



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109187971 A

(43)申请公布日 2019.01.11

(21)申请号 201810939822.4

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2018.08.17

G01N 33/58(2006.01)

(71)申请人 迪瑞医疗科技股份有限公司

地址 130000 吉林省长春市高新区宜居路
3333号

(72)发明人 李磊 孟令敏 王凯 孙成艳
高威

(74)专利代理机构 长春众邦菁华知识产权代理
有限公司 22214

代理人 李外

(51)Int.Cl.

G01N 33/573(2006.01)
G01N 21/76(2006.01)
G01N 33/532(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)

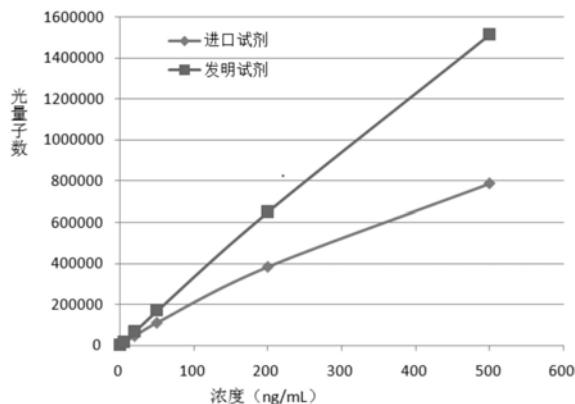
权利要求书2页 说明书12页 附图1页

(54)发明名称

神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测
试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明提供一种神经元特异性烯醇化酶化学发光检测试剂盒及其制备方法，属于体外检测技术领域。该试剂盒包括：链霉亲和素磁颗粒悬浮液、化学发光标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体和偶联标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体。本发明提供一种神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测试剂盒的制备方法。本发明的神经元特异性烯醇化酶化学发光检测试剂盒为全自动的测量样本，并直接给出数值，减少人为操作误差，并且实现无人值守，缩短了临床检测所需的时间，同时检测精度较高，试剂与仪器组成封闭系统，系统误差小。



1. 一种神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，该试剂盒包括：
 链霉亲和素磁颗粒悬浮液
 化学发光标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体
 偶联标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体。
2. 根据权利要求1所述的一种神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，所述的试剂盒中，链霉亲和素磁颗粒悬浮液质量百分比为0.01%～1%。
3. 根据权利要求1所述的一种神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，所述链霉亲和素磁颗粒悬浮液中，链霉亲和素磁颗粒的粒径是0.05～3μm。
4. 根据权利要求1所述的一种神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，所述化学发光标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体中，神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体与化学发光标记物摩尔比为1:(1～20)，化学发光标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体的浓度为≥0.1μg/mL。
5. 根据权利要求1或4所述的一种神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，所述化学发光标记物为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺和三联吡啶钌。
6. 根据权利要求1所述的一种神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，所述偶联标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体中，神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体与偶联标记物的摩尔比为1:(1～20)，偶联标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体的浓度为≥0.7μg/mL。
7. 根据权利要求1或6所述的一种神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，所述偶联标记物为生物素。
8. 根据权利要求1所述的一种神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，所述的试剂盒还包括化学发光底物液，所述化学发光底物液包括A液和B液，所述A液为硝酸溶液，B液为氢氧化钠溶液。
9. 根据权利要求1所述的一种神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，所述的试剂盒还包括神经元特异性烯醇化酶校准品，
 所述神经元特异性烯醇化酶校准品为浓度分别为0.00ng/mL、5ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、200ng/mL和500ng/mL的神经元特异性烯醇化酶溶液。
10. 根据权利要求1所述的一种神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测试剂盒的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：
 - 步骤一：链霉亲和素磁颗粒悬浮液的制备
 将链霉亲和素磁颗粒溶液和TBST溶液混匀后，放置在磁分离器上，直至上清液无混浊，弃上清，留取磁颗粒，清洗后在缓冲液中配成固相试剂；
 - 步骤二：化学发光标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体的制备
 将神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体放入离心管中离心，然后加入碳酸缓冲液，混匀后加入化学发光标记物溶液离心，将离心管密封后放入避光暗盒中，然后将暗盒放入气浴恒温振荡器中混匀，加入封闭液，放入气浴恒温振荡器中混匀，将封闭好的抗体经过纯化、收集，然后放入缓冲液中稀释，保存；
 - 步骤三：偶联标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体的制备
 将神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体放入离心管中离心，然后加入TRIS缓冲液，混匀

