



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110763839 A
(43)申请公布日 2020.02.07

(21)申请号 201911051087.4

(22)申请日 2019.10.31

(71)申请人 安徽大千生物工程有限公司
地址 231200 安徽省合肥市经开区桃花工
业园繁华大道工投·立恒工业广场
B12C

(72)发明人 芮双印 李祥宇 支新梅

(74)专利代理机构 合肥兴东知识产权代理有限
公司 34148

代理人 王伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/573(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/82(2006.01)

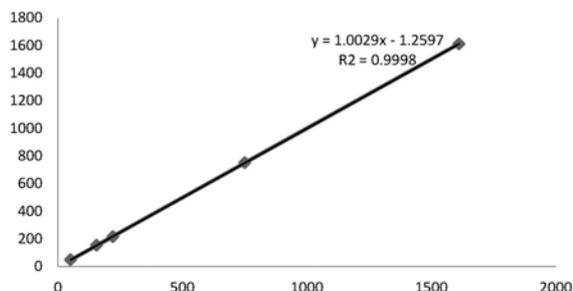
权利要求书8页 说明书19页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法

(57)摘要

本发明公开了一种TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分;其中,试剂R1包括:Tris-HCl缓冲液、PEG6000、BSA、NaCl、MgCl₂、NaN₃、EDTA;试剂R2包括:Tris-HCl缓冲液、PEG6000、BSA、TIMP-I多克隆抗体的胶乳微球、TX-100、NaCl、MgCl₂、NaN₃、EDTA。本发明还公开了一种上述TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备与使用方法。本发明试剂盒重复性与稳定性好、灵敏性与特异性高,且可在全自动生化分析仪上使用,成本低廉,可节省检测时间,便于临床应用。



1. 一种TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在于,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

试剂R1:

Tris-HCl 缓冲液	50~200 mM/L
PEG6000	10~50 g/L
BSA	5~20 g/L
NaCl	5~15 g/L
MgCl ₂	0.5~2 g/L
NaN ₃	0.5~2 g/L
EDTA	0.5~2 g/L

其溶剂为纯化水;

试剂R2:

Tris-HCl 缓冲液	50~200 mM/L
PEG6000	10~50 g/L
BSA	5~20 g/L
TIMP-I 多克隆抗体的胶乳微球	5%~15%
TX-100	0.5%-3%
NaCl	5~15 g/L
MgCl ₂	0.5~2 g/L
NaN ₃	0.5~2 g/L
EDTA	0.5~2 g/L

其溶剂为纯化水。

2. 根据权利要求1所述的TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在于,包括的成分及相应含量为:

试剂R1:

Tris-HCl 缓冲液	75 mM/L
PEG6000	20 g/L
BSA	11 g/L
NaCl	9 g/L
MgCl ₂	1.5 g/L
NaN ₃	1.0 g/L

EDTA	1.5 g/L
其溶剂为纯化水；	
试剂R2：	
Tris-HCl 缓冲液	75 mM/L
PEG6000	20 g/L
BSA	11 g/L
TIMP-I 多克隆抗体的胶乳微球	8%
TX-100	1.0%
NaCl	9 g/L
MgCl ₂	1.5 g/L
NaN ₃	1.0 g/L
EDTA	1.5 g/L

其溶剂为纯化水。

3. 根据权利要求1所述的TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在於,还包括TIMP-I校准品,包括的成分及相应含量为:

Tris-HCl 缓冲液	50~200 mM/L
PEG6000	10~50 g/L
BSA	5~20 g/L
NaCl	5~15 g/L
rTIMP-I	1~10 mg/L
NaN ₃	0.5~2 g/L
EDTA	0.5~2 g/L

其溶剂为纯化水。

4. 根据权利要求3所述的TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在於,所述TIMP-I校准品包括的成分及相应含量具体为:

Tris-HCl 缓冲液	75 mM/L
PEG6000	20 g/L
BSA	11 g/L
NaCl	9 g/L
rTIMP-I	4 mg/L
NaN ₃	1.0 g/L
EDTA	1.5 g/L

其溶剂为纯化水。

5. 根据权利要求3所述的TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在于,所述TIMP-I校准品中rTIMP-I具体为重组人TIMP-I蛋白,获取方法具体如下:

①人TIMP-I基因的获取:

设计人TIMP-I基因引物,上游引物的基因序列如SEQ ID NO.1所示,下游引物的基因序列如SEQ ID NO.2所示;其中,上游引物带有Nco I酶切位点,下游引物带有EcoR V酶切位点,上、下游引物均带有肠激酶酶切位点,且该序列经大肠杆菌偏好密码子优化;利用上述人TIMP-I基因引物进行PCR,以获得目标基因序列-重组人TIMP-I序列,该目标基因序列如SEQ ID NO.3所示;

②表达载体构建:

上述PCR产物经测序无误后,使用连接酶连接到克隆载体pMD-19T载体中,并导入到TOP10F'感受态细胞;

将上述步骤得到的TOP10F'感受态细胞接至LB培养基中,于37℃条件下培养过夜,并使用质粒提取试剂盒抽提质粒,然后采用Nco I和EcoR V酶进行双酶切,将双酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,并将目的片段切下回收DNA;最后,将回收的DNA使用连接酶连接到pET32a上,并导入BL21感受态细胞中;

将上述步骤得到的BL21感受态细胞接至LB培养基中,于37℃、220rpm条件下摇菌2h,并涂布于含氨苄青霉素A⁺的LB培养基平板上培养过夜;挑取LB平板上生长的菌落,经PCR鉴定目的基因,鉴定为阳性,即表示表达载体构建成功,记为pET-32a-rTIMP-I;

③重组人TIMP-I的表达:

挑取上述步骤得到的pET-32a-rTIMP-I工程菌于含100μg/mL氨苄青霉素A⁺的LB培养基中37℃摇菌1h复苏工程菌活性;接着,在含100μg/mL氨苄青霉素A⁺的LB培养基中放大培养4h,测其OD值;当OD值达到1.0时,加入IPTG,32℃诱导表达5h,离心收集细菌;破碎后获得上清和沉淀,即为带HIS标签的目的蛋白rTIMP-I;

④重组长效人TIMP-I粗制品的制备:

诱导表达结束后,离心收集细菌,并加入质量体积比1:2的PBS来重悬沉淀;将重悬液于-80℃与4℃温度下反复冻融5次,接着进行4℃超声裂解;最后,于4℃、12000r/min条件下离心15min,分别取上清、沉淀,得rTIMP-I粗制蛋白;

⑤重组长效人TIMP-I粗制品的纯化:

肠激酶酶切:将得到的rTIMP-I粗制蛋白使用肠激酶于23℃酶切过夜;

亲和层析:将酶切后粗制蛋白过滤处理后过GST亲和层析柱,用第一Elution buffer梯度洗脱,收集rTIMP-I峰;所述第一Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl,4.0mM还原性谷胱甘肽,pH 7.0;

脱盐、缓冲液置换:将第一步纯化的rTIMP-I过脱盐柱,用脱盐柱缓冲液置换,准备下一步离子交换层析;所述脱盐柱缓冲液的配方为:50mM Tris-Cl,pH 9.0;

离子交换层析:分别用Loading buffer平衡好柱体,上样后用第二Elution buffer梯度洗脱,收集rTIMP-I峰;所述Loading buffer的配方为:50mM Tris-Cl,pH 7.0;所述第二Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl,1M NaCl,pH 7.0;

分子筛层析:将离子交换层析收集到的rTIMP-I过分子筛层析柱,用第三Elution

buffer梯度洗脱,收集rTIMP-I峰;所述第三Elution buffer的配方为:50mM Na₂HPO₄、0.15M NaCl,pH7.0;

⑥取收集rTIMP-I做Western Blot验证:

使用TIMP-I单克隆抗体为第一抗体,使用HRP标记的山羊抗鼠IgG为第二抗体做WB,沉淀与上清样本在28kD处均有阳性条带,表明纯化后所得rTIMP-I为TIMP-I。

6.根据权利要求1-5任一所述的TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在于,所述试剂R2中TIMP-I多克隆抗体的胶乳微球的获取方法为:使用直径100~300nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用化学交联法将山羊抗人TIMP-I多克隆抗体交联到聚苯乙烯胶乳微球上。

7.根据权利要求6所述的TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在于,所述TIMP-I多克隆抗体的胶乳微球的具体获取步骤为:

①称取12g NHS以及18.5g EDAC,并将其溶于500mL的纯水中,再加入0.5M MES buffer 100mL,调整pH为6.0~7.0,再加入10%的聚苯乙烯胶乳微球100mL;其中,胶乳微球的直径为100~300,加水至1L,室温下搅拌反应30min;

②用0.05~0.1M的MES buffer清洗2次,离心后超声重悬微球到1%;

③用0.05~0.1M的MES buffer,PH值为7.0~9.0,来稀释山羊抗人TIMP-I多克隆抗体,使其最终蛋白浓度为1g/L;

④将微球溶液和抗体1:1混合,室温下搅拌孵育2h;

⑤离心去上清,用0.05~0.1M的MES buffer清洗2次,重悬保存,即得包被有血清组织金属蛋白酶抑制因子I抗体的胶乳微球。

8.根据权利要求6所述的TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在于,所述山羊抗人TIMP-I多克隆抗体的制备方法为:

(1)重组人TIMP-I蛋白的制备

①人TIMP-I基因的获取:

设计人TIMP-I基因引物,上游引物的基因序列如SEQ ID NO.1所示,下游引物的基因序列如SEQ ID NO.2所示;其中,上游引物带有Nco I酶切位点,下游引物带有EcoR V酶切位点,上、下游引物均带有肠激酶酶切位点,且该序列经大肠杆菌偏好密码子优化;利用上述人TIMP-I基因引物进行PCR,以获得目标基因序列-重组人TIMP-I序列,该目标基因序列如SEQ ID NO.3所示;

②表达载体构建:

上述PCR产物经测序无误后,使用连接酶连接到克隆载体pMD-19T载体中,并导入到TOP10F'感受态细胞;

将上述步骤得到的TOP10F'感受态细胞接至LB培养基中,于37℃条件下培养过夜,并使用质粒提取试剂盒抽提质粒,然后采用Nco I和EcoR V酶进行双酶切,将双酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,并将目的片段切下回收DNA;最后,将回收的DNA使用连接酶连接到pET32a上,并导入BL21感受态细胞中;

将上述步骤得到的BL21感受态细胞接至LB培养基中,于37℃、220rpm条件下摇菌2h,并涂布于含氨苄青霉素A⁺的LB培养基平板上培养过夜;挑取LB平板上生长的菌落,经PCR鉴定目的基因,鉴定为阳性,即表示表达载体构建成功,记为pET-32a-rTIMP-I;

③重组人TIMP-I的表达:

挑取上述步骤得到的pET-32a-rTIMP-I工程菌于含100 μ g/mL氨苄青霉素A⁺的LB培养基中37 $^{\circ}$ C摇菌1h复苏工程菌活性;接着,在含100 μ g/mL氨苄青霉素A⁺的LB培养基中放大培养4h,测其OD值;当OD值达到1.0时,加入IPTG,32 $^{\circ}$ C诱导表达5h,离心收集细菌;破碎后获得上清和沉淀,即为带HIS标签的目的蛋白rTIMP-I;

④重组长效人TIMP-I粗制品的制备:

诱导表达结束后,离心收集细菌,并加入质量体积比1:2的PBS来重悬沉淀;将重悬液于-80 $^{\circ}$ C与4 $^{\circ}$ C温度下反复冻融5次,接着进行4 $^{\circ}$ C超声裂解;最后,于4 $^{\circ}$ C、12000r/min条件下离心15min,分别取上清、沉淀,得rTIMP-I粗制蛋白;

⑤重组长效人TIMP-I粗制品的纯化:

肠激酶酶切:将得到的rTIMP-I粗制蛋白使用肠激酶于23 $^{\circ}$ C酶切过夜;

亲和层析:将酶切后粗制蛋白过滤处理后过GST亲和层析柱,用第一Elution buffer梯度洗脱,收集rTIMP-I峰;所述第一Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl、40mM还原性谷胱甘肽,pH 7.0;

脱盐、缓冲液置换:将第一步纯化的rTIMP-I过脱盐柱,用脱盐柱缓冲液置换,准备下一步离子交换层析;所述脱盐柱缓冲液的配方为:50mM Tris-Cl,pH 9.0;

离子交换层析:分别用Loading buffer平衡好柱体,上样后用第二Elution buffer梯度洗脱,收集rTIMP-I峰;所述Loading buffer的配方为:50mM Tris-Cl,pH 7.0;所述第二Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl、1M NaCl,pH 7.0;

分子筛层析:将离子交换层析收集到的rTIMP-I过分子筛层析柱,用第三Elution buffer梯度洗脱,收集rTIMP-I峰;所述第三Elution buffer的配方为:50mM Na₂HPO₄、0.15M NaCl,pH7.0;

⑥取收集rTIMP-I做Western Blot验证:

使用TIMP-I单克隆抗体为第一抗体,使用HRP标记的山羊抗鼠IgG为第二抗体做WB,沉淀与上清样本在28kD处均有阳性条带,表明纯化后所得rTIMP-I为TIMP-I;

(2) 山羊抗人TIMP-I多克隆抗体的制备

①山羊的免疫:

选择7月龄、体重45kg的雌性山羊,取1mL 5mg/mL rTIMP-I抗原与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只山羊于四蹄注射共2mL乳化抗原,进行第一次免疫;7天后,进行第二次免疫,免疫方案如前;21天后,进行第三次免疫,免疫方案如前;42天后,进行第四次免疫,免疫方案如前;49天后,进行第五次免疫,采用耳缘静脉注射2mL2.5mg/mL rTIMP-I抗原;55天,取耳缘静脉血使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:35及以上,终止免疫;采用颈部静脉无菌放血法获得全血;

②多克隆抗体的纯化:

将上述步骤获得的全血于室温划十字口静置2h,取上清获得粗制血清;将粗制血清于4 $^{\circ}$ C、3000r/min条件下离心15min,获得血清,再加入等体积的PBS混匀得混合液,并向混合液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4 $^{\circ}$ C静置3h以上;于4 $^{\circ}$ C、4200r/min条件下离心30min,上清中Ig含量较低弃去,将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4 $^{\circ}$ C下静置3h后,再于4 $^{\circ}$ C、4200r/min条件下离心30min;此时,上清弃去,将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4 $^{\circ}$ C下静置3h后,4 $^{\circ}$ C、4200r/min离心30min;离心后

的沉淀用200mL PBS溶解,并进一步装入10kD透析袋;最后,将其置于4℃环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析6h除盐,即得山羊抗人TIMP-I多克隆抗体;

③多克隆抗体的验证:

使用上述制备的rTIMP-I为抗原,使用上述制备的山羊抗人TIMP-I多克隆抗体为第一抗体,使用HRP标记的驴抗山羊IgG为第二抗体做WB,抗原在28kD处有阳性条带产生;因rTIMP-I已经商品化单抗验证,且无其他标签蛋白,使用多克隆抗体验证rTIMP-I同样出现阳性条带,表明多克隆抗体制备成功。

9.一种如权利要求1-8任一所述的TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1)重组人TIMP-I蛋白的制备

①人TIMP-I基因的获取:

设计人TIMP-I基因引物,上游引物的基因序列如SEQ ID NO.1所示,下游引物的基因序列如SEQ ID NO.2所示;其中,上游引物带有Nco I酶切位点,下游引物带有EcoR V酶切位点,上、下游引物均带有肠激酶酶切位点,且该序列经大肠杆菌偏好密码子优化;利用上述人TIMP-I基因引物进行PCR,以获得目标基因序列-重组人TIMP-I序列,该目标基因序列如SEQ ID NO.3所示;

②表达载体构建:

上述PCR产物经测序无误后,使用连接酶连接到克隆载体pMD-19T载体中,并导入到TOP10F'感受态细胞;

将上述步骤得到的TOP10F'感受态细胞接至LB培养基中,于37℃条件下培养过夜,并使用质粒提取试剂盒抽提质粒,然后采用Nco I和EcoR V酶进行双酶切,将双酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,并将目的片段切下回收DNA;最后,将回收的DNA使用连接酶连接到pET32a上,并导入BL21感受态细胞中;

将上述步骤得到的BL21感受态细胞接至LB培养基中,于37℃、220rpm条件下摇菌2h,并涂布于含氨苄青霉素A⁺的LB培养基平板上培养过夜;挑取LB平板上生长的菌落,经PCR鉴定目的基因,鉴定为阳性,即表示表达载体构建成功,记为pET-32a-rTIMP-I;

③重组人TIMP-I的表达:

挑取上述步骤得到的pET-32a-rTIMP-I工程菌于含100μg/mL氨苄青霉素A⁺的LB培养基中37℃摇菌1h复苏工程菌活性;接着,在含100μg/mL氨苄青霉素A⁺的LB培养基中放大培养4h,测其OD值;当OD值达到1.0时,加入IPTG,32℃诱导表达5h,离心收集细菌;破碎后获得上清和沉淀,即为带HIS标签的目的蛋白rTIMP-I;

④重组长效人TIMP-I粗制品的制备:

诱导表达结束后,离心收集细菌,并加入质量体积比1:2的PBS来重悬沉淀;将重悬液于-80℃与4℃温度下反复冻融5次,接着进行4℃超声裂解;最后,于4℃、12000r/min条件下离心15min,分别取上清、沉淀,得rTIMP-I粗制蛋白;

⑤重组长效人TIMP-I粗制品的纯化:

肠激酶酶切:将得到的rTIMP-I粗制蛋白使用肠激酶于23℃酶切过夜;

亲和层析:将酶切后粗制蛋白过滤处理后过GST亲和层析柱,用第一Elution buffer梯度洗脱,收集rTIMP-I峰;所述第一Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl、40mM还原性

谷胱甘肽,pH 7.0;

脱盐、缓冲液置换:将第一步纯化的rTIMP-I过脱盐柱,用脱盐柱缓冲液置换,准备下一步离子交换层析;所述脱盐柱缓冲液的配方为:50mM Tris-Cl,pH 9.0;

离子交换层析:分别用Loading buffer平衡好柱体,上样后用第二Elution buffer梯度洗脱,收集rTIMP-I峰;所述Loading buffer的配方为:50mM Tris-Cl,pH 7.0;所述第二Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl、1M NaCl,pH 7.0;

分子筛层析:将离子交换层析收集到的rTIMP-I过分子筛层析柱,用第三Elution buffer梯度洗脱,收集rTIMP-I峰;所述第三Elution buffer的配方为:50mM Na₂HPO₄、0.15M NaCl,pH7.0;

⑥取收集rTIMP-I做Western Blot验证:

使用TIMP-I单克隆抗体为第一抗体,使用HRP标记的山羊抗鼠IgG为第二抗体做WB,沉淀与上清样本在28kD处均有阳性条带,表明纯化后所得rTIMP-I为TIMP-I;

(2) 山羊抗人TIMP-I多克隆抗体的制备

①山羊的免疫:

选择7月龄、体重45kg的雌性山羊,取1mL 5mg/mL rTIMP-I抗原与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只山羊于四蹄注射共2mL乳化抗原,进行第一次免疫;7天后,进行第二次免疫,免疫方案如前;21天后,进行第三次免疫,免疫方案如前;42天后,进行第四次免疫,免疫方案如前;49天后,进行第五次免疫,采用耳缘静脉注射2mL 2.5mg/mL rTIMP-I抗原;55天,取耳缘静脉血使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:35及以上,终止免疫;采用颈部静脉无菌放血法获得全血;

②多克隆抗体的纯化:

将上述步骤获得的全血于室温划十字口静置2h,取上清获得粗制血清;将粗制血清于4℃、3000r/min条件下离心15min,获得血清,再加入等体积的PBS混匀得混合液,并向混合液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置3h以上;于4℃、4200r/min条件下离心30min,上清中Ig含量较低弃去,将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,再于4℃、4200r/min条件下离心30min;此时,上清弃去,将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,4℃、4200r/min离心30min;离心后的沉淀用200mL PBS溶解,并进一步装入10kD透析袋;最后,将其置于4℃环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析6h除盐,即得山羊抗人TIMP-I多克隆抗体;

③多克隆抗体的验证:

使用上述制备的rTIMP-I为抗原,使用上述制备的山羊抗人TIMP-I多克隆抗体为第一抗体,使用HRP标记的驴抗山羊IgG为第二抗体做WB,抗原在28kD处有阳性条带产生;因rTIMP-I已经商品化单抗验证,且无其他标签蛋白,使用多克隆抗体验证rTIMP-I同样出现阳性条带,表明多克隆抗体制备成功。

(3) TIMP-I多克隆抗体的胶乳微球的制备

使用直径100~300nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用化学交联法将步骤(2)制得的山羊抗人TIMP-I多克隆抗体交联到聚苯乙烯胶乳微球上,即得目标所需的TIMP-I多克隆抗体的胶乳微球;

(4) TIMP-I胶乳增强免疫比浊法试剂盒的制备

①配制试剂R1:

按照试剂R1的组分含量,将各组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂R1;

②配制试剂R2:

按照试剂R2的组分含量,将步骤(3)制得的TIMP-I多克隆抗体的胶乳微球以及余下的其他组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂R2;

③配制TIMP-I校准品:

TIMP-I校准品包括的成分及相应含量如下:

Tris-HCl 缓冲液	50~200 mM/L
PEG6000	10~50 g/L
BSA	5~20 g/L
NaCl	5~15 g/L
rTIMP-I	1~10 mg/L
NaN ₃	0.5~2 g/L
EDTA	0.5~2 g/L

其溶剂为纯化水;

按照试剂上述TIMP-I校准品的组分含量,将步骤(1)制得的rTIMP-I以及余下的其他组分于同一容器中混合,混合均匀后,制得rTIMP-I校准品。

10.一种如权利要求1-8任一所述的TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒的使用方法,其特征在于,包括如下具体步骤:

(1)吸取10 μ L样本,加入240 μ L试剂R1,37 $^{\circ}$ C孵育3~5min;

(2)加入60 μ L试剂R2,置37 $^{\circ}$ C孵育;

(3)孵育1min后读取吸光值A1,孵育3min后读取吸光值A2,计算 ΔA ;

其中,定标方法为6点定标,采用全自动生化分析仪进行检测,并设置校准品浓度分别为:0、94、188、375、750、1500ng/mL;依据定标值,根据 ΔA 测算样本中TIMP-I含量。

一种TIMP-1胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测及免疫学测定分析领域,尤其涉及一种基于多克隆抗体制备的血清组织金属蛋白酶抑制因子I胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法。

背景技术

[0002] TIMP是一类最重要的调节细胞外MMP活性的酶家族,并且是具有许多共同生化、生理特性的活性蛋白质。目前发现有4种成员,TIMP1~4。其中,TIMP-1可以抑制大部分MMPs,尤其是MMP-1的活性,被认为在肝纤维化中发挥了重要作用。TIMP-1首先是从兔的骨骼肌中分离出来,分子量为28.5kD,编码基因位于X染色体P11区,含有一个开放读码区,其蛋白分子中包含184个氨基酸,形成3个环状结构,由12个半胱氨酸残基形成6个二硫键而成。其N端为TIMP-1对活性MMP-1进行抑制的必需区,经过切除的TIMP-1只要保持N末端的完整性便能保持抑制活性,C端是TIMP-1与MMP-1作用的关键部位。研究发现,人种之间的TIMP-1无明显差异,且与鼠、羊等动物的TIMP-1基因相比较,同源性和80.86%,提示TIMP-1基因序列存在一定的种属差异性。

[0003] TIMP-1主要是由激活的HSC、肝细胞、内皮细胞分泌,主要是抑制胶原酶的活性,还抑制基质分解素和明胶酶B。TIMP-1基因在正常组织也有表达,血管内皮细胞是正常肝组织TIMP-1的主要来源,肝纤维化时表达明显增加,主要位于肝中央静脉、汇管区周围及肝窦壁的间质细胞。

[0004] TIMP-1是反应肝纤维化的重要血清学指标,其在肝脏细胞外基质(ECM)的降解中发挥重要的调节作用。肝纤维化的形成是由于细胞外基质(ECM)的合成和降解失去平衡,在肝纤维化过程中形成的细胞外基质主要被基质金属蛋白酶(MMPs)分解,而血清中的TIMP-1能够特异性的抑制金属蛋白酶(MMPs)分解,而血清中的TIMP-1能够特异性的抑制金属蛋白酶(MMPs)对细胞外基质的降解,从而形成或促进肝纤维化。研究表明,TIMP-1随着肝纤维化严重而表达增强,因此,检测TIMP-1浓度可以作为肝纤维化进程临床诊断的一种快速、有效的辅助手段。

[0005] 现有的TIMP-1检测方法主要有酶联免疫反应测定(ELISA)与荧光免疫测定法(FIA)。但以上两种方法均为非均相检测,无法实现检测的自动化,且重复性和稳定性较差,临床上难以推广应用。

[0006] 胶乳增强免疫比浊法是一种动态测定抗原抗体结合的检测方法:在特定的稀释系统中,抗原抗体发生结合,并且在结合比例合适时,会形成微粒从液相析出;在抗原和抗体结合的前后,会发生浊度的变化;通过全自动生化分析仪检测这种浊度变化,并利用标准品绘制线性曲线,可得出相应样品中待测物质的含量。该方法不需要特殊的仪器,操作上简单便捷。此外,胶乳增强免疫比浊法能够利用胶乳载体增强反应的吸光度,使检测的敏感性大大提高,通过全自动生化分析仪进行检测实现了检测的自动化,更加方便、快捷、节省时间,能够满足临床大样本检测的需求。

发明内容

[0007] 本发明的主要目的是提出一种基于多克隆抗体制备的血清组织金属蛋白酶抑制因子I胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法,旨在解决现有TIMP-I检测方法存在的自动化程度低以及重复性与稳定性差的问题。

[0008] 为实现上述目的,本发明提出一种TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

[0009] 试剂R1:

Tris-HCl 缓冲液	50~200 mM/L
PEG6000	10~50 g/L
BSA	5~20 g/L
NaCl	5~15 g/L
MgCl ₂	0.5~2 g/L
NaN ₃	0.5~2 g/L
EDTA	0.5~2 g/L

其溶剂为纯化水;

[0011] 试剂R2:

Tris-HCl 缓冲液	50~200 mM/L
PEG6000	10~50 g/L
BSA	5~20 g/L
TIMP-I 多克隆抗体的胶乳微球	5%~15%
TX-100	0.5%-3%
NaCl	5~15 g/L
MgCl ₂	0.5~2 g/L
NaN ₃	0.5~2 g/L
EDTA	0.5~2 g/L

[0013] 其溶剂为纯化水。

[0014] 作为本发明的优选方式之一,包括的成分及相应含量为:

[0015] 试剂R1:

	Tris-HCl 缓冲液	75 mM/L
	PEG6000	20 g/L
	BSA	11 g/L
[0016]	NaCl	9 g/L
	MgCl ₂	1.5 g/L
	NaN ₃	1.0 g/L
	EDTA	1.5 g/L
[0017]	其溶剂为纯化水；	
[0018]	试剂R2：	
	Tris-HCl 缓冲液	75 mM/L
	PEG6000	20 g/L
	BSA	11 g/L
	TIMP-I 多克隆抗体的胶乳微球	8%
[0019]	TX-100	1.0%
	NaCl	9 g/L
	MgCl ₂	1.5 g/L
	NaN ₃	1.0 g/L
	EDTA	1.5 g/L
	其溶剂为纯化水。	
[0020]	作为本发明的优选方式之一，还包括TIMP-I校准品，包括的成分及相应含量为：	
	Tris-HCl 缓冲液	50~200 mM/L
	PEG6000	10~50 g/L
	BSA	5~20 g/L
[0021]	NaCl	5~15 g/L
	rTIMP-I	1~10 mg/L
	NaN ₃	0.5~2 g/L
	EDTA	0.5~2 g/L
[0022]	其溶剂为纯化水。	
[0023]	作为本发明的优选方式之一，所述TIMP-I校准品包括的成分及相应含量具体为：	

	Tris-HCl 缓冲液	75 mM/L
	PEG6000	20 g/L
	BSA	11 g/L
[0024]	NaCl	9 g/L
	rTIMP-I	4 mg/L
	NaN ₃	1.0 g/L
	EDTA	1.5 g/L

