



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109239356 A

(43)申请公布日 2019.01.18

(21)申请号 201811060508.5

G01N 33/532(2006.01)

(22)申请日 2018.09.12

G01N 21/76(2006.01)

(71)申请人 迪瑞医疗科技股份有限公司

地址 130103 吉林省长春市高新区宜居路
3333号

(72)发明人 韩美玉 王立英 高威 孙成艳
何浩会

(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 于晓庆

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/553(2006.01)

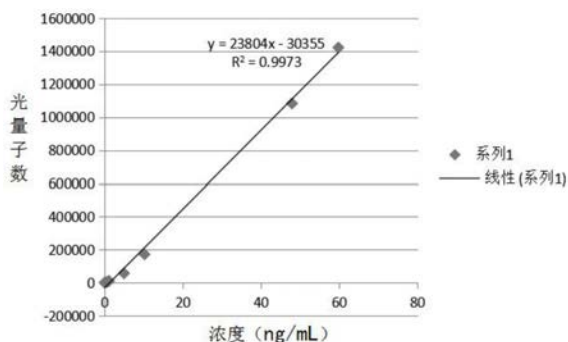
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

C肽化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和检测方法

(57)摘要

C肽化学发光定量检测试剂盒及其制备方法和检测方法,属于免疫分析领域,解决了现有定C-P检测方法存在的灵敏度低、反应时间长、成本高的问题。该试剂盒包括链霉亲和素包被的磁微粒;生物素标记的C肽抗体;吖啶酯标记的C肽抗体;清洗缓冲液;化学发光预激发液;校准品;质控品。检测方法为:样品中的C肽抗原与生物素标记的C肽抗体、吖啶酯标记的C肽抗体发生免疫反应,形成生物素-C肽抗体-C肽抗原-C肽抗体-吖啶酯溶剂;链霉亲和素包被的磁微粒与生物素相结合,形成磁珠-链霉亲和素-生物素-C肽抗体-C肽抗原-C肽抗体-吖啶酯复合物;加入清洗缓冲液等,计算出C肽浓度。本发明灵敏度高、特异性好、反应时间短、成本低。



1. C肽化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 包括: 链霉亲和素包被的磁微粒; 生物素标记的C肽抗体; 吡啶酯标记的C肽抗体; 清洗缓冲液; 化学发光预激发液; 校准品; 质控品。

2. 根据权利要求1所述的一种C肽化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述校准品包括低值校准品和高值校准品, 所述低值校准品浓度为1ng/ml, 所述高值校准品浓度为20ng/ml; 所述质控品包括低值质控品和高值质控品, 所述低值质控品浓度为1ng/ml, 所述高值质控品浓度为20ng/ml。

3. 根据权利要求1所述的一种C肽化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述化学发光预激发液包括酸性激发液和碱性激发液, 所述酸性激发液为硝酸和过氧化氢溶液, 所述碱性激发液为氢氧化钠溶液。

4. 根据权利要求1所述的一种C肽化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述清洗缓冲液为PB缓冲液。

5. 根据权利要求1所述的一种C肽化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述链霉亲和素包被的磁微粒中, 磁微粒与链霉亲和素的质量比为1: (10~20)。

6. 根据权利要求1所述的一种C肽化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述生物素标记的C肽抗体中, C肽抗体与生物素的摩尔比为1: (5~20)。

7. 根据权利要求1所述的一种C肽化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述吡啶酯标记的C肽抗体中, C肽抗体与吡啶酯的摩尔比为1: (5~20)。

8. 制备权利要求1至7中任意一项所述的C肽化学发光免疫检测试剂盒的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

步骤一、链霉亲和素包被磁微粒

取磁微粒, 用浓度为20mM的PB缓冲液清洗3次, 用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至10mg/ml; 按照磁微粒与链霉亲和素质量比为1: (10~20) 的比例添加链霉亲和素, 37℃孵育18~24h后, 置于磁分离架上分离磁珠; 去上清, 用浓度为20mM的PB缓冲液清洗3次, 加入封闭液, 37℃孵育18~24h后, 置于磁分离架上分离磁珠; 去上清, 用浓度为20mM的PB缓冲液清洗3次, 用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至10mg/ml, 得到链霉亲和素包被的磁微粒, 2~8℃保存备用;

