



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106093373 A

(43)申请公布日 2016.11.09

(21)申请号 201610359607.8

(22)申请日 2016.05.27

(71)申请人 安徽伊普诺康生物技术股份有限公司

地址 230000 安徽省合肥市包河工业区大连路与北京路交叉口西南角合肥华云印务有限公司综合东楼一至五层

(72)发明人 蔡晓辉 庄庆华 吴铮 徐运

(74)专利代理机构 杭州君度专利代理事务所
(特殊普通合伙) 33240

代理人 王桂名

(51)Int. Cl.

G01N 33/536(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种测定透明质酸的试剂盒

(57)摘要

本发明涉及医学及生物化学技术领域,具体来说是一种测定透明质酸的试剂盒。本发明的目的在于解决现有技术中透明质酸检测过程操作复杂、以及测定准确度低的问题,本发明解决上述技术问题提供的技术方案是:一种测定透明质酸的试剂盒,该试剂盒由试剂R1和试剂R2双液体组分组成试剂盒,其特征在于:所述的试剂R1为含无机盐离子、加速剂、表面活性剂、防腐剂的缓冲液;所述的试剂R2为含有标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒、助悬剂、防腐剂、稳定剂的缓冲液。本发明具有准确度高、操作方便等优点。

1. 一种测定透明质酸的试剂盒, 该试剂盒由试剂R1和试剂R2双液体组分组成试剂盒, 其特征在于: 所述的试剂R1为含有无机盐离子、加速剂、表面活性剂、防腐剂的缓冲液; 所述的试剂R2为含有标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒、助悬剂、防腐剂、稳定剂的缓冲液。

2. 如权利要求1所述的一种测定透明质酸的试剂盒, 其特征在于: 所述的缓冲液为Tris缓冲液、MOPS缓冲液、PBS缓冲液、MES缓冲液、甘氨酸缓冲液中的一种或多种组合而成, 所述的无机盐离子为氯化钠、氯化钾、硫酸钾中的一种或多种组合而成。

3. 如权利要求1所述的一种测定透明质酸的试剂盒, 其特征在于: 所述的加速剂为聚乙二醇-2000、聚乙二醇-6000、聚乙二醇-8000、聚乙烯吡咯烷酮中的一种或几种。

4. 如权利要求1所述的一种测定透明质酸的试剂盒, 其特征在于: 所述的稳定剂为牛血清白蛋白、蔗糖、海藻糖、EDTA中的一种或多种组合而成。

5. 如权利要求1所述的一种测定透明质酸的试剂盒, 其特征在于: 所述的防腐剂为苯酚、苯甲酸钠、叠氮钠中的一种或多种组合而成。

6. 如权利要求1所述的一种测定透明质酸的试剂盒, 其特征在于: 所述的表面活性剂为吐温系列、聚氧乙烯苯基醚、聚氧乙烯月桂醚系列中的一种或多种组合而成。

7. 如权利要求1所述的一种测定透明质酸的试剂盒, 其特征在于: 所述的助悬剂为阿拉伯胶、海藻酸钠、胶体二氧化硅、甘油中的一种或多种组合而成。

8. 如权利要求1所述的一种测定透明质酸的试剂盒, 其特征在于: 所述的彼此独立的试剂R1和试剂R2的成分及相应含量如下:

试剂R1:

Tris 缓冲液	30~170 mmol/L
氯化钠	50~250 mmol/L
聚乙二醇 - 2000	10~30 g/L
吐温 - 20	0.5~3.5 mL/L
叠氮钠	0.5 ~1.5 g/L

其溶剂为纯化水;

试剂R2:

Tris 缓冲液	20~100 mmol/L
牛血清白蛋白	10~40 g/L
甘油	5~15 g/L
叠氮钠	0.5~1.5 g/L

标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒 1~4 g/L

其溶剂为纯化水。

9. 如权利要求8所述的一种测定透明质酸的试剂盒, 其特征在于: 试剂盒的制备和使用包括以下步骤:

(1) 试剂R1液的配制:

(a) 按照试剂R1的组分含量, 将三羟甲基氨基甲烷溶于纯化水中, 搅拌均匀后, 配置成缓冲液;

(b) 按照试剂R1的组分含量, 将氯化钠、聚乙二醇-2000、叠氮钠、吐温-20溶于步骤(a)所制得的缓冲液中, 搅拌均匀即制得试剂R1液;

(2)所述的试剂R2的配制如下:

(a)、按照试剂R2的组分含量,将三羟甲基氨基甲烷溶于纯化水中,搅拌均匀后,配置成缓冲液;

(b)、按照试剂R2的组分含量,将牛血清白蛋白、甘油、叠氮钠溶于纯化水中,搅拌均匀即得分散液;

(c)用步骤(b)制得的分散液溶解标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒,使胶乳颗粒终浓度为2 g/L,然后超声分散得到试剂R2;

(3)用全自动生化分析仪测定反应后的吸光度差值;

(4)根据吸光度变化值计算出样本中的透明质酸的浓度。

10.如权利要求1所述的一种测定透明质酸的试剂盒,其特征在于:所述的标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒的制备方法如下:

(1)将粒径为120nm的胶乳颗粒,用50 mmol/L的MES缓冲液稀释胶乳颗粒到2 g/L,每mL溶液中加入EDAC 1.0 mg,室温反应1小时,在离心机内15000 rpm转速下离心30分钟,去上清,将沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中,超声分散;

(2)将步骤(1)的产物在离心机内15000 rpm转速下离心30分钟,弃上清,将沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中,使得胶乳颗粒最终浓度为4 g/L,超声分散,边搅拌边加入等体积的含8 mg/mL 抗人透明质酸抗体的MES稀释液,混合搅拌,室温反应2小时,胶乳颗粒最终浓度为2 g/L;

(3)将步骤(2)的产物在离心机内15000 rpm转速离心30分钟,弃上清,沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中超声分散,加入BSA,4℃封闭过夜;离心去上清,制得标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒。

一种测定透明质酸的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及医学及生物化学技术领域,具体来说是一种测定透明质酸的试剂盒。

背景技术

[0002] 透明质酸(HA)是人体基质的主要成分之一,为具D-葡萄糖醛酸及N-乙酰葡萄糖胺组成的双糖重复结构的一种粘多糖,分子量为4000万~8000万。又称玻尿酸,糖醛酸,基本结构是由两个双糖单位D-葡萄糖醛酸及N-乙酰葡萄糖胺组成的大型多糖类。与其它粘多糖不同,它不含硫。透明质酸除见于动物的关节液和眼球玻璃体等的分泌液、脐带、真皮表层等的结缔组织和Rous肉瘤等某种肿瘤外,它还包括A型、C型链球菌属在内的某些细菌的荚膜成分。细菌透明质酸不与蛋白质结合,但动物组织中的透明质酸或多或少含有一些蛋白质,似乎以蛋白多糖和肽多糖的形态存在。不过与蛋白质部分结合的方式还不清楚。链的长度以分子量10⁵-10⁶的和较长居多,但每因材料而异,而且使同一材料也决不是均一的,和大量水结合具有形成凝胶的性质,这些性质在生物体内对关节的润滑作用,以及皮肤的柔软性等与这种物质的功能是有联系的。另外在结缔组织受伤迅速修复时,透明质酸的合成会暂时升高,是组织再生时细胞活动的环节之一。从睾丸、皮肤、肝脏等动物组织及蛇毒、蛭、细菌、放线菌里也分别发现可水解和切断透明质酸的氨基葡萄糖苷或葡糖醛苷键的酶。

[0003] HA主要由间质细胞合成,经淋巴循环入血,由肝脏内皮细胞摄取,由特异的透明质酸酶水解,在体液中与蛋白质结合而存在,实际上属于糖蛋白的辅基。HA主要存在于结缔组织、皮肤、关节液、软骨及玻璃体液等处。构成该部位的组织基质。血清HA是反映肝内皮细胞功能,反映活动性纤维化,预测肝硬化的良好指标。

[0004] 目前检测透明质酸的方法有酶联免疫吸附法、化学发光。酶联免疫吸附法操作复杂,耗时长,且对操作人员有较高的专业技能要求,且酶联免疫法只能定性或者半定量;化学发光法成本高,且所需的仪器价格昂贵,普遍推广有一定的困难。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于解决现有技术中透明质酸检测过程操作复杂、以及测定准确度低的问题,提供一种测定透明质酸的试剂盒。

[0006] 本发明解决上述技术问题提供的技术方案是:一种测定透明质酸的试剂盒,该试剂盒由试剂R1和试剂R2双液体组分组成试剂盒,其特征在于:所述的试剂R1为含有无机盐离子、加速剂、表面活性剂、防腐剂的缓冲液;所述的试剂R2为含有标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒、助悬剂、防腐剂、稳定剂的缓冲液。

