

(12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 202066863 U

(45) 授权公告日 2011. 12. 07

(21) 申请号 201020585719. 3

(22) 申请日 2010. 10. 29

(73) 专利权人 厦门大学附属中山医院

地址 361004 福建省厦门市思明区湖滨南路
201-209 号

(72) 发明人 张忠英 陈美珺 游攀 金宏伟

(74) 专利代理机构 厦门南强之路专利事务所
35200

代理人 马应森

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 21/82(2006. 01)

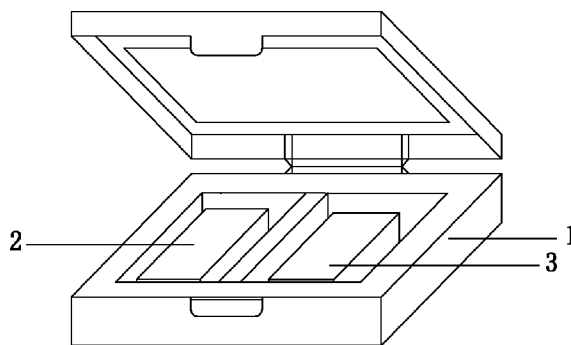
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 实用新型名称

检测脂联素的颗粒增强免疫透射比浊试剂盒

(57) 摘要

检测脂联素的颗粒增强免疫透射比浊试剂盒, 涉及免疫透射比浊的检测。包括盒体、应用液瓶和包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液瓶, 应用液瓶和包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液瓶置于盒体内, 应用液瓶中装应用液, 应用液的组成为表面活性剂 0.1%~0.5%、防腐剂 0.05%~1%、高分子加速剂 2%~8%、氯化钠 0.1%~10% 和缓冲剂 50~200mmol/L; 包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液瓶中装包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液, 包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液的组成为包被抗人脂联素单克隆抗体胶乳 0.5%~5%、表面活性剂 0.1%~0.5%、稳定剂 0.1%~0.5% 和缓冲剂 10~100mmol/L。



1. 检测脂联素的颗粒增强免疫透射比浊试剂盒,其特征在于包括箱体、应用液瓶和包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液瓶,所述应用液瓶和包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液瓶放置于盒体内。

检测脂联素的颗粒增强免疫透射比浊试剂盒

技术领域

[0001] 本实用新型涉及一种免疫透射比浊的检测,尤其是涉及一种检测脂联素的颗粒增强免疫透射比浊试剂盒。

背景技术

[0002] 脂联素 (adiponectin) 亦称 Acrp30、GBP28 或 AdipoQ,是由脂肪细胞分泌一种激素蛋白,能在人体血浆中稳定存在,浓度范围约为 3.0 ~ 17.0mg/L,约占血浆蛋白的 0.01% ([1]Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 257(1) : 79-83)。随着对脂联素研究的不断深入,已发现,脂联素在肥胖症患者和 II 型糖尿病患者血清中的浓度明显低于非肥胖者,其浓度的降低导致了胰岛素抵抗和高胰岛素血症,而脂联素有防止动脉粥样硬化斑块形成的作用,因此,脂联素与肥胖症患者 II 型糖尿病及冠心病的发生发展密切相关,即脂联素的明显降低预示着 II 型糖尿病及冠心病的发生明显增加 ([2]Zhang MH, Spies C, Ali S, et al. Adiponectin and inducible ischemia in patients with stable coronary heart disease :data from the Heart and Soul study[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 205(1) :233-238 ;[3]Kawano J, Arora R. The role of adiponectin in obesity, diabetes, and cardiovascular disease[J]. *J Cardiometab Syndr*. 2009, 4(1) :44-49)。测定血中脂联素水平,对这些疾病的诊断和预后有重要意义。

[0003] 目前,脂联素的临床诊断技术主要包括:放射免疫法 (RIA) ([4]Schulze MB, Shai I, Rimm EB, et al. Adiponectin and future coronary heart disease events among men with type 2 diabetes[J]. *Diabetes*, 2005, 54(2) :534-539)、酶联免疫试验 (ELISA) ([5] Urbonaviciene G, Frystyk J, Flyvbjerg A, et al. Association of serum adiponectin with risk for cardiovascular events in patients with peripheral arterial disease[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 210(2) :619-624) 等方法,它们的优点是灵敏度较高,缺点是操作繁琐,耗时长,易受人为操作和外界因素干扰,自动化程度低,而且放射性标记物会对操作者产生危害,对环境造成污染。这些缺点限制了现有的脂联素检测方法的推广应用,使其无法广泛地应用于临床诊断与科研工作。

