



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106199011 A

(43)申请公布日 2016.12.07

(21)申请号 201610505400.7

(22)申请日 2016.06.30

(71)申请人 深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区南山街道兴海路荔山工业区5栋1-4层

(72)发明人 夏福臻 钱纯亘 王刚 祝亮
何雨禧

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司 44224

代理人 徐春祺

(51)Int.Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

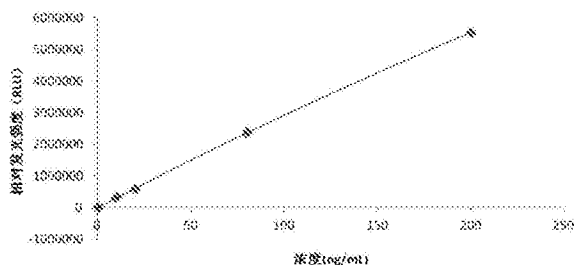
权利要求书3页 说明书13页 附图1页

(54)发明名称

脂联素化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种脂联素化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和应用,脂联素化学发光免疫检测试剂盒包括:脂联素单克隆抗体包被的固相载体和化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体。这种脂联素化学发光免疫检测试剂盒能够以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具,完成脂联素的检测。这种脂联素化学发光免疫检测试剂盒,经过实验,其检测灵敏度达到0.01ng/mL,相对于传统的脂联素的检测方法灵敏度至少提高了10倍,这种脂联素化学发光免疫检测试剂盒的检测精度较高。



1. 一种脂联素化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 包括: 脂联素单克隆抗体包被的固相载体和化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的脂联素化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述脂联素单克隆抗体包被的固相载体中, 所述固相载体为表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒。

3. 根据权利要求2所述的脂联素化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒为表面带有氨基、羧基、甲苯磺酰基或环氧乙烷基的磁微粒。

4. 根据权利要求2或3所述的脂联素化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒的粒径为 $0.05\mu\text{m}\sim 3\mu\text{m}$ 。

5. 根据权利要求1所述的脂联素化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述脂联素单克隆抗体包被的固相载体中, 所述固相载体上偶联有链霉亲和素、亲和素或中性亲和素, 所述脂联素单克隆抗体上偶联有生物素。

6. 根据权利要求1所述的脂联素化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中, 所述化学发光标记物为异鲁米诺、三联吡啶钌、吖啶酯、碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。

7. 根据权利要求1或6所述的脂联素化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中, 所述化学发光标记物上偶联有链霉亲和素、亲和素或中性亲和素, 所述脂联素单克隆抗体上偶联有生物素。

8. 根据权利要求1或6所述的脂联素化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中, 所述化学发光标记物与所述脂联素单克隆抗体通过化学反应键直接连接或通过蛋白交联剂连接。

9. 根据权利要求8所述的脂联素化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述蛋白交联剂选自碳酰二亚胺盐和琥珀酰亚胺中的至少一种。

10. 根据权利要求9所述的脂联素化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述蛋白交联剂选自1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺和磺酸化N-羟基琥珀酰亚胺中的至少一种。

11. 根据权利要求1所述的脂联素化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 还包括脂联素定标品。

12. 一种权利要求1~11中任一项所述的脂联素化学发光免疫检测试剂盒的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

将脂联素单克隆抗体和固相载体混合并充分反应, 得到脂联素单克隆抗体包被的固相载体; 以及

将化学发光标记物和脂联素单克隆抗体混合并充分反应, 得到化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体。

13. 根据权利要求12所述的脂联素化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述脂联素单克隆抗体包被的固相载体中, 所述固相载体为表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒;

所述将脂联素单克隆抗体和固相载体混合并充分反应, 得到脂联素单克隆抗体包被的

固相载体的操作为：取表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒的悬浮液，磁分离去上清后用缓冲液重悬，接着活化剂活化所述表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒的表面连接基团，接着加入脂联素单克隆抗体，室温下充分反应，磁分离去除上清后重悬，得到脂联素单克隆抗体包被的表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒。

14. 根据权利要求12所述的脂联素化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，所述脂联素单克隆抗体包被的固相载体中，所述固相载体上偶联有链霉亲和素、亲和素或中性亲和素，所述脂联素单克隆抗体上偶联有生物素；

所述将脂联素单克隆抗体和固相载体混合并充分反应，得到脂联素单克隆抗体包被的固相载体的操作为：将偶联有链霉亲和素、亲和素或中性亲和素的固相载体和偶联有生物素的脂联素单克隆抗体在缓冲液中混合，充分反应后得到脂联素单克隆抗体包被的固相载体。

15. 根据权利要求12所述的脂联素化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，所述化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中，所述化学发光标记物上偶联有链霉亲和素、亲和素或中性亲和素，所述脂联素单克隆抗体上偶联有生物素；

所述将化学发光标记物和脂联素单克隆抗体混合并充分反应，得到化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体的操作为：将偶联有链霉亲和素、亲和素或中性亲和素的化学发光标记物和偶联有生物素的脂联素单克隆抗体在缓冲液中混合，充分反应后得到化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体。

16. 根据权利要求12所述的脂联素化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，所述化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中，所述化学发光标记物与所述脂联素单克隆抗体通过化学反应键直接连接；

所述将化学发光标记物和脂联素单克隆抗体混合并充分反应，得到化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体的操作为：将脂联素单克隆抗体和化学发光标记物在缓冲液中混合，充分反应后得到化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体。

17. 根据权利要求12所述的脂联素化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，所述化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中，所述化学发光标记物与所述脂联素单克隆抗体通过蛋白交联剂连接；

所述将化学发光标记物和脂联素单克隆抗体混合并充分反应，得到化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体的操作为：将脂联素单克隆抗体、化学发光标记物和蛋白交联剂在缓冲液中混合，充分反应后得到化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体。

18. 一种脂联素的浓度的检测方法，采用如权利要求1~11中任一项所述脂联素化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，所述脂联素的浓度的检测方法包括如下步骤：

使用脂联素单克隆抗体包被的固相载体和化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体对待测样本进行夹心免疫试验，所述待测样本中的脂联素与脂联素单克隆抗体包被的固相载体和化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体反应，形成夹心复合物，经过清洗分离后，测得待测样本的发光强度；