[0007] 作为优选,所述的缓冲液为Tris缓冲液、MOPS缓冲液、PBS缓冲液、MES缓冲液、甘氨酸缓冲液中的一种或多种组合而成。所述的无机盐离子为氯化钠、氯化钾、硫酸钾中的一种或多种组合而成。

[0008] 作为优选,所述的加速剂为聚乙二醇-2000、聚乙二醇-6000、聚乙二醇-8000、聚乙烯吡咯烷酮中的一种或几种。

[0009] 作为优选,所述的稳定剂为牛血清白蛋白、蔗糖、海藻糖、EDTA中的一种或多种组合而成。

[0010] 作为优选,所述的防腐剂为苯酚、苯甲酸钠、叠氮钠中的一种或多种组合而成。

[0011] 作为优选,所述的表面活性剂为吐温系列、聚氧乙烯苯基醚、聚氧乙烯月桂醚系列中的一种或多种组合而成。

[0012] 作为优选,所述的助悬剂为阿拉伯胶、海藻酸钠、胶体二氧化硅、甘油中的一种或多种组合而成。

[0013] 作为优选,所述的彼此独立的试剂R1和试剂R2的成分及相应含量如下:

试剂R1:

Tris 缓冲液	30~170 mmol/L
氯化钠	50~250 mmol/L
聚乙二醇 - 2000	10~30 g/L
吐温 - 20	0.5~3.5 mL/L
叠氮钠	0.5 ~1.5 g/L

其溶剂为纯化水。

[0014]

试剂R2:

Tris 缓冲液	20~100 mmol/L
牛血清白蛋白	10~40 g/L
甘油	5~15 g/L
叠氮钠	0.5~1.5 g/L

标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒 1~4 g/L
其溶剂为纯化水。

[0015]

作为优选,试剂盒的制备和使用包括以下步骤:

(1)试剂R1液的配制:

(a)按照试剂R1的组分含量,将三羟甲基氨基甲烷溶于纯化水中,搅拌均匀后,配置成Tris缓冲液;

(b)按照试剂R1的组分含量,将氯化钠、聚乙二醇-2000、叠氮钠、吐温-20溶于步骤(a)所制得的缓冲液中,搅拌均匀即制得试剂R1液;

(2)所述的试剂R2的配制如下:

(a)、按照试剂R2的组分含量,将三羟甲基氨基甲烷溶于纯化水中,搅拌均匀后,配置成Tris缓冲液;

(b)、按照试剂R2的组分含量,将牛血清白蛋白、甘油、叠氮钠溶于纯化水中,搅拌均匀即得分散液;

(c)用步骤(b)制得的分散液溶解标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒,使胶乳颗粒终浓度为2 g/L,然后超声分散得到试剂R2;

(3)用全自动生化分析仪测定反应后的吸光度差值;

(4)根据吸光度变化值计算出样本中的透明质酸的浓度。

[0016] 作为优选,所述的标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒的制备方法如下:

(a)将粒径为120nm的胶乳颗粒,用50 mmol/L的MES缓冲液稀释胶乳颗粒到2 g/L,每mL溶液中加入EDAC 1.0 mg,室温反应1小时,在离心机内15000 rpm转速下离心30分钟,去上清,将沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中,超声分散;

(b)将步骤(a)的产物在离心机内15000 rpm转速下离心30分钟,弃上清,将沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中,使得胶乳颗粒最终浓度为4 g/L,超声分散,边搅拌边加入等体积的含8 mg/mL 抗人透明质酸抗体的MES稀释液,混合搅拌,室温反应2小时,胶乳颗粒最终浓度为2 g/L;

(c)将步骤(b)的产物在离心机内15000 rpm转速离心30分钟,弃上清,沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中超声分散,加入BSA,4℃封闭过夜;离心去上清,制得标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒。

[0017] 本发明所采用的胶乳增强免疫比浊法的反应原理是:样本中相应的透明质酸抗原与标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒发生特异性结合,在促凝剂作用下形成不溶性的聚苯乙烯微球-抗原-聚苯乙烯微球颗粒复合物乳浊液,产生一定的浊度,其浊度高低与样本中的透明质酸抗原浓度成正比关系,在一定波长下进行浊度测定,即可测得样本中被检测透明质酸的含量。

[0018] 样本中透明质酸(HA)的活性(ng/mL) = $C_s \times \frac{\Delta A_T}{\Delta A_R}$ (ng/mL)

