



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110082537 A

(43)申请公布日 2019.08.02

(21)申请号 201910308294.7

(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 李磊 李冬梅 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 王莹

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

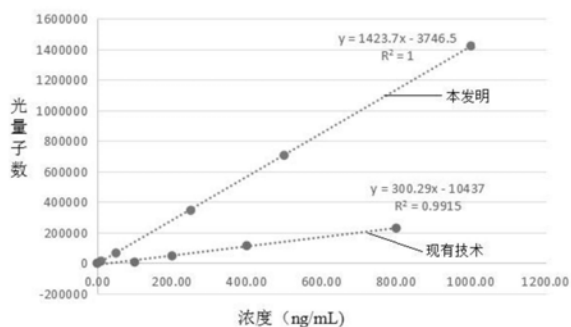
权利要求书2页 说明书14页 附图1页

(54)发明名称

血管内皮生长因子化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种血管内皮生长因子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。解决了现有的检测血管内皮生长因子的方法操作繁琐、检测时间长、自动化程度低、受人为因素影响大、灵敏度低、重复性差的问题。本发明的试剂盒,包括R1试剂、R2试剂和R3试剂;R1试剂包含链霉亲和素磁颗粒和缓冲液I;R2试剂包括化学发光标记物标记的血管内皮生长因子单克隆抗体和缓冲液II;R3试剂包括偶联标记物标记的血管内皮生长因子单克隆抗体和缓冲液III。该试剂盒操作简单、检测时间短、自动化程度高、不受人为因素影响、灵敏度高、重复性好、抗干扰性好、检测范围宽、热稳定性好。



1. 血管内皮生长因子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试剂包括链霉亲和素磁颗粒和缓冲液I;

所述R2试剂包括化学发光标记物标记的血管内皮生长因子单克隆抗体和缓冲液II;

所述R3试剂包括偶联标记物标记的血管内皮生长因子单克隆抗体和缓冲液III。

2. 根据权利要求1所述的血管内皮生长因子化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述R1试剂中链霉亲和素磁颗粒的质量百分浓度为0.01%~1%; 所述R2试剂中化学发光标记物标记的血管内皮生长因子单克隆抗体的浓度为 $\geq 0.1\mu\text{g/mL}$; 所述R3试剂中偶联标记物标记的血管内皮生长因子单克隆抗体的浓度为 $\geq 0.7\mu\text{g/mL}$ 。

3. 根据权利要求2所述的血管内皮生长因子化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述R1试剂中链霉亲和素磁颗粒的质量百分浓度为0.05%~0.072%; 所述R2试剂中化学发光标记物标记的血管内皮生长因子单克隆抗体的浓度为 $0.1\sim 1.0\mu\text{g/mL}$; 所述R3试剂中偶联标记物标记的血管内皮生长因子单克隆抗体的浓度为 $0.7\sim 2.0\mu\text{g/mL}$ 。

4. 根据权利要求1所述的血管内皮生长因子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 $0.05\sim 3\mu\text{m}$ 。

5. 根据权利要求1所述的血管内皮生长因子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血管内皮生长因子单克隆抗体中, 血管内皮生长因子单克隆抗体与化学发光标记物的摩尔比为1: (1~20), 所述化学发光标记物为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺和三联吡啶钌。

6. 根据权利要求1所述的血管内皮生长因子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血管内皮生长因子单克隆抗体中, 血管内皮生长因子单克隆抗体与偶联标记物的摩尔比为1: (1~20), 所述偶联标记物为生物素。

7. 根据权利要求1所述的血管内皮生长因子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0.05%~0.1%的表面活性剂、0.01%~0.1%的防腐剂和50~400mM的缓冲盐, pH为6.0~7.2的缓冲液。

8. 根据权利要求1所述的血管内皮生长因子化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述的试剂盒还包括化学发光底物液, 所述化学发光底物液包括A液和B液; A液为过氧化氢溶液和硝酸溶液, B液为氢氧化钠溶液。

9. 根据权利要求1所述的血管内皮生长因子化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述的试剂盒还包括血管内皮生长因子校准品, 校准品包括浓度分别为0.00ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、250ng/mL、500ng/mL和1000ng/mL的血管内皮生长因子的溶液。

10. 权利要求1~9任何一项所述的血管内皮生长因子化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 包括以下步骤:

步骤一、将链霉亲和素磁颗粒溶液和TBST溶液混匀后, 放置在磁分离器上, 直至上清液无混浊, 弃上清, 留取磁颗粒, 以缓冲液I清洗后在缓冲液I中配成固相试剂, 即为R1试剂;

步骤二、将血管内皮生长因子单克隆抗体放入离心管中离心, 然后加入碳酸缓冲液, 混匀后加入化学发光标记物溶液离心, 将离心管密封后放入避光暗盒中, 然后将暗盒放入气浴恒温振荡器中混匀, 加入封闭液, 放入气浴恒温振荡器中混匀, 将封闭好的抗体经过纯化、收集, 用缓冲液II稀释, 得到R2试剂;

