



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101819205 A

(43) 申请公布日 2010.09.01

(21) 申请号 201010190866.5

(22) 申请日 2010.06.03

(71) 申请人 中国人民解放军第三军医大学
地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩正街
30号

(72) 发明人 胡川闽 易维京 陈安 贾向阳

(74) 专利代理机构 重庆志合专利事务所 50210
代理人 胡荣瑛

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

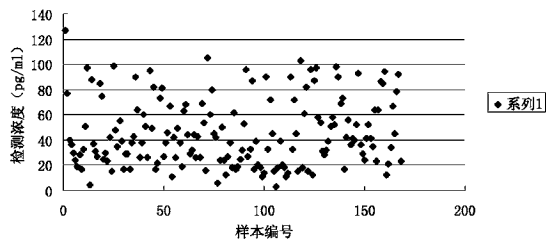
权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 3 页

(54) 发明名称

人 N 端 B 型利钠肽原免疫分析试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供一种人 N 端 B 型利钠肽原免疫分析试剂盒,其主要包括:1) 人 N 端 B 型利钠肽原校准品;2) 包被有人 N 端 B 型利钠肽原多克隆抗体的载体;3) 酶标记的人 N 端 B 型利钠肽原的单克隆抗体;4) 上述酶所作用的化学发光底物。本发明还提供上述试剂盒的制备方法。根据本发明的试剂盒,酶标记的人 N 端 B 型利钠肽原单抗与载体上包被的人 N 端 B 型利钠肽原多抗和被测样品的人 N 端 B 型利钠肽原抗原形成“双抗体夹心”结构,既有效地利用了化学发光技术原理、又确保了检测的灵敏性。另外,本发明的试剂盒可应用于开放式的化学发光测量仪,使用成本低,更易推广应用。



1. 一种人 N 端 B 型利钠肽原免疫分析试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:
 - 1) 人 N 端 B 型利钠肽原校准品;
 - 2) 包被有人 N 端 B 型利钠肽原多克隆抗体的载体;
 - 3) 酶标记的人 N 端 B 型利钠肽原的单克隆抗体;
 - 4) 上述酶所作用的化学发光底物。
2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,2) 中所述载体为固体载体。
3. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于,所述固体载体为微孔板、塑料珠、塑料管或磁性颗粒。
4. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,3) 中所述酶为碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。
5. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,4) 中所述化学发光底物为 1,2- 二氧乙烷类衍生物、鲁米诺或异鲁米诺,所述 1,2- 二氧乙烷类衍生物为 (金刚烷)-1,2- 二氧乙烷、3-(2`-螺旋金刚烷)-4- 甲氧基 -4-(3``- 磷酸氧基) 苯基 -1,2- 二氧乙烷、CSPD 或 CDP-Star。
6. 一种制备权利要求 1 所述试剂盒的方法,其特征在于包括以下步骤:
 - 1) 以重组人 N 端 B 型利钠肽原纯品配制人 N 端 B 型利钠肽原校准品;
 - 2) 用酶标记人 N 端 B 型利钠肽原的单克隆抗体;
 - 3) 以人 N 端 B 型利钠肽原的多克隆抗体包被载体;
 - 4) 分装人 N 端 B 型利钠肽原校准品、酶标记的人 N 端 B 型利钠肽原单克隆抗体和该酶所作用的化学发光底物;以及
 - 5) 组装为成品。
7. 根据权利要求 6 所述的方法,其特征在于,所述步骤 3) 所述的包被载体包括以下步骤:
 - 1) 包被
基于 1000mL 所述包被液包含 10.60g 的碳酸钠,配制包被液,所述包被液的 pH 值为 9.4-9.6,然后将制备的包被液与人 N 端 B 型利钠肽原的多克隆抗体混合,并将所得混合液负载于载体上;
 - 2) 用生理盐水洗涤上述载体;
 - 3) 封闭
基于 1000mL 所述封闭液包含 0.2g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.9g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、10g 胰蛋白胨、和 1mL 生物防腐剂,配制封闭液,所述封闭液的 pH 值为 7.0-7.5,然后将所得封闭液负载于上述洗涤后的载体上。
8. 根据权利要求 6 或 7 所述的方法,其特征在于,所述载体为微孔板、塑料珠、塑料管或磁性颗粒。
9. 根据权利要求 6 所述的方法,其特征在于,所述酶为碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。
10. 根据权利要求 6 所述的方法,其特征在于,所述化学发光底物为 1,2- 二氧乙烷类衍生物、鲁米诺或异鲁米诺,所述 1,2- 二氧乙烷类衍生物为 (金刚烷)-1,2- 二氧乙烷、3-(2`-螺旋金刚烷)-4- 甲氧基 -4-(3``- 磷酸氧基) 苯基 -1,2- 二氧乙烷、CSPD 或 CDP-Star。

人 N 端 B 型利钠肽原免疫分析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,具体地,本发明提供了一种人 N 端 B 型利钠肽原(Nt-proBNP) 化学发光免疫分析定量测定试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 心血管疾病无论在我国或者在全球,都是严重威胁人类生命和健康的重要疾病。世界卫生组织在 2004 年 9 月 26 日第 5 个“世界心脏日”时,在日内瓦发表的一份公报中指出,全球每年有 1700 万人死于心脏病和其他心血管疾病,约占全球死亡人数的 1/3,预计到 2020 年这个数字将突破 2000 万,心血管疾病和中风将成为人类死亡和致残的首要原因。其中,心力衰竭(心衰,Heart Failure, HF) 是严重危害人类健康的心血管疾病中的一种病理综合征,如今已不再被简单地看作是独立的临床疾病,而是作为心血管疾病发展到后期的一个阶段。从始发危险因子(高血压、高胆固醇血症、糖尿病)到左心室肥大、心肌细胞功能紊乱、冠心病,最后发展成为心力衰竭。2003 年,中国心血管健康多中心合作研究组应用四阶段整群随机抽样方法,在中国 10 省市抽样调查,结果显示心衰患病率为 0.9%,随着年龄增高,心衰患病率显著上升,北方明显高于南方(1.4% Vs 0.5%),女性略高于男性(1.0% Vs. 0.9%)。由于我国冠心病和高血压发病仍呈上升趋势,人口老龄化趋势明显, HF 正成为我国心血管领域的重要公共卫生问题。

