



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110398587 A

(43)申请公布日 2019.11.01

(21)申请号 201910701301.X

(22)申请日 2019.07.31

(71)申请人 宁波奥丞生物科技有限公司

地址 315000 浙江省宁波市海曙区望春工
业园区春华路885号

(72)发明人 周义正 唐静 崔丛丛

(74)专利代理机构 北京盛凡智荣知识产权代理
有限公司 11616

代理人 郑丰平

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种测定骨钙素含量的试剂盒及其检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种测定骨钙素含量的试剂盒及其检测方法,包括磁微粒偶联N-MID捕获抗体,酶标记N-MID检测抗体,N-MID校准品,酶作用的化学发光底物,清洗液;目前国内大多采用酶联免疫法和放射免疫法测定全段骨钙素,由于全段骨钙素自身稳定性差,标本存放温度和时间会影响实验结果,N-中端骨钙素(N-MID)不易被蛋白酶水解,血清中含量稳定,本发明试剂盒对血清中的N-MID进行检测,检测结果可靠。

1. 一种测定骨钙素含量的试剂盒,其特征在于,包括磁微粒偶联N-MID捕获抗体,酶标记N-MID检测抗体,N-MID校准品,酶作用的化学发光底物,清洗液。

2. 如权利要求1所述的一种测定骨钙素含量的试剂盒,其特征在于,所述N-MID校准品用缓冲液稀释而成,浓度为0ng/mL、0.5ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、500ng/mL、1000ng/mL,缓冲液是含有0.5-5.0%BSA的Tris或PBS或HEPES缓冲液。

3. 如权利要求1所述的一种测定骨钙素含量的试剂盒,其特征在于,所述磁微粒偶联N-MID捕获抗体的制备方法为:将磁微粒用缓冲液清洗后分散;加入EDC和NHS,搅拌均匀后再加入N-MID捕获抗体,4°搅拌过夜;磁分离磁微粒,去除上清液,用缓冲液清洗磁微粒后分散;向重新分散后的磁微粒溶液中加入封闭液封闭;磁分离磁微粒,去除上清液,用缓冲液清洗磁微粒后再次分散,得到磁微粒偶联N-MID捕获抗体溶液。

4. 如权利要求1所述的一种测定骨钙素含量的试剂盒,其特征在于,所述酶为辣根过氧化物酶。

5. 如权利要求1所述的一种测定骨钙素含量的试剂盒,其特征在于,所述酶标记N-MID检测抗体的制备方法为:取10mgHRP溶于0.2mL1.25%戊二醛中,20°C反应18h后,用0.15mol/L NaCl平衡过的Sephadex G-50凝胶柱层析,PBS缓冲液洗脱,除去游离的戊二醛,得到醛化的HRP溶液(10mg/ml),将5mg N-MID检测抗体溶于1mL 0.15mol/L NaCl中,再与醛化的HRP溶液(10mg/mL)混合,加入0.1mL 1mol/L的碳酸盐缓冲液(pH9.6),于4°C搅拌反应24h,反应结束后加入0.1mL 0.2mol/L赖氨酸,4°C反应4h,以封闭残留的醛基,终止反应,通过Sephadex G-200凝胶柱洗层析,PBS缓冲液洗脱,收集洗脱液,加入等量60%甘油,4°C保存,即得酶标记N-MID检测抗体。

6. 如权利要求1所述的一种测定骨钙素含量的试剂盒,其特征在于,所述封闭液为含1%BSA的PBS缓冲液(10mM,pH 7.4)。

7. 如权利要求1所述的一种测定骨钙素含量的试剂盒,其特征在于,所述的化学发光底物包括化学发光底物A液、化学发光底物B液,所述化学发光底物A液为含2mM H₂O₂、1g/L脱脂奶粉、0.5g/L卵白蛋白和0.1%Tween-20的Tris缓冲液(10mM,pH 7.0-9.0),含有;化学发光底物B液为含有1g/L鲁米诺、2g/L对咪唑苯酚、2g/L磺丁基-β-环糊精、2.4g/L光稳定剂的Tris缓冲液(10mM,pH 7.0-9.0)。

8. 如权利要求1所述的一种测定骨钙素含量的试剂盒,其特征在于,所述清洗液为含有0.05%Tween-20、0.2g/L NaCl的PBS缓冲溶液(10mM,pH 7.4)。

9. 一种测定骨钙素含量试剂盒的检测方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 取10μL待检测样本于反应杯中,后加入140μL酶标记N-MID检测抗体,充分混匀,并于37°C温育10min,同时准备校准样本和空白样本;

(2) 向反应体系中加入50μL磁微粒偶联N-MID捕获抗体,充分混匀,并于37°C温育10min,清洗分离磁珠;向磁珠中加入100μL化学发光底物A液和B液的混合溶液,反应并测定各管的光强度;

