



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115494244 B

(45) 授权公告日 2023.03.24

(21) 申请号 202211451733.8

G01N 21/76 (2006.01)

(22) 申请日 2022.11.21

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 115494244 A

CN 112159787 A, 2021.01.01

CN 102955026 A, 2013.03.06

CN 114397443 A, 2022.04.26

(43) 申请公布日 2022.12.20

CN 102481322 A, 2012.05.30

(73) 专利权人 保定佳瑞源生物芯片有限公司

CN 109517036 A, 2019.03.26

地址 071000 河北省保定市莲池区东三环

CN 102253216 A, 2011.11.23

299号深圳园展示中心202室

US 2017101466 A1, 2017.04.13

(72) 发明人 李雨峰 杨海侠 陈立柱 刘瑜

US 2011091463 A1, 2011.04.21

US 2003045716 A1, 2003.03.06

(74) 专利代理机构 北京盛广信合知识产权代理

CN 102955029 A, 2013.03.06

有限公司 16117

专利代理师 刘化帅

审查员 李逸凡

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

权利要求书1页 说明书14页

(54) 发明名称

一种癌抗原CA724的吡啶酯抗体标记稀释液及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种癌抗原CA724的吡啶酯抗体标记稀释液及其应用,涉及生物检测技术领域。该吡啶酯抗体标记稀释液包括以下组分:磷酸氢二钠1.13-1.15 g/L、磷酸二氢钠0.21-0.23 g/L、氯化钠8.76-8.78 g/L、4-氨基安替比林0.5-1.0 g/L、扑热息痛0.25-1.0 g/L、曲拉通X-100 1.1-1.3 mL/L、十二烷基硫酸钠0.45-0.55 g/L、大豆蛋白脲9.5-12 g/L、鱼蛋白脲5-10 g/L和硫酸庆大霉素0.45-0.55g/L。本发明制备的吡啶酯抗体标记稀释液稳定性好,灵敏度高,重复性好。

1. 一种癌抗原CA724的吡啶酯抗体标记稀释液,包括以下组分:磷酸氢二钠1.13 g/L、磷酸二氢钠0.21 g/L、氯化钠8.76 g/L、4-氨基安替比林1.0 g/L、扑热息痛1.0g/L、曲拉通X-100 1.1 mL/L、十二烷基硫酸钠0.55 g/L、大豆蛋白胨10.5 g/L、鱼蛋白胨10.0 g/L和硫酸庆大霉素0.45 g/L。

2. 一种如权利要求1所述的吡啶酯抗体标记稀释液的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、根据所述吡啶酯抗体标记稀释液的配方,称取各个组分备用;

S2、向体外诊断试剂用纯化水中依次加入氯化钠、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠,搅拌使其充分溶解,之后调节pH为7.0-7.4,得到中间溶液;

S3、在所述中间溶液中加入硫酸庆大霉素、大豆蛋白胨、鱼蛋白胨、4-氨基安替比林、扑热息痛、曲拉通X-100和十二烷基硫酸钠,混合均匀;

S4、用体外诊断试剂用纯化水定容,得到所述吡啶酯标记稀释液。

3. 一种如权利要求1所述的吡啶酯抗体标记稀释液在制备磁微粒化学发光法检测试剂盒中的应用。

4. 如权利要求3所述的应用,其特征在于,所述试剂盒为检测癌抗原CA724的试剂盒。

5. 一种磁微粒化学发光法检测试剂盒,其特征在于,包含权利要求1所述的吡啶酯抗体标记稀释液。

6. 如权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒为检测癌抗原CA724的试剂盒。

一种癌抗原CA724的吡啶酯抗体标记稀释液及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,特别是涉及一种癌抗原CA724的吡啶酯抗体标记稀释液及其应用。

背景技术

[0002] 磁微粒化学发光法(magnetic particle chemiluminescence method)广泛用于测定抗原,其原理是使抗体结合到磁珠载体的表面,并保持其免疫活性,形成固相的抗体,即磁微粒包被。使抗体与吡啶酯连接成标记抗体,这种标记抗体既保留其免疫活性,又保留吡啶酯的活性,即吡啶酯标记抗体。在测定抗原CA724时,将磁微粒包被抗体工作液、吡啶酯标记抗体工作液和受检标本加入到反应杯中,若样本中含有CA724,其不同位点分别与包被抗体和标记抗体结合,形成包被抗体-检测抗原CA724-标记抗体夹心复合物。清洗去除游离的标记抗体后,加入化学发光底物到反应杯中。通过全自动免疫分析仪检测到吡啶酯反应产生的发光信号,检测到的光的积分与样本中CA724浓度成正比,全自动免疫化学发光分析仪可计算出样本CA724的浓度值。

[0003] 抗体一般只能在-20℃以及更低温度条件下长期贮藏2-8℃短时间储存一周,且不能反复冻融,才能避免其活性降低,从而有效地保证诊断方法结果的可靠性。目前经过标记抗体技术的不断发展,标记抗体免疫活性得到大大的提升,同时为了确保标记抗体免疫活性的稳定,市售的抗体都是制备成高纯度的浓缩液或冻干粉,抗体在制备成标记时,均需进行几千倍的大体积稀释后使用。但是如果将标记抗体放置于4℃条件下或进行大体积稀释后,其免疫活性将在很短的时间内迅速下降。

