



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104198728 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201410417807. 5

G01N 33/531 (2006. 01)

(22) 申请日 2014. 08. 22

G01N 33/532 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

(71) 申请人 广西南宁隆吉维特生物科技有限公司

地址 530000 广西壮族自治区南宁市总部路
3 号中国 - 东盟科技企业孵化基地二期
9 号厂房四层 411-412 室

(72) 发明人 张健 卢奕 李会强 黄昕
郭宏伟 邹春林

(74) 专利代理机构 北京华凯弘信专利代理事务
所(特殊普通合伙) 11463

代理人 李丙林 张玲

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

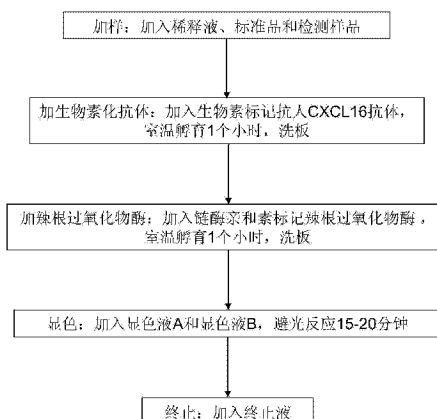
权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒及其制备和使用方法

(57) 摘要

本发明提供了一种人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒及其制备和使用方法。根据本发明一方面提供的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒,包括包被有羊抗人 CXCL16 单克隆抗体的酶标反应板, CXCL16 标准品,生物素标记抗人 CXCL16 抗体以及链酶亲和素标记辣根过氧化物酶。根据本发明另一方面提供的上述试剂盒的制备方法,包括制备:包被有羊抗人 CXCL16 单克隆抗体的酶标反应板、CXCL16 标准品、生物素标记抗人 CXCL16 抗体以及链酶亲和素标记辣根过氧化物酶。根据本发明又一方面提供的上述试剂盒的使用方法,包括加样、加生物素化抗体、加辣根过氧化物酶、显色以及终止步骤。



1. 一种人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒,包括:包被有羊抗人 CXCL16 单克隆抗体的酶标反应板, CXCL16 标准品,生物素标记抗人 CXCL16 抗体,链酶亲和素标记辣根过氧化物酶。

2. 根据权利要求 1 所述的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒,其中,所述 CXCL16 标准品由重组人 CXCL16 制备,共 6 瓶,其含 CXCL16 的浓度范围为 0-10ng/ml;所述生物素标记抗人 CXCL16 抗体的浓度为 125-250ng/ml。

3. 根据权利要求 2 所述的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒,还包括洗涤液,稀释液,显色液 A、显色液 B 和终止液。

4. 根据权利要求 3 所述的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒,其中,所述洗涤液为含吐温的磷酸盐缓冲液,所述稀释液为含 BSA 的磷酸盐缓冲液,所述显色液 A 为含 H_2O_2 的磷酸盐柠檬酸缓冲液,所述显色液 B 为含 TMB 的柠檬酸缓冲液,所述终止液为 1-2M 的 H_2SO_4 溶液。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒的制备方法,包括包被有羊抗人 CXCL16 单克隆抗体的酶标反应板的制备, CXCL16 标准品的制备,生物素标记抗人 CXCL16 抗体的制备,链酶亲和素标记辣根过氧化物酶的制备。

6. 根据权利要求 5 所述的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒的制备方法,其中,包被有羊抗人 CXCL16 单克隆抗体的酶标反应板的制备过程为:取空白酶标反应板,每孔加入 100-200 μ l 的羊抗人 CXCL16 单克隆抗体,室温过夜孵育,弃去孔内液体,拍干后进行封闭。

7. 根据权利要求 6 所述的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒的制备方法,其中,所述封闭过程为:每孔加入 250-350 μ l 封闭液,孵育后弃去孔内液体,拍干后风干。

8. 根据权利要求 7 所述的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒的制备方法,其中,所述封闭过程中的孵育条件为 37℃ 孵育 2 个小时或者 4℃ 过夜孵育。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒的制备方法,其中,包被的所述羊抗人 CXCL16 单克隆抗体的浓度为 667-1000ng/ml,所述封闭液为含有 BSA 和蔗糖的 0.01M 的磷酸盐缓冲液。

10. 一种检测人血清中 CXCL16 含量的方法,使用权利要求 1 至 5 中任一项所述的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒,包括以下步骤:

(1) 加样:取所述 CXCL16 标准品分别加入所述酶标反应板,作为标准孔;所述酶标反应板上除所述标准孔外为样品孔,所述样品孔内依次加入所述稀释液和检测样品,所述稀释液和检测样品的加入量相等,且所述稀释液和检测样品的加入量之和与所述 CXCL16 标准品的加入量相等;所述酶标反应板的加样顺序为先于所述样品孔内加入所述稀释液,然后于所述标准孔内加入所述标准品,最后于所述样品孔内加入所述检测样品;

(2) 加生物素化抗体:取所述生物素标记抗人 CXCL16 抗体加入所述酶标反应板的标准孔和样品孔,室温孵育 1 个小时,洗板;

(3) 加辣根过氧化物酶:取所述链酶亲和素标记辣根过氧化物酶加入所述酶标反应板的标准孔和样品孔,室温孵育 1 个小时,洗板;