步骤二、生物素标记C肽抗体

取C肽抗体, 用浓度为20mM的PB缓冲液置换C肽抗体保存液, 用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至1mg/ml; 按照C肽抗体与生物素摩尔比为1: (5~20) 的比例添加生物素, 37℃孵育2~4h进行标记; 加入封闭液, 37℃孵育2~4h后, 用蛋白纯化仪进行纯化, 收集蛋白峰值, 得到生物素标记的C肽抗体;

步骤三、吡啶酯标记C肽抗体

取C肽抗体, 用浓度为20mM的PB缓冲液置换C肽抗体保存液, 用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至1mg/ml, 按照C肽抗体与吡啶酯摩尔比为1: (5~20) 的比例添加吡啶酯, 37℃孵育2~4h进行标记; 加入封闭液, 37℃孵育2~4h后, 用蛋白纯化仪进行纯化, 收集蛋白峰值, 得到吡啶酯标记的C肽抗体。

9. 根据权利要求8所述的制备方法, 其特征在于, 所述封闭液选用浓度为20mM的PB缓冲液, 其中含有2~5%的BSA。

10. 如权利要求1至7中任意一项所述的C肽化学发光免疫检测试剂盒的检测方法, 其特

征在于,包括以下步骤:

步骤一、向样品中依次加入生物素标记的C肽抗体、吖啶酯标记的C肽抗体和链霉亲和素包被的磁微粒,样品中的C肽抗原与生物素标记的C肽抗体、吖啶酯标记的C肽抗体发生免疫反应,形成生物素-C肽抗体-C肽抗原-C肽抗体-吖啶酯溶剂;

步骤二、链霉亲和素包被的磁微粒与生物素相结合,形成磁珠-链霉亲和素-生物素-C肽抗体-C肽抗原-C肽抗体-吖啶酯复合物;

步骤三、加入清洗缓冲液,将杂质清洗去除;

步骤四、加入酸性激发液,使吖啶酯游离;

步骤五、加入碱性激发液,使吖啶酯发射光子;

步骤六、根据样品的光量子数计算出C肽的浓度。

C肽化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析技术领域,具体涉及一种C肽化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和检测方法。

背景技术

[0002] C肽原是由C肽B链、C肽和C肽A链组成。C肽B链是从第1个氨基酸到第30个氨基酸;C肽是从第33个氨基酸到第63个氨基酸;C肽A链是从第66个氨基酸到第86个氨基酸。C肽是通过第31、32位的精氨酸和第64位赖氨酸、65位精氨酸连接C肽的B链和A链。C肽原随细胞浆中的微泡进入高尔基体,经蛋白水解酶的作用,切去第31、32位的精氨酸和第64位赖氨酸、65位精氨酸,生成没有活性的C肽,同时C肽原中的A链和B链连接生成C肽。一分子的C肽原分解为一分子C肽和一分子C-肽。C肽由31个氨基酸分子组成,分子量为3020Da。C肽与C肽以等克分子量从B细胞分泌到血液中,不被肝细胞所摄取,主要在肾脏中代谢并从肾脏排出体外。

[0003] C肽不受C肽抗体的干扰,对于接受C肽治疗的病人,测定C肽水平可以评估残存β细胞的功能。C肽主要通过肾脏降解和排泄,所以尿液中的C肽浓度高于血清中的浓度。尿C肽具有不受C肽原的影响、留取样本方便等特点,检测24小时尿C肽可反映受检者一段时间内血中C肽的平均值。

[0004] 人胰岛素原(proinsulin)是由胰岛素和C肽组成,具有双重免疫活性,既可与胰岛素抗体结合,又可与C肽抗体结合。在生理情况下,只有极少量的C肽原释放入血,在病理情况下,胰岛β细胞释放C肽原增多,血中C肽原水平升高。由于C肽原的浓度还不到C肽的十分之一,故一般测得C肽(总C肽)可代表血中的游离C肽。

[0005] 目前用于检测C肽的免疫分析方法主要有酶联免疫分析法和化学发光免疫分析法。酶联免疫分析法采用辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记抗体,用于催化发光底物产生颜色变化,操作简单,但是标记物易失活,发光底物需要避光,试剂的检测灵敏度较低,导致测试结果不准确。化学发光免疫分析法采用催化剂催化化学发光物质形成一种激发态中间体,当激发态中间体回到稳定的基态时,发出光子,具有操作简单,自动化程度高,检测速度快等优点。

