



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110308287 A

(43)申请公布日 2019.10.08

(21)申请号 201910701274.6

(22)申请日 2019.07.31

(71)申请人 宁波奥丞生物科技有限公司

地址 315000 浙江省宁波市海曙区望春工
业园区春华路885号

(72)发明人 周义正 唐静 黄丹娣

(74)专利代理机构 北京盛凡智荣知识产权代理
有限公司 11616

代理人 郑丰平

(51) Int. Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种胎盘生长因子的化学发光试剂盒的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种胎盘生长因子的化学发光试剂盒的制备方法,包括:链霉亲和素磁微粒的制备、链霉亲和素磁微粒悬浮液制备、生物素标记的胎盘生长因子的制备、化学发光物质标记的胎盘生长因子抗体的制备等步骤;本发明中链霉亲和素磁微粒通过链霉亲和素和生物素之间的高亲和力作用,可以绑定任何生物素标记的分子,链霉亲和素磁微粒可用于免疫及分子检测,本发明采用聚苯乙烯磁微粒,具有粒径均一、比表面积大、形貌规整的特点,有利于快捷、高效地捕获目标分子以及实现磁性分离,本发明建立的磁微粒化学发光法具有特异性强、准确快速、检测时间短、检测结果准确、重复性好等优点。

1. 一种胎盘生长因子的化学发光试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 链霉亲和素磁微粒悬浮液制备:取链霉亲和素磁微粒溶液,加入TBST溶液充分混匀后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁微粒,重复清洗5次后,用PBS缓冲液稀释后得到链霉亲和素磁微粒溶液;

(2) 生物素标记的胎盘生长因子的制备:取胎盘生长因子单克隆抗体,用超滤离心管进行超滤离心,将PBS缓冲液置换为标记缓冲液,进行离心;加入生物素原液,混匀,进行标记;标记反应结束后,加入封闭缓冲液;封闭后用超滤离心管进行超滤离心,超滤结束后,得到生物素标记的胎盘生长因子;

(3) 化学发光物质标记的胎盘生长因子抗体的制备:

取胎盘生长因子单克隆抗体,用超滤离心管进行超滤离心,将PBS缓冲液置换为标记缓冲液,进行离心;加入吖啶酯原液,混匀,进行标记;标记反应结束后,加入封闭缓冲液;封闭后用超滤离心管进行超滤离心,超滤结束后,得到化学发光物质标记的胎盘生长因子抗体;

(4) 分装步骤1-3制备的试剂,组装成所述试剂盒。

2. 如权利要求1所述的一种胎盘生长因子的化学发光试剂盒的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中,包括链霉亲和素磁微粒溶液的制备方法。

3. 如权利要求2所述的一种胎盘生长因子的化学发光试剂盒的制备方法,其特征在于,所述链霉亲和素磁微粒溶液的制备方法包括:将磁流体和聚乙二醇溶于无水乙醇中,移入带有搅拌器、冷凝管和N₂入口的三颈瓶中,N₂气氛中,65℃条件下,300r/min搅拌30min,然后升温至70℃,依次加入苯乙烯、马来酸酐、丙烯酸、二乙烯基苯、过氧化苯甲酰,10min后,反应物成乳液状,保持N₂气氛,70℃,搅拌速度300r/min,反应时间12h,反应完成后聚苯乙烯磁微粒收集备用;将PBS缓冲液进行高压灭菌,链霉亲和素溶于PBS缓冲液中,取200u1装于EP管中待用;将聚苯乙烯磁微粒放入超纯水中浸泡,用PBS缓冲液清洗3次后,再加入PBS缓冲液中,超声分散后得到聚苯乙烯磁微粒分散液;取聚苯乙烯磁微粒分散液,加入的戊二醛室温震荡反应,进行磁分离,用纯水清洗多余的戊二醛3-5次,再次将聚苯乙烯磁微粒悬浮于PBS缓冲液中,然后再加入到装有链霉亲和素溶液的EP管中,室温震荡培养,最后将链霉亲和素磁微粒分散在PBS溶液中,4℃保存待用。

