

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610135109.1

[51] Int. Cl.
G01N 33/573 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2008年7月2日

[11] 公开号 CN 101210926A

[22] 申请日 2006.12.27

[21] 申请号 200610135109.1

[71] 申请人 中国科学院大连化学物理研究所

地址 116023 辽宁省大连市中山路457号

[72] 发明人 张玉奎 赵立 徐茂兰 张晓丹
张丽华 张维冰 杨青 张津

[74] 专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限公司
代理人 许宗富 周秀梅

权利要求书2页 说明书6页 附图1页

[54] 发明名称

一种检测人血清中组织激肽释放酶的试剂盒
及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及基因工程领域，具体的说是一种检测人血清中组织激肽释放酶的试剂盒及其制备方法，包括，包被人组织激肽释放酶抗血清的酶联反应板、检测人组织激肽释放酶抗血清的酶抗体、标准人组织激肽释放酶抗血清的酶样品、亲和素-过氧化物酶、底物缓冲液和终止液。本试剂盒可用于缺血性疾病的早期诊断，检测方法简便快速、成本低廉、灵敏度及特异性高。本发明也提供了制备方法。

1. 一种检测人血清中组织激肽释放酶的试剂盒，其特征在于：包括，包被人组织激肽释放酶抗血清的酶联反应板、检测人组织激肽释放酶抗血清的酶抗体、标准人组织激肽释放酶抗血清的酶样品、亲和素-过氧化物酶、底物缓冲液和终止液。

2. 按照权利要求 1 所述的检测人血清中组织激肽释放酶的试剂盒，其特征在于：所述检测人组织激肽释放酶抗血清的酶抗体为连接生物素的人组织激肽释放酶抗血清，抗体浓度为 0.5—2ug/ul；

标准样品为从人尿中提取的组织激肽释放酶 0.05—24 ng/ml

亲和素-过氧化物酶为：Pero-avidin 用 PBS 稀释成 0.5—2ul/1ug 浓度；

底物缓冲液为：缓冲液 A: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 23—25g、柠檬酸· H_2O 9—10g, 30% H_2O_2 900—1100uL, 双蒸水 900—1100ml 调 pH 至 4.8—5.2；

缓冲液 B: DMF 30—50ml, TMB 0.09—0.11g, 双蒸水 90—110mL；

终止液为：0.5—2M H_2SO_4 溶液；浓洗涤液为：10—15 倍的 PBS，内含体积 0.1%吐温 20；稀释液为：重量体积浓度 1—5%牛血清白蛋白的 PBS。

3. 一种权利要求 1 所述的检测人血清中组织激肽释放酶试剂盒的制备方法，其特征在于：

1) 抗原合成：收集尿液超滤浓缩，贮存于-20 度，反复冻融 3—5 次，经纱布和 Nitex 膜过滤，离心，沉淀经 35—80%硫酸铵盐析，离心收集沉淀，用 20mM Tris-HCl 重溶解后透析，透析液经过 DE-52 纤维素层析柱，以 0.1—0.5M 氯化钠-磷酸盐缓冲液进行洗脱，收集具有 Tos-Arg-Ome 酯酶活性的流出峰，以 0.2M 氯化钠-磷酸盐缓冲液对流出峰进行透析，透析液经过以抑酶肽为配体的琼脂糖凝胶亲和柱，以透析缓冲液洗脱直至流出液中无蛋白，再以乙酸钠缓冲液洗脱组织激肽释放酶，亲和洗脱的具有 Tos-Arg-Ome 酯酶活性的流出峰再经过 Sephacryl S-200 进一步纯化，得到组织激肽释放酶抗原；

2) 包被抗原：将组织激肽释放酶抗原和兔血清进行偶联得到包被抗原；

3) 检测人组织激肽释放酶抗血清的酶抗体：将 100 毫克纯化的组织激肽释放酶和等量氟氏完全佐剂研钵中研磨乳化；而后将研磨的乳液多点注射到每只雌性新西兰白兔背部；20—30 天对白兔加强免疫 50 毫克乳液；末次免疫后 1—2 月由耳缘静脉收集血样于玻璃试管中以 1500g/分钟离心 15 分钟，血清储存于-20 度；将 15—20 毫升抗血清样品通过蛋白 A-sepharose 凝胶柱，以 0.5M 磷酸缓冲液洗脱至基线，以 0.1 M 甘氨酸缓冲液洗脱免疫球蛋白，洗脱条件为 34 滴/分钟，100 滴/试管，洗脱液以 0.5M Tris 碱中和，收集 280nm 吸光度大于 0.15 的样品；

