



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107741504 A

(43)申请公布日 2018.02.27

(21)申请号 201710917748.1

(22)申请日 2017.09.30

(71)申请人 安徽伊普诺康生物技术股份有限公司

地址 236000 安徽省合肥市包河经济开发区繁华大道与吉林路交口东南角联东U谷第一期18号楼1-4层

(72)发明人 吴铮 丁先骏 吴泽东 庄庆华  
张金东

(74)专利代理机构 合肥市浩智运专利代理事务所(普通合伙) 34124

代理人 王志兴

(51) Int. Cl.

G01N 33/78(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

(54)发明名称

一种甲状旁腺激素检测试剂盒的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种甲状旁腺激素检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:(1)按试剂R1组分含量,将MOPSO溶于纯化水,调pH,得R1缓冲液;将NaCl、NaN<sub>3</sub>、阿拉伯胶、Tween-80、PEG-2000溶于R1缓冲液,得试剂R1;(2)按试剂R2组分含量,将MOPSO溶于纯化水,调pH,得R2缓冲液;将NaCl、NaN<sub>3</sub>、BSA、甘油溶于R2缓冲液,得R2分散液;制备胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体;R2分散液溶解胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体,得试剂R2。本发明优点为:操作简单、快速,定量检测准确;试剂盒灵敏度高、线性范围;试剂盒稳定性佳,特异性强;成本低、无污染、用于全自动生化分析仪。

1. 一种甲状旁腺激素检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 按照下列组分含量配制试剂R1:

试剂R1:

MOPSO 缓冲液	70-90 mM
NaCl	80-100 mM
NaN <sub>3</sub>	0.5-1.5 g/L
阿拉伯胶	15-20 g/L
Tween-80	2-4 ml/L
PEG-2000	8-12 g/L

其溶剂为纯化水;

①按照上述试剂R1的组分含量,将MOPSO溶于纯化水中,搅拌均匀,调节pH,配制成R1缓冲液;

②按照上述试剂R1的组分含量,将NaCl、NaN<sub>3</sub>、阿拉伯胶、Tween-80、PEG-2000溶于R1缓冲液中,搅拌均匀,待所有原料充分溶解,即制得试剂R1;

(2) 按照下列组分含量配制试剂R2:

试剂R2:

MOPSO 缓冲液	40-60 mM
NaCl	120-130 mM
NaN <sub>3</sub>	0.3-0.7 g/L
BSA	30-50 g/L
甘油	0.5-1.5 ml/L
胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体	0.5-3 %

其溶剂为纯化水;

①按照上述试剂R2的组分含量,将MOPSO溶于纯化水中,搅拌均匀,调节pH,配制成R2缓冲液;

②按照上述试剂R2的组分含量,将NaCl、NaN<sub>3</sub>、BSA、甘油溶于R2缓冲液中,搅拌均匀,即得R2分散液;

③制备胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体:

a. 取粒径为80nm和120nm的胶乳微球于MES缓冲液中,加入EDAC溶液混匀后于37℃环境

中孵育混匀1h,离心去上清;再加入NHS溶液恢复至原体积后,混匀于37°C环境中孵育混匀1h,离心去上清,得混合微球乳液;

b. 在混合微球乳液中加入聚乙烯对氯甲基苯乙烯共聚物,共聚80nm和120nm粒径的胶乳;离心沉淀,将剩余物质分散于MES缓冲液中,反复2-4次,最后于MES缓冲液中恢复至原体积,再加入甲状旁腺多克隆抗体,于37°C下反应3-4h,离心,将沉淀物分散于原体积的PBS缓冲液中,反复2-4次,最后将沉淀物分散于原体积的NHS缓冲液中,加入BSA;

c. 2-8°C封存45-50h,得最终所需的胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体;

④用R2分散液来溶解得到的胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体,超声分散,最终制得试剂R2;其中,聚乙烯对氯甲基苯乙烯共聚物在试剂R2中的最终浓度为9%-11%。

2. 根据权利要求1所述的甲状旁腺激素检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中,R1缓冲液的pH为6.5。

3. 根据权利要求1所述的甲状旁腺激素检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中,R2缓冲液的pH为6.5。

4. 根据权利要求1所述的甲状旁腺激素检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述制备胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体的步骤a中,采用的MES缓冲液为100mM MES缓冲液。

