



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109507323 A

(43)申请公布日 2019.03.22

(21)申请号 201811496455.1

(22)申请日 2018.12.07

(71)申请人 上海浩港生物技术有限公司

地址 200120 上海市浦东新区芙蓉花路500
弄2号楼1-2层

(72)发明人 董学渊 蒋林彬

(74)专利代理机构 北京华智则铭知识产权代理
有限公司 11573

代理人 陈向敏

(51)Int.Cl.

G01N 30/02(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒

(57)摘要

本发明属于试剂盒技术领域,公开了一种用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒,用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒包括:30倍浓缩洗涤液、酶标试剂、酶标包被板、样品稀释液、显色剂A、显色剂B、终止液、标准品、标准品稀释液、质谱仪;本发明通过采用高特异性引物和适宜方法的组合,能够实现快速、简便、准确、高效、实用、经济的检测LBP基因标签SNP基因型,可用于LBP基因在疾病遗传易感性的关联研究,利于LBP基因标签SNP检测预测疾病的发生、发展风险;同时,提供的稀释液检测结果精确可靠,分散效果良好,可长期稳定保存,并且可通用于不同的临床免疫诊断项目的血清或血浆样本稀释液,对于临床医学诊断具有重要意义。



1. 一种用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒,其特征在于,所述用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒包括:

30倍浓缩洗涤液、酶标试剂、酶标包被板、样品稀释液、显色剂A、显色剂B、终止液、标准品、标准品稀释液、质谱仪;

终止液为HCl和H₂SO₄;

显色剂A由:PBS缓冲液,柠檬酸,ED-TA乙二氨四乙酸,ProcLin-300,过氧化氢(过氧化氢挥发性太高,容易丢失,我们现在正用过氧化脲来代替,效果还不错)组成;

显色剂B由:PBS缓冲液,柠檬酸,ED-TA乙二氨四乙酸,ProcLin-300,硫代硫酸钠等。

2. 如权利要求1所述用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒,其特征在于,所述用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒检测方法如下:

步骤一,标准品加入标准品稀释液进行稀释;

步骤二,加样;

分别设空白孔(空白对照孔不加样品及酶标试剂,其余各步操作相同)、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样50μl,待测样品孔中先加样品稀释液40μl,然后再加待测样品10μl(样品最终稀释度为5倍)。加样将样品加于酶标板孔底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀;

步骤三,用封板膜封板后置37℃温育30分钟;

步骤四,将30倍浓缩洗涤液用蒸馏水30倍稀释后备用;

步骤五,小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置30秒后弃去,如此重复5次,拍干;

步骤六,每孔加入酶标试剂50μl,空白孔除外;重复步骤三和步骤五操作;

步骤七,每孔先加入显色剂A50μl,再加入显色剂B50μl,轻轻震荡混匀,37℃避光显色15分钟;

步骤八,每孔加终止液50μl,终止反应(此时蓝色立转黄色);

步骤九,利用高效液相串联质谱仪对上述液体进行检测,得到血液中LBP色谱图,计算人类血液中LBP含量数据。

3. 如权利要求1所述用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒,其特征在于,所述LBP基因标签单核苷酸多态性位点的检测方法如下:

1) 特异性引物的设计

根据被证实的LBP基因标签单核苷酸多态性位点,设计特异性扩增引物和测序引物,其中,所述特异性扩增引物中的一条用生物素标记;

2) PCR扩增

以待测标本的DNA为模板,用步骤1)所述的特异性扩增引物进行PCR反应,得PCR扩增物;

3) 焦磷酸测序

将步骤2)所得PCR扩增物采用碱变性使其分开成单链,取其中被生物素标记的单链PCR扩增产物纯化后,与步骤1)所述测序引物进行杂交反应,并分析结果以判断所述待测标本的靶单核苷酸是否具备多态性。

4. 如权利要求1所述用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒,其特征在于,所述标

准品稀释液包括:缓冲溶液、白蛋白,所述白蛋白的含量为10~100g/L、碱金属氯化物、任选的乳化剂;并且所述稀释液的pH值为6.0~8.0。

5.如权利要求4所述用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒,其特征在于,所述白蛋白选自:血清蛋白、乳清蛋白、卵清蛋白。

6.如权利要求4所述用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒,其特征在于,所述缓冲溶液选自:磷酸缓冲溶液(PB)、磷酸盐缓冲溶液(PBS)、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲溶液(Tris-HCl)或其组合。