[0006] 目前市售的C肽(C-P)检测试剂盒主要分为以下3种:一是ELISA方法即辣根过氧化物酶或者碱性磷酸酶标记一株C-P抗体,固相载体(微孔板或固相微粒)包被另一株C-P抗体,利用辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶催化发光底物产生颜色变化,检测血清或血浆中C-P的浓度;二是采用异鲁米诺衍生物直接标记抗体,采用FITC抗体-FITC将C-P抗体间接偶联至磁微粒表面;三是三联吡啶钉电化学发光法,采用链霉亲和素磁珠,一株C-P抗体标记生物素,另一株C-P抗体标记三联吡啶钉,经过免疫反应形成磁珠-链霉亲和素-生物素-C-P抗体-C-P抗原-C-P抗体-三联吡啶钉复合物,在电场加压条件下发光。

[0007] 以上定量检测C-P的方法存在以下缺陷:1)ELISA方法采用微孔板或固相微粒作为固相载体,包被密度有限,灵敏度较低,反应时间较长;2)采用异鲁米诺衍生物直接标记抗体,采用FITC抗体-FITC将C-P抗体间接偶联至磁微粒表面,将引入更多的影响因素,影响检

测结果的灵敏度;3)采用三联吡啶钉的电化学发光法,仪器要求较高,试剂及仪器都比较昂贵。

发明内容

[0008] 为了解决现有定量检测C-P的方法存在的灵敏度低、反应时间长、成本高的问题,本发明提供一种C肽化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和检测方法。

[0009] 本发明为解决技术问题所采用的技术方案如下:

[0010] 本发明的C肽化学发光免疫检测试剂盒,包括:链霉亲和素包被的磁微粒;生物素标记的C肽抗体;吡啶酯标记的C肽抗体;清洗缓冲液;化学发光预激发液;校准品;质控品。

[0011] 作为优选的实施方式,所述校准品包括低值校准品和高值校准品,所述低值校准品浓度为1ng/ml,所述高值校准品浓度为20ng/ml。

[0012] 作为优选的实施方式,所述质控品包括低值质控品和高值质控品,所述低值质控品浓度为1ng/ml,所述高值质控品浓度为20ng/ml。

[0013] 作为优选的实施方式,所述化学发光预激发液包括酸性激发液和碱性激发液,所述酸性激发液为硝酸和过氧化氢溶液,所述碱性激发液为氢氧化钠溶液。

[0014] 作为优选的实施方式,所述清洗缓冲液为PB缓冲液。

[0015] 作为优选的实施方式,所述链霉亲和素包被的磁微粒中,磁微粒与链霉亲和素的质量比为1:(10~20)。

[0016] 作为优选的实施方式,所述生物素标记的C肽抗体中,C肽抗体与生物素的摩尔比为1:(5~20)。

[0017] 作为优选的实施方式,所述吡啶酯标记的C肽抗体中,C肽抗体与吡啶酯的摩尔比为1:(5~20)。

[0018] 本发明的C肽化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0019] 步骤一、链霉亲和素包被磁微粒

[0020] 取磁微粒,用浓度为20mM的PB缓冲液清洗3次,用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至10mg/ml;按照磁微粒与链霉亲和素质量比为1:(10~20)的比例添加链霉亲和素,37℃孵育18~24h后,置于磁分离架上分离磁珠;去上清,用浓度为20mM的PB缓冲液清洗3次,加入封闭液,37℃孵育18~24h后,置于磁分离架上分离磁珠;去上清,用浓度为20mM的PB缓冲液清洗3次,用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至10mg/ml,得到链霉亲和素包被的磁微粒,2~8℃保存备用;

[0021] 步骤二、生物素标记C肽抗体

[0022] 取C肽抗体,用浓度为20mM的PB缓冲液置换C肽抗体保存液,用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至1mg/ml;按照C肽抗体与生物素摩尔比为1:(5~20)的比例添加生物素,37℃孵育2~4h进行标记;加入封闭液,37℃孵育2~4h后,用蛋白纯化仪进行纯化,收集蛋白峰值,得到生物素标记的C肽抗体;

[0023] 步骤三、吡啶酯标记C肽抗体

[0024] 取C肽抗体,用浓度为20mM的PB缓冲液置换C肽抗体保存液,用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至1mg/ml,按照C肽抗体与吡啶酯摩尔比为1:(5~20)的比例添加吡啶酯,37℃孵育2~4h进行标记;加入封闭液,37℃孵育2~4h后,用蛋白纯化仪进行纯化,收集蛋白峰值,

