



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109212181 A

(43)申请公布日 2019.01.15

(21)申请号 201810942522.1

(22)申请日 2018.08.17

(71)申请人 泰州泽成生物技术有限公司

地址 225300 江苏省泰州市中国医药城口
泰路西侧、陆家路东侧G59幢62号西半
侧一至四层

(72)发明人 王赞 刘振世 石慧 程云燕

江川 刘振国

(74)专利代理机构 北京联瑞联丰知识产权代理

事务所(普通合伙) 11411

代理人 黄冠华

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

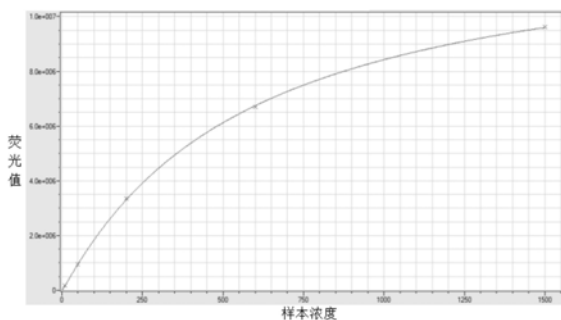
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白
检测试剂盒及其制备方法和使用方法

(57)摘要

本发明公开了一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒及其制备方法和使用方法;所述试剂盒内包括荧光素标记的NGAL抗体溶液、碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液、包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液、NGAL校准品和发光底物溶液;本发明的试剂盒将免疫磁微粒技术和化学发光技术相结合,提供了一种接近均相的反应体系,让连接标记示踪物的NGAL抗体与连接桥连物的NGAL抗体先与待检测抗体反应,形成双抗原夹心结构的复合物;由于在形成双抗原夹心复合物的过程中,与标记抗原的都是小分子物质,其空间位阻远远小于磁性微球的空间位阻,能够促进抗原-抗体结合反应充分进行,使得灵敏度、精密度、检测范围等检测性能大大提高。



1. 一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒内包括荧光素标记的NGAL抗体溶液、碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液、包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液、NGAL校准品和发光底物溶液;

所述荧光素标记的NGAL抗体溶液是将NGAL抗体加入到含有荧光素的pH为7-9的Tris-HCl缓冲液反应制备而成;

所述碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液由碱性磷酸酶与NGAL抗体通过交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯连接而成;

所述包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液是将荧光素抗体与含有羧基活性基团的磁微粒混合反应而成;

所述NGAL校准品是将NGAL抗原溶解到校准品缓冲溶液中配制而成,所述校准品缓冲溶液是通过在1L的新生牛血清中加入0.01g~0.05g的四环素和0.1g~0.5g的硫酸新霉素,完全溶解后经过0.22 μ m滤膜处理制备而成;

所述发光底物溶液是将发光底物溶解于含有Tris、氯化钠(NaCl)、亚硫酸钠(Na₂SO₃)和Proclin-300的底物中配制而成。

2. 根据权利要求1所述的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒,其特征在:

所述荧光素标记的NGAL抗体溶液浓度为0.8-1.2 μ g/mL,pH为7-9;

所述碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液浓度为0.5-0.8 μ g/ml,pH为7-9。

3. 一种如权利要求1或2所述的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1) 制备所述荧光素标记的NGAL抗体溶液:

(1-1) 配制含有荧光素的pH为7-9的Tris-HCl缓冲液,所述缓冲液中含有4-8wt%的聚乙二醇6000(PEG-6000)、0.7-0.9wt%的氯化钠、0.08-0.1wt%的叠氮钠、0.6wt%的ProClin-300、0.8-1wt%的牛血清白蛋白和20mM乙二胺四乙酸二钠(EDTA);

(1-2) 按照所述荧光素与所述NGAL抗体分子比为150:1的比例,将步骤(1-1)中pH为7-9缓冲液与NGAL抗体混合,充分混匀,室温静置反应;

(1-3) 将步骤(1-2)中的反应液通过G-25凝胶柱分离未结合的荧光素,得到含荧光素标记的NGAL抗体溶液;

(2) 制备所述碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液:

(2-1) 使用二甲基亚砜溶剂将NGAL抗体溶解,使溶解后的NGAL抗体浓度为30-60mg/mL,加入交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯混合均匀,置于室温反应2-3小时;取适量二甲基亚砜溶剂对NGAL抗体与辛二酸二琥珀酰亚胺酯的连接物进行稀释,使稀释后的二甲基亚砜溶剂和NGAL抗体与辛二酸二琥珀酰亚胺酯的连接物的体积比为1:10,并将得到混合溶液置于2-8 $^{\circ}$ C下保存备用;

(2-2) 按照碱性磷酸酶与步骤(2-1)中交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯的摩尔比为1:2的量将浓度为1-2mg/mL的碱性磷酸酶缓冲液加入步骤(2-1)中的混合溶液并混合均匀,室温放置反应1.5h;

(2-3) 将步骤(2-2)中的反应液通过G-25凝胶柱除盐,即得所述碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液;

(3) 制备所述包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液:

(3-1) 在偶联剂碳二亚胺的环境下,将含有羧基活性基团的磁微粒与荧光素抗体混合均匀,室温放置反应10-20h,磁分离,除上清液,即得到所述包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液;