步骤三、将血管内皮生长因子单克隆抗体放入离心管中离心,然后加入TRIS缓冲液,混匀后加入偶联标记物溶液离心,反应后,加入赖氨酸,继续反应,最后将反应液用脱盐柱纯化、收集后,用缓冲液Ⅲ稀释,得到R3试剂。

血管内皮生长因子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,具体涉及一种血管内皮生长因子化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 血管内皮生长因子(VEGF)是一个分子量为45KD的高度糖基化的碱性蛋白,有两个相同亚单位通过二硫键结合形成,等电点为8.5,具有很强的耐热和耐酸能力。人VEGF基因有5种不同的异构体,分别为VEGF206、VEGF189、VEGF165、VEGF145和VEGF121。位于血管内皮细胞上的3种VEGF受体(VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3)是VEGF的高亲和力结合位点,这三种受体均是跨膜受体。研究表明VEGF受体在体外与VEGF有高度亲和力。

[0003] VEGF是调节新血管生成的最重要的细胞因子。研究表明VEGF在血管系统的发育分化中具有不可替代的作用。在人类各种恶性肿瘤疾病中,VEGF的分泌增加有着普遍性和广泛性。有大量文献报道,与正常人相比,癌症患者血液中VEGF浓度显著升高。因此,检测人血液中的VEGF浓度,能够用于癌症的早期普查诊断。另一方面,VEGF在人体血液中的浓度随肿瘤的消长情况而变化。肿块大、生长快时,VEGF的血液浓度就高;而当肿瘤因化疗或手术“临床治愈”时,VEGF的血液浓度降低。因此VEGF的检测可作为疗效观察和预后的指标。VEGF是恶性肿瘤诊断中的一个重要组成部分。另外,血液VEGF水平增高亦见于糖尿病、血管炎症性疾病、某些免疫性疾病和妊娠等。

[0004] 化学发光免疫测定(CLIA)是继酶免技术、放免技术、荧光免疫技术和时间分辨荧光免疫技术之后发展的一项新兴免疫测定技术。由于它既具有免疫反应的高度特异性,又具有发光反应的高敏感性,近年来已被国内外临床实验室及科研单位广泛应用于各种激素、特种蛋白及药物的监测和分析。该方法具有灵敏度高、特异性强、线性范围宽、操作简便、试剂稳定性好、容易实现自动化的优点,是理想的临床微量生化检验分析手段。

[0005] 常见的化学发光体系有多种,最主要的有:HRP-鲁米诺系统、吖啶酯系统、电化学发光体系等。吖啶酯发光体系相对于其他体系而言具有其特殊的优点:首先吖啶酯标记工艺简单,标记物发光稳定,试剂盒有效期长,成本相对较低;且发光为闪光型,发光快速集中且强大,方便实现快速检测,检测的灵敏度和精密度都很高,对于仪器的要求简单,便于实现全自动化操作;其次,吖啶酯发光系统较为简单,碱性-过氧化氢就可以直接发光,不需要增强剂或者催化剂,干扰因素少,本底极低,信噪比很高。

[0006] 目前我国获准上市的临床检测血管内皮生长因子试剂盒检测原理主要以酶联免疫法(ELISA)和辣根过氧化物酶联合鲁米诺类化合物化学发光。但是,现有的酶联免疫法不仅操作繁琐,自动化程度低,受人为因素影响大,不利于在基层医院推及,而且特异性及灵敏性都有待提高。

[0007] 基于以上情况,研制开发高特异性、高灵敏度的吖啶酯类血管内皮生长因子化学发光免疫分析试剂盒,用于肿瘤的广谱筛查、辅助诊断、预后检测,从理论与实际意义上讲是切实可行,并有广泛市场前景。

发明内容

[0008] 本发明的目的是为了解决现有的检测血管内皮生长因子的方法操作繁琐、检测时间长、自动化程度低、受人为因素影响大、灵敏度低、重复性差的问题,而提供一种血管内皮生长因子化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。

[0009] 本发明解决上述技术问题采取的技术方案如下。

[0010] 本发明首先提供一种血管内皮生长因子化学发光免疫检测试剂盒,包括R1试剂、R2试剂和R3试剂;

[0011] 所述R1试剂包括链霉亲和素磁颗粒和缓冲液I;

[0012] 所述R2试剂包括化学发光标记物标记的血管内皮生长因子单克隆抗体和缓冲液II;

[0013] 所述R3试剂包括偶联标记物标记的血管内皮生长因子单克隆抗体和缓冲液III。

[0014] 优选的是,优选R1试剂中链霉亲和素磁颗粒的质量百分浓度为0.01%~1%,更优选的为0.05%~0.072%。

[0015] 优选的是,优选R2试剂中化学发光标记物标记的血管内皮生长因子单克隆抗体的浓度为 $\geq 0.1\mu\text{g/mL}$,更优选的 $0.1\sim 1.0\mu\text{g/mL}$ 。

[0016] 优选的是,优选R3试剂中偶联标记物标记的血管内皮生长因子单克隆抗体的浓度为 $\geq 0.7\mu\text{g/mL}$,更优选的 $0.7\sim 2.0\mu\text{g/mL}$ 。

