



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107817351 A

(43)申请公布日 2018.03.20

(21)申请号 201711035489.6

(22)申请日 2017.10.31

(71)申请人 太原瑞盛生物科技有限公司

地址 030000 山西省太原市尖草坪区太原
不锈钢产业园区钢园北路10号

(72)发明人 曹晶 刘丽青 胡雪婷 常燕
杜爱铭 徐兵

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种胎儿纤连蛋白的化学发光检测试剂盒
及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种胎儿纤连蛋白的化学发光检测试剂盒及其制备方法。该试剂盒包括：磁微粒偶联的胎儿纤连蛋白(fFN)捕获抗体、吖啶酯标记的胎儿纤连蛋白(fFN)检测抗体、胎儿纤连蛋白校准品、化学发光预激发液A、化学发光激发液B、清洗液。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，本发明建立的直接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，该试剂盒可适用于各种发光检测仪器。

1. 一种胎儿纤连蛋白的化学发光检测试剂盒及其组成,其特征在于:磁微粒偶联的胎儿纤连蛋白(fFN)捕获抗体、吡啶酯标记的胎儿纤连蛋白(fFN)检测抗体、胎儿纤连蛋白校准品、化学发光预激发液A、化学发光激发液B、清洗液。

2. 根据权利要求1所述的一种胎儿纤连蛋白的化学发光检测试剂盒及其组成,其特征在于:所述的磁珠的内核为四氧化三铁或三氧化二铁,磁微粒的表面修饰基团为一种或多种活性功能基团,包括但不限于羧基、氨基、对甲苯磺酰基或链霉亲和素-生物素。

3. 根据权利要求1所述的一种胎儿纤连蛋白的化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述的磁微粒可直接与胎儿纤连蛋白捕获抗体偶联,或将磁微粒与链霉亲和素偶联,同时采用生物素标记胎儿纤连蛋白捕获抗体。

4. 根据权利要求1所述的一种胎儿纤连蛋白的化学发光检测试剂盒及其组成,其特征在于:所述化学发光标记物为吡啶酯,如NSP-DMAE-NHS、NSP-SA-NHS等。

5. 根据权利要求1所述的一种胎儿纤连蛋白的化学发光检测试剂盒及其组成,其特征在于:所述的吡啶酯标记的是胎儿纤连蛋白(fFN)检测抗体。

6. 根据权利要求1所述的一种胎儿纤连蛋白的化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述的检测抗体和捕获抗体均是胎儿纤连蛋白(fFN)单克隆抗体。

7. 根据权利要求1所述的一种胎儿纤连蛋白的化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述的校准品是以含有BSA的缓冲液为基质,加入胎儿纤连蛋白纯品配置而成的系列浓度梯度的校准品溶液。

8. 根据权利要求1所述的一种胎儿纤连蛋白的化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述的化学发光预激发液A由 H_2O_2 和 HNO_3 的混合液组成,化学发光激发液B由Triton X-100和NaOH的混合液组成。

9. 根据权利要求1所述的一种胎儿纤连蛋白的化学发光检测试剂盒及其组成,包括以下步骤:在反应杯中加入一定量的待测样本,再加入磁颗粒偶联悬浮液,混匀,37℃孵育,加入清洗液去掉上清;之后按照一定的比例加入吡啶酯标记物,37℃孵育,加入清洗液去掉上清,加入化学发光预激发液A和激发液B,测定相应的发光强度RLU/s。

一种胎儿纤连蛋白的化学发光检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测分析领域,具体是一种胎儿纤连蛋白的免疫化学发光检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 胎儿纤连蛋白(fetal fibronectin, fFN)是可用于预测早产短期风险的糖蛋白。fFN由位于羊膜囊和母亲子宫内膜(蜕膜)之间接合处的绒毛膜滋养细胞产生。胎儿纤连蛋白在此接合处可大量检出并维持接合处的完整性。妊娠早期即可在宫颈阴道粘液检测到fFN,24周以后则检测不到fFN。但是,在妊娠36周后又可重新检测到fFN。据美国妇产科学会(ACOG)称,正常的孕期为40周,妇女可在怀孕36-42周时分娩。孕期36周以后在宫颈阴道粘液中检测到fFN是正常的,因为fFN通常在准备好分娩时释放。妊娠早期在阴道粘液中升高的fFN反映了子宫胎接合处组织正常的生长和建立。当这一过程结束,fFN水平逐渐降低。孕期22-36周之间不能检测到fFN。此期间fFN水平升高反映子宫胎盘接合处失调,且与早产风险增高相关。

