



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106053826 A

(43)申请公布日 2016. 10. 26

(21)申请号 201610319249.8

(22)申请日 2016.05.12

(71)申请人 威海威高生物科技有限公司

地址 264210 山东省威海市高新区兴山路18号

(72)发明人 蒙红胜 乔文革 吴晗琪 王凌凌  
王文艳

(74)专利代理机构 青岛高晓专利事务所 37104  
代理人 宋文学

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/553(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

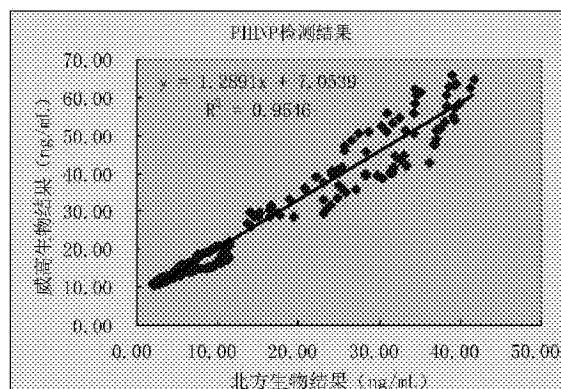
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

## (54)发明名称

Ⅲ型前胶原N端肽定量测定试剂盒及其制备方法

## (57)摘要

本发明提供一种磁微粒化学发光法Ⅲ型前胶原N端肽定量测定试剂盒及其制备方法。试剂盒由测PⅢNP磁微粒、测PⅢNP示踪结合物、质控品组成,本发明还提供了一种该定量测定试剂盒的制备方法,其采用的是微粒子化学发光免疫分析技术,可以借助全自动化学发光法进行检测,减少操作时间,降低人为操作误差,提高检测精密度和准确性,适合于临床肝纤维化早期的辅助诊断。



1. 一种Ⅲ型前胶原N端肽定量测定试剂盒,包括测PⅢNP磁微粒、测PⅢNP示踪结合物、质控品,其特征在于:所述测PⅢNP磁微粒为标记有Ⅲ型前胶原N端肽单克隆抗体的磁性微球和磁微粒保存液;测PⅢNP示踪结合物为标记有Ⅲ型前胶原N端肽抗体的示踪标记物和示踪结合物稀释液;质控品为一低含量Ⅲ型前胶原N端肽的溶液和一高含量Ⅲ型前胶原N端肽的溶液,用于测定仪内储存主曲线的校正。

2. 根据权利要求1所述的一种Ⅲ型前胶原N端肽定量测定试剂盒,其特征在于:所述磁性微球为 $Fe_2O_3$ 或 $Fe_3O_4$ 磁性纳米粒子与有机高分子材料的复合体。

3. 根据权利要求2所述的一种Ⅲ型前胶原N端肽定量测定试剂盒,其特征在于:所述磁性微球通过表面改性而带有一种或多种活性功能基团,包括但不限于-OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>, -CHO, -SO<sub>3</sub>H。

4. 根据权利要求1所述的一种Ⅲ型前胶原N端肽定量测定试剂盒,其特征在于:所述抗体为一种或多种单克隆抗体和/或多克隆抗体。

5. 根据权利要求1-4任意一项所述的一种Ⅲ型前胶原N端肽定量测定试剂盒,其特征在于:所述示踪标记物为鲁米诺和/或异鲁米诺及其衍生物。

6. 根据权利要求5所述的一种Ⅲ型前胶原N端肽定量测定试剂盒,其特征在于:所述磁微粒保存液和示踪物稀释液包括稳定剂、表面活性剂、防腐剂,包括但不限于TBS缓冲系统、HAC-NAC缓冲系统、PBS缓冲液系统、MES缓冲系统、HEPES缓冲系统,其缓冲能力为调节pH值6.0-8.5、浓度范围为0.01-0.2mol/L。

7. 一种权利要求5所述Ⅲ型前胶原N端肽定量测定试剂盒的制备方法,其特征在于:具体步骤如下:

1)磁微粒标记PⅢNP抗体的制备

将带羧基的磁微粒与EDC分别按照1:1、1:2、1:3的重量比例进行混合后,按照每毫克磁微粒分别加入PⅢNP单抗15 $\mu$ g、20 $\mu$ g、25 $\mu$ g、30 $\mu$ g,分别在20 $^{\circ}$ C、23 $^{\circ}$ C、26 $^{\circ}$ C反应1小时,加入甘氨酸,使甘氨酸浓度达到25mM,反应0.5小时,将标记好的磁微粒保存在含1%牛血清白蛋白的0.01M PBS中,于2-8 $^{\circ}$ C贮存;