[0004] 对于磁微粒化学发光法检测试剂盒而言,其关键技术之一是确保试剂盒内的标记抗体的免疫活性不发生改变,这不仅要求标记抗体制备成的吡啶酯标记抗体工作液可以进行几千倍的稀释,还能在2-8℃条件下进行保存及运输即可保证稳定性。因此,研究制备的吡啶酯标记抗体工作液需要在加速稳定性和2-8℃实时追踪稳定性更好,且灵敏度和重复性均需符合要求。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种癌抗原CA724的吡啶酯抗体标记稀释液及其应用,以解决上述现有技术存在的问题,本发明制备的稀释液稳定性好,灵敏度高,重复性好。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供了如下方案:

[0007] 本发明提供一种癌抗原CA724的吡啶酯抗体标记稀释液,包括以下组分:磷酸氢二钠1.13-1.15 g/L、磷酸二氢钠0.21-0.23 g/L、氯化钠8.76-8.78 g/L、4-氨基安替比林0.5-1.0 g/L、扑热息痛0.25-1.0 g/L、曲拉通X-100 1.1-1.3 mL/L、十二烷基硫酸钠0.45-0.55 g/L、大豆蛋白胨9.5-12 g/L、鱼蛋白胨5-10 g/L和硫酸庆大霉素0.45-0.55g/L。

[0008] 进一步地,所述的吡啶酯抗体标记稀释液,优选包括以下组分:磷酸氢二钠1.13 g/L、磷酸二氢钠0.21 g/L、氯化钠8.76 g/L、4-氨基安替比林1.0 g/L、扑热息痛1.0g/L、曲

拉通X-100 1.1 mL/L、十二烷基硫酸钠0.55 g/L、大豆蛋白胨10.5 g/L、鱼蛋白胨10.0 g/L和硫酸庆大霉素0.45 g/L。

[0009] 本发明还提供一种上述的吡啶酯抗体标记稀释液的制备方法,包括以下步骤:

[0010] S1、根据所述吡啶酯抗体标记稀释液的配方,称取各个组分备用;

[0011] S2、向体外诊断试剂用纯化水中依次加入氯化钠、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠,搅拌使其充分溶解,之后调节pH为7.0-7.4,得到中间溶液;

[0012] S3、在所述中间溶液中加入硫酸庆大霉素、大豆蛋白胨、鱼蛋白胨、4-氨基安替比林、扑热息痛、曲拉通X-100和十二烷基硫酸钠,混合均匀;

[0013] S4、用体外诊断试剂用纯化水定容,得到所述吡啶酯标记稀释液。

[0014] 本发明还提供上述的吡啶酯抗体标记稀释液在制备磁微粒化学发光法检测试剂盒中的应用。

[0015] 进一步地,所述试剂盒为检测癌抗原CA724的试剂盒。

[0016] 本发明还提供一种磁微粒化学发光法检测试剂盒,包含上述的吡啶酯抗体标记稀释液。

[0017] 进一步地,所述试剂盒为检测癌抗原CA724的试剂盒。

[0018] 本发明公开了以下技术效果:

[0019] 本发明中采用磷酸盐缓冲液体系,在此缓冲液体系中加入4-氨基安替吡啶、扑热息痛、鱼蛋白胨、大豆蛋白胨、十二烷基硫酸钠、曲拉通X-100和硫酸庆大霉素。其中4-氨基安替比林是吡啶酯保护剂;扑热息痛为过氧化氢保护剂;十二烷基硫酸钠和曲拉通X-100作为表面活性剂,主要增加吡啶酯标记抗体工作液的灵敏度,其次对标记抗体也有一定的保护作用;采用硫酸庆大霉素作为防腐剂,防止微生物的生长,效果更佳;大豆蛋白胨和鱼蛋白胨的联合使用保护标记抗体的稳定性,与普通配方(对比例1)相比,其保护标记抗体的能力更好,且经济成本较低。

[0020] 这几种保护剂在吡啶酯标记抗体稀释液中相互作用,使得吡啶酯标记抗体稀释液稳定性更好。此吡啶酯标记抗体稀释液在37℃加速稳定性实验中放置3天、7天后的降解率低,加速7天降解率仍低于10%,用于检测的校准品各浓度点与约定的标准曲线线性相关系数均大于0.9900,同时各浓度点于2-8℃实时稳定性实验中放置1个月、3个月、6个月、12个月和13个月的降解率低,且各浓度点约定的标准曲线线性相关系数均大于0.9900,加速稳定性实验和实施稳定性实验都可证明其免疫活性仍很高,降解率明显较低。

[0021] 本吡啶酯标记抗体工作液稳定性更好,同时能大幅度提高磁微粒化学发光检测值的准确性,操作方法简单,易于配制,节约物料成本,适合推广使用,更适用于临床的应用。

具体实施方式

[0022] 现详细说明本发明的多种示例性实施方式,该详细说明不应认为是对本发明的限制,而应理解为是对本发明的某些方面、特性和实施方案的更详细的描述。

[0023] 应理解本发明中所述的术语仅仅是为描述特别的实施方式,并非用于限制本发明。另外,对于本发明中的数值范围,应理解为还具体公开了该范围的上限和下限之间的每个中间值。在任何陈述值或陈述范围内的中间值以及任何其他陈述值或在所述范围内的中间值之间的每个较小的范围也包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括

