



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109239359 A

(43)申请公布日 2019.01.18

(21)申请号 201811061298.1

G01N 33/532(2006.01)

(22)申请日 2018.09.12

G01N 21/76(2006.01)

(71)申请人 迪瑞医疗科技股份有限公司

地址 130000 吉林省长春市高新区宜居路
3333号

(72)发明人 刘杨 翟涛 高威 孙成艳
何浩会

(74)专利代理机构 长春众邦菁华知识产权代理
有限公司 22214

代理人 刘微

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/553(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

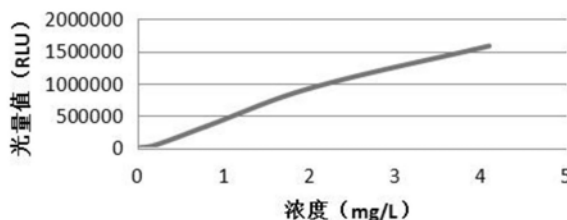
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒及其
制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种 β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法,属于免疫分析的技术领域,解决现有技术灵敏度低、成本高等问题。该试剂盒包括以下试剂:R1:含有链霉亲和素包被的磁珠的液体;R2:含有吖啶酯标记的 β 2-MG抗体的液体;R3:含有生物素标记的 β 2-MG抗体的液体。本发明的 β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒具有检测灵敏度高、特异性强、重复性好、检测范围广、稳定性好等优点,可广泛用于 β 2-MG的临床检测。



1. β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒,其特征在于,包括以下试剂:

R1:含有链霉亲和素包被的磁珠的液体;

R2:含有吖啶酯标记的 β 2-MG抗体的液体;

R3:含有生物素标记的 β 2-MG抗体的液体;

其中,R1中链霉亲和素包被的磁珠的浓度为0.05%-0.1%;

R2中 β 2-MG抗体与吖啶酯的摩尔比为1:3-1:15;吖啶酯标记的 β 2-MG抗体的浓度为0.1-0.5 μ g/ml;

R3中 β 2-MG抗体与生物素的摩尔比为1:3-1:15;生物素标记的 β 2-MG抗体的浓度为0.5-3 μ g/ml;

R1缓冲液的pH值为7.0-8.0,R2和R3缓冲液的pH值均为6.0-6.8。

2.根据权利要求1所述的 β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒,其特征在于,还包括两点企业校准品,校准品中含有 β 2-MG的浓度分别为0.1mg/L和2mg/L。

3.根据权利要求2所述的 β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒,其特征在于,校准品的缓冲液为含有20%小牛血清的100mM PBS缓冲液。

4.根据权利要求1所述的 β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒,其特征在于,R1的制备方法为:取浓度为100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒溶液,加入20倍体积的TBST溶液充分混匀10分钟后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒;重复清洗3次后用含有0.05%吐温和0.02%叠氮钠、pH7.0-8.0的25mM Tris缓冲液配成磁珠浓度为0.05%-0.1%的固相试剂R1。

5.根据权利要求1所述的 β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒,其特征在于,R2的制备方法为:将 β 2-MG抗体加入50mM-200mM PBS缓冲溶液,将 β 2-MG抗体与吖啶酯按摩尔体积比1:3-1:15混合,充分混匀;室温放置2-4小时后,加入1mL 20%赖氨酸的封闭液,混匀,封闭时间为1h;封闭后对吖啶酯标记抗体溶液进行纯化,收取纯化后溶液,用含有0.05%吐温、pH6.0-6.8的400mM Bistris缓冲液稀释至终浓度为0.1-0.5 μ g/ml的试剂R2。

6.根据权利要求1所述的 β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒,其特征在于,R3的制备方法为:将 β 2-MG抗体加入50mM-200mM PBS缓冲溶液,将 β 2-MG抗体与生物素按摩尔体积比1:3-1:15混合,充分混匀,室温放置2-4小时后,对生物素标记抗体溶液进行纯化,收取纯化后溶液,用含有1%BSA、pH6.0-6.8的400mM Bistris缓冲液将纯化后的抗体配制成终浓度为0.5-3 μ g/ml的试剂R3。

