



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110568182 A

(43)申请公布日 2019.12.13

(21)申请号 201910868121.0

(22)申请日 2019.09.12

(71)申请人 苏州普瑞斯生物科技有限公司

地址 215000 江苏省苏州市高新区锦峰路8号

(72)发明人 袁嘉扬 单以朗

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

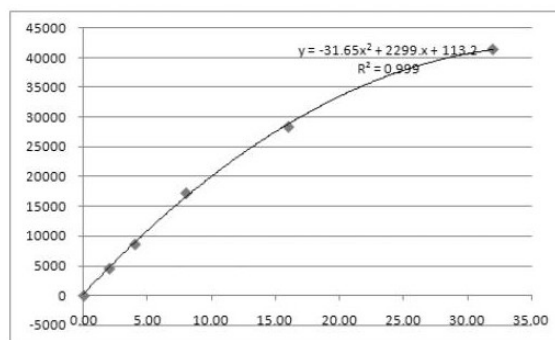
权利要求书3页 说明书12页 附图1页

(54)发明名称

一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及生物技术领域,涉及一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒的制备方法,公开了试剂R2由反应液、保存液以及胶乳微球抗体偶联物组成,其反应液由第二缓冲液构成,胶乳微球抗体偶联物由小胶乳微球、大胶乳微球、生物素、链霉亲和素、脂联素单抗、脂联素多抗以及1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成。优点是:经多次研发实验后,我司采用大小胶乳微球方案:大胶乳联脂联素单抗增加低端灵敏度;小胶乳连接链霉亲和素按比例混合,脂联素多抗连接生物素按比例混合,二者再按比例混合反应,可提高线性范围;将两种胶乳按照比例混合,可改善重复性和灵敏度线性范围可做到1.00-32.00mg/L。



1. 一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒,其特征在于:包括试剂R1和试剂R2,所述试剂R1的各组分及浓度包括:

第一缓冲液 6.0-12.2 g/L

第一稳定剂 0.5-2 g/L

氯化钠 5.0-27.0 g/L

表面活性剂 1-5 ml/L

聚乙二醇 6000 60-120 g/L

第一防腐剂 0.8-2.0 ml/L

所述试剂R2由反应液、保存液以及胶乳微球抗体偶联物组成,其反应液由第二缓冲液构成,其保存液由甘氨酸、第二稳定剂、第二防腐剂构成,胶乳微球抗体偶联物由小胶乳微球、大胶乳微球、生物素、链霉亲和素、脂联素单抗、脂联素多抗以及1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成,各组分的浓度为:

第二缓冲液 8.05-27.30 g/L

甘氨酸 1.26-9.83 g/L

第二稳定剂 0.5-2.0 g/L

第二防腐剂 0.8-2.0 ml/L

小胶乳微球 0.05-2.0%

大胶乳微球 0.05-2.0%

生物素 5-20 g/L

链霉亲和素 5-20 g/L

脂联素单抗 0.05-3.0 g/L

脂联素多抗 0.05-3.0 g/L

1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 0.005-0.3 g/L。

2. 根据权利要求1所述的一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒,其特征在于:所述试剂R1中的第一缓冲液包括PBS缓冲液、HEPES缓冲液、MES缓冲液、Tris缓冲液中的一种或几种。

3. 根据权利要求1所述的一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒,其特征在于:所述试

剂R2中的第二缓冲液包括PBS缓冲液、HEPES缓冲液、甘氨酸缓冲体系、MES缓冲液、Tris缓冲液等中的一种或几种。

4. 根据权利要求1所述的一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒, 其特征在于: 所述试剂R1和试剂R2中的第一稳定剂和第二稳定剂均包括酪蛋白、甘露醇、牛血清白蛋白中的一种或几种以上混合物。

5. 根据权利要求1所述的一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒, 其特征在于: 所述试剂R1中的表面活性剂包括吐温20、曲拉通X-100、聚乙烯吡咯烷酮、辛基苯基聚氧乙烯醚中的一种或几种以上混合物。

6. 根据权利要求1所述的一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒, 其特征在于: 所述试剂R1中的第一防腐剂和试剂R2中的第二防腐剂包括叠氮钠、Proclin-950、Proclin-300、硫柳汞中的一种。

7. 根据权利要求1所述的一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒, 其特征在于: 所述试剂R2中的小胶乳微球所选粒径为15-85nm, 大胶乳微球所选粒径为270-630nm。