或排除在范围内。

[0024] 除非另有说明,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所述领域的常规技术人员通常理解的相同含义。虽然本发明仅描述了优选的方法和材料,但是在本发明的实施或测试中也可以使用与本文所述相似或等同的任何方法和材料。本说明书中提到的所有文献通过引用并入,用以公开和描述与本文所述文献相关的方法和-或材料。在与任何并入的文献冲突时,以本说明书的内容为准。

[0025] 在不背离本发明的范围或精神的情况下,可对本发明说明书的具体实施方式做多种改进和变化,这对本领域技术人员而言是显而易见的。由本发明的说明书得到的其他实施方式对技术人员而言是显而易见的。本发明说明书和实施例仅是示例性的。

[0026] 关于本文中所使用的“包含”、“包括”、“具有”、“含有”等等,均为开放性的用语,即意指包含但不限于。

[0027] 实施例1

[0028] 本实施例的癌抗原CA724的吡啶酯标记稀释液的各组分及其用量如表1所示,制备方法如下:

[0029] S1、按照表1所示的稀释液的配方,称取各个组分备用;

[0030] S2、向800 mL体外诊断试剂用纯化水中依次加入氯化钠、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠,匀速搅拌使其充分溶解,之后调节pH为7.4(7.2±0.2可达相同效果),得到中间溶液;

[0031] S3、向中间溶液中加入硫酸庆大霉素、大豆蛋白胨、鱼蛋白胨、4-氨基安替比林、扑热息痛、曲拉通X-100和十二烷基硫酸钠,匀速搅拌使充分混匀;

[0032] S4、用体外诊断试剂用纯化水定容至1000 mL,得到吡啶酯标记稀释液,置于2℃保存备用。

[0033] 实施例2

[0034] 本实施例的癌抗原CA724的吡啶酯标记稀释液的各组分及其用量如表1所示,制备方法同实施例1。

[0035] 实施例3

[0036] 本实施例的癌抗原CA724的吡啶酯标记稀释液的各组分及其用量如表1所示,制备方法同实施例1。

[0037] 对比例1

[0038] 本对比例的癌抗原CA724的吡啶酯标记稀释液的各组分及其用量如表1所示,制备方法如下:

[0039] S1、按照表1所示的吡啶酯标记抗体稀释液的配方,称取各个组分备用;

[0040] S2、向800 mL体外诊断试剂用纯化水中依次加入磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠、匀速搅拌使其充分溶解;

[0041] S3、调节溶液的pH为7.4;

[0042] S4、加入新生牛血清、曲拉通X-100、吐温20和Proclin300,匀速搅拌使充分混匀;

[0043] S5、用体外诊断试剂用纯化水定容至1000 mL,得到吡啶酯标记抗体稀释液,置于2℃保存备用。

[0044] 对比例2

[0045] 本实施例的癌抗原CA724的吡啶酯标记稀释液的各组分及其用量如表1所示,制备

方法如下：

[0046] S1、按照表1所示的稀释液的配方，称取各个组分备用；

[0047] S2、向800 mL体外诊断试剂用纯化水中依次加入氯化钠、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠，匀速搅拌使其充分溶解，之后调节pH为7.4(7.2±0.2可达相同效果)，得到中间溶液；

[0048] S3、向中间溶液中加入硫酸庆大霉素、鱼蛋白胨、4-氨基安替比林、扑热息痛、曲拉通X-100和十二烷基硫酸钠，匀速搅拌使充分混匀；

[0049] S4、用体外诊断试剂用纯化水定容至1000 mL，得到吡啶酯标记稀释液，置于2℃保存备用。

[0050] 对比例3

[0051] 本实施例的癌抗原CA724的吡啶酯标记稀释液的各项组分及其用量如表1所示，制备方法如下：

[0052] S1、按照表1所示的稀释液的配方，称取各个组分备用；

[0053] S2、向800 mL体外诊断试剂用纯化水中依次加入氯化钠、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠，匀速搅拌使其充分溶解，之后调节pH为7.4(7.2±0.2可达相同效果)，得到中间溶液；

[0054] S3、向中间溶液中加入硫酸庆大霉素、大豆蛋白胨、4-氨基安替比林、扑热息痛、曲拉通X-100和十二烷基硫酸钠，匀速搅拌使充分混匀；

[0055] S4、用体外诊断试剂用纯化水定容至1000 mL，得到吡啶酯标记稀释液，置于2℃保存备用。

[0056] 表1 实施例1-3和对比例1-3的吡啶酯标记抗体稀释液的配方

组分	实施例1	实施例2	实施例3	对比例1	对比例2	对比例3
磷酸氢二钠	1.13 g	1.15 g	1.14 g	1.15 g	1.13 g	1.13 g
磷酸二氢钠	0.21 g	0.23 g	0.22 g	0.23 g	0.21 g	0.21 g
氯化钠	8.76 g	8.78 g	8.77 g	8.77 g	8.76 g	8.76 g
4-氨基安替比林	1.0 g	0.8g	0.5 g	-	1.0 g	1.0 g
扑热息痛	1.0 g	0.5 g	0.25 g	-	1.0 g	1.0 g
曲拉通 X-100	1.1 mL	1.3 mL	1.2 mL	1.2 mL	1.1 mL	1.1 mL
十二烷基硫酸钠	0.55 g	0.45 g	0.5 g	-	0.55 g	0.55 g
大豆蛋白胨	10.5 g	9.5 g	12 g	-	-	10.5 g
鱼蛋白胨	10.0 g	8.0 g	5 g	-	10.0 g	-
硫酸庆大霉素	0.45 g	0.5 g	0.55g	-	0.45 g	0.45 g
吐温 20	-	-	-	1 mL	-	-
新生牛血清	-	-	-	10 g	-	-
防腐剂 Proclin300	-	-	-	0.5 mL	-	-
体外诊断试剂用纯化水	加至 1000 mL					

