



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104007260 A

(43) 申请公布日 2014.08.27

(21) 申请号 201410265732.3

(22) 申请日 2014.06.13

(71) 申请人 天津康尔克生物科技有限公司

地址 301706 天津市武清区大碱厂镇兰家庄村西

(72) 发明人 兰成杰

(74) 专利代理机构 天津滨海科纬知识产权代理有限公司 12211

代理人 杨慧玲

(51) Int. Cl.

G01N 33/573(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

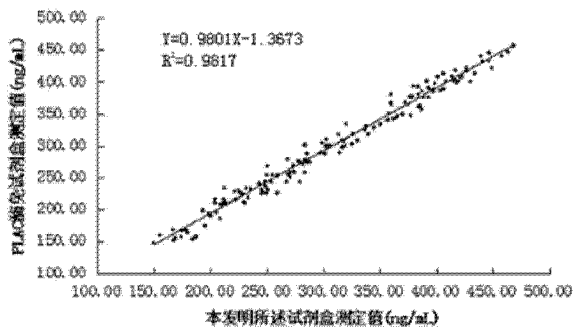
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

一种脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒及制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒及制备方法,该脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒包括:标准品和质控品、包被载体、酶标记物、显色液、分析缓冲液及浓缩洗涤液;该脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒制备方法包括:制备脂蛋白相关磷脂酶 A2 标准品和质控品;制备包被有脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体的载体;制备脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体酶标记物;制备分析缓冲液;制备浓缩洗涤液;组装脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒。本发明可以取代其他试剂盒来进行脂蛋白相关磷脂酶 A2 的定量检测。本发明试剂盒价格低廉,而且操作简便,灵敏度高,便于在临床上大规模推广使用。



1. 一种脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒包括:标准品和质控品、包被载体、酶标记物、显色液、分析缓冲液及浓缩洗涤液;

标准品和质控品是以胎牛血清为基质,由脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗原稀释而成,其中标准品的浓度包括 1000ng/mL、500ng/mL、250ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、0ng/mL 共 6 个浓度,质控品分为质控低值和质控高值,浓度范围依次为 $150 \pm 30\text{ng/mL}$ 、 $300 \pm 60\text{ng/mL}$ 。

2. 如权利要求 1 所述的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述包被载体为微孔板、磁性颗粒或塑料管。

3. 如权利要求 1 所述的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述酶标记物为碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。

4. 如权利要求 1 所述的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述显色液为四甲基苯胺或 3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3'-磷酸氧基)苯基-1,2-二氧乙烷。

5. 如权利要求 1 所述的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述分析缓冲液为含有 1%牛血清白蛋白和 0.05%吐温的 10mM 磷酸盐缓冲溶液, pH 为 7.2-7.4。

6. 如权利要求 1 所述的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述浓缩洗涤液为含有 1%吐温的 20mM 磷酸盐缓冲溶液, pH 为 7.2-7.4。

7. 一种脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒制备方法,其特征在于,所述脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒制备方法包括以下步骤:

步骤一,制备脂蛋白相关磷脂酶 A2 标准品和质控品:

用 $\text{pH} = 7.4$, 20mmol/L 的 PBS 缓冲液与胎牛血清按体积比 3:1 比例混合配制成基础缓冲液,用基础缓冲液将脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗原稀释成浓度为 1000、500、250、100、50、0ng/mL 标准品;用基础缓冲液将脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗原稀释成浓度为 $300 \pm 60\text{ng/mL}$ 的高值质控品和 $150 \pm 30\text{ng/mL}$ 的低值质控品;

步骤二,制备包被有脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体的载体:

所述包被载体为微孔板或塑料管时,包被载体通过以下方法制备:脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体用包被缓冲液稀释,取待包被载体,将经过稀释的脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体负载于载体上,包被结束后,吸去包被缓冲液,再加入封闭缓冲液,置于 37°C 封闭 2 小时或 4°C 封闭过夜;弃去封闭液,室温 $18-25^\circ\text{C}$ 干燥 3-4 小时后加入干燥剂密封包装,得到脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体包被载体,所述包被缓冲液为 pH 为 7.2-7.4、10mmol/L 磷酸盐溶液,脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体的稀释浓度为 $1\mu\text{g/mL}$;稀释的脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体在载体上的包被量可为每孔 100uL;包被的条件可置于 37°C 包被 2 小时或 4°C 包被过夜;封闭缓冲液为 pH7.2-7.4、10mmol/L PBST 溶液,内含 1% BSA 及 1~10%蔗糖;封闭缓冲液的加入量可为每孔 300uL;封闭后包被载体的干燥环境相对湿度小于 30%;