[0003] 在发达国家, HF 是一种常见情况,影响着 1%~2% 的人口,并且有着很高的死亡率,特别是在老年患者中。有学者统计,心力衰竭患者一旦出现典型症状,5 年存活率男性为 25%,女性为 38%,与恶性肿瘤病人相仿。目前慢性心脏衰竭在 70 岁以上老年人群中的发病率约为 10% 以上。有资料显示,由于饮食习惯的改变等原因,中国目前有 2 亿人超重、7000 万人肥胖,高血压和高血脂的人数都超过 1.6 亿,所有这些,导致了中国的冠心病、中风等心血管疾病患者呈爆发性增长。在发达国家,约有 7% 的人群患有此病,但只有 2% 的人被诊断出来,还没有特异的生化参数和治疗监测方法。

[0004] HF 的不良预后,使越来越多的学者开始考虑应打破传统的观念,于尚未出现明显“充血性”症状之前就着手干预治疗,从根本上防治 HF,延缓 HF 发展进程,提高患者的远期存活率。HF 尽早发现是非常重要的,因为,如果被发现得早,通常它是能用药物控制的。因此,对心衰的预防和及时正确的诊断和治疗非常重要。传统根据病史和体征对心衰患者的诊治及长期监控是非常不完善的,常需住院来调节体液的潴留。如果有一个能有效监控心衰的生化标志物应用于临床诊断,那将是非常有效的。因此,心脏生物化学标志物的准确有效的应用,显得更加重要。

[0005] 目前研究证实,脑利钠肽或 B 型钠尿肽(brain natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide ;BNP) 或非活性的脑利钠肽原 N 末端(NT-ProBNP) 是较好的心衰标志物,能反映心室容积扩大、心室超负荷和心脏功能有无损伤及损伤程度。早在 2000 年“Heart”杂志在一篇名为“BNP:很快成为治疗心衰患者的常规措施”的编者评论中就明确认为 BNP 有助于诊断心衰,可作为心衰患者预后标志物,是一种较新的监控心衰的方法。

BNP 是一种钠尿肽,由心室分泌的类肽化合物,具有利钠、利尿、舒血管、抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统和交感神经系统的作用。研究表明容量负荷引起的心室压力改变以及室壁张力的增加是刺激 BNP 分泌的因素。BNP 是含有 32 个氨基酸残基的多肽,是从氨基酸前体蛋白 (pro-BNP) 中的羧基端裂解而来,同时产生 76 个氨基酸非活性的 N 端 B 型利钠肽原 (NT-proBNP),在血中浓度随 BNP 升高而升高。MuellerT 与 Hervas 等研究发现血浆 BNP、NT-proBNP 浓度的升高对于心衰的诊断具有很高敏感性,可作为心力衰竭诊断的敏感指标,并能评估心功能损害严重程度。NT-proBNP 和含有 C 端 32 个氨基酸的具有生物活性的 BNP 是等摩尔释放,因此二者在心血管系统疾病的诊断、治疗监测和预后方面有着相似的临床应用。但与 BNP 相比,NT-proBNP 因其半衰期长 (半衰期为 120min)、心衰时升高幅度大而更有利于临床应用。

[0006] 美国 FDA 在 2000 年 11 月 22 日首次批准了 Biosite Diagnostics 公司用于帮助诊断充血性心力衰竭的 BNP 试剂盒“Biosite Diagnostics Triage BNP”。这是一种床旁检验 (POCT),使用六滴全血或血浆可在 15 分钟完成此项检测。如以 100pg/ml 为诊断心衰判断值时,特异性为 95.6%,灵敏度为 82.4%。与纽约心脏学会 (NYHA) 的心衰功能分级相比,发现 BNP 的检验具有敏感、准确、快速的特点,能够准确地反映心衰的严重程度,并与心衰的功能分级有良好的相关性,而且更能诊断出早期的心脏功能紊乱。早期实验的研究对象多是急诊室呼吸困难、肺病、心脏病患者,结果显示 BNP、NT-proBNP 与心衰具有很好的相关性,有些心力衰竭患者 BNP 正常,阳性预测值达到 90% -95%,其阴性预测能力更具有诊断价值。当急性心力衰竭出现左室充盈压增加的临床综合征以及如缺血、肺栓塞等任何导致肌细胞伸展的情形,检验 NT-proBNP 非常有益,同时对于鉴别呼吸困难是否为心源性原因具有重要意义,优于常规临床判断。另外,NT-proBNP 还能辅助判断进展期心衰患者的预后,以及对左心室功能不全的治疗进行监测和指导。

[0007] 2000 年前后,国际上已经认定 NT-proBNP 是测定心衰的一个具有划时代意义的特异性标志物。2002 年 11 月 19 日,FDA 批准上市 NT-proBNP,一种用于实验室帮助诊断充血性心力衰竭 (congestive heart failure) 的新的酶联免疫检测试剂盒。这种检测试剂, Elecsys proBNP 测定 (Elecsys proBNPImmunoassay),是由印地安纳州 Indianapolis 的罗氏诊断学公司 (RocheDiagnostics, Inc) 制造的。FDA 批准这种检验试剂是基于生产厂商在美国和欧洲 16 个医学中心对 2000 多位健康和病患男女进行的临床研究。此项研究显示充血性心力衰竭症状的严重性与 NT-proBNP 的水平有关。

[0008] 目前,国内的医院使用的同类产品,全部依赖进口,而且国际上只有少数几家公司拥有此项技术。如前所述,NT-proBNP 作为一种良好的心肌标志物已经获得临床认可,得到广泛的应用,但由于目前的相关检测试剂依赖进口,导致患者使用成本相对较高,进口的 NT-proBNP 的 ELISA 检测试剂盒的价格为 7200 元人民币 /96 次检测、RIA 检测试剂盒的价格为 9800 元 /125 次检测。通过检索,国内尚未见到 NT-proBNP 检测试剂相关专利及新药申报,因此,自主研发具有知识产权的特异性 NT-proBNP 单克隆抗体,生产我国自己的 NT-proBNP 检测试剂,改变目前依赖国外进口产品的状况,具有非常重要的现实意义。

[0009] 近十年来标记免疫分析技术的研究和应用发展迅速,已广泛应用于生物医学基础理论研究及临床疾病诊断各领域。其中技术工艺成熟,具有先进性且实用性强,易于推广的主要有:放射免疫分析、酶免疫分析、时间分辨荧光免疫分析和化学发光免疫分析等四种。

这些超微量检测技术的基本理论大体相同,但是所用示踪剂及所发出的信号各不相同。根据大量的试验结果及临床应用资料,从实用性、稳定性、准确性及发展前景来看,依次为化学发光免疫分析、时间分辨荧光免疫分析、放射免疫分析以及酶免疫分析。放射免疫分析方法存在诸多缺点,如操作复杂、测定结果不稳定、试剂保存时间短、放射性污染、仪器昂贵等。

