



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103308681 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 18

(21) 申请号 201310253719. 1

(22) 申请日 2013. 06. 25

(71) 申请人 武汉生之源生物科技有限公司
地址 430223 湖北省武汉市东湖开发区大学
园路武大科技园创业楼四楼

(72) 发明人 华权高 许可 沈鹤霄 黄爱
来祥兵 伍卫姣 舒芹

(74) 专利代理机构 北京市德权律师事务所
11302

代理人 刘丽君

(51) Int. Cl.

G01N 33/573 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

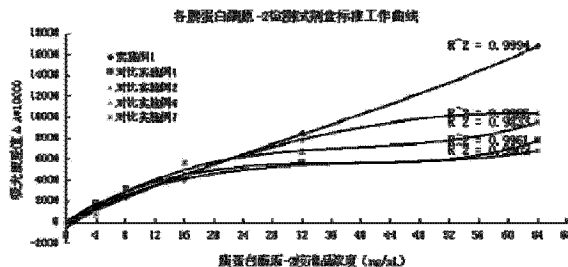
权利要求书2页 说明书13页 附图2页

(54) 发明名称

胰蛋白酶原-2 检测试剂盒及制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种胰蛋白酶原-2 含量检测试剂盒及其制备方法。本发明检测试剂盒由彼此独立的试剂 I 和试剂 II 组成;其中,试剂 I 的组分包括:生物缓冲剂、防腐剂、无机盐和水;试剂 II 的组分包括:包被胰蛋白酶原-2 抗体的胶乳颗粒、生物缓冲剂、防腐剂和水。本发明检测试剂盒采用粒径为 100-300nm 的胶乳颗粒制备包被胰蛋白酶原-2 抗体的胶乳颗粒,能有效保证试剂盒的灵敏度、检测线性范围、测值准确性及开瓶稳定性;此外,本发明采用化学交联法制备抗体包被胶乳颗粒,保证了抗体与胶乳颗粒的结合稳定性,提高了检测试剂盒的稳定性。本发明检测试剂盒具有稳定性好、灵敏度高、特异性强、操作简便等优点。



1. 一种胰蛋白酶原-2 胶乳增强透射免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒由彼此独立的试剂 I 和试剂 II 组成;所述试剂 I 的组分包括:生物缓冲剂、防腐剂、无机盐和水;试剂 II 的组分包括:包被胰蛋白酶原-2 抗体的胶乳颗粒、生物缓冲剂、防腐剂和水。

2. 按照权利要求 1 所述的胰蛋白酶原-2 含量检测试剂盒,其特征在于:所述包被胰蛋白酶原-2 抗体的胶乳颗粒的粒径为 100-300nm,优选为 150-250nm,更优选为 180-220nm,最优选为 200nm。

3. 按照权利要求 1 或 2 所述的胰蛋白酶原-2 含量检测试剂盒,其特征在于:所述胰蛋白酶原-2 抗体包被胶乳颗粒的方法为化学交联法。

4. 按照权利要求 3 所述的胰蛋白酶原-2 含量检测试剂盒,其特征在于,所述化学交联法包括以下步骤:

(1) 胶乳溶液的配制:用 2-(N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液分散胶乳颗粒,得到胶乳溶液;

(2) 向胶乳溶液中依次加入 N- 羟基琥珀酰亚胺和 1- 乙基-3-(3- 二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺得到混合溶液;将混合溶液搅拌反应后,反应产物离心,弃上清,将沉淀洗涤后在去离子水中悬浮,得到胶乳微球溶液;

(3) 将胰蛋白酶原-2 单克隆或多克隆抗体溶解于 2-(N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液中,得到胰蛋白酶原-2 抗体溶液;

(4) 将胰蛋白酶原-2 抗体溶液与胶乳微球溶液混合均匀,搅拌反应;反应完成后,向反应溶液中加入乙醇胺,搅拌反应,将反应产物离心,弃上清,洗涤沉淀,即得。

5. 按照权利要求 4 所述的方法,其特征在于:步骤(1)中用 0.01-0.1mol/L2-(N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液分散胶乳颗粒,得到胶乳溶液;按 W/V 计,胶乳微球的终浓度为 0.3-5%;

步骤(2)中 N- 羟基琥珀酰亚胺和 1- 乙基-3-(3- 二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺在混合溶液中的终浓度分别为 0.05-1mg/mL 和 0.1-2mg/mL;按 W/V 计,所述胶乳微球的终浓度为 0.3-5%;

步骤(3)中将胰蛋白酶原-2 单克隆或多克隆抗体溶解于 50-100mmol/L2-(N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液中,得到胰蛋白酶原-2 抗体溶液,抗体的终浓度为 0.5-2mg/mL。

6. 按照权利要求 1 所述的胰蛋白酶原-2 含量检测试剂盒,其特征在于:所述的生物缓冲剂为三羟甲基氨基甲烷;所述的生物防腐剂为 Proclin-300;所述的无机盐为氯化钠。

7. 按照权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:每 1 升试剂 I 中各组分的用量为:生物缓冲剂为 2-50g,防腐剂 0.25-3mL,无机盐 2-25g;优选的,每 1 升试剂 I 中各组分的用量为:生物缓冲剂为 5-25g,防腐剂 0.5-1mL,无机盐 5-15g;更优选的,每 1 升试剂 I 中各组分的用量为:生物缓冲剂为 12g,防腐剂 0.6mL,无机盐 9g。

8. 按照权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:每 1 升试剂 II 中各组分的用量为:包被胰蛋白酶原-2 抗体的胶乳颗粒 0.5-4g,生物缓冲剂 2-50g,防腐剂 0.25-3mL;优选的,每 1 升试剂 II 中各组分的用量为:包被胰蛋白酶原-2 抗体的胶乳颗粒 0.8-3g,生物缓冲剂 5-25g,防腐剂 0.5-1mL;更优选的,每 1 升试剂 II 中各组分的用量为:包被胰蛋白酶原-2 抗体的胶乳颗粒 1.7g,生物缓冲剂 12g,防腐剂 0.7mL。

9. 按照权利要求 1-3 任何一项所述的检测试剂盒,其特征在于:试剂 I 的 pH 值范围为 6.5-8.5,试剂 II 的 pH 值的范围为 6.5-8.5。

10. 一种制备权利要求 1-9 任何一项所述检测试剂盒的方法,包括(1) 制备试剂 I :将

各组分溶解于蒸馏水或双蒸水中,混合均匀,定容得到试剂 I ;(2) 制备试剂 II :首先制备胰蛋白酶原 -2 抗体包被的胶乳颗粒溶液,并同时将其余各组分用一定量的蒸馏水和双蒸水溶解,得混合溶液 ;将胶乳颗粒溶液与混合溶液混合均匀,定容,得到试剂 II ;(3) 将试剂 I 和试剂 II 单独分装,密封,即得。

胰蛋白酶原 -2 检测试剂盒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及胰蛋白酶原 -2 含量检测试剂盒,尤其涉及一种人体内胰蛋白酶原 -2 含量的检测试剂盒及其制备方法,本发明进一步涉及该检测试剂盒在检测人体内胰蛋白酶原 -2 含量的使用方法,属于人体内胰蛋白酶原 -2 含量的检测领域。

背景技术

[0002] 急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床常见的急腹症之一,据国外统计,其发病率在 6.5 ~ 80/10 万人,约占急腹症的 10%。有学者认为,其发病机制与基因改变导致胰蛋白酶的过度活化有关。本症起病急,病情险恶,约 20% ~ 30% 的 AP 病例可转化为坏死性胰腺炎,导致败血症等严重并发症,因此,早期确诊和治疗十分重要。血淀粉酶(AMS)是诊断 AP 的常用检测项目,但是其敏感性和特异性都不是十分理想。