7.如权利要求4所述用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒,其特征在于,所述稀释液还包括选自下组的一种或多种组分:

- (a) 金属离子螯合物;
- (b) 碱金属硫酸盐;
- (c) 防腐剂。

8.如权利要求4所述用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒,其特征在于,所述稀释液具有以下的一种或多种特性:

- (a) 所述稀释液在室温下的电导率 ρ 为 $0.55 \times 10^4 \sim 0.75 \times 10^4 \mu\text{S}/\text{cm}$;
- (b) 所述稀释液为待测样本提供的渗透压为250~380mOsm/Kg;
- (c) 所述稀释液的pH为7.2~7.8。

一种用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于试剂盒技术领域,尤其涉及一种用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒。

背景技术

[0002] 脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)又称内毒素,是革兰阴性细菌外膜的主要成分。LPS与急性期蛋白脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharidebindingprotein,LBP)结合,可导致炎症反应失控及免疫防御屏障机能下降,引起全身炎症反应综合征、脓毒性休克、急性肺损伤甚至多器官功能障碍综合征。脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharidebindingprotein,LBP)是一种分子量为60kDa,456个氨基酸组成的糖蛋白,以单链多肽的形式在肝细胞内合成,它属于I型急性期反应蛋白,存在于人和动物的血清中。LBP既可将细菌脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)多聚体转换为单聚体,加速LPS与其受体CD14结合,显著放大LPS的致炎作用;也可加速LPS与靶细胞膜上的清除受体结合,使LPS被靶细胞清除;还可催化LPS与脂蛋白结合,后者可中和LPS的生物学活性,加速体内LPS的清除。然而,现有用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒不能检测LBP基因标签单核苷酸多态性位点,功能单一;同时,现有血清或血浆样本粘稠度都较高,采用单纯采用人阴性血清或血浆、小牛血清进行稀释,受检测时间限制,往往难以稀释混合均匀,导致检测结果容易存在一定的偏差。

[0003] 综上所述,现有技术存在的问题是:现有用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒不能检测LBP基因标签单核苷酸多态性位点,功能单一;同时,现有血清或血浆样本粘稠度都较高,采用单纯采用人阴性血清或血浆、小牛血清进行稀释,受检测时间限制,往往难以稀释混合均匀,导致检测结果容易存在一定的偏差。

发明内容

[0004] 针对现有技术存在的问题,本发明提供了一种用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒。

[0005] 本发明是这样实现的,一种用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒包括:

[0006] 30倍浓缩洗涤液、酶标试剂、酶标包被板、样品稀释液、显色剂A、显色剂B、终止液、标准品、标准品稀释液、质谱仪;

[0007] 终止液为HCl和H₂SO₄;

[0008] 显色剂A由:PBS缓冲液,柠檬酸,ED-TA乙二氨四乙酸,ProcLin-300,过氧化氢(过氧化氢挥发性太高,容易丢失,我们现在正用过氧化脲来代替,效果还不错)组成;

[0009] 显色剂B由:PBS缓冲液,柠檬酸,ED-TA乙二氨四乙酸,ProcLin-300,硫代硫酸钠等。

[0010] 一种用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒检测方法如下:

[0011] 步骤一,标准品加入标准品稀释液进行稀释;

[0012] 步骤二,加样;

[0013] 分别设空白孔(空白对照孔不加样品及酶标试剂,其余各步操作相同)、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样50 μ l,待测样品孔中先加样品稀释液40 μ l,然后再加待测样品10 μ l(样品最终稀释度为5倍)。加样将样品加于酶标板孔底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀;

[0014] 步骤三,用封板膜封板后置37 $^{\circ}$ C温育30分钟;

[0015] 步骤四,将30倍浓缩洗涤液用蒸馏水30倍稀释后备用;

[0016] 步骤五,小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置30秒后弃去,如此重复5次,拍干;

[0017] 步骤六,每孔加入酶标试剂50 μ l,空白孔除外;重复步骤三和步骤五操作;

[0018] 步骤七,每孔先加入显色剂A50 μ l,再加入显色剂B50 μ l,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}$ C避光显色15分钟;

[0019] 步骤八,每孔加终止液50 μ l,终止反应(此时蓝色立转黄色);