[0010] 化学发光免疫分析法是一种较先进而有效的方法,然而,目前化学发光免疫分析技术在 NT-proBNP 免疫分析产品的高效性和稳定性方面存在问题。另一方面,现有技术中的化学发光免疫分析试剂盒均为封闭式全自动化学发光测量系统,需要昂贵的全自动化学发光测量仪,从而限制了推广使用,无法广泛地应用于临床诊断和科研工作。

发明内容

[0011] 本发明解决了上述问题,即将化学发光技术与 NT-proBNP 的免疫分析学有效地结合,提供了一种能够简便、快速、灵敏、稳定地检测 NT-proBNP 的试剂盒,该试剂盒适于在产业上有效地推广应用。

[0012] 本发明的其中一个目的是提供一种人 N 端 B 型利钠肽原 (NT-proBNP) 化学发光免疫分析定量测定试剂盒。

[0013] 本发明的另一目的是提供一种制备上述试剂盒的方法。

[0014] 根据本发明的试剂盒包括:1) 人 N 端 B 型利钠肽原校准品;2) 包被有人 N 端 B 型利钠肽原的多克隆抗体的载体;3) 酶标记的人 N 端 B 型利钠肽原的单克隆抗体;以及 4) 上述酶所作用的化学发光底物。

[0015] 进一步,根据本发明的制备上述试剂盒的方法包括以下步骤:

[0016] 1) 以重组人 N 端 B 型利钠肽原纯品配制人 N 端 B 型利钠肽原校准品;

[0017] 2) 用酶标记人 N 端 B 型利钠肽原的单克隆抗体;

[0018] 3) 以人 N 端 B 型利钠肽原的多克隆抗体包被载体;

[0019] 4) 分装上述人 N 端 B 型利钠肽原校准品、酶标记的人 N 端 B 型利钠肽原的单克隆抗体和该酶所作用的化学发光底物;以及

[0020] 5) 组装为成品。

[0021] 在上述根据本发明的试剂盒及其制备方法中,所述载体可为固相载体,优选为微孔板、塑料珠、塑料管或磁性颗粒。所述酶可以为碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。所述化学发光底物可以为 1,2-二氧乙烷类衍生物、鲁米诺或异鲁米诺,其中所述 1,2-二氧乙烷类衍生物为(金刚烷)-1,2-二氧乙烷、3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3''-磷酸氧基)苯基-1,2-二氧乙烷 (AMPPD)、CSPD 或 CDP-Star。

[0022] 根据本发明的方法中,其中所述包被载体的步骤 3) 包括以下步骤:

[0023] 1) 包被

[0024] 基于 1000mL 所述包被液包含 10.60g 的碳酸钠,配制包被液,所述包被液的 pH 值为 9.4-9.6,然后将制备的包被液与人 N 端 B 型利钠肽原的多克隆抗体混合,并将所得混合液负载于载体上;

[0025] 2) 用生理盐水洗涤上述载体;以及

[0026] 3) 封闭

[0027] 基于 1000mL 所述封闭液包含 0.2g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.9g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、10g 胰蛋白酶、和 1mL 生物防腐剂, 配制封闭液, 所述封闭液的 pH 值为 7.0-7.5, 然后将所得封闭液负载于上述洗涤后的载体上。

[0028] 具体的上述试剂盒可以包括人 N 端 B 型利钠肽原校准品、抗体包被板、酶标记物与化学发光底物液、20 倍浓缩洗涤液等。其中, 所述人 N 端 B 型利钠肽原校准品为标准级, 纯度不低于 90%、抗体包被板为 48 孔或 96 孔的微孔条、酶标记人 N 端 B 型利钠肽原单抗为偶联辣根过氧化物酶、化学发光底物液为鲁米诺、浓缩洗涤液为 Tris-HCl (含 Tween 20)。

[0029] 本发明“人 N 端 B 型利钠肽原化学发光免疫分析定量测定试剂盒”可以特异地定量检测出病人标本中人 N 端 B 型利钠肽原的含量, 可以根据人 N 端 B 型利钠肽原含量的多少判断是否发生心衰以及对心脏功能进行评价。它具有简便、快速、灵敏、稳定等优点。该人 N 端 B 型利钠肽原测定试剂盒 (化学发光法) 的各项指标均达到酶联免疫分析法的标准。并且, 根据本发明的检测系统为开放式操作, 简便快速, 不需要昂贵的全自动化学发光测量仪, 特别适合广大的中小医院推广使用, 为临床诊断和科研工作提供一种非常有价值的检测手段。根据本发明的试剂盒, 酶标记的人 N 端 B 型利钠肽原单抗与载体上包被的人 N 端 B 型利钠肽原多抗和被测样品的人 N 端 B 型利钠肽原抗原形成“双抗体夹心”结构, 因此本发明采用的“双抗体夹心一步法”反应模式, 既有效地利用了化学发光技术原理、又确保了检测的灵敏性。另外, 这种模式还便于操作和生产。

[0030] 本发明的试剂盒应用的是酶催化发光底物, 通过检测发光底物产生的光信号代替酶联免疫分析中的显色底物, 因而具有与酶联免疫分析同等的特异性, 而灵敏度大大提高, 比现今的酶联免疫吸附分析灵敏度提高约 10 倍, 可为心衰及其它相关心脏疾病的诊断提供更为特异、快速、可靠的依据。

[0031] 为了让本发明的上述和其它目的、特征和优点能更明显易懂, 下文特举较佳实施例, 并配合附图, 作详细说明根据下。

附图说明

[0032] 图 1 为本发明组装成的板式 NT-proBNP 化学发光定量检测试剂盒, 其中包含: 以重组人 N 端 B 型利钠肽原纯品配制人 N 端 B 型利钠肽原校准品; 用酶标记人 N 端 B 型利钠肽原的单克隆抗体; 以人 N 端 B 型利钠肽原的多克隆抗体包被载体; 分装上述人 N 端 B 型利钠肽原校准品、酶标记的人 N 端 B 型利钠肽原的单克隆抗体和该酶所作用的化学发光底物、洗涤液、使用说明等;

[0033] 图 2 为本发明在使用时在威海威高集团的 JR-1 型发光仪上检测, 同时在该仪器上直接完成数据处理及结果分析;

[0034] 图 3 为正常人 N 端 B 型利钠肽原含量及临界值的确定,

[0035] 其中: 168 例健康人血清, 求得的平均值为 44.96pg/ml, 标准偏差为 25.93pg/ml, 计算的平均值加上 2.7 倍的标准偏差所对应的浓度值作为临界值, 结果为 114.96pg/ml;

[0036] 图 4 为本发明与 Roche 的电化学发光检测试剂盒相关性比较结果:

[0037] 从重庆第三军医大学西南医院收集的血清标本使用本发明的“人 N 端 B 型利钠肽原化学发光定量检测试剂盒”和 Roche 的电化学发光检测试剂盒测定量检测血清标本 234 份, 并经统计学处理结果表明, 该方法检测的结果高度相关, 相关系数 $r = 0.9459$;

[0038] 图 5 为检测灵敏度的测定结果：

[0039] 选择已知浓度样本 (21000pg/ml)，用临床确定阴性血清倍比稀释，检测结果表明该发明检测下限 < 100pg/ml，上限接近 30000pg/ml，能满足临床人 N 端 B 型利钠肽原的检测需要。

具体实施方式

[0040] 实施例 1 制备发明的板式 N 端 B 型利钠肽原定量检测试剂盒

[0041] 一、抗 NT-proBNP 抗体的制备

[0042] 将本实验室重组表达的 NT-proBNP 蛋白（公开于公开号为 CN 101230101A 的专利申请中）从 -80℃ 冰箱取出，溶解后过滤，Lowry 法测定蛋白含量，用 pH5.8 的 20mmol/L PBS 将其稀释到 0.5mg/ml。选取 10 只 6 周龄、体重约 20g 的雌性 Balb/c 小鼠。抗原乳化选用双注射器互推法。首次免疫时，将重组表达的 NT-proBNP 蛋白与等体积的弗氏完全佐剂乳化混合，每只小鼠按 100 μg NT-proBNP 的量皮内多点加腹腔注射。第 14 和第 28 天分别进行第二次第三次免疫，佐剂改用不完全弗氏佐剂，抗原量、注射体积和途径不变，第 3 次免疫后间接 ELISA 法测定效价。融合前 3 天进行加强免疫，每只小鼠腹腔注射不加佐剂的 100 μg NT-proBNP，3 天后细胞融合。筛选的阳性克隆经多次克隆化稳定后，采用腹水法制备纯化单抗，抗体经亚类鉴定、特异性分析、表位鉴定及亲和力测定后选择位于 N 端的高亲和力抗体备用。

[0043] 本发明通过生物信息学分析，综合考虑蛋白质的二级结构、抗原性、亲疏水性、可及性及柔韧性，综合蛋白分子的糖基化情况预测与上述单抗最佳配对的线性表位序列，采用多肽合成及偶联 BSA 的方式获得免疫原（选择 NT-proBNP 氨基酸序列 C 端约 15 个氨基酸送上海吉尔生化委托合成，纯度 > 95%，并偶联 BSA 的方式获得免疫原），免疫新西兰大白兔，经过多次免疫，待兔血清中的抗 NT-proBNP 抗体达到较高效价后放血，经过抗原亲和层析纯化后得到了高效价、高亲和力的 NT-proBNP 特异性的多克隆抗体。

[0044] 二、酶标记抗体制备

[0045] 将上述一中制备的 NT-proBNP 单克隆抗体用改良高碘酸法标记辣根过氧化物酶，用 PBS 充分透析后加入等体积甘油和防腐剂在 -20℃ 分装保存。

[0046] 三、NT-proBNP 校准品的制备

[0047] 用重组 NT-proBNP 纯品（公开于公开号为 CN 101230101A 的专利申请中）配置，设置 0、100、500、2500、10000、30000pg/ml 共 6 瓶。

[0048] 四、酶标抗体浓度选定

[0049] 采用方阵法（包被物、待检样品的参考品及酶标记抗体分别为不同的稀释度）选择酶标抗体的最佳工作浓度大于 1 : 5000（大约 0.2-0.5 μg/ml）

[0050] 五、固相包被板的制备

[0051] (1) 包被

[0052] 无水碳酸钠 10.60g

[0053] 充分溶解后，用盐酸调整 pH 至 9.4-9.6，加入适量 NT-proBNP 多克隆抗体（至终浓度为 1.5 μg/ml），然后加入微孔板各孔中，每孔 100 μl，4℃ 24 小时。

[0054] (2) 洗涤：用生理盐水在 Bio-RAD 洗板机上洗涤一次。

[0055] (3) 封闭

[0056] 封闭液配方：

[0057] $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2g

[0058] $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g

[0059] 胰蛋白胨 10g

[0060] Proclin300 1mL

[0061] 双蒸水 定容至 1000mL

[0062] 将上述试剂称量好放入清洁容器中，加双蒸水定容，混匀后调节 pH 为 7.0。将包被好的 ELISA 板每孔加满封闭液，室温放置 3 小时。甩掉封闭液，在吸水纸上拍干。室温除湿干燥 24 小时。立即进行真空封袋。封袋后放置 15 分钟检查无漏气，如果有漏气需要重新封袋。置 2-8℃ 保存。

[0063] 六、酶标抗体稀释液的配制

[0064] Tris 12.120g

[0065] 小牛血清 10ml

[0066] Proclin300 1mL

[0067] 双蒸水 定容至 1000mL

[0068] 将上述试剂称量好放入清洁容器中，加双蒸水定容，混匀后调节 pH 为 7.4。

[0069] 七、化学发光底物液

[0070] A 液

[0071] Tris 0.2mM

[0072] Luminol 0.15mM

[0073] 羟基香豆素 0.59mM

[0074] 没食子酸 0.35mM

[0075] B 液

[0076] 氨基酸氧化酶 0.85mM

[0077] DTPA 0.5mM

[0078] 维生素 C 0.12mM

[0079] 乙酸 - 乙酸缓冲液 200mM

[0080] Tween 20 (V/V) 0.8%

[0081] 八、20X 洗涤液

[0082] Tris 24.240g

[0083] NaCl 160g

[0084] KCl 4g

[0085] HCl 15ml

[0086] Tween20 20ml

[0087] 去离子水 定容至 1000ml

[0088] 调节 pH7.4 左右。

[0089] 九、半成品及成品组成

[0090] 上述步骤所得产品分装即为半成品，批量制备后用于考察试剂盒的特异性、灵敏

度、精密度及稳定性,合格才能组装成 NT-proBNP 定量检测试剂盒成品。

[0091] 实施例 2 制备本发明的管式人 N 端 B 型利钠肽原定量检测试剂盒

[0092] 除以辣根过氧化物酶标记的 NT-proBNP 单抗,以相同条件准备化学发光底物、包被液及封闭液,只是选用以塑料珠和塑料管为载体,其余均以与实施例 1 相同的方法制备人 N 端 B 型利钠肽原定量检测试剂盒。