[0003] 胰蛋白酶原(trypsinogen, TPS)是胰蛋白酶的前体,有 2 种同工酶:胰蛋白酶原 -1(TPS-1)和胰蛋白酶原 -2(TPS-2)。其中 TPS-2 是丝氨酸蛋白酶,具有激活基质金属酶功能,能引起组织胶原蛋白的溶解。TPS-2 相对分子质量较小,能透过肾小球毛细血管壁,并在肾小管吸收较少。因此,血液和尿液中的 TPS-2 浓度相差不大。国内外关于 TPS-2 诊断胰腺炎的价值评价几乎都认为在灵敏度和特异性方面优于淀粉酶(amylose, AMY)和血清脂肪酶。

[0004] 免疫层析法检测尿胰蛋白酶原 -2,诊断急性胰腺炎的敏感性和特异性分别为 96.3% 和 93.3%。证明免疫层析法尿胰蛋白酶原 -2 的检测可作为诊断急性胰腺炎较好的指标。

[0005] 北京军区总医院研究报道,采用 ELISA 法定量检测,以 44.05 μ g/L 为临界值,血清胰蛋白酶原 -2 鉴别胰腺癌与胰腺炎的敏感度和特异度分别为 63.3% 和 73.9%;以 1.85 μ g/L 为临界值,鉴别诊断胰腺癌与健康人的敏感度为 91.4%,特异度为 95.7%。

[0006] 虽然胰蛋白酶原 -2 是辅助诊断胰腺炎的特异性和敏感性指标,但是该指标目前常用的检测方法为酶联免疫法和免疫层析法。酶联免疫法检测样本的准确度较高,灵敏度高,但是检测过程繁琐,耗时较长,且样本需要批量检测,不适用于及时检验;同时酶联免疫法检测自动化程度低,检测结果受人为因素影响较大。免疫层析法是近几年来国外兴起的一种快速诊断技术,这种方法检测样本迅速,但一般不能定量检测只能用作定性判断。胶乳增强透射免疫比浊检测(PETIA)技术是在胶乳凝集定性试验基础上发展建立的一种非放射性均相免疫测定法,可以对各种微量的抗原物质和小分子半抗原进行精确的定量测定,同时该检测方法耗时短,自动化程度高,目前越来越多的应用到临床实验室中。鉴于胰蛋白酶原 -2 具有明确的诊断意义,开发一种对于胰蛋白酶原 -2 能够快速检测和准确定量的检测试剂盒,对于临床上急性胰腺炎的快速准确诊断具有重要的意义。

发明内容

[0007] 本发明的目的之一是提供一种准确度好、灵敏度高、稳定性好、线性范围广的胰蛋

白酶原 -2 含量检测的胶乳增强透射免疫比浊法检测试剂盒。

[0008] 本发明的目的之二是提供一种所述胰蛋白酶原 -2 含量检测试剂盒的制备方法。

[0009] 本发明的上述目的是通过以下技术方案来实现的：

[0010] 一种胰蛋白酶原 -2 胶乳增强透射免疫比浊法检测试剂盒，由彼此独立的试剂 I 和试剂 II 组成，所述试剂 I 的组分包括：生物缓冲剂、防腐剂、无机盐和水；所述试剂 II 的组分包括：包被胰蛋白酶原 -2 抗体的胶乳颗粒、生物缓冲剂、防腐剂和水。

[0011] 本发明通过大量的实验发现，试剂 II 中胶乳颗粒的粒径对试剂盒的检测灵敏度、线性范围、检测结果的准确性及试剂盒的开瓶稳定性等方面有着极显著的影响；本发明通过大量的实验发现，当胶乳颗粒的粒径为 100-300nm 时，检测灵敏度、线性范围、准确性以及开瓶稳定性等特性要优于其它粒径胶乳颗粒制备的试剂盒。当胶乳颗粒的粒径为 150-250nm 时其性能要优于粒径为 100-150nm 及 250-300nm 的胶乳颗粒制备出的检测试剂盒，尤其是当胶乳颗粒的粒径为 180-220nm 时具有较好的检测效果；本发明非常意外发现，当胶乳颗粒的粒径为 200nm 时所制备出来的检测试剂盒在检测灵敏度、线性范围、准确性以及开瓶稳定性等方面明显优于其它粒径的胶乳颗粒的检测效果。

[0012] 胰蛋白酶原 -2 致敏胶乳颗粒可以采用多种方法进行制备，在各胶乳试剂盒制备的过程中常采用的有物理吸附法和化学键结合交联法；本发明通过实验发现，采用化学键结合交联法制备的包被抗体的胶乳颗粒，其抗体与胶乳微球颗粒表面的基团通过化学键结合，其结合的稳定性要显著优于物理吸附法制备的胶乳颗粒，采用化学交联法抗体与胶乳微球颗粒通过化学键结合，抗体不易从胶乳颗粒表面脱落，有利于维持试剂盒的开瓶稳定性，使产品的货架期及使用周期明显延长。

[0013] 优选的，本发明采用以下所述的化学交联法制备包被抗体的胶乳颗粒，该方法包括如下步骤：

[0014] (1) 胶乳溶液的配制：用 2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液分散胶乳颗粒，得到胶乳溶液；

[0015] (2) 向胶乳溶液中依次加入 N- 羟基琥珀酰亚胺和 1- 乙基 -3- (3- 二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺得到混合溶液；将混合溶液搅拌反应后，反应产物离心，弃上清，沉淀洗涤后在去离子水中悬浮，得到胶乳微球溶液；

[0016] (3) 将胰蛋白酶原 -2 单克隆或多克隆抗体溶解于 2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液中，得到胰蛋白酶原 -2 抗体溶液；

[0017] (4) 将胰蛋白酶原 -2 抗体溶液与胶乳微球溶液混合均匀，搅拌反应；反应完成后，向反应溶液中加入乙醇胺，搅拌反应，将反应产物离心，弃上清，洗涤沉淀，即得。

[0018] 为了达到更好的技术效果，步骤(1)中用 0.01-0.1mol/L 2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液分散胶乳颗粒，得到胶乳溶液；按 W/V 计，胶乳微球的终浓度优选为 0.3-5%。

[0019] 步骤(2)中，N- 羟基琥珀酰亚胺和 1- 乙基 -3- (3- 二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺在混合溶液中的终浓度分别为 0.05-1mg/mL 和 0.1-2mg/mL；按 W/V 计，所述胶乳微球的终浓度为 0.3-5%。

[0020] 步骤(3)中，优选的，将胰蛋白酶原 -2 单克隆或多克隆抗体溶解于 50-100mmol/L 2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液中，得到胰蛋白酶原 -2 抗体溶液，抗体的终浓度优选为 0.5-2mg/mL。

[0021] 为了达到更好的检测效果,本发明每 1 升试剂 I 中各组分的用量为:生物缓冲剂为 2-50g,防腐剂 0.25-3mL,无机盐 2-25g;优选的,每 1 升试剂 I 中各组分的用量为:生物缓冲剂为 5-25g,防腐剂 0.5-1mL,无机盐 5-15g;更优选的,每 1 升试剂 I 中各组分的用量为:生物缓冲剂为 12g,防腐剂 0.6mL,无机盐 9g;

