



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103344635 A

(43) 申请公布日 2013. 10. 09

(21) 申请号 201310301643. 5

(22) 申请日 2013. 07. 18

(71) 申请人 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司
地址 300300 天津市东丽区开发区四纬路
10 号

(72) 发明人 刘萍 栾大伟 李克锦

(74) 专利代理机构 天津滨海科纬知识产权代理
有限公司 12211

代理人 韩敏

(51) Int. Cl.

G01N 21/76(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

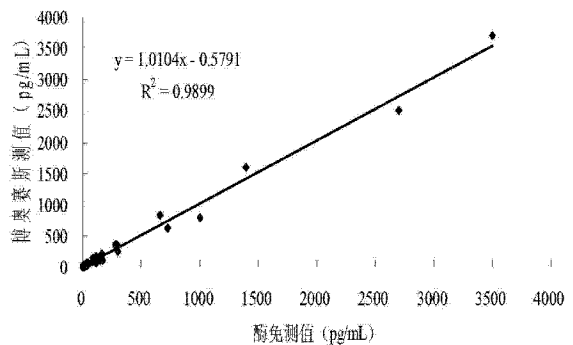
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种克拉拉细胞蛋白纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种克拉拉细胞蛋白(CC16)纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,所述试剂盒包括:克拉拉细胞蛋白校准品;偶联有链霉亲和素的纳米磁微粒悬浮液;生物素标记的克拉拉细胞蛋白抗体;克拉拉细胞蛋白抗体酶结合物,所用的酶为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶纯度 RZ ≥ 3. 0,活性 ≥ 250U/mL;克拉拉细胞蛋白质控品;化学发光液 A 液和 B 液;20 倍浓缩洗液;反应管。另外本发明还公开了本发明试剂盒的制备方法。本发明试剂盒与现有试剂盒相比灵敏度高、可测定浓度范围宽、试剂有效期长、试剂成本低、操作简单、检测自动化程度高等优点。



1. 一种克拉拉细胞蛋白纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:

- 1) 克拉拉细胞蛋白校准品,浓度为 0, 20, 50, 200, 800, 4000pg/mL;
- 2) 偶联有链霉亲和素的纳米磁微粒悬浮液;
- 3) 生物素标记的克拉拉细胞蛋白抗体,所述抗体为单克隆抗体;

4) 克拉拉细胞蛋白抗体酶结合物,所述抗体为单克隆抗体,与生物素标记的克拉拉细胞蛋白抗体不为同一株,所用的酶为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶纯度 $RZ \geq 3.0$,活性 $\geq 250U/mL$;

5) 克拉拉细胞蛋白质控品:质控品包括浓度 35pg/mL 的低值质控品和 2000pg/mL 的高值质控品;

6) 化学发光液 A 液和 B 液:A 液为 5mmol/L, pH8.6 的 Tris-HCl 缓冲液,且该缓冲液中含有终浓度 0.7g/L 鲁米诺和终浓度 0.165g/L 对碘酚;B 液为 0.675g/L 过氧化脲;

- 7) 20 倍浓缩洗液;
- 8) 反应管。

2. 根据权利要求 1 所述的克拉拉细胞蛋白纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于,所述的纳米磁微粒是表面包裹带有氨基或羧基活性基团的四氧化三铁,粒径 10-50nm。

3. 根据权利要求 1 所述的克拉拉细胞蛋白纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于,所述的反应管的材料是透明聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯或玻璃。

4. 一种制备所述权利要求 1-3 任一权利要求所述的试剂盒的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 克拉拉细胞蛋白校准品的配制:

将克拉拉细胞蛋白纯品用校准品稀释液稀释成校准品浓储液,所述校准品稀释液是含 50% 牛血清的缓冲液,将浓储液用校准品稀释液稀释至工作浓度,分别为 0, 20, 50, 200, 800, 4000pg/mL;

(2) 克拉拉细胞蛋白质控品的配制:

用校准品稀释液将克拉拉细胞蛋白纯品稀释配制成浓储液,将浓储液用校准品稀释液稀释至 35pg/mL 和 2000pg/mL;

(3) 纳米磁微粒-链霉亲和素悬浮液的制备:

A、四氧化三铁纳米磁微粒制备

采用沉淀法制备四氧化三铁纳米磁微粒,具体制备方法如下:1) 将 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 和 $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 以摩尔比 2:1 加入到蒸馏水中,剧烈搅拌溶解;2) 在氮气氛下加 0.5M 氨水于上述铁盐溶液中,调 pH9-10,反应温度 $65^\circ C$,反应时间 45min;3) 反应结束后,用蒸馏水洗涤至中性,弃上清,于 $60^\circ C$ 烘干,即得 10-50nm 的四氧化三铁纳米磁微粒;

B、纳米磁珠表面羧基的偶联

采用分散聚合法进行偶联,具体制备方法如下:取上述制备的纳米磁微粒超声分散在 10%PEG8000 溶液中,得磁流体溶液,向磁流体溶液中按体积比 1:10 加入无水乙醇,搅拌 30min 后,移入带有搅拌器,冷凝管,氮气入口的三颈瓶中,加入交联剂 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺;在氮气的保护下,升温至 $60 \pm 1^\circ C$,恒温搅拌 30min,之后依次加入磁流体体积 3% 的过

氧化苯甲酰,搅拌速度约为 500rpm,磁流体溶液相同体积的苯乙烯,磁流体溶液体积 25% 的丙烯酸,保持氮气气流,其余条件保持不变,反应 8-10h,所得产物静置,用蒸馏水反复洗涤,再用盐酸调节 pH=1,浸泡 24h,静置;再用蒸馏水反复洗涤,除去未包覆的 Fe_3O_4 磁粉,把沉淀下来的产品放入真空干燥箱中 50°C 下干燥 24h,得到表面联有羧基的纳米磁微粒;

C、纳米磁微粒-链霉亲和素悬浮液的制备,配制 1L,方法如下:

取 100mL 0.1M MES 缓冲液,加入 15mg 表面联有羧基的纳米磁微粒,室温搅拌 40min,之后加入 7.5mg 链霉亲和素,然后加入 5mg/mL EDC 溶液, $2-8^\circ\text{C}$ 反应 1h 后,用 0.01M PBS 缓冲液洗涤 3 次,最后用 0.01M PBS 定溶至 1L 即可;

(4) 生物素标记的克拉拉细胞蛋白抗体的制备

取 0.7mg 克拉拉细胞蛋白抗体,用硼酸盐缓冲液在 $2-8^\circ\text{C}$ 下透析 1~3h;将透析后的抗体加入 50ug 生物素,同时加入二甲基亚砜,使二甲基亚砜最终质量浓度大于 5%,缓慢振荡,避光反应 2.5h;在上述溶液中加入 250uL 1M 氯化铵溶液,常温避光反应 60min;用 0.01M PBS 溶液在 $2-8^\circ\text{C}$ 下透析 24h,期间换液 3-4 次;

(5) 克拉拉细胞蛋白抗体酶结合物的制备

采用改良高碘酸钠氧化法将克拉拉细胞蛋白抗体与辣根过氧化物酶进行偶联后,用酶稀释液将其稀释至工作浓度 1:5000-6000,并加入 10% 酶稳定剂,储存于 $2-8^\circ\text{C}$;

(6) 20 倍浓缩洗液的配制

20 倍浓缩洗液包括 58g/L 磷酸氢二钠,5.92g/L 磷酸二氢钠,180g/L NaCl,10mL/L Tween-20 和 2% Proclin300;

(7) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

A 液为 0.7g/L 鲁米诺,0.165g/L 对碘酚,缓冲液为 pH8.6 的 5mmol/L Tris-HCl,避光保存;B 液为 0.675g/L 过氧化脲,用工艺用水配制;A 液和 B 液在使用前 5min 混合;

(8) 组装:将上述试剂组装成盒,储存于 $2-8^\circ\text{C}$,每种试剂各一瓶;

(9) 对采用该方法制备的试剂盒进行物理检查,对准确度、剂量-反应曲线的线性、精密度、特异性、灵敏度、质控品的测定值和稳定性进行测定。

一种克拉拉细胞蛋白纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫分析医学领域,具体的,本发明提供了一种克拉拉细胞蛋白(CC16)纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 矽肺是因在生产过程中长期吸入大量游离二氧化硅引起的以肺间质胶原沉积为特征的肺组织纤维化为主的疾病,是影响范围最广泛的职业病之一,也是对工人健康危害最为严重的一种职业病。近年来矽肺病的流行呈现出群发性、低龄化及致残率高的特点,这给矽肺的防治工作带来了新的挑战。目前对矽肺的纤维化病变尚无特效药物治疗,因此,对矽肺易感人群的早期筛选、早期诊断,探索矽肺发病的早期效应生物标志物至关重要。

