(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110208549 A
(43)申请公布日 2019.09.06

(21)申请号 201910586160.1

(22)申请日 2019.07.01

(71)申请人 北京利德曼生化股份有限公司
地址 100000 北京市大兴区经济技术开发区兴海路5号

(72)发明人 王鹏 李冉 郭建夫

(74)专利代理机构 北京久维律师事务所 11582
代理人 邢江峰

(51)Int.Cl.
G01N 33/68(2006.01)
G01N 21/76(2006.01)
G01N 33/533(2006.01)

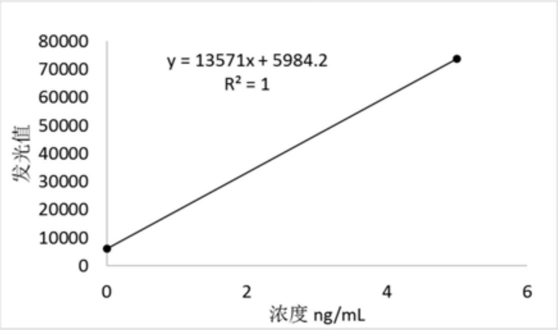
权利要求书2页 说明书11页 附图1页

(54)发明名称

一种可溶性生长刺激表达基因2蛋白sST2发光试剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种可溶性生长刺激表达基因2蛋白sST2发光试剂盒，所述试剂盒包括R1试剂、R2试剂、磁分离试剂，所述R1试剂包括异硫氰酸荧光素标记的抗人sST2单克隆抗体；所述R2试剂包括碱性磷酸酶标记的抗人sST2单克隆抗体；所述磁分离试剂包括抗异硫氰酸荧光素抗体标记的磁性微粒；本发明通过与全自动化学免疫发光仪联用，大大降低了操作难度和检测时间；控制了检测成本的同时，有效提高了sST2检测的灵敏度、线性范围、准确度和重复性，具有极强的市场推广潜力。



CN 110208549 A

1.一种可溶性生长刺激表达基因2蛋白sST2发光试剂盒，其特征在于：所述试剂盒包括R1试剂、R2试剂、磁分离试剂；

所述R1试剂包括异硫氰酸荧光素标记的抗人sST2单克隆抗体；

所述R2试剂包括碱性磷酸酶标记的抗人sST2单克隆抗体；

所述磁分离试剂包括抗异硫氰酸荧光素抗体标记的磁性微粒。

2.根据权利要求1所述的一种可溶性生长刺激表达基因2蛋白sST2发光试剂盒，其特征在于：所述异硫氰酸荧光素标记的抗人sST2单克隆抗体浓度为0.5—2.0μg/mL，碱性磷酸酶标记的抗人sST2单克隆抗体浓度为0.5—2.0μg/mL，所述抗异硫氰酸荧光素抗体标记的磁性微粒的浓度为0.5—2.0mg/mL。

3.根据权利要求1或2所述的一种可溶性生长刺激表达基因2蛋白sST2发光试剂盒，其特征在于：所述R1试剂还包括牛血清白蛋白、酪蛋白、动物血清、异噬性抗体阻断剂、防腐剂和缓冲液。

4.根据权利要求3所述的一种可溶性生长刺激表达基因2蛋白sST2发光试剂盒，其特征在于：所述异嗜性抗体阻断剂浓度为10-100ug/mL。

5.根据权利要求1或2所述的一种可溶性生长刺激表达基因2蛋白sST2发光试剂盒，其特征在于：所述R2试剂和磁分离试剂，分别还包括牛血清白蛋白、酪蛋白、动物血清、防腐剂和缓冲液。

6.根据权利要求5所述的一种可溶性生长刺激表达基因2蛋白sST2发光试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括校准品液，所述校准品液包括重组人sST2抗原、牛血清白蛋白、酪蛋白、动物血清、防腐剂和缓冲液，所述重组人sST2抗原浓度分别为0.0ng/mL、5.0ng/mL、20.0ng/mL、50.0ng/mL、150.0ng/mL和300.0ng/mL之一。

7.根据权利要求6所述的一种可溶性生长刺激表达基因2蛋白sST2发光试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括质控品液，所述质控品液包括重组人sST2抗原、牛血清白蛋白、动物血清、防腐剂和缓冲液，所述sST2抗原浓度分别为30.0ng/mL和150.0ng/mL之一。

8.根据权利要求7所述的一种可溶性生长刺激表达基因2蛋白sST2发光试剂盒，其特征在于：所述牛血清白蛋白的质量百分比浓度为0.5—5.0％，所述动物血清选自羊血清、牛血清、马血清和鸡血清中的一种，动物血清的质量百分比浓度为0.5—5.0％。

9.根据权利要求1所述的一种可溶性生长刺激表达基因2蛋白sST2发光试剂盒，其特征在于：所述R1试剂包括异硫氰酸荧光素标记的抗人sST2单克隆抗体的制备方法，包括如下步骤：

Q1、将抗人sST2单克隆抗体采用pH为9.0的碳酸盐缓冲液过夜透析；

Q2、采用0.2M的碳酸氢钠溶液配制0.2—1mg/mL的异硫氰酸荧光素溶液；

Q3、向Q1处理后的抗人sST2单克隆抗体中加入Q2制备的异硫氰酸荧光素溶液，混匀，室温反应20h，然后采用pH为9.0的碳酸盐缓冲液过夜透析即得；其中，每毫克抗人sST2单克隆抗体加入0.15mL的异硫氰酸荧光素溶液。

10.根据权利要求1所述的一种可溶性生长刺激表达基因2蛋白sST2发光试剂盒，其特征在于：所述R2试剂中，碱性磷酸酶标记的抗人sST2单克隆抗体的制备方法，包括如下步骤：

