



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110146692 A

(43)申请公布日 2019.08.20

(21)申请号 201910449405.6

(22)申请日 2019.05.28

(71)申请人 迪瑞医疗科技股份有限公司
地址 130000 吉林省长春市高新区宜居路
3333号

(72)发明人 孟令敏 阚洪晶 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 李外

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

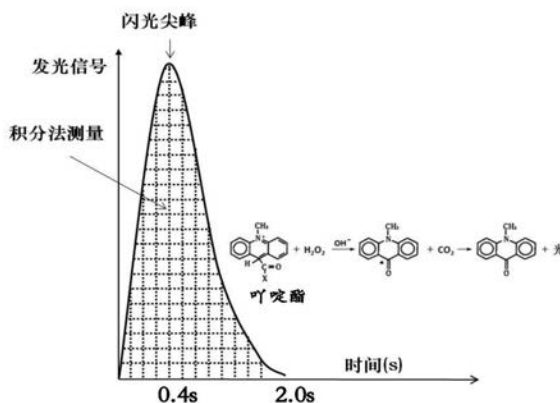
权利要求书3页 说明书36页 附图1页

(54)发明名称

一种基于吡啶酯化学发光、链霉亲和素磁珠-生物素放大反应体系及检测试剂盒

(57)摘要

本发明提供一种基于吡啶酯化学发光、链霉亲和素磁珠-生物素放大反应体系的检测试剂盒,同时还提供了该试剂盒的制备工艺及检测方法,属于体外诊断技术领域。该试剂盒的反应体系包括:吡啶酯标记的抗体或抗原、生物素标记的抗体或抗原、链霉亲和素包被带有羧基或者Tosyl官能团的磁珠,所述的磁珠粒径范围为0.1-5 μm。本发明通过采用不同粒径的磁珠共混或者添加链霉亲和素的方法以及将生物素标记物与链霉亲和素磁珠预混三种方案解决了免疫试剂生物素干扰的问题。本发明的试剂盒检测线性范围宽,线性拟合度>0.99,特异性好,灵敏度高,检测浓度低,抗生物素干扰能力高达100ng/mL以上。



1. 一种基于吡啶酯化学发光、链霉亲和素磁珠-生物素放大反应体系,其特征在于,包括:

吡啶酯标记的抗体或抗原、生物素标记的抗体或抗原、链霉亲和素包被带有羧基或者 Tosyl 官能团的磁珠;

所述的磁珠粒径为0.1-5 μm 。

2. 根据权利要求1所述的一种基于吡啶酯化学发光、链霉亲和素-生物素放大反应体系,其特征在于,所述的吡啶酯标记的抗体或抗原的制备方法,包括:

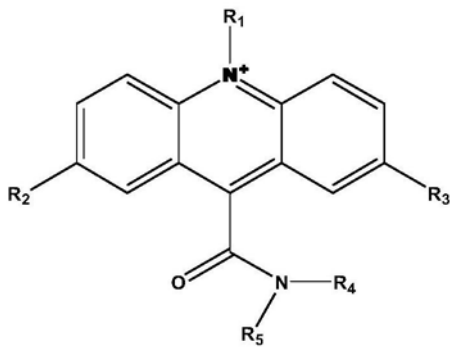
(1) 配备吡啶酯母液

取待标记的抗体或者抗原,标记前使用pH7.4 25mM的磷酸缓冲液替换抗体或者抗原自带的缓冲液,吡啶酯标记前先在无水N,N-二甲基甲酰胺中溶解成0.1~100mg/mL的吡啶酯母液;

(2) 吡啶酯标记

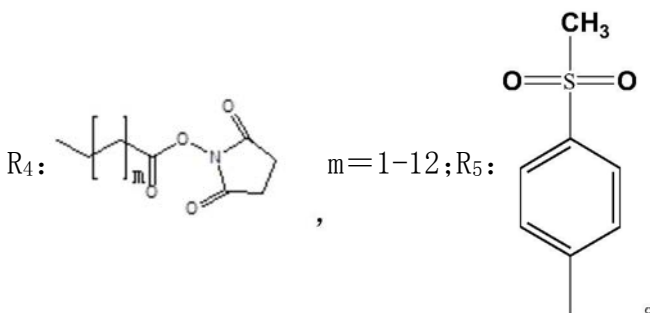
在避光条件下,取置换完缓冲液的抗体或者抗原和吡啶酯母液按照摩尔浓度1:(1-200)的比例进行标记,标记缓冲液为pH7.4 25mM的PB,在避光条件下悬混标记1-12小时,反应结束后纯化,得到吡啶酯标记的抗体或抗原;

所述的吡啶酯为N-羟基丁二酰亚胺-吡啶酯,结构式如式1所示:



式 1

式1中, R₁: ; R₂和R₃独立地选自:H或 中的一种,n=1-12;



3. 根据权利要求1所述的一种基于吡啶酯化学发光、链霉亲和素磁珠-生物素放大反应体系,其特征在于,所述的生物素标记的抗体或抗原的制备方法,包括:

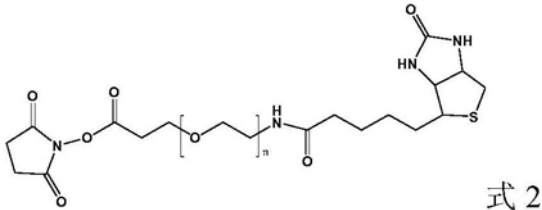
(1) 配制生物素母液

取待标记的抗体或者抗原,标记前使用pH7.4 25mM的磷酸缓冲液替换掉抗体或者抗原自带的缓冲液,生物素标记前先在无水N,N-二甲基甲酰胺中溶解成0.1~100mg/mL的生物素母液;

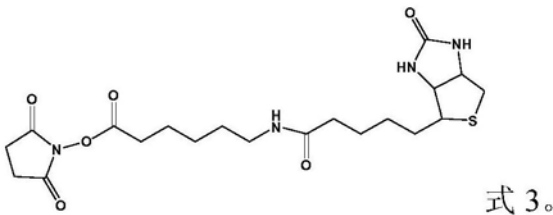
(2) 生物素标记

在避光条件下,取置换完缓冲液的抗体或者抗原和生物素母液按照摩尔浓度1:(1-200)的比例进行标记,标记缓冲液为pH7.4 25mM PB,在避光条件下悬混标记1-12小时,反应结束后纯化,得到生物素标记的抗体或抗原;

所述生物素的结构式如式2或者式3所示:



其中, $n=1-13$;



4. 根据权利要求1所述的一种基于吡啶酯化学发光、链霉亲和素磁珠-生物素放大反应体系,其特征在于,所述的链霉亲和素包被带有羧基或者Tosyl官能团的磁珠的制备方法,包括:

当磁珠为羧基磁珠时,该制备方法为:

将链霉亲和素溶解于2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液中,配成浓度1-10mg/mL的缓冲液,2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液pH值范围为5.5~6.7;

取羧基磁珠,使用2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液清洗,然后加入1-3-(二甲氨基-丙基)-3-乙基碳二甲氨基盐酸盐(EDC HCl)活化缓冲液活化,EDC HCl用量为磁珠质量的1%~100%,活化反应时间为5-60min,活化完成后移走上清液,加入链霉亲和素溶液,链霉亲和素用量为磁珠用量的0.1%~10%,磁珠在包被反应液中的浓度为1-50mg/mL,包被反应时间为1~24h,包被反应在室温条件下进行;

当磁珠为Tosyl官能团磁珠时,制备方法包括:

将链霉亲和素溶解于磷酸盐缓冲液中,配成浓度1-10mg/mL的缓冲液,磷酸盐缓冲液pH值范围为7.0~8.0;

取Tosyl官能团的磁珠,使用磷酸盐缓冲液清洗,然后加入磷酸盐缓冲液重悬,再加入链霉亲和素溶液和硫酸铵,在37°C条件下使用混匀器摇匀包被4-48h,磁珠在包被反应液中的浓度范围为1-50mg/mL,链霉亲和素用量为磁珠质量的0.1%~10%,硫酸铵的反应浓度范围为0.1~2.5mol/L。

5. 基于权利要求1所述的反应体系的检测试剂盒,其特征在于,命名为试剂盒A,该试剂盒A包括:

磁颗粒反应液 R_{a1} 、吡啶酯标记物反应液 R_{a2} 和生物素标记物反应液 R_{a3} ;

所述的磁颗粒反应液 R_{a1} 包括链霉亲和素磁珠1、链霉亲和素磁珠2、第一表面活性剂、氯化钠、第一缓冲液、第一防腐剂和第一蛋白稳定剂;

一种基于吖啶酯化学发光、链霉亲和素磁珠-生物素放大反应体系及检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于体外诊断技术领域,具体涉及一种基于吖啶酯化学发光、链霉亲和素磁珠-生物素放大反应体系的检测试剂盒,同时还提供了该试剂盒的制备工艺及检测方法。

背景技术

[0002] 免疫分析技术经历了酶免分析技术(EIA)、放射免疫分析技术(RIA)、荧光免疫分析技术(FIA)、时间分辨荧光免疫分析技术(TRFIA)和化学发光免疫分析技术(CLIA)几个阶段。其中,CLIA作为最先进的免疫分析技术,不仅自动化程度高、检测速度快,而且还具有较高的灵敏度和分析特异性。CLIA根据发光分子的不同,可以分为金刚烷体系、鲁米诺体系、异鲁米诺体系、钌联吡啶体系以及吖啶酯体系等。鲁米诺、金刚烷体系由于有酶的参与,易受环境pH值、温度等因素影响;钌联吡啶电化学发光体系对仪器设备的性能要求较高,对清洗条件要求苛刻;异鲁米诺较鲁米诺发光体系发光效率低;吖啶酯化学发光体系与其它化学发光体系比较,具有背景低、标记工艺简单、标记后光量子产率不减少、发光时间短、稳定性好等优点,目前广泛应用于体外诊断技术当中。

[0003] 吖啶酯在免疫化学发光分析中的应用始于1979年,当前应用于化学发光免疫分析的吖啶酯分为以雅培化学发光免疫试剂为代表的酰胺类吖啶酯和以西门子化学发光免疫试剂为代表的DMAE类两种,二者发光性能相近。吖啶酯化学发光为闪光型,在化学发光免疫分析领域与其它技术相比具有优势,吖啶酯化学发光在加入启动剂0.4s后发射光强度达到最大,半衰期为0.9s,2s内发光基本结束,可以实现快速检测。吖啶酯标记工艺简单,标记反应一步完成,发光过程只需要在碱性条件下,经过氢氧化氧化就可以直接发光,不需要其它发光催化剂。

[0004] 链霉亲和素是由链霉菌分泌的一种蛋白质,它能与生物素发生特异性结合,它们之间的结合力是目前已知的最强的非共价键结合力。因为这一特性,链霉亲和素-生物素反应体系在纯化和检测领域得到了广泛的应用。链霉亲和素以同源四聚体的形式存在,每摩尔的四聚体分子可结合四摩尔的生物素分子,所以在免疫检测领域具有信号放大作用。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种基于吖啶酯化学发光、链霉亲和素磁珠-生物素放大反应体系及检测试剂盒。该检测试剂盒具有较高的灵敏度和特异性。

[0006] 本发明首先提供一种基于吖啶酯化学发光、链霉亲和素磁珠-生物素放大反应体系,包括:

[0007] 吖啶酯标记的抗体或抗原、生物素标记的抗体或抗原、链霉亲和素包被带有羧基或者Tosyl官能团的磁珠;