[0017] 优选的是,所述链霉亲和素磁颗粒的粒径为 $0.05\sim 3\mu\text{m}$ 。

[0018] 优选的是,所述化学发光标记物标记的血管内皮生长因子单克隆抗体中,血管内皮生长因子单克隆抗体与化学发光标记物的摩尔比为1:(1~20),所述化学发光标记物为吡啶酯、鲁米诺、异鲁米诺和三联吡啶钌。

[0019] 优选的是,所述偶联标记物标记的血管内皮生长因子单克隆抗体中,血管内皮生长因子单克隆抗体与偶联标记物的摩尔比为1:(1~20),所述偶联标记物为生物素。

[0020] 优选的是,所述缓冲液I、缓冲液II和缓冲液III均为含有0.05%~0.1%的表面活性剂、0.01%~0.1%的防腐剂和50~400mM的缓冲盐的pH为6.0~7.2的缓冲液。

[0021] 优选的是,所述的试剂盒还包括化学发光底物液,所述化学发光底物液包括A液和B液;A液为过氧化氢溶液和硝酸溶液,B液为氢氧化钠溶液。

[0022] 优选的是,所述的试剂盒还包括血管内皮生长因子校准品,校准品包括浓度分别为0.00ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、250ng/mL、500ng/mL和1000ng/mL的血管内皮生长因子的溶液。

[0023] 本发明还提供上述的血管内皮生长因子的化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0024] 步骤一、将链霉亲和素磁颗粒溶液和TBST溶液混匀后,放置在磁分离器上,直至上清液无混浊,弃上清,留取磁颗粒,以缓冲液I清洗后在缓冲液I中配成固相试剂,即为R1试剂;

[0025] 步骤二、将血管内皮生长因子单克隆抗体放入离心管中离心,然后加入碳酸缓冲液,混匀后加入化学发光标记物溶液离心,将离心管密封后放入避光暗盒中,然后将暗盒放入气浴恒温振荡器中混匀,加入封闭液,放入气浴恒温振荡器中混匀,将封闭好的抗体经过纯化、收集,用缓冲液II稀释,得到R2试剂;

[0026] 步骤三、将血管内皮生长因子单克隆抗体放入离心管中离心,然后加入TRIS缓冲液,混匀后加入偶联标记物溶液离心,反应后,加入赖氨酸,继续反应,最后将反应液用脱盐柱纯化、收集后,用缓冲液Ⅲ稀释,得到R3试剂。

[0027] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0028] 本发明的血管内皮生长因子化学发光免疫检测试剂盒,以链霉亲和素磁颗粒作为固相载体,结合发光强度和灵敏度都较高的化学发光物质对VEGF进行标记,采用过氧化氢化学发光体系,以双抗体夹心法实现对VEGF的定量检测,操作简单、检测时间短、自动化程度高、不受人因素为影响、灵敏度高、重复性好、抗干扰性好、检测范围宽、热稳定好。具体来讲:

[0029] 1、本发明的链霉亲和素磁珠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;

[0030] 2、本发明的血管内皮生长因子化学发光免疫测定试剂盒选择吖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,且吖啶酯的化学发光免疫分析系统线性范围宽。

[0031] 3、本发明的血管内皮生长因子化学发光免疫检测试剂盒为全自动的测量样本,并直接给出数值,减少人为操作误差,并且实现无人值守,缩短了临床检测所需的时间,同时检测精度较高,试剂与仪器组成封闭系统,系统误差小。

[0032] 4、本发明的血管内皮生长因子化学发光免疫检测试剂盒,经检测,线性检测范围明显高于现有检测试剂盒,变异系数(CV) $\leq 5.0\%$,批间差 $\leq 5.0\%$,在37℃条件下放置14天,校准品及临床光量子数衰减应 $\leq \pm 15\%$,检测结果不受黄疸(胆红素 $< 65\text{mg/dL}$)、高脂血症(甘油三酯 $< 2200\text{mg/dL}$)、类风湿因子(1500U/mL)和生物素($< 20\text{ng/mL}$)的影响。

附图说明

[0033] 图1为本发明实施例1的血管内皮生长因子化学发光免疫检测试剂盒与现有国产试剂盒(威海威高生物科技有限公司,血管内皮生长因子(VEGF)测定试剂盒(化学发光法))的标准校准曲线。

具体实施方式

[0034] 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。

[0035] 本发明提供的血管内皮生长因子化学发光免疫检测试剂盒,包括R1试剂、R2试剂和R3试剂:

[0036] R1试剂由链霉亲和素磁颗粒和缓冲液I组成;

[0037] R2试剂由化学发光标记物标记的血管内皮生长因子单克隆抗体和缓冲液II组成;

[0038] R3试剂由偶联标记物标记的血管内皮生长因子单克隆抗体和缓冲液III组成。

[0039] 上述技术方案中,R1试剂中链霉亲和素磁颗粒的质量百分浓度优选为0.01%~1%,更优选为0.05%~0.072%。链霉亲和素磁颗粒的粒径优选为0.05~3 μm ,更优选为3 μm ;当链霉亲和素磁颗粒的粒径低于0.05 μm 时,抗原或者抗体与磁珠结合率低,可能导致整