2)异鲁米诺标记PⅢNP抗体的制备

将异鲁米诺加入PⅢNP抗体中标记,戊二醛使用浓度分别为0.75%、1.0%、1.25%、1.5%,按照每毫克抗体分别加入异鲁米诺0.05mg、0.10mg、0.15mg、0.20mg,抗体与异鲁米诺的最佳标记比例为10:1,分别在20 $^{\circ}$ C、23 $^{\circ}$ C、26 $^{\circ}$ C反应1.5小时,用PH7.2-7.4的0.01M PBS透析,透析后加入等体积甘油-20 $^{\circ}$ C存放;

3)测PⅢNP磁微粒的制备

采用方阵滴定法确定磁微粒标记PⅢNP抗体的最适工作浓度,用磁微粒保存液进行稀释,混匀即得到测PⅢNP磁微粒,置2-8 $^{\circ}$ C存放;

4)测PⅢNP示踪结合物的制备

采用方阵滴定法确定异鲁米诺标记PⅢNP抗体的最适工作浓度,用示踪结合物稀释液进行稀释,混匀即得到测PⅢNP示踪结合物,置2-8 $^{\circ}$ C存放;

5)质控品的制备

用质控品稀释液将PⅢNP纯品稀释成工作浓度,配成测定值为1.76-2.12ng/mL的质控品1和测定值为354.53-423.08ng/mL的质控品2。

8. 根据权利要求7所述Ⅲ型前胶原N端肽定量测定试剂盒的制备方法,其特征在于:具体步骤如下:

1)磁微粒标记PⅢNP抗体的制备

将带羧基的磁微粒与EDC 1:1、1:2、1:3的重量比例,进行混合后,分别按照每毫克磁微粒加入PⅢNP单抗15 $\mu$ g、20 $\mu$ g、25 $\mu$ g、30 $\mu$ g,分别在20 $^{\circ}$ C、23 $^{\circ}$ C、26 $^{\circ}$ C反应1小时,加入甘氨酸封闭EDC的多余的位点,使甘氨酸浓度达到25mM,分别在20 $^{\circ}$ C、23 $^{\circ}$ C、26 $^{\circ}$ C反应0.5小时,将标记好的磁微粒保存在含1%牛血清白蛋白的0.01M PBS中,于2-8 $^{\circ}$ C贮存;

2)异鲁米诺标记PⅢNP抗体的制备

将异鲁米诺加入PⅢNP抗体中标记,戊二醛使用浓度分别为0.75%、1.0%、1.25%、1.5%,按照每毫克抗体分别加入异鲁米诺0.05mg、0.10mg、0.15mg、0.20mg,抗体与异鲁米诺的最佳标记比例为10:1,分别在20 $^{\circ}$ C、23 $^{\circ}$ C、26 $^{\circ}$ C反应1.5小时,用PH 7.2-7.4的0.01M PBS透析,透析后加入等体积甘油-20 $^{\circ}$ C存放;

3)测PⅢNP磁微粒的制备

采用方阵滴定法确定磁微粒标记PⅢNP抗体的最适工作浓度,用磁微粒保存液进行稀释,混匀即得到测PⅢNP磁微粒,置2-8 $^{\circ}$ C存放,

磁微粒保存液的组成为:磷酸氢二钠2.68g/L,磷酸二氢钠0.39g/L,氯化钠8.5g/L,硫柳汞1.0g/L,牛血清白蛋白10g/L;

4)测PⅢNP示踪结合物的制备

采用方阵滴定法确定异鲁米诺标记PⅢNP抗体的最适工作浓度,用示踪结合物稀释液进行稀释,混匀即得到测PⅢNP示踪结合物,置2-8 $^{\circ}$ C存放;

示踪结合物稀释液组成为:磷酸氢二钠2.68g/L,磷酸二氢钠0.39g/L,氯化钠8.5g/L,硫柳汞1.0g/L,Tween-20 1mL/L,小牛血清200mL/L;

5)质控品的制备

用质控品稀释液将PⅢNP纯品稀释成工作浓度,配成测定值为1.76-2.12ng/mL的质控品1和测定值为354.53-423.08ng/mL的质控品2,

质控品稀释液配方为:磷酸氢二钠2.68g/L,磷酸二氢钠0.39g/L,氯化钠8.5g/L,硫柳汞1.0g/L,牛血清白蛋白10.0g/L。

## Ⅲ型前胶原N端肽定量测定试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫诊断技术领域,涉及一种定量测定试剂盒,具体涉及一种用于测定Ⅲ型前胶原N端肽的磁微粒化学发光免疫测定试剂盒,本发明还涉及该试剂盒的制备方法,以及使用该试剂盒来测定Ⅲ型前胶原N端肽浓度的方法。

