



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107340386 A

(43)申请公布日 2017. 11. 10

(21)申请号 201710431240.0

(22)申请日 2017.06.09

(71)申请人 厦门大学附属中山医院

地址 361004 福建省厦门市思明区湖滨南路201-209号

(72)发明人 张忠英 叶春蕾

(74)专利代理机构 厦门南强之路专利事务所  
(普通合伙) 35200

代理人 马应森

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/96(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

基于微粒子化学发光免疫分析的sST2检测试剂盒

(57)摘要

基于微粒子化学发光免疫分析的sST2检测试剂盒,涉及化学发光检测试剂盒。sST2检测试剂盒设有反应缓冲液、包被有sST2单克隆抗体的磁性微粒子、标记有吖啶酯的sST2单克隆抗体、发光液、sST2抗原标准品溶液、浓缩洗涤液。制备反应缓冲液;制备包被有sST2抗体的磁微粒;制备吖啶酯标记的sST2抗体;制备sST2抗原标准品溶液;制备发光液;制备洗涤液。采用微粒子化学发光免疫分析技术,比ELISA具有更高的灵敏度和更好的稳定性,填补国内人血清sST2检测的微粒子化学发光诊断试剂生产的空白。具有操作简单、灵敏度高、线性范围宽、结果稳定、安全性好、便于自动化等优点,在临床检验等方面具有广阔的应用前景。

1. 基于微粒子化学发光免疫分析的sST2检测试剂盒,其特征在于设有反应缓冲液、包被有sST2单克隆抗体的磁性微粒子、标记有吡啶酯的sST2单克隆抗体、发光液、sST2抗原标准品溶液、浓缩洗涤液。

2. 如权利要求1所述基于微粒子化学发光免疫分析的sST2检测试剂盒,其特征在于所述发光液包括发光液A和发光液B,所述发光液A为过氧化氢和硝酸水溶液;所述发光液A中过氧化氢的质量百分浓度为0.5%~3%,硝酸的摩尔浓度为0.01~0.5M。

3. 如权利要求1所述基于微粒子化学发光免疫分析的sST2检测试剂盒,其特征在于所述发光液B为氢氧化钠与Triton X-100水溶液;所述发光液B中的氢氧化钠的摩尔浓度为0.05~1M,Triton X-100的体积百分浓度为0.1%~2%。

4. 如权利要求1~3所述基于微粒子化学发光免疫分析的sST2检测试剂盒的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

- 1) 制备反应缓冲液;
- 2) 制备包被有sST2抗体的磁微粒;
- 3) 制备吡啶酯标记的sST2抗体;
- 4) 制备sST2抗原标准品溶液;
- 5) 制备发光液;
- 6) 制备洗涤液。

5. 如权利要求4所述基于微粒子化学发光免疫分析的sST2检测试剂盒的制备方法,其特征在于在步骤1)中,所述制备反应缓冲液的具体方法为:pH为7.4的磷酸盐缓冲液,内含0.5%牛血清白蛋白、0.5%酪蛋白、0.05%Tween-20和防腐剂。

6. 如权利要求4所述基于微粒子化学发光免疫分析的sST2检测试剂盒的制备方法,其特征在于在步骤2)中,所述制备包被有sST2抗体的磁微粒的具体方法为:

(1) 将磁微粒、EDC与NHS的质量比为1:1:1,并加入pH为5.0的50mM MES溶液,使磁微粒浓度为4mg/mL,放置在垂直旋转仪上活化,活化环境温度25℃,时间20min;

(2) 将活化后的磁微粒与sST2单克隆抗体比例为每毫克磁微粒标记30μg的抗体,放置在垂直旋转仪上标记,反应环境温度25℃,时间3h;

(3) 将反应后的磁微粒用洗液洗涤,加入含有甘氨酸、0.5%牛血清白蛋白、0.05% Tween-20、pH为7.4的磷酸盐缓冲液,使磁微粒浓度为4mg/mL,放置在垂直旋转仪上终止,反应环境温度25℃,时间2h;

