



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106370864 A

(43)申请公布日 2017.02.01

(21)申请号 201610784324.8

(22)申请日 2016.08.31

(71)申请人 镇江华测金太医学检验所有限公司

地址 212016 江苏省镇江市京口区宗泽路
60号恺源大厦10楼

(72)发明人 陆上苏 吴伟 徐恒

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

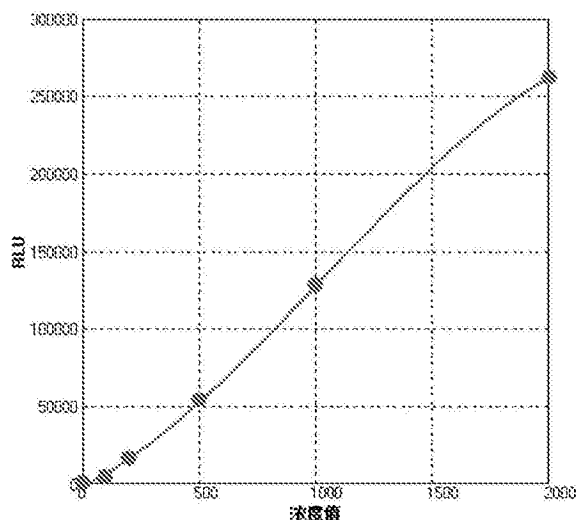
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白
的化学发光盒

(57)摘要

本发明公开了一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的化学发光盒,其特征在于:包括盒体,设在盒体内的化学发光板和设在盒体内的试剂,所述化学发光板为乳白色不透明聚苯乙烯96孔化学发光板,各孔包被有抗NGAL抗体,抗体包被浓度为 $5.0\ \mu\text{g/mL}$,所述试剂包括:NGAL系列标准品溶液,NGAL系列质控品溶液,样本稀释液,酶标NGAL抗体,链酶亲和素-HRP,化学发光底物A液,化学发光底物B液,浓缩洗涤液。本发明的化学发光酶联免疫检测试剂盒具有高灵敏度、简便快速、准确度高的特点,与传统的ELISA法比较,操作时间大幅度减少。可用作检测肾损伤的辅助诊断。



1. 一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的化学发光盒,其特征在于:包括盒体,设在盒体内的化学发光板和设在盒体内的试剂,所述化学发光板为乳白色不透明聚苯乙烯96孔化学发光板,各孔包被有抗NGAL抗体,抗体包被浓度为 $5.0\mu\text{g/mL}$,所述试剂包括:NGAL系列标准品溶液,NGAL系列质控品溶液,样本稀释液,酶标NGAL抗体,链酶亲和素-HRP,化学发光底物A液,化学发光底物B液,浓缩洗涤液。

2. 根据权利要求1所述的一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的化学发光盒,其特征在于:所述盒体检测样本为人血清样本。

3. 根据权利要求2所述的一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的化学发光盒,其特征在于:所述NGAL系列标准品溶液浓度分别为: 0 、 100ng/mL 、 200ng/mL 、 500ng/mL 、 1000ng/mL 、 2000ng/mL 。

4. 根据权利要求3所述的一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的化学发光盒,其特征在于:所述NGAL系列质控品溶液浓度分别为: 400 – 600ng/mL 、 160 – 240ng/mL 。

5. 根据权利要求4所述的一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的化学发光盒,其特征在于:所述样本稀释液为 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液, $\text{pH}=7.4$,磷酸盐缓冲液是每升含有 16g NaCl , 0.4g KCl , $0.4\text{g KH}_2\text{PO}_4$, $5.8\text{g Na}_2\text{HPO}_4$ 的水溶液。

6. 根据权利要求5所述的一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的化学发光盒,其特征在于:所述酶标NGAL抗体是由NGAL抗体与生物素偶合制成的偶联物作为检测抗体。

7. 根据权利要求6所述的一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的化学发光盒,其特征在于:所述浓缩洗涤溶液是含有体积分数 0.05% 吐温-20的 $\text{pH}=7.4$, 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液。

8. 根据权利要求7所述的一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的化学发光盒,其特征在于:所述化学发光液A液为鲁米诺含量为 0.01M 、对甲苯酚含量为 0.001M $\text{pH}=8.8$ 的三羟甲基氨基甲烷溶液;所述化学发光液B液为每 100mL 溶液含柠檬酸 2.1g ,无水 Na_2HPO_4 2.82g , 0.75% 的过氧化氢脲 0.64mL 的水溶液,所述百分比为质量百分比。

