



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106841597 A

(43)申请公布日 2017.06.13

(21)申请号 201710171777.8

(22)申请日 2017.03.22

(71)申请人 苏州普瑞斯生物科技有限公司

地址 215000 江苏省苏州市高新区锦峰路8号

(72)发明人 吴朝晖

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

涎液化糖链抗原测定试剂及其制备方法

(57)摘要

本发明揭示了一种涎液化糖链抗原测定试剂,包括预处理试剂、抗体胶乳试剂、校准试剂;所述预处理试剂包括缓冲剂、信号增强剂、防腐剂,所述预处理试剂的PH值为7.2-7.6;所述抗体胶乳试剂包括缓冲剂、结合有抗人涎液化糖链抗原抗体的胶乳微球、稳定剂,所述胶乳微球直径为100-400nm;所述校准试剂包括定量的涎液化糖链抗原。本发明还揭示了一种涎液化糖链抗原测定试剂的制备方法。本发明通过抗人涎液化糖链抗原抗体与胶乳微球结合,可采用胶乳增强免疫比浊法来测定人体血清中KL-6的含量,该试剂操作简便,准确度高,重复性好,适于高通量检测,能够在全自动生化分析仪上使用,与酶免定量方法测定的结果有很好的符合性。

1. 一种涎液化糖链抗原测定试剂,其特征在于,包括预处理试剂、抗体胶乳试剂、校准试剂;

所述预处理试剂包括缓冲剂、信号增强剂、防腐剂,所述预处理试剂的PH值为7.2-7.6;

所述抗体胶乳试剂包括缓冲剂、结合有抗人涎液化糖链抗原抗体的胶乳微球、稳定剂,所述胶乳微球直径为100-400nm;

所述校准试剂包括定量的涎液化糖链抗原。

2. 根据权利要求1所述的涎液化糖链抗原测定试剂,其特征在于,所述预处理试剂中的缓冲剂为磷酸盐、三羟甲基氨基甲烷、甘氨酸、4-羟乙基哌嗪乙磺酸中的一种,信号增强剂为聚乙二醇10000、氟化钠中的一种。

3. 根据权利要求1所述的涎液化糖链抗原测定试剂,其特征在于,所述抗体胶乳试剂中与胶乳微球结合的抗人涎液化糖链抗原抗体为鼠抗人涎液化糖链抗原单克隆抗体、羊抗人涎液化糖链抗原单克隆抗体、兔抗人涎液化糖链抗原单克隆抗体中至少一种,或者是鼠抗人涎液化糖链抗原多克隆抗体、羊抗人涎液化糖链抗原多克隆抗体、兔抗人涎液化糖链抗原多克隆抗体中至少一种。

4. 根据权利要求1所述的涎液化糖链抗原测定试剂,其特征在于,所述抗体胶乳试剂中的稳定剂为环糊精、酪蛋白、抗坏血酸中的一种或多种。

5. 一种涎液化糖链抗原测定试剂的制备方法,其特征在于,分别制备预处理试剂、抗体胶乳试剂、校准试剂;

所述预处理试剂的制备方法包括以下步骤:将缓冲剂、信号增强剂、防腐剂、无机盐与水混合调配为PH值为7.2-7.6的溶液即得;

所述抗体胶乳试剂的制备方法依次包括以下步骤:

S1、将抗人涎液化糖链抗原抗体在PH8.0-9.0的碳酸氢钠缓冲溶液中,于2-8摄氏度进行至少两次透析,以除去干扰标记反应的杂质;

S2、将透析后的抗人涎液化糖链抗原抗体溶液用pH9.0-9.5的磷酸盐缓冲液稀释到1-2mg/ml,加入适量的荧光素,在25摄氏度持续、轻微混合1小时,进行标记反应以制得荧光素化抗人涎液化糖链抗原抗体溶液;

S3、将步骤S2所得溶液在pH7.5-8.0的磷酸盐缓冲液中,于2-8摄氏度进行至少两次透析,除去未反应的荧光素;

S4、将透析后的荧光素化抗人涎液化糖链抗原抗体溶液与适量的结合有抗荧光素抗体的胶乳微球溶液混合,在25摄氏度持续、轻微混合1小时,并加入稳定剂即得;