[0022] 本发明每 1 升试剂 II 中各组分的用量为:包被胰蛋白酶原 -2 抗体的胶乳颗粒 0.5-4g,生物缓冲剂 2-50g,防腐剂 0.25-3mL;优选的,每 1 升试剂 II 中各组分的用量为:包被胰蛋白酶原 -2 抗体的胶乳颗粒 0.8-3g,生物缓冲剂 5-25g,防腐剂 0.5-1mL;更优选的,每 1 升试剂 II 中各组分的用量为:包被胰蛋白酶原 -2 抗体的胶乳颗粒 1.7g,生物缓冲剂 12g,防腐剂 0.7mL。

[0023] 本发明试剂 I 或试剂 II 中所述的防腐剂主要是为了防止细菌滋生导致的产品变质,防止因产品质量问题对检测结果带来的不良影响,因此,任何一种能阻止细菌及真菌繁殖的物质均能作为本发明的防腐剂,如:苯甲酸钠、叠氮化钠或它们的混合物;本发明试剂 I 或试剂 II 优选 Proclin-300 作为防腐剂,采用 Proclin-300 作为防腐剂用量小,且毒性小,不与其他组分发生交叉反应对试剂盒的稳定性等方面有优势,同时 Proclin-300 不与检测样本中的物质发生反应不会对检测结果造成不良影响。

[0024] 本发明试剂 I 或试剂 II 中所述的生物缓冲剂是能够用于维持一定 pH 值的各种生物缓冲剂,例如可以是三羟甲基氨基甲烷(Tris)、三羟甲基胺基乙磺酸(Tris)、2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸(HEPES)、三羟甲基胺基丙磺酸(TAPS)、哌嗪-1,4-二羟基丙磺酸(POPSO)、3-(N-吗啡啉)丙磺酸(MOPS)等各种常用生物缓冲液,为了维持反应过程中反应体系的稳定性避免对检测结果造成不良影响,本发明试剂 I 和试剂 II 采用同一种生物缓冲剂,优选为三羟甲基氨基甲烷(Tris)。

[0025] 本发明试剂 I 所述的无机盐在反应体系中能影响样本中的抗原与试剂中的抗体发生反应,有利于交联的形成,其浓度对形成的交联物的大小有一定的影响,从而对检测结果有一定影响;常见的各种无机盐均能用于本试剂盒中,本发明优选氯化钠作为无机盐组分。

[0026] 本发明试剂 I 或试剂 II 的 pH 值的范围优选为 6.5-8.5。

[0027] 本发明检测试剂盒中所用到的每种组分均能通过商业途径从生物试剂公司或医药公司购买得到。

[0028] 本发明的目的之二是提供一种制备所述检测胰蛋白酶原 -2 试剂盒的方法,包括:

[0029] (1) 制备试剂 I:将各组分溶解于蒸馏水或双蒸水中,混合均匀,定容得到试剂 I; (2) 制备试剂 II:首先制备胰蛋白酶原 -2 抗体包被的胶乳颗粒溶液,并同时将其余各组分用一定量的蒸馏水和双蒸水溶解,得混合溶液;将胶乳颗粒溶液与混合溶液混合均匀,定容,得到试剂 II; (3) 将试剂 I 和试剂 II 单独分装,密封,即得。

[0030] 本发明的目的之三是提供所述胰蛋白酶原 -2 检测试剂盒检测样品中胰蛋白酶原 -2 含量的检测方法(该方法为两点终点法),包括以下步骤:

[0031] 向 10 μ L 待检测样本(校准管以校准品做样品,空白以蒸馏水为样品,校准品粉末购自美国 R&D Systems, Inc. 公司)中加入 120 μ L 的试剂 I 充分混匀,于 37 $^{\circ}$ C 恒温 5 分钟,再向混合体系中加入 30 μ L 试剂 II,混匀,37 $^{\circ}$ C 恒温 1 分钟后,空白管调零,波长 560nm,测定各管吸光度 A1,4 分钟后测定各管吸光度 A2,计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。根据多点校准品浓度和对

应吸光度变化值 ΔA , 采用多点非线性校准模式确定工作曲线, 样本吸光度变化在工作曲线上相对应的浓度值即为测定浓度。

[0032] 本发明检测试剂盒采用粒径为 100-300nm 的胶乳颗粒制备包被胰蛋白酶原 -2 抗体的胶乳颗粒, 能有效保证试剂盒的灵敏度、检测线性范围、测值准确性及开瓶稳定性, 同时本发明检测试剂盒抗体包被胶乳颗粒的工艺采用化学交联法保证了抗体与胶乳颗粒的结合稳定性, 从而保证了检测试剂盒的稳定性, 包被胶乳颗粒的胰蛋白酶原 -2 抗体能特异性的识别样本中的胰蛋白酶原 -2 抗原, 并与之结合, 保证了试剂盒具有良好的特异性, 此外, 该试剂盒中的各种组分的选择和配比也是试剂盒优良性能的保证。

附图说明

[0033] 图 1 为本发明胰蛋白酶原 -2 检测试剂盒标准工作曲线。

[0034] 图 2 为本发明实施例 1 与对比实施例 1、2、6、7 制备的胰蛋白酶原 -2 检测试剂盒标准工作曲线的比对。

[0035] 图 3 为本发明实施例 1 与对比实施例 7 制备的胰蛋白酶原 -2 检测试剂盒热稳定性比对。

[0036] 图 4 为本发明检测试剂盒与市售酶联免疫检测试剂盒测定人血清中胰蛋白酶原 -2 含量其结果的相关性。

具体实施方式

[0037] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明, 本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的, 并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是, 在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换, 但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0038] 预备实施例 1 包被胰蛋白酶原 -2 抗体的胶乳颗粒的制备

[0039] (1) 胶乳溶液的配制: 取 1g 粒径为 200nm 的聚苯乙烯胶乳微球颗粒, 并用 100mL 的 0.05mol/L 2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液分散胶乳颗粒, 胶乳微球颗粒的终浓度为 1% (W/V);

[0040] (2) 向(1)步胶乳溶液中加入 10mg 的 N-羟基琥珀酰亚胺, 其终浓度为 0.1mg/mL; 加入 50mg 的 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺, 其终浓度为 0.5mg/mL, 搅拌使各物质充分溶解, 在室温下将此混合物搅拌反应 30 分钟, 反应完成后, 将反应体系于 18000 转/min, 离心 30min, 弃上清;

[0041] (3) 用 0.05mol/L 2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液洗涤(2)步沉淀物, 除去未反应的 N-羟基琥珀酰亚胺和 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺; 将胶乳微球用 100mL 去离子水悬浮, 使胶乳微球的终浓度为 1% (W/V);

[0042] (4) 将 1mg 胰蛋白酶原 -2 单克隆抗体(购自 LifeSpan BioSciences, Inc. 公司)溶解于 1mL 75mmol/L 2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液中, 抗体的终浓度为 1mg/mL;

[0043] (5) 将(4)步的胰蛋白酶原 -2 抗体溶液与(3)步的胶乳微球溶液按照 1:80 的体积比例混合, 将反应体系搅拌混匀, 并将混合体系于室温下轻轻搅拌反应 4h;

[0044] (6) 上述反应完成后, 向反应溶液中加入一定量的乙醇胺, 乙醇胺的加入量为每

1mL 反应混合液为 2.5uL, 搅拌反应 10min, 反应完成后, 将反应体系于 18000 转 /min, 离心 30min, 倾去上清, 用 0.05mol/L2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液洗涤胶乳微球颗粒, 去除未结合的蛋白质和乙醇胺, 用 50mL0.05mol/L2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液复溶胶乳颗粒, 既得包被抗体的胶乳颗粒溶液。

