



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102495215 A

(43) 申请公布日 2012.06.13

(21) 申请号 201110399728.2

(22) 申请日 2011.12.06

(71) 申请人 任庆远

地址 273400 山东省临沂市费县健康路 71
号费县人民医院检验科

申请人 李守玮

(72) 发明人 任庆远 李守玮

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 6 页

(54) 发明名称

一种定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了定量检测肿瘤坏死因子 α 的诊断试剂盒及其检测方法,该试剂盒包含 TNF- α 磁分离试剂,酶标抗体,增强剂,校准品、控制品,浓缩液以及底物。本发明试剂盒采用免疫磁微粒分离技术与竞争酶联免疫技术结合,具有更高的检测灵敏度和特异性,并且大大缩短了检测时间,可以在 10 分钟内检测数个生物样本,对于尿液、血清等样本可以不需前处理直接进行检测。

1. 一种定量检测 TNF- α 的试剂盒,其特征在于,该试剂盒包含 TNF- α 磁分离试剂,酶标抗体,增强剂,校准品、控制品,浓缩液以及底物;所述试剂盒按照如下方法制备而成:第一步:TNF- α 磁分离试剂的制备步骤:

1) 将 1.0mg 辛二酸二琥珀酰亚胺酯溶于 50 μ l DMSO 中,取 2mgTNF- α 单克隆抗体溶于 PH 9.5 的 0.1mol/L PB 缓冲液中至总体积为 1ml;

2) 用移液枪吸取步骤 1 中的辛二酸二琥珀酰亚胺酯加入到步骤 1 的抗体溶液中,置室温 90min;

3) 将步骤 2 获得的溶液加入到浓缩管中然后放入到高速冷冻离心机中在 3000g 下浓缩 30min 至体积为 0.5ml;

4) 取 0.5ml 磁珠,加入 5ml 反应杯中,放入试管架,经磁铁吸附 2 分钟后吸取上清;

5) 加入步骤 3 获得的抗体溶液,混匀后室温反应 4 小时;

6) 加入 0.3ml 1mol/L 的 TRIS 溶液 37 $^{\circ}$ C 15 分钟;

7) 加入 1.5ml PH 7.20.1mol/L PB 清洗已经标记的磁珠,混匀 30 秒,上架,去上清;

8) 用 100ml 磁珠保存液将磁珠转入 125ml 玻璃瓶;磁珠保存液配方为 0.1% BSA, 0.05% 吐温-20, 0.02% NaN₃, 20% 乙醇, 4 $^{\circ}$ C 保存;

9) 将步骤 8 获得的溶液用磁珠缓冲液按照 1 : 1 的体积比例混匀,即得试剂盒中磁分离试剂;所述磁珠缓冲液为浓度是 1mol/L 的 TRIS-HCl 缓冲液。

第二步:酶标抗体制备步骤:

1) 2.5mgTNF- α 单克隆抗体溶于 1.0ml 的 N,N-二甲基甲酰胺中,加入 1ml 的 10mg/ml 辣根过氧化物酶水溶液和 1.3mg 碳化二亚胺,1 小时后将 1.0ml 20mg/ml 的碳化二亚胺加入,混合物不断搅拌,4 $^{\circ}$ C 过夜;

2) 将步骤 1 的溶液装入透析袋中,对 0.15M 的 PH7.4PBS 透析,4 $^{\circ}$ C 过夜,收集保留液;然后加入 10ml 浓度为 15mg/ml 的 BSA 溶液,4 $^{\circ}$ C 储存备用;最后将上述溶液用酶标抗体稀释液以 1 : 1000 的体积比混合均匀,即得酶标抗体;所述酶标抗体稀释液为浓度是 1mol/L 的 TRIS-HCl 缓冲液。

第三步:增强剂配制步骤:

1) 称取 TRIS1.56g 和 NaCl 4.23g 于 1L 容器中;用移液器将 Proclin-300 量取 0.2ml 于 10ml 纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入上述 1L 容器中;

2) 用量筒量取 800ml 纯化水于上述 1L 容器中,充分搅拌,直至完全溶解,调 PH 在 7.35-7.45 之间;