(4) 显色:向所述标准孔和样品孔中分别依次加入所述显色液 A 和所述显色液 B,避光反应 15-20 分钟;

(5) 终止:用所述终止液终止反应。

人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒及其制备和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学检测领域,具体而言,涉及一种人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒及其制备和使用方法。

背景技术

[0002] 趋化因子 (chemokines, CK) 是具有多种生物学功能的小分子蛋白质,是细胞因子家族中非常重要的成员。CK 分子中均有 4 个保守的半胱氨酸 (C),根据其氨基端 (N 端) 前两个半胱氨酸位置将趋化因子分为 4 类: C 类、CC 类、CXC 类和 CX3C 类,相应受体分别称为 CR、CCR、CXCR 与 CX3CR。目前,所发现的趋化因子主要属于 CXC 类和 CC 类。趋化因子及其受体分子作为控制靶点,可用于相关疾病的控制和治疗。

[0003] CXCL16 是一种独特的 CXC 趋化因子,以跨模型和可溶性两种形式存在。全长的 CXCL16 是 1 个跨膜型趋化因子,由 4 个结构域组成,即:趋化结构域、糖基化黏蛋白样柄、单螺旋的跨膜结构域及胞浆结构域,前两者相连接形成胞外区域。CXCR6 是 CXCL16 的唯一受体,主要在记忆性 T 细胞、B 细胞、树突状细胞和激活的 CD₈⁺T 淋巴细胞中表达。

[0004] 趋化因子与靶细胞表面七次跨膜的 G 蛋白偶联受体相结合,通过信号转导途径介导细胞迁移。肿瘤组织中趋化因子及受体为肿瘤细胞生长、黏附及定向迁移提供条件,与肿瘤转移密切相关。CXCL16 在细胞外液形成一定浓度梯度引导 CXCR6(+) 靶细胞定向游走,快速募集靶细胞进行应答,稳定 CXCR6(+) 细胞迁移和组织归巢。在肉瘤、胶质瘤、恶性黑色素瘤、乳腺癌、肺癌、食道癌、卵巢癌、宫颈癌等癌细胞中均存在 CXCR6 的过度表达。CXCL16 在细胞外液形成一定浓度梯度引导 CXCR6(+) 靶细胞定向游走,快速募集靶细胞进行应答,稳定 CXCR6(+) 细胞迁移和组织归巢。此外研究表明,CXCL16 在动脉粥样硬化、风湿免疫疾病及其他炎症性疾病中起重要作用。

[0005] 可见 CXCL16 无论是对炎症的评估还是对肿瘤的监测都有很高的价值,将其作为疾病的指标的研究也越来越受到重视。目前国外已有测定 CXCL16 的 ELISA 试剂盒面试,但多为仅供科研应用,因操作耗时等因素还不适合用于临床,如 R&D Systems 的 Immunoassay DCX160 系列。而国内测定 CXCL16 的 ELISA 试剂盒,虽然价格适中,但试剂盒质量不稳定,灵敏度和准确度都达不到临床应用的要求。

[0006] 因此,为了解决现有技术中的上述不足,本发明提出了一种新的解决方案。

发明内容

[0007] 为了解决现有技术中的上述问题,本发明一方面提供了一种人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒,另一方面提供了上述人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒的制备和使用方法。根据本发明提供的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒,成本低,稳定性好,具有较高的灵敏度和准确度;根据本发明另一方面提供的上述人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒的制备和使用方法,操作简单,步骤简化,用时较短。

[0008] 本发明一方面提供了一种人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒,包括:包被有羊抗

人 CXCL16 单克隆抗体的酶标反应板, CXCL16 标准品, 生物素标记抗人 CXCL16 抗体, 链酶亲和素标记辣根过氧化物酶。

[0009] 优选地, 所述 CXCL16 标准品由重组人 CXCL16 制备, 共 6 瓶, 其含 CXCL16 的浓度范围为 0-10ng/ml; 所述生物素标记抗人 CXCL16 抗体的浓度 125-250ng/ml。

[0010] 进一步地, 所述人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒还包括洗涤液, 稀释液, 显色液 A、显色液 B 和终止液。

[0011] 进一步地, 所述洗涤液为含吐温的磷酸盐缓冲液, 所述稀释液为含 BSA 的磷酸盐缓冲液, 所述显色液 A 为含 H_2O_2 的磷酸盐柠檬酸缓冲液, 所述显色液 B 为含 TMB 的柠檬酸缓冲液, 所述终止液为 1-2M 的 H_2SO_4 溶液。

[0012] 本发明另一方面提供了所述人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒的制备方法, 包括包被有羊抗人 CXCL16 单克隆抗体的酶标反应板的制备, CXCL16 标准品的制备, 生物素标记抗人 CXCL16 抗体的制备, 链酶亲和素标记辣根过氧化物酶的制备。

[0013] 进一步地, 包被有羊抗人 CXCL16 单克隆抗体的酶标反应板的制备过程为: 取空白酶标反应板, 每孔加入 100-200 μ l 的羊抗人 CXCL16 单克隆抗体, 室温过夜孵育, 弃去孔内液体, 拍干后进行封闭。

