



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105866106 A

(43)申请公布日 2016.08.17

(21)申请号 201610443565.6

(22)申请日 2016.06.20

(71)申请人 袁氏(宿迁)生物技术有限公司

地址 223800 江苏省宿迁市宿城区宿迁经济开发区北区纬二路

(72)发明人 袁雪生 张书胜

(74)专利代理机构 常州佰业腾飞专利代理事务所(普通合伙) 32231

代理人 黄杭飞

(51) Int. Cl.

G01N 21/76(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种化学发光免疫分析仪试剂盒的制备

(57)摘要

本发明公开了一种化学发光免疫分析仪试剂盒的制备,所述重氮化原料的质量组成,所述形成CLEN-BSA和HRP-CLEN后进行偶联物的鉴定,可以确定并提高合成产物的偶联比,所述中试剂盒组装后按规定方法抽样检测,可以确保生产的试剂盒的有消息,该化学发光免疫分析仪试剂盒,以CLEN为目标检测物标记HRP并配以鲁米诺作为发光底物,减少了基质效应的影响同时极大的提高了线性检测范围及灵敏度,市场潜力巨大,前景广阔。

1. 一种化学发光免疫分析仪试剂盒的制备,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 盐酸克伦特罗(CLEN)的重氮化

取盐酸克伦特罗,加入 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCL和蒸馏水于反应器中,同时将pH调节至0.4-0.6,然后,往其中连续缓慢加入 $0.2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na NO₂,并搅拌50-70min;

(2) 盐酸克伦特罗(CLEN)与牛血清白蛋白(BSA)的偶联

将牛血清白蛋白溶于磷酸盐缓冲液中,边搅拌边将重氮化的盐酸克伦特罗缓慢加入其中,形成反应体系,加入过程中用 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na OH调节p H值,滴加完成后,将反应体系置于4℃下,调节转速进行反应,形成反应液,反应结束后反应液于4℃下, $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ p H=7的磷酸盐缓冲液中透析2-4d,转入容器中静止3-5h后离心,形成CLEN-BSA;

(3) 盐酸克伦特罗(CLEN)与辣根过氧化物酶(HRP)的偶联

将辣根过氧化物酶溶于磷酸盐缓冲液中,边搅拌边将重氮化的盐酸克伦特罗缓慢加入其中,形成反应体系,加入过程中用 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na OH调节p H值,滴加完成后,将反应体系置于4℃下,调节转速进行反应,形成反应液,反应结束后反应液于4℃下, $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ p H=7的磷酸盐缓冲液中透析2-4d,转入容器中静止3-5h后离心,形成HRP-CLEN;

(4) 多克隆抗体制备

将CLEN-BSA与弗氏佐剂混合后,以皮下多位点注射方式免疫雌性新西兰兔,接着取全血并分离血清,用正辛酸-饱和硫酸铵法提取抗体,然后将抗体加甘油于-20℃保存备用;

(5) CLEN标准溶液的制备

确定抗体和HRP-CLEN的最佳稀释度,配制40.000ng/m L CLEN标准溶液;

(6) 试剂盒组装

将CLEN标准溶液($40\mu\text{g}/\text{m L}$)、HRP-CLEN、底物液、终止液、浓缩洗涤液和多克隆抗体加入到抗体包被的发光板条中,即得到成品。

2. 按照权利要求1所述的一种化学发光免疫分析仪试剂盒的制备,其特征在于:所述步骤(1)中,所述重氮化原料的质量组成包括盐酸克伦特罗50-70份、HCL10-30份、蒸馏水5-15份和Na NO₂0.6-0.8份。

3. 按照权利要求1所述的一种化学发光免疫分析仪试剂盒的制备,其特征在于:所述步骤(2)和(3)中形成CLEN-BSA和HRP-CLEN后进行偶联物的鉴定。

4. 按照权利要求3所述的一种化学发光免疫分析仪试剂盒的制备,其特征在于:所述偶联物的鉴定的方法为配置CLEN溶液($0.25\text{mg} \cdot \text{m L}^{-1}$)和载体蛋白溶液($0.5\text{mg} \cdot \text{m L}^{-1}$),分别对CL、载体蛋白和偶联物溶液进行紫外扫描。