7.根据权利要求5或6所述的 β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒,其特征在于,纯化步骤采用的是AKTA蛋白纯化仪。

8.根据权利要求1所述的 β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、制备试剂R1,R1的制备方法为:取浓度为100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒溶液,加入20倍体积的TBST溶液充分混匀10分钟后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒;重复清洗3次后用含有0.05%吐温和0.02%叠氮钠、pH7.0-8.0的25mM Tris缓冲液配制成磁珠浓度为0.05%-0.1%的固相试剂R1;

S2、制备试剂R2,R2的制备方法为:将 β 2-MG抗体加入50mM-200mM PBS缓冲溶液,将 β 2-MG抗体与吖啶酯按摩尔体积比1:3-1:15混合,充分混匀;室温放置2-4小时后,加入1mL

20%赖氨酸封闭液,混匀,封闭时间为1h;封闭后对吡啶酯标记抗体溶液进行纯化,收取纯化后溶液,用含有0.05%吐温、pH6.0-6.8的400mM Bistris缓冲液稀释至终浓度为0.1-0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的试剂R2;

S3、制备试剂R3,R3的制备方法为:将 β 2-MG抗体加入50mM-200mM PBS缓冲溶液,将 β 2-MG抗体与生物素按摩尔体积比1:3-1:15混合,充分混匀,室温放置2-4小时后,对生物素标记抗体溶液进行纯化,收取纯化后溶液,用含有1%BSA、pH6.0-6.8的400mM Bistris缓冲液将纯化后的抗体配制成终浓度为0.5-3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的试剂R3。

9.根据权利要求1所述的 β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:将待测样本与R2及R3试剂孵育10min,再加入R1试剂孵育10min,洗涤,加入激发液记录相对发光强度。

β2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫分析的技术领域,尤其涉及一种β2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] β2-微球蛋白(简称β2-MG)是由Berggard和Bearn于1968年从肾脏患者尿中分离出的一种蛋白质,由于它的分子量为11800,电泳时显于β2区带,故被命名为β2-微球蛋白。β2-MG是人体有核细胞产生的一种由100个氨基酸残基组成的单链多肽低分子蛋白。β2-MG与人类白细胞抗原(HLA)的轻链部分相同,链内含有一对二硫键,β2-MG与HLA-A、B、C抗原的重链非共价的相结合而存在于细胞膜上。一般认为除成熟红细胞和胎盘滋养层细胞外,其它细胞均含有β2-MG。因此,起源于人体间质细胞上皮和造血系统的正常细胞和恶性细胞均能合成β2-MG。它可从有核细胞中脱落进入血循环,使血液中的β2-MG升高。

[0003] 血、尿β2-MG不仅可对肾脏疾病的临床诊断起辅助作用,还可作为肾脏损害程度的指标。正常情况下β2-MG在血液、尿液中含量都很少,血液中β2-MG经肾小球过滤后99.9%被近端小管重吸收。但在发生急、慢性肾炎,肾功能衰竭,肾移植后发生排斥反应等肾脏疾病时β2-MG水平升高。故测定血液β2-MG可作为肾小球滤过率的指标,主要的临床应用在于监测肾小管功能。当血液β2-MG水平上升,可反映肾小球滤过功能下降或体内合成增加,尿液中β2-MG升高,可反映肾小管功能受损和肾小球滤过率增加。此外,据文献报道,多种血液系统及实体性肿瘤患者β2-微球蛋白含量也可异常增高,在淋巴系统中如慢性淋巴细胞白血病、淋巴细胞肉瘤、多发性骨髓瘤等中尤为明显;在肺癌、乳腺癌、胃肠道癌及子宫颈癌等恶性肿瘤患者体内也可见增高。另外,类风湿关节炎,系统性红斑狼疮,肝炎等患者β2-MG水平也可升高。