后加入偶联标记物溶液离心,标记反应后加入赖氨酸继续反应,最后将反应液用脱盐柱纯化、收集后放入缓冲液中稀释,保存。

神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于体外检测技术领域,涉及一种神经元特异性烯醇化酶(NSE)化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] NSE是神经元及神经内分泌细胞三羧酸循环过程中催化2-磷酸甘油酸变成磷酸烯醇式丙酮酸的关键酶。基因核苷酸序列全长2423bp,编码434个氨基酸残基,生物半衰期可能大于20h,分子量为78kD,等电点pH4.7,是一种酸性蛋白酶。NSE是烯醇化酶基因家族成员之一,烯醇化酶是由 α 、 β 、 γ 三个亚基组成的二聚体,其同工酶分为 $\alpha\alpha$ 、 $\beta\beta$ 、 $\gamma\gamma$ 、 $\alpha\gamma$ 和 $\alpha\beta$ 五种。 α 亚基主要存在于肝、肾等组织,故称为非神经系统的烯醇化酶(NNE); β 亚基主要存在于骨骼肌和心肌,称为肌肉特异性的烯醇化酶(MSE); γ 亚基主要存在于神经组织, $\gamma\gamma$ 、 $\alpha\gamma$ 组成的同工酶为神经元和神经内分泌细胞特有,故命名为神经元特异性烯醇化酶(neuro-specificenolase,NSE)。

[0003] 在临床应用方面,NSE主要作为中枢神经系统损害的标志物,其分泌的动态变化可预示神经系统损伤的敏感性和特异性。常用于肿瘤诊断、监测治疗效果及预后评估等。多种中枢神经系统疾病如脑损伤、脑肿瘤、视网膜损伤、以及其他原因引起的脑损伤中,血中NSE浓度都会出现不同程度的升高,NSE可作为损伤的敏感性和特异性指标。

[0004] NSE是用于小细胞肺癌诊断的、具有高特异性和高灵敏性的肿瘤标记物,其特异性高达80%~90%。可用于鉴别诊断,监测小细胞肺癌放疗、化疗后的治疗效果。用神经元特异性烯醇化酶监测小细胞肺癌的复发,比临床确定复发要早4~12周;神经元特异性烯醇化酶还可用于神经母细胞瘤和肾母细胞瘤的鉴别诊断,并且监测神经母细胞瘤的病情变化,评价疗效和报告复发;

[0005] NSE在内分泌肿瘤中显示出很高的免疫活性,并且可以在血清中直接检出,因此可以用来监测肿瘤患者的病情进展,评价治疗效果。血清学检测比放射线检查、解剖学检查方便迅速,因此NSE作为肿瘤标记物在临床中的应用十分广泛。

[0006] 目前我国获准上市的国产及进口试剂盒检测原理主要有酶联免疫法(ELISA)、电化学发光免疫法(ECLI)、时间分辨免疫荧光法(TRFIA)和化学发光免疫法(CLIA)。传统的酶联免疫法不仅操作繁琐,自动化程度低,受人为因素影响大,而且特异性和灵敏度都有待提高。电化学发光免疫法(ECLI)、时间分辨免疫荧光法(TRFIA)和化学发光免疫法(CLIA)具有灵敏度高、线性范围宽、操作简便、容易实现自动化的优点,是理想的临床微量生化检验分析手段。但是目前临幊上检测神经元特异性烯醇化酶(NSE)主要以国外进口试剂为主,国外进口试剂价格昂贵,货期长,给患者带来沉重的经济负担及诸多不便,不利于在基层医院推及。

[0007] 化学发光免疫测定技术是一种高度敏感的微量测定技术,具备敏感性高、特异性强、测定范围宽、试剂稳定性好、操作简便等特点。目前基于化学发光免疫分析原理的检测

仪器已成功商品化,如雅培诊断公司(Abbott)的ARCHITECT(i)型化学发光免疫分析仪及其配套试剂盒,采用吖啶酯标记抗体作为检测探针,抗体包被磁珠为反应载体,并结合自动化的检测系统,可快速检测多种疾病标志物。但是基于化学发光免疫技术用于检测NSE的国产试剂盒的研究相对较少,不能满足国内需求。

发明内容

[0008] 本发明的目的是为了解决现有的检测NSE的方法检测时间长、灵敏度低、重复性差的问题,而提供一种神经元特异性烯醇化酶化学发光检测试剂盒及其制备方法。

[0009] 本发明首先提供一种神经元特异性烯醇化酶化学发光检测试剂盒,该试剂盒包括:

[0010] 链霉亲和素磁颗粒悬浮液

[0011] 化学发光标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体

[0012] 偶联标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体。

[0013] 优选的是,所述的试剂盒中,链霉亲和素磁颗粒悬浮液质量百分比为0.01%~1%。

[0014] 优选的是,所述链霉亲和素磁颗粒悬浮液中,链霉亲和素磁颗粒的粒径是0.05~3 μm 。

[0015] 优选的是,所述化学发光标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体中,神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体与化学发光标记物摩尔比为1:(1~20),化学发光标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体的浓度为 $\geq 0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0016] 优选的是,所述化学发光标记物为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺和三联吡啶钌。

[0017] 优选的是,所述偶联标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体中,神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体与偶联标记物的摩尔比为1:(1~20),偶联标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体的浓度为 $\geq 0.7\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0018] 优选的是,所述偶联标记物为生物素。

[0019] 优选的是,所述的试剂盒还包括化学发光底物液,所述化学发光底物液包括A液和B液,所述A液为硝酸溶液,B液为氢氧化钠溶液。

[0020] 优选的是,所述的试剂盒还包括神经元特异性烯醇化酶校准品,

[0021] 所述神经元特异性烯醇化酶校准品为浓度分别为0.00ng/mL、5ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、200ng/mL和500ng/mL的神经元特异性烯醇化酶溶液。

[0022] 本发明还提供上述的神经元特异性烯醇化酶的化学发光检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0023] 步骤一:链霉亲和素磁颗粒悬浮液的制备

[0024] 将链霉亲和素磁颗粒溶液和TBST溶液混匀后,放置在磁分离器上,直至上清液无混浊,弃上清,留取磁颗粒,清洗后在缓冲液中配成固相试剂;

[0025] 步骤二:化学发光标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体的制备

[0026] 将神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体放入离心管中离心,然后加入碳酸缓冲液,混匀后加入化学发光标记物溶液离心,将离心管密封后放入避光暗盒中,然后将暗盒放入气浴恒温振荡器中混匀,加入封闭液,放入气浴恒温振荡器中混匀,将封闭好的抗体经过纯

化、收集，然后放入缓冲液中稀释，保存；

[0027] 步骤三：偶联标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体的制备

[0028] 将神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体放入离心管中离心，然后加入TRIS缓冲液，混匀后加入偶联标记物溶液离心，标记反应后加入赖氨酸继续反应，最后将反应液用脱盐柱纯化、收集后放入缓冲液中稀释，保存。

[0029] 本发明的有益效果

[0030] 本发明首先提供一种神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测试剂盒，该试剂盒以链霉亲和素磁颗粒悬浮液作为固相载体，双抗体夹心原理进行检测，结合发光强度和灵敏度都较高的化学发光物质对NSE进行标记，采用过氧化氢化学发光体系，以双抗体夹心法实现对NSE的定量检测，该试剂盒选择吖啶酯为化学发光免疫分析系统的标记材料，该材料有激发态回到基态时产生的能量跃迁为直接化学发光，不需要酶的参与，节约时间及成本；采用链霉亲和素磁珠与生物素标记的类似物可以牢牢的结合在一起，减少非特异性吸附，提高测试样本的准确度，抗干扰能力强。本发明的神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测试剂盒为全自动的测量样本，并直接给出数值，减少人为操作误差，并且实现无人值守，缩短了临床检测所需的时间，同时检测精度较高，试剂与仪器组成封闭系统，系统误差小。

附图说明

[0031] 图1为实施例5得到的NSE标准曲线。

具体实施方式

[0032] 为了使本发明的优点、目的和方法更加详实易懂，下面结合附图和具体实施例对本发明的具体实施方式做详细的说明。在下面的描述中阐述了诸多细节以便于理解，但本发明可以以不同与描述的其他方式来实施。

[0033] 本发明首先提供一种神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测试剂盒，该试剂盒包括：

[0034] 链霉亲和素磁颗粒悬浮液

[0035] 化学发光标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体

[0036] 偶联标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体。

[0037] 按照本发明，所述的试剂盒中，链霉亲和素磁颗粒悬浮液质量百分比优选为0.01%~1%，更优选为0.072%。

[0038] 按照本发明，所述链霉亲和素磁颗粒悬浮液中，链霉亲和素磁颗粒的粒径优选为0.05~3μm，更优选为3μm。当链霉亲和素磁颗粒的粒径低于0.05μm时，抗原或者抗体与磁珠结合率低，可能导致整体光量子数偏低；当链霉亲和素磁颗粒的粒径高于3μm时，非特异性结合效果明显，可能导致试剂盒灵敏度差等。

[0039] 按照本发明，所述化学发光标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体中，神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体与化学发光标记物摩尔比优选为1:(1~20)，更优选为1:3~20；化学发光标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体的浓度为≥0.1μg/mL。所述化学发光标记物优选为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺和三联吡啶钌，更优选为吖啶酯。