(4) 制备所述NGAL校准品:

(4-1) 配制校准品缓冲溶液:在1L的新生牛血清中加入0.01g~0.05g的四环素和0.1g~0.5g的硫酸新霉素,完全溶解后经过0.22 μ m滤膜处理制备而成;

(4-2) 用所述校准品缓冲溶液溶解NGAL抗原,即得所述NGAL校准品;

(5) 制备所述发光底物溶液:

(5-1) 取Tris 2g、氯化钠(NaCl) 6g、亚硫酸钠(Na₂SO₃) 0.005g和Proclin-300 0.5mL于烧杯中,加入600mL纯化水,充分搅拌混匀至溶解,调节pH至7.5;加200mL发光底物,用0.2 μ m滤器过滤,纯化水定容至1000mL,混匀即得所述发光底物溶液。

4. 根据权利要求3所述的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒的制备方法,其特征在:所述发光底物为Lumi-Phos 480、金刚烷、鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物和吡啶酯中的至少一种。

5. 根据权利要求3所述的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒的制备方法,其特征在:所述磁微粒具有超顺磁性,每克磁微粒上所带的羧基活性基团含量不小于0.5mmol;所述荧光素抗体为单克隆抗体,稀释效价大于1:100万。

6. 一种如权利要求1或2所述的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒的使用方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1) 免疫反应:在反应管中加入待检测样本,依次加入所述试剂盒中的荧光素标记的NGAL抗体溶液和含碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液,混匀,20-40 $^{\circ}$ C下温育30min;加入所述试剂盒中的磁微粒悬浮液,混匀,20-40 $^{\circ}$ C下温育30min,得到固定在磁性微球上的双抗原夹心复合物;

(2) 洗涤:在步骤(1)中得到的固定在磁性微球上的双抗原夹心复合物的反应管中加入清洗液,并震荡,使磁微粒在磁场中沉降,除去上清液,清除掉没有通过待测抗体形成双抗原夹心复合物的连接标记示踪物的抗原,重复本步骤3-5次;所述清洗液是通过将160NaCl、4gKCl、24.2g三羟甲基氨基甲烷(Tris)、1mL吐温20溶于900mL双蒸水中,用HCl调整至PH7.4,用双蒸水定容至1000ml,并用双蒸水稀释15倍制备而成;

(3) 加底物检测:在经过步骤(2)洗涤后的反应管中加入所述试剂盒中的发光底物溶液,充分混匀,检测发光值;

(4) 采用四参数拟合方式,以校准品浓度值为X轴,以NGAL校准品发光强度值为Y轴,建立标准曲线,根据待测样本的发光强度值回算待测样本的浓度值。

一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒及其制备方法和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及体外检测技术领域,特别涉及一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒及其制备方法和使用方法。

背景技术

[0002] 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 生理状态下是一种生长因子,主要参与了早期肾脏上皮的发生、生长。在正常组织包括肾脏,肺,胃及结肠的上皮组织中表达量较低。在发生缺血性和毒性肾损伤过程中,肾小管上皮细胞中的NGAL将显著增加,在开始的两个小时内,尿液和血液中NGAL水平将显著增加,因此NGAL是早期急性肾损伤的敏感标志物。

[0003] NGAL也是反映肾脏慢性损害的一种有潜力的新标记物,在慢性肾脏病(chronic kidney disease,CKD)患者中,NGAL能确切反映肾脏损害的程度,是CKD进展的一个强力和独立的风险指标。

[0004] 目前中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测方法多采用免疫学方法。免疫学检测技术利用抗原、抗体特异性反应原理检测机体内待测物质的技术。放射免疫检测、荧光免疫检测、酶联免疫检测及化学发光检测技术逐渐发展成熟,并逐步取代了传统的免疫沉淀、免疫凝聚等技术,免疫学检测技术的发展使临床检测检验发生了巨大的变化:可检测项目剧增、检测灵敏度和特异度更高,自动化程度增加。尤其是后期发展的化学发光免疫检测技术进一步提高了检测的灵敏度和特异度等检测性能,为疾病的定量检测、诊断、治疗提供了直观的资料。

[0005] 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白对急性肾损伤、慢性肾脏病等疾病的诊断具有无可替代的参考作用。目前我国批准上市的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂多为国产,采用的检测生物学多为酶免和化学发光。酶免检测法在检测灵敏度、检测线性范围等方面远不及化学发光检测法。此外化学发光还具有底物危害小、有效期长、干扰因素少、自动化程度高等优势。因此,在面对成分复杂的临床待测样品,化学发光表现更胜一筹。磁微粒免疫检测技术是利用高分子材料合成的一定颗粒大小的磁性固相微粒作载体,以物理吸附、化学偶联等方法包被上具有特异性亲和力的抗体或抗原等各种免疫活性物质,具有分离速度快、效率高、重复性好、操作简单、不影响被分离细胞或其他生物材料的生物学形状和功能等特点,在外加磁场作用下可定向运动,使得某些特殊成分得以分离、浓缩或纯化。

发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题是提供一种将磁分离技术和化学发光技术相结合,简单快速,结果准确的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒及其制备方法和使用方法。

[0007] 为了解决上述技术问题,本发明的技术方案为:

[0008] 一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒,所述试剂盒内包括荧光素标记的 NGAL抗体溶液、碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液、包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液、NGAL校准品和发光底物溶液;

[0009] 所述荧光素标记的NGAL抗体溶液是将NGAL抗体加入到含有荧光素的pH为7-9的Tris-HCl缓冲液反应制备而成;

[0010] 所述碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液由碱性磷酸酶与NGAL抗体通过交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯连接而成;

[0011] 所述包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液是将荧光素抗体与含有羧基活性基团的磁微粒混合反应而成;

[0012] 所述NGAL校准品是将NGAL抗原溶解到校准品缓冲溶液中配制而成,所述校准品缓冲溶液是通过在1L的新生牛血清中加入0.01g~0.05g的四环素和0.1g~0.5g的硫酸新霉素,完全溶解后经过0.22 μ m滤膜处理制备而成;

[0013] 所述发光底物溶液是将发光底物溶解于含有Tris、氯化钠(NaCl)、亚硫酸钠(Na₂SO₃)和Proclin-300的底物中配制而成。

[0014] 优选的,所述荧光素标记的NGAL抗体溶液浓度为0.8-1.2 μ g/mL,pH为7-9;

[0015] 所述碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液浓度为0.5-0.8 μ g/ml,pH为7-9。

[0016] 一种所述的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0017] (1) 制备所述荧光素标记的NGAL抗体溶液:

[0018] (1-1) 配制含有荧光素的pH为7-9的Tris-HCl缓冲液,所述缓冲液中含有4-8wt%的聚乙二醇6000(PEG-6000)、0.7-0.9wt%的氯化钠、0.08-0.1wt%的叠氮钠、0.6wt%的ProClin-300、0.8-1wt%的牛血清白蛋白和20mM乙二胺四乙酸二钠(EDTA);

[0019] (1-2) 按照所述荧光素与所述NGAL抗体分子比为150:1的比例,将步骤(1-1)中 pH为7-9缓冲液与NGAL抗体混合,充分混匀,室温静置反应;

[0020] (1-3) 将步骤(1-2)中的反应液通过G-25凝胶柱分离未结合的荧光素,得到含荧光素标记的NGAL抗体溶液;

[0021] (2) 制备所述碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液:

[0022] (2-1) 使用二甲基亚砜溶剂将NGAL抗体溶解,使溶解后的NGAL抗体浓度为 30-60mg/mL,加入交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯混合均匀,置于室温反应2-3小时;取适量二甲基亚砜溶剂对NGAL抗体与辛二酸二琥珀酰亚胺酯的连接物进行稀释,使稀释后的二甲基亚砜溶剂和NGAL抗体与辛二酸二琥珀酰亚胺酯的连接物的体积比为1:10,并将得到混合溶液置于2-8 $^{\circ}$ C下保存备用;

[0023] (2-2) 按照碱性磷酸酶与步骤(2-1)中交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯的摩尔比为1:2 的量将浓度为1-2mg/mL的碱性磷酸酶缓冲液加入步骤(2-1)中的混合溶液并混合均匀,室温放置反应1.5h;

[0024] (2-3) 将步骤(2-2)中的反应液通过G-25凝胶柱除盐,即得所述碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液;

[0025] (3) 制备所述包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液:

[0026] (3-1) 在偶联剂碳二亚胺的环境下,将含有羧基活性基团的磁微粒与荧光素抗体混合均匀,室温放置反应10-20h,磁分离,除上清液,即得到所述包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液;

[0027] (4) 制备所述NGAL校准品:

[0028] (4-1) 配制校准品缓冲溶液:在1L的新生牛血清中加入0.01g~0.05g的四环素和0.1g~0.5g的硫酸新霉素,完全溶解后经过0.22 μ m滤膜处理制备而成;

[0029] (4-2) 用所述校准品缓冲溶液溶解NGAL抗原,即得所述NGAL校准品;

[0030] (5) 制备所述发光底物溶液:

[0031] (5-1) 取Tris 2g、氯化钠(NaCl) 6g、亚硫酸钠(Na_2SO_3) 0.005g和Proclin-300 0.5mL 于烧杯中,加入600mL纯化水,充分搅拌混匀至溶解,调节pH至7.5;加200mL发光底物,用0.2 μ m滤器过滤,纯化水定容至1000mL,混匀即得所述发光底物溶液。

[0032] 优选的,所述发光底物为Lumi-Phos 480、金刚烷、鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物和吡啶酯中的至少一种。

[0033] 优选的,所述磁微粒具有超顺磁性,每克磁微粒上所带的羧基活性基团含量不小于 0.5mmol;所述荧光素抗体为单克隆抗体,稀释效价大于1:100万。

[0034] 一种所述的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒的使用方法,包括如下步骤:

[0035] (1) 免疫反应:在反应管中加入待检测样本,依次加入所述试剂盒中的荧光素标记的 NGAL抗体溶液和含碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液,混匀,20-40 $^{\circ}\text{C}$ 下温育30min;加入所述试剂盒中的磁微粒悬浮液,混匀,20-40 $^{\circ}\text{C}$ 下温育30min,得到固定在磁性微球上的双抗原夹心复合物;

