



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112305212 A

(43)申请公布日 2021.02.02

(21)申请号 201910679478.4

(22)申请日 2019.07.25

(71)申请人 苏州普瑞斯生物科技有限公司

地址 215000 江苏省苏州市高新区锦峰路8号

(72)发明人 袁嘉扬 杜微微

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

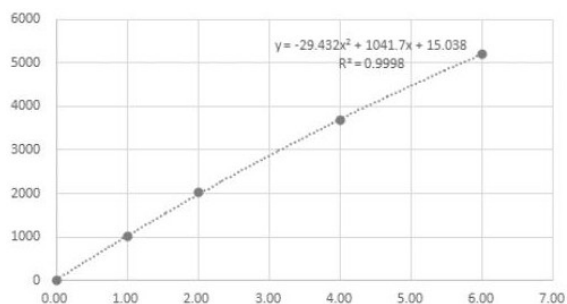
权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及本发明涉及生物技术领域,涉及一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒,尤其涉及一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒的制备方法,包括试剂R1和试剂R2,所述试剂R2由第二缓冲液、保存液以及触珠蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物组成,其保存液由N,N-二羟乙基甘氨酸、稳定剂、第二防腐剂构成,触珠蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物由生物素、链霉亲和素、触珠蛋白单克隆抗体、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成。本发明的优点是:我司采用触珠蛋白单克隆抗体1:2连接生物素,与链霉亲和素二者1:1混合反应,可明显改善重复性和灵敏度,线性范围可做到0.10-6.00g/L。



1. 一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于:包括试剂R1和试剂R2,所述试剂R1的各组分及浓度包括:

第一缓冲液 A 0.8-3.2 g/L

第一缓冲液 B 8.75-24.31 g/L

氯化钠 5.8-20.0 g/L

PEG 6000 40-120 g/L

第一防腐剂 0.8-2.0 ml/L

所述试剂R2由第二缓冲液、保存液以及触珠蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物组成,其保存液由N,N-二羟乙基甘氨酸、稳定剂、第二防腐剂构成,触珠蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物由生物素、链霉亲和素、触珠蛋白单克隆抗体、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成,各组分的浓度为:

第二缓冲液 8.05-27.30 g/L

N,N-二羟乙基甘氨酸 1.26-9.83 g/L

稳定剂 0.5-2.0 g/L

第二防腐剂 0.8-2.0 ml/L

生物素 5-20 g/L

链霉亲和素 5-20 g/L

触珠蛋白单克隆抗体 0.05-3.0 g/L

1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 0.005-0.3 g/L。

2. 根据权利要求1所述的一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于:所述试剂R1中的第一缓冲液A和第二缓冲液B包括PBS缓冲液、HEPES缓冲液、MES缓冲液、Tris缓冲液中的一种或几种。

3. 根据权利要求1所述的一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于:所述试剂R1中的第一防腐剂为叠氮钠、Proclin-950、Proclin-300中的一种。

4. 根据权利要求1所述的一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于:所述试剂R2中的第二缓冲液为PBS缓冲液、HEPES缓冲液、甘氨酸缓冲体系、MES缓冲液、Tris缓冲液中的一种或几种。

5. 根据权利要求1所述的一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于:所述试剂R2中的稳定剂为酪蛋白、甘露醇、牛血清白蛋白中的一种或几种以上混合物。

6. 根据权利要求1所述的一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于:所述

试剂R2中的第二防腐剂为叠氮钠、Proclin-950、Proclin-300中的一种。

7. 根据权利要求1所述的一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于:所述R1试剂pH在6.80-8.00之间;R2试剂pH在6.30-8.50之间。

8. 根据权利要求1所述的一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于:所述R2试剂中生物素结合触珠蛋白单克隆抗体比例为1:1-3:1之间,链霉亲和素结合生物素-触珠蛋白单克隆抗体比例为0.5:1-4:1之间。

9. 如权利要求1-8中任一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:A)、试剂R1制备:

在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200-300rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入第一缓冲液A和第一缓冲液B,搅拌至物料完全溶解、溶液清澈透明、配液罐底部无沉淀,之后投入氯化钠,待物料完全溶解后再按照上述投料方式依次投入PEG 6000和第一防腐剂,投料完成后,继续搅拌至全部物料完全溶解,溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值并定容至最终体积;

溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

B)、试剂R2制备:

B1反应液的配制:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200-300rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入第二缓冲液,搅拌至物料完全溶解,清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值到4.50-6.50之间,并定容至最终体积;

溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

B2保存液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200-300rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入N,N-二羟乙基甘氨酸,搅拌至物料完全溶解,之后投入稳定剂,待物料完全溶解后再投入第二防腐剂,待清澈透明,配液罐底部无沉淀,调节pH值到6.30-8.50之间,并定容至最终体积;

溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放备用,进行标识;

B3触珠蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物的制备:将触珠蛋白单克隆抗体以反应液稀释到0.05-3.0g/L的浓度,与生物素按1:1-1:3结合透析过夜后,按照1:0.5-1:4加入链霉亲和素,混匀,将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以反应液溶解到0.005-0.3g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入稳定剂封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14000rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,将制备好的R2装入成品罐中,并定容至终浓度,进行标识。

一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,涉及一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒,尤其涉及一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒的制备方法。

背景技术

[0002] 触珠蛋白又称结合珠蛋白,是一种急性时相蛋白,在肝细胞合成,是由两条轻链(α 链)和两条重链(β 链)组成的糖蛋白。触珠蛋白能结合溶血引起的游离血红蛋白,并转运到肝细胞进行降解。溶血发生时,由于其清除速度比肝脏合成新的触珠蛋白速度快得多,所以任何能使红细胞破碎引起血红蛋白增多的情况,都会使血清中触珠蛋白浓度降低。溶血性贫血、肝细胞损害时浓度显著降低;炎症、创伤和冠心病时浓度明显升高。因此触珠蛋白的测定有重要的生物学和医学意义。触珠蛋白抗体可与血清中的触珠蛋白产生凝集反应,形成抗原抗体复合物,其浊度高低在一定量抗体存在时与血清中触珠蛋白成正比。通过测定特定波长的吸光度值,参照校准曲线即可计算出血清中触珠蛋白的浓度。

[0003] 一个层面上,目前面市或公开的触珠蛋白检测试剂或试剂盒的种类并不多。一方面使得用户所能够选择的范围比较窄;另一方面,面市产品少意味着市场竞争小,价格高,进而用户使用成本居高不下;再一个方面,也使得这一类型的产品难以通过活跃的市场竞争形成有效的技术促进,进而使得该类型产品在技术上长期没有新进展。

[0004] 另一个层面上,就目前已公开的触珠蛋白测定产品来看,虽然产品种类不足,但其在实际应用中已经暴露出严重的技术问题。例如,国家食品药品监督管理局于2012年11月26日发布了:Ortho-Clinical Diagnostics, Inc公司对触珠蛋白测定试剂盒(免疫比浊法)进行召回,由于用户使用频繁出现样品处理和无法获得测定结果的问题,该公司对其生产的部分型号批次的触珠蛋白测定试剂盒(免疫比浊法)(注册号:国食药监械(进)字2010第2402877号)进行主动召回。虽然这次召回没有涉及中国市场,但仍然反映出了目前触珠蛋白检测试剂(盒)存在一定的技术缺陷和不稳定性。

[0005] 目前我国国内也有一些触珠蛋白测定产品面市。例如浙江康特生物科技有限公司(市售1)或宁波瑞源生物科技有限公司(市售2)生产的触珠蛋白测定试剂盒(免疫比浊法),这两种试剂盒均供体外定量检测人血清中触珠蛋白的含量。这两种试剂盒的产品储存条件及有效期均为:2-8℃条件下(干燥、避光)储存,有效期12个月。经实际验证,这两种试剂盒在开启后,其中的试剂在2-8℃避光保存最多稳定30天,其中的校准品在2-8℃避光保存最多稳定7天。有的市售触珠蛋白测定产品的密封有效期甚至只有6个月不到。而一个产品从出厂,到经历各级经销商,再到医院或其他使用机构,所经历的流通或运输时间很多情况下长达数月之久。也就是说上述试剂盒在到达用户手中之时其实际有效期已经大大缩短,再加上试剂一旦开启其稳定期仅仅数天,最多数十天。以上原因会导致大量开封前过期产品或开封后失效产品,理论上这些过期或失效产品应当废弃或回收,但实际上其中的一部分仍混杂在流通途径中。这一方面造成了资源的极大浪费,另一方面造成了市场的混乱,更甚者这些过期失效产品一旦用于检测者很可能造成错误的测定结果从而引起严重医疗事

