



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105866415 A

(43)申请公布日 2016.08.17

(21)申请号 201610325808.6

(22)申请日 2016.05.18

(71)申请人 北京北方生物技术研究所有限公司

地址 100076 北京市丰台区潘家庙甲20号

(72)发明人 李军 赵玉军 曾玲 于爽

白云鹏 申海燕 陈震 姚兰忠

(51)Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

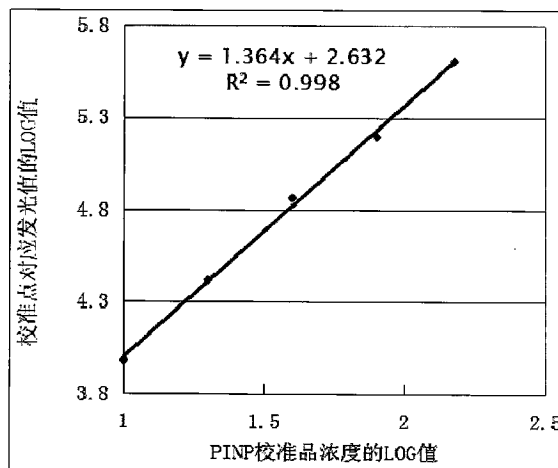
权利要求书1页 说明书11页 附图3页

(54)发明名称

I型胶原氨端肽定量检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于检测I型胶原氨端肽的化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法,所述试剂盒包括预包装抗I型胶原氨端肽单克隆抗体的96孔板;I型胶原氨端肽抗原校准品;辣根过氧化物酶标记的抗I型胶原氨端肽抗体酶结合物;发光底物鲁米诺发光液;浓缩洗涤液和质控血清。本发明克服进口试剂盒存在的问题,解决进一步推广应用的需求,而提供一种无放射性污染,操作简便,性价比高,能一次检测大量样品的I型胶原氨端肽定量检测试剂盒及其制备方法。



1. 一种定量检测人血清I型胶原氨端肽的化学发光免疫分析试剂盒,其特征在于:该试剂盒内包含有预包被抗I型胶原氨端肽单克隆抗体的96孔板;I型胶原氨端肽抗原校准品;辣根过氧化物酶标记的抗I型胶原氨端肽抗体酶结合物;发光底物鲁米诺发光液;浓缩洗涤液和质控血清。

2. 如权利要求1所述一种定量检测人血清I型胶原氨端肽的化学发光免疫分析试剂盒,其特征在于所述抗I型胶原氨端肽单克隆抗体的制备,方法如下:

1) 将I型胶原氨端肽与佐剂混合腹腔注射BALB/C小鼠3次,每次间隔3周,取小鼠静脉血测免疫效价;取效价高的小鼠尾静脉注射加强免疫一次,三天后取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞在聚乙二醇作用下细胞融合,一周后取细胞生长孔上清经ELISA测抗体分泌情况,将阳性分泌孔扩大培养;注射入BALB/C小鼠腹腔内,8-10天收集腹水。离心取腹水上清;

2) 量取腹水,加入2倍体积0.06M pH4.8乙酸盐缓冲液,每毫升腹水加入正辛酸35 μ I,室温搅拌30分钟,12000RPM离心30分钟;取上清,调pH7.4,加入45%体积饱和硫酸铵溶液,在4 $^{\circ}$ C下搅拌60分钟,12000RPM离心20分钟,取沉淀溶于0.02M、pH7.4磷酸盐缓冲中,对0.02M、pH7.4磷酸盐缓冲液透析,换液5次;收集透析单抗溶液,测定蛋白浓度即得到抗I型胶原氨端肽单克隆抗体。

3. 如权利要求1所述一种定量检测人血清I型胶原氨端肽的化学发光免疫分析试剂盒,其特征在于:所述预包被抗I型胶原氨端肽单克隆抗体的96孔板,其是经以下重量份数比的原料制成pH7.4的磷酸盐缓冲液按照4 μ g/ml包被浓度包被所述的单克隆抗体的,磷酸氢二钠5.8份,磷酸二氢钠0.6份,去离子水1000份。

4. 如权利要求1所述一种定量检测人血清I型胶原氨端肽的化学发光免疫分析试剂盒,其特征在于:四组分缓冲液是经以下重量份数比的原料制成pH7.4液体,磷酸氢二钠2.9份,磷酸二氢钾0.2份,氯化钾0.2份,生理盐水500份。

5. 如权利要求1所述一种定量检测人血清I型胶原氨端肽的化学发光免疫分析试剂盒,其特征在于:I型胶原氨端肽抗原校准品是经样品稀释液稀释而成,样品稀释液是经以下体积分数比的原料制成,新生牛血清1份,四组分缓冲液4份,稀释浓度分别为150ng/ml,80ng/ml,40ng/ml,20ng/ml,10ng/ml。

6. 如权利要求1所述一种定量检测人血清I型胶原氨端肽的化学发光免疫分析试剂盒,其特征在于:辣根过氧化物酶标记的抗I型胶原氨端肽抗体酶结合物是用样品稀释液按照1:70000比例稀释而成。

I型胶原氨端肽定量检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测试剂盒,具体涉及一种以化学发光板做载体制备固相抗体,用于定量检测人血清中I型胶原氨端肽的化学发光免疫分析的试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] I型胶原氨端肽(N-terminal propeptide of Type I procollagen, PINP),是I型前胶原分泌至骨细胞外沉积前,经氨基端肽酶裂解所产生的氨基端多肽,在此过程中,PINP与I型胶原呈等分子浓度,并进入血液循环。由于PINP与新形成的骨胶原成等比例。因此,血清PINP水平可作为检测骨胶原合成情况的指标。研究认为:PINP在众多的骨标志物中,更适合检测单一病人的抗骨吸收和骨形成治疗,特异性更好。同时PINP还用于对Paget,病和癌的骨转移、儿童生长迟缓及其它局部病变如:脑脊液、创伤分泌液、皮肤水泡、支气管肺泡积液的检验。