所述校准试剂的制备方法包括以下步骤:使用稀释液将涎液化糖链抗原稀释到所需浓度即得。

6. 根据权利要求5所述的涎液化糖链抗原测定试剂的制备方法,其特征在于,所述抗体胶乳试剂的制备步骤S2中的荧光素为活化荧光素,用超纯水溶解后直接进行标记反应。

7. 根据权利要求5所述的涎液化糖链抗原测定试剂的制备方法,其特征在于,所述抗体胶乳试剂的制备步骤S4中稳定剂为环糊精、酪蛋白、抗坏血酸中的一种或多种。

8. 根据权利要求5所述的涎液化糖链抗原测定试剂的制备方法,其特征在于,所述抗体胶乳试剂的制备步骤S4中的胶乳微球为单一的粒径,或由不同粒径大小的胶乳微球混合而成。

涎液化糖链抗原测定试剂及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种可采用胶乳增强免疫比浊法测定人血清中涎液化糖链抗原含量的涎液化糖链抗原测定试剂及其制备方法。

背景技术

[0002] KL-6(涎液化糖链抗原)属cluster9MUC1类,相对分子量接近200000的糖蛋白。主要由增殖、再生的或受损的肺泡Ⅱ型上皮细胞分泌,在正常肺组织中,KL-6在Ⅱ型肺泡细胞,呼吸性细支气管上皮细胞和支气管腺浆液细胞上表达。

[0003] 当机体肺泡上皮细胞遭受一定程度的损伤时,一方面,Ⅱ型肺泡上皮细胞增生并激活,对KL-6的分泌快速增加;另一方面肺间质基底膜通透性增加,使KL-6开始向血液循环扩散,血清KL-6水平也出现一定程度的升高。

[0004] 间质性肺炎,尤其是活动性高的病例,血清KL-6尤呈高值。健康者和无间质性肺炎、肺纤维化的呼吸系统疾病则呈低值。

[0005] KL-6是检测间质性肺炎的全新血清生物标记物(高灵敏度和高特异度),是诊断、监测和预后的有用指标,可评估间质性肺疾病的活动性,可预测ILDs的临床转归,可提供有价值的解决方案。

[0006] KL-6的检测

[0007] KL-6是一种相对稳定的蛋白质,在-20℃下标本可以长期保存。目前有层析定性和酶免定量的检测方法可用,层析定性仅能在样本浓度超过检测限后简单确定有无,无法准确定量,不能反映病情的轻重程度及对病情进行及早的发现和治理,而且存在较大的假阴或假阳,酶免方法主要是被科学研究者应用于科研,由于各自进行检测试剂的制备,没有统一的配方及工艺,没有对检测条件深入研究,导致不同批次试剂检测结果差异较大。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种涎液化糖链抗原测定试剂及其制备方法。

[0009] 为实现上述发明目的之一,本发明采用如下技术方案:

[0010] 一种涎液化糖链抗原测定试剂,包括预处理试剂、抗体胶乳试剂、校准试剂;

[0011] 所述预处理试剂包括缓冲剂、信号增强剂、防腐剂,所述预处理试剂的PH值为7.2-7.6;

[0012] 所述抗体胶乳试剂包括缓冲剂、结合有抗人涎液化糖链抗原抗体的胶乳微球、稳定剂,所述胶乳微球直径为100-400nm;

[0013] 所述校准试剂包括定量的涎液化糖链抗原。

[0014] 作为本发明进一步改进的技术方案,所述预处理试剂中的缓冲剂为磷酸盐、三羟甲基氨基甲烷、甘氨酸、4-羟乙基哌嗪乙磺酸中的一种,信号增强剂为聚乙二醇10000、氟化钠中的一种。

[0015] 作为本发明进一步改进的技术方案,所述抗体胶乳试剂中与胶乳微球结合的抗人

涎液化糖链抗原抗体为鼠抗人涎液化糖链抗原单克隆抗体、羊抗人涎液化糖链抗原单克隆抗体、兔抗人涎液化糖链抗原单克隆抗体中至少一种,或者是鼠抗人涎液化糖链抗原多克隆抗体、羊抗人涎液化糖链抗原多克隆抗体、兔抗人涎液化糖链抗原多克隆抗体中至少一种。

[0016] 作为本发明进一步改进的技术方案,所述抗体胶乳试剂中的稳定剂为环糊精、酪蛋白、抗坏血酸中的一种或多种。

[0017] 为实现上述另一发明目的,本发明采用如下技术方案:

[0018] 一种涎液化糖链抗原测定试剂的制备方法,分别制备预处理试剂、抗体胶乳试剂、校准试剂;

[0019] 所述预处理试剂的制备方法包括以下步骤:将缓冲剂、信号增强剂、防腐剂、无机盐与水混合调配为PH值为7.2-7.6的溶液即得;

[0020] 所述抗体胶乳试剂的制备方法依次包括以下步骤:

[0021] S1、将抗人涎液化糖链抗原抗体在PH8.0-9.0的碳酸氢钠缓冲溶液中,于2-8摄氏度进行至少两次透析,以除去干扰标记反应的杂质;

[0022] S2、将透析后的抗人涎液化糖链抗原抗体溶液用pH9.0-9.5的磷酸盐缓冲液稀释到1-2mg/ml,加入适量的荧光素,在25摄氏度持续、轻微混合1小时,进行标记反应以制得荧光素化抗人涎液化糖链抗原抗体溶液;

[0023] S3、将步骤S2所得溶液在pH7.5-8.0的磷酸盐缓冲液中,于2-8摄氏度进行至少两次透析,除去未反应的荧光素;

[0024] S4、将透析后的荧光素化抗人涎液化糖链抗原抗体溶液与适量的结合有抗荧光素抗体的胶乳微球溶液混合,在25摄氏度持续、轻微混合1小时,并加入稳定剂即得;

[0025] 所述校准试剂的制备方法包括以下步骤:使用稀释液将涎液化糖链抗原稀释到所需浓度即得。

[0026] 作为本发明进一步改进的技术方案,所述抗体胶乳试剂的制备步骤S2中的荧光素为活化荧光素,用超纯水溶解后直接进行标记反应。

[0027] 作为本发明进一步改进的技术方案,所述抗体胶乳试剂的制备步骤S4中稳定剂为环糊精、酪蛋白、抗坏血酸中的一种或多种。

[0028] 作为本发明进一步改进的技术方案,所述抗体胶乳试剂的制备步骤S4中的胶乳微球为单一的粒径,或由不同粒径大小的胶乳微球混合而成。

[0029] 相对于现有技术,本发明的技术效果在于:

[0030] 本发明通过抗人涎液化糖链抗原抗体与胶乳微球结合,可采用胶乳增强免疫比浊法来测定人体血清中KL-6的含量,该试剂操作简便,准确度高,重复性好,适于高通量检测,能够在全自动生化分析仪上使用,与酶免定量方法测定的结果有很好的符合性。

具体实施方式

[0031] 以下将结合具体实施方式对本发明进行详细描述。但这些实施方式并不限制本发明,本领域的普通技术人员根据这些实施方式所做出的结构、方法、或功能上的变换均包含在本发明的保护范围内。

[0032] 本发明提供了一种涎液化糖链抗原测定试剂,包括预处理试剂、抗体胶乳试剂、校

准试剂；

[0033] 所述预处理试剂包括缓冲剂、信号增强剂、防腐剂，所述预处理试剂的PH值为7.2-7.6；

[0034] 所述抗体胶乳试剂包括缓冲剂、结合有抗人涎液化糖链抗原抗体的胶乳微球、稳定剂，所述胶乳微球直径为100-400nm；

[0035] 所述校准试剂包括定量的涎液化糖链抗原。

[0036] 进一步的，所述预处理试剂中的缓冲剂为磷酸盐、三羟甲基氨基甲烷、甘氨酸、4-羟乙基哌嗪乙磺酸中的一种，信号增强剂为聚乙二醇10000、氯化钠中的一种。

[0037] 进一步的，所述抗体胶乳试剂中与胶乳微球结合的抗人涎液化糖链抗原抗体为鼠抗人涎液化糖链抗原单克隆抗体、羊抗人涎液化糖链抗原单克隆抗体、兔抗人涎液化糖链抗原单克隆抗体中至少一种，或者是鼠抗人涎液化糖链抗原多克隆抗体、羊抗人涎液化糖链抗原多克隆抗体、兔抗人涎液化糖链抗原多克隆抗体中至少一种。