8. 根据权利要求1所述的一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒, 其特征在于: 所述试剂R2中的脂联素单抗为小鼠单抗; 脂联素多抗为羊多抗, 兔多抗中的一种。

9. 根据权利要求1所述的一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒, 其特征在于: 所述R1试剂pH在5.90-8.90之间; 所述R2试剂pH在6.00-8.00之间。

10. 一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒的制备方法, 其特征在于:

包括如下步骤:A)、试剂R1制备:

在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上, 调节搅拌器转速至200-300rpm, 使搅拌保持匀速状态, 边搅拌边投入第一缓冲液、氯化钠、第一稳定剂、表面活性剂、聚乙二醇6000和第一防腐剂, 搅拌至物料完全溶解、溶液清澈透明、配液罐底部无沉淀, 调整PH值5.90-8.90之间并定容至最终体积;

溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程, 通过微孔滤膜过滤, 过滤后的溶液存放在成品罐中, 进行标识;

B)、试剂R2制备:

B1反应液的制备: 在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上, 调节搅拌器转速至200-300rpm, 使搅拌保持匀速状态, 边搅拌边投入第二缓冲液, 搅拌至物料完全溶解, 清澈透明, 配液罐底部无沉淀, 调整PH值到5.50-6.50之间, 并定容至最终体积;

溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程, 通过微孔滤膜过滤, 过滤后的溶液存放在成品罐中, 进行标识;

B2保存液的制备: 在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上, 调节搅拌器转速至200-300rpm, 使搅拌保持匀速状态, 边搅拌边投入甘氨酸、第二稳定剂和第二防腐剂, 搅拌20-30分钟至物料完全溶解, 调节pH值到6.00-8.00之间, 继续搅拌5-10分钟至全部物料完全溶解, 溶液清澈透明, 配液罐底部无沉淀, 定容至最终体积;

溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程, 通过微孔滤膜过滤, 过滤后的溶液存放备用, 进行标识;

B3胶乳微球抗体偶联物的制备:

步骤一: 将小胶乳微球用反应液稀释到0.05-2.0%的浓度, 与链霉亲和素按1:2-1:5比

例透析过夜结合；

将脂联素多抗以反应液稀释到0.05-3.0g/L的浓度,与生物素按1:1-1:3比例透析过夜结合；

将上述的胶乳-链霉亲和素和生物素-脂联素多抗按照0.5:1-4:1比例进行混合；

将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以反应液溶解到0.005-0.3g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入牛血清白蛋白封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14000rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,超声重悬,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,超声重悬；

步骤二:大胶乳微球用反应液稀释到0.05-2.0%的浓度,脂联素单抗以反应液稀释到0.05-3.0g/L的浓度,将两者按0.5:1-4:1比例混匀；

将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以反应液溶解到0.005-0.3g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入牛血清白蛋白封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14000rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,超声重悬,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,超声重悬；

步骤三:将步骤一中偶联成功的胶乳和步骤二中偶联成功的胶乳按2:1-5:1比例混合均匀,装入成品罐中,并定容至终浓度,进行标识为制备好的R2。

一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,涉及一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒,尤其涉及一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒的制备方法。

背景技术

[0002] 脂联素 (Adiponectin, APN) 亦称 Acrp30、GBP28 或 AdipoQ, 是一种由脂肪细胞合成和分泌细胞因子, 能在人体血浆中稳定存在, 浓度范围约为 3.0-30.0mg/L, 约占血浆蛋白的 0.01%。人类脂联素含 244 个氨基酸, 包括 3 个区域: 氨基末端信号序列、胶原结构域和羧基末端的球形结构域。脂联素以三聚体 (65kb)、六聚体 (150kb) 和高分子量聚合体 (18-36 个多体, >280kb) 三种亚型存在于血液中。临床研究显示, 脂联素与肥胖、II 型糖尿病、冠心病、胰岛素抵抗密切相关, 具有抗动脉粥样硬化形成、抗炎症和血管损伤后抗内膜增生的特性。

[0003] 脂联素的测定方法有多种, 例如放射免疫法 (RIA)、酶联免疫吸附法 (ELISA) (人脂联素 ELISA 试剂盒, CN102517256A)。ELISA 方法虽然在临床上使用了近二十年, 但它依然存在一些致命缺点, 操作时间长、自动化程度低。放射免疫法 (RIA) 灵敏度高, 但不稳定, 重复性比 ELISA 差, 而且存在放射性污染的危险。

发明内容

[0004] 本发明的目的是: 针对上述不足, 提供一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒及其制备方法。