[0003] 目前,没有国产的I型胶原氨端肽化学发光检测试剂盒。市场上以芬兰的Orion公司的I型胶原氨端肽放射免疫分析药盒为主。放射免疫分析药盒存在放射性污染,标记物半衰期短,对操作者具有放射性损伤,且方法繁琐,耗时长并且价格昂贵等缺陷,限制了其今后的进一步发展。

发明内容

[0004] 本发明克服了进口试剂盒存在的放射性污染,价格偏高,步骤繁琐,不宜推广等问题,提供了一种无放射性污染,操作简便,性价比高,能一步定量检测人血清样品中的I型胶原氨端肽的化学发光免疫分析的试剂盒及其制备方法。

[0005] 本发明基于免疫反应和化学发光反应原理,能够检测人血清中I型胶原氨端肽含量,采用双抗体夹心模式。即使用2株抗I型胶原氨端肽单克隆抗体,其中一株单抗包被于化学发光微孔板,在微孔板各孔中分别加入标准品或血清样品后,再加入另一株辣根过氧化物酶标记的酶标单抗,温育后即形成固相抗体-抗原-酶标抗体复合物。充分洗涤后,洗去游离未结合成分,加入发光底物液,测定每孔发光值,以各标准品发光值的对数为纵坐标(Y轴),各标准品浓度的对数为横坐标(X轴)作图,得到标准曲线。样品中I型胶原氨端肽浓度与其发光值成正比,即可从标准曲线上查出相应浓度。

[0006] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的

[0007] 1、自行制备所述定量检测试剂盒中核心原料

[0008] 为了实现本发明,对试剂反应的核心原料进行了制备。制备过程包括浓校准品的制备,单克隆抗体的制备,酶标抗体的制备。

[0009] 2、确定所述定量检测试剂盒的组分及制备工艺,包括包被浓度的确定、酶稀释度的确定、校准品测定范围的确定等。

[0010] 本试剂盒所需缓冲液包含以下内容:

[0011] 1)、pH7.4的磷酸盐缓冲液,其是经以下重量份数比的原料配制:磷酸氢二钠

($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)5.8份,磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)0.6份,去离子水1000份。

[0012] 2)、pH7.4的四组分缓冲液,其是经以下重量份数比的原料配制:磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)2.9份,磷酸二氢钾(KH_2PO_4)0.2份,氯化钾(KCL)0.2份,生理盐水500份。

[0013] 3)、样品稀释液,其是经以下体积分数比的原料制成,新生牛血清1份,四组分缓冲液4份。

[0014] 本试剂盒提供的一种定量检测I型胶原氨端肽的试剂盒包括以下组分:

[0015] 1)、预包被抗I型胶原氨端肽单克隆抗体的96孔板(包被板);

[0016] 2)、I型胶原氨端肽抗原校准品(共6瓶)(校准品);

[0017] 3)、辣根过氧化物酶标记的抗I型胶原氨端肽单克隆抗体酶结合物(酶结合物);

[0018] 4)、发光底物液A、发光底物液B;

[0019] 5)、质控血清;

[0020] 6)、浓缩洗涤液(20 \times);

[0021] 3、所述定量检测人血清中I型胶原氨端肽的化学发光免疫分析的试剂盒,该试剂盒是按照以下步骤检测的:

[0022] 取出试剂盒和待测血清样品,平衡至室温。浓缩洗涤液用蒸馏水1:20稀释待用。

[0023] 1)、取出96孔板。标准曲线各孔分别加入浓度为0ng/ml,10ng/ml,20ng/ml,40ng/ml,80ng/ml,150ng/ml的标准液各20 μl ,或待测血清样品20 μl ,然后每孔加入100 μl 经样品稀释液稀释后的抗I型胶原氨端肽抗体酶结合物,37 $^\circ\text{C}$ 温育1小时;

[0024] 2)、甩干孔内混合物,用稀释后的浓缩洗涤液注满各孔,静置20秒左右,吸去或甩干孔内液体,重复5次,最后在吸水纸上拍干;

[0025] 3)、每孔加入50 μl 发光底物液A和50 μl 发光底物液B,微量振荡器震荡10-20秒,室温避光反应5分钟后,用化学发光仪器检测各孔发光值;

[0026] 4)、使用Log-Log线性拟合方式进行数据处理。

[0027] 4、所述定量检测人血清中I型胶原氨端肽的化学发光免疫分析的试剂盒,其预包被抗I型胶原氨端肽单克隆抗体优选的包被浓度为4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。表1为包被浓度优选结果:

[0028] 表1

[0029]

包被浓度($\mu\text{l}/\text{ml}$)	1	2	4	8	16
S0发光值	195	271	474	670	1075
10ng/ml发光值	1135	3135	11985	13765	13965
S/S0	5.8	11.6	25.3	20.5	13.0

[0030] 对预包被抗I型胶原氨端肽单克隆抗体的包被浓度检测,应满足PINP抗原浓度为10ng/ml的发光值与S0发光值比值(S/S0)不低于2.0。结果表明,各包被浓度均能达到上述要求,证明所选用的抗I型胶原氨端肽单克隆抗体其免疫活性可以达到要求,可用于包被。其中包被浓度为4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 左右时,S/S0的比值最大。

