



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 108152490 A

(43)申请公布日 2018.06.12

(21)申请号 201711394918.9

(22)申请日 2017.12.22

(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 33/532(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种大内皮素-1的化学发光检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种大内皮素-1的化学发光检测试剂盒及其制备方法。该试剂盒包括：磁微粒偶联的大内皮素-1(ET-1)捕获抗体、吖啶酯标记的大内皮素-1(ET-1)检测抗体、大内皮素-1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，该试剂盒适用于各种发光检测仪器。

1. 一种大内皮素-1的化学发光检测试剂盒及其组成,其特征在于:磁微粒偶联的大内皮素-1 (ET-1) 捕获抗体、吡啶酯标记的大内皮素-1 (ET-1) 检测抗体、大内皮素-1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所述的一种大内皮素-1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所述的一种大内皮素-1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大内皮素-1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大内皮素-1捕获抗体。

4. 根据权利要求1所述的一种大内皮素-1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所述的一种大内皮素-1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大内皮素-1 (ET-1) 检测抗体。

6. 根据权利要求1所述的一种大内皮素-1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大内皮素-1 (ET-1) 单克隆抗体。

7. 根据权利要求1所述的一种大内皮素-1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,加入大内皮素-1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所述的一种大内皮素-1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所述的一种大内皮素-1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。

一种大内皮素-1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,具体是一种大内皮素-1的免疫化学发光检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 内皮素(ET)是一种具有多种生物学效应的活性肽。ET 家族中与肿瘤关系最密切的是ET-1,参与了许多肿瘤的发生发展过程。ET-1是从培养的猪主动脉内皮细胞上清液中,分离获得的1种具有强烈收缩血管作用的活性肽,共有3种类型,即 ET-1、ET-2和 ET-3。研究表明,ET 除可收缩血管外,还具有其它广泛的生物学活性,而且与肿瘤的关系密切。许多学者又发现肝癌、恶性血管细胞癌、乳腺癌和胰腺癌等患者血浆中ET-1的水平较正常人高,并在肝癌组织中发现了 ET-1的浓集区,因而认为肿瘤细胞本身也能产生ET-1。ET-1具有促进肿瘤细胞增殖、抑制细胞凋亡、促进肿瘤血管生成、增强细胞黏附和侵袭等多方面的作用。ET分子是由 21个氨基酸残基和两对二硫键连接4个半胱氨酸组成的双环状结构。对哺乳动物研究发现 ET家族包含3种同源异构肽,即 ET21、ET22和ET23。虽然 ET三种异构体在结构上有很多相似之处,ET21 与 ET22相差2个氨基酸,ET23与其它两种相差6个氨基酸,但是它们分别由不同的基因独立表达,其组织分布与受体的结合以及表现出的生物学效应也不尽相同。ET 在人体组织中有广泛分布,其中ET21主要由各种内皮细胞和上皮细胞表达,ET22主要存在于肾脏和小肠,而ET23主要存在于神经系统。

[0003] 内皮素-1(ET-1)在肿瘤血管形成过程中的作用引起广泛的重视。ET-1可通过旁分泌的方式直接及间接的促进肿瘤中血管的生成。有研究证实ET-1在肺癌组织中高表达并参与诱导肺癌细胞的增殖。ET-1 普遍存在于肺癌细胞中。ET-1含量可能与肿瘤分化程度有一定关系。ET-1可作为肺腺癌、鳞癌的一个检测指标。肿瘤分化程度越低ET-1含量越高,肿瘤分化程度越高ET-1含量越低。

[0004] 目前大内皮素-1检测的方法有:放射免疫法、酶联免疫法等。放射免疫法虽然具有高灵敏度、高特异性的优点,但其操作步骤较多,需要特殊的检测设备,试剂价格昂贵,需使用配套的仪器且存在放射性污染,使操作人员受到放射性危害;另外,放射性同位素易衰减,有效期短,不易保存。酶联免疫法采用辣根过氧化物酶,采用辣根过氧化物酶的主要缺点为:鲁米诺在没有辣根过氧化物酶存在情况下,也会被 H_2O_2 氧化自身发光,本底相对较高,影响信噪比,反应动力学复杂,影响因素多,结果不够稳定,要得到灵敏度高且平台期长的底物不容易。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大内皮素-1的试剂盒。