[0057]

[0058] 效果验证实验

[0059] 一、加速热稳定性选择实验

[0060] 1. 实验步骤

[0061] (1) 分别用上述实施例1~3与对比例1制备的吡啶酯标记稀释液稀释标记抗体至规定浓度,将稀释后的吡啶酯标记抗体工作液置于37℃,分别放置3天和7天后备用。

[0062] (2) 取已制备好的磁微粒包被抗体工作液。

[0063] (3) 用校准品稀释液稀释后的CA724校准品(0、0.48、2.4、12、60、300U/mL),每个条件下的每个滴度均做复孔。每孔加入稀释后的校准品15μL。

[0064] (4) 上机检测发光值,具体操作如下,将磁微粒包被抗体工作液、吡啶酯标记抗体工作液放入试剂船内,把CA724校准品放入样本架上。

[0065] (5) 通过全自动化学发光检测仪的全自动方式将50 μL的磁微粒包被抗体工作液和吡啶酯标记抗体工作液的加样到反应管中,再加入15 μL的样本共孵育15 min。

[0066] (6) 将孵育15 min的样液用自配清洗液进行洗脱。

[0067] (7) 最后加入先加入底物A再加入底物B,直接检测发光值。

[0068] 相关试剂准备:

[0069] 其中校准品稀释液、底物液A、底物液B的配方及配制方法如下:

[0070] a1 .校准品稀释液的标准配方:按照1000 mL基准量计,Tris 12.11 g,浓盐酸3.2 mL,氯化钠9 g,牛血清白蛋白5 g,Proclin-300 0.5 mL,蔗糖5 g,体外诊断试剂用纯化水定容至1000 mL。

[0071] a2 .校准品稀释液的配制方法:

[0072] 配制桶中加体外诊断试剂用纯化水800 mL,依次称取氯化钠和Tris加入到配制桶中,匀速搅拌使其充分溶解,再加入浓盐酸,再加入牛血清白蛋白、蔗糖和Proclin-300,匀速搅拌使其充分混匀,用体外诊断试剂用纯化水定容至1000 mL,置于2℃保存备用。

[0073] b1 .底物液A的标准配方:按照1000 mL基准量计,浓硝酸3.45 mL,双氧水16.45 g。

[0074] b2 .底物液A的配制方法:

[0075] 配制桶中加入体外诊断试剂用纯化水800 mL,准确称取浓硝酸和双氧水,加入到配制桶中,搅拌充分溶解后定容至1000 mL,置于2℃保存备用。

[0076] c1 .底物液B的标准配方:按照1000 mL基准量计,曲拉通X-100 3.2 g,氢氧化钠12 g。

[0077] c2 .底物液B的配制方法:

[0078] 配制桶中加入体外诊断试剂用纯化水800 mL,准确称取曲拉通X-100、氢氧化钠,加入到配制桶中,匀速搅拌,充分溶解后定容至1000 mL,2℃避光保存备用。

[0079] c4. 自配清洗液的配制配方:按照10 L基准量计,磷酸氢二钠40 g,磷酸二氢钠229.9 g,氯化钠1800 g,吐温20 100 mL,Proclin-300 10 mL。

[0080] 洗液的配制方法:

[0081] 配制桶中加入体外诊断试剂用纯化水8 L,准确称取磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠、吐温20和Proclin300,加入到配制桶中,匀速搅拌,充分溶解后定容至10L,2℃避光保存备用。

[0082] 2. 实验结果

[0083] 实施例1~3及对比例1的吡啶酯标记稀释液热稳定性选择实验结果见表2-7。

[0084] 表2 实施例1的加速稳定性选择实验结果

加速时间	0天	3天	3天降解率	7天	7天降解率
0U/mL	0.24	0.23	-	0.22	-
0.48U/mL	1.02	0.99	-3%	0.98	-4%
2.4U/mL	4.61	4.47	-3%	4.36	-5%
12U/mL	16.27	15.98	-2%	15.56	-4%
60U/mL	46.47	45.67	-2%	44.93	-3%
300U/mL	390.53	374.64	-4%	369.64	-5%
线性相关系数	0.9926	0.9931	-	0.993	-
斜率	1.3063	1.2524	-	1.236	-

[0085]

