



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104614537 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 13

(21) 申请号 201510069643. 6

(22) 申请日 2015. 02. 10

(71) 申请人 深圳市新产业生物医学工程股份有限公司

地址 518122 广东省深圳市坪山新区金沙社区金辉路 16 号

(72) 发明人 饶微 高莉 杜凯 李钦 徐红  
罗凯 李婷华 袁锦云

(74) 专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限公司 11372

代理人 钟日红 刘烽

(51) Int. Cl.

G01N 33/74(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

权利要求书2页 说明书18页

(54) 发明名称

血管紧张素 II 检测试剂盒及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及一种用于检测血管紧张素 II 的化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法, 所述试剂盒包括组分 A 和组分 B, 所述组分 A 为血管紧张素 II 抗原或血管紧张素 II 抗原与蛋白载体的连接物, 组分 B 为和抗血管紧张素 II 抗体, 所述组分 A 和组分 B 中的一种标记示踪标记物, 另一种包被磁球。本发明进一步涉及一种使用该试剂盒来检测血管紧张素 II 浓度的方法。根据本发明, 使用所提供的试剂盒测定血管紧张素 II 的浓度, 能够获得高的检测灵敏度和准确性。

1. 一种用于检测血管紧张素 II 的化学发光免疫检测试剂盒, 所述试剂盒包括组分 A 和组分 B, 所述组分 A 为血管紧张素 II 抗原或血管紧张素 II 抗原与蛋白载体的连接物, 组分 B 为抗血管紧张素 II 抗体, 所述组分 A 和组分 B 中的一种标记示踪标记物, 另一种包被磁球。

2. 根据权利要求 1 所述试剂盒, 其特征在于, 所述蛋白载体选自牛血清白蛋白、人血清白蛋白、兔血清白蛋白、血蓝蛋白、牛 IgG、人 IgG、卵清蛋白、肌红蛋白和甲状腺球蛋白中的至少一种。

3. 根据权利要求 1 所述试剂盒, 其特征在于, 所述示踪标记物选自金刚烷、鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物、吖啶酯、碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶中的至少一种。

4. 根据权利要求 1 所述试剂盒, 其特征在于, 所述示踪标记物为 N-(4-氨基)-N-乙基异鲁米诺。

5. 根据权利要求 1 所述的试剂盒, 其特征在于, 所述磁球为  $Fe_2O_3$  或  $Fe_3O_4$  磁性纳米粒子与有机高分子材料的复合物, 并具有 0.1-5  $\mu m$  的粒径; 并且, 所述磁球任选地通过表面改性而带有多种活性功能基团。

6. 根据权利要求 1 所述的试剂盒, 其特征在于, 在所述试剂盒中, 血管紧张素 II 抗原或血管紧张素 II 抗原与蛋白载体的连接物浓度为 0.002-0.01mg/ml; 抗血管紧张素 II 抗体浓度为 0.05-1mg/ml; 磁球浓度为 0.05-1mg/ml; 示踪标记物浓度为 0.2-1mg/l。

7. 根据权利要求 1 所述的试剂盒, 其特征在于,

所述示踪标记物直接或间接标记组分 A 或组分 B, 所述间接标记的方式包括通过异硫氰酸荧光素与抗异硫氰酸荧光素抗体体系或链霉亲和素与生物素体系间接标记组分 A 或组分 B;

组分 A 或组分 B 直接或间接包被磁球, 所述间接包被的方式通过异硫氰酸荧光素与抗异硫氰酸荧光素抗体体系或链霉亲和素与生物素体系间接包被磁球。

8. 根据权利要求 7 所述的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒包括选自组分 A1 和组分 A2 中的任意一种的组分, 以及选自组分 B1、组分 B2 和组分 B3 中的任意一种的组分; 其中

组分 A1 为 N-(4-氨基)-N-乙基异鲁米诺直接标记的血管紧张素 II 抗原;

组分 A2 为链霉亲和素标记的 N-(4-氨基)-N-乙基异鲁米诺和生物素化的血管紧张素 II 抗原;

组分 B1 为抗血管紧张素 II 抗体直接包被的磁球;

组分 B2 为生物素化的抗血管紧张素 II 抗体和链霉亲和素包被的磁球; 以及

组分 B3 为抗血管紧张素 II 抗体标记的异硫氰酸荧光素和羊抗异硫氰酸荧光素抗体包被的磁球。

9. 根据权利要求 7 所述的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒包括选自组分 C1 和组分 C2 中的任意一种的组分, 以及选自组分 D1、组分 D2 和组分 D3 中的任意一种的组分; 其中

组分 C1 为 N-(4-氨基)-N-乙基异鲁米诺直接标记的抗血管紧张素 II 抗体;

组分 C2 为链霉亲和素标记的 N-(4-氨基)-N-乙基异鲁米诺和生物素化的抗血管紧张素 II 抗体;

组分 D1 为血管紧张素 II 抗原直接包被的磁球;

组分 D2 为生物素化的血管紧张素 II 抗原和链霉亲和素包被的磁球; 以及

组分 D3 为血管紧张素 II 抗原标记的异硫氰酸荧光素和羊抗异硫氰酸荧光素抗体包被

的磁球。

10. 根据权利要求 1-9 中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括血管紧张素 II 抗原的低点校准品和高点校准品,并任选地包括缓冲液。

11. 一种用于制备如权利要求 1-10 中任意一项所述的试剂盒的方法,所述方法包括:将组分 A 或组分 B 中的一种直接或间接标记示踪标记物,将另一种直接或间接包被磁球。

12. 根据权利要求 11 所述的方法,其特征在于,

所述间接标记包括将示踪标记物通过异硫氰酸荧光素与抗异硫氰酸荧光素抗体体系或链霉亲和素与生物素体系标记所述组分 A 或组分 B;

所述间接包被包括将所述组分 A 或组分 B 通过异硫氰酸荧光素与抗异硫氰酸荧光素抗体体系或链霉亲和素与生物素体系间接包被磁球。

13. 一种检测血管紧张素 II 浓度的方法,其特征在于,所述方法包括使用如权利要求 1-10 中任意一项所述的试剂盒,通过化学发光免疫法对待测样品中的血管紧张素 II 浓度进行检测。

14. 根据权利要求 13 所述的方法,其特征在于,所述方法包括使用如权利要求 1-8 中任意一项所述的试剂盒,通过化学发光免疫分析仪检测血管紧张素 II 浓度。

## 血管紧张素 II 检测试剂盒及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测试剂盒,具体涉及一种用于检测血管紧张素 II 的化学发光免疫检测试剂盒。本发明还涉及该试剂盒的制备方法,以及使用该试剂盒来检测血管紧张素 II 浓度的方法。

### 背景技术

[0002] 血管紧张素 II (A II) 是经血管紧张素转化酶 (Angiotensin0Converting Emzyme, ACE) 剪切 C- 末端两个氨基酸残基形成,是一种 8 肽物质。

[0003] 肾素 - 血管紧张素 - 醛固酮系统 (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) 是一个激素系统,当大量失血或血压下降时,肾脏分泌肾素,肾素催化血管紧张素原水解产生血管紧张素 I (A I),A I 基本没有生物学活性。A II 具有高效的收缩血管作用,从而使血压升高。A II 也能刺激肾上腺皮质分泌醛固酮,醛固酮能促进肾脏对水和钠离子的重吸收,继而增加体液容量,升高血压。

[0004] 目前,临床上测定 A II 的方法主要有放射性免疫法、酶联免疫法等。例如,北京北方生物技术研究所生产的碘 [<sup>125</sup>I] 血管紧张素 II 放射免疫分析药盒采用竞争法原理测定血浆中的 A II 含量。加入样本和兔抗 -A II 抗体 (蓝色) 及 <sup>125</sup>I-A II 标记物 (红色) 后,<sup>125</sup>I-A II 标记物与样本中的 A II 竞争结合兔抗 -A II 抗体,加入驴抗兔免疫分离剂,充分摇匀后,室温放置 15min,3000 转 / 分离心 15min,去上清,测沉淀管的放射性计数 (cpm)。样本中的 A II 浓度依据由校准品浓度和对应的放射性计数建立的 Log-Logit 数学模型进行定量,从而检测样本中的 A II 含量。

[0005] 然而,放射性免疫法及酶联免疫法存在诸多不足。例如,上述放射性免疫法存在放射性污染、标记物半衰期短、对操作者具有放射性损伤,且操作繁琐,耗时长,灵敏度低,检测范围窄,且不能实现全自动化的缺陷。传统的放射性免疫法或酶联免疫法方法检测时间长,同时主要依靠纯手工加样等系列繁琐操作,效率低,容易导致实验结果误差大;由于酶促反应不够彻底,且易受外部干扰因素影响,如温度、时间及材料浓度影响,因此检测时特异性低,灵敏度差,检测范围窄。因此,本领域亟需一种在灵敏度高的同时提高检测试剂的安全性和稳定性,操作更加简便,还能够借助分析仪器实现检测过程全自动化的检测 A II 的检测试剂盒。

### 发明内容

[0006] 为了解决上述现有技术中存在的问题,本发明的目的是提供一种用于检测 A II 的化学发光免疫检测试剂盒,以获得高的检测灵敏度和准确性,还能提高检测试剂的稳定性,延长检测试剂的保存时间。

[0007] 本发明还提供用于检测 A II 的化学发光免疫检测试剂盒的制备方法。

[0008] 另外,本发明还提供了根据本发明提供的 A II 化学发光免疫检测试剂盒的应用,尤其是采用所述试剂盒,通过全自动化学发光法进行 A II 检测的方法,减少操作时间,降低

人为操作误差,同时利用化学示踪标记物的特异性,提高检测灵敏度。

[0009] 根据本发明,提供了一种用于检测 A II 的化学发光免疫检测试剂盒,所述试剂盒包括组分 A 和组分 B,所述组分 A 为 A II 抗原或 A II 抗原与蛋白载体的连接物,组分 B 为抗 A II 抗体,所述组分 A 和组分 B 中的一种标记示踪标记物,另一种包被磁球。

