



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109444429 A

(43)申请公布日 2019.03.08

(21)申请号 201811521732.X

(22)申请日 2018.12.13

(71)申请人 郑州安图生物工程股份有限公司

地址 450016 河南省郑州市经济技术开发区经开第十五大街199号

(72)发明人 谢茜 许可 李忠信 尹伊
周方方

(74)专利代理机构 郑州异开专利事务所(普通合伙) 41114

代理人 王霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

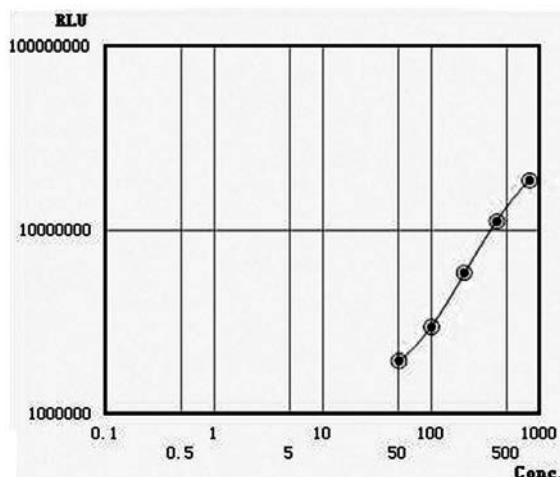
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

利用化学发光免疫技术测定层粘连蛋白的试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种利用化学发光免疫技术测定层粘连蛋白的试剂盒,包括结合了层粘连蛋白单克隆抗体的磁微粒混悬液;辣根过氧化物酶标记的层粘连蛋白单克隆抗体;层粘连蛋白系列校准品,所述磁微粒混悬液和酶结合物中添加有释放剂。本发明的优点在于可快速有效的解离样本中聚合的LN分子,不会随着样本的存放发生变化;检测速度快,过程稳定、无放射性污染,在没有磁场存在的情况下,磁性微粒悬浮在液体中,使得抗原抗体反应类似于均相反应;磁性微粒在外加磁场的作用下可方便地分离;磁性微粒的粒径达到纳米级,使得包被固相接近于液相状态,相对微孔板式,减少了包被,封闭等多个影响精密性的操作步骤,检测的精密性和稳定性得到极大的提升。



1. 一种利用化学发光免疫技术测定层粘连蛋白的试剂盒,包括结合了层粘连蛋白单克隆抗体的磁微粒混悬液;辣根过氧化物酶标记的层粘连蛋白单克隆抗体;层粘连蛋白系列校准品,其特征在于:所述磁微粒混悬液和酶结合物中添加有释放剂。

2. 根据权利要求1所述的利用化学发光免疫技术测定层粘连蛋白的试剂盒,其特征在于:所述释放剂为柠檬酸、葡萄糖酸、三乙醇胺、8-苯胺-1-萘磺酸、乙二胺四乙酸、乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮中的一种。

3. 根据权利要求1所述的利用化学发光免疫技术测定层粘连蛋白的试剂盒,其特征在于:所述磁微粒的粒径为纳米级。

利用化学发光免疫技术测定层粘连蛋白的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫分析医学两用,尤其是涉及一种利用化学发光免疫技术测定层粘连蛋白的试剂盒。

背景技术

[0002] 层粘连蛋白(LN)是一种大分子糖蛋白,是由 α 、 β 、 γ 3条多肽链构成的异三聚体,分子量大于800kD。正常肝组织中LN含量很少,主要分布于血管壁、胆管壁及淋巴管壁等部位。肝纤维化时,大量沉积于肝窦内皮细胞间隙,降低内皮细胞的通透性使其毛细血管化,并使门脉压升高,故可反映肝窦毛细血管化和汇管区纤维化。同时,LN与肝纤维化形成的病因密切相关:研究表明,LN水平在酒精性肝硬化中明显高于病毒性和胆汁性肝硬化,并且可反映酒精性肝病是否存在门脉高压及门脉高压程度。

