



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102680712 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 19

(21) 申请号 201210200339. 7

(22) 申请日 2012. 06. 18

(71) 申请人 王钊

地址 610000 四川省成都市青羊区玉宇路
998号3栋5单元1804号

(72) 发明人 王钊

(74) 专利代理机构 成都顶峰专利事务所(普通
合伙) 51224

代理人 成实

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 21/31(2006. 01)

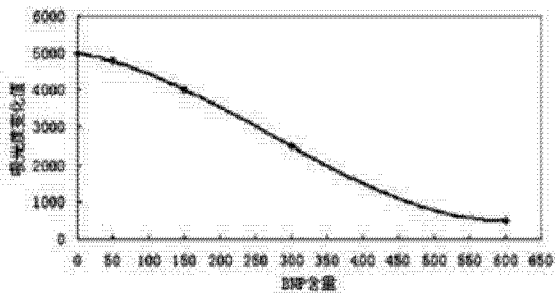
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 BNP 检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 BNP 检测试剂盒及其制备方法,解决了目前夹心法检测 BNP 难度较高,检测时间长等问题。本发明的试剂盒,由胶乳颗粒以及反应缓冲液组成,其特征在于:所述胶乳颗粒包被有以下人工合成的氨基酸序列:FGRKMDR-X;X由2~4个K组成。本发明还提供了该试剂盒的制备方法。本发明具有准确性高、检测时间短、可靠性高等优点。



1. 竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 BNP 检测试剂盒,由胶乳颗粒以及反应缓冲液组成,其特征在于:所述胶乳颗粒包被有以下人工合成的氨基酸序列:

FGRKMDR-X;X 由 2 ~ 4 个 K 组成。

2. 根据权利要求 1 所述的竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 BNP 检测试剂盒,其特征在于,所述反应缓冲液中含有抗 FGRKMDR 抗原表位的单克隆抗体。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 BNP 检测试剂盒,其特征在于,是基于免疫竞争法对检测样本中的 BNP 进行定量测定。

4. 根据权利要求 1 ~ 3 任一项所述的竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 BNP 检测试剂盒的制备方法,包括胶乳颗粒的制备和反应缓冲液的制备,其特征在于,所述胶乳颗粒的制备方法由以下步骤组成:

(a1) 活化胶乳颗粒,离心,去上清,使用 HEPES 缓冲液复溶;

(a2) 加入人工合成的氨基酸序列 FGRKMDR-X,室温下反应 2 小时;

(a3) 加入上述反应体积 1/100 的 1M 甘氨酸,以及 10%BSA 溶液,反应 30min;

(a4) 离心,去上清,使用 HEPES 缓冲液复溶即制成成品。

5. 根据权利要求 4 所述的竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 BNP 检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述离心的条件为 22000rpm,离心的时间为 10min。

6. 根据权利要求 5 所述的竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 BNP 检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述(a1)中活化胶乳颗粒所采用的试剂为 EDC 和 S-NHS。

7. 根据权利要求 4 ~ 6 任一项所述的竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 BNP 检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述反应缓冲液制备过程如下:

在 100mM 的 MES 缓冲液中加入终浓度为 0.001 ~ 0.1mg/ml 的抗 FGRKMDR 抗原表位的单克隆抗体。

竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 BNP 检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及的是生物技术领域,具体涉及的是竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 BNP 检测试剂盒,本发明还涉及该试剂盒的制备方法。

背景技术

[0002] B 型尿钠肽又称脑尿钠肽(Brain natriuretic peptide, BNP)。BNP 作为心衰定量标志物,不仅反映左室收缩功能障碍,也反映左室舒张功能障碍、瓣膜功能障碍和右室功能障碍情况。以 BNP 100pg/ml 作为临界值的阴性预测值达到 90%,可以减少 74% 的临床不确定性;而 BNP 超过 400pg/ml 提示患者存在心力衰竭的可能性达 95%。而 BNP 在 100-400pg/ml 时可能由肺部疾病、右心衰、肺栓塞等情况引起。呼吸困难患者急诊就诊时的 BNP 水平以及治疗后的变化也可以反映其出院时风险。因此,及时准确测量 BNP 含量十分重要。