故。

[0006] 综上所述,如何进一步提高触珠蛋白测定试剂(盒)的稳定性、灵敏度、准确度等性能是本领域值得关注的研究方向。

发明内容

[0007] 本发明的目的是:针对上述不足,提供一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒及其制备方法。

[0008] 为达到上述目的,本发明采用的技术方案是:

[0009] 一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒,包括试剂R1和试剂 R2,所述试剂R1的各组分及浓度包括:

第一缓冲液 A 0.8-3.2 g/L

第一缓冲液 B 8.75-24.31 g/L

[0010] 氯化钠 5.8-20.0 g/L

PEG 6000 40-120 g/L

第一防腐剂 0.8-2.0 ml/L

[0011] 所述试剂R2由第二缓冲液、保存液以及触珠蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物组成,其保存液由N,N-二羟乙基甘氨酸、稳定剂、第二防腐剂构成,触珠蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物由生物素、链霉亲和素、触珠蛋白单克隆抗体、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成,各组分的浓度为:

第二缓冲液 8.05-27.30 g/L

N,N-二羟乙基甘氨酸 1.26-9.83 g/L

稳定剂 0.5-2.0 g/L

第二防腐剂 0.8-2.0 ml/L

[0012]

生物素 5-20 g/L

链霉亲和素 5-20 g/L

触珠蛋白单克隆抗体 0.05-3.0 g/L

1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 0.005-0.3 g/L。

[0013] 所述试剂R1中的第一缓冲液A和第二缓冲液B包括PBS缓冲液、HEPES缓冲液、MES缓冲液、Tris缓冲液中的一种或几种。

[0014] 所述试剂R1中的第一防腐剂为叠氮钠、Proclin-950、Proclin-300中的一种。

[0015] 所述试剂R2中的第二缓冲液为PBS缓冲液、HEPES缓冲液、甘氨酸缓冲体系、MES缓冲液、Tris缓冲液中的一种或几种。

[0016] 所述试剂R2中的稳定剂为酪蛋白、甘露醇、牛血清白蛋白中的一种或几种以上混合物。

[0017] 所述试剂R2中的第二防腐剂为叠氮钠、Proclin-950、Proclin-300中的一种。

[0018] 所述R1试剂pH在6.80-8.00之间；R2试剂pH在6.30-8.50之间。

[0019] 所述R2试剂中生物素结合触珠蛋白单克隆抗体比例为1:1-3:1 之间，链霉亲和素结合生物素-触珠蛋白单克隆抗体比例为0.5:1-4:1 之间。

[0020] 一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒的制备方法，包括如下步骤：A)、试剂R1制备：

[0021] 在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上，调节搅拌器转速至200-300rpm，使搅拌保持匀速状态，边搅拌边投入第一缓冲液A 和第一缓冲液B，搅拌至物料完全溶解、溶液清澈透明、配液罐底部无沉淀，之后投入氯化钠，待物料完全溶解后再按照上述投料方式依次投入PEG 6000和第一防腐剂，投料完成后，继续搅拌至全部物料完全溶解，溶液清澈透明，配液罐底部无沉淀，调整PH值并定容至最终体积；

[0022] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程，通过微孔滤膜过滤，过滤后的溶液存放在成品罐中，进行标识；

[0023] B)、试剂R2制备：

[0024] B1反应液的配制：在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上，调节搅拌器转速至200-300rpm，使搅拌保持匀速状态，边搅拌边投入第二缓冲液，搅拌至物料完全溶解，清澈透明，配液罐底部无沉淀，调整PH值到4.50-6.50之间，并定容至最终体积；