其溶剂为纯化水。

[0025] 作为本发明的优选方式之一,所述TIMP-I校准品中rTIMP-I具体为重组人TIMP-I蛋白,获取方法具体如下:

[0026] ①人TIMP-I基因的获取:

[0027] 设计人TIMP-I基因引物,上游引物的基因序列如SEQ ID NO.1所示,下游引物的基因序列如SEQ ID NO.2所示;其中,上游引物带有Nco I酶切位点,下游引物带有EcoR V酶切位点,上、下游引物均带有肠激酶酶切位点,且该序列经大肠杆菌偏好密码子优化;利用上述人TIMP-I基因引物进行PCR,以获得目标基因序列-重组人TIMP-I序列,该目标基因序列如SEQ ID NO.3所示;

[0028] ②表达载体构建:

[0029] 上述PCR产物经测序无误后,使用连接酶连接到克隆载体pMD-19T载体中,并导入到TOP10F'感受态细胞;

[0030] 将上述步骤得到的TOP10F'感受态细胞接至LB培养基中,于37℃条件下培养过夜,并使用质粒提取试剂盒抽提质粒,然后采用Nco I和EcoR V酶进行双酶切,将双酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,并将目的片段切下回收DNA;最后,将回收的DNA使用连接酶连接到pET32a上,并导入BL21感受态细胞中;

[0031] 将上述步骤得到的BL21感受态细胞接至LB培养基中,于37℃、220rpm条件下摇菌2h,并涂布于含氨苄青霉素A⁺的LB培养基平板上培养过夜;挑取LB平板上生长的菌落,经PCR鉴定目的基因,鉴定为阳性,即表示表达载体构建成功,记为pET-32a-rTIMP-I;

[0032] ③重组人TIMP-I的表达:

[0033] 挑取上述步骤得到的pET-32a-rTIMP-I工程菌于含100μg/mL氨苄青霉素A⁺的LB培养基中37℃摇菌1h复苏工程菌活性;接着,在含100μg/mL氨苄青霉素A⁺的LB培养基中放大培养4h,测其OD值;当OD值达到1.0时,加入IPTG,32℃诱导表达5h,离心收集细菌;破碎后获得上清和沉淀,即为带HIS标签的目的蛋白rTIMP-I;

[0034] ④重组长效人TIMP-I粗制品的制备:

[0035] 诱导表达结束后,离心收集细菌,并加入质量体积比1:2的PBS来重悬沉淀;将重悬液于-80℃与4℃温度下反复冻融5次,接着进行4℃超声裂解;最后,于4℃、12000r/min条件下离心15min,分别取上清、沉淀,得rTIMP-I粗制蛋白;

[0036] ⑤重组长效人TIMP-I粗制品的纯化:

[0037] 肠激酶酶切:将得到的rTIMP-I粗制蛋白使用肠激酶于23℃酶切过夜;

[0038] 亲和层析:将酶切后粗制蛋白过滤处理后过GST亲和层析柱,用第一Elution buffer梯度洗脱,收集rTIMP-I峰;所述第一Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl、40mM还原性谷胱甘肽,pH 7.0;

[0039] 脱盐、缓冲液置换:将第一步纯化的rTIMP-I过脱盐柱,用脱盐柱缓冲液置换,准备下一步离子交换层析;所述脱盐柱缓冲液的配方为:50mM Tris-Cl,pH 9.0;

[0040] 离子交换层析:分别用Loading buffer平衡好柱体,上样后用第二Elution buffer梯度洗脱,收集rTIMP-I峰;所述Loading buffer的配方为:50mM Tris-Cl,pH 7.0;所述第二Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl、1M NaCl,pH 7.0;

[0041] 分子筛层析:将离子交换层析收集到的rTIMP-I过分子筛层析柱,用第三Elution buffer梯度洗脱,收集rTIMP-I峰;所述第三Elution buffer的配方为:50mM Na₂HPO₄、0.15M NaCl, pH7.0;

[0042] ⑥取收集rTIMP-I做Western Blot验证:

[0043] 使用TIMP-I单克隆抗体为第一抗体,使用HRP标记的山羊抗鼠IgG为第二抗体做WB,沉淀与上清样本在28kD处均有阳性条带,表明纯化后所得rTIMP-I为TIMP-I。

[0044] 作为本发明的优选方式之一,所述试剂R2中TIMP-I多克隆抗体的胶乳微球的获取方法为:使用直径100~300nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用化学交联法将山羊抗人TIMP-I多克隆抗体交联到聚苯乙烯胶乳微球上。

[0045] 作为本发明的优选方式之一,所述TIMP-I多克隆抗体的胶乳微球的具体获取步骤为:

[0046] ①称取12g NHS以及18.5g EDAC,并将其溶于500mL的纯水中,再加入0.5M MES buffer 100mL,调整pH为6.0~7.0,再加入10%的聚苯乙烯胶乳微球100mL;其中,胶乳微球的直径为100~300,加水至1L,室温下搅拌反应30min;

[0047] ②用0.05~0.1M的MES buffer清洗2次,离心后超声重悬微球到1%;

[0048] ③用0.05~0.1M的MES buffer,PH值为7.0~9.0,来稀释山羊抗人TIMP-I多克隆抗体,使其最终蛋白浓度为1g/L;

[0049] ④将微球溶液和抗体1:1混合,室温下搅拌孵育2h;

[0050] ⑤离心去上清,用0.05~0.1M的MES buffer清洗2次,重悬保存,即得包被有血清组织金属蛋白酶抑制因子I抗体的胶乳微球。

[0051] 作为本发明的优选方式之一,所述山羊抗人TIMP-I多克隆抗体的制备方法为:

[0052] (1) 重组人TIMP-I蛋白的制备

[0053] ①人TIMP-I基因的获取:

[0054] 设计人TIMP-I基因引物,上游引物的基因序列如SEQ ID NO.1所示,下游引物的基因序列如SEQ ID NO.2所示;其中,上游引物带有Nco I酶切位点,下游引物带有EcoR V酶切位点,上、下游引物均带有肠激酶酶切位点,且该序列经大肠杆菌偏好密码子优化;利用上述人TIMP-I基因引物进行PCR,以获得目标基因序列-重组人TIMP-I序列,该目标基因序列如SEQ ID NO.3所示;

[0055] ②表达载体构建:

[0056] 上述PCR产物经测序无误后,使用连接酶连接到克隆载体pMD-19T载体中,并导入到TOP10F'感受态细胞;

[0057] 将上述步骤得到的TOP10F'感受态细胞接至LB培养基中,于37℃条件下培养过夜,并使用质粒提取试剂盒抽提质粒,然后采用Nco I和EcoR V酶进行双酶切,将双酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,并将目的片段切下回收DNA;最后,将回收的DNA使用连接酶连接到pET32a上,并导入BL21感受态细胞中;

[0058] 将上述步骤得到的BL21感受态细胞接至LB培养基中,于37℃、220rpm条件下摇菌2h,并涂布于含氨苄青霉素A⁺的LB培养基平板上培养过夜;挑取LB平板上生长的菌落,经PCR鉴定目的基因,鉴定为阳性,即表示表达载体构建成功,记为pET-32a-rTIMP-I;

[0059] ③重组人TIMP-I的表达:

[0060] 挑取上述步骤得到的pET-32a-rTIMP-I工程菌于含100μg/mL氨苄青霉素A⁺的LB培养基中37℃摇菌1h复苏工程菌活性;接着,在含100μg/mL氨苄青霉素A⁺的LB培养基中放大培养4h,测其OD值;当OD值达到1.0时,加入IPTG,32℃诱导表达5h,离心收集细菌;破碎后获得上清和沉淀,即为带HIS标签的目的蛋白rTIMP-I;

[0061] ④重组长效人TIMP-I粗制品的制备:

[0062] 诱导表达结束后,离心收集细菌,并加入质量体积比1:2的PBS来重悬沉淀;将重悬液于-80℃与4℃温度下反复冻融5次,接着进行4℃超声裂解;最后,于4℃、12000r/min条件下离心15min,分别取上清、沉淀,得rTIMP-I粗制蛋白;

[0063] ⑤重组长效人TIMP-I粗制品的纯化:

[0064] 肠激酶酶切:将得到的rTIMP-I粗制蛋白使用肠激酶于23℃酶切过夜;

[0065] 亲和层析:将酶切后粗制蛋白过滤处理后过GST亲和层析柱,用第一Elution buffer梯度洗脱,收集rTIMP-I峰;所述第一Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl、40mM还原性谷胱甘肽,pH 7.0;

[0066] 脱盐、缓冲液置换:将第一步纯化的rTIMP-I过脱盐柱,用脱盐柱缓冲液置换,准备下一步离子交换层析;所述脱盐柱缓冲液的配方为:50mM Tris-Cl,pH 9.0;

[0067] 离子交换层析:分别用Loading buffer平衡好柱体,上样后用第二Elution buffer梯度洗脱,收集rTIMP-I峰;所述Loading buffer的配方为:50mM Tris-Cl,pH 7.0;所述第二Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl、1M NaCl,pH 7.0;

[0068] 分子筛层析:将离子交换层析收集到的rTIMP-I过分子筛层析柱,用第三Elution buffer梯度洗脱,收集rTIMP-I峰;所述第三Elution buffer的配方为:50mM Na₂HPO₄、0.15M NaCl, pH7.0;

[0069] ⑥取收集rTIMP-I做Western Blot验证:

[0070] 使用TIMP-I单克隆抗体为第一抗体,使用HRP标记的山羊抗鼠IgG为第二抗体做WB,沉淀与上清样本在28kD处均有阳性条带,表明纯化后所得rTIMP-I为TIMP-I;