[0031] 预包被抗I型胶原氨端肽单克隆抗体包被浓度为2、3、4、6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,在各板条中加入20 μl 校准品、100 μl 酶结合物,37 $^\circ\text{C}$ 温育1小时,充分洗涤去除游离组分后加入化学发光底物液,室温避光反应5分钟后用化学发光仪测定各孔发光值。检验结果见表2:

[0032] 表2

包被浓度		2 μ g/ml	3 μ g/ml	4 μ g/ml	6 μ g/ml	
[0033]	校准品 ng/ml	0	376	431	489	588
		10	3151	9604	11510	13500
		20	8057	26719	30254	26035
		40	20650	69043	70456	76481
		80	38845	164149	174458	167726
		150	91353	370769	403144	440559
相关系数		0.9973	0.9993	0.9998	0.9975	
S1/S0		8.4	22.3	23.6	23	

[0034] 由表2看出,随着包被抗体浓度的增加,发光值随之缓慢增加,S1/S0值随之增大,灵敏度提高。在包被浓度达到3 μ g/ml以后基本达到包被饱和的平台期,当包被浓度4 μ g/ml时,其相关系数最好,S1/S0值最大。因此说明4 μ g/ml包被浓度是最适合的包被浓度。

[0035] 将预包被4 μ g/ml包被浓度的抗I型胶原氨端肽单克隆抗体包被板置37 $^{\circ}$ C 7天,与2-8 $^{\circ}$ C包被板同时检验。往这2种板条中加入20 μ l校准品、100 μ l酶结合物,置37 $^{\circ}$ C温育1小时,洗板后拍干,每孔加入发光底物液A和发光底物液B各50 μ l,室温避光反应5分钟后用化学发光仪测定各孔发光值。其稳定性检验结果见表3

[0036] 表3

包被板		2-8 $^{\circ}$ C	37 $^{\circ}$ C 7天	
[0037]	校准品 ng/ml	0	484	499
		10	10575	10433
		20	25893	30079
		40	77501	72655
		80	180037	164423
		150	413902	399408
相关系数		0.9992	0.9988	
S1/S0		21.9	20.9	

[0038] 由表3可知2-8 $^{\circ}$ C与37 $^{\circ}$ C的4 μ g/ml包被浓度的包被板发光值、S1/S0,相关系数未见明显差异,相关系数均大于0.9900,因此其稳定性达到要求。由上表得知预包被抗I型胶原氨端肽单克隆抗体优选的包被浓度为4 μ g/ml。

[0039] 其辣根过氧化物酶标记的抗I型胶原氨端肽抗体酶结合物优选的稀释度为1:60000左右;表4为酶结合物稀释度优选结果:

[0040] 表4

[0041]

稀释度	1:20000	1:40000	1:60000	1:80000	1:100000
S0发光值	3052	1930	560	475	385
10ng/ml发光值	36330	20460	12345	9060	7195
S/S0	11.9	10.6	22.0	19.1	18.7

[0042] 将酶标抗体用样品稀释液稀释几个滴度:1:60000,1:70000,1:80000,取包被板条,每孔加入20 μ l校准品、100 μ l上述各酶结合物,置37 $^{\circ}$ C温育1小时,洗板后拍干,每孔加入发光底物液A和发光底物液B各50 μ l,室温避光反应5分钟后用化学发光仪测定各孔发光值。

结果如表5:

[0043] 表5

酶稀释度		1: 60000	1: 70000	1: 80000
[0044] 校准品 (ng/ml)	0	582	475	423
	10	12748	11301	9192
	20	26624	24558	24521
	40	69608	67021	52485
	80	159189	161186	145874
	150	432768	404563	375684
相关系数		0.9983	0.9993	0.9988
S1/S0		21.90	23.79	21.73

[0045] 由表5看出,随着酶标抗体滴度的增加,各标准点发光值随之下降,通过S1/S0的比值,我们可以看出1:70000时,该比值最大为23.79,相关系数也很好。选择1:70000作为使用浓度。

[0046] 将酶结合物放置37℃7天,与放置2-8℃酶结合物同时检验。往板条中加入20μI校准品、100μI酶结合物,置37℃温育1小时,洗板后拍干,每孔加入发光底物液A和发光底物液B各50μI,室温避光反应5分钟后用化学发光仪测定各孔发光值。其稳定性检验结果见表6

[0047] 表6

酶结合物		2-8℃	37℃ 7天
[0048] 校准品 ng/ml	0	473	482
	10	11594	9565
	20	27440	26758
	40	77984	70940
	80	189907	171498
	150	405598	377667
相关系数		0.9993	0.9991
S1/S0		24.5	19.8

[0049] 可见酶结合物置37℃7天很稳定,证明酶结合物制备工艺流程可以达到要求。其辣根过氧化物酶标记的抗I型胶原氨端肽抗体酶结合物优选的稀释度为1:70000。

[0050] 其校准品范围为10ng/ml至150ng/ml,表7为校准品测定范围优选结果:

[0051] 表7

首点 末点	2.5ng/ml	5ng/ml	10ng/ml	20ng/ml	40ng/ml
[0052] 40ng/ml	0.9975	-	-	-	-
80ng/ml	0.9976	0.9964	-	-	-
150ng/ml	0.9977	0.9971	0.9999	-	-
200ng/ml	0.9953	0.9940	0.9958	0.9928	-
300ng/ml	0.9908	0.9882	0.9882	0.9812	0.9645

[0053] 在试剂盒测定范围之内样品的发光值应与浓度呈良好的线性关系,剂量-反应曲线相关系数应达到0.9900以上。从表7看出相关系数达0.9900以上最大线性范围在2.5-

200ng/ml之间。正常人血清PINP范围小于66ng/ml。考虑正常人血清的浓度及相关疾病患者的浓度范围,再结合试剂本身线性范围的限制,综合考虑,本试剂盒测定范围定为10-150ng/ml。标准品设置为:0,10,20,40,80,150ng/ml六个浓度点。