[0045] 预备实施例 2 包被胰蛋白酶原 -2 抗体的胶乳颗粒的制备

[0046] (1) 胶乳溶液的配制: 取 0.8g 粒径为 150nm 的聚苯乙烯胶乳微球颗粒, 并用 100mL 的 0.05mol/L2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液分散胶乳颗粒, 胶乳微球颗粒的终浓度为 0.8% (W/V);

[0047] (2) 向(1)步胶乳溶液中加入 15mg 的 N- 羟基琥珀酰亚胺, 其终浓度为 0.15mg/mL; 加入 40mg 的 1- 乙基 -3- (3- 二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺, 其终浓度为 0.4mg/mL, 搅拌使各物质充分溶解, 在室温下将此混合物搅拌反应 30 分钟, 反应完成后, 将反应体系于 20000 转 /min, 离心 20min, 弃上清;

[0048] (3) 用 0.05mol/L2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液洗涤(2)步沉淀物, 除去未反应的 N- 羟基琥珀酰亚胺和 1- 乙基 -3- (3- 二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺; 将胶乳微球用 100mL 去离子水悬浮, 使胶乳微球的终浓度为 0.8% (W/V);

[0049] (4) 将 1mg 胰蛋白酶原 -2 多克隆抗体(购自 LifeSpan BioSciences, Inc. 公司) 溶解于 1mL80mmol/L2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液中, 抗体的终浓度为 1mg/mL;

[0050] (5) 将(4)步的胰蛋白酶原 -2 抗体溶液与(3)步的胶乳微球溶液按照 1:100 的体积比例混合, 并将混合体系于室温下轻轻搅拌反应 4h;

[0051] (6) 上述反应完成后, 向反应溶液中加入一定量的乙醇胺, 乙醇胺的加入量为每 1mL 反应混合液为 3uL, 搅拌反应 15min, 反应完成后, 将反应体系于 20000 转 /min, 离心 30min, 倾去上清, 用 0.05mol/L2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液洗涤胶乳微球颗粒, 去除未结合的蛋白质和乙醇胺, 用 50mL0.05mol/L2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液复溶胶乳颗粒, 既得包被抗体的胶乳颗粒溶液。

[0052] 预备实施例 3 包被胰蛋白酶原 -2 抗体的胶乳颗粒的制备

[0053] (1) 胶乳溶液的配制: 取 1.2g 粒径为 250nm 的聚苯乙烯胶乳微球颗粒, 并用 100mL 的 0.05mol/L2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液分散胶乳颗粒, 胶乳微球颗粒的终浓度为 1.2% (W/V);

[0054] (2) 向(1)步胶乳溶液中加入 20mg 的 N- 羟基琥珀酰亚胺, 其终浓度为 0.2mg/mL; 加入 50mg 的 1- 乙基 -3- (3- 二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺, 其终浓度为 0.5mg/mL, 搅拌使各物质充分溶解, 在室温下将此混合物搅拌反应 40 分钟, 反应完成后, 将反应体系于 18000 转 /min, 离心 30min, 弃上清;

[0055] (3) 用 0.05mol/L2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液洗涤(2)步沉淀物, 除去未反应的 N- 羟基琥珀酰亚胺和 1- 乙基 -3- (3- 二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺; 将胶乳微球用 100mL 去离子水悬浮, 使胶乳微球的终浓度为 1.2% (W/V);

[0056] (4) 将 1mg 胰蛋白酶原 -2 多克隆抗体(购自 LifeSpan BioSciences, Inc. 公司) 溶解于 1mL80mmol/L2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液中, 抗体的终浓度为 1mg/mL;

[0057] (5) 将(4)步的胰蛋白酶原 -2 抗体溶液与(3)步的胶乳微球溶液按照 1:90 的体积比例混合, 并将混合体系于室温下轻轻搅拌反应 5h;

[0058] (6) 上述反应完成后,向反应溶液中加入一定量的乙醇胺,乙醇胺的加入量为每 1mL 反应混合液为 2 μ L,搅拌反应 20min,反应完成后,将反应体系于 18000 转 /min,离心 30min,倾去上清,用 0.05mol/L2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液洗涤胶乳微球颗粒,去除未结合的蛋白质和乙醇胺,用 50mL0.05mol/L2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液复溶胶乳颗粒,既得包被抗体的胶乳颗粒溶液。

[0059] 预备实施例 4 包被胰蛋白酶原 -2 抗体的胶乳颗粒的制备

[0060] (1) 胶乳溶液的配制:取 1g 粒径为 100nm 的聚苯乙烯胶乳微球颗粒,并用 100mL 的 0.03mol/L2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液分散胶乳颗粒,胶乳微球颗粒的终浓度为 1% (W/V);

[0061] (2) 向(1)步胶乳溶液中加入 18mg 的 N- 羟基琥珀酰亚胺,其终浓度为 0.18mg/mL;加入 35mg 的 1- 乙基 -3- (3- 二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺,其终浓度为 0.35mg/mL,搅拌使各物质充分溶解,在室温下将此混合物搅拌反应 45 分钟,反应完成后,将反应体系于 18000 转 /min,离心 30min,弃上清;

[0062] (3) 用 0.03mol/L2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液洗涤(2)步沉淀物,除去未反应的 N- 羟基琥珀酰亚胺和 1- 乙基 -3- (3- 二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺;将胶乳微球用 100mL 去离子水悬浮,使胶乳微球的终浓度为 1% (W/V);

[0063] (4) 将 0.1mg 胰蛋白酶原 -2 多克隆抗体(购自 LifeSpan BioSciences, Inc. 公司) 溶解于 0.1mL80mmol/L2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液中,抗体的终浓度为 1mg/mL;

[0064] (5) 将(4)步的胰蛋白酶原 -2 抗体溶液与(3)步的胶乳微球溶液按照 1:70 的体积比例混合,将反应体系搅拌混匀,并将混合体系于室温下轻轻搅拌反应 5h;

[0065] (6) 上述反应完成后,向反应溶液中加入一定量的乙醇胺,乙醇胺的加入量为每 1mL 反应混合液为 2 μ L,搅拌反应 20min,反应完成后,将反应体系于 18000 转 /min,离心 30min,倾去上清,用 0.05mol/L2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液洗涤胶乳微球颗粒,去除未结合的蛋白质和乙醇胺,用 50mL0.05mol/L2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液复溶胶乳颗粒,既得包被抗体的胶乳颗粒溶液。

[0066] 预备实施例 5 包被胰蛋白酶原 -2 抗体的胶乳颗粒的制备

[0067] (1) 胶乳溶液的配制:取 1.5g 粒径为 300nm 的聚苯乙烯胶乳微球颗粒,并用 100mL 的 0.06mol/L2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液分散胶乳颗粒,胶乳微球颗粒的终浓度为 1.5% (W/V);

[0068] (2) 向(1)步胶乳溶液中加入 25mg 的 N- 羟基琥珀酰亚胺,其终浓度为 0.25mg/mL;加入 40mg 的 1- 乙基 -3- (3- 二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺,其终浓度为 0.4mg/mL,搅拌使各物质充分溶解,在室温下将此混合物搅拌反应 30 分钟,反应完成后,将反应体系于 15000 转 /min,离心 30min,弃上清;

[0069] (3) 用 0.06mol/L2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液洗涤(2)步沉淀物,除去未反应的 N- 羟基琥珀酰亚胺和 1- 乙基 -3- (3- 二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺;将胶乳微球用 100mL 去离子水悬浮,使胶乳微球的终浓度为 1.5% (W/V);