### 背景技术

[0002] 肝纤维化是指由各种致病因子所致肝内结缔组织异常增生,导致肝内弥漫性细胞外基质过度沉淀的病理过程,它不是一个独立的疾病,许多慢性肝脏疾病均可引起肝纤维化,其病因大致可分为感染性(慢性乙型、丙型和丁型病毒性肝炎,血吸虫病等),先天性代谢缺陷(肝豆状核变性、血色病、 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶缺乏症等)及化学代谢缺陷(慢性酒精性肝病、慢性药物性肝病)及自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化和原发性硬化性胆管炎等。肝纤维化肝脏遭到各种致病原侵袭时,引起肝脏损害与炎症反应,肝组织免疫系统同时被激活,进行组织修复。肝纤维化是指这种组织修复过程、过度及失控时,肝组织内细胞外基质过度增生与异常沉积所致肝脏结构和肝功能异常改变的一种病理过程。

[0003] Ⅲ型前胶原N端肽(ProcollagenⅢN-terminal Peptide, PⅢNP)是Ⅲ型前胶原在细胞外形成原胶原前被内切酶切下后进入血循环的氨基端尾肽。完整的Ⅲ型胶原肽主要由肝脏通过窦状隙内皮细胞受体介导的内吞作用被清除,而小片段则主要由肾脏排泄清除,故胶原代谢活跃及肝功能损伤时,血液PⅢNP增高。PⅢNP在肝纤维化病人血液中水平的上升与纤维化的活动程度有伴随关系,因此,PⅢNP被视为肝纤维化生成的血清学指标。

[0004] 传统的PⅢNP检测方法包括酶联免疫法、化学发光法、放射免疫法等。但酶联免疫法和化学发光法检测时间长,主要依靠纯手工加样等系列繁琐操作,效率低,导致实验结果易误差大,而酶促反应不够彻底,且易受外部干扰因素影响,如温度、时间及材料浓度等,因此检测时特异性低、灵敏度差、检测范围窄。放射免疫法的优点是灵敏、特异、简便易行、用样量少等,但试剂的半衰期段费用较高,需要用闪烁计数仪等专门的设备,放射性核素对人体存在着一定潜在的危害性,试验废物处理困难,放射性核素标记有时会改变某些生物物质的生理活性。因此,本领域亟需一种在保证灵敏度高、稳定性好的同时操作更加简便、迅速,能够借助分析仪器实现检测过程全自动化的测定试剂盒。

[0005] 专利200810102020.4公开了一种Ⅲ型前胶原N端肽(PⅢNP)化学发光免疫分析定量测定试剂盒及其制备方法。其包括:1)Ⅲ型前胶原N端肽质控品;2)包被有Ⅲ型前胶原N端肽的单克隆抗体的固相载体;3)Ⅲ型前胶原N端肽的单克隆抗体酶标记物;4)化学发光底物;以及5)浓缩洗涤液。进一步,根据本发明制备上述试剂盒的方法包括以下步骤:1)以Ⅲ型前胶原N端肽纯品配制Ⅲ型前胶原N端肽质控品;2)以Ⅲ型前胶原N端肽的单克隆抗体包被载体;3)以酶标记Ⅲ型前胶原N端肽的单克隆抗体;4)配制化学发光底物;5)配制浓缩洗涤液;6)分装上述Ⅲ型前胶原N端肽质控品、酶标记物、化学发光底物和浓缩洗涤液;以及7)组装为成品。该试剂盒具有简便、快速、灵敏、稳定等优点。

## 发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种具有高灵敏度和特异性,适合于临床辅助诊断的微粒子化学发光法Ⅲ型前胶原N端肽定量测定试剂盒及其制备方法。本发明是在酶免疫分析基础上结合高灵敏度的化学发光测定技术和磁性微粒分离技术,较其他方法有许多独特的优点,首先它用顺磁性微粒作为固相载体,由于颗粒体积小,表面积大,扩大了反应面积,大大提高了灵敏度,其次由于使用全自动仪器及配套试剂,使人为因素减至最低,提高了方法的稳定性和结果的重复性,同时也使得批内差异与批间差异都较小。

[0007] 本发明采用的技术方案是:

[0008] 一种Ⅲ型前胶原N端肽定量测定试剂盒,包括测PⅢNP磁微粒、测PⅢNP示踪结合物、质控品,所述测PⅢNP磁微粒为标记有Ⅲ型前胶原N端肽单克隆抗体的磁性微球和磁微粒保存液;测PⅢNP示踪结合物为标记有Ⅲ型前胶原N端肽抗体的示踪标记物和示踪结合物稀释液;质控品为一低含量Ⅲ型前胶原N端肽的溶液和一高含量Ⅲ型前胶原N端肽的溶液,用于测定仪内储存主曲线的校正。

[0009] 本发明是利用磁微粒化学发光免疫分析技术定量测定人血浆中Ⅲ型前胶原N端肽的含量。在磁性微粒子上共价标记Ⅲ型前胶原N端肽抗体,加入待测样本,第一步反应形成磁微粒标记抗体-抗原结合物,与第二步反应加入的示踪标记的Ⅲ型前胶原N端肽抗体,形成磁微粒标记抗体-抗原-示踪标记抗体复合物,充分洗涤后,加入激发液,催化发光,相对发光强度(RLU)与人血浆中PⅢNP含量呈正相关,根据标准曲线即可计算出样本中PⅢNP的含量。