体光量子数偏低;当链霉亲和素磁颗粒的粒径高于 $3\mu\text{m}$ 时,非特异性结合效果明显,可能导致试剂盒灵敏度差等。

[0040] 上述技术方案中,R2试剂中化学发光标记物标记的血管内皮生长因子单克隆抗体的浓度优选为 $\geq 0.1\mu\text{g/mL}$,更优选为 $0.1\sim 1.0\mu\text{g/mL}$ 。化学发光标记物标记的血管内皮生长因子单克隆抗体中,血管内皮生长因子单克隆抗体与化学发光标记物的摩尔比优选为 $1:(1\sim 20)$,更优选为 $1:(3\sim 20)$ 。化学发光标记物优选为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺和三联吡啶钌,更优选为吖啶酯。

[0041] 上述技术方案中,R3试剂中偶联标记物标记的血管内皮生长因子单克隆抗体的浓度优选为 $\geq 0.7\mu\text{g/mL}$,更优选为 $0.7\sim 2.0\mu\text{g/mL}$ 。偶联标记物标记的血管内皮生长因子单克隆抗体中,血管内皮生长因子单克隆抗体与偶联标记物的摩尔比优选为 $1:(1\sim 20)$,更优选为 $1:(5\sim 20)$ 。偶联标记物优选为生物素。

[0042] 上述技术方案中,缓冲液I、缓冲液II和缓冲液III均为缓冲液,I、II和III仅是为了区分不同试剂中的缓冲液添加的标号。该缓冲液为含有 $0.05\%\sim 0.1\%$ 的表面活性剂、 $0.01\%\sim 0.1\%$ 的防腐剂和 $50\sim 400\text{mM}$ 的缓冲盐,pH为 $6.0\sim 7.2$ 的缓冲液;其中,表面活性剂优选为吐温,防腐剂优选为ProClin300,缓冲盐优选为Tris-HCl、PB、MES或HEPES。本发明提供两种常用缓冲液,但不限于此,缓冲液I为含有 50mM MES、 0.05% 吐温-20和 0.05% Proclin300的pH为 $7.0\sim 7.2$ 的缓冲液或含有 100mM PBS、 0.1% 吐温-20和 0.1% Proclin300的pH为 $7.0\sim 7.2$ 的缓冲液,缓冲液II和缓冲液III均为含有 50mM MES、 0.05% 吐温-20和 0.05% Proclin300的pH为 $6.0\sim 6.5$ 的缓冲液或含有 100mM PBS、 0.1% 吐温-20和 0.1% Proclin300的pH为 $6.0\sim 6.5$ 的缓冲液。

[0043] 上述试剂盒中,还可以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为过氧化氢溶液和硝酸溶液;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。

[0044] 上述试剂盒中,还可以包括校准品;标准品包括浓度分别为 0.00ng/mL 、 10ng/mL 、 50ng/mL 、 250ng/mL 、 500ng/mL 和 1000ng/mL 的血管内皮生长因子的溶液。校准品用于绘制标准曲线。

[0045] 本发明还提供上述的血管内皮生长因子的化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0046] 步骤一、R1试剂制备

[0047] 将链霉亲和素磁颗粒溶液和TBST溶液混匀后,放置在磁分离器上,直至上清液无混浊,弃上清,留取磁颗粒,用缓冲液I清洗后在缓冲液I中配成所需质量百分浓度的固相试剂,即为R1试剂, $2\sim 8^\circ\text{C}$ 保存;

[0048] 其中,链霉亲和素磁颗粒溶液的浓度优选为 $50\sim 100\text{mg/mL}$,来源为商购,如选自安捷伦公司,货号PL6827-1006;链霉亲和素磁颗粒溶液和TBST溶液的体积比优选为 $(0.5\sim 1):(5\sim 10)$;混匀时间优选为 $10\sim 15\text{min}$;一般重复清洗 $3\sim 5$ 次。

[0049] 步骤二、R2试剂制备

[0050] 将血管内皮生长因子单克隆抗体放入离心管中离心,优选在室温下离心 $10\text{s}\sim 30\text{s}$,保证抗体位于离心管底部位置,然后加入碳酸缓冲液,混匀后加入化学发光标记物的DMF溶液离心,离心温度优选为室温,离心时间优选为 $0.5\sim 3\text{min}$;将离心管密封后放入避光

暗盒中,然后将暗盒放入气浴恒温振荡器(25℃)中混匀,混匀时间优选为2~4h,加入封闭液,放入气浴恒温振荡器中混匀,封闭时间优选为1~2h,将封闭好的抗体经过纯化、收集,然后用缓冲液Ⅱ稀释,2~8℃保存;

[0051] 其中,化学发光标记物溶液的浓度优选为2~2.5mg/mL;封闭液优选为赖氨酸封闭液,赖氨酸质量百分浓度优选为20~25%;赖氨酸封闭液与血管内皮生长因子抗体的体积比优选为1:(1~5)。

