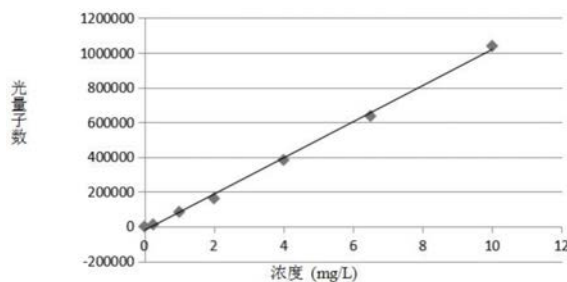
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

胱抑素C化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种胱抑素C化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法,属于试剂盒技术领域。解决了现有技术中胱抑素C的检测方法样本需求量大、存在稀有重金属污染风险的技术问题。本发明的试剂盒,包括R1试剂、R2试剂和R3试剂;R1试剂包含质量百分浓度为0.02%~1%的链霉亲和素磁颗粒和缓冲液I;R2试剂包括浓度为0.1~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的化学发光标记物标记的胱抑素C抗体和缓冲液II;R3试剂包括浓度为0.7~2.0 $\mu\text{g/mL}$ 的偶联标记物标记的胱抑素C抗体和缓冲液III。该试剂盒具有灵敏度高、准确定量、无放射性风险及样本需求量少等优点。



1. 胱抑素C化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,包括R1试剂、R2试剂和R3试剂;
所述R1试剂包含链霉亲和素磁颗粒和缓冲液I,R1试剂中链霉亲和素磁颗粒的质量百分浓度为0.02%~1%;
所述R2试剂包括化学发光标记物标记的胱抑素C抗体和缓冲液II,R2试剂中化学发光标记物标记的胱抑素C抗体的浓度为0.1~1.0 μ g/mL;
所述R3试剂包括偶联标记物标记的胱抑素C抗体和缓冲液III,R3试剂中偶联标记物标记的胱抑素C抗体的浓度为0.7~2.0 μ g/mL。
2. 根据权利要求1所述的胱抑素C化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述缓冲液I、缓冲液II和缓冲液III均为含有50~200mM的缓冲盐、0.05%~0.1%的表面活性剂和0.01%~0.1%的防腐剂,pH为6.5~7.2的缓冲液。
3. 根据权利要求2所述的胱抑素C化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述缓冲液I、缓冲液II和缓冲液III分别还含有0.05%~0.1%的稳定剂,所述稳定剂为牛血清白蛋白。
4. 根据权利要求2所述的胱抑素C化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述表面活性剂为吐温-20,防腐剂为NaN₃或ProClin300,缓冲盐为tris-HCl、PB、MES或HEPES。
5. 根据权利要求1所述的胱抑素C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为0.05~3 μ m。
6. 根据权利要求1所述的胱抑素C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胱抑素C抗体中,胱抑素C抗体与化学发光标记物的标记摩尔比为1:(3~20);化学发光标记物为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺或三联吡啶钼。
7. 根据权利要求1所述的胱抑素C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胱抑素C抗体中,胱抑素C抗体与偶联标记物的标记摩尔比为1:(5~20);偶联标记物为生物素或抗原。
8. 根据权利要求1所述的胱抑素C化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,该试剂盒中还包括校准品;所述校准品包括浓度分别为0.00mg/L、0.25mg/L、1.00mg/L、2.00mg/L、4.00mg/L、6.50mg/L和10.00mg/L的胱抑素C蛋白溶液。
9. 根据权利要求1所述的胱抑素C化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,该试剂盒中还包括化学发光预激发液A和化学发光激发液B;所述化学发光激发液A为硝酸溶液和过氧化氢溶液;所述化学发光激发液B为氢氧化钠溶液。
10. 权利要求1~9任何一项所述的胱抑素C化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:
步骤一、制备R1试剂
将链霉亲和素磁颗粒溶液加入TBST溶液中,充分混匀后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒,使用缓冲液I清洗磁颗粒后,再用缓冲液I配成磁颗粒质量百分浓度为0.02%~1%的固相试剂,即为R1试剂;
步骤二、制备R2试剂
先将胱抑素C抗体放入离心管中,保证胱抑素C抗体位于离心管底部位置后加入碳酸缓冲液,充分混匀,混匀后加入化学发光标记物的DMF溶液,用离心机室温条件下离心0.5~1min;
然后将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,将暗盒放入气浴恒温振荡器中混匀,