[0014] 进一步地, 所述封闭过程为: 每孔加入 250-350 μ l 封闭液, 孵育后弃去孔内液体, 拍干后风干。

[0015] 可选地, 所述封闭过程中的孵育条件为 37°C 孵育 2 个小时或者 4°C 过夜孵育。

[0016] 优选地, 包被的所述羊抗人 CXCL16 单克隆抗体的浓度为 667-1000ng/ml, 所述封闭液为含有 BSA 和蔗糖的 0.01M 的磷酸盐缓冲液。

[0017] 本发明又一方面提供了一种检测人血清中 CXCL16 含量的方法, 使用所述人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒, 包括以下步骤:

[0018] (1) 加样: 取所述 CXCL16 标准品分别加入所述酶标反应板, 作为标准孔; 所述酶标反应板上除所述标准孔外为样品孔, 所述样品孔内依次加入所述稀释液和检测样品, 所述稀释液和检测样品的加入量相等, 且所述稀释液和检测样品的加入量之和与所述 CXCL16 标准品的加入量相等; 所述酶标反应板的加样顺序为先于所述样品孔内加入所述稀释液, 然后于所述标准孔内加入所述标准品, 最后于所述样品孔内加入所述检测样品;

[0019] (2) 加生物素化抗体: 取所述生物素标记抗人 CXCL16 抗体加入所述酶标反应板的标准孔和样品孔, 室温孵育 1 个小时, 洗板;

[0020] (3) 加辣根过氧化物酶: 取所述链酶亲和素标记辣根过氧化物酶加入所述酶标反应板的标准孔和样品孔, 室温孵育 1 个小时, 洗板;

[0021] (4) 显色: 向所述标准孔和样品孔中分别依次加入所述显色液 A 和所述显色液 B, 避光反应 15-20 分钟;

[0022] (5) 终止: 用所述终止液终止反应。

[0023] 根据本申请提供的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒及其制备和使用方法, 能够带来以下有益效果: 本发明提供的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒, 成本低, 稳定性好, 具有较高的灵敏度 (灵敏度可高达 0.009ng/ml) 和准确度, 弥补了我国国内自主研发人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒的空缺, 为人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒的临床应用奠定了基础; 本发明另一方面提供的上述人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒的制备和

使用方法,优化了试验条件,操作简单,步骤简化,用时较短,且能够取得较好的结果,为基础研究和临床提供服务,有助于提高临床诊治水平。

附图说明

[0024] 图 1 示出了本发明实施例提供的使用本发明提供的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒检测人血清中 CXCL16 含量的方法的流程示意图;

[0025] 图 2 示出了本发明实施例提供的使用本发明提供的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒检测人血清中 CXCL16 含量的检测的标准曲线。

具体实施方式

[0026] 下面参照附图详细介绍本发明的示例性实施例。提供这些示例性实施例的目的是为了使得本领域普通技术人员能够清楚地理解本发明,并且根据这里的描述能够实现本发明。附图和具体实施例不旨在对本发明进行限定,本发明的范围由所附权利要求限定。

[0027] 根据本发明一方面提供的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒,包括:包被有羊抗人 CXCL16 单克隆抗体的酶标反应板,CXCL16 标准品,生物素标记抗人 CXCL16 抗体,链酶亲和素标记辣根过氧化物酶。

[0028] 上述酶标反应板为 96 孔或 48 孔或其他规格的酶标反应板,且优选为可灵活拆卸的酶标反应板。需要注意的是,本发明提供的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒中的包被有羊抗人 CXCL16 单克隆抗体的酶标反应板,优选地,被装入抽真空的不透光的锡箔纸袋子内,以延长羊抗人 CXCL16 单克隆抗体的活性,进而延长本试剂盒的使用寿命。

[0029] 上述 CXCL16 标准品由重组人 CXCL16 制备,共 6 瓶,其含 CXCL16 的浓度范围为 0-10ng/ml,分别为 10ng/ml、5ng/ml、2.5ng/ml、1.25ng/ml、0.625ng/ml 以及 0pg/ml;所述生物素标记抗人 CXCL16 抗体的浓度为 125-250ng/ml,优选地,该生物素标记抗人 CXCL16 抗体的浓度为 250ng/ml。

[0030] 本发明提供的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒,还包括洗涤液,稀释液,显色液 A、显色液 B 和终止液。其中,上述洗涤液为 pH7.2-7.4 的含 0.05%吐温-20(Tween-20)的磷酸盐缓冲液(PBS),上述稀释液为 pH7.2-7.4 的含 0.1%牛血清白蛋白(BSA)的磷酸盐缓冲液(PBS),显色液 A 为含体积比为 0.054%的 H_2O_2 的磷酸盐柠檬酸缓冲液,显色液 B 为含浓度为 0.48g/l 的 TMB 的柠檬酸缓冲液,终止液为 1-2M 的 H_2SO_4 溶液,优选地,终止液为 1M 的 H_2SO_4 溶液。