[0054] 校准品稀释液配方同酶结合物稀释液。各校准品点设置为0,10,20,40,80,150ng/ml。

[0055] 将PINP校准品按照标示浓度和预设校准品的浓度点,用校准品稀释液稀释成校准品S1-S5点(10,20,40,80,150ng/ml),S0为校准品稀释液。用此校准品检测回收样本计算回收率,测定校准品曲线及准确性。在测定回收率时,将已知浓度,高、中、低三个水平的PINP样本(A)加入到血浆B中,所加入A与B之间的体积比例为1:9,配制成C,分别测量B和C,结果记为XB和XC,添加抗原的血清实测浓度与添加校准品稀释液的血清的测值之差与实际的抗原投入浓度(理论浓度)的比值为回收率,公式为:回收率=(XC×1-0.9×XB)/(A浓度×0.1)×100%。检验结果见表8

[0056] 表8

校准品浓度(ng/ml)	校准品发光值	样本	加入浓度(ng/ml)	实测浓度(ng/ml)	回收率
0	552	正常人血清	0	18.8	
10	10568	回收1	100	26.8	98.97%
20	25190	回收2	300	47.6	102.46%
40	63394	回收3	500	68.6	103.32%
80	159420				
150	403793				
相关系数	0.9997				

[0058] 将校准品置37℃7天,与2-8℃校准品同时检验。往板条中加入20μl校准品、100μl酶结合物,置37℃温育1小时,洗板后拍干,每孔加入发光底物液A和发光底物液B各50μl,室温避光反应5分钟后用化学发光仪测定各孔发光值。检测结果如表9

[0059] 表9

校准品		2-8℃	37℃ 7天
校准品 ng/ml	0	489	608
	10	11121	12941
	20	28362	28388
	40	76128	78463
	80	191180	182771
	150	411272	371080
相关系数		0.9996	0.9990
S1/S0		22.7	21.3

[0061] 由上述数据可以看出:校准品的曲线相关系数大于0.9900,平均回收率在90.0~110.0%范围内,37℃7天很稳定,证明校准品制备工艺流程可以达到要求。

[0062] 本试剂盒采用一步反应。选择两种加样模式进行检验,分别如下:

[0063] A. 50μl样本+50μl酶结合物

[0064] B. 20 μ I样本+100 μ I酶结合物

[0065] 按照这两种加样模式加入校准品和酶结合物,37 $^{\circ}$ C温育1小时,充分洗涤去除游离组分后加入化学发光底物液,测其发光强度。检验结果如表10:

[0066] 表10

加样模式		50ul 样本+50ul 酶结合物	20ul 样本+100ul 酶结合物
校准品 (ng/ml)	0	688	486
	10	16134	10022
	20	42868	27085
	40	73676	75271
	80	158893	174065
	150	261912	402278
相关系数		0.9945	0.9992
S1/S0		23.45	20.62
S5/S4		1.65	2.31

[0068] 两种模式相关系数都较好,灵敏度都满足要求。A模式比B模式S5与S4比值略低,表现为线性宽度略窄。低样本加样量会有助于加宽线性范围,另一方面可以减少病人血样的使用量,从而节约血量进行其他项目的检测。综合考虑,选择B模式20 μ I校准品(样本)+100 μ I酶结合物作为本试剂盒加样模式。

附图说明

[0069] 图1 PINP定量检测试剂盒标准曲线图

[0070] 图2 PINP定量检测试剂盒测定范围结果图

[0071] 图3 PINP定量检测试剂盒与国外放免药盒检测血样相关性图

具体实施方式

[0072] 下面结合附图,详细说明本发明的实施操作,但本发明请求保护的技术方案不受限于下述实施方式,在不改变其要点的情况下,可做各种改变进行实施。其中实施例中使用的试剂,如果没有特别说明,在满足实验要求的情况下,均购自试剂公司。

[0073] 主要试剂及原料

[0074] 1、I型胶原氨端肽浓校准品(自行制备)

[0075] 2、抗I型胶原氨端肽单克隆抗体(自行制备)

[0076] 3、辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗I型胶原氨端肽单克隆抗体(自行制备)

[0077] 实施例1I型胶原氨端肽浓校准品的制备

[0078] 1、取癌性病人腹水2升,10000RPM离心,取上清。

[0079] 2、采用硫酸铵分级沉淀法。先加入40%的硫酸铵后搅拌过夜,10000RPM离心,弃沉淀;上清继续加硫酸铵至60%,10000RPM离心,留沉淀。沉淀用Buffer A溶解、透析,每隔12小时换液,透析两天,。其中Buffer A的配方为20mM Tris,1mM EDTA,50mM NaCl,pH7.4;透析液配方为20mM Tris,1mM EDTA,50mM NaCl,pH7.4。

[0080] 3、透析好的样品10000RPM离心,留上清。上清用盐酸调溶液的pH值为6.2,搅拌4小

时,10000RPM离心,留沉淀;沉淀用生理盐水溶解后,用Buffer A透析过夜,取透析好的样品,10000RPM离心,留上清。

[0081] 4、采用柱层析法:经过Buffer A透析的样品上阴离子交换柱Q-SepHaroseFF,用Buffer A和Buffer B(20mM Tris,1mM EDTA,1M NaCl)进行梯度洗脱,收集40~60%Buffer B部分洗脱液;收集物用Buffer C(0.1MHAC-NaAC,PH4.4)透析,之后上阳离子交换柱CM-SepHaroseFF,用Buffer C和Buffer A进行梯度洗脱,收集20~50%Buffer A馏分,浓缩成5mg/ml。取200 μ l上superdex200分子筛层析,收集35KD位置的峰,浓缩成1mg/ml,加入0.1%叠氮钠,1mM PMSF即得到I型胶原氨端肽浓校准品。