Q1、配制10—15mg/mL的2-亚氨基硫羟烷盐酸盐溶液；

Q2、取抗人sST2单克隆抗体置于试管中，加入2-亚氨基硫羟烷盐酸盐溶液，混匀，室温放置20—60min，得活化的抗人sST2单克隆抗体；

Q3、称取碱性磷酸钠置于试管中，碱性磷酸钠的质量为抗人sST2单克隆抗体质量的0.5—1.5倍；

Q4、向装有碱性磷酸钠的试管中加入5—10mg/mL的Sulfo-SMCC溶液，混匀，室温放置10—30min，得活化的碱性磷酸钠；

Q5、向装有活化的抗人sST2单克隆抗体的试管中加入1M的$MgCl_2$溶液，然后加入活化的碱性磷酸钠，4℃放置12—20h；

Q6、利用蛋白质纯化系统收集Q5中制得的碱性磷酸酶标记的抗抗人sST2单克隆抗体。

11.根据权利要求1所述的一种可溶性生长刺激表达基因2蛋白sST2发光试剂盒，其特征在于：所述磁分离试剂中抗异硫氰酸荧光素抗体标记的磁性微粒的制备方法，包括如下步骤：

Q1、磁微粒加磁场，用pH值为3.5—5.5的MES缓冲液清洗，然后采用MES缓冲液悬浮磁微粒，得磁微粒浓度为50mg/mL的悬浮液；

Q2、向悬浮液中加入抗异硫氰酸荧光素抗体，混匀；其中每毫升悬浮液中加入0.5—2.5mg的抗异硫氰酸荧光素抗体；

Q3、向Q2处理后的悬浮液中加入10mg/mL的EDC溶液；其中悬浮液和EDC溶液的体积比为1:1，搅拌2—6h，然后加磁场，静置10—30min，倒出上清液，即得。

一种可溶性生长刺激表达基因2蛋白sST2发光试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析技术领域，具体涉及一种可溶性生长刺激表达基因 2蛋白sST2发光试剂盒。

背景技术

[0002] 一种人可溶性生长刺激表达基因2蛋白(sST2)磁微粒化学发光检测试剂盒，ST2是白介素1(IL-1)受体家族的一员，ST2蛋白有2种类型，第一种是可溶形式，称为可溶性ST2或sST2，另一种是与细胞膜结合的形式，称为ST2受体或ST2L。

[0003] ST2的配体是白介素-33，即IL-33，生理上，IL-33与ST2受体结合是心肌疾病或损伤后的应对措施，可下调心脏功能，由于sST2与IL-33结合，阻止其与ST2受体的结合，导致不能传递心脏保护性信号，因此IL-33心脏保护性信号可以被可溶性ST2信号抵消，在有高浓度sST2时，心脏的负荷压力更大，研究ST2意义在于：根据现有技术中已经发表的研究成果表明：ST2值高于临床阈值患者的死亡的风险很高，相反，ST2低于阈值则死亡率低很多，故根据ST2值预测死亡率；根据现有技术中研发成果表明：ST2浓度与心衰严重程度有关，当ST2浓度高于35.0ng/mL阈值时提示预后不良的风险较高；对于心电图ST抬高的心梗(STEMI)患者或没有ST抬高的急性冠脉综合征(NSTE-ACS)患者，ST2升高都强烈预示可能发生死亡或心脏衰竭。急性冠脉综合征患者，如果ST2水平高于35.0ng/ml，在30天内死亡或发展为心衰的风险比那些ST2浓度低于阈值患者的风险高3倍，一年内的相对风险高2.3倍，同时根据现有技术中研发成果表明：ST2参与心肌重建过程，可以用来辅助判别病人对于依普利酮(Eplerenone)等抗心肌纤维化药物的治疗效果。

[0004] 国内已申请专利的检测技术包括胶体金免疫层析法(公开号CN 202735352U)和酶联免疫吸附(ELISA)法(公开号CN 106556705A)，但是：胶体金免疫层析法，操作简单，检测方面，但灵敏度、线性、重复性和定量准确性较差，目前更多运用于疾病初步筛查；而ELISA法技术成熟，检测费用较低，但灵敏度和线性范围较差，操作复杂，重复性较差，即便采用全自动酶免分析仪，检测速度仍然较慢，无法满足临床快速定量检测需求。

[0005] 因此，找到一种既能够降低操作难度、减少检测时间、控制检测成本，又能够提高检测灵敏度、准确度和重复性的检测方法是本领域亟需解决的技术问题。

发明内容

[0006] 根据上述阐述，本发明的目的在于提供一种可溶性生长刺激表达基因2 蛋白sST2发光试剂盒，可以达到安全稳定，各成分协同效应好，抑菌性能高效、广谱的天然防腐剂的作用。

[0007] 本发明提供的技术方案：

[0008] 一种可溶性生长刺激表达基因2蛋白sST2发光试剂盒，所述试剂盒包括R1试剂、R2试剂、磁分离试剂；

[0009] 所述R1试剂包括异硫氰酸荧光素标记的抗人sST2单克隆抗体；

[0010] 所述R2试剂包括碱性磷酸酶标记的抗人sST2单克隆抗体；

[0011] 所述磁分离试剂包括抗异硫氰酸荧光素抗体标记的磁性微粒。

[0012] 上述技术方案中，所述异硫氰酸荧光素标记的抗人sST2单克隆抗体浓度为0.5—2.0μg/mL，碱性磷酸酶标记的抗人sST2单克隆抗体浓度为 0.5—2.0μg/mL，所述抗异硫氰酸荧光素抗体标记的磁性微粒的浓度为 0.5—2.0mg/mL。

[0013] 上述技术方案中，所述R1试剂还包括牛血清白蛋白、酪蛋白、动物血清、异噬性抗体阻断剂、防腐剂和缓冲液。

[0014] 上述技术方案中，所述异嗜性抗体阻断剂浓度为10-100ug/mL。

[0015] 上述技术方案中，所述R2试剂和磁分离试剂，分别还包括牛血清白蛋白、酪蛋白、动物血清、防腐剂和缓冲液。

[0016] 上述技术方案中，所述试剂盒还包括校准品液，所述校准品液包括重组人sST2抗原、牛血清白蛋白、酪蛋白、动物血清、防腐剂和缓冲液，所述重组人sST2抗原浓度分别为0.0ng/mL、5.0ng/mL、20.0ng/mL、50.0ng/mL、150.0ng/mL和300.0ng/mL之一。