[0003] 目前对层粘连蛋白的测定方法有:1、Elisa 测定方法:该方法一般用于半定量的测定,测定准确度、灵敏度、精密度较差,而且操作比较繁琐,不利于在临床中广泛应用。2、放射免疫测定方法:该方法因为试剂有放射性污染和试剂有效期短暂(半衰期)等缺陷在逐渐被淘汰。

[0004] 化学发光免疫分析(Chemiluminescence Immunoassay,CLIA)是近十年来在世界范围内发展非常迅速的非放射性免疫分析技术,是继放射免疫分析(RIA)和酶免疫分析(EIA)之后发展起来的一种超高灵敏度的微量测定技术,具有高灵敏度、检测范围宽、操作简便快速、标记物稳定性好、无污染、仪器简单经济等优点。它是放射性免疫分析与普通酶免疫分析的取代者,是目前免疫定量分析最理想的方法。

[0005] 由于血清中的LN分子呈聚合态,只有部分位点暴露可以被抗体识别,但是这个状态下的检测结果是偏低的。血清被抽离体外之后,随着存放时间的增多,聚合态的LN分子会逐渐解离,这时检测结果会逐渐升高,在2-8℃的存放条件下,采血5-7天LN分子基本解离完全,检测结果达到平台期,而在-20℃的存放条件下,则需要数月才能完全解离。但是对于医院来说,当天是要出检测报告的,因此不能等待样本中的LN分子自行解离,而不进行解离的样本检测结果偏低,会造成医生的误判。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种能够快速解离样本中聚合的LN分子,从而准确测定层粘连蛋白的试剂盒。

[0007] 为实现上述目的,本发明可采取下述技术方案:

本发明所述的利用化学发光免疫技术测定层粘连蛋白的试剂盒,包括结合了层粘连蛋白单克隆抗体的磁微粒混悬液;辣根过氧化物酶标记的层粘连蛋白单克隆抗体;层粘连蛋白系列校准品,所述磁微粒混悬液和酶结合物中添加有释放剂。

[0008] 所述释放剂为柠檬酸、葡萄糖酸、三乙醇胺、8-苯胺-1-萘磺酸(ANS)、乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA)、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)中的

一种。

[0009] 所述磁微粒的粒径为纳米级。

[0010] 本发明的优点在于可快速有效的解离样本中聚合的LN分子,采血当天检测结果和采血后2-8℃存放7天的检测结果一致,不会随着样本的存放发生变化;检测速度快,40分钟即可出结果;过程稳定、无放射性污染等,在没有磁场存在的情况下,磁性微粒悬浮在液体中,使得抗原抗体反应类似于均相反应;磁性微粒在外加磁场的作用下可方便地分离,洗涤快速;磁性微粒的粒径达到纳米级,使得包被固相接近于液相状态,相对微孔板式,减少了包被,封闭等多个影响精密性的操作步骤,检测的精密性和稳定性得到极大的提升。本发明试剂盒的分析内精密性在6%以内,日间精密性10%以内,批间精密性12%以内;本发明试剂盒灵敏度高,分析灵敏度不高于5ng/mL,优于酶免试剂和放免试剂;本发明试剂盒稳定性好,在2-8℃至少可以稳定存放一年;本发明试剂盒特异性好,和同系列的透明质酸(HA)、Ⅲ型前胶原N端肽(PⅢNP)、Ⅳ型胶原(Col Ⅳ)无交叉。

附图说明

[0011] 图1是本发明试剂盒拟合的定标曲线图。

具体实施方式

[0012] 下面通过具体实施例对本发明做更加清楚的说明,以便于本领域技术人员的理解。如无特殊说明,本发明实施例中所用的试剂和检测仪器均为市售产品,所用方法为本领域常规方法。

[0013] 实施例1 制备测定层粘连蛋白的试剂盒(磁微粒化学发光法)