4) 检测人组织激肽释放酶抗血清的酶抗体标记生物素：将 2mg/ml 纯化的步骤 3 中的产物于 4℃对 0.1mol/L 碳酸氢钠 1000ml 透析 24 小时，加入

10 μ l 新鲜配制的生物素-N-羟基琥珀酸亚胺酯，室温反应 1 小时后于 4 $^{\circ}$ C 下对 1000ml 磷酸盐缓冲液透析 24 小时，透析后加入等体积的灭菌甘油，分装，贮存于-20 $^{\circ}$ C 备用；而后将辣根过氧化物酶的亲和素与标记有生物素的检测人组织激肽释放酶抗血清的酶抗体偶联；

5) 酶反应板制备：用缓冲溶液将人组织激肽释放酶抗血清的酶稀释成 0.5—3 μ g/ml，微孔板每孔加入 100 μ l，4 $^{\circ}$ C 过夜包被，用洗涤液洗板三次，每孔 250 μ L，然后称取 1g BSA，加入 80 ml PBS 溶解，定容至 100 ml，无菌过滤，加入各孔中，每孔加入 200 μ l，放入湿盒中 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时，弃去液体，以洗涤液洗板三次，每孔加洗涤液 300 μ l；4-16 $^{\circ}$ C 冷风干燥 2 小时，放入有干燥剂的包装袋中抽真空封口，保存于 4 $^{\circ}$ C。

一种检测人血清中组织激肽释放酶的试剂盒及其制备方法

技术领域

本发明涉及基因工程领域，具体的说是一种检测人血清中组织激肽释放酶的试剂盒及其制备方法。

背景技术

进入二十一世纪以来，得益于医药行业的突破和医疗手段的进步，人民的生活水平、健康状况、生存寿命都极大的提高了。上一个世纪抗生素的发现及各种疫苗的出现，使许多致命的疾病如肺结核、天花等得到控制，但同时新的致命疾病及难以治愈的疾病也不断出现。其中，较为突出的就是各种缺血性疾病，如缺血性脑中风、缺血性心肌病等，而且这些疾病的发病率还正不断上升。由于这类缺血性疾病的发病是一个渐进的过程，一旦诊断延误，发病受损的组织难以逆转，如中风引起的半身不遂及失语等，给患者及家属带来极大痛苦。尽早诊断是控制其发生、发展的有效手段。目前诊断此类疾病国内外多采用脑血管造影等手段，其价格昂贵，且必须在有条件的医疗机构才能进行，县级以下普通门诊一般都不具备其设施，不利于大多数普通人群的普遍筛查。组织激肽释放酶水平与缺血性脑中风有很大相关性，血清中组织激肽释放酶水平与颈动脉梗阻分级成明显正相关关系，也与脑缺血治疗指征成正相关性等。因此，可利用人组织激肽释放酶作为标记物，以 ELISA 方法测量外周血中组织激肽释放酶的水平，可以对多种疾病的诊断和愈后提供帮助。还有，随着生命科学技术的飞速发展，近年来人们正在利用基因工程的手段，进行表达人组织激肽释放酶的科学实验，也迫切需要一种随时检测表达量的简便方法。而本试剂盒检测成本低、操作简单、灵敏度高、特异性及稳定性好，可普遍用于临床检测及基础医学研究。

发明内容

本发明的目的，在于提供一种成本低、操作简单、灵敏度高、特异性及稳定性好的检测人血清中组织激肽释放酶的试剂盒及其制备方法。

为实现上述目的，本发明的所采用的技术方案为：

试剂盒包括：包被人组织激肽释放酶抗血清的酶联反应板、检测人组织激肽释放酶抗血清的酶抗体、标准人组织激肽释放酶抗血清的酶样品、亲和素-过氧化物酶、底物缓冲液和终止液。