(4) 将终止后的磁微粒用洗液洗涤,加入0.5%牛血清白蛋白、0.5%酪蛋白、0.05% Tween-20、防腐剂、pH为7.4的磷酸盐缓冲液,使磁微粒浓度为4mg/mL,2~8℃保存备用。

7. 如权利要求4所述基于微粒子化学发光免疫分析的sST2检测试剂盒的制备方法,其特征在于在步骤3)中,所述制备吡啶酯标记的sST2抗体的具体方法为:

(1) 取待标记sST2单克隆抗体50μg,加入含NaCl的磷酸盐缓冲液至体积为300μL,再加入5μL吡啶酯母液,振荡混匀,避光反应30min;

(2) 反应后加入200μL含NaCl和甘氨酸的磷酸盐缓冲液,手工颠倒20次混匀,避光反应30min;反应后将产物转移至透析袋中,透析液为pH为7.4的20mM PBS缓冲液,2~8℃避光透析,每隔2h换一次PBS缓冲液,共更换3次,以除去未标记的吡啶酯;

(3) 将标记物取出,加入10μL 10%牛血清白蛋白溶液,再按照实际体积加入等体积甘

油,手工颠倒混匀后,-20℃以下避光保存备用。

8.如权利要求4所述基于微粒子化学发光免疫分析的sST2检测试剂盒的制备方法,其特征在于在步骤4)中,所述制备sST2抗原标准品溶液的具体方法为:采用sST2抗原,用含有0.5%牛血清白蛋白、0.5%酪蛋白、0.05%Tween-20、pH为7.4的磷酸盐缓冲液梯度稀释为800ng/mL、400ng/mL、200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL、3.125ng/mL、1.5625ng/mL的系列标准品溶液。

9.如权利要求4所述基于微粒子化学发光免疫分析的sST2检测试剂盒的制备方法,其特征在于在步骤5)中,所述制备发光液的具体方法为:所述发光液包括发光液A和发光液B;所述发光液A为过氧化氢和硝酸水溶液,发光液A中过氧化氢的质量百分浓度为0.5%~3%,硝酸的摩尔浓度为0.01~0.5M;所述发光液B为氢氧化钠与Triton X-100水溶液,氢氧化钠的摩尔浓度在0.05~1M,Triton X-100的体积百分浓度为0.1%~2%。

10.如权利要求4所述基于微粒子化学发光免疫分析的sST2检测试剂盒的制备方法,其特征在于在步骤6)中,所述制备洗涤液的具体方法为:洗涤液是含有表面活性剂Triton X-100和生物防腐剂的磷酸盐缓冲液。

## 基于微粒子化学发光免疫分析的sST2检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及化学发光检测试剂盒,尤其是涉及基于微粒子化学发光免疫分析的sST2检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 心力衰竭是指任何心脏结构或功能异常导致心脏充盈或射血能力受损的一组复杂临床综合征,是各种心脏疾病的终末阶段。目前全球有近2300万人患有心力衰竭,其中美国有近600万人患有心力衰竭,而中国也有近500万人患有心力衰竭,占全球总人数的1/4左右。NT-proBNP是目前公认的诊断心力衰竭的有效指标。因灵敏度高、与心衰程度正相关、并能够预测心衰的治疗效果而广泛应用。但NT-proBNP作为心衰的标志物存在如下不足:NT-proBNP会随着年龄增长而增高,且女性高于男性;急性冠脉综合征、肺部疾病、慢性肾功能不全等其他疾病也能导致NT-proBNP升高。生长刺激表达基因2蛋白,即ST2,又被称为IL1RL1或IL-1R,是白介素1受体家族成员之一,有跨膜型(ST2L)和可溶性(sST2)两种形式。研究表明,心力衰竭患者sST2水平显著升高,并且与NT-proBNP相比,sST2的诊断价值不受肾功能的影响,sST2的浓度水平不会随着肾功能不全的严重程度而显著升高([1]Bayes-Genis A,Zamora E,de Antonio M,et al.Soluble ST2 serum concentration and renal function in heart failure[J].J Card Fail,2013,19:768-75.)。《2014中国心力衰竭诊断和治疗指南》指出,sST2能够为心衰患者的危险分层提供额外的信息,可用于评价心衰的预后([2]中华医学会心血管病分会,《中华心血管病杂志》编辑委员会.中国心力衰竭诊断和治疗指南2014[J].中华心血管病杂志,2014,42(2):98-121.);《2013美国心脏病学会心力衰竭诊断和治疗指南》指出,sST2能够提示心衰患者的危险分层,并对利钠肽的预后评估作用有一定的补充价值([3]Yancy CW,Jessup M,Bozkurt B,et al.2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure:a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association task force on practice guidelines 2013[J].J Am Coll Cardio,2013,62(16):147-239.)。sST2已经成为心衰最具潜力的生物标志物之一,对于心衰的诊断和预后有着重要的意义。