[0010] 所述磁性微球为 $Fe_2O_3$ 或 $Fe_3O_4$ 磁性纳米粒子与有机高分子材料的复合体。

[0011] 所述磁性微球通过表面改性而带有一种或多种活性功能基团,包括但不限于-OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>, -CHO, -SO<sub>3</sub>H。

[0012] 所述抗体为一种或多种单克隆抗体和/或多克隆抗体。

[0013] 所述示踪标记物为鲁米诺和/或异鲁米诺及其衍生物。

[0014] 所述质控品中Ⅲ型前胶原N端肽浓度为0.1-600ng/mL。

[0015] 所述磁微粒保存液和示踪物稀释液包括稳定剂、表面活性剂、防腐剂,包括但不限于TBS缓冲系统、HAC-NAC缓冲系统、PBS缓冲液系统、MES缓冲系统、HEPES缓冲系统,缓冲能力为调节pH值6.0-8.5,浓度范围为0.01-0.2mol/L。

[0016] 所述稳定剂为新生牛血清(NBS)、牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白(CS)、山梨醇、乙二胺四乙酸(EDTA)中的至少一种;

[0017] 优选所述稳定剂包括0.5-30%NBS和/或BSA。

[0018] 所述表面活性剂为吐温系列、Triton X-100、CTAC中的至少一种;

[0019] 所述吐温系列包括吐温20(TWEEN-20)、吐温21(TWEEN-21)、吐温40(TWEEN-40)、吐温60(TWEEN-60)、吐温61(TWEEN-61)、吐温80(TWEEN-80)、吐温81(TWEEN-81)、吐温85(TWEEN-85)。

[0020] 优选所述表面活性剂为浓度范围为0.1-1%的吐温20。

[0021] 所述防腐剂选自硫柳汞、叠氮钠、抗生素类、proclin中的至少一种;所述硫柳汞的浓度不大于1‰;所述叠氮钠的浓度不大于1‰;所述抗生素类包括庆大霉素等;所述

proclin的浓度不大于2‰。

[0022] 稳定剂可以提供良好稳定反应环境,使抗原/抗体保持天然构象,可以选择上述稳定剂其中一种。

[0023] 表面活性剂能够在试剂加入到反应体系时,降低表面张力,提高分散性和稳定性。

[0024] 一种所述Ⅲ型前胶原N端肽定量测定试剂盒的制备方法,具体步骤如下:

[0025] 1)磁微粒标记PⅢNP抗体的制备

[0026] 将带羧基的磁微粒与EDC分别按照1:1、1:2、1:3的重量比例进行混合后,按照每毫克磁微粒分别加入PⅢNP单抗15μg、20μg、25μg、30μg,分别在20℃、23℃、26℃反应1小时,加入甘氨酸,使甘氨酸浓度达到25mM,反应0.5小时,将标记好的磁微粒保存在含1%牛血清白蛋白的0.01M PBS中,于2-8℃贮存;

[0027] 2)异鲁米诺标记PⅢNP抗体的制备

[0028] 将异鲁米诺加入PⅢNP抗体中标记,戊二醛使用浓度分别为0.75%、1.0%、1.25%、1.5%,按照每毫克抗体分别加入异鲁米诺0.05mg、0.10mg、0.15mg、0.20mg,抗体与异鲁米诺的最佳标记比例为10:1,分别在20℃、23℃、26℃反应1.5小时,用PH7.2-7.4的0.01M PBS透析,透析后加入等体积甘油-20℃存放;

[0029] 3)测PⅢNP磁微粒的制备

[0030] 采用方阵滴定法确定磁微粒标记PⅢNP抗体的最适工作浓度,用磁微粒保存液进行稀释,混匀即得到测PⅢNP磁微粒,置2-8℃存放;

[0031] 4)测PⅢNP示踪结合物的制备

[0032] 采用方阵滴定法确定异鲁米诺标记PⅢNP抗体的最适工作浓度,用示踪结合物稀释液进行稀释,混匀即得到测PⅢNP示踪结合物,置2-8℃存放;

[0033] 5)质控品的制备

[0034] 用质控品稀释液将PⅢNP纯品稀释成工作浓度,配成测定值为1.76-2.12ng/mL的质控品1和测定值为354.53-423.08ng/mL的质控品2。

[0035] 进一步的,所述Ⅲ型前胶原N端肽定量测定试剂盒的制备方法,具体步骤如下:

[0036] 1)磁微粒标记PⅢNP抗体的制备

[0037] 将带羧基的磁微粒与EDC 1:1、1:2、1:3的重量比例,进行混合后,分别按照每毫克磁微粒加入PⅢNP单抗15μg、20μg、25μg、30μg,分别在20℃、23℃、26℃反应1小时,加入甘氨酸封闭EDC的多余的位点,使甘氨酸浓度达到25mM,分别在20℃、23℃、26℃反应0.5小时,将标记好的磁微粒保存在含1%牛血清白蛋白的0.01M PBS中,于2-8℃贮存;

[0038] 2)异鲁米诺标记PⅢNP抗体的制备

[0039] 将异鲁米诺加入PⅢNP抗体中标记,戊二醛使用浓度分别为0.75%、1.0%、1.25%、1.5%,按照每毫克抗体分别加入异鲁米诺0.05mg、0.10mg、0.15mg、0.20mg,抗体与异鲁米诺的最佳标记比例为10:1,分别在20℃、23℃、26℃反应1.5小时,用PH 7.2-7.4的0.01M PBS透析,透析后加入等体积甘油-20℃存放;

[0040] 3)测PⅢNP磁微粒的制备

[0041] 采用方阵滴定法确定磁微粒标记PⅢNP抗体的最适工作浓度,用磁微粒保存液进行稀释,混匀即得到测PⅢNP磁微粒,置2-8℃存放,

[0042] 磁微粒保存液的组成为:磷酸氢二钠2.68g/L,磷酸二氢钠0.39g/L,氯化钠8.5g/L

L, 硫柳汞1.0g/L, 牛血清白蛋白10g/L;

[0043] 4) 测PⅢNP示踪结合物的制备

[0044] 采用方阵滴定法确定异鲁米诺标记PⅢNP抗体的最适工作浓度, 用示踪结合物稀释液进行稀释, 混匀即得到测PⅢNP示踪结合物, 置2-8℃存放;

[0045] 示踪结合物稀释液组成为: 磷酸氢二钠2.68g/L, 磷酸二氢钠0.39g/L, 氯化钠8.5g/L, 硫柳汞1.0g/L, Tween-20 1mL/L, 小牛血清200mL/L;

[0046] 5) 质控品的制备

[0047] 用质控品稀释液将PⅢNP纯品稀释成工作浓度, 配成测定值为1.76-2.12ng/mL的质控品1和测定值为354.53-423.08ng/mL的质控品2,

[0048] 质控品稀释液配方为: 磷酸氢二钠2.68g/L, 磷酸二氢钠0.39g/L, 氯化钠8.5g/L, 硫柳汞1.0g/L, 牛血清白蛋白10.0g/L。

[0049] 本发明试剂盒的优点是采用了微粒子化学发光免疫分析技术, 排除了人为和环境的影响, 提高了试剂精密度; 用微粒子做固相载体, 扩大了反应表面积, 线性范围更宽; 全自动化, 其操作更加简便易行, 同时本发明的试剂盒能够与化学发光免疫分析仪尤其是系列化学发光免疫分析仪(AutolumiS 500、AutolumiS 1000、AutolumiS 2000、AutolumiS 3000全自动化学发光测定仪)配套使用, 在样本测定过程中实现了全自动化, 使得浓度的检测可以简单、方便、快速、批量地进行, 同时保证检测的系统误差较小。

## 附图说明

[0050] 图1为本发明试剂盒和北方生物试剂盒上的测定值进行相关性分析结果

## 具体实施方式

[0051] 实施例1

[0052] 1) 磁微粒标记PⅢNP抗体的制备

[0053] 将带羧基的磁微粒与EDC 1:1、1:2、1:3的重量比例, 进行混合后, 分别按照每毫克磁微粒加入PⅢNP单抗15μg、20μg、25μg、30μg, 分别在20℃、23℃、26℃反应1小时, 加入一定量甘氨酸封闭EDC的多余的位点, 使之浓度达到25mM, 分别在20℃、23℃、26℃反应0.5小时。将标记好的磁微粒保存在含1%牛血清白蛋白的0.01M PBS中, 于2-8℃贮存;

[0054] 2) 异鲁米诺标记PⅢNP抗体的制备

[0055] 将异鲁米诺加入PⅢNP抗体中标记, 戊二醛使用浓度分别为0.75%、1.0%、1.25%、1.5%, 按照每毫克抗体分别加入异鲁米诺0.05mg、0.10mg、0.15mg、0.20mg, 抗体与异鲁米诺的最佳标记比例为10:1, 分别在20℃、23℃、26℃反应1.5小时, 用PH7.2-7.4的0.01M PBS透析, 透析后加入等体积甘油-20℃存放;

[0056] 3) 测PⅢNP磁微粒的制备

[0057] 采用方阵滴定法确定磁微粒标记PⅢNP抗体的最适工作浓度, 用磁微粒保存液进行稀释, 混匀即得到测PⅢNP磁微粒, 置2-8℃存放;