[0093] 实施例 3 制备本发明的基于磁微粒子的人 N 端 B 型利钠肽原定量检测试剂盒

[0094] 除以磁性颗粒作为载体外,其余均与以实施例 1 相同的方法制备人 N 端 B 型利钠肽原定量检测试剂盒。

[0095] 实施例 4 本发明的板式人 N 端 B 型利钠肽原定量检测试剂盒的使用方法

[0096] 以上实施例 1 制备的板式人 N 端 B 型利钠肽原定量检测试剂盒的具体操作如下:

[0097] 1) 试剂盒保存于 4℃ 冰箱中,使用前取出室温平衡 15 分钟。

[0098] 2) 取出包被板条,插入板条架中。

[0099] 3) 反应孔中分别加各浓度校准品,每孔分别加 0、100、500、2500、10000、30000pg/ml 各 50 μ l,每孔加酶标记物 50 μ l,用微量震荡器充分振荡混匀,37℃ 温育 1 小时。

[0100] 4) 甩去反应液,每孔加满稀释液后的洗涤液,洗板 5 次,最后在干净的吸水纸上扣干。

[0101] 5) 各孔加化学发光底物液 100 μ l,用微量震荡器充分振荡混匀,室温避光反应 5 分钟。

[0102] 6) 在加化学发光底物液后的第 5 分钟后,在化学发光测量仪依序测定各孔的发光强度 (RLU)。

[0103] 7) 以校准品浓度为横坐标,发光强度 (RLU) 值为纵坐标绘出标准曲线,以各待测血清 RLU 值在标准曲线上查出该血清的 NT-proBNP 的浓度。

[0104] 实施例 5 本发明的板式人 N 端 B 型利钠肽原定量检测试剂盒的方法学鉴定

[0105] 按照本领域中常规的制造及检定规程(请提供引用出处)(参考 2000 版《中国生物制品规程》中有关体外诊断试剂的制检规程格式,主要包括以下几个方面:

[0106] 1. 定义、组成及用途。

[0107] 2. 制造:包括基本要求、专用原材料和制造程序。

[0108] 3. 半成品检定。

[0109] 4. 成品检定。

[0110] 5. 保存及有效期。)

[0111] 对实施例 1 中制备的试剂盒进行检定,相关结论见下表 1:

[0112] 表 1 试剂盒总体评价

[0113]

| 评价项目 | 检验标准 | 检验结果 |
|------------|-------------------|----------|
| 准确性 | 平均回收率 90.0-110.0% | 符合标准 |
| 特异性 | 与多种类似物交叉反应率<0.01% | 符合标准 |
| 精密性 CV (%) | <10% | 符合临床检测标准 |
| 灵敏度 | 100-30000pg/ml | 符合临床检测标准 |
| 稳定性 | 各组分于 4℃ 至少 6 个月 | 符合临床检测标准 |

[0114] 选择已知浓度样本 (21000pg/ml), 用临床确定阴性血清倍比稀释, 检测结果如下:

[0115] 表 2 检测灵敏度测定

[0116]

| 罗氏 (pg/ml) | 本发明 (pg/ml) |
|------------|-------------|
| 21000 | 27110 |
| 10500 | 11980 |
| 5250 | 6210 |
| 2625 | 2911 |
| 1312 | 1602 |
| 656 | 711 |
| 328 | 356 |
| 164 | 181 |
| 82 | 89 |
| 41 | 50 |
| 20 | 24 |

[0117] 结论:说明板式人 N 端 B 型利钠肽原化学发光定量检测试剂盒的准确性、特异性、灵敏度和稳定性完全合格, 并达到临床人 N 端 B 型利钠肽原检测的要求。

[0118] 实施例 6 正常人人 N 端 B 型利钠肽原含量及临界值的确定

[0119] 随机取 168 例健康人血清用实施例 1 ~ 3 中制备的“人 N 端 B 型利钠肽原化学发光定量检测试剂盒”测定结果如下:

[0120] 168 例健康人血清,测得 NT-proBNP 平均值为 44.96pg/ml,标准偏差为 25.93pg/ml,以平均值加上 2.7 倍的标准偏差所对应的浓度值作为临界值,结果为 114.96pg/ml。

[0121] 实施例 7 本发明的板式人 N 端 B 型利钠肽原定量检测试剂盒与 Roche 的电化学发光检测试剂盒比较

[0122] 从重庆第三军医大学西南医院收集经 Roche 的电化学发光检测试剂盒检测过的血清标本,使用实施例 1 的板式人 N 端 B 型利钠肽原化学发光定量检测试剂盒检测,以比较两种试剂盒的相关性。

[0123] 一、临床血清标本的来源

[0124] 从重庆第三军医大学西南医院收集正常人血清 168 份, Roche 的电化学发光检测试剂盒检测定量检测过的血清标本 234 份。

[0125] 二、使用板式人 N 端 B 型利钠肽原定量检测试剂盒与 Roche 的电化学发光检测试剂盒比较

[0126] 1、方法

[0127] 所有收集的血清标本使用本发明实施例 1 的“人 N 端 B 型利钠肽原化学发光定量检测试剂盒”(按说明书操作)和 Roche 的电化学发光检测试剂盒检测定量检测血清标本 234 份,并经统计学处理结果表明,该两种方法检测的结果高度相关,结果如图 3-5。

[0128] 2、结果

[0129] 人 N 端 B 型利钠肽原化学发光定量检测试剂盒 JR-1 型发光仪上测试,与 Roche 的电化学发光检

[0130] 测结果对照见表 3:

[0131] 表 3234 例临床样本 NT-proBNP 检测结果

[0132]

| 编号 | 罗氏 (pg/ml) | 本发明 (pg/ml) | 编号 | 罗氏 (pg/ml) | 本发明 (pg/ml) |
|----|------------|-------------|-----|------------|-------------|
| 1 | 742.4 | 742 | 118 | 10680 | 5762 |
| 2 | 2797 | 2790 | 119 | 3057 | 2883 |
| 3 | 3986 | 5268 | 120 | 5463 | 5050 |
| 4 | 365.6 | 727 | 121 | 3304 | 4646 |
| 5 | 10660 | 4140 | 122 | 809.4 | 1070 |
| 6 | 27.85 | 7 | 123 | 1236 | 1365 |
| 7 | 13011 | 13000 | 124 | 3256 | 3175 |
| 8 | 954.8 | 691 | 125 | 84.24 | 35 |