[0004] 目前用于检测β2-MG的免疫分析方法主要有酶联免疫分析法和化学发光免疫分析法。酶联免疫分析法采用辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记抗体,用于催化发光底物产生颜色变化,操作简单,但是标记物易失活,发光底物需要避光,试剂的检测灵敏度较低,导致测试结果不准确。化学发光免疫分析法采用催化剂催化化学发光物质形成一种激发态中间体,当激发态中间体回到稳定的基态时,发出光子,具有操作简单,自动化程度高,检测速度快等优点。以上定量检测β2-MG的方法存在以下缺陷:1) ELISA方法采用微孔板作为固定性,包被密度有限,灵敏度较低,反应时间较长;2) 采用异鲁米诺衍生物直接标记抗体,采用FITC抗体-FITC将FER抗体间接偶联至磁珠表面,引入更多的影响因素,影响结果的检测。

发明内容

[0005] 本发明针对上述技术问题,提供一种β2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法,该试剂盒用于定量检测人血清/尿液中的β2-MG含量,具有灵敏度高,操作简单,成本低等优点。

[0006] 为了实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0007] β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒,包括以下试剂:

[0008] R1:含有链霉亲和素包被的磁珠的液体;

[0009] R2:含有吖啶酯标记的 β 2-MG抗体的液体;

[0010] R3:含有生物素标记的 β 2-MG抗体的液体;

[0011] 其中,R1中链霉亲和素包被的磁珠的浓度为0.05%-0.1%;

[0012] R2中 β 2-MG抗体与吖啶酯的摩尔比为1:3-1:15;吖啶酯标记的 β 2-MG抗体的浓度为0.1-0.5 μ g/ml;

[0013] R3中 β 2-MG抗体与生物素的摩尔比为1:3-1:15;生物素标记的 β 2-MG抗体的浓度为0.5-3 μ g/ml;

[0014] R1缓冲液的pH值为7.0-8.0,R2和R3缓冲液的pH值均为6.0-6.8。

[0015] 进一步地,上述的检测 β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒,还包括两点企业校准品,校准品中含有 β 2-MG的浓度分别为0.1mg/L和2mg/L。

[0016] 进一步地,校准品缓冲液为含有20%小牛血清的100mM PBS缓冲液。

[0017] 进一步地,R1的制备方法为:取浓度为100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒溶液,加入20倍体积的TBST溶液充分混匀10分钟后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒;重复清洗3次后用含有0.05%吐温和0.02%叠氮钠、pH7.0-8.0的25mM Tris缓冲液配成磁珠浓度为0.05%-0.1%的固相试剂R1。

[0018] 进一步地,R2的制备方法为:将 β 2-MG抗体加入50mM-200mM PBS缓冲溶液,将 β 2-MG抗体与吖啶酯按摩尔体积比1:3-1:15混合,充分混匀;室温放置2-4小时后,加入1mL 20%赖氨酸封闭液,混匀,封闭时间为1h;封闭后对吖啶酯标记抗体溶液进行纯化,收取纯化后溶液,用含有0.05%吐温、pH6.0-6.8的400mM Bistris缓冲液稀释至终浓度为0.1-0.5 μ g/ml的试剂R2。

[0019] 进一步地,R3的制备方法为:将 β 2-MG抗体加入50mM-200mM

[0020] PBS缓冲溶液,将 β 2-MG抗体与生物素按摩尔体积比1:3-1:15混合,充分混匀,室温放置2-4小时后,对生物素标记抗体溶液进行纯化,收取纯化后溶液,用含有1%BSA、pH6.0-6.8的400mM Bistris缓冲液将纯化后的抗体配制成终浓度为0.5-3 μ g/ml的试剂R3。