[0003] 妊娠期间母体和胎儿本身合成一些特异性物质,同时诱发早产的某些因素如生殖道感染时,可刺激母体和胎儿合成一些特异性物质如fFN。当早产发生前,母体发生一些相应的变化,其可能的机制是:引起早产发生的炎症产物和炎症介质通过刺激绒毛产生fFN,其不受前列腺素的调节,并且不依赖花生四烯酸环氧化酶通路;炎症反应过程中,白细胞通过释放前列腺素及蛋白酶在局部发挥作用,破坏蜕膜、绒毛间的细胞外基质界面,加强胎膜的降解,改变宫颈条件,使fFN释放到宫颈、阴道中,从而使宫颈阴道分泌物中fFN含量有所增加;早产有宫缩出现甚至是难以察觉的子宫收缩时,可使蜕膜、绒毛膜分离,导致胎膜和蜕膜轻微损伤释放fFN,同时,羊水中的fFN又可经损伤的胎膜渗漏到羊膜腔外,这些fFN也可经胎膜与子宫蜕膜的间隙进入宫颈和阴道。由此可从宫颈阴道分泌物中检测fFN来预测早产,而且测定宫颈阴道分泌物操作简单、无创伤,使得此项检查更多地为人们所关注。近年人们对宫颈阴道分泌物中的fFN预测早产已进行了较多的研究,认为其是预测早产的一个重要指标。

[0004] 目前胎儿纤连蛋白检测的方法有:胶体金法等。CN 104391121 A(2015年3月)公开了一种胶体金法检测胎儿纤连蛋白的试剂盒,利用胶体金法进行检测的缺点是最后检测结果是肉眼可见的颜色进行表征,误差较大,并且操作繁琐,流程较多,更易出现误差,灵敏度低。本发明采用吡啶酯标记,具有如下优点:①背景发光低,信噪比高,发光反应干扰因素少;②闪光型发光,光释放快速集中、发光效率高、发光强度大;③吡啶酯分子量小,避免遮蔽抗体结合位点,提高系统整体灵敏度;④易于与蛋白质联结且联结后光子产率不减少;⑤标记物稳定,不受环境氧化剂的影响(在2-8℃下可保存数月之久)。因此吡啶取代物是一类非常有效的化学发光标记物。

[0005] 本发明采用的方法为化学发光法,其优点为:灵敏度高、特异性强、准确快速、检测时间短、线性范围宽,检测结果具有更高的准确性与重复性。

发明内容

[0006] 本发明提供了一种具有较高灵敏度和特异性的检测胎儿纤连蛋白的试剂盒。

[0007] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

一种胎儿纤连蛋白的化学发光检测试剂盒及制备方法,本发明所提供的化学发光法检测胎儿纤连蛋白的试剂盒,采取磁微粒偶联胎儿纤连蛋白(fFN)捕获抗体,吡啶酯标记胎儿纤连蛋白(fFN)检测抗体。试剂盒还包括胎儿纤连蛋白校准品、化学发光预激发液A、化学发光激发液B以及清洗液。

[0008] 作为本发明进一步的方案,所述的磁微粒可直接与胎儿纤连蛋白抗体偶联,也可将磁微粒与链霉亲和素偶联,同时采用生物素标记胎儿纤连蛋白抗体。

[0009] 作为本发明进一步的方案,所述磁珠的表面修饰基团为羧基、氨基、链霉亲和素-生物素或对甲苯磺酰基。磁珠使用前固相的不完全沉降会影响精确度,因此选择时应选分散性好,沉降速度慢的磁珠。

[0010] 作为本发明进一步的方案,所述的化学发光标记物为吡啶酯,如:NSP-DMAE-NHS、NSP-SA-NHS等。

[0011] 作为本发明进一步的方案,所述的吡啶酯标记的是胎儿纤连蛋白(fFN)检测抗体。

[0012] 作为本发明进一步的方案,所述的吡啶酯标记胎儿纤连蛋白(fFN)检测抗体的缓冲液是pH 8.0-11.0、浓度为0.01-0.20mol/L的 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液。