[0082] 实施例2抗I型胶原氨端肽单克隆抗体的制备

[0083] 1、将I型胶原氨端肽与佐剂混合腹腔注射BALB/C小鼠3次,每次间隔3周,取小鼠静脉血测免疫效价;取效价高的小鼠尾静脉注射加强免疫一次,三天后取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞在聚乙二醇作用下细胞融合,一周后取细胞生长孔上清经ELISA测抗体分泌情况,将阳性分泌孔扩大培养。注射入BALB/C小鼠腹腔内,8-10天收集腹水。离心取腹水上清。

[0084] 2、量取腹水,加入2倍体积0.06M pH4.8乙酸盐缓冲液,每毫升腹水加入正辛酸35 μ l,室温搅拌30分钟,12000RPM离心30分钟。取上清,调pH7.4,加入45%体积饱和硫酸铵溶液,在4 $^{\circ}$ C下搅拌60分钟,12000RPM离心20分钟,取沉淀溶于0.02M、pH7.4磷酸盐缓冲中,对0.02M、pH7.4磷酸盐缓冲液透析,换液5次。收集透析单抗溶液,测定蛋白浓度即得到抗I型胶原氨端肽单克隆抗体。

[0085] 预包被抗I型胶原氨端肽单克隆抗体的96孔板的制备

[0086] 1、将抗I型胶原氨端肽单克隆抗体用pH7.4的磷酸盐缓冲液(磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)5.8份,磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)0.6份,去离子水1000份)稀释至4 μ g/ml。

[0087] 2、每孔加稀释后的抗体液0.1ml,4 $^{\circ}$ C过夜包被。

[0088] 3、甩干包被液,每孔加含0.5%BSA的封闭液封闭,每孔加封闭液0.15ml,4 $^{\circ}$ C过夜封闭。

[0089] 4、甩干封闭液,在干燥间干燥24~26小时,保存备用。

[0090] 实施例3辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗I型胶原氨端肽单克隆抗体的制备

[0091] 1、HRP与抗体的连接选用改良过碘酸钠氧化法。此方法是在pH5左右的条件下,用高碘酸钠直接将HRP分子上的羟基氧化成醛基形成醛化酶,加入乙二醇以中和 NaIO_4 。此醛基与抗体分子的氨基形成schiff碱,再加入 NaBH_4 还原,形成稳定的酶-抗体结合物。

[0092] 2、称取5mg HRP溶解于1.2ml 0.2mol/L pH5.6HAC-NaAC缓冲液中,逐滴加入0.1mol/L NaIO_4 0.5ml,2~8 $^{\circ}$ C搅拌反应1小时,加入0.8mol/L乙二醇0.2ml,2~8 $^{\circ}$ C搅拌反应半小时,对0.001mol/L pH4.2HAC-NaAC透析过夜,换液一次。取标记用抗体10mg,与醛化酶混合,用pH9.51.0mol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液调pH至9.0~9.5,2~8 $^{\circ}$ C搅拌反应3小时,加入 NaBH_4 ,使终浓度大约为1mg/ml,2~8 $^{\circ}$ C搅拌反应1小时,对pH7.40.01mol/LPB透析过夜,换液一次,加入等体积饱和硫酸铵溶液,2~8 $^{\circ}$ C搅拌反应半小时,放置半小时,7000RPM离心30分钟,去上清,将沉淀溶于适量(约1ml)pH7.40.01mol/LPB中,对pH7.40.01mol/L PB充分透析2~3天,期间换液4~6次,得到的即为辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗I型胶原氨端肽单克隆抗体。

[0093] 实施例4标准曲线的建立

[0094] 1、将I型胶原氨端肽浓校准品用样品稀释液稀释成各个校准点,分别是10ng/ml, 20ng/ml, 40ng/ml, 80ng/ml, 150ng/ml。

[0095] 2、以I型胶原氨端肽各校准品浓度的LOG值为横坐标,以其对应发光值的LOG值为纵坐标,在线性坐标轴上建立标准曲线。结果见图1所示。

[0096] 实施例5试剂盒性能指标

[0097] 1、灵敏度

[0098] 重复测定20孔零标准点,计算出试剂盒的灵敏度为0.4ng/ml

[0099] 2、准确性

[0100] 在测定回收率时,将已知浓度,高、中、低三个水平的PINP样本(A)加入到血浆B中,所加入A与B之间的体积比例为1:9,配制成C,分别测量B和C,结果记为XB和XC,添加抗原的血清实测浓度与添加校准品稀释液的血清的测值之差与实际的抗原投入浓度(理论浓度)的比值为回收率,公式为:回收率=(XC×1-0.9×XB)/(A浓度×0.1)×100%。

[0101] 包被板中加入20μI校准品及20μI上述各样本、100μI酶结合物,置37℃温育1小时,洗板后拍干,每孔加入发光底物液A和发光底物液B各50μI,室温避光反应5min后用化学发光仪测定各孔发光值,以Log-Log模式进行拟合,计算各样本测值。回收率=(回收样本实测浓度-未添加抗原的血清实测浓度)/实际的抗原加入浓度(理论浓度)。结果见表11:

[0102] 表11

校准品浓度 (ng/ml)	校准品发光值	样本	加入浓度 (ng/ml)	实测浓度 (ng/ml)	回收率
0	505	正常人血清	0	14.3	
10	10779	回收 1	100	22.8	98.91%
20	27055	回收 2	300	42.9	100.07%
40	63322	回收 3	500	64.1	102.43%
80	157201				
150	397646				
相关系数	0.9996				