一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的化学发光盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 的化学发光盒,用于检测肾损伤病人血清中的NGAL蛋白的浓度。可用作检测脑梗死等脑损伤疾的辅助诊断。属于免疫学检测领域。

背景技术

[0002] 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (neutrophil gelatinase associated lipocalin, NGAL), 是人脂质运载蛋白家族中的一个新成员。近年来, NGAL作为一种新的肾损伤标志物倍受关注。

[0003] 人类NGAL基因定位于第9号染色体长臂 (9q34), 全长5869bp, 包括1695bp的5'端非转录区、178bp的3'端非转录区及由7个外显子和6个内含子构成的3696bp的原初转录区; 其相对分子质量为25000bp。

[0004] NGAL在肾脏病领域最早被作为急性肾损伤 (AKI) 新的早期诊断标志物提出。正常情况下NGAL在肾组织少量表达, 缺血-再灌注肾损伤动物模型中血、尿NGAL分别上升300倍和1000倍。针对儿童心脏手术的研究显示并发AKI者术后2h尿NGAL浓度明显升高, 远早于1~3d后才出现改变的血清肌酐, 而术后12h尿NGAL水平则与AKI的病死率明显相关, 成年患者心脏手术后2h尿NGAL同样可作为AKI的早期诊断指标, 并与其发病率及体外循环持续时间明显相关, 但该相关性较儿童低, 考虑可能与受试人群基础疾病状态等因素相关。在肾移植手术中, 尿及肾组织中的NGAL高表达均与术后肾功能延迟恢复 (DGF) 相关。

发明内容

[0005] 为了解决现有技术中的问题, 本发明提供了一种具有高灵敏度、简便快速、准确度高的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 的化学发光盒。

[0006] 为了解决上述问题, 本发明所采取的技术方案是:

[0007] 一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的化学发光盒, 其特征在于: 包括盒体, 设在盒体内的化学发光板和设在盒体内的试剂, 所述化学发光板为乳白色不透明聚苯乙烯96孔化学发光板, 各孔包被有抗NGAL抗体, 抗体包被浓度为5.0 μ g/mL, 所述试剂包括: NGAL系列标准品溶液, NGAL系列质控品溶液, 样本稀释液, 酶标NGAL抗体, 链酶亲和素-HRP, 化学发光底物A液, 化学发光底物B液, 浓缩洗涤液。

[0008] 前述的一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的化学发光盒, 其特征在于: 所述盒体检测样本为人血清样本。

[0009] 前述的一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的化学发光盒, 其特征在于: 所述NGAL系列标准品溶液浓度分别为: 0、100ng/mL、200ng/mL、500ng/mL、1000ng/mL、2000ng/mL。

[0010] 前述的一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的化学发光盒, 其特征在于: 所述NGAL系列质控品溶液浓度分别为: 400-600ng/mL、160-240ng/mL。

[0011] 前述的一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的化学发光盒,其特征在于:所述样本稀释液为0.05mol/L磷酸盐缓冲液,pH=7.4,磷酸盐缓冲液是每升含有16g NaCl,0.4g KCl,0.4g KH₂PO₄,5.8g Na₂HPO₄的水溶液。

[0012] 前述的一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的化学发光盒,其特征在于:所述酶标NGAL抗体是由NGAL抗体与生物素偶合制成的偶联物作为检测抗体

[0013] 前述的一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的化学发光盒,其特征在于:所述浓缩洗涤溶液是含有体积分数0.05%吐温-20的pH=7.4,0.1mol/L磷酸盐缓冲液。

[0014] 前述的一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的化学发光盒,其特征在于:所述化学发光液A液为鲁米诺含量为0.01M、对甲苯酚含量为0.001M pH=8.8的三(羟甲基)氨基甲烷溶液;所述化学发光液B液为每100mL溶液含柠檬酸2.1g,无水Na₂HPO₄ 2.82g,0.75%的过氧化氢脲0.64mL的水溶液,所述百分比为质量百分比。