[0003] 目前,国内外检测sST2的方法主要是酶联免疫试验(ELISA) ([4]Thomas Mueller,Matthias Zimmermann,Benjamin Dieplinger,et al.Comparison of plasma concentrations of soluble ST2 measured by three different commercially available assays:The MBL ST2 assay,the Presage ST2 assay,and the R&D ST2 assay[J].Clinica Chimica Acta,2012,413:1493-94.),该方法线性范围窄,灵敏度低,稳定性差,操作繁琐,且自动化程度低。这些缺点限制了sST2检测的推广应用,使其无法广泛地应用于临床诊断与科研工作。

[0004] 微粒子化学发光免疫分析技术(Chemiluminescence Immunoassay,CLIA)是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合,用于各种抗原、半抗原、抗体、激素、酶、脂肪酸、维生素和药物等的检测分析技术,是继放免分析、酶免分析、荧光免疫

分析和时间分辨荧光免疫分析之后发展起来的一项最新免疫测定技术,具有操作简单、灵敏度高、线性范围宽、结果稳定、安全性好、便于自动化、产品有效期长、对环境无污染、对人体无毒无害等优点,是目前体外诊断试剂检测方法中的佼佼者,在技术上具有明显的优势。目前微粒子化学发光免疫分析法已广泛应用于乙肝两对半(CN 102072957)、性激素(CN 103954779)、肿瘤标志物等各种抗原的检测,取得了良好的社会效益,但国内外尚未见有此类sST2检测试剂盒问世,本项目的研发将填补这一空白,其市场应用前景广阔。

## 发明内容

[0005] 本发明的目的在于针对上述现有技术的不足,提供一种基于微粒子化学发光免疫分析的sST2检测试剂盒及其制备方法。

[0006] 所述基于微粒子化学发光免疫分析的sST2检测试剂盒,设有反应缓冲液、包被有sST2单克隆抗体的磁性微粒子、标记有吡啶酯的sST2单克隆抗体、发光液、sST2抗原标准品溶液、浓缩洗涤液。

[0007] 所述发光液包括发光液A和发光液B,所述发光液A为过氧化氢和硝酸水溶液;所述发光液A中过氧化氢的质量百分浓度可为0.5%~3%,硝酸的摩尔浓度可为0.01~0.5M。

[0008] 所述发光液B为氢氧化钠与Triton X-100水溶液;所述发光液B中的氢氧化钠的摩尔浓度可为0.05~1M,Triton X-100的体积百分浓度可为0.1%~2%。

[0009] 所述基于微粒子化学发光免疫分析的sST2检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0010] 1) 制备反应缓冲液;

[0011] 2) 制备包被有sST2抗体的磁微粒;

[0012] 3) 制备吡啶酯标记的sST2抗体;

[0013] 4) 制备sST2抗原标准品溶液;

[0014] 5) 制备发光液;

[0015] 6) 制备洗涤液。

[0016] 在步骤1)中,所述制备反应缓冲液的具体方法可为:pH为7.4的磷酸盐缓冲液,内含0.5%牛血清白蛋白、0.5%酪蛋白、0.05%Tween-20和防腐剂。

