



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107490677 A

(43)申请公布日 2017.12.19

(21)申请号 201710601082.9

(22)申请日 2017.07.21

(71)申请人 王贤俊

地址 325000 浙江省温州市瓯海娄桥工业
园区森茂路28号

(72)发明人 王贤俊 何丹

(74)专利代理机构 温州名创知识产权代理有限
公司 33258

代理人 曾建芳

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/72(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

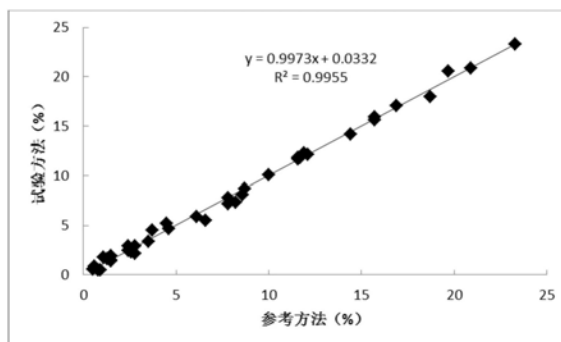
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种羧基胶乳微球与糖化血红蛋白抗体的
交联组合液及其交联方法

(57)摘要

本发明公开了一种羧基胶乳微球与糖化血红蛋白抗体的交联组合液,其包括羊抗人糖化血红蛋白多克隆抗体、交联剂、活化液、清洗液、保存液,交联剂包括碳二亚胺与N-羟基琥珀酰亚胺,该交联组合液主要用于羧基胶乳微球与糖化血红蛋白抗体的交联过程。该交联组合液组成简单,价格低廉,可用于临床中常用的胶乳免疫比浊法检测试剂中的交联反应,且由该交联组合液经交联反应后制得的交联微球稳定性好,灵敏度高,抗干扰能力强。



1. 一种羧基胶乳微球与糖化血红蛋白抗体的交联组合液,其特征在于,包括羊抗人糖化血红蛋白多克隆抗体、交联剂、活化液、清洗液、保存液,交联剂包括碳二亚胺与N-羟基琥珀酰亚胺,

胶乳微球的微球粒径为120nm,

活化液由20mM的pH=6.0的磷酸盐缓冲液、质量分数为0.02%的叠氮钠组成,

清洗液由20mM的pH=7.0磷酸盐缓冲液、质量分数为0.01%的TritonX-100、质量分数为0.02%的叠氮钠组成,

保存液由20mM, pH7.0磷酸盐缓冲液,质量分数为0.05%的BSA,质量分数为0.5%的蔗糖,质量分数为0.02%的叠氮钠组成。

2. 一种羧基胶乳微球与糖化血红蛋白抗体的交联方法,其特征在于,①制备交联过程中的交联组合液,交联组合液包括羊抗人糖化血红蛋白多克隆抗体、交联剂、活化液、清洗液、保存液,交联剂包括碳二亚胺与N-羟基琥珀酰亚胺,

胶乳微球的微球粒径为120nm,

活化缓冲液由20mM的pH=6.0的磷酸盐缓冲液、质量分数为0.02%的叠氮钠组成,

清洗液由20mM的pH=7.0磷酸盐缓冲液、质量分数为0.01%的TritonX-100、质量分数为0.02%的叠氮钠组成,

保存液由20mM, pH7.0磷酸盐缓冲液,质量分数为0.05%的BSA,质量分数为0.5%的蔗糖,质量分数为0.02%的叠氮钠组成,

②取5%羧基胶乳微球0.2mL,加入0.8mL活化液进行活化,活化次数为3次,震荡混匀15min/次,然后以13000r/min的速度离心20min,去掉上清,得到微球沉淀;

③于微球沉淀中加入1mL活化液悬起微球沉淀,超声3次,5min/次,每次以10000r/min速度离心15min处理,去掉上清,重新加入1mL活化液悬起微球沉淀,得到微球溶液;

④于微球溶液中加入交联剂后,加入活化缓冲液溶解,微球溶液与交联剂的质量比为10:1,所述碳二亚胺与N-羟基琥珀酰亚胺的质量比为1:2;

⑤步骤④反应后,经离心处理,13000r/min离心20min,去掉上清,用清洗液清洗,重复清洗3次,9000r/min离心10min,去上清,得到乳胶微球;

⑥采用20mM的pH=7.0的磷酸盐缓冲液稀释浓度为10mg/mL的羊抗人糖化血红蛋白多克隆抗体液2mL,加入经步骤⑤活化处理后的胶乳微球,充分悬浮胶乳微球;