[0052] 步骤三、R3试剂制备

[0053] 将血管内皮生长因子单克隆抗体放入离心管中离心,优选在室温下离心10~30s,确保抗体位于离心管底部位置,离心后加入TRIS缓冲液充分混匀,然后加入偶联标记物的DMF溶液,用离心机室温条件下离心30s,2~8℃混匀,混匀时间优选为2~4h,加入封闭液,放入气浴恒温振荡器中混匀(25℃),封闭时间优选为1~2h,将封闭好的抗体经过纯化、收集,然后用缓冲液Ⅲ稀释,2~8℃保存;

[0054] 其中,偶联标记物溶液的浓度优选为2-3mg/mL,偶联标记物的来源为商购,选自ACROBiosystems公司;封闭液优选为赖氨酸封闭液,赖氨酸质量百分浓度优选为20-25%;赖氨酸封闭液与血管内皮生长因子抗体的体积比优选为1:(1~5)。

[0055] 步骤四、将R1试剂、R2试剂和R3试剂分别灌封于不同的试剂瓶,得到血管内皮生长因子化学发光免疫检测试剂盒。

[0056] 上述技术方案中,如包括校准品,还需先制备校准品,即将血管内皮生长因子用缓冲液分别配制成浓度为0.00ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、250ng/mL、500ng/mL和1000ng/mL的血管内皮生长因子的溶液,等量分装,需2~8℃保存;

[0057] 所用缓冲液含有50~200mM的PB、150mM的氯化钠、0.5~2%的牛血清白蛋白及0.05%~0.1%的吐温-20,pH为6.0~6.5。

[0058] 本发明的血管内皮生长因子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,完成对血管内皮生长因子的检测,试剂盒与仪器配套,检测所需的时间短,检测精度较高。

[0059] 本发明的血管内皮生长因子化学发光免疫检测试剂盒用于检测血管内皮生长因子时,利用全自动化学发光免疫分析仪(CM180)对血管内皮生长因子校准品进行检测,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血管内皮生长因子的浓度;最后对血管内皮生长因子全自动化学发光免疫分析系统进行性能(灵敏度、线性、抗干扰/特异性)的评价。

[0060] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细的描述。偶联标记物选自ACROBiosystems公司。链霉亲和素磁颗粒溶液选自安捷伦公司,货号PL6827-1006。

[0061] 实施例1

[0062] 步骤一、R1试剂制备

[0063] 取浓度100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液0.5mL(50mg),加入10mL的TBST溶液充分混匀10min,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中配成磁颗粒质量百分浓度为0.05%的固相试剂,即为R1试剂,2~8℃保存,缓冲液I为含有50mM MES、0.05%吐温和0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液。

[0064] 步骤二、R2试剂制备

[0065] 将250 μ g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20s)后加入PBS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5 μ l 2mg/mL吡啶酯的DMF溶液,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 $^{\circ}$ C),混匀2h。加入1mL 20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25 $^{\circ}$ C),中速混匀,封闭时间为1h。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪上进行纯化(葡聚糖凝胶G25预装柱),用PB缓冲液洗脱,分步收集。将纯化后的血管内皮生长因子抗体浓溶液用含有50mM MES、0.05%吐温和0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为0.1 μ g/ml,2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0066] 步骤三、R3试剂制备

[0067] 将500 μ g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20s)后加入TRIS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入2ml 2mg/mL生物素的DMF溶液,用离心机室温条件下离心30s,2~8 $^{\circ}$ C混匀3h。加入1mL 20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25 $^{\circ}$ C),中速混匀,封闭时间为2h。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪(葡聚糖凝胶G250柱)纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将纯化后的血管内皮生长因子抗体浓溶液用含有50mM MES、0.05%吐温-20和0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为1.0 μ g/mL,2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0068] 实施例2

[0069] 步骤一、R1试剂制备

[0070] 取浓度是100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒溶液0.72毫升(72mg),加入15mL的TBST溶液充分混匀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次后在缓冲液I中配成磁颗粒质量百分浓度为0.072%的固相试剂,即为R1试剂,2~8 $^{\circ}$ C保存,缓冲液I为含有100mM PBS、0.1%吐温-20和0.1%Proclin300,pH7.2的缓冲液。

[0071] 步骤二、R2试剂制备

[0072] 将500 μ g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30s)后加入TRIS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入15 μ l 2.5mg/mL吡啶酯的DMF溶液,用离心机室温条件下离心45s,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(23 $^{\circ}$ C),混匀3.5h。加入2mL 25%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(23 $^{\circ}$ C),中速混匀,封闭时间为1.5h。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪上进行纯化(葡聚糖凝胶G25预装柱),用PB缓冲液洗脱,分步收集。将纯化后的血管内皮生长因子抗体浓溶液用含有100mM PBS、0.1%吐温-20和0.1%Proclin300,pH6.0的缓冲液稀释至终浓度为0.2 μ g/ml,2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0073] 步骤三、R3试剂制备

[0074] 将750 μ g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20s)后加入磷酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5ml 3mg/mL生物素的DMF溶液,用离心机室温条件下离心45s,4 $^{\circ}$ C混匀6h。加入3mL 25%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(23 $^{\circ}$ C),中速混匀,封闭时间为2h。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪(葡聚糖凝胶G250柱)纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将纯化后的血管内皮生长因子抗体浓溶液用含有100mM PBS、0.1%吐温-20和0.1%Proclin300,pH6.0的缓冲液稀释至终浓度为1.2 μ g/ml,2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0075] 实施例3