[0038] 进一步的，所述抗体胶乳试剂中的稳定剂为环糊精、酪蛋白、抗坏血酸中的一种或多种。

[0039] 本发明还提供了一种涎液化糖链抗原测定试剂的制备方法，分别制备预处理试剂、抗体胶乳试剂、校准试剂；

[0040] 所述预处理试剂的制备方法包括以下步骤：将缓冲剂、信号增强剂、防腐剂、无机盐与水混合调配为PH值为7.2-7.6的溶液即得；

[0041] 所述抗体胶乳试剂的制备方法依次包括以下步骤：

[0042] S1、将抗人涎液化糖链抗原抗体在PH8.0-9.0的碳酸氢钠缓冲溶液中，于2-8摄氏度进行至少两次透析，以除去干扰标记反应的杂质；

[0043] S2、将透析后的抗人涎液化糖链抗原抗体溶液用pH9.0-9.5的磷酸盐缓冲液稀释到1-2mg/ml，加入适量的荧光素，在25摄氏度持续、轻微混合1小时，进行标记反应以制得荧光素化抗人涎液化糖链抗原抗体溶液；

[0044] S3、将步骤S2所得溶液在pH7.5-8.0的磷酸盐缓冲液中，于2-8摄氏度进行至少两次透析，除去未反应的荧光素；

[0045] S4、将透析后的荧光素化抗人涎液化糖链抗原抗体溶液与适量的结合有抗荧光素抗体的胶乳微球溶液混合，在25摄氏度持续、轻微混合1小时，并加入稳定剂即得；

[0046] 所述校准试剂的制备方法包括以下步骤：使用稀释液将涎液化糖链抗原稀释到所需浓度即得。

[0047] 抗体胶乳试剂的制备步骤S1、S3中采用的是低温多次透析方法，可以充分保证抗人涎液化糖链抗原抗体的生物活性。

[0048] 进一步的，所述抗体胶乳试剂的制备步骤S2中的荧光素为活化荧光素，用超纯水溶解后直接进行标记反应。

[0049] 进一步的，所述抗体胶乳试剂的制备步骤S4中稳定剂为环糊精、酪蛋白、抗坏血酸中的一种或多种。

[0050] 进一步的，所述抗体胶乳试剂的制备步骤S4中的胶乳微球为单一的粒径，或由不同粒径大小的胶乳微球混合而成。通过不同粒径的胶乳微球组合，可以使该涎液化糖链抗原测定试剂的性能达到更高灵敏度以及更宽线性范围。

[0051] 本发明进行样本中涎液化糖链抗原含量测定的原理是：利用抗原抗体反应，先加入预处理试剂，使样本中的涎液化糖链抗原的抗原位点暴露，当加入结合有抗人涎液化糖链抗原抗体的胶乳微球试剂即抗体胶乳试剂，使反应液中的抗原抗体交联反应形成抗原抗体复合物，使胶乳微球凝集，从而产生一定的浊度，样本中涎液化糖链抗原的含量在一定范围内与产生的浊度成正相关，再通过校准曲线进行计算，从而得到涎液化糖链抗原的含量。

[0052] 本发明与现有技术相比，具有如下特点：

[0053] 1) 本发明的涎液化糖链抗原测定试剂具有高的检测灵敏度，最低检测能够达到70.0U/ml，操作简便，快速，从检测到出结果最多只需要10分钟，甚至更短。

[0054] 2) 抗体胶乳试剂中的结合抗体的胶乳微球的制备通过FITC(荧光素)-抗FITC抗体桥架使抗体连接胶乳微球，这样有利于保证抗人涎液化糖链抗原抗体活性，对抗体功效无伤害，工艺简化，产率高，稳定性好，批间差异小，在2-8摄氏度至少可以保存一年。

[0055] 3) 本发明的涎液化糖链抗原测定试剂对样品中涎液化糖链抗原含量检测的数据经统计分析，与科研的酶免法无显著性差异，检测结果可靠，临床评价良好，可用于临床应用。

[0056] 以下结合一实施例对本发明进行说明

[0057] 实施例一

[0058] 一、制备抗体胶乳试剂

[0059] 将10mg抗人涎液化糖链抗原抗体在PH9.0的0.05mol/L, 1L碳酸氢钠缓冲溶液中，于2-8摄氏度进行3次透析，每次1小时，除去防腐剂等干扰标记反应的杂质。

[0060] 将透析后的抗体溶液用pH9.0的0.05mol/L磷酸盐缓冲液稀释到1mg/ml，用1ml超纯水溶解1mg活化荧光素FITC，加入到抗体溶液中，在25摄氏度持续、轻微混合1小时进行标记反应。