[0013] 作为本发明进一步的方案,所述的吡啶酯与抗体的摩尔比为5-100:1。

[0014] 作为本发明进一步的方案,所述的吡啶酯溶于DMSO或DMF中,且所配制溶液的最终浓度为0.1-100 mmol/L。

[0015] 作为本发明进一步的方案,所述的检测抗体和捕获抗体均是胎儿纤连蛋白(fFN)单克隆抗体。

[0016] 作为本发明进一步的方案,所述的校准品是用含有0.5-5.0% BSA的Tris或PBS或HEPES缓冲液为基质,加入胎儿纤连蛋白纯品配置而成。

[0017] 作为本发明进一步的方案,所述的胎儿纤连蛋白校准品溶液浓度分别为:0 ng/mL、4ng/mL、16 ng/mL、64 ng/mL、256 ng/mL、1024 ng/mL。

[0018] 作为本发明进一步的方案,所述的化学发光预激发液A为 H_2O_2 和 HNO_3 的混合液,其中 H_2O_2 质量分数为0.01-5.0%, HNO_3 浓度为0.01-1.0 mol/L。

[0019] 作为本发明进一步的方案,所述的化学发光激发液B为Triton X-100和NaOH的混合液,其中Triton X-100的质量分数为0.01-2.0%,NaOH的浓度为0.05-1.0 mol/L。

[0020] 作为本发明进一步的方案,所述的清洗液包括以下组分:pH值7.0-9.0、浓度为5.0-50.0 mmol/L的Tris或HEPES或其它溶液,其中含有质量分数为0.01-0.25%的Tween-20。

[0021] 本发明的原理是将抗体-抗原反应的高度特异性与吡啶酯发光的高度灵敏性结合起来,利用吡啶酯捕捉反应产生的光子检测产物浓度。

[0022] 本发明的优点在于采用夹心法联合磁微粒化学发光技术以测定胎儿纤连蛋白的含量。吡啶酯作为标记物的直接化学发光具有明显优势,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,可以完全捕捉反应产生的光子,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,吡啶酯易与蛋白质联结,且联结后光子产率不减少。

具体实施方式

[0023] 本发明提供了一种胎儿纤连蛋白的化学发光检测试剂盒,为使本发明目的、技术方案及效果更加清楚、明确,以下对本发明进行详细说明。

[0024] 本发明提供一种胎儿纤连蛋白的化学发光检测试剂盒及制备方法,磁微粒偶联的胎儿纤连蛋白(fFN)捕获抗体、吡啶酯标记的胎儿纤连蛋白(fFN)检测抗体。试剂盒还包括胎儿纤连蛋白校准品、化学发光预激发液A、化学发光激发液B以及清洗液。

[0025] 具体地,本发明在制备磁微粒偶联捕获抗体的过程中,所述偶联抗体的缓冲液为pH值5.0-6.0、浓度为20-200 mmol/L MES的缓冲液。

[0026] 具体地,本发明在制备磁微粒偶联捕获抗体的过程中,所述封闭缓冲液为含1% BSA的缓冲液。

[0027] 具体地,本发明在制备吡啶酯标记检测抗体的过程中,所述的吡啶酯标记胎儿纤连蛋白(fFN)检测抗体的缓冲液是pH 8.0-11.0、浓度为0.01-0.20mol/L的 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液。

[0028] 具体地,本发明所述校准品是由含有0.5-5.0% BSA的Tris或PBS或HEPES缓冲液为基质,加入胎儿纤连蛋白纯品配置而成。

[0029] 具体地,所述的化学发光预激发液A为 H_2O_2 和 HNO_3 的混合液,其中 H_2O_2 质量分数为0.01-5.0%, HNO_3 浓度为0.01-1.0 mol/L。

[0030] 具体地,本发明所述化学发光激发液B为Triton X-100和NaOH的混合液,其中Triton X-100的质量分数为0.01-2.0%,NaOH的浓度为0.05-1.0 mol/L。

[0031] 具体地,本发明所述清洗液为pH值7.0-9.0、浓度为5.0-50.0 mmol/L的Tris或HEPES或其它溶液,其中含有质量分数为0.01-0.25%的Tween-20。