[0031] 需要注意的是,上述洗涤液为浓缩的洗涤液,此浓缩倍数并不局限于某一个数,可以根据试剂盒生产的需要而确定,比如可以是 20 倍或 40 倍,使用本试剂盒进行检测时要进行相应倍数的稀释方可使用,且稀释前应先将装有该洗涤液的试剂瓶上下颠倒反复混匀;上述显色液 A 和显色液 B,优选地,装入棕色试剂瓶内,且该棕色试剂瓶的瓶口处设有滴头,通过该滴头滴出的一滴液体的容积为 50 μ l,以方便使用本试剂盒进行检测。

[0032] 根据本发明的另一方面提供了上述人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒的制备方法,包括包被有羊抗人 CXCL16 单克隆抗体的酶标反应板的制备,CXCL16 标准品的制备,生物素标记抗人 CXCL16 抗体的制备,链酶亲和素标记辣根过氧化物酶的制备。

[0033] 上述包被有羊抗人 CXCL16 单克隆抗体的酶标反应板的制备过程为:取空白酶标

反应板,每孔加入 100-200 μ l 的浓度为 667-1000ng/ml 的羊抗人 CXCL16 单克隆抗体,室温过夜孵育,弃去孔内液体,拍干后进行封闭。优选地,每孔加入 150 μ l 的浓度为 667ng/ml 的羊抗人 CXCL16 单克隆抗体,室温过夜孵育,弃去孔内液体,拍干后进行封闭。

[0034] 需要说明的是,此处孵育和以下所有孵育,不管孵育条件和时间是怎样的,孵育时酶标反应板都应该盖上盖子或贴上封板膜,上述盖子和封板膜的罩住酶标反应板的所有孔,以防止酶标反应板内的液体挥发或溅出;此处拍干和以下所有拍干,最好让酶标反应板在不掉屑的吸水纸或棉毛巾上进行拍干,且每次拍干应更换干净的吸水纸或棉毛巾,对可拆卸的酶标反应板拍干时注意不要使板条掉离板框,以保证使用本试剂盒检测的准确性。

[0035] 上述羊抗人 CXCL16 单克隆抗体也需要制备,其原浓度为 100 μ g/ml,用 pH7.4 的 0.1M 的磷酸缓冲液 (PB) 稀释 1:150-1:100,即稀释到浓度为 667-1000ng/ml。

[0036] 上述封闭过程为:每孔加入 250-350 μ l 的封闭液 37℃ 孵育 2 个小时或者 4℃ 过夜孵育,优选地,每孔加入 300 μ l 的封闭液,孵育后弃去孔内液体,拍干后风干备用。上述封闭液为含有 BSA 和蔗糖的 0.01M 的磷酸盐缓冲液 (PBS),优选地,封闭液为含有 1% BSA 和 5% 蔗糖的 0.01M 的磷酸盐缓冲液。

[0037] 需要注意的是,上述封闭液并不局限于含有 BSA 和蔗糖的 0.01M 的磷酸盐缓冲液,可以是现有技术中已有的含其他成分的封闭液,比如含酪蛋白,只要是能够对已包被有羊抗人 CXCL16 单克隆抗体的酶标反应板能够起到封闭作用的溶液即可,以减少非特异性结合背景的影响。

[0038] 上述 CXCL16 标准品的制备:以重组人 CXCL16 (976-MC-025) 作为标准品,原液浓度为 25 μ g/ml,稀释 2500 倍至 10ng/ml,以 10ng/ml 作为最高点浓度,再做 2 倍倍比稀释,共稀释 4 个梯度,得 5ng/ml、2.5ng/ml、1.25ng/ml 以及 0.625ng/ml,另外取标准品稀释液作为最低点浓度,即 0ng/ml。此处标准品的稀释液为 pH7.2-7.4 的含 0.1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸盐缓冲液 (PBS)。

[0039] 上述生物素标记抗人 CXCL16 抗体的制备:以生物素化人 CXCL16 抗体 (BAF976) 作为第二抗体,将购买的 CXCL16 抗体浓度调制为约 5mg/ml,用 pH9.5 的 0.1M 的碳酸氢钠缓冲液透析,过夜,并于 280nm 处测吸光度值,计算抗体总量,将活化的生物素溶于二甲基甲酰胺 (DMF) 中,按照生物素与抗体的摩尔比为 20:1 的比例,将生物素缓慢、逐滴加入抗体溶液中,边滴加边搅拌,全部加入后室温搅拌 1 小时,然后将反应后的液体用 0.1M 的磷酸盐缓冲液于 4℃ 透析 24 小时,其中换液数次,充分除去未结合的生物素,即得浓度为 50 μ g/ml 的生物素化的人 CXCL16 抗体,用 pH7.2-7.4 的含 0.1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释 1:400-1:200,即稀释到浓度为 125-250ng/ml。

[0040] 上述链酶亲和素标记辣根过氧化物酶的制备:用含 5-10% BSA 的 0.01M 的 PBS 作为稀释液稀释到其工作浓度,即做 1:200 稀释。该链酶亲和素标记辣根过氧化物酶购自 R&D 公司,货号为 DY998。

[0041] 其他相关溶液的制备或配制实施例如下:

[0042] (1) 磷酸缓冲液 (0.1M, pH7.4): 取 500ml 的 ddH₂O (双蒸水) 加入 2.96g 的 NaH₂PO₄·2H₂O (磷酸二氢钠) 和 29g 的 Na₂HPO₄·12H₂O (磷酸氢二钠),充分溶解后,调 pH 至 7.4,加 ddH₂O 定容至 1L。