4. 如权利要求1或3所述的一种胎盘生长因子的化学发光试剂盒的制备方法,其特征在于,所述PBS缓冲液的浓度为50mmol/L,pH为7.8。

5. 如权利要求1所述的一种胎盘生长因子的化学发光试剂盒的制备方法,其特征在于,所述链霉亲和素磁微粒中的磁微粒的粒径为1-3μm。

6. 如权利要求1所述的一种胎盘生长因子的化学发光试剂盒的制备方法,其特征在于,所述标记缓冲液为20mmol/L PBS,150mmol/L NaCl,pH8.0。

7. 如权利要求1所述的一种胎盘生长因子的化学发光试剂盒的制备方法,其特征在于,所述封闭缓冲液为20mmol/L PB,150mmol/L NaCl,10%赖氨酸,pH8.0。

8. 如权利要求1所述的一种胎盘生长因子的化学发光试剂盒的制备方法,其特征在于,胎盘生长因子抗体与吖啶酯原液的摩尔比为10:1。

一种胎盘生长因子的化学发光试剂盒的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断领域,具体涉及一种胎盘生长因子的化学发光试剂盒的制备方法。

背景技术

[0002] 胎盘生长因子 (PLGF) 最早于1991年由Maglione等从人的胎盘cDNA文库中分离纯化而得。PLGF主要由合体滋养层细胞合成,可与位于滋养层细胞和血管内皮细胞的酪氨酸酶受体结合,是一个对滋养层细胞功能有自分泌作用和对血管生长有旁分泌作用的蛋白。PLGF对滋养层细胞和内皮细胞功能有独特的调节作用,能够促进新生血管生成。检测孕妇血液PLGF水平在临床上可用于识别胎盘合体滋养层细胞存在供氧压力,对子痫前期进行预测、鉴别和治疗监测。

[0003] 到目前为止,用于检测人血清中胎盘生长因子残留的方法主要有:酶联免疫法(ELISA),但是,酶联免疫法虽然检测价格低廉、快速,但灵敏度不够,只适用于微量物质的检测和鉴定;本发明采用方法为直接化学发光法,采用吖啶酯作为化学发光标记物具有明显优势,主要表现在:反应不需要催化剂,只要碱性环境即可进行,反应迅速,可以完全捕捉反产生的光子,背景发光低,信噪比高,干扰因素少,试剂稳定性好,体系简单,激发液成本低,吖啶酯易与蛋白质联结,且联结后光子产率不减少。

[0004] 磁微粒可以作为生物大分子的载体,抗体包被的磁微粒称为免疫磁微粒,由于其既有结合抗原的特性又有磁性的特点,因此,在从复杂样品中分离、纯化与浓集目的微生物、细胞和生物大分子等方面具有较多优势,包括快速、特异性强、操作简便、使用范围广等。纳米材料是20世纪90年代后得到迅猛发展的新材料,纳米磁微粒(粒径小于10nm~100nm)在磁结构和磁性方面与一般磁微粒有很大区别:纳米磁性颗粒,单位体积颗粒数目更多,比表面积更大;具有超顺磁性,磁相互作用很弱;它可在外加磁场作用下定向运动,使得某些特殊成份得以分离、浓集或纯化等。本发明建立的磁微粒化学发光法灵敏度高、特异性强、准确快速、检测时间短、检测结果具有更高的准确性与重复性。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种胎盘生长因子的化学发光试剂盒的制备方法,具有特异性强、准确快速、检测时间短、检测结果具有更高的准确性与重复性等优点。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:一种胎盘生长因子的化学发光试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0007] (1) 链霉亲和素磁微粒悬浮液制备:取链霉亲和素磁微粒溶液,加入TBST溶液充分混匀后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁微粒,重复清洗5次后,用PBS缓冲液稀释后得到链霉亲和素磁微粒溶液;

[0008] (2) 生物素标记的胎盘生长因子的制备:取胎盘生长因子单克隆抗体,用超滤离心管进行超滤离心,将PBS缓冲液置换为标记缓冲液,进行离心;加入生物素原液,混匀,进行

标记;标记反应结束后,加入封闭缓冲液;封闭后用超滤离心管进行超滤离心,超滤结束后,得到生物素标记的胎盘生长因子;

