



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109212197 A

(43)申请公布日 2019.01.15

(21)申请号 201810902963.9

G01N 33/532(2006.01)

(22)申请日 2018.08.09

(71)申请人 迪瑞医疗科技股份有限公司

地址 130103 吉林省长春市高新区宜居路
3333号

(72)发明人 高智玲 李冬梅 高威 孙成艳
何浩会

(74)专利代理机构 长春众邦菁华知识产权代理
有限公司 22214

代理人 王莹

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

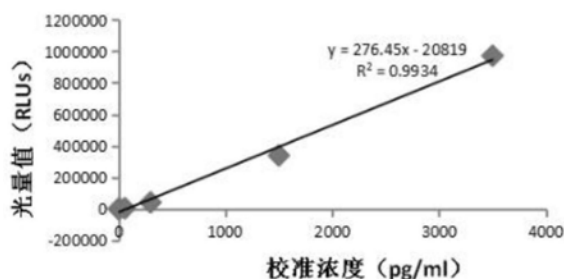
权利要求书2页 说明书11页 附图1页

(54)发明名称

甲状旁腺素试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种甲状旁腺素试剂盒及其制备方法,属于免疫诊断技术领域。解决了现有技术中甲状旁腺激素的方法或是精准度底,或是货价期短、操作复杂、测试结果不稳定、价格昂贵的技术问题。本发明的试剂盒,包括R1试剂、R2试剂和R3试剂;R1试剂为含有链霉亲和素磁颗粒的缓冲液I,R2试剂为经缓冲液I稀释的化学发光标记物标记的甲状旁腺素单克隆抗体溶液,R3试剂为经缓冲液I稀释的偶联标记的甲状旁腺素单克隆抗体溶液。该试剂盒采用化学发光免疫分析法对甲状旁腺素进行检测,具有检测灵敏度高,定量检测准确,操作简单,无放射性风险及检测时间短,并且可以对抗原、抗体类目标物质进行检测的优点。



1. 甲状旁腺素试剂盒,其特征在于,包括R1试剂、R2试剂和R3试剂;

所述R1试剂为含有链霉亲和素磁颗粒的缓冲液I,R1试剂中链霉亲和素磁颗粒的浓度为0.007%~1%;

所述R2试剂为经缓冲液I稀释的化学发光标记物标记的甲状旁腺素单克隆抗体溶液,R2试剂中化学发光标记物标记的甲状旁腺素单克隆抗体的浓度为0.1~1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

所述R3试剂为经缓冲液I稀释的偶联标记的甲状旁腺素单克隆抗体溶液,R3试剂中偶联标记的甲状旁腺素单克隆抗体的浓度为0.7~2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

所述缓冲液I由50~200mM的咪唑乙磺酸、bistris丙烷或柠檬酸,0.05%~0.1%的稳定剂和0.01~0.1%的防腐剂组成,PH为6.0~6.5。

2. 根据权利要求1所述的甲状旁腺素试剂盒,其特征在于,所述链霉亲和素磁颗粒的粒径是0.05~1 μm 。

3. 根据权利要求1所述的甲状旁腺素试剂盒,其特征在于,所述化学发光标记物标记的甲状旁腺素单克隆抗体中,甲状旁腺素单克隆抗体与化学发光标记物的标记的摩尔比为1:(3~20);化学发光标记物为吖啶酯或三联吡啶钡。

4. 权利要求1所述的甲状旁腺素试剂盒,其特征在于,所述偶联标记的甲状旁腺素单克隆抗体中,甲状旁腺素单克隆抗体与偶联标记物的标记摩尔比为1:(5~20);偶联标记物为生物素。

5. 根据权利要求1所述的甲状旁腺素试剂盒,其特征在于,所述稳定剂为吐温。

6. 根据权利要求1所述的甲状旁腺素试剂盒,其特征在于,所述防腐剂为 NaN_3 或ProClin300。

7. 根据权利要求1所述的甲状旁腺素试剂盒,其特征在于,该试剂盒中还包括甲状旁腺素校准品;所述甲状旁腺素校准品包括浓度分别为0 pg/mL 、10 pg/mL 、60 pg/mL 、300 pg/mL 、1500 pg/mL 、3500 pg/mL 的甲状旁腺素溶液。

8. 根据权利要求1所述的甲状旁腺素试剂盒,其特征在于,该试剂盒中还包括化学发光预激发液A和化学发光激发液B;所述化学发光激发液A为硝酸溶液;所述化学发光激发液B为氢氧化钠溶液。