[0003] 目前市场上已有的 BNP (脑尿钠肽)以及 ProBNP (脑尿钠肽前体)还有 Nt-ProBNP (N 端 - 脑尿钠肽前体)测定方法有化学 / 电化学发光免疫检测、放射免疫检测、酶联免疫检测,其缺点是检测时间普遍较长(约 30min),检测费用昂贵。另外胶体金法检测 BNP 项目,虽然快速,但目前不能定量,检测费用同样昂贵,对于医生诊断贡献有限。据 Hytest 公司专家分析目前市面上的上述后两种 BNP 检测可能会因为 ProBNP 以及 Nt-ProBNP 的糖基化造成漏检;而 BNP 相对不稳定,半衰期较短。因此,相对快速的对于 BNP 检测尤为重要。

[0004] 传统的胶乳颗粒增强免疫比浊法检测抗原物质时采用的是夹心法检测原理,即被检测物抗原与样本稀释液(试剂 1)混合后孵育一定时间,再与包被有对应抗体的纳米颗粒(试剂 2)发生抗原抗体反应,形成不容性的免疫复合物,在全自动生化仪上表现为吸光度上升(形成一定的吸光度变化值),这种吸光度的变化值与被测物质抗原含量正相关,使用已知浓度的标准品绘制标准曲线,则可根据被测标本的反应吸光度变化计算出其含量。其要求是抗原物质要有两个以上的无空间位阻的抗原表位。但是,BNP (脑尿钠肽)中无糖基化且和心脏疾病关系密切的抗原表位只有 7 个氨基酸,采用夹心法检测难度较高。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于解决目前夹心法检测 BNP 难度较高,检测时间长的问题,提供一种速度快、检测简便的竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 BNP 检测试剂盒及其制备方法。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用的技术方案如下:

竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 BNP 检测试剂盒,由胶乳颗粒以及反应缓冲液组成,所述胶乳颗粒包被有以下人工合成的氨基酸序列:

FGRKMDR-X; X 由 2 ~ 4 个 K 组成。

[0007] 进一步,所述反应缓冲液中含有抗 FGRKMDR 抗原表位的单克隆抗体。

[0008] 更进一步地,所述竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 BNP 检测试剂盒是基于免疫竞争法对检测样本中的 BNP 进行定量测定。

[0009] 竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 BNP 检测试剂盒的制备方法,包括胶乳颗粒的制备和反应缓冲液的制备,所述胶乳颗粒的制备方法由以下步骤组成:

- (a1) 活化胶乳颗粒,离心,去上清,使用 HEPES 缓冲液复溶;
- (a2) 加入人工合成的氨基酸序列 FGRKMDR-X,室温下反应 2 小时;
- (a3) 加入上述反应体积 1/100 的 1M 甘氨酸,以及 10%BSA 溶液,反应 30min;
- (a4) 离心,去上清,使用 HEPES 缓冲液复溶即制成成品。

[0010] 为了更有效的得到所需胶乳颗粒;所述离心的条件为 22000rpm,离心的时间为 10min。

[0011] 作为一种优选,所述(a1)中活化胶乳颗粒所采用的试剂为 EDC 和 S-NHS。

[0012] 进一步,所述反应缓冲液制备过程如下:

在 100mM 的 MES 缓冲液中加入终浓度为 0.001 ~ 0.1mg/ml 的抗 FGRKMDR 抗原表位的单克隆抗体。

[0013] 本发明原理是:纳米颗粒包被的是和被测抗原物质相同或相似的抗原,与一定量的对应的抗体发生抗原抗体反应,形成不容性的免疫复合物,在全自动生化仪上表现为形成一定的吸光度变化值。当被测物中含有此种抗原时,由于竞争原理,所形成的吸光度变化值与无被测物质时相比下降,在竞争法中吸光度的变化值与被测物质抗原含量负相关,使用已知浓度的标准品绘制标准曲线,则可根据被测标本的反应吸光度变化计算出其含量。

[0014] 本发明具有以下优点及有益效果:

1、在 BNP 的抗原测定中,由于其抗原太小,无法提供形成夹心免疫复合物的多个抗原表位;使用本发明无需形成多个抗原表位,即可有效的对 BNP 进行检测,使检测方法更简便,检测结果更准确。