[0076] 步骤一、R1试剂制备

[0077] 取浓度100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液0.5mL(50mg),加入10mL的TBST溶液充分混匀10min,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中配成磁颗粒质量百分浓度为0.05%的固相试剂,即为R1试剂,2~8℃保存,缓冲液I为含有50mM MES、0.05%吐温和0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液。

[0078] 步骤二、R2试剂制备

[0079] 将250μg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20s)后加入PBS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5μl 2mg/mL吡啶酯的DMF溶液,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。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。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪上进行纯化(葡聚糖凝胶G25预装柱),用PB缓冲液洗脱,分步收集。将纯化后的血管内皮生长因子抗体浓溶液用含有50mM MES、0.05%吐温和0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为0.2μg/mL,2~8℃保存。

[0080] 步骤三、R3试剂制备

[0081] 将500μg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20s)后加入TRIS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入2mL 2mg/mL生物素的DMF溶液,用离心机室温条件下离心30s,2~8℃混匀4h。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。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪(葡聚糖凝胶G250柱)纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将纯化后的血管内皮生长因子抗体浓溶液用含有50mM MES、0.05%吐温-20和0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为0.7μg/mL,2~8℃保存。

[0082] 对实施例1~3的血管内皮生长因子化学发光免疫检测试剂盒的性能进行评价。

[0083] 检测方法:以全自动化学发光免疫分析仪(CM180)为检测工具,方法学为双抗体夹心法,仪器依次加入20μL的血清样本,50μL的R2试剂,50μL的R3试剂,孵育10min,加入40μL的R1试剂,孵育10min后,进行磁分离,加入清洗液清洗5次,仪器将反应复合物送入暗室,一次加入发光底物液A液(H₂O₂溶液和HNO₃溶液)和B液(NaOH溶液)进行反应,采集光信号,记录发光值。

[0084] 以下为实施例1的血管内皮生长因子化学发光免疫检测试剂盒的评价数据,实施例2~3在样本不变的情况下,检测效果接近,不再赘述。

[0085] 1、空白限

[0086] 平行测定零值一级校准品(一级校准品A,理论浓度0.00ng/mL)20次,记录其信号值,计算均数M和标准差SD,并计算M+2SD的值,测定相邻浓度一级校准品(一级校准品B)3次,记录其信号值,取平均值。根据零值一级校准品和相邻浓度一级校准品之间的浓度-信号值结果进行两点线性回归拟合出一次方程,M+2SD所对应的信号值带入方程,所得浓度即为空白限。检测结果如表1所示。

[0087] 表1VEGF空白限测试数据

[0088]

测定次数	一级校准品 A	一级校准品 B
Rep1	101	13752
Rep2	59	13483
Rep3	95	13887
Rep4	124	/
Rep5	147	
Rep6	131	

[0089]

Rep7	85	
Rep8	71	
Rep9	77	
Rep10	126	
Rep11	99	
Rep12	142	
Rep13	140	
Rep14	60	
Rep15	139	
Rep16	181	
Rep17	166	
Rep18	151	
Rep19	189	
Rep20	168	
测定均值	123	13707
样品	一级校准品 A	一级校准品 B
浓度 (ng/mL)	0	10
标准差 (SD)	40	/
均值+2SD	202	/
空白限 (ng/mL)	0.0586	

[0090] 从表1可以看出,空白限远小于0.5ng/mL,符合标准。

[0091] 2、线性

[0092] 将接近线性范围上限的高值样本(线性范围为0.5ng/mL~1000ng/mL)分别稀释为至少5种浓度,其中低值浓度样本须接近线性范围的下限。本实验采用表2中的L1~L7七种浓度检测,L2~L7经L1稀释获得。对每一浓度的样本均重复检测3次,计算平均值,将结果平均值和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合,计算线性相关系数r,具体检测结果如表2和图1所示。

[0093] 表2VEGF线性测试数据

[0094]

理论值(ng/mL)	L7	L6	L5	L4	L3	L2	L1	相关系数 (r)
	0.25	0.98	3.90	15.63	62.50	250.00	1000.00	
测定值(ng/mL)	0.23	0.99	4.09	16.32	63.12	245.06	1008.60	1.0000
发明试剂光量子数	351	1303	5392	20484	86196	341224	1438067	0.9999
对比试剂光量子数	56	42	88	88	1708	63642	288275	0.9984

[0095] 由表2本发明的VEGF检测试剂盒的线性测试数据及图1本发明的VEGF检测试剂盒及国产试剂(威海威高生物科技有限公司, 血管内皮生长因子(VEGF)测定试剂盒(化学发光法))的标准曲线对比图可以看出, 结果符合要求(线性范围为0.5ng/mL~1000ng/mL, 线性相关系数 $r \geq 0.9900$), 且本发明的试剂盒与国产试剂相比具有更宽的线性范围, 以及更高的线性线性相关系数, 并且在低值范围内具有更高的分析灵敏度, 进而可以保证在检测范围内提供更准确的检验结果。

