



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109870584 A

(43)申请公布日 2019.06.11

(21)申请号 201711257965.9

(22)申请日 2017.12.04

(71)申请人 天津康尔克生物科技有限公司

地址 301700 天津市武清区大碱厂镇兰家庄村西

(72)发明人 兰成杰 陶剑

(51)Int.Cl.

G01N 33/92(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

(54)发明名称

一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白
检测试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒,属于免疫检测分析技术领域。所述试剂盒包含样本稀释液、洗涤液、显色液及终止液、辣根过氧化物酶标记的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体、不同浓度的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品、可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白质控品和微孔反应板,微孔反应板包被可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体。所述试剂盒中所述标准品直接使用,实现了高效、快速检测,同时所述质控品可鉴定检测结果是否准确,不同浓度的所述标准品可得到不同规格的检测试剂盒,适应不同客户需求。

1. 一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒包含有样本稀释液、洗涤液、显色液及终止液、酶标记物,所述酶标记物为辣根过氧化物酶或标记的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体;所述检测试剂盒还包括:多个不同浓度的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品、可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白质控品、以及微孔反应板,所述微孔反应板包被可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体;

所述多个不同浓度的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品的浓度依次为0ng/ml、6.4ng/ml、16ng/ml、40ng/ml、100ng/ml和200ng/ml。

2. 根据权利要求1所述的一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述可溶中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白质控品包括低值范围质控品和高值范围质控品,所述低值范围质控品浓度为24~36ng/ml,所述高值范围质控品浓度为48~72ng/ml。

3. 根据权利要求1所述的一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述低值范围质控品浓度为30ng/ml,所述高值范围质控品浓度为60ng/ml。

4. 根据权利要求1~3任一项所述的一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品的制备方法为:以胎牛血清处理基质对可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗原进行稀释,配制得到可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品。

5. 根据1~3任一项所述的一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述质控品的制备方法为:以胎牛血清处理基质对可溶中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗原进行稀释,配制得到可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白质控品。

6. 根据权利要求4所述的一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒,其特征在于:以胎牛血清处理基质对可溶中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗原进行稀释,配制得到可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白质控品。

一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 检测试剂盒,属于免疫检测分析技术领域。

背景技术

[0002] 急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 常见于急重症患者,早期诊断、治疗能显著改善预后。目前肾功能异常的实验室指标主要还是血清肌酐 (Scr),但Scr相对于AKI是一种不敏感且十分滞后的标志物。因为只是反映肾小球的滤过功能,但由于肾脏的代偿能力非常强,肾小球滤过率降至正常的30%以下时,Scr才会发生明显变化,但此时很可能已经错过了治疗的关键期。由于缺乏早期、具有预测性、非侵入性的标志物使得临床无法早期发现肾损伤,并及时采取有效的治疗措施。

[0003] NGAL是一个25KD的小分子蛋白质,由178个氨基酸组成,属于载脂蛋白家族成员,其功能是转运疏水性小分子配体。NGAL产生于中性粒细胞,也在人类多种正常组织(如肺、气管、胃、结肠、肾、子宫、前列腺和唾液腺等)的上皮细胞中有不同程度的低表达。在各种肾脏疾病中NGAL则异常高表达。虽然其生物学功能尚未完全阐明,但目前的研究表明:在老鼠的体外实验中,NGAL促进后肾间充质的早期始祖细胞产生增殖效应,并且促进原始间质细胞向上皮分化,产生肾的形状并表达肾小球、近端小管、远端小管的表面标志物,以调节肾脏的发生。另外,肾脏损伤可造成肾上皮细胞内游离铁积聚,而铁的堆积与蛋白尿、肾小管间质病变、脂质过氧化等病变程度直接相关,超负荷的铁可增加缺血性肾损伤的易感性。NGAL通过调节铁代谢以减少胞外铁产生的活性氧而减轻氧化应激引起的细胞凋亡,同时细胞内铁可通过多种途径增加细胞修复、减少凋亡。因此,NGAL可能在肾脏损伤时起着对抗损伤的作用。

