



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102680698 B

(45) 授权公告日 2016. 03. 30

(21) 申请号 201110215295. 0

CN 101566633 A, 2009. 10. 28,

(22) 申请日 2011. 07. 29

CN 101566633 A, 2009. 10. 28,

(73) 专利权人 南京诺尔曼生物技术有限公司

US 5866432 A, 1999. 02. 02,

地址 210031 江苏省南京市高新技术开发区
星火路 10 号人才大厦 E 楼四层

US 5866432 A, 1999. 02. 02,

CN 1790022 A, 2006. 06. 21,

CN 101625366 A, 2010. 01. 13,

(72) 发明人 何仕钊

CN 101769932 A, 2010. 07. 07,

CN 101819202 A, 2010. 09. 01,

(74) 专利代理机构 北京泛诚知识产权代理有限公司 11298

审查员 毕秀华

代理人 杨本良 文琦

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102072960 A, 2011. 05. 25,

CN 102072960 A, 2011. 05. 25,

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

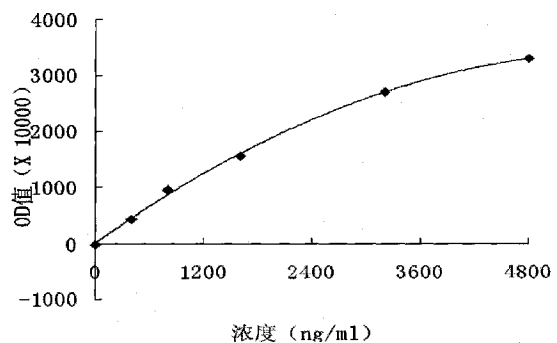
(54) 发明名称

中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL)
测定试剂盒 (胶乳增强免疫比浊法)

(57) 摘要

本发明涉及一种测定血清中的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 含量测定的试剂盒。所要解决的技术问题是提供一种适用于全自动生化分析仪以及特种蛋白仪使用的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白含量测定试剂盒。技术方案是:检测中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白试剂盒,包括:a、试剂 R1:缓冲液、加速剂、表面活性剂,其余为纯化水;b、试剂 R2:缓冲液、结合有抗人的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体的乳胶微球 c、校准品:缓冲液,稳定剂,防腐剂以及根据浓度需要确定的一定量的重组人中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白纯品,其余为纯化水。通过以上试剂组合,快速的测定血清中 NGAL 的含量。

NAGL校准曲线



1. 一种采用胶乳增强免疫比浊法检测人血清中 NGAL 含量的试剂盒, 包含试剂 R1, R2 以及校准液; 所述试剂 R1pH 值为 7.2-8.6 的缓冲液, 所述试剂 R2 为抗人 NGAL 抗体胶乳试剂; 所述校准液为含有定量的 NGAL 的重组蛋白或者是从人血清中提取出来的天然 NGAL,

其特征在于, 所述抗人 NGAL 抗体为单克隆抗体,

所述抗人 NGAL 抗体的胶乳试剂的制备包括以下步骤:

步骤 1: 将羧化的胶乳在 pH7.0 的溶液活化;

步骤 2: 洗涤去掉溶液中的碳化二亚胺, 加 pH7.5-9.0 的缓冲液, 加入 NGAL 抗体, 在 37 度反应 4 小时;

步骤 3: 将步骤 2 所得的液体用 pH7.5-9.0 的固定液固定 6 小时;

步骤 4: 将步骤 3 所得的液体用 pH7.5-9.0 的封闭液体封闭 12 小时; 以及

步骤 5: 将步骤 4 所得的液体离心去上清液, 取沉淀后用含有稳定剂和防腐剂的缓冲液洗涤分散即得,

其中, 步骤 1 所述溶液为含有 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐或 N-羟基琥珀酰亚胺中的一种或者二种,