式中: $\Delta A_T/\text{min}$ 以空白管吸光度作对照的样品管吸光度值

$\Delta A_S/\text{min}$ 以空白管吸光度作对照的校准管吸光度值

C_s 校准液中HA的浓度

与现有技术相比,本发明具有以下有益优点:本发明在试剂R1液中添加了加速剂,在试剂R2中采用标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒,对透明质酸的检测灵敏度更高,检测准确性更好,在助悬剂的作用下,标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒稳定悬浮于试剂R2中,当和样本反应时,在加速剂的作用下,可迅速发生反应,即使在较低量的样本下,也可以发生较为明显反应,因此检测准确度高,而且不会产生环境污染,另外检测也比较方便。

[0019] 附图说明:

图1为实施例1中本试剂盒与化学发光法的检测结果对比

图2为实施例2中本试剂盒与化学发光法的检测结果对比。

具体实施方式

[0020] 以下结合具体实施例进一步说明,但本发明并不仅限于这些实施例。

[0021] 实施例1

本发明的试剂盒包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,其中

试剂R1:

Tris 缓冲液	100 mmol/L
氯化钠	150 mmol/L
聚乙二醇 - 2000	20 g/L
吐温 - 20	2.0 mL/L

叠氮钠 1.0 g/L
其溶剂为纯化水。

[0022]

试剂R2:
Tris 缓冲液 60 mmol/L
牛血清白蛋白 30 g/L
甘油 10 g/L
叠氮钠 1.0 g/L
标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒 2.5g/L
其溶剂为纯化水。

[0023] 实施例2

本发明的试剂盒包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,其中

试剂R1:
MES缓冲液 100 mmol/L
氯化钾 150 mmol/L
聚乙二醇-6000 20 g/L
吐温 - 20 2.0 mL/L
叠氮钠 1.0g/L
其溶剂为纯化水。

[0024]

试剂R2:
MES缓冲液 70 mmol/L
海藻糖 35.0 g/L
甘油 10g/L
叠氮钠 1.0 g/L
标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒 2.5 g/L

实施例3

试剂盒的制备和使用方法

1、制备标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒:

(a)将粒径为120nm的胶乳颗粒,用50 mmol/L的MES缓冲液稀释胶乳颗粒到2 g/L,每mL溶液中加入EDAC 1.0 mg,室温反应1小时,在离心机内15000 rpm转速下离心30分钟,去上清,将沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中,超声分散;

(b)将步骤(a)的产物在离心机内15000 rpm转速下离心30分钟,弃上清,将沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中,使得胶乳颗粒最终浓度为4 g/L,超声分散,边搅拌边加入等体积的含8 mg/mL 抗人透明质酸抗体的MES稀释液,混合搅拌,室温反应2小时,胶乳颗粒最终浓度为2 g/L;

(c)将步骤(b)的产物在离心机内15000 rpm转速离心30分钟,弃上清,沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中超声分散,加入BSA,4℃封闭过夜;离心去上清,制得标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒。

[0025] 2、按照下列组分含量配制好试剂：

试剂R1：

Tris 缓冲液	100 mmol/L
氯化钠	150 mmol/L
聚乙二醇 - 2000	20 g/L
吐温 - 20	2.0 mL/L
叠氮钠	1.0 g/L

其溶剂为纯化水。

[0026]

试剂R2：

Tris 缓冲液	60 mmol/L
牛血清白蛋白	30 g/L
甘油	10 g/L
叠氮钠	1.0 g/L

标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒 2.5g/L

其溶剂为纯化水。

[0027] 3、全自动生化分析仪参数设置

(a)检测温度:37℃；

(b)检测波长:主波长600nm；

(c)反应时间 :10min,其中,孵育时间 5min,加入试剂 R2 后立即测定读取吸光度 A1,5min后读取吸光度 A2,计算吸光度变化 $\Delta A = A2-A1$ ；

(d) 反应方向:正反应；

4、检测步骤

(a)取200 μ l试剂R1与2.5 μ l待测样本混匀；

(b)将混匀后的溶液在37℃的条件下孵育5min；

(c)加入50 μ l试剂R2,立即测定读取吸光度A1,5min后读取吸光度A2,计算吸光度变化 $\Delta A = A2-A1$ ；

(d) 样本中透明质酸的活性(ng/mL)= $C_s \times \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2}$ (ng/mL)计算出样本中的透明质酸的浓度。