[0017] 上述技术方案中，所述试剂盒还包括质控品液，所述质控品液包括重组人sST2抗原、牛血清白蛋白、动物血清、防腐剂和缓冲液，所述sST2抗原浓度分别为30.0ng/mL和150.0ng/mL之一。

[0018] 上述技术方案中，所述牛血清白蛋白的质量百分比浓度为0.5—5.0％，所述动物血清选自羊血清、牛血清、马血清和鸡血清中的一种，动物血清的质量百分比浓度为0.5—5.0％。

[0019] 上述技术方案中，所述防腐剂选自叠氮化钠和Procline300中的一种，所述防腐剂的质量百分比浓度为0.1—0.3％。

[0020] 上述技术方案中，所述缓冲液选自PBS缓冲液、HEPES缓冲液、Tris-HCl 缓冲液、MES缓冲液和MOPS缓冲液中的一种，所述缓冲液pH值为6.0—9.0。

[0021] 上述技术方案中，所述R1试剂包括异硫氰酸荧光素标记的抗人sST2 单克隆抗体的制备方法如下：

[0022] Q1、将抗人sST2单克隆抗体采用pH为9.0的碳酸盐缓冲液过夜透析；

[0023] Q2、采用0.2M的碳酸氢钠溶液配制0.2—1mg/mL的异硫氰酸荧光素溶液；

[0024] Q3、向Q1处理后的抗人sST2单克隆抗体中加入Q2制备的异硫氰酸荧光素溶液，混匀，室温反应20h，然后采用pH为9.0的碳酸盐缓冲液过夜透析即得；其中，每毫克抗人sST2单克隆抗体加入0.15mL的异硫氰酸荧光素溶液。

[0025] 上述技术方案中，所述R2试剂中，碱性磷酸酶标记的抗人sST2单克隆抗体的制备方法如下：

[0026] Q1、配制10—15mg/mL的2-亚氨基硫羟烷盐酸盐溶液；

[0027] Q2、取抗人sST2单克隆抗体置于试管中，加入2-亚氨基硫羟烷盐酸盐溶液，混匀，室温放置20—60min，得活化的抗人sST2单克隆抗体；

[0028] Q3、称取碱性磷酸钠置于试管中，碱性磷酸钠的质量为抗人sST2单克隆抗体质量的0.5—1.5倍；

[0029] Q4、向装有碱性磷酸钠的试管中加入5—10mg/mL的Sulfo-SMCC溶液，混匀，室温放置10—30min，得活化的碱性磷酸钠；

[0030] Q5、向装有活化的抗人sST2单克隆抗体的试管中加入1M的$MgCl_2$溶液，然后加入活化的碱性磷酸钠，4℃放置12—20h；

[0031] Q6、利用蛋白质纯化系统收集Q5中制得的碱性磷酸酶标记的抗抗人sST2单克隆抗体。

[0032] 上述技术方案中，所述磁分离试剂中抗异硫氰酸荧光素抗体标记的磁性微粒的制备方法如下：

[0033] Q1、磁微粒加磁场，用pH值为3.5—5.5的MES缓冲液清洗，然后采用MES缓冲液悬浮磁微粒，得磁微粒浓度为50mg/mL的悬浮液；

[0034] Q2、向悬浮液中加入抗异硫氰酸荧光素抗体，混匀；其中每毫升悬浮液中加入0.5—2.5mg的抗异硫氰酸荧光素抗体；

[0035] Q3、向Q2处理后的悬浮液中加入10mg/mL的EDC溶液；其中悬浮液和EDC溶液的体积比为1:1，搅拌2—6h，然后加磁场，静置10—30min，倒出上清液，即得。

[0036] 本发明的试剂盒通过与全自动化学免疫发光仪联用，大大降低了操作难度和检测时间；控制了检测成本的同时，与市售试剂盒相比，还减少了样本预稀释环节，有效提高了sST2检测的灵敏度、线性范围、准确度和重复性，具体为：1、通过强碱试剂从结合蛋白中解离人sST2，然后在中和试剂作用下实现磁微粒化学发光检测，该试剂盒具有较高的灵敏度、特异性和较宽的检测范围；2、使用悬浮磁微球捕捉待测抗原，比表面积大，可更好捕捉样本中的待测物，灵敏度高、检测范围宽；3、使用磁微球作为固相载体，方便清洗，去除非特异性结合，有利于提高检测准确度；4、可以与全自动化学发光分析仪联用，操作步骤极大简化，加大了检测速度和检测通量，提高了检测效率，同时避免了人为操作导致的误差；5、只需要2mL血液就可以进行检测，患者体验好，有利于患者接受；6、使用高质量单抗抗干扰能力强，检测范围完全涵盖现有临床检测需求，具有极强的市场推广潜力。

附图说明

[0037] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案，下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动性的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0038] 图1为本发明实施例3中A，B点连点拟合曲线；

[0039] 图2为本发明实施例4中人sST2磁微粒化学发光检测试剂盒与市售 ELISA法试剂盒测定值的相关性。

具体实施方式

[0040] 下面将结合本发明的附图，对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[0041] 实施例1人sST2磁微粒化学发光检测试剂盒的组成

[0042] 在实施例1中，人sST2磁微粒化学发光检测试剂盒包括R1试剂、R2 试剂、磁分离试

剂、校准品液和质控品液;其中,

[0043] R1试剂包括异硫氰酸荧光素标记的抗人sST2单克隆抗体、牛血清白蛋白、动物血清、异嗜性抗体阻断剂、防腐剂和缓冲液;

[0044] 异硫氰酸荧光素标记的抗人sST2单克隆抗体浓度为1.0μg/mL;

[0045] 牛血清白蛋白的质量百分比浓度为5.0%;动物血清为质量百分比浓度为 5.0%的牛血清;异嗜性抗体阻断剂浓度为50ug/mL;防腐剂为质量百分比浓度为0.2%的叠氮化钠;缓冲液为pH为7.5的Tris-HCl缓冲液。