步骤 2 所述的洗涤过程为高速冷冻离心机离心或者是用孔径小于 100nm 的中空纤维管状进行过滤,

步骤 3 所述溶液含有 6-氨基己酸或甘氨酸,

步骤 5 所述溶液含有的稳定剂选自甘氨酸、小牛血清、吐温-20、曲拉通、氯化钠、氯化镁中的一种或者几种,

其中, 步骤 5 所述溶液含有的甘氨酸、小牛血清的浓度质量分数为 0.05-0.5%; 吐温-20 或者曲拉通浓度质量分数为 0.005-0.01%; 氯化镁、氯化钠的浓度质量分数为 0.05-0.15%。

中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 测定试剂盒 (胶乳增强免疫比浊法)

技术领域：

[0001] 本发明涉及生物技术领域，具体涉及一种采用乳胶增强免疫比浊法测定入血清中中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白含量的试剂盒。

背景技术

[0002] 人类中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL) 分子量约为 25kDa, 共价结合于中性粒细胞明胶酶。NGAL 生理状态下是一种生长因子，主要参与了早期肾脏上皮的发生、生长。在正常组织包括肾脏，肺，胃及结肠的上皮组织中表达量较低。肾脏缺血再灌注损伤后，近曲小管上皮大量表达 NGAL，是近来发现的早期诊断 AKI 的敏感的生物标志物。尿 NGAL 是肾脏缺血再灌注损伤的一个敏感的指标，同时其表达量与肾脏缺血时间相关。

[0003] 在寻找 AKI 早期诊断标记物的研究中，人们发现 NGAL 是一个很好的预测及诊断指标。有学者在急性缺血再灌注和顺铂诱导的 AKI 小鼠模型中，发现在损伤发生数小时之内即可检测到 NGAL 的表达明显增高 [6-7]。尿 NGAL 是缺血性肾损伤的一个早期、敏感的指标，即 AKI 时血、尿 NGAL 水平均升高，尿 NGAL 水平升高更为显著。并且 NGAL 升高较早期肾脏损伤的其他指标如肾脏损伤分子 (kidney injury molecular 1, KIM-1)、Cyr61 (cystein rich protein 61)、132-微球蛋白等出现得要早。同时，NGAL 水平与肾脏损伤程度呈正相关，血和尿 NGAL 可作为诊断 AKI 的早期、敏感、特异性的早期生物学标记物，并在一定程度上可以反映 AKI 严重程度及判断预后。NGAL 已被证实作为小儿心脏搭桥手术后，预测急性肾损害的早期可靠指标。

[0004] NGAL 也是反映肾脏慢性损害的一种有潜力的新标记物，在慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 患者中，NGAL 能确切反映肾脏损害的程度，是 CKD 进展的一个强力和独立的风险指标。

[0005] Suzuki 等发现与血 NGAL 水平相比，尿 NGAL 是儿童 SLE 患者 LN 活动度和肾损害的一个新的标记物，且 LN 病理分型不同其 NGAL 水平亦不同 (依据 WHO 的 LN 分型，IV 型患儿 NGAL 水平明显高于 V 型)。

[0006] 在对抗中性粒细胞胞浆抗体 (antineutrophil cytoplasmic antibodies, ANCA) 相关性血管炎的研究中，Chen 等发现患者血清 NGAL 水平在疾病初期和复发期均较缓解期显著升高，提示循环 NGAL 水平可作为评价 ANCA 相关性血管炎疾病活动的一个有用指标。

[0007] 目前在临床上使用的 NGAL 检测方法只有酶免疫法 (ELISA)，此方法存在操作繁琐，标本需要预处理，检测时间长等缺点。而胶乳增强免疫比浊法具有操作简便，快速，检测灵敏度高、特异、定量准确等优点，在临床应用能得到广泛认可。

发明内容

[0008] 本发明的目的是建立一种新的检测方法，通过鼠抗人的中性粒细胞明胶酶相关脂

质运载蛋白抗体（或者单抗）与胶乳颗粒偶联，采用胶乳增强比浊法来测定人体血清 / 尿液中 NGAL 的含量，运用该方法的试剂具有不需要预处理标本，操作简单，准确度高，重复性好，且能够在全自动生化分析仪或者特种蛋白仪以及分光光度计上使用。