取出,加入赖氨酸封闭液,再放入气浴恒温振荡器中混匀并封闭1~2h;

再将封闭好的朮抑素C抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用磷酸缓冲液洗脱,分别收集;

最后将收集好的朮抑素C抗体溶液用缓冲液Ⅱ稀释至终浓度为0.1~1.0 μ g/mL,即为R2试剂;

步骤三、制备R3试剂

取朮抑素C抗体,用pH为6.0~6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入已活化的长链磺化生物素,2~8℃反应1~3h,再转入室温继续反应10~30min,最后加入赖氨酸反应10~30min,反应液脱盐柱纯化,加入缓冲液Ⅲ稀释至终浓度为0.7~2.0 μ g/mL,即为R3试剂。

胱抑素C化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于试剂盒技术领域,具体涉及一种胱抑素C化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 胱抑素C (CystatinC, CysC) 是半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族的成员之一,胱氨酸蛋白酶是一种淀粉生成酶,主要存在于小动脉壁,产生淀粉样物质,而CysC是半胱氨酸蛋白酶的细胞外抑制剂,在CysC中含量最为丰富,并对细胞内蛋白的转换起作用。CysC由机体有核细胞产生,仅经肾小球滤过而被清除,是一种反映肾小球滤过率 (GFR) 变化的理想的同源性标志物。自从1985年以来,CysC已被视为检测肾功能的良好标志物,其不受许多生理病理因素的影响,它能敏感反映早期肾功能损害,可用于肾脏透析、糖尿病肾病、肾移植和肿瘤患者肾功能的监控。

[0003] 目前测定胱抑素C的方法有乳胶增强免疫散射浊度法 (PENIA)、胶体金等方法。PENIA能在较低的背景检测到轻度的升高,且较少受干扰因素的影响。但是,实际上由于样本存在非特异性背景散射而需要把标本先稀释,标本体积为80微升,这对儿科及特殊患者即仅有少量标本的患者不太适用,另外存在稀有重金属污染的风险。

[0004] 有鉴于此,有必要提供一种操作简单、精准定量、无污染、灵敏度高、样本需求量少的胱抑素C检测方法。

发明内容

[0005] 本发明为解决现有技术中胱抑素C的检测方法样本需求量大、存在稀有重金属污染风险的技术问题,提供一种胱抑素C化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。

[0006] 本发明解决上述技术问题采取的技术方案如下:

[0007] 本发明提供的胱抑素C化学发光免疫检测试剂盒,包括R1试剂、R2试剂和R3试剂;

[0008] 所述R1试剂包含链霉亲和素磁颗粒和缓冲液I,R1试剂中链霉亲和素磁颗粒的质量百分浓度为0.02%~1%;

[0009] 所述R2试剂包括化学发光标记物标记的胱抑素C抗体和缓冲液II,R2试剂中化学发光标记物标记的胱抑素C抗体的浓度为0.1~1.0 μ g/mL;

[0010] 所述R3试剂包括偶联标记物标记的胱抑素C抗体和缓冲液III,R3试剂中偶联标记物标记的胱抑素C抗体的浓度为0.7~2.0 μ g/mL。

[0011] 优选的是,所述缓冲液I、缓冲液II和缓冲液III均为含有50~200mM的缓冲盐、0.05%~0.1%的表面活性剂和0.01%~0.1%的防腐剂,pH为6.5~7.2的缓冲液;

[0012] 更优选的是,所述表面活性剂为吐温-20,防腐剂为NaN₃或ProClin300,缓冲盐为tris-HCl、PB、MES或HEPES;

[0013] 更优选的是,所述缓冲液I、缓冲液II和缓冲液III均还含有0.05%~0.1%的稳定剂,所述稳定剂为牛血清白蛋白。

[0014] 优选的是,所述链霉亲和素磁颗粒的粒径为0.05~3 μ m。

[0015] 优选的是,所述化学发光标记物标记的胱抑素C抗体中,胱抑素C抗体与化学发光标记物的标记摩尔比为1:(3~20);化学发光标记物为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺或三联吡啶钌。