[0036] (2) 洗涤:在步骤(1)中得到的固定在磁性微球上的双抗原夹心复合物的反应管中加入清洗液,并震荡,使磁微粒在磁场中沉降,除去上清液,清除掉没有通过待测抗体形成双抗原夹心复合物的连接标记示踪物的抗原,重复本步骤3-5次;所述清洗液是通过将160NaCl、4gKCl、24.2g三羟甲基氨基甲烷(Tris)、1mL吐温20溶于900mL双蒸水中,用 HCl调整至PH7.4,用双蒸水定容至1000ml,并用双蒸水稀释15倍制备而成;

[0037] (3) 加底物检测:在经过步骤(2)洗涤后的反应管中加入所述试剂盒中的发光底物溶液,充分混匀,检测发光值;

[0038] (4) 采用四参数拟合方式,以校准品浓度值为X轴,以NGAL校准品发光强度值为Y轴,建立标准曲线,根据待测样本的发光强度值回算待测样本的浓度值。

[0039] 采用上述技术方案,(1) 本发明的试剂盒将免疫磁微粒技术和化学发光技术相结合,提供了一种接近均相的反应体系,让连接标记示踪物的NGAL抗体与连接桥连物的NGAL抗体先与待检测抗体反应,形成双抗原夹心结构的复合物;由于在形成双抗原夹心复合物的过程中,与标记抗原的都是小分子物质,其空间位阻远远小于磁性微球的空间位阻,能够促进抗原-抗体结合反应充分进行,使得灵敏度、精密度、检测范围等检测性能大大提高;

(2) 本发明采用辛二酸二琥珀酰亚胺作为交联剂进行NGAL抗体和碱性磷酸酶偶联,辛二酸二琥珀酰亚胺与其他交联剂相比具有更高的偶联效率,且工艺稳定,在提高检测效率的同时,降低了制备成本;(3) 本发明的试剂盒能够与全自动化学发光免疫分析仪配套使用,能够样本检测的全自动化,使得NGAL抗体浓度检测方便、快速、简单和批量地进行,最大程度

的降低了系统误差,为试剂盒的使用效期和检测性能提供保障。

附图说明

[0040] 图1为使用本发明的试剂盒测试校准品得到的标准曲线图;

[0041] 图2为使用本发明的试剂盒和使用雅培NGAL试剂盒同时测试尿液样本的相关性拟合图。

具体实施方式

[0042] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步说明。在此需要说明的是,对于这些实施方式的说明用于帮助理解本发明,但并不构成对本发明的限定。此外,下面所描述的本发明各个实施方式中所涉及的技术特征只要彼此之间未构成冲突就可以相互组合。

[0043] 实施例1

[0044] 一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒,所述试剂盒内包括荧光素标记的 NGAL抗体溶液、碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液、包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液、NGAL校准品和发光底物溶液;所述碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液由碱性磷酸酶与NGAL抗体通过交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯连接而成。具体制备方法如下:

[0045] (1) 制备荧光素标记的NGAL抗体溶液:

[0046] (1-1) 配制含有荧光素的pH为8的Tris-HCl缓冲液,所述缓冲液中含有6wt%的聚乙二醇6000 (PEG-6000)、0.8wt%的氯化钠、0.5wt%的叠氮钠、0.6wt%的PROCLIN-300、0.9wt%的牛血清白蛋白和20mM乙二胺四乙酸二钠 (EDTA);

[0047] (1-2) 按照所述荧光素与所述NGAL抗体分子比为150:1的比例,将步骤(1-1)中 pH为8缓冲液与NGAL抗体混合,充分混匀,室温静置反应;

[0048] (1-3) 将步骤(1-2)中的反应液通过G-25凝胶柱分离未结合的荧光素,即得到含荧光素标记的NGAL抗体溶液;

[0049] (2) 制备碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液:

[0050] (2-1) 使用二甲基亚砜溶剂将NGAL抗体溶解,使溶解后的NGAL抗体浓度为 45mg/mL,加入交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯混合均匀,置于室温反应2.5小时;取适量二甲基亚砜溶剂对NGAL抗体与辛二酸二琥珀酰亚胺酯的连接物进行稀释,使稀释后的二甲基亚砜溶剂和NGAL抗体与辛二酸二琥珀酰亚胺酯的连接物的体积比为1:10,并将得到混合溶液置于5°C下保存备用;

[0051] (2-2) 按照碱性磷酸酶与步骤(2-1)中交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯的摩尔比为1:2 的量将浓度为1.5mg/mL的碱性磷酸酶缓冲液加入步骤(2-1)中的混合溶液并混合均匀,室温放置反应1.5h;

[0052] (2-3) 将步骤(2-2)中的反应液通过G-25凝胶柱除盐,即得所述碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液;

[0053] (3) 制备包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液:

[0054] (3-1) 在偶联剂碳二亚胺的环境下,将含有羧基活性基团的磁微粒与荧光素抗体混合均匀,室温放置反应15h,磁分离,除上清液,调整浓度和pH,即得到所述包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液;

[0055] (4) 制备所述NGAL校准品:

[0056] (4-1) 配制校准品缓冲溶液:在1L的新生牛血清中加入0.03g的四环素和0.3g的硫酸新霉素,完全溶解后经过0.22 μ m滤膜处理制备而成;

[0057] (4-2) 用所述校准品缓冲溶液溶解NGAL抗原,即得所述NGAL校准品;