[0010] 应理解,在本发明提供的上述试剂盒中,所述抗 A II 抗体可以是一种或多种抗 A II 单克隆抗体和 / 或抗 A II 多克隆抗体。实际上,在本发明中所提及的抗体都可以是单克隆抗体和 / 或多克隆抗体。

[0011] 本发明适用的蛋白载体可以选自本领域常用的蛋白载体中的至少一种。例如,所述蛋白载体选自牛血清白蛋白 (BSA)、人血清白蛋白 (HSA)、兔血清白蛋白 (RSA)、血蓝蛋白 (KLH)、牛 IgG、人 IgG、卵清蛋白 (OVA)、肌红蛋白和甲状腺球蛋白中的至少一种。

[0012] 根据本发明,所述示踪标记物可以选自本领域中常用于标记抗原或抗体的示踪标记物,例如选自金刚烷、鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物、吡啶酯、碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶中的至少一种,优选为 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 (ABEI)。

[0013] 根据本发明,所述示踪标记物直接标记或者间接标记 A II 抗原 (或其与蛋白载体的连接物) 或抗 A II 抗体。其中,间接标记包括但不限于通过异硫氰酸荧光素 (FITC) 与抗 FITC 抗体体系或链霉亲和素 (SA) 与生物素 (Biotin) 体系间接标记 A II 抗原 (或其与蛋白载体的连接物) 或抗 A II 抗体。所述“直接标记”是指示踪标记物直接与 A II 抗原 (或 A II 抗原与蛋白载体连接物) 或针对待测抗原的抗体连接进行标记;所述“间接标记”是指通过中间媒介链接体系使得示踪标记物标记 A II 抗原 (或其与蛋白载体的连接物) 或抗 A II 抗体,所述中间媒介链接体系包括但不限于 FITC 与抗 FITC 抗体体系或链霉亲和素与生物素体系。本发明人发现,间接标记有利于减弱空间效应,有利于信号的放大,使得检测更加灵敏。

[0014] 根据本发明,A II 抗原 (或其与蛋白载体的连接物) 或抗 A II 抗体直接包被磁球,或者通过 FITC 与抗 FITC 抗体体系或链霉亲和素与生物素体系间接包被磁球。所述“直接包被”是指利用 A II 抗原 (或其与蛋白载体的连接物) 或抗 A II 抗体直接对磁球进行包被;所述“间接包被”是指通过中间媒介链接体系,使得 A II 抗原 (或其与蛋白载体的连接物) 或抗 A II 抗体对磁球进行包被,所述中间媒介链接体系包括但不限于 FITC 与抗 FITC 抗体体系或链霉亲和素与生物素体系。同样,间接包被的优点在于,有利于减弱空间效应,有利于信号的放大,使得检测更加灵敏。

[0015] 适用于本发明的磁球也称为磁珠,可以是本领域中常用的磁性微球。优选的是,本发明使用的磁球,是将纳米级的  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  或  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性粒子和有机高分子材料进行复合,形成具有超顺磁性和极大量蛋白吸附容量的微米级的固相微球,具有在外加磁场作用下可迅速被磁化,在撤走磁场后剩磁为零的属性。其中,所述有机高分子材料的种类没有特别限制,可根据需要进行选择。

[0016] 本发明所使用的磁性微球应能满足直径为 0.1-5  $\mu\text{m}$ ,磁性微球还可以通过表面改性而带有多种活性功能基团,包括但不限于 -OH、-COOH、-NH<sub>2</sub>。

[0017] 在一个具体实施例中,所述磁球为  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  或  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米粒子与有机高分子材料的复合体,并具有 0.1-5  $\mu\text{m}$  的粒径;并且,所述磁球任选地通过表面改性而带有多种活性功能基团。

[0018] 根据本发明的一些实施方案,所述试剂盒包括选自组分 A1 和组分 A2 中的任意一种的组分,以及选自组分 B1、组分 B2 和组分 B3 中的任意一种的组分;其中,组分 A1 为 ABEI 直接标记的 A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物);组分 A2 为链霉亲和素标记的 ABEI 和生物素化的 A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物);组分 B1 为抗 A II 抗体直接包被的磁球;组分 B2 为生物素化的抗 A II 抗体和链霉亲和素包被的磁球;以及组分 B3 为抗 A II 抗体标记的 FITC 和抗 FITC 抗体包被的磁球。

[0019] 根据本发明的另一些实施方案,所述试剂盒包括选自组分 C1 和组分 C2 中的任意一种的组分,以及选自组分 D1、组分 D2 和组分 D3 中的任意一种的组分;其中,组分 C1 为 ABEI 直接标记的抗 A II 抗体;组分 C2 为链霉亲和素标记的 ABEI 和生物素化的抗 A II 抗体;组分 D1 为 A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物)直接包被的磁球;组分 D2 为生物素化的 A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物)和链霉亲和素包被的磁球;以及组分 D3 为 A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物)标记的 FITC 和抗 FITC 抗体包被的磁球。

[0020] 根据本发明,所述试剂盒还可以包括 A II 抗原的低点校准品和高点校准品,并任选地包括缓冲液。本发明所述低点校准品与高点校准品是两者相对而言,其中“低点校准品”,是指将 A II 抗原用 50%牛血清制品稀释成浓度为 10-60pg/ml 得到的校准品;而“高点校准品”是指将 A II 抗原用 50%牛血清制品稀释成浓度为 400-800pg/ml 得到的校准品。

[0021] 根据本发明提供的试剂盒,所包含的各成分浓度优选如下: AII 抗原或血管紧张素 II 抗原与蛋白载体的连接物为 0.002-0.01mg/ml;抗 AII 抗体为 0.05-1mg/ml;磁球为 0.05-1mg/ml;FITC 为 0.002-0.01mg/ml;抗 FITC 抗体为 0.05-1mg/ml;链霉亲和素为 0.05-1mg/ml;生物素为 0.002-0.01mg/ml;示踪标记物为 0.2-1mg/l;以及如果使用了蛋白载体,其浓度为 2-10mg/l。上述各成分的浓度均基于包含该成分的单独的试剂盒组分的量计。

[0022] 在本发明的一种实施方案中,在本发明的试剂盒中,在 A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物)上标记 ABEI,并用抗 A II 抗体包被磁球。

[0023] 例如,在本发明的一个具体的实施例中,所述试剂盒包括 A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物)标记的 ABEI、抗 A II 抗体包被的磁球、低点校准品和高点校准品。

[0024] 例如,在本发明的一个具体的实施例中,所述试剂盒包括 A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物)标记的 ABEI、生物素化的抗 A II 抗体、链霉亲和素包被的磁球、低点校准品和高点校准品。

[0025] 例如,在本发明的一个具体的实施例中,所述试剂盒包括 A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物)标记的 ABEI、抗 A II 抗体标记的 FITC、抗 FITC 多克隆抗体包被的磁球、低点校准品和高点校准品。

[0026] 例如,在本发明的一个具体的实施例中,所述试剂盒包括生物素化的 A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物)、链霉亲和素标记的 ABEI、抗 A II 抗体包被的磁球、低点校准品和高点校准品。

[0027] 在本发明的另一种实施方案中,在本发明的试剂盒中,在抗 A II 抗体上标记 ABEI,并用 A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物)包被磁球。

[0028] 例如,在本发明的一个具体的实施例中,所述试剂盒包括抗 A II 抗体标记的 ABEI、A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物)包被的磁球、低点校准品和高点校准品。

[0029] 例如,在本发明的一个具体的实施例中,所述试剂盒包括抗 A II 抗体标记的 ABEI、A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物)标记的 FITC、抗 FITC 多克隆抗体包被的磁球、低点校准品和高点校准品。

[0030] 例如,在本发明的一个具体的实施例中,所述试剂盒包括生物素化的抗 A II 抗体、链霉亲和素标记的 ABEI、A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物)包被的磁球、低点校准品和高点校准品。

[0031] 例如,在本发明的一个具体的实施例中,所述试剂盒包括抗 A II 抗体标记的 ABEI、生物素化的 A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物)、链霉亲和素包被的磁球、低点校准品和高点校准品。

[0032] 本发明还提供了一种用于制备如上所述的试剂盒的方法,包括:将组分 A(A II 抗原或其与蛋白载体的连接物)和组分 B(抗 A II 抗体)中的一种直接或间接标记示踪标记物,将另一种直接或间接包被磁球。

[0033] 根据本发明提供的方法,所述间接标记包括将示踪标记物通过异硫氰酸荧光素与抗异硫氰酸荧光素抗体体系或链霉亲和素与生物素体系标记所述 A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物)或抗 A II 抗体。

[0034] 根据本发明提供的方法,所述间接包被包括将所述 A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物)或抗 A II 抗体通过异硫氰酸荧光素与抗异硫氰酸荧光素抗体体系或链霉亲和素与生物素体系间接包被磁球。

[0035] 在一些具体实施方案中,用于制备所述试剂盒的方法包括以下步骤:i)A II 抗原标记步骤,利用示踪标记物直接或间接地标记 A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物);和 ii)抗 A II 抗体包被磁球步骤,将抗 A II 抗体直接或间接地包被磁球。

[0036] 在另一些具体实施方案中,用于制备所述试剂盒的方法包括以下步骤:i')抗 A II 抗体标记步骤,利用示踪标记物直接或间接地标记抗 A II 抗体;和 ii')A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物)包被磁球步骤,将 A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物)直接或间接地包被磁球。

[0037] 在一些实施方案,在步骤 i)中,将示踪标记物通过 FITC 与抗 FITC 抗体体系或链霉亲和素与生物素体系间接标记 A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物);和/或在步骤 ii)中,将抗 A II 抗体通过 FITC 与抗 FITC 抗体体系或链霉亲和素与生物素体系间接包被磁球。