5. 根据权利要求1所述的甲状旁腺激素检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述制备胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体的步骤a中,采用的EDAC溶液为50g/L的EDAC溶液。

6. 根据权利要求1所述的甲状旁腺激素检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述制备胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体的步骤a中,采用的NHS溶液为50g/L的NHS溶液。

7. 根据权利要求1所述的甲状旁腺激素检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述制备胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体的步骤b中,加入的BSA为30g/L的BSA。

## 一种甲状旁腺激素检测试剂盒的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医学检验技术领域,尤其涉及一种甲状旁腺激素检测试剂盒的制备方法。

### 背景技术

[0002] 甲状旁腺激素(parathyroid hormone),是甲状旁腺主细胞分泌的碱性单链多肽类激素,简称PTH。甲状旁腺激素由84个氨基酸组成,主要功能是调节脊椎动物体内钙和磷的代谢,促使血钙水平升高,血磷水平下降。

[0003] 在甲状旁腺主细胞内首先合成PTH的第一前身物质,称为前甲状旁腺激素原,含115个氨基酸,以后这一前身物质在细胞内裂解成为含90个氨基酸的第二前身物质甲状旁腺激素原,后者进而在细胞内裂解成为含84个氨基酸的多肽,即PTH。正常人血浆中PTH的浓度约为1纳克/毫升。

[0004] 目前,检测甲状旁腺激素的方法主要是酶联免疫吸附法和放射免疫分析法。其中,酶联免疫吸附法操作繁琐,定量检测效果不佳,结果受人为因素影响结果较大;放射免疫分析法则有放射型污染,且所需仪器较昂贵。

[0005] 因此,目前急需一种操作简单、定量检测准确、无污染、成本低的甲状旁腺激素检测试剂盒的制备方法。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供了一种操作简单、定量检测准确、无污染、成本低的甲状旁腺激素检测试剂盒的制备方法。

[0007] 本发明是通过以下技术方案实现的:一种甲状旁腺激素检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0008] (1)按照下列组分含量配制试剂R1:

[0009] 试剂R1:

	MOPSO 缓冲液	70-90 mM
	NaCl	80-100 mM
	NaN <sub>3</sub>	0.5-1.5 g/L
[0010]	阿拉伯胶	15-20 g/L
	Tween-80	2-4 ml/L
	PEG-2000	8-12 g/L

其溶剂为纯化水；

[0011] ①按照上述试剂R1的组分含量，将MOPSO溶于纯化水中，搅拌均匀，调节pH，配制成R1缓冲液；

[0012] ②按照上述试剂R1的组分含量，将NaCl、NaN<sub>3</sub>、阿拉伯胶、Tween-80、PEG-2000溶于R1缓冲液中，搅拌均匀，待所有原料充分溶解，即制得试剂R1；

[0013] (2) 按照下列组分含量配制试剂R2：

[0014] 试剂R2：

	MOPSO 缓冲液	40-60 mM
	NaCl	120-130 mM
	NaN <sub>3</sub>	0.3-0.7 g/L
[0015]	BSA	30-50 g/L
	甘油	0.5-1.5 ml/L
	胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体	0.5-3 %

[0016] 其溶剂为纯化水；

[0017] ①按照上述试剂R2的组分含量，将MOPSO溶于纯化水中，搅拌均匀，调节pH，配制成R2缓冲液；

[0018] ②按照上述试剂R2的组分含量，将NaCl、NaN<sub>3</sub>、BSA、甘油溶于R2缓冲液中，搅拌均匀，即得R2分散液；

[0019] ③制备胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体：

[0020] a. 取粒径为80nm和120nm的胶乳微球于MES缓冲液中，加入EDAC溶液混匀后于37℃环境中孵育混匀1h，离心去上清；再加入NHS溶液恢复至原体积后，混匀于37℃环境中孵育混匀1h，离心去上清，得混合微球乳液；

[0021] b. 在混合微球乳液中加入聚乙烯对氯甲基苯乙烯共聚物，共聚80nm和120nm粒径的胶乳；离心沉淀，将剩余物质分散于MES缓冲液中，反复2-4次，最后于MES缓冲液中恢复至