[0020] 步骤九,利用高效液相串联质谱仪对上述液体进行检测,得到血液中LBP色谱图,计算人类血液中LBP含量数据。

[0021] 进一步,所述LBP基因标签单核苷酸多态性位点的检测方法如下:

[0022] 1) 特异性引物的设计

[0023] 根据被证实的LBP基因标签单核苷酸多态性位点,设计特异性扩增引物和测序引物,其中,所述特异性扩增引物中的一条用生物素标记;

[0024] 2) PCR扩增

[0025] 以待测标本的DNA为模板,用步骤1)所述的特异性扩增引物进行PCR反应,得PCR扩增物;

[0026] 3) 焦磷酸测序

[0027] 将步骤2)所得PCR扩增物采用碱变性使其分开成单链,取其中被生物素标记的单链PCR扩增产物纯化后,与步骤1)所述测序引物进行杂交反应,并分析结果以判断所述待测标本的靶单核苷酸是否具备多态性。

[0028] 进一步,所述标准品稀释液包括:缓冲溶液、白蛋白,所述白蛋白的含量为10~100g/L、碱金属氯化物、任选的乳化剂;并且所述稀释液的pH值为6.0~8.0。

[0029] 进一步,所述白蛋白选自:血清蛋白、乳清蛋白、卵清蛋白。

[0030] 进一步,所述缓冲溶液选自:磷酸缓冲溶液(PB)、磷酸盐缓冲溶液(PBS)、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲溶液(Tris-HCl)或其组合。

[0031] 进一步,所述稀释液还包括选自下组的一种或多种组分:

[0032] (a) 金属离子螯合物;

[0033] (b) 碱金属硫酸盐;

[0034] (c) 防腐剂。

[0035] 进一步,所述稀释液具有以下的一种或多种特性:

[0036] (a) 所述稀释液在室温下的电导率 ρ 为 $0.55 \times 10^4 \sim 0.75 \times 10^4 \mu\text{S}/\text{cm}$;

[0037] (b) 所述稀释液为待测样本提供的渗透压为250~380mOsm/Kg;

[0038] (c) 所述稀释液的pH为7.2~7.8。

[0039] 本发明的优点及积极效果为:本发明通过采用高特异性引物和适宜方法的组合,

能够实现快速、简便、准确、高效、实用、经济的检测LBP基因标签SNP基因型,可用于LBP基因在疾病遗传易感性的关联研究,能够满足临床检验实际工作的需要,利于LBP基因标签SNP检测预测疾病的发生、发展风险。与现有技术相比,其应用焦磷酸测序技术可以快速、准确地进行短DNA序列分析,便于构建标准化操作流程,具有高精度、高通量、低成本等优点;PCR扩增引物效率高,产物可直接进行焦磷酸测序,无需进行产物纯化等二次处理,操作简便,样品用量少;同时,提供的稀释液检测结果精确可靠,分散效果良好,可长期稳定保存,并且可通用于不同的临床免疫诊断项目的血清或血浆样本稀释液,对于临床医学诊断具有重要意义。

附图说明

[0040] 图1是本发明实施例提供的用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒结构框图。

[0041] 图2是本发明实施例提供的用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒检测流程图。

具体实施方式

[0042] 为能进一步了解本发明的发明内容、特点及功效,兹例举以下实施例,并配合附图详细说明如下。

[0043] 下面结合附图对本发明的结构作详细的描述。

[0044] 如图1所示,本发明提供的用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒包括:30倍浓缩洗涤液、酶标试剂、酶标包被板、样品稀释液、显色剂A、显色剂B、终止液、标准品、标准品稀释液、质谱仪;

[0045] 终止液为HCl和H₂SO₄;

[0046] 显色剂A由:PBS缓冲液,柠檬酸,ED-TA乙二氨四乙酸,ProcLin-300,过氧化氢(过氧化氢挥发性太高,容易丢失,我们现在正用过氧化脲来代替,效果还不错)组成;

[0047] 显色剂B由:PBS缓冲液,柠檬酸,ED-TA乙二氨四乙酸,ProcLin-300,硫代硫酸钠等。

[0048] 如图2所示,一种用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒检测方法如下:

[0049] 步骤S101,标准品加入标准品稀释液进行稀释;

[0050] 步骤S102,加样;

[0051] 分别设空白孔(空白对照孔不加样品及酶标试剂,其余各步操作相同)、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样50 μ l,待测样品孔中先加样品稀释液40 μ l,然后再加待测样品10 μ l(样品最终稀释度为5倍)。加样将样品加于酶标板孔底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀;

