



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111044718 A

(43)申请公布日 2020.04.21

(21)申请号 201911327522.1

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2019.12.20

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

(71)申请人 北京指真生物科技有限公司

地址 101111 北京市大兴区北京经济技术
开发区科创十四街20号院1号楼三层
302

(72)发明人 马永波 李根 徐兵 杨宝君
刘燕 刘希凯

(74)专利代理机构 北京慕达星云知识产权代理
事务所(特殊普通合伙)
11465

代理人 崔自京

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/74(2006.01)

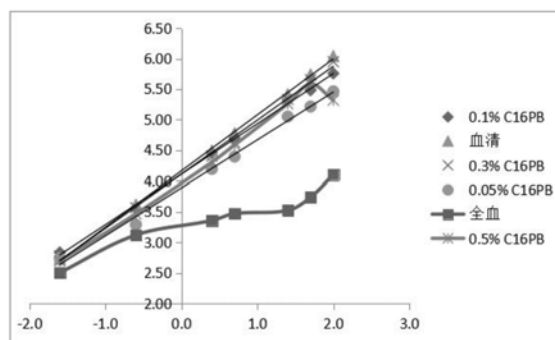
权利要求书2页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种全血的免疫发光分析用稀释液及其分
析方法

(57)摘要

本发明公开了一种全血的免疫发光分析用稀释液,所述稀释液中各组分的质量浓度为:PBS 5~20mmol/L、BSA 0.1%~1%、PC-300 0.01%~0.1%、分散剂0.01%~0.5%。通过取全血的免疫发光分析用稀释液、校准品、偶联有PCT抗体的磁微粒混悬液依次加入反应管中,振荡混匀,37℃孵育10~30min,分离,清洗,将洗涤后的反应容器继续加入吡啶酯标记物继续孵育12min,分离,清洗,在全自动发光仪中进行测试可进行全血的免疫发光分析。本发明的有益效果为:加入样本稀释液,并在样本稀释液中加入分散剂,分散剂可使抗原和抗体充分反应,其发光值较不加分散剂有了很大的提高且CV变化不大。



1. 一种全血的免疫发光分析用稀释液,其特征在于,所述稀释液中各组分的质量浓度为:PBS 5~20mmol/L、BSA 0.1%~1%、PC-3000.01%~0.1%、分散剂0.01%~0.5%。

2. 根据权利要求1所述的一种全血的免疫发光分析用稀释液,其特征在于,所述分散剂为N-十二烷基-N,N-二甲基氨基丙磺酸盐、十烷基二甲基氧化铵、十六烷基醚羟丙基羧酸甜菜碱、十六烷基聚氧乙烯醚羟丙基羧酸甜菜碱中的一种或多种。

3. 一种以权利要求1所述全血的免疫发光分析用稀释液进行全血的免疫发光分析方法,其特征在于,步骤如下:

(1) 偶联有PCT抗体的磁微粒混悬液的制备

(11) 取羧基磁微粒于硅化离心管中,加入200~500μL pH值为5.0~6.5、浓度为0.05~0.2mol/L的MES缓冲液,涡旋混匀,置于磁力架上,静置5min使所述羧基磁微粒与所述MES缓冲液分离,弃去上清,重复上述步骤3次后加入200~500μL pH值为5.0~6.5、浓度为0.05~0.2mol/L的MES缓冲液重悬羧基磁微粒;

(12) 再加入20~200μL 4℃的浓度为10~200mg/mL的EDC偶联试剂,于旋转反应器的涡旋,室温孵育15~40min;

(13) 孵育后去除上清液,用0.1M MES缓冲液清洗1次;

(14) 清洗后加入150μL MES缓冲液重悬羧基磁微粒,加入10~100μg降钙素原PCT抗体,混匀,室温反应2~4h;

(15) 之后加入0.1~5mL封闭缓冲液进行封闭,时间为1~5h;

(16) 封闭后去上清,加入600μL清洗缓冲液洗涤3次,得到偶联有PCT抗体的磁微粒混悬液,置于1.5mL浓度为2mg/mL的保存液中,2~8℃保存备用;

所述保存液为10mMPBS、1%BSA、0.5%Tween-20、0.05%PC-300的混合液;

(2) 吡啶酯标记的PCT单克隆抗体的制备

(21) 在离心管中加入120μL浓度为0.05~0.5M、pH值为8.0~10.0的Na₂CO₃-NaHCO₃标记缓冲液,再加入0.2mg的PCT单克隆抗体,混匀;