[0007] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

一种大内皮素-1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大内皮素-1的试剂盒,采取磁微粒偶联大内皮素-1 (ET-1) 捕获抗体,吡啶酯标记大内皮素-1 (ET-1) 检测抗体。试剂盒还包括大内皮素-1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大内皮素-1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大内皮素-1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大内皮素-1 (ET-1) 检测抗体。

[0012] 作为本发明进一步的方案,所述的吡啶酯标记大内皮素-1 (ET-1) 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大内皮素-1 (ET-1) 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,加入大内皮素-1纯品配置而成。

[0017] 作为本发明进一步的方案,所述的大内皮素-1校准品溶液浓度分别为: 0 ng/L、5 ng/L、25 ng/L、125 ng/L、625 ng/L、1000 ng/L。

[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大内皮素-1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] 本发明提供了一种大内皮素-1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] 本发明提供一种大内皮素-1的化学发光检测试剂盒及制备方法,磁微粒偶联的大内皮素-1(ET-1)捕获抗体、吡啶酯标记的大内皮素-1(ET-1)检测抗体。试剂盒还包括大内皮素-1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,所述的吡啶酯标记大内皮素-1(ET-1)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,加入大内皮素-1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1:一种大内皮素-1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

磁微粒偶联的大内皮素-1单克隆抗体;

吡啶酯标记的大内皮素-1(ET-1)单克隆抗体;

大内皮素-1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. 偶联大内皮素-1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 大内皮素-1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 μL 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 μL 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 μL 的保存液(300 mmol/L的甘氨酸、2%的甘油、5%的蔗糖)中,2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

[0040] 3. 吡啶酯标记大内皮素-1 (ET-1)单克隆抗体的制备

(1)纯化大内皮素-1 (ET-1)抗体:将100 μg 的大内皮素-1 (ET-1)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 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液。

[0041] (2)称取1.7 mg的吡啶酯NSP-DMAE-NHS,溶于447 μL 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)将透析后的大内皮素-1 (ET-1)单克隆抗体置于500 μL 离心管内,加入200 μL pH 9.8、浓度为50 mmol/L的 Na_2CO_3 - NaHCO_3 的缓冲液(避光反应),加入759 μL ,6.5 mmol/L的NSP-DMAE-NHS DMF溶液,使吡啶酯与大内皮素-1 (ET-1)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 μL 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. 大内皮素-1系列校准品溶液的制备

用含有1% BSA 的Tris-HCl 缓冲液为基质,加入大内皮素-1纯品配成标示浓度分别为:0 ng/L、5 ng/L、25 ng/L、125 ng/L、625 ng/L、1000 ng/L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 H_2O_2 和 HNO_3 组成。其中,其中 H_2O_2 的质量分数为1.5%, HNO_3 的浓度为0.1 mol/L,用棕色瓶分装成20 mL/支,2-8 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL ,再加入磁颗粒偶联悬浮液150 μL ,振荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL ,振荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL 化学发光预激发液A,1s后加入100 μL 化学发光激发液B,测量其相

对发光强度,样本中大内皮素-1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大内皮素-1的分析灵敏度为2.5 ng/L。

[0056] 2. 精密度测定

用fFN试剂盒测试浓度为 (46 ± 4.6) ng/L和 (200 ± 20) ng/L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

取大内皮素-1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。结果显示大内皮素-1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)	一种大内皮素-1的化学发光检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN108152490A	公开(公告)日	2018-06-12
申请号	CN2017111394918.9	申请日	2017-12-22
[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	G01N33/532 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/532 G01N21/76		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种大内皮素-1的化学发光检测试剂盒及其制备方法。该试剂盒包括：磁微粒偶联的大内皮素-1 (ET-1) 捕获抗体、吖啶酯标记的大内皮素-1 (ET-1) 检测抗体、大内皮素-1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。