[0005] 为达到上述目的, 本发明采用的技术方案是:

[0006] 一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒, 包括试剂 R1 和试剂 R2, 所述试剂 R1 的各组分及浓度包括:

第一缓冲液 6.0-12.2 g/L

第一稳定剂 0.5-2 g/L

氯化钠 5.0-27.0 g/L

[0007]

表面活性剂 1-5 ml/L

聚乙二醇 6000 60-120 g/L

第一防腐剂 0.8-2.0 ml/L

[0008] 所述试剂 R2 由反应液、保存液以及胶乳微球抗体偶联物组成, 其反应液由第二缓冲液构成, 其保存液由甘氨酸、第二稳定剂、第二防腐剂构成, 胶乳微球抗体偶联物由小胶乳微球、大胶乳微球、生物素、链霉亲和素、脂联素单抗、脂联素多抗以及 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成, 各组分的浓度为:

- 第二缓冲液 8.05-27.30 g/L
- 甘氨酸 1.26-9.83 g/L
- 第二稳定剂 0.5-2.0 g/L
- [0009] 第二防腐剂 0.8-2.0 ml/L
- 小胶乳微球 0.05-2.0%
- 大胶乳微球 0.05-2.0%
- 生物素 5-20 g/L
- 链霉亲和素 5-20 g/L
- [0010] 脂联素单抗 0.05-3.0 g/L
- 脂联素多抗 0.05-3.0 g/L
- [0011] 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐0.005-0.3g/L。
- [0012] 所述试剂R1中的第一缓冲液包括PBS缓冲液、HEPES缓冲液、MES缓冲液、Tris缓冲液中的一种或几种。
- [0013] 所述试剂R2中的第二缓冲液包括PBS缓冲液、HEPES缓冲液、甘氨酸缓冲体系、MES缓冲液、Tris缓冲液等中的一种或几种。
- [0014] 所述试剂R1和试剂R2中的第一稳定剂和第二稳定剂均包括酪蛋白、甘露醇、牛血清白蛋白中的一种或几种以上混合物。
- [0015] 所述试剂R1中的表面活性剂包括吐温20、曲拉通X-100、聚乙烯吡咯烷酮、辛基苯基聚氧乙烯醚中的一种或几种以上混合物。
- [0016] 所述试剂R1中的第一防腐剂和试剂R2中的第二防腐剂包括叠氮钠、Proclin-950、Proclin-300、硫柳汞中的一种。
- [0017] 所述试剂R2中的小胶乳微球所选粒径为15-85nm，大胶乳微球所选粒径为270-630nm。
- [0018] 所述试剂R2中的脂联素单抗为小鼠单抗；脂联素多抗为羊多抗，兔多抗中的一种。
- [0019] 所述R1试剂pH在5.90-8.90之间；所述R2试剂pH在6.00-8.00之间。
- [0020] 一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒的制备方法，其特征在于：包括如下步骤：
A)、试剂R1制备：
- [0021] 在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上，调节搅拌器转速至200-300rpm，使搅拌保持匀速状态，边搅拌边投入第一缓冲液、氯化钠、第一稳定剂、表面活性剂、聚乙二醇6000和第一防腐剂，搅拌至物料完全溶解、溶液清澈透明、配液罐底部无沉淀，调整PH值5.90-8.90之间并定容至最终体积；
- [0022] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程，通过微孔滤膜过滤，过滤后的溶液存放

在成品罐中,进行标识;

[0023] B)、试剂R2制备:

[0024] B1反应液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200-300rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入第二缓冲液,搅拌至物料完全溶解,清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值到5.50-6.50之间,并定容至最终体积;

[0025] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0026] B2保存液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200-300rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入甘氨酸、第二稳定剂和第二防腐剂,搅拌20-30分钟至物料完全溶解,调节pH值到6.00-8.00之间,继续搅拌5-10分钟至全部物料完全溶解,溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,定容至最终体积;

[0027] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放备用,进行标识;

[0028] B3胶乳微球抗体偶联物的制备:

[0029] 步骤一:将小胶乳微球用反应液稀释到0.05-2.0%的浓度,与链霉亲和素按1:2-1:5比例透析过夜结合;

[0030] 将脂联素多抗以反应液稀释到0.05-3.0g/L的浓度,与生物素按1:1-1:3比例透析过夜结合;

[0031] 将上述的胶乳-链霉亲和素和生物素-脂联素多抗按照0.5:1-4:1比例进行混合;

[0032] 将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以反应液溶解到0.005-0.3g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入牛血清白蛋白封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14000rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,超声重悬,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,超声重悬;