[0008] 所述的磁珠粒径0.1-5 μm 。

[0009] 优选的是,所述的吖啶酯标记的抗体或抗原的制备方法,包括:

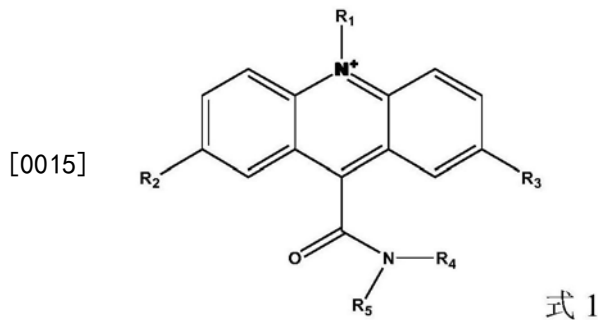
[0010] (1) 配备吡啶酯母液


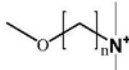
[0011] 取待标记的抗体或者抗原,标记前使用pH7.4 25mM的磷酸缓冲液(PB)替换抗体或者抗原自带的缓冲液,吡啶酯标记前先在无水N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中溶解成0.1~100mg/mL的吡啶酯母液;

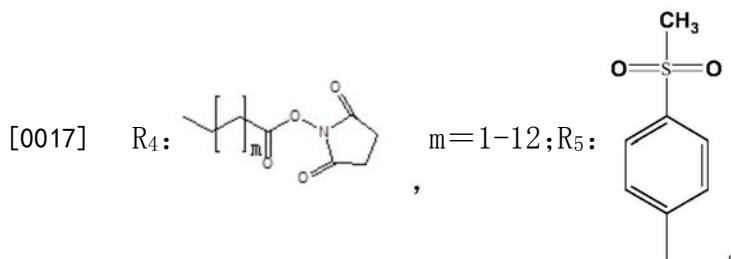
[0012] (2) 吡啶酯标记

[0013] 在避光条件下,取置换完缓冲液的抗体或者抗原和吡啶酯母液按照摩尔浓度1:(1-200)的比例进行标记,标记缓冲液为pH7.4 25mM的PB,在避光条件下悬混标记1-12小时,反应结束后纯化,得到吡啶酯标记的抗体或抗原;

[0014] 所述的吡啶酯为N-羟基丁二酰亚胺(NHS)-吡啶酯,结构式如式1所示:



[0016] 式1中, R_1 : ; R_2 和 R_3 独立地选自:H或、中的一种, $n = 1-12$;



[0018] 优选的是,所述的生物素标记的抗体或抗原的制备方法,包括:

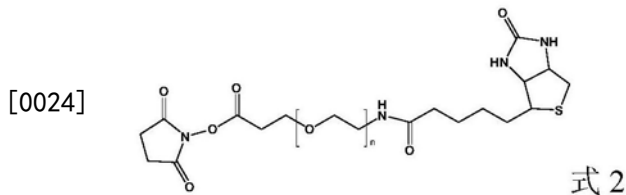
[0019] (1) 配制生物素母液

[0020] 取待标记的抗体或者抗原,标记前使用pH7.4 25mM的磷酸缓冲液(PB)替换掉抗体或者抗原自带的缓冲液,生物素标记前先在无水N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中溶解成0.1~100mg/mL的生物素母液;

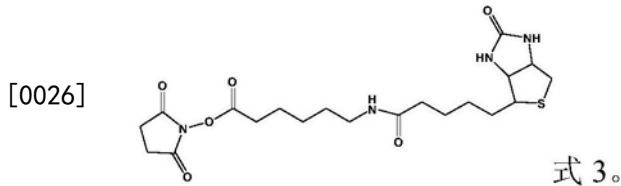
[0021] (2) 生物素标记

[0022] 在避光条件下,取置换完缓冲液的抗体或者抗原和生物素母液按照摩尔浓度1:(1-200)的比例进行标记,标记缓冲液为pH7.4 25mM PB,在避光条件下悬混标记1-12小时,反应结束后纯化,得到生物素标记的抗体或抗原;

[0023] 所述生物素的结构式如式2或者式3所示:



[0025] 其中, $n=1-13$,



[0027] 优选的是,所述的链霉亲和素包被带有羧基或者Tosyl官能团的磁珠的制备方法,包括:

[0028] 当磁珠为羧基磁珠时,该制备方法为:

[0029] 将链霉亲和素溶解于2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)缓冲液中,配成浓度1-10mg/mL的缓冲液,MES缓冲液pH值范围为5.5~6.7;

[0030] 取羧基磁珠,使用MES缓冲液清洗,然后加入EDC HCl活化缓冲液活化,EDC HCl用量为磁珠质量的1%~100%,活化反应时间为5-60min.,活化完成后移走上清液,加入链霉亲和素溶液,链霉亲和素用量为磁珠用量的0.1%~10%,磁珠在包被反应液中的浓度为1-50mg/mL,包被反应时间为1~24h,包被反应在室温条件下进行;

[0031] 当磁珠为Tosyl官能团磁珠时,制备方法包括:

[0032] 将链霉亲和素溶解于磷酸盐(PB)缓冲液中,配成浓度1-10mg/mL的缓冲液,PB缓冲液pH值范围为7.0~8.0;

[0033] 取Tosyl官能团的磁珠,使用PB缓冲液清洗,然后加入PB缓冲液重悬,再加入链霉亲和素溶液和硫酸铵,在37℃条件下使用混匀器摇匀包被4-48h,磁珠在包被反应液中的浓度范围为1-50mg/mL,链霉亲和素用量为磁珠质量的0.1%~10%,硫酸铵的反应浓度范围为0.1~2.5mol/L;

[0034] 所述的生物素标记的抗体或抗原与链霉亲和素磁珠的混合物中链霉亲和素磁珠的粒径为1~5μm;

[0035] 本发明提供一种基于上述反应体系的检测试剂盒,命名为试剂盒A,该试剂盒A包括:

[0036] 磁颗粒反应液R_{a1}、吡啶酯标记物反应液R_{a2}和生物素标记物反应液R_{a3};

[0037] 所述的磁颗粒反应液R_{a1}包括链霉亲和素磁珠1、链霉亲和素磁珠2、第一表面活性剂、氯化钠、第一缓冲液、第一防腐剂和第一蛋白稳定剂;

[0038] 或者包括:链霉亲和素磁珠1、第一表面活性剂、氯化钠、链霉亲和素、第一缓冲液、第一防腐剂和第一蛋白稳定剂;

[0039] 所述的链霉亲和素磁珠1的粒径为2.5~5μm,链霉亲和素磁珠2的粒径为0.1~2μm;

[0040] 所述的吡啶酯标记物反应液R_{a2}包含吡啶酯标记的抗体或抗原、氯化钠、第二缓冲液、第二防腐剂和第二表面活性剂和第二蛋白稳定剂;

[0041] 所述的生物素标记物反应液R_{a3}包含生物素标记的抗体或抗原、氯化钠、第三缓冲液、第三防腐剂、第三表面活性剂和第三蛋白稳定剂。

[0042] 本发明提供一种基于上述反应体系的检测试剂盒,命名为试剂盒B,该试剂盒B包括:

[0043] 磁颗粒反应液R_{b1}、吡啶酯标记物反应液R_{b2}和项目稀释液R_{b3};

[0044] 所述的磁颗粒反应液R_{b1}包含生物素标记的抗体或抗原与链霉亲和素磁珠的混合物、氯化钠、第一表面活性剂、第一缓冲液、第一防腐剂和第一蛋白稳定剂;

[0045] 所述的生物素标记的抗体或抗原与链霉亲和素磁珠的混合物中链霉亲和素磁珠的粒径为1~5 μm ;

[0046] 所述的吡啶酯标记物反应液R_{b2}包含吡啶酯标记的抗体或抗原、氯化钠、第二缓冲液、第二防腐剂、第二表面活性剂和第二蛋白稳定剂;

[0047] 所述的项目稀释液R_{b3}包含氯化钠、第三缓冲液、第三防腐剂、第三表面活性剂和第三蛋白稳定剂。

[0048] 优选的是,试剂盒A、B所述的第一缓冲液、第二缓冲液和第三缓冲液独立的选自2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)、哌嗪-NN-双(2-乙磺酸)(PIPES)、3-(N-吗啡基)-2-羟基丙磺酸钠(MOPSO)、Tris-盐酸或二(2-羟乙基)亚胺基三(羟甲基)甲烷(Bistris),缓冲范围为pH5.0-8.5,浓度为10-600mmol/L。

[0049] 优选的是,试剂盒A、B所述的第一防腐剂、第二防腐剂和第三防腐剂独立的选自NaN₃、Proclin 300或Proclin 950,质量浓度为0.01%-1%。

[0050] 优选的是,试剂盒A、B所述的第一表面活性剂、第二表面活性剂和第三表面活性剂独立的选自吐温、聚乙二醇、泊洛沙姆、曲拉通和氯化胆碱,质量浓度为0.01%-5%。

[0051] 优选的是,试剂盒A、B所述的第一蛋白稳定剂、第二蛋白稳定剂和第三蛋白稳定剂独立的选自牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白、牛血清Gamma球蛋白(BGG)、卵蛋白、鱼蛋白中的一种或几种,质量浓度为0.1%-10%。

[0052] 优选的是,所述的生物素标记的抗体或抗原与链霉亲和素磁珠3的混合物的制备方法,包括:

[0053] 取链霉亲和素磁珠3,使用PB pH7.4的缓冲液清洗,然后加入生物素标记的抗体或抗原,在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下预混5min.-18h,磁珠反应浓度范围为1-50mg/mL,预混反应液为磁珠保存液。

[0054] 本发明的原理

[0055] 吡啶酯化学发光动力学及化学发光原理详见图1,H₂O₂在吡啶酯C-9位发生亲电加成反应生成过氧化物,过氧化物经过渡态二氧乙烷酮分解成激发态的N-甲基吡啶酮和CO₂,前者返回到基态发出约 $\lambda=430\text{nm}$ 的光子。利用抗体和抗原之间特异性的免疫反应,使用化学发光分析仪分析吡啶酯发光信号,可以实现被测物的定量或者定性分析。

[0056] 生物素干扰一直是免疫检测试剂盒尤其是链霉亲和素-生物素体系免疫检测试剂盒亟欲解决的问题,门诊患者有超过7%的人服用生物素,约7.4%的患者血液样本生物素含量超过免疫检测试剂平台声称的生物素干扰免疫检测的最低阈值10ng/mL。本发明通过采用不同粒径的磁珠共混或者添加链霉亲和素的方法以及将生物素标记物与链霉亲和素磁珠预混三种方案减少因样本中的生物素与磁珠表面链霉亲和素结合占位而导致试剂检

测结果的出现偏差的问题。不同粒径的磁珠表面积和非特异性吸附能力不同。小粒径的磁珠表面积比大粒径的磁珠大,链霉亲和素蛋白载量更高,所以可以结合更多的生物素,从而可以降低因样本中生物素占位带来的干扰。但是小粒径的磁珠不易清洗,表面非特异性吸附更高,影响试剂的灵敏度。两种粒径的磁珠共混可达到最佳的试剂灵敏度和抗生物素干扰能力。对灵敏度要求不高的项目,适当添加链霉亲和素通过特定的反应流程设计,也可减少样本中的生物素干扰。生物素标记物与链霉亲和素磁珠预混体系因生物素反应物已经结合到磁珠表面,所以不会受到样本中的生物素干扰。