[0004] NGAL是一种有可能用于AKI早期诊断的新的标志物之一。AKI时不仅有肾小球滤过功能的急剧下降,而且通常都伴有肾小管的功能障碍。NGAL不仅因肾小球滤过率下降而在血循环中积累,肾小管损伤部位更是会大量表达释放,因此发生AKI时NGAL的升高较其他指标更快,且与AKI的相关性更高。NGAL在肾脏疾病的早期诊断和对疾病预后的判断等方面将发挥重要作用。

[0005] 因此,对中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的快速、全面、准确、特异检测显得尤为重要。到目前为止,商品的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测手段都尚存在一定局限性。

发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒,所述试剂盒可对中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白进行快速、全面、准确、特异的检测。

[0007] 为实现本发明的目的,提供以下技术方案。

[0008] 一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒,所述试剂盒包含有样本稀释液、洗涤液、显色液及终止液、酶标记物,所述酶标记物为辣根过氧化物酶标记的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体;所述检测试剂盒还包括:多个不同浓度的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品、可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白质控品、以及微孔反应板,所述微孔反应板包被可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体。

[0009] 所述多个不同浓度的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品的浓度依次为0ng/ml、6.4ng/ml、16ng/ml、40ng/ml、100ng/ml和200ng/ml。

[0010] 优选的,所述可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品的制备方法为:以胎牛血清处理基质对可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗原进行稀释,配制得到可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品。

[0011] 优选的,所述可溶中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白质控品包括低值范围质控品和高值范围质控品,所述低值范围质控品浓度为24~36ng/ml,所述高值范围质控品浓度为48~72ng/ml。

[0012] 优选的,所述低值范围质控品浓度为30ng/ml,所述高值范围质控品浓度为60ng/ml。

[0013] 优选的,所述质控品的制备方法为:以胎牛血清处理基质对可溶中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗原进行稀释,配制得到可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白质控品。

[0014] 一种本发明所述中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0015] (1) 制备可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品和可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白质控品:使用胎牛血清处理基质将可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗原稀释得到可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品,同时使用胎牛血清处理基质将可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗原稀释得到质控品;

[0016] (2) 制备可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体包被的微孔反应板:吸取可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体,加入0.01mol/L, pH=7.2的磷酸盐溶液中进行稀释,4℃储存备用;取微孔板,每孔加入100μL稀释后的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体,覆膜后置于4℃包被18~22小时;甩去孔内液体,每孔加入200μL内含1~3%牛血清白蛋白、3~5%蔗糖、0.05~0.15%Princlin300的0.01mol/L, pH=7.4的磷酸盐溶液,覆膜后置于4℃封闭18~22小时;甩去孔内液体,并在吸水纸上拍干,室温下干燥2~4天后真空密封包装,得到可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体包被的微孔反应板,所述微孔反应板保存于4℃。

[0017] (3) 制备辣根过氧化物酶标记的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体:称取辣根过氧化物酶2mg,溶解于1mL去离子水中,加入1~2mL浓度为0.05mol/L的过碘酸钠溶液,4℃缓慢摇动30~60min;用浓度为0.001mol/L, pH=4.4的醋酸钠溶液透析18~22小时;加入2mg可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体,4℃避光振荡18~22小时;加入400μL浓度为0.2mol/L的NaBH₄溶液,用浓度为0.02mol/L, pH=7.4的磷酸缓冲液透析18~22小时;用HPLC二次纯化,收集蛋白峰,加入等体积甘油,得到辣根过氧

化物酶标记的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体,于-20℃保存。

[0018] (4) 制备样本稀释液:取磷酸二氢钠1.409g、磷酸氢二钠4.372g、氯化钠8.5g、牛血清白蛋白5g、吐温-200.5mL、加水定容至1L,用氢氧化钠调pH至 7.4 ± 0.1 ;

[0019] (5) 制备洗涤液:取磷酸二氢钠28.18g、磷酸氢二钠87.44g、氯化钠170g、吐温-2010mL,加水定容至1L,使用时用水稀释20倍;

[0020] (6) 制备显色液:称取100gTMB,用10mLDMSO和10mL无水乙醇配成的混合液溶解,4℃避光保存备用;配制0.1mol/LpH4.0~5.0的柠檬酸溶液;向1000mL所述配制的柠檬酸溶液中加入100~200mg过氧化氢尿素;溶解充分后,加入PVP,使其终浓度为0.2~0.6%,4℃放置18~22小时;加入事先溶解的TMB混合液,并加入2~4%聚乙二醇,加水定容至1000mL,4℃避光保存;