[0038] 在一些实施方案,在步骤 i')中,将示踪标记物通过 FITC 与抗 FITC 抗体体系或链霉亲和素与生物素体系间接标记抗 A II 抗体;和/或在步骤 ii')中,将 A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物)通过 FITC 与抗 FITC 抗体体系或链霉亲和素与生物素体系间接包被磁球。

[0039] 根据本发明的试剂盒制备方法还可以包括低点校准品和高点校准品的配制,还可以进一步包括试剂盒的组装。

[0040] 根据本发明,还提供了一种检测 A II 浓度的方法,所述方法包括使用如上所述的试剂盒通过化学发光免疫法对待测样品中的 A II 浓度进行检测。

[0041] 在一个实施方案中,所述检测 A II 浓度的方法包括使用如上所述的试剂盒,通过化学发光免疫分析仪检测 A II 浓度。在本发明的一个优选的实施方案中,所述方法全自动地进行。根据本发明,所述化学发光免疫分析仪优选为 Maglumi 系列化学发光免疫分析仪

(深圳新产业生物医学工程股份有限公司生产)。

[0042] 具体地,针对 A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物)上标记示踪标记物,利用抗 A II 抗体包被磁球的情况,进行化学发光检测的检测步骤可以包括:1) 获取待测样本。待测样本可为直接得到的血清、血浆及全血,也可以是通过抽取人体血样进行分离得到,或经过酶抑制剂处理后的样本;2) 利用标记有示踪标记物的 A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物)和包被有抗 A II 抗体的磁球与待测样本混合后进行温育,得到反应产物;3) 清洗后上机检测化学发光信号,得到相应的光信号数据;4) 分析相应光信号数据,得到 A II 抗原含量。

[0043] 针对抗 A II 抗体上标记示踪标记物,利用 A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物)包被磁球的情况,进行化学发光检测的检测步骤可以包括:1) 获取待测样本。待测样本可为直接得到的血清、血浆及全血,也可以是通过抽取人体血样进行分离得到,或经过酶抑制剂处理后的样本;2) 将标记有示踪标记物的抗 A II 抗体和包被有 A II 抗原(或其与蛋白载体的连接物)的磁球与待测样本混合后进行温育,得到反应产物;3) 清洗后上机检测化学发光信号,得到相应的光信号数据;4) 分析相应光信号数据,得到 A II 含量。

[0044] 本发明的有益效果在于:

[0045] 1. 特异性高,灵敏度好,检测范围较宽。

[0046] 2. 操作更加简便易行,同时本发明的试剂盒能够与化学发光免疫分析仪(尤其是 Maglumi 系列化学发光免疫分析仪)配套使用,在样本测定过程中实现了全自动化,使得 A II 浓度的检测可以简单、方便、快速、批量地进行,同时保证检测的系统误差较小。

[0047] 3. 本发明通过化学发光免疫法来检测 A II,避免使用污染环境、危害人体健康的放射性标记物,更加安全,对环境友好;同时,本发明的标记物不仅安全,还很稳定,克服了放射性免疫法等现有技术方法中存在的标记物的半衰期短的问题。

## 具体实施方式

[0048] 以下结合非限制性实施例来对本发明作进一步的解释和说明。然而,需要注意的是,本发明的下列具体实施方式并不对本发明作出任何的限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0049] 以下实施例中:

[0050] A II 抗原:购自 Sigma 公司;

[0051] 抗 A II 抗体:购自 Biogenesis 公司;

[0052] 羊抗 FITC 多克隆抗体:购自美国 Jackson 公司;

[0053] FITC:购自上海纪宁实业有限公司;

[0054] 生物素、链霉亲和素:均购自美国 Biosources 公司;

[0055] ABEI:由深圳市新产业生物医学工程股份有限公司生产;

[0056] 磁性微球由深圳市新产业生物医学工程股份有限公司生产,80% 粒径分布为 1-5  $\mu\text{m}$ ,磁化强度为 4000 高斯时沉淀时间为 10-15 秒,BSA 为 30mg 时蛋白吸附浓度为 0.8mg-1.2mg;

[0057] Maglumi 2000 化学发光分析仪由深圳市新产业生物医学工程股份有限公司提供。

[0058] 实施例 1

[0059] (1) A II 抗原的标记, 具体步骤如下:

[0060] 透析液 (F 溶液) 的配制: 在 5000ml 容器中加入  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  14.31g 和  $\text{NaHCO}_3$  26.46g, 加纯化水稀释至 4500ml, 将配制好的 F 溶液置于磁力搅拌器上备用。

[0061] 选用合适截留量 (常用分子量 14000) 的透析袋, 量取足够容纳 F 溶液的尺寸, 润湿后扎紧一端, 纯化水试漏 3 次 (需无漏液)。

[0062] 取 100  $\mu\text{g}$  A II 抗原用 0.1mol/L pH9.5 的碳酸缓冲液 (F 溶液) 调整到 1ml。放入透析液中, 室温搅拌透析 2 小时, 将透析好的溶液加入 300  $\mu\text{g}$  ABEI 活化酯, 37°C 反应 2 小时。

[0063] 通过 G-25 凝胶柱纯化 A II 抗原与 ABEI 的连接产物。

[0064]  $\text{D}_2$  溶液的配制: 在 2000ml 烧杯中加入 200ml 的 0.5M 磷酸盐缓冲液 (P001 溶液)、20g BSA、8g  $\text{NaN}_3$ 、2g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、600ml 甘油, 加纯化水稀释到 2000ml, 过滤。

[0065] 将纯化好的连接产物用  $\text{D}_2$  溶液对倍稀释, 即得到标记有 ABEI 的 A II 抗原。

[0066] (2) 抗 A II 抗体包被磁球, 具体步骤如下:

[0067] A 溶液的配制: 称取 2.55g 三水合乙酸钠放入 5000ml 烧杯中, 用量筒量取 4500ml 纯化水倒入烧杯, 待溶解后再加入 14ml 乙酸混匀后, 加纯化水稀释至 5000ml (pH 为 3.6)。

[0068] 向小白瓶中加入 5 倍于包被体积的 A 溶液, 放入超声波仪器中一边超声一边搅拌清洗 2-3 分钟, 然后置于磁铁上, 待上清液清亮后, 倒出上清液。该步骤重复三次。

[0069] 将粒径为 1  $\mu\text{m}$  磁球加入与包被体积等量的 pH3.6 醋酸缓冲液中, 使磁球的悬浮浓度为 20mg/ml, 再加入 CMC (浓度为 10mg/ml), 加入纯化的抗 A II 抗体

[0070] 将磁球悬浮液放入恒温震荡水浴箱中 37°C 反应 24 小时 (震荡水浴锅振摇速度: 260rpm)。

[0071] 以 P001: 纯化水 = 1:9 体积比率配制 pH7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 500ml 加入 2.5g BSA 混匀混匀溶解, 即为磁球清洗液。

[0072] 将温浴好的磁球悬浮液倒入烧杯中, 然后置于磁铁上沉淀后, 倒掉上清, 加入 5 倍体积的磁球清洗液搅拌清洗, 然后放置在磁铁上, 待上清液清亮后倒掉上清液, 重复该清洗步骤四次。

[0073] C 溶液配制: 称取 MC (甲基纤维素) 160g 倒入 5000ml 烧杯中, 加纯化水至 4000ml, 至于 90°C 的水浴箱中加热搅溶 2 小时。另取 4000ml 0.5M 磷酸盐缓冲液, 加入 80g  $\text{NaN}_3$  (分析纯), 80ml 吐温 -20 (分析纯), 混匀, 过滤。将此两份溶液充分混匀后加入 200g BSA, 加水至 40000ml。

[0074] 将清洗完毕后的磁球悬浮于 C 溶液中, 悬浮浓度为 20mg/ml, 即得到抗 A II 抗体包被的磁球, 此悬浮液体积即为本步骤所述包被体积。

[0075] 将上述磁球悬浮液进一步稀释至以磁球计为 0.1mg/ml 的悬浮液, 备用。

[0076] (3) A II 低点校准品、高点校准品的制备

[0077] 将 A II 抗原用 50% 牛血清制品按不同比例稀释成浓度分别为 613.238pg/ml 及 32.614pg/ml 的两个高、低校准品定标点。

[0078] (4) 组装

[0079] 将上述试剂成分分装后组装成试剂盒, 储存于 2 ~ 8°C。

[0080] 实施例 2

[0081] (1) A II 抗原的标记, 具体步骤如下:

[0082] 透析液 (F 溶液) 的配制: 在 5000ml 容器中加入  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  14.31g,  $\text{NaHCO}_3$  26.46g, 加纯化水稀释至 4500ml。配制好的 F 溶液置于磁力搅拌器上备用。

[0083] 选用合适截留量 (常用分子量 14000) 的透析袋, 量取足够容纳 F 溶液的尺寸, 润湿后扎紧一端, 纯化水试漏 3 次 (需无漏液)。

[0084] 取 100  $\mu\text{g}$  A II 抗原用 0.1mol/L pH9.5 的碳酸缓冲液 (F 溶液) 调整到 1ml。放入透析液中, 室温搅拌透析 2 小时, 将透析好的溶液加入 300  $\mu\text{g}$  ABEI 活化酯, 37 $^\circ\text{C}$  反应 2 小时。

[0085] 通过 G-25 凝胶柱纯化 A II 抗原与 ABEI 的连接产物。

[0086]  $\text{D}_2$  溶液的配制: 在 2000ml 烧杯中加入 200ml 0.5M 磷酸盐缓冲液、20g BSA、8g  $\text{NaN}_3$ 、2g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、600ml 甘油, 加纯化水稀释至 2000ml, 过滤。

[0087] 纯化好的连接产物用  $\text{D}_2$  溶液对倍稀释。

[0088] (2) 羊抗 FITC 多克隆抗体包被磁球, 具体步骤如下:

[0089] 按实施例 1 中方法配制好 A 溶液。

[0090] 向小白瓶中加入 5 倍于包被体积的 A 溶液, 放入超声波仪器中一边超声一边搅拌清洗 2-3 分钟, 然后置于磁铁上, 待上清液清亮后, 倒出上清液。该步骤重复三次。

[0091] 将磁球加入包被体积等量的 pH3.6 醋酸缓冲液中, 使磁球的悬浮浓度为 20mg/ml, 再加入 CMC (浓度为 10mg/ml), 加入纯化的羊抗 FITC 多克隆抗体。

[0092] 将磁球悬浮液放入恒温震荡水浴箱中 37 $^\circ\text{C}$  反应 24 小时 (震荡水浴锅振摇速度: 260rpm)。

[0093] 以 P001: 纯化水 = 1:9 体积比率配制 pH7.4 的 PBS 缓冲液 500ml, 加入 2.5g BSA 混匀溶解, 即为磁球清洗液。

[0094] 将温浴好的磁球悬浮液倒入烧杯中, 然后置于磁铁上沉淀后, 倒掉上清, 加入 5 倍体积的磁球清洗液搅拌清洗, 然后放置在磁铁上, 待上清液清亮后倒掉上清液, 重复该清洗步骤四次。

[0095] 按照实施例 1 的方法制备 C 溶液。

[0096] 将清洗完毕后的磁球悬浮在 C 溶液中, 悬浮液浓度为 20mg/ml, 即得到羊抗 FITC 多克隆抗体包被的磁球, 此悬浮液体积即为本步骤所述包被体积。

[0097] 将上述磁球悬浮液进一步稀释至以磁球计为 0.5mg/ml 的悬浮液, 备用。

[0098] (3) 抗 A II 抗体标记, 具体步骤如下:

[0099] 取 1mg 抗 A II 抗体用 0.1mol/L pH9.5 的碳酸缓冲液 (F 溶液) 调整到 1ml。放入透析液中, 室温搅拌透析 2 小时, 将透析好的溶液加入 300  $\mu\text{g}$  FITC, 室温边摇边反应 24h。

[0100] 通过 G-25 凝胶柱纯化抗 A II 抗体与 FITC 的连接产物。

[0101]  $\text{C}_2$  溶液的配制: 加入 200ml 0.5M 磷酸盐缓冲液、20g BSA、8g  $\text{NaN}_3$ 、8g、2g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、加纯化水稀释至 2000ml (过滤)。配制好  $\text{C}_2$  溶液, 以纯化好的连接产物用  $\text{C}_2$  溶液对倍稀释。

[0102] (4) A II 低点校准品、高点校准品的制备

[0103] 将 A II 抗原用 50% 牛血清制品按不同比例稀释成浓度为 591.578pg/ml 及

42. 260pg/ml 两个高、低校准品定标点。

[0104] (5) 组装

[0105] 将上述试剂成分分装后组装成试剂盒, 储存于 2 ~ 8℃。

[0106] 实施例 3

[0107] (1) 抗 A II 抗体的标记, 具体步骤如下:

[0108] 透析液 (F 溶液) 的配制: 在 5000ml 烧杯中加入  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  14.31g,  $\text{NaHCO}_3$  26.46g, 加纯化水稀释至 4500ml, 将配制好的 F 溶液置于磁力搅拌器上备用。

[0109] 选用合适截留量 (常用分子量 14000) 的透析袋, 量取足以容纳 F 溶液的尺寸, 润湿后扎紧一端, 纯化水试漏 3 次 (需无漏液)。

[0110] 取 1mg 抗 A II 抗体用 0.1mol/L pH9.5 的碳酸缓冲液 (F 溶液) 调整到 1ml。放入透析液中, 室温搅拌透析 2 小时, 将透析好的溶液加入 300  $\mu\text{g}$  ABEI 活化酯, 37℃ 反应 2 小时。

[0111] 通过 G-25 凝胶柱纯化抗 A II 抗体与 ABEI 的连接产物。

[0112] 按实施例 1 中方法配制好  $\text{D}_2$  溶液。

[0113] 将纯化好的连接产物用  $\text{D}_2$  溶液对倍稀释。

[0114] (2) A II 抗原包被磁球, 具体步骤如下:

[0115] 按实施例 1 中的方法配制好 A 溶液。

[0116] 向小白瓶中加入 5 倍于包被体积的 A 溶液, 放入超声波仪器中一边超声一边搅拌清洗 2-3 分钟, 然后置于磁铁上, 待上清液清亮后, 倒出上清液。该步骤重复三次。

[0117] 将磁球加入包被体积等量的 pH3.6 醋酸缓冲液中, 使磁球的悬浮浓度为 20mg/ml, 再加入 1-环己基-2-吗啉乙基碳二亚胺对甲苯磺酸盐 (CMC), 使其浓度为 10mg/ml, 按一定比率加入纯化的 A II 抗原

[0118] 将磁球放入恒温震荡水浴箱中 37℃ 反应 24 小时 (震荡水浴锅振摇速度: 260rpm)。

[0119] 以 P001: 纯化水 = 1:9 体积比率配制 pH7.4 PBS 缓冲液 500ml, 加入 2.5g BSA 混匀混匀溶解, 即为磁球清洗液。

[0120] 将温浴好的磁球悬浮液倒入烧杯中, 然后置于磁铁上沉淀后, 倒掉上清, 加入 5 倍体积的磁球清洗液搅拌清洗, 然后放置在磁铁上, 待上清液清亮后倒掉上清液, 重复该清洗步骤四次。

[0121] 按照实施例 1 的方法制备 C 溶液。将清洗完毕后的磁球悬浮于 C 溶液中, 悬浮浓度为 20mg/ml, 即得到抗 A II 抗体包被的磁球, 此悬浮液体积即为本步骤所述包被体积。

[0122] 将上述磁球悬浮液进一步稀释至以磁球计为 1mg/ml 的悬浮液, 备用。

[0123] (3) A II 低点校准品、高点校准品

[0124] 将 A II 抗原用 50% 牛血清制品按不同比例稀释成浓度分别为 562.34pg/ml 及 17.78pg/ml 的两个高、低校准品定标点。

[0125] (4) 组装

[0126] 将上述试剂成分分装后组装成试剂盒, 储存于 2 ~ 8℃。

[0127] 实施例 4

[0128] (1) 抗 A II 抗体的标记, 具体步骤如下:

[0129] 透析液(F溶液)的配制:在5000ml烧杯中加入 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 14.31g,  $\text{NaHCO}_3$ 26.46g,加水定容至4500ml。配制好的F溶液置于磁力搅拌器上备用。

[0130] 选用合适截留量(常用分子量14000)的透析袋,量取足够容纳F溶液的尺寸,润湿后扎紧一端,纯化水试漏3次(需无漏液)。

[0131] 取1mg抗A II抗体用0.1mol/L pH9.5的碳酸缓冲液(F溶液)调整到1ml。放入透析液中,室温搅拌透析2小时,将透析好的溶液加入300 $\mu\text{g}$  ABEI活化酯,37 $^\circ\text{C}$ 反应2小时。

[0132] 通过G-25凝胶柱纯化抗A II抗体与ABEI的连接产物。

[0133] 按照实施例1的方法制备D<sub>2</sub>溶液。

[0134] 将纯化好的连接产物用D<sub>2</sub>溶液对倍稀释。

[0135] (2)羊抗FITC多克隆抗体包被磁球,具体步骤如下:

[0136] 按实施例1中方法配制好A溶液。

[0137] 向小白瓶中加入5倍于包被体积的A溶液,放入超声波仪器中一边超声一边搅拌清洗2-3分钟,然后置于磁铁上,待上清液清亮后,倒出上清液。该步骤重复三次。

[0138] 将磁球加入包被体积等量的pH3.6醋酸缓冲液中,使磁球悬浮浓度为20mg/ml,再加入CMC(使其浓度为10mg/ml),按一定比率加入纯化的羊抗FITC多克隆抗体。

[0139] 将磁球放入恒温震荡水浴箱中37 $^\circ\text{C}$ 反应24小时(震荡水浴锅振摇速度:260rpm)。

[0140] 以P001:纯化水=1:9体积比率配制pH7.4PBS缓冲液500ml,加入2.5g BSA混匀溶解,即为磁球清洗液。

[0141] 将温浴好的磁球悬浮液倒入烧杯中,然后置于磁铁上沉淀后,倒掉上清,加入5倍体积的磁球清洗液搅拌清洗,然后放置在磁铁上,待上清液清亮后倒掉上清液,重复该清洗步骤四次。

[0142] 按照实施例1的方法制备C溶液。

[0143] 将清洗完毕后的羊抗FITC多克隆抗体包被的磁球悬浮在C溶液中,悬浮浓度为20mg/ml,即得到羊抗FITC多克隆抗体包被的磁球,此悬浮液体积即为本步骤所述包被体积。

[0144] 将上述磁球悬浮液进一步稀释至以磁球计为0.05mg/ml的悬浮液,备用。

[0145] (3)A II抗原标记,具体步骤如下:

[0146] 透析液(F溶液)的配制,在5000ml烧杯中加入 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 14.31g,  $\text{NaHCO}_3$ 26.46g,加水定容至4500ml,配制好的F溶液置于磁力搅拌器上备用。

[0147] 选用合适截留量(常用14000)的透析袋,量取合适的尺寸,润湿后扎紧一端,纯化水试漏3次(需无漏液)。

[0148] 取100 $\mu\text{g}$  A II抗原用0.1mol/L pH9.5的碳酸缓冲液(F溶液)调整到1ml。放入透析液中,室温搅拌透析2小时,将透析好的溶液加入300 $\mu\text{g}$  FITC,室温边摇边反应24h。

[0149] 通过G-25凝胶柱纯化A II抗原和FITC的连接产物。

[0150] C<sub>2</sub>溶液的配制:加入200ml P001溶液、20g BSA、8g  $\text{NaN}_3$ 、2g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、定容到2000ml(过滤)。