[0070] (4) 将 0.1mg 胰蛋白酶原 -2 多克隆抗体(购自 LifeSpan BioSciences, Inc. 公司) 溶解于 0.1mL50mmol/L2- (N- 吗啡啉) 乙磺酸缓冲液中,抗体的终浓度为 1mg/mL;

[0071] (5) 将(4)步的胰蛋白酶原 -2 抗体溶液与(3)步的胶乳微球溶液按照 1:50 的体

积比例混合,将反应体系搅拌混匀,并将混合体系于室温下轻轻搅拌反应 3h;

[0072] (6) 上述反应完成后,向反应溶液中加入一定量的乙醇胺,乙醇胺的加入量为每 1mL 反应混合液为 3 μ L,搅拌反应 30min,反应完成后,将反应体系于 15000 转/min,离心 30min,倾去上清,用 0.06mol/L2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液洗涤胶乳微球颗粒,去除未结合的蛋白质和乙醇胺,用 50mL0.06mol/L2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液复溶胶乳颗粒,既得包被抗体的胶乳颗粒溶液。

[0073] 预备实施例 6 包被胰蛋白酶原-2 抗体的胶乳颗粒的制备

[0074] (1)胶乳溶液的配制:取 1g 粒径为 180nm 的聚苯乙烯胶乳微球颗粒,并用 100mL 的 0.05mol/L2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液分散胶乳颗粒,胶乳微球颗粒的终浓度为 1% (W/V);

[0075] (2)向(1)步胶乳溶液中加入 20mg 的 N-羟基琥珀酰亚胺,其终浓度为 0.2mg/mL;加入 30mg 的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺,其终浓度为 0.3mg/mL,搅拌使各物质充分溶解,在室温下将此混合物搅拌反应 30 分钟,反应完成后,将反应体系于 20000 转/min,离心 30min,弃上清;

[0076] (3)用去离子水洗涤(2)步沉淀物,除去未反应的 N-羟基琥珀酰亚胺和 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺;将胶乳微球用 100mL 去离子水悬浮,使胶乳微球的终浓度为 1% (W/V);

[0077] (4)将 0.1mg 胰蛋白酶原-2 多克隆抗体(购自 LifeSpan BioSciences, Inc. 公司)溶解于 0.1mL40mmol/L2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液中,抗体的终浓度为 1mg/mL;

[0078] (5)将(4)步的胰蛋白酶原-2 抗体溶液与(3)步的胶乳微球溶液按照 1:90 的体积比例混合,将反应体系搅拌混匀,并将混合体系于室温下轻轻搅拌反应 3.5h;

[0079] (6)上述反应完成后,向反应溶液中加入一定量的乙醇胺,乙醇胺的加入量为每 1mL 反应混合液为 2 μ L,搅拌反应 40min,反应完成后,将反应体系于 20000 转/min,离心 30min,倾去上清,用去离子水洗涤胶乳微球颗粒,去除未结合的蛋白质和乙醇胺,用 50mL0.05mol/L2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液复溶胶乳颗粒,既得包被抗体的胶乳颗粒溶液。

[0080] 预备实施例 7 包被胰蛋白酶原-2 抗体的胶乳颗粒的制备

[0081] (1)胶乳溶液的配制:取 0.7g 粒径为 220nm 的聚苯乙烯胶乳微球颗粒,并用 100mL 的 0.05mol/L2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液分散胶乳颗粒,胶乳微球颗粒的终浓度为 0.7% (W/V);

[0082] (2)向(1)步胶乳溶液中加入 10mg 的 N-羟基琥珀酰亚胺,其终浓度为 0.1mg/mL;加入 25mg 的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺,其终浓度为 0.25mg/mL,搅拌使各物质充分溶解,在室温下将此混合物搅拌反应 30 分钟,反应完成后,将反应体系于 20000 转/min,离心 40min,弃上清;

[0083] (3)用去离子水洗涤(2)步沉淀物,除去未反应的 N-羟基琥珀酰亚胺和 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺;将胶乳微球用 100mL 去离子水悬浮,使胶乳微球的终浓度为 0.7% (W/V);

[0084] (4)将 0.1mg 胰蛋白酶原-2 多克隆抗体(购自 LifeSpan BioSciences, Inc. 公司)溶解于 0.2mL40mmol/L2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液中,抗体的终浓度为 0.05mg/mL;

[0085] (5)将(4)步的胰蛋白酶原-2 抗体溶液与(3)步的胶乳微球溶液按照 1:50 的体

积比例混合,将反应体系搅拌均匀,并将混合体系于室温下轻轻搅拌反应 3.5h;

[0086] (6) 上述反应完成后,向反应溶液中加入一定量的乙醇胺,乙醇胺的加入量为每 1mL 反应混合液为 2 μ L,搅拌反应 30min,反应完成后,将反应体系于 20000 转/min,离心 40min,倾去上清,用去离子水洗涤胶乳微球颗粒,去除未结合的蛋白质和乙醇胺,用 50mL 0.05mol/L 2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液复溶胶乳颗粒,既得包被抗体的胶乳颗粒溶液。

[0087] 实施例 1 检测试剂盒的制备

[0088] 1、试剂 I 的制备:

[0089] 按所述用量取各组分:

[0090] 三羟甲基氨基甲烷 12g

[0091] Proclin300 0.7mL

[0092] 氯化钠 9g

[0093] 将上述各组分溶解于 900mL 双蒸水中,用 1mol/L 盐酸和 1mol/L 氢氧化钠溶液调节溶液 pH 至 7.5,后用蒸馏水定容至 1L,密封 4 $^{\circ}$ C 保存,备用。

[0094] 2、试剂 II 的制备:

[0095] 按所述用量量取各组分:

[0096] Proclin300 0.7mL

[0097] 三羟甲基氨基甲烷 12g

[0098] 将上述各组分溶解于 600mL 双蒸水中,搅拌、充分溶解,后加入 1.5g 预备实施例 1 制备的包被胰蛋白酶原 -2 抗体的胶乳颗粒溶液,充分混匀之后,用 1mol/L 盐酸和 1mol/L 氢氧化钠溶液调节溶液 pH 至 7.5,后用双蒸水定容至 1L,密封 4 $^{\circ}$ C 保存,备用。

[0099] 实施例 2 检测试剂盒的制备

[0100] 1、试剂 I 的制备:

[0101] 按所述用量取各组分:

[0102] 三羟甲基氨基甲烷 18g

[0103] Proclin300 1mL

[0104] 氯化钠 10g

[0105] 将上述各组分溶解于 900mL 双蒸水中,用 1mol/L 盐酸和 1mol/L 氢氧化钠溶液调节溶液 pH 至 7.5,后用蒸馏水定容至 1L,密封 4 $^{\circ}$ C 保存,备用。

[0106] 2、试剂 II 的制备:

[0107] 按所述用量量取各组分:

[0108] Proclin300 1mL

[0109] 三羟甲基氨基甲烷 18g

[0110] 将上述各组分溶解于 600mL 双蒸水中,搅拌、充分溶解,后加入 2g 预备实施例 2 制备的包被胰蛋白酶原 -2 抗体的胶乳颗粒溶液,充分混匀之后,用 1mol/L 盐酸和 1mol/L 氢氧化钠溶液调节溶液 pH 至 7.5,后用双蒸水定容至 1L,密封 4 $^{\circ}$ C 保存,备用。

[0111] 实施例 3 检测试剂盒的制备

[0112] 1、试剂 I 的制备:

[0113] 按所述用量取各组分:

[0114] 三羟甲基氨基甲烷 10g

- [0115] Proclin300 0.6mL
- [0116] 氯化钠 8g
- [0117] 将上述各组分溶解于 900mL 双蒸水中,用 1mol/L 盐酸和 1mol/L 氢氧化钠溶液调节溶液 pH 至 7.0,后用蒸馏水定容至 1L,密封 4℃保存,备用。
- [0118] 2、试剂 II 的制备:
- [0119] 按所述用量量取各组分:
- [0120] Proclin300 0.6mL
- [0121] 三羟甲基氨基甲烷 10g
- [0122] 将上述各组分溶解于 600mL 双蒸水中,搅拌、充分溶解,后加入 1.2g 预备实施例 3 制备的包被胰蛋白酶原 -2 抗体的胶乳颗粒溶液,充分混匀之后,用 1mol/L 盐酸和 1mol/L 氢氧化钠溶液调节溶液 pH 至 7.0,后用双蒸水定容至 1L,密封 4℃保存,备用。
- [0123] 实施例 4 检测试剂盒的制备
- [0124] 1、试剂 I 的制备:
- [0125] 按所述用量量取各组分:
- [0126] 三羟甲基氨基甲烷 30g
- [0127] Proclin300 1.5mL
- [0128] 氯化钠 15g
- [0129] 将上述各组分溶解于 900mL 双蒸水中,用 1mol/L 盐酸和 1mol/L 氢氧化钠溶液调节溶液 pH 至 8.0,后用蒸馏水定容至 1L,密封 4℃保存,备用。
- [0130] 2、试剂 II 的制备:
- [0131] 按所述用量量取各组分:
- [0132] Proclin300 1.5mL
- [0133] 三羟甲基氨基甲烷 30g
- [0134] 将上述各组分溶解于 600mL 双蒸水中,搅拌、充分溶解,后加入 1.5g 预备实施例 4 制备的包被胰蛋白酶原 -2 抗体的胶乳颗粒溶液,充分混匀之后,用 1mol/L 盐酸和 1mol/L 氢氧化钠溶液调节溶液 pH 至 8.0,后用双蒸水定容至 1L,密封 4℃保存,备用。
- [0135] 实施例 5 检测试剂盒的制备
- [0136] 1、试剂 I 的制备:
- [0137] 按所述用量量取各组分:
- [0138] 三羟甲基氨基甲烷 6g
- [0139] Proclin300 1.2mL
- [0140] 氯化钠 20g
- [0141] 将上述各组分溶解于 900mL 双蒸水中,用 1mol/L 盐酸和 1mol/L 氢氧化钠溶液调节溶液 pH 至 7.3,后用蒸馏水定容至 1L,密封 4℃保存,备用。
- [0142] 2、试剂 II 的制备:
- [0143] 按所述用量量取各组分:
- [0144] Proclin300 1.2mL
- [0145] 三羟甲基氨基甲烷 6g
- [0146] 将上述各组分溶解于 600mL 双蒸水中,搅拌、充分溶解,后加入 1g 预备实施例 5 制

备的包被胰蛋白酶原-2抗体的胶乳颗粒溶液,充分混匀之后,用1mol/L盐酸和1mol/L氢氧化钠溶液调节溶液pH至7.3后用双蒸水定容至1L,密封4℃保存,备用。

[0147] 实施例6检测试剂盒的制备

[0148] 1、试剂I的制备:

[0149] 按所述用量取各组分:

[0150] 三羟甲基氨基甲烷 15g

[0151] Proclin300 1.7mL

[0152] 氯化钠 12g

[0153] 将上述各组分溶解于900mL双蒸水中,用1mol/L盐酸和1mol/L氢氧化钠溶液调节溶液pH至7.3,后用蒸馏水定容至1L,密封4℃保存,备用。

[0154] 2、试剂II的制备:

[0155] 按所述用量量取各组分:

[0156] Proclin300 1.7mL

[0157] 三羟甲基氨基甲烷 15g

[0158] 将上述各组分溶解于600mL双蒸水中,搅拌、充分溶解,后加入1g预备实施例6制备的包被胰蛋白酶原-2抗体的胶乳颗粒溶液,充分混匀之后,用1mol/L盐酸和1mol/L氢氧化钠溶液调节溶液pH至7.3,后用双蒸水定容至1L,密封4℃保存,备用。

[0159] 实施例7检测试剂盒的制备

[0160] 1、试剂I的制备:

[0161] 按所述用量取各组分:

[0162] 三羟甲基氨基甲烷 14g

[0163] Proclin300 0.8mL

[0164] 氯化钠 9g

[0165] 将上述各组分溶解于900mL双蒸水中,用1mol/L盐酸和1mol/L氢氧化钠溶液调节溶液pH至7.2,后用蒸馏水定容至1L,密封4℃保存,备用。

[0166] 2、试剂II的制备:

[0167] 按所述用量量取各组分:

[0168] Proclin300 0.8mL

[0169] 三羟甲基氨基甲烷 14g

[0170] 将上述各组分溶解于600mL双蒸水中,搅拌、充分溶解,后加入1g预备实施例7制备的包被胰蛋白酶原-2抗体的胶乳颗粒溶液,充分混匀之后,用1mol/L盐酸和1mol/L氢氧化钠溶液调节溶液pH至7.2,后用双蒸水定容至1L,密封4℃保存,备用。

[0171] 对比实施例1胰蛋白酶原-2检测试剂盒的制备

[0172] 除了胶乳颗粒的粒径为90nm外,其余均与实施例4完全相同。

[0173] 对比实施例2胰蛋白酶原-2检测试剂盒的制备

[0174] 除了胶乳颗粒的粒径为310nm外,其余均与实施例5完全相同。

[0175] 对比实施例3胰蛋白酶原-2检测试剂盒的制备

[0176] 除了胶乳颗粒的粒径为80nm外,其余均与实施例1完全相同。

[0177] 对比实施例4胰蛋白酶原-2检测试剂盒的制备

- [0178] 除了胶乳颗粒的粒径为 320nm 外,其余均与实施例 3 完全相同。
- [0179] 对比实施例 5 胰蛋白酶原 -2 检测试剂盒的制备
- [0180] 除了胶乳颗粒的粒径为 70nm 外,其余均与实施例 2 完全相同。
- [0181] 对比实施例 6 胰蛋白酶原 -2 检测试剂盒的制备
- [0182] 除了胶乳颗粒的粒径为 60nm 外,其余均与实施例 6 完全相同。
- [0183] 对比实施例 7 胰蛋白酶原 -2 检测试剂盒的制备
- [0184] 除了胶乳颗粒的粒径为 350nm 外,其余均与实施例 7 完全相同。
- [0185] 试验例 1 本发明检测试剂盒标准工作曲线
- [0186] 配制浓度为 0ng/mL, 4ng/mL, 8ng/mL, 16ng/mL, 32ng/mL, 64ng/mL 的胰蛋白酶原 -2 标准品溶液,用本发明实施例 1-7 及对比实施例 1-7 所制备的胰蛋白酶原 -2 检测试剂盒分别对其进行检测,绘制各检测试剂盒标准工作曲线。
- [0187] 各试剂盒标准工作曲线见图 1 和图 2,从图 1 可以看出本发明实施例 1-7 所制备的检测试剂盒具有良好的线性,根据图 2 可以看出本发明实施例 1-7 所制备的检测试剂盒的线性范围要明显的优于对比实施例 1-7 所制备的检测试剂盒。此外,本发明采用最优化的条件制备出的试剂盒(即实施例 1 所制备的试剂盒),其标准工作曲线较其余试剂盒(实施例 2-7 所制备的试剂盒)线性更优良,其标准工作曲线接近于直线。
- [0188] 试验例 2 本发明检测试剂盒的重复性和准确度试验
- [0189] 用购自美国 R&D Systems, Inc. 公司的胰蛋白酶原 -2 粉末配制 4ng/mL 的校准品作为样本,用本发明实施例 1、实施例 4 及实施例 5 制备的检测试剂盒测定校准品溶液,每个试剂盒重复测定 10 次,分别计算测定均值(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 $(1-M/\text{样本浓度}) \times 100\%$ 计算相对偏差进行准确度考察。
- [0190] 试验结果见下表 1,由表 1 的结果可知本发明实施例 1 采用最优粒径制备的检测试剂盒,其准确度及精密度优于采用其他粒径制备的检测试剂盒。
- [0191] 表 1 本发明检测试剂盒的重复性及准确度结果
- [0192]