[0058] (5) 制备所述发光底物溶液:

[0059] (5-1) 取Tris 2g、氯化钠(NaCl) 6g、亚硫酸钠(Na_2SO_3) 0.005g和Proclin-300 0.5mL 于烧杯中,加入600mL纯化水,充分搅拌混匀至溶解,调节pH至7.5;加200mL发光底物,用0.2 μ m滤器过滤,纯化水定容至1000mL,混匀即得所述发光底物溶液。

[0060] 所述磁微粒具有超顺磁性,每克磁微粒上所带的羧基活性基团含量不小于0.5mmol;所述荧光素抗体为单克隆抗体,稀释效价大于1:100万。

[0061] 实施例2

[0062] 一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒的使用方法,包括如下步骤:

[0063] (1) 免疫反应:在反应管中加入待检测样本,依次加入所述试剂盒中的荧光素标记的 NGAL抗体溶液和含碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液,混匀,30 $^{\circ}$ C下温育30min;加入所述试剂盒中的磁微粒悬浮液,混匀,30 $^{\circ}$ C下温育30min,得到固定在磁性微球上的双抗原夹心复合物;

[0064] (2) 洗涤:在步骤(1)中得到的固定在磁性微球上的双抗原夹心复合物的反应管中加入清洗液,并震荡,使磁微粒在磁场中沉降,除去上清液,清除掉没有通过待测抗体形成双抗原夹心复合物的连接标记示踪物的抗原,重复本步骤4次;所述清洗液是通过将160NaCl、4gKCl、24.2g三羟甲基氨基甲烷(Tris)、1mL吐温20溶于900mL双蒸水中,用HCl调整至 PH7.4,用双蒸水定容至1000ml,并用双蒸水稀释15倍制备而成;

[0065] (3) 加底物检测:在经过步骤(2)洗涤后的反应管中加入所述试剂盒中的发光底物溶液,充分混匀,检测发光值;

[0066] (4) 采用四参数拟合方式,以校准品浓度值为X轴,以NGAL校准品发光强度值为Y轴,建立标准曲线,根据待测样本的发光强度值回算待测样本的浓度值。

[0067] 实施例3

[0068] 一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒,所述试剂盒内包括荧光素标记的 NGAL抗体溶液、碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液、包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液、NGAL校准品和发光底物溶液;所述碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液由碱性磷酸酶与NGAL抗体通过交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯连接而成。具体制备方法如下:

[0069] (1) 制备荧光素标记的NGAL抗体溶液:

[0070] (1-1) 配制含有荧光素的pH为7的Tris-HCl缓冲液,所述缓冲液中含有4wt%的聚乙二醇6000(PEG-6000)、0.7wt%的氯化钠、0.08wt%的叠氮钠、0.6wt%的PROCLIN-300、0.8wt%的牛血清白蛋白和20mM乙二胺四乙酸二钠(EDTA);

[0071] (1-2) 按照所述荧光素与所述NGAL抗体分子比为150:1的比例,将步骤(1-1)中 pH为7缓冲液与NGAL抗体混合,充分混匀,室温静置反应;

[0072] (1-3) 将步骤(1-2)中的反应液通过G-25凝胶柱分离未结合的荧光素,即得到含荧光素标记的NGAL抗体溶液;

[0073] (2) 制备碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液:

[0074] (2-1) 使用二甲基亚砜溶剂将NGAL抗体溶解,使溶解后的NGAL抗体浓度为 30mg/mL,加入交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯混合均匀,置于室温反应2小时;取适量二甲基亚砜溶剂对NGAL抗体与辛二酸二琥珀酰亚胺酯的连接物进行稀释,使稀释后的二甲基亚砜溶剂和NGAL抗体与辛二酸二琥珀酰亚胺酯的连接物的体积比为1:10,并将得到混合溶液置于2℃下保存备用;

[0075] (2-2) 按照碱性磷酸酶与步骤(2-1)中交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯的摩尔比为1:2 的量将浓度为1mg/mL的碱性磷酸酶缓冲液加入步骤(2-1)中的混合溶液并混合均匀,室温放置反应1.5h;

[0076] (2-3) 将步骤(2-2)中的反应液通过G-25凝胶柱除盐,即得所述碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液;

[0077] (3) 制备包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液:

[0078] (3-1) 在偶联剂碳二亚胺的环境下,将含有羧基活性基团的磁微粒与荧光素抗体混合均匀,室温放置反应10h,磁分离,除上清液,调整浓度和pH,即得到所述包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液;

[0079] (4) 制备所述NGAL校准品:

[0080] (4-1) 配制校准品缓冲溶液:在1L的新生牛血清中加入0.01g的四环素和0.1g的硫酸新霉素,完全溶解后经过0.22μm滤膜处理制备而成;

[0081] (4-2) 用所述校准品缓冲溶液溶解NGAL抗原,即得所述NGAL校准品;

[0082] (5) 制备所述发光底物溶液:

[0083] (5-1) 取Tris 2g、氯化钠(NaCl) 6g、亚硫酸钠(Na₂SO₃) 0.005g和Proclin-300 0.5mL 于烧杯中,加入600mL纯化水,充分搅拌混匀至溶解,调节pH至7.5;加200mL发光底物,用0.2μm滤器过滤,纯化水定容至1000mL,混匀即得所述发光底物溶液。