[0151] 纯化好的连接产物用C<sub>2</sub>溶液对倍稀释,即可。

[0152] (4)A II 低点校准品、高点校准品的制备

[0153] 将 A II 抗原用 50% 牛血清制品按不同比例稀释成浓度分别为 645.12pg/ml 及 46.50pg/ml 两个高、低校准品定标点。

[0154] (5) 组装

[0155] 将上述试剂成分分装后组装成试剂盒, 储存于 2 ~ 8℃。

[0156] 实施例 5

[0157] (1) 抗 A II 抗体的标记, 具体步骤如下:

[0158] 取 1mg 抗 A II 抗体用 0.1mol/L pH9.5 的碳酸缓冲液 (F 溶液) 调整到 1ml。放入透析液中, 室温搅拌透析 2 小时, 将透析好的溶液加入 300 μg ABEI 活化酯, 37℃ 反应 2 小时。

[0159] 通过 G-25 凝胶柱纯化抗 A II 抗体和 ABEI 的连接产物。

[0160] 按照实施例 1 的方法配制 D<sub>2</sub> 溶液, 纯化好的连接产物用 D<sub>2</sub> 溶液对倍稀释。

[0161] (2) A II 抗原生物素化

[0162] 取 100 μg Biotin 及 100 μg A II 抗原用 0.1mol/L pH9.5 的碳酸缓冲液 (F 溶液) 调整到 1ml。放入透析液中, 室温搅拌透析 2 小时, 37℃ 反应 2 小时。

[0163] 通过 G-25 凝胶柱纯化。

[0164] 将纯化好的连接产物用 D<sub>2</sub> 溶液对倍稀释。

[0165] (3) SA 包被磁球, 具体步骤如下:

[0166] 按照实施例 1 的方法配制 A 溶液。

[0167] 向小白瓶中加入 5 倍于包被体积的 A 溶液, 放入超声波仪器中一边超声一边搅拌清洗 2-3 分钟, 然后置于磁铁上, 待上清液清亮后, 倒出上清液。该步骤重复三次。

[0168] 将磁球加入与包被体积等量的 pH3.6 醋酸缓冲液中, 使磁球的悬浮浓度为 20mg/ml, 再加入 CMC (浓度为 10mg/ml), 加入纯化的 SA。

[0169] 将磁球悬浮液放入恒温震荡水浴箱中 37℃ 反应 24 小时 (震荡水浴锅振摇速度: 260rpm)。

[0170] 以 P001: 纯化水 = 1:9 体积比率配制 pH7.4 的 PBS 缓冲液 500ml, 加入 2.5g BSA 混匀溶解, 即为磁球清洗液。

[0171] 将温浴好的磁球悬浮液倒入烧杯中, 然后置于磁铁上沉淀后, 倒掉上清, 加入 5 倍体积的磁球清洗液搅拌清洗, 然后放置在磁铁上, 待上清液清亮后倒掉上清液, 重复该清洗步骤四次。

[0172] 按照实施例 1 的方法制备 C 溶液。

[0173] 将清洗完毕后的 SA 包被的磁球悬浮在 C 溶液中, 悬浮浓度为 20mg/ml, 即得到 SA 包被的磁球, 此悬浮液体积即为本步骤所述包被体积。

[0174] 将上述磁球悬浮液进一步稀释至以磁球计为 0.5mg/ml 的悬浮液, 备用。

[0175] (4) A II 低点校准品、高点校准品的制备

[0176] 将 A II 抗原用 50% 牛血清制品按不同比例稀释成浓度为 563.245pg/ml 及 15.337pg/ml 两个高、低校准品定标点。

[0177] (5) 组装

[0178] 将上述试剂成分分装后组装成试剂盒, 储存于 2 ~ 8℃。

[0179] 实施例 6

[0180] (1) 抗 A II 抗体生物素化, 具体步骤如下:

[0181] 取 100  $\mu$ g Biotin 及 1mg 抗 A II 抗体用 0.1mol/L pH9.5 的碳酸缓冲液 (F 溶液) 调整到 1ml。放入透析液中, 室温搅拌透析 2 小时, 37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时。

[0182] 通过 G-25 凝胶柱纯化。

[0183] 配制 D2 溶液, 纯化好的连接产物用 D<sub>2</sub> 溶液对倍稀释。

[0184] (2) SA 的标记

[0185] 取 100  $\mu$ g SA 用 0.1mol/L pH9.5 的碳酸缓冲液 (F 溶液) 调整到 1ml。放入透析液中, 室温搅拌透析 2 小时, 将透析好的溶液加入 300  $\mu$ g ABEI 活化酯, 37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时。

[0186] G-25 凝胶柱纯化。

[0187] 纯化好的连接产物用 D<sub>2</sub> 溶液对倍稀释, 即可。

[0188] (3) A II 抗原包被磁球, 具体步骤如下:

[0189] 按照实施例 1 的方法配制好 A 溶液。

[0190] 向小白瓶中加入 5 倍于包被体积的 A 溶液, 放入超声波仪器中一边超声一边搅拌清洗 2-3 分钟, 然后置于磁铁上, 待上清液清亮后, 倒出上清液。该步骤重复三次。

[0191] 将磁球加入包被体积等量的 pH3.6 醋酸缓冲液, 使磁球的悬浮浓度为 20mg/ml, 再加入 CMC (浓度为 10mg/ml), 加入纯化的 A II 抗原。

[0192] 将磁球悬浮液放入恒温震荡水浴箱中 37 $^{\circ}$ C 反应 24 小时 (震荡水浴锅振摇速度: 260rpm)。

[0193] 以 P001: 纯化水 = 1:9 体积比率配制 pH7.4 PBS 缓冲液 500ml 加入 2.5g BSA 混匀混匀溶解, 即为磁球清洗液。

[0194] 将温浴好的磁球悬浮液倒入烧杯中, 然后置于磁铁上沉淀后, 倒掉上清, 加入 5 倍体积的磁球清洗液搅拌清洗, 然后放置在磁铁上, 待上清液清亮后倒掉上清液, 重复该清洗步骤四次。

[0195] 按照实施例 1 的方法配制 C 溶液。

[0196] 将清洗完毕后的磁球悬浮在 C 溶液中, 悬浮浓度为 20mg/ml, 即得到抗 A II 抗体包被的磁球。

[0197] 将上述磁球悬浮液进一步稀释至以磁球计为 0.5mg/ml 的悬浮液, 备用。

[0198] (4) A II 低点校准品、高点校准品

[0199] 将 A II 抗原用 50% 牛血清制品按不同比例稀释成浓度为 515.73pg/ml 及 9.70pg/ml 两个高、低校准品定标点。

[0200] (5) 组装

[0201] 将上述试剂成分分装后组装成试剂盒, 储存于 2 ~ 8 $^{\circ}$ C。

[0202] 实施例 7:

[0203] (1) A II 抗原 -BSA 蛋白连接物的标记, 具体步骤如下:

[0204] 透析液 (F 溶液) 的配制: 在 5000ml 容器中加入 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 14.31g, NaHCO<sub>3</sub> 26.46g, 加纯化水稀释至 4500ml。配制好的 F 溶液置于磁力搅拌器上备用。

[0205] 选用合适截留量 (常用分子量 14000) 的透析袋, 量取足够容纳 F 溶液的尺寸, 润湿后扎紧一端, 纯化水试漏 3 次 (需无漏液)。

[0206] 取 100  $\mu$ g A II 抗原-BSA 蛋白连接物用 0.1mol/L pH9.5 的碳酸缓冲液 (F 溶液) 调整到 1ml。放入透析液中, 室温搅拌透析 2 小时, 将透析好的溶液加入 300  $\mu$ g ABEI 活化酯, 37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时。

[0207] 通过 G-25 凝胶柱纯化 A II 抗原-BSA 蛋白链接物与 ABEI 的连接产物。

[0208]  $D_2$  溶液的配制: 在 2000ml 烧杯中加入 200ml 0.5M 磷酸盐缓冲液、20g BSA、8g  $\text{NaN}_3$ 、2g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、600ml 甘油, 加纯化水稀释至 2000ml, 过滤。

[0209] 纯化好的连接产物用  $D_2$  溶液对倍稀释。

[0210] (2) 羊抗 FITC 多克隆抗体包被磁球, 具体步骤如下:

[0211] 按实施例 1 中方法配制好 A 溶液。

[0212] 向小白瓶中加入 5 倍于包被体积的 A 溶液, 放入超声波仪器中一边超声一边搅拌清洗 2-3 分钟, 然后置于磁铁上, 待上清液清亮后, 倒出上清液。该步骤重复三次。

[0213] 将磁球加入包被体积等量的 pH3.6 醋酸缓冲液中, 使磁球的悬浮浓度为 20mg/ml, 再加入 CMC (浓度为 10mg/ml), 加入纯化的羊抗 FITC 多克隆抗体。

[0214] 将磁球悬浮液放入恒温震荡水浴箱中 37 $^{\circ}$ C 反应 24 小时 (震荡水浴锅振摇速度: 260rpm)。

[0215] 以 P001: 纯化水 = 1:9 体积比率配制 pH7.4 的 PBS 缓冲液 500ml, 加入 2.5g BSA 混匀溶解, 即为磁球清洗液。

[0216] 将温浴好的磁球悬浮液倒入烧杯中, 然后置于磁铁上沉淀后, 倒掉上清, 加入 5 倍体积的磁球清洗液搅拌清洗, 然后放置在磁铁上, 待上清液清亮后倒掉上清液, 重复该清洗步骤四次。

[0217] 按照实施例 1 的方法制备 C 溶液。

[0218] 将清洗完毕后的磁球悬浮在 C 溶液中, 悬浮液浓度为 20mg/ml, 即得到羊抗 FITC 多克隆抗体包被的磁球, 此悬浮液体积即为本步骤所述包被体积。

[0219] 将上述磁球悬浮液进一步稀释至以磁球计为 0.5mg/ml 的悬浮液, 备用。

[0220] (3) 抗 A II 抗体标记, 具体步骤如下:

[0221] 取 1mg 抗 A II 抗体用 0.1mol/L pH9.5 的碳酸缓冲液 (F 溶液) 调整到 1ml。放入透析液中, 室温搅拌透析 2 小时, 将透析好的溶液加入 300  $\mu$ g FITC, 室温边摇边反应 24h。

[0222] 通过 G-25 凝胶柱纯化抗 A II 抗体与 FITC 的连接产物。

[0223]  $C_2$  溶液的配制: 加入 200ml 0.5M 磷酸盐缓冲液、20g BSA、8g  $\text{NaN}_3$ 、2g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、加纯化水稀释至 2000ml (过滤)。配制好  $C_2$  溶液, 以纯化好的连接产物用  $C_2$  溶液对倍稀释。

[0224] (4) A II 低点校准品、高点校准品的制备

[0225] 将 A II 抗原用 50% 牛血清制品按不同比例稀释成浓度为 591.578pg/ml 及 42.260pg/ml 两个高、低校准品定标点。

[0226] 实施例 8: 利用检测试剂盒进行化学发光检测 A II

[0227] 使用上述实施例 1-7 制备好的 A II 检测试剂盒和 Maglumi 2000 化学发光分析仪, 通过化学发光免疫竞争法来检测样本的 A II 浓度, 待测样本为 160 例临床样本。A II 浓度与相对光强度 (Relative Light Unit, RLU) 成一定的比例关系, 可以使用测定仪来自动拟合计算 A II 浓度。

[0228] 选取实施例 1 中所得的试剂盒进行化学发光法检测的具体步骤描述如下：

[0229] 1、在样本架上依次加载校准品或待测样本，待测样本为经过酶抑制剂处理后的样本。

[0230] 2、将样本架插入 Maglumi 2000 化学发光分析仪的样本仓，编辑样本号开始运行试验，具体加样步骤为：校准品或待测样本加 100  $\mu$  l，然后加示踪标记物标记的 A II 抗原溶液 50  $\mu$  l，加抗 A II 抗体包被的磁性微球悬浮液 20  $\mu$  l，混匀，37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟，仪器自动清洗两遍后直接进入测量室得到各个样本的光强度信号，通过十点曲线及两点定标自动拟合出待测样本的 A II 抗原浓度值。检测结果见表 1。

[0231] 选取实施例 4 中所得的试剂盒进行化学发光法检测的具体步骤描述如下：

[0232] 1、在样本架上依次加载校准品或待测样本，待测样本为经过酶抑制剂处理后的样本。

[0233] 2、将样本架插入 Maglumi 2000 化学发光分析仪的样本仓，编辑样本号开始运行试验，具体加样步骤为：校准品或待测样本加 100  $\mu$  l，然后加标记有示踪标记物的抗 A II 抗体溶液 50  $\mu$  l，加 A II 抗原标记的 FITC 溶液 50  $\mu$  l，加羊抗 FITC 多克隆抗体包被的磁性微球悬浮液 20  $\mu$  l，混匀，37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟，仪器自动清洗两遍后直接进入测量室得到各个样本的光强度信号，通过十点曲线及两点定标自动拟合出待测样本的 A II 抗原浓度值。检测结果见表 1。

[0234] 选取实施例 7 中所得的试剂盒进行化学发光法检测的具体步骤描述如下：

[0235] 1、在样本架上依次加载校准品或待测样本，待测样本为经过酶抑制剂处理后的样本。

[0236] 2、将样本架插入 Maglumi 2000 化学发光分析仪的样本仓，编辑样本号开始运行试验，具体加样步骤为：校准品或待测样本加 100  $\mu$  l，然后加标记有示踪标记物的抗 A II 抗体溶液 50  $\mu$  l，加 A II 抗原标记的 FITC 溶液 50  $\mu$  l，加羊抗 FITC 多克隆抗体包被的磁性微球悬浮液 20  $\mu$  l，混匀，37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟，仪器自动清洗两遍后直接进入测量室得到各个样本的光强度信号，通过十点曲线及两点定标自动拟合出待测样本的 A II 抗原浓度值。检测结果见表 1。

[0237] 对比例 1

[0238] 采用市面上现有的主流商品化放射性免疫试剂盒对实施例 8 中的 160 例临床样本进行检测，检测结果见表 1。

[0239] 表 1

[0240]

样本号	卧/立位	放射性免疫试剂盒的测定值 (pg/ml)	实施例 1 试剂盒测定值 (pg/ml)	实施例 4 试剂盒测定值 (pg/ml)	实施例 7 试剂盒测定值 (pg/ml)	样本号	卧/立位	放射性免疫试剂盒的测定值 (pg/ml)	实施例 1 试剂盒测定值 (pg/ml)	实施例 4 试剂盒测定值 (pg/ml)	实施例 7 试剂盒测定值 (pg/ml)
1	卧位	37.762	36.245	39.800	41.167	81	卧位	22.163	21.349	23.381	23.957
	立位	55.751	56.519	55.473	54.823		立位	53.658	52.563	55.682	55.324
2	卧位	43.275	40.925	43.766	44.356	82	卧位	38.402	38.847	39.694	38.409
	立位	65.040	64.662	64.062	64.116		立位	57.593	56.954	58.153	58.769
3	卧位	36.708	37.765	37.586	36.414	83	卧位	32.385	34.609	30.973	31.618
	立位	55.150	52.685	54.117	53.843		立位	58.318	55.361	60.106	60.265
4	卧位	37.749	40.181	38.295	38.346	84	卧位	46.733	45.156	47.844	48.308
	立位	56.578	54.682	55.474	56.591		立位	90.205	87.116	92.666	93.740
5	卧位	44.910	44.742	44.525	45.436	85	卧位	37.290	39.113	41.720	41.187
	立位	67.052	67.340	64.132	64.083		立位	55.956	53.571	54.515	53.888
6	卧位	55.120	53.210	54.245	53.130	86	卧位	30.016	30.842	29.600	30.776
	立位	82.293	83.049	82.022	80.298		立位	65.532	64.781	66.599	66.635
7	卧位	47.191	47.869	48.741	48.109	87	卧位	53.064	53.624	55.855	55.686
	立位	70.700	70.303	70.433	71.627		立位	80.169	75.842	79.102	80.372
8	卧位	50.051	48.242	50.408	49.494	88	卧位	41.055	41.681	42.515	42.542
	立位	75.766	77.244	74.790	74.489		立位	61.598	61.339	61.493	61.633
9	卧位	49.362	49.554	48.461	50.062	89	卧位	46.113	41.314	47.740	47.996
	立位	88.476	86.486	90.195	89.918		立位	68.708	68.518	69.342	69.502
10	卧位	49.268	48.934	50.408	51.968	90	卧位	34.112	34.036	34.608	34.533
	立位	73.755	75.926	70.808	71.562		立位	50.695	47.801	49.853	50.816
11	卧位	39.850	37.742	39.539	40.319	91	卧位	54.084	51.214	54.687	54.663
	立位	59.432	61.890	57.401	57.507		立位	81.319	81.873	80.678	81.165
12	卧位	45.128	42.200	43.001	42.728	92	卧位	69.143	67.590	70.494	71.726
	立位	68.220	69.180	67.938	68.101		立位	144.282	142.695	144.623	144.923
13	卧位	43.044	43.945	43.128	42.316	93	卧位	53.895	51.561	57.155	57.146
	立位	65.331	65.837	65.017	64.732		立位	80.787	78.408	84.893	85.053
14	卧位	39.293	41.061	40.307	41.251	94	卧位	49.997	49.023	50.825	50.185
	立位	59.467	60.855	57.064	57.107		立位	74.655	72.195	73.762	72.591
15	卧位	44.390	45.281	45.638	46.335	95	卧位	27.467	24.064	28.414	28.310
	立位	66.541	66.028	65.914	67.105		立位	81.006	78.636	82.787	82.456
16	卧位	50.869	52.337	49.050	49.059	96	卧位	35.768	35.989	37.792	38.533
	立位	106.902	104.551	104.795	105.962		立位	53.947	53.694	56.802	57.888
17	卧位	29.194	28.829	30.458	29.554	97	卧位	48.158	49.361	51.737	52.691
	立位	43.599	45.018	45.655	45.649		立位	71.549	68.784	73.319	73.703
18	卧位	34.752	37.864	31.799	31.726	98	卧位	42.626	43.663	45.528	45.916

[0241]