所述检测人组织激肽释放酶抗血清的酶抗体为连接生物素的人组织激肽释放酶抗血清，抗体浓度为 0.5—2 μ g/ μ l；标准样品为从人尿中提取的组织激肽释放酶 0.05—24 ng/ml；亲和素-过氧化物酶为：Pero-avidin 用 PBS 稀释成 0.5—2 μ l/1 μ g 浓度；底物缓冲液为：缓冲液 A: Na₂HPO₄·12H₂O 23—

25g、柠檬酸·H₂O 9—10g, 30%H₂O₂ 900—1100uL, 双蒸水 900—1100ml 调 pH 至 4.8—5.2; 缓冲液 B: DMF30—50ml, TMB0.09—0.11g, 双蒸水 90—110mL; 终止液为: 0.5-2M H₂SO₄ 溶液; 浓洗涤液为: 10-15 倍的 PBS, 内含体积 0.1%吐温 20; 稀释液为: 重量体积浓度 1-5%牛血清白蛋白的 PBS。

试剂盒的制备方法:

1) 抗原合成: 收集尿液超滤浓缩, 贮存于-20 度, 反复冻融 3—5 次, 经纱布和 Nitex 膜过滤, 离心, 沉淀经 35-80%硫酸铵盐析, 离心收集沉淀, 用 20mMTris-HCl 重溶解后透析, 透析液经过 DE-52 纤维素层析柱, 以 0.1-0.5M 氯化钠-磷酸盐缓冲液进行洗脱, 收集具有 Tos-Arg-Ome 酯酶活性的流出峰, 以 0.2M 氯化钠-磷酸盐缓冲液对流出峰进行透析, 透析液经过以抑酶肽为配体的琼脂糖凝胶亲和柱, 以透析缓冲液洗脱直至流出液中无蛋白, 再以乙酸钠缓冲液洗脱组织激肽释放酶, 亲和洗脱的具有 Tos-Arg-Ome 酯酶活性的流出峰再经过 Sephacryl S-200 进一步纯化, 得到组织激肽释放酶抗原;

2) 包被抗原: 将组织激肽释放酶抗原和兔血清进行偶联得到包被抗原;

3) 检测人组织激肽释放酶抗血清的酶抗体: 将 100 毫克纯化的组织激肽释放酶和等量氟氏完全佐剂研钵中研磨乳化; 而后将研磨的乳液多点注射到每只雌性新西兰白兔背部; 20-30 天对白兔加强免疫 50 毫克乳液; 末次免疫后 1-2 月由耳缘静脉收集血样于玻璃试管中以 1500g/分钟离心 15 分钟, 血清储存于-20 度; 将 15-20 毫升抗血清样品通过蛋白 A-sepharose 凝胶柱, 以 0.5M 磷酸缓冲液洗脱至基线, 以 0.1 M 甘氨酸缓冲液洗脱免疫球蛋白, 洗脱条件为 34 滴/分钟, 100 滴/试管, 洗脱液以 0.5M Tris 碱中和, 收集 280nm 吸光度大于 0.15 的样品;

4) 检测人组织激肽释放酶抗血清的酶抗体标记生物素: 将 2mg/ml 纯化的步骤 3 中的产物于 4℃对 0.1mol/L 碳酸氢钠 1000ml 透析 24 小时, 加入 10μl 新鲜配制的生物素-N-羟基琥珀酸亚胺酯, 室温反应 1 小时后于 4℃下对 1000ml 磷酸盐缓冲液透析 24 小时, 透析后加入等体积的灭菌甘油, 分装, 贮存于-20℃备用; 而后将辣根过氧化物酶的亲和素与标记有生物素的检测人组织激肽释放酶抗血清的酶抗体偶联;

5) 酶反应板制备: 用缓冲溶液将人组织激肽释放酶抗血清的酶稀释成 0.5—3μg/ml, 微孔板每孔加入 100μl, 4℃过夜包被, 用洗涤液洗板三次, 每孔 250uL, 然后称取 1g BSA, 加入 80 ml PBS 溶解, 定容至 100 ml, 无菌过滤, 加入各孔中, 每孔加入 200μl, 放入湿盒中 37℃反应 1 小时, 弃去液体, 以洗涤液洗板三次, 每孔加洗涤液 300μl; 4-16℃冷风干燥 2 小时, 放入有干燥剂的包装袋中抽真空封口, 保存于 4℃。

本发明具有如下优点:

本发明用从人尿中提取的人组织激肽释放酶、由组织激肽释放酶免疫动物制备的特异性免疫球蛋白、制成了组织激肽释放酶检测试剂盒。其检

测成本低，特别有益于不完全性脑阻塞患者的早期发现，亦适用于不完全性心肌梗塞等缺血性疾病的早期发现。诊断特异性达 90%，灵敏：采用标准阳性对照检测灵敏度达到 $0.05 \mu\text{IU/ml}$ 。稳定；经稳定性实验，本发明于 4°C 保存，至 24 个月时经检测，偏差 $\pm 20\%$ 。试剂配套，使用方便，价格便宜，易于临床检验。利用本发明试剂盒，可为生物工程中细胞表达组织激肽释放酶的量进行跟踪检测。以便于细胞培养过程中培养基的改良，添加剂的增减，培养条件的选择时，可获得一个重要的检测指标。

附图说明

图 1 为本发明标准物的浓度与 OD 值的标准曲线，其中：HUK 浓度 $0.1\text{ng/ml} \sim 3.255\text{ng/ml}$, $r=0.9948$ 。

具体实施方式

实施例 1

检测人血清中组织激肽释放酶的试剂盒包括：包被人组织激肽释放酶抗血清的酶联反应板、检测人组织激肽释放酶抗血清的酶抗体、标准人组织激肽释放酶抗血清的酶样品、亲和素-过氧化物酶、底物缓冲液、终止液。

所述检测人组织激肽释放酶抗血清的酶抗体为连接生物素的人组织激肽释放酶抗血清 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ；

标准样品为从人尿中提取的组织激肽释放酶 $0.20\text{—}3.25\text{ng/ml}$ ；

亲和素-过氧化物酶：Pero-avidin 用 PBS 稀释成 $1\mu\text{g}/1\mu\text{l}$ ；

底物缓冲液为： 0.1M 柠檬酸 $\text{pH}5.0+0.03\%$ 过氧化氢（缓冲液 A： $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ $23\text{—}25\text{g}$ 、柠檬酸 $\cdot \text{H}_2\text{O}$ $9\text{—}10\text{g}$ ， $30\%\text{H}_2\text{O}_2$ $900\text{—}1100\mu\text{L}$ ，双蒸水 $900\text{—}1100\text{ml}$ 调 pH 至 $4.8\text{—}5.2$ ；）和 0.1% TMB+ 40% DMF（缓冲液 B：DMF $30\text{—}50\text{ml}$ ，TMB $0.09\text{—}0.11\text{g}$ ，双蒸水 $90\text{—}110\text{mL}$ ；），按 9: 1 比例配制。

终止液为： $2.45\%\text{MH}_2\text{SO}_4$ 溶液；

浓洗涤液为： 10 倍的 PBS，内含 0.1% 吐温 20；

稀释液为：重量体积浓度 1% 牛血清白蛋白的 PBS；

检测人血清中组织激肽释放酶的试剂盒的制备方法步骤为：

1) 抗原合成：：收集 12 升尿液超滤浓缩至 300 毫升，贮存于 -20 度，反复冻融 5 次，经三层纱布和 Nitex 膜过滤， 5000g 离心 30 分钟，沉淀经 $35\text{—}80\%$ 硫酸铵盐析，离心收集沉淀，重溶解后透析，透析液经过 DE-52 纤维素层析柱，以 $0.1\text{—}0.5\text{M}$ 氯化钠 0.1M 磷酸盐缓冲液 ($\text{pH} 6.5$) 进行洗脱，收集具有 Tos-Arg-Ome 酯酶活性的流出峰，以 0.2M 氯化钠 0.1M 磷酸盐缓冲液 ($\text{pH} 6.5$) 对流出峰进行透析，透析液经过以抑酶肽为配体的琼脂糖凝胶亲和柱，以透析缓冲液洗脱直至流出液中无蛋白，再以 0.1M 乙酸钠缓冲液 ($\text{pH} 3.5$) 洗脱组织激肽释放酶，亲和洗脱的具有 Tos-Arg-Ome 酯酶活性的流出峰再经过 Sephacryl S-200 进一步纯化，得到组织激肽释放酶抗原；将组织激肽释放酶抗原由聚丙烯酰胺凝胶电泳检测蛋白纯度，经过上述过程由原尿到纯化的蛋白，组织激肽释放酶被纯化了 2114 倍。建

