



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104049088 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 17

(21) 申请号 201410284471. X

(22) 申请日 2014. 06. 24

(71) 申请人 广西博士海意信息科技有限公司

地址 530022 广西壮族自治区南宁市民族大道 38-2 号 1211 室

(72) 发明人 李永锋 陈国勇 傅汝毅 陶玲云  
蓝文苑

(74) 专利代理机构 广州市红荔专利代理有限公司 44214

代理人 李珊

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种血浆 HSP70 抗体化学发光定量检测试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种血浆 HSP70 抗体化学发光定量检测试剂盒,属于体外临床检验和化学发光免疫检测领域。该试剂盒包括血浆 HSP70 抗体检测反应板,反应板包被有重组 HSP70 抗原。血浆 HSP70 抗体定量检测试剂盒,还包括:酶结合物,发光底物,校准品,质控品,浓缩洗涤液。本发明可以专一的定量检测出血浆 HSP70 抗体的含量,与传统的 ELISA 技术相比,本发明不仅保留了 ELISA 技术的高度特异性,检测结果的稳定性、可靠性和操作的简便性,同时采用的化学发光法提高了检测的灵敏度。

1. 一种血浆 HSP70 抗体化学发光定量检测试剂盒,其特征在于:包括反应板,酶结合物,发光底物,校准品,质控品,浓缩洗涤液,所述的反应板包被有重组 HSP70 抗原。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述的校准品以血浆 HSP70 抗体纯品配制,浓度为 0、0.25、1、5、10、25、50 ng/ml。

3. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述的质控品以血浆 HSP70 抗体纯品配制,由质控品 I 和质控品 II 两部分组成,质控品 I 的浓度为 2-8ng/ml,质控品 II 的浓度为 20-30ng/ml。

4. 如权利要求 3 所述的试剂盒,其特征在于,所述的质控品 I 的浓度为 5ng/ml,质控品 II 的浓度为 25ng/ml。

5. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述的酶结合物为 HRP 标记的抗血浆 HSP70 抗体的抗体,所述的反应板材质是不透明的聚苯乙烯或聚乙烯,所述的发光底物为鲁米诺、异鲁米诺或其衍生物,所述的浓缩洗涤液是 pH7.0-pH8.0 的中性缓冲液。

## 一种血浆 HSP70 抗体化学发光定量检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于体外临床检验和化学发光免疫检测领域,尤其涉及一种用于定量检测血浆 HSP70 抗体的试剂盒。

### 背景技术

[0002] 热休克蛋白家族 (HSPs) 是一类高度保守的蛋白,HSP70 是热休克蛋白家族中的重要成员,其分为诱导型的组成型的。当机体受到外界环境中多种不良因素刺激时,诱导型的 HSP70 蛋白表达升高。HSP70 蛋白对细胞损伤的修复、存活和维持正常的细胞功能是必需的。在环境刺激、病原菌感染、疾病引起细胞应激损伤中发挥分子伴侣作用,阻止蛋白聚集,促进损伤蛋白的重新折叠。在大多数的哺乳动物,只有在应激条件下诱导型 HSP70 表达,而且显著的细胞和机体应激后才能检测到,但是在人和灵长类,诱导型的 HSP70 有一个基准值,在一些特殊条件下如过热、化学有毒物质暴露、缺氧、缺血、感染、自身免疫性疾病、凋亡、器官移植、细菌和病毒引起的感染,动脉粥样硬化等心血管疾病中,生物体的 HSP70 表达显著升高;在正常老化过程,精子发生,月经,运动练习等正常生理过程中,生物体的 HSP70 表达也显著升高,提示其在这些过程中可能发挥重要作用。研究者发现在很多疾病的发生、形成、预后过程中 Hsps 的自身抗体显著改变,提示 HSP70 抗体在这些过程中可能具有重要作用。一般认为诱导型的 HSP70 是细胞内的蛋白,但是研究发现在正常人的外周循环和一些疾病状态下能够检测到可溶性的 HSP70 和 HSP70 抗体,细胞内的 HSP70 能够释放到细胞外,引起机体产生 HSP70 抗体。近来的研究发现在各种风湿性疾病和自身免疫性疾病,HSP70 能够被机体识别,产生自身抗体;人群流行病学研究发现 HSP70 抗体与动脉粥样硬化的进展和严重程度密切相关。所以建立快速、可靠的检测血中 HSP70 抗体的方法,将为多种疾病的监控提供重要的手段。现在检测 HSP70 抗体的方法主要有 Western Blotting、Elisa 方法。各种方法互相印证,同时又存在检测灵敏度、专业性、设备设施条件及成本的影响。目前,以血清学反应原理为基础的酶联免疫吸附测定 (Elisa) 是被广泛接受和推广的方法。