| | | | | | |
|----|-------|-------|-----|-------|-------|
| 9 | 300 | 300 | 126 | 98.82 | 64 |
| 10 | 2042 | 4092 | 127 | 527.1 | 492 |
| 11 | 2956 | 3068 | 128 | 1367 | 1295 |
| 12 | 6245 | 3447 | 129 | 2544 | 4924 |
| 13 | 643.9 | 517 | 130 | 75.11 | 27 |
| 14 | 155.4 | 167 | 131 | 1573 | 921 |
| 15 | 1076 | 1550 | 132 | 188.4 | 17 |
| 16 | 5933 | 2652 | 133 | 149.5 | 171 |
| 17 | 30700 | 24924 | 134 | 109.9 | 81 |
| 18 | 439.9 | 273 | 135 | 584.1 | 581 |
| 19 | 1722 | 2158 | 136 | 423.4 | 411 |
| 20 | 10730 | 4453 | 137 | 1525 | 951 |
| 21 | 2303 | 1753 | 138 | 628.8 | 1185 |
| 22 | 33.95 | 20 | 139 | 315.4 | 265 |
| 23 | 35000 | 6142 | 140 | 294.8 | 288 |
| 24 | 9512 | 3769 | 141 | 35000 | 26246 |
| 25 | 12582 | 10451 | 142 | 3286 | 2508 |
| 26 | 35000 | 37162 | 143 | 12566 | 5395 |
| 27 | 4510 | 5120 | 144 | 1985 | 2848 |
| 28 | 9874 | 10150 | 145 | 1014 | 390 |
| 29 | 2108 | 1921 | 146 | 778.6 | 1478 |
| 30 | 20.41 | 7 | 147 | 3113 | 4016 |
| 31 | 8096 | 9220 | 148 | 18.01 | 11 |

| | | | | | |
|----|-------|-------|-----|-------|-------|
| 32 | 405.3 | 511 | 149 | 146.3 | 119 |
| 33 | 319.9 | 411 | 150 | 9433 | 6091 |
| 34 | 3327 | 4529 | 151 | 21000 | 20299 |
| 35 | 670.9 | 522 | 152 | 10500 | 10470 |
| 36 | 4114 | 3921 | 153 | 5250 | 5096 |
| 37 | 14.11 | 22 | 154 | 2625 | 2545 |
| 38 | 1255 | 1922 | 155 | 1312 | 1504 |
| 39 | 454.4 | 521 | 156 | 656 | 699 |
| 40 | 4717 | 5096 | 157 | 328 | 229 |
| 41 | 4545 | 6238 | 158 | 164 | 117 |
| 42 | 116.9 | 76 | 159 | 82 | 66 |
| 43 | 3161 | 4281 | 160 | 41 | 29 |
| 44 | 7952 | 10902 | 161 | 20 | 2 |
| 45 | 190.5 | 211 | 162 | 5250 | 4390 |
| 46 | 1675 | 3020 | 163 | 9936 | 8191 |
| 47 | 3087 | 4519 | 164 | 502.3 | 204 |
| 48 | 3947 | 4027 | 165 | 519.9 | 324 |
| 49 | 211.7 | 216 | 166 | 132.4 | 156 |
| 50 | 11761 | 15230 | 167 | 9566 | 6672 |
| 51 | 780.8 | 927 | 168 | 2051 | 5486 |
| 52 | 73.77 | 19 | 169 | 35000 | 36621 |
| 53 | 1471 | 2718 | 170 | 84.58 | 77 |
| 54 | 6016 | 7152 | 171 | 35000 | 27336 |

| | | | | | |
|----|-------|-------|-----|--------|-------|
| 55 | 778.4 | 819 | 172 | 3485 | 3572 |
| 56 | 355.1 | 450 | 173 | 5153 | 4779 |
| 57 | 5007 | 9023 | 174 | 89.74 | 43 |
| 58 | 482.5 | 596 | 175 | 11549 | 12888 |
| 59 | 5808 | 10230 | 176 | 65.18 | 36 |
| 60 | 12237 | 9847 | 177 | 3437 | 2319 |
| 61 | 15181 | 16210 | 178 | 4638 | 7580 |
| 62 | 11517 | 10173 | 179 | 2455 | 3915 |
| 63 | 5525 | 6230 | 180 | 14718 | 20782 |
| 64 | 153.5 | 163 | 181 | 1666 | 949 |
| 65 | 13730 | 14780 | 182 | 2997 | 2374 |
| 66 | 13112 | 20015 | 183 | 438.1 | 305 |
| 67 | 639.5 | 738 | 184 | 3662.7 | 4807 |
| 68 | 7160 | 9240 | 185 | 9759 | 11723 |
| 69 | 3601 | 5020 | 186 | 14768 | 16379 |
| 70 | 283.3 | 203 | 187 | 5891 | 6794 |
| 71 | 1151 | 988 | 188 | 117 | 124 |
| 72 | 310.7 | 296 | 189 | 109 | 38 |
| 73 | 21116 | 25330 | 190 | 42.79 | 15 |
| 74 | 3649 | 2970 | 191 | 74.97 | 36 |
| 75 | 74.86 | 63 | 192 | 35000 | 35248 |
| 76 | 210.1 | 199 | 193 | 259.9 | 158 |
| 77 | 12302 | 13120 | 194 | 834.5 | 186 |

| | | | | | |
|-----|-------|-------|-----|-------|-------|
| 78 | 252.7 | 331 | 195 | 698.9 | 783 |
| 79 | 225.5 | 219 | 196 | 5143 | 7318 |
| 80 | 6024 | 7180 | 197 | 311.2 | 179 |
| 81 | 31.46 | 24 | 198 | 35000 | 29266 |
| 82 | 298.2 | 302 | 199 | 157 | 146 |
| 83 | 42.97 | 12 | 200 | 1826 | 2829 |
| 84 | 35000 | 29870 | 201 | 286.9 | 291 |
| 85 | 31.91 | 22 | 202 | 6482 | 11677 |
| 86 | 6779 | 5420 | 203 | 940.7 | 793 |
| 87 | 2061 | 1920 | 204 | 6373 | 4420 |
| 88 | 1546 | 2134 | 205 | 286.4 | 221 |
| 89 | 21721 | 18526 | 206 | 35000 | 30626 |
| 90 | 407.7 | 419 | 207 | 5808 | 11594 |
| 91 | 1554 | 2018 | 208 | 5018 | 3813 |
| 92 | 2191 | 2018 | 209 | 52.56 | 18 |
| 93 | 3422 | 3121 | 210 | 35000 | 27901 |
| 94 | 2749 | 3069 | 211 | 1218 | 1374 |
| 95 | 12446 | 8217 | 212 | 198.9 | 154 |
| 96 | 600.7 | 522 | 213 | 1092 | 558 |
| 97 | 29.98 | 10 | 214 | 4155 | 14303 |
| 98 | 3654 | 5185 | 215 | 500 | 296 |
| 99 | 1210 | 1524 | 216 | 1261 | 1077 |
| 100 | 61.5 | 54 | 217 | 35000 | 19633 |