得到吡啶酯标记的C肽抗体。

[0025] 作为优选的实施方式,所述封闭液选用浓度为20mM的PB缓冲液,其中含有2~5%的BSA。

[0026] 本发明的C肽化学发光免疫检测试剂盒的检测方法,包括以下步骤:

[0027] 步骤一、向样品中依次加入生物素标记的C肽抗体、吡啶酯标记的C肽抗体和链霉亲和素包被的磁微粒,样品中的C肽抗原与生物素标记的C肽抗体、吡啶酯标记的C肽抗体发生免疫反应,形成生物素-C肽抗体-C肽抗原-C肽抗体-吡啶酯溶剂;

[0028] 步骤二、链霉亲和素包被的磁微粒与生物素相结合,形成磁珠-链霉亲和素-生物素-C肽抗体-C肽抗原-C肽抗体-吡啶酯复合物;

[0029] 步骤三、加入清洗缓冲液,将杂质清洗去除;

[0030] 步骤四、加入酸性激发液,使吡啶酯游离;

[0031] 步骤五、加入碱性激发液,使吡啶酯发射光子;

[0032] 步骤六、根据样品的光量子数计算出C肽的浓度。

[0033] 本发明的有益效果是:与现有技术相比,本发明提供一种C肽化学发光免疫检测试剂盒,能够实现对血清/血浆/尿液中C肽的检测,采用双抗体夹心法,同时利用生物素-亲和素体系级联放大效应,采用吡啶酯瞬时化学发光及磁珠分离技术,大大提高了试剂盒的检测灵敏度,减少了反应时间,降低了试剂成本,同时降低了噪音干扰。

[0034] 本发明的C肽化学发光免疫检测试剂盒与其他厂家的链霉亲和素磁珠-生物素-C肽抗体相比,具有工艺及操作简单、特异性好、磁珠的分散态良好、磁珠不易凝集、试剂重复性好等优点。

附图说明

[0035] 图1为本发明的C肽化学发光免疫检测试剂盒剂量反应标准曲线。

具体实施方式

[0036] 本发明的C肽化学发光免疫检测试剂盒,主要包括:链霉亲和素包被的磁微粒;生物素标记的C肽抗体;吡啶酯标记的C肽抗体;清洗缓冲液;化学发光预激发液;校准品;质控品。

[0037] 校准品包括低值校准品和高值校准品,所述低值校准品浓度为1ng/ml,所述高值校准品浓度为20ng/ml。

[0038] 质控品包括低值质控品和高值质控品,低值质控品浓度为1ng/ml,高值质控品浓度为20ng/ml。

[0039] 化学发光预激发液包括酸性激发液和碱性激发液,酸性激发液为硝酸和过氧化氢溶液,碱性激发液为氢氧化钠溶液。

[0040] 清洗缓冲液为加入表面活性剂的PB缓冲液。

[0041] 链霉亲和素包被的磁微粒中,磁微粒与链霉亲和素的质量比为1:(10~20)。

[0042] 生物素标记的C肽抗体中,C肽抗体与生物素的摩尔比为1:(5~20)。

[0043] 吡啶酯标记的C肽抗体中,C肽抗体与吡啶酯的摩尔比为1:(5~20)。

[0044] 本发明的C肽化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,主要包括以下步骤:

[0045] 步骤一、链霉亲和素包被磁微粒

[0046] 取磁微粒,用浓度为20mM的PB缓冲液清洗3次,用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至10mg/ml;按照磁微粒与链霉亲和素质量比为1:(10~20)的比例添加链霉亲和素,37℃孵育18~24h后,置于磁分离架上分离磁珠;去上清,用浓度为20mM的PB缓冲液清洗3次,加入封闭液(浓度为20mM的PB缓冲液,其中含有2~5%的BSA),37℃孵育18~24h后,置于磁分离架上分离磁珠;去上清,用浓度为20mM的PB缓冲液清洗3次,用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至10mg/ml,得到链霉亲和素包被的磁微粒,2~8℃保存备用;

[0047] 步骤二、生物素标记C肽抗体

[0048] 取C肽抗体,用浓度为20mM的PB缓冲液置换C肽抗体保存液,用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至1mg/ml;按照C肽抗体与生物素摩尔比为1:(5~20)的比例添加生物素,37℃孵育2~4h进行标记;加入封闭液(浓度为20mM的PB缓冲液,其中含有2~5%的BSA),37℃孵育2~4h后,用蛋白纯化仪进行纯化,收集蛋白峰值,得到生物素标记的C肽抗体;