[0021] 进一步地,上述纯化步骤采用的是AKTA蛋白纯化仪。

[0022] 本发明还提供了上述的 β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0023] S1、制备试剂R1,R1的制备方法为:取浓度为100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒溶液,加入20倍体积的TBST溶液充分混匀10分钟后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒;重复清洗3次后用含有0.05%吐温和0.02%叠氮钠、pH7.0-8.0的25mM Tris缓冲液配制成磁珠浓度为0.05%-0.1%的固相试剂R1;

[0024] S2、制备试剂R2,R2的制备方法为:将 β 2-MG抗体加入50mM-200mM PBS缓冲溶液,将 β 2-MG抗体与吖啶酯按摩尔体积比1:3-1:15混合,充分混匀;室温放置2-4小时后,加入1mL 20%赖氨酸封闭液,混匀,封闭时间为1h;封闭后对吖啶酯标记抗体溶液进行纯化,收取纯化后溶液,用含有0.05%吐温、pH6.0-6.8的400mM Bistris缓冲液稀释至终浓度为0.1-0.5 μ g/ml的试剂R2;

[0025] S3、制备试剂R3,R3的制备方法为:将 β 2-MG抗体加入50mM-200mM PBS缓冲溶液,将

β 2-MG抗体与生物素按摩尔体积比1:3-1:15混合,充分混匀,室温放置2-4小时后,对生物素标记抗体溶液进行纯化,收取纯化后溶液,用含有1%BSA、pH6.0-6.8的400mM Bistris缓冲液将纯化后的抗体配制成终浓度为0.5-3 μ g/ml的试剂R3。

[0026] 本发明还提供了上述的 β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒的检测方法,包括以下步骤:

[0027] 1) 将待测样本与R2及R3试剂孵育10min,样本中 β 2-MG抗原与生物素标记 β 2-MG第一抗体、吖啶酯标记的 β 2-MG第二抗体发生免疫反应,形成生物素- β 2-MG抗体- β 2-MG- β 2-MG抗体-吖啶酯溶剂;

[0028] 2) 再加入R1试剂孵育10min,链霉亲和素磁珠与生物素结合,形成磁珠-链霉亲和素-生物素- β 2-MG抗体- β 2-MG- β 2-MG抗体-吖啶酯复合物;

[0029] 3) 加入清洗缓冲液洗涤,将未反应的溶液清洗去除;

[0030] 4) 加入酸性激发液,使吖啶酯标记物游离;加入碱性激发液,使吖啶酯发射光子;光电倍增管接收光量子数与 β 2-MG的含量成正比。

[0031] 其中,清洗缓冲液包括50g/L磷酸氢二钠、10g/L磷酸二氢钠、100g/L NaCl、2%的Triton-100和2%的Proclin-300;

[0032] 酸性激发液为过氧化氢和硝酸水溶液,过氧化氢的质量浓度为1~2%,硝酸的摩尔浓度为6~8mM;

[0033] 碱性激发液为氢氧化钠水溶液,氢氧化钠的摩尔浓度为0.3~0.4M。

[0034] 本发明的试剂盒采用夹心法原理定量测定血清或血浆中的 β 2-MG,在链霉亲和素-磁微粒悬浮液中加入生物素- β 2-MG抗体复合物,通过生物素和链霉亲和素的亲和反应,形成磁微粒-亲和素-生物素- β 2-MG复合物,通过抗原抗体反应,形成抗原抗体复合物形成磁微粒-生物素- β 2-MG抗体- β 2-MG- β 2-MG抗体-吖啶酯,用磁场将复合物吸附在反应杯底部,洗掉游离的成分,加入酸碱激发液,根据发光强度定量测量样本中 β 2-MG的含量。

[0035] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0036] 本发明提供的检测 β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒,采用一步法双抗体夹心的反应模式,定量测定人体血清中 β 2-MG的含量,确保的检测的灵敏度。本发明使用吖啶酯化学发光体系,稳定性好,特异性强,灵敏度高,线性范围广,检测时间短为临床诊断提供更为特异、稳定、快速、可靠的检测手段,解决了现有技术中试剂的有效期短、操作繁琐、灵敏度低、检测成本高的缺点。