[0033] 步骤二:大胶乳微球用反应液稀释到0.05-2.0%的浓度,脂联素单抗以反应液稀释到0.05-3.0g/L的浓度,将两者按0.5:1-4:1比例混匀;

[0034] 将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以反应液溶解到0.005-0.3g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入牛血清白蛋白封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14000rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,超声重悬,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,超声重悬;

[0035] 步骤三:将步骤一中偶联成功的胶乳和步骤二中偶联成功的胶乳按2:1-5:1比例混合均匀,装入成品罐中,并定容至终浓度,进行标识为制备好的R2。

[0036] 与现有技术相比,本发明所达到的技术效果是:经多次研发实验后,我司采用大小胶乳微球方案:大胶乳联脂联素单抗增加低端灵敏度;小胶乳连接链霉亲和素按比例混合,脂联素多抗连接生物素按比例混合,二者再按比例混合反应,可提高线性范围;将两种胶乳按照比例混合,可改善重复性和灵敏度线性范围可做到1.00-32.00mg/L。

附图说明

[0037] 图1是本发明实施例4的定标曲线图。

具体实施方式

[0038] 一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒,包括试剂R1和试剂R2,所述试剂R1的各组分及浓度包括:第一缓冲液,6.0-12.2g/L,第一稳定剂,0.5-2g/L,氯化钠,5.0-27.0g/L,表面活性剂,1-5ml/L,聚乙二醇,600060-120g/L,第一防腐剂,0.8-2.0ml/L;

[0039] 所述试剂R2由反应液、保存液以及胶乳微球抗体偶联物组成,其反应液由第二缓冲液构成,其保存液由甘氨酸、第二稳定剂、第二防腐剂构成,胶乳微球抗体偶联物由小胶乳微球、大胶乳微球、生物素、链霉亲和素、脂联素单抗、脂联素多抗以及1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成,各组分的浓度为:第二缓冲液,8.05-27.30g/L,甘氨酸,1.26-9.83g/L第二稳定剂,0.5-2.0g/L,第二防腐剂,0.8-2.0ml/L,小胶乳微球,0.05-2.0%,大胶乳微球,0.05-2.0%,生物素,5-20g/L,链霉亲和素,5-20g/L脂联素单抗,0.05-3.0g/L,脂联素多抗,0.05-3.0g/L,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,0.005-0.3g/L。

[0040] 所述试剂R1中的第一缓冲液包括PBS缓冲液、HEPES缓冲液、MES缓冲液、Tris缓冲液中的一种或几种,在实施例,优选的第一缓冲液优选的为三羟甲基氨基甲烷,其浓度优选可为:6.0g/L、9g/L、12.2g/L。

[0041] 所述试剂R2中的第二缓冲液包括PBS缓冲液、HEPES缓冲液、甘氨酸缓冲体系、MES缓冲液、Tris缓冲液等中的一种或几种,在实施例,优选的第二缓冲液优选的为MES (2-(N-吗啉) 乙磺酸一水合物,其浓度优选可为:8.05g/L、18g/L、27.3g/L。

[0042] 所述试剂R1和试剂R2中的第一稳定剂和第二稳定剂均包括酪蛋白、甘露醇、牛血清白蛋白中的一种或几种以上混合物,在实施例,试剂R1中的第一稳定剂优选为:酪蛋白、甘露醇、牛血清白蛋白,对应的浓度分别为:0.5g/L、1.2g/L、2g/L;试剂R2中的第二稳定剂优选为:酪蛋白、甘露醇、牛血清白蛋白,对应的浓度分别为:0.5g/L、1.2g/L、2g/L。

[0043] 所述试剂R1中的表面活性剂包括吐温20、曲拉通X-100、聚乙烯吡咯烷酮、辛基苯基聚氧乙烯醚中的一种或几种以上混合物,在实施例,试剂R1中的表面活性剂优选为:吐温20、曲拉通X-100、聚乙烯吡咯烷酮,对应的浓度分别为:1ml/L、3ml/L、5ml/L。

[0044] 所述试剂R1中的第一防腐剂和试剂R2中的第二防腐剂包括叠氮钠、Proclin-950、Proclin-300、硫柳汞中的一种,在实施例,试剂R1中的第一防腐剂优选为:叠氮钠、Proclin-950、Proclin-300,对应的浓度分别为:0.8ml/L、1.4ml/L、2ml/L;在实施例,试剂R2中的第二防腐剂优选为:叠氮钠、Proclin-950、Proclin-300,对应的浓度分别为:0.8ml/L、1.4ml/L、2ml/L。