[0015] 本发明所达到的有益效果:本发明主要是利用抗原与抗体的特异性免疫反应的基本原理来实现的。化学发光免疫分析法是化学发光法和免疫分析法结合的产物,因此同时具有化学发光法的高灵敏性和免疫分析法的高特异性。在整个反应过程中,样品中NGAL含量越高,反应体系中发光强度越强;反之,样品中NGAL含量越少,发光强度越弱。本发明的化学发光酶联免疫检测试剂盒具有高灵敏度、简便快速、准确度高的特点,与传统的ELISA法比较,操作时间大幅度减少。可用作检测肾损伤的辅助诊断。

附图说明

[0016] 图1是本发明化学发光试剂盒标准曲线。

具体实施方式

[0017] 下面结合附图对本发明作进一步描述。以下实施例仅用于更加清楚地说明本发明的技术方案,而不能以此来限制本发明的保护范围。

[0018] 本发明中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的化学发光盒,第一方面提供了一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)的化学发光酶联免疫(CLEIA)检测试剂盒,包括盒体,设在盒体内的化学发光板和设在盒体内的试剂:

[0019] 1.包被有抗NGAL抗体的白色不透明96孔可拆卸或不可拆卸的聚苯乙烯化学发光板,抗体包被浓度为5.0μg/mL。

[0020] 2.NGAL系列标准品溶液。浓度分别为:0、50、100、250、500、1000ng/mL。

[0021] 3.NGAL系列质控品溶液浓度分别为:500±100、200±40ng/mL。

[0022] 4.样本稀释液。为0.05mol/L磷酸盐缓冲液,pH=7.4。

[0023] 5.酶标NGAL抗体。由NGAL抗体与生物素偶联制备得到。

[0024] 6.链亲和素-HRP。

[0025] 7.发光底物液。化学发光液分为A、B液。化学发光液A液为化学发光底物-鲁米诺和发光增强剂-对甲苯酚溶液,化学发光液B液为过氧化氢脲溶液。

[0026] 8.浓缩洗涤液。浓缩洗涤溶液具体为含有吐温-20(Tween-20)缓冲液的20倍浓缩磷酸盐缓冲液,使用前用双蒸水稀释至工作浓度后使用,用于实验过程中洗涤化学发光板

[0027] 本发明第二方面该试剂盒适用于肾损伤的辅助诊断。

[0028] 本发明第三方面该试剂盒检测样本为人血清样本。

[0029] 本发明第四方面相关溶液的配制：

[0030] 本发明试剂盒中涉及的NGAL标准品溶液、样本稀释液、化学发光液及浓缩洗涤液及其配方对本发明试剂盒检测的灵敏度影响很大；其中各溶液的主要成分及其配制方法是：

[0031] 1. NGAL系列标准品溶液：以常规方法将NGAL纯品用标准品稀释液配制成浓度分别为0、100ng/mL、200ng/mL、500ng/mL、1000ng/mL、2000ng/mL的NGAL标准溶液。

[0032] 2. NGAL系列质控品溶液：以常规方法将NGAL纯品用标准品稀释液配制成浓度分别为：500±100ng/mL、200±40ng/mL。

[0033] 3. 酶标NGAL抗体溶液：用NGAL抗体与生物素偶联制备，将所得NGAL抗原用酶标NGAL稀释液稀释成1:4000的工作浓度。

[0034] 4. 标准品稀释液：为含有BSA，蔗糖的0.05mol/L磷酸盐缓冲液，pH=7.4，是每升含有20g BSA，50g蔗糖，16g NaCl，0.4g KCl，0.4g KH₂PO₄，5.8g Na₂HPO₄的水溶液。

[0035] 5. 酶标抗原稀释液：为含有BSA的0.05mol/L磷酸盐缓冲液，pH=7.4，是每升含有20g BSA，16g NaCl，0.4g KCl，0.4g KH₂PO₄，5.8g Na₂HPO₄的水溶液。

[0036] 6. 样本稀释液：为0.05mol/L磷酸盐缓冲液，pH=7.4，磷酸盐缓冲液是每升含有16g NaCl，0.4g KCl，0.4g KH₂PO₄，5.8g Na₂HPO₄的水溶液。

[0037] 7. 化学发光液：A液为鲁米诺含量为0.01M、对甲苯酚含量为0.001M，pH=8.8的三(羟甲基)氨基甲烷溶液，B液为每100mL溶液含柠檬酸2.1g，无水Na₂HPO₄ 2.82g，0.75%的过氧化氢脲0.64mL的水溶液。