[0057] 本发明的有益效果

[0058] 本发明提供一种基于吡啶酯化学发光、链霉亲和素磁珠-生物素放大反应体系的检测试剂盒,同时还提供了该试剂盒的制备工艺及检测方法。通过采用不同粒径的磁珠共混或者添加链霉亲和素的方法以及将生物素标记物与链霉亲和素磁珠预混三种方案解决了免疫试剂生物素干扰的问题,本发明适用的样本类型有:疾病标志物、毒品、药品、病原微生物、环境污染物。本发明的试剂盒检测线性范围宽,线性拟合度 >0.99 ,特异性好,灵敏度高,检测浓度低,抗生物素干扰能力高达 100ng/mL 以上。试剂盒的测试原理可以是双抗体夹心法,双抗原夹心法、间接法、捕获法、竞争法、中和法,也可以是这些方法学之间的组合。根据吡啶酯发光强度(RLU)和被测物浓度的标准曲线,即可以实现被测物的定量或者定性分析。

附图说明

[0059] 图1为本发明吡啶酯化学发光动力学及化学发光原理示意图。

具体实施方式

[0060] 本发明首先提供一种基于吡啶酯化学发光、链霉亲和素磁珠-生物素放大反应体系,包括:

[0061] 吡啶酯标记的抗体或抗原、生物素标记的抗体或抗原、链霉亲和素包被带有羧基或者Tosyl官能团的磁珠;

[0062] 所述的磁珠粒径 $0.1\text{-}5\mu\text{m}$ 。

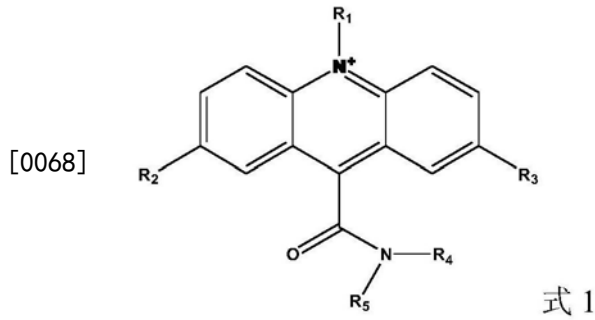
[0063] 按照本发明,所述的吡啶酯标记的抗体或抗原的制备方法,包括:(1) 配备吡啶酯母液

[0064] 取待标记的抗体或者抗原,标记前使用 $\text{pH}7.4$ 25mM 的磷酸缓冲液(PB)替换抗体或者抗原自带的缓冲液,吡啶酯标记前事先在无水 N,N -二甲基甲酰胺(DMF)中溶解成 $0.1\sim 100\text{mg/mL}$ 的吡啶酯母液;

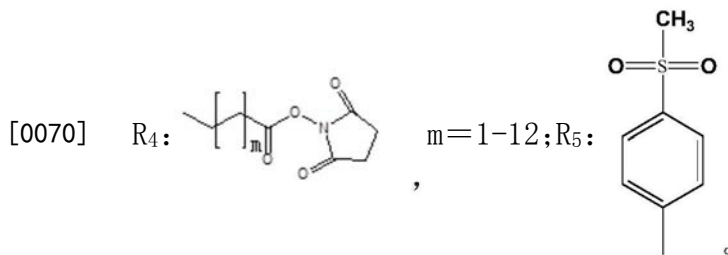
[0065] (2) 吡啶酯标记工艺

[0066] 在避光条件下,取置换完缓冲液的抗体或者抗原和吡啶酯母液按照摩尔浓度 $1:(1\text{-}200)$ 的比例进行标记,标记缓冲液为 $\text{pH}7.4$ 25mM 的PB,在避光条件下悬混标记 $1\text{-}12$ 小时,反应结束后使用AKTA纯化仪纯化,得到吡啶酯标记的抗体或抗原;

[0067] 所述的吡啶酯为DMAE类型吡啶酯,结构式如式1:



[0069] 式1中, R₁: ; R₂和R₃独立地选自:H和 中的一种, n=1-12;



[0071] 按照本发明,所述的生物素标记的抗体或抗原的制备方法,包括:

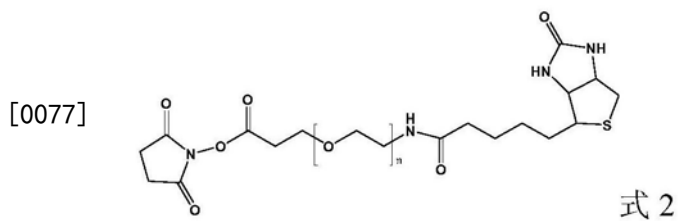
[0072] (1) 配制生物素母液

[0073] 取待标记的抗体或者抗原,标记前使用pH7.4 25mM的磷酸缓冲液(PB)替换掉抗体或者抗原自带的缓冲液,生物素标记前事先在无水N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中溶解成0.1~100mg/mL的生物素母液;

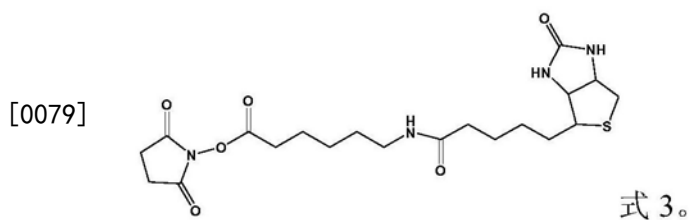
[0074] (2) 生物素标记工艺

[0075] 在避光条件下,取置换完缓冲液的抗体或者抗原和生物素母液按照摩尔浓度1:(1-200)的比例进行标记,标记缓冲液为pH7.4 25mM PB,在避光条件下悬混标记1-12小时,反应结束后使用AKTA纯化仪纯化,得到生物素标记的抗体或抗原;

[0076] 所述生物素的结构式如式2或者式3所示:



[0078] 其中, n=1-13;



[0080] 所述的链霉亲和素磁珠制备包括:

[0081] 按照本发明,所述的链霉亲和素包被带有羧基或者Tosyl官能团的磁珠的制备方

法,包括:

[0082] (1) 链霉亲和素包被羧基官能团磁珠

[0083] 将链霉亲和素溶解于10mM 2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)缓冲液中,配成浓度1-10mg/mL的缓冲液,MES缓冲液pH值范围为5.5~6.7;

[0084] 取羧基磁珠,使用10mM MES缓冲液清洗三次,然后加入EDC HCl活化缓冲液活化,EDC HCl在使用前事先在10mM MES缓冲液中配成浓度范围为0.01-50mg/mL的浓溶液,EDC HCl用量为磁珠质量的1%~100%,活化反应时间为5-60min.,活化完成后移走上清液,迅速加入链霉亲和素溶液,链霉亲和素用量为磁珠用量的0.1%~10%,磁珠在包被反应液中的浓度为1-50mg/mL,包被反应时间为1~24h,包被反应在室温条件下进行,反应过程使用混匀器混匀.反应结束后使用10mM MES缓冲液清洗三次,然后重悬至链霉亲和素磁珠保存液中保存。

[0085] 所述的磁珠保存液为25mM Tris,0.1%吐温,0.01%BSA,0.2%的NaN₃。

[0086] (2) 链霉亲和素包被Tosyl官能团磁珠

[0087] 将链霉亲和素溶解于10mM磷酸盐(PB)缓冲液中,配成浓度1-10mg/mL的缓冲液,PB缓冲液pH值范围为7.0~8.0。

[0088] 取Tosyl官能团的磁珠,使用10mM PB缓冲液清洗三次,然后加入适量PB缓冲液重悬,再加入适量链霉亲和素溶液和硫酸铵,在37℃条件下使用混匀器摇匀包被4-48h,硫酸铵事先溶解于10mM PB缓冲液中配成浓度范围为2-10mol/L的浓溶液,磁珠在包被反应液中的浓度范围为1-50mg/mL,链霉亲和素用量为磁珠质量的0.1%~10%,硫酸铵的反应浓度范围为0.1~2.5mol/L.反应结束后使用10mM PB缓冲液清洗三次,然后重悬至链霉亲和素磁珠保存液中保存。

[0089] 所述的磁珠保存液为25mM Tris,0.1%吐温,0.01%BSA,0.2%的NaN₃。

[0090] 本发明提供一种基于上述反应体系的检测试剂盒,命名为试剂盒A,该试剂盒A包括:

[0091] 磁颗粒反应液R_{a1}、吡啶酯标记物反应液R_{a2}和生物素标记物反应液R_{a3};

[0092] 所述的磁颗粒反应液R_{a1}包括链霉亲和素磁珠1、链霉亲和素磁珠2、第一表面活性剂、氯化钠、第一缓冲液、第一防腐剂和第一蛋白稳定剂;优选还包括阻断剂;

[0093] 或者包括:链霉亲和素磁珠1、第一表面活性剂、氯化钠、链霉亲和素、第一缓冲液、第一防腐剂和第一蛋白稳定剂;优选还包括阻断剂;

[0094] 所述的链霉亲和素磁珠1的粒径为2.5~5μm,链霉亲和素磁珠2的粒径为0.1~2μm;所述的链霉亲和素磁珠1和链霉亲和素磁珠2的质量浓度优选为0.03%-0.1%。

[0095] 所述的吡啶酯标记物反应液R_{a2}包含吡啶酯标记的抗体或抗原、氯化钠、第二缓冲液、第二防腐剂和第二表面活性剂和第二蛋白稳定剂;优选还包括血清和阻断剂;

[0096] 所述的生物素标记物反应液R_{a3}包含生物素标记的抗体或抗原、氯化钠、第三缓冲液、第三防腐剂和第三表面活性剂和第三蛋白稳定剂,优选还包括血清和阻断剂。

[0097] 按照本发明,所述的吡啶酯标记的抗体或抗原优选为吡啶酯标记的人附睾蛋白4(HE4)抗体或吡啶酯标记的细胞角蛋白19片段(CYFRA21-1)抗体,所述的吡啶酯标记的抗体浓度优选为0.1-3μg/mL。

[0098] 按照本发明,所述的生物素标记的抗体或抗原优选为生物素标记的人附睾蛋白4

(HE4) 抗体或生物素标记的细胞角蛋白19片段 (CYFRA21-1) 抗体, 所述的生物素标记的抗体浓度优选为0.5-8 μ g/mL。

[0099] 按照本发明, 所述的试剂盒A磁颗粒反应液 R_{a1} 中的链霉亲和素质量浓度优选为0.03%-0.1%。

[0100] 按照本发明, 试剂盒A所述NaCl含量优选为10-600mmol/L。

[0101] 按照本发明, 试剂盒A所述的第一缓冲液、第二缓冲液和第三缓冲液优选独立的选自2-(N-吗啡啉) 乙磺酸 (MES)、哌嗪-NN-双(2-乙磺酸) (PIPES)、3-(N-吗啡基)-2-羟基丙磺酸钠 (MOPSO)、Tris-盐酸或二(2-羟乙基) 亚胺基三(羟甲基) 甲烷 (Bistris), 缓冲范围为pH5.0-8.5, 浓度为10-600mmol/L, 更优选为25-400mmol/L。

[0102] 按照本发明, 试剂盒A所述的第一防腐剂、第二防腐剂和第三防腐剂优选 NaN_3 、Proclin300或Proclin 950, 质量浓度范围为0.01%-1%。