[0003] 肺特异性的克拉拉细胞蛋白(clara cell protein, CC16)是由克拉拉细胞分泌,有抑制免疫、抗炎、抗纤维化、清除沉积在呼吸道中的有害物质及抑止肺表面活性物质降解等作用,参与肺内一系列生理、病理过程,其血清含量可反映呼吸道损伤及肺血屏障完整性早期改变。

[0004] 目前,临床领域应用的CC16检测方法主要是酶联免疫测定法。酶联免疫测定法具备操作简单、试剂无污染、高于胶体金的敏感性、结果可用仪器测定等特点得以推广,但敏感性相对较低,板间差异大,测值重复性较差,所用标记酶与底物可定量测定范围窄,及仪器测定范围窄等缺点。

发明内容

[0005] 本发明要解决的问题是提供克拉拉细胞蛋白的纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法,避免了测值重复性差,酶联免疫法灵敏度低,检测范围窄等缺陷。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:克拉拉细胞蛋白(CC16)纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,包括:克拉拉细胞蛋白校准品;偶联有链霉亲和素的纳米磁微粒悬浮液;生物素标记的克拉拉细胞蛋白抗体;克拉拉细胞蛋白抗体酶结合物,所用的酶为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶纯度 $RZ \geq 3.0$,活性 $\geq 250U/mL$;克拉拉细胞蛋白质控品,质控品包括浓度 $35pg/mL$ 的低值质控品和 $2000pg/mL$ 的高值质控品;化学发光液A液和B液,A液为 $5mmol/L$, $pH8.6$ 的Tris-HCl缓冲液,且该缓冲液中含有终浓度 $0.7g/L$ 鲁米诺和终浓度 $0.165g/L$ 对碘酚;B液为 $0.675g/L$ 过氧化脲;20倍浓缩洗液;反应管。

[0007] 进一步,所述的纳米磁微粒是表面包裹带有氨基或羧基活性基团的四氧化三铁,粒径 $10-50nm$ 。

[0008] 进一步,所述的反应管的材料是透明聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯或玻璃。

[0009] 试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0010] (1)克拉拉细胞蛋白校准品的配制:

[0011] 将克拉拉细胞蛋白纯品用校准品稀释液稀释成校准品浓储液,所述校准品稀释

液是含 50% 牛血清的缓冲液,将浓储液用校准品稀释液稀释至工作浓度,分别为 0, 20, 50, 200, 800, 4000pg/mL ;

[0012] (2) 克拉拉细胞蛋白质控品的配制 :

[0013] 用校准品稀释液将克拉拉细胞蛋白纯品稀释配制成浓储液,将浓储液用校准品稀释液稀释至 35pg/mL 和 2000pg/mL ;

[0014] (3) 纳米磁微粒 - 链霉亲和素悬浮液的制备 :

[0015] A、四氧化三铁纳米磁微粒制备

[0016] 采用沉淀法制备四氧化三铁纳米磁微粒,具体制备方法如下 :1) 将 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 以摩尔比 2 : 1 加入到蒸馏水中,剧烈搅拌溶解 ;2) 在氮气氛下加 0.5M 氨水于上述铁盐溶液中,调 pH9-10,反应温度 65°C,反应时间 45min ;3) 反应结束后,用蒸馏水洗涤至中性,弃上清,于 60°C 烘干,即得 10-50nm 的四氧化三铁纳米磁微粒 ;

[0017] B、纳米磁珠表面羧基的偶联

[0018] 采用分散聚合法进行偶联,具体制备方法如下 :取上述制备的纳米磁微粒超声分散在 10%PEG8000 溶液中,得磁流体溶液,向磁流体溶液中按体积比 1 : 10 加入无水乙醇,搅拌 30min 后,移入带有搅拌器,冷凝管,氮气入口的三颈瓶中,加入交联剂 N, N' - 亚甲基双丙烯酰胺 ;在氮气的保护下,升温至 $60 \pm 1^\circ\text{C}$,恒温搅拌 30min,之后依次加入磁流体体积 3% 的过氧化苯甲酰,搅拌速度约为 500rpm,磁流体溶液相同体积的苯乙烯,磁流体溶液体积 25% 的丙烯酸,保持氮气气流,其余条件保持不变,反应 8-10h,所得产物静置,用蒸馏水反复洗涤,再用盐酸调节 pH=1,浸泡 24h,静置 ;再用蒸馏水反复洗涤,除去未包覆的 Fe_3O_4 磁粉,把沉淀下来的产品放入真空干燥箱中 50°C 下干燥 24h,得到表面联有羧基的纳米磁微粒 ;