9. 根据权利要求1所述的甲状旁腺素试剂盒,其特征在于,该试剂盒中还包括清洗液;所述清洗液为磷酸缓冲液。

10. 权利要求1~9任何一项所述的甲状旁腺素试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤一、制备R1试剂

将链霉亲和素磁颗粒溶液加入TBST溶液中,充分混匀后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒,使用缓冲液I清洗磁颗粒后,再用缓冲液I配成磁颗粒浓度为0.007%~1%的固相试剂,即为R1试剂;

步骤二、制备R2试剂

先将甲状旁腺素单克隆抗体放入离心管中,保证甲状旁腺素单克隆抗体位于离心管底部位置后加入碳酸缓冲液,充分混匀,混匀后加入化学发光标记物的DMF溶液,用离心机室温条件下离心0.5min;

然后将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,将暗盒放入气浴恒温振荡器中混匀,

加入赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器中混匀,封闭0.5~1h;

再将封闭好的甲状旁腺素单克隆抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用磷酸缓冲液洗脱,分别收集;

最后将收集好的甲状旁腺素单克隆抗体溶液用缓冲液I稀释至终浓度为0.1~1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,即为R2试剂;

步骤三、制备R3试剂

取甲状旁腺素单克隆抗体,用pH为6.0~6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入已活化的长链碘化生物素,2~8 $^{\circ}\text{C}$ 反应1~2h,再转入室温继续反应30~40min,最后加入赖氨酸反应30~40min,反应液脱盐柱纯化,加入缓冲液I稀释至终浓度为0.7~2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,即为R3试剂。

甲状旁腺素试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫诊断技术领域,具体涉及一种甲状旁腺素试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 甲状旁腺素(parathyroidhormone,PTH)在甲状旁腺内合成,并分泌到血液中。PTH(1-84),也称为生物完整性PTH,是含有84个氨基酸的单链多肽,分子量约为9500道尔顿。PTH的半衰期只有几分钟,随后断裂为各种片段,并以极快的速度从血液循环中清除。通过检测生物全段PTH(1-84)可直接了解甲状旁腺的分泌活性。

[0003] PTH的主要作用是增加血钙,这主要通过促进骨骼中钙的释放和远端小管中的肾再吸收作用来实现。PTH和降钙素的相互作用确保血钙浓度的稳定。高血钙浓度抑制PTH分泌,低血钙浓度则促进PTH分泌。PTH还能增进肾近端小管中1- α 羟化酶的活性,促进维生素D活性代谢物1,25二羟-维生素D的合成,后者转而增加钙的肠吸收,并对甲状旁腺水平上的PTH分泌发挥内分泌反馈作用。PTH还可降低近端小管中的磷酸盐的肾再吸收,进而使血清磷减少。此外,PTH通过与成骨细胞PTH受体结合刺激骨骼生成,从而增强I型胶原蛋白的合成。这种促进骨合成代谢的作用现已在临床实践中用来治疗骨质疏松症。甲状旁腺功能障碍影响PTH分泌,会导致血钙浓度升高或降低(高钙血症或低钙血症)。甲状旁腺分泌功能下降(甲状旁腺机能减退)的探测要求高灵敏性检测,以便能测定PTH水平。甲状旁腺功能亢进会导致PTH分泌增加(甲状旁腺机能亢进)。其主要与甲状旁腺腺瘤有关。继发性甲状旁腺机能亢进血钙浓度降低,则是其他疾病造成(如维生素D缺乏)。目前,评估甲状旁腺机能亢进时,PTH和钙浓度的测定更为重要。术中使用的临床研究原发性甲状旁腺机能亢进,肾衰有关的继发性甲状旁腺机能亢进,以及肾移植手术后第三型甲状旁腺机能亢进的甲状旁腺腺瘤切除术中PTH测定也已经有报道。因为PTH的半衰期仅为3-5min,所以切除异常腺体后PTH浓度明显降低,这样外科医生通过测定PTH就能评估切除是否完整以及全部分泌功能亢进的甲状旁腺组织是否已完全从患者身上切除。

[0004] 目前测定甲状旁腺激素的方法主要是联免酶疫吸附法(EIA)和放射免疫分析法(RIA)。但二者在实际应用中都均存在一些固有缺陷,其中,酶联免疫吸附法操作繁琐,且酶容易失活,结果受人为因素影响结果较大,难以精确定量。放射免疫分析法则有放射性污染,标记物的货价期短、操作复杂、测试结果不稳定,且所需仪器较昂贵。