3) 称取 Mak330.9g 于上述 1L 容器中;最后定容 1000ml,完全溶解后,用 0.2 μ m 滤器过滤。

第四步:

校准品和控制品的配制:

将 TNF- α 配制浓度分别为 0.10、0.20、0.40、0.80、1.60ng/ml 的校准品;将 TNF- α 配制成浓度分别为 0.20、0.80ng/ml 的控制品。

第五步:

浓缩液配制步骤,配制 1L:

1) 称取 TRIS 12.54g 和 NaCl 325.6g 于 1L 容器中;

- 2) 称取 5g Tween-20 于 100ml 容器中加入 20ml 水使其完全溶解后,倒入上述 1L 容器中;
- 3) 用移液器将 Proclin-300 量取 0.2ml 于盛有 10ml 纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入上述 1L 容器中;
- 4) 用量筒量取 800ml 纯化水于上述 1L 容器中,充分搅拌,直至完全溶解;
- 5) 调 PH,控制其范围在 7.35-7.45 之间;
- 6) 最后定容 1000ml,完全溶解后用 0.2um 滤器过滤即得。

第六步:

底物配制步骤,配制 1L:

- 1) 称取 TRIS 2.35g、NaCl 6.41g、 Na_2SO_3 0.002g 和 Proclin-3000.2ml 于 1L 烧杯中;
- 2) 用量筒量取 600ml 纯化水于 1L 烧杯中,充分搅拌,直至完全溶解,调 PH 在 7.95-8.05 之间;
- 3) 加入 250ml Lumi-Phos 530 后,用 0.2um 滤器过滤收集滤液,用纯化水定容至 1000ml,混匀后即得。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒的使用方法如下:

- 1)、加 15 μl TNF- α 校准品、TNF- α 控制品、待测标本至对应试管底部;
- 2)、加 25 μl 酶标抗体至每一试管中;
- 3)、加 25 μl 增强剂至每一试管中;
- 4)、加 25 μl 磁分离试剂至每一试管中;
- 5)、用塑料薄膜覆盖试管,多管混匀器轻轻振荡试管架 30s 后,置 37°C 水浴 30 分钟;
- 6)、然后放至磁分离器上,确保每支试管都与分离器表面接触,沉淀 2 分钟,倒转分离器倒出上清液;
- 7)、浓缩液用纯化水稀释 10 倍后,加 100 μl 稀释后的浓缩液至每一试管中,置多管混匀器上轻轻振荡混匀 30s;
- 8)、加 100 μl 底物溶液至试管中混匀 3 秒,发光检测仪检测。

3. 如权利要求 1 或者 2 所述的试剂盒在诊断疾病中的应用。

一种定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及测定一种定量检测肿瘤坏死因子 α 的诊断试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 肿瘤坏死因子,简称 TNF,是由巨噬细胞分泌的一种小分子蛋白。肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 主要由单核-巨噬细胞分泌;TNF- β 主要由活化的 T 淋巴细胞分泌,两者有相似致热性。小剂量呈单峰热,大剂量呈双峰热;TNF 在体内外均能刺激 IL-1 的产生。

[0003] 人类的 TNF- α 基因长约 2.76kb,小鼠为 2.78kb,结构非常相似,均由 4 个外显子和 3 个内含子组成,与 MHC 基因群密切连锁,分别定位于第 6 对和第 17 对染色体上。1984 年从 HL-60、U937 等细胞中克隆成功 rHu TNF- α cDNA,并在大肠杆菌中获得高表达。人 TNF- α 前体由 233 个氨基酸残基组成,含 76 个氨基酸残基的信号肽,切除信号肽后成熟型 TNF- α 为 157 氨基酸残基,非糖基化,第 69 位和 101 位两个半胱氨酸形成分子内二硫键。rHu TNF- α 分子量为 17kDa。成熟的小鼠 TNF- α 与 rMu TNF- α 有 79%氨基酸组成同源性,TNF- α 的生物学作用似无明显的种属特异性。