(22) 之后加入5μL 6.5 mmol/L的NSP-SA-NHSDMF溶液,避光反应至吡啶酯与PCT单克隆抗体的摩尔比为5~25:1,震荡混匀,室温下反应1~4h;

(23) 再加入10~100μL质量浓度为10%的赖氨酸,反应10~40min;

(24) 将标记物NSP-SA-NHS-Ab与游离NSP-SA-NHS通过Sephadex G-25柱分离,用0.1mol/L pH值为6.3的PBS纯化缓冲液平衡并淋洗层析柱进行层析,过程中用紫外分光光度计检测产物200~800nm的光谱,分离得到吡啶酯标记的PCT单克隆抗体,之后加入质量分数1%的BSA和质量分数0.05%的防腐剂,分装冰冻保存备用;

(3) PCT校准品的制备

用含有20%全血的校准品缓冲液将降钙素原PCT纯品稀释成浓度为0、0.02、0.2、2、20、100ng/mL的校准品,所述校准品缓冲液为含1%BSA的10mM PBS, pH为7.4;

(4) 检测

取全血的免疫发光分析用稀释液40μL、校准品100μL、偶联有PCT抗体的磁微粒混悬液50μL依次加入反应管中,振荡混匀,37℃孵育10~30min,分离,清洗,将洗涤后的反应容器继续加入10μL吡啶酯标记的PCT单克隆抗体继续孵育12min,分离,清洗,在全自动发光仪中进行测试。

4.如权利要求3所述的一种全血的免疫发光分析方法,其特征在于,所述封闭缓冲液为:浓度为50mM含1% (W/W) BSA的Tris缓冲液,pH值为7.2。

5.如权利要求3所述的一种全血的免疫发光分析方法,其特征在于,步骤(16)中所述清洗缓冲液为pH7.0、浓度为5mmol/l的PBS缓冲液。

一种全血的免疫发光分析用稀释液及其分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫发光分析用稀释液及其分析方法,具体涉及一种全血的免疫发光分析用稀释液及其分析方法,属于免疫检测分析技术领域。

背景技术

[0002] 目前化学发光免疫分析方法中检测的样本基本都是血清,而血清要等血液凝固后才能更好地进行分离,血液凝固一般是在4℃放置几个小时甚至更长的时间,血液凝固之后经过3~4次离心分离才能得到血清。因而过程比较繁琐且费时。对于婴幼儿炎症检测等项目来说,快速有效地检测出结果可减少婴儿的痛苦。本发明采用全血标本,采用全血可以大大缩短前期血清处理时间,标本周转时间短,操作简单化。目前市场上也有用POCT实现全血的检测,其优点是可以在患者身边实现即时检测,并快速取得诊断结果,但其实施中存在以下问题:检测结果不准确,重复性差,且一般用于定性检测,无法获得相对准确的检测结果且由于试剂和仪器的特殊性,检验费用增加。

发明内容

[0003] 有鉴于此,本发明采用统计学的方法先对全血中血球压积进行统计分析,然后做出血清的校准曲线,之后调整全血中稀释液的成分,对全血的校准曲线进行校正拟合,并与血清校准曲线进行换算,得到所测抗原或抗体的量。

[0004] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0005] 一种全血的免疫发光分析用稀释液,所述稀释液中各组分的质量浓度为:PBS5~20mmol/L、BSA0.1%~1%、PC-3000.01%~0.1%、分散剂0.01%~0.5%。

[0006] 优选的,所述分散剂为N-十二烷基-N,N-二甲基氨基丙磺酸盐、十烷基二甲基氧化铵、十六烷基醚羟丙基羧酸甜菜碱、十六烷基聚氧乙烯醚羟丙基羧酸甜菜碱中的一种或多种。

[0007] 本发明全血的免疫发光分析用稀释液,组分中加入分散剂,可以使全血得到充分稀释从而使抗原与抗体充分反应,其发光值较不加分散剂有了很大的提高且CV变化也不大。

[0008] 本发明还提供了以上述全血的免疫发光分析用稀释液进行全血的免疫发光分析方法,步骤如下:

[0009] (1) 偶联有PCT抗体的磁微粒混悬液的制备

[0010] (11) 取一定量的羧基磁微粒于硅化离心管中,加入200~500μL pH值为5.0~6.5、浓度为0.05~0.2mol/L的MES缓冲液,涡旋混匀,置于磁力架上,静置5min使所述羧基磁微粒与所述MES缓冲液分离,弃去上清,重复上述步骤3次后加入200~500μL pH值为5.0~6.5、浓度为0.05~0.2mol/L的MES缓冲液重悬羧基磁微粒;