[0016] 优选的是,所述偶联标记物标记的胱抑素C抗体中,胱抑素C抗体与偶联标记物的标记摩尔比为1:(5~20);偶联标记物为生物素或抗原。

[0017] 优选的是,该试剂盒中还包括校准品;所述校准品包括浓度分别为0.00mg/L、0.25mg/L、1.00mg/L、2.00mg/L、4.00mg/L、6.50mg/L和10.00mg/L的胱抑素C蛋白溶液。

[0018] 优选的是,该试剂盒中还包括化学发光预激发液A和化学发光激发液B;所述化学发光激发液A为硝酸溶液和过氧化氢溶液;所述化学发光激发液B为氢氧化钠溶液。

[0019] 本发明还提供上述胱抑素C化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0020] 步骤一、制备R1试剂

[0021] 将链霉亲和素磁颗粒溶液加入TBST溶液中,充分混匀后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒,使用缓冲液I清洗磁颗粒后,再用缓冲液I配成磁颗粒质量百分浓度为0.02%~1%的固相试剂,即为R1试剂;

[0022] 步骤二、制备R2试剂

[0023] 先将胱抑素C抗体放入离心管中,保证胱抑素C抗体位于离心管底部位置后加入碳酸缓冲液,充分混匀,混匀后加入化学发光标记物的DMF溶液,用离心机室温条件下离心0.5~1min;

[0024] 然后将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,将暗盒放入气浴恒温振荡器中混匀,取出,加入赖氨酸封闭液,再放入气浴恒温振荡器中混匀并封闭1~2h;

[0025] 再将封闭好的胱抑素C抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用磷酸缓冲液洗脱,分别收集;

[0026] 最后将收集好的胱抑素C抗体溶液用缓冲液II稀释至终浓度为0.1~1.0 μ g/mL,即为R2试剂;

[0027] 步骤三、制备R3试剂

[0028] 取胱抑素C抗体,用pH为6.0~6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入已活化的长链碘化生物素,2~8 $^{\circ}$ C反应1~3h,再转入室温继续反应10~30min,最后加入赖氨酸反应10~30min,反应液脱盐柱纯化,加入缓冲液III稀释至终浓度为0.7~2.0 μ g/mL,即为R3试剂。

[0029] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0030] 本发明的胱抑素C化学发光免疫检测试剂盒具有灵敏度高、准确定量、无放射性风险及样本需求量少等优点。具体来讲:

[0031] 1、本发明的胱抑素C化学发光免疫检测试剂盒采用链霉亲和素磁颗粒与生物素标记的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;

[0032] 2、本发明的胱抑素C化学发光免疫检测试剂盒抗原、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;

[0033] 3、本发明的胱抑素C化学发光免疫测定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,系统误差小,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,并且实现无人值守;

[0034] 4、本发明的脬抑素C化学发光免疫测定试剂盒选择吡啶酯等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,且吡啶酯的化学发光免疫分析系统线性范围宽。

附图说明

[0035] 图1为本发明实施例1的脬抑素C化学发光免疫测定试剂盒的反应校准曲线。

具体实施方式

[0036] 为了进一步理解本发明,下面对本发明优选实施方案进行描述,但是应当理解,这些描述只是为进一步说明本发明的特征和优点,而不是对本发明权利要求的限制。

[0037] 本发明提供的脬抑素C化学发光免疫检测试剂盒,包括R1试剂、R2试剂和R3试剂:

[0038] R1试剂包含链霉亲和素磁颗粒和缓冲液I,R1试剂中链霉亲和素磁颗粒的质量百分浓度为0.02%~1%;

[0039] R2试剂包括化学发光标记物标记的脬抑素C抗体和缓冲液II,R2试剂中化学发光标记物标记的脬抑素C抗体的浓度为0.1~1.0 μ g/mL;

[0040] R3试剂包括偶联标记物标记的脬抑素C抗体和缓冲液III,R3试剂中偶联标记物标记的脬抑素C抗体的浓度为0.7~2.0 μ g/mL。

[0041] 上述技术方案中,缓冲液I、缓冲液II和缓冲液III均为含有50~200mM的缓冲盐、0.05%~0.1%的表面活性剂和0.01%~0.1%的防腐剂,pH为6.5~7.2的缓冲液;缓冲液I、缓冲液II和缓冲液III还可以分别独立的含有0.05%~0.1%的稳定剂;