[0103] 按照本发明, 试剂盒A所述的第一表面活性剂、第二表面活性剂和第三表面活性剂优选吐温、聚乙二醇、泊洛沙姆、曲拉通和氯化胆碱, 质量浓度为0.01%-5%。

[0104] 按照本发明, 试剂盒A所述第一蛋白稳定剂、第二蛋白稳定剂和第三蛋白稳定剂优选为牛血清白蛋白 (BSA)、酪蛋白、牛血清Gamma球蛋白 (BGG)、卵蛋白、鱼蛋白中的一种或几种, 所述的蛋白稳定剂的质量浓度范围为0.1%-10%。

[0105] 按照本发明, 试剂盒A所述血清优选为牛血清、人血清、羊血清, 所述的血清质量浓度范围为1%-50%。

[0106] 按照本发明, 试剂盒A所述阻断剂可以使用鼠 IGG、或者罗氏、Scantibody、Meridian商品化的阻断剂, 阻断剂使用浓度范围优选为10-500 μ g/mL, 更优选为50-200 μ g/mL。

[0107] 按照本发明, 所述的试剂盒A的制备方法, 包括:

[0108] 步骤一: R_{a1} 反应液的制备

[0109] 将第一缓冲液、第一表面活性剂、第一防腐剂和第一蛋白稳定剂混合, 配制成 R_{a1} 基础缓冲液;

[0110] 取链霉亲和素磁珠1和链霉亲和素磁珠2, 用pH7.2的PBS缓冲液清洗, 然后将磁珠重悬至 R_{a1} 基础缓冲液中, 配成质量浓度0.03%-0.1%的 R_{a1} 反应液, 所述的PBS缓冲液包括20mmol/L PB与150mmol/L氯化钠;

[0111] 或者, 将第一缓冲液、第一表面活性剂、第一蛋白稳定剂、链霉亲和素、NaCl和第一防腐剂混合, 配制成 R_{a1} 基础缓冲液;

[0112] 取链霉亲和素磁珠磁珠1, 用pH7.2的PBS缓冲液清洗, 然后将磁珠重悬至 R_{a1} 基础缓冲液中, 配成质量浓度0.03%-0.1%的 R_{a1} 反应液。所述的PBS缓冲液包括20mmol/L PB与150mmol/L氯化钠;

[0113] 步骤二 R_{a2} 反应液的制备

[0114] 将氯化钠、第二蛋白稳定剂、第二缓冲液、第二防腐剂和第二表面活性剂混合, 配制成 R_{a2} 基础缓冲液;

[0115] 取吡啶酯标记的抗体置于 R_{a2} 基础缓冲液中, 配成浓度为0.1-3 μ g/mL的 R_{a2} 反应液;

[0116] 步骤三 R_{a3} 反应液的制备

[0117] 将氯化钠、第三蛋白稳定剂、第三缓冲液、第三防腐剂和第三表面活性剂混合, 配

制成R_{a3}基础缓冲液。

[0118] 取生物素标记的抗体置于R_{a3}基础缓冲液中,配成浓度0.5-8 μ g/mL的R_{a3}反应液。

[0119] 步骤四校准品的制备

[0120] 校准品的制备根据抗体或抗原的不同,按照本领域技术人员常规方法制备即可。

[0121] 按照本发明,所述的链霉亲和素磁珠1和链霉亲和素磁珠2的制备方法,包括

[0122] 将链霉亲和素溶解于10mM MES缓冲液中,配成浓度1-10mg/mL的缓冲液,MES缓冲液pH值为6.0。

[0123] 取适量羧基磁珠(羧基磁珠的粒径根据需要制备的磁珠1或磁珠2的粒径范围选择,选自2.5~5 μ m或0.1~2 μ m),使用10mM MES缓冲液清洗三次,然后加入EDC HCl活化缓冲液活化,EDC HCl在使用前事先在10mM MES缓冲液中配成浓度范围为0.01-50mg/mL的浓溶液,EDC HCl用量为磁珠质量的1%~100%,活化反应时间为5-60min.。活化完成后移走上清液,迅速加入

[0124] 链霉亲和素溶液,链霉亲和素用量为磁珠用量的0.1%~10%,磁珠在包被反应液中的浓度为1-50mg/mL,包被反应时间为1~24h,包被反应在室温条件下进行,反应过程使用混匀器混匀。反应结束后使用10mM MES缓冲液清洗三次,然后重悬至链霉亲和素磁珠保存液中保存。

[0125] 所述的磁珠保存液为25mM Tris,0.1%吐温,0.01%BSA,0.2%的NaN₃。

[0126] 本发明提供一种基于上述反应体系的检测试剂盒,命名为试剂盒B,该试剂盒B包括:

[0127] 磁颗粒反应液R_{b1}、吡啶酯标记物反应液R_{b2}和项目稀释液R_{b3};

[0128] 所述的磁颗粒反应液R_{b1}包含生物素标记的抗原与链霉亲和素磁珠3的混合物、氯化钠、第一表面活性剂、第一缓冲液、第一防腐剂和第一蛋白稳定剂;优选还包括血清和阻断剂;

[0129] 所述的生物素标记的抗原与链霉亲和素磁珠3的混合物中链霉亲和素磁珠3的粒径为1~5 μ m;

[0130] 所述的吡啶酯标记物反应液R_{b2}包含吡啶酯标记的抗体、氯化钠、第二缓冲液、第二防腐剂、第二表面活性剂和第二蛋白稳定剂;优选还包括血清和阻断剂;

[0131] 所述的项目稀释液R_{b3}包含氯化钠、第三缓冲液、第三防腐剂、第三表面活性剂和第三蛋白稳定剂,优选还包括血清和阻断剂。

[0132] 按照本发明,试剂盒B所述的生物素标记的抗原与链霉亲和素磁珠3的混合物优选为生物素标记的甲状腺素(T4)抗原与链霉亲和素磁珠3的混合物或者生物素标记的孕酮(P)抗原与链霉亲和素磁珠3的混合物,所述的生物素标记的抗原与链霉亲和素磁珠3的混合物质量浓度优选为0.03-0.1%。

[0133] 按照本发明,试剂盒B所述的吡啶酯标记的抗体优选为吡啶酯标记的甲状腺素(T4)抗体或吡啶酯标记的孕酮(P)抗体,所述的吡啶酯标记的抗体浓度优选为1-800ng/mL。

[0134] 按照本发明,试剂盒B所述的第一缓冲液、第二缓冲液和第三缓冲液优选独立的选自2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)、哌嗪-NN-双(2-乙磺酸)(PIPES)、3-(N-吗啡基)-2-羟基丙磺酸钠(MOPSO)、Tris-盐酸或二(2-羟乙基)亚胺基三(羟甲基)甲烷(BisTris),缓冲范围为pH5.0-8.5,更优选pH6.0-7.4,浓度为10-600mmol/L,更优选为25-400mmol/L。

[0135] 按照本发明,试剂盒B所述的第一防腐剂、第二防腐剂和第三防腐剂优选 NaN_3 、Proclin 300或Proclin 950,质量浓度范围为0.01%–1%。

[0136] 按照本发明,试剂盒B所述的第一表面活性剂、第二表面活性剂和第三表面活性剂优选吐温、聚乙二醇、泊洛沙姆、曲拉通和氯化胆碱,质量浓度为0.01%–5%。

[0137] 按照本发明,试剂盒B所述第一蛋白稳定剂、第二蛋白稳定剂和第三蛋白稳定剂优选为牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白、牛血清Gamma球蛋白(BGG)、卵蛋白、鱼蛋白中的一种或几种,所述的蛋白稳定剂的质量浓度范围为0.1%–10%。

[0138] 按照本发明,试剂盒B所述血清优选为牛血清、人血清、羊血清,所述的血清质量浓度范围为1%–50%。

[0139] 按照本发明,试剂盒B所述阻断剂可以使用鼠IGG、或者罗氏、Scantibody、Meridian商品化的阻断剂,阻断剂使用浓度范围优选为10–500 $\mu\text{g}/\text{mL}$,更优选为50–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0140] 按照本发明,所述的Rb1、Rb2和Rb3反应液中的氯化钠浓度优选为10–600 mmol/L 。

[0141] 按照本发明,所述的生物素标记的抗体或抗原与链霉亲和素磁珠3的混合物的制备方法,包括:

[0142] 步骤一:链霉亲和素磁珠3的制备

[0143] 将链霉亲和素溶解于PB缓冲液中,配成浓度1–10 mg/mL 的链霉亲和素缓冲液,PB缓冲液pH值范围为7.0~8.0。

[0144] 取Tosyl官能团的磁珠,磁珠的粒径为1~5 μm ,使用PB缓冲液清洗,然后加入适量PB缓冲液重悬,再加入链霉亲和素溶液和硫酸铵,在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下使用混匀器摇匀包被4–48h。硫酸铵事先溶解于10 mM PB缓冲液中配成浓度范围为2–10 mol/L 的浓溶液,磁珠在包被反应液中的浓度范围为1–50 mg/mL ,链霉亲和素用量为磁珠质量的0.1%~10%,硫酸铵的反应浓度范围为0.1~2.5 mol/L 。反应结束后使用PB缓冲液清洗,然后重悬至链霉亲和素磁珠保存液中保存。所述的磁珠保存液为25 mM Tris,0.1%吐温,0.2%的 NaN_3 。

[0145] 步骤二:生物素标记的抗体或抗原与链霉亲和素磁珠3预混

[0146] 取链霉亲和素磁珠3,使用PB pH7.4的缓冲液清洗,然后加入生物素标记的抗原,每毫克链霉亲和素磁珠3对应的生物素标记的抗原用量为20 ng ,在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下预混反应5min.–18h,磁珠反应浓度范围为1–50 mg/mL ,预混反应液为磁珠保存液。预混结束后,使用PB pH7.4的缓冲液清洗,然后在磁珠保存液中保存。所述的磁珠保存液优选为25 mM Tris,0.1%吐温,0.2%的 NaN_3 。

[0147] 按照本发明,所述的试剂盒B的制备方法如下:

[0148] 步骤一Rb1反应液的制备

[0149] 将第一缓冲液、氯化钠、第一蛋白稳定剂、第一防腐剂和第一表面活性剂混合,配制成Rb1基础缓冲液;

[0150] 将生物素标记的抗体或抗原与链霉亲和素磁珠3的混合物置于Rb1基础缓冲液中,配成磁珠浓度为0.03%–0.1%的Rb1反应液;

[0151] 步骤二Rb2反应液的制备

[0152] 将氯化钠、第二缓冲液、第二防腐剂、第二蛋白稳定剂和第二表面活性剂混合,配制成Rb2基础缓冲液;

[0153] 取吡啶酯标记的抗体或抗原置于R_{b2}基础缓冲液中,配成浓度为1-800ng/mL的R_{b2}反应液;

[0154] 步骤三R_{b3}反应液的制备

[0155] 将氯化钠、第三缓冲液、第三蛋白稳定剂、第三防腐剂 and 第三表面活性剂混合,配制成R_{b3}反应液;

[0156] 步骤四:校准品

[0157] 校准品的制备根据抗体或抗原的不同,按照本领域技术人员常规方法制备即可。

[0158] 本发明还提供上述两种试剂盒的检测方法,具体包括:

[0159] 方法1

[0160] 第一步,将样本、R_{a1} (R_{b1})、R_{a3} (R_{b3})、反应液顺序加入反应杯中,孵育0-25分钟;第二步加入清洗液清洗;第三步加入R_{a2} (R_{b2}) 孵育5-25分钟;第四步加入清洗液清洗;第五步将预激发液和激发液加入到反应混合物中,激发发光反应。采用化学发光分析仪测量产生的光量子数,样本中被测物的含量与光量子数成正比或者反比。

[0161] 方法2

[0162] 第一步,将样本、R_{a3} (R_{b3})、R_{a2} (R_{b2}) 反应液顺序加入反应杯中,孵育0-25分钟;第二步加入R_{a1} (R_{b1}) 孵育5-25分钟;第三步加入清洗液清洗;第四步将预激发液和激发液加入到反应混合物中,激发发光反应。采用化学发光分析仪测量产生的光量子数,样本中被测物的含量与光量子数成正比或者反比。

[0163] 方法3

[0164] 第一步,将样本、R_{a1} (R_{b1})、R_{a3} (R_{b3}) 反应液顺序加入反应杯中,孵育0-25分钟;第二步加入R_{a2} (R_{b2}) 孵育5-25分钟;第三步加入清洗液清洗;第四步将预激发液和激发液加入到反应混合物中,激发发光反应。采用化学发光分析仪测量产生的光量子数,样本中被测物的含量与光量子数成正比或者反比。

[0165] 方法4

[0166] 第一步,将样本、R_{a3} (R_{b3})、R_{a1} (R_{b1})、R_{a2} (R_{b2}) 反应液顺序加入反应杯中,孵育10-30分钟;第二步加入清洗液清洗;第三步将预激发液和激发液加入到反应混合物中,激发发光反应。采用化学发光分析仪测量产生的光量子数,样本中被测物的含量与光量子数成正比或者反比。

[0167] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细的描述。

[0168] 实施例1试剂盒A

[0169] 1.1试剂盒构成如下:

[0170]

反应液	配方
R _{a1}	链霉亲和素磁珠1, 粒径3 μ m, 质量百分比为0.05%; 链霉亲和素磁珠2, 粒径1 μ m, 质量百分比为0.05%; BSA, 质量百分比为0.1%; HEPES, 50mmol/L pH7.4; 吐温-20, 质量百分比为0.01%;

[0171]

	Proclin 300, 0.01%。
R _{a2}	吡啶酯标记的HE4鼠单克隆抗体, 浓度为0.2 μ g/mL; BGG, 质量百分比为0.5%; 氯化钠, 摩尔浓度为0.15mol/L; MES, 50mmol/L pH6.0; 小鼠IGG 200 μ g/mL; Scantibody阻断剂 100 μ g/mL; 吐温-20, 质量百分比为0.05%; Proclin 300, 0.04%。
R _{a3}	生物素标记的HE4鼠单克隆抗体, 浓度为1.4 μ g/mL; BSA, 质量百分比为1%; 氯化钠, 摩尔浓度为0.15mol/L; HEPES, 50mmol/L pH7.4; 氯化胆碱, 质量百分比为0.1%; Proclin 300, 0.05%。

[0172] 1.2试剂盒的制备方法

[0173] (1) R_{a1}反应液的制备

[0174] 链霉亲和素磁珠1和链霉亲和素磁珠2的制备具体为:

[0175] 取粒径分别为3 μ m和1 μ m Tosyl官能团的磁珠, 使用10mM PB缓冲液清洗三次, 然后加入PB缓冲液重悬, 再加入链霉亲和素溶液和硫酸铵, 在37 $^{\circ}$ C条件下使用混匀器摇匀包被24h, 硫酸铵事先溶解于10mM PB缓冲液中配成浓度范围为4mol/L的浓溶液, 磁珠在包被反应液中的浓度范围为20mg/mL, 链霉亲和素用量为磁珠质量的2%, 硫酸铵的反应浓度范围为1.6mol/L。反应结束后使用10mM PB缓冲液清洗三次, 然后重悬至链霉亲和素磁珠保存液中保存备用, 得到链霉亲和素磁珠1和链霉亲和素磁珠2;

[0176] 取链霉亲和素磁珠1和链霉亲和素磁珠2, 粒径分别为3 μ m和1 μ m, 用pH7.2的PBS缓冲液清洗三次, 然后将磁珠重悬至适量的R_{a1}基础缓冲液中(除磁珠之外的其它成分), 配成磁珠质量浓度0.1%的R_{a1}反应液。

[0177] (2) R_{a2}反应液的制备

[0178] a. 制备吡啶酯标记的HE4抗体:

[0179] 取适量HE4抗体, 与溶解于DMF中的吡啶酯(3mg/mL)按照摩尔浓度1:3的比例进行标记, 标记缓冲液为pH7.4PB(20mmol/L), 标记时间6h, 反应过程需要避光。标记反应结束后, 使用AKTA纯化仪(G25凝胶柱)纯化, 流速为3mL/min, 收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量, 定量浓度为256.1 μ g/mL。

[0180] b. 制备R_{a2}反应液:

[0181] 取适量吡啶酯标记的HE4抗体原液于R_{a2}基础缓冲液中, 配成HE4抗体浓度为0.2 μ g/mL的R_{a2}反应液。

[0182] (3) R_{a3}反应液的制备

[0183] a. 制备生物素标记的HE4抗体:

[0184] 取适量HE4抗体, 与溶解于DMF中的生物素(3mg/mL)按照摩尔浓度1:10的比例进行

标记,标记缓冲液为pH7.4PB (20mmol/L),标记时间3h,反应过程需要避光。标记反应结束后,使用AKTA纯化仪(G25凝胶柱)纯化,流速为3mL/min,收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量,定量浓度为213.6 μ g/mL。

[0185] b. 制备R_{a3}反应液:

[0186] 取适量生物素标记的HE4抗体原液于R_{a3}基础缓冲液中(除抗体外的其它成分),配成浓度为1.4 μ g/mL的R_{a3}反应液。

[0187] 1.3试剂盒的测试方法

[0188] 第一步,将30 μ L样本、60 μ L R_{a2}、60 μ L R_{a3}反应液顺序加入反应杯中,孵育10分钟;第二步,在反应杯中继续加入50 μ L R_{a1}反应液,孵育10分钟;第三步,加入清洗液,清洗五次;第四步,将预激发液和激发液加入到反应混合物中,激发发光反应,测量产生的光量子数。

[0189] 实施例1制备的HE4试剂盒的最低检测限参考表1,线性参考表2,重复性参考表3,与罗氏试剂临床相关性及生物素抗干扰数据参考表4。

[0190] 表1

使用一级校准品 A 及一级校准品 B 计算最低检测限		
测定次数	一级校准品 A	一级校准品 B
Rep1	902	56771
Rep2	954	56787
Rep3	1121	58346
Rep4	1221	一级校准品 A 浓度 0 pmol/L, 一级校准品 B 浓度 27.46 pmol/L
Rep5	1011	
Rep6	976	
Rep7	988	
Rep8	940	
Rep9	1303	
Rep10	976	
Rep11	942	
Rep12	1098	
Rep13	956	
Rep14	970	
Rep15	953	
Rep16	933	
Rep17	1263	
Rep18	970	
Rep19	994	
Rep20	1028	
测定均值	1025	57301
标准差 (SD)	115	/
均值+2SD	1256	/
最低检测限 (pmol/L)	0.11	

[0192] 表2

[0193]

稀释比例	L6	L5	L4	L3	L2	L1	相关系数 (r)
	0.01	0.02	0.1	0.2	0.6	1	
测定均值 浓度 (pmol/L)	15.56	30.92	133.93	310.77	1050.45	1799.13	0.999

[0194] 表3

测定次数	重复性样本 1 浓度 (pmol/L)	重复性样本 2 浓度 (pmol/L)
Rep1	106.64	1040.55
Rep2	104.22	1022.13
Rep3	104.86	1046.56
Rep4	105.14	1030.67
Rep5	110.56	1045.62
Rep6	111.35	1022.88
Rep7	109.23	1085.33
Rep8	105.69	1041.52
Rep9	108.44	1013.87
Rep10	111.39	1048.82
M (测定均值, pmol/L)	107.75	1039.80
SD	2.79	19.98
CV	2.59%	1.92%

[0195] 表4

[0197]

编号	罗氏测试结果浓度 (pmol/L)	迪瑞测试结果 (pmol/L)
1	17.63	27.52
2	24.05	27.26
3	31.1	37.93
4	38.51	39.48
5	39.69	39.24
6	43.75	43.14
7	44.61	56.42
8	49.59	49.73
9	59.34	62.31
10	68.81	72.04
11	79.13	118.14
12	104	111.87
13	130.2	125.78
14	138.7	197.62
15	157.7	152.1
16	164.3	173.5
17	179.1	198.88
18	191.6	195.08
19	216.4	242.83
20	238.6	229.44

21	251.8	298.35
22	289.9	304.07
23	309.6	312.29
24	397.9	356.69
25	412.8	473.9
26	499.5	482.22
27	516.6	542.36
28	588.4	715.82
29	628.1	610.79
30	673.9	670.29
31	710.7	623.28
32	777.3	717.99
33	800.5	878.51
34	810.8	896.9
[0198] 35	866.9	930.58
36	918.3	1084.54
37	968.8	1001.78
38	1075	1112.79
39	1163	1286.54
40	1207	1182.71
41	1249	1220.46
42	1289	1459.88
43	1370	1134.85
44	1422	1408.63
45	1421	1589.9
46	>1500	> 1800
47	>1500	> 1800
临床相关性 $r>0.987$		

[0199] 对比例1试剂盒A配方如下：

[0200]

反应液	配方
R _{a1}	链霉亲和素磁珠1，粒径3 μm ，质量百分比为0.1%； BSA，质量百分比为0.1%； HEPES，50mmol/L pH7.4； 吐温-20，质量百分比为0.01%； Proclin 300，0.01%。
R _{a2}	同实施例1。
R _{a3}	同实施例1。

[0201] 1.2试剂盒的制备方法

[0202] (1) R_{a1}反应液的制备

[0203] 取链霉亲和素磁珠1，粒径3 μm ，用pH7.2的PBS缓冲液清洗三次，然后将磁珠重悬至

适量的R_{a1}基础缓冲液中(除磁珠之外的其它成分),配成磁珠质量浓度0.1%的R_{a1}反应液。

[0204] (2) R_{a2}反应液的制备

[0205] 同实施例1。

[0206] (3) R_{a3}反应液的制备

[0207] 同实施例1。

[0208] 1.3试剂盒的测试方法

[0209] 同实施例1

[0210] 对比例1制备的HE4试剂盒的最低检测限参考表5,生物素抗干扰数据参考表6。

[0211] 表5

使用一级校准品 A 及一级校准品 B 计算最低检测限		
测定次数	一级校准品 A	一级校准品 B
Rep1	425	65491
Rep2	479	66321
Rep3	625	65634
Rep4	598	一级校准品 A 浓度 0 pmol/L, 一级校准品 B 浓度 27.46 pmol/L
Rep5	388	
Rep6	590	
Rep7	418	
Rep8	619	
Rep9	538	
Rep10	601	
Rep11	580	
Rep12	423	
Rep13	646	
Rep14	459	
Rep15	601	
Rep16	496	
Rep17	537	
Rep18	612	
Rep19	554	
Rep20	497	
测定均值	534	65815
标准差 (SD)	81	/
均值+2SD	695	/
最低检测限 (pmol/L)	0.07	

[0213] 对比例2试剂盒A配方如下:

[0214]