[0004] 颗粒增强免疫透射比浊法 (particle-enhanced turbidimetric immunoassay, PETIA) 是近年来出现的一种较为稳定、准确的体液蛋白均相免疫比浊检测方法,其基本原理是一定粒径胶乳颗粒的表面交联单克隆或多克隆抗体,当交联有抗体的微球与抗原结合后,在短时间内会迅速聚集在一起,改变了反应液的吸光度。而且,这种改变与被测抗原的浓度有较强的相关性,在一定范围内可以反映被测抗原的浓度。此技术通过颗粒增强的方式,放大了抗原抗体反应,弥补了普通透射比浊法灵敏度不高的不足,同时又继承了透射比浊法稳定性好、方便快速的优点,克服 ELISA 和 RIA 方法的缺点,已越来越广泛应用于临床上各种微量蛋白的定量检测。目前,胶乳增强免疫透射比浊法已广泛用于胱抑素 C ([6] Al-Turkmani MR, Law T, Kellogg MD. Performance evaluation of a particle-enhanced

turbidimetric cystatin C assay on the Hitachi 917 analyzer[J]. Clin Chim Acta. 2008, 398(1-2):75-77)、脂蛋白(a)、C反应蛋白、超敏C反应蛋白、抗链球菌溶血素O的检测,取得良好的社会效益,但国内外至今尚未见有此类脂联素检测试剂盒问世。

发明内容

[0005] 本实用新型的目的在于提供一种检测脂联素的颗粒增强免疫透射比浊试剂盒。

[0006] 本实用新型包括箱体、应用液瓶和包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液瓶,所述应用液瓶和包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液瓶放置于盒体内,所述应用液瓶中装应用液,所述应用液的组成及其按质量百分比的含量为表面活性剂 0.1%~0.5%、防腐剂 0.05%~1%、高分子加速剂 2%~8%、氯化钠 0.1%~10%和缓冲剂 50~200mmol/L;所述包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液瓶中装包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液,所述包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液的组成及其按质量百分比的含量为包被抗人脂联素单克隆抗体胶乳 0.5%~5%、表面活性剂 0.1%~0.5%、稳定剂 0.1%~0.5%和缓冲剂 10~100mmol/L。

[0007] 所述应用液中的表面活性剂可选自 Tween 20 或 Triton-X100 等。

[0008] 所述应用液中的防腐剂可选自 Proclin 300 或叠氮钠等。

[0009] 所述应用液中的高分子加速剂可选自聚乙二醇 6000 (PEG6000) 或聚乙二醇 8000 (PEG8000) 等。

[0010] 所述应用液中的缓冲剂可选自三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、磷酸盐或甘氨酸等。

[0011] 所述包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液中的表面活性剂可选自 Tween 20 或 Triton-X100 等。

[0012] 所述包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液中的稳定剂可选自牛血清白蛋白 (BSA) 等。

[0013] 所述包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液中的缓冲剂选自三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、磷酸盐或甘氨酸等。

[0014] 所述应用液缓冲剂与胶乳悬液缓冲剂最好保持一致。

[0015] 本实用新型可采用以下方法制备:

[0016] 1) 制备胶乳抗体

[0017] 将两种小鼠抗人脂联素单克隆抗体分别与醛基微球交联,得两种胶乳抗体悬液;

[0018] 所述将两种小鼠抗人脂联素单克隆抗体分别与醛基微球交联,可采用以下具体方法:在碳酸盐缓冲液中将醛基微球分别与两种小鼠抗人脂联素单克隆抗体混匀,37℃旋转反应后,加入碳酸盐缓冲液配制的 NaBH₄ 溶液,4℃旋转反应后,再加入碳酸盐缓冲液配制的甘氨酸溶液,再 4℃旋转反应后,用清洗贮存液进行清洗,所得胶乳抗体沉淀重悬于清洗贮存液中,得胶乳抗体悬液,置于 4℃环境放置;

[0019] 所述两种小鼠抗人脂联素单克隆抗体可采用 clone:Adn37 抗体和 clone:Adn26 抗体;