[0019] C、纳米磁微粒 - 链霉亲和素悬浮液的制备,配制 1L,方法如下 :

[0020] 取 100mL0.1M MES 缓冲液,加入 15mg 表面联有羧基的纳米磁微粒,室温搅拌 40min,之后加入 7.5mg 链霉亲和素,然后加入 5mg/mL EDC 溶液,2-8°C 反应 1h 后,用 0.01M PBS 缓冲液洗涤 3 次,最后用 0.01M PBS 定溶至 1L 即可 ;

[0021] (4) 生物素标记的克拉拉细胞蛋白抗体的制备

[0022] A、克拉拉细胞蛋白抗体的制备

[0023] 按照常规免疫方法制备克拉拉细胞蛋白抗体。

[0024] B、生物素标记的克拉拉细胞蛋白抗体的制备

[0025] 取 0.7mg 克拉拉细胞蛋白抗体,用硼酸盐缓冲液在 2 ~ 8°C 下透析 1 ~ 3h ;将透析后的抗体加入 50ug 生物素,同时加入二甲基亚砜,使二甲基亚砜最终质量浓度大于 5%,缓慢振荡,避光反应 2.5h ;在上述溶液中加入 250uL1M 氯化铵溶液,常温避光反应 60min ;用 0.01M PBS 溶液在 2 ~ 8°C 下透析 24h,期间换液 3-4 次 ;

[0026] (5) 克拉拉细胞蛋白抗体酶结合物的制备

[0027] 采用改良高碘酸钠氧化法将克拉拉细胞蛋白抗体与辣根过氧化物酶进行偶联后,用酶稀释液将其稀释至工作浓度 1 : 5000-6000,并加入 10% 酶稳定剂,储存于 2 ~ 8°C ;

[0028] (6) 20 倍浓缩洗液的配制

[0029] 20 倍浓缩洗液包括 58g/L 磷酸氢二钠,5.92g/L 磷酸二氢钠,180g/L NaCl,10mL/L Tween-20 和 2%Proclin300 ;

[0030] (7) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

[0031] A液为0.7g/L鲁米诺,0.165g/L对碘酚,缓冲液为pH8.6的5mmol/L Tris-HCl,避光保存;B液为0.675g/L过氧化脲,用工艺用水配制;A液和B液在使用前5min混合;

[0032] (8) 组装:将上述试剂组装成盒,储存于2~8℃,每种试剂各一瓶;

[0033] (9) 对采用该方法制备的试剂盒进行物理检查,对准确度、剂量-反应曲线的线性、精密度、特异性、灵敏度、质控品的测定值和稳定性进行测定。

[0034] 本发明的原理是,采用双抗体夹心法测定血清或血浆中的CC16,在亲和素-纳米磁微粒悬浮液中加入生物素-CC16抗体结合物,通过亲和素和生物素的亲和反应,形成磁微粒-亲和素-生物素-CC16抗体复合物,加入样本和酶,通过抗原抗体反应,形成磁微粒-亲和素-生物素-CC16抗体-CC16抗原-CC16抗体-HRP复合物,用磁场将复合物吸附在试管底部,清洗掉游离的成分,加入底物工作液,在氧化剂作用下,HRP催化鲁米诺生成处于激发态的氨基邻苯二甲酸离子,其恢复到基态时,释放出425nm的光子,于第5分钟测定各加样孔的发光值RLU。样本的RLU与样本CC16浓度呈正相关。样本中的CC16浓度依据由校准品CC16浓度和对应的RLU建立的Log(X)-Log(Y)数学模型进行定量,从而检测人血清、血浆中的CC16含量。

[0035] 本专利发明的克拉拉细胞蛋白纳米磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒,具有以下优点:

[0036] (1) 灵敏度高,本试剂盒的分析灵敏度不高于5.0pg/mL。

[0037] (2) 精密性良好,批内不精密度不高于5%,批间不精密度不高于10%。

[0038] (3) 成本低,与市场上同类产品比较,本试剂盒性能良好,成本低,具有临床应用价值。

[0039] (4) 稳定性良好,本产品可在37℃可存放7天以上,在2~8℃可存放1年。

附图说明

[0040] 图1是本发明的试剂盒测定克拉拉细胞蛋白与酶联免疫法测定克拉拉细胞蛋白的测定结果比较图,其中纵坐标为本试剂盒测得的克拉拉细胞蛋白值,横坐标为酶联免疫试剂盒测定克拉拉细胞蛋白值,两种方法相关系数 $r=0.9899$,直线方程 $y=1.0104x-0.5791$ 。