[0003] 与目前常用的酶联免疫 (ELISA) 检测方法相比,化学发光免疫分析既具有放射免疫的高灵敏度,又具有酶联免疫的操作简便、快速的特点,易于标准化操作。检测过程中不使用有害的试剂,试剂保持期长,成为非放射性免疫分析法中最有前途的方法之一。在化学发光免疫分析中包含两个部分,即免疫反应系统和化学发光系统。免疫反应系统的基本原理是 ELISA。抗原或抗体结合到某种固相载体表面,待测样品中的抗体或抗原按一定程序与结合到固相载体上的抗原或抗体反应形成抗原-抗体复合物。再加入酶标的抗原或抗体与其反应,底物在酶的催化下变成有色产物,通过分析有色产物检测待测样本中物质。化学发光系统的原理在于免疫反应中的酶作用于发光底物。发光底物在酶的作用下,底物发生化学反应并释放出大量的能量,产生激发态的中间体。这种激发态中间体,当其回到稳定的基态时,可同时发射出光子。利用发光信号测量仪器即可测量光量子产额,该光量子产额与样品中的待测物质的量成正比。由此可以建立标准曲线并计算样品中待测物质的含量。

## 发明内容

[0004] 为快速、高效的定性、定量检测血浆 HSP70 抗体,本发明提供一种用于定性、定量检测血浆 HSP70 抗体的化学发光免疫分析定量检测试剂盒。

[0005] 本发明的技术方案如下:

一种血浆 HSP70 抗体化学发光定量检测试剂盒,包括反应板,酶结合物,发光底物,校准品,质控品,浓缩洗涤液,所述的反应板包被有重组 HSP70 蛋白抗原。

[0006] 所述的校准品以血浆 HSP70 抗体纯品配制,浓度为 500ng/ml。

[0007] 所述的质控品以血浆 HSP70 抗体纯品配制,由质控品 I 和质控品 II 两部分组成,质控品 I 的浓度为 2-8ng/ml,质控品 II 的浓度为 20-30ng/ml。

[0008] 所述的质控品 I 的浓度优选为 5ng/ml,质控品 II 的浓度优选为 25ng/ml。

[0009] 所述的酶结合物为 HRP 标记的抗血浆 HSP70 抗体的抗体即酶标记的抗抗体,所述的反应板材质是不透明的聚苯乙烯或聚乙烯,所述的发光底物为鲁米诺、异鲁米诺或其衍生物,所述的浓缩洗涤液是 pH7.0-pH8.0 的中性缓冲液。

[0010] 本发明提供的血浆 HSP70 抗体化学发光定量检测试剂盒具有以下优越性:

1. 本发明可定性、定量的检测病人血浆 HSP70 抗体的含量,并通过血浆 HSP70 抗体的含量多少帮助诊断病情,判断病人病情发展、变化。

[0011] 2. 本发明采用化学发光免疫分析技术,既保留了酶联免疫的操作简便、快速的特点,又具有放射免疫的高灵敏度,易于标准化操作,适合在医院普及、推广使用。

[0012] 3. 本发明通过检测发光信号值分析显色底物,大大提高了检测的灵敏性,与 ELISA 法相比,其分析灵敏度大幅度提高。

[0013]