反应液	配方
R _{a1}	链霉亲和素磁珠2, 粒径1 μ m, 质量百分比为0.1%; BSA, 质量百分比为0.1%; HEPES, 50mmol/L pH7.4; 吐温-20, 质量百分比为0.01%; Proclin 300, 0.01%。
R _{a2}	同实施例1。
R _{a3}	同实施例1。

[0215] 1.2试剂盒的制备方法

[0216] (1) R_{a1}反应液的制备[0217] 取链霉亲和素磁珠2, 粒径1 μ m, 用pH7.2的PBS缓冲液清洗三次, 然后将磁珠重悬至适量的R_{a1}基础缓冲液中(除磁珠之外的其它成分), 配成磁珠质量浓度0.1%的R_{a1}反应液。[0218] (2) R_{a2}反应液的制备

[0219] 同实施例1。

[0220] (3) R_{a3}反应液的制备

[0221] 同实施例1。

[0222] 1.3试剂盒的测试方法

[0223] 同实施例1

[0224] 对比例2制备的HE4试剂盒的最低检测限参考表6, 生物素抗干扰数据参考表7。

[0225] 表6

使用一级校准品 A 及一级校准品 B 计算最低检测限			
测定次数	一级校准品 A	一级校准品 B	
Rep1	1499	68804	
Rep2	1624	67598	
Rep3	1881	69652	
Rep4	1691	一级校准品 A 浓度 0 pmol/L, 一级校准品 B 浓度 27.46 pmol/L	
Rep5	1768		
Rep6	1858		
Rep7	1703		
Rep8	1585		
Rep9	1770		
Rep10	1681		
Rep11	1292		
Rep12	1562		
Rep13	1902		
Rep14	1547		
Rep15	1671		
Rep16	1545		
Rep17	2107		
Rep18	1712		
Rep19	1920		
Rep20	1892		
测定均值	1711		68685
标准差 (SD)	185		/
均值+2SD	2081		/
最低检测限 (pmol/L)	0.15		

[0226] 表7

[0227]

实施例	样本a测值 (pmol/L)	样本b测值 (pmol/L)	偏差
实施例1	256.12	247.67	-3.3%
对比例1	246.10	201.53	-18.1%
对比例2	251.05	265.28	5.7%

[0228] 样本a:生物素干扰血清阴性;

[0229] 样本b:生物素干扰血清阳性,在样本a中添加生物素后制备成样本b,生物素含量100ng/mL。

[0230] 从本发明实施例1和对比例1和2的实验数据可以看出:实施例1在灵敏度和抗生物素干扰综合性能方面优于对比例1和2。可以说明:两种粒径的磁珠共混可以提升试剂盒的检出限和抗生物素干扰能力。

[0231] 实施例2试剂盒A

[0232] 1.1试剂盒构成如下:

[0234]

反应液	配方
R _{a1}	链霉亲和素磁珠1, 粒径2.8 μ m, 质量百分比为0.03%; 氯化钠, 摩尔浓度为0.15mol/L; 酪蛋白, 质量百分比为0.01% 聚乙二醇, 质量百分比为1%; Bistris, 100mmol/L pH6.5; 链霉亲和素, 100 μ g/mL; Meridian阻断剂 200 μ g/mL; Proclin 950, 0.05%。
R _{a2}	吡啶酯标记的CYFRA21-1鼠单克隆抗体, 浓度为1 μ g/mL; BGG, 质量百分比为0.01%; 氯化钠, 摩尔浓度为0.15mol/L; PB, 100mmol/L pH6.0; 曲拉通, 质量百分比为0.5%; Proclin 950, 0.05%。
R _{a3}	生物素标记的CYFRA21-1鼠单克隆抗体, 浓度为4 μ g/mL; BSA, 质量百分比为10%; 氯化钠, 摩尔浓度为600mmol/L; HEPES, 100mmol/L pH7.2; 曲拉通, 质量百分比为0.05%; NaN ₃ , 1%。

[0235] 1.2试剂盒的制备方法

[0236] (1) R_{a1}反应液的制备[0237] 取链霉亲和素磁珠1, 粒径2.8 μ m, 用pH7.2的PBS缓冲液清洗三次, 然后将磁珠重悬至适量的R_{a1}基础缓冲液中(除磁珠之外的其它成分), 配成质量浓度0.03%的R_{a1}反应液。[0238] (2) R_{a2}反应液的制备

[0239] a. 制备吡啶酯标记的CYFRA21-1抗体:

[0240] 取适量CYFRA21-1抗体, 与溶解于DMF中的吡啶酯(3mg/mL)按照摩尔浓度1:50的比例进行标记, 标记缓冲液为pH7.4 PB(20mmol/L), 标记时间12h, 反应过程需要避光。标记反应结束后, 使用AKTA纯化仪(G25凝胶柱)纯化, 流速为3mL/min, 收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量, 定量浓度为248.1 μ g/mL。[0241] b. 制备R_{a2}反应液:[0242] 取适量吡啶酯标记的CYFRA21-1抗体原液于R_{a2}基础缓冲液中, 配成CYFRA21-1抗体浓度为1 μ g/mL的R_{a2}反应液。[0243] (3) R_{a3}反应液的制备

[0244] a. 制备生物素标记的CYFRA21-1抗体:

[0245] 取适量CYFRA21-1抗体, 与溶解于DMF中的生物素(3mg/mL)按照摩尔浓度1:40的比例进行标记, 标记缓冲液为pH7.4PB(20mmol/L), 标记时间8h, 反应过程需要避光。标记反应结束后, 使用AKTA纯化仪(G25凝胶柱)纯化, 流速为3mL/min, 收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量, 定量浓度为278.6 μ g/mL。

[0246] b. 制备Ra3反应液:

[0247] 取适量生物素标记的CYFRA21-1抗体原液于Ra3基础缓冲液中(除抗体外的其它成分),配成浓度为4 μ g/mL的Ra3反应液。

[0248] 1.3试剂盒的测试方法

[0249] 第一步,将50 μ L样本、90 μ L Ra1、90 μ L Ra3反应液顺序加入反应杯中,孵育20分钟;第二步,在反应杯中继续加入70 μ L Ra2反应液,孵育5分钟;第三步,加入清洗液,清洗五次;第四步,将预激发液和激发液加入到反应混合物中,激发发光反应。测量产生的光量子数,样本中被测物的含量与光量子数成正比。

[0250] 实施例2制备的CYFRA21-1试剂盒的最低检测限参考表8,线性参考表9,重复性参考表10,与罗氏试剂临床相关性和生物素抗干扰能力参考表11。

[0251] 表8

使用一级校准品 A 及一级校准品 B 计算最低检测限		
测定次数	一级校准品 A	一级校准品 B
Rep1	627	5412
Rep2	542	5514
Rep3	654	5229
Rep4	585	一级校准品 A 浓度 0 ng/mL, 一级校准品 B 浓度 4.29 ng/mL
Rep5	590	
Rep6	678	
Rep7	623	
Rep8	548	
Rep9	898	
Rep10	574	
Rep11	567	
Rep12	610	
Rep13	517	
Rep14	531	
Rep15	543	
Rep16	570	
Rep17	539	
Rep18	640	
Rep19	650	
Rep20	617	
测定均值	605	5385
标准差 (SD)	82.94	/
均值+2SD	770.88	/
最低检出限(ng/mL)	0.15	

[0253] 表9

[0254]

稀释比例	L6	L5	L4	L3	L2	L1	相关系数(r)
	0.01	0.02	0.05	0.25	0.5	1.00	
测定均值 浓度	0.65	3.96	25.84	148.32	299.81	600.48	0.999

[0255]

(ng/mL)							
---------	--	--	--	--	--	--	--

[0256] 表10

测定次数	重复性样本 1 浓度 (ng/mL)	重复性样本 2 浓度 (ng/mL)
Rep1	5.72	91.38
Rep2	5.57	87.24
Rep3	5.77	90.3
Rep4	5.48	90.86
Rep5	5.47	89.02
Rep6	5.48	88.67
Rep7	5.69	90.37
Rep8	5.74	89.24
Rep9	5.65	89.35
Rep10	5.57	91.6
M (测定均值, ng/mL)	5.614	89.803
SD	0.12	1.35
CV	2.05%	1.50%

[0257]

[0258] 表11

[0259]

编号	罗氏测试结果 浓度 (ng/mL)	迪瑞测试结果 浓度 (ng/mL)
1	0.55	0.46
2	0.90	0.69
3	0.90	0.9
4	1.00	1.03
5	1.15	1.13
6	1.66	1.76
7	1.92	2.23
8	1.97	2.01
9	2.01	2.22
10	2.14	1.88
11	2.20	2.34
12	2.24	2.09
13	2.99	2.76
14	3.04	2.47
15	3.15	3.07
16	3.98	5.03
17	4.02	5.9
18	4.07	4.26
19	4.61	4.35
20	5.06	4.93
21	6.25	6.26
22	7.04	8.23
23	8.65	9.68
24	8.98	9.03
25	9.61	9.11

	26	9.71	9.26
	27	10.62	10.63
	28	11.95	12.63
	29	13.02	13.97
	30	14.92	13.33
	31	16.67	15.61
	32	22.83	23.79
	33	26.72	26.24
	34	34.26	33.86
[0260]	35	37.91	52.21
	36	42.16	40.74
	37	47.67	47.2
	38	60.58	78.96
	39	197.27	179.54
	40	223.90	208.13
	41	267.40	243.75
	42	386.53	391.26
	43	456.87	416.79
	44	>500	522.91
临床相关性 $r > 0.997$ 。			

[0261] 对比例3试剂盒A

[0262] 1.1试剂盒构成

[0263]

反应液	配方
R _{a1}	链霉亲和素磁珠1, 粒径2.8 μ m, 粒径质量百分比为0.03%; 氯化钠, 摩尔浓度为0.15mol/L; 酪蛋白, 质量百分比为0.01% 聚乙二醇, 质量百分比为1%; Bistris, 100mmol/L pH6.5; Meridian阻断剂 200 μ g/mL; Proclin 950, 0.05%。
R _{a2}	同实施例2
R _{a3}	同实施例2

[0264] 1.2试剂盒的制备方法

[0265] (1) R_{a1}反应液的制备

[0266] 取链霉亲和素磁珠1, 粒径2.8 μ m, 用pH7.2的PBS缓冲液清洗三次, 然后将磁珠重悬至适量的R_{a1}基础缓冲液中(除磁珠之外的其它成分), 配成质量浓度0.03%的R_{a1}反应液。

[0267] (2) R_{a2}反应液的制备

[0268] 同实施例2

[0269] (3) R_{a3}反应液的制备

[0270] 同实施例2

[0271] 1.3试剂盒的测试方法

[0272] 同实施例2

[0273] 对比例3制备的CYFRA21-1试剂盒的物素抗干扰能力参考表12。

[0274] 表12

[0275]

实施例	样本c测值 (ng/mL)	样本d测值 (ng/mL)	偏差
实施例2	190.01	185.02	-2.63%
对比例3	181.23	125.38	-30.8%

[0276] 样本c:生物素干扰血清阴性;

[0277] 样本d:生物素干扰血清阳性,在样本c中添加生物素制备成样本d,生物素含量100ng/mL。

[0278] 从本发明实施例2和对比例3的实验数据可以看出:实施例2的抗生物素干扰能力优于对比例3。说明在配方中适当添加链霉亲和素,可提升抗生物素干扰能力。

[0279] 实施例3试剂盒B

[0280] 1.1试剂盒构成

[0281]