[0011] (12) 再加入20~200μL 4℃的浓度为10~200mg/mL的EDC偶联试剂,于旋转反应器上涡旋,室温孵育15~40min;

- [0012] (13) 孵育后去除上清液,用0.1MMES缓冲液清洗1次;
- [0013] (14) 清洗后加入150 μ L MES缓冲液重悬羧基磁微粒,加入10~100 μ g降钙素原PCT抗体,混匀,室温反应2~4h;
- [0014] (17) 之后加入0.1~5mL封闭缓冲液进行封闭,时间为1~5h;
- [0015] (18) 封闭后去上清,加入600 μ L清洗缓冲液洗涤3次,得到偶联有PCT抗体的磁微粒混悬液,置于1.5mL浓度为2mg/mL的保存液中,2~8 $^{\circ}$ C保存备用;
- [0016] 所述保存液为10mMPBS、1%BSA、0.5%Tween-20、0.05%PC-300的混合液;
- [0017] (2) 吡啶酯标记的PCT单克隆抗体的制备
- [0018] (21) 在离心管中加入120 μ L浓度为0.05~0.5M、pH值为8.0~10.0的Na₂CO₃-NaHCO₃标记缓冲液,再加入0.2mg的PCT单克隆抗体,混匀;
- [0019] (22) 之后加入5 μ L6.5mmol/L的NSP-SA-NHSDMF溶液,避光反应至吡啶酯与PCT单克隆抗体的摩尔比为5~25:1,震荡混匀,室温下反应1~4h;
- [0020] (23) 再加入10~100 μ L质量浓度为10%的赖氨酸,反应10~40min;
- [0021] (24) 将标记物NSP-SA-NHS-Ab与游离NSP-SA-NHS通过Sephadex G-25柱分离,用0.1mol/LpH值为6.3的PBS纯化缓冲液平衡并淋洗层析柱进行层析,过程中用紫外分光光度计检测产物200~800nm的光谱,分离得到吡啶酯标记的PCT单克隆抗体,之后加入质量分数1%的BSA和质量分数0.05%的防腐剂,分装冰冻保存备用;
- [0022] (3) PCT校准品的制备
- [0023] 用含有20%全血的校准品缓冲液将降钙素原PCT纯品稀释成浓度为0、0.02、0.2、2、20、100ng/mL的校准品,所述校准品缓冲液为含1%BSA的10mMPBS,pH为7.4;
- [0024] (4) 检测
- [0025] 取全血的免疫发光分析用稀释液40 μ L、校准品100 μ L、偶联有PCT抗体的磁微粒混悬液50 μ L依次加入反应管中,振荡混匀,37 $^{\circ}$ C孵育10~30min,分离,清洗,将洗涤后的反应容器继续加入10 μ L吡啶酯标记的PCT单克隆抗体继续孵育12min,分离,清洗,在全自动发光仪中进行测试,绘制标准曲线;
- [0026] 样品检测方法同标准曲线的制备。
- [0027] 优选的,所述封闭缓冲液为:浓度为50mM含1%(W/W)BSA的Tris缓冲液,pH值为7.2。
- [0028] 优选的,步骤(16)中所述清洗缓冲液为pH7.0、浓度为5mmol/L的PBS缓冲液。
- [0029] 本发明取得的有益效果为:(1)实现全血的检测,快速便捷;(2)可定量检测,检测结果准确;(3)全血比血清粘稠,且全血中的红细胞可能影响了抗原与抗体的结合,因而加入样本稀释液,并在样本稀释液中加入分散剂,分散剂可以使抗原和抗体充分反应,其发光值较不加分散剂有了很大的提高且CV变化也不大。

附图说明

- [0030] 图1为本发明实施例5双对数线性拟合结果图,其中,横坐标为校准品浓度的对数值,纵坐标为所测发光值的对数值;
- [0031] 图2为本发明实施例6全自动发光仪测试结果图,其中,横坐标为校准品的浓度,纵坐标为所测发光值;

[0032] 图3为本发明实施例6双对数线性拟合结果图,其中,横坐标为校准品浓度的对数值,纵坐标为所测发光值的对数值;

[0033] 图4为本发明实施例7全自动发光仪测试结果图,其中,横坐标为校准品的浓度,纵坐标为所测发光值;