[0084] 所述磁微粒具有超顺磁性,每克磁微粒上所带的羧基活性基团含量不小于0.5mmol;所述荧光素抗体为单克隆抗体,稀释效价大于1:100万。

[0085] 实施例4

[0086] 一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒的使用方法,包括如下步骤:

[0087] (1) 免疫反应:在反应管中加入待检测样本,依次加入所述试剂盒中的荧光素标记的 NGAL抗体溶液和含碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液,混匀,20℃下温育30min;加入所述试剂盒中的磁微粒悬浮液,混匀,20℃下温育30min,得到固定在磁性微球上的双抗原夹心复合物;

[0088] (2) 洗涤:在步骤(1)中得到的固定在磁性微球上的双抗原夹心复合物的反应管中加入清洗液,并震荡,使磁微粒在磁场中沉降,除去上清液,清除掉没有通过待测抗体形成双抗原夹心复合物的连接标记示踪物的抗原,重复本步骤3次;所述清洗液是通过将160NaCl、4gKCl、24.2g三羟甲基氨基甲烷(Tris)、1mL吐温20溶于900mL双蒸水中,用HCl调整至 PH7.4,用双蒸水定容至1000ml,并用双蒸水稀释15倍制备而成;

[0089] (3) 加底物检测:在经过步骤(2)洗涤后的反应管中加入所述试剂盒中的发光底物溶液,充分混匀,检测发光值;

[0090] (4) 采用四参数拟合方式,以校准品浓度值为X轴,以NGAL校准品发光强度值为Y轴,建立标准曲线,根据待测样本的发光强度值回算待测样本的浓度值。

[0091] 实施例5

[0092] 一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒,所述试剂盒内包括荧光素标记的 NGAL抗体溶液、碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液、包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液、NGAL校准品和发光底物溶液;所述碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液由碱性磷酸酶与NGAL抗体通过交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯连接而成。具体制备方法如下:

[0093] (1) 制备荧光素标记的NGAL抗体溶液:

[0094] (1-1) 配制含有荧光素的pH为9的Tris-HCl缓冲液,所述缓冲液中含有8wt%的聚乙二醇6000 (PEG-6000)、0.9wt%的氯化钠、0.1wt%的叠氮钠、0.6wt%的PROCLIN-300、1wt%的牛血清白蛋白和20mM乙二胺四乙酸二钠 (EDTA);

[0095] (1-2) 按照所述荧光素与所述NGAL抗体分子比为150:1的比例,将步骤(1-1)中 pH为9缓冲液与NGAL抗体混合,充分混匀,室温静置反应;

[0096] (1-3) 将步骤(1-2)中的反应液通过G-25凝胶柱分离未结合的荧光素,即得到含荧光素标记的NGAL抗体溶液;

[0097] (2) 制备碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液:

[0098] (2-1) 使用二甲基亚砜溶剂将NGAL抗体溶解,使溶解后的NGAL抗体浓度为 60mg/mL,加入交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯混合均匀,置于室温反应3小时;取适量二甲基亚砜溶剂对NGAL抗体与辛二酸二琥珀酰亚胺酯的连接物进行稀释,使稀释后的二甲基亚砜溶剂和NGAL抗体与辛二酸二琥珀酰亚胺酯的连接物的体积比为1:10,并将得到混合溶液置于8℃下保存备用;

[0099] (2-2) 按照碱性磷酸酶与步骤(2-1)中交联剂辛二酸二琥珀酰亚胺酯的摩尔比为1:2 的量将浓度为2mg/mL的碱性磷酸酶缓冲液加入步骤(2-1)中的混合溶液并混合均匀,室温放置反应1.5h;

[0100] (2-3) 将步骤(2-2)中的反应液通过G-25凝胶柱除盐,即得所述碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液;

[0101] (3) 制备包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液:

[0102] (3-1) 在偶联剂碳二亚胺的环境下,将含有羧基活性基团的磁微粒与荧光素抗体混合均匀,室温放置反应20h,磁分离,除上清液,调整浓度和pH,即得到所述包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液;

[0103] (4) 制备所述NGAL校准品:

[0104] (4-1) 配制校准品缓冲溶液:在1L的新生牛血清中加入0.05g的四环素和0.5g的硫酸新霉素,完全溶解后经过0.22μm滤膜处理制备而成;

[0105] (4-2) 用所述校准品缓冲溶液溶解NGAL抗原,即得所述NGAL校准品;

[0106] (5) 制备所述发光底物溶液:

[0107] (5-1) 取Tris 2g、氯化钠 (NaCl) 6g、亚硫酸钠 (Na₂SO₃) 0.005g和Proclin-300 0.5mL 于烧杯中,加入600mL纯化水,充分搅拌混匀至溶解,调节pH至7.5;加200mL发光底物,用0.2μm滤器过滤,纯化水定容至1000mL,混匀即得所述发光底物溶液。

[0108] 所述磁微粒具有超顺磁性,每克磁微粒上所带的羧基活性基团含量不小于

0.5mm1;所述荧光素抗体为单克隆抗体,稀释效价大于1:100万。

[0109] 实施例6

[0110] 一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒的使用方法,包括如下步骤:

[0111] (1) 免疫反应:在反应管中加入待检测样本,依次加入所述试剂盒中的荧光素标记的NGAL抗体溶液和含碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液,混匀,40℃下温育30min;加入所述试剂盒中的磁微粒悬浮液,混匀,40℃下温育30min,得到固定在磁性微球上的双抗原夹心复合物;

[0112] (2) 洗涤:在步骤(1)中得到的固定在磁性微球上的双抗原夹心复合物的反应管中加入清洗液,并震荡,使磁微粒在磁场中沉降,除去上清液,清除掉没有通过待测抗体形成双抗原夹心复合物的连接标记示踪物的抗原,重复本步骤5次;所述清洗液是通过将160NaCl、4gKCl、24.2g三羟甲基氨基甲烷(Tris)、1mL吐温20溶于900mL双蒸水中,用HCl调整至PH7.4,用双蒸水定容至1000ml,并用双蒸水稀释15倍制备而成;

[0113] (3) 加底物检测:在经过步骤(2)洗涤后的反应管中加入所述试剂盒中的发光底物溶液,充分混匀,检测发光值;

[0114] (4) 采用四参数拟合方式,以校准品浓度值为X轴,以NGAL校准品发光强度值为Y轴,建立标准曲线,根据待测样本的发光强度值回算待测样本的浓度值。

[0115] 实施例7

[0116] 本发明试剂盒灵敏度检测:对零校准品重复检测20次,计算发光强度的平均值(M)和标准差(SD),并计算M-2SD,根据标准曲线上对应的浓度,计算对应的浓度值即为分析灵敏度。结果显示,本发明的灵敏度不大于5ng/ml。

[0117] 本发明试剂盒精密性检测:通过分析内变异、分析间变异及批间变异来分析本发明试剂盒的精密性,分别选取实施例1(Q1)、实施例3(Q2)和实施例5(Q3)中的批次:

[0118] a)、分析内和分析间变异数据表

| | | 第一批试剂 | 第二批试剂 | 第三批试剂 |
|-------------------|----|-------|-------|-------|
| [0119] 分析内变异(CV%) | Q1 | 3.47 | 5.29 | 2.66 |
| | Q2 | 2.21 | 2.44 | 3.36 |
| | Q3 | 2.04 | 1.99 | 2.52 |
| 分析间变异(CV%) | Q1 | 5.91 | 4.98 | 5.04 |
| | Q2 | 5.77 | 3.66 | 5.15 |
| | Q3 | 3.32 | 4.16 | 3.45 |

[0120] b)、批间变异数据表

[0121]

| | Q1 | Q2 | Q3 |
|-------|------|------|------|
| 变异CV% | 7.09 | 5.25 | 5.06 |

[0122] 以上数据显示,本发明的试剂盒分析内变异、分析间变异及批间变异均小于10%。

[0123] 本发明试剂盒准确性检测:使用本发明试剂盒检测200份临床阴性尿液样本,本试剂假阳性率为0%。

[0124] 通过添加回收方法,由参考物质发光值拟合浓度值,拟合浓度与标示浓度之比平均值在 0.85-1.15之间(如下表所示)

| 准确度 | 参考物质 | 目标浓度 ng/ml | 拟合浓度 ng/ml | 回收率 |
|---------------|---------|------------|------------|-------|
| [0125] (无国标品) | 10F+90B | 159.00 | 153.88 | 96.8% |

[0126] 与同类产品对照:如图2所示,将本发明的试剂盒与雅培NGAL试剂盒同时对120份临床尿液样本进行测定,结果显示二者测定结果相关性较好,相关系数R为0.982。

[0127] 以上结合附图对本发明的实施方式作了详细说明,但本发明不限于所描述的实施方式。对于本领域的技术人员而言,在不脱离本发明原理和精神的情况下,对这些实施方式进行多种变化、修改、替换和变型,仍落入本发明的保护范围内。