[0020] 所述醛基微球可采用上海照康生物科技有限公司提供的醛基微球,所述醛基微球的粒径可为 100~300nm,最好为 150nm,醛基微球的质量百分比为 0.5%~5%;

[0021] 所述碳酸盐缓冲液 pH 可为 8.5~9.6,最好为 9.6;质量百分比为 20~100mmol/L

L, 最好为 50mmol/L。

[0022] 所述 37℃ 旋转反应的时间可为 4 ~ 16h, 最好为 16h ;

[0023] 所述 NaBH₄ 溶液的质量百分比为 0.05 ~ 0.5g/L, 最好为 0.1g/L ;

[0024] 所述 4℃ 旋转反应的时间可为 2 ~ 4h, 最好为 4h ;

[0025] 所述甘氨酸溶液的质量百分比可为 10 ~ 100mmol/L, 最好为 50mmol/L ;

[0026] 所述再 4℃ 旋转反应的时间可为 2 ~ 24h, 最好为 16h ;

[0027] 所述清洗贮存液 pH 可为 7.4 ~ 8.8, 最好为 8.0, 包括缓冲剂、表面活性剂和稳定剂。缓冲剂可以是磷酸盐, 也可以是三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 或甘氨酸, 缓冲剂在清洗贮存液中所占的质量百分比为 10 ~ 100mmol/L, 最好为 25mmol/L, 表面活性剂和稳定剂的质量百分比分别为 0.1% ~ 0.5% 和 0.05% ~ 0.5%, 最好为 0.2% 和 0.1%。

[0028] 2) 制备包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液

[0029] 分别将步骤 1) 制备的两种胶乳抗体悬液混合, 得包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液 ; 所述两种胶乳抗体悬液混合最好是两种胶乳抗体悬液等体积混合。

[0030] 3) 制备应用液

[0031] 将表面活性剂、防腐剂、高分子加速剂、氯化钠和缓冲剂一并完全溶解于水中, 得应用液 ; 所述缓冲剂种类与步骤 2) 中清洗贮存液中缓冲剂保持一致 ; 所述应用液 pH 值可为 7.4 ~ 8.0, 最好为 8.0 ; 所述表面活性剂所占的质量百分比可为 0.1% ~ 0.5%, 最好为 0.2%, 防腐剂所占的质量百分比可为 0.05% ~ 1%, 最好为 0.1%, 高分子加速剂所占的质量百分比可为 2% ~ 8%, 最好为 4% ; 氯化钠所占的质量百分比可为 0.1% ~ 10%, 最好为 1.2%, 缓冲剂的质量百分比可为 50 ~ 200mmol/L, 最好为 100mmol/L。

[0032] 4) 配制脂联素系列标准品

[0033] 选用脂联素标准品, 使用小牛血清进行系列稀释 : S6 : 40 μg/ml, S5 : 20 μg/ml, S4 : 10 μg/ml, S3 : 5 μg/ml, S2 : 1 μg/ml S1 : 0.2 μg/ml S0 : 小牛血清, 分装即可。

[0034] 所述脂联素标准品可选用商品化高纯度脂联素标准品 ; 所述分装可采用 0.5ml/瓶分装。

[0035] 以下给出采用所述检测脂联素的颗粒增强免疫透射比浊试剂盒在生化分析仪上进行脂联素检测的具体条件 :

[0036] 在生化分析仪上设定参数 :

[0037] 反应温度 : 37℃ ;

[0038] 分析方法 : 2 点终点法 ;

[0039] 主波长 : 570nm, 副波长 : 800nm (可不用) ;

[0040] 样品量 / 应用液 (R1) / 包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液 (R2) : 5 μl / 200 μl / 50 μl ;

[0041] 反应方向 : 上升。

[0042] 本实用新型采用抗人脂联素单克隆抗体包被醛基微球, 通过颗粒增强的方式, 放大了抗原抗体反应, 弥补了普通透射比浊法灵敏度不高的不足, 同时又继承了透射比浊法稳定性好、方便快速的优点, 克服 ELISA 和 RIA 方法操作复杂、重复性不好等的缺点, 实现人血脂联素在生化仪上大批量定量快速检测人脂联素水平, 归纳起来有以下几个方面的突出优点 : (1) 灵敏度较高, 可达 0.2 μg/ml ; (2) 不易受人为操作和外界因素干扰, 检测稳定性