| | | | | | |
|-----|-------|------|-----|-------|------|
| 101 | 3605 | 5474 | 218 | 415.9 | 645 |
| 102 | 2766 | 2123 | 219 | 263.1 | 226 |
| 103 | 287.8 | 213 | 220 | 10784 | 4885 |
| 104 | 3656 | 2384 | 221 | 150.3 | 230 |
| 105 | 996.7 | 477 | 222 | 4348 | 5705 |
| 106 | 12165 | 2952 | 223 | 6004 | 3104 |
| 107 | 421 | 218 | 224 | 232.2 | 211 |
| 108 | 2557 | 3256 | 225 | 143.5 | 216 |
| 109 | 3713 | 5478 | 226 | 989 | 2137 |
| 110 | 246.2 | 236 | 227 | 244.3 | 141 |
| 111 | 186.5 | 191 | 228 | 2369 | 4012 |
| 112 | 321.1 | 254 | 229 | 2098 | 6210 |
| 113 | 753.5 | 1556 | 230 | 4042 | 1224 |
| 114 | 353.9 | 349 | 231 | 11312 | 4505 |
| 115 | 190.5 | 114 | 232 | 784.4 | 930 |
| 116 | 9898 | 8961 | 233 | 1464 | 1162 |
| 117 | 974.8 | 850 | 234 | 1219 | 1348 |

[0133]

[0134]

[0135]

[0136]

[0137]

[0138] ①符合率分析

[0139] 以本发明测定的临界值为标准,判断阳性和阴性,将检测结果对照见表4:

[0140] 表4 234例临床样本NT-proBNP检测结果符合率统计表

| | | 罗氏 | | 合计 |
|---------------|----|-----|----|-----|
| | | 阳性 | 阴性 | |
| [0141] 本发明 | 阳性 | 205 | 0 | 205 |
| | 阴性 | 1 | 28 | 29 |
| 合计 | | 206 | 28 | 234 |

[0142] 阳性符合率 = $205/206 \times 100\% = 99.51\%$;

[0143] 阴性符合率 = $28/29 \times 100\% = 96.6\%$;

[0144] 总符合率 = $(205+28)/234 \times 100\% = 99.5\%$ 。(P < 0.01)

[0145] 结论 : 本发明与 Roche 的电化学发光试剂盒检测同样样本的比较结果, 两种方法均高度相关, P 均值 < 0.01。说明两种方法均有同等的使用价值。上述结果表明 : 试剂盒的各项指标均达到试剂盒的标准并满足了 NT-proBNP 临床检测的需求。相对于目前国内进口使用的 Roche 的电化学发光试剂盒, 具有相同的检测效果, 但不需要昂贵的全自动化检测分析仪, 试剂成本低廉的优势, 适合在国内普及推广。

[0146] 虽然本发明已以较佳实施例披露根据上, 然其并非用以限定本发明, 任何所属技术领域的技术人员, 在不脱离本发明之精神和范围内, 当可作些许之更动与改进, 因此本发明之保护范围当视权利要求所界定者为准。