[0086] 表3 实施例2的加速稳定性选择实验结果

加速时间	0天	3天	3天降解率	7天	7天降解率
0U/mL	0.25	0.23	-	0.22	-
0.48U/mL	1.04	1.01	-3%	0.97	-7%
2.4U/mL	4.57	4.34	-5%	4.22	-8%
12U/mL	16.27	15.55	-4%	15.11	-7%
60U/mL	46.41	44.22	-5%	42.98	-7%
300U/mL	386.53	369.64	-4%	367.64	-5%
线性相关系数	0.9928	0.9927	-	0.9923	-
斜率	1.2926	1.2362	-	1.2302	-

[0087]

[0088] 表4 实施例3的加速稳定性选择实验结果

加速时间	0天	3天	3天降解率	7天	7天降解率
0U/mL	0.26	0.25	-	0.24	-
0.48U/mL	1.06	1.02	-4%	0.98	-8%
2.4U/mL	4.64	4.43	-5%	4.31	-7%
12U/mL	16.37	15.32	-6%	15.24	-7%
60U/mL	46.84	44.69	-5%	43.68	-7%
300U/mL	392.62	373.32	-5%	361.64	-8%
线性相关系数	0.9927	0.9928	-	0.9929	-
斜率	1.3132	1.2488	-	1.2092	-

[0089]

[0090] 表5 对比例1的加速稳定性选择实验结果

[0091]

加速时间	0天	3天	3天降解率	7天	7天降解率
0U/mL	0.25	0.23	-	0.22	-
0.48U/mL	1.02	0.92	-10%	0.87	-15%
2.4U/mL	4.69	4.43	-6%	4.23	-10%
12U/mL	17.98	16.12	-10%	15.45	-14%
60U/mL	55.98	48.12	-14%	42.98	-23%
300U/mL	456.79	421.79	-8%	381.64	-16%
线性相关系数	0.9934	0.9932	-	0.9916	-
斜率	1.5295	1.4135	-	1.278	-

[0092] 表6 对比例2的加速稳定性选择实验结果

[0093]

加速时间	0天	3天	3天降解率	7天	7天降解率
0U/mL	0.26	0.24	-	0.22	-
0.48U/mL	1.06	1.01	-5%	0.98	-8%
2.4U/mL	4.78	4.43	-7%	4.34	-9%
12U/mL	16.43	15.56	-5%	14.56	-11%
60U/mL	46.56	44.56	-4%	41.98	-10%
300U/mL	391.62	376.62	-4%	354.64	-9%
线性相关系数	0.9926	0.9925	-	0.9925	-
斜率	1.3096	1.2599	-	1.1862	-

[0094] 表7 对比例3的加速稳定性选择实验结果

[0095]

加速时间	0天	3天	3天降解率	7天	7天降解率
0U/mL	0.27	0.23	-	0.21	-
0.48U/mL	1.05	1.02	-3%	0.96	-9%
2.4U/mL	4.73	4.39	-7%	4.31	-9%
12U/mL	16.56	15.32	-7%	14.87	-10%
60U/mL	46.67	44.45	-5%	41.87	-10%
300U/mL	391.45	376.23	-4%	354.78	-9%
线性相关系数	0.9926	0.9925	-	0.9924	-
斜率	1.3089	1.2589	-	1.1865	-

[0096] 从表2-7中数据可以看出,本发明的配方及制备方法制得的吡啶酯标记抗体稀释液对抗体的保护效果更好。对比例1制备的吡啶酯标记抗体稀释液配制成的标记抗体工作液各浓度点于37℃加速时,仅能保证3天降解率低于15%,而在放置7天后的降解率竟高达

23%；对比例2制备的吡啶酯标记抗体稀释液配制成的标记抗体工作液各浓度点于37℃加速时，仅能保证3天降解率低于7%，而在放置7天后的降解率达到11%；对比例3制备的吡啶酯标记抗体稀释液配制成的标记抗体工作液各浓度点于37℃加速时，仅能保证3天降解率低于7%，而在放置7天后的降解率达到10%；而经本发明实施例1~3制备的吡啶酯标记稀释液配制成的吡啶酯标记抗体工作液各浓度点于37℃放置7天后的降解率仍低于10%，能够达到加速稳定性要求，且各浓度点约定的标准曲线线性相关系数也能满足要求，因此本发明实施例1~3制备的吡啶酯标记抗体稀释液的保护效果更好。其中，实施例1采用的原料配比和制备方法是本发明相对更优的技术方案，制得的吡啶酯标记抗体稀释液对标记抗体的保护效果更好，灵敏度更高。

[0097] 二、实时稳定性选择实验

[0098] 1. 实验步骤

[0099] (1) 分别用上述实施例1~3及对比例1~3制备的吡啶酯标记稀释液稀释标记抗体至规定浓度，将稀释后的吡啶酯标记抗体工作液置于2-8℃分别放置1个月、3个月、6个月、12个月、13个月后备用。

[0100] (2) 取已制备好的磁微粒包被抗体工作液。

[0101] (3) 用校准品稀释液稀释后的CA724校准品(0、0.48、2.4、12、60、300 U/mL)，每个条件下的每个滴度均做复孔。每孔加入稀释后的校准品15 μL。

[0102] (4) 上机检测发光值，具体操作如下，将磁微粒包被抗体工作液、吡啶酯标记抗体工作液放入试剂船内，把CA724校准品放入样本架上。

[0103] (5) 通过全自动化学发光检测仪的全自动方式将50 μL的磁微粒包被抗体工作液和吡啶酯标记抗体工作液的加样到反应管中，再加入15 μL的样本共孵育15 min。