	立位	52.203	54.210	50.261	49.585		立位	64.508	67.524	66.854	67.214
19	卧位	45.910	49.057	48.195	48.620	99	卧位	27.057	24.144	27.141	28.038
	立位	68.406	68.337	68.906	68.898		立位	39.871	36.442	41.850	41.526
20	卧位	38.629	38.525	39.362	39.371	100	卧位	38.838	38.288	37.052	37.180
	立位	58.423	58.104	55.940	56.304		立位	69.002	65.176	70.513	71.435
21	卧位	44.465	43.263	42.413	41.070	101	卧位	43.075	42.653	41.227	40.613
	立位	65.875	64.367	66.030	65.662		立位	64.331	66.272	62.730	62.692
22	卧位	52.912	54.814	52.720	53.780	102	卧位	55.053	53.137	55.231	54.577
	立位	113.635	111.597	110.825	110.091		立位	82.310	80.420	82.836	82.936
23	卧位	31.070	30.563	30.523	30.748	103	卧位	40.025	38.038	37.611	39.300
	立位	46.237	45.089	47.078	47.667		立位	70.115	71.414	72.016	70.801
24	卧位	47.519	47.680	45.536	46.112	104	卧位	38.969	39.710	36.420	34.887
	立位	71.702	70.632	70.062	69.779		立位	58.465	57.202	57.885	59.237
25	卧位	49.540	49.666	50.279	50.023	105	卧位	55.298	53.717	56.483	56.690
	立位	74.011	76.018	71.693	73.246		立位	83.616	84.298	81.852	82.368
26	卧位	32.812	34.355	34.574	34.258	106	卧位	37.775	37.514	39.938	40.974
	立位	49.216	46.024	47.088	45.949		立位	57.003	53.581	56.049	56.775
27	卧位	45.790	46.603	45.547	44.930	107	卧位	32.599	28.637	30.538	31.303
	立位	68.299	68.741	66.005	66.919		立位	73.360	74.770	72.414	72.719
28	卧位	35.609	38.944	37.242	36.862	108	卧位	42.698	40.340	42.684	42.532
	立位	54.108	55.587	55.878	55.038		立位	74.866	71.040	73.713	74.019
29	卧位	46.775	44.069	49.796	49.527	109	卧位	35.492	38.662	34.963	35.087
	立位	70.198	69.592	73.347	72.181		立位	73.439	73.816	77.237	75.794
30	卧位	37.869	35.267	36.292	35.875	110	卧位	46.888	45.939	49.753	50.360
	立位	57.011	58.519	57.789	57.700		立位	70.286	68.142	67.327	68.226
31	卧位	35.079	36.305	33.739	33.726	111	卧位	35.177	34.335	34.203	34.684
	立位	52.442	55.473	50.909	50.589		立位	52.620	50.104	54.704	54.960
32	卧位	35.088	32.908	37.749	39.283	112	卧位	47.866	47.168	49.285	49.993
	立位	52.805	51.400	52.630	51.797		立位	71.823	69.103	71.632	70.266
33	卧位	47.630	49.642	48.839	48.971	113	卧位	61.800	61.752	62.006	61.482
	立位	71.474	70.084	74.424	74.170		立位	132.633	130.442	134.379	135.805
34	卧位	47.334	48.937	46.640	47.308	114	卧位	46.694	48.749	51.172	50.265
	立位	71.497	72.090	72.838	72.879		立位	70.207	68.729	66.687	66.029
35	卧位	42.781	44.473	39.790	39.976	115	卧位	53.424	52.530	52.503	52.754
	立位	63.905	62.095	63.705	63.273		立位	79.824	76.884	80.405	79.022
36	卧位	31.281	31.127	32.179	32.415	116	卧位	66.248	69.231	68.540	68.136
	立位	46.610	48.609	44.620	45.111		立位	98.598	100.093	102.367	103.366
37	卧位	43.008	42.003	43.334	44.345	117	卧位	35.785	34.287	37.542	37.570
	立位	64.072	63.536	61.425	61.641		立位	53.549	54.372	56.761	58.160
38	卧位	49.500	47.928	50.884	52.246	118	卧位	47.719	47.589	49.683	50.312
	立位	74.980	74.164	75.815	76.303		立位	72.057	70.191	71.367	70.131
39	卧位	27.701	27.625	24.628	24.691	119	卧位	39.424	38.947	41.866	42.611
	立位	41.915	44.261	41.579	40.705		立位	59.104	56.546	61.616	62.651
40	卧位	52.949	55.064	53.226	53.402	120	卧位	31.611	29.579	34.794	34.923
	立位	99.113	98.154	99.357	99.357		立位	46.664	48.403	45.271	44.713
41	卧位	42.010	40.352	43.044	42.446	121	卧位	32.036	33.694	34.321	34.324
	立位	62.949	65.396	65.252	64.718		立位	48.492	46.572	48.645	49.357
42	卧位	32.879	31.163	33.309	33.021	122	卧位	41.223	44.062	42.078	41.840

[0242]

	立位	49.668	48.560	50.730	51.639		立位	62.276	65.134	60.580	60.227
43	卧位	40.305	39.813	42.996	43.753	123	卧位	39.816	38.439	39.625	40.864
	立位	60.085	59.286	57.953	59.053		立位	60.121	60.409	59.858	60.697
44	卧位	40.084	36.951	40.252	41.850	124	卧位	36.165	38.511	33.760	33.556
	立位	59.977	56.825	60.834	62.444		立位	54.813	55.791	55.557	56.279
45	卧位	29.065	27.385	30.498	31.734	125	卧位	24.852	22.113	22.097	22.521
	立位	43.056	42.049	43.636	42.527		立位	67.177	63.516	67.827	67.159
46	卧位	35.904	35.688	33.607	34.592	126	卧位	25.937	27.088	25.489	24.359
	立位	53.895	55.215	52.823	54.028		立位	78.488	78.349	75.548	75.432
47	卧位	46.065	46.828	46.917	46.442	127	卧位	39.447	41.176	42.673	42.212
	立位	69.099	71.380	69.398	68.046		立位	69.122	68.450	70.113	71.172
48	卧位	34.245	34.220	32.092	32.515	128	卧位	44.175	44.515	43.012	41.858
	立位	51.237	50.627	49.374	50.604		立位	66.174	67.988	67.777	67.296
49	卧位	54.173	55.106	53.993	55.726	129	卧位	46.311	44.456	45.890	45.714
	立位	81.524	81.986	82.279	83.622		立位	79.381	80.145	82.767	82.788
50	卧位	21.514	24.433	19.731	19.842	130	卧位	47.986	44.408	48.002	49.180
	立位	33.010	31.991	35.543	33.672		立位	72.056	74.611	73.009	72.526
51	卧位	42.826	43.502	43.850	42.742	131	卧位	52.010	54.099	50.575	50.569
	立位	64.392	61.880	62.968	62.139		立位	98.150	96.470	99.997	100.492
52	卧位	32.702	33.229	33.447	33.594	132	卧位	44.688	42.692	45.310	45.445
	立位	48.596	48.625	50.052	48.915		立位	67.003	66.350	65.615	66.693
53	卧位	25.640	26.219	24.124	23.015	133	卧位	30.287	26.536	33.522	34.198
	立位	38.644	38.444	40.715	41.541		立位	79.827	80.361	79.958	78.998
54	卧位	48.968	47.672	50.644	51.021	134	卧位	45.971	48.277	46.510	47.872
	立位	103.460	103.990	102.987	103.610		立位	69.032	68.511	67.243	66.295
55	卧位	42.450	42.226	44.392	44.771	135	卧位	36.033	35.993	36.879	36.344
	立位	83.543	86.662	83.295	84.627		立位	63.403	60.805	68.045	68.000
56	卧位	30.614	28.548	32.925	32.215	136	卧位	35.092	33.161	35.721	36.350
	立位	86.570	83.548	85.140	85.004		立位	52.559	51.545	52.526	52.887
57	卧位	50.328	49.264	49.239	49.385	137	卧位	42.482	41.167	44.933	46.374
	立位	74.912	75.660	74.688	75.012		立位	63.455	61.918	61.249	60.510
58	卧位	40.553	37.788	42.464	42.891	138	卧位	40.358	38.649	40.661	42.304
	立位	60.770	61.647	62.678	62.310		立位	60.986	60.415	65.560	66.133
59	卧位	55.914	56.130	55.960	56.164	139	卧位	35.765	34.728	36.550	36.190
	立位	84.463	88.008	84.706	84.690		立位	54.022	53.125	52.875	51.324
60	卧位	37.180	37.836	35.444	34.234	140	卧位	41.524	39.307	45.082	45.004
	立位	55.808	56.492	56.933	56.329		立位	62.533	62.532	62.580	62.982
61	卧位	47.142	46.419	48.251	47.621	141	卧位	43.561	41.409	41.798	41.915
	立位	70.362	72.149	70.684	71.113		立位	95.013	97.361	92.817	92.509
62	卧位	31.918	29.994	30.644	31.155	142	卧位	60.169	56.675	59.490	58.296
	立位	61.634	63.753	63.547	63.915		立位	109.954	110.449	108.421	108.971
63	卧位	43.024	41.439	42.448	43.124	143	卧位	38.735	39.423	38.158	38.370
	立位	95.335	95.831	98.009	97.187		立位	77.406	76.332	78.886	78.915
64	卧位	28.873	31.964	29.706	29.451	144	卧位	39.732	42.033	40.088	40.953
	立位	63.879	62.593	62.309	61.710		立位	79.207	80.356	82.916	81.943
65	卧位	39.901	41.293	38.980	39.301	145	卧位	30.055	28.768	32.778	34.290
	立位	87.655	88.525	85.508	84.357		立位	29.522	29.697	28.384	29.962
66	卧位	36.955	35.252	36.542	38.252	146	卧位	27.512	27.526	25.686	27.255

[0243]

	立位	81.951	81.869	83.003	82.916		立位	25.291	27.286	26.003	26.217
67	卧位	44.496	43.811	45.036	45.868	147	卧位	28.970	28.302	26.599	26.224
	立位	67.921	67.327	64.506	65.964		立位	27.595	27.651	25.937	25.872
68	卧位	34.580	35.319	32.699	31.365	148	卧位	48.105	26.167	28.987	29.016
	立位	76.336	73.592	74.180	73.467		立位	88.813	29.469	26.006	27.303
69	卧位	33.897	33.755	32.952	31.766	149	卧位	28.291	27.162	25.892	24.779
	立位	73.876	72.667	75.065	74.466		立位	27.599	24.135	28.902	29.564
70	卧位	40.225	40.065	42.593	41.539	150	卧位	26.309	23.746	30.478	30.046
	立位	68.769	69.211	65.915	64.906		立位	28.195	27.047	28.109	27.288
71	卧位	32.423	29.005	31.506	31.959	151	卧位	27.234	28.509	28.434	27.203
	立位	63.949	65.883	66.826	67.619		立位	27.278	26.793	23.762	24.490
72	卧位	29.574	30.114	28.112	29.240	152	卧位	29.393	28.756	28.613	29.489
	立位	68.426	70.249	64.980	65.669		立位	27.629	28.500	24.986	25.687
73	卧位	39.062	38.500	38.582	37.983	153	卧位	27.734	26.332	28.587	29.903
	立位	86.303	86.058	86.483	85.505		立位	29.818	28.441	29.936	29.608
74	卧位	32.066	33.726	31.119	32.472	154	卧位	28.341	27.137	26.172	26.181
	立位	69.814	69.836	71.140	70.304		立位	25.041	24.053	26.568	26.402
75	卧位	28.487	26.709	27.888	28.122	155	卧位	25.863	24.562	27.447	27.416
	立位	63.133	61.492	63.470	64.171		立位	29.930	30.785	30.161	30.344
76	卧位	38.047	38.527	37.190	38.716	156	卧位	27.717	25.621	25.281	24.597
	立位	82.821	82.525	81.989	80.780		立位	28.130	24.883	29.908	29.607
77	卧位	46.316	45.897	48.756	48.891	157	卧位	26.858	29.400	27.719	26.312
	立位	62.261	61.971	61.074	61.247		立位	29.408	28.214	31.721	31.398
78	卧位	27.403	26.304	29.823	30.282	158	卧位	27.138	22.171	29.404	29.737
	立位	60.110	59.859	61.535	62.087		立位	25.566	27.654	26.194	26.759
79	卧位	42.052	40.036	40.359	40.420	159	卧位	29.647	32.565	31.535	33.177
	立位	64.060	62.002	63.575	64.330		立位	29.165	31.549	27.836	26.826
80	卧位	34.629	36.801	35.365	35.741	160	卧位	28.271	23.832	26.743	25.589
	立位	70.473	70.673	71.548	70.543		立位	26.632	25.073	27.313	27.793

