



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107515296 B

(45)授权公告日 2019.02.26

(21)申请号 201710601083.3

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2017.07.21

G01N 33/544(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107515296 A

(43)申请公布日 2017.12.26

(73)专利权人 王贤俊

地址 325000 浙江省温州市瓯海娄桥工业园区森茂路28号

(72)发明人 王贤俊 何丹

(74)专利代理机构 温州名创知识产权代理有限公司 33258

代理人 曾建芳

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

(56)对比文件

CN 102628865 A, 2012.08.08, 全文.

CN 102818899 A, 2012.12.12, 全文.

CN 104535770 A, 2015.04.22, 全文.

CN 105911298 A, 2016.08.31, 全文.

CN 106199000 A, 2016.12.07, 全文.

CN 106950363 A, 2017.07.14, 全文.

US 5232859 A, 1993.08.03, 全文.

EP 1028312 A1, 2000.08.16, 全文.

CN 103048465 A, 2013.04.17, 全文.

黄飏 等. 免疫分析中的干扰物及其排除.

《标记免疫分析与临床》. 2004, 第11卷(第3期), 177-179.

审查员 周洋

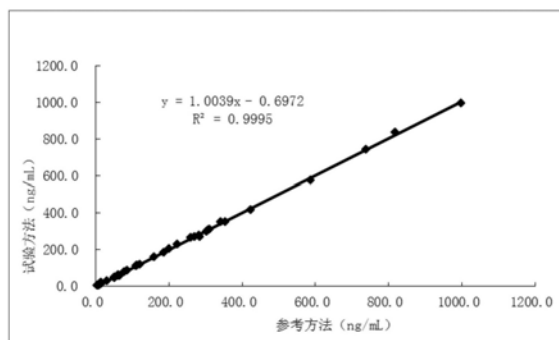
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种肌红蛋白抗体胶乳微球的偶联方法

(57)摘要

本发明公开了一种肌红蛋白抗体胶乳微球的偶联方法,其偶联过程中使用的功能液包括羧基胶乳微球、羊抗人肌红蛋白单克隆抗体、偶联剂、活化液、清洗液、封闭液、保存液,偶联剂包括碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺,本发明中肌红蛋白抗体偶联微球稳定性好,灵敏度高,抗干扰能力强,易于保存等优点,该偶联方法操作简单,可用于临床中常用的胶乳免疫比浊法检测试剂。



1. 一种肌红蛋白抗体胶乳微球的偶联方法,其特征在于,包括以下步骤:①制备用于偶联过程中的功能液,该功能液包括羧基胶乳微球、羊抗人肌红蛋白单克隆抗体、偶联剂、活化液、清洗液、封闭液、保存液,偶联剂包括碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺,

所述的活化液由30mM的pH=6.0的MES缓冲液、10mM的氯化镁、质量分数为0.03%的叠氮钠组成,

清洗液由30mM的pH=7.2磷酸盐缓冲液、质量分数为0.1%的BSA、质量分数为0.03%的叠氮钠组成,

封闭液由30mM的pH=7.2磷酸盐缓冲液、质量分数为5%的BSA、质量分数为0.03%的叠氮钠组成,

保存液由30mM的pH=7.2磷酸盐缓冲液、质量分数为0.1%的BSA、质量分数为0.5%的蔗糖、质量分数为0.03%的叠氮钠组成,

所述羧基胶乳微球粒径为90nm,

②取5%羧基胶乳微球0.2mL,加入0.8mL活化缓冲剂进行活化处理,活化3次,震荡混匀15min/次,然后以13000r/min的速度离心20min,去掉上清,得到微球沉淀,

③于微球沉淀中,加入1mL活化液悬起微球沉淀,进行5min超声混匀形成微球溶液,加入偶联剂,偶联剂与微球溶液的质量比为1:15,偶联剂中的碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺的质量比为1:3,偶联剂的加入顺序为:先加入碳二亚胺室温震荡15min,再加入N-羟基琥珀酰亚胺室温震荡15min;

④对经步骤③处理后的溶液进行离心处理,以13000r/min的速度离心20min,去掉上清,用清洗液清洗,重复清洗3次,再以9000r/min的速度离心10min,去上清,得到微球;