[0042] 其中,稳定剂优选为牛血清白蛋白,表面活性剂优选为吐温-20,防腐剂优选为NaN₃或ProClin300,缓冲盐优选为tris-HCl、PB、MES或HEPES。

[0043] 上述技术方案中,链霉亲和素磁颗粒的粒径优选为0.05~3 μ m。

[0044] 上述技术方案中,化学发光标记物标记的脬抑素C抗体中,脬抑素C抗体与化学发光标记物的标记摩尔比为1:(3~20);化学发光标记物为吡啶酯、鲁米诺、异鲁米诺或三联吡啶钌,优选为吡啶酯。

[0045] 上述技术方案中,偶联标记物标记的脬抑素C抗体中,脬抑素C抗体与偶联标记物的标记摩尔比为1:(5~20);偶联标记物为生物素或抗原,优选为生物素,如Sulfo-NHS-LC-Biotin(购买自ACROBiosystems)。

[0046] 上述试剂盒中,还包括校准品;所述校准品包括浓度分别为0.00mg/L、0.25mg/L、1.00mg/L、2.00mg/L、4.00mg/L、6.50mg/L和10.00mg/L的脬抑素C蛋白溶液。

[0047] 上述试剂盒中,还包括化学发光预激发液A和化学发光激发液B;化学发光激发液A为硝酸溶液和过氧化氢溶液;化学发光激发液B为氢氧化钠溶液。化学发光预激发液A和化学发光激发液B可通过商购获得。

[0048] 本发明的脬抑素C化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0049] 步骤一、R1试剂制备

[0050] 取链霉亲和素磁颗粒溶液,加入的TBST溶液充分混匀(一般需10~15min)后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒,用缓冲液I重复清洗3~5次后,用缓

冲液I配成磁颗粒质量百分浓度为0.02%~1%的固相试剂,即为R1试剂,2~8℃保存。

[0051] 其中,链霉亲和素磁颗粒溶液可购买自安捷伦科技有限公司,浓度为10~100mg/ml,链霉亲和素磁颗粒溶液与TBST溶液的体积比优选为(0.1~1):(5~10)。

[0052] 步骤二、R2试剂制备

[0053] 将胱抑素C抗体放入离心管中,离心机室温离心20~30s,使胱抑素C抗体位于离心管底部位置,加入碳酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入含有化学发光标记物的DMF溶液,用离心机室温条件下离心0.5~1min;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(24~25℃),混匀3~4h;取出,加入赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(24~25℃),中速混匀,封闭时间为1h~2h;将封闭好的抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集;将收集好的抗体溶液用缓冲液II稀释至终浓度为0.1~1.0μg/mL,2~8℃保存。

[0054] 其中,含有化学发光标记物的DMF溶液中化学发光标记物的浓度优选为2mg/mL,胱抑素C抗体与化学发光标记物的标记摩尔比优选为1:(3~20),赖氨酸封闭液中赖氨酸的质量百分浓度优选为20%~30%;赖氨酸封闭液与胱抑素C抗体的配比优选为1mL:(250~1000)μg。

[0055] 步骤三、R3试剂制备

[0056] 取胱抑素C抗体,用pH为6.0~6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入已活化的偶联标记物,2~8℃反应1~3h,再转入室温继续反应10~30min,最后加入赖氨酸反应10~30min,反应液用脱盐柱纯化,用缓冲液III稀释至终浓度为0.7~2.0μg/mL,2~8℃保存。

[0057] 其中,胱抑素C抗体与偶联标记物的标记摩尔比优选为1:(5~20),胱抑素C抗体与赖氨酸的摩尔比优选为1:100;

[0058] 步骤四、将R1、R2和R3试剂分别灌封于不同的试剂瓶,得到胱抑素C化学发光免疫检测试剂盒。

[0059] 上述技术方案中,如包含校准品,还需先制备校准品,将胱抑素C抗原用缓冲液分别配制成浓度为0.00mg/L、0.25mg/L、1.00mg/L、2.00mg/L、4.00mg/L、6.50mg/L和10.00mg/L的校准品,等量分装;