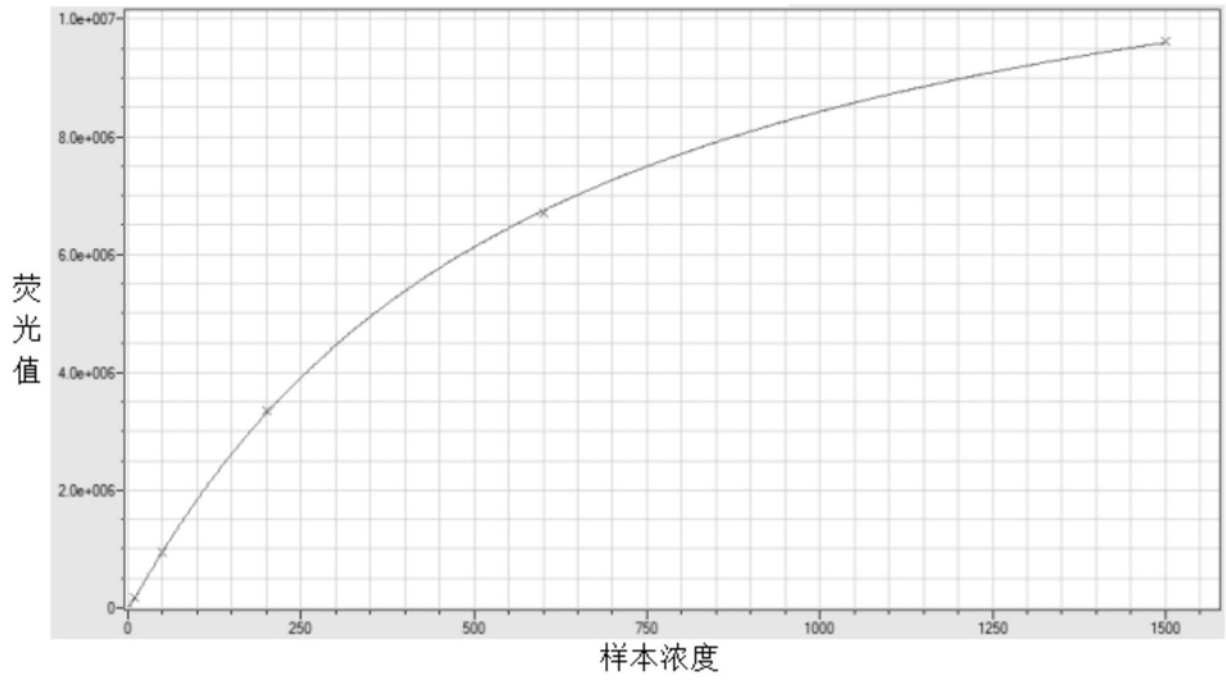


图1

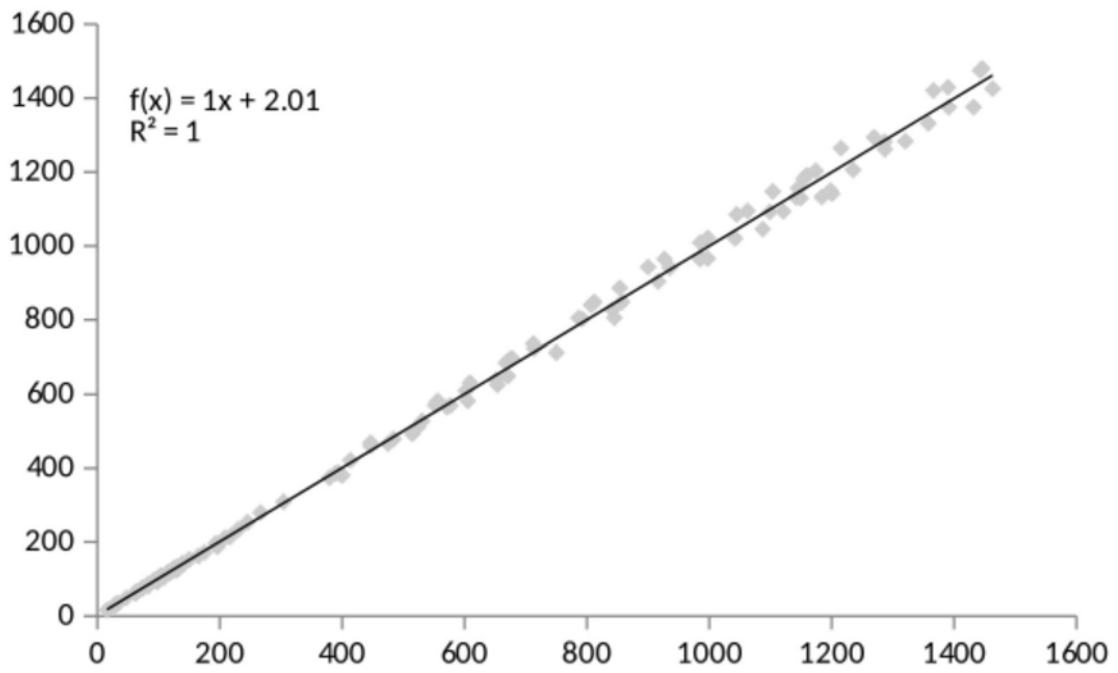


图2

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒及其制备方法和使用方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN109212181A | 公开(公告)日 | 2019-01-15 |
| 申请号 | CN201810942522.1 | 申请日 | 2018-08-17 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 泰州泽成生物技术有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 泰州泽成生物技术有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 泰州泽成生物技术有限公司 | | |
| [标]发明人 | 王赞 刘振世 石慧 程云燕 江川 刘振国 | | |
| 发明人 | 王赞 刘振世 石慧 程云燕 江川 刘振国 | | |
| IPC分类号 | G01N33/533 | | |
| CPC分类号 | G01N33/533 | | |
| 代理人(译) | 黄冠华 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒及其制备方法和使用方法；所述试剂盒内包括荧光素标记的NGAL抗体溶液、碱性磷酸酶标记的NGAL抗体溶液、包被荧光素抗体的磁微粒悬浮液、NGAL校准品和发光底物溶液；本发明的试剂盒将免疫磁微粒技术和化学发光技术相结合，提供了一种接近均相的反应体系，让连接标记示踪物的NGAL抗体与连接桥连物的NGAL抗体先与待检测抗体反应，形成双抗原夹心结构的复合物；由于在形成双抗原夹心复合物的过程中，与标记抗原的都是小分子物质，其空间位阻远远小于磁性微球的空间位阻，能够促进抗原-抗体结合反应充分进行，使得灵敏度、精密度、检测范围等检测性能大大提高。