[0058] 磁微粒保存液的主要组成为: 磷酸氢二钠2.68g/L, 磷酸二氢钠0.39g/L, 氯化钠8.5g/L, 硫柳汞1.0g/L, 牛血清白蛋白10g/L;

[0059] 4) 测PⅢNP示踪结合物的制备

[0060] 采用方阵滴定法确定异鲁米诺标记PⅢNP抗体的最适工作浓度,用示踪结合物稀释液进行稀释,混匀即得到测PⅢNP示踪结合物,置2-8℃存放;

[0061] 示踪结合物稀释液主要组成为:磷酸氢二钠2.68g/L,磷酸二氢钠0.39g/L,氯化钠8.5g/L,硫柳汞1.0g/L,Tween-20 1mL/L,小牛血清200mL/L;

[0062] 5)质控品的制备

[0063] 用质控品稀释液将PⅢNP纯品稀释成工作浓度,配成质控品1(低值质控品)和质控品2(高值质控品)。质控品测定值应在范围之内(质控品1:1.76-2.12ng/mL;质控品2:354.53-423.08ng/mL);

[0064] 质控品稀释液配方:磷酸氢二钠2.68g/L,磷酸二氢钠0.39g/L,氯化钠8.5g/L,硫柳汞1.0g/L,牛血清白蛋白10.0g/L。

[0065] 本发明上述各种原材料的选择要求如下:

[0066] 磁微粒标记用Ⅲ型前胶原N端肽抗体的选择

[0067] 首先就抗体的外观、浓度、纯度、效价进行验证,结果抗体为微带乳光的澄清液体,无肉眼可见异物,无摇不散的沉淀,用紫外吸收法检测其蛋白含量应不低于2.0mg/mL,效价应不低于标示效价且不低于1:10000,SDS-PAGE检测纯度应主带清晰,无明显杂带。

[0068] 异鲁米诺标记用Ⅲ型前胶原N端肽单克隆抗体的选择

[0069] 首先仍就抗体的外观、浓度、纯度、效价进行验证,结果抗体为微带乳光的澄清液体,无肉眼可见异物,无摇不散的沉淀,用紫外吸收法检测其蛋白含量应不低于2.0mg/mL,效价应不低于标示效价且不低于1:10000,SDS-PAGE检测纯度应主带清晰,无明显杂带,研究结果表明另一株Ⅲ型前胶原N端肽单克隆抗体也完全可用于本发明试剂盒的制备。

[0070] 磁微粒的选择

[0071] 通过对磁微粒的外观,标记蛋白的比率,磁响应性,磁微粒吸附一致性等方面进行分析,经过多次分析研究,将磁微粒混匀,在灯光下观察,易分散,无聚集,无异物;将蛋白采用不同的方法进行标记,标记率应大于90%;将磁微粒置370-380特斯拉的磁铁上,观察磁微粒的聚集速度,分散均匀的磁微粒在10秒钟内完全聚集;磁微粒吸附一致性 $CV \leq 10\%$ 。研究结果表明直径为0.90-1.10 $\mu\text{m}$ 的磁微粒,含有羧基基团,标记率最高,可用于本发明诊断试剂盒的制备。

[0072] 异鲁米诺的选择

[0073] 将异鲁米诺用DMSO(二甲基亚砷)进行溶解,用纯化水进行稀释至 $1.2 \times 10^{-5}\text{M/L}$ 的量,加入10 $\mu\text{L}$ 异鲁米诺液体,各加入200 $\mu\text{L}$ 激发液,测定其发光值,发光值应 $\geq 160000$ ,经过研究,采用Sigma Aldrich提供的异鲁米诺作为发光的原料。

[0074] 清洗液、激发A液、激发B液的配制

[0075] 清洗液的主要成分为:磷酸氢二钠28.6g/L、磷酸二氢钠3.9g/L、氯化钠160g/L、Tween20 10mL/L,用纯化水按照10倍稀释使用。激发A液为含有0.35mol/L NaOH的溶液(其中含有1mM的铁氰化钾),激发B液为含有1.32%w/v  $\text{H}_2\text{O}_2$ 的的缓冲液。

[0076] 反应体系的选择

[0077] 采用一步法和两步法对比不同样本用量和试剂用量检测结果的差异,以确定试剂盒的反应体系。样本为高 $P_H$ 、中 $P_M$ 、低值样本 $P_L$ 以及阴性样本N。一步法加入样本50-150 $\mu\text{L}$ 、示踪结合物50-150 $\mu\text{L}$ 和磁微粒20 $\mu\text{L}$ ,温育10分钟,洗涤后,加入激发液进行测定;两步法先加

入样本50-150 $\mu$ L和磁微粒20 $\mu$ L,温育10分钟,再加入测PⅢNP示踪结合物50-150 $\mu$ L,再温育10分钟,经清洗液洗涤后,加入激发A液和激发B液进行检测。重复三次试验,计算P/N,选择P/N值最大者为佳。