[0096] 3、重复性

[0097] 用低、高两种不同浓度的样本各重复检测10次, 计算10次测量结果的平均值(M)和标准差(SD), 按公式(1)计算变异系数(CV), 变异系数(CV)应 $\leq 8.0\%$ 。

[0098] $CV = SD/M \times 100\%$ (1)

[0099] 式中: CV—变异系数; SD—测量结果的标准差; M—测量结果的平均值。表3VEGF重复性测试数据

[0100]

测定次数	低值样本(ng/mL)	高值样本(ng/mL)
Rep1	50.53	507.62
Rep2	51.64	497.07
Rep3	51.97	519.96
Rep4	52.65	505.27
Rep5	50.59	504.90
Rep6	51.07	507.27
Rep7	52.45	494.32
Rep8	52.47	498.72
Rep9	51.61	502.30
Rep10	52.72	498.33

[0101]

测定均值 M(ng/mL)	51.77	503.58
SD	0.78	6.96
CV	1.51%	1.38%

[0102] 4、批间差

[0103] 用实施例1的方法制备3个批号试剂盒,分别检测同一份样本,检测结果如表4所示。

[0104] 表4VEGF批间差测试数据

[0105]

测定次数	低值样本(ng/mL)			高值样本(ng/mL)		
	第一批	第二批	第三批	第一批	第二批	第三批
Rep1	50.53	52.51	51.84	507.62	511.71	508.42
Rep2	51.64	50.88	49.42	497.07	506.41	504.90
Rep3	51.97	49.31	50.43	519.96	510.80	502.30
Rep4	52.65	50.34	49.21	505.27	517.56	502.86
Rep5	50.59	51.22	52.72	504.90	501.27	514.45
Rep6	51.07	50.25	51.84	507.27	515.38	505.71
Rep7	52.45	49.62	49.36	494.32	506.85	498.02
Rep8	52.47	49.35	50.40	498.72	494.71	497.58
Rep9	51.61	51.33	50.55	502.30	518.69	502.76
Rep10	52.72	50.25	51.18	498.33	491.19	510.42
测定均值 M	50.99			505.26		
标准差 (SD)	1.13			7.43		
批间变异系数(CV)	2.22%			1.47%		

[0106] 从表4可以看出,3个批号的试剂盒之间的批间变异系数(CV) $\leq 15.0\%$ 。

[0107] 5、热稳定性

[0108] 对实施例1的试剂盒的热稳定性进行评价:取同一批次试剂盒在2~8℃和37℃条件下分别放置14天后对检测样本进行检测,检测样本和检测结果如表5所示。

[0109] 表5热稳定性测试数据

[0110]

测试样本说明	理论 浓度	VEGF 高温稳定性数据		
		零时间 2-8℃	14 天 2-8℃	14 天 37℃

[0111]

	(ng/ mL)	平均 光量 子数	CV	平均 光量 子数	CV	与零时 间比光 量子数 衰减率	平均光 量子数	CV	与零时间 光量子数 衰减率	与 2-8℃1 4 天光 量子数 衰减率
生理盐水	0	56	95.34%	73	15.17%	30.36%	99	6.77%	76.79%	35.62%
VEGF 校准-1	0	42	11.27%	43	13.21%	2.38%	41	1.62%	-2.38%	-4.65%
VEGF 校准-2	10	13274	1.46%	13545	6.36%	2.04%	13680	7.28%	3.06%	1.00%
VEGF 校准-3	50	67042	0.38%	66278	2.60%	-1.14%	67706	1.28%	0.99%	2.15%
VEGF 校准-4	250	34927 1	2.34%	34581 3	0.65%	-0.99%	338897	1.57%	-2.97%	-2.00%
VEGF 校准-5	500	69901 6	1.09%	70607 7	0.03%	1.01%	735320	0.20%	5.19%	4.14%
VEGF 校准-6	1000	14184 04	0.85%	14226 30	0.26%	0.30%	136149 9	1.60%	-4.01%	-4.30%
平均衰减率				校准平均衰减		-3.65%	校准平均衰减		-3.44%	-3.69%
VEGF 临床-1	48.52	62701	1.13%	63361	0.53%	1.05%	69301	0.70%	10.53%	9.37%
VEGF 临床-2	160.2	21291 5	0.44%	22844 0	2.83%	7.29%	226222	4.56%	6.25%	-0.97%
VEGF 临床-3	361.35	48024 7	0.41%	51057 8	2.72%	6.32%	520689	0.06%	8.42%	1.98%
VEGF 临床-4	452.24	64054 1	0.01%	66590 9	0.28%	3.96%	653225	0.22%	1.98%	-1.90%
VEGF 临床-5	681.56	98792 9	0.85%	96874 6	1.21%	-1.94%	939971	1.42%	-4.85%	-2.97%
平均衰减率				临床平均衰减		-0.55%	临床平均衰减		0.57%	-2.79%