[0049] 步骤三、吖啶酯标记C肽抗体

[0050] 取C肽抗体,用浓度为20mM的PB缓冲液置换C肽抗体保存液,用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至1mg/ml,按照C肽抗体与吖啶酯摩尔比为1:(5~20)的比例添加吖啶酯,37℃孵育2~4h进行标记;加入封闭液(浓度为20mM的PB缓冲液,其中含有2~5%的BSA),37℃孵育2~4h后,用蛋白纯化仪进行纯化,收集蛋白峰值,得到吖啶酯标记的C肽抗体。

[0051] 本发明的C肽化学发光免疫检测试剂盒的检测方法,主要包括以下步骤:

[0052] 步骤一、将样品加入试剂盒中,样品中的C肽抗原与生物素标记的C肽抗体、吖啶酯标记的C肽抗体发生免疫反应,形成生物素-C肽抗体-C肽抗原-C肽抗体-吖啶酯溶剂;

[0053] 步骤二、链霉亲和素包被的磁微粒与生物素相结合,形成磁珠-链霉亲和素-生物素-C肽抗体-C肽抗原-C肽抗体-吖啶酯复合物;

[0054] 步骤三、加入清洗缓冲液,将杂质(这部分属于游离的吖啶酯或者是样品中不与抗体结合的其他物质的混合物)清洗去除;

[0055] 步骤四、加入酸性激发液,使吖啶酯游离;

[0056] 步骤五、加入碱性激发液,使吖啶酯发射光子;

[0057] 步骤六、根据样品的光量子数计算出C肽的浓度。

[0058] 本发明的C肽化学发光免疫检测试剂盒用于检测C肽含量时,利用全自动化学发光免疫分析仪对C肽校准品进行检测,绘制标准曲线,内置于电脑软件;然后根据需求按照上述的检测方法测试临床样品,根据样品的光量子数与C肽浓度成正比的关系计算出C肽的浓度;最后对本发明的C肽化学发光免疫检测试剂盒进行性能(灵敏度、线性、抗干扰/特异性)的评价。

[0059] 以下结合实施例对本发明作进一步详细说明。

[0060] 实施例中所用到的校准品可通过以下方法制备得到:

[0061] ①校准品缓冲液的配制:校准品缓冲液由0.1mol/L的PB、0.15mol/L的氯化钠、1%的牛血清白蛋白和0.05%的tween-20组成,pH值为6.5,2~8℃保存备用。

[0062] ②取一定量的C肽用第①步所得校准品缓冲液分别配制成浓度为0ng/mL,0.50ng/mL、1.00ng/mL、5.00ng/mL、10.00ng/mL、50.00ng/mL、60.00ng/mL的校准品,等量分装成浓度分别为0ng/mL,0.50ng/mL、1.00ng/mL、5.00ng/mL、10.00ng/mL、50.00ng/mL、60.00ng/mL

的7瓶校准品。

[0063] 实施例1 C肽化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0064] 1) 链霉亲和素包被磁微粒

[0065] 取一定量的磁微粒,用浓度为20mM的PB缓冲液清洗3次,然后用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至10mg/ml;按照磁微粒与链霉亲和素质量比为1:15的比例添加链霉亲和素,37℃孵育21h后,置于磁分离架上分离磁珠;去上清,用浓度为20mM的PB缓冲液清洗3次,加入浓度为20mM的PB缓冲液(含有3%的BSA)作为封闭液,37℃孵育21h后,置于磁分离架上分离磁珠;去上清,用浓度为20mM的PB缓冲液清洗3次,用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至10mg/ml,得到链霉亲和素包被的磁微粒试剂,2~8℃保存备用。

[0066] 2) 生物素标记C肽抗体

[0067] 取一定量的C肽抗体,首先用浓度为20mM的PB缓冲液置换C肽抗体保存液,用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至1mg/ml;按照C肽抗体与生物素摩尔比为1:10的比例添加生物素,37℃孵育3h进行标记;加入浓度为20mM的PB缓冲液(含有3%的BSA)作为封闭液,37℃孵育3h后,用蛋白纯化仪进行纯化,收集蛋白峰值,得到生物素标记的C肽抗体。