⑦将上述步骤④处理过的液体与步骤⑥的乳胶微球混合,震荡混匀,室温孵育5h;

⑧经离心处理,8000r/min离心10min,去掉上清;

⑨用2mL保存液悬起上述沉淀,震荡混匀,时间为4min,其中,前2min静止,然后,放置于冰上震荡1min,撤去冰后继续震荡2min,4℃保存。

一种羧基胶乳微球与糖化血红蛋白抗体的交联组合液及其交联方法

技术领域

[0001] 本发明涉及血清中糖化血红蛋白载体的制备技术领域,尤其是一种羧基胶乳微球与糖化血红蛋白抗体的交联组合液及其交联方法。

背景技术

[0002] 许多研究报道,糖化血红蛋白的特点决定了它在糖尿病监测中有很大的意义。血糖越高,糖化血红蛋白就越高,所以能反映血糖控制水平。由于血糖是不断波动的,每次抽血只能反映当时的血糖水平,而糖化血红蛋白则是逐渐生成的,短暂的血糖升高不会引起糖化血红蛋白的升高;反过来,短暂的血糖降低也不会造成糖化血红蛋白的下降。由于吃饭不影响其测定,故可以在餐后进行检测。糖化血红蛋白相当稳定,不易分解,所以它虽然不能反映短期内的血糖波动,却能很好地反映较长时间的血糖控制程度,糖化血红蛋白能反映采血前2个月之内的平均血糖水平。糖化血红蛋白是指其在总血红蛋白中的比例,所以不受血红蛋白水平的影响。

[0003] 目前,应用较多的检测主要有:酶联免疫吸附试验、免疫过滤胶体金染色法和放免法。其中乳胶免疫比浊法适用于全自动生化分析仪,通过与血清样本中目的物结合产生浊度的变化,进而反应吸光度值的变化,产生检测信号值,该检测结果是疾病分期、判断预后和指导治疗的一项评判标志。与上述检测方法相比,乳胶免疫比浊法灵敏度较高,准确度高,操作简单等特点。该方法能够很好的弥补上述其他方法的不足。然而,胶乳微球-抗体交联组合物成为了该检测程序中的关键步骤,本发明基于糖化血红蛋白的特性,研发了一种羧基胶乳微球与糖化血红蛋白抗体的交联方法,采用交联方法制得胶乳微球-抗体交联组合物。

发明内容

[0004] 为了克服现有技术的不足,本发明提供了一种羧基胶乳微球与糖化血红蛋白抗体的交联组合液,该交联组合液通过交联方法制得的胶乳微球-抗体交联组合物能够提高乳胶免疫比浊法检测糖化血红蛋白含量的灵敏度、准确度和抗干扰能力,而该交联组合液组成简单、成本低。

[0005] 为了实现上述目的,本发明采用的技术方案是:羧基胶乳微球与糖化血红蛋白抗体的交联组合液,其特征在于,包括羊抗人糖化血红蛋白多克隆抗体、交联剂、活化液、清洗液、保存液,交联剂包括碳二亚胺与N-羟基琥珀酰亚胺,

[0006] 胶乳微球的微球粒径为120nm,

[0007] 胶乳微球的微球粒径为120nm,

[0008] 活化液由20mM的pH=6.0的磷酸盐缓冲液、质量分数为0.02%的叠氮钠组成,

[0009]

[0010] 清洗液由20mM的pH=7.0磷酸盐缓冲液、质量分数为0.01%的TritonX-100、质量

分数为0.02%的叠氮钠组成,

[0011] 保存液由20mM,pH7.0磷酸盐缓冲液,质量分数为0.05%的BSA,质量分数为0.5%的蔗糖,质量分数为0.02%的叠氮钠组成。

[0012] 本发明的另一目的是提供了一种羧基胶乳微球与糖化血红蛋白抗体的交联方法,其特征在于,①制备交联过程中的交联组合液,交联组合液包括羊抗人糖化血红蛋白多克隆抗体、交联剂、活化液、清洗液、保存液,交联剂包括碳二亚胺与N-羟基琥珀酰亚胺,