(3) 根据校准品的浓度与光强度的关系绘制标准工作曲线,样本光强度在标准工作曲线上相对应的浓度值即为待测样品的测定浓度。

一种测定骨钙素含量的试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断领域,具体涉及一种测定骨钙素含量的试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 骨钙素也称 γ 羧基谷氨酸蛋白或依赖维生素K蛋白,是骨基质中最重要的一种特异性非胶原蛋白,由骨和牙齿中的成骨细胞合成并分泌,其与骨钙的结合作用依赖于维生素K。骨钙素分子含49个氨基酸,分子量约为5800D。在骨合成中,成骨细胞产生骨钙素,此过程依赖于维生素K,同时维生素D3有促进产生骨钙素的作用。使用维生素K拮抗剂,可使此蛋白在骨中的含量减少,但并不影响其脯氨酸的含量,也不影响骨的机械强度。骨钙素产生后一部分进入骨基质,另一部分释放进入外周血。其降解产物骨钙素N端中分子片段(N-MID)因其良好的稳定性和重复性,可代替骨钙素反应骨形成的状态。骨钙素的主要生理功能是维持骨的正常矿化速率,抑制异常的羟基磷灰石结晶的形成,抑制软骨矿化速率。

[0003] 通过血清骨钙素可以了解成骨细胞,特别是新形成的成骨细胞的活动状态。骨钙素值随年龄的变化以及骨更新率的变化而不同。骨更新率越快,骨钙素值越高,反之降低。在原发性骨质疏松中,绝经后骨质疏松症是高转换型的,所以骨钙素明显升高;老年性骨质疏松症是低转换型的,因而骨钙素升高不明显。故可根据骨钙素的变化情况鉴别骨质疏松是高转换型的还是低转换型的,对临床研究骨疾病和内分泌代谢性骨病的发病机理、研究骨质成分具有重要意义。

[0004] 当前诊断骨质疏松主要通过双能X线设备测量骨密度或是酶联免疫法,但双能X线设备测量骨密度对于骨折风险预测、骨质疏松症的治疗效果评判却欠缺足够的敏感性和及时性,存在一定局限;市场上有酶联免疫吸附法为原理的定量检测试剂盒,但因骨钙素在血液中的不稳定性,使其检测的意义大打折扣。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种测定骨钙素含量的试剂盒及其检测方法,具有灵敏度高、操作快速简便等优点。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:一种测定骨钙素含量的试剂盒,包括磁微粒偶联N-MID捕获抗体,酶标记N-MID检测抗体,N-MID校准品,酶作用的化学发光底物,清洗液。

[0007] 优选的,所述N-MID校准品用缓冲液稀释而成,浓度为0ng/mL、0.5ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、500ng/mL、1000ng/mL,缓冲液是含有0.5-5.0%BSA的Tris或PBS或HEPES缓冲液。

[0008] 优选的,所述磁微粒偶联N-MID捕获抗体的制备方法为:将磁微粒用缓冲液清洗后分散;加入EDC和NHS,搅拌均匀后再加入N-MID捕获抗体,4 $^{\circ}$ 搅拌过夜;磁分离磁微粒,去除上清液,用缓冲液清洗磁微粒后分散;向重新分散后的磁微粒溶液中加入封闭液封闭;磁

分离磁微粒,去除上清液,用缓冲液清洗磁微粒后再次分散,得到磁微粒偶联N-MID捕获抗体溶液。

[0009] 优选的,所述酶为辣根过氧化物酶。

[0010] 优选的,所述酶标记N-MID检测抗体的制备方法为:取10mgHRP溶于0.2mL 1.25%戊二醛中,20℃反应18h后,用0.15mol/L NaCl平衡过的Sephadex G-50凝胶柱层析,PBS缓冲液洗脱,除去游离的戊二醛,得到醛化的HRP溶液(10mg/mL),将5mg N-MID检测抗体溶于1mL 0.15mol/L NaCl中,再与醛化的HRP溶液(10mg/mL)混合,加入0.1mL 1mol/L的碳酸盐缓冲液(pH9.6),于4℃搅拌反应24h,反应结束后加入0.1mL 0.2mol/L赖氨酸,4℃反应4h,以封闭残留的醛基,终止反应,通过Sephadex G-200凝胶柱洗层析,PBS缓冲液洗脱,收集洗脱液,加入等量60%甘油,4℃保存,即得酶标记N-MID检测抗体。

[0011] 优选的,所述封闭液为含1%BSA的PBS缓冲液(10mM,pH 7.4)。

[0012] 优选的,所述的化学发光底物包括化学发光底物A液、化学发光底物B液,所述化学发光底物A液为含2mM H₂O₂、1g/L脱脂奶粉、0.5g/L卵白蛋白和0.1%Tween-20的Tris缓冲液(10mM,pH7.0-9.0),含有;化学发光底物B液为含有1g/L鲁米诺、2g/L对咪唑苯酚、2g/L磺丁基-β-环糊精、2.4g/L光稳定剂的Tris缓冲液(10mM,pH 7.0-9.0)。