[0005] 有鉴于此,有必要提供一种作简单、精准定量、无污染、灵敏度高的甲状旁腺激素的方法。

发明内容

[0006] 本发明的目的是解决现有技术中甲状旁腺激素的方法或是精准度底,或是货价期短、操作复杂、测试结果不稳定、价格昂贵的技术问题,提供一种甲状旁腺素试剂盒及其制备方法。

[0007] 本发明解决上述技术问题采取的技术方案如下:

- [0008] 本发明提供的甲状旁腺素试剂盒,包括R1试剂、R2试剂和R3试剂;
- [0009] 所述R1试剂为含有链霉亲和素磁颗粒的缓冲液I,R1试剂中链霉亲和素磁颗粒的浓度为0.007%~1%;
- [0010] 所述R2试剂为经缓冲液I稀释的化学发光标记物标记的甲状旁腺素单克隆抗体溶液,R2试剂中化学发光标记物标记的甲状旁腺素单克隆抗体的浓度为0.1~1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$;
- [0011] 所述R3试剂为经缓冲液I稀释的偶联标记的甲状旁腺素单克隆抗体溶液,R3试剂中偶联标记的甲状旁腺素单克隆抗体的浓度为0.7~2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$;
- [0012] 所述缓冲液I由50~200mM的吗啉乙磺酸(MES)、bistris丙烷或柠檬酸,0.05%~0.1%的稳定剂和0.01~0.1%的防腐剂组成,PH为6.0~6.5。
- [0013] 优选的是,所述链霉亲和素磁颗粒的粒径是0.05~1 μm 。
- [0014] 优选的是,所述化学发光标记物标记的甲状旁腺素单克隆抗体中,甲状旁腺素单克隆抗体与化学发光标记物的标记的摩尔比为1:(3~20);化学发光标记物为吡啶酯或三联吡啶钡。
- [0015] 优选的是,所述偶联标记的甲状旁腺素单克隆抗体中,甲状旁腺素单克隆抗体与偶联标记物的标记摩尔比为1:(5~20);偶联标记物为生物素。
- [0016] 优选的是,所述稳定剂为吐温。
- [0017] 优选的是,所述防腐剂为 NaN_3 或ProClin300。
- [0018] 优选的是,该试剂盒中还包括甲状旁腺素校准品;所述甲状旁腺素校准品包括浓度分别为0pg/mL、10pg/mL、60pg/mL、300pg/mL、1500pg/mL、3500pg/mL的甲状旁腺素溶液。
- [0019] 优选的是,该试剂盒中还包括化学发光预激发液A和化学发光激发液B;所述化学发光激发液A为硝酸溶液;所述化学发光激发液B为氢氧化钠溶液。
- [0020] 优选的是,该试剂盒中还包括清洗液;所述清洗液为磷酸缓冲液。
- [0021] 本发明还提供上述甲状旁腺素试剂盒的制备方法,包括以下步骤:
- [0022] 步骤一、制备R1试剂
- [0023] 将链霉亲和素磁颗粒溶液加入TBST溶液中,充分混匀后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒,使用缓冲液I清洗磁颗粒后,再用缓冲液I配成磁颗粒浓度为0.007%~1%的固相试剂,即为R1试剂;
- [0024] 步骤二、制备R2试剂
- [0025] 先将甲状旁腺素单克隆抗体放入离心管中,保证甲状旁腺素单克隆抗体位于离心管底部位置后加入碳酸缓冲液,充分混匀,混匀后加入化学发光标记物的DMF溶液,用离心机室温条件下离心0.5min;
- [0026] 然后将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,将暗盒放入气浴恒温振荡器中混匀,加入赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器中混匀,封闭0.5~1h;
- [0027] 再将封闭好的甲状旁腺素单克隆抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用磷酸缓冲液洗脱,分别收集;
- [0028] 最后将收集好的甲状旁腺素单克隆抗体溶液用缓冲液I稀释至终浓度为0.1~1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,即为R2试剂;
- [0029] 步骤三、制备R3试剂
- [0030] 取甲状旁腺素单克隆抗体,用pH为6.0~6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入已活化

的长链磺化生物素,2~8℃反应1~2h,再转入室温继续反应30~40min,最后加入赖氨酸反应30~40min,反应液脱盐柱纯化,加入缓冲液I稀释至终浓度为0.7~2.0μg/ml,即为R3试剂。