[0068] 3) 吖啶酯标记C肽抗体

[0069] 取一定量的C肽抗体,首先用浓度为20mM的PB缓冲液置换C肽抗体保存液,用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至1mg/ml,按照C肽抗体与吖啶酯摩尔比为1:10的比例添加吖啶酯,37℃孵育3h进行标记;加入浓度为20mM的PB缓冲液(含有3%的BSA)作为封闭液,37℃孵育3h后,用蛋白纯化仪进行纯化,收集蛋白峰值,得到吖啶酯标记的C肽抗体。

[0070] 实施例2 C肽化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0071] 1) 链霉亲和素包被磁微粒

[0072] 取一定量的磁微粒,用浓度为20mM的PB缓冲液清洗3次,然后用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至10mg/ml;按照磁微粒与链霉亲和素质量比为1:10的比例添加链霉亲和素,37℃孵育18h后,置于磁分离架上分离磁珠;去上清,用浓度为20mM的PB缓冲液清洗3次,加入浓度为20mM的PB缓冲液(含有2%的BSA)作为封闭液,37℃孵育18h后,置于磁分离架上分离磁珠;去上清,用浓度为20mM的PB缓冲液清洗3次,用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至10mg/ml,得到链霉亲和素包被的磁微粒试剂,2~8℃保存备用。

[0073] 2) 生物素标记C肽抗体

[0074] 取一定量的C肽抗体,首先用浓度为20mM的PB缓冲液置换C肽抗体保存液,用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至1mg/ml;按照C肽抗体与生物素摩尔比为1:5的比例添加生物素,37℃孵育2h进行标记;加入浓度为20mM的PB缓冲液(含有2%的BSA)作为封闭液,37℃孵育2h后,用蛋白纯化仪进行纯化,收集蛋白峰值,得到生物素标记的C肽抗体。

[0075] 3) 吖啶酯标记C肽抗体

[0076] 取一定量的C肽抗体,首先用浓度为20mM的PB缓冲液置换C肽抗体保存液,用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至1mg/ml,按照C肽抗体与吖啶酯摩尔比为1:5的比例添加吖啶酯,37℃孵育2h进行标记;加入浓度为20mM的PB缓冲液(含有2%的BSA)作为封闭液,37℃孵育2h后,用蛋白纯化仪进行纯化,收集蛋白峰值,得到吖啶酯标记的C肽抗体。

[0077] 实施例3 C肽化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0078] 1) 链霉亲和素包被磁微粒

[0079] 取一定量的磁微粒,用浓度为20mM的PB缓冲液清洗3次,然后用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至10mg/ml;按照磁微粒与链霉亲和素质量比为1:20的比例添加链霉亲和素,37℃孵育24h后,置于磁分离架上分离磁珠;去上清,用浓度为20mM的PB缓冲液清洗3次,加入浓度为20mM的PB缓冲液(含有5%的BSA)作为封闭液,37℃孵育24h后,置于磁分离架上分离磁珠;去上清,用浓度为20mM的PB缓冲液清洗3次,用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至10mg/ml,得到链霉亲和素包被的磁微粒试剂,2~8℃保存备用。

[0080] 2) 生物素标记C肽抗体

[0081] 取一定量的C肽抗体,首先用浓度为20mM的PB缓冲液置换C肽抗体保存液,用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至1mg/ml;按照C肽抗体与生物素摩尔比为1:20的比例添加生物素,37℃孵育4h进行标记;加入浓度为20mM的PB缓冲液(含有5%的BSA)作为封闭液,37℃孵育4h后,用蛋白纯化仪进行纯化,收集蛋白峰值,得到生物素标记的C肽抗体。

[0082] 3) 吡啶酯标记C肽抗体

[0083] 取一定量的C肽抗体,首先用浓度为20mM的PB缓冲液置换C肽抗体保存液,用浓度为20mM的PB缓冲液稀释至1mg/ml,按照C肽抗体与吡啶酯摩尔比为1:20的比例添加吡啶酯,37℃孵育4h进行标记;加入浓度为20mM的PB缓冲液(含有5%的BSA)作为封闭液,37℃孵育4h后,用蛋白纯化仪进行纯化,收集蛋白峰值,得到吡啶酯标记的C肽抗体。

[0084] 实施例4样品检测

[0085] 利用本发明的C肽化学发光免疫检测试剂盒检测C肽含量时,以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具对C肽校准品进行检测,根据表1中的数据绘制标准曲线,如图1所示,内置于电脑软件。图1中具体相关参数如表1所示。

[0086] 表1

[0087]