⑤偶联抗体的处理:羊抗人肌红蛋白单克隆抗体经木瓜蛋白酶于37℃下处理15min后,加入体积分数为0.01%的过氧化氢使该木瓜蛋白酶失活,得到抗体,

⑥将步骤⑤处理好的抗体与步骤④处理过的微球混合,震荡混匀,室温孵育5h,经离心处理,以9000r/min的速度离心10min,去掉上清,

⑦用2mL封闭液悬起经步骤⑥处理过的沉淀,震荡混匀4min,其中,前2min静止,然后,放置于冰上震荡1min,撤去冰后继续震荡2min,最后,室温封闭1h;

⑧将步骤⑦的液体经离心处理,以9000r/min的速度离心10min,去上清,

⑨用2mL保存液悬起经步骤⑧处理过的沉淀,震荡混匀,时间为4min,其中,前2min静止,然后,放置于冰上震荡1min,撤去冰后继续震荡2min,4℃保存。

一种肌红蛋白抗体胶乳微球的偶联方法

技术领域

[0001] 本发明涉及肌红蛋白的含量检测技术领域,尤其是涉及一种肌红蛋白含量检测过程中的胶乳微球抗体的制备方法。

背景技术

[0002] 乳胶颗粒凝集试验能够用于全自动生化分析仪,其通过与血清样本中目的物结合产生浊度的变化,进而反应吸光度值的变化,产生检测信号值,该检测结果是疾病分期、判断预后和指导治疗的一项评判标志。

[0003] 目前,应用较多的检测主要有:酶联免疫吸附试验、免疫过滤胶体金染色法和放免法。其中乳胶颗粒凝集试验法测定速度快,灵敏度较高,结合物稳定性好,操作简单等优点。综上所述,该方法能够很好的弥补上述其他方法的不足。然而,抗体胶乳微球的偶联方法成为了该检测程序中的关键步骤,采用简单的化学偶联法,保证抗体效价的前提下进行温和、快速的偶联。该方法能够广泛的应用到不同项目的检测试剂中,许多研究报道,肌红蛋白可作为急性心肌梗死诊断的早期最灵敏的指标。但是该蛋白特异性差,在创伤、肾功能衰竭等疾病中,都可导致其升高,导致检测相关项目的增加,时间延长。本发明基于肌红蛋白的特性,研发了一种肌红蛋白抗体胶乳微球的偶联方法。

发明内容

[0004] 为了克服现有技术的不足,本发明提供了一种肌红蛋白抗体胶乳微球的偶联方法,该方法仅适用于肌红蛋白抗体与羧基胶乳微球的偶联,该偶联方法能够提供乳胶颗粒凝集试验法测定的灵敏度和抗干扰能力。

[0005] 为了实现上述目的,本发明采用的技术方案是:一种肌红蛋白抗体胶乳微球的偶联方法,其特征在于,包括以下步骤:①制备用于偶联过程中的功能液,该功能液包括羧基胶乳微球、羊抗人肌红蛋白单克隆抗体、偶联剂、活化液、清洗液、封闭液、保存液,偶联剂包括碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺,

[0006] 所述的活化液由30mM的pH=6.0的MES缓冲液、10mM的氯化镁、质量分数为0.03%的叠氮钠组成,

[0007] 清洗液由30mM的pH=7.2磷酸盐缓冲液、质量分数为0.1%的BSA、质量分数为

[0008] 0.03%的叠氮钠组成,

[0009] 封闭液由30mM的pH=7.2磷酸盐缓冲液、质量分数为5%的BSA、质量分数为0.03%的叠氮钠组成,

[0010] 保存液由30mM的pH=7.2磷酸盐缓冲液、质量分数为0.1%的BSA、质量分数为0.5%的蔗糖、质量分数为0.03%的叠氮钠组成,

[0011] 所述羧基胶乳微球粒径为90nm,

[0012] ②取5%羧基胶乳微球0.2mL,加入0.8mL活化缓冲剂进行活化处理,活化3次,震荡混匀15min/次,然后以13000r/min的速度离心20min,去掉上清,得到微球沉淀,

[0013] ③于微球沉淀中,加入1mL活化液悬起微球沉淀,进行5min超声混匀形成微球溶液,加入偶联剂,偶联剂与微球溶液的质量比为1:15,偶联剂中的碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺的质量比为1:3,偶联剂的加入顺序为:先加入碳二亚胺室温震荡15min,再加入N-羟基琥珀酰亚胺室温震荡15min;

[0014] ④对经步骤③处理后的溶液进行离心处理,以13000r/min的速度离心20min,去掉上清,用清洗液清洗,重复清洗3次,再以9000r/min的速度离心10min,去上清,得到微球;