图 1

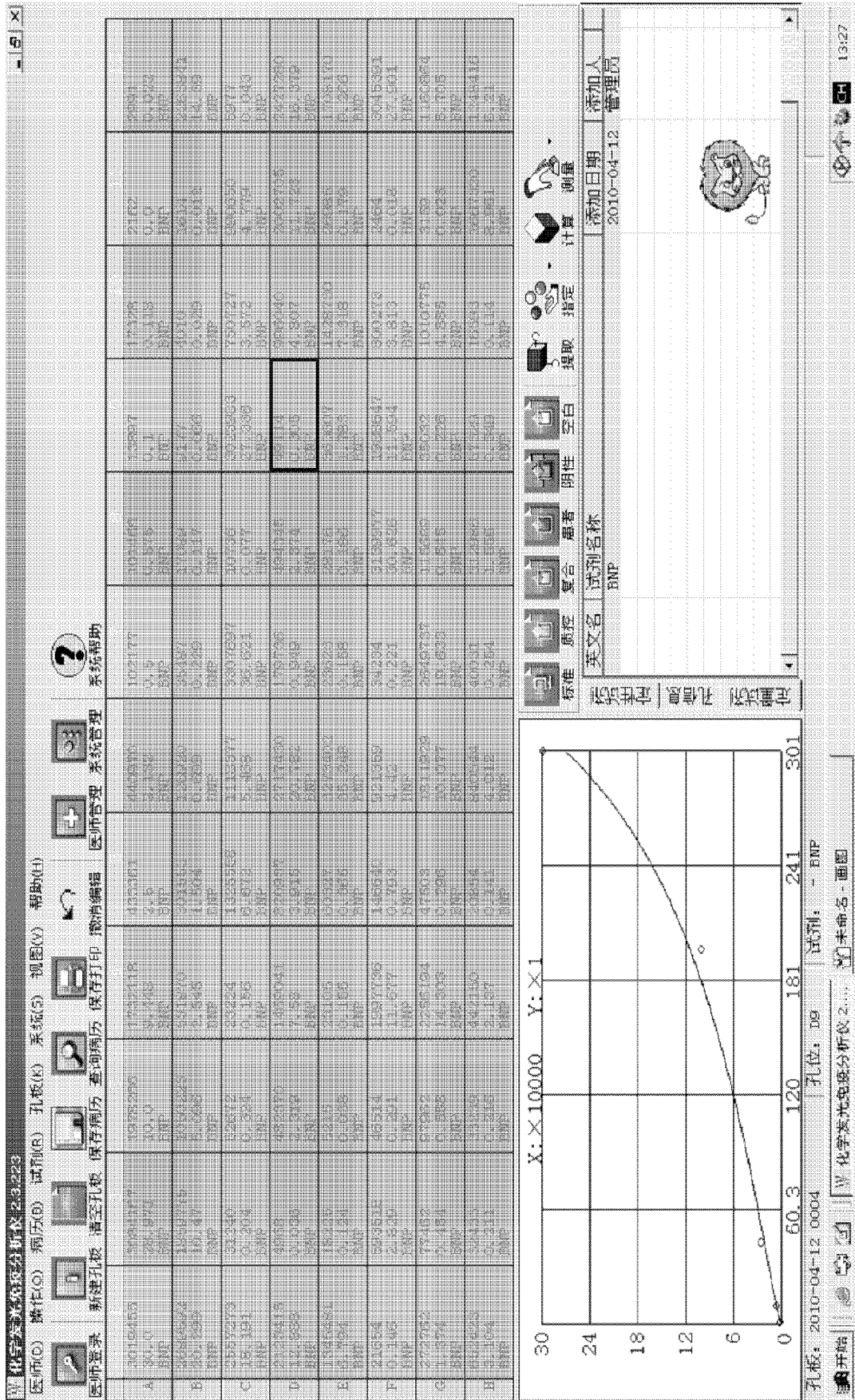


图 2

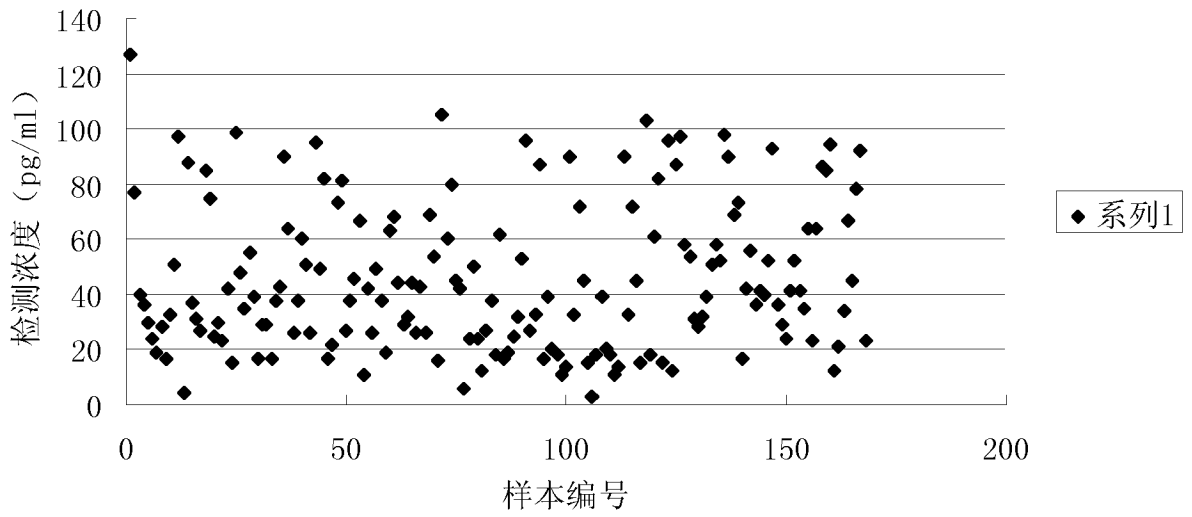


图 3

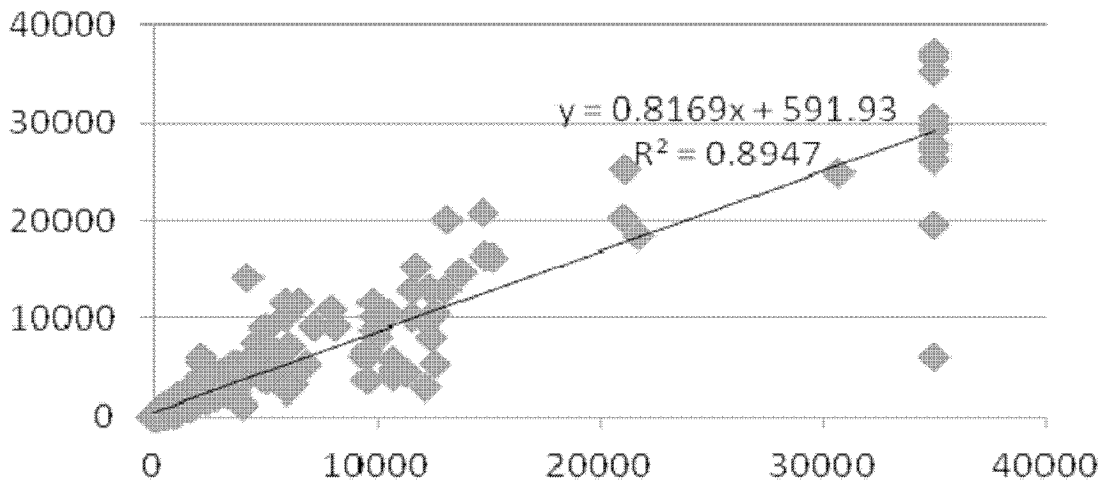


图 4

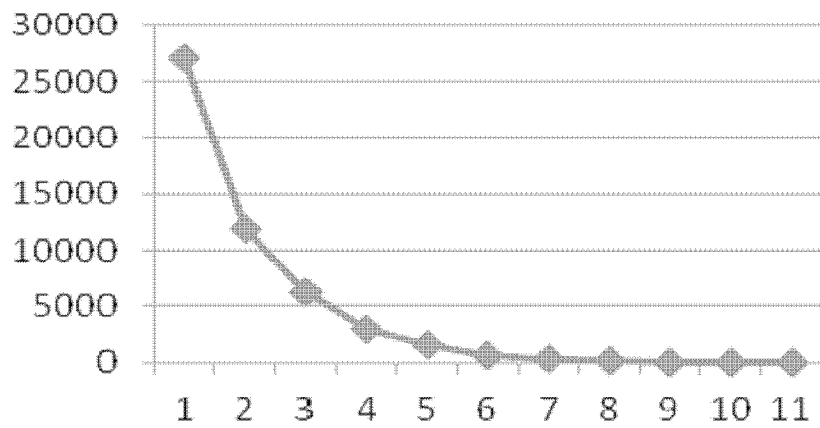


图 5

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 人N端B型利钠肽原免疫分析试剂盒及其制备方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN101819205A | 公开(公告)日 | 2010-09-01 |
| 申请号 | CN201010190866.5 | 申请日 | 2010-06-03 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 中国人民解放军第三军医大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 中国人民解放军第三军医大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 中国人民解放军第三军医大学 | | |
| [标]发明人 | 胡川闽 易维京 陈安 贾向阳 | | |
| 发明人 | 胡川闽 易维京 陈安 贾向阳 | | |
| IPC分类号 | G01N33/577 G01N33/535 G01N33/543 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明提供一种人N端B型利钠肽原免疫分析试剂盒，其主要包括：1)人N端B型利钠肽原校准品；2)包被有人N端B型利钠肽原多克隆抗体的载体；3)酶标记的人N端B型利钠肽原的单克隆抗体；4)上述酶所作用的化学发光底物。本发明还提供上述试剂盒的制备方法。根据本发明的试剂盒，酶标记的人N端B型利钠肽原单抗与载体上包被的人N端B型利钠肽原多抗和被测样品的人N端B型利钠肽原抗原形成“双抗体夹心”结构，既有效地利用了化学发光技术原理、又确保了检测的灵敏性。另外，本发明的试剂盒可应用于开放式的化学发光测量仪，使用成本低，更易推广应用。