5. 按照权利要求1所述的一种化学发光免疫分析仪试剂盒的制备,其特征在于:所述步骤(6)中试剂盒组装后按规定方法抽样检测,合格后出厂。

6. 按照权利要求5所述的一种化学发光免疫分析仪试剂盒的制备,其特征在于:所述检验的对象为检测线性、灵敏度和特异性。

一种化学发光免疫分析仪试剂盒的制备

技术领域

[0001] 本发明属于化学发光免疫研发和应用领域,更具体地说,本发明涉及一种化学发光免疫分析仪试剂盒的制备。

背景技术

[0002] 化学发光免疫分析技术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。作为新型疾病检测诊断方法,化学发光诊断试剂是多种相互关联的诊断试剂的集合,通过化学发光免疫试剂对血清进行快速检测,在几秒钟内即能得到准确的检测结果。与目前常用的放射性免疫分析法和酶联免疫分析法相比,其灵敏度高,检测时间短,测量线性范围宽,稳定性、安全性好,试剂中不含放射性和致畸物质,对人体无害。该试剂盒可广泛应用于传染性疾病、肥胖及相关疾病、内分泌系统、遗传病、肿瘤的早期诊断,同时亦可应用于环保监测、刑事侦查、海关检查、动植物检验检疫等众多领域。

发明内容

[0003] 本发明所要解决的问题是提供一种化学发光免疫分析仪试剂盒的制备。

[0004] 为了实现上述目的,本发明采取的技术方案为:

[0005] 一种化学发光免疫分析仪试剂盒的制备,包括如下步骤:

[0006] (1)盐酸克伦特罗(CLEN)的重氮化

[0007] 取盐酸克伦特罗,加入 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{HCL}$ 和蒸馏水于反应器中,同时将pH调节至0.4-0.6,然后,往其中连续缓慢加入 $0.2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{Na NO}_2$,并搅拌50-70min;

[0008] (2)盐酸克伦特罗(CLEN)与牛血清白蛋白(BSA)的偶联

[0009] 将牛血清白蛋白溶于磷酸盐缓冲液中,边搅拌边将重氮化的盐酸克伦特罗缓慢加入其中,形成反应体系,加入过程中用 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{Na OH}$ 调节pH值,滴加完成后,将反应体系置于 4°C 下,调节转速进行反应,形成反应液,反应结束后反应液于 4°C 下, $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{pH}=7$ 的磷酸盐缓冲液中透析2-4d,转入容器中静止3-5h后离心,形成CLEN-BSA;

[0010] (3)盐酸克伦特罗(CLEN)与辣根过氧化物酶(HRP)的偶联

[0011] 将辣根过氧化物酶溶于磷酸盐缓冲液中,边搅拌边将重氮化的盐酸克伦特罗缓慢加入其中,形成反应体系,加入过程中用 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{Na OH}$ 调节pH值,滴加完成后,将反应体系置于 4°C 下,调节转速进行反应,形成反应液,反应结束后反应液于 4°C 下, $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{pH}=7$ 的磷酸盐缓冲液中透析2-4d,转入容器中静止3-5h后离心,形成HRP-CLEN;

[0012] (4)多克隆抗体制备

[0013] 将CLEN-BSA与弗氏佐剂混合后,以皮下多位点注射方式免疫雌性新西兰兔,接着取全血并分离血清,用正辛酸-饱和硫酸铵法提取抗体,然后将抗体加甘油于 -20°C 保存备用;

- [0014] (5)CLEN标准溶液的制备
- [0015] 确定抗体和HRP-CLEN的最佳稀释度,配制40.000ng/m L CLEN标准溶液;
- [0016] (6)试剂盒组装
- [0017] 将CLEN标准溶液(40 μ g/m L)、HRP-CLEN、底物液、终止液、浓缩洗涤液和多克隆抗体加入到抗体包被的发光板条中,即得到成品。
- [0018] 优选的,所述重氮化原料的质量组成包括盐酸克伦特罗50-70份、HCL10-30份、蒸馏水5-15份和Na NO₂0.6-0.8份。
- [0019] 优选的,所述步骤(2)和(3)中形成CLEN-BSA和HRP-CLEN后进行偶联物的鉴定。
- [0020] 优选的,所述偶联物的鉴定的方法为配置CLEN溶液(0.25mg \cdot m L⁻¹)和载体蛋白溶液(0.5mg \cdot m L⁻¹),分别对CL、载体蛋白和偶联物溶液进行紫外扫描。
- [0021] 优选的,所述步骤(6)中试剂盒组装后按规定方法抽样检测,合格后出厂。
- [0022] 优选的,所述检验的对象为检测线性、灵敏度和特异性。
- [0023] 有益效果:本发明提供了一种化学发光免疫分析仪试剂盒的制备,所述重氮化原料的质量组成,所述形成CLEN-BSA和HRP-CLEN后进行偶联物的鉴定,可以确定并提高合成产物的偶联比,所述中试剂盒组装后按规定方法抽样检测,可以确保生产的试剂盒的有消息,该化学发光免疫分析仪试剂盒,以CLEN为目标检测物标记HRP并配以鲁米诺作为发光底物,减少了基质效应的影响同时极大的提高了线性检测范围及灵敏度,市场潜力巨大,前景广阔。