[0060] 缓冲液含有0.1mol/L的PB、0.15mol/L的氯化钠、1%的牛血清白蛋白及0.05%的吐温-20,pH为6.5,需2~8℃保存。

[0061] 本发明的胱抑素C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,完成对胱抑素C的检测,试剂盒与仪器配套,检测所需的时间短,检测精度较高。

[0062] 本发明的胱抑素C化学发光免疫检测试剂盒的检测步骤如下:

[0063] 利用全自动化学发光免疫分析仪(CM180)对胱抑素C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胱抑素C的浓度;最后对胱抑素C全自动化学发光免疫分析系统进行性能(灵敏度、线性和准确度)的评价。

[0064] 以下结合实施例进一步说明本发明。链霉亲和素磁颗粒溶液来自安捷伦科技有限公司,货号PL6727-1001。生物素Sulfo-NHS-LC-Biotin,购买自ACROBiosystems。

[0065] 实施例1

[0066] 步骤一、R1试剂制备

[0067] 取浓度是150mg/ml的链霉亲和素磁颗粒溶液1.5mL,加入10mL的TBST溶液充分混匀10min后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒,用缓冲液I重复清洗3次后在缓冲液I中配成链霉亲和素磁颗粒的质量百分浓度为0.02%的溶液,即R1试剂,2~8℃保存。其中,缓冲液I为含有50mM MES、0.15%吐温-20和0.1%Proclin300,pH6.5的缓冲液。

[0068] 步骤二、R2试剂制备

[0069] 将500μg抗体放入离心管中,离心机室温离心20s,保证抗体位于离心管底部位置后,加入碳酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入0.75μL 2mg/mL吖啶酯的DMF溶液(胱抑素C抗体与吖啶酯的标记摩尔比为1:3),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。取出,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。将纯化后的胱抑素C抗体浓溶液用缓冲液II稀释至吖啶酯标记的胱抑素C抗体的浓度为0.1μg/mL,即为R2试剂,2~8℃保存。其中,缓冲液II为含有50mM MES、0.05%吐温-20和0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液。

[0070] 步骤三、R3试剂制备

[0071] 取胱抑素C抗体,将pH6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入已活化的长链磺化生物素 Sulfo-NHS-LC-Biotin(胱抑素C抗体与生物素的标记摩尔比为1:5),2~8℃反应2h,再转入室温继续反应30min,最后加入赖氨酸(赖氨酸与胱抑素C抗体的摩尔比100:1)反应30min,反应液用脱盐柱纯化收集。将纯化后的胱抑素C抗体浓溶液用缓冲液III稀释至生物素标记的胱抑素C抗体的浓度为0.7μg/mL,即为R3试剂,2~8℃保存。其中,缓冲液III为含有50mM MES、0.05%吐温-20和0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液。

[0072] 实施例2

[0073] 步骤一、R1试剂制备

[0074] 取浓度是50mg/ml的链霉亲和素磁颗粒溶液0.5mL,加入10mL的TBST溶液充分混匀15min,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒,用缓冲液I重复清洗5次后在缓冲液I中配成链霉亲和素磁颗粒的质量百分浓度为0.5%的溶液,即R1试剂,2~8℃保存,缓冲液I为含有50mM MES、0.10%吐温-20和0.05%Proclin300,pH7.2的缓冲液。

[0075] 步骤二、R2试剂制备

[0076] 将250μg胱抑素C抗体放入离心管中,离心机室温离心40s,保证抗体位于离心管底部位置后,加入碳酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入0.375μL的2mg/mL吖啶酯DMF溶液(胱抑素C抗体与吖啶酯的标记摩尔比为1:10),用离心机室温条件下离心1min;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5h;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3h;将封闭好的抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将纯化后的胱抑素C抗体浓溶液用缓冲液II稀释至吖啶酯标记的胱抑素C抗体的浓度为0.5μg/mL,即为R2试剂,2~8℃保存。其中,缓冲液II为含有50mM MES、0.10%吐温和0.05%Proclin300,pH7.0的缓冲液。

[0077] 步骤三、R3试剂制备

[0078] 取250μg胱抑素C抗体,pH6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入已活化的长链磺化生物素(胱抑素C抗体与生物素的标记摩尔比为1:10),6℃反应3h,再转入室温继续反应