[0040] 按照本发明，所述偶联标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体中，神经

元特异性烯醇化酶单克隆抗体与偶联标记物的摩尔比优选为1:(1~20),更优选为1:5~20;偶联标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体的浓度为 $\geq 0.7\mu\text{g}/\text{mL}$,所述偶联标记物优选为生物素。

[0041] 按照本发明,所述的试剂盒还包括化学发光底物液,所述化学发光底物液包括A液和B液;所述A液为硝酸溶液,B液为氢氧化钠溶液。

[0042] 按照本发明,所述的试剂盒还包括神经元特异性烯醇化酶校准品。

[0043] 所述神经元特异性烯醇化酶校准品优选为浓度分别为0.00ng/mL、5ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、200ng/mL和500ng/mL的神经元特异性烯醇化酶溶液。

[0044] 本发明还提供上述的神经元特异性烯醇化酶的化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0045] 步骤一:链霉亲和素磁颗粒悬浮液的制备

[0046] 将链霉亲和素磁颗粒溶液和TBST溶液混匀后,放置在磁分离器上,直至上清液无混浊,弃上清,留取磁颗粒,清洗后在缓冲液中配成固相试剂;

[0047] 所述的链霉亲和素磁颗粒溶液的浓度优选为50~100mg/ml;链霉亲和素磁颗粒溶液和TBST溶液的体积比优选为(0.5~1):(5~15);所述的混匀时间优选为10~15分钟,所述的缓冲液为50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300, pH6.5或100mM PBS、0.1%吐温-20、0.1%Proclin300, pH7.2;所述的固相试剂的浓度优选为0.01%~1%,更优选为0.05%;所述的链霉亲和素磁颗粒溶液的来源为商购,选自安捷伦公司,货号PL6827-1006。

[0048] 步骤二:化学发光标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体的制备

[0049] 将神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体放入离心管中离心,优选在室温下离心10s~30s,保证抗体位于离心管底部位置,然后加入磷酸缓冲液,混匀后加入化学发光标记物溶液离心,所述的离心温度优选为室温,离心时间优选为0.5min~3min;将离心管密封后放入避光暗盒中,然后将暗盒放入气浴恒温振荡器(25℃)中混匀,所述的混匀时间优选为2~4h,加入封闭液,放入气浴恒温振荡器中混匀,所述的封闭时间优选为1~2h,将封闭好的抗体经过纯化、收集,然后放入缓冲液中稀释,保存;

[0050] 所述的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体的质量(μg):化学发光标记物溶液的体积(μl)优选为(250~500):(5~15);所述的化学发光标记物溶液的浓度优选为2~2.5mg/mL;所述的封闭液优选为赖氨酸,质量分数优选为20~25%;所述的缓冲液为50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300, pH6.5或100mM PBS、0.1%吐温-20、0.1%Proclin300, pH6.0;

[0051] 步骤三:偶联标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体的制备

[0052] 将神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体放入离心管中离心,确保抗体位于离心管底部位置,优选在室温下离心10s~30s,离心后加入TRIS缓冲液充分混匀,然后加入偶联标记物,用离心机室温条件下离心30~45s,2~8℃混匀,所述的混匀时间优选为2~4h,加入封闭液,放入气浴恒温振荡器中混匀(25℃),所述的封闭时间优选为1~2h,将封闭好的抗体经过纯化、收集,然后放入缓冲液中稀释,保存;

[0053] 所述的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体的质量(μg):偶联标记物溶液的体积(mL)优选为(500~750):(2~5);所述的偶联标记物溶液的浓度优选为2~3mg/mL;所述的封闭液优选为赖氨酸,所述的偶联标记物的来源为商购,选自ACROBiosystems公司。所述的缓冲液为50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300, pH6.5或100mM PBS、0.1%吐温-20、

0.1%Proclin300,pH6.0。

[0054] 本发明的神经元特异性烯醇化酶化学发光检测试剂盒用于检测神经元特异性烯醇化酶时,利用全自动化学发光免疫分析仪(CM180)对神经元特异性烯醇化酶校准品进行检测,绘制标准曲线,内置于电脑软件;然后根据需求测试临床样本,根据样本的光量子数计算神经元特异性烯醇化酶的浓度;最后对神经元特异性烯醇化酶全自动化学发光免疫分析系统进行性能(灵敏度、线性、抗干扰/特异性)的评价。下面结合具体实施例对本发明做进一步详细的描述。

[0055] 实施例1:神经元特异性烯醇化酶化学发光检测试剂盒的制备:

[0056] (1)链霉亲和素磁颗粒悬浮液的制备:

[0057] 取浓度100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液0.5mL(50mg),加入10mL的TBST溶液充分混匀10min,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒。重复清洗3次后使用50mM MES、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液中配成磁珠浓度为0.05%的固相试剂,2~8℃保存。

[0058] (2)吖啶酯标记工艺:

[0059] 将250ug抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入PBS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5μl 2mg/mL吖啶酯DMF溶液,用离心机室温条件下离心0.5min。将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,之后将暗盒放入气浴恒温振荡器(25℃),混匀4h。加入1mL 20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封闭时间为1h。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪上进行纯化(葡聚糖凝胶G25预装柱),用PB缓冲液洗脱,分步收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的神经元特异性烯醇化酶抗体浓溶液用50mM MES、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为0.1μg/ml,2~8℃保存。

[0060] (3)偶联标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体制备工艺:

[0061] 将500ug抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入TRIS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入2ml 2mg/mL生物素的DMF溶液,用离心机室温条件下离心30s。2~8℃混匀4小时。加入1mL 20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封闭时间为1h。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪(葡聚糖凝胶G250柱)纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的神经元特异性烯醇化酶抗体浓溶液用50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为1.0μg/mL,2~8℃保存。

[0062] 实施例2神经元特异性烯醇化酶化学发光检测试剂盒的制备:

[0063] (1)链霉亲和素磁颗粒悬浮液的制备:

[0064] 取浓度是100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒溶液0.72毫升(72mg),加入15mL的TBST溶液充分混匀15分钟后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒。重复清洗3次后在100mM PBS、0.1%吐温-20、0.1%Proclin300,pH7.2的缓冲液中配成磁珠浓度为0.072%的固相试剂,2~8℃保存。

[0065] (2)吖啶酯标记工艺:

[0066] 将500ug抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心30s)后加入TRIS冲溶液,充分混匀,混匀后加入15μl 2.5mg/mL吖啶酯DMF溶液,用离心机室温条

件下离心45s。将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,之后将暗盒放入气浴恒温振荡器(23℃),混匀3.5h。加入2mL 25% 赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(23℃),中速混匀,封闭时间为1.5h。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪上进行纯化(葡聚糖凝胶G25预装柱),用PB缓冲液洗脱,分步收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的神经元特异性烯醇化酶抗体浓溶液用100mM PBS、0.1% 吐温-20、0.1% Proclin300, pH6.0的缓冲液稀释至终浓度为0.2μg/ml,2~8℃保存。

[0067] (3) 偶联标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体制备工艺:

[0068] 将500ug抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入TRIS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入2ml 2mg/ml生物素的DMF溶液,用离心机室温条件下离心30s。2~8℃混匀4小时。加入1mL 20% 赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封闭时间为1h。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪(葡聚糖凝胶G250柱)纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的神经元特异性烯醇化酶抗体浓溶液用50mM MES、0.05% 吐温-20、0.05% Proclin300, pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为1.0μg/ml,2~8℃保存。

[0069] 将750ug抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入磷酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5ml 3mg/ml生物素的DMF溶液,用离心机室温条件下离心45s。4℃混匀6小时。加入3mL 25% 赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(23℃),中速混匀,封闭时间为2h。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪(葡聚糖凝胶G250柱)纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的神经元特异性烯醇化酶抗体浓溶液用100mM PBS、0.1% 吐温-20、0.1% Proclin300, pH6.0的缓冲液稀释至终浓度为1.2μg/ml,2~8℃保存。

[0070] 实施例3神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测试剂盒的制备:

[0071] (1) 链霉亲和素磁颗粒悬浮液的制备:

[0072] 取浓度100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒溶液0.5mL(50mg),加入10mL的TBST溶液充分混匀10min,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒。重复清洗3次后使用50mM MES、0.05% 吐温、0.05% Proclin300, pH6.5的缓冲液中配成磁珠浓度为0.05%的固相试剂,2~8℃保存。

[0073] (2) 吲哚酯标记工艺:

[0074] 将250ug抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入PBS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5μl 2mg/ml吲哚酯DMF溶液,用离心机室温条件下离心0.5min。将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,之后将暗盒放入气浴恒温振荡器(25℃),混匀2h。加入1mL 20% 赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封闭时间为1h。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪上进行纯化(葡聚糖凝胶G25预装柱),用PB缓冲液洗脱,分步收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的神经元特异性烯醇化酶抗体浓溶液用50mM MES、0.05% 吐温、0.05% Proclin300, pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为0.1μg/ml,2~8℃保存。

[0075] (3) 偶联标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体制备工艺:

[0076] 将500ug抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入TRIS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入2ml 2mg/ml生物素的DMF溶液,用离心机室温

条件下离心30s。2~8℃混匀3小时。加入1mL 20%赖氨酸封闭液，放入气浴恒温振荡器(25℃)，中速混匀，封闭时间为2h。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪(葡聚糖凝胶G250柱)纯化，用PB缓冲液洗脱，分部收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的神经元特异性烯醇化酶抗体浓溶液用50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300, pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为1.0μg/mL,2~8℃保存。

[0077] 实施例4:神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测试剂盒检测方法:

[0078] 以全自动化学发光免疫分析仪(CM180)为检测工具,方法学为双抗体夹心法,仪器依次加入10 μ L的血清样本,50 μ L吖啶酯标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体,50 μ L生物素标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体及40 μ L链霉亲和素磁颗粒。孵育20min后,进行磁分离。仪器将反应物送入暗室,一次加入发光底物液A液(HNO₃溶液)和B液(NaOH溶液)进行反应,最后记录光量子数。

[0079] 实施例5:神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测试剂盒性能评价

[0080] (1) 准确度(回收率)

[0081] 将浓度约为150ng/mL(允许其浓度偏差为±20%)的NSE样品(A)加入到2~5ng/mL样品(B)中,所加入的样品A与样品B之间的体积比例为1:9,按公式(1)计算回收率R,回收率应在(85%~115%)范围内。

$$[0082] \quad R = \frac{c \times (V_0 + V) - c_0 \times V_0}{V \times c_c} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

[0083] 式中:R—回收率;

[0084] V—样品A的体积：

[0085] V_0 —样品B的休积.

[0086] c—样品B加入样本A后的检测浓度：

[0087] c_0 —样品B的检测浓度：

[0088] c 一样是A的浓度

[0089] 素1NSE准确度测试数据

测定次数	A 样本浓度 (ng/mL)	B 样本浓度 (ng/mL)	A+B 混合浓度 (ng/mL)	回收率
Rep1	156.94	2.31	17.05	96.35%
Rep2	156.18	2.09	17.08	
均值	156.56	2.20	17.07	

〔0091〕 (2) 空白限

[0092] 平行测定零值一级校准品或样本稀释液20次,记录其信号值,计算均数M和标准差SD,并计算 $M+2SD$ 的值,测定相邻浓度一级校准品3次,记录其信号值,取平均值。根据零值一级校准品和相邻浓度一级校准品之间的浓度—信号值结果进行两点线性回归拟合出一次方程, $M+2SD$ 所对应的信号值带入方程,所得浓度即为空白限,结果应小于2.5ng/ml。

[0093] 表2NSE空白限测试数据

测定次数	一级校准品 A	一级校准品 B
Rep1	184	10654
Rep2	175	11058
Rep3	234	11126
Rep4	220	
Rep5	197	
Rep6	217	
Rep7	211	
Rep8	217	
Rep9	248	
Rep10	257	
Rep11	195	/
Rep12	209	
Rep13	206	
Rep14	215	
Rep15	216	
Rep16	200	
Rep17	198	
Rep18	184	
Rep19	183	
Rep20	192	
测定均值	208	10946
样品	一级校准品 A	一级校准品 B

浓度 (ng/mL)	0.00	5.00
标准差 (SD)	21	/
均值+2SD	251	/
检出限 (ng/mL)	0.020	

[0096] (3) 线性

[0097] 将接近线性范围上限的高值样本按一定比例稀释为至少5种浓度,其中低值浓度样本须接近线性范围的下限。对每一浓度的样本均重复检测3次,计算平均值,将结果平均值和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合,计算线性相关系数r,结果应符合要求(线性范围为2.5ng/mL~500ng/mL,线性相关系数r≥0.9900)。

[0098] 由表3NSE线性测试数据及图1NSE发明专利试剂及进口试剂标准曲线对比图可以看出,发明专利试剂与进口试剂相比具有更宽的线性范围,以及更高的线性相关系数,进而可以保证在检测范围内提供更准确的检验结果。

[0099] 表3NSE线性测试数据

[0100]

理论值ng/mL)	L6	L5	L4	L3	L2	L1	相关系数(r)
	2.50	7.50	30.00	125.00	250.00	500.00	
测定值(ng/mL)	2.9	7.60	30.54	130.21	258.08	517.57	1.0000
	2.65	7.50	31.02	129.61	261.95	516.50	
测定均值(ng/mL)	2.78	7.55	30.78	129.91	260.02	517.04	
发明试剂光量子数	201	16325	68126	168817	651194	1515893	0.999
进口试剂光量子数	3396	14251	46941	111394	384807	789517	0.995