[0034] 图5为本发明实施例7双对数线性拟合结果图,其中,横坐标为校准品浓度的对数值,纵坐标为所测发光值的对数值;

[0035] 图6为本发明实施例8中全血中加0.3% C16PB与血清的校准曲线对比图,其中,横坐标为校准品浓度的对数值,纵坐标为所测发光值的对数值。

具体实施方式

[0036] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围,以下以PCT为例对本发明进一步详细说明。

[0037] 在以下实施例中,所用仪器或试剂均为本领域内公知。

[0038] 实施例1

[0039] 偶联有PCT抗体的磁微粒混悬液的制备,步骤如下:

[0040] (1) 取3mg (30 μ L) 羧基磁微粒于2mL硅化离心管中,加入300 μ L浓度为0.1mol/L的MES (pH5.0) 缓冲液,涡旋混匀,置于磁力架上,静置5min使磁微粒与液体分开,弃去上清,重复上述步骤,洗涤磁珠3次,之后加入300 μ LMES缓冲液 (pH5.0) 重悬磁珠。

[0041] (2) 再加入50 μ L浓度为20mg/mL的偶联试剂EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺) (用预冷的0.1MMES溶EDC),于旋转反应器上涡旋,室温孵育30min。

[0042] (3) 孵育后去上清,迅速用0.1MMES清洗1次。

[0043] (4) 清洗后加入150 μ LMES缓冲液 (pH5.0) 重悬磁珠,再加入60 μ g PCT抗体,混匀,室温反应3h。

[0044] (5) 之后加入1mL封闭缓冲液进行封闭,时间为1h。

[0045] (6) 封闭后去上清,加入600 μ L清洗缓冲液洗涤3次。

[0046] (7) 将上述制备好的磁微粒混悬液置于1.5mL保存液中 (10mMPBS、1%BSA、0.5% Tween-20、0.05%PC-300) (浓度为2mg/mL), 2~8 $^{\circ}$ C保存备用。

[0047] 实施例2

[0048] 吡啶酯标记的PCT单克隆抗体的制备,步骤如下:

[0049] (1) 在2mL离心管中加入120 μ LN Na_2CO_3 -NaHCO $_3$ 标记缓冲液,再加入0.2mg的PCT单克隆抗体,混匀。

[0050] (2) 再加入3.1 μ L6.5mmol/L的NSP-SA-NHSDMF溶液,避光反应,使吡啶酯与PCT单克隆抗体的摩尔比为15:1,震荡混匀,室温下反应2h。

[0051] (3) 之后加入10 μ L质量浓度为10%的赖氨酸,反应20min,使标记反应终止。

[0052] (4) 标记物NSP-SA-NHS-Ab与游离NSP-SA-NHS通过SephadexG-25柱 (1 $\times$ 25cm) 分离,用纯化缓冲液0.1mol/L的PBS (pH6.3) 平衡并淋洗层析柱。分离过程中用紫外分光光度计检测产物800nm~200nm的光谱,根据产物特征吸收峰分离产物,然后加入1%BSA (质量分

数)和0.05%防腐剂后分装冰冻保存。

[0053] 实施例3

[0054] 血清配制的PCT校准品的制备,步骤如下:

[0055] 用含有20%血清的校准品缓冲液,将PCT纯品稀释至工作浓度配制标示浓度为0、0.02、0.2、2、20、100ng/mL的一系列校准品,校准品缓冲液为含1%BSA的10mMPBS,pH为7.4。

[0056] 实施例4

[0057] 全血配制的PCT校准品的制备:

[0058] 用含有20%全血的校准品缓冲液,将PCT纯品稀释至工作浓度配制标示浓度为0、0.02、0.2、2、20、100ng/mL的一系列校准品,校准品缓冲液为含1%BSA的10mMPBS,pH为7.4。

[0059] 实施例5

[0060] 降钙素原PCT定量检测试剂盒,使用操作程序如下:

[0061] 根据棋盘实验,得到磁珠和吡啶酯的最佳稀释倍数,磁珠混悬液稀释10倍,吡啶酯稀释16000倍。

[0062] 取上述血清配置的校准品40μL/全血配置的校准品100μL、偶联磁微粒混悬液50μL依次加入反应管中,振荡混匀,37℃孵育9min,分离,清洗;将洗涤后的反应容器继续加入350μL吡啶酯标记物继续孵育10min,分离,清洗;在全自动发光仪中进行测试。其测试结果如表1~2所示(此测定结果是在对大量样本进行测定统计后得到,是取血球的平均压积是40时进行的测定),对所测结果采用双对数线性拟合,其结果如图1所示;

