



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101819208 A

(43) 申请公布日 2010.09.01

(21) 申请号 201010139399.3

(22) 申请日 2010.03.31

(71) 申请人 浙江伊利康生物技术有限公司

地址 325011 浙江省温州市温州经济开发区  
高科技园区 27 号小区

(72) 发明人 王贤理 蒙凯 蔡其浩

(74) 专利代理机构 杭州九洲专利事务所有限公  
司 33101

代理人 王洪新

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/544(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

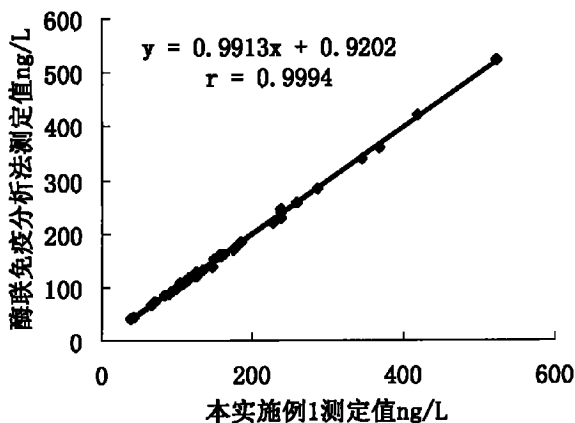
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 2 页

## (54) 发明名称

一种纳米微球免疫比浊法检测脑钠肽试剂盒

## (57) 摘要

本发明涉及一种测定血清中的脑钠肽的试剂盒。所要解决的技术问题是提供一种样本无需稀释、操作简单、准确度高、重复性好,适用于临床常用的自动生化分析仪的纳米微球免疫比浊法检测脑钠肽试剂盒。技术方案是:一种纳米微球免疫比浊法检测脑钠肽试剂盒,包含:a、试剂 R<sub>1</sub>:缓冲液、防腐剂、稳定剂、电解质、表面活性剂,其余为纯化水;b、试剂 R<sub>2</sub>:缓冲液、结合有脑钠肽抗体的纳米微球及防腐剂,微球直径为 50-150nm;c、参考校准品:缓冲液、稳定剂、防腐剂以及根据所需要的 BNP 参考校准品浓度添加的相应量的重组脑钠肽纯品,其余为纯化水。



1. 一种纳米微球免疫比浊法检测脑钠肽试剂盒,包含试剂 R<sub>1</sub>、试剂 R<sub>2</sub>,参考校准品;其中:

a、试剂 R<sub>1</sub>:一种使样品中脑钠肽抗原位点充分暴露,有利于与抗脑钠肽抗体试剂充分结合的脑钠肽溶液,包括 5-200mmol/L 缓冲液、0.1-5mmol/L 防腐剂、0.5-5mmol/L 的稳定剂、50-200mmol/L 电解质、0.1-4mmol/L 表面活性剂,其余为纯化水;

b、试剂 R<sub>2</sub>:一种结合有抗人脑钠肽抗体的纳米微球溶液,包括 5-200mmol/L 缓冲液、重量比例 0.1% -5%的脑钠肽抗体的纳米微球及适量防腐剂,微球直径为 50-150nm;

c、参考校准品:一种用来与样品比较,进行结果计算的脑钠肽参考校准品,包括缓冲液 100-200mmol/L、稳定剂 160-180mmol/L、适量防腐剂以及根据所需要的 BNP 参考校准品浓度添加的相应量的重组脑钠肽纯品,其余为纯化水。

2. 根据权利要求 1 所述的一种纳米微球免疫比浊法检测脑钠肽试剂盒,其特征在于所述试剂 R<sub>1</sub> 加入了反应加速剂,浓度为 3-10mmol/L。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的一种纳米微球免疫比浊法检测脑钠肽试剂盒,其特征在于所述稳定剂是乙二胺四乙酸二钠、牛血清白蛋白以及氯化钠中的一种或多种的混合。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的一种纳米微球免疫比浊法检测脑钠肽试剂盒,其特征在于所述缓冲液是三羟甲基氨基甲烷或 CAPSO。

5. 根据权利要求 3 所述的一种纳米微球免疫比浊法检测脑钠肽试剂盒,其特征在于所述试剂 R<sub>2</sub> 制备方法是:用 pH7.4 的缓冲液在室温下稀释重量比例为 1 : 1 的抗人 BNP 抗体多克隆抗体和纳米微球,将两者混匀后室温振荡吸附 2 小时,加入缓冲液封闭 1 小时,离心去上清,用缓冲液稀释至浓度为 0.3%,并加入适量防腐剂。