[0025] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程，通过微孔滤膜过滤，过滤后的溶液存放在成品罐中，进行标识；

[0026] B2保存液的制备：在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上，调节搅拌器转速至200-300rpm，使搅拌保持匀速状态，边搅拌边投入N,N-二羟乙基甘氨酸，搅拌至物料完全溶解，之后投入稳定剂，待物料完全溶解后再投入第二防腐剂，待清澈透明，配液罐底部无沉淀，调节pH值到6.30-8.50之间，并定容至最终体积；

[0027] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程，通过微孔滤膜过滤，过滤后的溶液存放备用，进行标识；

[0028] B3触珠蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物的制备：将触珠蛋白单克隆抗体以反应液稀释到0.05-3.0g/L的浓度，与生物素按1:1-1:3结合透析过夜后，按照1:0.5-1:4加入链霉亲和素，混匀，将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以反应液溶解到0.005-0.3g/L的浓度，边摇匀边滴加入上述混合溶液中，室温反应120分钟，加入稳定剂封闭，振荡混匀，室温反应60分钟，将混合液以14000rpm的转速离心30分钟，吸去上清，加入保存液，重复离心清洗3次，最后一次离心去上清后，加入保存液，将制备好的R2装入成品罐中，并定容至终浓度，进行标识。

[0029] 与现有技术相比，本发明所达到的技术效果是：经多次研发实验后，我司采用触珠蛋白单克隆抗体1:2连接生物素，与链霉亲和素二者1:1混合反应，可明显改善重复性和灵敏度，线性范围可做到 0.10-6.00g/L。

附图说明

[0030] 图1是本发明实施例4中胶乳微球间接偶联触珠蛋白抗体定标曲线图。其中X轴表示标准品浓度,Y轴表示吸光度。

[0031] 图2是本发明实施例4中线性范围测定图。

具体实施方式

[0032] 下面结合附图及实施例对本发明作进一步描述:

[0033] 实施例一:

[0034] 本发明的一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒,包括试剂 R1和试剂R2,所述试剂R1的各组分及浓度包括:作为第一缓冲液 A的二水合磷酸二氢钠,其含量为0.8g/L,作为第一缓冲液B的十二水合磷酸氢二钠,其含量为8.75g/L,氯化钠,其含量为5.8g/L, PEG 6000,其含量为40g/L,作为第一防腐剂的Proclin-950,其含量为0.8ml/L;

[0035] 所述试剂R2由作为第二缓冲液的2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物、保存液以及触珠蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物组成,其保存液由N,N-二羟乙基甘氨酸、作为稳定剂的牛血清白蛋白、作为第二防腐剂的Proclin-950构成,触珠蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物由生物素、链霉亲和素、触珠蛋白单克隆抗体、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成,各组分的浓度为:2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物,其含量为8.05g/L,N,N-二羟乙基甘氨酸,其含量为1.26g/L,牛血清白蛋白,其含量为0.5 g/L,Proclin-950,其含量为0.8ml/L,生物素,其含量为5g/L,链霉亲和素,其含量为5g/L,触珠蛋白单克隆抗体,其含量为0.05 g/L,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,其含量为0.005 g/L。

[0036] 所述R1试剂pH在6.80;R2试剂pH在6.30。

[0037] 所述R2试剂中生物素结合触珠蛋白单克隆抗体比例为2:1之间,链霉亲和素结合生物素-触珠蛋白单克隆抗体比例为1:1之间。

[0038] 一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:A)、试剂R1制备:

[0039] 在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入二水合磷酸二氢钠和十二水合磷酸氢二钠,搅拌至物料完全溶解、溶液清澈透明、配液罐底部无沉淀,之后投入氯化钠,待物料完全溶解后再按照上述投料方式依次投入PEG 6000和Proclin-950,投料完成后,继续搅拌至全部物料完全溶解,溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值在6.8并定容至最终体积;

[0040] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0041] B)、试剂R2制备:

[0042] B1反应液的配制:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物,搅拌至物料完全溶解,清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值到4.50,并定容至最终体积;