[0045] 所述试剂R2中的小胶乳微球所选粒径为15-85nm,大胶乳微球所选粒径为270-630nm,在实施例,优选的小胶乳微球粒径分别为12nm、47nm、85nm;大胶乳微球的粒径分别为270nm、450nm、630nm。

[0046] 所述试剂R2中的脂联素单抗为小鼠单抗;脂联素多抗为羊多抗,兔多抗中的一种。

[0047] 所述R1试剂pH在5.90-8.90之间;所述R2试剂pH在6.00-8.00之间。

[0048] 一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:
A)、试剂R1制备:

[0049] 在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200-300rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入第一缓冲液、氯化钠、第一稳定剂、表面活性剂、聚乙二

醇6000和第一防腐剂,搅拌至物料完全溶解、溶液清澈透明、配液罐底部无沉淀,调整PH值5.90-8.90之间并定容至最终体积;

[0050] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0051] B)、试剂R2制备:

[0052] B1反应液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200-300rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入第二缓冲液,搅拌至物料完全溶解,清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值到5.50-6.50之间,并定容至最终体积;

[0053] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0054] B2保存液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200-300rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入甘氨酸、第二稳定剂和第二防腐剂,搅拌20-30分钟至物料完全溶解,调节pH值到6.00-8.00之间,继续搅拌5-10分钟至全部物料完全溶解,溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,定容至最终体积;

[0055] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放备用,进行标识;

[0056] B3胶乳微球抗体偶联物的制备:

[0057] 步骤一:将小胶乳微球用反应液稀释到0.05-2.0%的浓度,与链霉亲和素按1:2-1:5比例透析过夜结合;

[0058] 将脂联素多抗以反应液稀释到0.05-3.0g/L的浓度,与生物素按1:1-1:3比例透析过夜结合;

[0059] 将上述的胶乳-链霉亲和素和生物素-脂联素多抗按照0.5:1-4:1比例进行混合;

[0060] 将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以反应液溶解到0.005-0.3g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入牛血清白蛋白封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14000rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,超声重悬,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,超声重悬;

[0061] 步骤二:大胶乳微球用反应液稀释到0.05-2.0%的浓度,脂联素单抗以反应液稀释到0.05-3.0g/L的浓度,将两者按0.5:1-4:1比例混匀;

[0062] 将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以反应液溶解到0.005-0.3g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入牛血清白蛋白封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14000rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,超声重悬,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,超声重悬;

[0063] 步骤三:将步骤一中偶联成功的胶乳和步骤二中偶联成功的胶乳按2:1-5:1比例混合均匀,装入成品罐中,并定容至终浓度,进行标识为制备好的R2。

[0064] 下面结合附图及实施例对本发明作进一步描述:

[0065] 实施例一:

[0066] 一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒的制备方法,包括如下步骤:A)、试剂R1制备:

[0067] 在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200rpm,使搅

拌保持匀速状态,边搅拌边投入6.0g/L的三羟甲基氨基甲烷、5.0g/L的氯化钠、0.5g/L的酪蛋白、1ml/L的吐温20、60g/L的聚乙二醇6000和0.8ml/L的叠氮钠,搅拌至物料完全溶解、溶液清澈透明、配液罐底部无沉淀,调整PH值5.90并定容至最终体积;

[0068] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0069] B)、试剂R2制备:

[0070] B1反应液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入8.05g/L的MES (2-(N-吗啉) 乙磺酸一水合物,搅拌至物料完全溶解,清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值到5.50,并定容至最终体积;

[0071] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0072] B2保存液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入1.26g/L的甘氨酸、0.5g/L的酪蛋白和0.8ml/L的叠氮钠,搅拌20分钟至物料完全溶解,调节pH值到6.00之间,继续搅拌5分钟至全部物料完全溶解,溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,定容至最终体积;

[0073] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放备用,进行标识;

[0074] B3胶乳微球抗体偶联物的制备:

[0075] 步骤一:将12nm粒径的小胶乳微球用反应液稀释到0.05%的浓度,与浓度为5g/L的链霉亲和素按1:2比例透析过夜结合;

[0076] 将脂联素多抗以反应液稀释到0.05g/L的浓度,与浓度为5g/L的生物素按1:1比例透析过夜结合;

[0077] 将上述的胶乳-链霉亲和素和生物素-脂联素多抗按照1:1比例进行混合;