校准点	校准品浓度 (ng/mL)	光量子数
1	0.00	677
2	0.63	5556
3	1.11	10717
4	4.96	57525
5	10.20	172403
6	47.89	1083307
7	59.75	1421833

[0088] 然后根据需求按照本发明的检测方法测试临床样品,同时采用一步法两步孵育对样品中的C肽进行检测,具体的检测过程如下:

[0089] 1) 向样品中依次加入生物素标记的C肽抗体、吡啶酯标记的C肽抗体和链霉亲和素包被的磁微粒,样品中的C肽抗原与生物素标记的C肽抗体(第一抗体)、吡啶酯标记的C肽抗体(第二抗体)发生免疫反应,形成生物素-C肽抗体-C肽抗原-C肽抗体-吡啶酯溶剂;

[0090] 2) 链霉亲和素包被的磁微粒与生物素相结合,形成磁珠-链霉亲和素-生物素-C肽抗体-C肽抗原-C肽抗体-吡啶酯复合物;

[0091] 3) 加入清洗缓冲液,将杂质(这部分属于游离的吡啶酯或者是样品中不与抗体结合的其他物质的混合物)清洗去除;

[0092] 4) 加入酸性激发液,使吡啶酯游离;

[0093] 5) 加入碱性激发液,使吡啶酯发射光子;

[0094] 6) 记录样品的光量子数,根据样品的光量子数与C肽浓度成正比的关系计算出C肽的浓度。

[0095] 实施例5 C肽化学发光免疫检测试剂盒的性能评价

[0096] ①最低检测限检测

[0097] 用零浓度校准品(一级校准品A)和样本稀释液(一级校准品B)作为样品进行检测,重复测定20次,得出20次检测结果的RLU值(相对发光值),计算其平均值(M)和标准差(SD),得出 $M+2SD$,根据零浓度校准品和相邻校准品之间的浓度—RLU值结果进行两点回归拟合得出一次方程,将 $M+2SD$ 的RLU值带入上述一次方程,求出对应的浓度值,即为最低检测限,结果应符合应小于 0.1ng/mL 。结果如表2所示。

[0098] 表2最低检测限数据

[0099]

测定次数	一级校准品 A	一级校准品 B
Rep1	639	5867
Rep2	565	5112
Rep3	596	5904
Rep4	594	/
Rep5	470	
Rep6	563	
Rep7	440	
Rep8	549	
Rep9	445	
Rep10	660	
Rep11	575	
Rep12	683	

[0100]

Rep13	536	
Rep14	426	
Rep15	657	
Rep16	563	
Rep17	600	
Rep18	605	
Rep19	531	
Rep20	579	
测定均值	563.80	5627.67
样品	一级校准品 A	一级校准品 B
浓度 (ng/mL)	0.00	0.64
标准差 (SD)	73.42	/
测定均值+2SD	710.64	/
最低检测限 (ng/mL)	0.012	

[0101] ②线性检测

[0102] 线性检测的标准曲线如图1所示。将接近线性范围上限的高值浓度样品按一定比例稀释为至少5种浓度,其中低值浓度样品须接近线性范围的下限。按照试剂盒说明书进行操作,将每一浓度的样品重复检测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,并计算线性相关系数 r ,结果应符合线性范围为 $0.2\sim 1000\text{ng/mL}$,线性相关系数 r 应 ≥ 0.9900 。结果如表3所示。

[0103] 表3线性数据

[0104]

理论值 ng/mL	L9	L8	L7	L6	L5	L4	L3	L2	L1	相关 系数 (r)
测定值 ng/mL	40	20	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	0.00	0.9999
	39.99	19.99	9.86	4.98	2.51	1.26	0.63	0.30	0.00	
	39.97	20.01	9.81	4.95	2.57	1.22	0.66	0.28	0.00	

[0105]

	40.01	20.21	9.96	4.98	2.52	1.26	0.65	0.29	0.00	
测定均值 ng/mL	39.99	20.07	9.87	4.97	2.53	1.24	0.65	0.29	0.01	

[0106] ③重复性检测

[0107] 用同一批号试剂盒,对高值和低值两个浓度的样品各重复检测10次,计算10次测量结果的平均值 $\bar{X}$ 和标准差SD,根据公式(1)计算变异系数(CV),结果应符合变异系数(CV)应 $\leq 8.0\%$ 。结果如表4所示。

$$[0108] \quad CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\% \quad (1)$$

[0109] 式中:CV—变异系数;

[0110] SD—测量结果的标准差;