[0037] 本发明提供的检测 β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒的制备方法及检测方法,该方法简单易操作,制备得到的检测 β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒,检测灵敏度高、线性范围广、稳定性好。

附图说明

[0038] 为了更清楚地说明本申请实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例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中记载的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0039] 图1为本发明实施例提供的 β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒剂量反应校准曲线。

具体实施方式

[0040] 本发明提供的 β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒,包括以下试剂:

[0041] R1:含有链霉亲和素包被的磁珠的液体;

[0042] R2:含有吖啶酯标记的 β 2-MG抗体的液体;

[0043] R3:含有生物素标记的 β 2-MG抗体的液体;

[0044] 其中,R1中链霉亲和素包被的磁珠的浓度为0.05%-0.1%;

[0045] R2中 β 2-MG抗体与吖啶酯的摩尔比为1:3-1:15;吖啶酯标记的 β 2-MG抗体的浓度为0.1-0.5 μ g/ml;

[0046] R3中 β 2-MG抗体与生物素的摩尔比为1:3-1:15;生物素标记的 β 2-MG抗体的浓度为0.5-3 μ g/ml;

[0047] R1缓冲液的pH值为7.0-8.0,R2和R3缓冲液的pH值均为6.0-6.8。

[0048] 上述的检测 β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒,还包括两点企业校准品,校准品中含有 β 2-MG的浓度分别为0.1mg/L和2mg/L,校准品缓冲液为含有20%小牛血清的100mM PBS缓冲液。

[0049] 为了使本领域的技术人员更好地理解本发明的技术方案,下面将结合附图和实施例对本发明作进一步的详细介绍。

[0050] 实施例1主校准品制备

[0051] 用含有20%小牛血清的100mM PBS缓冲液将 β 2-MG稀释成校准品,等量分装成浓度分别为0mg/L、0.05mg/L、0.2mg/L、0.8mg/L、2mg/L、4.1mg/L的6瓶主校准品。基于主校准品的拟合曲线进行回值得到两点校准值,其中企业两点校准的浓度分别为0.1mg/L和2mg/L。

[0052] 参见图1所示, β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒剂量反应校准曲线,线性相关系数 $r \geq 0.9900$,校准合格,具体参数见表1。

[0053] 表1校准品检测相对光量值

[0054]

测定校准品浓度 (mg/L)	相对光强度 (RLU)
0	85
0.05	5067
0.20	40658
0.80	334901
2.00	921224
4.10	1581721

[0055] 实施例2 β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒的制备

[0056] R1的制备:取浓度为100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒溶液0.5毫升(50mg),加入10毫升的TBST溶液充分混匀10分钟后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒。重复清洗3次后,用含有0.05%吐温和0.02%叠氮钠、pH7.0的25mM Tris缓冲液配制成磁珠浓度为0.05%的固相试剂R1,2~8℃保存。

[0057] R2的制备:将500 μ g抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入50mM PBS缓冲溶液,充分混匀,混匀后,按抗体:吖啶酯=1:3摩尔比加入2mg/mL吖啶酯的DMF溶液,用离心机室温条件下离心0.5分钟。将离心管用封口膜密封后放

入避光暗盒中,之后将暗盒放入气浴恒温振荡器(25℃),混匀2小时。加入1mL 20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封闭时间为1h。将封闭好的抗体选用GE公司AKTA全自动蛋白纯化仪上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的吖啶酯标记抗体浓溶液用含有0.05%吐温、pH6.0的400mM Bistris缓冲液稀释至终浓度为0.1μg/ml的试剂R2,2~8℃保存。