[0009] 为了解决上述的技术问题，本发明实现了以下技术：

[0010] 1. 一种采用胶乳增强免疫比浊法检测 NGAL 含量的试剂盒，其特征在于，包含试剂 R1, R2 以及校准品；所述试剂 R1：PH 值为 7.2-8.6 的缓冲液，所述试剂 R2 为抗人 NGAL 抗体胶乳试剂；所述标准品为含有定量的 NGAL 的重组蛋白或者是从人血清中提取出来的天然 NGAL。

[0011] 2. 所述的 NGAL 检测试剂盒中的 R1 试剂主要包含缓冲液，无机盐，加速剂和防腐剂。

[0012] 3. 所述的 NGAL 检测试剂盒中 R2 试剂主要包含稳定剂，抗人单（多）克隆抗体胶乳颗粒，缓冲液，稳定剂和防腐剂。其中乳胶微球直径为 80-200nm。

[0013] 4. 试剂 R1 所述的无机盐选自氯化钠，氯化钾，硫酸钾一种或几种。缓冲液为：Tris 缓冲液，MES 缓冲液，磷酸盐缓冲液，碳酸盐缓冲液，甘氨酸 - 氢氧化钠缓冲液中一种或几种。加速剂为聚乙二醇 4000，聚乙二醇 6000，聚乙二醇 8000 中一种或几种。

[0014] 5. 试剂 R2 所选用的抗体为鼠抗人 NGAL 单克隆抗体，羊抗人 NGAL 单克隆抗体，兔抗人 NGAL 单克隆抗体一种或者几种混合。也可以选鼠抗人 NGAL 多克隆抗体，羊抗人 NGAL 多克隆抗体，兔抗人 NGAL 多克隆抗体其中一种。

[0015] 6. 试剂 R2 中的稳定剂选自小牛白蛋白，明胶，甘氨酸，吐温 20，曲拉通中的一种或者几种。

[0016] 7. 本发明所述的试剂 R2 为抗人 NGAL 抗体胶乳试剂，采用的是抗人的 NGAL 抗体与胶乳颗粒相偶联。经过离心（过滤）的方法去掉未反应的偶联剂以及未反应的抗体，在含有稳定剂和防腐剂的缓冲液中分散而成。

[0017] 8. 所述抗人 NGAL 抗体的胶乳试剂的制备包括以下步骤。

[0018] 步骤 1：将胶乳在 PH7.0 的溶液中活化。

[0019] 步骤 2：洗涤去掉溶液中的碳化二亚胺，加 PH7.5-9.0 的缓冲液，加入 NGAL 抗体，在 37 度反应 4 小时。

[0020] 步骤 3：将步骤 2 所得的液体用 PH7.5-9.0 的固定液固定 6 小时。

[0021] 步骤 4：将步骤 3 所得的液体用 PH7.5-9.0 的封闭液体封闭 12 小时。

[0022] 步骤 5：将步骤 4 所得的液体洗涤去掉未结合抗体，溶液用含有稳定剂和防腐剂的缓冲液洗涤分散即得。

[0023] 9. 作为优选，步骤 1 中所用的缓冲液为 PBS 缓冲液，MES 缓冲液，Tris 缓冲液中的任何一种缓冲液，且浓度在 20-100mmol/L，PH 在 6.5-7.5 之间。

[0024] 10. 作为优选，步骤 1 中所用的胶乳可以是羧基化的聚苯乙烯胶乳或者是氨基化的聚苯乙烯胶乳。其孔径在 80nm-200nm 均可。

[0025] 11. 作为优选，步骤 1 中含有 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐或 N-羟基琥珀酰亚胺中的一种或者多种。