[0104] (6) 将孵育15 min的样液用自配清洗液进行洗脱。

[0105] (7) 最后加入先加入底物A再加入底物B，检测发光值。

[0106] 其中校准品稀释液、底物液A、底物液B和自配清洗液的配方及配制方法同前述的加速稳定性选择实验。

[0107] 2. 实验结果

[0108] 实施例1~3及对比例1~3制备的吡啶酯标记稀释液的实时稳定性选择实验见表8-13。

[0109] 表8 实施例1的实时稳定性选择实验结果

[0110]

加速时间	0天	1个月	1个月降解率	3个月	3个月降解率	6个月	6个月降解率	12个月	12个月降解率	13个月	13个月降解率
0U/mL	0.25	0.23	-	0.22	-	0.21	-	0.20	-	0.20	-
0.48U/mL	1.04	1.03	-1%	1.02	-2%	1.01	-3%	0.99	-5%	0.99	-5%
2.4U/mL	4.63	4.59	-1%	4.56	-2%	4.52	-2%	4.49	-3%	4.45	-4%
12U/mL	17.87	17.67	-1%	17.45	-2%	17.32	-3%	17.12	-4%	16.98	-5%
60U/mL	50.21	49.89	-1%	49.78	-1%	49.45	-2%	49.24	-2%	49.12	-2%
300U/mL	393.63	386.76	-2%	381.93	-3%	377.25	-4%	373.78	-5%	372.78	-5%
线性相关系数	0.9939	0.9941	-	0.9943	-	0.9944	-	0.9945	-	0.9945	-
斜率	1.3145	1.2912	-	1.275	-	1.2592	-	1.2476	-	1.2433	-

[0111] 表9 实施例2的实时稳定性选择实验结果

[0112]

加速时间	0天	1个月	一个月降解率	3个月	3个月降解率	6个月	6个月降解率	12个月	12个月降解率	13个月	13个月降解率
0U/mL	0.24	0.23	-	0.22	-	0.21	-	0.21	-	0.21	-
0.48U/mL	1.06	1.03	-3%	1.02	-4%	1.01	-5%	0.99	-7%	0.98	-8%
2.4U/mL	4.74	4.69	-1%	4.63	-2%	4.59	-3%	4.52	-5%	4.47	-6%
12U/mL	17.86	17.34	-3%	17.01	-5%	16.78	-6%	16.56	-7%	16.44	-8%
60U/mL	50.78	49.69	-2%	49.22	-3%	48.78	-4%	47.34	-7%	47.01	-7%
300U/mL	394.61	388.71	-1%	378.98	-4%	373.24	-5%	369.79	-6%	365.78	-7%
线性相关系数	0.994	0.9939	-	0.9942	-	0.9944	-	0.994	-	0.994	-
斜率	1.3176	1.2982	-	1.2653	-	1.246	-	1.2348	-	1.2213	-

[0113] 表10 实施例3的实时稳定性选择实验结果

[0114]

加速时间	0天	1个月	一个月降解率	3个月	3个月降解率	6个月	6个月降解率	12个月	12个月降解率	13个月	13个月降解率
0U/mL	0.26	0.24	-	0.23	-	0.21	-	0.20	-	0.20	-
0.48U/mL	1.05	1.04	-1%	1.02	-3%	1.01	-4%	0.99	-6%	0.97	-8%
2.4U/mL	4.71	4.61	-2%	4.58	-3%	4.52	-4%	4.48	-5%	4.35	-8%
12U/mL	17.76	16.98	-4%	16.87	-5%	16.67	-6%	16.45	-7%	16.32	-8%
60U/mL	50.67	49.34	-3%	48.67	-4%	48.23	-5%	47.98	-5%	47.34	-7%
300U/mL	396.56	384.79	-3%	379.94	-4%	376.12	-5%	372.79	-6%	369.78	-7%
线性相关系数	0.9939	0.994	-	0.994	-	0.994	-	0.9941	-	0.994	-
斜率	1.3244	1.2852	-	1.2689	-	1.2562	-	1.2451	-	1.2352	-

[0115] 表11 对比例1的实时稳定性选择实验结果

[0116]

加速时间	0天	1个月	一个月降解率	3个月	3个月降解率	6个月	6个月降解率	12个月	12个月降解率	13个月	13个月降解率
0U/mL	0.26	0.25	-	0.23	-	0.22	-	0.22	-	0.21	-
0.48U/mL	1.09	1	-8%	0.98	-10%	0.96	-12%	0.95	-13%	0.94	-14%
2.4U/mL	4.98	4.54	-9%	4.45	-11%	4.34	-13%	4.31	-13%	4.24	-15%
12U/mL	18.76	16.98	-9%	16.56	-12%	16.39	-13%	16.2	-14%	16.1	-14%
60U/mL	52.03	45.87	-12%	45.34	-13%	45.24	-13%	45.01	-13%	44.89	-14%
300U/mL	434.56	418.79	-4%	403.94	-7%	395.12	-9%	390.79	-10%	384.79	-11%
线性相关系数	0.9927	0.991	-	0.9915	-	0.9919	-	0.992	-	0.9922	-
斜率	1.4531	1.4027	-	1.3524	-	1.3225	-	1.308	-	1.2876	-