使用脂联素单克隆抗体包被的固相载体和化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体对脂联素定标品进行夹心免疫试验，所述脂联素定标品中的脂联素与脂联素单克隆抗体包被的固相载体和化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体反应，形成夹心复合物，经过清

洗分离后,测得脂联素定标品的发光强度,根据所述脂联素定标品的发光强度和所述脂联素定标品的浓度构建横纵坐标分别为浓度和发光强度的脂联素的标准曲线;以及

将所述待测样本的发光信号带入所述脂联素的标准曲线中,计算得到所述待测样本中的脂联素的浓度。

脂联素化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及体外检测领域,尤其涉及一种脂联素化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 脂肪组织主要由大量聚集成团的脂肪细胞构成,脂联素(Adiponectin/ADPN)是脂肪细胞分泌的一种内源性生物活性多肽或蛋白质,在人体内以3-30ug/ml的浓度出现在循环血浆中。脂联素又被称作Acrp30、apM1、AdipoQ、GBP28,最初,脂联素是在人体皮下脂肪组织、血浆和鼠科动物的脂肪细胞中被发现。人体内的脂联素由244个氨基酸组成,分子量为30KD。由氨基末端的分泌信号序列(aa 1-18),一段特异序列(aa19-41),一组由22个氨基酸组成的胶原重复序列(aa 42-107),一段球状序列(aa108-244)组成。其中球状区是脂联素生物活性的关键部位,和TNF- α 的结构相似,脂联素与胶原VIII、X和补体C1q高度同源。脂联素的单聚体和三聚体是其生物活性形式或受体亲和配基可以特异性结合骨骼肌或肝脏细胞膜上的G蛋白耦联受体一型或二型脂联素受体,进而调节脂肪酸氧化和糖代谢。

[0003] 脂联素是一种胰岛素增敏激素(An Insulin-sensitizing Hormone),能改善胰岛素抗性(Insulin resistance)和动脉硬化症;对人体的研究发现,脂联素水平能预示II型糖尿病和冠心病的发展,并在临床试验表现出抗糖尿病、抗动脉粥样和炎症的潜力。

[0004] 传统的脂联素的检测方法主要采用酶联免疫吸附法,然而,受限于酶联免疫的特点,传统的脂联素的检测方法在检测过程中处于开放的空间,容易引起各种试剂之间的交叉污染,并且由于检测过程多采用手工操作,试剂或样本的加量不很精确,操作过程极为繁琐和复杂,容易发生操作差错,检测精度较差。

发明内容

[0005] 基于此,有必要提供一种检测精度较高的脂联素化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和应用。

[0006] 一种脂联素化学发光免疫检测试剂盒,包括:脂联素单克隆抗体包被的固相载体和化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体。

[0007] 在一个实施例中,所述脂联素单克隆抗体包被的固相载体中,所述固相载体为表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒。

[0008] 在一个实施例中,所述表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒为表面带有氨基、羧基、甲苯磺酰基或环氧乙烷基的磁微粒。

[0009] 在一个实施例中,所述表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒的粒径为0.05 μ m~3 μ m。

[0010] 在一个实施例中,所述脂联素单克隆抗体包被的固相载体中,所述固相载体上偶联有链霉亲和素、亲和素或中性亲和素,所述脂联素单克隆抗体上偶联有生物素。

[0011] 在一个实施例中,所述化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中,所述化学发

光标记物为异鲁米诺、三联吡啶钌、吖啶酯、碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。

[0012] 在一个实施例中,所述化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中,所述化学发光标记物上偶联有链霉亲和素、亲和素或中性亲和素,所述脂联素单克隆抗体上偶联有生物素。

[0013] 在一个实施例中,所述化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中,所述化学发光标记物与所述脂联素单克隆抗体通过化学反应键直接连接或通过蛋白交联剂连接。

[0014] 在一个实施例中,所述蛋白交联剂选自碳酰二亚胺盐和琥珀酰亚胺中的至少一种。

[0015] 在一个实施例中,所述蛋白交联剂选自1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺和磺酸化N-羟基琥珀酰亚胺中的至少一种。

[0016] 在一个实施例中,还包括脂联素定标品。

[0017] 一种上述的脂联素化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0018] 将脂联素单克隆抗体和固相载体混合并充分反应,得到脂联素单克隆抗体包被的固相载体;以及

[0019] 将化学发光标记物和脂联素单克隆抗体混合并充分反应,得到化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体。

[0020] 在一个实施例中,所述脂联素单克隆抗体包被的固相载体中,所述固相载体为表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒;

[0021] 所述将脂联素单克隆抗体和固相载体混合并充分反应,得到脂联素单克隆抗体包被的固相载体的操作为:取表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒的悬浮液,磁分离去上清后用缓冲液重悬,接着活化剂活化所述表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒的表面连接基团,接着加入脂联素单克隆抗体,室温下充分反应,磁分离去除上清后重悬,得到脂联素单克隆抗体包被的表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒。

[0022] 在一个实施例中,所述脂联素单克隆抗体包被的固相载体中,所述固相载体上偶联有链霉亲和素、亲和素或中性亲和素,所述脂联素单克隆抗体上偶联有生物素;

[0023] 所述将脂联素单克隆抗体和固相载体混合并充分反应,得到脂联素单克隆抗体包被的固相载体的操作为:将偶联有链霉亲和素、亲和素或中性亲和素的固相载体和偶联有生物素的脂联素单克隆抗体在缓冲液中混合,充分反应后得到脂联素单克隆抗体包被的固相载体。

[0024] 在一个实施例中,所述化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中,所述化学发光标记物上偶联有链霉亲和素、亲和素或中性亲和素,所述脂联素单克隆抗体上偶联有生物素;

[0025] 所述将化学发光标记物和脂联素单克隆抗体混合并充分反应,得到化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体的操作为:将偶联有链霉亲和素、亲和素或中性亲和素的化学发光标记物和偶联有生物素的脂联素单克隆抗体在缓冲液中混合,充分反应后得到化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体。