步骤三,制备脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体酶标记物:

用于标记的酶为碱性磷酸酶时,酶标记抗体的制备方法为:采用戊二醛交联法将脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体与碱性磷酸酶偶联,用 pH 为 7.2、10mmol/L PBS 缓冲液充分透析,在透析后的结合物溶液中加入等体积的甘油, -20°C 以下保存;标记好的脂蛋白相关磷脂酶 A2

抗体酶结合物可用 20% 胎牛血清稀释液稀释至工作浓度, 置于 4℃ 保存至有效期, 胎牛血清稀释液为 pH 为 7.4、20mmol/L PBST 溶液, 内含 20% 胎牛血清、1 ~ 10% 蔗糖、0.01% 食品红;

步骤四, 制备分析缓冲液, 分析缓冲液为 pH7.4、10mmol/L PBST 缓冲液, 内含 1% BSA、1% 防腐剂;

步骤五, 制备浓缩洗涤液, 浓缩洗涤液为 pH7.2-7.4、20mmol/L PBS 缓冲液, 内含 1% 吐温;

步骤六, 组装脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒, 将标准品和质控品、包被载体、酶标记物、显色液、分析缓冲液及浓缩洗涤液组装成脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒。

8. 如权利要求 7 所述的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒制备方法, 其特征在于, 在步骤二中, 载体为磁性颗粒时, 包被载体通过以下方法制备: 吸取 3mL 内含 2% 磁颗粒的 PBS 溶液, 用磁力架分离, 用去离子水清洗; 用清洗液清洗磁颗粒并调整体积至 6mL; 加入 5mg 脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体, 置于 4℃ 内混匀 30min; 加入 12mg 碳二亚胺, 置于 4℃ 内孵育过夜; 用 pH7.4、100mmol/L PBS 缓冲液清洗磁颗粒; 加入 Tris 和 EDTA, 使终浓度依次为 50mmol/L 和 4mmol/L; 调节 pH 至 7.4, 抗体终浓度为 1mg/mL, 得到脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体包被载体, 清洗液为 pH6.0、10mmol/L PBS 缓冲液。

9. 如权利要求 7 所述的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒制备方法, 其特征在于, 在步骤三中, 用于标记的酶为辣根过氧化物酶时, 酶标记抗体的制备方法为: 溶解 2mg 辣根过氧化物酶于 1mL 去离子水中, 加入 0.4mL 50mmol/L 过碘酸钠溶液, 4℃ 缓慢摇动 30min, 用 pH4.4、1mmol/L 醋酸钠缓冲液透析过夜, 加入 2mg 脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体, 4℃ 震荡过夜, 使用 400uL 200mmol/L NaBH₄ 溶液进行还原, 经 pH7.4、20mmol/L PBS 缓冲液透析过夜后用 HPLC 二次纯化, 收集蛋白峰, 加入等体积甘油, -20℃ 以下保存; 标记好的脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体酶结合物可用 20% 胎牛血清稀释液稀释至工作浓度, 可置于 4℃ 保存至有效期, 胎牛血清稀释液为 pH7.4、10mmol/L PBST 溶液, 内含 20% 胎牛血清、1% 蔗糖、0.01% 食品红。

一种脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测分析技术领域,尤其涉及一种脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒及制备方法。

背景技术

[0002] 动脉粥样硬化 (atherosclerosis) 是严重危害人类健康的常见病种,在过去很长一段时间内始终是医学和生物化学研究的重点。因为它普及面广,在人体内潜伏期长,往往以局部缺血、心绞痛、心肌梗塞、中风、冠心病或心力衰竭等致命病的形式爆发,已成为现阶段最常见的死因。

[0003] 脂蛋白相关磷脂酶 A2 (Lp-PLA2) 是心血管疾病中一种新的炎症酶,属于磷脂酶家族中 PLA2 的一种,是丝氨酸依赖的磷脂酶,能水解氧化低密度脂蛋白 (LDL),产生溶血磷脂酰胆碱 (lysophosphatidylcholine, Lyso-PC) 和氧化型游离脂肪酸 (oxidized free fatty acids, ox-FA),促进动脉粥样硬化的形成和发展。越来越多的研究证实,Lp-PLA2 活性能反映动脉粥样硬化病变的严重程度,并与易损斑块的稳定性有关。它可作为缺血性卒中独立的预测因子,可提供传统危险因子评估以外的预测信息,测定其水平有助于指导预防策略。Lp-PLA2 与其他炎症因子(如 C-反应蛋白等)相比,受其他危险因素的影响较小,检测具有更高的灵敏度和特异性,目前已被用作预测心血管事件的风险指标,用以对患者心血管疾病进行早期诊断、疗效观察及预后评估。大量临床研究证实,Lp-PLA2 与其他心血管疾病标志物联检,可以更进一步提高诊断的敏感性和特异性。