[0078] 表1样本和示踪结合物用量

[0079]

	方案 1	方案 2	方案 3
--	------	------	------

[0080]

样本用量 ( $\mu$ L)	50	100	150	50	100	150	50	100	150
测 PⅢNP 示踪结合物用量( $\mu$ L)	50	50	50	100	100	100	150	150	150

[0081] 表2反应模式

[0082]

第一次	P/N	一步法								
		方案 1			方案 2			方案 3		
	P <sub>H</sub> /N	34.10	34.62	32.76	35.52	36.26	34.91	34.67	35.12	33.83
	P <sub>M</sub> /N	16.95	17.47	16.49	19.12	19.70	18.71	17.14	17.85	16.84
	P <sub>L</sub> /N	5.03	5.12	4.99	5.16	5.21	5.15	5.13	5.15	5.06
		两步法								
		方案 1			方案 2			方案 3		
	P <sub>H</sub> /N	31.90	32.55	31.28	33.27	33.37	32.22	32.12	32.66	31.34
	P <sub>M</sub> /N	16.18	16.46	16.09	16.37	16.53	15.91	16.16	16.48	16.08
	P <sub>L</sub> /N	4.91	4.92	4.89	4.97	4.99	4.92	4.94	4.97	4.85
第二次		一步法								
		方案 1			方案 2			方案 3		
	P <sub>H</sub> /N	34.18	34.78	32.77	35.44	36.29	35.15	34.79	35.18	33.77
	P <sub>M</sub> /N	16.99	17.56	16.53	19.06	19.61	18.82	17.20	17.81	16.87
	P <sub>L</sub> /N	5.05	5.11	4.99	5.14	5.21	5.12	5.12	5.16	5.07
		两步法								
		方案 1			方案 2			方案 3		
	P <sub>H</sub> /N	31.74	32.52	31.23	33.03	33.26	32.28	32.27	32.79	31.62
	P <sub>M</sub> /N	16.15	16.41	16.08	16.33	16.47	16.21	16.29	16.42	16.20
	P <sub>L</sub> /N	4.90	4.92	4.87	4.96	5.01	4.90	4.94	4.99	4.88
第三次		一步法								
		方案 1			方案 2			方案 3		
	P <sub>H</sub> /N	33.92	34.73	32.88	35.51	36.07	35.00	34.40	34.81	33.89
	P <sub>M</sub> /N	16.91	17.45	16.52	19.04	19.72	18.76	17.08	17.84	16.80
	P <sub>L</sub> /N	5.05	5.11	4.98	5.15	5.21	5.15	5.09	5.12	5.05
		两步法								
		方案 1			方案 2			方案 3		
	P <sub>H</sub> /N	31.62	32.68	31.33	33.24	33.58	32.37	32.19	32.82	31.38
		16.02	16.24	15.99	16.40	16.61	16.19	16.14	16.39	16.03
	P <sub>L</sub> /N	4.89	4.90	4.82	4.96	5.01	4.90	4.92	4.98	4.85

[0083] 由表1、表2可以得到,具体加样方法如下:100 $\mu$ L样本、20 $\mu$ L测PⅢNP磁微粒、100 $\mu$ L测PⅢNP示踪结合物,37 $^{\circ}$ C孵育10分钟,再用稀释后的清洗液洗涤3次,最终分别加入200 $\mu$ L激发A液和激发B液,测定发光值。

[0084] 本试剂盒的方法学评价方法

[0085]

项目	质检标准	结果
		合格/不合格
物理性能	液体组分应澄清，无沉淀或絮状物；所有组分应无包装破损；装量应不少于标示值	合格
准确度	准确度内控品测定浓度与标示浓度比值应在0.90-1.10范围内	合格
批内精密度	批内精密度（CV）应不大于10%	合格
批间精密度	批间精密度（CV）应不大于10%	合格
最低检出限	试剂盒最低检出限应不大于0.1ng/mL	合格
灵敏度	灵敏度即回归方程的斜率，应大于0.5	合格
线性	线性相关系数r值应不低于0.9900	合格
质控品测定值	质控品测定值应在允许范围内，质控品1：1.76-2.12ng/mL；质控品2：354.53-423.08ng/mL	合格
特异性	100ng/mL I型胶原、100ng/mL IV型胶原，检测表观值应不大于0.1ng/mL	合格
检测范围	本试剂盒的检测范围为0.1-600ng/mL	合格

[0086] 相关性分析

[0087] 本发明试剂盒临床考核结果：河南中医学院第二附属医院、河南中医学院第三附属医院两家医院临床考核，检测结果如表5、表6所示：

[0088] 表5：河南中医学院第二附属医院PⅢNP检测结果

[0089]