[0031] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0032] 本发明的甲状旁腺素试剂盒采用化学发光免疫分析法对甲状旁腺素进行检测,具有检测灵敏度高,定量检测准确,操作简单,无放射性风险及检测时间短,并且可以对抗原、抗体类目标物质进行检测的优点,具体来讲:

[0033] 1、本发明的甲状旁腺素试剂盒采用顺磁性链霉亲和素磁颗粒微粒作为固相载体,其比表面积大,提高了检测的灵敏度;

[0034] 且本发明的甲状旁腺素试剂盒与化学发光免疫检测仪器组成封闭系统,降低了人为操作的误差,进一步提高了整个系统的灵敏度与准确度;

[0035] 2、本发明的甲状旁腺素试剂盒与检测样品所形成的抗原抗体复合物,稳定性佳,且分别由化学发光标记物(吖啶酯)标记的抗体及偶联标记(生物素标记)的抗体进行检测,增加了发光率的同时扩大了反应级,大大提高了试剂的特异性及检测速度,经验证,该试剂盒从检测到出结果只需20min;

[0036] 3、本发明的甲状旁腺素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。

附图说明

[0037] 图1为本发明实施例1的甲状旁腺素试剂盒的反应校准曲线。

[0038] 图2为本发明实施例2的甲状旁腺素试剂盒的反应校准曲线。

[0039] 图3为本发明实施例3的甲状旁腺素试剂盒的反应校准曲线。

具体实施方式

[0040] 为了进一步理解本发明,下面结合实施例对本发明优选实施方案进行描述,但是应当理解,这些描述只是为进一步说明本发明的特征和优点,而不是对本发明权利要求的限制。

[0041] 本发明的甲状旁腺素试剂盒,包括R1试剂、R2试剂和R3试剂,还可以包括甲状旁腺素校准品、化学发光预激发液A、化学发光激发液B和清洗液。

[0042] 其中,R1试剂为含有链霉亲和素磁颗粒的缓冲液I,R1试剂中链霉亲和素磁颗粒的浓度为0.007%~1%,链霉亲和素磁颗粒的粒径优选为0.05~1μm;

[0043] R2试剂为经缓冲液I稀释的化学发光标记物标记的甲状旁腺素单克隆抗体溶液,R2试剂中化学发光标记物标记的甲状旁腺素单克隆抗体的浓度为0.1~1.0μg/mL;化学发光标记物标记的甲状旁腺素单克隆抗体中,甲状旁腺素单克隆抗体与化学发光标记物的标记的摩尔比优选为1:(3~20);化学发光标记物优选为吖啶酯或三联吡啶钐;

[0044] R3试剂为经缓冲液I稀释的偶联标记的甲状旁腺素单克隆抗体溶液,R3试剂中偶联标记的甲状旁腺素单克隆抗体的浓度为0.7~2.0μg/ml;偶联标记的甲状旁腺素单克隆抗体中,甲状旁腺素单克隆抗体与偶联标记物的标记摩尔比优选为1:(5~20);偶联标记物优选为生物素;

[0045] 甲状旁腺素校准品包括浓度分别为0pg/mL、10pg/mL、60pg/mL、300pg/mL、1500pg/mL、3500pg/mL的甲状旁腺素溶液；甲状旁腺素校准品的溶剂优选由0.1mol/L的PB、0.15mol/L的氯化钠、1%的牛血清白蛋白及0.05%的tween-20组成的pH值6.5的缓冲液。

[0046] 化学发光激发液A为硝酸溶液；

[0047] 化学发光激发液B为氢氧化钠溶液；

[0048] 清洗液为磷酸缓冲液。

[0049] 上述技术方案中，缓冲液I由50~200mM的吗啉乙磺酸、bistris丙烷或柠檬酸，0.05%~0.1%的稳定剂和0.01~0.1%的防腐剂组成，PH为6.0~6.5；稳定剂优选为吐温，防腐剂优选为NaN₃或ProClin300。

[0050] 本发明还提供上述甲状旁腺素试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

[0051] 步骤一、制备R1试剂

[0052] 将链霉亲和素磁颗粒溶液加入TBST溶液中，充分混匀后，放置于磁分离器上，直至上清无混浊，弃上清，留取磁颗粒，使用缓冲液I清洗磁颗粒后，再用缓冲液I配成磁颗粒浓度为0.007%~1%的固相试剂，即为R1试剂；