[0004] 目前,临床上用于测定 Lp-PLA2 的方法有 ELISA 法和免疫比浊法两种。免疫比浊法检测灵敏度低,很容易受血脂浓度影响产生假性升高,且不适用于大批量、自动化式检测平台。ELISA 法具有更高的灵敏度、特异性,且具有检测时间短、测量线性范围宽、稳定性好、操作简便快捷、便于自动化、安全无污染等诸多优点,已广泛应用于传染病、肥胖相关疾病、内分泌系统、遗传病、肿瘤的早期诊断、动植物检验检疫等众多领域,并已逐渐成为标记免疫分析的一个重要方向。

发明内容

[0005] 本发明实施例的目的在于提供一种简便、快捷、准确的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒及制备方法,旨在解决酶联免疫分析技术在人 Lp-PLA2 免疫分析产品的应用方面仍是空白的问题。

[0006] 本发明实施例是这样实现的,一种脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒,该脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒包括:标准品和质控品、包被载体、酶标记物、显色液、分析缓冲液及浓缩洗涤液;

[0007] 标准品和质控品是以胎牛血清为基质,由脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗原稀释而成,其中标准品的浓度包括 1000ng/mL、500ng/mL、250ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、0ng/mL 共 6 个浓

度,质控品分为质控低值和质控高值,浓度范围依次为 $150 \pm 30\text{ng/mL}$ 、 $300 \pm 60\text{ng/mL}$ 。

[0008] 进一步载体为微孔板、磁性颗粒或塑料管。

[0009] 进一步用于标记的酶为碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。

[0010] 进一步显色液为四甲基联苯胺或 3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3'-磷酸氧基)苯基-1,2-二氧乙烷。

[0011] 进一步分析缓冲液为含有 1%牛血清白蛋白和 0.05%吐温的 10mM 磷酸盐缓冲溶液, pH7.2-7.4。

[0012] 进一步浓缩洗涤液为含有 1%吐温的 20mM 磷酸盐缓冲溶液, pH7.2-7.4。

[0013] 本发明实施例的另一目的在于提供一种脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒制备方法,该脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒制备方法包括以下步骤:

[0014] 步骤一,制备脂蛋白相关磷脂酶 A2 标准品和质控品:

[0015] 用 pH7.4、20mmol/L PBS 缓冲液与胎牛血清按体积比 3:1 比例混合配制成基础缓冲液,用基础缓冲液将脂蛋白相关磷脂酶 A2 重组抗原稀释成浓度为 1000、500、250、100、50、0ng/mL 标准品;用基础缓冲液将脂蛋白相关磷脂酶 A2 重组抗原稀释成浓度为 300ng/mL 高值质控品和 150ng/mL 低值质控品,高、低质控品的浓度测定范围经统计学分析确定为 $300 \pm 35\text{ng/mL}$ 、 $150 \pm 15\text{ng/mL}$;

[0016] 步骤二,制备包被有脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体的载体:

[0017] 载体为微孔板或塑料管时,包被载体通过以下方法制备:脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体用包被缓冲液稀释,取待包被载体,将经过稀释的脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体负载于载体上,包被结束后,吸去包被缓冲液,再加入封闭缓冲液,置于 37°C 封闭 2 小时或 4°C 封闭过夜;弃去封闭液,室温 18-25°C 干燥 3-4 小时后加入干燥剂密封包装,得到脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体包被载体,所述包被缓冲液为 pH7.2-7.4、10mmol/L 磷酸盐溶液,脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体的稀释浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$;稀释的脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体在载体上的包被量可为每孔 100 μl ;包被的条件可置于 37°C 包被 2 小时或 4°C 包被过夜;封闭缓冲液为 pH7.2-7.4、10mmol/L PBST 溶液,内含 1% BSA 及 1~10%蔗糖;封闭缓冲液的加入量可为每孔 300 μl ;封闭后包被载体的干燥环境相对湿度小于 30%;