[0043] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0044] B2保存液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入N,N-二羟乙基甘氨酸,搅拌至物料完全溶解,之后投入牛血清白蛋白,待物料完全溶解后再投入Proclin-950,待清澈透明,配液罐底部无沉淀,调节pH值到6.30,并定容至最终体积;

[0045] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放备用,进行标识;

[0046] B3触珠蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物的制备:将触珠蛋白单克隆抗体以反应液稀释到0.05g/L的浓度,与生物素按1:2结合透析过夜后,按照1:1加入链霉亲和素,混匀,将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以反应液溶解到0.005g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入牛血清白蛋白封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14000rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,将制备好的R2装入成品罐中,并定容至终浓度,进行标识。

[0047] 实施例二:

[0048] 本发明的一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒,包括试剂R1和试剂R2,所述试剂R1的各组分及浓度包括:作为第一缓冲液A的二水合磷酸二氢钠,其含量为2g/L,作为第一缓冲液B的十二水合磷酸氢二钠,其含量为16g/L,氯化钠,其含量为12g/L,PEG 6000,其含量为80g/L,作为第一防腐剂的Proclin-300,其含量为1.2ml/L;

[0049] 所述试剂R2由作为第二缓冲液的2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物、保存液以及触珠蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物组成,其保存液由N,N-二羟乙基甘氨酸、作为稳定剂的甘露醇、作为第二防腐剂的Proclin-300构成,触珠蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物由生物素、链霉亲和素、触珠蛋白单克隆抗体、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成,各组分的浓度为:2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物,其含量为18g/L,N,N-二羟乙基甘氨酸,其含量为5g/L,甘露醇,其含量为1.2g/L,Proclin-300,其含量为1.2ml/L,生物素,其含量为12g/L,链霉亲和素,其含量为12g/L,触珠蛋白单克隆抗体,其含量为2g/L,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,其含量为0.2g/L。

[0050] 所述R1试剂pH在7.4;R2试剂pH在7.2。

[0051] 所述R2试剂中生物素结合触珠蛋白单克隆抗体比例为3:1之间,链霉亲和素结合生物素-触珠蛋白单克隆抗体比例为4:1之间。

[0052] 一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:A)、试剂R1制备:

[0053] 在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至250rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入二水合磷酸二氢钠和十二水合磷酸氢二钠,搅拌至物料完全溶解、溶液清澈透明、配液罐底部无沉淀,之后投入氯化钠,待物料完全溶解后再按照上述投料方式依次投入PEG 6000和Proclin-300,投料完成后,继续搅拌至全部物料完全溶解,溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值至7.4并定容至最终体积;

[0054] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0055] B)、试剂R2制备:

[0056] B1反应液的配制:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至250rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物,搅拌至物料完全溶解,清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值到5.5,并定容至最终体积;

[0057] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0058] B2保存液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至250rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入N,N-二羟乙基甘氨酸,搅拌至物料完全溶解,之后投入甘露醇,待物料完全溶解后再投入Proclin-300,待清澈透明,配液罐底部无沉淀,调节pH值到7.2之间,并定容至最终体积;

[0059] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放备用,进行标识;

[0060] B3触珠蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物的制备:将触珠蛋白单克隆抗体以反应液稀释到2g/L的浓度,与生物素按1:3结合透析过夜后,按照1:4加入链霉亲和素,混匀,将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以反应液溶解到0.2g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入甘露醇封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14000rpm的转速离心 30分钟,吸去上清,加入保存液,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,将制备好的R2装入成品罐中,并定容至终浓度,进行标识。

[0061] 实施例三:

[0062] 本发明的一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒,包括试剂 R1和试剂R2,所述试剂R1的各组分及浓度包括:作为第一缓冲液 A的二水合磷酸二氢钠,其含量为3.2g/L,作为第一缓冲液B的十二水合磷酸氢二钠,其含量为24.31g/L,氯化钠,其含量为20.0g/L,PEG 6000,其含量为120g/L,作为第一防腐剂的叠氮钠,其含量为 2.0ml/L;