[0046] 异硫氰酸荧光素标记的抗人sST2单克隆抗体的制备方法如下:

[0047] (1)将抗人sST2单克隆抗体置于透析袋中,采用pH为9.0的碳酸盐缓冲液过夜透析;

[0048] (2)采用0.2M的碳酸氢钠溶液配制浓度为0.5mg/mL的异硫氰酸荧光素溶液;

[0049] (3)向步骤(1)处理后的抗人sST2单克隆抗体中加入步骤(2)制备的异硫氰酸荧光素溶液,混匀,室温反应20h,然后采用pH为9.0的碳酸盐缓冲液过夜透析即得;其中,每毫克抗人sST2单克隆抗体加入0.15mL的异硫氰酸荧光素溶液。

[0050] R1试剂的制备方法如下:

[0051] (1)在容器中添加700mL去离子水,加入终浓度为0.05M Tris-HCl;(2) 混匀,使用1M氢氧化钠或1M HCl调整pH值至7.5±0.05;

[0052] (3)依次添加牛血清、牛血清白蛋白、异嗜性抗体阻断剂和叠氮化钠,终浓度分别为5%(v/v)、5%(v/v)、50ug/mL、0.2%(w/w);

[0053] (4)混匀,使用1M氢氧化钠或1M HCl调整pH值至7.5±0.05;

[0054] (5)加入终浓度为1.0μg/mL异硫氰酸荧光素标记的抗人sST2单克隆抗体;

[0055] (6)混匀,使用1M氢氧化钠或1M HCl微调pH值至7.5±0.05;

[0056] (7)4℃保存待用。

[0057] R2试剂包括碱性磷酸酶标记的抗人sST2单克隆抗体、牛血清白蛋白、动物血清、防腐剂和缓冲液;碱性磷酸酶标记的抗人sST2单克隆抗体浓度为1.0μg/mL;牛血清白蛋白的质量百分比浓度为5.0%;动物血清为质量百分比浓度为5.0%的牛血清;防腐剂为质量百分比浓度为0.2%的叠氮化钠;缓冲液为pH为7.5的Tris-HCl缓冲液。

[0058] 碱性磷酸酶标记的抗人sST2单克隆抗体的制备方法如下:

[0059] (1)用去离子水配制10mg/mL的2-亚氨基硫羟烷盐酸盐溶液;

[0060] (2)取抗人sST2单克隆抗体置于尖底试管中,加入试管体积1/100的 2-亚氨基硫羟烷盐酸盐溶液,混匀,室温放置60min,得活化的抗人sST2 单克隆抗体;

[0061] (3)称取碱性磷酸钠置于试管中,碱性磷酸钠的质量为人sST2单克隆抗体质量的1.0倍;

[0062] (4)用无水N,N-二甲基甲酰胺配制10mg/mL的Sulfo-SMCC溶液,向装有碱性磷酸钠的试管中加入1/20试管体积的Sulfo-SMCC溶液,混匀,室温放置10—30min,得活化的碱性磷酸钠;

[0063] (5)向装有活化的抗人sST2单克隆抗体的试管中加入1/500体积的1M 的MgCl2溶液,然后加入活化的碱性磷酸钠,4℃放置20h;

[0064] (6)利用蛋白质纯化系统收集步骤(5)中制得的碱性磷酸酶标记的抗人sST2单克

隆抗体;即安装蛋白质纯化系统(AKTA purifier100),使用 Superdex200制备级柱子,使用去离子水配制质量百分比浓度为2%的三乙醇胺溶液平衡柱子,流速为1mL/min;收集各洗脱峰流分,测定各洗脱峰流分的280nm处吸光值,收集280nm处吸光值大于0.02的流分,即得。

[0065] R2试剂的制备方法如下:

[0066] (1)在容器中添加700mL去离子水,加入终浓度为0.05M Tris-HCl;(2) 混匀,使用1M氢氧化钠或1M HCl调整pH值至7.5±0.05;

[0067] (3)依次添加牛血清、牛血清白蛋白、异嗜性抗体阻断剂和叠氮化钠,终浓度分别为5%(v/v)、5%(v/v)、50ug/mL、0.2%(w/w);

[0068] (4)混匀,使用1M氢氧化钠或1M HCl调整pH值至7.5±0.05;

[0069] (5)加入终浓度为1.0μg/mL碱性磷酸酶标记的抗人sST2单克隆抗体;

[0070] (6)混匀,使用1M氢氧化钠或1M HCl微调pH值至7.5±0.05;

[0071] (7)4℃保存待用。

[0072] 磁分离试剂包括抗异硫氰酸荧光素抗体标记的磁性微粒、牛血清白蛋白、动物血清、防腐剂和缓冲液;抗异硫氰酸荧光素抗体标记的磁性微粒的浓度为1.0mg/mL;动物血清为质量百分比浓度为5.0%的马血清;防腐剂为质量百分比浓度为0.2%的叠氮化钠;缓冲液为pH为8.0的Tris-HCl缓冲液。

[0073] 抗异硫氰酸荧光素抗体标记磁分离试剂的制备方法如下:

[0074] (1)裸磁微粒加磁场,静置15min,倒出上清液,用pH值为5的MES 缓冲液清洗磁微粒,然后采用MES缓冲液悬浮磁微粒,得磁微粒浓度为 50mg/mL的悬浮液;

[0075] (2)向悬浮液中加入抗异硫氰酸荧光素抗体,混匀;其中每毫升悬浮液中加入0.5mg的抗异硫氰酸荧光素抗体;

[0076] (3)用去离子水配制浓度为10mg/mL的EDC溶液,向步骤(2)处理后的悬浮液中加入EDC溶液;其中悬浮液和EDC溶液的体积比为1:1,搅拌5h,然后加磁场,静置10min,倒出上清液,加入已配置好的含5%马血清、0.2%叠氮化钠的0.05M Tris-HCl缓冲液(pH值为8.0),稀释配制1mg/mL 磁分离试剂。