[0018] 载体为磁性颗粒时,包被载体通过以下方法制备:吸取 3mL 内含 2%磁颗粒的 PBS 溶液,用磁力架分离,用去离子水清洗;用清洗液清洗磁颗粒并调整体积至 6mL;加入 5mg 脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体,置于 4°C 内混匀 30min;加入 12mg 碳二亚胺,置于 4°C 内孵育过夜;用 pH7.4、100mmol/L PBS 缓冲液清洗磁颗粒;加入 Tris 和 EDTA,使终浓度依次为 50mmol/L 和 4mmol/L;调节 pH 至 7.4,抗体终浓度为 1mg/mL,得到脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体包被载体,清洗液为 pH6.0、10mmol/L PBS 缓冲液;

[0019] 步骤三,制备脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体酶标记物:

[0020] 用于标记的酶为碱性磷酸酶时,酶标记抗体的制备方法为:采用戊二醛交联法将脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体与碱性磷酸酶偶联,用 pH7.2、10mmol/L PBS 缓冲液充分透析,在透析后的结合物溶液中加入等体积的甘油,-20°C 以下保存;标记好的脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体酶结合物可用 20%胎牛血清稀释液稀释至工作浓度,置于 4°C 保存至有效期,胎牛血清稀释液为 pH7.4、20mmol/L PBST 溶液,内含 20%胎牛血清、1~10%蔗糖、0.01%食品红;

[0021] 用于标记的酶为辣根过氧化物酶时,酶标记抗体的制备方法为:溶解 2mg 辣根过氧化物酶于 1mL 去离子水中,加入 0.4mL 50mmol/L 过碘酸钠溶液,4℃ 缓慢摇动 30min,用 pH4.4、1mmol/L 醋酸钠缓冲液透析过夜,加入 2mg 脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体,4℃ 震荡过夜,使用 400uL 200mmol/L NaBH₄ 溶液进行还原,经 pH7.4、20mmol/L PBS 缓冲液透析过夜后用 HPLC 二次纯化,收集蛋白峰,加入等体积甘油,-20℃ 以下保存;标记好的脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体酶结合物可用 20% 胎牛血清稀释液稀释至工作浓度,可置于 4℃ 保存至有效期,胎牛血清稀释液为 pH7.4、10mmol/L PBST 溶液,内含 20% 胎牛血清、1% 蔗糖、0.1% 防腐剂、0.01% 食品红;

[0022] 步骤四,制备分析缓冲液,分析缓冲液为 pH7.4、10mmol/L PBST 缓冲液,内含 1% BSA;

[0023] 步骤五,制备浓缩洗涤液,浓缩洗涤液为 pH7.2-7.4、20mmol/L PBS 缓冲液,内含 1% 吐温;

[0024] 步骤六,组装脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒,将标准品和质控品、包被载体、酶标记物、显色液、分析缓冲液及浓缩洗涤液组装成脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒。

[0025] 本发明提供的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒及制备方法,采用双抗体夹心反应模式,可以对人血样本中的脂蛋白相关磷脂酶 A2 分子进行专一的定量检测。具有灵敏度高、检测范围宽、稳定性好、操作简便快速无污染等优点。本发明与其他开放式全自动酶联免疫检测平台相结合,可以有效缩短检测时间,降低检测成本和人力花费。项目开发的产品市场前景广阔,经济和社会效益显著;与免疫比浊等方法相比较,本发明简化了操作步骤,缩短了检测时间、大大提高了测定的灵敏度和准确性。

[0026] 本发明使用的脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体具有高度特异性,得到的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒及制备方法可以取代其他试剂盒来进行脂蛋白相关磷脂酶 A2 的定量检测。与国外试剂盒相比,本发明试剂盒不仅价格低廉,而且操作简便,灵敏度高,便于在临床上大规模推广使用。

附图说明

[0027] 图 1 是本发明的实施例 1 所制备的试剂盒中的标准品线形图;

[0028] 图 2 为本发明实施例 1 提供的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒与美国 PLAC 公司脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫测定试剂盒检测 200 例心血管病人相关性的结果示意图。

具体实施方式

[0029] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0030] 下面结合附图及具体实施例对本发明的应用原理作进一步描述。

[0031] 本发明实施例的一种脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒包括:标准品和质控品、包被载体、酶标记物、显色液、分析缓冲液及浓缩洗涤液;

[0032] 标准品和质控品是以胎牛血清为基质,由脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗原稀释而成,其中标准品的浓度包括 1000ng/mL、500ng/mL、250ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、0ng/mL 共 6 个浓度,质控品分为质控低值和质控高值,浓度范围依次为 $150 \pm 30\text{ng/mL}$ 、 $300 \pm 60\text{ng/mL}$;

[0033] 载体为微孔板、磁性颗粒或塑料管;

[0034] 用于标记的酶为碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶;