[0038] 8. 浓缩洗涤液：按体积分数0.05%将吐温-20添加至pH=7.4，0.1mol/L磷酸盐缓冲液中。

[0039] 9. 包被溶液：1.59g碳酸钠和2.53g碳酸氢钠溶于1L水中，调节pH=9.5。

[0040] 10. 封闭溶液：10g BSA溶于1L洗涤溶液中，再加入重量比为5%的NaN₃。

[0041] 本发明第五方面化学发光板的包被：

[0042] 本发明中包被化学发光板采用将抗NGAL抗体置于设定的包被溶液中，以设定的浓度，在37℃恒温箱中反应包被。

[0043] 本发明采用的是pH=9.5的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液。本发明中微孔板中所包被的抗NGAL抗体在碱性环境下可以很好的结合在微孔板塑料表面上，可以经受多次洗板，采用的抗体包被浓度为5.0μg/mL。包被好的微孔板可以用封闭溶液封闭，封闭液中惰性蛋白优选BSA，需加入NaN₃防止变质

[0044] 本发明第六方面该试剂盒的实验操作方法：

[0045] 1. 化学发光板使用前每孔加200μl清洗液，等待30秒后甩尽清洗液，重复2次。

[0046] 2. 将校准品溶液、质控品溶液或样本溶液各20μl分别加入化学发光板微孔中，再加入样本稀释液80μl，震荡混匀后，用封板膜封板，37℃水浴20分钟。

[0047] 3. 甩去化学发光板孔内液体，每孔加200μl清洗液，等待30秒后甩尽清洗液，重复此操作5次。

[0048] 4. 加入生物素标记抗体，每孔100μl，用封板膜封板，37℃水浴30分钟。

[0049] 5. 甩去孔内液体，每孔加200μl清洗液，等待30秒后甩尽清洗液，重复此操作5次。

[0050] 6. 每孔加入100 μ l的链酶亲和素-HRP,用封板膜封板,37℃水浴30分钟。

[0051] 7. 甩去孔内液体,每孔加200 μ l清洗液,等待30秒后甩尽清洗液,重复此操作5次。

[0052] 8. 每孔分别加入50 μ l发光液A液和50 μ l发光液B液,立刻置于化学发光仪器中读数。

[0053] 本发明理化实验数据

[0054] 1. 最低检测线

[0055] 用零浓度校准品作为样本进行检测,重复测定20次,得出20次测量结果的发光值(RLU值),计算其平均值(M)和标准差(SD),得出M+2SD所对应的RLU值,根据试剂盒所用校准品的定标曲线方程,将M+2SD所对应的RLU值带入标准曲线中,求出对应的浓度值,即为检测限。

[0056]

检验编号	RLU 值	发光值均值 (M)	标准差 SD	M+2SD	最低检测限 (ng/ml)
1	269	266	13.62	292.74	20.22
2	278				
3	258				
4	270				
5	273				
6	255				
7	255				
8	248				
9	285				
10	243				
11	252				
12	291				
13	255				
14	261				
15	275				
16	278				
17	285				
18	270				
19	260				
20	252				

[0057] 2. 准确度

[0058] 取准确度参考品作为样本进行检测。重复测量3次后,其平均结果记为M,根据公式(1)计算测量浓度的相对偏差。

[0059] $B = (M - T) / T \times 100\%$ • 公式(1)

[0060] 式中:

[0061] B—相对偏差;

[0062] M—测量浓度3次结果的平均值;

[0063] T—准确度参考品的浓度。

[0064]

准确度参考品 浓度 (T) (ng/ml)	样本RLU值	样本测量浓 度 (ng/ml)	均值 (M) (ng/ml)	相对偏差 (B)
500	59636	547.89	544.68	8.94%
	57962	535.89		
	59966	550.25		

[0065] 3. 重复性

[0066] 用两个浓度水平的样本各重复检测10次,计算10次测量浓度结果的平均值M和标准差SD,根据公式(2)得出变异系数CV。

[0067] $CV = SD / M \times 100\%$ • 公式(2)

[0068] 式中:

[0069] CV—变异系数;

[0070] SD—10次测量结果的标准差;

[0071] M—10次测量结果的平均值。

[0072]

样本浓度 (ng/ml)	检验 编号	RLU 值	测量浓度 (ng/ml)	均值 (M) (ng/ml)	标准 差	变异 系数
500	1	59376	546.03	532.31	17.77	3.34%
	2	53916	506.54			
	3	55070	514.96			
	4	58492	539.70			
	5	57966	535.92			