原体积,再加入甲状旁腺多克隆抗体,于37℃下反应3-4h,离心,将沉淀物分散于原体积的PBS缓冲液中,反复2-4次,最后将沉淀物分散于原体积的NHS缓冲液中,加入BSA;

[0022] c. 2-8℃封存45-50h,得最终所需的胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体;

[0023] ④用R2分散液来溶解得到的胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体,超声分散,最终制得试剂R2;其中,聚乙烯对氯甲基苯乙烯共聚物在试剂R2中的最终浓度为9%-11%。

[0024] 作为本发明的优选方式之一,所述步骤(1)中,R1缓冲液的pH为6.5。

[0025] 作为本发明的优选方式之一,所述步骤(2)中,R2缓冲液的pH为6.5。

[0026] 作为本发明的优选方式之一,所述制备胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体的步骤a中,采用的MES缓冲液为100mM MES缓冲液。

[0027] 作为本发明的优选方式之一,所述制备胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体的步骤a中,采用的EDAC溶液为50g/L的EDAC溶液。

[0028] 作为本发明的优选方式之一,所述制备胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体的步骤a中,采用的NHS溶液为50g/L的NHS溶液。

[0029] 作为本发明的优选方式之一,所述制备胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体的步骤b中,加入的BSA为30g/L的BSA。

[0030] 本发明相比现有技术的优点在于:

[0031] (1) 采用本方法制备的试剂盒具有较高的检测灵敏度,操作简单、定量检测准确、快速,从检测到出结果只需10分钟;

[0032] (2) 胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体的制备过程中,采取了不同粒径的胶乳微球混合使用,大大提高了试剂盒的灵敏度和线性范围;

[0033] (3) 采用本方法制备的试剂盒与样品所形成的抗原抗体复合物,稳定性佳,在特定波长下有一定的吸光度,特异性强;

[0034] (4) 采用本方法制备的试剂盒可直接用于全自动生化分析仪上,无需大型仪器设备配合,成本低,且无放射性污染,可大规模的开展和推广。

## 具体实施方式

[0035] 下面对本发明的实施例作详细说明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0036] 实施例1

[0037] 本实施例的一种甲状旁腺激素检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0038] (1) 按照下列组分含量配制试剂R1:

[0039] 试剂R1:

	MOPSO 缓冲液 (pH 6.5)	70 mM
	NaCl	80 mM
	NaN <sub>3</sub>	0.5 g/L
[0040]	阿拉伯胶	15 g/L
	Tween-80	2 ml/L
	PEG-2000	8 g/L

其溶剂为纯化水；

[0041] ①按照上述试剂R1的组分含量，将MOPSO溶于纯化水中，搅拌均匀，调节pH，配制成R1缓冲液；

[0042] ②按照上述试剂R1的组分含量，将NaCl、NaN<sub>3</sub>、阿拉伯胶、Tween-80、PEG-2000溶于R1缓冲液中，搅拌均匀，待所有原料充分溶解，即制得试剂R1；

[0043] (2) 按照下列组分含量配制试剂R2：

[0044] 试剂R2：

	MOPSO 缓冲液 (pH 6.5)	40 mM
	NaCl	120 mM
	NaN <sub>3</sub>	0.3 g/L
[0045]	BSA	30 g/L
	甘油	0.5 ml/L
	胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体	0.5 %

其溶剂为纯化水；

[0046] ①按照上述试剂R2的组分含量，将MOPSO溶于纯化水中，搅拌均匀，调节pH，配制成R2缓冲液；

[0047] ②按照上述试剂R2的组分含量，将NaCl、NaN<sub>3</sub>、BSA、甘油溶于R2缓冲液中，搅拌均匀，即得R2分散液；

[0048] ③制备胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体：

[0049] a. 取粒径为80nm和120nm的胶乳微球于100mM MES缓冲液中，加入50g/L EDAC溶液混匀后于37℃环境中孵育混匀1h，离心去上清；再加入50g/L NHS溶液恢复至原体积后，混匀于37℃环境中孵育混匀1h，离心去上清，得混合微球乳液；