[0041] 图2是克拉拉细胞蛋白抗体的制备工艺

具体实施方式

[0042] 实施例1:制备克拉拉细胞蛋白纳米磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒

[0043] (1) 克拉拉细胞蛋白校准品的配制:

[0044] 将克拉拉细胞蛋白纯品(购自US BIO公司)用校准品稀释液稀释成校准品浓储液,所述校准品稀释液是含50%牛血清的缓冲液,将浓储液用校准品稀释液稀释至工作浓度,分别为0,20,50,200,800,4000pg/mL;

[0045] (2) 克拉拉细胞蛋白质控品的配制:

[0046] 用校准品稀释液将克拉拉细胞蛋白纯品稀释配制成浓储液,将浓储液用校准品稀释液稀释至35pg/mL和2000pg/mL;

[0047] (3) 纳米磁微粒-链霉亲和素悬浮液的制备:

[0048] A、四氧化三铁纳米磁微粒制备

[0049] 采用沉淀法制备四氧化三铁纳米磁微粒,具体制备方法如下:1)将 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 以摩尔比2:1加入到蒸馏水中,剧烈搅拌溶解;2)在氮气氛下加0.5M氨水于上述铁盐溶液中,调pH9-10,反应温度 65°C ,反应时间45min;3)反应结束后,用蒸馏水洗涤至中性,弃上清,于 60°C 烘干,即得10-50nm的四氧化三铁纳米磁微粒;

[0050] B、纳米磁珠表面羧基的偶联

[0051] 采用分散聚合法进行偶联,具体制备方法如下:取上述制备的纳米磁微粒超声分散在10%PEG8000溶液中,得磁流体溶液,向磁流体溶液中按体积比1:10加入无水乙醇,搅拌30min后,移入带有搅拌器,冷凝管,氮气入口的三颈瓶中,加入交联剂N,N'-亚甲基双丙烯酰胺;在氮气的保护下,升温至 $60 \pm 1^\circ\text{C}$,恒温搅拌30min,之后依次加入磁流体体积3%的过氧化苯甲酰,搅拌速度约为500rpm,磁流体溶液相同体积的苯乙烯,磁流体溶液体积25%的丙烯酸,保持氮气气流,其余条件保持不变,反应8-10h,所得产物静置,用蒸馏水反复洗涤,再用盐酸调节pH=1,浸泡24h,静置;再用蒸馏水反复洗涤,除去未包覆的 Fe_3O_4 磁粉,把沉淀下来的产品放入真空干燥箱中 50°C 下干燥24h,得到表面联有羧基的纳米磁微粒;

[0052] C、纳米磁微粒-链霉亲和素悬浮液的制备,配制1L,方法如下:

[0053] 取100mL0.1M MES缓冲液,加入15mg表面联有羧基的纳米磁微粒,室温搅拌40min,之后加入7.5mg链霉亲和素,然后加入5mg/mL EDC溶液, $2-8^\circ\text{C}$ 反应1h后,用0.01M PBS缓冲液洗涤3次,最后用0.01M PBS定溶至1L即可;

[0054] (4)生物素标记的克拉拉细胞蛋白抗体的制备

[0055] A、克拉拉细胞蛋白抗体的制备

[0056] 按照如图2所示的工艺流程制备克拉拉细胞蛋白抗体。

[0057] B、生物素标记的克拉拉细胞蛋白抗体的制备

[0058] 取0.7mg克拉拉细胞蛋白抗体,制备方法见说明书附图2,用硼酸盐缓冲液在 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 下透析1~3h;将透析后的抗体加入50ug生物素,同时加入二甲基亚砜,使二甲基亚砜最终质量浓度大于5%,缓慢振荡,避光反应2.5h;在上述溶液中加入250uL1M氯化铵溶液,常温避光反应60min;用0.01M PBS溶液在 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 下透析24h,期间换液3-4次;

[0059] (5)克拉拉细胞蛋白抗体酶结合物的制备

[0060] 采用改良高碘酸钠氧化法将克拉拉细胞蛋白抗体与辣根过氧化物酶进行偶联后,用酶稀释液将其稀释至工作浓度1:5000-6000,并加入10%酶稳定剂,储存于 $2 \sim 8^\circ\text{C}$;