[0013] 胶乳微球的微球粒径为120nm,

[0014] 活化缓冲液由20mM的pH=6.0的磷酸盐缓冲液、质量分数为0.02%的叠氮钠组成,

[0015] 清洗液由20mM的pH=7.0磷酸盐缓冲液、质量分数为0.01%的TritonX-100、质量分数为0.02%的叠氮钠组成,

[0016] 保存液由20mM,pH7.0磷酸盐缓冲液,质量分数为0.05%的BSA,质量分数为0.5%的蔗糖,质量分数为0.02%的叠氮钠组成,

[0017] ②取5%羧基胶乳微球0.2mL,加入0.8mL活化液进行活化,活化次数为3次,震荡混匀15min/次,然后以13000r/min的速度离心20min,去掉上清,得到微球沉淀;

[0018] ③于微球沉淀中加入1mL活化液悬起微球沉淀,超声3次,5min/次,每次以10000r/min速度离心15min处理,去掉上清,重新加入1mL活化液悬起微球沉淀,得到微球溶液;

[0019] ④于微球溶液中加入交联剂后,加入活化缓冲液溶解,微球溶液与交联剂的质量比为10:1,所述碳二亚胺与N-羟基琥珀酰亚胺的质量比为1:2;

[0020] ⑤步骤④反应后,经离心处理,13000r/min离心20min,去掉上清,用清洗液清洗,重复清洗3次,9000r/min离心10min,去上清,得到乳胶微球;

[0021] ⑥采用20mM的pH=7.0的磷酸盐缓冲液稀释浓度为10mg/mL的羊抗人糖化血红蛋白多克隆抗体液2mL,加入经步骤⑤活化处理后的胶乳微球,充分悬浮胶乳微球;

[0022] ⑦将上述步骤④处理过的液体与步骤⑥的乳胶微球混合,震荡混匀,室温孵育5h;

[0023] ⑧经离心处理,8000r/min离心10min,去掉上清;

[0024] ⑨用2mL保存液悬起上述沉淀,震荡混匀,时间为4min,其中,前2min静止,然后,放置于冰上震荡1min,撤去冰后继续震荡2min,4℃保存。

[0025] 采用上述方案,本发明的交联组合液组成简单,价格低廉,可用于临床中常用的胶乳免疫比浊法检测试剂中的交联反应,且由该交联组合液经交联反应后制得的交联微球稳定性好,灵敏度高,抗干扰能力强。

[0026] 下面结合附图对本发明作进一步描述。

附图说明

[0027] 附图1为本发明具体实施例3试剂理论浓度与实际浓度检测结果相关分析图,采用全自动生化分析仪,对40个血清样本进行测定,并对其进行相关分析。其中相关系数: $r^2=0.995$,线性方程为: $y=0.997x+0.033$ 。

具体实施方式

[0028] 本发明的保护范围不局限于下述具体实施方式,本领域一般技术人员根据本发明公开的内容,可以采用其他多种具体实施方式实施本发明的,或者凡是采用本发明的设计

结构和思路,做简单变化或更改的,都落入本发明的保护范围。

[0029] 下面实施例描述的是羧基胶乳微球与糖化血红蛋白抗体的交联方法,其包括以下步骤:①制备交联过程中的交联组合液,交联组合液包括羊抗人糖化血红蛋白多克隆抗体、交联剂、活化液、清洗液、保存液,交联剂包括碳二亚胺与N-羟基琥珀酰亚胺,

[0030] 胶乳微球的微球粒径为120nm,

[0031] 活化缓冲液由20mM的pH=6.0的磷酸盐缓冲液、质量分数为0.02%的叠氮钠组成,

[0032] 清洗液由20mM的pH=7.0磷酸盐缓冲液、质量分数为0.01%的TritonX-100、质量分数为0.02%的叠氮钠组成,

[0033] 保存液由20mM, pH7.0磷酸盐缓冲液,质量分数为0.05%的BSA,质量分数为0.5%的蔗糖,质量分数为0.02%的叠氮钠组成,

[0034] ②取5%羧基胶乳微球0.2mL,加入0.8mL活化液进行活化,活化次数为3次,震荡混匀15min/次,然后以13000r/min的速度离心20min,去掉上清,得到微球沉淀;

[0035] ③于微球沉淀中加入1mL活化液悬起微球沉淀,超声3次,5min/次,每次以10000r/min速度离心15min处理,去掉上清,重新加入1mL活化液悬起微球沉淀,得到微球溶液;

[0036] ④于微球溶液中加入交联剂后,加入活化缓冲液溶解,微球溶液与交联剂的质量比为10:1,所述碳二亚胺与N-羟基琥珀酰亚胺的质量比为1:2;