[0063] 所述试剂R2由作为第二缓冲液的2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物、保存液以及触珠蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物组成,其保存液由N,N-二羟乙基甘氨酸、作为稳定剂的酪蛋白、作为第二防腐剂的叠氮钠构成,触珠蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物由生物素、链霉亲和素、触珠蛋白单克隆抗体、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成,各组分的浓度为:2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物,其含量为27.30g/L,N,N-二羟乙基甘氨酸,其含量为9.83g/L,酪蛋白,其含量为2.0g/L,叠氮钠,其含量为 2.0ml/L,生物素,其含量为20g/L,链霉亲和素,其含量为20g/L,触珠蛋白单克隆抗体,其含量为3.0g/L,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,其含量为0.3g/L。

[0064] 所述R1试剂pH在8.00;R2试剂pH在8.50。

[0065] 所述R2试剂中生物素结合触珠蛋白单克隆抗体比例为1:1之间,链霉亲和素结合生物素-触珠蛋白单克隆抗体比例为0.5:1之间。

[0066] 一种触珠蛋白专利免疫比浊法检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:A)、试剂R1制备:

[0067] 在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至300rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入二水合磷酸二氢钠和十二水合磷酸氢二钠,搅拌至物料完全溶解、溶液清澈透明、配液罐底部无沉淀,之后投入氯化钠,待物料完全溶解后再按照上

述投料方式依次投入PEG 6000和叠氮钠,投料完成后,继续搅拌至全部物料完全溶解,溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值至8.00 并定容至最终体积;

[0068] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0069] B)、试剂R2制备:

[0070] B1反应液的配制:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至300rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物,搅拌至物料完全溶解,清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值到6.50,并定容至最终体积;

[0071] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0072] B2保存液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至300rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入N,N-二羟乙基甘氨酸,搅拌至物料完全溶解,之后投入酪蛋白,待物料完全溶解后再投入叠氮钠,待清澈透明,配液罐底部无沉淀,调节pH值到8.50之间,并定容至最终体积;

[0073] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放备用,进行标识;

[0074] B3触珠蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物的制备:将触珠蛋白单克隆抗体以反应液稀释到3.0g/L的浓度,与生物素按1:1结合透析过夜后,按照1:0.5加入链霉亲和素,混匀,将 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以反应液溶解到0.3 g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入酪蛋白封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14000rpm 的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,将制备好的R2装入成品罐中,并定容至终浓度,进行标识。

[0075] 实施例四:

[0076] 直接使用触珠蛋白单克隆抗体,使用标准品进行定标,结果如表1和图1所示:

[0077] 表1:直接使用触珠蛋白单克隆抗体定标结果

[0078]	校准品浓度 (g/L)	dOD		均值
	0.00	9	8	9
	1.00	853	854	854
	2.00	1627	1626	1627
	4.00	2432	2438	2435
	6.00	2366	2363	2365

[0079] 线性范围可做到0.10-4.00g/L,浓度大于4.00g/L时出现hook 效应。

[0080] 其精密度CV:

[0081]

1	0.15	1.87	3.24
2	0.16	2.00	3.26
3	0.17	1.80	3.25
4	0.17	1.65	3.27
5	0.16	1.60	3.65
6	0.16	1.70	3.03
7	0.16	2.14	3.69
8	0.14	1.99	2.94
9	0.14	1.94	2.99
10	0.17	1.95	3.68
均值	0.16	1.86	3.30

[0082]

SD	0.01	0.17	0.29
CV	7.48%	9.34%	8.65%

[0083] 精密度CV较大,基本>6%。

[0084] 实施例五:

[0085] 使用触珠蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物,使用标准品进行定标,结果如表2和图2所示:

[0086] 表2:使用触珠蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物定标结果

[0087]

校准品浓度 (g/L)	dOD		均值
0.00	9	8	9
1.00	1014	1016	1015
2.00	2022	2025	2024
4.00	3674	3678	3676
6.00	5216	5218	5217

[0088] 线性范围可做到0.10-6.00g/L。

[0089] 其精密度CV：

[0090]

1	0.15	1.87	3.24
2	0.16	1.79	3.21
3	0.15	1.78	3.33
4	0.15	1.82	3.33
5	0.16	1.94	3.15

[0091]