6. 根据权利要求 4 所述的一种纳米微球免疫比浊法检测脑钠肽试剂盒,其特征在于所述试剂 R<sub>2</sub> 制备方法是:用 pH7.4 的缓冲液在室温下稀释重量比例为 1 : 1 的抗人 BNP 抗体多克隆抗体和纳米微球,将两者混匀后室温振荡吸附 2 小时,加入缓冲液封闭 1 小时,离心去上清,用缓冲液稀释至浓度为 0.3%,并加入适量防腐剂。

## 一种纳米微球免疫比浊法检测脑钠肽试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于测定血清成份的试剂盒,特别是测定血清中的脑钠肽(BNP)的试剂盒,可广泛应用在医学及生物化学技术领域。

### 背景技术

[0002] 脑钠肽(Brain Natriuretic Peptide, BNP) 又称B型利钠肽(B-type Natriuretic Peptide),是心脏细胞产生的结构相关的肽类激素家族钠尿肽中的一种。由32个氨基酸组成,其中含一个17个氨基酸通过一对二硫键组成的环状结构。BNP广泛分布于脑、脊髓、心肺等组织,其中以心脏含量最高。脑内以延髓含量最高,心脏内BNP主要存在于左、右心房,其中右心房含量为左心房3倍多,心室的BNP含量约不足心房的1/20,在房间隔、房室瓣、主动脉、肝动脉与肺静脉壁内亦含有少量BNP。当心功能不全时,由于心脏容量负荷或压力负荷增加,心肌受到牵张或室壁压力增大,会使血中BNP的指标浓度增高,而这恰恰是诊断心衰较为敏感的指标。可以独立预测左心室舒张末期压力升高状况。因此,测定BNP的临床意义主要有:助急性呼吸困难的鉴别诊断;可预测心源性猝死。可对心力衰竭病人的危险分层;可监测心力衰竭的治疗;BNP水平还可提示心力衰竭病人的预后。在2001年修订的欧洲心脏病学会心衰诊疗指南中,已经把脑钠肽作为心衰诊断的工具。2005年欧洲和美国的指南,均进一步肯定了脑钠肽在心衰诊断中的作用。可以作为一个更好的预示心衰状况的指标。

[0003] 已知测定脑钠肽的方法有放射免疫法(IRA)、免疫放射测量法(IRMA)、电化学发光法(ECLA)、酶联免疫法(ELISA法);放射免疫法不经提取血浆BNP直接测量,此测定系统采用两种抗人BNP单克隆抗体,一种识别BNP的C端序列,一种识别其环状结构,即应用夹心法测定血浆BNP浓度,此法虽然较为敏感、准确、易于操作;但是此法与免疫放射测量法一样都存在着放射线辐射和污染等问题。电化学发光法较放射免疫法更为敏感、准确,精密,但成本昂贵,需要配套化学发光仪才能检测。酶免疫法(ELISA)存在着操作繁琐,样品需要预处理等缺点。

### 发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是克服上述背景技术的不足,提供一种脑钠肽检测试剂的改进,所提供的试剂应具有样本无需稀释、操作简单、准确度高、重复性好、适用于临床常用的自动生化分析仪的特点。

[0005] 本发明提供的技术方案是:

[0006] 一种纳米微球免疫比浊法检测脑钠肽试剂盒,包含试剂 $R_1$ 、试剂 $R_2$ ,参考校准品;其中:

[0007] a、试剂 $R_1$ :一种使样品中脑钠肽抗原位点充分暴露,有利于与抗脑钠肽抗体试剂充分结合的脑钠肽溶液,包括5-200mmol/L缓冲液、0.1-5mmol/L防腐剂、0.5-5mmol/L的稳定剂、50-200mmol/L电解质、0.1-4mmol/L表面活性剂,其余为纯化水;

[0008] b、试剂 R<sub>2</sub> :一种结合有抗人脑钠肽抗体的纳米微球溶液,包括 5-200mmol/L 缓冲液、重量比例 0.1% -5% 的结合有脑钠肽抗体的纳米微球及适量防腐剂,微球直径为 50-150nm ;

[0009] c、参考校准品 :一种用来与样品比较,进行结果计算的脑钠肽参考校准品,包括缓冲液 100-200mmol/L、稳定剂 160-180mmol/L、适量防腐剂以及根据所需要的 BNP 参考校准品浓度添加的相应量的重组脑钠肽纯品,其余为纯化水。