[0043] (2) 磷酸盐缓冲液 (0.1M, pH7.4): 取 800ml 的 ddH₂O (双蒸水) 加入 2.96g 的

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (磷酸二氢钠)、29g 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (磷酸氢二钠) 和 8.5g 的 NaCl (氯化钠), 充分溶解后, 调 pH 至 7.4, 加 ddH_2O 定容至 1L。

[0044] (3) 封闭液: 取 0.1g 的 BSA (牛血清白蛋白) 和 0.5g 的蔗糖溶于 10ml 的 PBS 溶液 (0.1M, pH7.4)。

[0045] (4) 显色液 A: 取 450ml 的 ddH_2O (双蒸水) 加入 8.2g 的醋酸钠、1.58g 的柠檬酸和 0.27ml 的 30% 的 H_2O_2 , 调节 pH 至 5.3, 用 ddH_2O 定容至 500ml, 分装, 4℃ 储存。

[0046] (5) 显色液 B: 取 400ml 的 ddH_2O (双蒸水) 加入 0.186g 的 EDTA (乙二胺四乙酸)、0.96g 的柠檬酸、0.54ml 的 10M 的 NaOH 、50ml 的丙三醇和 0.24g 的 TMB-HCl (四甲基联苯胺二盐酸盐) 调节 pH 值 3.0, 用 ddH_2O 定容至 500ml, 分装, 4℃ 储存, 整个配制过程应注意避光。

[0047] (6) 终止液: 取 400ml 的 ddH_2O (双蒸水) 加入 13.9ml 的 12M 的浓 H_2SO_4 , 混匀, 用去离子水定容至 500ml, 分装 4℃ 储存。

[0048] (7) 碳酸氢钠缓冲液 (0.1M, pH9.5): 取 8.4g 的 NaHCO_3 (碳酸氢钠) 溶于 8000ml 的 ddH_2O (双蒸水), 调节 pH 至 9.5, 用去离子水定容至 1L。

[0049] 图 1 示出了本发明实施例提供的使用本发明提供的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒检测人血清中 CXCL16 含量的方法的流程示意图。参照图 1, 本发明又一方面提供了一种检测人血清中 CXCL16 含量的方法, 使用权利要求 1 至 5 中任一项所述的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒, 即本发明又一方面提供了一种上述人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒的使用方法, 包括以下步骤:

[0050] (1) 加样: 取上述 CXCL16 标准品分别加入上述酶标反应板, 作为标准孔; 上述酶标反应板上除上述标准孔外为样品孔, 该样品孔内依次加入上述稀释液和检测样品, 该稀释液和检测样品的加入量相等, 且上述稀释液和检测样品的加入量之和与上述 CXCL16 标准品的加入量相等; 所述酶标反应板的加样顺序为先于所述样品孔内加入所述稀释液, 然后于所述标准孔内加入所述标准品, 最后于所述样品孔内加入所述检测样品;

[0051] (2) 加生物素化抗体: 取所述生物素标记抗人 CXCL16 抗体加入上述酶标反应板的标准孔和样品孔, 室温孵育 1 个小时, 洗板;

[0052] (3) 加辣根过氧化物酶: 取上述链酶亲和素标记辣根过氧化物酶加入上述酶标反应板的标准孔和样品孔, 室温孵育 1 个小时, 洗板;

[0053] (4) 显色: 向上述标准孔和样品孔中分别依次加入上述显色液 A 和显色液 B, 避光反应 15-20 分钟;

[0054] (5) 终止: 用上述终止液终止反应。

[0055] 需要说明的是, 使用本发明提供的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒进行检测前, 应将本试剂盒的整体 (包括酶标反应板和其包含的各种试剂) 静置于室温平衡 30 分钟左右, 因本发明提供的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒的保存的优选条件为 4℃, 若不平衡至室温因检测过程中孵育条件不足对检测结果有一定影响; 上述洗板均为洗板 3-5 次, 每次洗板将上述酶标反应板的所有孔内均加入 300-350 μl 的配制好的上述洗涤液, 混匀后静置 3-5 分钟, 拍干 (前文已介绍), 然后进行下一次洗板。

[0056] 需要注意的是, 使用本试剂盒时的孵育条件并不局限于上述室温孵育 1 个小时, 可以是室温孵育 1-2 个小时, 也可以是 37℃ 孵育 0.5-1 个小时, 只不过室温孵育 1 个小时为

上述步骤 (2) 与步骤 (3) 中最优选地孵育条件, 且上述步骤 (2) 与步骤 (3) 中的孵育条件也可以不一致。另外, 此处的室温和其他的室温一般都是指 25℃。

[0057] 上述步骤 (1) 中, 加入上述 CXCL16 标准品的量为 50-200 μ l, 优选地, 加入上述 CXCL16 标准品的量为 100 μ l, 则加入上述稀释液和检测样品的量均为 25-100 μ l, 优选地, 加入上述稀释液和检测样品的量均为 50 μ l。

