



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107748254 A

(43)申请公布日 2018.03.02

(21)申请号 201710915557.1

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2017.09.30

(71)申请人 安徽伊普诺康生物技术股份有限公司

地址 236000 安徽省合肥市包河经济开发区繁华大道与吉林路交口东南角联东U谷第一期18号楼1-4层

(72)发明人 庄庆华 丁先骏 吴泽东 吴铮  
张金东 朱雨

(74)专利代理机构 合肥市浩智运专利代理事务所(普通合伙) 34124

代理人 王志兴

(51) Int. Cl.

G01N 33/536(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

(54)发明名称

一种N-端脑利钠肽前体检测试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种N-端脑利钠肽前体检测试剂盒,包含体积比为4:1的试剂R1和R2;试剂R1包含:缓冲液15-40mmol/L、PEG-6000 0.5-2.5%、蔗糖0.1-0.5g/L、海藻糖0.1-0.5g/L、牛血清白蛋白5-15g/L、防腐剂0.2-0.8g/L;试剂R2包含:缓冲液15-40mmol/L、牛血清白蛋白10-30g/L、表面活性剂1.5-5.5g/L、胶乳微球0.2-1.2%、防腐剂0.2-1.2g/L、N-端脑利钠肽前体抗体0.1-2.0%、聚乙烯吡咯烷酮3-5g/L。本发明的优点在于:试剂盒成本低、特异性强、灵敏度高、稳定性好,可定量检测N-端脑利钠肽前体的含量。

1. 一种N-端脑利钠肽前体检测试剂盒,其特征在于,包含体积比为4:1的试剂R1和试剂R2;

其中,所述试剂R1的组分及含量为:

缓冲液 15-40 mmol/L,

PEG-6000 0.5-2.5 %,

蔗糖 0.1-0.5 g/L,

海藻糖 0.1-0.5 g/L,

牛血清白蛋白 5-15 g/L,

防腐剂 0.2-0.8 g/L;

所述试剂R2的组分及含量为:

缓冲液 15-40 mmol/L,

牛血清白蛋白 10-30 g/L,

表面活性剂 1.5-5.5 g/L,

胶乳微球 0.2-1.2 %,

防腐剂 0.2-1.2 g/L,

N-端脑利钠肽前体抗体 0.1-2.0 %,

聚乙烯吡咯烷酮 3-5 g/L。

2. 根据权利要求1所述的N-端脑利钠肽前体检测试剂盒,其特征在于,所述缓冲液选自HEPES缓冲液或硼酸缓冲液。

3. 根据权利要求1所述的N-端脑利钠肽前体检测试剂盒,其特征在于,所述防腐剂选自HY-500防腐剂或叠氮钠。

4. 根据权利要求1所述的N-端脑利钠肽前体检测试剂盒,其特征在于,所述表面活性剂选自S9或曲拉通-100。

5. 根据权利要求1所述的N-端脑利钠肽前体检测试剂盒,其特征在于,所述胶乳微球的粒径为80nm。

6. 权利要求1至5中任一项所述的N-端脑利钠肽前体检测试剂盒在检测样本中N-端脑利钠肽前体的含量中的应用。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述应用通过以下步骤实现:

1) 向比色杯中加入样本和试剂R1,混匀,37℃孵育1分钟,置入全自动生化分析仪中,读取吸光度A1;

2) 再向比色杯中添加试剂R2,混匀,37℃孵育5分钟,置入全自动生化分析仪中,读取吸光度A2;

3) 根据校准曲线计算出样本中N-端脑利钠肽前体抗原的含量。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,按体积比计,样本:试剂R1:试剂R2=1:80:40,且样本、试剂R1和试剂R2的总体积至少为比色杯总体积的2/3。

## 一种N-端脑利钠肽前体检测试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医学检验技术领域,更具体涉及一种N-端脑利钠肽前体检测试剂盒及其应用。

### 背景技术

[0002] 心血管疾病是目前危害人类健康的重要疾病之一,中国每年因该疾病入院病人在三千多万,死于该疾病的有三百多万人,而且每年呈上升趋势。所以,利用合适的医疗设备对心血管疾病的诊断、治疗和康复已成为一个引起全球性重视的话题。N-端脑利钠肽前体(NT-ProBNP)是B型利钠肽激素原分裂后无活性的N端碎片,是典型的心脏标志物,主要在心肌细胞所受容量负荷增高时由左心室分泌。N-端脑利钠肽前体的应用在于协助诊断充血性心力衰竭,判断病情的严重程度和预后,以及指导治疗已经取得了医学界的广泛关注。

[0003] 迄今,已有多篇相关的研究论文发表于新英格兰医学杂志、循环医学、美国心脏病学院杂志等权威杂志上。这些论文探讨了诸如NT-ProBNP在心衰急诊诊断中的作用、快速NT-ProBNP检测用于区别充血性心衰或肺部疾患导致的呼吸困难的病人等问题,为心衰的诊断和评估开辟了一个崭新的领域。