[0004] TNF- α 参与了多种体内的生物学过程,能够杀伤或抑制肿瘤细胞,提高中性粒细胞的吞噬能力,抗病毒细菌感染,促进髓样白血病细胞向巨噬细胞分化等。应用 TNF- α 在治疗肿瘤等方面开始临床 II 期试验,也可与 IL-2 联合治疗肿瘤,目前认为全身用药的疗效不及局部用药,后者如病灶内注射,局部浓度高且副作用也较轻。近年来已采用 TNF 基因治疗开始对黑素瘤等肿瘤进行临床验证。TNF 还与一些临床某些疾病的病变程度有关,例如大骨节病、结肠炎、脑膜炎以及哮喘等等,临床上可通过检测 TNF- α 等生化指标来分析疾病的发生程度。

[0005] 过去以放免为代表的检测肿瘤坏死因子的检测试剂盒受方法学的限制,其灵敏度和抗干扰能力严重不足,存在很大的弊端,已基本上退出市场,目前应用较多的为酶联免疫检测技术和化学发光技术。化学发光技术兴起于上个世纪 80 年代是继酶联免疫技术和放免技术之后发展起来的新兴技术,由于其高灵敏度、高特异性,同时方法简便、快速,标记结合物稳定,无放射性同位素损伤和污染等特点,在近些年得到了飞速发展。

[0006] 磁微粒分离酶联免疫检测技术是一种以磁性微粒为固相分离载体,将免疫磁微粒分离技术与酶联免疫检测技术相结合而建立的一种新型免疫检测方法。传统 ELISA 方法,抗原、抗体的结合反应是在固相(ELISA 板反应孔)表面进行的,而磁微粒分离酶联免疫检测方法,抗原、抗体的结合反应也在近似液相的条件下进行,因而反应快速、彻底。与传统 ELISA 相比具有灵敏度高,检测用时少的优点。

发明内容

[0007] 本发明需要解决的技术问题在于提供一种定量检测 TNF- α 的诊断试剂盒及其检测方法,采用该试剂盒进行 TNF- α 检测具有较高的灵敏度和特异性,和更短的获得检测结果的时间和更简便的操作方式。

[0008] 本发明提供的试剂盒,其包含的试剂有 TNF- α 磁分离试剂,酶标抗体,增强剂,校准品、控制品,浓缩液以及底物。

[0009] 所述的磁分离试剂含有标记有 TNF- α 单克隆抗体的磁性微球。

[0010] 所述的酶标抗体是含有辣根过氧化物酶标记的 TNF- α 单克隆抗体。

[0011] 所述的增强剂是含有 Tris 的缓冲液。

[0012] 所述的校准品及控制品是含有一定量的 TNF- α 抗原的溶液。

[0013] 所述浓缩液是含有 TWEEN-20 和 Proclin-300 的缓冲液。

[0014] 所述的底物为酶促化学发光底物。

[0015] 本发明 TNF- α 的定量检测试剂盒,优选通过如下步骤制备而成:

[0016] 第一步:磁分离试剂的制备步骤:

[0017] 1、将 1.0mg 辛二酸二琥珀酰亚胺酯溶于 50 μ l DMSO 中,取 2mgTNF- α 单克隆抗体溶于 PH 9.5 的 0.1mol/L PB 缓冲液中至总体积为 1ml;

[0018] 2、用移液枪吸取步骤 1 中的辛二酸二琥珀酰亚胺酯加入到步骤 1 的抗体溶液中,置室温 90min;

[0019] 3、将步骤 2 抗体溶液加入到浓缩管中然后放入到高速冷冻离心机中在 3000g 下浓缩 30min 至体积为 0.5ml;

[0020] 4、取 0.5ml 磁珠,加入 5ml 反应杯中,放入专用试管架,经磁铁吸附 2 分钟后吸取上清;

[0021] 5、每次加入 1.5ml PH9.50.1mol/L PB,混匀 30 秒,上架,去上清,重复操作 3 次;将步骤 3 获得的抗体溶液加入到上述磁珠中,混匀后室温反应 4 小时;