[0053] 其中，链霉亲和素磁颗粒与TBST溶液的配比优选为50mg:10mL；一般清洗需重复清洗三次；R1试剂需在2~8℃保存。

[0054] 步骤二、制备R2试剂

[0055] 先将甲状旁腺素单克隆抗体放入离心管中，保证甲状旁腺素单克隆抗体位于离心管底部位置后加入碳酸缓冲液，充分混匀，混匀后加入化学发光标记物的DMF溶液，用离心机室温条件下离心0.5min；

[0056] 然后将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中，将暗盒放入气浴恒温振荡器中混匀，加入赖氨酸封闭液，放入气浴恒温振荡器中混匀，封闭0.5~1h；

[0057] 再将封闭好的甲状旁腺素单克隆抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化，用磷酸缓冲液洗脱，分别收集；

[0058] 最后将收集好的甲状旁腺素单克隆抗体溶液用缓冲液I稀释至终浓度为0.1~1.0 μg/mL，即为R2试剂；

[0059] 其中，保证甲状旁腺素单克隆抗体位于离心管底部采取的技术手段一般是使离心机室温离心20s；甲状旁腺素单克隆抗体与化学发光标记物的标记摩尔比优选为1:(3~20)；气浴恒温振荡器的温度优选为25℃，气浴恒温振荡器中混匀一般需要4h，速度一般采用中速；赖氨酸封闭液的浓度为20%，其加入量与甲状旁腺素单克隆抗体的配比为:1mL:500μg；R2试剂需在2~8℃保存。

[0060] 步骤三、制备R3试剂

[0061] 取甲状旁腺素单克隆抗体，用pH为6.0~6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入已活化的长链磺化生物素，2~8℃反应1~2h，再转入室温继续反应30~40min，最后加入赖氨酸反应30~40min，反应液脱盐柱纯化，加入缓冲液I稀释至终浓度为0.7~2.0μg/ml，即为R3试剂；

[0062] 其中，甲状旁腺素单克隆抗体与偶联标记物的标记摩尔比优选为1:(5~20)。

[0063] 步骤四、校准品制备

[0064] 将甲状旁腺素用缓冲液分别配制成浓度为0pg/mL、10pg/mL、60pg/mL、300pg/mL、

1500pg/mL、3500pg/mL的校准品,等量分装成浓度分别为0pg/mL、10pg/mL、60pg/mL、300pg/mL、1500pg/mL、3500pg/mL的6瓶校准品;

[0065] 缓冲液由0.1mol/L的PB、0.15mol/L的氯化钠、1%的牛血清白蛋白及0.05%的tween-20组成,pH值6.5,需2-8℃保存。

[0066] 上述技术方案中,采用的甲状旁腺素单克隆抗体为小鼠甲状旁腺素单克隆抗体,为现有技术。

[0067] 本发明的甲状旁腺素试剂盒的检测步骤如下:

[0068] 以全自动化学发光免疫分析仪(CM180)为检测工具,方法学为夹心法。即:先向仪器依次加入10μL的样本、50μL的R3试剂、50μL的R2试剂和40μL的R1试剂,反应20min后,进行磁分离;然后仪器将反应物送入暗室,一次性加入化学发光激发液A(HNO₃溶液)和化学发光激发液B(NaOH溶液)进行反应,最后记录光量子数。

[0069] 以下结合实施例进一步说明本发明。

[0070] 实施例1

[0071] 甲状旁腺素试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0072] R1试剂制备:取浓度是100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒(粒径0.1μm)溶液0.5毫升(50mg)加入TBST溶液中,充分混匀后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒,使用缓冲液I清洗三次,清洗后,再用缓冲液I配成磁颗粒浓度为0.05%的固相试剂,即为R1试剂,2~8℃保存;

[0073] R2试剂制备:将500μg小鼠甲状旁腺素单克隆抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入碳酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5μl 2mg/mL吡啶酯的DMF溶液,用离心机室温条件下离心0.5min;将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,之后将暗盒放入气浴恒温振荡器(25℃)中,混匀4h;加入1mL 20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封闭时间为1h。将封闭好的抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分别收集;将收集好的抗体溶液用缓冲液I稀释至终浓度为0.1μg/mL,即为R2试剂,2~8℃保存。