[0052] 步骤S103,用封板膜封板后置37 $^{\circ}$ C温育30分钟;

[0053] 步骤S104,将30倍浓缩洗涤液用蒸馏水30倍稀释后备用;

[0054] 步骤S105,小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置30秒后弃去,如此重复5次,拍干;

[0055] 步骤S106,每孔加入酶标试剂50 μ l,空白孔除外;重复步骤三和步骤五操作;

[0056] 步骤S107,每孔先加入显色剂A50 μ l,再加入显色剂B50 μ l,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}$ C避

光显色15分钟；

[0057] 步骤S108,每孔加终止液50 μ l,终止反应(此时蓝色立转黄色)；

[0058] 步骤S109,利用高效液相串联质谱仪对上述液体进行检测,得到血液中LBP色谱图,计算人类血液中LBP含量数据。

[0059] 本发明提供的LBP基因标签单核苷酸多态性位点的检测方法如下：

[0060] 1) 特异性引物的设计

[0061] 根据被证实的LBP基因标签单核苷酸多态性位点,设计特异性扩增引物和测序引物,其中,所述特异性扩增引物中的一条用生物素标记；

[0062] 2) PCR扩增

[0063] 以待测标本的DNA为模板,用步骤1)所述的特异性扩增引物进行PCR反应,得PCR扩增物；

[0064] 3) 焦磷酸测序

[0065] 将步骤2)所得PCR扩增物采用碱变性使其分开成单链,取其中被生物素标记的单链PCR扩增产物纯化后,与步骤1)所述测序引物进行杂交反应,并分析结果以判断所述待测标本的靶单核苷酸是否具备多态性。

[0066] 本发明提供的标准品稀释液包括:缓冲溶液、白蛋白,所述白蛋白的含量为10~100g/L、碱金属氯化物、任选的乳化剂;并且所述稀释液的pH值为6.0~8.0。

[0067] 本发明提供的白蛋白选自:血清蛋白、乳清蛋白、卵清蛋白。

[0068] 本发明提供的缓冲溶液选自:磷酸缓冲溶液(PB)、磷酸盐缓冲溶液(PBS)、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲溶液(Tris-HCl)或其组合。

[0069] 本发明提供的稀释液还包括选自下组的一种或多种组分：

[0070] (a) 金属离子螯合物；

[0071] (b) 碱金属硫酸盐；

[0072] (c) 防腐剂。

[0073] 本发明提供的稀释液具有以下的一种或多种特性：

[0074] (a) 所述稀释液在室温下的电导率 ρ 为 $0.55 \times 10^4 \sim 0.75 \times 10^4 \mu\text{S}/\text{cm}$ ；

[0075] (b) 所述稀释液为待测样本提供的渗透压为250~380mOsm/Kg；

[0076] (c) 所述稀释液的pH为7.2~7.8。

[0077] 以上所述仅是对本发明的较佳实施例而已,并非对本发明作任何形式上的限制,凡是依据本发明的技术实质对以上实施例所做的任何简单修改,等同变化与修饰,均属于本发明技术方案的范围。



图1



图2

专利名称(译)	一种用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒		
公开(公告)号	CN109507323A	公开(公告)日	2019-03-22
申请号	CN201811496455.1	申请日	2018-12-07
[标]发明人	蒋林彬		
发明人	董学渊 蒋林彬		
IPC分类号	G01N30/02 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/68		
CPC分类号	G01N30/02 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/68 G01N2030/027		
代理人(译)	陈向敏		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于试剂盒技术领域，公开了一种用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒，用质谱仪检测人类血液中LBP含量的试剂盒包括：30倍浓缩洗涤液、酶标试剂、酶标包被板、样品稀释液、显色剂A、显色剂B、终止液、标准品、标准品稀释液、质谱仪；本发明通过采用高特异性引物和适宜方法的组合，能够实现快速、简便、准确、高效、实用、经济的检测LBP基因标签SNP基因型，可用于LBP基因在疾病遗传易感性的关联研究，利于LBP基因标签SNP检测预测疾病的发生、发展风险；同时，提供的稀释液检测结果精确可靠，分散效果良好，可长期稳定保存，并且可通用于不同的临床免疫诊断项目的血清或血浆样本稀释液，对于临床医学诊断具有重要意义。