## 具体实施方式

[0014] 实施例 1:制备本发明的血浆 HSP70 抗体化学发光定量检测试剂盒

### 1. 固相包被板的制备

1) 包被:使用 pH9.6 的 0.05mol/L 的碳酸钠缓冲液,加入适量重组 HSP70 抗原混匀,然后加入到微孔板板孔中,100  $\mu$ l/孔,4 $^{\circ}$ C 过夜;

2) 封闭:弃去包被液,在吸水纸上拍干,加入含有 3% BSA 和 0.05% 防腐剂 (Proclin<sup>TM</sup> 300) 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.4),200  $\mu$ l/孔,37 $^{\circ}$ C 2 小时;

3) 封袋:弃去封闭液,在吸水纸上拍干,室温下于真空干燥箱中抽 5 小时,立即进行真空封袋,检查有无漏气,如有重新封袋,贴上标签后于 2-8 $^{\circ}$ C 保存。

### [0015] 2. 酶标抗 HSP70 抗体的抗体(酶标二抗)的制备

抗血浆 HSP70 抗体的抗体用过碘酸盐氧化法与辣根过氧化物酶交联,通过方阵滴定,确定酶标抗体的使用浓度。加入甘油,-20 $^{\circ}$ C 以下保存。

### [0016] 3. 抗 HSP70 抗体校准品的制备

用含有 3% BSA 和 0.05% 防腐剂 (Proclin<sup>TM</sup> 300) 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 稀释抗 HSP70 抗体,分装 0、0.25、1、5、10、25、50 ng/ml 共 7 个浓度。

### [0017] 4. 抗 HSP70 抗体质控品的制备

用含有 3% BSA, 1% 海藻糖和 0.05% 防腐剂 (Proclin™ 300) 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 稀释抗 HSP70 抗体纯品配制质控品 1, 2, 浓度分别为 5ng/ml 和 25ng/ml。

[0018] 5. 化学发光底物液

从市场上购置鲁米诺化学发光底物液

6. 浓缩洗涤液

取 1 M PBS 缓冲液 100ml, 吐温 -20 5ml 加水定容至 1L 即成, 临用前稀释 10 倍。

[0019] 7. 半成品及成品组成。

[0020] 上述步骤所得产品分装后即为半成品。抽检合格后组装成试剂盒成品, 成品还需抽检, 合格后才能出厂。

[0021] 实施例 2: 本发明的试剂盒的使用方法

以实施例 1 制备的血浆 HSP70 抗体化学发光定量检测试剂盒的具体操作如下:

1. 试剂、样本准备

1) 试剂准备

① 试剂盒置于室温 (18-26°C) 平衡 20 分钟。

[0022] ② 从试剂盒中取出浓缩洗涤液, 用纯化水 1 : 20 稀释后加入洗板机的洗液瓶中。

[0023] 2) 样本准备

使用前将待测的合格血清或血浆置于室温 (18-26°C) 平衡 20 分钟。

[0024] 2. 试验条件

在室温 (18-26°C) 严格按照试剂盒说明书进行操作。

[0025] 3. 操作步骤

1) 取出所需的重组 HSP70 抗原包被的微孔板反应条置于微孔架上 (剩余的微孔反应条立即放回铝箔袋中, 并重新密封铝箔袋)。

[0026] 2) 加入校准品 1 ~ 7、质控品 1 ~ 2 和待测样本, 每孔 50  $\mu$  l, 充分混匀, 置于 37°C 恒温箱孵育 20 分钟。

[0027] 3) 手工洗板: 弃去孔内液体, 洗涤液注满各孔, 静置 5 秒, 甩干, 重复 5 次后拍干; 或洗板机洗涤: 程序设置 4 个循环, 每孔 350  $\mu$  l, 洗涤后拍干。

[0028] 4) 加入酶标抗体, 每孔 50  $\mu$  l, 充分混匀, 置于 37°C 恒温孵育 20 分钟。

[0029] 5) 重复程序 3)。

[0030] 6) 加入发光底物液, 每孔 100  $\mu$  l, 充分混匀。

[0031] 7) 放入化学发光仪中检测信号值。

[0032] 4. 试验结果的计算

可以采用作图法或计算法进行结果计算。

[0033] 作图法: 以标准品抗原含量的 lg 值为横坐标 (x), 以其对应的信号值为纵坐标 (y) 绘制出标准曲线, 根据检测样本测得的信号值在标准曲线上得出相应的抗原含量 lg 值, 计算抗原含量。