[0021] (7) 制备终止液:量取50mL浓硫酸沿烧杯壁缓慢地注入870mL水中,混匀,使其被稀释18.4倍,4℃保存。

[0022] 有益效果

[0023] 本发明提供了一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒,试剂盒中的多种不同浓度的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品无需进行稀释处理可以直接使用,简化了操作步骤,缩短了检测时间,实现了高效、快速检测,同时可溶中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白质控品可以鉴定检测结果是否准确,多个不同浓度的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白微孔反应板使用的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体具有高度特异性,且可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品可以实现对样本中的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白分子进行专一的定量检测;提供的不同浓度的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品可以得到标准曲线,根据标准曲线可以得到待测样品中可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的浓度;试剂盒可与全自动酶联反应分析仪相结合,可以进一步有效缩短检测时间,降低检测成本和人力花费。

具体实施方式

[0024] 一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒,包含有微孔反应板、酶标记物、样本稀释液、显色液、终止液、洗涤液、可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品、可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白质控品,其中,酶标记物为辣根过氧化物酶标记的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体,可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品是以胎牛血清处理基质对可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗原进行稀释得到,可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白质控品是以胎牛血清处理基质对可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗原进行稀释得到,微孔反应板为包被可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体;本试剂盒中的不同浓度可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品可以直接使用绘制标准曲线,根据样品的OD值由标准曲线得到样品对应的浓度,可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白质控品用来鉴定检测结果是否准确,酶标记物也无需稀释处理,操作简单,可以有效缩短检测时间,进而降低检测成本和人力花费。

[0025] 上述胎牛血清处理基质的制备方法为:取适量研细后的硫酸铵于室温下边搅拌边

加入胎牛血清中,使其终浓度为100~300g/L,4℃放置18~22小时;10,000转离心20~40分钟,取上清液滤纸过滤;将滤后上清液装透析袋,于4℃下在10倍体积的生理盐水中透析,每隔3~5小时更换一次透析液,一共三次;转入10体积的0.05mol/L硼酸溶液中进行透析,每隔3~5小时更换一次透析液,一共四次;将透析后的液体放入干净容器内,于56℃热灭活1~2小时;加入0.05~0.15%的Proclin300和0.05~0.15%的庆大霉素,混合均匀后用0.22 μm滤膜过滤除菌得到胎牛血清,于-20℃下保存待用。

[0026] 实施例1

[0027] 一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0028] (1) 制备可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品和质控品:取适量研细后的硫酸铵于室温下边搅拌边加入胎牛血清中,使其终浓度为100g/L,4℃放置18小时;10,000转离心20分钟,取上清液滤纸过滤;将滤后上清液装透析袋,于4℃下在10倍体积的生理盐水中透析,每隔3小时更换一次透析液,一共三次;转入10体积的0.05mol/L硼酸溶液中进行透析,每隔3小时更换一次透析液,一共四次;将透析后的液体放入干净容器内,于56℃热灭活1小时;加入0.05%的Proclin300和0.05%的庆大霉素,混合均匀后用0.22 μm滤膜过滤除菌得到胎牛血清处理基质,于-20℃下保存待用;使用上述制备得到的胎牛血清处理基质将可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗原稀释得到6个不同浓度依次为0ng/ml、6.4ng/ml、16ng/ml、40ng/ml、100ng/ml、200ng/ml的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品,同时使用胎牛血清处理基质将可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗原稀释得到浓度为30ng/ml低值范围质控品;

[0029] (2) 制备可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体包被的微孔反应板:吸取适量可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体,加入0.01mol/L, pH=7.2的磷酸盐溶液中进行稀释,使其终浓度为2 μg/mL,4℃储存备用;取微孔板,每孔加入100 μL稀释后的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体,覆膜后置于4℃包被18小时;甩去孔内液体,每孔加入200 μL内含1%牛血清白蛋白、3%蔗糖、0.05% Proclin300的0.01mol/L, pH=7.4的磷酸盐溶液,覆膜后置于4℃封闭18小时;甩去孔内液体,并在吸水纸上拍干,室温下干燥2天后真空密封包装,得到可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体包被的微孔反应板,所述微孔反应板保存于4℃;