[0026] 12. 作为优选，在步骤 2 中，去掉溶液 1 中所含的未反应的物质，采用的是高速冷冻离心机或者超微孔径的过滤膜进行过滤。

[0027] 13. 作为优选,在步骤 5 中,所用的稳定剂是小牛血清白蛋白,明胶,甘氨酸,脱脂奶粉一种或者几种相混合。

[0028] 14. 本发明检测的原理是:利用抗原抗体反应,先加入试剂 R1,使血清/尿液中的 NGAL 的位点暴露,当加入抗人的 NGAL 胶乳颗粒溶液,使溶液中的抗原抗体反应形成不溶于溶液的抗原抗体复合物,从而产生一定的浊度,在人血清/尿液中 NGAL 的含量在一定的范围内 NGAL 的含量与浊度成正比。再通过标准曲线进行计算,从而得到 NGAL 的含量。

[0029] 15. 本发明与现有技术相比,具有如下特点:

[0030] 1) 本发明试剂盒具有较高的检测灵敏度,最低检测能够达到 25ng/mL,操作简单,快速,从检测到出结果最多只需要 10 分钟,甚至更短。

[0031] 2) 本发明的试剂盒 R2 试剂中的抗体乳胶的制备由于采用的化学偶联法,稳定性好,在 2-8 度至少可以保存 12 个月。而采用物理吸附法的胶乳抗体试剂,批间差异比较大,而且稳定性不好。

[0032] 3) 本发明试剂盒与进口试剂盒对样品中 NGAL 含量检测的数据经统计分析,无显著性差异,检测结果可靠,在临床上可以替代进口试剂,大幅降低成本以及检测时间。

附图说明

[0033] 图 1 为本发明实施例 1 的校准曲线

[0034] 实施案例

[0035] 本发明公开了一种检测 NGAL 含量的试剂盒,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,他们都被视为包括在本发明内。本发明的产品及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围对本文所述的方法和用进行改动或者适当变更与组合,本实现和应用本发明技术。

[0036] 下面以具体的实施例对本发明做进一步说明。

[0037] 一、NGAL 试剂 R1 即样品缓冲液的制备

[0038]

磷酸二氢钠	2.86g/L
磷酸氢二钠	28.65g/L
氯化钠	6.87g/L
氯化镁	0.34g/L
聚乙二醇 6000	25g/L
叠氮钠	2.0g/L
纯水	1L

[0039] 四 NGAL 试剂中校准品的制备

[0040] 1) 校准品稀释液

[0041]

磷酸二氢钠	2.86g/L
磷酸氢二钠	28.65g/L
氯化钠	9g/L
小牛白蛋白	50g/L
叠氮钠	2.5g/L
稳定剂	10g/L

[0042] 二、按照需要的 NGAL 参考校准品浓度将相应的重组 NGAL 纯品 1920ng 加入校准品稀释液 2ml 的缓冲液中,制备得到 960ng/ml 浓度的 NGAL 校准品在使用的时候在用缓冲液按照比例稀释成多个浓度。

[0043] 三、NGAL 测定方法(日立 7060 全自动生化分析仪)

[0044] 校准品浓度:4800ng/ml 3200ng/ml 1600ng/ml 800ng/ml 400ng/ml 0ng/ml

[0045] 测定波长:主波长:570nm 副波长:800nm

[0046] 试剂比例:R1 : R2 : S = 150ul : 50ul : 4ul

[0047] 校准方式:spline

[0048] 读点方式:在试剂 R1 与样品加入,反应 5 分钟,读点 A1,然后加入 R2 后,反应 5 分钟,再读点 A2,计算吸光度的变化。

[0049] 校准曲线见图 1

[0050] 四、本发明所述试剂盒的分析性能评估

[0051] 1. 灵敏度测定

[0052] 用本发明所述的试剂盒对空白样本(含有 5%牛血清的生理盐水)重复测定 20 次,最低检测限度为空白的均值浓度加上二个标准差,得到最低检测限度为 12ng/ml。