[0063] 表1血清配置的校准品的测试结果

校准品浓度 (ng/mL)	1	2	平均值	CV (%)
0	487	490	489	0.4
0.025	554	546	550	1.0
0.25	4136	4066	4101	1.2
2.5	27484	28628	28056	2.9
5.0	59213	60623	59918	1.7
25.0	200856	210553	205704	3.3
50.0	647346	632882	640114	1.6
100.0	1396982	1373470	1385226	1.2

[0065] 表2全血配置的校准品的测试结果

校准品浓度 (ng/mL)	1	2	平均值	CV (%)
0	587	1891	1239	74.4
0.025	483	157	320	72.0
0.25	623	1623	1323	63.0
2.5	986	3586	2286	80.4
5.0	1145	4783	2964	86.8
25.0	4704	1986	3345	57.5
50.0	3895	7083	5489	41.1

100.0	7463	17885	12674	58.1
-------	------	-------	-------	------

[0067] 从表1~2和图1可知,全血配置的校准品CV变化大,且测值比血清配置的校准品低很多。考虑到全血比血清粘稠,且全血中的红细胞可能影响了抗原与抗体的结合,因而加入样本稀释液,并在样本稀释液中加入分散剂,延长反应时间,改变加样顺序重新进行实验。

[0068] 实施例6

[0069] 测全血时样本稀释液中加入分散剂进行测试。

[0070] 在样本稀释液中不加分散剂、在样本稀释液中加入0.1%的分散剂(N-十二烷基-N,N-二甲基氨基丙磺酸盐(DDAPS)、十烷基二甲基氧化铵(DDAO)、十六烷基醚羟丙基羧酸甜菜碱(C16PB)、十六烷基聚氧乙烯醚羟丙基羧酸甜菜碱(C16(EO)3PB))并在试剂盒组建中加入稀释液,稀释液为(10mmPBS、0.5%BSA、0.05%PC-300、0.1%分散剂),改变上述试剂盒加样顺序并延长反应时间。

[0071] 调整后的实验步骤如下:取上述样本稀释液40μL、全血配置的校准品100μL、磁微粒混悬液50μL、依次加入反应管中,振荡混匀,37℃孵育18min,分离,清洗;将洗涤后的反应容器继续加入350μL吡啶酯标记物继续孵育12min,分离,清洗;在全自动发光仪中进行测试。其测试结果如图2所示,对所测结果采用双对数线性拟合,其结果如图3所示;

[0072] 由图2~3可知,在样本稀释液中加入C16PB时,其发光值较加入其他分散剂有了很大的提高且CV变化也不大,接下来将对C16PB的使用量进行进一步优化。

[0073] 实施例7

[0074] 样本稀释中分散剂C16PB使用量的优化。

[0075] 在样本稀释液中分别加入0.05%、0.1%、0.3%、0.5%的分散剂十六烷基醚羟丙基羧酸甜菜碱(C16PB),并按照实施例6中的步骤进行操作,其测试结果如表3~4和图4所示,对所测结果采用双对数线性拟合,其结果如图5所示:

[0076] 表3血清配置的校准品的测试结果

[0077]	校准品浓度 (ng/mL)	1	2	平均值	CV (%)
	0	487	490	489	0.4

[0078]	0.025	554	546	550	1.0
	0.25	4136	4066	4101	1.2
	2.5	27484	28628	28056	2.9
	5.0	59213	60623	59918	1.7
	25.0	200856	210553	205704	3.3
	50.0	647346	632882	640114	1.6
	100.0	1396982	1373470	1385226	1.2

[0079] 表4样本稀释液中加0.3%C16PB的全血配置的校准品的测试结果

[0080]	校准品浓度 (ng/mL)	1	2	平均值	CV (%)
	0	564	532	548	4.1

0.025	783	737	760	4.3
0.25	2615	2781	2698	4.4
2.5	17135	18787	17961	6.5
5.0	36564	33714	35139	5.7
25.0	105210	115762	110486	6.8
50.0	318620	306682	312651	2.7
100.0	612104	647204	629654	3.9

[0081] 由表3~4和图4~5可知,样本稀释液中C16PB的浓度为0.3%时,其测试结果与血清测试结果更接近,接下来我们将将其与血清进行换算。

[0082] 实施例8

[0083] 全血与血清测试结果的换算,步骤如下:

[0084] 对上述血清和样本稀释液中C16PB的浓度为0.3%时所测结果分别采用双对数线性拟合,其结果如图6所示。

[0085] 由图6可以得出,标准方程为: $y_{\text{血清}}=0.927x+4.163$, $y_{\text{全血}}=0.813x+4.029$ 通过换算可知, $y_{\text{血清}}=1.14y_{\text{全血}}-0.43$ 。

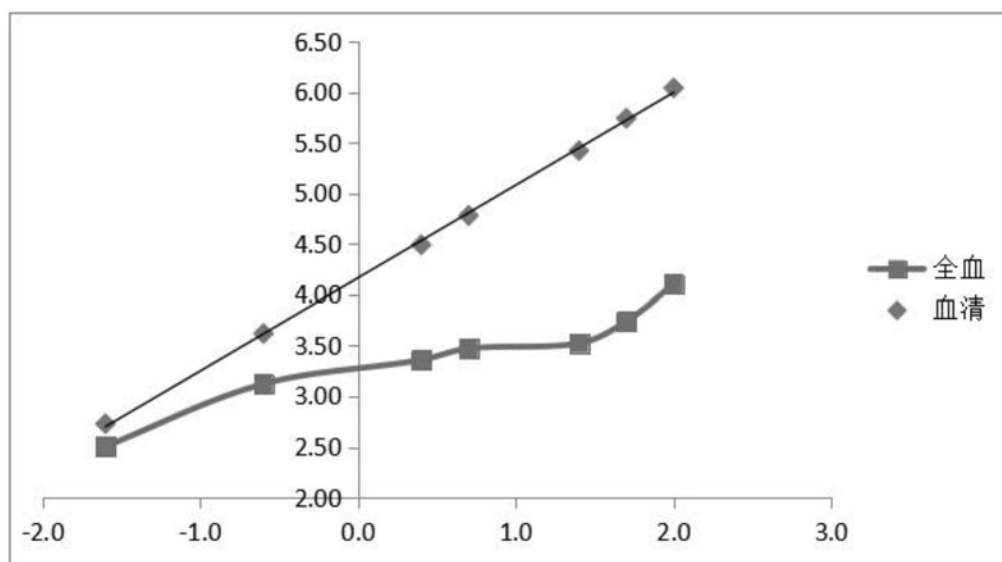


图1

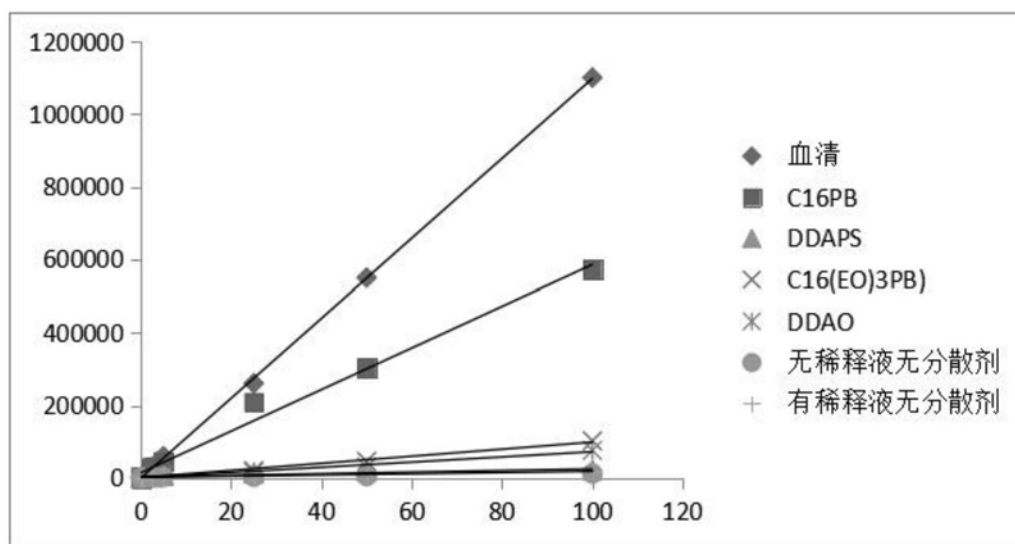


图2

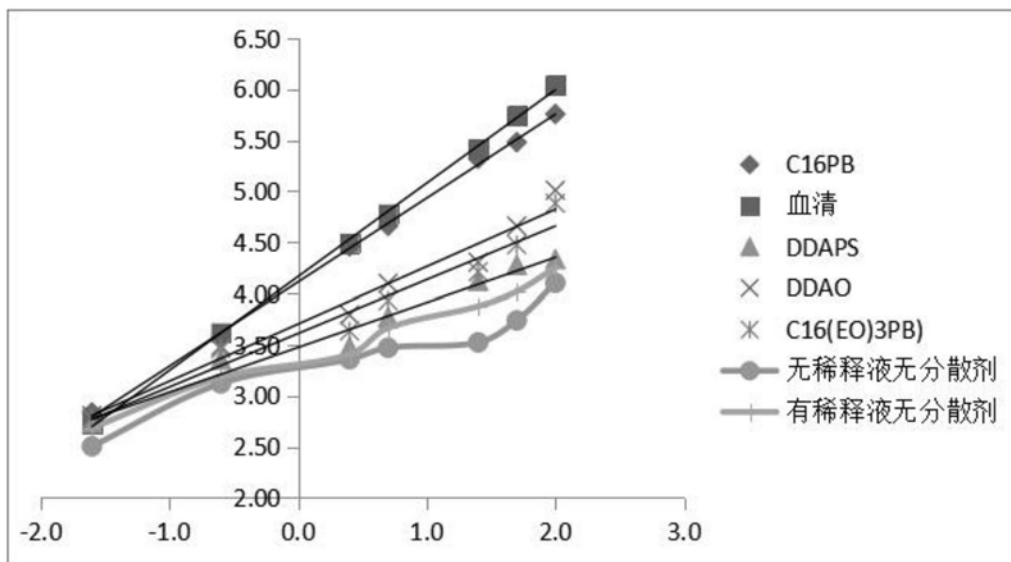


图3

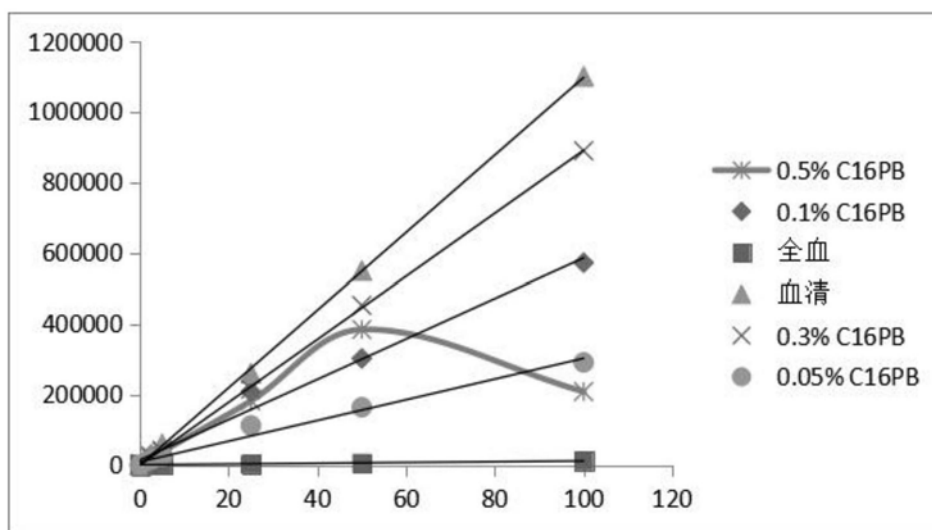


图4