[0015] 2、采用本发明的试剂盒可快速对 BNP 进行检测,检测时间仅需要 10min。

[0016] 3、本发明采用包被有人工合成的氨基酸 FGRKMDR-X 的胶乳颗粒以及含有抗 FGRKMDR 抗原表位的单克隆抗体的反应缓冲液对 BNP 进行检测;因此,本发明具有特异性好、准确性高的优点。

[0017] 4、通过本发明的试剂盒进行检测,其检测成本相对低廉,适合推广应用。

[0018] 5、本发明的免疫竞争法同时适用于其他小分子抗原的测定。

附图说明

[0019] 图 1 为本发明不同含量的 BNP 参考标准的标准曲线。

具体实施方式

[0020] 下面结合实施例对本发明作进一步说明,但本发明的实施方式不限于下列实施例。

[0021] 实施例 1

本发明由胶乳颗粒以及反应缓冲液组成。

[0022] 所述胶乳颗粒包被有以下人工合成的氨基酸序列:FGRKMDR-X;X 由 2 ~ 4 个 K 组成。所述反应缓冲液中含有抗 FGRKMDR 抗原表位的单克隆抗体。该 FGRKMDR 为现有的氨基酸序列。

[0023] 所述人工合成的氨基酸序列:FGRKMDR-X,由生工生物工程(上海)有限公司合成。抗 FGRKMDR 抗原表位的单克隆抗体由 Abcom 公司提供。

[0024] (a) 所述胶乳颗粒的制备方法由以下步骤组成:

(a1) 采用 EDC 和 S-NHS 活化胶乳颗粒,活化时间为 15min,活化后的物质在 22000rpm 的条件下离心 10min,去上清,使用 HEPES 缓冲液复溶;

(a2) 加入人工合成的氨基酸序列 FGRKMDRKK,在室温下反应 2 小时;

(a3) 加入上述反应体积 1/100 的 1M 甘氨酸,以及 10%BSA 溶液,反应 30min;

(a4) 在 22000rpm 的条件下离心 10min,去上清,使用 HEPES 缓冲液复溶。

[0025] 根据上述步骤即可制备出本发明所需的胶乳颗粒。上述步骤中 EDC 为 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐;上述 S-NHS 为 N-羟基琥珀酰亚胺。

[0026] (b) 所述反应缓冲液制备过程如下:

在 100mM 的 MES 缓冲液中加入终浓度为 0.001 ~ 0.1mg/ml 的抗 FGRKMDR 抗原表位的单克隆抗体。所述 MES 为脂肪酸甲酯磺酸盐;MES 缓冲液的 pH 为 5.0 ~ 7.5。本实施例中抗 FGRKMDR 抗原表位的单克隆抗体的终浓度为 0.001mg/ml。

[0027] 采用上述步骤制备出的胶乳颗粒和反应缓冲液,检测出不同浓度下的 BNP 标准品的吸光度,通过该浓度和吸光度制成本发明的标准曲线;其检测过程如下:

往日立 7060 全自动生化分析仪器中加入本发明的胶乳颗粒和反应缓冲液,胶乳颗粒 200ul,反应缓冲液 50ul。再向该全自动生化仪中加入 30ul 的样本。进行检测,检测参数:反应时间 10min,18 ~ 31 读点,570nm 单波长。

[0028] 标准曲线的制作过程如下:采用以下标准样本校准点浓度 0.0pg/ml、50pg/ml、150pg/ml、300pg/ml、600pg/ml;用 5 点 Spline 或 Log4p 模式校准,通过检测结果制作出本发明标准曲线。本实施例的标准曲线如图 1 所示,其中 X 轴代表 BNP 含量,Y 轴表示吸光度变化值。

[0029] 完成标准曲线后,即可进行标本测定,由仪器可自动计算出样本中 BNP 含量。

[0030] 本实施例对 9 份样本进行检测;同时,采用 Roche cobas e 411 电化学发光全自动免疫分析系统和 pro BNP II 脑利钠肽前体对样本进行检测作为对照实验,检测结果如表 1。