[0101] (4) 重复性

[0102] 用低、高两种不同浓度的样本各重复检测10次，计算10次测量结果的平均值(M)和标准差(SD)，按公式(2)计算变异系数(CV)，变异系数(CV)应≤8.0%。

[0103] CV=SD/M×100% (2)

[0104] 式中:CV—变异系数;

[0105] SD—测量结果的标准差:

[0106] M—测量结果的平均值。

[0107] 表4NSE重复性测试数据

表10-1 主要经济指标数据

测定次数	低值样本 (ng/mL)	高值样本 (ng/mL)
Rep1	10.82	103.64
Rep2	10.30	104.03
Rep3	10.34	104.20
Rep4	10.86	104.33
Rep5	10.62	102.25
Rep6	10.10	102.63
Rep7	10.15	102.79
Rep8	10.42	100.89
Rep9	9.91	101.26
Rep10	9.95	101.42
测定均值M	10.35	102.74
SD	0.34	1.28
CV	3.2%	1.2%

[0109] (5) 批间差

[0110] 用3个批号试剂盒分别检测同一份样本，则3个批号试剂盒之间的批间变异系数(CV)≤15.0%。

[0111] 表5NSE批间差测试数据

[0112]

测定次数	低值样本(ng/mL)			高值样本(ng/mL)		
	第一批	第二批	第三批	第一批	第二批	第三批
Rep1	10.82	10.82	10.65	105.07	103.64	102.05
Rep2	10.30	10.28	10.24	105.47	104.03	102.75
Rep3	10.34	10.23	10.73	107.82	104.20	101.50
Rep4	10.86	10.64	10.55	107.96	104.33	102.99
Rep5	10.62	10.31	10.58	105.78	102.25	100.65
Rep6	10.10	9.80	10.38	104.03	102.63	100.45
Rep7	10.15	9.94	10.16	106.35	102.79	102.69
Rep8	10.42	10.31	10.60	101.19	100.89	99.88
Rep9	9.91	9.89	10.35	101.57	101.26	101.98
Rep10	9.95	9.56	10.24	100.68	101.42	101.50
测定均值	10.32			102.99		
标准差 (SD)	0.33			2.14		
批间变异系数(CV)	3.16%			2.08%		

[0113] (6) 热稳定性

[0114] 试剂盒在37℃条件下放置14天,校准品及临床光量子数衰减应≤±15%。

[0115] 表6热稳定性测试数据

[0116]

测 试 样 本 说 明	理论浓度 (ng/mL)	NSE 高温稳定性数据								
		零时间 2-8℃		14 天 2-8℃			14 天 37℃			
		平均光 量子数	CV	平均光 量子数	CV	与零时 间比光 量子数衰 减率	平均光 量子数	CV	与零时 间光量 子数衰 减率	
生理盐水	0	256	95.34%	173	15.17%	-32.62%	199	6.77%	-22.46%	15.07%
NSE 校准-1	0	201	11.27%	185	13.21%	-7.96%	163	1.62%	-18.91%	-11.89%
NSE 校准-2	5	16325	1.46%	15626	6.36%	-4.28%	15308	7.28%	-6.23%	-2.04%
NSE 校准-3	20	68126	0.38%	66045	2.60%	-3.05%	66000	1.28%	-3.12%	-0.07%
NSE 校准-4	50	168817	2.34%	160706	0.65%	-4.80%	164679	1.57%	-2.45%	2.47%
NSE 校准-5	200	651194	1.09%	655329	0.03%	0.63%	652676	0.20%	0.23%	-0.40%
NSE 校准-6	500	1515893	0.85%	1456710	0.26%	-3.90%	1431320	1.60%	-5.58%	-1.74%
平均衰减率				校准平均衰减		-3.89%	校准平均衰减		-6.01%	-2.28%
NSE 临床-1	4.83	15503	1.13%	15235	0.53%	-1.73%	15359	0.70%	-0.93%	0.81%
NSE 临床-2	6.02	20189	0.44%	20092	2.83%	-0.48%	19777	4.56%	-2.04%	-1.57%
NSE 临床-3	6.13	20070	0.41%	19598	2.72%	-2.35%	19914	0.06%	-0.77%	1.62%
NSE 临床-4	19.55	58781	0.01%	57836	0.28%	-1.61%	55111	0.22%	-6.24%	-4.71%
NSE 临床-5	23.03	78501	0.85%	75736	1.21%	-3.52%	74925	1.42%	-4.56%	-1.07%

[0117]