具体实施方式

- [0024] 实施例1:
- [0025] 一种化学发光免疫分析仪试剂盒的制备,包括如下步骤:
- [0026] (1)盐酸克伦特罗(CLEN)的重氮化
- [0027] 取盐酸克伦特罗,加入1mol \cdot L⁻¹HCL和蒸馏水于反应器中,同时将pH调节至0.4,然后,往其中连续缓慢加入0.2mol \cdot L⁻¹Na NO₂,并搅拌50min,所述重氮化原料的质量组成包括盐酸克伦特罗50份、HCL10份、蒸馏水5份和NaNO₂0.6份;
- [0028] (2)盐酸克伦特罗(CLEN)与牛血清白蛋白(BSA)的偶联
- [0029] 将牛血清白蛋白溶于磷酸盐缓冲液中,边搅拌边将重氮化的盐酸克伦特罗缓慢加入其中,形成反应体系,加入过程中用1mol \cdot L⁻¹Na OH调节p H值,滴加完成后,将反应体系置于4 $^{\circ}$ C下,调节转速进行反应,形成反应液,反应结束后反应液于4 $^{\circ}$ C下,0.01mol \cdot L⁻¹p H=7的磷酸盐缓冲液中透析2d,转入容器中静止3h后离心,形成CLEN-BSA,形成CLEN-BSA后进行偶联物的鉴定,所述偶联物的鉴定的方法为配置CLEN溶液(0.25mg \cdot m L⁻¹)和载体蛋白溶液(0.5mg \cdot m L⁻¹),分别对CL、载体蛋白和CLEN-BSA溶液进行紫外扫描;
- [0030] (3)盐酸克伦特罗(CLEN)与辣根过氧化物酶(HRP)的偶联
- [0031] 将辣根过氧化物酶溶于磷酸盐缓冲液中,边搅拌边将重氮化的盐酸克伦特罗缓慢加入其中,形成反应体系,加入过程中用1mol \cdot L⁻¹Na OH调节p H值,滴加完成后,将反应体系置于4 $^{\circ}$ C下,调节转速进行反应,形成反应液,反应结束后反应液于4 $^{\circ}$ C下,0.01mol \cdot L⁻¹p H=7的磷酸盐缓冲液中透析2d,转入容器中静止3h后离心,形成HRP-CLEN,形成HRP-CLEN后进行偶联物的鉴定,所述偶联物的鉴定的方法为配置CLEN溶液(0.25mg \cdot m L⁻¹)和载体蛋白

溶液($0.5\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),分别对CL、载体蛋白和HRP-CLEN溶液进行紫外扫描;

[0032] (4)多克隆抗体制备

[0033] 将CLEN-BSA与弗氏佐剂混合后,以皮下多位点注射方式免疫雌性新西兰兔,接着取全血并分离血清,用正辛酸-饱和硫酸铵法提取抗体,然后将抗体加甘油于 -20°C 保存备用;

[0034] (5)CLEN标准溶液的制备

[0035] 确定抗体和HRP-CLEN的最佳稀释度,配制 $40.000\text{ng}/\text{mL}$ CLEN标准溶液;

[0036] (6)试剂盒组装

[0037] 将CLEN标准溶液($40\mu\text{g}/\text{mL}$)、HRP-CLEN、底物液、终止液、浓缩洗涤液和多克隆抗体加入到抗体包被的发光板条中,即得到成品,试剂盒组装后按规定方法抽样检测,合格后出厂,所述检验的对象为检测线性、灵敏度和特异性。

[0038] 实施例2:

[0039] 一种化学发光免疫分析仪试剂盒的制备,包括如下步骤:

[0040] (1)盐酸克伦特罗(CLEN)的重氮化

[0041] 取盐酸克伦特罗,加入 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{HCL}$ 和蒸馏水于反应器中,同时将pH调节至0.5,然后,往其中连续缓慢加入 $0.2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{NaNO}_2$,并搅拌60min,所述重氮化原料的质量组成包括盐酸克伦特罗60份、HCL20份、蒸馏水10份和 NaNO_2 0.7份;

[0042] (2)盐酸克伦特罗(CLEN)与牛血清白蛋白(BSA)的偶联

[0043] 将牛血清白蛋白溶于磷酸盐缓冲液中,边搅拌边将重氮化的盐酸克伦特罗缓慢加入其中,形成反应体系,加入过程中用 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{NaOH}$ 调节pH值,滴加完成后,将反应体系置于 4°C 下,调节转速进行反应,形成反应液,反应结束后反应液于 4°C 下, $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{pH}=7$ 的磷酸盐缓冲液中透析3d,转入容器中静止4h后离心,形成CLEN-BSA,形成CLEN-BSA后进行偶联物的鉴定,所述偶联物的鉴定的方法为配置CLEN溶液($0.25\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)和载体蛋白溶液($0.5\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),分别对CL、载体蛋白和CLEN-BSA溶液进行紫外扫描;

[0044] (3)盐酸克伦特罗(CLEN)与辣根过氧化物酶(HRP)的偶联

[0045] 将辣根过氧化物酶溶于磷酸盐缓冲液中,边搅拌边将重氮化的盐酸克伦特罗缓慢加入其中,形成反应体系,加入过程中用 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{NaOH}$ 调节pH值,滴加完成后,将反应体系置于 4°C 下,调节转速进行反应,形成反应液,反应结束后反应液于 4°C 下, $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{pH}=7$ 的磷酸盐缓冲液中透析3d,转入容器中静止4h后离心,形成HRP-CLEN,形成HRP-CLEN后进行偶联物的鉴定,所述偶联物的鉴定的方法为配置CLEN溶液($0.25\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)和载体蛋白溶液($0.5\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),分别对CL、载体蛋白和HRP-CLEN溶液进行紫外扫描;

[0046] (4)多克隆抗体制备

[0047] 将CLEN-BSA与弗氏佐剂混合后,以皮下多位点注射方式免疫雌性新西兰兔,接着取全血并分离血清,用正辛酸-饱和硫酸铵法提取抗体,然后将抗体加甘油于 -20°C 保存备用;

[0048] (5)CLEN标准溶液的制备

[0049] 确定抗体和HRP-CLEN的最佳稀释度,配制 $40.000\text{ng}/\text{mL}$ CLEN标准溶液;

[0050] (6)试剂盒组装

[0051] 将CLEN标准溶液($40\mu\text{g}/\text{mL}$)、HRP-CLEN、底物液、终止液、浓缩洗涤液和多克隆抗

体加入到抗体包被的发光板条中,即得到成品,试剂盒组装后按规定方法抽样检测,合格后出厂,所述检验的对象为检测线性、灵敏度和特异性。

[0052] 实施例3:

[0053] 一种化学发光免疫分析仪试剂盒的制备,包括如下步骤:

[0054] (1)盐酸克伦特罗(CLEN)的重氮化

[0055] 取盐酸克伦特罗,加入 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCL和蒸馏水于反应器中,同时将pH调节至0.6,然后,往其中连续缓慢加入 $0.2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na NO₂,并搅拌70min,所述重氮化原料的质量组成包括盐酸克伦特罗70份、HCL30份、蒸馏水15份和Na NO₂0.8份;

[0056] (2)盐酸克伦特罗(CLEN)与牛血清白蛋白(BSA)的偶联

[0057] 将牛血清白蛋白溶于磷酸盐缓冲液中,边搅拌边将重氮化的盐酸克伦特罗缓慢加入其中,形成反应体系,加入过程中用 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na OH调节pH值,滴加完成后,将反应体系置于4℃下,调节转速进行反应,形成反应液,反应结束后反应液于4℃下, $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH=7的磷酸盐缓冲液中透析4d,转入容器中静止5h后离心,形成CLEN-BSA,形成CLEN-BSA后进行偶联物的鉴定,所述偶联物的鉴定的方法为配置CLEN溶液($0.25\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)和载体蛋白溶液($0.5\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),分别对CL、载体蛋白和CLEN-BSA溶液进行紫外扫描;