测试序号	实施例 1	实施例 4	实施例 5
1	3.986	3.906	4.032
2	3.991	3.876	3.945
3	4.005	4.102	3.967
4	4.003	4.111	4.012
5	3.994	3.994	4.065
6	4.008	4.012	3.918
7	3.989	3.912	3.899
8	4.012	4.087	4.025
9	4.015	3.901	3.906
10	4.008	4.056	4.078
平均值 (M)	4.001	3.996	3.985
标准差 (S)	0.009	0.087	0.063
变异系数 (CV%)	0.225%	2.177%	1.581%
相对偏差 (Bias%)	0.025%	0.100%	0.375%

[0193] 试验例 3 本发明检测试剂盒的灵敏度试验

[0194] 以生理盐水为空白样本,用实施例 1 所制备的检测试剂盒重复测定 20 次,计算结果均值为 0.0005,标准差 S 为 0.00031,根据以空白均值加上两倍标准差的方法计算吸光度变化量为 0.00112,用稀释后浓度分别为 1ng/mL、2ng/mL 和 3ng/mL 的胰蛋白酶原-2 校准品溶液,吸光度变化值为 0.0004、0.0013 和 0.0032,其中 2ng/mL 胰蛋白酶原-2 校准品吸光度变化值与空白测值的计算结果 0.00112,因此本发明检测试剂盒检测胰蛋白酶原-2 的灵敏度可达 2ng/mL,适合低值样本的检测应用。

[0195] 试验例 4 本发明检测试剂盒热稳定性检测试验

[0196] 将本发明实施例 1 及对比实施例 7 所制备的检测试剂盒置于 37℃ 分别热处理 0 天、3 天、5 天和 7 天,在不同的处理时间之后分别测定胰蛋白酶原-2 校准品,记录其 ΔA 值,并绘制其变化曲线。试验结果见图 3。从图 3 中结果可知本发明检测试剂盒具有良好的热稳定性。

[0197] 试验例 5 本发明试剂盒与酶联免疫分析试剂盒测值的相关性试验

[0198] 1、供试试剂盒

[0199] (1) 实施例 1 所制备的试剂盒。

[0200] (2) 对照检测试剂盒:酶联免疫试剂盒(购自 antibodies-online 公司)。

[0201] 2、试验方法及结果

[0202] 通过用本发明实施例 1 所制备的试剂盒与购自 antibodies-online 公司的酶联免疫试剂盒测定血清样本中胰蛋白酶原 -2 的含量的测定值进行比较, 试验结果为图 4 所示, 并进行回归分析。从图 4 中可以看出本发明试剂盒与酶联试剂盒在血清中胰蛋白酶原 -2 测定方面具有良好的相关性。