[0053] 2. 线性评估

[0054] 取浓度将近 4600ng/ml (4540.2ng/ml) 的临床血清标本,进行稀释,至少稀释 6 个点,每个点重复测定 3 次,根据式 (1), (2), (3) 计算出直线方程 $y = a+bx$:

$$[0055] \quad b = \frac{n \sum X_i Y_i - \sum X_i \cdot \sum Y_i}{n \sum X_i^2 - (\sum X_i)^2} \dots\dots\dots (1)$$

$$[0056] \quad |a| = \frac{|\sum Y_i - b \sum X_i|}{n} \dots\dots\dots (2)$$

$$[0057] \quad r = \frac{n \sum X_i Y_i - \sum X_i \cdot \sum Y_i}{\sqrt{[n \cdot \sum X_i^2 - (\sum X_i)^2][n \cdot \sum Y_i^2 - (\sum Y_i)^2]}} \dots\dots\dots (3)$$

[0058] 式中:b- 回归线的斜率;

[0059] |a|- 回归线截距的绝对值;

[0060] r- 回归系数;

[0061] X_i - 测定管溶液的浓度;

[0062] Y_i -3 次重复测定的与测定管溶液浓度对应的吸光度均值;

[0063] i-1, 2, 3, …… , n;

[0064] n- 测定样本数。

[0065] 经计算得出,在 0.1ng/ml 到 4540ng/ml 的范围内,本试剂盒能达到很好的线性。

[0066] 3 与酶联免疫方法的试剂盒测定结果的相关性。

[0067] 通过测定 100 例标本(其中阳性血清 70 例,阴性血清 30 例)本试剂盒与酶联免疫方法的试剂盒的相关系数 $R^2 = 0.987$,相关方程为:

[0068] $Y = 0.9X + 0.687$ 。

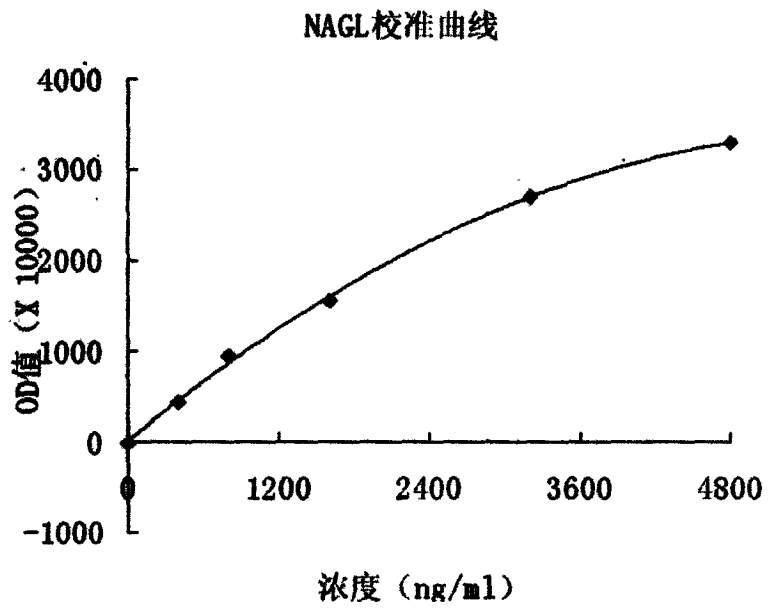


图 1

专利名称(译)	中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)测定试剂盒(胶乳增强免疫比浊法)		
公开(公告)号	CN102680698B	公开(公告)日	2016-03-30
申请号	CN201110215295.0	申请日	2011-07-29
[标]申请(专利权)人(译)	南京诺尔曼生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京诺尔曼生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京诺尔曼生物技术有限公司		
[标]发明人	何仕钊		
发明人	何仕钊		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
代理人(译)	文琦		
其他公开文献	CN102680698A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种测定血清中的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)含量测定的试剂盒。所要解决的技术问题是提供一种适用于全自动生化分析仪以及特种蛋白仪使用的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白含量测定试剂盒。技术方案是：检测中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白试剂盒，包括：a、试剂R1：缓冲液、加速剂、表面活性剂，其余为纯化水；b、试剂R2：缓冲液、结合有抗人的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体的乳胶微球c、校准品：缓冲液，稳定剂，防腐剂以及根据浓度需要确定的一定量的重组人中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白纯品，其余为纯化水。通过以上试剂组合，快速的测定血清中NGAL的含量。