[0035] 显色液为四甲基联苯胺或 3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3'-磷酸氧基)苯基-1,2-二氧乙烷;

[0036] 分析缓冲液为含有 1% 牛血清白蛋白和 0.05% 吐温的 10mM 磷酸盐缓冲溶液, pH7.2-7.4;

[0037] 浓缩洗涤液为含有 1% 吐温的 20mM 磷酸盐缓冲溶液, pH7.2-7.4。

[0038] 本发明具体的方法如下:

[0039] 步骤一,制备脂蛋白相关磷脂酶 A2 标准品和质控品:

[0040] 用 pH7.4、20mmol/L PBS 缓冲液与胎牛血清按体积比 3:1 比例混合配制成基础缓冲液,用基础缓冲液将脂蛋白相关磷脂酶 A2 重组抗原稀释成浓度为 1000、500、250、100、50、0ng/mL 标准品;用基础缓冲液将脂蛋白相关磷脂酶 A2 重组抗原稀释成浓度为 300ng/mL 高值质控品和 150ng/mL 低值质控品,高、低质控品的浓度测定范围经统计学分析确定为 $300 \pm 60\text{ng/mL}$ 、 $150 \pm 30\text{ng/mL}$;

[0041] 步骤二,制备包被有脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体的载体:

[0042] 载体为微孔板或塑料管时,包被载体可通过以下方法制备:脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体用包被缓冲液稀释,取待包被载体,将经过稀释的脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体负载于载体上,包被结束后,吸去包被缓冲液,再加入封闭缓冲液,置于 37°C 封闭 2 小时或 4°C 封闭过夜;弃去封闭液,室温 (18-25°C) 干燥 3-4 小时后加入干燥剂密封包装,得到脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体包被载体,所述包被缓冲液为 pH7.2-7.4、10mmol/L 磷酸盐溶液,所述脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体的稀释浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$;所述稀释的脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体在载体上的包被量可为每孔 100 μl ;所述包被的条件可置于 37°C 包被 2 小时或 4°C 包被过夜;所述封闭缓冲液为 pH7.2-7.4、10mmol/L PBST 溶液,内含 1% BSA、1~10% 蔗糖;所述封闭缓冲液的加入量可为每孔 300 μl ;所述封闭后包被载体的干燥环境相对湿度小于 30%;

[0043] 载体为磁性颗粒时,包被载体可通过以下方法制备:吸取 3mL 内含 2% 磁颗粒的 PBS 溶液,用磁力架分离,用去离子水清洗;用清洗液清洗磁颗粒并调整体积至 6mL;加入 5mg 脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体,置于 4°C 内混匀 30min;加入 12mg 碳二亚胺,置于 4°C 内孵育过夜;用 pH7.4、100mmol/L PBS 缓冲液清洗磁颗粒;加入 Tris 和 EDTA,使终浓度依次为 50mmol/L 和 4mmol/L;调节 pH 至 7.4,抗体终浓度为 1mg/mL,得到脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体包被载体,所述清洗液为 pH6.0、10mmol/L PBS 缓冲液;

[0044] 步骤三,制备脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体酶标记物:

[0045] 用于标记的酶为碱性磷酸酶时,酶标记抗体的制备方法为:采用戊二醛交联法将脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体与碱性磷酸酶偶联,用 pH7.2、10mmol/L PBS 缓冲液充分透析,在透析后的结合物溶液中加入等体积的甘油,-20°C 以下保存;标记好的脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体酶结合物可用 20% 胎牛血清稀释液稀释至工作浓度,可置于 4°C 保存至有效期,所述胎牛血清稀释液为 pH7.4、20mmol/L PBST 溶液,内含 20% 胎牛血清、1~10% 蔗糖、

0.01%食品红；

[0046] 用于标记的酶为辣根过氧化物酶时，酶标记抗体的制备方法为：溶解 2mg 辣根过氧化物酶于 1mL 去离子水中，加入 0.4mL 50mmol/L 过碘酸钠溶液，4℃ 缓慢摇动 30min，用 pH4.4、1mmol/L 醋酸钠缓冲液透析过夜，加入 2mg 脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体，4℃ 震荡过夜，使用 400uL 200mmol/L NaBH₄ 溶液进行还原，经 pH7.4、20mmol/L PBS 缓冲液透析过夜后用 HPLC 二次纯化，收集蛋白峰，加入等体积甘油，-20℃ 以下保存；标记好的脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体酶结合物可用 20% 胎牛血清稀释液稀释至工作浓度，可置于 4℃ 保存至有效期，所述胎牛血清稀释液为 pH7.4、10mmol/L PBST 溶液，内含 20% 胎牛血清、1% 蔗糖、0.1% 防腐剂、0.01% 食品红；