[0017] 在步骤2)中,所述制备包被有sST2抗体的磁微粒的具体方法可为:

[0018] (1) 将磁微粒、EDC与NHS的质量比为1:1:1,并加入pH为5.0的50mM MES溶液,使磁微粒浓度为4mg/mL,放置在垂直旋转仪上活化,活化环境温度25℃,时间20min;

[0019] (2) 将活化后的磁微粒与sST2单克隆抗体比例为每毫克磁微粒标记30μg的抗体,放置在垂直旋转仪上标记,反应环境温度25℃,时间3h;

[0020] (3) 将反应后的磁微粒用洗液洗涤,加入含有甘氨酸、0.5%牛血清白蛋白、0.05% Tween-20、pH为7.4的磷酸盐缓冲液,使磁微粒浓度为4mg/mL,放置在垂直旋转仪上终止,反应环境温度25℃,时间2h;

[0021] (4) 将终止后的磁微粒用洗液洗涤,加入0.5%牛血清白蛋白、0.5%酪蛋白、0.05% Tween-20、防腐剂、pH为7.4的磷酸盐缓冲液,使磁微粒浓度为4mg/mL,2~8℃保存备用。

[0022] 在步骤3)中,所述制备吡啶酯标记的sST2抗体的具体方法可为:

[0023] (1) 取待标记sST2单克隆抗体50 $\mu$ g,加入含NaCl的磷酸盐缓冲液至体积为300 $\mu$ L,再加入5 $\mu$ L吡啶酯母液,振荡混匀,避光反应30min;

[0024] (2) 反应后加入200 $\mu$ L含NaCl和甘氨酸的磷酸盐缓冲液,手工颠倒20次混匀,避光反应30min;反应后将产物转移至透析袋中,透析液为pH为7.4的20mM PBS缓冲液,2~8 $^{\circ}$ C避光透析,每隔2h换一次PBS缓冲液,共更换3次,以除去未标记的吡啶酯;

[0025] (3) 将标记物取出,加入10 $\mu$ L 10%牛血清白蛋白溶液,再按照实际体积加入等体积甘油,手工颠倒混匀后,-20 $^{\circ}$ C以下避光保存备用。

[0026] 在步骤4)中,所述制备sST2抗原标准品溶液的具体方法可为:采用sST2抗原,用含有0.5%牛血清白蛋白、0.5%酪蛋白、0.05%Tween-20、pH为7.4的磷酸盐缓冲液梯度稀释为800ng/mL、400ng/mL、200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL、3.125ng/mL、1.5625ng/mL的系列标准品溶液。

[0027] 在步骤5)中,所述制备发光液的具体方法可为:所述发光液包括发光液A和发光液B;所述发光液A为过氧化氢和硝酸水溶液,发光液A中过氧化氢的质量百分浓度可为0.5%~3%,硝酸的摩尔浓度可为0.01~0.5M;所述发光液B为氢氧化钠与Triton X-100水溶液,氢氧化钠的摩尔浓度在0.05~1M,Triton X-100的体积百分浓度可为0.1%~2%。

[0028] 在步骤6)中,所述制备洗涤液的具体方法可为:洗涤液是含有表面活性剂Triton X-100和生物防腐剂的磷酸盐缓冲液。

[0029] 本发明所述基于微粒子化学发光免疫分析的sST2检测试剂盒的优点是采用微粒子化学发光免疫分析技术,比ELISA具有更高的灵敏度和更好的稳定性,填补了国内人血清sST2检测的微粒子化学发光诊断试剂生产的空白。

[0030] 本发明的反应缓冲液为抗原抗体反应提供合适的反应条件;采用磁性微粒子偶联单克隆抗体,由于微粒子可以悬浮于样本溶液中,有利于微粒子表面抗体与待测物充分接触,缩短反应时间;以吡啶酯作为标记物,可以得到稳定、高强度的信号。本发明所述的基于微粒子化学发光免疫分析的人sST2检测试剂盒,具有操作简单、灵敏度高、线性范围宽、结果稳定、安全性好、便于自动化等优点,在临床检验等方面具有广阔的应用前景。