1、制备磁微粒混悬液

将粒径为1nm的羧基化磁微粒原液充分混匀,取出适量进行磁分离,去除上清,加入0.05M,PH5.5的醋酸缓冲液进行重悬清洗,重复2次,加入交联剂EDC 10mg对磁微粒表面羧基进行活化,加入天然纯化或重组的层粘连蛋白抗原3uL进行偶联,室温震荡反应2h,磁分离,去除上清,用添加了2%鱼明胶和1% ANS的0.05M,PH7.0的磷酸盐缓冲液做为封保液进行封闭,放置2-8℃保存。

[0014] 2、制备酶结合物

在0.02M,PH7.0的磷酸盐中加入0.5%的BSA和1% ANS配制成稀释液1L,添加辣根过氧化物酶标记的层粘连蛋白单抗5uL,混合均匀,放置2-8℃保存。

[0015] 3、制备校准品

在0.02M,PH7.0的磷酸盐中加入0.5%的BSA配制成稀释液1L,分成5等份,分别添加天然纯化或重组的Ⅲ型前胶原N端肽抗原配制成50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL、400ng/mL、800ng/mL的系列浓度,放置2-8℃保存。

[0016] 实施例2 本发明试剂盒的使用方法

使用无添加普通管/分离胶管/促凝管采集全血5mL,于37℃静置30min,后用4000转/min的转速离心10min,取离心后的血清做为检测样本。样本收集后在室温放置不可超过8小时,如果不在8小时内检测需将样本放置在2~8℃的冰箱中,若需48小时以上保存或运输,则应冻存于-20℃以下,避免反复冻融。使用前恢复到室温,轻轻摇动混匀。

[0017] 测试步骤

1) 在反应容器(以下简称“孔”)中分别加入校准品(用于定标)或样本,加样量均为50 μ l/孔。

[0018] 2) 每孔分别加入磁微粒混悬液20 μ l。

[0019] 3) 每孔加入酶结合物50 μ l。

[0020] 4) 混匀后37℃温育34分钟。

[0021] 5) 清洗液洗涤5次。

[0022] 6) 每孔加入发光底物A和发光底物B各50 μ l。

[0023] 7) 混匀后1~5分钟检测发光强度。

[0024] 8) 结果计算:

首先采用四参数(lin-log)拟合方式,以校准品浓度值为X轴,以校准品发光强度值的log值为Y轴建立定标曲线,拟合的曲线如图1所示。

[0025] 根据待测样品的发光强度值回算相应的浓度值。仪器操作系统可通过存储的定标曲线以及样本测试得到的信号值自动计算样本测试结果。

[0026] 实施例3 本发明试剂盒的性能检测

1、分析灵敏度

用0值校准品做为灵敏度控制品,进行10孔测定,计算其发光值的平均数(M)与标准差(SD),根据剂量-反应曲线回算M+2SD的浓度值,所得结果即为分析灵敏度。检测结果见下表1。

[0027] 表1

孔	发光值
S0	21886
S0	21053
S0	21252
S0	21684
S0	23264
S0	19597
S0	20497
S0	19525
S0	20626
S0	19911
M+2SD	23250
灵敏度 (ng/mL)	0.36

从表1数据可以看出,本试剂盒的分析灵敏度远低于5ng/mL。

[0028] 2、精密性

用同一个批号试剂盒分别检测高、低两种室内质控品(Q1、Q2),要求重复测定4天,每天至少5次重复,根据四参数(lin-log)拟合标准曲线计算测量结果,再计算至少20次测量结果的平均值M和标准差SD,根据公式 $CV=SD/M*100\%$ 得出变异系数CV。检测结果见下表2。