[0047] 步骤四，制备分析缓冲液，分析缓冲液为 pH7.4、10mmol/L PBST 缓冲液，内含 1% BSA；

[0048] 步骤五，制备浓缩洗涤液，浓缩洗涤液为 pH7.2-7.4、20mmol/L PBS 缓冲液，内含 1% 吐温；

[0049] 步骤六，组装脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒，将标准品和质控品、包被载体、酶标记物、显色液、分析缓冲液及浓缩洗涤液组装成脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒。

[0050] 结合以下的实施例对本发明的应用效果做进一步的说明：

[0051] 实施例 1：

[0052] 本发明实施例的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒包括标准品和质控品、包被载体、碱性磷酸酶酶标记物、显色液、分析缓冲液、浓缩洗涤液；

[0053] 其中：

[0054] 1. 标准品和质控品用下述方法制成：用 pH7.4、20mmol/L PBS 缓冲液与胎牛血清按体积比 3:1 比例混合配制成基础缓冲液，用基础缓冲液将脂蛋白相关磷脂酶 A2 重组抗原稀释成浓度为 1000、500、250、100、50、0ng/mL 标准品；用基础缓冲液将脂蛋白相关磷脂酶 A2 重组抗原稀释成浓度为 300ng/mL 高值质控品和 150ng/mL 低值质控品，高、低质控品的浓度测定范围经统计学分析确定为 300±60ng/mL、150±30ng/mL；

[0055] 2. 包被微孔板的制备步骤为：脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体用包被缓冲液稀释，取待包被载体，将经过稀释的脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体负载于载体上，包被结束后，吸去包被缓冲液，再加入封闭缓冲液，置于 37℃ 封闭 2 小时或 4℃ 封闭过夜；弃去封闭液，室温（18-25℃）干燥 3-4 小时后加入干燥剂密封包装，得到脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体包被载体，所述包被缓冲液为 pH7.2、10mmol/L 磷酸盐溶液，所述脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体的稀释浓度为 1ug/mL；所述稀释的脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体在载体上的包被量可为每孔 100uL；所述包被的条件可置于 37℃ 包被 2 小时或 4℃ 包被过夜；所述封闭缓冲液为 pH7.4、10mmol/L PBST 溶液，内含 1% BSA 及 1~10% 蔗糖；所述封闭缓冲液的加入量可为每孔 300uL；所述封闭后包被载体的干燥环境相对湿度小于 30%；

[0056] 3. 碱性磷酸酶标记抗体的制备方法为：采用戊二醛交联法将脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体与碱性磷酸酶偶联，用 pH7.2、10mmol/L PBS 缓冲液充分透析，在透析后的结合物溶液中加入等体积的甘油，-20℃ 以下保存；标记好的脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体酶结合物可用 20% 胎牛血清稀释液稀释至工作浓度，可置于 4℃ 保存至有效期，所述胎牛血清稀释液

为 pH7.4、20mmol/L PBST 溶液,内含 20%胎牛血清、1%蔗糖、0.01%食品红;

[0057] 4. 分析缓冲液的制备配方为:pH7.4、10mmol/L PBST 缓冲液,内含 1% BSA;

[0058] 5. 浓缩洗涤液的制备配方为:pH7.4、20mmol/L PBS 缓冲液,内含 1%吐温;

[0059] 6. 半成品及成品组成:上述步骤所得产品分装即为半成品,随机抽取三批进行特异性、精密度、灵敏度及稳定性检验,合格后组装为脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒;

[0060] 实验证明:用塑料管替代实施例 1 步骤 2 中的微孔板,其他同实施例 1,可以制备出相应的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒;

[0061] 用磁性颗粒替代实施例 1 步骤 2 中的微孔板,并在所述试剂盒中放入空白微孔板或塑料管,其他同实施例 1,可以制备出相应的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒;

[0062] 实验证明:用 pH 为 7.3 或 7.4 的包被缓冲液替代实施例 1 步骤 2 中的 pH 值为 7.2 的包被缓冲液,其他同实施例 1,可以制备出相应的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒;

[0063] 实验证明:用 pH 为 7.2 或 7.3 的封闭缓冲液替代实施例 1 步骤 2 中的 pH 值为 7.4 的封闭缓冲液,其他同实施例 1,可以制备出相应的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒;

[0064] 实验证明:用 pH 为 7.2 或 7.3 的浓缩洗涤液替代实施例 1 步骤 2 中的 pH 值为 7.4 的浓缩洗涤液,其他同实施例 1,可以制备出相应的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒;