[0073]

	6	54946	514.06			
	7	60667	555.24			
	8	58485	539.65			
	9	55344	516.96			
	10	60499	554.05			

[0074]

样本浓度 (ng/ml)	检验 编号	RLU 值	测量浓度 (ng/ml)	均值 (M) (ng/ml)	标准 差	变异 系数
200	1	18237	214.90	225.06	15.17	6.74%
	2	19924	230.70			
	3	21057	241.15			
	4	20757	238.39			
	5	18915	221.28			
	6	19631	227.97			
	7	20745	238.28			
	8	20339	234.54			
	9	16053	193.97			
	10	17663	209.45			

[0075] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征及优点。本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理,在不脱离本发明精神和范围的前提下,本发明还会有各种变化和改进,这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等效物界定。

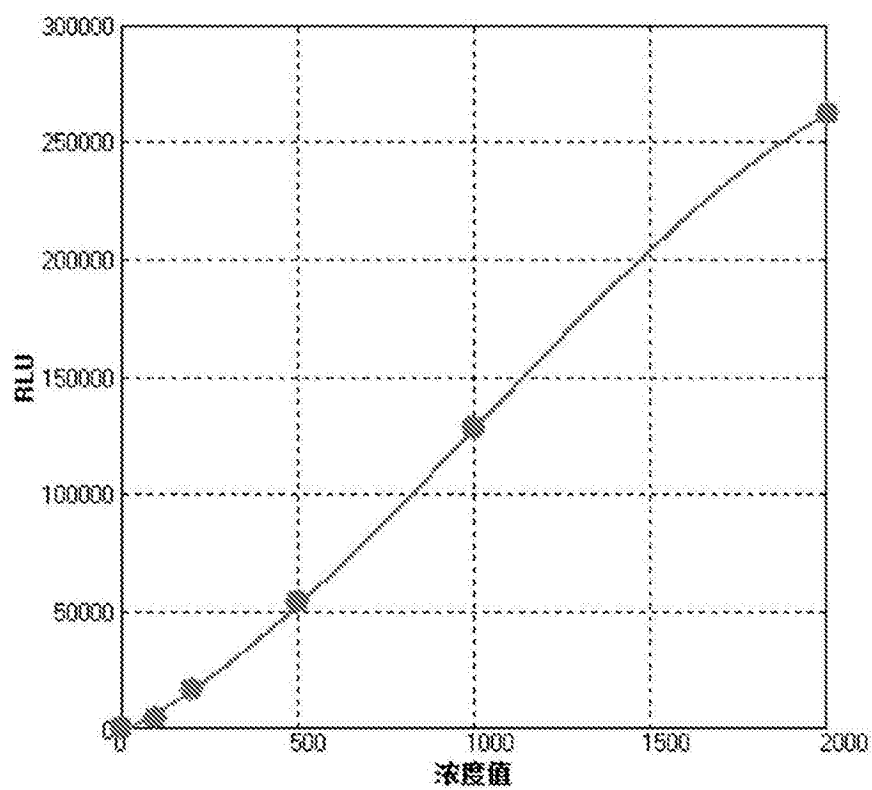


图1

专利名称(译)	一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的化学发光盒		
公开(公告)号	CN106370864A	公开(公告)日	2017-02-01
申请号	CN201610784324.8	申请日	2016-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	镇江华测金太医学检验所有限公司		
申请(专利权)人(译)	镇江华测金太医学检验所有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	镇江华测金太医学检验所有限公司		
[标]发明人	陆上苏 吴伟 徐恒		
发明人	陆上苏 吴伟 徐恒		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/53 G01N2333/775 G01N2800/347		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的化学发光盒，其特征在于：包括盒体，设在盒体内的化学发光板和设在盒体内的试剂，所述化学发光板为乳白色不透明聚苯乙烯96孔化学发光板，各孔包被有抗NGAL抗体，抗体包被浓度为 5.0 µg/mL，所述试剂包括：NGAL系列标准品溶液，NGAL系列质控品溶液，样本稀释液，酶标NGAL抗体，链酶亲和素-HRP，化学发光底物A液，化学发光底物B液，浓缩洗涤液。本发明的化学发光酶联免疫检测试剂盒具有高灵敏度、简便快速、准确度高的特点，与传统的ELISA法比较，操作时间大幅度减少。可用作检测肾损伤的辅助诊断。