6	0.15	1.94	3.16
7	0.14	1.84	3.30
8	0.15	1.94	3.33
9	0.15	1.88	3.35
10	0.15	1.94	3.09
均值	0.15	1.87	3.25
SD	0.00	0.07	0.09
CV	2.32%	3.50%	2.85%

[0092] 精密度CV明显改善,4%以内。

[0093] 综上所述:根据实施例四以及实施例五的定标结果显示,常规方法中直接采用触珠蛋白单克隆抗体与抗原反应,该方法发现灵敏度和线性范围均较差;经多次研发实验后,我司采用触珠蛋白单克隆抗体 1:2连接生物素,与链霉亲和素二者1:1混合反应,可明显改善重复性和灵敏度,线性范围可做到0.10-6.00g/L。

[0094] 上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点,其目的在于让熟悉此项技术的人士能够了解本发明的内容并据以实施,并不能以此限制本发明的保护范围。凡根据本发明精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

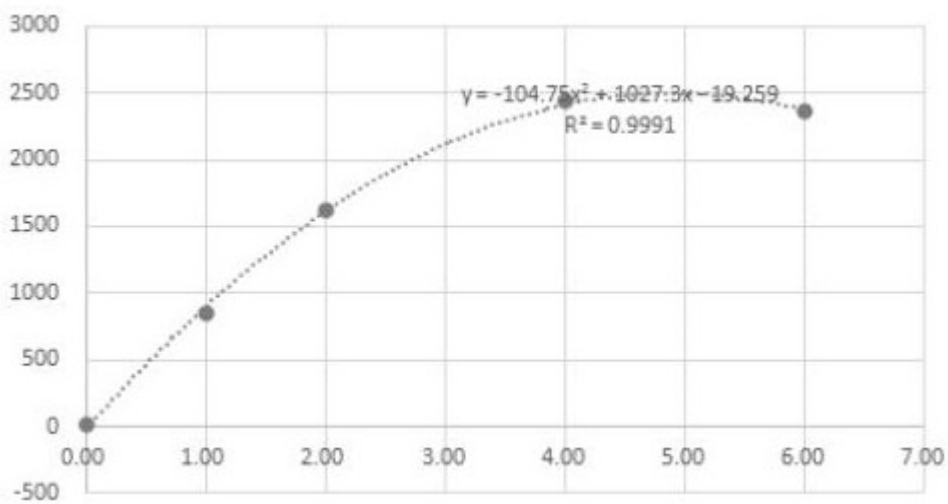


图1

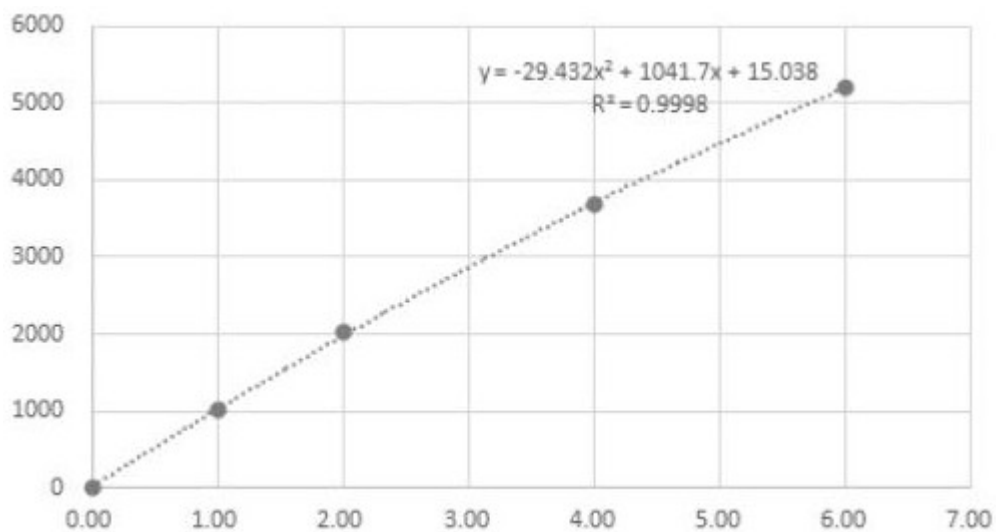


图2