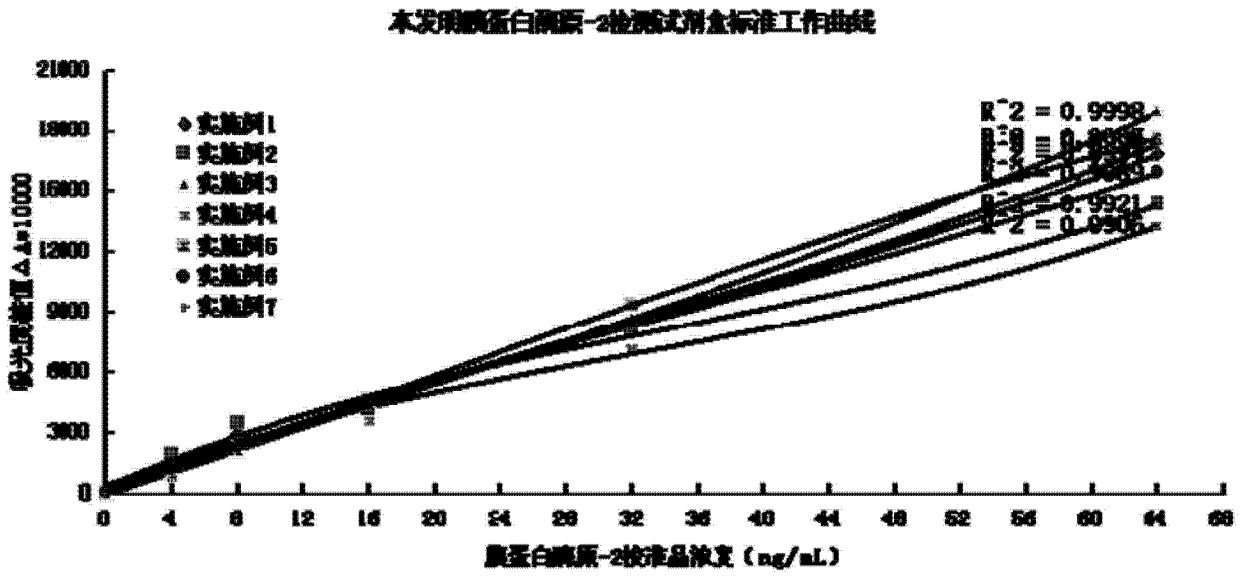


图 1

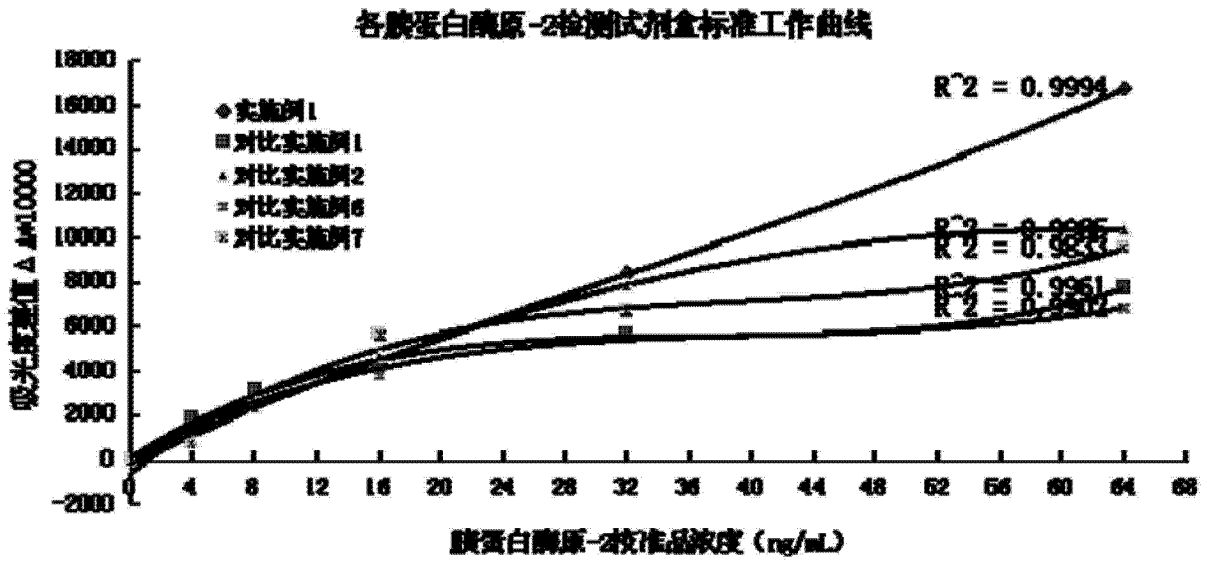


图 2

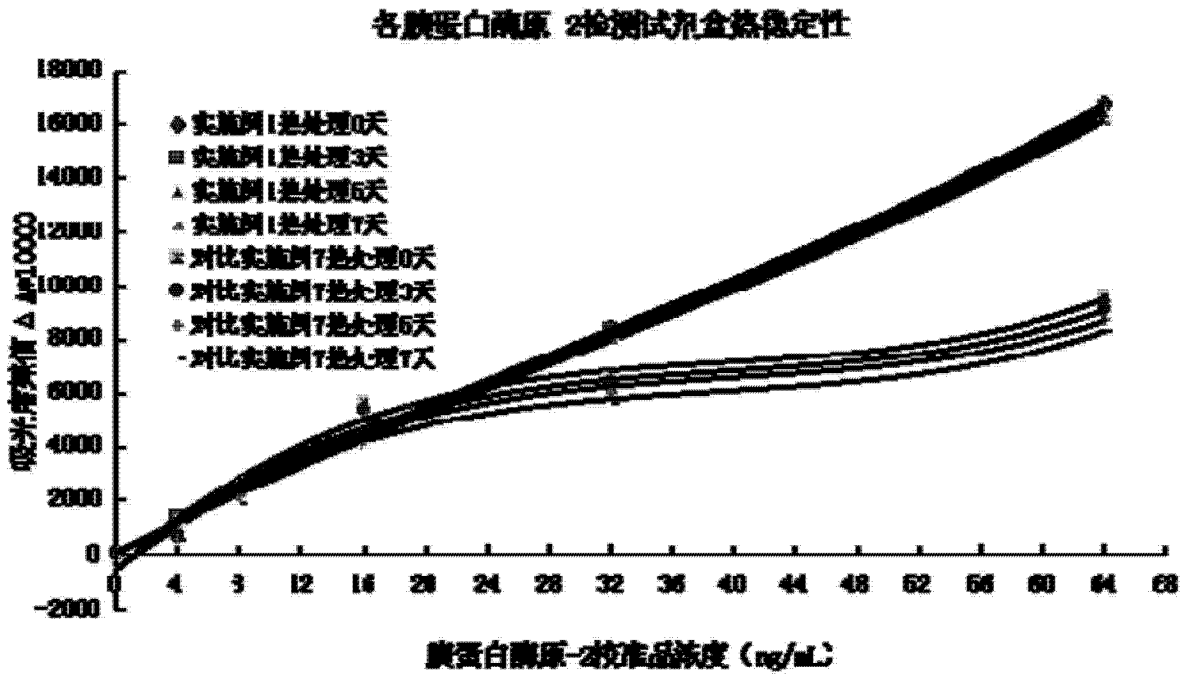


图 3

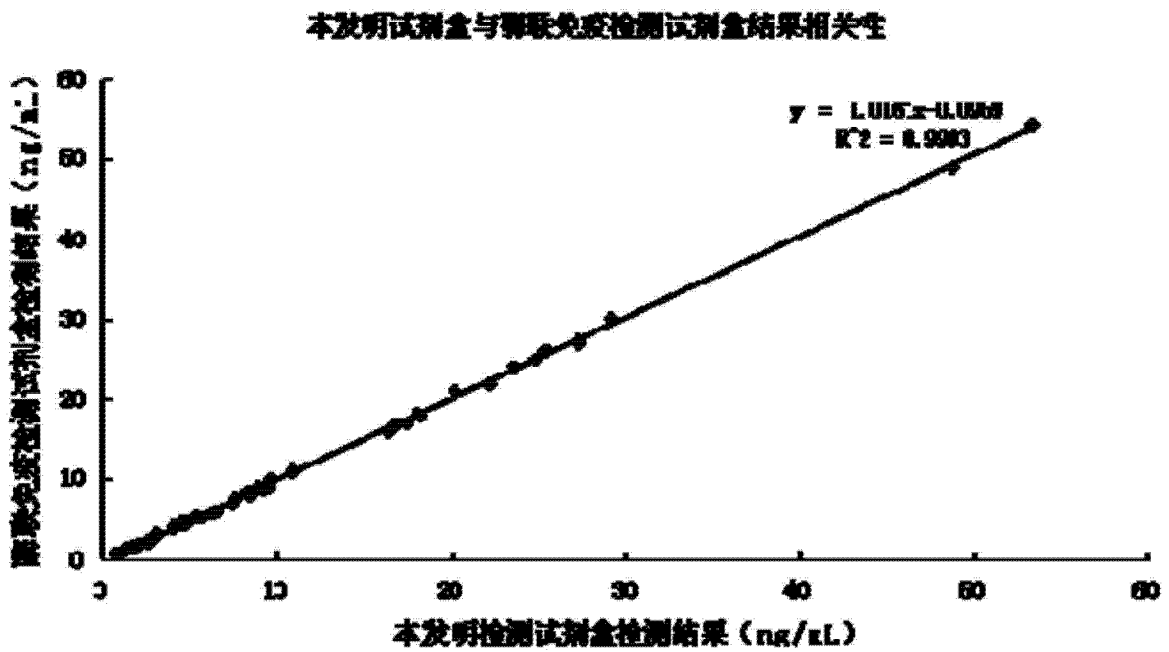


图 4

专利名称(译)	胰蛋白酶原-2检测试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN103308681A	公开(公告)日	2013-09-18
申请号	CN201310253719.1	申请日	2013-06-25
[标]申请(专利权)人(译)	武汉生之源生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉生之源生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉生之源生物科技股份有限公司		
[标]发明人	华权高 许可 沈鹤霄 黄爱 来祥兵 伍卫姣 舒芹		
发明人	华权高 许可 沈鹤霄 黄爱 来祥兵 伍卫姣 舒芹		
IPC分类号	G01N33/573 G01N33/531		
代理人(译)	刘丽君		
其他公开文献	CN103308681B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种胰蛋白酶原-2含量检测试剂盒及其制备方法。本发明检测试剂盒由彼此独立的试剂I和试剂II组成；其中，试剂I的组分包括：生物缓冲剂、防腐剂、无机盐和水；试剂II的组分包括：包被胰蛋白酶原-2抗体的胶乳颗粒、生物缓冲剂、防腐剂和水。本发明检测试剂盒采用粒径为100-300nm的胶乳颗粒制备包被胰蛋白酶原-2抗体的胶乳颗粒，能有效保证试剂盒的灵敏度、检测线性范围、测值准确性及开瓶稳定性；此外，本发明采用化学交联法制备抗体包被胶乳颗粒，保证了抗体与胶乳颗粒的结合稳定性，提高了检测试剂盒的稳定性。本发明检测试剂盒具有稳定性好、灵敏度高、特异性强、操作简便等优点。