[0065] 实施例 2:

[0066] 一种脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒包括以下组分:

[0067] 1. 标准品和质控品(同实施例 1);

[0068] 2. 包被载体(同实施例 1)

[0069] 3. 辣根过氧化物酶标记物,其制备方法为:溶解 2mg 辣根过氧化物酶于 1mL 去离子水中,加入 0.4mL 50mmol/L 过碘酸钠溶液,4℃缓慢摇动 30min,用 pH4.4、1mmol/L 醋酸钠缓冲液透析过夜,加入 2mg 脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体,4℃震荡过夜,使用 400uL 200mmol/L NaBH₄ 溶液进行还原,经 pH7.4、20mmol/L PBS 缓冲液透析过夜后用 HPLC 二次纯化,收集蛋白峰,加入等体积甘油,-20℃以下保存;标记好的脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体酶结合物可用 20%胎牛血清稀释液稀释至工作浓度,可置于 4℃保存至有效期,所述胎牛血清稀释液为 pH7.4、10mmol/L PBST 溶液,内含 20%胎牛血清、1%蔗糖、0.01%食品红;

[0070] 4. 分析缓冲液(同实施例 1);

[0071] 5. 浓缩洗涤液(同实施例 1);

[0072] 6. 半成品及成品组成(同实施例 1);

[0073] 实验证明:用塑料管替代实施例 1 步骤 2 中的微孔板,其他同实施例 1,可以制备出相应的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒;

[0074] 用磁性颗粒替代实施例 1 步骤 2 中的微孔板,并在所述试剂盒中放入空白微孔板或塑料管,其他同实施例 1,可以制备出相应的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒;

[0075] 实验证明:用 pH 为 7.3 或 7.4 的包被缓冲液替代实施例 1 步骤 2 中的 pH 值为 7.2 的包被缓冲液,其他同实施例 1,可以制备出相应的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒;

剂盒；

[0076] 实验证明：用 pH 为 7.2 或 7.3 的封闭缓冲液替代实施例 1 步骤 2 中的 pH 值为 7.4 的封闭缓冲液，其他同实施例 1，可以制备出相应的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒；

[0077] 实验证明：用 pH 为 7.2 或 7.3 的浓缩洗涤液替代实施例 1 步骤 2 中的 pH 值为 7.4 的浓缩洗涤液，其他同实施例 1，可以制备出相应的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒；

[0078] 实施例 3：

[0079] 以下给出采用实施例 1 中制备的酶联免疫检测试剂盒检测临床样本中脂蛋白相关磷脂酶 A2 的具体操作方法：

[0080] 1. 样本处理：待测样本为血浆时，用 EDTA 抗凝管取血 2mL，1500r/min 离心 10 分钟，收集上清液；待测样本为血清时，用普通管或促凝管取血 2mL，4℃ 下放置 30 分钟后，1500r/min 离心 10 分钟，收集上清液；

[0081] 2. 样本检测：将样本、分析缓冲液加到固相有脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体的微孔板中，反应 30min 后，样本中的脂蛋白相关磷脂酶 A2 与固相抗体特异性结合，洗去游离成分，加入酶标记物避光反应 30min，被酶标记的脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体与抗原、固相抗体形成“夹心”复合物，洗去游离成分，加入显色液，避光反应 5min 后测定各孔吸光值，其与其中的脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗原浓度正相关，样本浓度依据样本的 OD 值可进行定量计算；

[0082] 实施例 4：

[0083] 以下给出按照本领域中常规的制造及检定规程对实施例 1 中制备的酶联免疫检测试剂盒进行检定，结果见表 1：

[0084] 表 1

[0085]

检验项目	检验标准	检验结果
灵敏度	≤10ng/mL	符合标准
精密度 CV(%)	批内<5%，批间<10%	符合标准
准确性	平均回收率 101.51%±1.23%	符合标准
特异性	与类似物的交叉反应率≤0.01%	符合标准
稳定性	各试剂组分置于 37℃ 至少 7 天，仍保持稳定	符合标准

[0086] 说明本发明的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒相关技术指标符合国家体外诊断试剂规范；

[0087] 实施例 5：

[0088] 以下给出使用实施例 1 中制备的脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒与美国 PLAC 公司脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫测定试剂盒共同检测 150 份心血管病人样本的相关性结果；

[0089] 1. 临床样本的来源：从天津市武警总医院收集心血管病人血清样本 150 份，其中

动脉粥样硬化患者 81 例,冠心病患者 69 例;