[0009] (3) 化学发光物质标记的胎盘生长因子抗体的制备:

[0010] 取胎盘生长因子单克隆抗体,用超滤离心管进行超滤离心,将PBS缓冲液置换为标记缓冲液,进行离心;加入吖啶酯原液,混匀,进行标记;标记反应结束后,加入封闭缓冲液;封闭后用超滤离心管进行超滤离心,超滤结束后,得到化学发光物质标记的胎盘生长因子抗体;

[0011] (4) 分装步骤1-3制备的试剂,组装成所述试剂盒。

[0012] 优选的,所述步骤(1)中,包括链霉亲和素磁微粒溶液的制备方法,所述链霉亲和素磁微粒溶液的制备方法包括:将磁流体和聚乙二醇溶于无水乙醇中,移入带有搅拌器、冷凝管和N₂入口的三颈瓶中,N₂气氛中,65℃条件下,300r/min搅拌30min,然后升温至70℃,依次加入苯乙烯、马来酸酐、丙烯酸、二乙烯基苯、过氧化苯甲酰,10min后,反应物成乳液状,保持N₂气氛,70℃,搅拌速度300r/min,反应时间12h,反应完成后聚苯乙烯磁微粒收集备用;将PBS缓冲液进行高压灭菌,霉亲和素溶于PBS缓冲液中,取200ul装于EP管中待用;将聚苯乙烯磁微粒放入超纯水中浸泡,用PBS缓冲液清洗3次后,再加入PBS缓冲液中,超声分散后得到聚苯乙烯磁微粒分散液;取聚苯乙烯磁微粒分散液,加入的戊二醛室温震荡反应,进行磁分离,用纯水清洗多余的戊二醛3-5次,再次将聚苯乙烯磁微粒悬浮于PBS缓冲液中,然后再加入到装有链霉亲和素溶液的EP管中,室温震荡培养,最后将链霉亲和素磁微粒分散在PBS溶液中,4℃保存待用。

[0013] 所述PBS缓冲液的浓度为50mmol/L,pH为7.8。

[0014] 所述链霉亲和素磁微粒中的磁微粒的粒径为1-3μm。

[0015] 所述标记缓冲液为20mmol/L PBS,150mmol/L NaCl,pH8.0。

[0016] 所述封闭缓冲液为20mmol/L PB,150mmol/L NaCl,10%赖氨酸,pH8.0。

[0017] 胎盘生长因子抗体与吖啶酯原液的摩尔比为10:1。

[0018] 本发明具有有益效果:

[0019] 本发明中链霉亲和素磁微粒通过链霉亲和素和生物素之间的高亲和力作用,可以绑定任何生物素标记的分子,如抗体、蛋白质、多肽、DNA等。粒子具有较大的比表面积和很高的捕获效率。复合物通过磁分离易于从溶液中分离,链霉亲和素磁微粒可用于免疫及分子检测,链霉亲和素-生物素系统具有极高的结合亲和力在生物领域具有广泛的应用,本产品采用聚苯乙烯磁微粒,粒径均一、比表面积大、形貌规整,有利于方便、快捷、高效地捕获目标分子以及实现磁性分离,本发明建立的磁微粒化学发光法具有特异性强、准确快速、检测时间短、检测结果具有更高的准确性与重复性等优点。

具体实施方式

[0020] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。

[0021] 实施例1

[0022] 一种胎盘生长因子的化学发光试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0023] (1) 链霉亲和素磁微粒悬浮液制备:取链霉亲和素磁微粒溶液,加入TBST溶液充分混匀后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁微粒,重复清洗5次后,用PBS

缓冲液 (50mmol/L, pH=7.8) 稀释后得到浓度为0.05%的链霉亲和素磁微粒溶液;

[0024] (2) 生物素标记的胎盘生长因子的制备:取500ug胎盘生长因子单克隆抗体,用30KDa超滤离心管进行超滤离心,将PBS缓冲液 (50mmol/L, pH=7.8) 置换为标记缓冲液,进行离心;加入生物素原液,混匀,进行标记;标记反应结束后,加入封闭缓冲液;封闭后用超滤离心管进行超滤离心,超滤结束后,得到抗体浓度为0.5 μ g/mL的生物素标记的胎盘生长因子溶液;