[0074] R3试剂制备:取0.5μg/ml小鼠甲状旁腺素单克隆抗体,采用pH为6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入10倍摩尔比已活化的长链碘化生物素Sulfo-NHS-LC-Biotin,2~8℃反应2h,再转入室温继续反应30min,最后加入100倍摩尔比的赖氨酸反应30min,反应液用脱盐柱纯化,加入缓冲液I稀释至终浓度为0.7μg/ml。

[0075] R1、R2和R3试剂中,缓冲液I由50mM的吗啉乙磺酸、0.05%的吐温和0.05%的ProClin300组成,PH为6.5。

[0076] 实施例2

[0077] 甲状旁腺素试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0078] R1试剂制备:取浓度是100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒(粒径0.5μm)溶液0.5毫升(50mg)加入TBST溶液中,充分混匀后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒,使用缓冲液I清洗三次,清洗后,再用缓冲液I配成磁颗粒浓度为1%的固相试剂,即为R1试剂,2~8℃保存;

[0079] R2试剂制备:将500μg小鼠甲状旁腺素单克隆抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入碳酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5μl 2mg/

mL吡啶酯的DMF溶液,用离心机室温条件下离心0.5min;将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,之后将暗盒放入气浴恒温振荡器(25℃)中,混匀2h;加入1mL 20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封闭时间为1h。将封闭好的抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分别收集;将收集好的抗体溶液用缓冲液I稀释至终浓度为0.5μg/mL,即为R2试剂,2~8℃保存。

[0080] R3试剂制备:取1.5μg/ml小鼠甲状旁腺素单克隆抗体,采用pH为6.0的TRIS缓冲液透析纯化后加入20倍摩尔比已活化的长链磺化生物素Sulfo-NHS-LC-Biotin,2~8℃反应2h,再转入室温继续反应30min,最后加入100倍摩尔比的赖氨酸反应30min,反应液用脱盐柱纯化,加入缓冲液I稀释至终浓度为2.0μg/ml,即为R3试剂。

[0081] R1、R2和R3试剂中,缓冲液I由100mM MES、0.05%吐温和0.05%Proclin300组成,pH为6.0的缓冲液。

[0082] 实施例3

[0083] 甲状旁腺素试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0084] R1试剂制备:取浓度是100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒(粒径0.8μm)溶液0.5毫升(50mg)加入TBST溶液中,充分混匀后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒,使用缓冲液I清洗三次,清洗后,再用缓冲液I配成磁颗粒浓度为0.01%的固相试剂,即为R1试剂,2~8℃保存;

[0085] R2试剂制备:将500μg小鼠甲状旁腺素单克隆抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入碳酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5μl 2mg/mL吡啶酯的DMF溶液,用离心机室温条件下离心0.5min;将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,之后将暗盒放入气浴恒温振荡器(25℃)中,混匀3h;加入1mL 20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封闭时间为1h。将封闭好的抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分别收集;将收集好的抗体溶液用缓冲液I稀释至终浓度为1.0μg/mL,即为R2试剂,2~8℃保存。

[0086] R3试剂制备:取2.0μg/ml小鼠甲状旁腺素单克隆抗体,采用pH为6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入15倍摩尔比已活化的长链磺化生物素Sulfo-NHS-LC-Biotin,2~8℃反应2h,再转入室温继续反应30min,最后加入100倍摩尔比的赖氨酸反应30min,反应液用脱盐柱纯化,加入缓冲液I稀释至终浓度为1.0μg/ml。

[0087] R1、R2和R3试剂中,缓冲液I由200mM的吗啉乙磺酸、0.05%的吐温和0.1%的ProClin300组成,PH值为6.5。

[0088] 校准品制备:将甲状旁腺素用缓冲液分别配制成浓度为0pg/mL、10pg/mL、60pg/mL、300pg/mL、1500pg/mL、3500pg/mL的校准品,等量分装成浓度分别为0pg/mL、10pg/mL、60pg/mL、300pg/mL、1500pg/mL、3500pg/mL的6瓶校准品;缓冲液由0.1mol/L的PB、0.15mol/L的氯化钠、1%的牛血清白蛋白及0.05%的tween-20组成,pH值6.5,校准品需2~8℃保存。

[0089] 对实施例1~3的甲状旁腺素试剂盒的性能进行评价,该甲状旁腺素试剂盒的检测步骤如具体实施方式中所述。

[0090] 灵敏度的检测:参照《体外诊断试剂分析性能评估系列指导原则》,主校准品A为零浓度校准品,主校准品B为相邻校准品;测试主校准品A,重复20次;测试主校准品B,重复2次,检测结果如表1所示。