[0022] 6、加入 0.3ml 1mol/L 的 TRIS 溶液 37 $^{\circ}$ C 15 分钟;

[0023] 7、每次加入 1.5ml PH 7.20.1mol/L PB 清洗已经标记的磁珠,混匀 30 秒,上架,去上清,重复操作 3 次;

[0024] 8、用 100ml 磁珠保存液将磁珠转入 125ml 玻璃瓶;磁珠保存液配方为(均为质量体积比)0.1% BSA,0.05%吐温-20,0.02% NaN₃,20%乙醇,4 $^{\circ}$ C 保存。

[0025] 9、将步骤 8 获得的磁分离试剂用磁珠缓冲液按照 1:1 的体积比例混匀,即得本发明试剂盒中磁分离试剂;所述磁珠缓冲液为浓度是 1mol/L 的 TRIS-HCl 缓冲液。

[0026] 第二步:酶标抗体制备步骤:

[0027] 1、2.5mgTNF- α 单克隆抗体溶于 1.0ml 的 N,N-二甲基甲酰胺中,加入 1ml 的 10mg/ml 辣根过氧化物酶水溶液和 1.3mg 碳化二亚胺,1 小时后将 1.0ml 20mg/ml 的碳化二亚胺加入,混合物不断搅拌,4 $^{\circ}$ C 过夜;

[0028] 2、将步骤 1 的溶液装入透析袋中,对 0.15M 的 PH7.4PBS 透析,4 $^{\circ}$ C 过夜,收集保留液;然后加入 10ml 浓度为 15mg/ml 的 BSA 溶液,4 $^{\circ}$ C 储存备用;最后将收集到的辣根过氧化物酶与 TNF- α 单克隆抗体的偶联物用酶标抗体稀释液以 1:1000 的体积比混合均匀,即得酶标抗体;所述酶标抗体稀释液为浓度是 1mol/L 的 TRIS-HCl 缓冲液。

[0029] 第三步:增强剂配制步骤:

[0030] 1、称取 TRIS1.56g 和 NaCl 4.23g 于 1L 容器中;用移液器将 Proclin-300 量取 0.2ml 于 10ml 纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入上述 1L 容器中;

[0031] 2、用量筒量取 800ml 纯化水于上述 1L 容器中,充分搅拌,直至完全溶解调 PH,控制

PH 在 7.35-7.45 之间；

[0032] 3、称取 Mak330.9g 于上述 1L 容器中；最后定容 1000ml，完全溶解后，用 0.2um 滤器过滤。

[0033] 第四步：

[0034] 校准品和控制品的配制：

[0035] 校准品浓度分别为 0.10、0.20、0.40、0.80、1.60ng/ml；控制品浓度分别为 0.20、0.80ng/ml。

[0036] 第五步：

[0037] 浓缩液配制步骤，配制 1L：

[0038] 1、称取 TRIS 12.54g 和 NaCl 325.6g 于 1L 容器中；

[0039] 2、称取 5g Tween-20 于 100ml 容器中加入 20ml 水使其完全溶解后，倒入上述 1L 容器中；

[0040] 3、用移液器将 Proclin-300 量取 0.2ml 于盛有 10ml 纯化水的烧杯中完全溶解后，倒入上述 1L 容器中；

[0041] 4、用量筒量取 800ml 纯化水于上述 1L 容器中，充分搅拌，直至完全溶解；

[0042] 5、调 PH，控制其范围在 7.35-7.45 之间；

[0043] 6、最后定容 1000ml，完全溶解后用 0.2um 滤器过滤即得。

[0044] 第六步：

[0045] 底物配制步骤，配制 1L：

[0046] 1、称取 TRIS 2.35g、NaCl 6.41g、Na₂SO₃0.002g 和 Proclin-3000.2ml 于 1L 烧杯中；

[0047] 2、用量筒量取 600ml 纯化水于 1L 烧杯中，充分搅拌，直至完全溶解，调 PH，控制其范围在 7.95-8.05 之间；

[0048] 3、加入 250ml Lumi-Phos 530 后，用 0.2um 滤器过滤收集滤液，用纯化水定容至 1000ml，混匀后即得。

[0049] 本发明的主要创新之处在于：

[0050] 1、本发明试剂盒将化学发光技术与免疫磁微粒相结合，提供了一种接近均相的反应体系，与现有技术相比，本发明试剂盒具有更高的检测灵敏度和特异性，并达到了较佳的性能参数。