[0058] 需要注意的是, 上述步骤 (1) 中, 样品孔内也可以不加入上述稀释液, 即不对检测样品做 2 倍稀释, 但是这样本底会偏高, 且稀释法比未稀释法相比稳定性要高。另外, 如果要采用未稀释法进行使用本试剂盒, 则加入上述 CXCL16 标准品的量与加入上述检测样品的量应相等。由此可知, 无论是否采用稀释法进行使用本试剂盒, 原则上上述标准孔与样品孔内的液体的量是一致的。

[0059] 还需要注意的是, 上述步骤 (1) 中的加样顺序, 若采用稀释法, 则上述酶标反应板的加样顺序为先于上述样品孔内加入上述稀释液, 然后于上述标准孔内加入上述标准品, 最后于上述样品孔内加入上述检测样品; 若不采用稀释法, 则上述酶标反应板的加样顺序为先于上述标准孔内加入上述标准品, 然后于上述样品孔内加入上述检测样品。此加样顺序并不局限于此, 但若采用稀释法则必须先加入稀释液, 标准品和检测样品先加哪个都是可以, 只不过后续的步骤要与该次序一致, 这样可以保证每个孔的反应时间是一直的, 先加样的孔也是先终止的孔, 因稀释液不与包被抗体反应所以应最先加入酶标反应板。

[0060] 上述步骤 (1) 结束后直接进行步骤 (2), 其间并不需要孵育、洗板, 则为一步法, 但使用本试剂盒并不局限于一步法, 也可以采用传统的两步法, 即上述步骤 (1) 结束后进行室温孵育 1-2 个小时, 洗板, 拍干, 然后进行上述步骤 (2)。

[0061] 使用本发明提供的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒若采用两步法, 则最长耗时为 5 个多小时, 但 5 个小时的反应时间无论对于临床推广还是对于酶联免疫检测 (ELISA) 本身来说都显得过长。本发明提供的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒中所应用的包被抗体为单克隆抗体, 生物素化抗体为多克隆抗体, 只要二者识别的抗原表位不是一个, 理论上就可将二抗与标本同时加入微孔, 让两种抗体同时与标本中各自的抗原表位结合而不会产生竞争并相互影响, 这样不仅可以将反应时间缩短, 也有助于降低本底、提高试剂盒检测结果的稳定性。

[0062] 综上所述, 把反应时间从“加抗原反应 2 小时、加抗体反应 2 小时、加酶反应 1 小时”缩短到“同时加抗原和抗体反应 1 小时、加酶反应 1 小时”的模式, 经实验发现顺利显色, 且梯度与浓度变化一致, 说明一步法可行, 不存在抗原表位的竞争。因此决定将一步法作为使用本发明提供的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒的最为优选的使用方法, 有利于将人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒推广普及于临床。

[0063] 需要说明的是, 上述步骤 (4) 中加入上述显色液 A 和显色液 B 后应混匀, 再避光反应 15-20 分钟; 上述步骤 (5) 除了用上述终止液终止反应, 还包括获得检测结果。

[0064] 上述获得检测结果包括定性结果和定量结果, 定性结果采用目测方法, 分别对比样品孔与标准孔的颜色, 即可得出检测结果, 颜色越深表示含 CXCL16 的浓度越高; 定量结果采用酶标仪测定波长 450nm 的吸光度, 通过标准孔的吸光度的 OD 值和浓度绘制标准曲线, 再通过样品孔的吸光度的 OD 值和标准曲线得出每个样品孔中含 CXCL16 的浓度值。

[0065] (1) 人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒的部分重要条件为: 用浓度为 1000ng/ml

的羊抗人 CXCL16 单克隆抗体包被,生物素标记抗人 CXCL16 抗体的浓度为 250ng/ml ;

[0066] (2) 检测样本介绍 :第 1 组为用于对比的乳腺癌标本 8 份,第 2 组为肿瘤转移阳性标本 16 份,第 3 组为肿瘤转移阴性标本 8 份,第 4 组为黄河医院体检对照 8 份 ;

[0067] (3) 加样 :取 CXCL16 标准品分别加入酶标反应板,每孔加入 100 μ l,作为标准孔 ;酶标反应板上除上述标准孔外为样品孔,样品孔内依次加入 50 μ l 的稀释液和 50 μ l 的检测样品 ;

[0068] (4) 加生物素化抗体 :取生物素标记抗人 CXCL16 抗体加入酶标反应板的标准孔和样品孔,每孔加入 50 μ l,封板,室温孵育 1 个小时,用洗涤液洗板 5 次,拍干 ;

[0069] (5) 加辣根过氧化物酶 :取链酶亲和素标记辣根过氧化物酶加入酶标反应板的标准孔和样品孔,每孔加入 100 μ l,封板,室温孵育 1 个小时,用洗涤液洗板 5 次,拍干 ;

[0070] (6) 显色 :向标准孔和样品孔中分别依次加入一滴显色液 A 和显色液 B,避光反应 15-20 分钟 ;

[0071] (7) 终止 :向标准孔和样品孔中分别加入 100 μ l 的终止液,混匀后,用酶标仪测定波长 450nm 的吸光度,获得 OD 值,绘制标准曲线 (见图 2, X 轴为标准品浓度值, Y 轴为 OD 值),计算并获得检测结果 (见表 1 和表 2)。