[0030] (3) 制备辣根过氧化物酶标记的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体:称取辣根过氧化物酶2mg,溶解于1mL去离子水中,加入1mL浓度为0.05mol/L的过碘酸钠溶液,4℃缓慢摇动30min;用浓度为0.001mol/L, pH=4.4的醋酸钠溶液透析18小时;加入2mg可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体,4℃避光振荡18小时;加入400 μL浓度为0.2mol/L的NaBH₄溶液,用浓度为0.02mol/L, pH=7.4的磷酸缓冲液透析18小时;用HPLC二次纯化,收集蛋白峰,加入等体积甘油,得到辣根过氧化物酶标记的可溶性单克隆抗体,于-20℃保存;

[0031] (4) 制备样本稀释液:取磷酸二氢钠1.409g、磷酸氢二钠4.372g、氯化钠8.5g、牛血清白蛋白5g、吐温-200.5mL、加水定容至1L,用氢氧化钠调pH至7.4±0.1;

[0032] (5) 制备洗涤液:取磷酸二氢钠28.18g、磷酸氢二钠87.44g、氯化钠170g、吐温-2010mL,加水定容至1L,使用时用水稀释20倍;

[0033] (6) 制备显色液:称取100gTMB,用10mLDMSO和10mL无水乙醇配成的混合液溶解,4℃避光保存备用;配制0.1mol/L, pH=4.0的柠檬酸溶液;向1000mL所述配制的柠檬酸溶液中加入100mg过氧化氢尿素;溶解充分后,加入PVP,使其终浓度为0.2%,4℃放置18小时;加入事先溶解的TMB混合液,并加入2%聚乙二醇,加水定容至1000mL,4℃避光保存;

[0034] (7) 制备终止液:量取50mL浓硫酸沿烧杯壁缓慢地注入870mL水中,混匀,使其被稀释18.4倍,4℃保存。

[0035] 实施例2

[0036] 一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0037] (1) 制备可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品和质控品:取适量研细后的硫酸铵于室温下边搅拌边加入胎牛血清中,使其终浓度为200g/L,4℃放置20小时;10,000转离心30分钟,取上清液滤纸过滤;将滤后上清液装透析袋,于4℃下在10倍体积的生理盐水中透析,每隔4小时更换一次透析液,一共三次;转入10体积的0.05mol/L硼酸溶液中进行透析,每隔4小时更换一次透析液,一共四次;将透析后的液体放入干净容器内,于56℃热灭活1.5小时;加入0.1%的Proclin300和0.1%的庆大霉素,混合均匀后用0.22μm滤膜过滤除菌得到胎牛血清处理基质,于-20℃下保存待用;使用上述制备得到的胎牛血清处理基质将可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗原稀释得到6个不同浓度依次为0ng/ml、6.4ng/ml、16ng/ml、40ng/ml、100ng/ml、200ng/ml的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品,同时使用胎牛血清处理基质将可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗原稀释得到浓度为30ng/ml低值范围质控品和浓度为60ng/ml高值范围质控品;

[0038] (2) 制备可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体包被的微孔反应板:吸取适量可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体,加入0.01mol/L, pH=7.2的磷酸盐溶液中进行稀释,使其终浓度为4μg/mL,4℃储存备用;取微孔板,每孔加入100μL稀释后的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体,覆膜后置于4℃包被20小时;甩去孔内液体,每孔加入200μL内含2%牛血清白蛋白、4%蔗糖、0.1%Princlin300的0.01mol/L, pH=7.4的磷酸盐溶液,覆膜后置于4℃封闭20小时;甩去孔内液体,并在吸水纸上拍干,室温下干燥3天后真空密封包装,得到可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体包被的微孔反应板,所述微孔反应板保存于4℃;

[0039] (3) 制备辣根过氧化物酶标记的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体:称取辣根过氧化物酶2mg,溶解于1mL去离子水中,加入1.5mL浓度为0.05mol/L的过碘酸钠溶液,4℃缓慢摇动45min;用浓度为0.001mol/L, pH=4.4的醋酸钠溶液透析20小时;加入2mg可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体,4℃避光振荡20小时;加入400μL浓度为0.2mol/L的NaBH₄溶液,用浓度为0.02mol/L, pH=7.4的磷酸缓冲液透析20小时;用HPLC二次纯化,收集蛋白峰,加入等体积甘油,得到辣根过氧化物酶标记的可溶性单克隆抗体,于-20℃保存;