反应液	配方
R _{b1}	生物素标记的T4与链霉亲和素磁珠3的混合物, 粒径1 μ m, 质量百分比为0.1%; 氯化钠, 摩尔浓度为10mmol/L; Tris, 25mmol/L pH7.4; 吐温, 质量百分比为0.01%; 卵蛋白, 质量百分比为0.1%; Proclin 950, 0.2%。
R _{b2}	吡啶酯标记的T4鼠单克隆抗体, 浓度为0.2 μ g/mL; 氯化钠, 摩尔浓度为0.15mol/L; PB, 50mmol/L pH6.0; 卵蛋白, 质量百分比为0.1%; 曲拉通, 质量百分比为0.05%; Proclin 950, 0.05%。
R _{b3}	氯化钠, 摩尔浓度为0.15mol/L; Bistris, 400mmol/L pH7.0; 吐温, 质量百分比为1%; 卵蛋白, 质量百分比为0.1%; 氯化胆碱, 质量百分比为0.05%; Proclin 950, 0.05%。

[0282] 1.2试剂盒的制备方法

[0283] (1) R_{b1}反应液的制备

[0284] 链霉亲和素磁珠3制备方法

[0285] 将链霉亲和素溶解于10mM磷酸盐 (PB) 缓冲液中, 配成浓度2mg/mL的链霉亲和素缓冲液, PB缓冲液pH值为7.4。

[0286] 取适量Tosyl官能团的磁珠3, 粒径1 μ m, 使用10mM PB缓冲液清洗三次, 然后加入适量PB缓冲液重悬, 再加入链霉亲和素缓冲液和硫酸铵, 在37 $^{\circ}$ C条件下使用混匀器摇匀包被

4h。硫酸铵事先溶解于10mM PB缓冲液中配成浓度范围为4mol/L的浓溶液,磁珠在包被反应液中的浓度范围为20mg/mL,链霉亲和素用量为磁珠质量的2%,硫酸铵的反应浓度范围为1.6mol/L。反应结束后使用10mM PB缓冲液清洗三次,然后重悬至链霉亲和素磁珠保存液中保存。

[0287] 所述的磁珠保存液为25mM Tris,0.1%吐温,0.2%的NaN₃。

[0288] 链霉亲和素磁珠3与生物素标记T4抗体的混合物制备

[0289] 取链霉亲和素磁珠3,使用10mM PB pH7.4的缓冲液清洗三次,然后加入生物素标记T4抗体,在37℃条件下预混20min.,磁珠反应浓度为20mg/mL,每毫克链霉亲和素磁珠用生物素用量为20ng。预混结束后,使用10mM PB pH7.4的缓冲液清洗三次,然后在磁珠保存液中保存。

[0290] 所述的磁珠保存液为25mM Tris,0.1%吐温,0.2%的NaN₃。

[0291] 使用时,取生物素标记的T4抗体与链霉亲和素磁珠3的混合物,用pH7.2的PBS缓冲液清洗三次,然后将磁珠重悬至适量的R_b1基础缓冲液中(除磁珠之外的其它成分),配成质量浓度0.1%的R_b1反应液。

[0292] (2) R_b2反应液的制备

[0293] a. 制备吡啶酯标记的T4抗体:

[0294] 取适量T4抗体,与溶解于DMF中的吡啶酯(3mg/mL)按照摩尔浓度1:100的比例进行标记,标记缓冲液为pH7.4PB(20mmol/L),标记时间2h,反应过程需要避光。标记反应结束后,使用AKTA纯化仪(G25凝胶柱)纯化,流速为3mL/min,收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量,定量浓度为281.5μg/mL。

[0295] b. 制备R_b2反应液:

[0296] 取适量吡啶酯标记的T4抗体原液于R_b2基础缓冲液中,配成T4抗体浓度为50ng/mL的R_b2反应液。

[0297] (3) R_b3反应液的制备

[0298] 按照R_b3反应液配方进行配制。

[0299] 1.3试剂盒的测试方法

[0300] 第一步,将100μL样本、70μL R_b3、50μL R_b1、70μL R_b2反应液顺序加入反应杯中,孵育30分钟;第二步,加入清洗液,清洗五次;第三步,将预激发液和激发液加入到反应混合物中,激发发光反应。采用化学发光分析仪测量产生的光量子数,样本中被测物的含量与光量子数成反比。

[0301] 实施例3制备的FT4试剂盒的最低检测限参考表13,线性参考表14,重复性参考表15,与西门子试剂临床相关性参考表16。

[0302] 表13

使用一级校准品 A 及一级校准品 B 计算最低检测限		
测定次数	一级校准品 A	一级校准品 B
Rep1	3980312	1225924
Rep2	4048820	1207846
Rep3	3958040	1182840
Rep4	4012108	一级校准品 A 浓度 0 ng/dL, 一级校准品 B 浓度 0.77 ng/dL
Rep5	4066027	
Rep6	3971346	
Rep7	4008324	
Rep8	3978501	
Rep9	4116980	
Rep10	4206857	
Rep11	4138702	
Rep12	4122103	
Rep13	4119076	

Rep14	4090354	一级校准品 A 浓度 0 ng/dL, 一级校准品 B 浓度 0.77 ng/dL	
Rep15	4054783		
Rep16	4048051		
Rep17	4030294		
Rep18	4051367		
Rep19	4064271		
Rep20	4086857		
测定均值	4057659		1216885
标准差 (SD)	63828		/
均值-2SD	3930003		/
最低检测限 (ng/dL)	0.03		

[0305] 表14

[0306]

稀释比例	L7	L6	L5	L4	L3	L2	L1	相关系数 (r)
	1.00	0.75	0.50	0.30	0.10	0.05	0.001	
测定均值 (ng/dL)	12.66	9.71	6.63	3.75	1.49	0.72	0.01	0.999

[0307] 表15

测定次数	重复性样本 1 浓度 (ng/dL)	重复性样本 2 浓度 (ng/dL)
Rep1	0.71	9.27
Rep2	0.72	9.34
Rep3	0.72	8.98
Rep4	0.70	9.49
Rep5	0.72	9.30
Rep6	0.71	9.58
Rep7	0.70	9.44
Rep8	0.71	9.46
Rep9	0.72	9.30
Rep10	0.71	9.50
M (ng/dL, 测定均值)	0.71	9.37
SD	0.01	0.17
CV	1.11%	1.78%

[0309] 表16

编号	罗氏测试结果 浓度 (ng/dL)	迪瑞测试结果 浓度 (ng/dL)
1	0.73	0.62
2	0.89	0.86
3	0.96	0.94
4	1.04	1.05
5	1.20	1.27
6	1.26	1.19
7	1.28	1.20
8	1.30	1.18
9	1.31	1.25

[0310]

[0311]

10	1.31	1.19
11	1.32	1.24
12	1.33	1.16
13	1.34	1.30
14	1.34	1.39
15	1.35	1.36
16	1.37	1.29
17	1.38	1.39
18	1.39	1.39
19	1.44	1.34
20	1.46	1.44
21	1.49	1.33
22	1.52	1.47
23	1.57	1.62
24	1.60	1.42
25	1.69	1.66
26	1.71	1.68
27	1.78	1.79
28	1.91	1.87
29	1.98	1.96
30	2.01	2.06
31	2.56	2.73
32	2.77	2.99
33	3.38	3.51
34	4.10	4.43
35	4.51	5.05
36	7.12	7.38
37	7.75	7.73
38	8.16	7.98
39	8.36	8.59
40	8.89	9.01
41	9.49	9.56
42	10.23	10.25
43	10.98	10.87
44	11.56	11.67
45	11.96	>12
临床相关性 $r > 0.998$ 。		

[0312] 对比例4试剂盒B

[0313] 1.1试剂盒构成

[0314]

反应液	配方
R _{b1}	链霉亲和素磁珠3, 粒径1 μ m, 质量百分比为0.1%; 氯化钠, 摩尔浓度为10mmol/L; Tris, 25mmol/L pH7.4; 卵蛋白, 质量百分比为0.1%;

[0315]

	吐温, 质量百分比为0.01%; Proclin 950, 0.2%。
R _{b2}	同实施例3
R _{b3}	T4生物素衍生物, 浓度50ng/mL 卵蛋白, 质量百分比为0.1%; 氯化钠, 摩尔浓度为0.15mol/L; Bistris, 400mmol/L pH7.0; 吐温, 质量百分比为1%; Proclin 950, 0.05%。

[0316] 1.2试剂盒的制备方法

[0317] (1) R_{b1}反应液的制备

[0318] 取链霉亲和素磁珠3, 用pH7.2的PBS缓冲液清洗三次, 然后将磁珠重悬至适量的R_{b1}基础缓冲液中(除磁珠之外的其它成分), 配成质量浓度0.1%的R_{b1}反应液。

[0319] (2) R_{b2}反应液的制备

[0320] 同实施例3。

[0321] (3) R_{b3}反应液的制备[0322] 按照R_{b3}反应液配方进行配制。

[0323] 1.3试剂盒的测试方法

[0324] 同实施例3。

[0325] 对比例4制备的FT4试剂盒的生物素抗干扰能力与实施例3对比参考表17。

[0326] 表17

[0327]

实施例	样本e测值 (ng/dL)	样本f测值 (ng/dL)	偏差
实施例3	4.87	4.79	-1.7%
对比例4	4.95	5.87	18.6%

[0328] 样本e:生物素干扰血清阴性;

[0329] 样本f:生物素干扰血清阳性, 在样本e中添加生物素制备样本f, 生物素含量100ng/mL。

[0330] 从本发明实施例3和对比例4的实验数据可以看出:实施例3生物素标记物与链霉亲和素磁珠预混体系生物素抗干扰能力优于非预混体系对比例4。

[0331] 实施例4试剂盒B

[0332] 1.1试剂盒构成

[0333]

反应液	配方
R _{b1}	生物素标记的P与链霉亲和素磁珠3的混合物，粒径为3 μ m，质量百分比为0.05%； 氯化钠，摩尔浓度为0.15mol/L； PIPES，50mmol/L pH7.2； 鱼蛋白，质量百分比为0.05%； 吐温，质量百分比为0.02%； Proclin 900，0.01%。
R _{b2}	吡啶酯标记的P单克隆抗体，浓度为300ng/mL； 氯化钠，摩尔浓度为0.15mol/L； 鱼蛋白，质量百分比为0.05%； MES，50mmol/L pH6.0； 聚乙二醇，质量百分比为1%； Proclin 300，0.04%。

[0334]

R _{b3}	氯化钠，摩尔浓度为0.15mol/L； PIPES，50mmol/L pH6.8； 鱼蛋白，质量百分比为0.05%； 吐温，质量百分比为0.05%； NaN ₃ ，0.2%。
-----------------	--

[0335] 1.2试剂盒的制备方法

[0336] (1) R_{b1}反应液的制备

[0337] 链霉亲和素磁珠3制备方法

[0338] 将链霉亲和素溶解于10mM磷酸盐 (PB) 缓冲液中，配成浓度2mg/mL的链霉亲和素缓冲液，PB缓冲液pH值为7.4。

[0339] 取适量Tosyl官能团的磁珠，粒径3 μ m，使用10mM PB缓冲液清洗三次，然后加入适量PB缓冲液重悬，再加入适量链霉亲和素缓冲液和硫酸铵，在37 $^{\circ}$ C条件下使用混匀器摇匀包被18h。硫酸铵事先溶解于10mM PB缓冲液中配成浓度范围为6mol/L的浓溶液，磁珠在包被反应液中的浓度范围为40mg/mL，链霉亲和素用量为磁珠质量的4%，硫酸铵的反应浓度范围为1.8mol/L。反应结束后使用10mM PB缓冲液清洗三次，然后重悬至链霉亲和素磁珠保存液中保存。