[0026] 在一个实施例中,所述化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中,所述化学发光标记物与所述脂联素单克隆抗体通过化学反应键直接连接;

[0027] 所述将化学发光标记物和脂联素单克隆抗体混合并充分反应,得到化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体的操作为:将脂联素单克隆抗体和化学发光标记物在缓冲液中混合,充分反应后得到化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体。

[0028] 在一个实施例中,所述化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中,所述化学发光标记物与所述脂联素单克隆抗体通过蛋白交联剂连接;

[0029] 所述将化学发光标记物和脂联素单克隆抗体混合并充分反应,得到化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体的操作为:将脂联素单克隆抗体、化学发光标记物和蛋白交联剂在缓冲液中混合,充分反应后得到化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体。

[0030] 一种脂联素的浓度的检测方法,采用上述脂联素化学发光免疫检测试剂盒,所述脂联素的浓度的检测方法包括如下步骤:

[0031] 使用脂联素单克隆抗体包被的固相载体和化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体对待测样本进行夹心免疫试验,所述待测样本中的脂联素与脂联素单克隆抗体包被的固相载体和化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体反应,形成夹心复合物,经过清洗分离后,测得待测样本的发光强度;

[0032] 使用脂联素单克隆抗体包被的固相载体和化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体对脂联素定标品进行夹心免疫试验,所述脂联素定标品中的脂联素与脂联素单克隆抗体包被的固相载体和化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体反应,形成夹心复合物,经过清洗分离后,测得脂联素定标品的发光强度,根据所述脂联素定标品的发光强度和所述脂联素定标品的浓度构建横纵坐标分别为浓度和发光强度的脂联素的标准曲线;以及

[0033] 将所述待测样本的发光信号带入所述脂联素的标准曲线中,计算得到所述待测样本中的脂联素的浓度。

[0034] 这种脂联素化学发光免疫检测试剂盒能够以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具,完成脂联素的检测。这种脂联素化学发光免疫检测试剂盒,经过实验,其检测灵敏度达到0.01ng/mL,相对于传统的脂联素的检测方法灵敏度至少提高了10倍,这种脂联素化学发光免疫检测试剂盒的检测精度较高。

附图说明

[0035] 图1为实施例3得到的脂联素的标准曲线图;

[0036] 图2为实施例7得到的脂联素的标准曲线图。

具体实施方式

[0037] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面结合附图和具体实施例对本发明的具体实施方式做详细的说明。在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明。但是本发明能够以很多不同于在此描述的其它方式来实施,本领域技术人员可以在不违背本发明内涵的情况下做类似改进,因此本发明不受下面公开的具体实施的限制。

[0038] 一实施方式的脂联素化学发光免疫检测试剂盒,包括:脂联素单克隆抗体包被的固相载体和化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体。

[0039] 脂联素单克隆抗体包被的固相载体中,脂联素单克隆抗体可以为人源、基因工程

表达或动物源。

[0040] 化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中,脂联素单克隆抗体可以为人源、基因工程表达或动物源。

[0041] 脂联素单克隆抗体包被的固相载体和化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中,各自使用的脂联素单克隆抗体可以相同,也可以不相同。

[0042] 在一个实施方式中,脂联素单克隆抗体包被的固相载体中,固相载体为表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒、表面可进行蛋白质物理吸附的硅基材料或经过高分子表面处理的磁微粒。

[0043] 固相载体为表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒或经过高分子表面处理的磁微粒时,优选的,脂联素单克隆抗体与磁微粒的质量比为1:25~35。

[0044] 表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒可以为表面带有氨基、羧基、甲苯磺酰基或环氧乙烷基的磁微粒。

[0045] 表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒的粒径优选为0.05 μ m~3 μ m。

[0046] 以固相载体为表面带有用于羧基的磁微粒为例,脂联素单克隆抗体包被的固相载体的制备过程可以为:取羧基化的磁微粒的悬浮液,磁分离去上清后用MES缓冲液重悬,接着加入EDC水溶液,活化羧基化的磁微粒的表面羧基,接着加入脂联素单克隆抗体,室温下混悬2h~10h,磁分离去除上清后用Tris缓冲液重悬,得到脂联素单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒。其中,MES(2-(N-吗啡啉)乙磺酸)缓冲液的浓度为0.02M,pH为5.5;Tris缓冲液的浓度为0.1M并且含有2%BSA,pH为8.0;EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺)水溶液的浓度为10mg/mL~20mg/mL,EDC与羧基化的磁微粒的比例为0.05:0.1~1。

[0047] 在另一个实施方式中,脂联素单克隆抗体包被的固相载体中,固相载体上偶联有链霉亲和素、亲和素或中性亲和素,脂联素单克隆抗体上偶联有生物素。

[0048] 脂联素单克隆抗体包被的固相载体可以是直接购买的商品化亲和素固相载体,也可以是通过亲和素化学键和偶联其他固相载体制备的亲和素固相载体。

[0049] 化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中,化学发光标记物为异鲁米诺、三联吡啶钼、吖啶酯、碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。

[0050] 优选的,抑制素单克隆抗体标记的化学发光标记物中,脂联素单克隆抗体与化学发光标记物的比例为50:1~10。

[0051] 在一个实施例中,化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中,化学发光标记物上偶联有链霉亲和素、亲和素或中性亲和素,脂联素单克隆抗体上偶联有生物素。

[0052] 以化学发光标记物上偶联有链霉亲和素,脂联素单克隆抗体上偶联有生物素为例,化学发光标记物为吖啶酯为例,化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体的制备过程如下:取脂联素单克隆抗体溶液,加入500 μ L pH8.0的磷酸盐缓冲液,加入0.1mg生物素琥珀酰亚胺(Biotin-NHS)混合,室温下避光反应,1h~2h后取出,离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先分别用纯净水及TBS缓冲液进行处理,收集脱盐管中的液体保存,得到生物素标记的脂联素单克隆抗体;取链霉亲和素溶液,加入0.1M~0.2M pH 9.0~9.5的碳酸盐缓冲液,混匀,然后加入吖啶酯混匀,室温下避光反应,1~2h后取出,用zeba离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先分别用纯净水及TBS缓冲液进行处理,最后加入得到的吖啶酯标记的链霉亲和素;将生物素标记的脂联素单克隆抗体和吖啶酯标记的链霉亲和素混合,得到吖啶酯