立人组织激肽释放酶参考品的质量标准如下：分子量：经过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定分子量为 39,500 尔顿。活性：以合成底物 Tos-Arg-Met 测定组织激肽释放酶活性为 74.0EU/mg 蛋白，以天然底物牛低分子量激肽原测定组织激肽释放酶活性为 22 μ g 激肽/mg 蛋白。纯度：经过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测纯度大于 99%。蛋白浓度测定：利用 280nm 消光系数 E(280)测定，组织激肽释放酶 E(280)=1.5，即利用 1cm 比色杯测定 280nm 处 1mg/ml HUK 溶液的吸光度为 1.5。利用上述方法测定人组织激肽释放酶参考品的浓度。为利用亲和色谱方法从人尿液中提取纯化得到，经过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测纯度大于 99%，利用 280nm 消光系数 E(280)测定蛋白浓度，稀释后 (3.25ng/ μ l) 无菌过滤后分装。

2) 包被抗原：将组织激肽释放酶抗原和兔血清进行偶联得到包被抗原；

3) 检测人组织激肽释放酶抗血清的酶抗体：将 100 毫克纯化的组织激肽释放酶和等量氟氏完全佐剂研钵中研磨乳化；而后将研磨的乳液多点注射到每只雌性新西兰白兔背部；20-30 天对白兔加强免疫 50 毫克乳液；末次免疫后 1-2 月由耳缘静脉收集血样于玻璃试管中以 1500g/分钟离心 15 分钟，血清储存于 -20 度；将 15-20 毫升抗血清样品通过蛋白 A-sepharose 凝胶柱，以 0.5M 磷酸缓冲液 (pH8.0) 洗脱至基线，以 0.1 M 甘氨酸缓冲液 (pH3.0) 洗脱免疫球蛋白，洗脱条件为 34 滴/分钟，100 滴/试管，洗脱液以 0.5M Tris 碱 (pH9.0) 中和，收集 280nm 吸光度大于 0.15 的样品；测定抗体溶液浓度为 3.6mg/ml，利用 SDS-PAGE 检测纯化抗体的纯度大于 99%。利用被比稀释测定效价大于 1: 100000。

4) 检测人组织激肽释放酶抗血清的酶抗体标记生物素：将 2mg/ml 纯化的步骤 3 中的产物于 4 $^{\circ}$ C 在 0.1mol/L 碳酸氢钠 (pH9.5) 1000ml 透析 24 小时，加入 10 μ l 新鲜配制的生物素-N-羟基琥珀酸亚胺酯 (BNHS, 10mg /1ml DMSO)，室温反应 1 小时后于 4 $^{\circ}$ C 下对 1000ml 磷酸盐缓冲液透析 24 小时，透析后加入等体积的灭菌甘油，分装，贮存于 -20 $^{\circ}$ C 备用；而后将辣根过氧化物酶的亲和素与标记有生物素的检测人组织激肽释放酶抗血清的酶抗体偶联；采用方阵滴定法测定抗体工作浓度为 2 μ g/mL

5) 酶反应板制备：用缓冲溶液将人组织激肽释放酶抗血清的酶稀释成 1 μ g/ml，微孔板每孔加入 100 μ l，4 $^{\circ}$ C 过夜包被，用洗涤机洗板三次，每孔 250 μ L，然后称取 1g BSA，加入 80 ml PBS 溶解，定容至 100 ml，无菌过滤，加入各孔中，每孔加入 200 μ l，放入湿盒中 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时，弃去液体，以洗涤液洗板三次，每孔加洗涤液 300 μ l。16 $^{\circ}$ C 冷风干燥 2 小时，放入有干燥剂的包装袋中抽真空封口，保存于 4 $^{\circ}$ C。