[0071] (2) 山羊抗人TIMP-I多克隆抗体的制备

[0072] ①山羊的免疫:

[0073] 选择7月龄、体重45kg的雌性山羊,取1mL 5mg/mL rTIMP-I抗原与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只山羊于四蹄注射共2mL乳化抗原,进行第一次免疫;7天后,进行第二次免疫,免疫方案如前;21天后,进行第三次免疫,免疫方案如前;42天后,进行第四次免疫,免疫方案如前;49天后,进行第五次免疫,采用耳缘静脉注射2mL 2.5mg/mL rTIMP-I抗原;55天,取耳缘静脉血使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:35

及以上,终止免疫;采用颈部静脉无菌放血法获得全血;

[0074] ②多克隆抗体的纯化:

[0075] 将上述步骤获得的全血于室温划十字口静置2h,取上清获得粗制血清;将粗制血清于4℃、3000r/min条件下离心15min,获得血清,再加入等体积的PBS混匀得混合液,并向混合液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置3h以上;于4℃、4200r/min条件下离心30min,上清中Ig含量较低弃去,将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,再于4℃、4200r/min条件下离心30min;此时,上清弃去,将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,4℃、4200 r/min离心30min;离心后的沉淀用200mL PBS溶解,并进一步装入10kD透析袋;最后,将其置于4℃环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析6h除盐,即得山羊抗人TIMP-I多克隆抗体;

[0076] ③多克隆抗体的验证:

[0077] 使用上述制备的rTIMP-I为抗原,使用上述制备的山羊抗人TIMP-I多克隆抗体为第一抗体,使用HRP标记的驴抗山羊IgG为第二抗体做WB,抗原在28kD处有阳性条带产生;因rTIMP-I已经商品化单抗验证,且无其他标签蛋白,使用多克隆抗体验证rTIMP-I同样出现阳性条带,表明多克隆抗体制备成功。

[0078] 一种上述TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0079] (1)重组人TIMP-I蛋白的制备

[0080] ①人TIMP-I基因的获取:

[0081] 设计人TIMP-I基因引物,上游引物的基因序列如SEQ ID NO.1所示,下游引物的基因序列如SEQ ID NO.2所示;其中,上游引物带有Nco I酶切位点,下游引物带有EcoR V酶切位点,上、下游引物均带有肠激酶酶切位点,且该序列经大肠杆菌偏好密码子优化;利用上述人TIMP-I基因引物进行PCR,以获得目标基因序列-重组人TIMP-I序列,该目标基因序列如SEQ ID NO.3所示;

[0082] ②表达载体构建:

[0083] 上述PCR产物经测序无误后,使用连接酶连接到克隆载体pMD-19T载体中,并导入到TOP10F'感受态细胞;

[0084] 将上述步骤得到的TOP10F'感受态细胞接至LB培养基中,于37℃条件下培养过夜,并使用质粒提取试剂盒抽提质粒,然后采用Nco I和EcoR V酶进行双酶切,将双酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,并将目的片段切下回收DNA;最后,将回收的DNA使用连接酶连接到pET32a上,并导入BL21感受态细胞中;

[0085] 将上述步骤得到的BL21感受态细胞接至LB培养基中,于37℃、220rpm条件下摇菌2h,并涂布于含氨苄青霉素A⁺的LB培养基平板上培养过夜;挑取LB平板上生长的菌落,经PCR鉴定目的基因,鉴定为阳性,即表示表达载体构建成功,记为pET-32a-rTIMP-I;

[0086] ③重组人TIMP-I的表达:

[0087] 挑取上述步骤得到的pET-32a-rTIMP-I工程菌于含100μg/mL氨苄青霉素A⁺的LB培养基中37℃摇菌1h复苏工程菌活性;接着,在含100μg/mL氨苄青霉素A⁺的LB培养基中放大培养4h,测其OD值;当OD值达到1.0时,加入IPTG,32℃诱导表达5h,离心收集细菌;破碎后获得上清和沉淀,即为带HIS标签的目的蛋白rTIMP-I;

[0088] ④重组长效人TIMP-I粗制品的制备:

[0089] 诱导表达结束后,离心收集细菌,并加入质量体积比1:2的PBS来重悬沉淀;将重悬液于-80℃与4℃温度下反复冻融5次,接着进行4℃超声裂解;最后,于4℃、12000r/min条件下离心15min,分别取上清、沉淀,得rTIMP-I粗制蛋白;

[0090] ⑤重组长效人TIMP-I粗制品的纯化:

[0091] 肠激酶酶切:将得到的rTIMP-I粗制蛋白使用肠激酶于23℃酶切过夜;

[0092] 亲和层析:将酶切后粗制蛋白过滤处理后过GST亲和层析柱,用第一Elution buffer梯度洗脱,收集rTIMP-I峰;所述第一Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl、40mM还原性谷胱甘肽,pH 7.0;

[0093] 脱盐、缓冲液置换:将第一步纯化的rTIMP-I过脱盐柱,用脱盐柱缓冲液置换,准备下一步离子交换层析;所述脱盐柱缓冲液的配方为:50mM Tris-Cl,pH 9.0;

[0094] 离子交换层析:分别用Loading buffer平衡好柱体,上样后用第二Elution buffer梯度洗脱,收集rTIMP-I峰;所述Loading buffer的配方为:50mM Tris-Cl,pH 7.0;所述第二Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl、1M NaCl,pH 7.0;

[0095] 分子筛层析:将离子交换层析收集到的rTIMP-I过分子筛层析柱,用第三Elution buffer梯度洗脱,收集rTIMP-I峰;所述第三Elution buffer的配方为:50mM Na₂HPO₄、0.15M NaCl, pH7.0;

[0096] ⑥取收集rTIMP-I做Western Blot验证:

[0097] 使用TIMP-I单克隆抗体为第一抗体,使用HRP标记的山羊抗鼠IgG为第二抗体做WB,沉淀与上清样本在28kD处均有阳性条带,表明纯化后所得rTIMP-I为TIMP-I;

[0098] (2) 山羊抗人TIMP-I多克隆抗体的制备

[0099] ①山羊的免疫:

[0100] 选择7月龄、体重45kg的雌性山羊,取1mL 5mg/mL rTIMP-I抗原与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只山羊于四蹄注射共2mL乳化抗原,进行第一次免疫;7天后,进行第二次免疫,免疫方案如前;21天后,进行第三次免疫,免疫方案如前;42天后,进行第四次免疫,免疫方案如前;49天后,进行第五次免疫,采用耳缘静脉注射2mL 2.5mg/mL rTIMP-I抗原;55天,取耳缘静脉血使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:35及以上,终止免疫;采用颈部静脉无菌放血法获得全血;

[0101] ②多克隆抗体的纯化:

[0102] 将上述步骤获得的全血于室温划十字口静置2h,取上清获得粗制血清;将粗制血清于4℃、3000r/min条件下离心15min,获得血清,再加入等体积的PBS混匀得混合液,并向混合液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置3h以上;于4℃、4200r/min条件下离心30min,上清中Ig含量较低弃去,将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,再于4℃、4200r/min条件下离心30min;此时,上清弃去,将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,4℃、4200 r/min离心30min;离心后的沉淀用200mL PBS溶解,并进一步装入10kD透析袋;最后,将其置于4℃环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析6h除盐,即得山羊抗人TIMP-I多克隆抗体;

[0103] ③多克隆抗体的验证:

[0104] 使用上述制备的rTIMP-I为抗原,使用上述制备的山羊抗人TIMP-I多克隆抗体为第一抗体,使用HRP标记的驴抗山羊IgG为第二抗体做WB,抗原在28kD处有阳性条带产生;

因 rTIMP-I 已经商品化单抗验证,且无其他标签蛋白,使用多克隆抗体验证 rTIMP-I 同样出现阳性条带,表明多克隆抗体制备成功。

[0105] (3) TIMP-I 多克隆抗体的胶乳微球的制备

[0106] 使用直径 100~300nm 的聚苯乙烯胶乳微球,并采用化学交联法将步骤(2)制得的山羊抗人 TIMP-I 多克隆抗体交联到聚苯乙烯胶乳微球上,即得目标所需的 TIMP-I 多克隆抗体的胶乳微球;

[0107] (4) TIMP-I 胶乳增强免疫比浊法试剂盒的制备

[0108] ①配制试剂 R1:

[0109] 按照试剂 R1 的组分含量,将各组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂 R1;

[0110] ②配制试剂 R2:

[0111] 按照试剂 R2 的组分含量,将步骤(3)制得的 TIMP-I 多克隆抗体的胶乳微球以及余下的其他组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂 R2;

[0112] ③配制 TIMP-I 校准品:

[0113] TIMP-I 校准品包括的成分及相应含量如下:

	Tris-HCl 缓冲液	50~200 mM/L
	PEG6000	10~50 g/L
	BSA	5~20 g/L
[0114]	NaCl	5~15 g/L
	rTIMP-I	1~10 mg/L
	NaN ₃	0.5~2 g/L
	EDTA	0.5~2 g/L

[0115] 其溶剂为纯化水;

[0116] 按照试剂上述 TIMP-I 校准品的组分含量,将步骤(1)制得的 rTIMP-I 以及余下的其他组分于同一容器中混合,混合均匀后,制得 rTIMP-I 校准品。

[0117] 一种上述 TIMP-I 胶乳增强比浊法检测试剂盒的使用方法,包括如下具体步骤:

[0118] (1) 吸取 10 μ L 样本,加入 240 μ L 试剂 R1,37 $^{\circ}$ C 孵育 3~5min;

[0119] (2) 加入 60 μ L 试剂 R2,置 37 $^{\circ}$ C 孵育;