[0340] 所述的磁珠保存液为25mM Tris,0.1%吐温,0.2%的NaN₃。

[0341] 链霉亲和素磁珠3与生物素标记的P抗体混合物制备

[0342] 取适量链霉亲和素磁珠3，使用10mM PB pH7.4的缓冲液清洗三次，然后加入生物素标记的P抗体，在37 $^{\circ}$ C条件下预混20min.，磁珠反应浓度为20mg/mL，每毫克链霉亲和素磁珠3生物素用量为100ng。预混结束后，使用10mM PB pH7.4的缓冲液清洗三次，然后在磁珠保存液中保存。

[0343] 所述的磁珠保存液为25mM Tris,0.1%吐温,0.1%BSA,0.2%的NaN₃。

[0344] 使用时，取适量生物素标记的P抗体与链霉亲和素磁珠3的混合物，用pH7.2的PBS缓冲液清洗三次，然后将磁珠重悬至适量的R_{b1}基础缓冲液中(除磁珠之外的其它成分)，配成质量浓度0.05%的R_{b1}反应液。

[0345] (2) R_{b2}反应液的制备

[0346] a. 制备吡啶酯标记的P抗体

[0347] 取适量P抗体,与溶解于DMF中的吡啶酯(3mg/mL)按照摩尔浓度1:1的比例进行标记,标记缓冲液为pH7.4 PB(20mmol/L),标记时间12h,反应过程需要避光。标记反应结束后,使用AKTA纯化仪(G25凝胶柱)纯化,流速为3mL/min,收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量,定量浓度为268.5μg/mL。

[0348] b. 制备R_{b2}反应液

[0349] 取适量吡啶酯标记的P抗体原液于R_{b2}基础缓冲液中,配成P抗体浓度为300ng/mL的R_{b2}反应液。

[0350] (3) R_{b3}反应液的制备

[0351] 按照R_{b3}反应液配方进行配制。

[0352] 1.3试剂盒的测试方法

[0353] 第一步,将50μL样本、50μL R_{b2}反应液顺序加入反应杯中,孵育10分钟,第二步在反应杯中加入50μL R_{b3}、50μL R_{b1}反应液,孵育10分钟;第三步,加入清洗液,清洗五次;第四步,将预激发液和激发液加入到反应混合物中,激发发光反应。采用化学发光分析仪测量产生的光量子数,样本中被测物的含量与光量子数成反比。

[0354] 实施例4制备的P试剂盒的最低检测限参考表18,线性参考表19,重复性参考表20,与罗氏试剂临床相关性参考表21。

[0355] 表18

使用一级校准品 A 及一级校准品 B 计算最低检测限		
测定次数	一级校准品 A	一级校准品 B
Rep1	889916	574373
Rep2	904662	497915
Rep3	825996	503872
Rep4	875698	一级校准品 A 浓度 0 ng/mL, 一级校准品 B 浓度 0.67ng/mL
Rep5	897569	
Rep6	867945	
Rep7	834978	
Rep8	887637	
Rep9	894671	
Rep10	819876	
Rep11	904567	
Rep12	978654	
Rep13	844987	
Rep14	894856	
Rep15	887598	
Rep16	825697	
Rep17	875623	
Rep18	846976	
Rep19	896752	
Rep20	897564	
测定均值	877611	525387
标准差 (SD)	37265	/
均值-2SD	803081	/
最低检测限 (ng/mL)	0.14	

[0357] 表19

[0358]

稀释比例	L7	L6	L5	L4	L3	L2	L1	相关系数 (r)
	1.00	0.50	0.25	0.10	0.02	0.01	0.003	
测定均值 (ng/mL)	59.98	30.81	14.65	5.46	1.09	0.48	0.15	0.999

[0359] 表20

测定次数	重复性样本 1 浓度 (ng/mL)	重复性样本 2 浓度 (ng/mL)
Rep1	3.24	20.28
Rep2	3.13	20.96
Rep3	3.02	21.02
Rep4	3.06	21.35

[0360]

[0361]

Rep5	3.13	20.91
Rep6	3.15	21.23
Rep7	3.09	20.45
Rep8	3.18	21.06
Rep9	3.05	20.98
Rep10	3.12	20.57
M (ng/mL, 测定均值)	3.12	20.88
SD	0.065	0.342
CV	2.10%	1.64%

[0362] 表21

[0363]

编号	罗氏测试结果 浓度 (ng/mL)	迪瑞测试结果 浓度 (ng/mL)
1	<0.05	0.51
2	0.05	0.18
3	0.10	0.28
4	0.06	0.29
5	0.08	0.35
6	0.09	0.36
7	0.13	0.38
8	0.20	0.39
9	0.06	0.40
10	0.21	0.40
11	0.24	0.41
12	0.10	0.49
13	0.31	0.63
14	0.15	0.95
15	2.12	2.64
16	2.43	2.67
17	3.17	3.95
18	3.60	4.65
19	8.06	9.02
20	10.49	11.30
21	10.07	12.58
22	9.90	13.40
23	9.96	13.42
24	9.76	13.53
25	9.41	14.00
26	14.21	14.44
27	9.63	14.57
28	9.78	14.68
29	10.26	14.75
30	9.61	15.11
31	12.91	16.49
32	13.00	17.81
33	11.27	18.05

	34	17.10	18.43
	35	12.88	18.91
	36	14.51	18.95
	37	17.63	23.38
	38	27.91	26.09
	39	30.29	31.04
[0364]	40	27.63	32.02
	41	41.01	35.92
	42	49.86	52.46
	43	53.08	56.71
	44	>60	68.11
	45	>60	71.99
临床相关性 $r > 0.983$			

[0365] 对比例5试剂盒B

[0366] 1.1试剂盒构成

[0367]

反应液	配方
R _{b1}	链霉亲和素磁珠3, 粒径4.5 μ m, 质量百分比为0.05%; 氯化钠, 摩尔浓度为0.15mol/L; 鱼蛋白, 质量百分比为0.05%; PIPES, 50mmol/L pH7.2; 吐温, 质量百分比为0.02%; Proclin 900, 0.01%。
R _{b2}	同实施例4
R _{b3}	P生物素衍生物, 浓度150ng/mL; 氯化钠, 摩尔浓度为0.15mol/L; 鱼蛋白, 质量百分比为0.05%; PIPES, 50mmol/L pH6.8; 吐温, 质量百分比为0.05%; NaN ₃ , 0.2%。

[0368] 1.2试剂盒的制备方法

[0369] (1) R_{b1}反应液的制备

[0370] 取链霉亲和素磁珠3, 用pH7.2的PBS缓冲液清洗三次, 然后将磁珠重悬至适量的R_{b1}基础缓冲液中(除磁珠之外的其它成分), 配成质量浓度0.05%的R_{b1}反应液。

[0371] (2) R_{b2}反应液的制备

[0372] 同实施例4

[0373] (3) R_{b3}反应液的制备

[0374] 按照R_{b3}反应液配方进行配制。

[0375] 1.3试剂盒的测试方法

[0376] 同实施例4

[0377] 对比例5制备的P试剂盒的生物素抗干扰数据与实施例4对比参考表22。

[0378] 表22

[0379]

实施例	样本 g 测值 (ng/mL)	样本 h 测值 (ng/mL)	偏差
实施例 4	9.56	9.78	2.3%

[0380]

对比例 5	9.89	11.97	21.0%
-------	------	-------	-------

[0381] 样本g:生物素干扰血清阴性;

[0382] 样本h:生物素干扰血清阳性,在样本g中添加生物素制备样本h,生物素含量100ng/mL。

[0383] 从本发明实施例4和对比例5的实验数据可以看出:实施例四生物素标记物与链霉亲和素磁珠预混体系生物素抗干扰能力优于非预混体系对比例5。

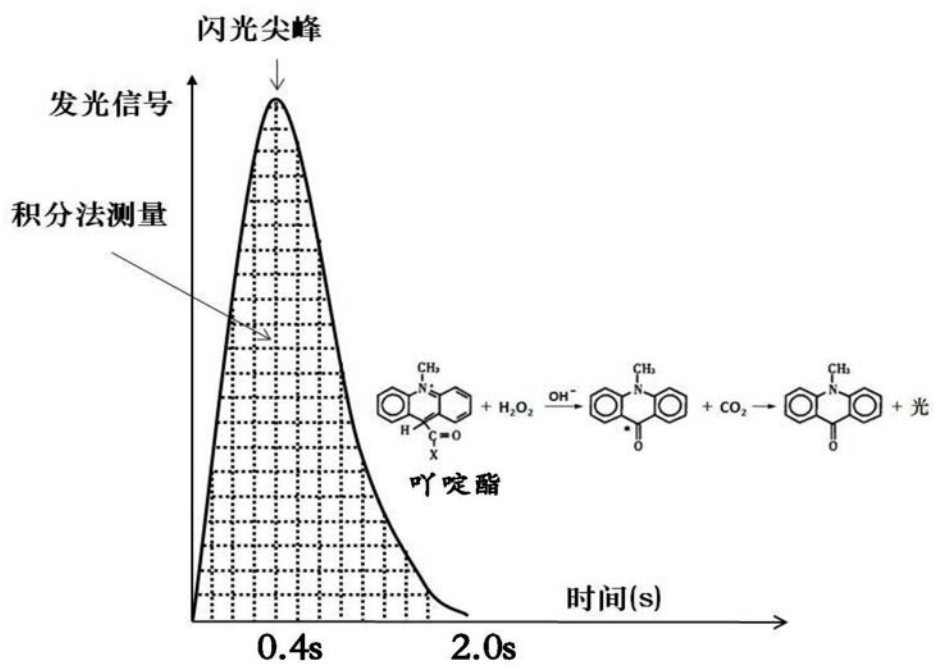


图1

专利名称(译)	一种基于吡啶酯化学发光、链霉亲和素磁珠-生物素放大反应体系及检测试剂盒		
公开(公告)号	CN110146692A	公开(公告)日	2019-08-20
申请号	CN201910449405.6	申请日	2019-05-28
[标]发明人	孟令敏 阚洪晶 孙成艳 高威 何浩会		
发明人	孟令敏 阚洪晶 孙成艳 高威 何浩会		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/532 G01N33/543 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/53 G01N33/532 G01N33/54326		
代理人(译)	李外		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种基于吡啶酯化学发光、链霉亲和素磁珠-生物素放大反应体系的检测试剂盒，同时还提供了该试剂盒的制备工艺及检测方法，属于体外诊断技术领域。该试剂盒的反应体系包括：吡啶酯标记的抗体或抗原、生物素标记的抗体或抗原、链霉亲和素包被带有羧基或者Tosyl官能团的磁珠，所述的磁珠粒径范围为0.1-5 μ m。本发明通过采用不同粒径的磁珠共混或者添加链霉亲和素的方法以及将生物素标记物与链霉亲和素磁珠预混三种方案解决了免疫试剂生物素干扰的问题。本发明的试剂盒检测线性范围宽，线性拟合度 > 0.99 ，特异性好，灵敏度高，检测浓度低，抗生物素干扰能力高达100ng/mL以上。