[0015] ⑤偶联抗体的处理:羊抗人肌红蛋白单克隆抗体经木瓜蛋白酶于37℃下处理15min后,加入体积分数为0.01%的过氧化氢使该木瓜蛋白酶失活,得到抗体,

[0016] ⑥将步骤⑤处理好的抗体与步骤④处理过的微球混合,震荡混匀,室温孵育5h,经离心处理,以9000r/min的速度离心10min,去掉上清,

[0017] ⑦用2mL封闭液悬起经步骤⑥处理过的沉淀,震荡混匀4min,其中,前2min静止,然后,放置于冰上震荡1min,撤去冰后继续震荡2min,最后,室温封闭1h;

[0018] ⑧将步骤⑦的液体经离心处理,以9000r/min的速度离心10min,去上清,

[0019] ⑨用2mL保存液悬起经步骤⑧处理过的沉淀,震荡混匀,时间为4min,其中,前2min静止,然后,放置于冰上震荡1min,撤去冰后继续震荡2min,4℃保存。

[0020] 采用上述方案,本发明中肌红蛋白抗体偶联微球稳定性好,灵敏度高,抗干扰能力强,易于保存等优点,该偶联方法操作简单,可用于临床中常用的胶乳免疫比浊法检测试剂。

[0021] 下面结合附图对本发明作进一步描述。

附图说明

[0022] 附图1为本发明具体实施例4试剂理论浓度与实际浓度检测结果相关分析图,采用全自动生化分析仪,对40个血清样本进行测定,并对其进行相关分析。其中相关系数: $r^2=0.999$,线性方程为: $y=1.003x-0.697$ 。

具体实施方式

[0023] 本发明的保护范围不局限于下述具体实施方式,本领域一般技术人员根据本发明公开的内容,可以采用其他多种具体实施方式实施本发明的,或者凡是采用本发明的设计结构和思路,做简单变化或更改的,都落入本发明的保护范围。

[0024] 下面实施例描述的是肌红蛋白抗体胶乳微球的偶联方法,其包括以下步骤:①制备偶联过程中的功能液,该功能液包括羧基胶乳微球、羊抗人肌红蛋白单克隆抗体、偶联剂、活化液、清洗液、封闭液、保存液,偶联剂包括碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺,

[0025] 活化液由30mM的pH=6.0的MES缓冲液、10mM的氯化镁、质量分数为

[0026] 0.03%的叠氮钠组成,

[0027] 清洗液由30mM的pH=7.2磷酸盐缓冲液、质量分数为0.1%的BSA、质量分数为0.03%的叠氮钠组成,

[0028] 封闭液由30mM的pH=7.2磷酸盐缓冲液、质量分数为5%的BSA、质量分数为0.03%的叠氮钠组成,

[0029] 保存液由30mM的pH=7.2磷酸盐缓冲液、质量分数为0.1%的BSA、质量分数为

0.5%的蔗糖、质量分数为0.03%的叠氮钠组成,羧基胶乳微球粒径为90nm,

[0030] ②取5%羧基胶乳微球0.2mL,加入0.8mL活化缓冲剂进行活化处理,活化

[0031] 3次,震荡混匀15min/次,然后以13000r/min的速度离心20min,去掉上清,得到微球沉淀,

[0032] ③于微球沉淀中,加入1mL活化液悬起微球沉淀,进行5min超声混匀形成微球溶液,加入偶联剂,偶联剂与微球溶液的质量比为1:15,偶联剂中的碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺的质量比为1:3,偶联剂的加入顺序为:先加入碳二亚胺室温震荡15min,再加入N-羟基琥珀酰亚胺室温震荡15min;

[0033] ④对经步骤③处理后的溶液进行离心处理,以13000r/min的速度离心20min,去掉上清,用清洗液清洗,重复清洗3次,再以9000r/min的速度离心10min,去上清,得到微球;

[0034] ⑤偶联抗体的处理:羊抗人肌红蛋白单克隆抗体经木瓜蛋白酶于37℃下处理15min后,加入体积分数为0.01%的过氧化氢使该木瓜蛋白酶失活,得到抗体,

[0035] ⑥将步骤⑤处理好的抗体与步骤④处理过的微球混合,震荡混匀,室温孵育5h,经离心处理,以9000r/min的速度离心10min,去掉上清,

[0036] ⑦用2mL封闭液悬起经步骤⑥处理过的沉淀,震荡混匀4min,其中,前2min静止,然后,放置于冰上震荡1min,撤去冰后继续震荡2min,最后,室温封闭1h;