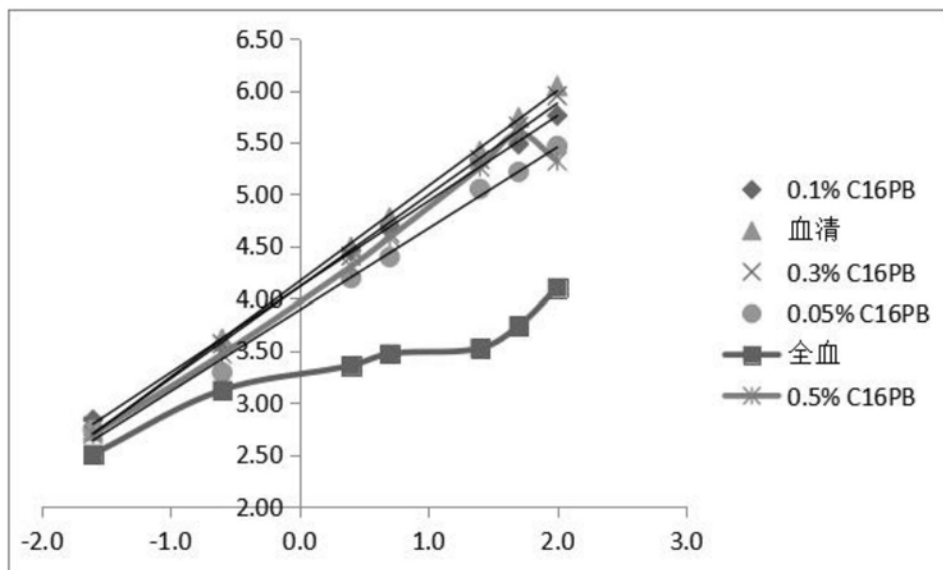


图5

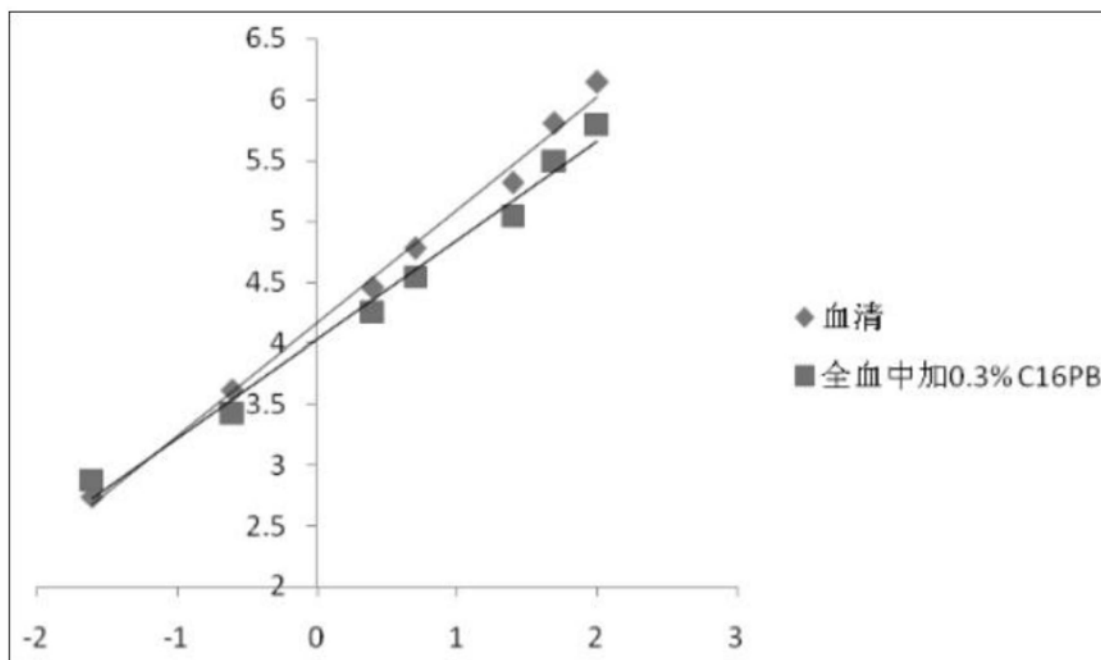


图6

专利名称(译)	一种全血的免疫发光分析用稀释液及其分析方法		
公开(公告)号	CN111044718A	公开(公告)日	2020-04-21
申请号	CN201911327522.1	申请日	2019-12-20
[标]发明人	马永波 李根 徐兵 杨宝君 刘燕 刘希凯		
发明人	马永波 李根 徐兵 杨宝君 刘燕 刘希凯		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/74 G01N33/577 G01N33/543 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/531 G01N33/54326 G01N33/577 G01N33/74 G01N2333/585		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种全血的免疫发光分析用稀释液，所述稀释液中各组分的质量浓度为：PBS 5～20mmol/L、BSA 0.1%～1%、PC-300 0.01%～0.1%、分散剂0.01%～0.5%。通过取全血的免疫发光分析用稀释液、校准品、偶联有PCT抗体的磁微粒混悬液依次加入反应管中，振荡混匀，37℃孵育10～30min，分离，清洗，将洗涤后的反应容器继续加入吡啶酯标记物继续孵育12min，分离，清洗，在全自动发光仪中进行测试可进行全血的免疫发光分析。本发明的有益效果为：加入样本稀释液，并在样本稀释液中加入分散剂，分散剂可使抗原和抗体充分反应，其发光值较不加分散剂有了很大的提高且CV变化不大。