[0010] BNP 参考校准品(添加重组人脑钠肽纯品的人血清或其它类似血清基质的液体。)的浓度可以是高浓度单点参考校准品,在使用时用生理盐水稀释成多个不同浓度的参考校准品,也可以直接制备成多个不同浓度的参考校准品,这里没有特别的限制,只要制得的 BNP 参考校准品能与样品比较,能够测定样品中 BNP 的含量即可。

[0011] 进一步,所述试剂 R<sub>1</sub> 加入了反应加速剂,浓度为 3-10mmol/L。

[0012] 所述稳定剂是乙二胺四乙酸二钠、牛血清白蛋白以及氯化钠中的一种或多种的混合。

[0013] 所述缓冲液是三羟甲基氨基甲烷或 CAPSO。

[0014] 所述试剂 R<sub>2</sub> 制备方法是 :用 pH7.4 的缓冲液在室温下稀释重量比例为 1 : 1 的抗人 BNP 抗体多克隆抗体和纳米微球,将两者混匀后室温振荡吸附 2 小时,加入缓冲液封闭 1 小时,离心去上清,用缓冲液稀释至浓度为 0.3%,并加入适量防腐剂。

[0015] 抗人 BNP 抗体多克隆抗体包括羊抗人 BNP 抗体多克隆抗体或兔抗人 BNP 抗体多克隆抗体或鼠抗人 BNP 抗体多克隆抗体。

[0016] 本发明检测试剂盒所需主要原料 :

[0017] 1、羊抗人脑钠肽多克隆抗体,外购或委托浙江伊利康生物技术研发中心按常规方法制备 ;该抗体仅与人脑钠肽反应,与其它抗原无免疫交叉反应,效价能够满足本试剂要求。

[0018] 2、纳米微球,市场上有许多商品化的纳米微球可供选择,包括美国 Sigma 公司、德国默克公司、日本 UNF 公司 ;可选择多种直径的纳米微球,本实施例采用了直径为 80 ~ 120nm 的微球进行实验,相应的试剂检测主波长为 600nm。

[0019] 3、重组脑钠肽纯品(外购,或由浙江伊利康生物技术研发中心制备),用于制备本试剂所需参考校准品。

[0020] 其余生化原料均可外购。

[0021] 本发明进行检测的原理是 :利用抗原抗体反应,先加入试剂 1(样品稀释液),解除样本中抗原周围的电子层和水化层,使抗原位点充分暴露 ;然后加入抗人 BNP 抗体的纳米微球溶液,使 BNP 抗体的纳米微球与样本中相应的 BNP 抗原反应,形成不溶性的抗原-抗体复合物,产生一定的浊度,其浊度高低与样本中的 BNP 含量成正比 ;在规定波长下测定该不溶性抗原-抗体复合物的吸光度值,与已知浓度的 BNP 参考校准品进行比较,则可计算出样本中 BNP 的含量。

[0022] 本发明为液体双试剂,用于检测液体中脑钠肽的浓度,具有特异性好,灵敏度高,准确性好及抗干扰能力强等优点 ;另外,进行检测时操作简单、样本不用预稀释,适用于临床全自动生化分析仪,进而大幅度提高检测效率。

[0023] 试剂 R2 中纳米微球与抗人 BNP 抗体的结合可以采用物理吸附法或化学交联法制

备, 优选物理吸附法。

### 附图说明

[0024] 图 1 是本发明实施例 1 进行检测所得的 BNP 测定值与通过酶联免疫 (ELISA) 分析法所得的 BNP 测定值的相互关系示意图。

[0025] 图 2 是本发明实施例 2 进行检测所得的 BNP 测定值与通过酶联免疫 (ELISA) 分析法所得的 BNP 测定值的相互关系示意图。

[0026] 图 3 是本发明实施例 3 进行检测所得的 BNP 测定值与通过酶联免疫 (ELISA) 分析法所得的 BNP 测定值的相互关系示意图。

### 具体实施方式

[0027] BNP 检测试剂的制备实施例：

[0028] 实施例一

[0029] 1、BNP 溶液 (试剂 R<sub>1</sub>)