[0112] 从表5可以看出,实施例1的试剂盒在37℃放置14天后,校准品及临床光量子数衰减 $\leq \pm 15\%$,符合要求。

[0113] 6、抗干扰

[0114] 对实施例1的试剂盒的抗干扰性进行评价,结果如表6所示。

[0115] 表6抗干扰特异性数据

[0116]

干扰物质及浓度		测试结果	平均光量子数	CV	干扰率
胆红素 (65mg/dL)	胆红素阴性 VEGF(50ng/ml)	49.28	67051	0.95%	-0.88%
	胆红素 VEGF(50ng/ml)	48.85	66457	6.15%	
	胆红素阴性 VEGF(500ng/ml)	528.65	799144	6.10%	2.56%
	胆红素 VEGF (500ng/ml)	542.16	761603	4.41%	
甘油三酯 (2200mg/dL)	甘油三酯阴性 VEGF(50ng/ml))	53.03	72233	4.52%	5.86%
	甘油三酯 2200mg/dL VEGF(50ng/ml)	56.14	76534	0.34%	
	甘油三酯阴性 VEGF(500ng/ml)	499.68	658904	2.14%	-3.21%
	甘油三酯 2200mg/dL VEGF(500ng/ml)	483.66	678710	3.73%	
RF (1500IU/mL)	RF 阴性 VEGF(50ng/ml)	55.83	76105	3.22%	0.19%
	RF 1500IU/mL VEGF(50ng/ml)	56.41	76908	2.12%	
	RF 阴性 VEGF(500ng/ml)	525.90	781075	4.15%	-2.33%
	RF 1500IU/mL VEGF(500ng/ml)	514.12	794142	3.11%	
	RF 原液 (3490IU/mL)	1.36	1788	4.10%	/
生物素 (20ng/mL)	生物素阴性 VEGF(50ng/ml)	48.90	66526	1.23%	0.84%
	生物素 VEGF(50ng/ml)	49.31	67092	4.98%	

[0117]

	生物素阴性 VEGF(500ng/ml)	483.32	678228	2.15%	1.99%
	生物素 VEGF(500ng/ml)	492.94	691858	0.58%	

[0118] 从表6可以看出,实施例1的试剂盒的检测结果不受黄疸(胆红素 $<65\text{mg/dL}$)、高脂血(症)(甘油三酯 $<2200\text{mg/dL}$)、类风湿因子(1500U/mL)和生物素($<20\text{ng/mL}$)的影响。

[0119] 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。

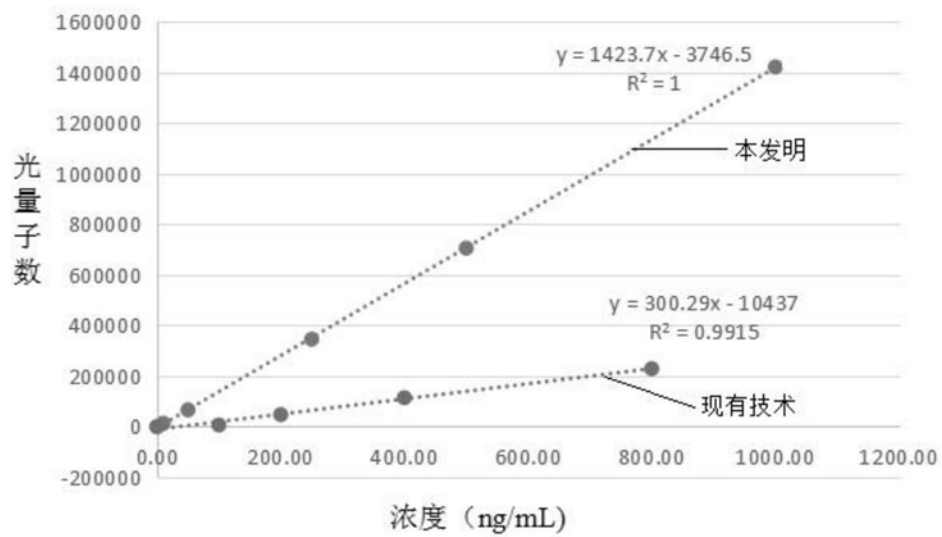


图1

专利名称(译)	血管内皮生长因子化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN110082537A	公开(公告)日	2019-08-02
申请号	CN201910308294.7	申请日	2019-04-17
[标]发明人	李磊 李冬梅 孙成艳 高威 何浩会		
发明人	李磊 李冬梅 孙成艳 高威 何浩会		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/532 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/54326 G01N33/6803		
代理人(译)	王莹		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种血管内皮生长因子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。解决了现有的检测血管内皮生长因子的方法操作繁琐、检测时间长、自动化程度低、受人为因素影响大、灵敏度低、重复性差的问题。本发明的试剂盒，包括R1试剂、R2试剂和R3试剂；R1试剂包含链霉亲和素磁颗粒和缓冲液I；R2试剂包括化学发光标记物标记的血管内皮生长因子单克隆抗体和缓冲液II；R3试剂包括偶联标记物标记的血管内皮生长因子单克隆抗体和缓冲液III。该试剂盒操作简单、检测时间短、自动化程度高、不受人为因素影响、灵敏度高、重复性好、抗干扰性好、检测范围宽、热稳定性好。