[0028] 实施例4

试剂盒的制备和使用方法

1、制备标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒：

(a)将粒径为120nm的胶乳颗粒,用50 mmol/L的MES缓冲液稀释胶乳颗粒到2 g/L,每mL溶液中加入EDAC 1.0 mg,室温反应1小时,在离心机内15000 rpm转速下离心30分钟,去上清,将沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中,超声分散；

(b)将步骤(a)的产物在离心机内15000 rpm转速下离心30分钟,弃上清,将沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中,使得胶乳颗粒最终浓度为4 g/L,超声分散,边搅拌边加入等体积的含8 mg/mL 抗人透明质酸抗体的MES稀释液,混合搅拌,室温反应2小时,胶乳颗粒最终

浓度为2 g/L;

(c)将步骤(b)的产物在离心机内15000 rpm转速离心30分钟,弃上清,沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中超声分散,加入BSA,4℃封闭过夜;离心去上清,制得标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒。

[0029] 2、按照下列组分含量配制好试剂:

试剂R1:

MES缓冲液	100 mmol/L
氯化钾	150 mmol/L
聚乙二醇-6000	20 g/L
吐温 - 20	2.0 mL/L
叠氮钠	1.0g/L

其溶剂为纯化水。

[0030]

试剂R2:

MES缓冲液	70 mmol/L
海藻糖	35.0 g/L
甘油	10g/L
叠氮钠	1.0 g/L

标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒 2.5 g/L

3、全自动生化分析仪参数设置

(a)检测温度:37℃;

(b)检测波长:主波长600nm;

(c)反应时间 :10min,其中,孵育时间 5min,加入试剂 R2 后立即测定读取吸光度 A1,5min后读取吸光度 A2,计算吸光度变化 $\Delta A = A2-A1$;

(d) 反应方向:正反应;

4、检测步骤

(a)取200 μ l试剂R1与2.5 μ l待测样本混匀;

(b)将混匀后的溶液在37℃的条件下孵育5min;

(c)加入50 μ l试剂R2,立即测定读取吸光度A1,5min后读取吸光度A2,计算吸光度变化 $\Delta A = A2-A1$;

(d) 样本中透明质酸的活性(ng/mL)= $C_s \times \frac{\Delta A_T}{\Delta A_S}$ (ng/mL)计算出样本中的透明质酸的浓度。

[0031]

参照附图1,附图1为用实施例1所制得的一种测定透明质酸的试剂盒多次测定不同样本中透明质酸的测定结果,以及在同等条件下与化学发光法测定结果的对比分析。从相关性实验结果可见,本试剂盒与化学发光检测结果相关性很好,相关方程 $y=1.0341x-0.4714$, $R^2=0.995$,从结果可以看出本试剂盒结果准确性可靠,相关性良好,可以应用于透明质酸的检测。

[0032] 参照附图2,附图2为用实施例2所制得的一种测定透明质酸的试剂盒多次测定不同样本中透明质酸的测定结果,以及在同等条件下与化学发光法测定结果的对比分析。从相关性实验结果可见,本试剂盒与化学发光检测结果相关性很好,相关方程 $y=1.0308x-0.3807$, $R^2=0.9961$,从结果可以看出本试剂盒结果准确性可靠,相关性良好,可以应用于透明质酸的检测。