30min,最后加入赖氨酸(赖氨酸与胱抑素C抗体的摩尔比100:1)反应50min,反应液用脱盐柱纯化收集。将纯化后的胱抑素C抗体浓溶液用缓冲液Ⅲ稀释至生物素标记的胱抑素C抗体的浓度为1.5 μ g/ml,即为R3试剂,2~8℃保存。其中,缓冲液Ⅲ为含有50mM MES、0.05%吐温-20和0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液。

[0079] 实施例3

[0080] 步骤一、R1试剂制备

[0081] 取浓度是100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒溶液1.0mL,加入10mL的TBST溶液充分混匀12min,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒,用缓冲液I重复清洗4次后在缓冲液I中配成链霉亲和素磁颗粒的质量百分浓度为1%的溶液,即R1试剂,2~8℃保存。缓冲液I为含有50mM MES、0.05%吐温-20和0.05%Proclin300,pH7.0的缓冲液。

[0082] 步骤二、R2试剂制备

[0083] 将1mg胱抑素C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50s)后加入碳酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入1.5 μ L的2mg/mL吡啶酯DMF溶液(胱抑素C抗体与吡啶酯的标记摩尔比为1:20),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3h;加入1mL20%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2.5h;将封闭好的抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将纯化后的胱抑素C抗体浓溶液用缓冲液Ⅱ稀释至吡啶酯标记的胱抑素C抗体的浓度为1.0 μ g/mL,即为R2试剂,2~8℃保存。其中,缓冲液Ⅱ为含有50mM MES、0.05%吐温和0.15%Proclin300,pH6.5的缓冲液。

[0084] 步骤三、R3试剂制备

[0085] 取1mg胱抑素C抗体,pH6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入已活化的长链碘化生物素(胱抑素C抗体与生物素的标记摩尔比为1:20),4℃反应2.5h,再转入室温继续反应1h,最后加入赖氨酸(赖氨酸与胱抑素C抗体的摩尔比100:1)反应40min,反应液用脱盐柱纯化收集。将纯化后的胱抑素C抗体浓溶液用缓冲液Ⅲ稀释至生物素标记的胱抑素C抗体的浓度为2.0 μ g/ml,即为R3试剂,2~8℃保存。其中,缓冲液Ⅲ为含有50mM MES、0.05%吐温-20和0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液。

[0086] 对实施例1~3的胱抑素C化学发光免疫检测试剂盒的性能进行评价。

[0087] 胱抑素C化学发光免疫检测试剂盒使用方法:以全自动化学发光免疫分析仪(CM180)为检测工具,方法学模式为双抗体夹心法,即仪器依次加入10 μ L的检测样本,50 μ L的R2试剂,50 μ L的R3试剂及40 μ L的R1试剂。反应20min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(HNO₃溶液和H₂O₂溶液)和B液(NaOH溶液)进行反应,最后记录光量子数。

[0088] 对实施例1组装成的胱抑素C化学发光免疫检测试剂盒进行线性的检测:检测样本为校准品(缓冲液为0.1mol/L的PB、0.15mol/L的氯化钠、1%的牛血清白蛋白及0.05%的吐温-20,pH6.5的缓冲液),建立校准品浓度(0.00mg/L、0.25mg/L、1.00mg/L、2.00mg/L、4.00mg/L、6.50mg/L、10.00mg/L)与光量子数的标准曲线,数据如表1所示,曲线如图1所示,得到线性相关系数 $r=0.9979$,线性范围为0.2~10mg/L。

[0089] 表1

[0090]

校准品浓度 (mg/L)	光量子数
0.00	450
0.25	12461
1.00	84564
2.00	162367
4.00	383542
6.50	636300
10.00	1039477

[0091] 数据处理: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,取其平均值加两倍标准差,带入零值校准品及相邻的校准所成直线所得即为灵敏度;计算胰抑素C化学发光免疫检测试剂盒的灵敏度为0.10mg/L,具体数据如表2所示。

[0092] 表2

[0093]

测试次数	光量子数	测试次数	光量子数
1	4252	11	4320

[0094]

2	4211	12	4308
3	4351	13	4311
4	4365	14	4451
5	4652	15	4364
6	4332	16	4227
7	4333	17	4362
8	4289	18	4333
9	4399	19	4287
10	4265	20	4178
平均值		4329.5	
标准差		99.90	
灵敏度 (mg/L)		0.10	