[0058] R3的制备:将β2-MG单克隆抗体300μg加入50KDa超滤离心管内,加入500μl的50mM PBS缓冲液,10000rpm离心10min,重复3次,将抗体内缓冲液置换为生物素标记缓冲液。收取置换后溶液,按抗体:生物素=1:3摩尔比加入生物素,静置2h。选用GE公司AKTA全自动蛋白纯化仪对生物素标记抗体溶液进行纯化,收取纯化后溶液,用含有1%BSA、pH6.0的400mM Bistris缓冲液将纯化后的抗体配制成终浓度为0.5μg/ml的试剂R3,4℃保存。

[0059] 实施例3β2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒的制备

[0060] R1的制备:取浓度为100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒溶液0.5毫升(50mg),加入10毫升的TBST溶液充分混匀10分钟后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒。重复清洗3次后,用含有0.05%吐温和0.02%叠氮钠、pH7.5的25mM Tris缓冲液配制成磁珠浓度为0.07%的固相试剂R1,2~8℃保存。

[0061] R2的制备:将500μg抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入100mM PBS缓冲溶液,充分混匀,混匀后,按抗体:吖啶酯=1:10摩尔比2mg/mL吖啶酯的DMF溶液,用离心机室温条件下离心0.5分钟。将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,之后将暗盒放入气浴恒温振荡器(25℃),混匀4小时。加入1mL 20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封闭时间为1h。将封闭好的抗体选用GE公司AKTA全自动蛋白纯化仪上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的吖啶酯标记抗体浓溶液用含有0.05%吐温pH6.5的400mM Bistris缓冲液稀释至终浓度为0.3μg/ml的试剂R2,2~8℃保存。

[0062] R3的制备:将β2-MG单克隆抗体300μg加入50KDa超滤离心管内,加入500μl的100mM PBS缓冲液,10000rpm离心10min,重复3次,将抗体内缓冲液置换为生物素标记缓冲液。收取置换后溶液,按抗体:生物素=1:10摩尔比加入生物素,静置2h。选用GE公司AKTA全自动蛋白纯化仪对生物素标记抗体溶液进行纯化,收取纯化后溶液,用含有1%BSA、pH6.5的400mM Bistris缓冲液将纯化后的抗体配制成终浓度为2μg/ml的试剂R3,4℃保存。

[0063] 实施例4β2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒的制备

[0064] R1的制备:取浓度为100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒溶液0.5毫升(50mg),加入10毫升的TBST溶液充分混匀10分钟后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒。重复清洗3次后,在含有0.05%吐温和0.02%叠氮钠、pH8.0的25mM Tris缓冲液配制成磁珠浓度为0.1%的固相试剂R1,2~8℃保存。

[0065] R2的制备:将500μg抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入200mM PBS缓冲溶液,充分混匀,混匀后,按抗体:吖啶酯=1:15摩尔比2mg/mL吖啶酯的DMF溶液,用离心机室温条件下离心0.5分钟。将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,之后将暗盒放入气浴恒温振荡器(25℃),混匀4小时。加入1mL 20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封闭时间为1h。将封闭好的抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使

用时将纯化后的吡啶酯标记抗体浓溶液用含有0.05%吐温pH6.8的400mM Bistris缓冲液稀释至终浓度为0.5μg/ml的试剂R2, 2~8℃保存。

[0066] R3的制备:将β2-MG单克隆抗体300μg加入50KDa超滤离心管内,加入500μl的200mM PBS缓冲液,10000rpm离心10min,重复3次,将抗体内缓冲液置换为生物素标记缓冲液。收取置换后溶液,按抗体:生物素=1:15摩尔比加入生物素,静置2h。选用GE公司AKTA全自动蛋白纯化仪对生物素标记抗体溶液进行纯化,收取纯化后溶液,用含有1%BSA、pH为6.8的400mM Bistris缓冲液将纯化后的抗体配制成为终浓度为3μg/ml试剂R3,4℃保存。

[0067] 实施例5β2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒的性能评估

[0068] 按照本领域常规的制造及检定规程对制备试剂盒进行检定,结果见表2。

[0069] 表2试剂盒性能评估结果

[0070]