[0031] 实施例 2

本实施例与实施例 1 的不同点在于胶乳颗粒包被的人工合成的氨基酸序列不同;同时,本实施例中所采用的抗 FGRKMDR 抗原表位的单克隆抗体的终浓度为 0.05 mg/ml。本实施例采用的人工合成的氨基酸序列为:FGRKMDRKKK。检测结果如表 1。

[0032] 实施例 3

本实施例与实施例 1 的不同点在于胶乳颗粒包被的人工合成的氨基酸序列不同;同时,本实施例中所采用的抗 FGRKMDR 抗原表位的单克隆抗体的终浓度为 0.1mg/ml。本实施例采用的人工合成的氨基酸序列为:FGRKMDRKKKK。检测结果如表 1。

[0033] 表 1

样本	实施例 1	实施例 2	实施例 3	对照实验
1	133.6	141.3	137.5	128.3
2	25.2	27.3	26.4	22.3
3	400.1	440.2	439.7	419.5

4	175.3	179.8	180.2	170.0
5	234.5	242.4	236.3	253.3
6	65.5	68.2	66.7	73.2
7	85.3	88.6	88.2	82.3
8	12.5	13.1	12.7	14.4
9	542.7	553.3	547.5	490.6

通过上表 1,即可有效的表明:通过本发明即可有效的检测出样本中 BNP 的含量(pg/ml),且其准确性高、检测时间短、可靠性高,方法简便,适合推广应用。

[0034] 按照上述实施例,便可很好地实现本发明。

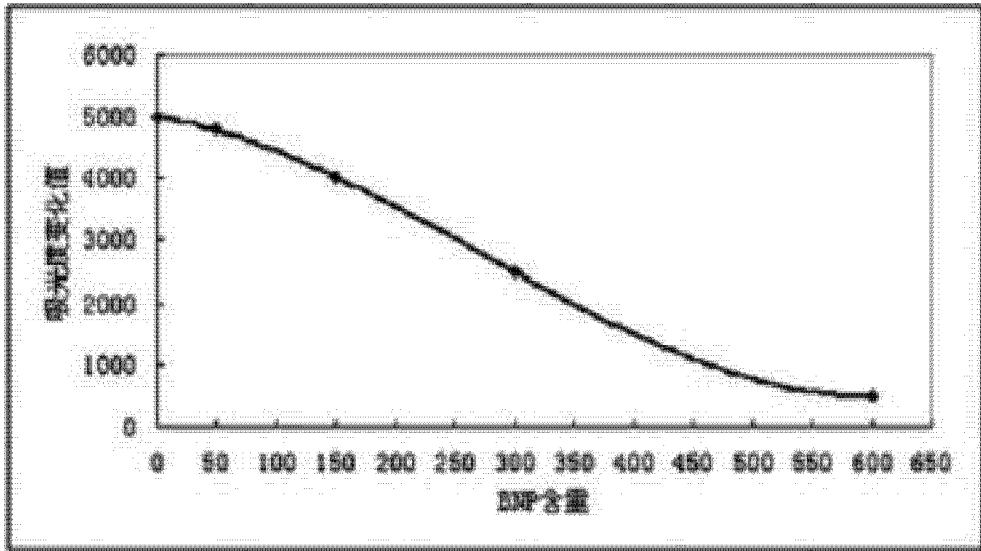


图 1

专利名称(译)	竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊BNP检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN102680712A	公开(公告)日	2012-09-19
申请号	CN201210200339.7	申请日	2012-06-18
[标]申请(专利权)人(译)	王钊		
申请(专利权)人(译)	王钊		
当前申请(专利权)人(译)	王钊		
[标]发明人	王钊		
发明人	王钊		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N21/31		
代理人(译)	成实		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊BNP检测试剂盒及其制备方法，解决了目前夹心法检测BNP难度较高，检测时间长等问题。本发明的试剂盒，由胶乳颗粒以及反应缓冲液组成，其特征在于：所述胶乳颗粒包被有以下人工合成的氨基酸序列：FGRKMDR-X；X由2~4个K组成。本发明还提供了该试剂盒的制备方法。本发明具有准确性高、检测时间短、可靠性高等优点。