[0032] 下面通过实施例对本发明进行详细说明。

[0033] 实施例1:一种胎儿纤连蛋白的化学发光检测试剂盒的组建及制备方法

1. 试剂盒的组建

磁微粒偶联的胎儿纤连蛋白单克隆抗体;

吡啶酯标记的胎儿纤连蛋白(fFN)单克隆抗体;

胎儿纤连蛋白系列校准品溶液;

化学发光预激发液A和化学发光激发液B;

清洗液。

[0034] 2. 偶联胎儿纤连蛋白单克隆抗体的磁微粒混悬液的制备

(1)取1 mg羧基磁微粒于0.5 mL离心管中,加入200 μL 浓度为0.1 mol/L的MES缓冲液,涡旋混匀,置于磁力架上,静置5 min使磁微粒与液体分开,弃去上清,洗涤3次,再加入200 μL 的MES(pH为6.0)缓冲液,涡旋。

[0035] (2)加入15 μg 胎儿纤连蛋白单克隆抗体,使羧基与抗体的摩尔比为150:1,涡旋,旋转反应管,室温孵育30 min。

[0036] (3)加入10 μL 浓度为10 mg/mL的偶联试剂EDC,于旋转反应器上涡旋,室温孵育2

h。

[0037] (4)取200 μ L含1% BSA的甘氨酸缓冲液(浓度为50mmol/L)进行封闭,时间为1 h。

[0038] (5)去上清,加入200 μ L的清洗缓冲液(TBS+0.05% Tween-20),洗涤3次。

[0039] (6)将上述制备好的磁微粒混悬液置于500 μ L的保存液(300 mmol/L的甘氨酸、2%的甘油、5%的蔗糖)中,2-8 $^{\circ}$ C保存。

[0040] 3. 吡啶酯标记胎儿纤连蛋白(fFN)单克隆抗体的制备

(1)纯化胎儿纤连蛋白(fFN)抗体:将100 μ g的胎儿纤连蛋白(fFN)抗体置于透析袋中,并将透析袋置于不小于1 L的标记缓冲液中透析,期间缓冲液更换5次,最后一次透析过夜,标记缓冲液是pH 9.8、浓度为50 mmol/L的Na₂CO₃-NaHCO₃缓冲液。

[0041] (2)称取1.7 mg的吡啶酯NSP-DMAE-NHS,溶于447 μ L无水二甲基甲酰胺(DMF)中,配成6.5 mmol/L的NSP-DMAE-NHS DMF溶液。

[0042] (3)将透析后的胎儿纤连蛋白(fFN)单克隆抗体置于500 μ L离心管内,加入200 μ L pH 9.8、浓度为50 mmol/L的Na₂CO₃-NaHCO₃的缓冲液(避光反应),加入759 μ L,6.5 mmol/L的NSP-DMAE-NHS DMF溶液,使吡啶酯与胎儿纤连蛋白(fFN)单克隆抗体的摩尔比值为7.4:1,振荡混匀,室温下反应1 h,加入100 μ L 浓度为10 g/L赖氨酸,静置15 min,使标记反应终止。

[0043] (4)标记物NSP-DMAE-NHS-Ab与游离NSP-DMAE-NHS通过Sephadex G-50柱(1 \times 25cm)分离,用纯化缓冲液pH 6.3、浓度为0.1 mol/L的PBS平衡并淋洗层析柱。

[0044] (5)分离过程中用色谱仪检测蛋白峰,分别测量流出液的化学发光强度和280 nm吸光度值。

[0045] (6)收集光度值高且吸光度大的洗脱液,加入1% BSA后分装冰冻保存。

[0046] 4. 胎儿纤连蛋白系列校准品溶液的制备

用含有1% BSA 的Tris-HCl 缓冲液为基质,加入胎儿纤连蛋白纯品配成标示浓度分别为:0 ng/mL、4ng/mL、16 ng/mL、64 ng/mL、256 ng/mL、1024 ng/mL的溶液。

[0047] 5. 发光激发液A、B的制备

(1)化学发光预激发液A由H₂O₂和HNO₃组成。其中,其中H₂O₂的质量分数为1.5%,HNO₃的浓度为0.1 mol/L,用棕色瓶分装成20 mL/支,2-8 $^{\circ}$ C保存备用。