试剂盒使用方法：

1) 配液：将浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水 10 倍稀释。

2) 编号：将样品对应微孔按序编号，每板应设空白对照 1 孔、阴性对照 3 孔、标准血清 5 孔。

- 4) 预洗: 用洗涤液将酶标板洗涤 3 遍。
- 5) 加样: 分别在相应孔中加入阴性对照 (3 孔)、标准血清 (5 孔) 及待检血清各 $100\ \mu\text{l}$ 。
- 6) 温育: 用封板膜封板后置 $37\text{°C} \pm 1\text{°C}$ 温育 120 ± 2 分钟。
- 7) 洗涤: 小心将封板膜揭掉, 使用洗板机吸干孔内液体, 用洗涤液洗涤 3 遍。
- 8) 加抗体: 每孔加入生物素化抗体 $100\ \mu\text{l}$, 空白孔除外。
- 9) 温育: 用封板膜封板后置 $37\text{°C} \pm 1\text{°C}$ 温育 60 ± 2 分钟。
- 10) 洗涤: 小心将封板膜揭掉, 使用洗板机吸干孔内液体, 用洗涤液洗涤 3 遍。
- 11) 加酶: 每孔加入酶标记物 $100\ \mu\text{l}$, 空白孔除外。
- 12) 温育: 用封板膜封板后置 $37\text{°C} \pm 1\text{°C}$ 温育 30 ± 2 分钟。
- 13) 洗涤: 小心将封板膜揭掉, 使用洗板机吸干孔内液体, 用洗涤液充分洗涤 5 遍, 最后一次尽量扣干。
- 14) 显色: 每孔加入底物 A、B 液各 90 和 $10\ \mu\text{l}$, 轻轻震荡混匀, 用封板膜封板后置 $37\text{°C} \pm 1\text{°C}$ 避光温育 10 分钟。
- 15) 测定: 每孔加终止液 $100\ \mu\text{l}$, 轻轻振荡混匀, 设定酶标仪波长为 450nm (建议使用双波长检测), 测定各 OD 值。

结果判定

以标准物的浓度为横坐标 (对数坐标), OD 值为纵坐标 (普通坐标) (参见图 1), 在半对数坐标纸上绘出标准曲线, 根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度; 或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式, 将样品的 OD 值代入方程式, 计算出样品浓度。经检测产品性能指标为: 灵敏度: $0.05\ \mu\text{IU/ml}$, 标准曲线: $R \geq 0.98$, 精密性: $CV \leq 10\%$ ($n=10$), 正常值: $0.3 \sim 10\ \mu\text{IU/ml}$, 测定范围: $0.1 \sim 30\ \mu\text{IU/ml}$ 。

实施例 2 与实施例 1 不同之处在于

采用人组织激肽释放酶免疫动物制备的抗体 (HUK-IgG) 包被酶联反应板, 从人尿中提取纯化的人组织激肽释放酶为抗原 (HUK), 生物素标记的组织激肽释放酶抗体加入保护剂, 亲和素加入保护剂, 以 1% 牛血清白蛋白的 PBS 为稀释液, 以柠檬酸、过氧化氢、四甲基苯 (TMB) 配制的显色物, 利用了双抗夹心 ELISA 法原理组装了试剂盒, 同时准备了详细使用说明书。

稀释液的制备: 用 $\text{PBSPH}7.2 + 1\% \text{BSA} + 0.05\% \text{吐温} + 0.05\% \text{ProClion-300}$ 。

酶联反应板的制备: 取美国南卡医学院提供的人组织激肽释放酶免疫动物制备的抗体 (HUK-IgG), 加入到 PBS (Ph7.2) 缓冲液中, 配制成 $1\ \mu\text{g/ml}$ 溶液。在 96 孔板中每孔加入 $100\ \mu\text{l}$, 置于 4°C 中 16h。取出包被板, 在洗板机上用含 0.1% 吐温-20 的 PBS 缓冲液, $250\ \mu\text{l}/\text{孔}$, 冲洗 3 次, 拍干。1% BSA 的溶液, $200\ \mu\text{l}/\text{孔}$ 封闭, 37°C 中 1h。取出封闭板, 在洗板机上用含 0.1% 吐温-20 的 PBS 缓冲液, $250\ \mu\text{l}/\text{孔}$, 冲洗 3 次, 拍干。 17°C 中风干 2h, 真空干

干燥封闭，储存于4℃中备用。

标准品（HUK）的制备：取美国南卡医学院提供的人组织激肽释放酶（HUK），用稀释液加入1.25%2M EDTA，稀释至3.25ng/ml，分装，储存于4℃中备用。