和重复性好,能较真实地反映被测物质的含量;(3)能利用生化分析仪进行检测,容易实现自动化,适于临床推广应用。

附图说明

[0043] 图 1 为本实用新型实施例的结构组成示意图。

具体实施方式

[0044] 参见图 1,本实用新型所述检测脂联素的颗粒增强免疫透射比浊试剂盒实施例包括盒体 1、应用液瓶 2 和包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液瓶 3,所述应用液瓶 2 和包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液瓶 3 放置于盒体 1 内,所述应用液瓶中装应用液,所述应用液的组成及其按质量百分比的含量为表面活性剂 0.1%~0.5%、防腐剂 0.05%~1%、高分子加速剂 2%~8%、氯化钠 0.1%~10%和缓冲剂 50~200mmol/L;所述包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液瓶中装包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液,所述包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液的组成及其按质量百分比的含量为包被抗人脂联素单克隆抗体胶乳 0.5%~5%、表面活性剂 0.1%~0.5%、稳定剂 0.1%~0.5%和缓冲剂 10~100mmol/L。

[0045] 实施例 1

[0046] 制备检测脂联素的颗粒增强免疫透射比浊试剂盒

[0047] 以 4mg 醛基微球为例,本实施例的主要步骤包括:

[0048] 1. 制备胶乳抗体

[0049] 选用高纯度、高亲和力的两种小鼠抗人脂联素单克隆抗体(clone:Adn37, clone:Adn26)。使用 20mmol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.6)将醛基微球分别与两种抗体以 10:1 的质量比混匀,37℃,旋转反应 16h,此时总反应体积为 400 μl;反应结束后,加入上述碳酸盐缓冲液配制的 4mg/ml NaBH₄ 溶液 20 μl,4℃,反应 4h;再加入封闭试剂 1mol/L 甘氨酸溶液 20 μl,4℃,反应 16h;25mmol/L TBS 缓冲液(含 Tween 20 0.2%,BSA 0.1%,pH7.4)清洗 3 次;沉淀重悬于 4ml 25mmol/L TBS 缓冲液(含 Tween 20 0.2%,BSA 0.1%,pH7.4),胶乳悬液浓度为 1mg/ml。

[0050] 2. 两种胶乳抗体混合,制备包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液

[0051] 分别将制备的两种胶乳抗体悬液等体积混合,此为 R2 胶乳悬液。

[0052] 3. 制备应用液

[0053] pH8.0 的 50mmol/L Tris 缓冲液,内含 1.2%的 NaCl,4%的 PEG6000,0.1% Proclin 300。

[0054] 4. 脂联素系列标准品的配制

[0055] 选用商品化高纯度脂联素标准品,使用小牛血清进行系列稀释:S6:40 μg/ml, S5:20 μg/ml, S4:10 μg/ml, S3:5 μg/ml, S2:1 μg/ml, S1:0.2 μg/ml S0:小牛血清,0.5ml/瓶分装即可。

[0056] 实施例 2

[0057] 制备检测脂联素的颗粒增强免疫透射比浊试剂盒

[0058] 以 4mg 醛基微球为例,本实施例的主要步骤包括:

- [0059] 1. 制备胶乳抗体
- [0060] 将醛基微球分别与两种抗体以 20 : 1 的质量比混匀,余同实施例 1。
- [0061] 2. 两种胶乳抗体混合,制备包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液
- [0062] 同实施例 1。
- [0063] 3. 制备应用液
- [0064] pH7.4 的 50mmol/L Tris 缓冲液,内含 1.2% 的 NaCl,6% 的 PEG6000,0.1% Proclin 300。
- [0065] 4. 脂联素系列标准品的配制
- [0066] 同实施例 1。
- [0067] 实施例 3
- [0068] 制备检测脂联素的颗粒增强免疫透射比浊试剂盒
- [0069] 1. 制备胶乳抗体
- [0070] 将步骤 1 制备胶乳抗体中加入 4mg/ml NaBH_4 溶液的量改为 $10 \mu\text{l}$, 4°C , 反应时间改为 2h,余同实施例 1。
- [0071] 2. 两种胶乳抗体混合,制备包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液
- [0072] 同实施例 1。
- [0073] 3. 制备应用液
- [0074] pH8.0 的 200mmol/L Tris 缓冲液,内含 5.0% 的 NaCl,6% 的 PEG8000,0.1% Proclin 300。
- [0075] 4. 脂联素系列标准品的配制
- [0076] 同实施例 1。
- [0077] 实施例 4
- [0078] 制备检测脂联素的颗粒增强免疫透射比浊试剂盒
- [0079] 1. 制备胶乳抗体
- [0080] 将实施例 1 步骤 1) 制备胶乳抗体中加入封闭试剂 1mol/L 甘氨酸溶液的量改为 $10 \mu\text{l}$, 4°C , 反应时间改为 4h, 25mmol/L TBS 缓冲液中 Tween 20 改为 0.5%, BSA 改为 0.5%, pH 改为 8.0, 余同实施例 1。
- [0081] 2. 两种胶乳抗体混合,制备包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液
- [0082] 同实施例 1。
- [0083] 3. 制备应用液
- [0084] 同实施例 1。
- [0085] 4. 脂联素系列标准品的配制
- [0086] 同实施例 1。
- [0087] 实施例 5
- [0088] 生化分析仪上进行脂联素的检测
- [0089] 在 7060 型生化分析仪上设定参数:反应温度 37°C ;分析方法:2 点终点法;主波长:570nm,副波长:800nm;样品量/R1/R2: $5 \mu\text{l}/250 \mu\text{l}/50 \mu\text{l}$;反应方向:上升。读点分别在 20 点及 34 点。选择多点定标后,仪器自动完成定标,定标 OK 后,进行常规血清标本的脂联素检测,结果经仪器自动换算直接以 mg/L 为单位报告数值。

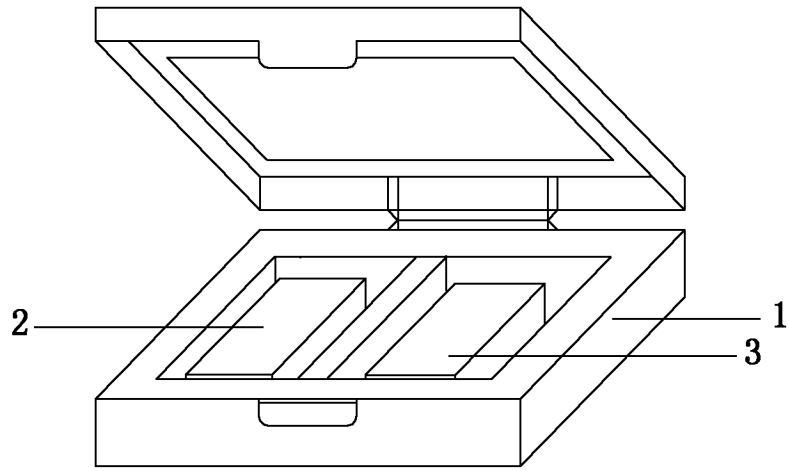


图 1

专利名称(译)	检测脂联素的颗粒增强免疫透射比浊试剂盒		
公开(公告)号	CN202066863U	公开(公告)日	2011-12-07
申请号	CN201020585719.3	申请日	2010-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	厦门大学附属中山医院		
申请(专利权)人(译)	厦门大学附属中山医院		
当前申请(专利权)人(译)	厦门大学附属中山医院		
[标]发明人	张忠英 陈美璐 游攀 金宏伟		
发明人	张忠英 陈美璐 游攀 金宏伟		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/531 G01N21/82		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

检测脂联素的颗粒增强免疫透射比浊试剂盒，涉及免疫透射比浊的检测。包括盒体、应用液瓶和包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液瓶，应用液瓶和包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液瓶置于盒体内，应用液瓶中装应用液，应用液的组成为表面活性剂0.1%~0.5%、防腐剂0.05%~1%、高分子加速剂2%~8%、氯化钠0.1%~10%和缓冲剂50~200mmol/L；包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液瓶中装包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液，包被抗人脂联素单克隆抗体的胶乳悬液的组成为包被抗人脂联素单克隆抗体胶乳0.5%~5%、表面活性剂0.1%~0.5%、稳定剂0.1%~0.5%和缓冲剂10~100mmol/L。