平均衰减率	临床平均衰减	-1.94%	临床平均衰减	-2.91%	-0.98%
-------	--------	--------	--------	--------	--------

[0118] (7) 抗干扰

[0119] 检测结果不受黄疸(胆红素<72mg/dL)、高脂血(症)(脂肪乳剂<1800mg/dL、类风湿因子(1500U/mL)和生物素(<72ng/mL)的影响。

[0120] 标准:回收率在初始值±10%范围内。

[0121] (8) 特异性

[0122] 测定浓度为500μg/L的非特异性神经元烯醇化酶(NNE)和浓度为100μg/L的细胞角蛋白19片段(CYFRA21-1)样本,其测定结果应不高于0.5μg/L。

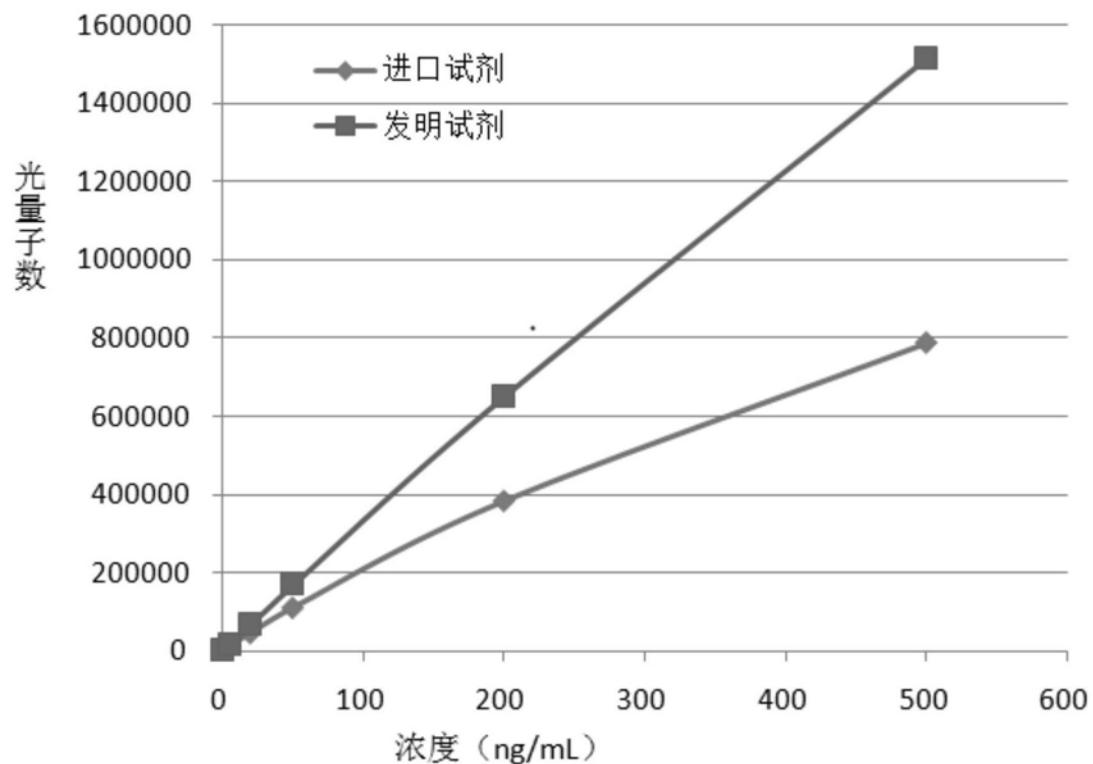


图1

专利名称(译)	神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN109187971A	公开(公告)日	2019-01-11
申请号	CN201810939822.4	申请日	2018-08-17
[标]发明人	李磊 孟令敏 王凯 孙成艳 高威		
发明人	李磊 孟令敏 王凯 孙成艳 高威		
IPC分类号	G01N33/573 G01N21/76 G01N33/532 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/58		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/532 G01N33/54326 G01N33/573 G01N33/577 G01N33/58 G01N2800/164 G01N2800/28 G01N2800/52		
代理人(译)	李外		
外部链接	Espacenet	Sipo	

摘要(译)

本发明提供一种神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法，属于体外检测技术领域。该试剂盒包括：链霉亲和素磁颗粒悬浮液、化学发光标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体和偶联标记物标记的神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体。本发明提供一种神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测试剂盒的制备方法。本发明的神经元特异性烯醇化酶化学发光免疫检测试剂盒为全自动的测量样本，并直接给出数值，减少人为操作误差，并且实现无人值守，缩短了临床检测所需的时间，同时检测精度较高，试剂与仪器组成封闭系统，系统误差小。