[0051] 2、本发明公开了一种新的专用增强剂以及浓缩液，使得反应过程更加稳定可靠，实验数据灵敏有效，可精确到 0.01ng，在提高产品性能的同时，并且大大降低了产品成本；

[0052] 3、本试剂盒中的 TNF- α 磁分离试剂，酶标抗体，增强剂，校准品、控制品，浓缩液以及底物均是该反应体系下的最优配方，给该试剂盒的使用效期及检测性能提供了有力保障。

[0053] 4、本试剂盒采用免疫磁微粒分离技术与竞争酶联免疫技术结合，与现有技术的试剂盒相比，大大缩短了检测时间，可以在 10 分钟内检测数个生物样本，对于尿液、血清等样本可以不需前处理直接进行检测。

具体实施方式

[0054] 实施例 1、

[0055] 一、TNF- α 磁分离试剂制备步骤：

[0056] 1、将 1.0mg 辛二酸二琥珀酰亚胺酯溶于 50 μ l DMSO 中，取 2mgTNF- α 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司产品) 溶于 PH 9.5 的 0.1mol/L PB 缓冲液中至总体积为 1ml；

[0057] 2、用移液枪吸取步骤 1 中的辛二酸二琥珀酰亚胺酯加入到步骤 1 的抗体溶液中，置室温 90min；

[0058] 3、将步骤 2 的溶液加入到 Centricon-10 浓缩管中然后放入到高速冷冻离心机中在 3000g 下浓缩 30min 至体积为 0.5ml；

[0059] 4、取 0.5ml 磁珠，加入 5ml 反应杯中，放入专用试管架，经磁铁吸附 2 分钟后吸取上清；磁珠为本领域常用磁珠，优选浓度 25mg/mL，直径为 800nm。

[0060] 5、每次加入 1.5ml PH9.50.1mol/L PB，混匀 30 秒，上架，去上清，重复操作 3 次；将步骤 4 获得的抗体溶液加入到上述磁珠中，混匀后室温反应 4 小时；

[0061] 6、加入 0.3ml 1mol/L 的 TRIS 溶液 37 $^{\circ}$ C 15 分钟；

[0062] 7、每次加入 1.5ml PH 7.20.1mol/L PB 清洗已经标记的磁珠，混匀 30 秒，上架，去上清，重复操作 3 次；

[0063] 8、用 100ml 磁珠保存液将磁珠转入 125ml 玻璃瓶；磁珠保存液配方为 0.1% BSA，0.05% 吐温-20，0.02% NaN₃，20% 乙醇（均为质量体积比），4 $^{\circ}$ C 保存。

[0064] 9、将步骤 8 获得的磁分离试剂用磁珠缓冲液按照 1：1 的体积比例混匀，即得本发明试剂盒中磁分离试剂；所述磁珠缓冲液为浓度是 1mol/L 的 TRIS-HCl 缓冲液。

[0065] 实施例 2

[0066] 一、酶标抗体的制备步骤：

[0067] 1、2.5mgTNF- α 单克隆抗体溶于 1.0ml 的 N,N-二甲基甲酰胺中，加入 1ml 的 10mg/ml 辣根过氧化物酶水溶液和 1.3mg 碳化二亚胺，1 小时后将 1.0ml 20mg/ml 的碳化二亚胺加入，混合物不断搅拌，4 $^{\circ}$ C 过夜；