[0058] (3)盐酸克伦特罗(CLEN)与辣根过氧化物酶(HRP)的偶联

[0059] 将辣根过氧化物酶溶于磷酸盐缓冲液中,边搅拌边将重氮化的盐酸克伦特罗缓慢加入其中,形成反应体系,加入过程中用 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na OH调节pH值,滴加完成后,将反应体系置于4℃下,调节转速进行反应,形成反应液,反应结束后反应液于4℃下, $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH=7的磷酸盐缓冲液中透析4d,转入容器中静止5h后离心,形成HRP-CLEN,形成HRP-CLEN后进行偶联物的鉴定,所述偶联物的鉴定的方法为配置CLEN溶液($0.25\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)和载体蛋白溶液($0.5\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),分别对CL、载体蛋白和HRP-CLEN溶液进行紫外扫描;

[0060] (4)多克隆抗体制备

[0061] 将CLEN-BSA与弗氏佐剂混合后,以皮下多位点注射方式免疫雌性新西兰兔,接着取全血并分离血清,用正辛酸-饱和硫酸铵法提取抗体,然后将抗体加甘油于-20℃保存备用;

[0062] (5)CLEN标准溶液的制备

[0063] 确定抗体和HRP-CLEN的最佳稀释度,配制 $40.000\text{ng}/\text{mL}$ CLEN标准溶液;

[0064] (6)试剂盒组装

[0065] 将CLEN标准溶液($40\mu\text{g}/\text{mL}$)、HRP-CLEN、底物液、终止液、浓缩洗涤液和多克隆抗体加入到抗体包被的发光板条中,即得到成品,试剂盒组装后按规定方法抽样检测,合格后出厂,所述检验的对象为检测线性、灵敏度和特异性。

[0066] 经过以上方法后,分别取出样品,测量结果如下:

[0067]

检测项目	实施例 1	实施例 2	实施例 3	现有指标
检测限 (ng/m L)	0.034	0.023	0.036	0.041
灵敏度 (ng/m L)	0.3658	0.3977	0.3574	0.299 8
精密度 (%)	96.61	97.77	96.66	93.60

[0068] 根据上述表格数据可以得出,当实施例2参数时制备后的化学发光免疫分析仪试剂盒比现有技术制备后的化学发光免疫分析仪试剂盒的检测限低,且灵敏度和精密度高,此时更有利于化学发光免疫分析仪试剂盒的制备。

[0069] 本发明提供了一种化学发光免疫分析仪试剂盒的制备,所述重氮化原料的质量组成,所述形成CLEN-BSA和HRP-CLEN后进行偶联物的鉴定,可以确定并提高合成产物的偶联比,所述中试剂盒组装后按规定方法抽样检测,可以确保生产的试剂盒的有消息,该化学发光免疫分析仪试剂盒,以CLEN为目标检测物标记HRP并配以鲁米诺作为发光底物,减少了基质效应的影响同时极大的提高了线性检测范围及灵敏度,市场潜力巨大,前景广阔。

[0070] 以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书内容所作的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

专利名称(译)	一种化学发光免疫分析仪试剂盒的制备		
公开(公告)号	CN105866106A	公开(公告)日	2016-08-17
申请号	CN201610443565.6	申请日	2016-06-20
[标]申请(专利权)人(译)	袁氏(宿迁)生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	袁氏(宿迁)生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	袁氏(宿迁)生物技术有限公司		
[标]发明人	袁雪生 张书胜		
发明人	袁雪生 张书胜		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/531		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种化学发光免疫分析仪试剂盒的制备，所述重氮化原料的质量组成，所述形成CLEN-BSA和HRP-CLEN后进行偶联物的鉴定，可以确定并提高合成产物的偶联比，所述中试剂盒组装后按规定方法抽样检测，可以确保生产的试剂盒的有消息，该化学发光免疫分析仪试剂盒，以CLEN为目标检测物标记HRP并配以鲁米诺作为发光底物，减少了基质效应的影响同时极大的提高了线性检测范围及灵敏度，市场潜力巨大，前景广阔。

检测项目	实施例1	实施例2	实施例3	现有指标
检测限 (ng/m L)	0.034	0.023	0.036	0.041
灵敏度 (ng/m L)	0.3658	0.3977	0.3574	0.299 8
精密度 (%)	96.61	97.77	96.66	93.60