标记的脂联素单克隆抗体。

[0053] 在另一实施例中,化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中,化学发光标记物与脂联素单克隆抗体通过化学反应键直接连接或通过蛋白交联剂连接。

[0054] 蛋白交联剂可以为碳酰二亚胺盐和琥珀酰亚胺中的至少一种。

[0055] 优选的,蛋白交联剂选自1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺和磺酸化N-羟基琥珀酰亚胺中的至少一种。

[0056] 以化学发光标记物为吖啶酯为例,化学发光标记物与脂联素单克隆抗体通过化学反应键直接连接制得化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体的过程如下:取脂联素单克隆抗体,加入碳酸盐缓冲液,混匀,然后加入吖啶酯混匀,室温下避光反应,1h~2h后取出,离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先分别用纯净水及TBS缓冲液进行处理,得到吖啶酯标记的脂联素单克隆抗体。

[0057] 以化学发光标记物为碱性磷酸酶,蛋白交联剂为1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺为例,化学发光标记物与脂联素单克隆抗体通过蛋白交联剂连接制得化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体的过程如下:取1mg脂联素单克隆抗体溶液、1mg碱性磷酸酶,加入500 μ L pH5.5的2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)缓冲液,加入1mg1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐和1mg N-羟基琥珀酰亚胺混合,室温下避光反应,1h~2h后取出,离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先分别用纯净水及TBS缓冲液进行处理,收集脱盐管中的液体保存,得到碱性磷酸酶标记的脂联素单克隆抗体。

[0058] 在其他的实施例中,上述脂联素化学发光免疫检测试剂盒还包括化学发光底物液。

[0059] 化学发光底物液包括A液和B液。A液可以为H₂O₂溶液,B液可以为NaOH溶液。

[0060] 本实施例中,A液为浓度为0.1mol/L的H₂O₂溶液,B液为浓度为0.25mol/L的NaOH溶液。

[0061] 在其他的实施例中,上述脂联素化学发光免疫检测试剂盒还包括脂联素定标品。

[0062] 脂联素定标品的制备过程如下:采用定标品缓冲液将脂联素配制成浓度分别为0~200ng/mL的脂联素的溶液。

[0063] 具体的,脂联素定标品为浓度分别为0ng/mL、0.5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、80ng/mL和200ng/mL的脂联素的溶液。

[0064] 这种脂联素化学发光免疫检测试剂盒能够以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具,完成脂联素的检测。这种脂联素化学发光免疫检测试剂盒,经过实验,其检测灵敏度达到0.01ng/mL,相对于传统的脂联素的检测方法灵敏度至少提高了10倍,这种脂联素化学发光免疫检测试剂盒的检测精度较高。

[0065] 这种脂联素化学发光免疫检测试剂盒使用时先利用全自动化学发光免疫分析仪对脂联素定标品进行检测,绘制标准曲线,内置于电脑软件,测试实际样本,根据样本发光值计算样本浓度,最后对脂联素全自动化学发光免疫分析系统进行性能(灵敏度、线性、精密性、干扰性)的评价。

[0066] 这种脂联素化学发光免疫检测试剂盒,具有以下优点:

[0067] 1、选择吖啶酯作为标记材料,并应用于化学发光免疫分析系统,该发光体系为直

接化学发光,与传统的酶促化学发光相比,该反应不需要酶的参与,更加节约成本;

[0068] 2、选用的吡啶酯或碱性磷酸酶化学发光免疫分析系统检测灵敏度高,能够达到0.01ng/mL,相比其它的检测方法灵敏度至少提高了10倍;

[0069] 3、选用吡啶酯的化学发光免疫分析系统线性范围宽,能达到200ng/mL以上;

[0070] 4、吡啶酯化学发光免疫分析系统重复性高,批内及批间差均在5%以内,这是其它化学发光免疫分析系统难以达到的;

[0071] 5、化学发光免疫分析系统已实现样本的定量,通过内置标准曲线到测试软件,只需测试样本就可直接得到样本的浓度值;

[0072] 6、化学发光免疫分析系统可以实现全自动化,试剂及样本的添加全有仪器完成,操作更加简便,减少了人为的误差。

[0073] 综上所述,这种脂联素化学发光免疫检测试剂盒检测成本低、灵敏度高、检测线性范围广、重现性高、可以定量、操作简单。

[0074] 此外,使用这种脂联素化学发光免疫检测试剂盒,通过测定特定人群的脂联素浓度水平或分布,受试者脂联素浓度与之比较,若偏离标定人群的脂联素浓度水平,则提示受试者为非健康或功能弱。也可以对同一受试者,进行连续脂联素水平监测,以评估胰岛素抗性和动脉硬化症,预示11型糖尿病和冠心病的发展,提示抗糖尿病、抗动脉粥样和炎症的潜力。

[0075] 本发明还公开了一种上述的脂联素化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0076] S110、将脂联素单克隆抗体和固相载体混合并充分反应,得到脂联素单克隆抗体包被的固相载体。

[0077] 脂联素单克隆抗体包被的固相载体中,脂联素单克隆抗体可以为人源、基因工程表达或动物源。

[0078] 在一个实施方式中,脂联素单克隆抗体包被的固相载体中,固相载体为表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒、表面可进行蛋白质物理吸附的硅基材料或经过高分子表面处理的磁微粒。

[0079] 固相载体为表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒或经过高分子表面处理的磁微粒时,优选的,脂联素单克隆抗体与磁微粒的质量比为1:25~35。

[0080] 表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒可以为表面带有氨基、羧基、甲苯磺酰基或环氧乙烷基的磁微粒。

[0081] 表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒的粒径优选为0.05 μ m~3 μ m。

[0082] 当脂联素单克隆抗体包被的固相载体中,固相载体为表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒时,S110为:取表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒的悬浮液,磁分离去上清后用缓冲液重悬,接着活化剂活化表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒的表面连接基团,接着加入脂联素单克隆抗体,室温下充分反应,磁分离去除上清后重悬,得到脂联素单克隆抗体包被的表面带有用于蛋白质化学反应连接基团的磁微粒。