[0068] 2、将步骤 1 的溶液装入透析袋中，对 0.15M 的 PH7.4PBS 透析，4 $^{\circ}$ C 过夜，收集保留液；然后加入 10ml 浓度为 15mg/ml 的 BSA 溶液，4 $^{\circ}$ C 储存备用；最后将收集到的辣根过氧化物酶与 TNF- α 单克隆抗体的偶联物用酶标抗体稀释液以 1：1000 的体积比混合均匀，即得酶标抗体；所述酶标抗体稀释液为浓度是 1mol/L 的 TRIS-HCl 缓冲液。

[0069] 实施例 3

[0070] 增强剂配制步骤：

[0071] 1、称取 TRIS1.56g 和 NaCl 4.23g 于 1L 容器中；用移液器将 Proclin-300 量取 0.2ml 于 10ml 纯化水的烧杯中完全溶解后，倒入上述 1L 容器中；

[0072] 2、用量筒量取 800ml 纯化水于上述 1L 容器中，充分搅拌，直至完全溶解调 PH，控制 PH 在 7.35-7.45 之间；

[0073] 3、称取 Mak330.9g 于上述 1L 容器中；最后定容 1000ml，完全溶解后，用 0.2 μ m 滤器过滤。Mak33 是罗氏公司的商品化的试剂。

[0074] 实施例 4

[0075] 校准品和控制品的配制步骤：

[0076] 1、最高点：最高浓度点为 X，目标点浓度为 A, B, C, D, E, F，配制 V 体积的溶液时，需

加入原料的体积为分别为 :表 1

[0077]

浓度	加入校准品稀释液体积	加入 X 体积
A	$V-A*V/X$	$A*V/X$
B	$V-B*V/X$	$B*V/X$
C	$V-C*V/X$	$C*V/X$
D	$V-D*V/X$	$D*V/X$
E	$V-E*V/X$	$E*V/X$
F	$V-F*V/X$	$F*V/X$

[0078] 2、TNF- α 定量检测试剂盒 TNF- α 校准品原料 (购于 Santa Cruz 公司) 用纯化水配制成浓度点为 0.10、0.20、0.40、0.80、1.60ng/ml ; 控制品用纯化水配制的浓度点为 0.20、0.80ng/ml。

[0079] 3、完全溶解后,贴好标签于 2-8°C 冷库贮存,有效期为 12 个月。

[0080] 实施例 5 :

[0081] 浓缩液配制步骤 :

[0082] 1、称取 TRIS 12.54g 和 NaCl 325.6g 于 1L 容器中 ;

[0083] 2、称取 5g Tween-20 于 100ml 容器中加适量水使其完全溶解后,倒入上述容器中 ;

[0084] 3、用移液器将 Proclin-300 量取 0.2ml 于盛有 10ml 纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入上述 1L 容器中 ;

[0085] 4、用量筒量取 800ml 纯化水于上述 1L 容器中,充分搅拌,直至完全溶解 ;

[0086] 5、用 HCL 或 NaOH 调 PH,测量其范围在 7.35-7.45 之间 ;

[0087] 6、最后定容 1000ml,测 PH 值,范围在 7.35-7.45 之间即符合要求,完全溶解后用 0.2 μ m 滤器过滤 ;过滤完后,贴好标签于 2-8°C 冷库贮存,有效期为 12 个月 ;

[0088] 实施例 6

[0089] 底物配制操作步骤 :

[0090] 1、称取 TRIS 2.35g、NaCl 6.41g、Na₂SO₃ 0.002g 和 Proclin-3000.2ml 于 1L 烧杯中 ;

[0091] 2、用量筒量取 600ml 纯化水于 1L 烧杯中,充分搅拌,直至完全溶解 ;用 HCl 或 NaOH 调 PH,测量其范围在 7.95-8.05 之间 ;

[0092] 3、加入 250ml Lumi-Phos 530 后,用 0.2 μ m 滤器过滤收集滤液,用纯化水定容至 1000ml,混匀后,贴好标签于 2-8°C 冷库贮存,有效期为 12 个月。

[0093] 本发明试剂盒的使用方法如下 :