[0025] (3) 化学发光物质标记的胎盘生长因子抗体的制备:

[0026] 取500ug胎盘生长因子单克隆抗体,用30KDa超滤离心管进行超滤离心,将PBS缓冲液 (50mmol/L, pH=7.8) 置换为标记缓冲液,进行离心;加入吖啶酯原液,混匀,进行标记;标记反应结束后,加入封闭缓冲液;封闭后用超滤离心管进行超滤离心,超滤结束后,得到抗体浓度为0.5 μ g/mL的化学发光物质标记的胎盘生长因子抗体;

[0027] (4) 分装步骤1-3制备的试剂,组装成所述试剂盒。

[0028] 优选的,所述步骤(1)中,包括链霉亲和素磁微粒溶液的制备方法,所述链霉亲和素磁微粒溶液的制备方法包括:

[0029] 将20g磁流体和2g聚乙二醇溶于73.68g无水乙醇中,移入带有搅拌器、冷凝管和N₂入口的三颈瓶中,N₂气氛中,65 $^{\circ}$ C条件下,300r/min搅拌30min,然后升温至70 $^{\circ}$ C,依次加入19.78g苯乙烯、2g马来酸酐、1.37g丙烯酸、0.25g二乙烯基苯、6g过氧化苯甲酰,10min后,反应物成乳液状,保持N₂气氛,70 $^{\circ}$ C,搅拌速度300r/min,反应时间12h,反应完成后聚苯乙烯磁微粒收集备用;

[0030] 将PBS缓冲液进行高压灭菌,将1mg的链霉亲和素溶于1ml的PBS缓冲液中,取200ul装于EP管中待用;

[0031] 将50mg聚苯乙烯磁微粒放入超纯水中浸泡,用PBS缓冲液清洗3次后,再加入2.5mlPBS缓冲液中,超声分散后得到聚苯乙烯磁微粒分散液;

[0032] 取2.5ml聚苯乙烯磁微粒分散液,加入2ml的戊二醛室温震荡反应6h,进行磁分离,用纯水清洗多余的戊二醛3-5次,再次将聚苯乙烯磁微粒悬浮于2.5mlPBS缓冲液中,然后再加入到装有200ul链霉亲和素容易的EP管中,室温震荡培养6h,最后将链霉亲和素磁微粒分散在5mlPBS溶液中,4 $^{\circ}$ C保存待用。

[0033] 所述PBS缓冲液的浓度为50mmol/L, pH为7.8。

[0034] 实施例2

[0035] 一种胎盘生长因子的化学发光试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0036] (1) 链霉亲和素磁微粒悬浮液制备:取链霉亲和素磁微粒溶液,加入TBST溶液充分混匀后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁微粒,重复清洗5次后,用PBS缓冲液 (50mmol/L, pH=7.8) 稀释后得到浓度为0.05%的链霉亲和素磁微粒溶液;

[0037] (2) 生物素标记的胎盘生长因子的制备:取500ug胎盘生长因子单克隆抗体,用30KDa超滤离心管进行超滤离心,将PBS缓冲液 (50mmol/L, pH=7.8) 置换为标记缓冲液,进行离心;加入生物素原液,混匀,进行标记;标记反应结束后,加入封闭缓冲液;封闭后用超滤离心管进行超滤离心,超滤结束后,得到抗体浓度为0.5 μ g/mL的生物素标记的胎盘生长因子溶液;

[0038] (3) 化学发光物质标记的胎盘生长因子抗体的制备:

[0039] 取500ug胎盘生长因子单克隆抗体,用30KDa超滤离心管进行超滤离心,将PBS缓冲液(50mmol/L,pH=7.8)置换为标记缓冲液,进行离心;加入吡啶酯原液,混匀,进行标记;标记反应结束后,加入封闭缓冲液;封闭后用超滤离心管进行超滤离心,超滤结束后,得到抗体浓度为0.5μg/mL的化学发光物质标记的胎盘生长因子抗体;