[0083] 以固相载体为表面带有用于羧基的磁微粒为例,脂联素单克隆抗体包被的固相载体的制备过程可以为:取羧基化的磁微粒的悬浮液,磁分离去上清后用MES缓冲液重悬,接

着加入EDC水溶液,活化羧基化的磁微粒的表面羧基,接着加入脂联素单克隆抗体,室温下混悬2h~10h,磁分离去除上清后用Tris缓冲液重悬,得到脂联素单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒。其中,MES(2-(N-吗啡啉)乙磺酸)缓冲液的浓度为0.02M,pH为5.5;Tris缓冲液的浓度为0.1M并且含有2%BSA,pH为8.0;EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺)水溶液的浓度为10mg/mL~20mg/mL,EDC与羧基化的磁微粒的比例为0.05:0.1~1。

[0084] 在另一个实施方式中,脂联素单克隆抗体包被的固相载体中,固相载体上偶联有链霉亲和素、亲和素或中性亲和素,脂联素单克隆抗体上偶联有生物素。

[0085] 脂联素单克隆抗体包被的固相载体可以是直接购买的商品化亲和素固相载体,也可以是通过亲和素化学键和偶联其他固相载体制备的亲和素固相载体。

[0086] 脂联素单克隆抗体包被的固相载体中,固相载体上偶联有链霉亲和素、亲和素或中性亲和素,脂联素单克隆抗体上偶联有生物素时,S110为:将偶联有链霉亲和素、亲和素或中性亲和素的固相载体和偶联有生物素的脂联素单克隆抗体在缓冲液中混合,充分反应后得到脂联素单克隆抗体包被的固相载体。

[0087] S120、将化学发光标记物和脂联素单克隆抗体混合并充分反应,得到化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体。

[0088] S110和S120的次序可以替换,不影响本方法。

[0089] 化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中,脂联素单克隆抗体可以为人源、基因工程表达或动物源。

[0090] 脂联素单克隆抗体包被的固相载体和化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中,各自使用的脂联素单克隆抗体可以相同,也可以不相同。

[0091] 化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中,化学发光标记物为异鲁米诺、三联吡啶钌、吖啶酯、碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。

[0092] 优选的,抑制素单克隆抗体标记的化学发光标记物中,脂联素单克隆抗体与化学发光标记物的比例为50:1~10。

[0093] 在一个实施例中,化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中,化学发光标记物上偶联有链霉亲和素、亲和素或中性亲和素,脂联素单克隆抗体上偶联有生物素。

[0094] 化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中,化学发光标记物上偶联有链霉亲和素、亲和素或中性亲和素,脂联素单克隆抗体上偶联有生物素时,S120为:将偶联有链霉亲和素、亲和素或中性亲和素的化学发光标记物和偶联有生物素的脂联素单克隆抗体在缓冲液中混合,充分反应后得到化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体。

[0095] 具体的,以化学发光标记物上偶联有链霉亲和素,脂联素单克隆抗体上偶联有生物素为例,化学发光标记物为吖啶酯为例,化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体的制备过程如下:取脂联素单克隆抗体溶液,加入500μL pH8.0的磷酸盐缓冲液,加入0.1mg生物素琥珀酰亚胺(Biotin-NHS)混合,室温下避光反应,1h~2h后取出,离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先分别用纯净水及TBS缓冲液进行处理,收集脱盐管中的液体保存,得到生物素标记的脂联素单克隆抗体;取链霉亲和素溶液,加入0.1M~0.2M pH 9.0~9.5的碳酸盐缓冲液,混匀,然后加入吖啶酯混匀,室温下避光反应,1~2h后取出,用zeba离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先分别用纯净水及TBS缓冲液进行处理,最后加入得到的吖啶酯标记的链霉亲和素;将生物素标记的脂联素单克隆抗体和吖啶酯标记的链霉亲和素混合,得到

吡啶酯标记的脂联素单克隆抗体。

[0096] 在另一实施例中,化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中,化学发光标记物与脂联素单克隆抗体通过化学反应键直接连接或通过蛋白交联剂连接。

[0097] 蛋白交联剂可以为碳酰二亚胺盐和琥珀酰亚胺中的至少一种。

[0098] 优选的,蛋白交联剂选自1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺和磺酸化N-羟基琥珀酰亚胺中的至少一种。

[0099] 化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中,化学发光标记物与脂联素单克隆抗体通过化学反应键直接连接时,S120为:将脂联素单克隆抗体和化学发光标记物在缓冲液中混合,充分反应后得到化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体。

[0100] 具体的,以化学发光标记物为吡啶酯为例,化学发光标记物与脂联素单克隆抗体通过化学反应键直接连接制得化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体的过程如下:取脂联素单克隆抗体,加入碳酸盐缓冲液,混匀,然后加入吡啶酯混匀,室温下避光反应,1h~2h后取出,离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先分别用纯净水及TBS缓冲液进行处理,得到吡啶酯标记的脂联素单克隆抗体。

[0101] 化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体中,化学发光标记物与脂联素单克隆抗体通过蛋白交联剂连接时,S120为:将脂联素单克隆抗体、化学发光标记物和蛋白交联剂在缓冲液中混合,充分反应后得到化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体。

[0102] 具体的,以化学发光标记物为碱性磷酸酶,蛋白交联剂为1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺为例,化学发光标记物与脂联素单克隆抗体通过蛋白交联剂连接制得化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体的过程如下:取1mg脂联素单克隆抗体溶液、1mg碱性磷酸酶,加入500μL pH5.5的2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)缓冲液,加入1mg1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐和1mg N-羟基琥珀酰亚胺混合,室温下避光反应,1h~2h后取出,离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先分别用纯净水及TBS缓冲液进行处理,收集脱盐管中的液体保存,得到碱性磷酸酶标记的脂联素单克隆抗体。