[0033] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

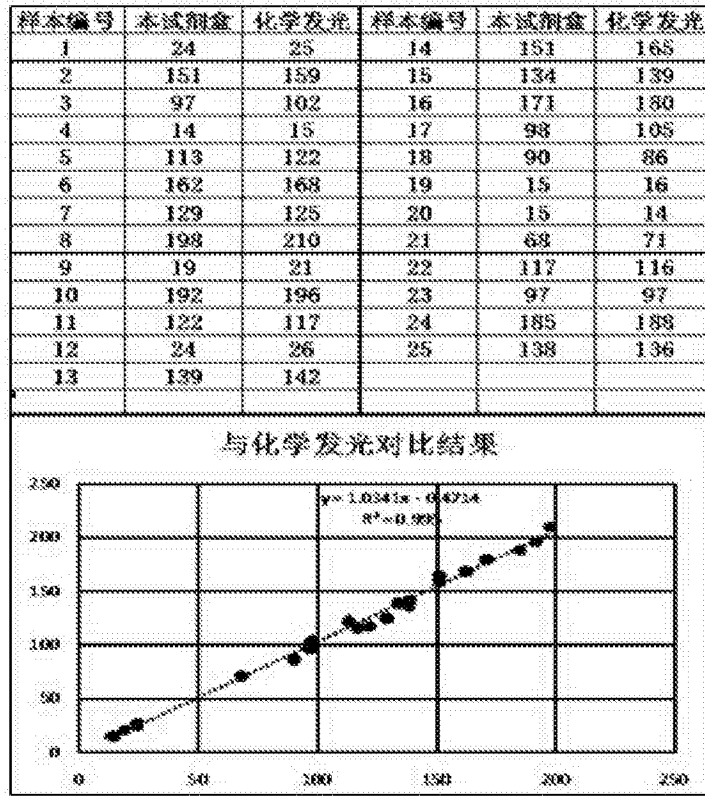


图1

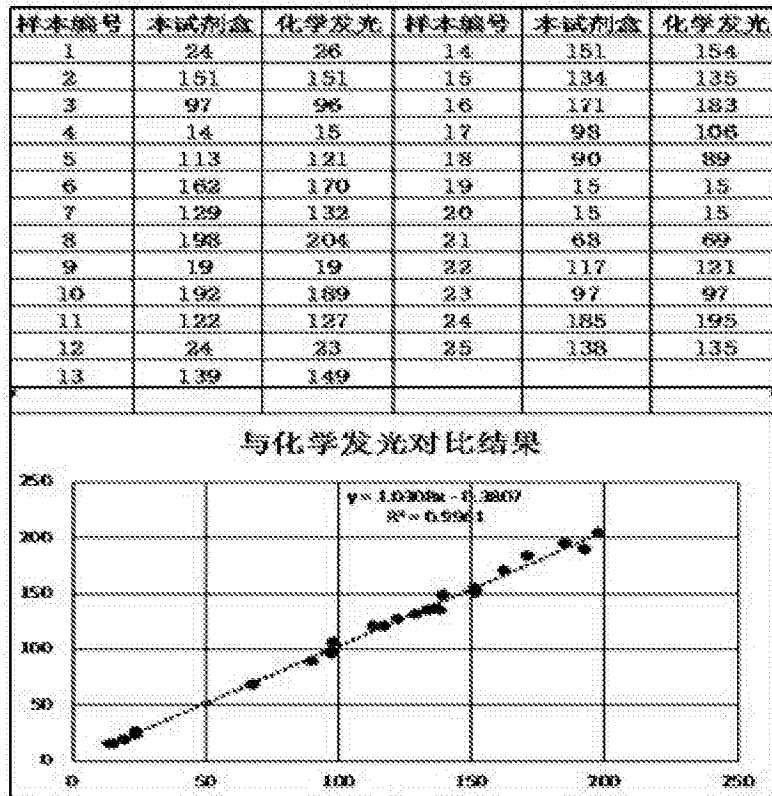


图2

专利名称(译)	一种测定透明质酸的试剂盒		
公开(公告)号	CN106093373A	公开(公告)日	2016-11-09
申请号	CN201610359607.8	申请日	2016-05-27
[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	蔡晓辉 庄庆华 吴铮 徐运		
发明人	蔡晓辉 庄庆华 吴铮 徐运		
IPC分类号	G01N33/536		
CPC分类号	G01N33/536		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及医学及生物化学技术领域，具体来说是一种测定透明质酸的试剂盒。本发明的目的在于解决现有技术中透明质酸检测过程操作复杂、以及测定准确度低的问题，本发明解决上述技术问题提供的技术方案是：一种测定透明质酸的试剂盒，该试剂盒由试剂R1和试剂R2双液体组分组成试剂盒，其特征在于：所述的试剂R1为含有无机盐离子、加速器、表面活性剂、防腐剂的缓冲液；所述的试剂R2为含有标记有抗人透明质酸抗体的胶乳颗粒、助悬剂、防腐剂、稳定剂的缓冲液。本发明具有准确度高、操作方便等优点。

样本编号	本试剂盒	化学发光	样本编号	本试剂盒	化学发光
1	24	25	14	151	165
2	151	159	15	134	139
3	97	102	16	171	180
4	14	15	17	98	105
5	113	122	18	90	86
6	162	168	19	15	16
7	129	125	20	15	14
8	198	210	21	68	71
9	19	21	22	117	116
10	192	196	23	97	97
11	122	117	24	185	188
12	24	26	25	138	136
13	139	142			