[0029] 表2

测定次数		低值 Q1 测定结果(ng/mL)				
		第一天	第二天	第三天	第四天	第五天
1	上午	119.24	120.60	111.89	121.90	132.33
2		143.53	137.91	116.97	127.18	144.45
3	下午	135.04	142.16	114.32	121.45	146.91
4		143.04	125.93	126.12	130.31	148.20
均值		130.47				
SD		11.57				
CV		8.86%				
测定次数		高值 Q2 测定结果(ng/mL)				
		第一天	第二天	第三天	第四天	第五天
1	上午	390.92	383.50	469.62	452.23	503.01
2		378.83	421.86	406.98	458.04	497.66
3	下午	422.47	473.95	439.43	483.97	475.49
4		456.04	419.81	400.47	385.29	485.98
均值		440.28				
SD		40.65				
CV		9.23%				

从表2数据可以看出：本试剂盒的天间精密性在10%以内。

[0030] 3、特异性

用校准品稀释液分别配制浓度为1000ng/mL透明质酸(HA)，100ng/mLⅢ型前胶原N端肽(PⅢNP)，1000ng/mLⅣ型胶原(CⅣ)作为特异性质控品。用一个批次试剂盒，复孔测定特异性质控品，将发光值代入剂量-反应曲线回算浓度值，计算浓度值的平均值。检测结果见表3。

[0031] 表3

编号	特异性质控品	检测结果
1	1000ng/mL HA	0.54ng/mL
2	100ng/mL PⅢNP	0.48ng/mL
3	1000ng/mL CⅣ	0.54ng/mL

从表3数据可以看出：本试剂盒和同系列的透明质酸(HA)、Ⅲ型前胶原N端肽(PⅢNP)、Ⅳ型胶原(Co1 Ⅳ)无交叉。

[0032] 4、新旧样本差异

5例样本按照正常的流程采集后分别在采集完成时、2-8℃存放2天、4天、7天时分别用本发明试剂盒和常规试剂盒进行检测，对比两种LN浓度检测结果随存放时间的变化差异。

[0033] 本发明试剂盒检测LN浓度结果(ng/mL)随存放时间的变化见表4。

[0034] 表4

样本编号	采集完成时	2-8℃存放 2 天	2-8℃存放 4 天	2-8℃存放 7 天
样本 1	52.9	52.9	52.22	53.57
样本 2	69.44	74.3	67.91	70.97
样本 3	85.74	85.71	82.91	88.57
样本 4	169.33	168.52	166.95	171.7
样本 5	211.89	214.14	209.7	214.08

常规试剂盒检测LN浓度结果 (ng/mL) 随存放时间的变化见表5。

[0035] 表5

样本编号	采集完成时	2-8℃存放 2 天	2-8℃存放 4 天	2-8℃存放 7 天
样本 1	5.21	13	38.11	52.73
样本 2	7.63	25.6	43.95	72.25
样本 3	14.22	51.85	85.82	87.63
样本 4	15.28	63.77	106.54	173.14
样本 5	23.25	71.48	174.44	208.24

从表4、表5中数据可见,采用常规试剂盒(不添加释放剂),随着时间的增加,检测LN浓度结果在持续上升,到7天升到最高点,而采用本发明试剂盒(添加了释放剂),刚采集完成的样本检测结果和存放了7天的样本检测结果基本一致,后续结果也不会随着样本的存放时间增加而出现大幅度的变化。故,本发明试剂盒中添加的释放剂是切实有效的,可以使LN的检测在样本采集之初就可以检测出正确的结果,大大缩短了检测时间,更利于临床应用。