[0103] 在其他的实施例中,脂联素化学发光免疫检测试剂盒还包括化学发光底物液。

[0104] 化学发光底物液包括A液和B液。A液可以为H₂O₂溶液,B液可以为NaOH溶液。

[0105] 本实施例中,A液为浓度为0.1mol/L的H₂O₂溶液,B液为浓度为0.25mol/L的NaOH溶液。

[0106] 在其他的实施例中,脂联素化学发光免疫检测试剂盒还包括脂联素定标品。

[0107] 脂联素定标品的制备过程如下:采用定标品缓冲液将脂联素配制成浓度分别为0~30ng/mL的脂联素的溶液。

[0108] 具体的,脂联素定标品为浓度分别为0ng/mL、0.5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、80ng/mL和200ng/mL的脂联素的溶液。

[0109] 本发明还公开了用上述脂联素化学发光免疫检测试剂盒的脂联素的浓度的检测方法,包括如下步骤:

[0110] S210、使用脂联素单克隆抗体包被的固相载体和化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体对待测样本进行夹心免疫试验,待测样本中的脂联素与脂联素单克隆抗体包被的

固相载体和化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体反应,形成夹心复合物,经过清洗分离后,测得待测样本的发光信号。

[0111] S220、使用脂联素单克隆抗体包被的固相载体和化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体对脂联素定标品进行夹心免疫试验,脂联素定标品中的脂联素与脂联素单克隆抗体包被的固相载体和化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体反应,形成夹心复合物,经过清洗分离后,测得脂联素定标品的发光强度,根据脂联素定标品的发光强度和脂联素定标品的浓度构建横纵坐标分别为浓度和发光强度的脂联素的标准曲线。

[0112] S210和S220的次序可以替换,不影响本方法。

[0113] 脂联素定标品的制备过程如下:采用定标品缓冲液将脂联素配制成浓度分别为0~30ng/mL的脂联素的溶液。

[0114] 具体的,脂联素定标品为浓度分别为0ng/mL、0.5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、80ng/mL和200ng/mL的脂联素的溶液。

[0115] S230、将S210得到的待测样本的发光信号带入S220得到的脂联素的标准曲线中,计算得到待测样本中的脂联素的浓度。

[0116] 以下为具体实施例。

[0117] 实施例1:脂联素化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0118] (1)脂联素单克隆抗体包被的磁颗粒的制备:

[0119] 取50mg粒径为0.05 μ m~3 μ m的羧基化的磁微粒(MagnaBind™,货号21353)悬浮液,磁分离去上清,用0.02M,pH为5.5的MES缓冲液重悬,加入0.5mL~2mL新配置的10mg/mL的EDC水溶液,活化磁珠表面羧基,加入3mg~5mg的脂联素单克隆抗体(Novus,NB100-65810),室温下混悬2h~10h,磁分离,去除上清,用含2%BSA的0.1M pH为8.0的Tris缓冲液重悬到1mg/mL,得到脂联素单克隆抗体包被的磁颗粒,每瓶5mL分装保存于4℃备用。

[0120] (2)吡啶酯标记的脂联素单克隆抗体的制备:

[0121] 取500 μ L 1.0mg/mL的脂联素单克隆标记抗体(Thermo Fisher Scientific,PA1-054)溶液,加入500 μ L 0.1~0.2M pH 9.0~9.5的碳酸盐缓冲液,混匀,然后加入10~20 μ L 5mg/mL的吡啶酯混匀,室温下避光反应,1~2h后取出,用2mL的zeba离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先分别用纯净水及TBS缓冲液进行处理,最后加入得到的吡啶酯标记的脂联素单克隆抗体溶液,收集离心管中的液体至保存管得到吡啶酯标记的脂联素单克隆抗体,每瓶1mL分装保存于4℃备用。

[0122] (3)脂联素定标品的制备:

[0123] 用标准品缓冲液(40mM Tris-HCl,0.5%BSA,1%NaCl,pH 8.0)将人源化脂联素蛋白配置成浓度为0ng/mL、0.5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、80ng/mL和200ng/mL,每瓶0.5mL分装,经冻干处理后,4℃保存备用。

[0124] 实施例2:脂联素吡啶酯化学发光免疫检测方法

[0125] 本发明以全自动化学发光免疫分析仪和实施例1制得的脂联素化学发光免疫检测试剂盒为检测工具,本发明的方法学模式为夹心法,即仪器依次加入50 μ L的样品、50 μ L的脂联素单克隆抗体包被的磁颗粒以及50 μ L的吡啶酯标记的脂联素单克隆抗体,反应10min后,进行磁分离,仪器将反应混合物送入暗室,依次加入发光底物A液(含0.1M HNO₃和0.5% H₂O₂)及B液(含0.25M NaOH)进行发光反应,最后记录发光强度,从标准曲线计算出被测样品

的脂联素含量。

[0126] 实施例3:实施例1制得的脂联素化学发光免疫检测试剂盒性能评价

[0127] 采用实施例2中的方法对脂联素定标品进行检测,得到绘制标准曲线如图1所示。

[0128] 灵敏度的检测:

[0129] 参照CLSI EP17-A文件推荐实验方案,计算脂联素化学发光免疫试剂盒的灵敏度,求得的灵敏度为0.01ng/mL。

[0130] 线性的检测:

[0131] 对浓度为0.01ng/mL、0.5ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL标准品做线性分析,计算线性相关系数, $r=0.9994$,另外,该试剂盒对脂联素样品检测的线性范围为0.01-200ng/mL。

[0132] 精密度测定:

[0133] 取浓度为0.1ng/mL及100ng/mL两个脂联素样品,每个样本每个浓度各做3个平行,用三批试剂盒进行检测,计算试剂盒批内及批间差,结果表明该试剂盒批内及批间差均小于5%。

[0134] 干扰性实验:

[0135] 取混合血清分别添加干扰物包括:结合胆红素、游离胆红素、血红蛋白、抗坏血酸、甘油酯,添加质量比按照1:20进行,分别测定混合血清及添加了各种干扰物后混合血清的测值,计算二者之间的偏差,以 $\pm 10\%$ 为可接受范围。结果表明,干扰性均达到NCCLS的文件标准,可用于临床实验室脂联素状况的准确评估。