[0078] 将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以反应液溶解到0.005g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入牛血清白蛋白封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14000rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,超声重悬,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,超声重悬;

[0079] 步骤二:将粒径为270nm的大胶乳微球用反应液稀释到0.05%的浓度,脂联素单抗以反应液稀释到0.05g/L的浓度,将两者按1:1比例混匀;

[0080] 将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以反应液溶解到0.005g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入牛血清白蛋白封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14000rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,超声重悬,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,超声重悬;

[0081] 步骤三:将步骤一中偶联成功的胶乳和步骤二中偶联成功的胶乳按2:1比例混合均匀,装入成品罐中,并定容至终浓度,进行标识为制备好的R2。

[0082] 实施例二:

[0083] 一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒的制备方法,包括如下步骤:A)、试剂R1制备:

[0084] 在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至250rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入9.0g/L的三羟甲基氨基甲烷、16g/L的氯化钠、1.2g/L的甘露醇、3ml/L的曲拉通X-100、90g/L的聚乙二醇6000和1.4ml/L的Proclin-950,搅拌至物料完全溶解、溶液清澈透明、配液罐底部无沉淀,调整PH值7.4并定容至最终体积;

[0085] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0086] B)、试剂R2制备:

[0087] B1反应液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至250rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入18g/L的MES (2-(N-吗啉) 乙磺酸一水合物,搅拌至物料完全溶解,清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值到6,并定容至最终体积;

[0088] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0089] B2保存液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至250rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入5.26g/L的甘氨酸、1.2g/L的甘露醇和1.4ml/L的Proclin-950,搅拌25分钟至物料完全溶解,调节pH值到7.00之间,继续搅拌7分钟至全部物料完全溶解,溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,定容至最终体积;

[0090] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放备用,进行标识;

[0091] B3胶乳微球抗体偶联物的制备:

[0092] 步骤一:将47nm粒径的小胶乳微球用反应液稀释到1%的浓度,与浓度为12g/L的链霉亲和素按1:4比例透析过夜结合;

[0093] 将脂联素多抗以反应液稀释到2g/L的浓度,与浓度为12g/L的生物素按1:2比例透析过夜结合;

[0094] 将上述的胶乳-链霉亲和素和生物素-脂联素多抗按照2:1比例进行混合;

[0095] 将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以反应液溶解到1.5g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入牛血清白蛋白封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14000rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,超声重悬,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,超声重悬;

[0096] 步骤二:将粒径为450nm的大胶乳微球用反应液稀释到1%的浓度,脂联素单抗以反应液稀释到1.5g/L的浓度,将两者按2:1比例混匀;

[0097] 将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以反应液溶解到1.5g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入牛血清白蛋白封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14000rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,超声重悬,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,超声重悬;

[0098] 步骤三:将步骤一中偶联成功的胶乳和步骤二中偶联成功的胶乳按3:1比例混合均匀,装入成品罐中,并定容至终浓度,进行标识为制备好的R2。

[0099] 实施例三:

[0100] 一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒的制备方法,包括如下步骤:A)、试剂R1制备:

[0101] 在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至300rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入12.2g/L的三羟甲基氨基甲烷、27g/L的氯化钠、2g/L的牛血清白蛋白、5ml/L的聚乙烯吡咯烷酮、120g/L的聚乙二醇6000和2ml/L的Proclin-300,搅拌至物料完全溶解、溶液清澈透明、配液罐底部无沉淀,调整PH值8.9并定容至最终体积;

[0102] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0103] B)、试剂R2制备:

[0104] B1反应液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至300rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入27.3g/L的MES (2-(N-吗啉) 乙磺酸一水合物,搅拌至物料完全溶解,清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值到6.5,并定容至最终体积;

[0105] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0106] B2保存液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至250rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入9.83g/L的甘氨酸、2g/L的牛血清白蛋白和2ml/L的Proclin-300,搅拌30分钟至物料完全溶解,调节pH值到8.00之间,继续搅拌10分钟至全部物料完全溶解,溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,定容至最终体积;

[0107] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放备用,进行标识;

[0108] B3胶乳微球抗体偶联物的制备:

[0109] 步骤一:将85nm粒径的小胶乳微球用反应液稀释到2%的浓度,与浓度为20g/L的链霉亲和素按1:5比例透析过夜结合;

[0110] 将脂联素多抗以反应液稀释到3g/L的浓度,与浓度为20g/L的生物素按1:3比例透析过夜结合;