[0072] 表 1 本发明实施例提供的使用本发明提供的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒检测样品的 OD 值

[0073]

OD 值	标准孔第 1 组	第 2 组 (1-8)	第 2 组 (9-16)	第 3 组	第 4 组
1	1.5040.858	0.484	0.841	0.738	0.876
2	1.5430.551	0.693	0.738	0.781	1.056
3	1.1090.65	0.567	0.528	0.882	0.781
4	0.6150.792	0.63	0.514	0.929	0.828
5	0.3841.129	0.816	0.65	0.847	0.717
6	0.0490.988	0.004	0.701	0.944	0.74
7	-1.005	0.709	0.646	0.735	0.808
8	-0.991	0.81	0.957	0.953	0.876

[0074] 表 2 本发明实施例提供的使用本发明提供的人血清 CXCL16 酶联免疫检测试剂盒检测样品中含有的 CXCL16 的浓度值

[0075]

CCL 浓度值 (单位为 pg/ml)	标准孔	第 1 组	第 2 组(1-8)	第 2 组 (9-16)	第 3 组	第 4 组
1	10	1.716	0.869	1.667	1.399	1.769
2	5	0.996	1.294	1.399	1.506	2.426
3	2.5	1.199	1.028	0.952	1.787	1.506
4	1.25	1.534	1.156	0.925	1.937	1.631
5	0.625	2.79	1.598	1.199	1.684	1.349

[0076]

6	0	2.146	-	1.312	1.988	1.404
7	-	2.212	1.331	1.19	1.392	1.576
8	-	2.158	1.582	2.033	2.019	1.769

[0077] 由实施例 1 的结果可知,标准品的 OD 值还可以,大部检测样品能测出值,而且各组的含量有区别,浓度由高到低依次是第 1 组、第 3 组、第 4 组以及第 2 组。测不出值的情况有多种原因,比如样品污染、操作失误等。

[0078] 最后对于检测样品还需要说明一下,检测的样品为人的血清,将人血清静置于室温 30 分钟,对待测血清进行离心处理 10-20 分钟,即可进行检测。若待测血清不能及时检测,则需将待测血清置于 -80 至 -20℃ 条件冻存。