[0048] (2)化学发光激发液B由Triton X-100 和NaOH的混合液组成。其中,Triton X-100的质量分数为1.0%,NaOH的浓度为0.4 mol/L,用棕色瓶分装成20 mL/支,2-8 $^{\circ}$ C保存备用。

[0049] 6. 清洗液的制备

称量3.05 g Tris,8.775 g NaCl至1000 mL的烧杯中,加入1mL质量分数为0.05% Tween-20,搅拌混匀,定容,将pH调至 7.6后保存备用。

[0050] 实施例2:用试剂盒检测与结果分析

(1)在反应杯中加入待测样本50 μ L,再加入磁颗粒偶联悬浮液150 μ L,振荡混匀,37 $^{\circ}$ C孵育8 min。

[0051] (2)分离,清洗3次。将洗涤后的反应容器充分振荡使磁微粒散开。

[0052] (3)向反应杯中加入吡啶酯标记物150 μ L,振荡混匀,37 $^{\circ}$ C孵育7 min。

[0053] (4)分离,清洗3次。将洗涤后的反应容器充分振荡使磁微粒散开。

[0054] (5)加入100 μ L化学发光预激发液A,1s后加入100 μ L化学发光激发液B,测量其相

对发光强度,样本中胎儿纤连蛋白的含量与其相对发光强度成一定比例关系。

[0055] 实施例3:试剂盒的性能指标

1. 试剂盒的灵敏度

用试剂盒中0 ng/mL校准品作为待测样本,重复测定20次,得出20次测量结果的RLU值(相对发光值),计算其平均值(M)和标准差(SD),得出 M+2SD 所对应RLU值,根据零浓度校准品与相邻校准品之间的浓度-RLU值结果进行两点回归拟合得出一次方程,将 M+2SD 的RLU 值带入上述方程中,求出对应的浓度值。按检测方案中最低检测限检测方法,重复3次实验,最后求出本试剂盒对胎儿纤连蛋白的分析灵敏度为2.5 ng/mL。

[0056] 2. 精密度测定

用fFN试剂盒测试浓度为(40±4.0) ng/mL和(400±40) ng/mL的样本,每个浓度重复测试10次,计算试剂盒精密度,结果表明该试剂盒CV均小于5%。

[0057] 3. 稳定性

取胎儿纤连蛋白检测试剂盒进行常规贮存稳定性试验,2-8℃放置分别按时间1,3,5,7,9,11,12,13,14,15个月进行检测;开盖稳定性试验分别按2-8℃放置0天、7天、14天、16天、18天、20天、22天、24天、26天、28天、30天、32天进行测定。结果显示胎儿纤连蛋白检测试剂盒贮存于2-8℃、避光环境中,有效期为12个月。开盖贮存于2-8℃、避光环境中,有效期为30天。

[0058] 对于本领域技术人员而言,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下,能够以其他的具体形式实现本发明。因此,无论从哪一点来看,均应将实施例看作是示范性的,而且是非限制性的,本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。

[0059] 此外,应当理解,虽然本说明书按照实施方式加以描述,但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案,说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见,本领域技术人员应当将说明书作为一个整体,各实施例中的技术方案也可以经适当组合,形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。

专利名称(译)	一种胎儿纤连蛋白的化学发光检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN107817351A	公开(公告)日	2018-03-20
申请号	CN2017111035489.6	申请日	2017-10-31
[标]发明人	曹晶 刘丽青 胡雪婷 常燕 杜爱铭 徐兵		
发明人	曹晶 刘丽青 胡雪婷 常燕 杜爱铭 徐兵		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/531 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/689 G01N21/76 G01N33/531 G01N33/54326		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种胎儿纤连蛋白的化学发光检测试剂盒及其制备方法。该试剂盒包括：磁微粒偶联的胎儿纤连蛋白 (fFN) 捕获抗体、吖啶酯标记的胎儿纤连蛋白 (fFN) 检测抗体、胎儿纤连蛋白校准品、化学发光预激发液A、化学发光激发液B、清洗液。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，本发明建立的直接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，该试剂盒可适用于各种发光检测仪器。