[0117] 表12 对比例2的实时稳定性选择实验结果

[0118]

加速时间	0天	1个月	一个月降解率	3个月	3个月降解率	6个月	6个月降解率	12个月	12个月降解率	13个月	13个月降解率
0U/mL	0.26	0.24	-	0.23	-	0.21	-	0.2	-	0.2	-
0.48U/mL	1.04	1.01	-3%	0.99	-5%	0.97	-7%	0.96	-8%	0.92	-12%
2.4U/mL	4.74	4.62	-3%	4.56	-4%	4.53	-4%	4.42	-7%	4.3	-9%
12U/mL	17.78	16.87	-5%	16.45	-7%	16.31	-8%	16.21	-9%	15.78	-11%
60U/mL	50.68	49.54	-2%	48.34	-5%	47.45	-6%	46.67	-8%	44.87	-11%
300U/mL	396.23	385.34	-3%	376.94	-5%	372.45	-6%	368.79	-7%	364.78	-8%
线性相关系数	0.9939	0.9941	-	0.9941	-	0.9939	-	0.9938	-	0.9938	-
斜率	1.3232	1.2872	-	1.2592	-	1.2442	-	1.232	-	1.2193	-

[0119] 表13 对比例3的实时稳定性选择实验结果

[0120]

加速时间	0天	1个月	一个月降解率	3个月	3个月降解率	6个月	6个月降解率	12个月	12个月降解率	13个月	13个月降解率
0U/mL	0.26	0.25	-	0.23	-	0.21	-	0.18	-	0.19	-
0.48U/mL	1.07	1.04	-3%	1.02	-5%	1.01	-6%	0.98	-8%	0.96	-10%
2.4U/mL	4.76	4.64	-3%	4.52	-5%	4.49	-6%	4.41	-7%	4.21	-12%
12U/mL	17.76	16.76	-6%	16.56	-7%	16.21	-9%	16.15	-9%	15.67	-12%
60U/mL	50.75	49.42	-3%	48.67	-4%	47.86	-6%	46.23	-9%	45.46	-10%
300U/mL	396.34	385.13	-3%	376.45	-5%	372.21	-6%	368.45	-7%	356.86	-10%
线性相关系数	0.9940	0.9941	-	0.9941	-	0.9941	-	0.9936	-	0.9939	-
斜率	1.3236	1.2866	-	1.2573	-	1.2434	-	1.231	-	1.1922	-

[0121] 从表8-13中数据可以看出,本发明的配方及制备方法制得的吡啶酯标记稀释液对标记抗体的保护效果更好。对比例1制备的吡啶酯标记稀释液配制成的吡啶酯标记抗体工作液各浓度点于2-8℃放置时,仅能保证一年内的降解率在15%以内;对比例2制备的吡啶酯标记稀释液配制成的吡啶酯标记抗体工作液各浓度点于2-8℃放置时,仅能保证一年内的降解率在12%以内;对比例3制备的吡啶酯标记稀释液配制成的吡啶酯标记抗体工作液各浓度点于2-8℃放置时,仅能保证一年内的降解率在12%以内;而经本发明实施例1~3制备的吡啶酯标记稀释液配制成的吡啶酯标记抗体工作液各浓度点于2-8℃放置一年内的降解率仍低于8%,能够达到加速稳定性要求,且各浓度点约定的标准曲线线性相关系数也能满足要求。本发明的吡啶酯标记稀释液有效期为一年,过有效期后的降解率还可以保持在8%以内,因此本发明实施例1~3制备的吡啶酯标记稀释液作为稀释标记抗体的稀释液效果更好。其中,实施例1采用的原料配比和制备方法是本发明相对更优的技术方案,制得的吡啶酯标记稀释液对标记抗体的保护效果更好。

[0122] 三、灵敏度验证实验

[0123] 1. 实验步骤

[0124] (1) 分别用上述实施例1、实施例2、对比例1、对比例2、对比例3制备的吡啶酯标记稀释液稀释标记抗体至规定浓度。

[0125] (2) 取已制备好的磁微粒包被抗体工作液。

[0126] (3) 用校准品稀释液充当空白样本,每个滴度均做复孔,每孔加入稀释后的校准品15 μL 。

[0127] (4) 上机检测发光值,具体操作如下,将磁微粒包被抗体工作液、吡啶酯标记抗体工作液放入试剂船内,把CA724校准品放入样本架上。

[0128] (5) 通过全自动化学发光检测仪的全自动方式将50 μL 的磁微粒包被抗体工作液和吡啶酯标记抗体工作液的加样到反应管中,再加入15 μL 的样本共孵育15 min。

[0129] (6) 将孵育15 min的样液用自配清洗液进行洗脱。

[0130] (7) 最后加入先加入底物A再加入底物B,检测发光值。

[0131] 其中校准品稀释液、底物液A、底物液B和自配清洗液的配方及配制方法同前述的加速稳定性选择实验。

[0132] 2. 实验结果

[0133] 分别用上述实施例1、实施例2、对比例1、对比例2、对比例3制备的吡啶酯标记稀释液的灵敏度结果见下表14。

[0134] 表14 灵敏度实验结果

[0135]