[0077] 校准品液和质控品液分别包括重组人sST2抗原、牛血清白蛋白、动物血清、防腐剂和缓冲液;牛血清白蛋白的质量百分比浓度为5.0%;动物血清为质量百分比浓度为5.0%的牛血清;防腐剂为质量百分比浓度为0.2%的叠氮化钠;缓冲液为pH值为7.4的Tris-HCl缓冲液;校准品液中人sST2抗原浓度分别为0.0ng/mL、5.0ng/mL、20.0ng/mL、50.0ng/mL、150.0ng/mL和 300.0ng/mL;质控品液中人sST2抗原浓度分别为50.0ng/mL和150.0ng/mL。

[0078] 校准品液和质控品液的制备方法为:

[0079] (1)用缓冲液、牛血清白蛋白、动物血清和防腐剂配制成校准品稀释液;

[0080] (2)用步骤(1)中的校准品稀释液稀释重组人sST2,获得人sST2浓度分别为0.0ng/mL、5.0ng/mL、20.0ng/mL、50.0ng/mL、150.0ng/mL和 300.0ng/mL的校准品;或者,用步骤(1)中的校准品稀释液稀释重组人sST2,得人sST2浓度分别为50.0ng/mL和150.0ng/mL的质控品。

[0081] 实施例1A中,人sST2磁微粒化学发光检测试剂盒的组成

[0082] 在实施例1A中,人sST2磁微粒化学发光检测试剂盒包括R1试剂、R2 试剂、磁分离

试剂、校准品液和质控品液；其中，

[0083] R1试剂包括异硫氰酸荧光素标记的抗人sST2单克隆抗体、牛血清白蛋白、动物血清、异嗜性抗体阻断剂、防腐剂和缓冲液；

[0084] 异硫氰酸荧光素标记的抗人sST2单克隆抗体浓度为1.5μg/mL；

[0085] 牛血清白蛋白的质量百分比浓度为5.0％；动物血清为质量百分比浓度为 4.0％的马血清；异嗜性抗体阻断剂浓度为100ug/mL；防腐剂为质量百分比浓度为0.15％的Procline300；缓冲液为pH为8.5的PBS缓冲液。

[0086] 异硫氰酸荧光素标记的抗人sST2单克隆抗体的制备方法通实施例1，相关的组分进行替换即可。

[0087] R2试剂包括碱性磷酸酶标记的抗人sST2单克隆抗体、牛血清白蛋白、动物血清、防腐剂和缓冲液；碱性磷酸酶标记的抗人sST2单克隆抗体浓度为2.0μg/mL；牛血清白蛋白的质量百分比浓度为3.5％；动物血清为质量百分比浓度为4.0％的牛血清；防腐剂为质量百分比浓度为0.1％的叠氮化钠；缓冲液为pH为6的MOPS缓冲液。

[0088] 碱性磷酸酶标记的抗人sST2单克隆抗体的制备方法同实施例1，将相应的组分替换即可。

[0089] 磁分离试剂包括抗异硫氰酸荧光素抗体标记的磁性微粒、牛血清白蛋白、动物血清、防腐剂和缓冲液；抗异硫氰酸荧光素抗体标记的磁性微粒的浓度为1.5mg/mL；动物血清为质量百分比浓度为5.0％的鸡血清；防腐剂为质量百分比浓度为1.2％的Procline300；缓冲液pH值为7.0的MOPS缓冲液。

[0090] 抗异硫氰酸荧光素抗体标记的磁性微粒的制备方法同实施例1，将相关的成分简单替换即可。

[0091] 校准品液和质控品液分别包括重组人sST2抗原、牛血清白蛋白、动物血清、防腐剂和缓冲液；牛血清白蛋白的质量百分比浓度为5.0％；动物血清为质量百分比浓度为4.0％的羊血清；防腐剂为质量百分比浓度为0.1％的叠氮化钠；缓冲液为pH值为6的Tris-HCl缓冲液；校准品液中人sST2抗原浓度分别为0.0ng/mL、5.0ng/mL、20.0ng/mL、50.0ng/mL、150.0ng/mL和 300.0ng/mL；质控品液中人sST2抗原浓度分别为50.0ng/mL和150.0ng/mL。

[0092] 制备方法同实施例1中的制备方法。

[0093] 在实施例1B中，人sST2磁微粒化学发光检测试剂盒包括R1试剂、R2 试剂、磁分离试剂、校准品液和质控品液；其中，

[0094] R1试剂包括异硫氰酸荧光素标记的抗人sST2单克隆抗体、牛血清白蛋白、酪蛋白、动物血清、异嗜性抗体阻断剂、防腐剂和缓冲液；

[0095] 异硫氰酸荧光素标记的抗人sST2单克隆抗体浓度为1.5μg/mL；

[0096] 牛血清白蛋白的质量百分比浓度为3.0％；酪蛋白的质量百分比浓度为 0.5％；动物血清为质量百分比浓度为3.0％的马血清和质量百分比浓度为 3.0％的牛血清；异嗜性抗体阻断剂浓度为50ug/mL；防腐剂为质量百分比浓度为1.5％的Procline300；缓冲液为pH为8.5的PBS缓冲液。

[0097] 异硫氰酸荧光素标记的抗人sST2单克隆抗体的制备方法通实施例1，相关的组分进行替换即可。

[0098] R2试剂包括碱性磷酸酶标记的抗人sST2单克隆抗体、牛血清白蛋白、酪蛋白、动物

血清、防腐剂和缓冲液；碱性磷酸酶标记的抗人sST2单克隆抗体浓度为2.0μg/mL；牛血清白蛋白的质量百分比浓度为3.0％；动物血清为质量百分比浓度为3.0％的马血清和质量百分比浓度为3.0％的牛血清；防腐剂为质量百分比浓度为质量百分比浓度为0.15％的Procline300；缓冲液为 pH为8.5的PBS缓冲液。