[0040] (4)分装步骤1-3制备的试剂,组装成所述试剂盒。

[0041] 所述步骤(1)中,包括链霉亲和素磁微粒溶液的制备方法。

[0042] 所述链霉亲和素磁微粒溶液的制备方法包括:

[0043] 将15g磁流体和2g聚乙二醇溶于50ml无水乙醇中,移入带有搅拌器、冷凝管和N₂入口的三颈瓶中,N₂气氛中,65℃条件下,500r/min搅拌30min,然后升温至70℃,依次加入20g苯乙烯、2g马来酸酐、1g丙烯酸、0.5g二乙烯基苯、6.5g过氧化苯甲酰,10min后,反应物成乳液状,保持N₂气氛,70℃,搅拌速度500r/min,反应时间12h,反应完成后聚苯乙烯磁微粒收集备用;

[0044] 将PBS缓冲液(50mmol/L,pH=7.8)进行高压灭菌,将1mg的链霉亲和素溶于1ml的PBS缓冲液(50mmol/L,pH=7.8)中,取200ul装于EP管中待用;

[0045] 将50mg聚苯乙烯磁微粒放入超纯水中浸泡,用PBS缓冲液(50mmol/L,pH=7.8)清洗3次后,再加入2.5mlPBS缓冲液(50mmol/L,pH=7.8)中,超声分散后得到聚苯乙烯磁微粒分散液;

[0046] 取2.5ml聚苯乙烯磁微粒分散液,加入2ml的戊二醛室温震荡反应6h,进行磁分离,用纯水清洗多余的戊二醛3-5次,再次将聚苯乙烯磁微粒悬浮于2.5mlPBS缓冲液(50mmol/L,pH=7.8)中,然后再加入到装有200ul链霉亲和素溶液的EP管中,室温震荡培养6h,最后将链霉亲和素磁微粒分散在5mlPBS溶液(50mmol/L,pH=7.8)中,4℃保存待用。

[0047] 所述磁流体为四氧化三铁。

[0048] 所述链霉亲和素磁微粒中的磁微粒的粒径为1-3μm。

[0049] 所述标记缓冲液为20mmol/L PBS,150mmol/L NaCl,pH8.0。

[0050] 所述封闭缓冲液为20mmol/L PB,150mmol/L NaCl,10%赖氨酸,pH8.0。

[0051] 胎盘生长因子抗体与吡啶酯原液的摩尔比为10:1。

[0052] 链霉亲和素磁微粒通过链霉亲和素和生物素之间的高亲和力作用,可以绑定任何生物素标记的分子,粒子具有较大的比表面积和很高的捕获效率。复合物通过磁分离易于从溶液中分离,链霉亲和素磁微粒可用于免疫及分子检测,链霉亲和素-生物素系统具有极高的结合亲和力在生物领域具有广泛的应用,本产品采用聚苯乙烯磁微粒,粒径均一、比表面积大、形貌规整,有利于方便、快捷、高效地捕获目标分子以及实现磁性分离。

[0053] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

专利名称(译)	一种胎盘生长因子的化学发光试剂盒的制备方法		
公开(公告)号	CN110308287A	公开(公告)日	2019-10-08
申请号	CN201910701274.6	申请日	2019-07-31
[标]发明人	周义正 唐静 黄丹娣		
发明人	周义正 唐静 黄丹娣		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/543 G01N33/532 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/532 G01N33/54326 G01N33/74		
代理人(译)	郑丰平		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种胎盘生长因子的化学发光试剂盒的制备方法，包括：链霉亲和素磁微粒的制备、链霉亲和素磁微粒悬浮液制备、生物素标记的胎盘生长因子的制备、化学发光物质标记的胎盘生长因子抗体的制备等步骤；本发明中链霉亲和素磁微粒通过链霉亲和素和生物素之间的高亲和力作用，可以绑定任何生物素标记的分子，链霉亲和素磁微粒可用于免疫及分子检测，本发明采用聚苯乙烯磁微粒，具有粒径均一、比表面积大、形貌规整的特点，有利于快捷、高效地捕获目标分子以及实现磁性分离，本发明建立的磁微粒化学发光法具有特异性强、准确快速、检测时间短、检测结果准确、重复性好等优点。