[0090] 2. 使用实施例 1 的试剂盒(按实施例 3 操作)和 PLAC 试剂盒(按其说明书操作)分别对 150 份血清样本进行检测;

[0091] 3. 两种试剂盒的测定结果经统计学分析显示,两种方法检测的结果高度相关,见附图 2,相关系数 $r > 0.98$, $P < 0.01$,说明两种方法具有同等的使用价值,但本发明制备的一种脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶联免疫检测试剂盒成本低廉,操作简便、快速,更易于推广;

[0092] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

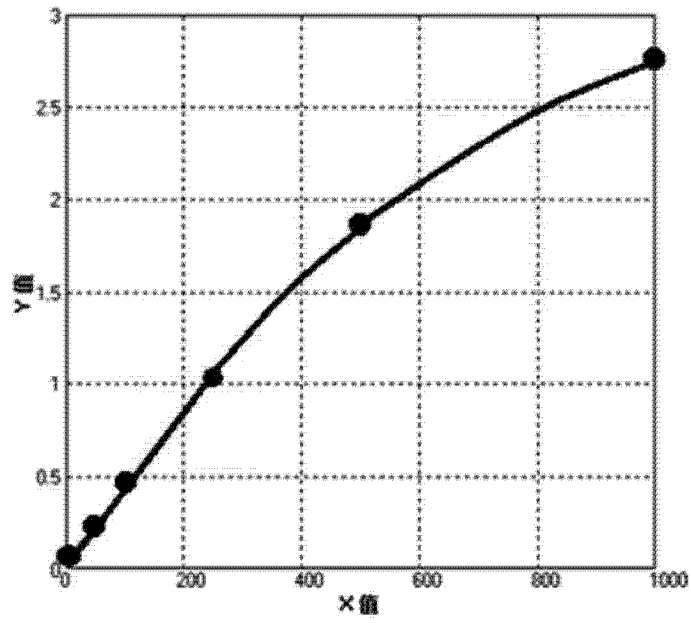


图 1

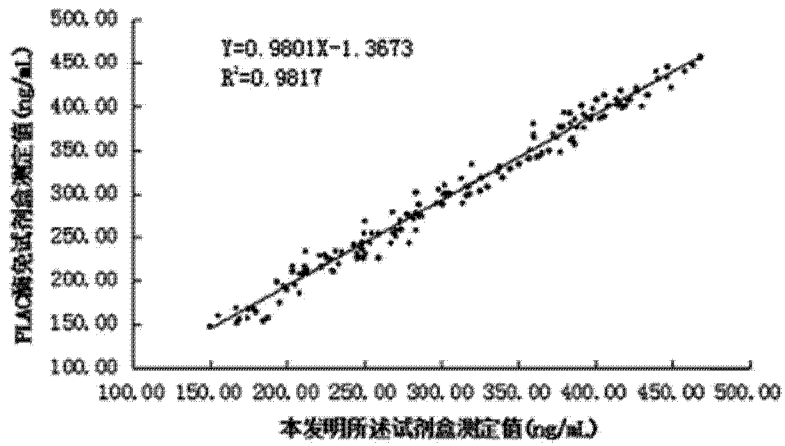


图 2

专利名称(译)	一种脂蛋白相关磷脂酶A2酶联免疫检测试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN104007260A	公开(公告)日	2014-08-27
申请号	CN201410265732.3	申请日	2014-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	天津康尔克生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	天津康尔克生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	天津康尔克生物科技有限公司		
[标]发明人	兰成杰		
发明人	兰成杰		
IPC分类号	G01N33/573 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/573 G01N2333/916		
代理人(译)	杨慧玲		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种脂蛋白相关磷脂酶A2酶联免疫检测试剂盒及制备方法，该脂蛋白相关磷脂酶A2酶联免疫检测试剂盒包括：标准品和质控品、包被载体、酶标记物、显色液、分析缓冲液及浓缩洗涤液；该脂蛋白相关磷脂酶A2酶联免疫检测试剂盒制备方法包括：制备脂蛋白相关磷脂酶A2标准品和质控品；制备包被有脂蛋白相关磷脂酶A2抗体的载体；制备脂蛋白相关磷脂酶A2抗体酶标记物；制备分析缓冲液；制备浓缩洗涤液；组装脂蛋白相关磷脂酶A2酶联免疫检测试剂盒。本发明可以取代其他试剂盒来进行脂蛋白相关磷脂酶A2的定量检测。本发明试剂盒价格低廉，而且操作简便，灵敏度高，便于在临床上大规模推广使用。