[0030] 三羟甲基氨基甲烷缓冲液 50mmol/L

[0031] 吐温 -20 (表面活性剂) 0.5mmol/L

[0032] NaCl (电解质) 100mmol/L

[0033] PEG-6000 (反应促进剂) 4mmol/L

[0034] 广谱杀菌剂 (防腐剂) 3mmol/L

[0035] 乙二胺四乙酸二钠 (稳定剂) 5mmol/L

[0036] 其余为纯化水

[0037] 2、抗人 BNP 抗体溶液 (试剂 R<sub>2</sub>)

[0038] 用 100mmol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (pH 7.4) 在室温下稀释羊抗人 BNP 抗体多克隆抗体和 80nm 纳米微球 (抗体和微球的重量比例为 1 : 1), 将两者混匀后室温振荡吸附 2 小时 (即本领域技术人员已公知的物理吸附法), 加入封闭液 (含 0.1% BSA 三羟甲基氨基四烷缓冲液) 封闭 1 小时, 离心去上清, 用 100mmol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲液稀释至浓度为 0.3%, 并加入适量防腐剂; 即获得脑钠肽检测试剂盒试剂 R<sub>2</sub>。

[0039] 3、血清型 BNP 溶液 (参考校准品)

[0040] 缓冲液 CAPSO 100mmol/L

[0041] 防腐剂广谱杀菌剂 2mmol/L

[0042] 稳定剂乙二胺四乙酸二钠 2mmol/L

[0043] 稳定剂牛血清白蛋白 3mmol/L

[0044] 稳定剂氯化钠 166mmol/L

[0045] 其余为纯化水

[0046] 按照需要的 BNP 参考校准品浓度将相应的重组脑钠肽纯品 200ng/L 加入上述缓冲液中, 制备得 200ng/L 浓度的 BNP 参考校准品。BNP 参考校准品的浓度可以是高浓度单点参考校准品, 在使用时用生理盐水稀释成多浓度参考校准品, 也可以制备成多浓度的参考校准品 (20ng/L ; 40ng/L ; 80ng/L ; 160ng/L ; 200ng/L)。

[0047] 采用本实施例获得的 BNP 测定值与通过酶联免疫 (ELISA) 分析法所得的 BNP 得值

进行比较(如图1所示;并进行回归分析),获知相关性  $r = 0.9994$  ( $y = 0.9913X + 0.9202$ ); 显示出本实施例与酶联免疫(ELISA)分析法具有良好的相关性。

#### [0048] 实施例二

##### [0049] 1、BNP 溶液(试剂 R<sub>1</sub>)

[0050]	三羟甲基氨基甲烷缓冲液	100mmol/L
[0051]	吐温-20(表面活性剂)	4mmol/L
[0052]	NaCl(电解质)	60mmol/L
[0053]	PEG-6000(反应促进剂)	8mmol/L
[0054]	广谱杀菌剂(防腐剂)	0.1mmol/L
[0055]	乙二胺四乙酸二钠(稳定剂)	0.5mmol/L

[0056] 其余为纯化水

##### [0057] 2、抗人 BNP 抗体溶液(试剂 R<sub>2</sub>)

[0058] 用 150mmol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲液(pH 7.4)在室温下稀释羊抗人 BNP 抗体多克隆抗体和 120nm 纳米微球(抗体和微球的重量比例为 1 : 1),将两者混匀后室温振荡吸附 2 小时(即本领域技术人员已公知的物理吸附法),加入封闭液(含 0.1% BSA 三羟甲基氨基四烷缓冲液)封闭 1 小时,离心去上清,用 100mmol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲液稀释至浓度为 4%,并加入适量防腐剂;即获得脑钠肽检测试剂盒试剂 R<sub>2</sub>。

##### [0059] 3、血清型 BNP 溶液(参考校准品)

[0060]	缓冲液 CAPSO	100mmol/L
[0061]	防腐剂广谱杀菌剂	5mmol/L
[0062]	稳定剂乙二胺四乙酸二钠	3mmol/L
[0063]	稳定剂牛血清白蛋白	3mmol/L
[0064]	稳定剂氯化钠	166mmol/L

[0065] 其余为纯化水

[0066] 按照需要的 BNP 参考校准品浓度将相应的重组脑钠肽纯品 300ng/L 加入上述缓冲液中,制备得 300ng/L 浓度的 BNP 参考校准品。BNP 参考校准品的浓度可以是高浓度单点参考校准品,在使用时用生理盐水稀释成多浓度参考校准品,也可以制备成多浓度的参考校准品(30ng/L;60ng/L;120ng/L;180ng/L;300ng/L)。