组别	例数	检测结果（ng/mL） $\bar{X} \pm SD$	
		本发明试剂盒	对照试剂
对照组	85	6.69 ± 3.01	14.25 ± 2.50
疾病组	43	27.08 ± 7.48	46.09 ± 11.52

[0090] 表6：河南中医学院第三附属医院PⅢNP检测结果

[0091]

组别	例数	检测结果（ng/mL） $\bar{X} \pm SD$
----	----	------------------------------

[0092]

		本发明试剂盒	对照试剂
对照组	80	6.37 ± 2.86	16.41 ± 3.39
疾病组	40	30.34 ± 8.07	42.48 ± 10.52

[0093] 河南中医学院第二附属医院两试剂盒对128例临床样本检测结果的相关系数 $r = 0.9894$ ，从相关系数及检验结果来看，本发明试剂盒与北方生物的试剂盒相关性良好。

[0094] 河南中医学院第三附属医院两试剂盒对120例临床样本检测结果的相关系数 $r = 0.9888$ ，从相关系数及检验结果来看，本发明试剂盒与北方生物的试剂盒相关性良好。

[0095] 对248份临床样本在本发明试剂盒和北方生物试剂盒上的测定值进行相关性分

析,分别以北方生物检测值和威高检测值为X/Y坐标,绘制坐标图1所示。

[0096] 采用线性回归对两试剂盒检测结果进行相关性分析,回归方程为 $y = 1.2891x + 7.0539$ ,相关系数 $r = 0.9770$ ;从相关系数及回归方程来看,本发明试剂盒与北方生物试剂盒相关性良好。

[0097] 本实例的工作过程:Ⅲ型前胶原N端肽定量测定试剂盒检测样品中Ⅲ型前胶原N端肽的检测方法是:首先取出清洗液,用纯化水按照10倍进行稀释。而后取出激发A液和B液,放置全自动化学发光测定仪合适的位置。然后将试剂盒从冰箱中取出后,放于仪器试剂区至少混匀30分钟后方可使用,并严格按照设定的程序进行加样和温育。

[0098] 以上对本发明的实施例进行了详细说明,但所述内容仅为本发明的较佳实施例,不能被认为用于限定本发明的实施范围。凡依本发明申请范围所作的均等变化与改进等,均应仍归属于本发明的专利涵盖范围之内。

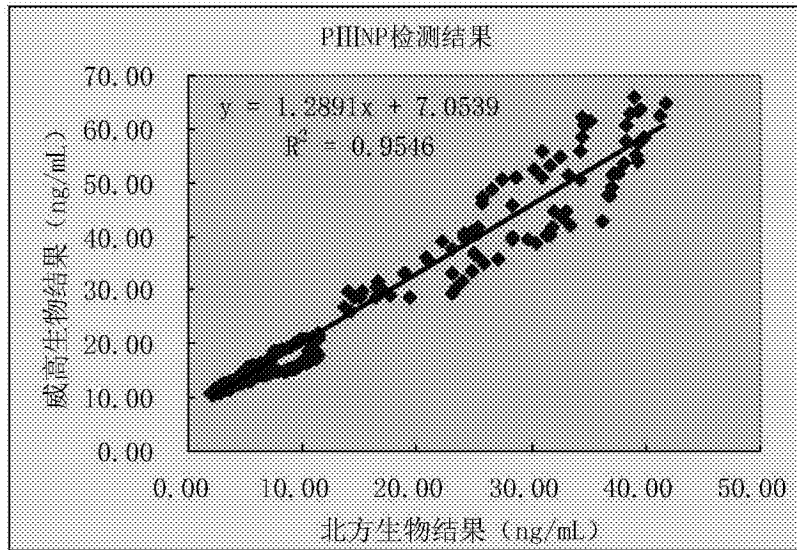


图1

专利名称(译)	III型前胶原N端肽定量测定试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106053826A</a>	公开(公告)日	2016-10-26
申请号	CN201610319249.8	申请日	2016-05-12
[标]申请(专利权)人(译)	威海威高生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	威海威高生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	威海威高生物科技有限公司		
[标]发明人	蒙红胜 乔文革 吴晗琪 王凌凌 王文艳		
发明人	蒙红胜 乔文革 吴晗琪 王凌凌 王文艳		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/553 G01N33/532 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N21/763 G01N33/532 G01N33/54326 G01N33/553		
代理人(译)	宋文学		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供一种磁微粒化学发光法III型前胶原N端肽定量测定试剂盒及其制备方法。试剂盒由测PIIINP磁微粒、测PIIINP示踪结合物、质控品组成，本发明还提供了一种该定量测定试剂盒的制备方法，其采用的是微粒子化学发光免疫分析技术，可以借助全自动化学发光法进行检测，减少操作时间，降低人为操作误差，提高检测精密度和准确性，适合于临床肝纤维化早期的辅助诊断。