[0099] 碱性磷酸酶标记的抗人sST2单克隆抗体的制备方法同实施例1，将相应的组分替换即可。

[0100] 磁分离试剂包括抗异硫氰酸荧光素抗体标记的磁性微粒、牛血清白蛋白、动物血清、防腐剂和缓冲液；抗异硫氰酸荧光素抗体标记的磁性微粒的浓度为1.5mg/mL；牛血清白蛋白的质量百分比浓度为3.0％；酪蛋白的质量百分比浓度为0.5％；动物血清为质量百分比浓度为3.0％的马血清和质量百分比浓度为3.0％的牛血清；异嗜性抗体阻断剂浓度为50ug/mL；防腐剂为质量百分比浓度为1.5％的Procline300；缓冲液为pH为8.5的PBS缓冲液。

[0101] 抗异硫氰酸荧光素抗体标记的磁性微粒的制备方法同实施例1，将相关的成分简单替换即可。

[0102] 校准品液和质控品液分别包括重组人sST2抗原、牛血清白蛋白、动物血清、防腐剂和缓冲液；牛血清白蛋白的质量百分比浓度为5.0％；动物血清为质量百分比浓度为4.0％的羊血清；防腐剂为质量百分比浓度为0.1％的叠氮化钠；缓冲液为pH值为6的Tris-HCl缓冲液；校准品液中人sST2抗原浓度分别为0.0ng/mL、5.0ng/mL、20.0ng/mL、50.0ng/mL、150.0ng/mL和 300.0ng/mL；质控品液中人sST2抗原浓度分别为50.0ng/mL和150.0ng/mL。

[0103] 制备方法同实施例1中的制备方法。

[0104] 实施例2人sST2磁微粒化学发光检测试剂盒的测定方法和绘制标准曲线

[0105] 本处使用实施例1中的试剂盒进行实验。将试剂盒从储存条件下取出后平衡至室温再用于样本检测；磁分离实际使用前彻底混匀以确保磁微粒悬浮均匀，并且不能使用磁力搅拌器进行搅拌；根据实际需要准备试管并做好标记。

[0106] 步骤1.取2.0mL静脉血至玻璃试管中，不加抗凝剂，室温静置，然后 3000rpm离心5min，取上清；

[0107] 步骤2.分别取10-50μL校准品液、质控品液和采集的血清样本置于对应的试管中；每次取样前都需要更换移液器头避免交叉污染；

[0108] 步骤3.分别加10—50μLR1和10—50μLR2试剂至步骤2的各试管中，将各试管采用多管混匀器2000rpm振荡混匀30s，然后置于36.5℃—37.5℃的水浴中15min；

[0109] 步骤4.分别将25μL磁分离试剂于步骤3处理后的各试管中，将各试管采用多管混匀器2000rpm振荡混匀30s，然后置于36.5℃—37.5℃的水浴中 5min；

[0110] 步骤5.将步骤4处理后的各试管置于磁分离器上吸附2min；

[0111] 步骤6.采用大而缓慢的圆周运动倒转分离器倒出各试管中的上清液，把倒转的各试管连同圆周运动倒转分离器一同放置于滤纸上，拍击，除去沾在各试管壁上的液滴；

[0112] 步骤7.分别加300μL清洗液至步骤6处理后的各试管中，将各试管采用多管混匀器2000rpm振荡混匀30s，重复清洗3次；

[0113] 步骤8.分别加150μL发光底物溶液至步骤7处理后的各试管中，混匀 3s，5min内采用化学发光分析仪测定各试管的发光强度；

[0114]　步骤9.校准品液发光强度测定结果如表1所示，利用四参数逻辑拟合得到校准品浓度-发光强度的回归曲线，根据测定的血清样本的发光强度由回归曲线反算出血清样本中待测物的浓度。

[0115]　表1校准品液发光强度测定结果

[0116]

校准点	浓度(ng/ml)	RLU	平均 RLU	拟合浓度	拟合偏差
A	0.00	5580	5398	0.00	——
		5217			
B	5.00	72683	73841	5.05	1.05%
		75000			
C	20.00	295947	299089	19.64	-1.80%
		302230			
D	50.00	800834	813898	50.57	1.14%
		826963			
E	150.00	2581224	2600655	151.30	0.87%
		2620086			
F	300.00	5379720	5342425	300.61	0.20%
		5305129			

[0117]

[0118]　实施例3人sST2磁微粒化学发光检测试剂盒的方法学检定

[0119]　按照本领域中的常规的制造及检定规程对实施例1中的试剂盒进行检定，结果如下：

[0120]　1.试剂盒精密度测定

[0121]　1.1批内精密度分析

[0122]　将实施例1中的试剂盒一批，分别测定高、低浓度的质控品液，10孔平行测定，计算其均值和标准差。通过标准差/均值获得批内变异系数，分别为 3.58%、4.93%，结果如表2所示。

[0123]　表2批内精密度分析结果

[0124]

靶值(ng/mL)	测定次数	分析内CV(%)
30.74	10	2.09
148.59	10	0.54

[0125]　1.2批间精密度分析

[0126]　将实施例1中的试剂盒取三批，每批试剂盒均测定高、低浓度的质控品液，10孔平行测定，每份质控品液得到30个浓度测值，统计批间变异系数分别为5.28%、5.50%，结果如表3所示。

[0127]　表3批间精密度分析结果

[0128]

靶值(ng/mL)	测定次数	分析内CV(%)
30.00	30	1.90

150.00	30	0.62

[0129] 2.试剂盒最低检测限

[0130] 最低检测限是在给定的显著性水平上可与零剂量相区别的剂量。用零浓度较准品作为样本进行检测，重复测定20次，得出20次测量结果的相对发光强度(RLU)值，计算其平均值(M)和标准差(SD)，得出M+2SD，根据零浓度较准品和相邻校准品之间的浓度-RLU进行两点回归拟合得出一次方程，将M+2SD的RLU值带入上述方程中，求出对应的浓度值，即为最低检测限。

[0131] 2.1 A点发光值结果如表4所示，其中25OHD-STD-A表示人sST2的A 点发光值。

[0132] 表4 A点发光值结果

[0133]

25OHD-STD-A(RLU)			
6189	6064	6045	5836
5749	5869	6078	6124
6092	6107	5873	6178
6187	5756	5830	6148
6189	6064	6045	5836

[0134] 2.2 B点发光值结果如表5所示，其中25OHD-STD-B表示人sST2的B 点发光值。

[0135] 表5实施例1试剂盒B点发光值结果

[0136]