[0120] (3) 孵育 1min 后读取吸光值 A1,孵育 3min 后读取吸光值 A2,计算 ΔA ;

[0121] 其中,定标方法为 6 点定标,采用全自动生化分析仪进行检测,并设置校准品浓度分别为:0、94、188、375、750、1500ng/mL;依据定标值,根据 ΔA 测算样本中 TIMP-I 含量。

[0122] 本发明试剂盒由试剂 R1 和试剂 R2 构成;所述试剂 R1 含有缓冲液(Tris-HCl 缓冲液)、表面活性剂(PEG6000)、稳定剂(BSA、NaCl、EDTA、MgCl₂)及防腐剂(NaN₃)构成, pH=7.0~8.0;所述试剂 R2 含有缓冲液(Tris-HCl 缓冲液)、表面活性剂(PEG6000、TX-100)、稳定剂(BSA、NaCl、EDTA、MgCl₂)、防腐剂(NaN₃)及 TIMP-I 多克隆抗体的胶乳微球, pH=7.0~8.0。

[0123] 本发明相比现有技术的优点在于:

[0124] (1) 本发明的TIMP-I的增强比浊法检测试剂盒国内无其他厂家上市,本发明可在全自动生化分析仪上使用,成本低廉,且自动化高,可节省检测时间,便于临床应用;

[0125] (2) 相比其他方法,本发明试剂盒利用胶乳增强免疫比浊法测定TIMP-I,检测信号倍数放大,提高了检测灵敏度;

[0126] (3) 本发明试剂盒采用抗人TIMP-I的多克隆抗体的方式,使用直径均一的聚苯乙烯胶乳微球,较其他使用大小不一聚苯乙烯胶乳微球的试剂盒提高了线性;并且,试剂盒中加入了抗干扰蛋白和表面活性剂,以保证试剂盒的稳定性和精密度。

附图说明

[0127] 图1是实施例4中重组TIMP-I蛋白的Western Blot鉴定结果(图中,泳道M:蛋白Marker 26610;泳道1:空白对照;泳道2:重组人TIMP-I纯化后样本;泳道3:abcam公司TIMP-I单抗对照);

[0128] 图2是实施例4中山羊抗TIMP-I多克隆抗体的Western Blot鉴定结果图(图中,泳道 M:蛋白Marker26610;泳道1:BSA对照;泳道2:山羊抗TIMP-I多克隆抗体纯化后样本;泳道3:abcam公司TIMP-I单抗对照);

[0129] 图3是实施例6中本发明试剂盒的线性范围线性回归图。

具体实施方式

[0130] 下面对本发明的实施例作详细说明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0131] 实施例1

[0132] 本实施例的一种TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2 双液体组分,包括的成分及相应含量为:

[0133] 试剂R1:

Tris-HCl 缓冲液	75 mM/L
PEG6000	20 g/L
BSA	11 g/L
NaCl	9 g/L
[0134] MgCl ₂	1.5 g/L
NaN ₃	1.0 g/L
EDTA	1.5 g/L

其溶剂为纯化水;

[0135] 试剂R2:

	Tris-HCl 缓冲液	75 mM/L
	PEG6000	20 g/L
	BSA	11 g/L
	TIMP-I 多克隆抗体的胶乳微球	8%
[0136]	TX-100	1.0%
	NaCl	9 g/L
	MgCl ₂	1.5 g/L
	NaN ₃	1.0 g/L
	EDTA	1.5 g/L

其溶剂为纯化水。

[0137] 此外,还包括TIMP-I校准品,包括的成分及相应含量为:

	Tris-HCl 缓冲液	75 mM/L
[0138]	PEG6000	20 g/L
	BSA	11 g/L
	NaCl	9 g/L
	rTIMP-I	4 mg/L
[0139]	NaN ₃	1.0 g/L
	EDTA	1.5 g/L

其溶剂为纯化水。

[0140] 进一步地,TIMP-I校准品中rTIMP-I具体为重组人TIMP-I蛋白(制备方法见实施例4)。

[0141] 进一步地,试剂R2中TIMP-I多克隆抗体的胶乳微球的获取方法为:使用直径100~300nm 的聚苯乙烯胶乳微球,并采用化学交联法将山羊抗人TIMP-I多克隆抗体(制备方法见实施例4)交联到聚苯乙烯胶乳微球上。

[0142] 实施例2

[0143] 本实施例的一种TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2 双液体组分,包括的成分及相应含量为:

[0144] 试剂R1:

	Tris-HCl 缓冲液	50 mM/L
	PEG6000	10 g/L
	BSA	5 g/L
[0145]	NaCl	5 g/L
	MgCl ₂	0.5 g/L
	NaN ₃	0.5 g/L
	EDTA	0.5 g/L
	其溶剂为纯化水；	
[0146]	试剂R2：	
	Tris-HCl 缓冲液	50 mM/L
	PEG6000	10 g/L
	BSA	5 g/L
	TIMP-I 多克隆抗体的胶乳微球	5%
[0147]	TX-100	0.5%
	NaCl	5 g/L
	MgCl ₂	0.5 g/L
	NaN ₃	0.5 g/L
	EDTA	0.5 g/L
[0148]	其溶剂为纯化水。	
[0149]	此外,还包括TIMP-I校准品,包括的成分及相应含量为:	
	Tris-HCl 缓冲液	50 mM/L
	PEG6000	10 g/L
	BSA	5 g/L
[0150]	NaCl	5 g/L
	rTIMP-I	1 mg/L
	NaN ₃	0.5 g/L
	EDTA	0.5 g/L
	其溶剂为纯化水。	
[0151]	进一步地,TIMP-I校准品中rTIMP-I具体为重组人TIMP-I蛋白(制备方法见实施例4)。	
[0152]	进一步地,试剂R2中TIMP-I多克隆抗体的胶乳微球的获取方法为:使用直径100~	

300nm 的聚苯乙烯胶乳微球, 并采用化学交联法将山羊抗人TIMP-I多克隆抗体(制备方法见实施例 4)交联到聚苯乙烯胶乳微球上。

[0153] 实施例3

[0154] 本实施例的一种TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒, 包括彼此独立的试剂R1和试剂R2 双液体组分, 包括的成分及相应含量为:

[0155] 试剂R1:

Tris-HCl 缓冲液	200 mM/L
PEG6000	50 g/L
BSA	20 g/L
NaCl	15 g/L
[0156] MgCl ₂	2 g/L
NaN ₃	2 g/L
EDTA	2 g/L

其溶剂为纯化水;

[0157] 试剂R2:

Tris-HCl 缓冲液	200 mM/L
PEG6000	50 g/L
[0158] BSA	20 g/L
TIMP-I 多克隆抗体的胶乳微球	15%
TX-100	3%
NaCl	15 g/L
[0159] MgCl ₂	2 g/L
NaN ₃	2 g/L
EDTA	2 g/L

其溶剂为纯化水。

[0160] 此外, 还包括TIMP-I校准品, 包括的成分及相应含量为:

	Tris-HCl 缓冲液	200 mM/L
	PEG6000	50 g/L
	BSA	20 g/L
[0161]	NaCl	15 g/L
	rTIMP-I	10 mg/L
	NaN ₃	2 g/L
	EDTA	2 g/L

其溶剂为纯化水。

[0162] 进一步地, TIMP-I校准品中rTIMP-I具体为重组人TIMP-I蛋白(制备方法见实施例4)。

[0163] 进一步地, 试剂R2中TIMP-I多克隆抗体的胶乳微球的获取方法为: 使用直径100~300nm 的聚苯乙烯胶乳微球, 并采用化学交联法将山羊抗人TIMP-I多克隆抗体(制备方法见实施例4)交联到聚苯乙烯胶乳微球上。

[0164] 实施例4

[0165] 本实施例的一种上述实施例1-3中TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备方法, 包括 如下步骤:

[0166] (1) 重组人TIMP-I蛋白的制备

[0167] ①人TIMP-I基因的获取:

[0168] 设计人TIMP-I基因引物, 上游引物的基因序列如SEQ ID NO.1所示, 下游引物的基因序列如SEQ ID NO.2所示; 其中, 上游引物带有Nco I酶切位点, 下游引物带有EcoR V酶切位点, 上、下游引物均带有肠激酶酶切位点, 且该序列经大肠杆菌偏好密码子优化; 利用上述人TIMP-I基因引物进行PCR, 以获得目标基因序列-重组人TIMP-I序列, 该目标基因序列如SEQ ID NO.3所示;

[0169] ②表达载体构建:

[0170] 上述PCR产物经测序无误后, 使用连接酶连接到克隆载体pMD-19T载体中, 并导入到TOP10F'感受态细胞;

[0171] 将上述步骤得到的TOP10F'感受态细胞接至LB培养基中, 于37℃条件下培养过夜, 并使用天根质粒提取试剂盒抽提质粒, 然后采用Nco I和EcoR V酶进行双酶切, 将双酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳, 并将目的片段切下回收DNA; 最后, 将回收的DNA使用连接酶连接到pET32a上, 并导入BL21感受态细胞中;

[0172] 将上述步骤得到的BL21感受态细胞接至LB培养基中, 于37℃、220rpm条件下摇菌2h, 并涂布于含氨苄青霉素A⁺的LB培养基平板上培养过夜; 挑取LB平板上生长的菌落, 经PCR鉴定目的基因, 鉴定为阳性, 即表示表达载体构建成功, 记为pET-32a-rTIMP-I;

[0173] ③重组人TIMP-I的表达:

[0174] 挑取上述步骤得到的pET-32a-rTIMP-I工程菌于含100μg/mL氨苄青霉素A⁺的LB培养基中37℃摇菌1h复苏工程菌活性; 接着, 在含100μg/mL氨苄青霉素A⁺的LB培养基中放大培养4h, 测其OD值; 当OD值达到1.0时, 加入IPTG, 32℃诱导表达(终浓度100μg/mL) 5h, 离

心收集细菌;破碎后获得上清和沉淀,即为带HIS标签的目的蛋白rTIMP-I;

[0175] ④重组长效人TIMP-I粗制品的制备:

[0176] 诱导表达结束后,离心收集细菌,并加入质量体积比1:2的PBS来重悬沉淀;将重悬液于-80℃与4℃温度下反复冻融5次,接着进行4℃超声裂解(超声功率400W、工作15s、间隔3s、超声破碎6min、重复4次);最后,于4℃、12000r/min条件下离心15min,分别取上清、沉淀,得rTIMP-I粗制蛋白;

[0177] ⑤重组长效人TIMP-I粗制品的纯化:

[0178] 肠激酶酶切:将得到的rTIMP-I粗制蛋白使用天根公司肠激酶于23℃酶切过夜;

[0179] 亲和层析:将酶切后粗制蛋白过滤处理后过GST亲和层析柱,用第一Elution buffer梯度洗脱,收集rTIMP-I峰;所述第一Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl、40mM还原性谷胱甘肽,pH 7.0;

[0180] 脱盐、缓冲液置换:将第一步纯化的rTIMP-I过脱盐柱,用脱盐柱缓冲液置换,准备下一步离子交换层析;所述脱盐柱缓冲液的配方为:50mM Tris-Cl,pH 9.0;

[0181] 离子交换层析:分别用Loading buffer平衡好柱体,上样后用第二Elution buffer梯度洗脱,收集rTIMP-I峰;所述Loading buffer的配方为:50mM Tris-Cl,pH 7.0;所述第二Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl、1M NaCl,pH 7.0;

[0182] 分子筛层析:将离子交换层析收集到的rTIMP-I过分子筛层析柱,用第三Elution buffer梯度洗脱,收集rTIMP-I峰;所述第三Elution buffer的配方为:50mM Na₂HPO₄、0.15M NaCl, pH7.0;

[0183] ⑥取收集rTIMP-I做Western Blot验证:

[0184] 使用abcam公司TIMP-I单克隆抗体(ab179580)为第一抗体,使用abcam公司山羊抗鼠IgG(HRP标记)为第二抗体做WB,上述收集的沉淀与上清样本在28kD处均有阳性条带,表明纯化后所得rTIMP-I为TIMP-I(见图1);将纯化的蛋白加入20%甘油无菌分装,于-80℃保存备用。

[0185] (2) 山羊抗人TIMP-I多克隆抗体的制备

[0186] ①山羊的免疫:

[0187] 选择7月龄、体重45kg的雌性山羊,取1mL 5mg/mL rTIMP-I抗原与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只山羊于四蹄注射共2mL乳化抗原,进行第一次免疫;7天后,进行第二次免疫,免疫方案如前;21天后,进行第三次免疫,免疫方案如前;42天后,进行第四次免疫,免疫方案如前;49天后,进行第五次免疫,采用耳缘静脉注射2mL 2.5mg/mL rTIMP-I抗原;55天,取耳缘静脉血使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:35及以上,终止免疫;采用颈部静脉无菌放血法获得全血;

[0188] ②多克隆抗体的纯化:

[0189] 将上述步骤获得的全血于室温划十字口静置2h,取上清获得粗制血清;将粗制血清于4℃、3000r/min条件下离心15min,获得血清,再加入等体积的PBS混匀得混合液,并向混合液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置3h以上;于4℃、4200r/min条件下离心30min,上清中Ig含量较低弃去,将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,再于4℃、4200r/min条件下离心30min;此时,上清弃去,将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,4℃、4200 r/min离心

30min;离心后的沉淀用200mL PBS溶解,并进一步装入10kD透析袋;最后,将其置于4℃环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析6h除盐,即得山羊抗人TIMP-I多克隆抗体;

[0190] ③多克隆抗体的验证:

[0191] 使用上述制备的rTIMP-I为抗原,使用上述制备的山羊抗人TIMP-I多克隆抗体为第一抗体,使用abcam公司驴抗山羊IgG(HRP标记,ab6885)为第二抗体做WB,抗原在28kD处有阳性条带产生(见图2);因rTIMP-I已经商品化单抗验证,且无其他标签蛋白,使用多克隆抗体验证rTIMP-I同样出现阳性条带,表明多克隆抗体制备成功。

[0192] (3)TIMP-I多克隆抗体的胶乳微球的制备

[0193] ①称取12g NHS以及18.5g EDAC,并将其溶于500mL的纯水中,再加入0.5M MES buffer 100mL,调整pH为6.0~7.0,再加入10%的聚苯乙烯胶乳微球100mL;其中,胶乳微球的直径为100~300,加水至1L,室温下搅拌反应30min;

[0194] ②用0.05~0.1M的MES buffer清洗2次,离心后超声重悬微球到1%;

[0195] ③用0.05~0.1M的MES buffer,PH值为7.0~9.0,来稀释山羊抗人TIMP-I多克隆抗体,使其最终蛋白浓度为1g/L;

[0196] ④将微球溶液和抗体1:1混合,室温下搅拌孵育2h;

[0197] ⑤离心去上清,用0.05~0.1M的MES buffer清洗2次,重悬保存,即得包被有血清组 织金属蛋白酶抑制因子I抗体的胶乳微球。

[0198] (4)TIMP-I胶乳增强免疫比浊法试剂盒的制备

[0199] ①配制试剂R1:

[0200] 按照试剂R1的组分含量,将各组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂R1;

[0201] ②配制试剂R2:

[0202] 按照试剂R2的组分含量,将步骤(3)制得的TIMP-I多克隆抗体的胶乳微球以及余下的其他组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂R2;

[0203] ③配制TIMP-I校准品:

[0204] 按照试剂上述TIMP-I校准品的组分含量,将步骤(1)制得的rTIMP-I以及余下的其他组分于同一容器中混合,混合均匀后,制得rTIMP-I校准品。

[0205] 实施例5

[0206] 本实施例的一种上述实施例1-3中TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒的测定方法:

[0207] 一、测定条件

[0208] 主波长:600nm;

[0209] 反应类型:两点终点法;

[0210] 反应方向:上升反应(+);

[0211] 反应温度:37℃;

[0212] 比色杯光径:1cm;

[0213] 校准方式:Logit-Log(5P)。

[0214] 二、操作步骤

[0215] (1)向比色杯中加入10μL样本与240μL试剂R1,37℃孵育3~5min;

[0216] (2) 加入60μL试剂R2,混匀,置37℃孵育;

[0217] (3) 孵育1min后读取吸光值A1,孵育3min后读取吸光值A2,计算 Δ A, Δ A=A2-A1。

[0218] 其中,定标方法为6点定标,采用日立7180全自动生化分析仪(或其他品牌型号)进行检测,并设置校准品浓度分别为:0、94、188、375、750、1500ng/mL;依据定标值,根据 Δ A 测算样本中TIMP-I含量。

[0219] 实施例6

[0220] 本实施例用以评价上述实施例中TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒:

[0221] (1) 线性相关性验证

[0222] 利用实施例1配方配制试剂,并在[50ng/ml-1600ng/ml]范围内用接近线性区间下限的低值标本稀释接近线性区间上限的高值标本,混合成至少5个不同浓度(Xi)的标本,每个标本重复测定3次,分别计算测定结果的均值(yi),见表1。以稀释浓度(Xi)为自变量,以测定结果均值(yi)为因变量求出线性回归方程。按公式(1)计算线性回归的相关系数r,所得结果应符合在50ng/mL~1500ng/mL范围内线性相关系数r应≥0.9900。

[0223]
$$r = \frac{\sum[(X_i - \bar{X})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum(X_i - \bar{X})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2}} \dots\dots\dots(1)$$

[0224] 表1本发明TIMP-I检测试剂盒线性相关性比对值

样本号	稀释浓度 (ng/ml)	测试一 (ng/ml)	测试二 (ng/ml)	测试三 (ng/ml)	平均值 (ng/ml)
1	50.5	48.2	53.1	47.9	49.9
2	220.4	210.9	220.5	215.7	216.8
3	155.0	151.8	155.2	158.4	155.1
4	1610.0	1619.7	1615.2	1605.7	1612.6
5	750.0	761.0	745.4	755.8	753.0

[0226] 如图3所示,本试剂盒的直线拟合曲线为:y=1.0029x-1.2597,R²=0.9998R²>0.99,满足临床技术要求。

[0227] (2) 准确度验证

[0228] 取高、低两个水平的质控品,按照说明书操作步骤进行测定,用同一批号试剂重复测定3次,测试结果记为(x_i),按(2)式求出相对偏差(B_i),3次结果测定值与质控品靶值相对偏差应≤15.0%;如果3次结果中有2次符合测定值与质控品靶值相对偏差应≤15.0%,1次不符合测定值与质控品靶值相对偏差应≤15.0%,应重新连续测试20次,并分别按照(2)式计算相对偏差(B_i),当大于等于19次结果符合测定值与质控品靶值相对偏差应≤15.0%,准确度被验证即符合要求。

[0229]
$$Bi = \frac{|xi - T|}{T} \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

[0230] 式中:x_i为测定结果;T为靶值。

[0231] 结果表明,检测值较靶值相对偏差较小,准确度较高;见表2。

[0232] 表2所述试剂盒准确度验证结果

准确度检测结果		
测试数	低值质控 (ng/ml)	高值质控 (ng/ml)
1	180.3	360.2
2	174.9	359.8
3	179.2	375.5
平均值	178.1	365.1
靶值	175.0	360.0
相对偏差 (%)	1.7%	1.4%