[0037] ⑧将步骤⑦的液体经离心处理,以9000r/min的速度离心10min,去上清,

[0038] ⑨用2mL保存液悬起经步骤⑧处理过的沉淀,震荡混匀,时间为4min,其中,前2min静止,然后,放置于冰上震荡1min,撤去冰后继续震荡2min,4℃保存。

[0039] 检测过程中应用的试剂1是由30mM的pH=7.2磷酸盐缓冲液、质量分数为0.5%的PEG-6000和质量分数为0.03%的叠氮钠组成的。将经上述方法处理后的肌红蛋白抗体胶乳微球作为试剂2进行分析检测;检测过程使用双试剂全自动生化分析仪,例如贝克曼DXC800、日立7600等全自动分析仪进行测定。将试剂1和试剂2放置在所设置好的位置上,在样本盘中对应位置放好蒸馏水、校准品和待测样品,操作程序如下:

[0040] 表1操作程序

[0041]	加入物	空白管 (B)	校准管 (S)	样品管 (T)
	试剂 1 (μ L)	224	224	224
	蒸馏水 (μ L)	4	-	-
[0042]	校准品 (μ L)	-	4	-
	样 品 (μ L)	-	-	4
	试剂 2 (μ L)	56	56	56
混匀, 在主波长 550nm 下读取吸光度 A_1 , 反应 5 分钟, 读取吸光度值 A_2 , 计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。				

[0043] 结果计算:以测定管 ΔA ,根据校准曲线可求得肌红蛋白的含量。

[0044] 具体实施例1

[0045] 按照上述述操作程序对胶乳微球的粒径进行筛选,检测结果如下表:

[0046]

粒径 (nm)	理论浓度 (ng/mL)	实际浓度 (ng/mL)	CB 值 (%)
90	45	44.6	-0.89
	200	203.9	1.95
	900	895.3	-0.52
120	45	42.3	-6.0
	200	192.2	-3.90
	900	875.3	-2.74
150	45	42.3	-6.0
	200	212.3	6.15
	900	901.6	0.18

[0047] 通过低值、中值、高值的实际浓度与理论浓度比较结果表明,二者差异较小并且在 $\pm 10\%$ 之内,但是三者不同的粒径相比较90nm的微球差异较小。

[0048] 具体实施例2

[0049] 按照上述述操作程序对抗干扰能力进行检测,检测结果如下表:

[0050]

名称	干扰物	加入量	理论值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	回收率 (%)
无处理抗体	类风湿因子 (IU/L)	0	85	——	——
		500	69	75.9	110.0
		1000	75	80.1	106.8
	胆红素 ($\mu\text{mol/L}$)	0	84	——	——
		150	68	69.8	102.6
		350	74	80.6	108.9
	血红蛋白 (g/L)	0	86	——	——
		1.5	67	70.3	104.9
		3.5	76	81.6	107.4
处理后抗体	类风湿因子	0	88	——	——
		500	70	71.3	101.9

[0051]

	(IU/L)	1000	79	80.6	102.1
	胆红素 ($\mu\text{mol/L}$)	0	89	——	——
		150	71	72.4	102.0
		350	78	80.1	102.7
	血红蛋白 (g/L)	0	88	——	——
		1.5	71	72.3	101.8
		3.5	78	79.1	101.4

[0052] 通过低值、中值、高值的实际浓度与理论浓度的比较,回收试验结果表明处理后抗体抗干扰能力强于无处理的抗体。

[0053] 具体实施例3

[0054] 按照上述述操作程序对该方法偶联的抗体胶乳微球的精密度,检测结果如下表:

[0055] 批内精密度:对某一血清样本测定10次,对下述数据计算,批内精密度差异结果为1.18%,测得差异较小。

[0056]

次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
浓度 (ng/mL)	161	160	159	163	165	162	159	160	160	160

[0057] 批间精密度:选取3个不同批次的偶联微球,分别对某一血清样本测定10次,结果如下表格所示,分别算出3批浓度的差异结果为0.59%,1.13%,

[0058] 0.67%;3个不同批号的试剂盒相比较,差异变化较小。

[0059]

批次 次数	第 1 批浓度 (ng/mL)	第 2 批浓度 (ng/mL)	第 3 批浓度 (ng/mL)
1	200	205	199
2	199	200	197
3	198	200	200
4	202	204	201
5	200	203	201
6	199	199	201
7	198	199	199
8	199	203	198
9	200	199	199
10	200	202	200