25OHD-STD-B(RLU)	
72683	75000

[0137] 2.3 A，B点连点拟合曲线如图1所示。

[0138] 由图1可知，A，B点连点拟合曲线方程为y＝13571x+5984.2，R2＝1。

[0139] 2.4根据A-B点浓度-RLU线性拟合方程，将M+2SD的RLU值带入上述方程中，求得对应的浓度值，即为最低检测限，即实施例1中试剂盒的最低检测限为0.023ng/mL。

[0140] 3.试剂盒抗干扰试验

[0141] 向180μL浓度为40-60ng/mL的正常血清中添加20μL校准品稀释液配制成干扰物，作为干扰样本；向180μL浓度为40-60ng/mL的正常血清中添加20μL较准品稀释液，作为对照样本；采用实施例1中的试剂盒测定对照样本和干扰样本，每个样本测定3次。结果如表6所示。

[0142] 表6试剂盒抗干扰试验结果

[0143]

添加物	拟合浓度ng/mL	偏差
对照样本	49.02±0.72	
20g/L甘油三酯	49.48±0.05	0.93%
5g/L血红蛋白	48.23±1.24	-1.62%
500uM游离胆红素	47.14±0.45	-3.84%
500uM结合胆红素	48.73±0.66	-0.60%
100IU/ml肝素钠	48.85±0.49	-0.35%
1000IU/ml类风湿因子	48.73±0.81	-0.60%

[0144] 由表6结果可知，干扰样本测值与对照样本测值的偏差均小于±15%。本发明的试剂盒抗干扰效果良好。

[0145] 4.钩端效应(HOOK)试验

[0146] 对实施例1中的试剂盒进行高浓度样本检测，发光值高于检测范围上限的样本浓度可认为没有HOOK效应。

[0147] 结果如表7所示。

[0148] 表7钩端效应(HOOK)试验结果

[0149]

配制浓度 ng/mL	发光值	发光值均值	拟合浓度 ng/mL
300	5422063	5414180	304.50
	5406297		
10000	11505423	11213417	620.17
	10921412		
100000	10710230	10625591	587.83
	10540952		
150000	8365030	8341452	463.08
	8317873		
200000	4027325	4035018	229.73
	4042711		

[0150]

[0151] 由表7结果可知，高至150000ng/mL样本未见HOOK效应。

[0152] 5.试剂盒稳定性试验

[0153] 对实施例1中的试剂盒分别进行4℃和37℃放置的稳定性实验，试剂盒 4℃放置12个月和37℃放置7天，标准品定标正常，质控品测值在规定范围内，最低检测限低于1ng/mL，分析内和分析间精密度分别小于±10%和±15%、准确度测值偏差小于±15%、交叉反应加样回收率小于±5%。因此，试剂盒有效期可达12个月。

[0154] 经过大量的实验证明，本发明的试剂盒方法学指标如下：

[0155] 检测范围：1.00～300.00ng/mL

[0156] 最低检测限：最小检测限不高于1.00ng/mL

[0157] 精密度：批内变异系数小于±10%，批间变异系数小于±15%

[0158] 抗干扰：一般浓度下常见干扰物对本发明试剂盒检测无干扰。

[0159] HOOK效应：高至150000ng/mL样本检测未见HOOK效应。

[0160] 稳定性：试剂各组分置4℃12个月和37℃7天后测定结果均符合要求，试剂盒效期可达12个月。

[0161] 实施例4本发明试剂盒同市售ELISA法试剂盒临床样本测值比对

[0162] 用实施例1中的试剂盒和市售ELISA法试剂盒对70份人血清样品同时进行检测，其检测结果如表9所示；以本发明试剂盒测定的血清人sST2浓度为纵坐标，以市售ELISA法试剂盒测定的结果为横坐标作图，如图2所示。

[0163] 采用本发明试剂盒测定的血清人sST2浓度为纵坐标，以市售ELISA法试剂盒测定的结果为横坐标作回归分析，经统计学处理结果表明，本方法同市售ELISA法试剂盒临床样本测定值相关性良好。

[0164] 从上面所述可以看出，本发明的优点和有益效果是：

[0165] (1)本发明提供的人sST2磁微粒化学发光检测试剂盒具有较高的灵敏度、特异性，较好的重复性和较宽的检测范围。

[0166] (2)本发明提供的人sST2磁微粒化学发光检测试剂盒使用悬浮磁微球捕捉待测抗原，比表面积大，可更好捕捉样本中的待测物，灵敏度高、检测范围宽。

[0167] (3)本发明提供的人sST2磁微粒化学发光检测试剂盒使用磁微球作为固相载体，方便清洗，去除非特异性结合，有利于提高检测准确度。

[0168] (4)本发明提供的人sST2磁微粒化学发光检测试剂盒可以与全自动化学发光分析仪联用，操作步骤极大简化，加大了检测速度和检测通量，提高了检测效率，同时避免了人为操作导致的误差。

[0169] (5)本发明提供的人sST2磁微粒化学发光检测试剂盒只需要2mL血液就可以进行检测，患者体验好，有利于患者接受。

[0170] (6)本发明提供的人sST2磁微粒化学发光检测试剂盒使用高质量单抗抗干扰能力强，检测范围完全涵盖现有临床检测需求，具有极强的市场推广潜力。

[0171] 以上所述，仅为本发明的具体实施方式，但本发明的保护范围并不局限于此，任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内，可轻易想到变化或替换，都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此，本发明的保护范围应所述以权利要求的保护范围为准。