[0040] (4) 制备样本稀释液:取磷酸二氢钠1.409g、磷酸氢二钠4.372g、氯化钠8.5g、牛血清白蛋白5g、吐温-200.5mL、加水定容至1L,用氢氧化钠调pH至7.4±0.1;

[0041] (5) 制备洗涤液:取磷酸二氢钠28.18g、磷酸氢二钠87.44g、氯化钠170g、吐温-2010mL,加水定容至1L,使用时用水稀释20倍;

[0042] (6) 制备显色液:称取100gTMB,用10mLDMSO和10mL无水乙醇配成的混合液溶解,4℃避光保存备用;配制0.1mol/L, pH=4.5的柠檬酸溶液;向1000mL所述配制的柠檬酸溶液中加入150mg过氧化氢尿素;溶解充分后,加入PVP,使其终浓度为0.4%,4℃放置20小时;加入所述事先溶解的TMB混合液,并加入3%聚乙二醇,加水定容至1000mL,4℃避光保存;

[0043] (7) 制备终止液:量取50mL浓硫酸沿烧杯壁缓慢地注入870mL水中,混匀,使其被稀释18.4倍,4℃保存。

[0044] 实施例3

[0045] 一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0046] (1) 制备可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品和质控品:取适量研细后的硫酸铵于室温下边搅拌边加入胎牛血清中,使其终浓度为300g/L,4℃放置22小时;10,000转离心40分钟,取上清液滤纸过滤;将滤后上清液装透析袋,于4℃下在10倍体积的生理盐水中透析,每隔5小时更换一次透析液,一共三次;转入10体积的0.05mol/L硼酸溶液中进行透析,每隔5小时更换一次透析液,一共四次;将透析后的液体放入干净容器内,于56℃热灭活2小时;加入0.15%的Proclin300和0.15%的庆大霉素,混合均匀后用0.22μm滤膜过滤除菌得到胎牛血清处理基质,于-20℃下保存待用;使用上述制备得到的胎牛血清处理基质将可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗原稀释得到6个不同浓度依次为0ng/ml、6.4ng/ml、16ng/ml、40ng/ml、100ng/ml、200ng/ml的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品,同时使用胎牛血清处理基质将可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗原稀释得到浓度为30ng/ml低值范围质控品和浓度为60ng/ml高值范围质控品;

[0047] (2) 制备可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体包被的微孔反应板:吸取适量可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体,加入0.01mol/L, pH=7.2的磷酸盐溶液中进行稀释,使其终浓度为6μg/mL,4℃储存备用;取微孔板,每孔加入100μL稀释后的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体,覆膜后置于4℃包被22小时;甩去孔内液体,每孔加入200μL内含3%牛血清白蛋白、5%蔗糖、0.15% Priclin300的0.01mol/L, pH=7.4的磷酸盐溶液,覆膜后置于4℃封闭22小时;甩去孔内液体,并在吸水纸上拍干,室温下干燥4天后真空密封包装,得到可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体包被的微孔反应板,所述微孔反应板保存于4℃。

[0048] (3) 制备辣根过氧化物酶标记的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体:称取辣根过氧化物酶2mg,溶解于1mL去离子水中,加入2mL浓度为0.05mol/L的过碘酸钠溶液,4℃缓慢摇动60min;用浓度为0.001mol/L, pH=4.4的醋酸钠溶液透析22小时;加入2mg可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体,4℃避光振荡22小时;加入400μL浓度为0.2mol/L的NaBH₄溶液,用浓度为0.02mol/L, pH=7.4的磷酸缓冲液透析22小时;用HPLC二次纯化,收集蛋白峰,加入等体积甘油,得到辣根过氧化物酶标记的可溶性单克隆抗体,于-20℃保存。

[0049] (4) 制备样本稀释液:取磷酸二氢钠1.409g、磷酸氢二钠4.372g、氯化钠8.5g、牛血清白蛋白5g、吐温-200.5mL、加水定容至1L,用氢氧化钠调pH至7.4±0.1;

[0050] (5) 制备洗涤液:取磷酸二氢钠28.18g、磷酸氢二钠87.44g、氯化钠170g、吐温-2010mL,加水定容至1L,使用时稀释20倍;