[0111] 将上述的胶乳-链霉亲和素和生物素-脂联素多抗按照4:1比例进行混合;

[0112] 将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以反应液溶解到3g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入牛血清白蛋白封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14000rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,超声重悬,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,超声重悬;

[0113] 步骤二:将粒径为630nm的大胶乳微球用反应液稀释到2%的浓度,脂联素单抗以反应液稀释到3g/L的浓度,将两者按4:1比例混匀;

[0114] 将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以反应液溶解到3g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入牛血清白蛋白封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14000rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,超声重悬,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,超声重悬;

[0115] 步骤三:将步骤一中偶联成功的胶乳和步骤二中偶联成功的胶乳按5:1比例混合均匀,装入成品罐中,并定容至终浓度,进行标识为制备好的R2。

[0116] 实施例四:

[0117] 胶乳微球间接偶联脂联素抗体,使用标准品进行定标,结果如表1和图1所示。

[0118] 表1:胶乳微球间接偶联 $\alpha 2$ -巨球蛋白抗体定标结果

[0119]	校准品浓度	d0D		均值
	(mg/L)			
[0120]	0.00	-9	-11	-10
	2.00	4586	4515	4551
	4.00	8739	8496	8618
	8.00	17226	17225	17226
	16.00	27634	29060	28347
	32.00	42359	40389	41374

[0121] 线性范围限定:

[0122] 选取待测样本用生理盐水进行稀释,产生接近于方法线性范围低限浓度水平的样本,一般为5个浓度水平,分别为:1.69mg/L、1.30mg/L、1.00mg/L、0.77mg/L和0.59mg/L。每个浓度水平样本重复测定10次。以 $CV \leq 8\%$ 为可接受界值,由数据中选取CV值等于或小于可接受界值的最低浓度水平做为检测范围低限,结果如表2所示。

[0123] 表2:

[0124]	理论浓度 (mg/L)	0.59	0.77	1.00	1.30	1.69
	1	0.53	0.68	1.05	1.30	1.67
	2	0.66	0.79	1.10	1.33	1.64
	3	0.61	0.73	0.94	1.32	1.71
	4	0.53	0.75	0.95	1.28	1.72
	5	0.62	0.88	0.90	1.39	1.71

[0125]

6	0.64	0.69	1.03	1.22	1.69
7	0.71	0.68	1.06	1.39	1.73
8	0.49	0.70	1.01	1.34	1.66
9	0.61	0.76	1.02	1.26	1.74
10	0.69	0.83	1.01	1.30	1.77
均值	0.61	0.75	1.01	1.31	1.70
SD	0.072	0.068	0.061	0.054	0.039
CV%	11.88%	9.04%	6.03%	4.08%	2.32%

[0126] 当样本浓度低于0.77mg/L时, $CV > 8\%$ 。当样本浓度高于1.00mg/L时, $CV < 8\%$ 。故线性范围低限定为1.00mg/L。

[0127] 选取待测样本添加脂联素标准品, 产生接近于方法线性范围高限浓度水平的样本, 一般为4个浓度水平, 分别为: 22.22mg/L、26.67mg/L、32.00mg/L、38.40mg/L和46.08mg/L。每个浓度水平样本重复测定10次。以 $CV \leq 8\%$ 为可接受界值, 由数据中选取CV值等于或小于可接受界值的最高浓度水平做为检测范围高限, 结果如表3所示。

[0128] 表3:

[0129]

理论浓度 (mg/L)	22.22	26.67	32.00	38.40	46.08
1	22.53	25.88	32.33	39.49	45.00
2	21.80	27.22	33.89	37.33	42.35

[0130]

3	22.34	26.17	32.16	37.72	49.00
4	22.52	25.78	32.82	32.98	55.16
5	22.50	26.66	30.56	42.03	48.35
6	22.55	25.77	31.88	33.45	53.09
7	22.65	27.66	29.79	41.96	44.25
8	22.72	27.70	33.44	36.66	50.45
9	22.76	27.36	33.02	35.97	39.78
10	22.35	27.72	34.02	43.56	40.20
均值	22.47	26.79	32.39	38.12	46.76
SD	0.273	0.833	1.375	3.610	5.296
CV%	1.22%	3.11%	4.25%	9.47%	11.32%

[0131] 当样本浓度高于38.40mg/L时, $CV > 8\%$ 。当样本浓度低于32.00mg/L时, $CV < 8\%$ 。故线性范围高限定为32.00mg/L。

[0132] 综上所述, 该发明的线性范围可做到1.00-32.00mg/L。

[0133] 实施例五:

[0134] 精密度CV检测:

[0135] 胶乳微球间接偶联脂联素抗体, 对样本重复检测10次, 检测结果如表4所示

[0136]

1	1.50	4.83	16.20
2	1.47	4.93	16.41
3	1.46	4.99	16.42

[0137]

4	1.42	5.06	16.50
5	1.53	5.05	16.25
6	1.55	5.04	16.83
7	1.45	4.70	16.56
8	1.43	5.04	16.49
9	1.46	4.98	16.36
10	1.42	4.74	16.49
均值	1.47	4.94	16.45
SD	0.045	0.133	0.175
CV	3.05%	2.70%	1.06%

[0138] 精密度CV较小,5%以内。

[0139] 综上所述:与现有技术相比,本发明所达到的技术效果是:经多次研发实验后,我司采用大小胶乳微球方案:大胶乳联脂联素单抗增加低端灵敏度;小胶乳连接链霉亲和素按比例混合,脂联素多抗连接生物素按比例混合,二者再按比例混合反应,可提高线性范围;将两种胶乳按照比例混合,可改善重复性和灵敏度线性范围可做到1.00-32.00mg/L。

[0140] 上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点,其目的在于让熟悉此项技术的人士能够了解本发明的内容并据以实施,并不能以此限制本发明的保护范围。凡根据本发明精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

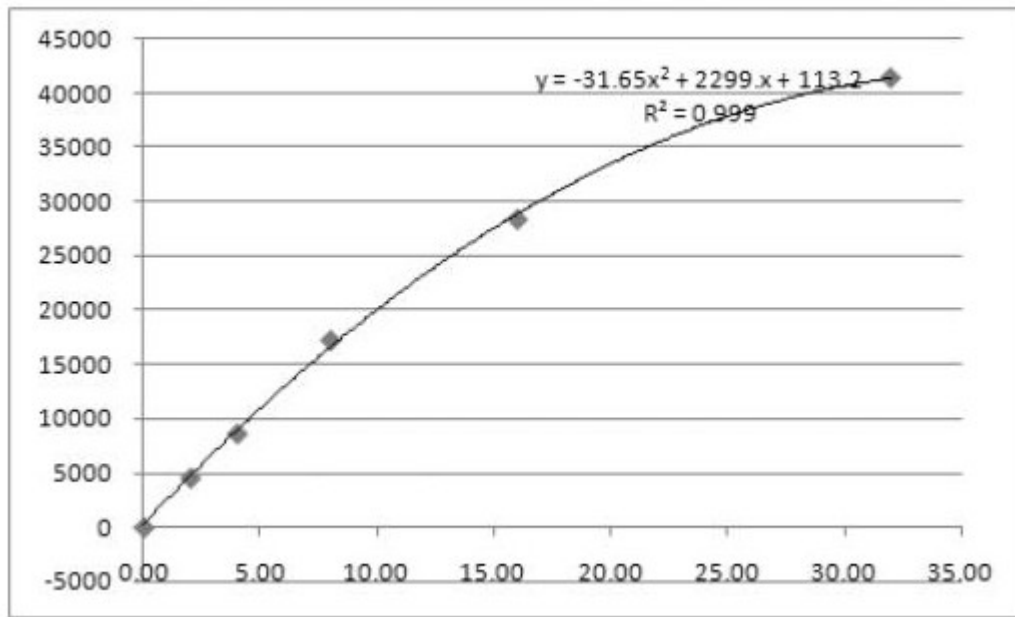


图1

专利名称(译)	一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN110568182A	公开(公告)日	2019-12-13
申请号	CN201910868121.0	申请日	2019-09-12
[标]发明人	袁嘉扬		
发明人	袁嘉扬 单以朗		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物技术领域，涉及一种脂联素-胶乳增强免疫比浊试剂盒的制备方法，公开了试剂R2由反应液、保存液以及胶乳微球抗体偶联物组成，其反应液由第二缓冲液构成，胶乳微球抗体偶联物由小胶乳微球、大胶乳微球、生物素、链霉亲和素、脂联素单抗、脂联素多抗以及1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成。优点是：经多次研发实验后，我司采用大小胶乳微球方案：大胶乳联脂联素单抗增加低端灵敏度；小胶乳连接链霉亲和素按比例混合，脂联素多抗连接生物素按比例混合，二者再按比例混合反应，可提高线性范围；将两种胶乳按照比例混合，可改善重复性和灵敏度线性范围可做到1.00-32.00mg/L。