实验组	S0 发光值 (RLU)					\bar{x}	SD	AVE+2*SD	浓度值 (U/mL)
实施例 1	245	239	244	245	243	239.11	5.62	250.36	0.14
	234	236	234	246	232				
	235	237	238	234	232				
	242	249	230	244	244				
实施例 2	236	231	248	246	242	238.33	6.14	250.62	0.16
	247	232	234	243	232				
	233	241	231	235	238				
	231	240	235	244	248				
对比例 1	465	468	479	478	466	470.72	5.83	482.39	0.35
	468	467	467	476	475				
	476	469	462	465	475				
	476	474	471	478	461				
对比例 2	369	364	376	363	371	370.59	5.28	381.15	0.25
	370	369	376	372	364				
	373	378	376	365	365				
	378	372	363	372	378				
对比例 3	363	378	369	378	362	370.53	6.66	383.84	0.26
	376	377	365	379	360				
	369	367	363	366	380				
	365	375	374	367	379				

[0136] 从表14可以看出,五组实验的最低检出量分别为0.14U/mL、0.16U/mL、0.35U/mL、0.25U/mL和0.26U/mL,均不高于0.35U/mL,可以满足试剂盒设计和应用的要求,但实施例1检出量更低,灵敏度更高,优势更加明显。

[0137] 四、重复性验证实验

[0138] 1. 实验步骤

[0139] (1) 分别用上述实施例1、实施例2、对比例1、对比例2、对比例3制备的吡啶酯标记稀释液稀释标记抗体至规定浓度。

[0140] (2) 取已制备好的磁微粒包被抗体工作液。

[0141] (3) 用校准品稀释液稀释后的CA724校准品(10、100 U/mL),每个条件下的每个滴度均做10孔。每孔加入稀释后的校准品15 μ L。

[0142] (4) 上机检测发光值,具体操作如下,将磁微粒包被抗体工作液、吡啶酯标记抗体工作液放入试剂船内,把CA724校准品放入样本架上。

[0143] (5) 通过全自动化学发光检测仪的全自动方式将50 μ L的磁微粒包被抗体工作液和吡啶酯标记抗体工作液的加样到反应管中,再加入15 μ L的样本共孵育15 min。

[0144] (6) 将孵育15 min的样液用自配清洗液进行洗脱。

[0145] (7) 最后加入先加入底物A再加入底物B,检测发光值。

[0146] 其中校准品稀释液、底物液A、底物液B和自配清洗液的配方及配制方法同前述的加速稳定性选择实验。

[0147] 2. 实验结果

[0148] 分别用上述实施例1、实施例2、对比例1、对比例2、对比例3制备的吡啶酯标记稀释液的灵敏度结果见下表15。

[0149] 表15 重复性实验结果

[0150]

实验组	重复性 (10U/mL)					重复性 (100U/mL)				
	实施例1	实施例2	对比例1	对比例2	对比例3	实施例1	实施例2	对比例1	对比例2	对比例3
测值 1	10.11	10.67	9.63	10.58	10.49	108.86	109.35	115.09	103.59	103.18
测值 2	10.60	9.97	11.47	9.38	9.33	102.83	101.87	126.82	119.17	115.29
测值 3	10.58	9.78	11.22	9.60	10.99	108.43	100.37	122.93	112.44	117.38
测值 4	10.18	9.43	10.12	9.66	9.04	101.98	102.69	100.77	101.86	118.07
测值 5	10.58	9.77	10.01	9.50	10.22	102.17	103.93	120.99	100.67	107.18
测值 6	9.90	10.58	11.49	10.97	11.00	104.15	102.52	100.46	118.19	113.21
测值 7	10.59	9.78	11.50	10.37	10.89	108.58	108.68	126.15	100.62	117.48
测值 8	10.78	9.19	9.26	9.34	9.35	102.73	106.19	117.70	102.24	100.03
测值 9	10.81	10.52	11.17	9.36	9.90	108.95	105.93	107.33	116.06	101.90
测值 10	9.78	10.00	10.77	10.39	9.61	109.29	108.80	102.45	113.03	114.42
批内均	10.39	9.97	10.66	9.91	10.08	105.79	105.03	114.07	116.40	108.86
批内	3.55%	4.92%	7.88%	6.07%	7.36%	3.07%	3.06%	9.20%	6.60%	6.47%

[0151] 从表15可以得知,用五组试剂盒分别检测浓度在10U/mL和100U/mL的重复性,在10U/mL的浓度下,实施例1的CV为3.55%,实施例2的CV为4.92%,对比例1的CV为7.88%,对比例2的CV为6.07%,对比例3的CV为7.36%;在100U/mL的浓度下,实施例1的CV为3.07%,实施例2的CV为3.06%,对比例1的CV为9.20%对比例2的CV为6.60%,对比例1的CV为6.47%。可以看出,实施例1与实施例2的重复性更好,优势更加明显。

[0152] 经过上述对于加速稳定性、实时稳定性、灵敏度和重复性的比对验证,可以看出发明制备的吡啶酯抗体标记稀释液稳定性好,灵敏度高,重复性好。

[0153] 以上所述的实施例仅是对本发明的优选方式进行描述,并非对本发明的范围进行限定,在不脱离本发明设计精神的前提下,本领域普通技术人员对本发明的技术方案做出的各种变形和改进,均应落入本发明权利要求书确定的保护范围内。