[0136] 实施例4、脂联素化学发光免疫检测试剂盒的对比实验

[0137] 分别用实施例2中的化学发光检测方法和传统的酶联免疫吸附法对浓度为0、0.05ng/mL的脂联素样品做检测,对零浓度样本进行20次重复测试,计算零浓度样本的均值(M)和SD,将 $M+2SD$ 的RLU值带入定标方程中,求出对应的浓度值,即为检测灵敏度。两种方法检测灵敏度相比,数据如下表所示:

[0138]

测试次数	化学发光检测 (RLU)	酶联免疫吸附法检测 (OD)
1	1057	0.066
2	1206	0.079
3	1097	0.069
4	1063	0.081
5	1110	0.073
6	1017	0.069
7	1047	0.056

[0139]

8		1107	0.074
9		989	0.063
10		1039	0.059
11		1102	0.087
12		1053	0.068
13		1004	0.074
14		1058	0.068
15		1110	0.071
16		1055	0.072
17		1048	0.067
18		1102	0.081
19		992	0.067
20		1080	0.069
Mean		1067	0.071
SD		50	0.007
M+2SD		1168	0.086
50pg/mL	1	11206	0.133
	2	10936	0.141
	3	10498	0.142
	Mean	10880	0.139
灵敏度 (pg/mL)		0.51	10.42

[0140] 由上表可以看出,化学发光检测方法的灵敏度较酶联免疫吸附法提高了约50倍。

[0141] 实施例5:脂联素化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0142] (1)脂联素单克隆抗体包被的磁颗粒的制备:

[0143] 取50mg粒径为0.05 μ m~2 μ m的甲苯磺酰基化的磁微粒(Dyna1,30110D)悬浮液,磁分离去上清,用pH9.0~11.0的硼酸盐缓冲液重悬,加入2mg~4mg的脂联素单克隆抗体(Novus,NB100-65810),加入0.5mL~2mL饱和硫酸铵溶液,37℃下旋转混合反应20h~30h,磁分离,去除上清,用含2%BSA的0.1M pH为8.0的Tris缓冲液重悬到1mg/mL,得到脂联素单克隆抗体包被的磁颗粒,每瓶5mL分装保存于4℃备用。

[0144] (2)碱性磷酸酶标记的脂联素单克隆抗体的制备:

[0145] 取500 μ L 2.0mg/mL的脂联素单克隆标记抗体(Thermo Fisher Scientific,PA1-054),加入500 μ L pH5.0的MES酸性缓冲液,加入1mg碱性磷酸酶混匀,然后加入1mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC.HCL)交联剂或加入1mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC.HCL)及1mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)混合交联剂,室温下避光反应,1h~2h后取出,离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先分别用纯净水及TBS缓冲液进行处理,收集脱盐管中的液体保存。将脱盐液上AKTA蛋白纯化系统进行纯化,收集得到碱性磷酸酶标记的脂联素单克隆抗体,每瓶1mL分装保存于4℃备用。

[0146] (3)脂联素定标品的制备:

[0147] 用标准品缓冲液(40mM Tris-HCl,0.5%BSA,1%NaCl,pH 8.0)将人源化脂联素蛋白配置成浓度为0ng/mL、0.5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、80ng/mL和200ng/mL,每瓶0.5mL分

装,经冻干处理后,4℃保存备用。

[0148] 实施例6:脂联素碱性磷酸酶化学发光免疫检测方法

[0149] 本发明以全自动化学发光免疫分析仪和实施例5制得的脂联素化学发光免疫检测试剂盒为检测工具,本发明的方法学模式为夹心法,即仪器依次加入20μL的样品、50μL的脂联素单克隆抗体包被的磁颗粒以及50μL的碱性磷酸酶标记的脂联素抗体,反应10min后,进行磁分离,仪器将反应混合物送入暗室,加入AMPPD发光底物进行发光反应,最后记录发光强度,从标准曲线计算出被测样品的脂联素含量。

[0150] 实施例7:实施例5制得的脂联素化学发光免疫检测试剂盒性能评价

[0151] 采用实施例6中的方法对脂联素定标品进行检测,得到绘制标准曲线如图2所示。

[0152] 灵敏度的检测:

[0153] 参照CLS1 EP17-A文件推荐实验方案,计算脂联素化学发光免疫试剂盒的灵敏度,求得的灵敏度为0.02ng/mL。

[0154] 实施例8:脂联素化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0155] (1)脂联素单克隆抗体包被的磁颗粒的制备。

[0156] 与实施例5中(1)一致。

[0157] (2)生物素标记脂联素单克隆抗体的制备:

[0158] 取500μL 2.0mg/mL的脂联素单克隆标记抗体,加入500μL pH8.0的磷酸盐缓冲液,加入0.1mg生物素琥珀酰亚胺(Biotin-NHS)混合,室温下避光反应,1~2h后取出,离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先分别用纯净水及TBS缓冲液进行处理,收集脱盐管中的液体保存。得到生物素标记的脂联素单克隆抗体,每瓶1mL分装保存于4℃备用。

[0159] (3)吡啶酯标记的链霉亲和素的制备:

[0160] 取500μL 1.0mg/mL的链霉亲和素,加入500μL 0.1~0.2M pH 9.0~9.5的碳酸盐缓冲液,混匀,然后加入10~20μL 5mg/mL的吡啶酯混匀,室温下避光反应,1~2h后取出,用2mL的zeba离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先分别用纯净水及TBS缓冲液进行处理,最后加入得到的吡啶酯标记的链霉亲和素,收集离心管中的液体至保存管得到吡啶酯标记的链霉亲和素,每瓶1mL分装保存于4℃备用。

[0161] (4)吡啶酯标记的脂联素单克隆抗体的制备:将生物素标记脂联素单克隆抗体和吡啶酯标记的链霉亲和素按照4:1比例混合,得到吡啶酯标记的脂联素单克隆抗体。

[0162] (5)脂联素定标品的制备:

[0163] 用标准品缓冲液(40mM Tris-HCl,0.5%BSA,1%NaCl,pH 8.0)将人源化脂联素蛋白配置成浓度为0ng/mL、0.5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、80ng/mL和200ng/mL,每瓶0.5mL分装,经冻干处理后,4℃保存备用。