[0067] 采用本实施例获得的 BNP 测定值与通过酶联免疫(ELISA)分析法所得的 BNP 得值进行比较(如图2所示;并进行回归分析),获知相关性  $r = 0.9992$  ( $y = 1.0002x - 0.264$ ); 显示出本实施例与酶联免疫(ELISA)分析法具有良好的相关性。

#### [0068] 实施例三

##### [0069] 1、BNP 溶液(试剂 R<sub>1</sub>)

[0070]	三羟甲基氨基甲烷(缓冲液)	200mmol/L
[0071]	吐温-20(表面活性剂)	2mmol/L
[0072]	NaCl(电解质)	200mmol/L
[0073]	PEG-6000(反应促进剂)	5mmol/L
[0074]	广谱杀菌剂(防腐剂)	3mmol/L
[0075]	乙二胺四乙酸二钠(稳定剂)	2mmol/L

[0076] 其余为纯化水

[0077] 2、抗人 BNP 抗体溶液（试剂 R<sub>2</sub>）

[0078] 用 200mmol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲液（pH 7.4）在室温下稀释羊抗人 BNP 抗体多克隆抗体和 100nm 纳米微球（抗体和微球的重量比例为 1 : 1），将两者混匀后室温振荡吸附 2 小时（即本领域技术人员已公知的物理吸附法），加入封闭液（含 0.1% BSA 三羟甲基氨基四烷缓冲液）封闭 1 小时，离心去上清，用 100mmol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲液稀释至浓度为 2%，并加入量的防腐剂；即获得脑钠肽检测试剂盒试剂 R<sub>2</sub>。

[0079] 3、血清型 BNP 溶液（参考校准品）

[0080] 缓冲液 CAPSO 200mmol/L

[0081] 防腐剂广谱杀菌剂 2mmol/L

[0082] 稳定剂乙二胺四乙酸二钠 0.5mmol/L

[0083] 稳定剂牛血清白蛋白 5mmol/L

[0084] 稳定剂氯化钠 166mmol/L

[0085] 其余为纯化水

[0086] 按照需要的 BNP 参考校准品浓度将相应的重组脑钠肽纯品 400ng/L 加入上述缓冲液中，制备得 400ng/L 浓度的 BNP 参考校准品。BNP 参考校准品的浓度可以是高浓度单点参考校准品，在使用时用生理盐水稀释成多浓度参考校准品，也可以制备成多浓度的参考校准品（50ng/L；100ng/L；150ng/L；200ng/L；400ng/L）。

[0087] 采用本实施例获得的 BNP 测定值与通过酶联免疫（ELISA）分析法所得的 BNP 得值进行比较（如图 3 所示；并进行回归分析），获知相关性  $r = 0.9997$  ( $y = 1.0035x - 0.423$ )；显示出本实施例与酶联免疫（ELISA）分析法具有良好的相关性。

[0088] 本发明的测定条件及步骤：

[0089]

加入物	空白管 (B)	校准管/样品管 (S/T)
蒸馏水 (μl)	2	—
校准液/样品 (μl)	—	2
R1 (μl)	210	210
混匀，37℃孵育 5 分钟；		
R2 (μl)	70	70
混匀，37℃孵育 10 秒，读取吸光度 A <sub>1</sub> ，再置 37℃孵育 5 分钟，在 600nm 读取各管吸光度 A <sub>2</sub> ； $\Delta A = A_2 - A_1$		

[0090] 结果的计算：

[0091] 
$$\text{BNP (mg/L)} = \text{CS} \times \frac{\Delta A_T}{\Delta A_S} \quad (\text{ng/L})$$