[0061] 改良过碘酸钠氧化法步骤包括:

[0062] A:HRP活化

[0063] 1)配置10mg/mL HRP溶液;

[0064] 2)配置12.8mg/mL过碘酸钠 NaIO_4 溶液;

[0065] 3)将上述1和2配制溶液按体积比1:1混匀, 4°C 避光反应30min;

[0066] 4)配置浓度为20uL/mL的乙二醇水溶液,与上述溶液3以相同体积混合,常温避光反应20min,活化即完成,放 -20°C 保存(保存时间不超过3个月)。

[0067] B、CC16单克隆抗体HRP标记

[0068] 1)将待标记原料装入透析袋中,用0.05M pH9.6的碳酸盐缓冲液,透析30min;

[0069] 2)将标记原料与活化的HRP按质量比1:2进行混合,之后用0.05M碳酸盐缓冲液于 4°C 透析24h(期间换液2-3次);

[0070] 3) 配置浓度为 2mg/mL 的 NaBH_4 水溶液, 按 1mgHRP 加 80 μL 配制好的 NaBH_4 水溶液的比例进行混合, 并于 4 $^\circ\text{C}$ 避光反应 2h;

[0071] 4) 将上述步骤 3 完成的标记液用 0.01M PBS 于 4 $^\circ\text{C}$ 透析 24h, 加入等体积甘油, -20 $^\circ\text{C}$ 保存。

[0072] 酶稀释液中包括 10mL/L 2M NaOH, 15g/L NaCl, 10g/L BSA, 5g/L Dextran T-2000(购自 Sigma 公司), 1.05g/L Triton X-100 (购自 Sigma 公司), 2.5mL/L 硫酸庆大霉素, 1mL/L 胭脂红(胭脂红为粉末固体, 配制成浓度 40mg/mL 以后使用), 2g/L Tween-20(购自 Sigma 公司), 1mL/L ProClin300 (购自 Sigma 公司);

[0073] (6) 20 倍浓缩洗液的配制

[0074] 20 倍浓缩洗液包括 58g/L 磷酸氢二钠, 5.92g/L 磷酸二氢钠, 180g/L NaCl, 10mL/L Tween-20 和 2%Proclin300;

[0075] (7) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

[0076] A 液为 0.7g/L 鲁米诺, 0.165g/L 对碘酚, 缓冲液为 pH8.6 的 5mmol/L Tris-HCl, 避光保存; B 液为 0.675g/L 过氧化脲, 用工艺用水配制; A 液和 B 液在使用前 5min 混合;

[0077] (8) 组装: 将上述试剂组装成盒, 储存于 2 ~ 8 $^\circ\text{C}$, 每种试剂各一瓶;

[0078] (9) 对采用该方法制备的试剂盒进行物理检查, 对准确度、剂量 - 反应曲线的线性、精密度、特异性、灵敏度、质控品的测定值和稳定性进行测定。

[0079] 实施例 2: 本发明试剂盒的检查

[0080] (1) 物理检查: 液体组分应澄清, 无沉淀或絮状物; 其他组分应无包装破损。

[0081] (2) 剂量 - 反应曲线的线性: 用双对数数学模型拟合, 剂量 - 反应曲线在 0-2500pg/mL 浓度范围内相关系数 r 绝对值不低于 0.9900。

[0082] (3) 分析灵敏度: 试剂盒分析灵敏度不高于 5.0pg/mL。

[0083] (4) 精密度: 10 孔平行测定高值和低值质控品, 计算测定结果的平均浓度(\bar{X})与标准差(SD), 批内不精密度($\text{CV}\%$) = $\text{SD} / \bar{X} \times 100\%$; 使用 3 批产品进行 3 次试验, 计算测定结果的平均浓度(\bar{X})与标准差(SD), 批间不精密度($\text{CV}\%$) = $\text{SD} / \bar{X} \times 100\%$, 结果应符合批内不精密度($\text{CV}\%$) 应不高于 5%; 批间不精密度($\text{CV}\%$) 应不高于 10%。

[0084] (5) 质控品的测定值: 平行测定 10 孔高值和低值的质控品, 用 $\text{Log}(X) - \text{Log}(Y)$ 数学模型拟合, 质控品测值应在允许范围内, 低值质控品测值在 35pg/mL, 高值质控品测值在 2000pg/mL。