[0234] (3) 精密度验证

[0235] 在重复条件下,取 (200 ± 40) ng/mL 和 (500 ± 100) ng/mL 浓度的样本 (质控品、校准品 或其他定值样本),用同一批号试剂重复测定10次,分别计算测定值的平均值和标准差,按 (2) 式计算批内变异系数 (CV), 所得结果 CV 应 $\leq 8.0\%$ 。

[0236] 变异系数 (CV) = $SD/\bar{x} \times 100\%$(2)

[0237] 式中:SD为标准差,计算公式为 $SD = \sqrt{(d_1^2 + d_2^2 + \dots + d_n^2)/n-1}$;

[0238] d_n 为同水平各次所测值的偏差,计算公式为 $d_n = x_n - \bar{x}$;

[0239] x_n 为同水平各次所测值;

[0240] \bar{x} 为平均值,计算公式为 $\bar{x} = (x_1 + x_2 + \dots + x_n)/n$ 。

[0241] 精密度检测数据如表3,检测结果表明,所述试剂盒在检测高值和低值样本时的变异系数较小分别为1.45%和2.71%,精密度较好。

[0242] 表3所述试剂盒精密度验证结果

重复性检测结果		
测试数	低值样本 (ng/ml)	高值样本 (ng/ml)
1	207.06	509.19

[0244]	2	195.01	502.55
	3	202.85	495.09
	4	194.74	512.42
	5	191.79	508.72
	6	191.37	506.20
	7	191.47	506.31
	8	198.46	489.96
	9	200.84	506.34
	10	194.66	495.57
	平均值	196.82	503.24
	SD	5.33	7.30
	CV (%)	2.71%	1.45%

[0245] (4) 灵敏度及特异度验证

[0246] 采用进口间接ELISA法TIMP-I检测试剂盒检测筛选50份阳性血清50份阴性血清，与 所述试剂盒同步检测此100份血清样本，按各试剂盒判定标准设高于参考标准为阳性，低于 参考标准为阴性；以进口间接ELISA法检测试剂盒为金标准计算各试剂盒的灵敏度和特异度， 结果见表4。结果表明，所述试剂盒有较高的灵敏度及特异度，可显著地提高临床检测的准 确性满足临床检测的需求。

[0247] 表4所述试剂盒灵敏度及特异度与市售试剂盒比较

试剂盒	检测项	金标准		灵敏度	特异度
		真阳性	真阴性		
[0248] 本发明所 述试剂盒	检测阳性	49	1	98%	98%
	检测阴性	1	49		

[0249] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精 神和原 则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110> 安徽大千生物工程有限公司

<120> 一种TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法

<130> 2019

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

ccatgggatg atgatgataa agccatcgcc gcagatccag cgccca 46

<210> 2

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

gatactctac tactactatt ttgctgggtg gtaactcttt attttc 46

<210> 3

<211> 803

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

ccatgggatg atgatgataa agccatcgcc gcagatccag cgcccagaga gacaccagag 60
aaccacccat ggcccccttt gagccctggc ttctggcatc ctgttgctgt ggctgatagc 120
cccagcaggg cctgcacctg tgtcccacc caccacaga cggccttctg caattccgac 180
ctcgtcatca gggccaagtt cgtggggaca ccagaagtca accagaccac cttataccag 240
cgttatgaga tcaagatgac caagatgtat aaagggttcc aagccttagg ggatgccgct 300
gacatccggt tcgtctacac ccccgcatg gagagtgtct gcgatactt ccacaggtcc 360
cacaaccgca gcgaggagtt tctcattgct ggaaaactgc aggatggact cttgcacatc 420
actacctgca gttttgtgge tccttggaac agcctgagct tagctcagcg ccggggcttc 480
accaagacct aactgttgg ctgtgaggaa tgcacagtgt ttccctgttt atccatcccc 540
tgcaaaactgc agagtggcac tcattgcttg tggacggacc agctcctcca aggctctgaa 600
aagggttcc agtcccgtca cettgectgc ctgectcggg agccagggtc gtgcacctgg 660
cagtccctgc ggtcccagat agcctgaatc ctgcccggag tggaagctga agcctgcaca 720
gtgtccacc tgttcccact cccatctttc ttccggacaa tgaataaag agttaccacc 780
cagcaaaata gtagtagagt atc 803

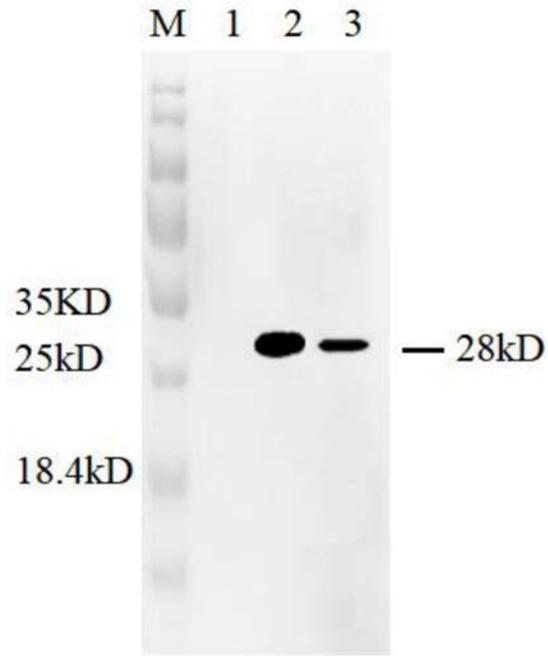


图1

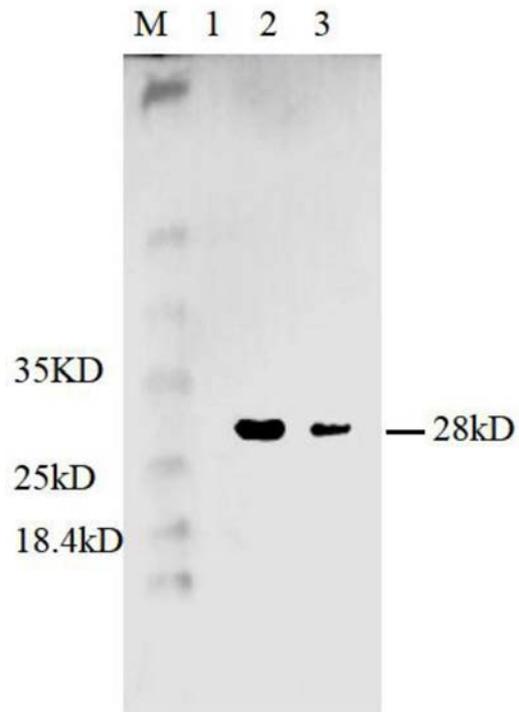


图2

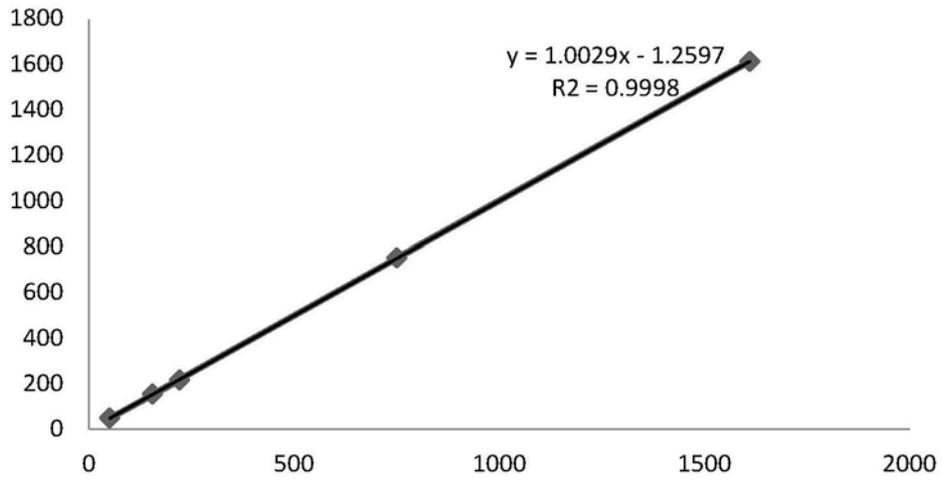


图3

专利名称(译)	一种TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法		
公开(公告)号	CN110763839A	公开(公告)日	2020-02-07
申请号	CN2019111051087.4	申请日	2019-10-31
[标]申请(专利权)人(译)	安徽大千生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	安徽大千生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	安徽大千生物工程有限公司		
[标]发明人	芮双印 李祥宇		
发明人	芮双印 李祥宇 支新梅		
IPC分类号	G01N33/573 G01N33/543 G01N33/531 G01N21/82		
CPC分类号	G01N21/82 G01N33/531 G01N33/54313 G01N33/573 G01N2333/96486		
代理人(译)	王伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒，包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分；其中，试剂R1包括：Tris-HCl缓冲液、PEG6000、BSA、NaCl、MgCl₂、NaN₃、EDTA；试剂R2包括：Tris-HCl缓冲液、PEG6000、BSA、TIMP-I多克隆抗体的胶乳微球、TX-100、NaCl、MgCl₂、NaN₃、EDTA。本发明还公开了一种上述TIMP-I胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备与使用方法。本发明试剂盒重复性与稳定性好、灵敏性与特异性高，且可在全自动生化分析仪上使用，成本低廉，可节省检测时间，便于临床应用。