[0094] 1、加 15 μ l TNF- α 校准品、质控品、待测标本至对应试管底部。

[0095] 2、加 25 μ l 酶标抗体至每一试管中。

[0096] 3、加 25 μ l 增强剂至每一试管中。

[0097] 4、加 25 μ l 磁分离试剂至每一试管中。

[0098] 5、多管混匀器轻轻振荡放有试管的试管架 30s 后,置 37°C 水浴 30 分钟。

[0099] 6、试管连架放至磁分离器上,确保每支试管都与分离器表面接触,沉淀 2 分钟,然后缓慢的倒转分离器倒出上清液。

[0100] 7、浓缩液用纯化水稀释 10 倍后,加 100 μ l 稀释后的浓缩液至每一试管中,置多管混匀器上轻轻振荡混匀 30s。

[0101] 8、加 100 μ l 底物溶液至试管中混匀 3 秒,迅速用准备好的发光检测仪进行检测。

[0102] 临床试验:

[0103] 病例:市人民医院临床确诊的支气管哮喘患者 56 例,男 29 例,女 27 例,年龄 46-67 岁,依据中华医学会呼吸病学分会哮喘组 2003 年制定的哮喘诊断标准(中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南. 中华结核和呼吸杂志,2003 年)。

[0104] 急性发作组(急性期条件:反复发作、喘息、呼吸困难、胸闷或咳嗽病史,支气管舒张实验阳性,符合哮喘急性期的诊断标准):38 例。病情缓解组(缓解期标准:经过治疗或未经治疗症状、体征消失,呼吸道功能恢复到急性发作前水平并维持 10 天以上):18 例。对照组:均经病史调查、胸部 x 线摄片、肺功能测定排除患有肺部疾病可能,所有病例均排除恶性肿瘤、活动性肺结核、风湿性疾病,实验室检查,确认无心血管、呼吸及肝、肾、代谢和内分泌疾病,近 2 个月无感染史的健康人群):18 例,男 10 例,女 8 例;年龄 48-72 岁。

[0105] 用 SPSS10.0 统计软件对数据进行处理,所测数据用均数 \pm 标准差 ($X \pm s$) 表示,各组血清 TNF- α 水平,组间比较用 t 检验; $P \leq 0.05$ 时为差异有统计学意义。

[0106]

组别	对照组 (ng/ml)	急性发作组 (ng/ml)	缓解组 (ng/ml)
TNF- α 含量	0.178 \pm 0.011	0.872 \pm 0.167	0.235 \pm 0.049

[0107] 由此证明细胞因子 TNF- α 在哮喘的病理生理过程中起着十分重要的调节作用。本实验对支气管哮喘患者血清中的 TNF- α 水平变化较正常对照组和缓解组有了显著性变化, $P \leq 0.05$ 。

[0108] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

专利名称(译)	一种定量检测肿瘤坏死因子 α 的试剂盒		
公开(公告)号	CN102495215A	公开(公告)日	2012-06-13
申请号	CN201110399728.2	申请日	2011-12-06
[标]申请(专利权)人(译)	任庆远		
申请(专利权)人(译)	任庆远		
当前申请(专利权)人(译)	任庆远		
[标]发明人	任庆远 李守玮		
发明人	任庆远 李守玮		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/535		
其他公开文献	CN102495215B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了定量检测肿瘤坏死因子 α 的诊断试剂盒及其检测方法，该试剂盒包含TNF- α 磁分离试剂，酶标抗体，增强剂，校准品、控制品，浓缩液以及底物。本发明试剂盒采用免疫磁微粒分离技术与竞争酶联免疫技术结合，具有更高的检测灵敏度和特异性，并且大大缩短了检测时间，可以在10分钟内检测数个生物样本，对于尿液、血清等样本可以不需前处理直接进行检测。

浓度	加入校准品稀释液体积	加入 X 体积
A	$V-A*V/X$	$A*V/X$
B	$V-B*V/X$	$B*V/X$
C	$V-C*V/X$	$C*V/X$
D	$V-D*V/X$	$D*V/X$
E	$V-E*V/X$	$E*V/X$
F	$V-F*V/X$	$F*V/X$

TNF- α 定量检测试剂盒 TNF- α 校准品原料 (购于 Santa Cruz