[0004] 目前市面上检测NT-ProBNP的试剂盒主要是以荧光免疫分析法、酶联免疫分析法的方式进行检测,这些方法成本高、准确度低。还需要配备特定的仪器进行配合检测,操作比较繁琐。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题在于提供了一种成本低、特异性强、灵敏度高、准确度高、稳定性好、可定量检测血清中N-端脑利钠肽前体的含量的N-端脑利钠肽前体检测试剂盒及其应用。

[0006] 本发明是通过以下技术方案解决上述技术问题的:

[0007] 一方面提供一种N-端脑利钠肽前体检测试剂盒,包含体积比为4:1的试剂R1和试剂R2;

[0008] 其中,所述试剂R1的组分及含量为:

- |        |   |               |
|--------|---|---------------|
|        | 缓冲液   | 15-40 mmol/L, |
|        | PEG-6000  | 0.5-2.5 %,    |
| [0009] | 蔗糖  | 0.1-0.5 g/L,  |
|        | 海藻糖   | 0.1-0.5 g/L,  |
|        | 牛血清白蛋白  | 5-15 g/L,     |
|        | 防腐剂   | 0.2-0.8 g/L;  |
| [0010] | 所述试剂R2的组分及含量为:  |               |
|        | 缓冲液   | 15-40 mmol/L, |
|        | 牛血清白蛋白  | 10-30 g/L,    |
|        | 表面活性剂   | 1.5-5.5 g/L,  |
| [0011] | 胶乳微球  | 0.2-1.2 %,    |
|        | 防腐剂   | 0.2-1.2 g/L,  |
|        | N-端脑利钠肽前体抗体   | 0.1-2.0 %,    |
|        | 聚乙烯吡咯烷酮   | 3-5 g/L。      |
| [0012] | 优选地,所述缓冲液选自HEPES缓冲液或硼酸缓冲液。  |               |
| [0013] | 优选地,所述防腐剂选自HY-500防腐剂或叠氮钠。   |               |
| [0014] | 优选地,所述表面活性剂选自S9或曲拉通-100。  |               |
| [0015] | 优选地,所述胶乳微球的粒径为80nm。   |               |
| [0016] | 另一方面,提供上述N-端脑利钠肽前体检测试剂盒在检测样本中N-端脑利钠肽前体的含量中的应用。                                |               |
| [0017] | 优选地,所述应用通过以下步骤实现:   |               |
| [0018] | 1) 向比色杯中加入样本和试剂R1,混匀,37℃孵育1分钟,置入全自动生化分析仪中,读取吸光度A1;                            |               |
| [0019] | 2) 再向比色杯中添加试剂R2,混匀,37℃孵育5分钟,置入全自动生化分析仪中,读取吸光度A2;                              |               |
| [0020] | 3) 根据校准曲线计算出样本中N-端脑利钠肽前体抗原的含量。  |               |
| [0021] | 优选地,按体积比计,样本:试剂R1:试剂R2=1:80:40,且样本、试剂R1和试剂R2的总体积至少为比色杯总体积的2/3。                |               |
| [0022] | 检测原理是在胶乳微球上包被N-端脑利钠肽前体多克隆抗体,N-端脑利钠肽前体多克隆抗体和样本中的N-端脑利钠肽前体抗原发生凝集反应,形成了抗原抗体复合物并产 |               |

生浊度,该浊度的高低与样本中的N-端脑利钠肽前体抗原浓度成正相关,测定其吸光度值并根据校准曲线计算出N-端脑利钠肽前体抗原的含量。

[0023] 应用本发明试剂盒,可以在日立系列、贝克曼系列、奥林巴斯系列、东芝系列、西门子系列、雅培系列、罗氏系列、希森美康系列、迈瑞系列、迪瑞系列全自动生化分析仪上进行使用。

[0024] 本发明相比现有技术具有以下优点:

[0025] 该试剂盒成本低、特异性强、灵敏度高、准确度高、稳定性好,可定量检测血清中N-端脑利钠肽前体的含量;以一株高特异性,高敏感性NT-proBNP单克隆抗体为标记抗体,另一株单克隆抗体为捕获抗体,结合链亲和素-生物素放大系统,应用免疫金标层析技术,检测人血中NT-proBNP的含量。并且具有较高的检测灵敏度,操作简单、快速,从检测到出结果最多只需要5分钟,甚至更短。

### 具体实施方式

[0026] 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。

[0027] 所有原料均为市购原料;所有配比中,对于固体,%表示g/100mL,对于液体,%表示mL/100mL。

[0028] 实施例1

[0029] 一种N-端脑利钠肽前体检测试剂盒,包含体积比为4:1的试剂R1和试剂R2。

[0030] 其中,试剂R1的组分及含量为:

HEPES 缓冲液 15 mmol/L

PEG-6000 0.5%

蔗糖 0.1g/L

[0031]

海藻糖 0.1g/L

牛血清白蛋白 5 g/L

HY-500 防腐剂 0.2 g/L;

[0032] 试剂R2的组分及含量为:

HEPES 缓冲液 15mmol/L

牛血清白蛋白 10 g/L

[0033]

S9 1.5 g/L

胶乳微球 0.2 %

	HY-500 防腐剂	0.2 g/L
[0034]	N-端脑利钠肽前体抗体	0.1 %
	聚乙烯吡咯烷酮	3g/L。

[0035] 试剂R1的配制如下：

[0036] (1) 按照上述试剂R1的组分含量，将牛血清白蛋白溶于HEPES缓冲液中，搅拌均匀，待充分溶解，即得分散液；

[0037] (2) 按照试剂R1的组分含量，将PEG-6000、蔗糖、海藻糖、HY-500防腐剂溶于步骤(1)所制得的分散液中，搅拌均匀待所有原料充分溶解，即制得试剂R1。

[0038] 试剂R2液的配制如下：

[0039] (1) 按照试剂R2的组分含量，将牛血清白蛋白溶于HEPES缓冲液中，搅拌均匀，待充分溶解，即得分散液；

[0040] (2) 按照试剂R2的组分含量，将S9、HY-500防腐剂、胶乳微球、聚乙烯吡咯烷酮溶于步骤(1)所制得的分散液中，搅拌均匀即得乳胶微球溶解试剂；

[0041] (3) 采用化学偶联法将N-端脑利钠肽前体抗体包被到乳胶微球中，制得抗体胶乳；

[0042] (4) 将步骤(3)制得的抗体胶乳离心去上清液，然后用步骤(2)制得的乳胶微球溶解试剂溶解沉淀物，使抗体胶乳的终浓度为1.0%，超声分散，制得试剂R2。

[0043] 上述试剂盒在检测样本中N-端脑利钠肽前体的含量中的应用通过以下步骤实现：

[0044] 1) 向比色杯中加入样本5.0 $\mu$ L和试剂R1 400 $\mu$ L，混匀，37 $^{\circ}$ C孵育1分钟，置入全自动生化分析仪中，读取吸光度A1；

[0045] 2) 再向比色杯中添加试剂R2 100 $\mu$ L，混匀，37 $^{\circ}$ C孵育5分钟，置入全自动生化分析仪中，读取吸光度A2；

[0046] 3) 根据校准曲线计算出样本中N-端脑利钠肽前体抗原 (NT-proBNP) 的含量。

[0047] 在日立7180全自动生化分析仪上分析，具体方法如下：

[0048]

主波长	340nm	副波长	450nm
测定方法	终点法	校准方法	多点
试剂样品比	100:1	反应方向	正反应
样品孵育时间	1分钟	测定时间	5分钟

[0049] 样本中NT-proBNP含量 (pg/mL) = CS  $\times$   $\Delta$  AT /  $\Delta$  AS (pg/mL)

[0050] 式中： $\Delta$  AT 以空白管吸光度作对照的样品管吸光度值

[0051]  $\Delta$  AS 以空白管吸光度作对照的校准管吸光度值

[0052] CS 校准液中NT-proBNP的浓度。

[0053] 实施例2

[0054] 一种N-端脑利钠肽前体检测试剂盒，包含体积比为4:1的试剂R1和试剂R2。

[0055] 其中，试剂R1的组分及含量为：

	HEPES 缓冲液	40 mmol/L
[0056]	PEG-6000	2.5%
	蔗糖	0.5 g/L
	海藻糖	0.5 g/L
[0057]	牛血清白蛋白	15 g/L
	HY-500 防腐剂	0.8 g/L;
[0058]	试剂R2的组分及含量为:	
	HEPES 缓冲液	40mmol/L
	牛血清白蛋白	30 g/L
	S9	5.5 g/L
[0059]	胶乳微球	1.2 %
	HY-500 防腐剂	1.2 g/L
	N-端脑利钠肽前体抗体	2.0 %
	聚乙烯吡咯烷酮	5g/L。
[0060]	按照实施例1的方法制备上述试剂盒并将上述试剂盒应用于检测样本中N-端脑利钠肽前体的含量。	
[0061]	实施例3	
[0062]	一种N-端脑利钠肽前体检测试剂盒,包含体积比为4:1的试剂R1和试剂R2。	
[0063]	其中,试剂R1的组分及含量为:	
	硼酸缓冲液	15mmol/L
	PEG-6000	0.5%
[0064]	蔗糖	0.1 g/L
	海藻糖	0.1 g/L
	牛血清白蛋白	5 g/L
[0065]	HY-500 防腐剂	0.2 g/L
[0066]	试剂R2的组分及含量为:	