[0013] 优选的,所述清洗液为含有0.05%Tween-20、0.2g/L NaCl的PBS缓冲溶液(10mM,pH 7.4)。

[0014] 本发明还提供如下技术方案:一种测定骨钙素含量试剂盒的检测方法,包括如下步骤:

[0015] (1)取10μL待检测样本于反应杯中,后加入140μL酶标记N-MID检测抗体,充分混匀,并于37℃温育10min,同时准备校准样本和空白样本;

[0016] (2)向反应体系中加入50μL磁微粒偶联N-MID捕获抗体,充分混匀,并于37℃温育10min,清洗分离磁珠;向磁珠中加入100μL化学发光底物A液和B液的混合溶液,反应并测定各管的光强度;

[0017] (3)根据校准品的浓度与光强度的关系绘制标准工作曲线,样本光强度在标准工作曲线上相对应的浓度值即为待测样品的测定浓度。

[0018] 当化学发光底物A液与B液混合后,所述化学发光底物液的pH值为8-9;HRP催化作用的较佳pH是中性或弱酸性,而鲁米诺化学发光反应的量子产率在pH为10左右时较高,若在酶的最佳条件下测定,检测的灵敏度会降低;反之,在碱性条件下HRP活性降低,使得催化能力减弱甚至丧失。本发明的化学发光底物A液与B液混合后pH为8-9,是灵敏度和发光量子产率综合较高的环境。

[0019] 本发明具有有益效果:目前国内大多采用酶联免疫法和放射免疫法测定全段骨钙素,由于全段骨钙素自身稳定性差,标本存放温度和时间会影响实验结果,N-中端骨钙素(N-MID)不易被蛋白酶水解,血清中含量稳定,本发明试剂盒对血清中的N-MID进行检测,检测结果可靠。

具体实施方式

[0020] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。

[0021] 实施例1

[0022] 一种测定骨钙素含量的试剂盒,包括磁微粒偶联N-MID捕获抗体,酶标记N-MID检测抗体,N-MID校准品,酶作用的化学发光底物,清洗液。

[0023] 优选的,所述N-MID校准品用缓冲液稀释而成,浓度为0ng/mL、0.5ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、500ng/mL、1000ng/mL,缓冲液是含有0.5-5.0%BSA的Tris或PBS或HEPES缓冲液。

[0024] 优选的,所述磁微粒偶联N-MID捕获抗体的制备方法为:将磁微粒用缓冲液清洗后分散;加入EDC和NHS,搅拌均匀后再加入N-MID捕获抗体,4°搅拌过夜;磁分离磁微粒,去除上清液,用缓冲液清洗磁微粒后分散;向重新分散后的磁微粒溶液中加入封闭液封闭;磁分离磁微粒,去除上清液,用缓冲液清洗磁微粒后再次分散,得到磁微粒偶联N-MID捕获抗体溶液。

[0025] 优选的,所述酶为辣根过氧化物酶。

[0026] 优选的,所述酶标记N-MID检测抗体的制备方法为:取10mgHRP溶于0.2ml 1.25%戊二醛中,20°C反应18h后,用0.15mol/l NaCl平衡过的Sephadex G-50凝胶柱层析,PBS缓冲液洗脱,除去游离的戊二醛,得到醛化的HRP溶液(10mg/mL),将5mg N-MID检测抗体溶于1mL0.15mol/L NaCl中,再与醛化的HRP溶液(10mg/mL)混合,加入0.1mL 1mol/L的碳酸盐缓冲液(pH9.6),于4°C搅拌反应24h,反应结束后加入0.1mL 0.2mol/L赖氨酸,4°C反应4h,以封闭残留的醛基,终止反应,通过Sephadex G-200凝胶柱洗层析,PBS缓冲液洗脱,收集洗脱液,加入等量60%甘油,4°C保存,即得酶标记N-MID检测抗体。

[0027] 优选的,所述封闭液为含1%BSA的PBS缓冲液(10mM,pH 7.4)。

[0028] 优选的,所述的化学发光底物包括化学发光底物A液、化学发光底物B液,所述化学发光底物A液为含2mM H₂O₂、1g/L脱脂奶粉、0.5g/L卵白蛋白和0.1%Tween-20的Tris缓冲液(10mM,pH7.0-9.0),含有;化学发光底物B液为含有1g/L鲁米诺、2g/L对咪唑苯酚、2g/L磺丁基-β-环糊精、2.4g/L光稳定剂的Tris缓冲液(10mM,pH 7.0-9.0)。