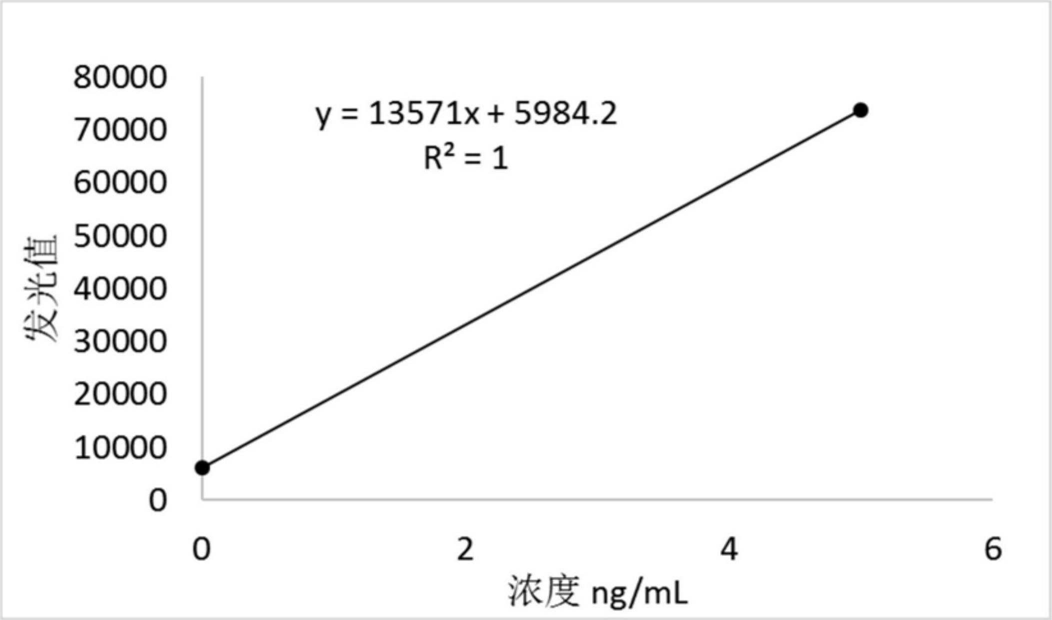

80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
发光值
y = 13571x + 5984.2
R² = 1
0
2
4
6
浓度 ng/mL

图1

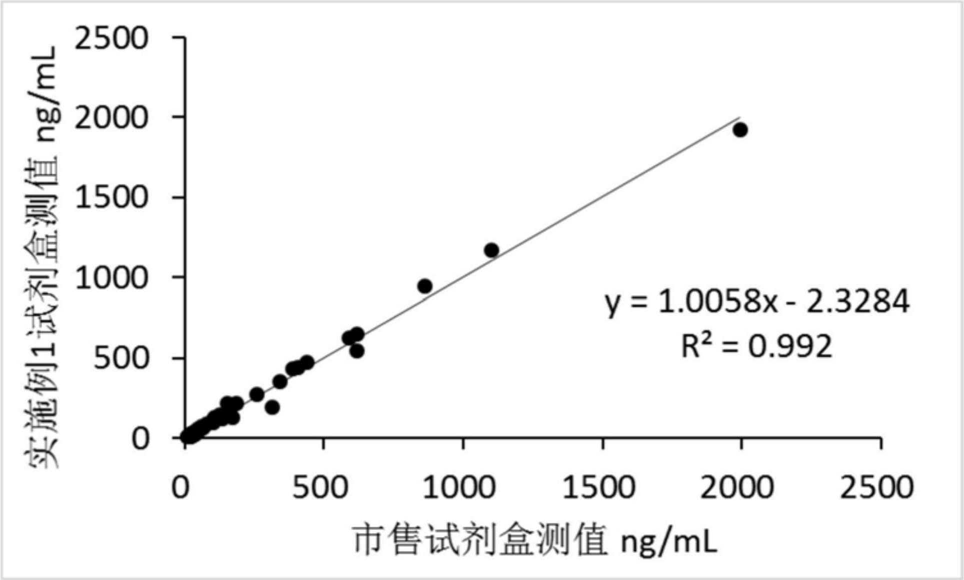
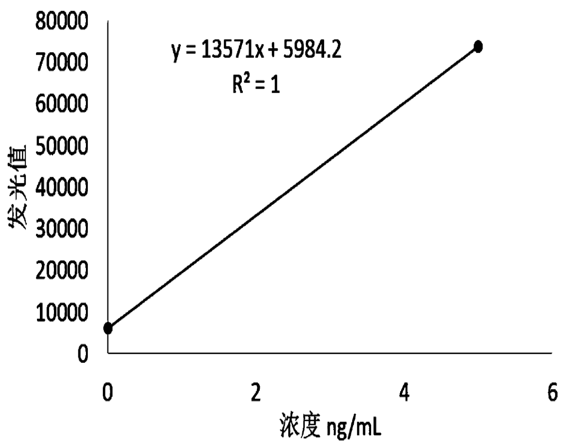

2500
2000
1500
1000
500
0
实施例1试剂盒测值 ng/mL
y = 1.0058x - 2.3284
R² = 0.992
0
500
1000
1500
2000
2500
市售试剂盒测值 ng/mL

图2

专利名称(译)	一种可溶性生长刺激表达基因2蛋白sST2发光试剂盒		
公开(公告)号	CN110208549A	公开(公告)日	2019-09-06
申请号	CN201910586160.1	申请日	2019-07-01
[标]申请(专利权)人(译)	北京利德曼生化股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京利德曼生化股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京利德曼生化股份有限公司		
[标]发明人	王鹏 李冉 郭建夫		
发明人	王鹏 李冉 郭建夫		
IPC分类号	G01N33/68 G01N21/76 G01N33/533		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/533 G01N33/68		
代理人(译)	邢江峰		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种可溶性生长刺激表达基因2蛋白sST2发光试剂盒，所述试剂盒包括R1试剂、R2试剂、磁分离试剂，所述R1试剂包括异硫氰酸荧光素标记的抗人sST2单克隆抗体；所述R2试剂包括碱性磷酸酶标记的抗人sST2单克隆抗体；所述磁分离试剂包括抗异硫氰酸荧光素抗体标记的磁性微粒；本发明通过与全自动化学免疫发光仪联用，大大降低了操作难度和检测时间；控制了检测成本的同时，有效提高了sST2检测的灵敏度、线性范围、准确度和重复性，具有极强的市场推广潜力。