[0061] 将荧光素化抗人涎液化糖链抗原抗体溶液在pH7.5, 0.05mol/L, 5L磷酸盐缓冲液中于2-8摄氏度进行3次透析，除去未反应的荧光素。

[0062] 将透析后的荧光素化抗体用pH7.5, 0.01mol/L磷酸盐缓冲液稀释到0.2mg/ml与等体积的0.1%的结合有抗FITC抗体胶乳微球溶液混合，在25摄氏度持续、轻微混合1小时后，加入0.1g环糊精，0.1g酪蛋白，1g抗坏血酸溶解并混合均匀即得抗体胶乳试剂。

[0063] 二、制备预处理试剂

[0064] 配制0.01mol/L, pH7.4, 含聚乙二醇10000 20g/L, 氯化钠9g/L, proclin3000.1%的磷酸盐缓冲液即得。

[0065] 三、制备校准试剂

[0066] 配制0.05mol/L, pH7.4, 含环糊精1g/L, 酪蛋白1g/L, 抗坏血酸10g/L, 氯化钠8g/L, proclin300 0.1%的磷酸盐缓冲液即得稀释液。

[0067] 按照需要的涎液化糖链抗原参考校准试剂浓度将纯化过的重组涎液化糖链抗原用稀释液稀释到所需浓度即得。

[0068] 以下对涎液化糖链抗原测定试剂的测定方法进行说明

[0069] 校准试剂浓度：10000U/ml、5000U/ml、2500U/ml、1250U/ml、625U/ml、0U/ml；

[0070] 测定波长：570nm；

[0071] 预处理试剂：抗体胶乳试剂：样本=150 μ l：50 μ l：3 μ l；

[0072] 校准方式:spline。

[0073] 检测过程:预处理试剂与样本加入,反应5分钟,然后加入抗体胶乳试剂后20秒,读取反应液吸光度A1,加入抗体胶乳试剂后5分钟,再读取反应液吸光度A2,计算吸光度的变化 $\Delta A=A2-A1$ 。

[0074] 用校准试剂浓度做横轴, ΔA 做纵轴,建立校准曲线。未知样本的浓度通过其反应的 ΔA 从校准曲线计算得到。

[0075] 以下对本发明涎液化糖链抗原测定试剂的性能指标进行说明

[0076] 1.空白检测限测定

[0077] 用涎液化糖链抗原测定试剂对空白样本(校准试剂稀释液)重复测定20次,空白检测限浓度为均值浓度加上二个标准差,得到空白检测限浓度要求 $\leq 10U/ml$ 。

[0078] 2.线性范围70-10000U/ml。

[0079] 3.与酶联免疫方法的试剂盒测定结果的相关性。

[0080] 通过测定100例标本(样本浓度在70-10000U/ml范围内均匀分布)本试剂制备的试剂盒与酶联免疫方法的试剂盒的相关系数 $R^2=0.977$,相关方程为: $Y=0.973X-17.26$ 。

[0081] 其中,X为本试剂的检测值,Y为酶免方法检测值。

[0082] 4.精密度

[0083] 同一试剂检测同一样本10次,用10次测值的标准差除以平均值即重复性变异系数, $\leq 5\%$ 。

[0084] 最后应说明的是:以上实施方式仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施方式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方式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;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施方式技术方案的精神和范围。

专利名称(译)	涎液化糖链抗原测定试剂及其制备方法		
公开(公告)号	CN106841597A	公开(公告)日	2017-06-13
申请号	CN201710171777.8	申请日	2017-03-22
[标]发明人	吴朝晖		
发明人	吴朝晖		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明揭示了一种涎液化糖链抗原测定试剂，包括预处理试剂、抗体胶乳试剂、校准试剂；所述预处理试剂包括缓冲剂、信号增强剂、防腐剂，所述预处理试剂的PH值为7.2-7.6；所述抗体胶乳试剂包括缓冲剂、结合有抗人涎液化糖链抗原抗体的胶乳微球、稳定剂，所述胶乳微球直径为100-400nm；所述校准试剂包括定量的涎液化糖链抗原。本发明还揭示了一种涎液化糖链抗原测定试剂的制备方法。本发明通过抗人涎液化糖链抗原抗体与胶乳微球结合，可采用胶乳增强免疫比浊法来测定人体血清中KL-6的含量，该试剂操作简便，准确度高，重复性好，适于高通量检测，能够在全自动生化分析仪上使用，与酶免定量方法测定的结果有很好的符合性。