生物素标记组织激肽释放抗体（Biotin-HUK IgG）的制备：取5.5mg/ml抗体（HUK-IgG）1ml，加入1.5mlPBS混匀，注入透析袋，在0.1M NaHCO₃ Ph9.5 1000ml溶液中，4℃条件下透析24小时。将透析后的IgG 2.5ml取出放入ep管中，加入新鲜配制的0.1M Bio Tinamidocaprprate25ul，23℃水浴1小时。将液体全部取出重新注入透析袋，在PBS中4℃条件下透析24小时。将透析后的Bio-IgG液体全部取出，加入等体积的无菌甘油，混匀，分装，-20℃保存备用。取Biotin-HUK IgG，用稀释液含0.1%苯酚，稀释至1ug/ml，分装，储存于4℃中备用。

亲和素-过氧化物酶（Pero-avidin）的制备：取Pero-avidin用PBS稀释成1ul/1ug浓度分装，储存于-20℃中备用。取1ul/1ug Pero-avidin，用稀释液含0.1%苯酚，稀释至1ug/ml，分装，储存于4℃中备用。

显色系统：以0.1M柠檬酸 Ph5.0+0.03%过氧化氢和0.1%TMB+40%DMF，按9:1比例配制。

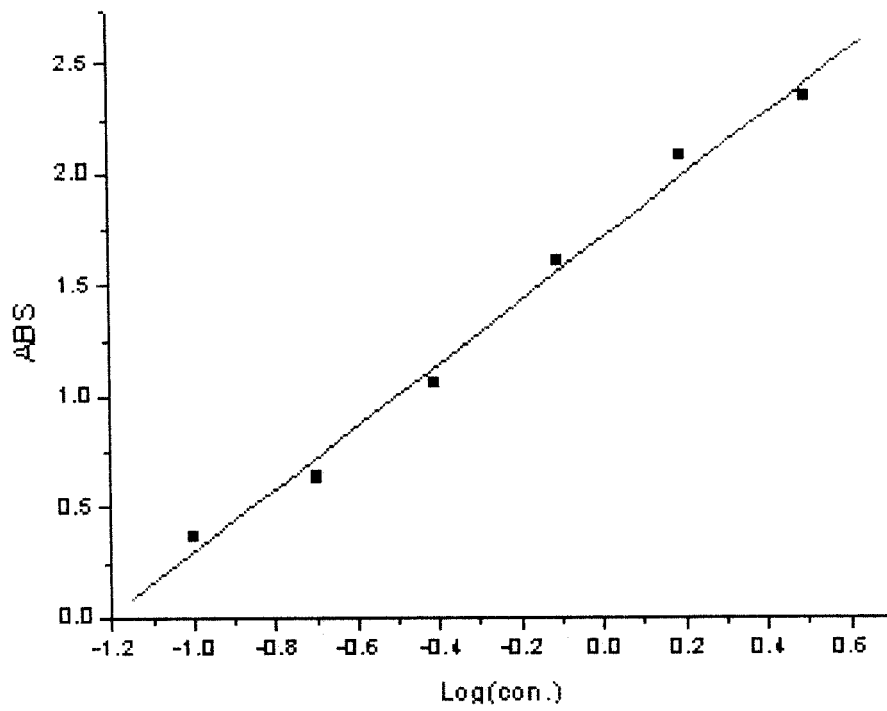


图 1

专利名称(译)	一种检测人血清中组织激肽释放酶的试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN101210926A	公开(公告)日	2008-07-02
申请号	CN200610135109.1	申请日	2006-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院大连化学物理研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院大连化学物理研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院大连化学物理研究所		
[标]发明人	张玉奎 赵立 徐茂兰 张晓丹 张丽华 张维冰 杨青 张津		
发明人	张玉奎 赵立 徐茂兰 张晓丹 张丽华 张维冰 杨青 张津		
IPC分类号	G01N33/573 G01N33/531		
代理人(译)	许宗富 周秀梅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及基因工程领域，具体的说是一种检测人血清中组织激肽释放酶的试剂盒及其制备方法，包括，包被人组织激肽释放酶抗血清的酶联反应板、检测人组织激肽释放酶抗血清的酶抗体、标准人组织激肽释放酶抗血清的酶样品、亲和素-过氧化物酶、底物缓冲液和终止液。本试剂盒可用于缺血性疾病的早期诊断，检测方法简便快速、成本低廉、灵敏度及特异性高。本发明也提供了制备方法。