[0091] 表1实施例1的甲状旁腺素试剂盒的灵敏度检测结果

[0092]

测定次数	主校准品 A	主校准品 B
[0093]		
Rep1	624	1857
Rep2	656	1934
Rep3	723	
Rep4	627	
Rep5	667	
Rep6	691	
Rep7	643	
Rep8	649	
Rep9	661	
Rep10	662	
Rep11	656	
Rep12	739	/
Rep13	644	
Rep14	709	
Rep15	673	
Rep16	660	
Rep17	646	
Rep18	691	
Rep19	647	
Rep20	668	
测定均值	666.8	1895.5
样品	主校准品 A	主校准品 B
浓度 (pg/ml)	0.00	10.00
标准差 (SD)	30.21	/
均值+2SD	727.23	/
最低检测限 (pg/mL)	0.4918	

[0094] 表2实施例2的甲状旁腺素试剂盒的灵敏度检测结果

[0095]

测定次数	主校准品 A	主校准品 B
Rep1	697	1778
Rep2	654	1894
Rep3	631	
Rep4	738	
Rep5	645	
Rep6	650	
Rep7	663	
Rep8	657	
Rep9	655	
Rep10	636	
Rep11	643	
Rep12	645	/
Rep13	644	
Rep14	641	
Rep15	652	
Rep16	630	
Rep17	643	
Rep18	644	
Rep19	655	
Rep20	644	
测定均值	653.35	1836
样品	主校准品 A	主校准品 B
浓度 (pg/ml)	0.00	10.00
标准差 (SD)	24.40	/
均值+2SD	702.15	/
最低检测限 (pg/mL)	0.4126	

[0096] 表3实施例3的甲状旁腺素试剂盒的灵敏度检测结果

[0097]

测定次数	主校准品 A	主校准品 B
Rep1	717	1832
Rep2	664	1901
Rep3	632	
Rep4	648	
Rep5	639	
Rep6	653	
Rep7	667	
Rep8	647	
Rep9	654	
Rep10	632	
Rep11	643	
Rep12	649	/
Rep13	657	
Rep14	648	
Rep15	642	
Rep16	636	
Rep17	645	
Rep18	649	
Rep19	659	
Rep20	674	
测定均值	652.75	1866.5
样品	主校准品 A	主校准品 B
浓度 (pg/ml)	0.00	10.00
标准差 (SD)	18.74	/
均值+2SD	690.24	/

[0098]

最低检测限 (pg/mL)	0.3089
---------------	--------

[0099] 从表1~3可以看出,本发明灵敏度最低检测线分别为0.4918pg/mL、0.4126pg/mL和0.3089pg/mL,灵敏度应小于1.0pg/mL。

[0100] 利用实施例1~3的甲状旁腺素试剂盒对校准品进行线性检测:即将浓度为3pg/mL、10pg/mL、60pg/mL、300pg/mL、1500pg/mL、3500pg/mL的校准品进行检测,检测结果如表4~6所示。

[0101] 表4实施例1的甲状旁腺素试剂盒对校准品的线性检测结果

[0102]

校准点	1	2	3	4	5	6
校准浓度 (pg/mL)	0	10	60	300	1500	3500
光量值	622	1846	4553	41569	339372	971656

[0103] 表5实施例2的甲状旁腺素试剂盒对校准品的线性检测结果

[0104]

校准点	1	2	3	4	5	6
校准浓度 (pg/mL)	0	10	60	300	1500	3500
光量值	637	1891	4623	42537	347412	971696

[0105] 表6实施例3的甲状旁腺素试剂盒对校准品的线性检测结果

[0106]

校准点	1	2	3	4	5	6
校准浓度 (pg/mL)	0	10	60	300	1500	3500
光量值	607	1879	4601	41498	351358	971712

[0107] 利用表3~6中数据作标准曲线,得到线性相关系数 $r=0.993\sim 0.995$,线性范围为5-3500pg/mL,分别如图1~3所示。

[0108] 对实施例1~3的甲状旁腺素试剂盒进行抗干扰特异性实验,检测结果如表7~9所示。

[0109] 表7实施例1的甲状旁腺素试剂盒的抗干扰特异性实验结果

[0110]

潜在干扰物质	浓度	平均回收率 (%)
--------	----	-----------

[0111]