[0037] ⑤步骤④反应后,经离心处理,13000r/min离心20min,去掉上清,用清洗液清洗,重复清洗3次,9000r/min离心10min,去上清,得到乳胶微球;

[0038] ⑥采用20mM的pH=7.0的磷酸盐缓冲液稀释浓度为10mg/mL的羊抗人糖化血红蛋白多克隆抗体液2mL,加入经步骤⑤活化处理后的胶乳微球,充分悬浮胶乳微球;

[0039] ⑦将上述步骤④处理过的液体与步骤⑥的乳胶微球混合,震荡混匀,室温孵育5h;

[0040] ⑧经离心处理,8000r/min离心10min,去掉上清;

[0041] ⑨用2mL保存液悬起上述沉淀,震荡混匀,时间为4min,其中,前2min静止,然后,放置于冰上震荡1min,撤去冰后继续震荡2min,4℃保存。

[0042] 将经上述步骤处理后的糖化血红蛋白抗体与羧基胶乳微球交联后的结果进行测定,使用双试剂全自动生化分析仪,例如贝克曼DXC800、日立7600等全自动分析仪进行测定。试剂1由20mM的pH=7.0的磷酸盐缓冲液、质量分数为0.02%的叠氮钠、质量分数为0.5%的PEG-6000组成;试剂2由20mM的pH=7.0磷酸盐缓冲液、质量分数为0.8%的人偶联糖化血红蛋白抗体胶乳微球、质量分数为0.05%的BSA、质量分数为0.5%的蔗糖、质量分数为0.02%的叠氮钠组成;将试剂1和试剂2放置在所设置好的位置上,在样本盘中对应位置放好蒸馏水、校准品和待测样本,操作程序如下:

[0043] 表1操作程序

[0044]

加入物	空白管 (B)	校准管 (S)	样品管 (T)
试剂 1 (μL)	224	224	224
蒸馏水 (μL)	4	-	-
校准品 (μL)	-	4	-
样 品 (μL)	-	-	4
试剂 2 (μL)	56	56	56
混匀, 在主波长 600nm 下读取吸光度 A_1 , 反应 5 分钟, 读取吸光度值 A_2 , 计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。			

[0045] 结果计算: 以测定管 ΔA , 根据校准曲线可求得糖化血红蛋白的含量。

[0046] 实施例1

[0047] 按照上述述操作程序对胶乳微球的粒径进行筛选, 检测结果如下表2:

[0048] 表2不同胶乳微球粒径的检测结果

[0049]

粒径 (nm)	理论浓度 (%)	实际浓度 (%)	CB 值 (%)
90	4	3.2	-20%
	8	7.1	-11.3%
	15	13.1	-12.7%
120	4	4.1	2.5%

[0050]

150	8	7.9	-1.3%
	15	14.5	-3.3%
	4	3.8	-5%
	8	7.6	-5%
	15	14.1	-6%

[0051] 通过低值, 中值, 高值的实际浓度与理论浓度比较结果表明, 二者差异较小并且在 $\pm 10\%$ 之内, 但是三者不同的粒径相比较120nm的微球差异较小。

[0052] 实施例2

[0053] 按照上述述操作程序对该方法偶联的抗体胶乳微球的精密度, 检测结果如下表:

[0054] 批内精密度: 对某一血清样本测定10次, 对下述数据计算, 批内精密度差异结果为2.48%, 测得差异较小。

[0055] 表3批内精密度检测结果

[0056]

次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
浓度 (%)	11.1	10.9	11.0	11.3	11.0	10.8	11.2	11.4	10.6	10.6

[0057] 批间精密度: 选取3个不同批次的偶联微球, 分别对某一血清样本测定10次, 结果如下表格所示, 分别算出3批浓度的差异结果为1.14%, 2.15%, 0.91%; 3个不同批号的试剂盒相比较, 差异变化较小。

[0058] 表4批间精密度检测结果

[0059]

批次 次数	第 1 批浓度 (%)	第 2 批浓度 (%)	第 3 批浓度 (%)
1	15.0	14.5	14.9
2	15.2	14.6	14.7
3	14.8	15.0	15.0
4	15.0	14.4	15.1
5	14.8	15.3	15.1
6	14.9	14.9	15.1
7	14.8	14.9	14.9
8	14.9	15.3	14.8
9	15.0	14.9	14.9
10	15.3	15.2	15.0