检验项目	检验标准		检验结果
灵敏度	≤0.05mg/L		0.0006mg/L
特异性	项目	测试浓度	交叉反应性 (%)
	IgG	30000mg/L	0
	IgA	4000mg/L	0
	IgM	2500mg/L	0
	IgE	0.5mg /L	0
精密度	批内 CV≤8%		5%
	批间 CV≤15%		8%
准确性	相对偏差<±15%		1.39%
稳定性	各试剂组分置 37℃放置 14 天		符合标准

[0071] 综上,在本发明的研究过程中,本发明人首先对所用的原材料进行了筛选及质量控制,包括抗体的浓度、纯度、亲和力的研究,吡啶酯及生物素标记后抗体活性。然后对吡啶酯及生物素标记体系进行了研究,使用不同标记比例及标记缓冲液进行实验,通过反复实验及对比实验,最终找到了方法简便、产率高、成本低、质量可靠的标记方法。

[0072] 此外,本发明的发明人还对试剂盒的反应模式及条件进行了探索。通过不同的反应模式及反应时间对比实验,最终确定了本试剂盒采用双抗体夹心一步法两步孵育反应模式,并最终确定了试剂孵育时间为10min,缩短了检测时间,提高了检测效率。

[0073] 实施例6β2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒的方法学检定

[0074] 1. 试剂盒线性范围测定

[0075] 将试剂盒拟定线性范围为0.05mg/L~4mg/L,采用实施例2是制备的试剂盒测定线性范围样本0.041mg/L、0.102mg/L、0.256mg/L、0.640mg/L、1.600mg/L、4.000mg/L,结果见表3,验证拟定的线性范围合格,获得线性范围为0.05mg/L~4mg/L,线性相关系数 $r \geq 0.9999$ 。

[0076] 表3试剂盒线性范围测定

[0077]

测定线性样本浓度 (mg/L)	相对光强度 (RLU)
0.041	11975
0.102	41321
0.256	153555
0.640	552251
1.600	1536794
4.000	2343929

[0078] 2. 试剂盒灵敏度的测定

[0079] 采用实施例2制备的试剂盒,测定20次零浓度样本,计算平均值(M)及标准差(SD),得出 $M+2SD$,根据零浓度校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带入方程,得出相应浓度值即为试剂盒灵敏度 0.0006mg/L ,结果见表4和表5。

[0080] 表4第1点发光值

[0081]

空白样本发光值				
87	84	103	132	59
90	105	146	89	145
158	76	162	63	96
92	95	139	74	72

[0082] 第一点发光均值 $M_1=103.35$, $SD_1=32.07$, $M_1+2SD_1=167.49$

[0083] 表5第2点发光值

[0084]

第二点 (0.05mg/L) 校准发光值		
5067	5308	5234

[0085] 第二点发光均值 $M=5203$,第一点(0,103.35)与第二点(0.05,5203)连线拟合曲线,计算的灵敏度 $=0.0006\text{mg/L}$ 。

[0086] 3. 试剂盒精密度测试

[0087] (1) 批内精密度

[0088] 采用实施例3制备的试剂盒,对高值和低值两个不同浓度的样品分别重复测定10次,得出批内变异系数为1.19%-1.97%,结果见表6。

[0089] 表6批内精密度测定结果

[0090]

测定标准物质浓度 (mg/L)	测定次数	变异系数CV%
0.1	10	1.97

2	10	1.19
---	----	------

[0091] (2) 批间精密度

[0092] 采用实施例3中制备的3批不同批号的试剂盒,对高值和低值两个不同浓度的样品分别重复测定10次,得出批间变异系数为3.25%~7.38%,结果见表7。

[0093] 表7批间精密度测定结果

[0094]