[0085] (6) 稳定性: 37 $^\circ\text{C}$ 放置 7 天, 测定值应符合上述各项要求。

[0086] 实施例 3: 本发明试剂盒的使用方法

[0087] (1) 将待检试剂盒在室温(18 ~ 25 $^\circ\text{C}$)下平衡 30 分钟。

[0088] (2) 配制洗液: 用蒸馏水将浓缩洗液按 1:20 稀释(1mL 洗液加 19mL 蒸馏水)。若浓缩洗液有结晶, 可将浓缩洗液置于室温或 37 $^\circ\text{C}$, 待结晶溶解后再进行稀释。

[0089] (3) 配制发光液: 使用前 5 分钟取适量发光液 A 与发光液 B 等体积混合。

[0090] (4) 将反应管编号, 向试管中依次加入 50 μL 校准品或血清标本、50 μL 磁性颗粒 - 链霉素亲和素悬浮液、50 μL 生物素 - 克拉拉细胞蛋白抗体结合物、100 μL 克拉拉细胞蛋白抗体酶结合物, 37 $^\circ\text{C}$ 下振荡反应 30min, 将试管架置于磁分离器上分离 5min, 然后倒出上清液, 加

入 500uL 洗液,充分混匀后,于磁分离器上分离,倒出洗液,重复 3 次,在各管中加入化学发光底物液 100uL,充分混匀,暗置 5min,在管式化学发光仪上测定各管的发光值(RLU),以校准品浓度的 Log 值为横坐标,以发光值的 Log 为纵坐标,绘制标准曲线,根据血清标本的发光值即可计算出克拉拉细胞蛋白的浓度。

[0091] 实施例 4:本试剂盒的方法学评价结果

[0092] 检测范围:范围为 20-4000pg/mL,对于浓度大于 4000pg/mL 的标本应先进行稀释后再进行测定。

[0093] 灵敏度:5.0pg/mL。

[0094] 精密度:小于 5%。

[0095] 准确性:回收率的平均值在 0.90 ~ 1.10 范围内。

[0096] 质控品测值:低值质控品 QcL 和高值质控品 QcH 的测值均在允许范围内,低值质控品测值在 28-42pg/mL,高值质控品测值在 1600-2400pg/mL。

[0097] 稳定性:将试剂盒中各试剂组分子于 37°C 下放置 7d,稳定性良好。

[0098] 实施例 5:本试剂盒的临床对比实验

[0099] 本专利发明的试剂盒已进行了临床考核,本次临床试验的样本总数 230 例,先以克拉拉细胞蛋白酶免检测试剂盒测试后,再用本专利发明的试剂盒(化学发光)进行测定,结果表明,直线方程为 $y=1.0104x-0.5791$,相关系数 $r=0.9899$ 。可见本方法制备的试剂盒与酶免测值有较好的一致性。以 SPSS13.0 统计分析软件对相关系数进行 t 检验(检验水准 $\alpha=0.05$), $P<0.001$,两种方法测定的克拉拉细胞蛋白值的相关密切程度是显著性的,可见两种方法测定的克拉拉细胞蛋白值密切相关,说明试剂盒的诊断能力较强,可推广临床应用。