[0092] 式中：

[0093]  $\Delta A_T$  待测样品平均每分钟吸光度变化值

[0094]  $\Delta A_s$  校准液平均每分钟吸光度变化值

[0095]  $C_s$  校准液中 BNP 的浓度

[0096] 尚需补充的是：本文凡未特别标明的比例均为重量比。

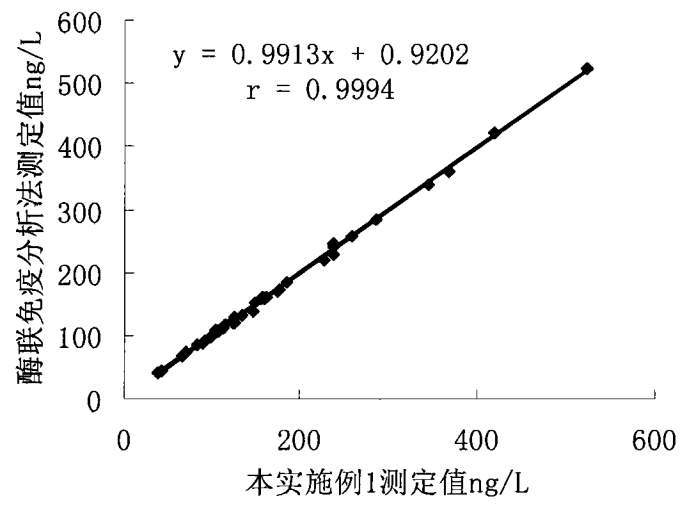


图 1

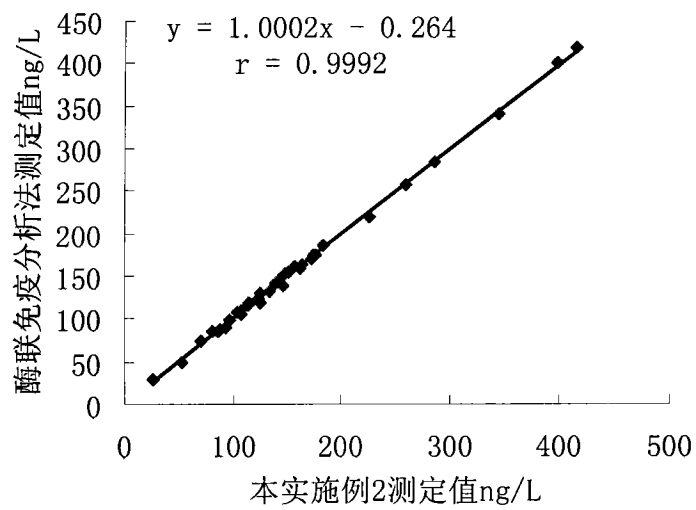


图 2

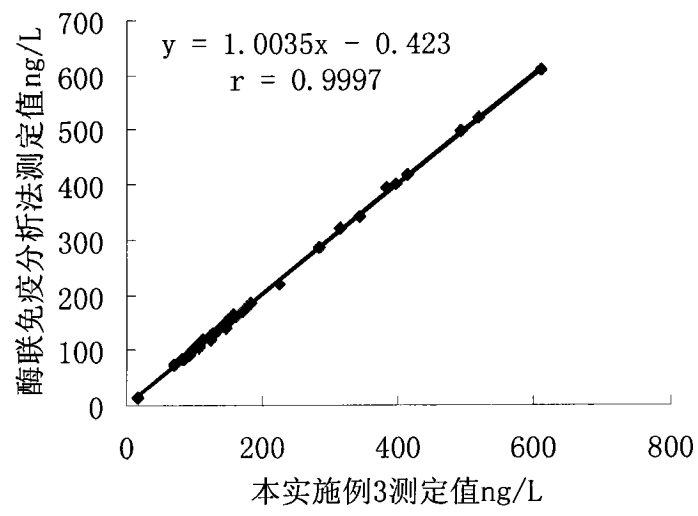


图 3

专利名称(译)	一种纳米微球免疫比浊法检测脑钠肽试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101819208A</a>	公开(公告)日	2010-09-01
申请号	CN201010139399.3	申请日	2010-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	浙江伊利康生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	浙江伊利康生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	浙江伊利康生物技术有限公司		
[标]发明人	王贤理 蒙凯 蔡其浩		
发明人	王贤理 蒙凯 蔡其浩		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/544 G01N33/531		
代理人(译)	王洪新		
其他公开文献	CN101819208B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种测定血清中的脑钠肽的试剂盒。所要解决的技术问题是提供一种样本无需稀释、操作简单、准确度高、重复性好,适用于临床常用的自动生化分析仪的纳米微球免疫比浊法检测脑钠肽试剂盒。技术方案是:一种纳米微球免疫比浊法检测脑钠肽试剂盒,包含:a、试剂R1:缓冲液、防腐剂、稳定剂、电解质、表面活性剂,其余为纯化水;b、试剂R2:缓冲液、结合有脑钠肽抗体的纳米微球及防腐剂,微球直径为50-150nm;c、参考校准品:缓冲液、稳定剂、防腐剂以及根据所需要的BNP参考校准品浓度添加的相应量的重组脑钠肽纯品,其余为纯化水。