[0104] 3、精密度

[0105] 包被板中加入20μI校准品,质控1、质控2各加10孔,再加入100μI酶结合物,置37℃温育1小时,洗板后拍干,每孔加入发光底物液A和发光底物液B各50μI,室温避光反应5min后用化学发光仪测定各孔发光值,根据各校准点发光值及相应浓度作Log-Log拟合,由拟合方程计算质控血清各孔的测值,计算质控浓度的平均值和标准差(SD),变异系数(CV)=标准差/平均值。结果见表12。

[0106] 表12

[0107]	校准品及质控(ng/ml)	校准品发光值		质控 1 测值	19.73	22.22
	0	497			21.24	21.79
	10	11126			21.86	21.02
	20	27941			20.60	19.58
	40	76093			19.51	20.44
	80	191280			92.51	89.60
	150	401983		86.51	97.14	
	质控 1 发光值	27895	32680	质控 2 测值	99.16	93.58
		30760	31825		93.93	90.26
		31975	30350		89.43	101.61
		29530	27610		质控 1 平均值	20.80
		27470	29225	质控 2 平均值	93.37	
	质控 2 发光值	222305	212915	质控 1 标准差	0.99	
		203075	237470	质控 2 标准差	4.75	
		244180	225785	质控 1 变异系数	4.77%	
226945		215050	质控 2 变异系数	5.09%		
212380		252370				

[0108] 4、特异性

[0109] 包被板中加入20 μ I校准品、1000ng/ml的PIIINP交叉原和100 μ I酶结合物,置37 $^{\circ}$ C温育1小时,洗板后拍干,每孔加入发光底物液A和发光底物液B各50 μ I,室温避光反应5min后用化学发光仪测定各孔发光值,以Log-Log模式进行拟合,计算交叉原的测值,结果见表13:

[0110] 表13

校准品浓度 (ng/ml)	校准品发光值	交叉原发光值
0	504	901
10	11967	972
20	26452	交叉原实测浓度 (ng/ml)
40	66912	
80	166156	0.79
150	390152	0.90
相关系数	0.9997	

[0112] 所述定量检测人血清中I型胶原氨端肽的化学发光免疫分析试剂盒主要性能指标应达到的标准:

[0113] 灵敏度:不高于5ng/ml;

[0114] 准确性:试剂盒回收率应在85.0~115.0%范围内;

[0115] 精密度(CV%):不高于15.0%;

[0116] 分析特异性:对主要交叉反应物1000ng/ml PIIINP交叉反应值 \leq 10ng/ml。

[0117] 实施例6与芬兰的Orion公司的I型胶原氨端肽放射免疫分析药盒进行比对

[0118] 采用本试剂盒和芬兰的Orion公司的I型胶原氨端肽放射免疫分析药盒对100例临床样本进行检测,测定结果见表14:

[0119] 表14

[0120]

样本号	Orion 公司 放免药盒	本试剂 盒
1#	19.42	18.46
2#	10.63	11.00
3#	20.04	19.60
4#	12.30	13.07
5#	26.91	28.65
6#	50.82	51.25
7#	52.60	50.51
8#	54.61	52.34
9#	40.14	40.98
10#	38.18	36.95
11#	10.53	10.11
12#	40.01	38.91
13#	31.13	30.49
14#	19.94	19.09
15#	11.79	12.05

样本号	Orion 公司 放免药盒	本试 剂盒
51#	58.67	59.67
52#	61.49	59.30
53#	38.56	37.80
54#	54.57	54.60
55#	51.40	44.70
56#	45.12	43.18
57#	62.63	61.68
58#	59.80	57.35
59#	38.70	40.44
60#	60.07	60.08
61#	21.22	21.14
62#	27.90	27.81
63#	13.63	13.32
64#	16.86	18.30
65#	25.30	26.31

[0121]	16#	15.46	14.80	66#	58.53	58.67
	17#	21.23	21.84	67#	17.04	18.50
	18#	29.72	29.87	68#	10.99	9.10
	19#	41.23	40.20	69#	30.06	29.83
	20#	26.90	28.60	70#	20.63	20.89
	21#	38.45	38.90	71#	23.42	27.10
	22#	60.41	59.10	72#	28.90	25.09
	23#	27.99	31.50	73#	25.12	23.54
	24#	58.78	57.80	74#	46.42	46.01
	25#	28.22	28.90	75#	65.25	65.55
	26#	25.02	23.20	76#	62.21	60.27
	27#	34.55	38.70	77#	11.86	15.60
	28#	33.45	36.20	78#	56.01	55.23
	29#	30.72	32.00	79#	59.48	51.70
	30#	40.33	42.70	80#	57.09	57.27
	31#	42.92	43.70	81#	24.10	15.31
	32#	42.03	40.60	82#	12.71	13.97
	33#	42.54	41.25	83#	49.98	48.33
	34#	59.53	59.64	84#	65.68	65.50
	35#	55.83	58.51	85#	20.43	16.40
	36#	38.94	37.56	86#	24.10	25.86
	37#	47.00	48.99	87#	22.50	25.60
	38#	45.49	45.82	88#	54.80	60.83
	39#	26.09	25.54	89#	19.35	19.31
	40#	14.20	15.39	90#	57.24	57.34
	41#	51.60	53.82	91#	87.27	85.96
	42#	62.72	61.94	92#	90.19	88.21
	43#	24.47	26.18	93#	82.50	81.05
	44#	13.33	11.32	94#	95.85	94.26
	45#	38.46	40.90	95#	88.78	90.10
	46#	18.68	18.21	96#	89.81	88.38
	47#	56.57	55.01	97#	100.82	99.33
	48#	14.49	16.09	98#	88.44	88.11
	49#	14.23	16.92	99#	87.92	82.70
	50#	46.75	45.75	100#	97.50	94.32