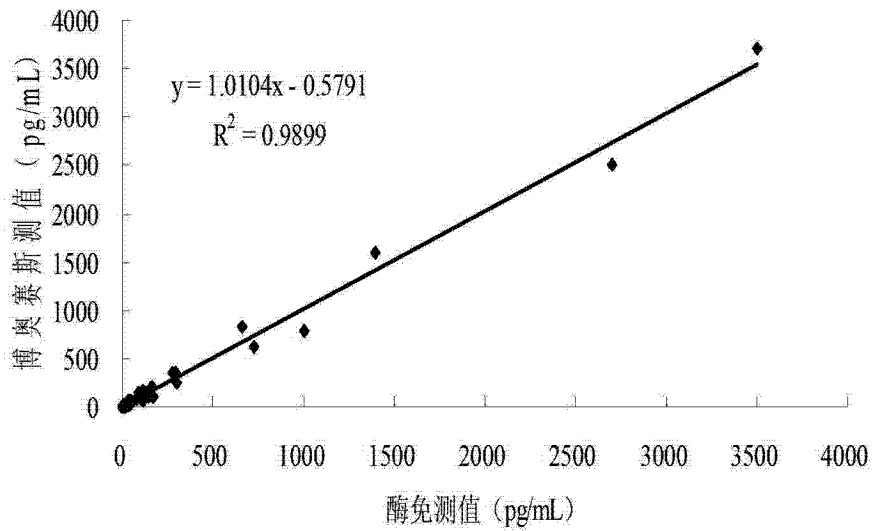


图 1

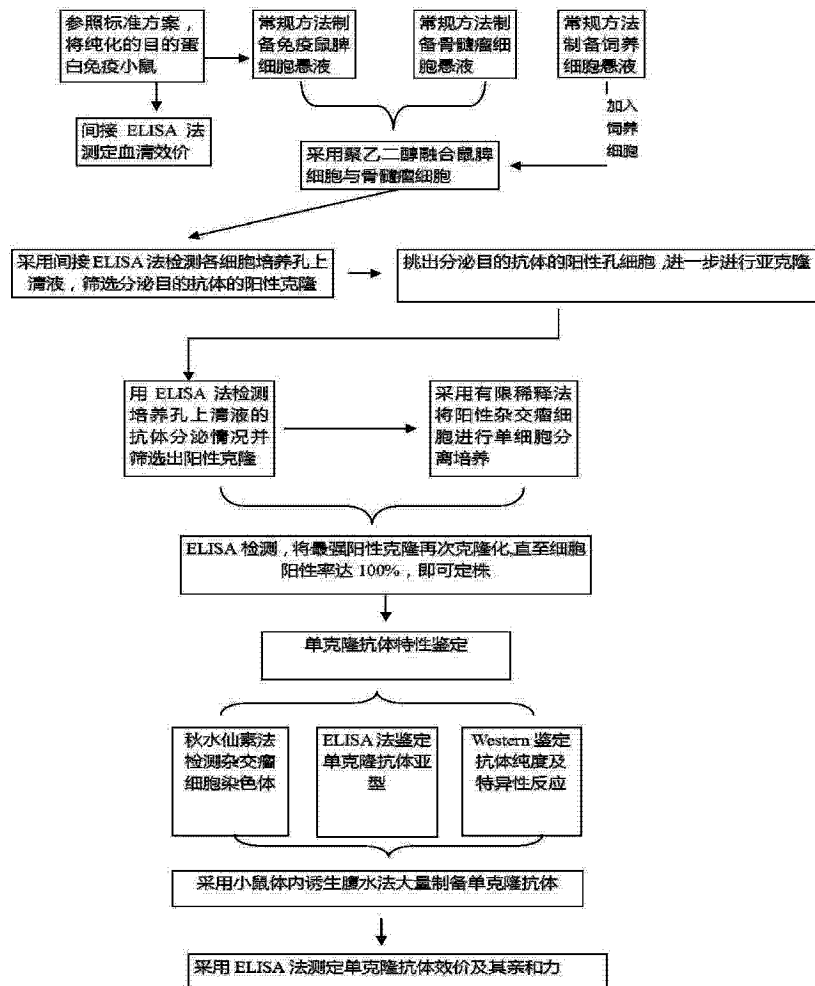


图 2

专利名称(译)	一种克拉拉细胞蛋白纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN103344635A	公开(公告)日	2013-10-09
申请号	CN201310301643.5	申请日	2013-07-18
[标]申请(专利权)人(译)	博奥赛斯(天津)生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	博奥赛斯(天津)生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	博奥赛斯(天津)生物科技有限公司		
[标]发明人	刘萍 栾大伟 李克锦		
发明人	刘萍 栾大伟 李克锦		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/68 G01N33/535		
代理人(译)	韩敏		
其他公开文献	CN103344635B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种克拉拉细胞蛋白 (CC16) 纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒, 所述试剂盒包括: 克拉拉细胞蛋白校准品; 偶联有链霉亲和素的纳米磁微粒悬浮液; 生物素标记的克拉拉细胞蛋白抗体; 克拉拉细胞蛋白抗体酶结合物, 所用的酶为辣根过氧化物酶, 辣根过氧化物酶纯度RZ≥3.0, 活性≥250U/mL; 克拉拉细胞蛋白质控品; 化学发光液A液和B液; 20倍浓缩洗液; 反应管。另外本发明还公开了本发明试剂盒的制备方法。本发明试剂盒与现有试剂盒相比灵敏度高、可测定浓度范围宽、试剂有效期长、试剂成本低、操作简单、检测自动化程度高等优点。