[0095] 对实施例1~3的胰抑素C化学发光免疫检测试剂盒进行准确度评价,使用校准品第三点和第六点进行测定,实测值与标示值的相对偏差应在±15%的范围内。具体数据如表3所示。计算公式为: $B_i = (X_i - T) / T \times 100\%$

[0096] 表3

[0097]

实施例	测定次数	测量浓度 (Xi) (mg/L)	校准品标定浓 度 (T) (mg/L)	相对偏差 (Bi)
实施例 1	重复 1	1.04	1.00	4.00%
	重复 2	1.01		1.00%
	重复 3	0.92		-8.00%
	重复 1	6.61	6.50	1.69%
	重复 2	6.50		0.00%
	重复 3	6.42		-1.23%
实施例 2	重复 1	1.02	1.00	2.00%
	重复 2	1.03		3.00%
	重复 3	1.06		6.00%
	重复 1	6.51	6.50	0.15%
	重复 2	6.45		-0.77%
	重复 3	6.54		0.62%
实施例 3	重复 1	1.05	1.00	5.00%
	重复 2	1.04		4.00%

[0098]

	重复 3	1.06	6.50	6.00%
	重复 1	6.62		1.85%
	重复 2	6.48		-0.31%
	重复 3	6.55		0.77%

[0099] 从表3可以看出,实施例1~3的胰抑素C化学发光免疫检测试剂盒进行准确度评价,相对偏差在±15%的范围内,测试偏差合格,性能良好。

[0100] 对所公开的实施例的上述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

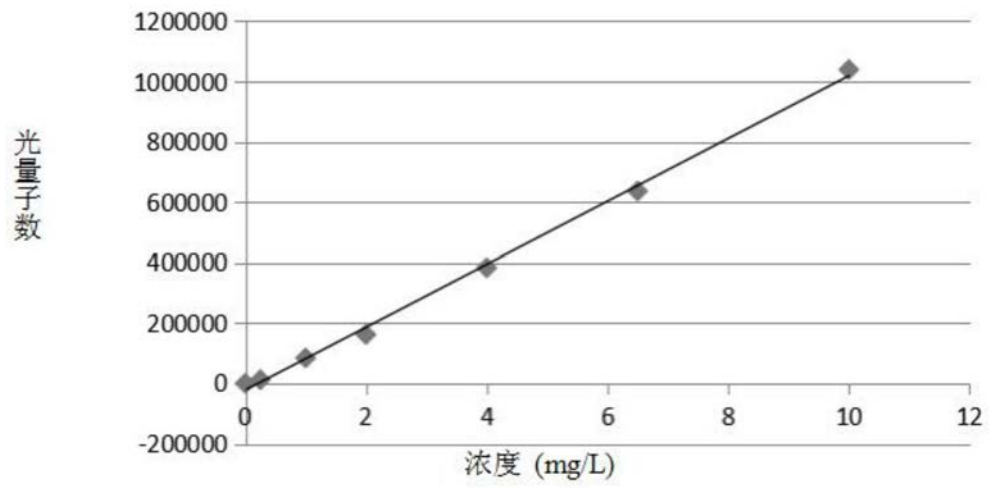


图1

专利名称(译)	朓抑素C化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN110082519A	公开(公告)日	2019-08-02
申请号	CN201910308690.X	申请日	2019-04-17
[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	G01N33/53 G01N33/532 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/532 G01N33/54326		
代理人(译)	王莹		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种朓抑素C化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法，属于试剂盒技术领域。解决了现有技术中朓抑素C的检测方法样本需求量大、存在稀有重金属污染风险的技术问题。本发明的试剂盒，包括R1试剂、R2试剂和R3试剂；R1试剂包含质量百分浓度为0.02%~1%的链霉亲和素磁颗粒和缓冲液I；R2试剂包括浓度为0.1~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的化学发光标记物标记的朓抑素C抗体和缓冲液II；R3试剂包括浓度为0.7~2.0 $\mu\text{g/mL}$ 的偶联标记物标记的朓抑素C抗体和缓冲液III。该试剂盒具有灵敏度高、准确定量、无放射性风险及样本需求量少等优点。