[0164] 实施例9:亲和素-生物素系统免疫检测脂联素的方法

[0165] 以全自动化学发光免疫分析仪和实施例8制得的脂联素化学发光免疫检测试剂盒为检测工具,即仪器依次加入10μL的样品、50μL的脂联素单克隆抗体包被的磁颗粒以及50μL的生物素标记的脂联素抗体、50μL吡啶酯标记的链霉亲和素,反应20min后,进行磁分离,仪器将反应混合物送入暗室,依次加入发光底物A液(含0.1M HNO₃和0.5%H₂O₂)及B液(含0.25M NaOH)进行发光反应,最后记录发光强度,从标准曲线计算出被测样品的脂联素含量。

[0166] 实施例10:实施例8制得的脂联素化学发光免疫检测试剂盒性能评价

[0167] 灵敏度的检测:

[0168] 参照CLSI EP17-A文件推荐实验方案,计算脂联素化学发光免疫试剂盒的灵敏度,求得的灵敏度为0.005ng/mL。

[0169] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

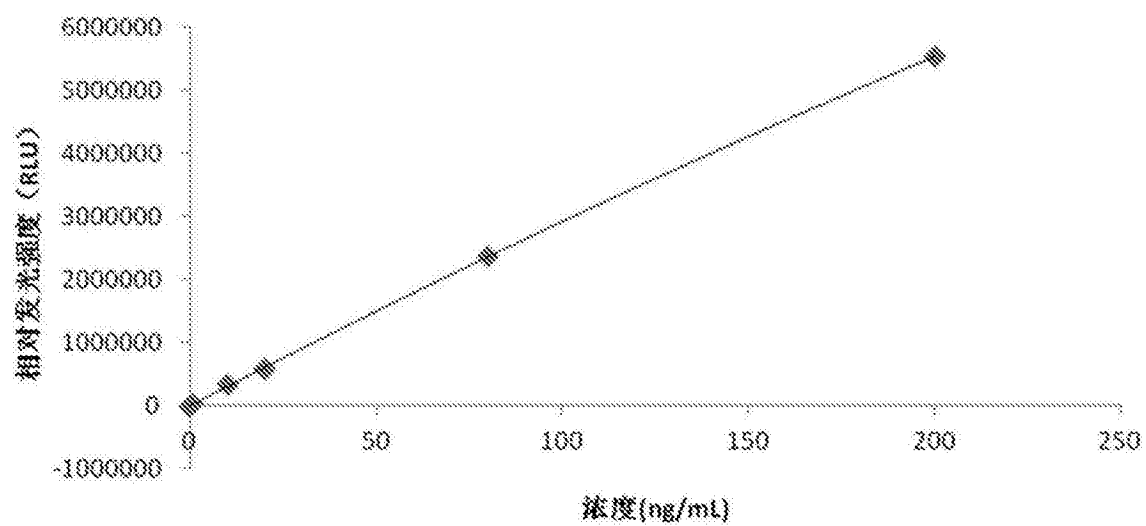


图1

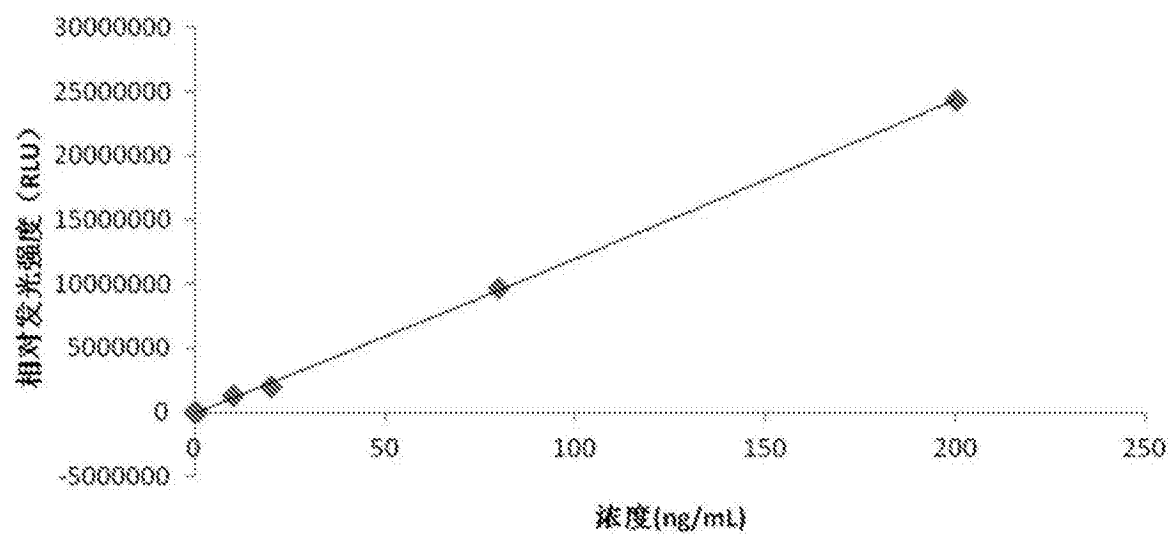


图2

专利名称(译)	脂联素化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN106199011A	公开(公告)日	2016-12-07
申请号	CN201610505400.7	申请日	2016-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司		
[标]发明人	夏福臻 钱纯亘 王刚 祝亮 何雨禧		
发明人	夏福臻 钱纯亘 王刚 祝亮 何雨禧		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/532 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/532 G01N33/74		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种脂联素化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和应用，脂联素化学发光免疫检测试剂盒包括：脂联素单克隆抗体包被的固相载体和化学发光标记物标记的脂联素单克隆抗体。这种脂联素化学发光免疫检测试剂盒能够以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具，完成脂联素的检测。这种脂联素化学发光免疫检测试剂盒，经过实验，其检测灵敏度达到0.01ng/mL，相对于传统的脂联素的检测方法灵敏度至少提高了10倍，这种脂联素化学发光免疫检测试剂盒的检测精度较高。