[0060] 具体实施例4

[0061] 相关性检测:选取40个血清样本,分别用已有的检测试剂盒作为参考方法与上述的偶联微球检测结果作为试验方法,二者进行相关分析,结果显示线性关系良好,检测结果如下:

[0062]

编号	参考方法 浓度 (ng/mL)	试验方法 浓度 (ng/mL)	编号	参考方法 浓度 (ng/mL)	试验方法 浓度 (ng/mL)
1	15.7	15.6	21	61.5	61.5
2	7.8	7.8	22	51.3	51.6
3	4.6	4.7	23	30.9	30.5
4	11.6	11.7	24	61.4	59.7
5	8.7	8.7	25	998.2	997.3
6	6.1	5.9	26	818.5	836.9
7	10.0	10.1	27	738.7	745.5
8	11.7	11.8	28	586.6	574.5
9	306.9	308.1	29	422.8	415.9
10	186.7	183.0	30	110.6	110.8
11	120.1	120.1	31	76.6	78.9
12	353.3	353.3	32	269.8	269.2
13	85.6	85.1	33	311.1	311.8
14	64.5	59.2	34	200.9	204.9
15	14.7	20.6	35	340.5	351.4
16	111.9	113.3	36	283.8	269.5
17	51.5	46.5	37	281.4	276.9
18	158.7	159.9	38	222.6	228.3
19	14.4	14.2	39	260.4	265.5
20	7.8	7.2	40	303.5	299.1

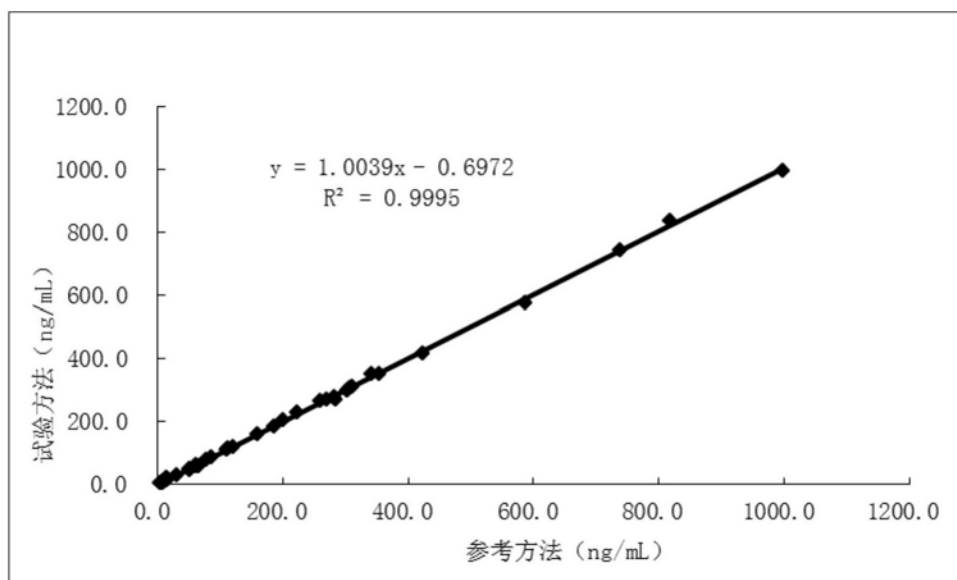


图1

专利名称(译)	一种肌红蛋白抗体胶乳微球的偶联方法		
公开(公告)号	CN107515296B	公开(公告)日	2019-02-26
申请号	CN2017110601083.3	申请日	2017-07-21
[标]申请(专利权)人(译)	王贤俊		
申请(专利权)人(译)	王贤俊		
当前申请(专利权)人(译)	王贤俊		
[标]发明人	王贤俊 何丹		
发明人	王贤俊 何丹		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/68 G01N33/543 G01N33/544		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54313 G01N33/544 G01N33/6887 G01N2333/805		
代理人(译)	曾建芳		
审查员(译)	周洋		
其他公开文献	CN107515296A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种肌红蛋白抗体胶乳微球的偶联方法，其偶联过程中使用的功能液包括羧基胶乳微球、羊抗人肌红蛋白单克隆抗体、偶联剂、活化液、清洗液、封闭液、保存液，偶联剂包括碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺，本发明中肌红蛋白抗体偶联微球稳定性好，灵敏度高，抗干扰能力强，易于保存等优点，该偶联方法操作简单，可用于临床中常用的胶乳免疫比浊法检测试剂。