[0051] (6) 制备显色液:称取100gTMB,用10mLDMSO和10mL无水乙醇配成的混合液溶解,4

℃避光保存备用;配制0.1mol/LpH=5.0的柠檬酸溶液;向1000mL所述步骤(2)配制的柠檬酸溶液中加入200mg过氧化氢尿素;溶解充分后,加入PVP,使其终浓度为0.6%,4℃放置22小时;加入所述事先溶解的TMB混合液,并加入4%聚乙二醇,加水定容至1000mL,4℃避光保存;

[0052] (7) 制备终止液:量取50mL浓硫酸沿烧杯壁缓慢地注入870mL水中,混匀,使其被稀释18.4倍,4℃保存。

[0053] 本发明所述中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒的使用方法为:

[0054] (1) 实验所需试剂及样本从冰箱中取出,在室温下平衡30分钟;

[0055] (2) 取一块微孔反应板,取出实验所需板条置于板架上,进行编号;

[0056] (3) 取各个浓度的标准品、质控品及实验样本20μL分别加入相应编号的孔中;

[0057] (4) 每孔加入80μL样本稀释液,振荡混匀30秒后覆膜并于37℃温育60分钟;

[0058] (5) 除去孔内液体,每孔加入300μL事先20倍稀释的洗涤液,振荡30秒后除去洗液,重复4次,拍干残留液体;

[0059] (6) 每孔加入100μL酶标记物,振荡混匀30秒后覆膜并于37℃温育30分钟;

[0060] (7) 除去孔内液体,每孔加入300μL事先20倍稀释的洗涤液,振荡30秒后除去洗液,重复4次,拍干残留液体;

[0061] (8) 每孔加入100μL显色液,混匀,37℃避光温育20分钟;

[0062] (9) 每孔加入50μL终止液,振荡混匀30秒后用酶标仪在450纳米波长条件下测定各孔的OD值;

[0063] (10) 以吸光度OD值为纵坐标(Y),相应的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品浓度为横坐标(X),通过四参数拟合方程做得相应的曲线,根据样本的OD值计算从标准曲线上读取样本中含有的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的含量。

[0064] 本发明检测试剂盒技术指标分析:

[0065] 试剂盒检测限 $\leq 2.0\text{ng/mL}$,与同源类受体蛋白结构类似物无明显交叉反应,标准曲线满足临床标本所需的测量范围为6.4~200ng/mL。

[0066] 产品效果的研究数据:

[0067] 用本发明的检测试剂盒分别对一批经医院确诊的急性肾损伤患者血清样本及正常人血清样本进行了测定试验,结果显示,本发明试剂盒对急性肾损伤的阳性检出率可达98%,而对正常人检测的假阳性率为0.7%,因此本发明试剂盒对急性肾损伤的临床辅助诊断具有十分重要的参考价值。

[0068] 本发明可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品的浓度不局限于0ng/ml、6.4ng/ml、16ng/ml、40ng/ml、100ng/ml、200ng/ml六个浓度;可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白质控品的浓度范围不局限于24~36ng/ml、48~72ng/ml。通过调整可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品和可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白质控品的浓度,同时按照上述方法制备微孔反应板、酶标记物、样本稀释液、洗涤液、显色液和终止液,可以制备出不同规格的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒。

[0069] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述

实施例进行变化、修改、替换和变型。

专利名称(译)	一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒		
公开(公告)号	CN109870584A	公开(公告)日	2019-06-11
申请号	CN201711257965.9	申请日	2017-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	天津康尔克生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	天津康尔克生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	天津康尔克生物科技有限公司		
[标]发明人	兰成杰 陶剑		
发明人	兰成杰 陶剑		
IPC分类号	G01N33/92 G01N33/577 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒，属于免疫检测分析技术领域。所述试剂盒包含样本稀释液、洗涤液、显色液及终止液、辣根过氧化物酶标记的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体、不同浓度的可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品、可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白质控品和微孔反应板，微孔反应板包被可溶性中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体。所述试剂盒中所述标准品直接使用，实现了高效、快速检测，同时所述质控品可鉴定检测结果是否准确，不同浓度的所述标准品可得到不同规格的检测试剂盒，适应不同客户需求。