[0036] 注:本申请中所用的全自动磁微粒化学发光仪 (AutoLumo A2000Plus) 由郑州安图生物工程股份有限公司提供。

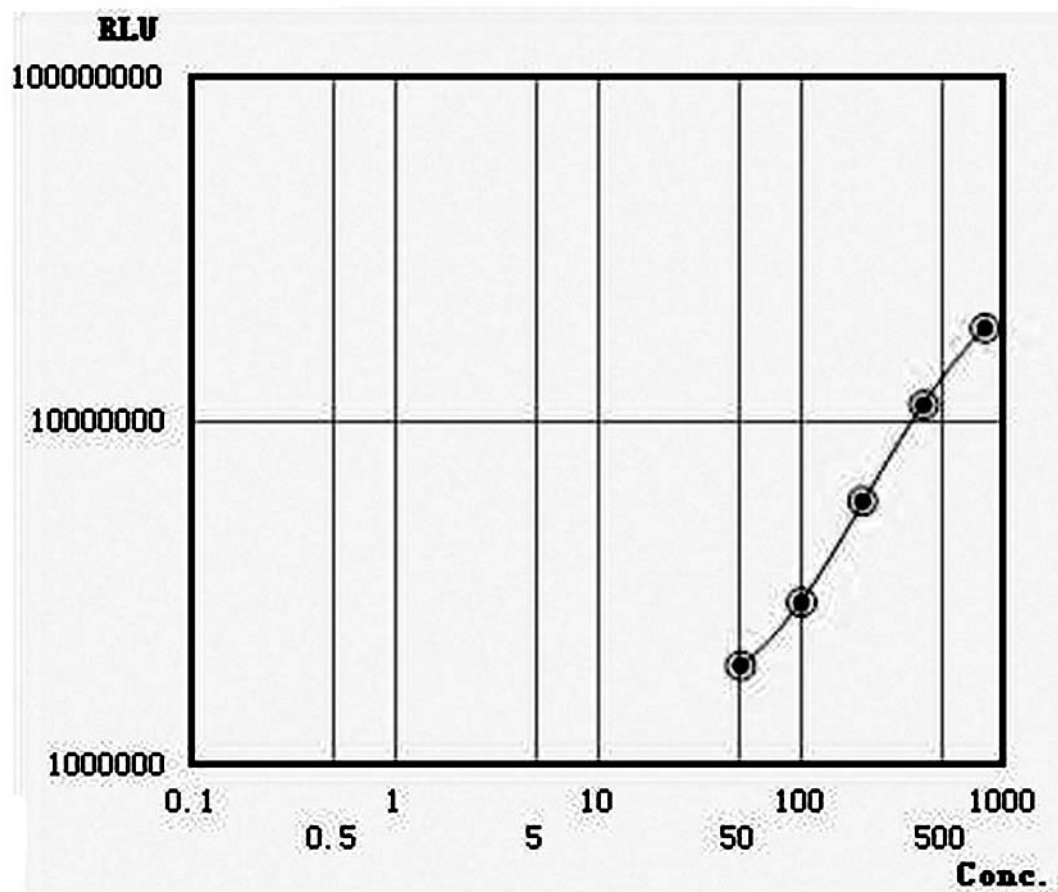


图1

专利名称(译)	利用化学发光免疫技术测定层粘连蛋白的试剂盒		
公开(公告)号	CN109444429A	公开(公告)日	2019-03-08
申请号	CN201811521732.X	申请日	2018-12-13
[标]申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
[标]发明人	谢茜 许可 李忠信 尹伊 周方方		
发明人	谢茜 许可 李忠信 尹伊 周方方		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/535 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/535 G01N33/577 G01N33/6893 G01N2800/085		
代理人(译)	王霞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种利用化学发光免疫技术测定层粘连蛋白的试剂盒，包括结合了层粘连蛋白单克隆抗体的磁微粒混悬液；辣根过氧化物酶标记的层粘连蛋白单克隆抗体；层粘连蛋白系列校准品，所述磁微粒混悬液和酶结合物中添加有释放剂。本发明的优点在于可快速有效的解离样本中聚合的LN分子，不会随着样本的存放发生变化；检测速度快，过程稳定、无放射性污染，在没有磁场存在的情况下，磁性微粒悬浮在液体中，使得抗原抗体反应类似于均相反应；磁性微粒在外加磁场的作用下可方便地分离；磁性微粒的粒径达到纳米级，使得包被固相接近于液相状态，相对微孔板式，减少了包被，封闭等多个影响精密性的操作步骤，检测的精密性和稳定性得到极大的提升。