[0029] 当化学发光底物A液与B液混合后,所述化学发光底物液的pH值为8-9;HRP催化作用的较佳pH是中性或弱酸性,而鲁米诺化学发光反应的量子产率在pH为10左右时较高,若在酶的最佳条件下测定,检测的灵敏度会降低;反之,在碱性条件下HRP活性降低,使得催化能力减弱甚至丧失。本发明的化学发光底物A液与B液混合后pH为8-9,是灵敏度和发光量子产率综合较高的环境。

[0030] 所述清洗液为含有0.05%Tween-20、0.2g/L NaCl的PBS缓冲溶液(10mM,pH 7.4)。

[0031] 本发明还提供如下技术方案:一种测定骨钙素含量试剂盒的检测方法,包括如下步骤:

[0032] (1) 取10μL待检测样本于反应杯中,后加入140μL酶标记N-MID检测抗体,充分混匀,并于37°C温育10min,同时准备校准样本和空白样本;

[0033] (2) 向反应体系中加入50μL磁微粒偶联N-MID捕获抗体,充分混匀,并于37°C温育10min,清洗分离磁珠;向磁珠中加入100μL化学发光底物A液和B液的混合溶液,反应并测定各管的光强度;

[0034] (3) 根据校准品的浓度与光强度的关系绘制标准工作曲线,样本光强度在标准工作曲线上相对应的浓度值即为待测样品的测定浓度。

[0035] 实施例2

[0036] 将实施例1所制备的试剂盒与化学发光试剂盒(购自罗氏)的性能对比

[0037] 试验方法:实施例1所制备的试剂盒检测样本采取如下措施:取10 μ L待检测样本于反应杯中,后加入140 μ L酶标记N-MID检测抗体,充分混匀,并于37 $^{\circ}$ C温育10min,同时准备校准样本和空白样本;向反应体系中加入50 μ L磁微粒偶联N-MID捕获抗体,充分混匀,并于37 $^{\circ}$ C温育10min,清洗分离磁珠;向磁珠中加入100 μ L化学发光底物A液和B液的混合溶液,反应并测定各管的光强度;绘制标准工作曲线,计算样本中N-MID含量。罗氏化学发光试剂盒检测样本的操作过程参考其产品说明书。

[0038] 试验结果:实施例1所制备的试剂盒与化学发光试剂盒对浓度为10ng/ml的N-MID校准品进行检测,对校准品重复测定10次,分别计算均值(M)和标准差(S),以 $S/M \times 100\%$ 计算变异系数进行重复性考察,以 $(10-M/\text{样本浓度}) \times 100\%$ 计算相对偏差进行准确度考察,实验结果见下表1,由表1的结果可知本发明实施例1所制备的检测试剂盒其重复性和准确度性能优良。

[0039] 表1实施例1制备的试剂盒与罗氏化学发光试剂盒参数对比

[0040]

测试序号	实施例1试剂盒	罗氏化学发光试剂盒
1	9.99	9.92
2	10.2	9.87
3	10.15	10.03
4	10.03	10.06
5	10.05	9.85
6	9.89	10.05
7	9.93	9.89
8	9.88	9.83
9	10.12	10.03
10	10.08	10.09
平均值(M)	10.032	9.962
标准差(S)	0.1039	0.094
变异系数(CV%)	1.036%	0.943%
相对偏差(Bias%)	0.32%	0.38%

[0041] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

专利名称(译)	一种测定骨钙素含量的试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN110398587A	公开(公告)日	2019-11-01
申请号	CN201910701301.X	申请日	2019-07-31
[标]发明人	周义正 唐静 崔丛丛		
发明人	周义正 唐静 崔丛丛		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/535 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/535 G01N33/54326 G01N33/68		
代理人(译)	郑丰平		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种测定骨钙素含量的试剂盒及其检测方法，包括磁微粒偶联N-MID捕获抗体，酶标记N-MID检测抗体，N-MID校准品，酶作用的化学发光底物，清洗液；目前国内大多采用酶联免疫法和放射免疫法测定全段骨钙素，由于全段骨钙素自身稳定性差，标本存放温度和时间会影响实验结果，N-中端骨钙素(N-MID)不易被蛋白酶水解，血清中含量稳定，本发明试剂盒对血清中的N-MID进行检测，检测结果可靠。

[0040]

测试序号	实施例1试剂盒	罗氏化学发光试剂盒
1	9.99	9.92
2	10.2	9.87
3	10.15	10.03
4	10.03	10.06
5	10.05	9.85
6	9.89	10.05
7	9.93	9.89
8	9.88	9.83
9	10.12	10.03
10	10.08	10.09
平均值(M)	10.032	9.962
标准差(S)	0.1039	0.094
变异系数(CV%)	1.036%	0.943%
相对偏差(Bias%)	0.32%	0.38%

[0041] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例，对于本领域的普通技术人员而言，可以