[0111] $\bar{X}$ —测量结果的平均值。

[0112] 表4重复性数据

[0113]

测定次数	重复性样品1(低值)	重复性样品2(高值)
Rep1	0.95	19.61
Rep2	0.98	19.86
Rep3	1.01	19.65
Rep4	0.96	19.33
Rep5	0.99	20.01
Rep6	0.96	20.23
Rep7	1.01	19.88
Rep8	1.00	19.68
Rep9	1.02	20.29
Rep10	0.96	20.54
测定均值	0.984	19.908
SD	0.026	0.366
CV	2.59%	1.84%

[0114] 由上述检测结果可知,本发明的试剂盒的检测线性相关系数 $r \geq 0.9900$,即线性检测合格;最低检测限是 0.012 ng/mL ;重复性检测结果符合变异系数(CV)应 $\leq 8.0\%$ 要求,即重复性检测合格。由此证明,本发明的试剂盒具有灵敏度高、线性范围广、稳定性好等优点。

[0115] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

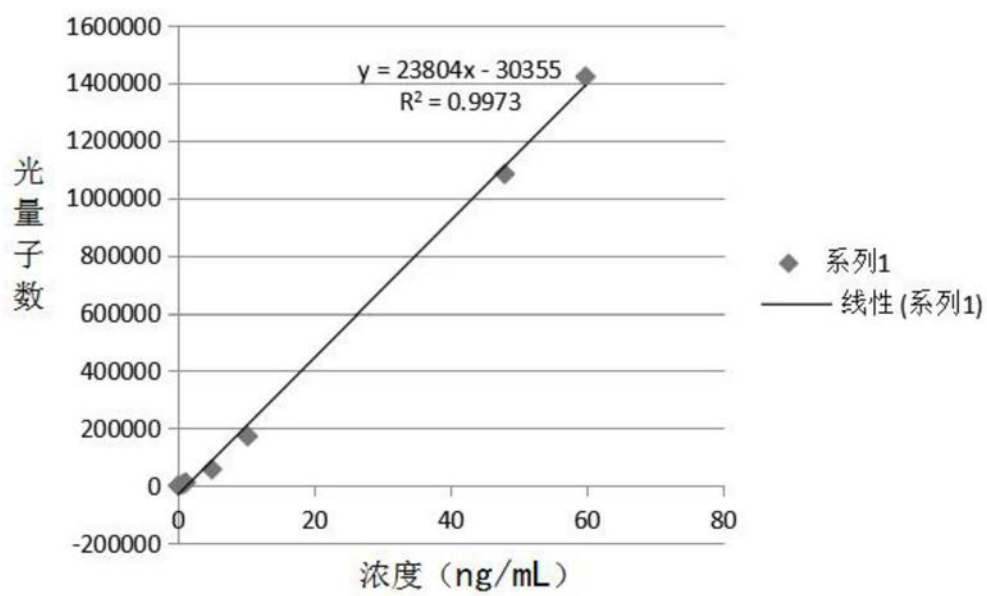


图1

专利名称(译)	C肽化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和检测方法		
公开(公告)号	CN109239356A	公开(公告)日	2019-01-18
申请号	CN201811060508.5	申请日	2018-09-12
[标]发明人	韩美玉 王立英 高威 孙成艳 何浩会		
发明人	韩美玉 王立英 高威 孙成艳 何浩会		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/58 G01N33/543 G01N33/553 G01N33/532 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/532 G01N33/54326 G01N33/553 G01N33/58 G01N33/68		
代理人(译)	于晓庆		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

C肽化学发光定量检测试剂盒及其制备方法和检测方法，属于免疫分析领域，解决了现有定C-P检测方法存在的灵敏度低、反应时间长、成本高的问题。该试剂盒包括链霉亲和素包被的磁微粒；生物素标记的C肽抗体；吖啶酯标记的C肽抗体；清洗缓冲液；化学发光预激发液；校准品；质控品。检测方法为：样品中的C肽抗原与生物素标记的C肽抗体、吖啶酯标记的C肽抗体发生免疫反应，形成生物素-C肽抗体-C肽抗原-C肽抗体-吖啶酯复合物；链霉亲和素包被的磁微粒与生物素相结合，形成磁珠-链霉亲和素-生物素-C肽抗体-C肽抗原-C肽抗体-吖啶酯复合物；加入清洗缓冲液等，计算出C肽浓度。本发明灵敏度高、特异性好、反应时间短、成本低。