	硼酸缓冲液	40mmol/L
	牛血清白蛋白	30 g/L
	S9	5.5g/L
[0067]	胶乳微球	1.2 %
	HY-500 防腐剂	1.2 g/L
	N-端脑利钠肽前体抗体	2.0 %
	聚乙烯吡咯烷酮	5g/L。
[0068]	按照实施例1的方法制备上述试剂盒并将上述试剂盒应用于检测样本中N-端脑利钠肽前体的含量。	
[0069]	实施例4	
[0070]	一种N-端脑利钠肽前体检测试剂盒,包含体积比为4:1的试剂R1和试剂R2。	
[0071]	其中,试剂R1的组分及含量为:	
	硼酸缓冲液	40mmol/L
	PEG-6000	2.5%
[0072]	蔗糖	0.5g/L
	海藻糖	0.5g/L
	牛血清白蛋白	15 g/L
	叠氮钠	0.8 g/L
[0073]	试剂R2的组分及含量为:	

	硼酸缓冲液	15mmol/L
	牛血清白蛋白	10 g/L
	曲拉通-100	1.5g/L
[0074]	胶乳微球	0.2 %
	HY-500 防腐剂	0.2 g/L
	N-端脑利钠肽前体抗体	0.1 %
	聚乙烯吡咯烷酮	3 g/L。
[0075]	按照实施例1的方法制备上述试剂盒并将上述试剂盒应用于检测样本中N-端脑利钠肽前体的含量。	
[0076]	实施例5	
[0077]	一种N-端脑利钠肽前体检测试剂盒,包含体积比为4:1的试剂R1和试剂R2。	
[0078]	其中,试剂R1的组分及含量为:	
	硼酸缓冲液	30mmol/L
	PEG-6000	1.5%
	蔗糖	0.3g/L
[0079]	海藻糖	0.3g/L
	牛血清白蛋白	10 g/L
	HY-500 防腐剂	0.6 g/L
[0080]	试剂R2的组成和含量为:	
	硼酸缓冲液	30mmol/L
[0081]	牛血清白蛋白	20 g/L
	S9	3g/L
	胶乳微球	0.6 %
[0082]	HY-500 防腐剂	0.6 g/L
	N-端脑利钠肽前体抗体	1.0 %
	聚乙烯吡咯烷酮	4g/L

[0083] 按照实施例1的方法制备上述试剂盒并将上述试剂盒应用于检测样本中N-端脑利钠肽前体的含量。

[0084] 该试剂盒成本低、特异性强、灵敏度高、准确度高、稳定性好,可定量检测血清中N-端脑利钠肽前体的含量;本发明的试剂盒以一株高特异性,高敏感性NT-proBNP单克隆抗体为标记抗体,另一株单克隆抗体为捕获抗体,结合链亲和素-生物素放大系统,应用免疫金标层析技术,检测人血中NT-proBNP的含量。

[0085] 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。

专利名称(译)	一种N-端脑利钠肽前体检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN107748254A</a>	公开(公告)日	2018-03-02
申请号	CN2017110915557.1	申请日	2017-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	安徽伊普诺康生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	安徽伊普诺康生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	安徽伊普诺康生物技术股份有限公司		
[标]发明人	庄庆华 丁先骏 吴泽东 吴铮 张金东 朱雨		
发明人	庄庆华 丁先骏 吴泽东 吴铮 张金东 朱雨		
IPC分类号	G01N33/536 G01N33/543 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/536 G01N33/54313 G01N33/577		
代理人(译)	王志兴		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)	缓冲液	15-40 mmol/L,
<p>本发明公开了一种N-端脑利钠肽前体检测试剂盒，包含体积比为4:1的试剂R1和R2；试剂R1包含：缓冲液15-40mmol/L、PEG-6000 0.5-2.5%、蔗糖0.1-0.5g/L、海藻糖0.1-0.5g/L、牛血清白蛋白5-15g/L、防腐剂0.2-0.8g/L；试剂R2包含：缓冲液15-40mmol/L、牛血清白蛋白10-30g/L、表面活性剂1.5-5.5g/L、胶乳微球0.2-1.2%、防腐剂0.2-1.2g/L、N-端脑利钠肽前体抗体0.1-2.0%、聚乙烯吡咯烷酮3-5g/L。本发明的优点在于：试剂盒成本低、特异性强、灵敏度高、稳定性好，可定量检测N-端脑利钠肽前体的含量。</p>	PEG-6000	0.5-2.5 %,
	蔗糖	0.1-0.5 g/L,
	海藻糖	0.1-0.5 g/L,
	牛血清白蛋白	5-15 g/L,
	防腐剂	0.2-0.8 g/L;