[0050] b. 在混合微球乳液中加入聚乙烯对氯甲基苯乙烯共聚物，共聚80nm和120nm粒径

的胶乳；离心沉淀，将剩余物质分散于MES缓冲液中，反复2次，最后于MES缓冲液中恢复至原体积，再加入甲状旁腺多克隆抗体，于37℃下反应3h，离心，将沉淀物分散于原体积的PBS缓冲液中，反复2次，最后将沉淀物分散于原体积的NHS缓冲液中，加入BSA 30g/L；

[0051] c. 2℃封存45h，得最终所需的胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体；

[0052] ④用R2分散液来溶解得到的胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体，超声分散，最终制得试剂R2；其中，聚乙烯对氯甲基苯乙烯共聚物在试剂R2中的最终浓度为9%。

[0053] 实施例2

[0054] 本实施例的一种甲状旁腺激素检测试剂盒的制备方法，包括如下步骤：

[0055] (1) 按照下列组分含量配制试剂R1：

[0056] 试剂R1：

MOPSO 缓冲液 (pH 6.5) 90 mM

NaCl 100 mM

[0057]

NaN<sub>3</sub> 1.5 g/L

阿拉伯胶 20 g/L

Tween-80 4 ml/L

[0058] PEG-2000 12 g/L

其溶剂为纯化水；

[0059] ①按照上述试剂R1的组分含量，将MOPSO溶于纯化水中，搅拌均匀，调节pH，配制成R1缓冲液；

[0060] ②按照上述试剂R1的组分含量，将NaCl、NaN<sub>3</sub>、阿拉伯胶、Tween-80、PEG-2000溶于R1缓冲液中，搅拌均匀，待所有原料充分溶解，即制得试剂R1；

[0061] (2) 按照下列组分含量配制试剂R2：

[0062] 试剂R2：

MOPSO 缓冲液 (pH 6.5) 60 mM

NaCl 130 mM

NaN<sub>3</sub> 0.7 g/L

[0063] BSA 50 g/L

甘油 1.5 ml/L

胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体 3 %

其溶剂为纯化水；

[0064] ①按照上述试剂R2的组分含量,将MOPSO溶于纯化水中,搅拌均匀,调节pH,配制成R2缓冲液;

[0065] ②按照上述试剂R2的组分含量,将NaCl、NaN<sub>3</sub>、BSA、甘油溶于R2缓冲液中,搅拌均匀,即得R2分散液;

[0066] ③制备胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体:

[0067] a.取粒径为80nm和120nm的胶乳微球于100mM MES缓冲液中,加入50g/L EDAC溶液混匀后于37℃环境中孵育混匀1h,离心去上清;再加入50g/L NHS溶液恢复至原体积后,混匀于37℃环境中孵育混匀1h,离心去上清,得混合微球乳液;

[0068] b.在混合微球乳液中加入聚乙烯对氯甲基苯乙烯共聚物,共聚80nm和120nm粒径的胶乳;离心沉淀,将剩余物质分散于MES缓冲液中,反复4次,最后于MES缓冲液中恢复至原体积,再加入甲状旁腺多克隆抗体,于37℃下反应4h,离心,将沉淀物分散于原体积的PBS缓冲液中,反复4次,最后将沉淀物分散于原体积的NHS缓冲液中,加入BSA 30g/L;

[0069] c.8℃封存50h,得最终所需的胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体;

[0070] ④用R2分散液来溶解得到的胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体,超声分散,最终制得试剂R2;其中,聚乙烯对氯甲基苯乙烯共聚物在试剂R2中的最终浓度为11%。

[0071] 实施例3

[0072] 本实施例的一种甲状旁腺激素检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0073] (1)按照下列组分含量配制试剂R1:

[0074] 试剂R1:

MOPSO 缓冲液 (pH 6.5)	80 mM
NaCl	90 mM
NaN <sub>3</sub>	1.0 g/L
[0075] 阿拉伯胶	18 g/L
Tween-80	3 ml/L
PEG-2000	10 g/L

其溶剂为纯化水;

[0076] ①按照上述试剂R1的组分含量,将MOPSO溶于纯化水中,搅拌均匀,调节pH,配制成R1缓冲液;

[0077] ②按照上述试剂R1的组分含量,将NaCl、NaN<sub>3</sub>、阿拉伯胶、Tween-80、PEG-2000溶于R1缓冲液中,搅拌均匀,待所有原料充分溶解,即制得试剂R1;

[0078] (2)按照下列组分含量配制试剂R2:

[0079] 试剂R2:

	MOPSO 缓冲液 (pH 6.5)	50 mM
	NaCl	125 mM
	NaN <sub>3</sub>	0.5 g/L
[0080]	BSA	40 g/L
	甘油	1 ml/L
	胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体	1.5 %

其溶剂为纯化水;

[0081] ①按照上述试剂R2的组分含量,将MOPSO溶于纯化水中,搅拌均匀,调节pH,配制成R2缓冲液;

[0082] ②按照上述试剂R2的组分含量,将NaCl、NaN<sub>3</sub>、BSA、甘油溶于R2缓冲液中,搅拌均匀,即得R2分散液;

[0083] ③制备胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体:

[0084] a. 取粒径为80nm和120nm的胶乳微球于100mM MES缓冲液中,加入50g/L EDAC溶液混匀后于37℃环境中孵育混匀1h,离心去上清;再加入50g/L NHS溶液恢复至原体积后,混匀于37℃环境中孵育混匀1h,离心去上清,得混合微球乳液;

[0085] b. 在混合微球乳液中加入聚乙烯对氯甲基苯乙烯共聚物,共聚80nm和120nm粒径的胶乳;离心沉淀,将剩余物质分散于MES缓冲液中,反复3次,最后于MES缓冲液中恢复至原体积,再加入甲状旁腺多克隆抗体,于37℃下反应3.5h,离心,将沉淀物分散于原体积的PBS缓冲液中,反复3次,最后将沉淀物分散于原体积的NHS缓冲液中,加入BSA 30g/L;

[0086] c. 4℃封存48h,得最终所需的胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体;

[0087] ④用R2分散液来溶解得到的胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体,超声分散,最终制得试剂R2;其中,聚乙烯对氯甲基苯乙烯共聚物在试剂R2中的最终浓度为10%。

[0088] 实施例4

[0089] 本实施例的采用上述实施例方法制备得到的甲状旁腺激素检测试剂盒的使用方法,包括如下步骤:

[0090] (1) 将4uL待测样品与150uL试剂R1混合,37℃孵育5min;

[0091] (2) 用全自动生化分析仪在波长600nm处测定反应后的吸光度A1;

[0092] (3) 再与50uL试剂R2混合,37℃反应5min;

[0093] (4) 用全自动生化分析仪在波长600nm处测定反应后的吸光度A2;

[0094] (5) 根据吸光度变化值  $\Delta A = A_2 - A_1$ ,计算出样本中甲状旁腺激素的浓度。

[0095] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	一种甲状旁腺激素检测试剂盒的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107741504A</a>	公开(公告)日	2018-02-27
申请号	CN201710917748.1	申请日	2017-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	安徽伊普诺康生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	安徽伊普诺康生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	安徽伊普诺康生物技术股份有限公司		
[标]发明人	吴铮 丁先骏 吴泽东 庄庆华 张金东		
发明人	吴铮 丁先骏 吴泽东 庄庆华 张金东		
IPC分类号	G01N33/78 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/78 G01N33/531 G01N2333/635		
代理人(译)	王志兴		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)	MOPSO 缓冲液	70-90 mM
<p>本发明公开了一种甲状旁腺激素检测试剂盒的制备方法，包括如下步骤：(1)按试剂R1组分含量，将MOPSO溶于纯化水，调pH，得R1缓冲液；将NaCl、NaN<sub>3</sub>、阿拉伯胶、Tween-80、PEG-2000溶于R1缓冲液，得试剂R1；(2)按试剂R2组分含量，将MOPSO溶于纯化水，调pH，得R2缓冲液；将NaCl、NaN<sub>3</sub>、BSA、甘油溶于R2缓冲液，得R2分散液；制备胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体；R2分散液溶解胶乳包被的甲状旁腺多克隆抗体，得试剂R2。本发明优点为：操作简单、快速，定量检测准确；试剂盒灵敏度高、线性范围；试剂盒稳定性佳，特异性强；成本低、无污染、用于全自动生化分析仪。</p>	NaCl	80-100 mM
	NaN <sub>3</sub>	0.5-1.5 g/L
	阿拉伯胶	15-20 g/L
	Tween-80	2-4 ml/L
	PEG-2000	8-12 g/L
	其溶剂为纯化水；	