[0079] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

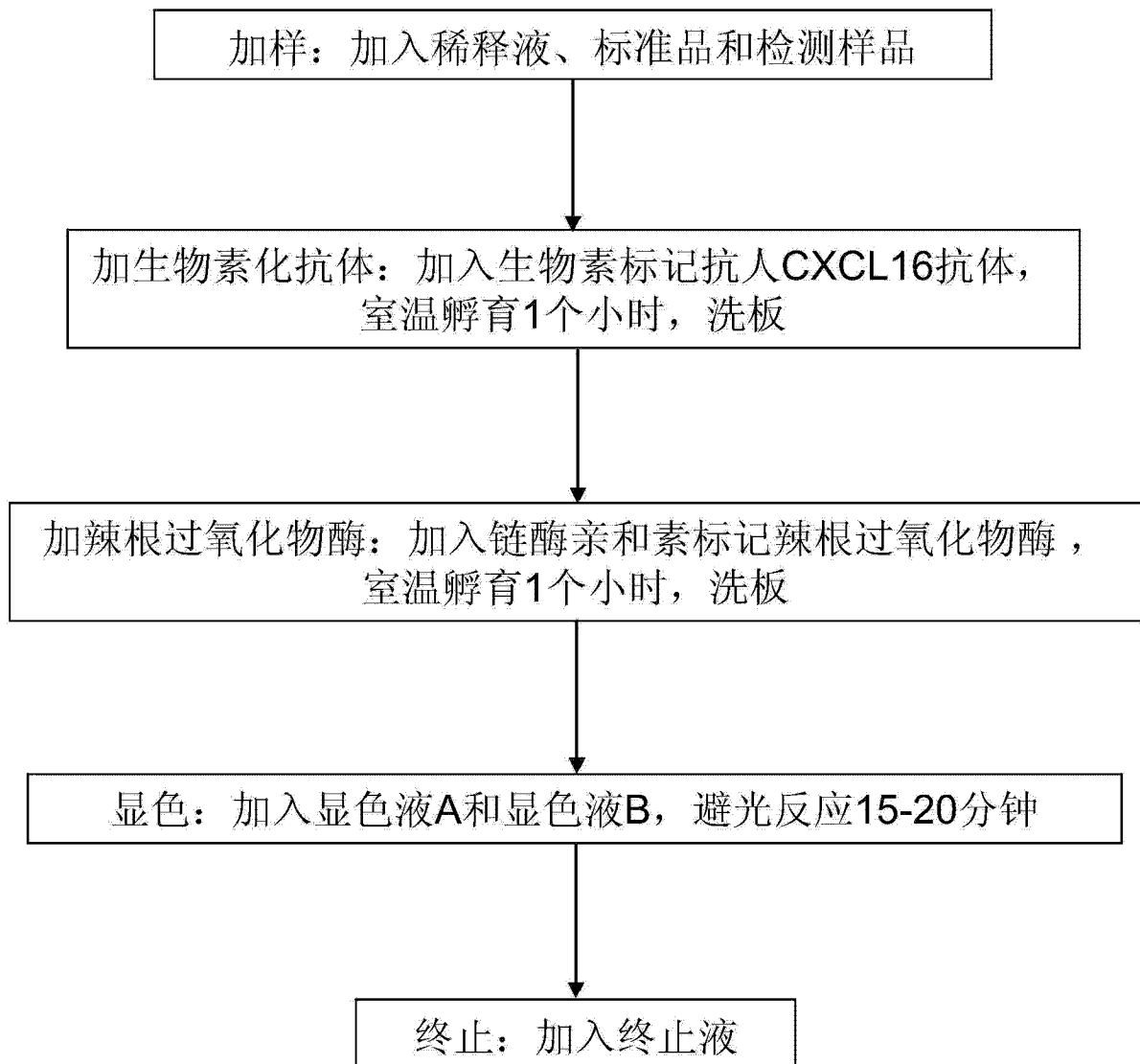


图 1

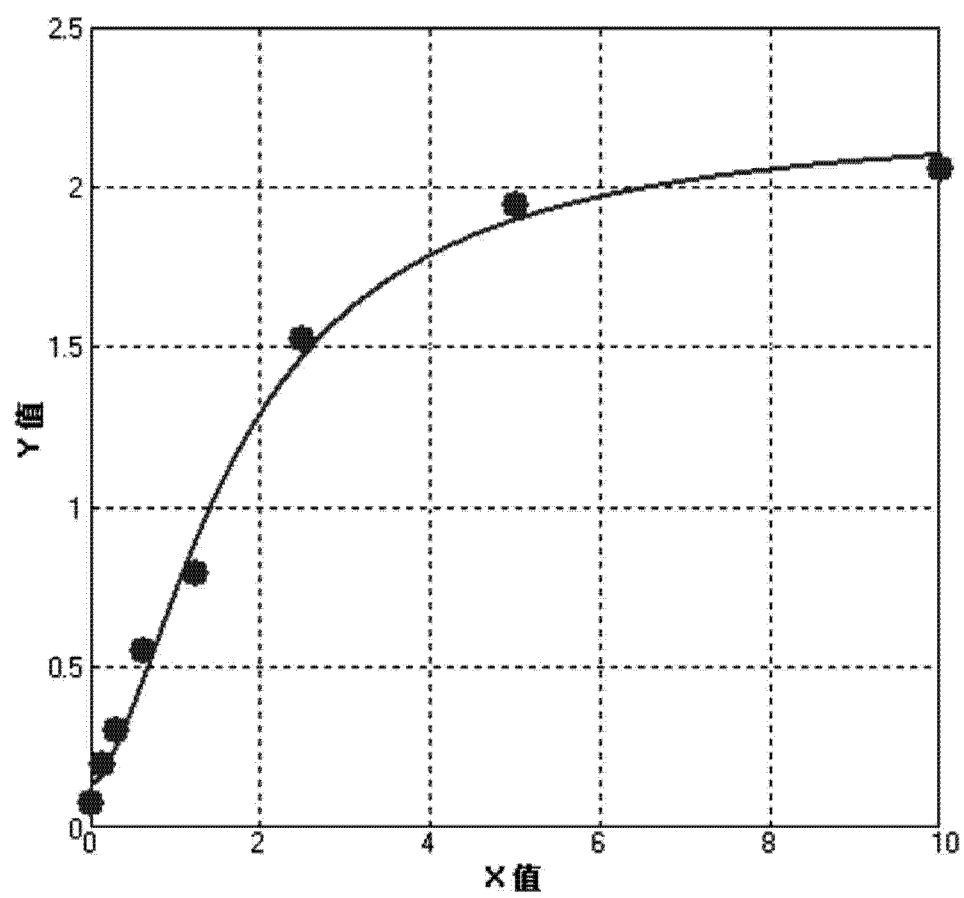


图 2

专利名称(译)	人血清CXCL16酶联免疫检测试剂盒及其制备和使用方法		
公开(公告)号	CN104198728A	公开(公告)日	2014-12-10
申请号	CN201410417807.5	申请日	2014-08-22
[标]申请(专利权)人(译)	广西南宁隆吉维特生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广西南宁隆吉维特生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广西南宁隆吉维特生物科技有限公司		
[标]发明人	张健 卢奕 李会强 黄昕 郭宏伟 邹春林		
发明人	张健 卢奕 李会强 黄昕 郭宏伟 邹春林		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/543 G01N33/535 G01N33/68		
代理人(译)	李丙林 张玲		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种人血清CXCL16酶联免疫检测试剂盒及其制备和使用方法。根据本发明一方面提供的人血清CXCL16酶联免疫检测试剂盒，包括包被有羊抗人CXCL16单克隆抗体的酶标反应板，CXCL16标准品，生物素标记抗人CXCL16抗体以及链酶亲和素标记辣根过氧化物酶。根据本发明另一方面提供的上述试剂盒的制备方法，包括制备：包被有羊抗人CXCL16单克隆抗体的酶标反应板、CXCL16标准品、生物素标记抗人CXCL16抗体以及链酶亲和素标记辣根过氧化物酶。根据本发明又一方面提供的上述试剂盒的使用方法，包括加样、加生物素化抗体、加辣根过氧化物酶、显色以及终止步骤。