胆红素	20 mg/dL	102
血红蛋白	500 mg/dL	98
甘油三酯	50000mg/dL	104
人血清白蛋白	49 g/L	97.2

[0112] 表8实施例2的甲状旁腺素试剂盒的抗干扰特异性实验结果

[0113]

潜在干扰物质	浓度	平均回收率 (%)
胆红素	20 mg/dL	103.4
血红蛋白	500 mg/dL	97
甘油三酯	50000mg/dL	101
人血清白蛋白	49 g/L	101

[0114] 表9实施例3的甲状旁腺素试剂盒的抗干扰特异性实验结果

[0115]

潜在干扰物质	浓度	平均回收率 (%)
胆红素	20 mg/dL	99
血红蛋白	500 mg/dL	101.5
甘油三酯	50000mg/dL	99
人血清白蛋白	49 g/L	98

[0116] 从表7~9可以看出,在胆红素20mg/dL (342 μ mol/L)、血红蛋白500mg/dL (5g/L)、甘油三酯(三酸甘油酯) 50000mg/dL (56.44mmol/L)、人血清白蛋白49g/L中的的样本,不会显著影响甲状旁腺素的测定($\pm 10\%$)。

[0117] 对所公开的实施例的上述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

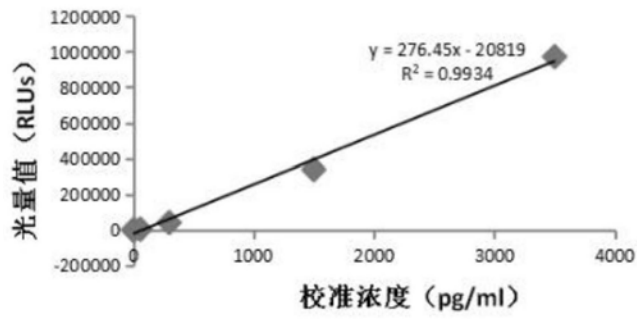


图1

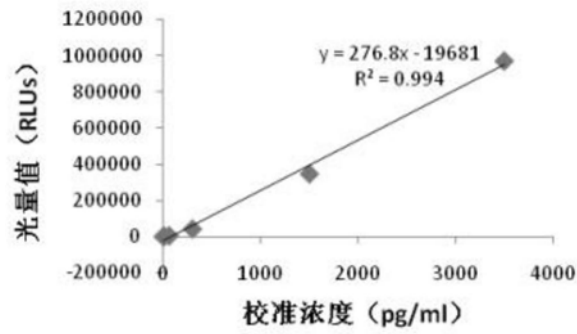


图2

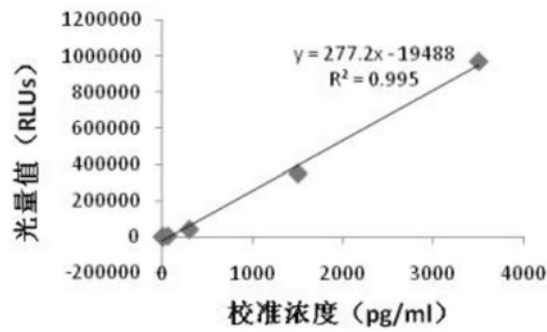


图3

专利名称(译)	甲状旁腺素试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN109212197A	公开(公告)日	2019-01-15
申请号	CN201810902963.9	申请日	2018-08-09
[标]发明人	高智玲 李冬梅 高威 孙成艳 何浩会		
发明人	高智玲 李冬梅 高威 孙成艳 何浩会		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/58 G01N21/76 G01N33/531 G01N33/532		
代理人(译)	王莹		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种甲状旁腺素试剂盒及其制备方法，属于免疫诊断技术领域。解决了现有技术中甲状旁腺激素的方法或是精准度底，或是货价期短、操作复杂、测试结果不稳定、价格昂贵的技术问题。本发明的试剂盒，包括R1试剂、R2试剂和R3试剂；R1试剂为含有链霉亲和素磁颗粒的缓冲液I，R2试剂为经缓冲液I稀释的化学发光标记物标记的甲状旁腺素单克隆抗体溶液，R3试剂为经缓冲液I稀释的偶联标记的甲状旁腺素单克隆抗体溶液。该试剂盒采用化学发光免疫分析法对甲状旁腺素进行检测，具有检测灵敏度高，定量检测准确，操作简单，无放射性风险及检测时间短，并且可以对抗原、抗体类目标物质进行检测的优点。