[0244] 本次临床对比试验选取的 160 例临床样本中, 145-160 号共 16 例样本为原发性醛固酮增多症确诊患者, 其余样本则为体检正常样本。原发性醛固酮增多症患者, 由于醛固酮分泌增多, 导致钠、水潴留, 进而导致细胞外液及血容量增多, 使肾小球入球小动脉压力上升, 引发球旁细胞及致密斑细胞受抑制, 使肾素分泌减少。肾素-血管紧张素系统的活性受抑制, 此种病人不仅在基础状态下血管紧张素 II 低下, 而且应用刺激肾素开释的力法, 如采用立位、低钠膳食或给利尿剂等, 血管紧张素 II 均不增加或略有增加。通过本发明实施例试剂盒检测健康个体血管紧张素 II, 95% 置信区间为立位: 25-60pg/ml, 卧位: 50-120pg/ml, 即正常人的立位和卧位检测值应分别落入上述参考区间内。

[0245] 如表 1 所示数据, 只有 148 号样本显示出本发明实施例试剂盒与放射性免疫试剂盒检测结果不一致; 除去 148 号检测结果, 将实施例 1、实施例 4 和实施例 7 试剂盒对其余样本的检测结果分别与用放射性免疫试剂盒对其余样本的检测结果进行直线拟合, 对于实施例 1 线性方程为  $y = 0.998x - 0.284$ , 相关系数  $R = 0.9955$ , 对于实施例 4 线性方程为  $y = 0.998x + 0.316$ , 相关系数  $R = 0.9960$ , 对于实施例 7 线性方程为  $y = 0.996x + 0.499$ , 相关系数  $R = 0.9950$ 。可见, 本发明提供的检测试剂盒与现有放免试剂盒有较好的一致性。

[0246] 然而, 加上对 148 号样本的测定结果综合来看, 本发明提供的似乎试剂盒和检测方法具有更高的准确性。148 号样本为取自原发性醛固酮增多症患者的样本, 其立卧位血管

紧张素 II 水平一般情况下都会偏低。采用实施例 1、实施例 4 及实施例 7 制备的试剂盒检测此样本所得结果接近置信区间下限,表示其立卧位血管紧张素 II 水平极低,与此样本的临床诊断相符合。然而,使用放免试剂盒的立、卧位检测结果均接近置信区间上限,这明显与临床实际情况不相符。由此说明本发明提供的试剂盒及其检测方法的检测效果优于所对比的放免试剂盒的检测效果,能够更加准确、真实地反应临床情况。

[0247] 对于上述其他实施例中制备的试剂盒,均经过临床检验,效果与实施例 1、实施例 4 及实施例 7 一致,出于节约篇幅考虑,在此不再列出检验数据。

[0248] 综上,与商品化的某放射性免疫试剂盒相比,根据本发明提供的试剂盒的测量值与实际值符合程度更好,临床符合率更高,说明试剂盒的诊断能力更强。此外,相比于放射性免疫试剂盒,本发明提供的试剂盒具有更高的稳定性、使用安全性和环保性。

[0249] 虽然本发明已作了详细描述,但对本领域技术人员来说,在本发明精神和范围内的修改将是显而易见的。此外,应当理解的是,本发明记载的各方面、不同具体实施方式各部分、和列举的各种特征可被组合或全部或部分互换。在上述的各个具体实施方式中,那些参考另一个具体实施方式的实施方式可适当地与其它实施方式组合,这是将由本领域技术人员所能理解的。此外,本领域技术人员将会理解,前面的描述仅是示例的方式,并不旨在限制本发明。

专利名称(译)	血管紧张素II检测试剂盒及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN104614537A</a>	公开(公告)日	2015-05-13
申请号	CN201510069643.6	申请日	2015-02-10
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市新产业生物医学工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市新产业生物医学工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市新产业生物医学工程股份有限公司		
[标]发明人	饶微 高莉 杜凯 李钦 徐红 罗凯 李婷华 袁锦云		
发明人	饶微 高莉 杜凯 李钦 徐红 罗凯 李婷华 袁锦云		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/532 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/74 G01N24/10/02		
代理人(译)	刘烽		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

### 摘要(译)

本发明涉及一种用于检测血管紧张素II的化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法,所述试剂盒包括组分A和组分B,所述组分A为血管紧张素II抗原或血管紧张素II抗原与蛋白载体的连接物,组分B为和抗血管紧张素II抗体,所述组分A和组分B中的一种标记示踪标记物,另一种包被磁球。本发明进一步涉及一种使用该试剂盒来检测血管紧张素II浓度的方法。根据本发明,使用所提供的试剂盒测定血管紧张素II的浓度,能够获得高的检测灵敏度和准确性。

样本号	阱/立位	放射性免疫试剂盒测定值 (pg/ml)	实施例 1 试剂盒测定值 (pg/ml)	实施例 4 试剂盒测定值 (pg/ml)	实施例 7 试剂盒测定值 (pg/ml)	样本号	阱/立位	放射性免疫试剂盒测定值 (pg/ml)	实施例 1 试剂盒测定值 (pg/ml)	实施例 4 试剂盒测定值 (pg/ml)	实施例 7 试剂盒测定值 (pg/ml)
1	阱位	37.762	36.245	39.800	41.167	81	阱位	22.163	21.349	23.381	23.957
	立位	55.751	56.519	55.473	54.823		立位	53.658	52.563	55.682	55.324
	立位	43.275	40.925	43.766	44.356		立位	38.402	38.847	39.694	38.409
2	阱位	65.040	64.662	64.062	64.116	82	阱位	57.593	56.954	58.153	58.769
	立位	36.708	37.765	37.586	36.414		立位	32.385	34.609	30.973	31.618
	立位	55.150	52.685	54.117	53.843		立位	58.318	55.361	60.106	60.265
3	阱位	37.749	40.181	38.295	38.346	83	阱位	46.733	45.156	47.844	48.308
	立位	56.578	54.682	55.474	56.591		立位	90.205	87.116	92.666	93.740
	立位	44.910	44.742	44.525	45.436		立位	37.290	39.113	41.720	41.187
4	阱位	67.052	67.340	64.132	64.083	84	立位	55.956	53.571	54.515	53.888
	立位	55.120	53.210	54.245	53.130		阱位	30.016	30.842	29.600	30.776
	立位	82.293	83.049	82.022	80.298		立位	65.532	64.781	66.599	66.635
5	阱位	47.191	47.869	48.741	48.109	85	立位	53.064	53.624	55.855	55.686
	立位	70.700	70.303	70.433	71.627		立位	80.169	75.842	79.102	80.372
	立位	50.051	48.242	50.408	49.494		立位	41.055	41.681	42.515	42.542
6	阱位	75.766	77.244	74.790	74.489	86	立位	61.598	61.339	61.493	61.633
	立位	49.362	49.554	48.461	50.062		立位	46.113	41.314	47.740	47.996
	立位	88.476	86.486	90.195	89.918		立位	68.708	68.518	69.342	69.502
7	阱位	49.268	48.934	50.408	51.968	87	立位	34.112	34.036	34.608	34.533
	立位	73.755	75.926	70.808	71.562		立位	50.695	47.801	49.853	50.816
	立位	39.850	37.742	39.539	40.319		立位	54.084	51.214	54.687	54.663
8	阱位	68.220	69.180	67.938	68.101	88	立位	81.319	81.873	80.678	81.165
	立位	45.128	42.200	43.001	42.728		立位	69.143	67.590	70.494	71.726
	立位	43.044	43.945	43.128	42.316		立位	144.282	142.695	144.623	144.923
9	阱位	65.331	65.837	65.017	64.732	89	立位	53.895	51.561	57.155	57.146
	立位	39.293	41.061	40.307	41.251		立位	80.787	78.408	84.893	85.053
	立位	59.467	60.855	57.064	57.107		立位	49.997	49.023	50.825	50.185
10	阱位	44.390	45.281	45.638	46.335	90	立位	74.655	72.195	73.762	72.591
	立位	66.541	66.028	65.914	67.105		立位	27.467	24.064	28.414	28.310
	立位	50.869	52.337	49.050	49.059		立位	81.006	78.636	82.787	82.456
11	阱位	106.902	104.551	104.795	105.962	91	立位	35.768	35.989	37.792	38.533
	立位	29.194	28.829	30.458	29.554		立位	53.947	53.694	56.802	57.888
	立位	43.599	45.018	45.655	45.649		立位	48.158	49.361	51.737	52.691
12	阱位	34.752	37.864	31.799	31.726	92	立位	71.540	68.784	73.319	73.703
	立位	42.626	43.663	45.528	45.916		立位	42.626	43.663	45.528	45.916