[0034] 计算法: 以标准品抗原含量的 lg 值为自变量 (x), 以其对应的信号值为应变量 (y), 求出回归方程, 将待测样本的信号值代入回归方程式, 求得对应的 HSP70 抗体的含量。

[0035] 5. 质量控制程序

1) 质控品 1 测定的浓度应在 5ng/ml  $\pm$  10%, 质控品 2 测定的浓度应在 25ng/ml  $\pm$  10%。

[0036] 2) 若血浆 HSP 抗体含量大于 50 ng/ml,应用校准品 1 重新测定,再按稀释倍数计算血浆 HSP70 抗体的含量。

[0037] 实施例 3:本发明的试剂盒的方法学鉴定

按照本领域常规的制造及检定过程对实施例 1 中制备的试剂盒进行检定:

1. 血浆 HSP70 抗体化学发光定量检测试剂盒的灵敏性检测

使用实施例 1 制备的血浆 HSP70 抗体化学发光定量检测试剂盒,在微孔板的微孔中加入不同浓度的血浆 HSP70 抗体抗原,血浆 HSP70 抗体抗原的浓度分别为 0、0.25、1、5、10、25、50 ng/ml。

[0038] 经过换算,本试剂盒的灵敏度达到了 0.1ng/ml

2. 血浆 HSP70 抗体化学发光定量检测试剂盒的特异性检测

使用实施例 1 制备的血浆 HSP70 抗体化学发光定量检测试剂盒,在微孔板的微孔中加入其他血浆中抗体,浓度为 20ng/ml,其他步骤再按实施例 2 所述的使用方法检测。

[0039] 本发明的试剂盒与其他血浆中抗体 HSP60 抗体等的交叉反应性小于 1%。

[0040] 3. 血浆 HSP70 抗体化学发光定量检测试剂盒的稳定性检测

通过试剂盒内部和组间的变异度判定,确定试剂盒的稳定性,具体方法如下:

1. 血浆 HSP70 抗体化学发光试剂盒内部变异系数确定方法:三个已知浓度样品(5ng, 12ng, 25ng)在一块包被 HSP70 蛋白的酶标板上各单独测定 20 次。变异系数计算方法:

$$CV = \text{批内标准差 } S / \text{平均值} \times 100\%$$

结果:变异系数的值  $CV = 7.2\% < 10\%$ 。

[0041] 2. 血浆 HSP70 抗体检测试剂盒反应之间变异系数确定方法:三个已知浓度的样品由四个研究人员单独各测定 20 次。

[0042] 试剂盒反应之间的变异系数:  $CV = \text{批间标准差 } S / \text{批间平均值} \times 100\%$

结果:  $CV = 6.6\% < 10\%$ 。

专利名称(译)	一种血浆HSP70抗体化学发光定量检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN104049088A</a>	公开(公告)日	2014-09-17
申请号	CN201410284471.X	申请日	2014-06-24
[标]申请(专利权)人(译)	广西博士海意信息科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广西博士海意信息科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广西博士海意信息科技有限公司		
[标]发明人	李永锋 陈国勇 傅汝毅 陶玲云 蓝文苑		
发明人	李永锋 陈国勇 傅汝毅 陶玲云 蓝文苑		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/96 G01N21/76 G01N33/535		
代理人(译)	李珊		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种血浆HSP70抗体化学发光定量检测试剂盒，属于体外临床检验和化学发光免疫检测领域。该试剂盒包括血浆HSP70抗体检测反应板，反应板包被有重组HSP70抗原。血浆HSP70抗体定量检测试剂盒，还包括：酶结合物，发光底物，校准品，质控品，浓缩洗涤液。本发明可以专一的定量检测出血浆HSP70抗体的含量，与传统的ELISA技术相比，本发明不仅保留了ELISA技术的高度特异性，检测结果的稳定性、可靠性和操作的简便性，同时采用的化学发光法提高了检测的灵敏度。