## 附图说明

[0031] 图1为本发明实施例的sST2抗原标准品溶液曲线。

## 具体实施方式

[0032] 下面具体描述基于微粒子化学发光免疫分析的人血清sST2检测试剂盒及其制备方法。

[0033] 一种检测人血清sST2含量的微粒子化学发光免疫分析试剂盒,设有反应缓冲液、包被有sST2单克隆抗体的磁性微粒子、标记有吡啶酯的sST2单克隆抗体、发光液A、发光液B、sST2抗原标准品溶液、浓缩洗涤液。

[0034] 本发明人血清sST2微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒的制备方法,其具体步骤如下:

[0035] (1) 制备反应缓冲液

[0036] pH为7.4的磷酸盐缓冲液,内含0.5%牛血清白蛋白、0.5%酪蛋白、0.05%Tween-

20和防腐剂。

[0037] (2) 制备包被有sST2抗体的磁微粒

[0038] 将磁微粒、EDC与NHS的质量比为1:1:1,并加入pH为5.0的50mM MES溶液,使磁微粒浓度为4mg/mL,放置在垂直旋转仪上活化,活化环境温度25℃,时间20min。将活化后的磁微粒与sST2单克隆抗体比例为每毫克磁微粒标记30μg的抗体,放置在垂直旋转仪上标记,反应环境温度25℃,时间3h。将反应后的磁微粒用洗液洗涤3次,加入含有甘氨酸、0.5%牛血清白蛋白、0.05%Tween-20、pH为7.4的磷酸盐缓冲液,使磁微粒浓度为4mg/mL,放置在垂直旋转仪上终止,反应环境温度25℃,时间2h。将终止后的磁微粒用洗液洗涤3次,加入0.5%牛血清白蛋白、0.5%酪蛋白、0.05%Tween-20、防腐剂、pH为7.4的磷酸盐缓冲液,使磁微粒浓度为4mg/mL,2-8℃保存备用。

[0039] (3) 制备吡啶酯标记的sST2抗体

[0040] 取待标记sST2单克隆抗体50μg,加入含NaCl的磷酸盐缓冲液至体积为300μL,再加入5μL吡啶酯母液,振荡混匀,室温避光反应30min。反应后加入200μL含NaCl和甘氨酸的磷酸盐缓冲液,手工颠倒20次混匀,室温避光反应30min。反应后将产物转移至透析袋中,透析液为pH为7.4的20mM PBS缓冲液,2~8℃避光透析,每隔2h换一次PBS缓冲液,共更换3次,以除去未标记的吡啶酯。将标记物取出,加入10μL 10%牛血清白蛋白溶液,再按照实际体积加入等体积甘油,手工颠倒混匀后,-20℃以下避光保存备用。

[0041] (4) 制备sST2抗原标准品溶液

[0042] 所述sST2抗原,使用含有0.5%牛血清白蛋白、0.5%酪蛋白、0.05%Tween-20、pH为7.4的磷酸盐缓冲液梯度稀释为800ng/mL、400ng/mL、200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL、3.125ng/mL、1.5625ng/mL的系列标准品溶液。

[0043] (5) 制备发光液

[0044] 发光液包括发光液A和发光液B。其中发光液A为过氧化氢和硝酸水溶液,发光液A中过氧化氢的质量百分浓度在0.5%~3%,硝酸的摩尔浓度在0.01~0.5M;发光液B为氢氧化钠与Triton X-100水溶液,氢氧化钠的摩尔浓度在0.05~1M,Triton X-100的体积百分浓度在0.1%~2%。

[0045] (6) 制备洗涤液

[0046] 洗液是含有表面活性剂(Triton X-100)和生物防腐剂的磷酸盐缓冲液。

[0047] 本发明所述的人血清sST2微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒对人血清sST2的检测过程如下:

[0048] 取20μL血清、50μL反应缓冲液以及50μL磁微粒(用反应缓冲液稀释为0.4mg/mL)在37℃的条件下反应15min,然后用洗液洗涤2次,再加入100μL吡啶酯标记的抗体,37℃反应10min,再用洗液洗涤4次,最终加入发光液A和发光液B,测定发光值。样本的含量可以利用该试剂盒的标准曲线,通过发光仪自动计算出来。

[0049] 表1

[0050]

组别	样本例数	检出阳性例数	阳性检出率(%)
心力衰竭组	205	152	74.15
正常对照组	117	21	17.95

[0051] 本发明所述的人血清sST2微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒分别对厦门大学附属中山医院确诊的心力衰竭患者血清样本及正常人样本进行了测定试验,结果如表1所示。

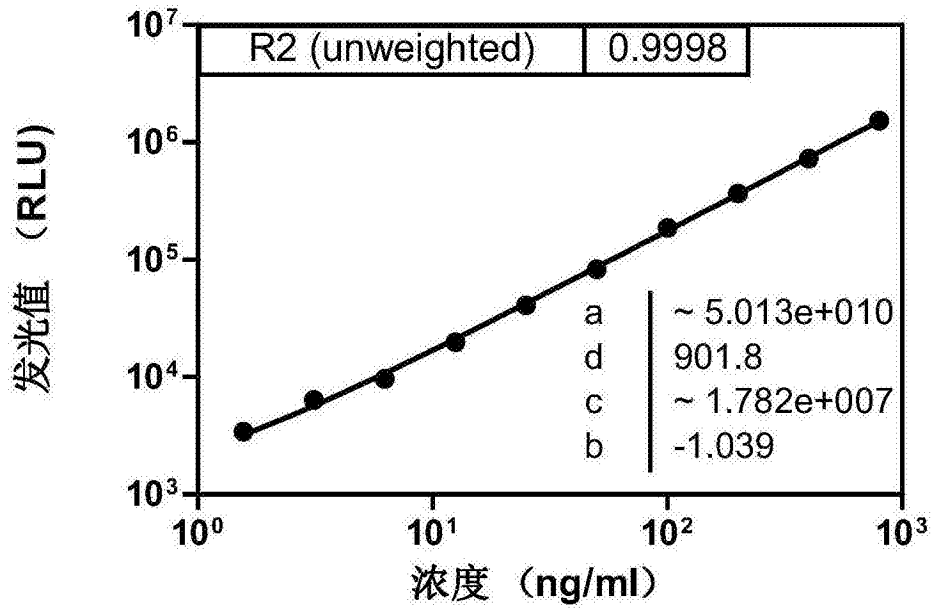


图1

专利名称(译)	基于微粒子化学发光免疫分析的sST2检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN107340386A</a>	公开(公告)日	2017-11-10
申请号	CN2017110431240.0	申请日	2017-06-09
[标]申请(专利权)人(译)	厦门大学附属中山医院		
申请(专利权)人(译)	厦门大学附属中山医院		
当前申请(专利权)人(译)	厦门大学附属中山医院		
[标]发明人	张忠英 叶春蕾		
发明人	张忠英 叶春蕾		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/96		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54326 G01N33/577 G01N33/96		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

基于微粒子化学发光免疫分析的sST2检测试剂盒，涉及化学发光检测试剂盒。sST2检测试剂盒设有反应缓冲液、包被有sST2单克隆抗体的磁性微粒子、标记有吲哚酯的sST2单克隆抗体、发光液、sST2抗原标准品溶液、浓缩洗涤液。制备反应缓冲液；制备包被有sST2抗体的磁微粒；制备吲哚酯标记的sST2抗体；制备sST2抗原标准品溶液；制备发光液；制备洗涤液。采用微粒子化学发光免疫分析技术，比ELISA具有更高的灵敏度和更好的稳定性，填补国内人血清sST2检测的微粒子化学发光诊断试剂生产的空白。具有操作简单、灵敏度高、线性范围宽、结果稳定、安全性好、便于自动化等优点，在临床检验等方面具有广阔的应用前景。