[0122] 本次临床对比试验选取100例临床样本,其中91-100号为PINP阳性样本,其余样本为正常临床样本。如表14所示数据,将本试剂盒与国外放免试剂盒的检测结果进行直线拟合,线性方程为 $y=0.973x+0.863$,相关系数 $R=0.995$ 。可见本发明提供的检测试剂盒与国外的放免试剂盒的测定结果大体上有较好的一致性。

[0123] 同时,相比于国外放免试剂盒,本发明提供的试剂盒的稳定性好,操作简便,成本低廉,并且使用安全性高,具有更好的环保性等优点。

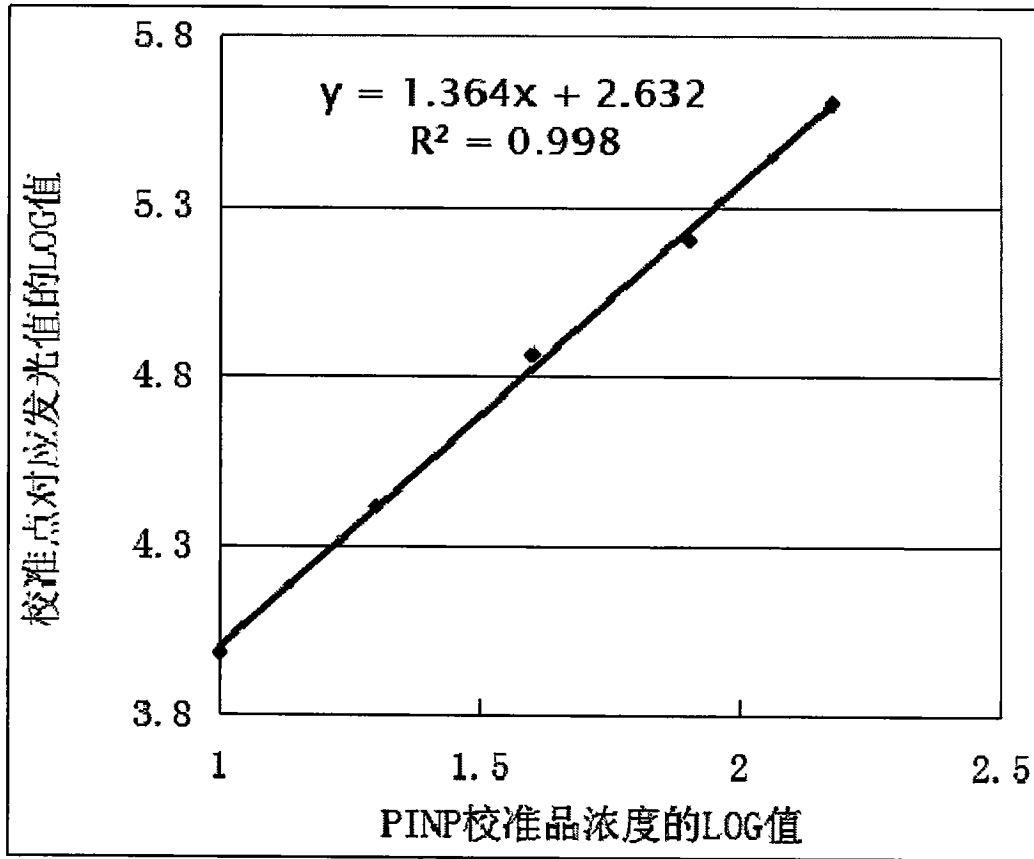


图1

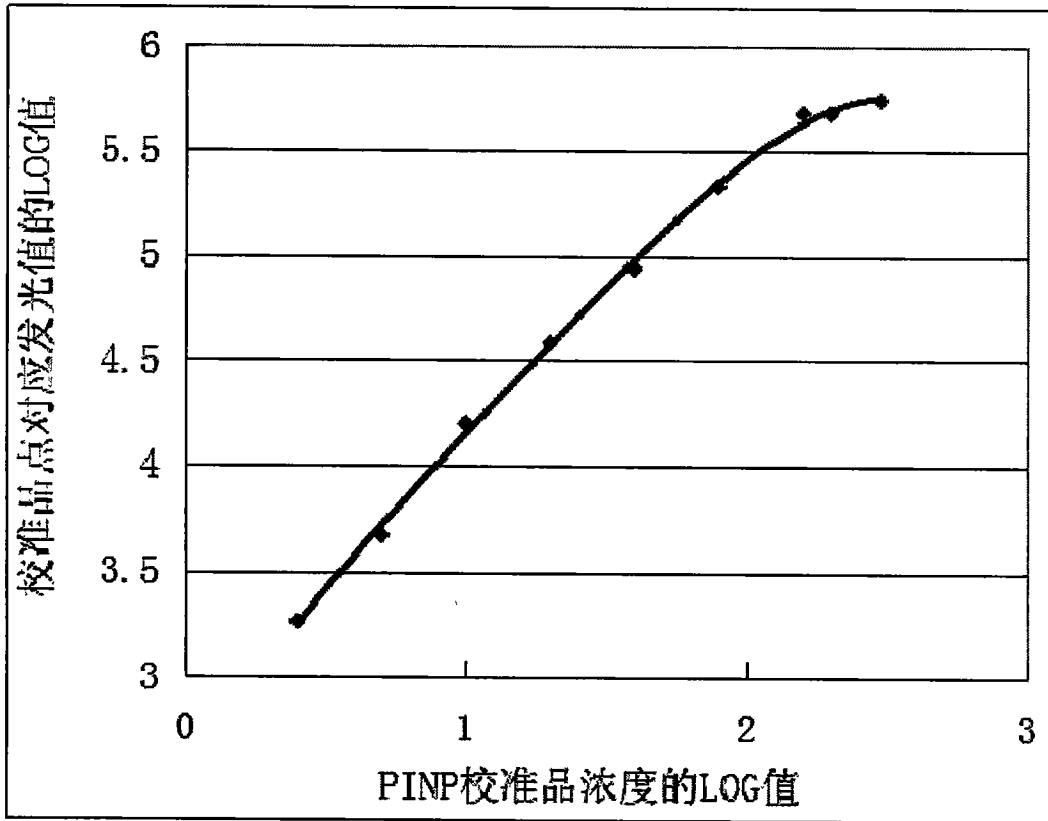


图2

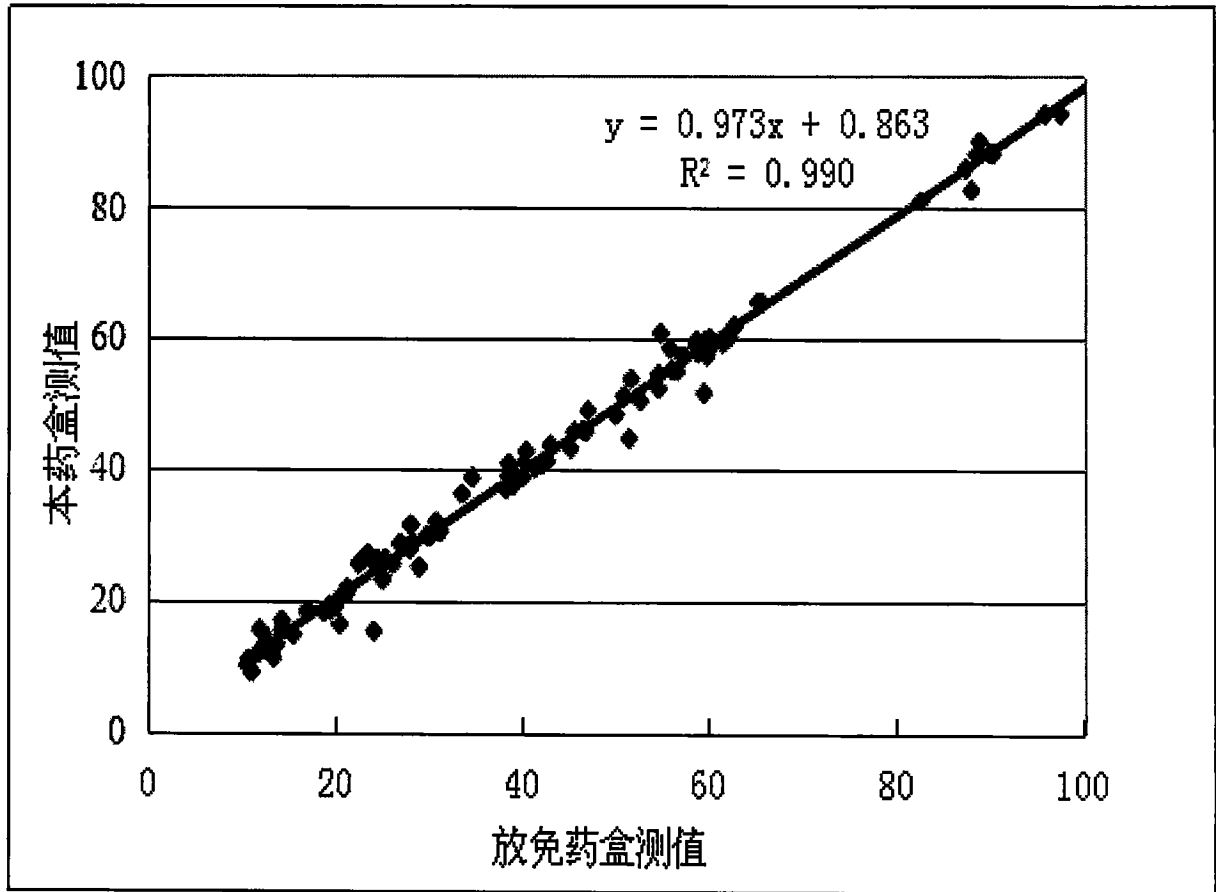


图3

专利名称(译)	I型胶原氨端肽定量检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN105866415A	公开(公告)日	2016-08-17
申请号	CN201610325808.6	申请日	2016-05-18
[标]申请(专利权)人(译)	北京北方生物技术研究所		
申请(专利权)人(译)	北京北方生物技术研究所有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京北方生物技术研究所有限公司		
[标]发明人	李军 赵玉军 曾玲 于爽 白云鹏 申海燕 陈震 姚兰忠		
发明人	李军 赵玉军 曾玲 于爽 白云鹏 申海燕 陈震 姚兰忠		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/53 G01N33/535 G01N33/543 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/577 G01N21/76 G01N33/53 G01N33/535 G01N33/543 G01N2333/435		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于检测I型胶原氨端肽的化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法，所述试剂盒包括预包被抗I型胶原氨端肽单克隆抗体的96孔板；I型胶原氨端肽抗原校准品；辣根过氧化物酶标记的抗I型胶原氨端肽抗体酶结合物；发光底物鲁米诺发光液；浓缩洗涤液和质控血清。本发明克服进口试剂盒存在的问题，解决进一步推广应用的需求，而提供一种无放射性污染，操作简便，性价比高，能一次检测大量样品的I型胶原氨端肽定量检测试剂盒及其制备方法。