[0060] 实施例3

[0061] 相关性检测:选取40个血清样本,分别用已有的检测试剂盒作为参考方法与上述的偶联微球检测结果作为试验方法,二者进行相关分析,结果显示线性关系良好,检测结果如下:

[0062] 表5相关性检测结果

[0063]

编号	参考方法 浓度 (%)	试验方法 浓度 (%)	编号	参考方法 浓度 (%)	试验方法 浓度 (%)
1	15.7	15.6	21	1.5	1.5
2	7.8	7.8	22	1.3	1.6
3	4.6	4.7	23	0.9	0.5
4	11.6	11.7	24	1.4	1.7
5	8.7	8.7	25	8.2	7.3
6	6.1	5.9	26	1.5	1.9
7	10.0	10.1	27	3.7	4.5
8	11.7	11.8	28	6.6	5.5
9	16.9	18.1	29	2.8	2.9
10	18.7	18.0	30	11.6	11.8
11	12.1	12.1	31	0.6	0.9
12	23.3	23.3	32	2.8	2.2
13	8.6	8.1	33	1.1	1.8
14	4.5	5.2	34	20.9	20.9
15	14.7	20.6	35	3.5	3.4
16	11.9	13.3	36	0.8	0.5
17	1.5	1.4	37	2.4	2.9
18	15.7	15.9	38	2.6	2.3
19	14.4	14.2	39	2.4	2.5
20	7.8	7.2	40	0.5	0.6

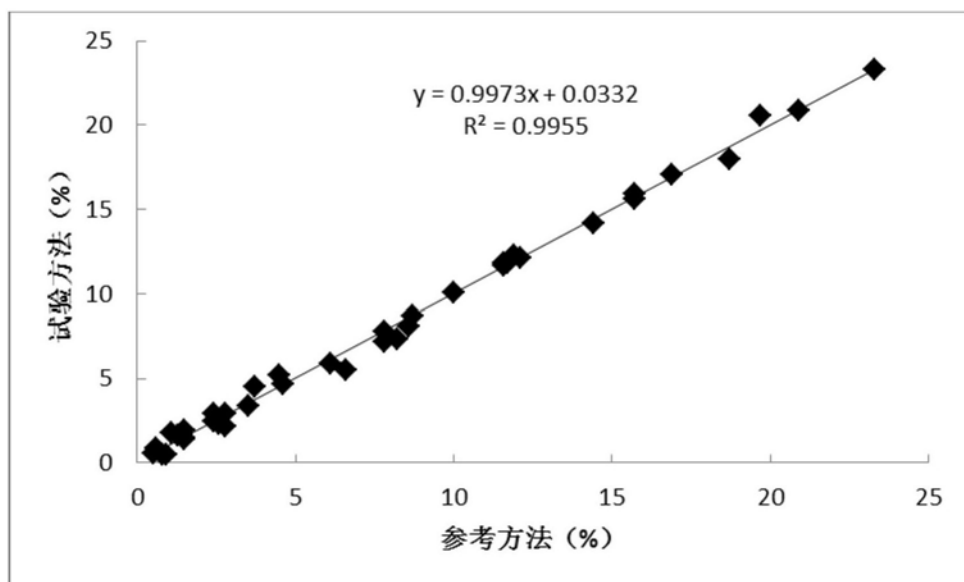


图1

专利名称(译)	一种羧基胶乳微球与糖化血红蛋白抗体的交联组合液及其交联方法		
公开(公告)号	CN107490677A	公开(公告)日	2017-12-19
申请号	CN2017110601082.9	申请日	2017-07-21
[标]申请(专利权)人(译)	王贤俊		
申请(专利权)人(译)	王贤俊		
当前申请(专利权)人(译)	王贤俊		
[标]发明人	王贤俊 何丹		
发明人	王贤俊 何丹		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/72 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54313 G01N33/721 G01N2333/805 G01N2800/042		
代理人(译)	曾建芳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种羧基胶乳微球与糖化血红蛋白抗体的交联组合液，其包括羊抗人糖化血红蛋白多克隆抗体、交联剂、活化液、清洗液、保存液，交联剂包括碳二亚胺与N-羟基琥珀酰亚胺，该交联组合液主要用于羧基胶乳微球与糖化血红蛋白抗体的交联过程。该交联组合液组成简单，价格低廉，可用于临床中常用的胶乳免疫比浊法检测试剂中的交联反应，且由该交联组合液经交联反应后制得的交联微球稳定性好，灵敏度高，抗干扰能力强。