测定标准物质浓度 (mg/L)	测定次数	变异系数CV%
0.1	30	7.38
2	30	3.25

[0095] 4. 试剂盒准确度测定

[0096] 将实施例4中制备的试剂盒其中1批,测定浓度为0.05mg/L及2mg/L的标准物质,相对偏差<10%,测试结果见表8:

[0097] 表8准确度测定结果

[0098]

测定标准物质浓度 (mg/L)	测定结果	相对偏差%
0.05	0.054	8
2	2.092	4.4

[0099] 5. 试剂盒特异性实验

[0100] β 2-MG检测浓度为0.01mg/L和1mg/L时观察下列交叉反应,结果见表9。

[0101] 表9特异性测定结果

[0102]

	测试浓度	交叉反应性
IgG	30000mg/L	0
IgA	4000mg/L	0
IgM	2500mg/L	0

[0103]

IgE	0.5mg /L	0
-----	----------	---

[0104] 6. 试剂盒稳定性实验

[0105] 将实施例4中制备的试剂盒分别置于4℃及37℃下储存14天进行稳定性实验,结果表明试剂盒标准品发光强度的变化、精密度、准确性等指标均在正常范围内,试剂盒有效期可达12个月。

[0106] 经过大量重复性实验,本发明的试剂盒指标如下:

[0107] 检测范围:0.02~4mg/L;

[0108] 灵敏度:最低检测限 $\leq$ 0.0006mg/L;

[0109] 精密度: $\leq$ 10%;

[0110] 准确度:测值标准物质偏差 $\leq$ 10%。

[0111] 特异性:测定浓度为30000mg/L的IgG,浓度为4000mg/L的IgA,浓度为2500mg/L的

IgM,浓度为0.5mg/L的IgE,其测定结果均为阴性。

[0112] 通过上述结果可以看出本发明研制的检测 β 2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒具有灵敏度高、特异性强、重复性好、检测范围广、稳定性好等优点,可广泛用于临床检测。

[0113] 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换,但这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

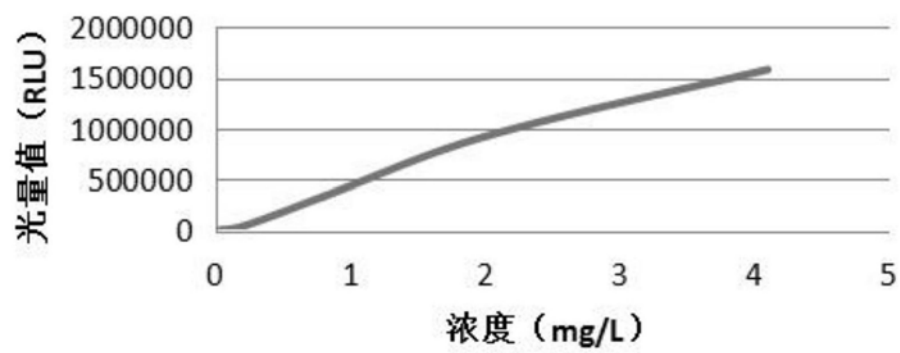


图1

专利名称(译)	β2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN109239359A	公开(公告)日	2019-01-18
申请号	CN201811061298.1	申请日	2018-09-12
[标]发明人	刘杨 翟涛 高威 孙成艳 何浩会		
发明人	刘杨 翟涛 高威 孙成艳 何浩会		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/553 G01N33/58 G01N33/532 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/6803 G01N21/76 G01N33/532 G01N33/54326 G01N33/553 G01N33/58		
代理人(译)	刘微		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种β2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法，属于免疫分析的技术领域，解决现有技术灵敏度低、成本高等问题。该试剂盒包括以下试剂：R1：含有链霉亲和素包被的磁珠的液体；R2：含有吲哚酯标记的β2-MG抗体的液体；R3：含有生物素标记的β2-MG抗体的液体。本发明的β2-MG化学发光免疫分析测定试剂盒具有检测灵敏度高、特异性强、重复性好、检测范围广、稳定性好等优点，可广泛用于β2-MG的临床检测。

