



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109001449 A

(43)申请公布日 2018.12.14

(21)申请号 201810708123.9

(22)申请日 2018.07.02

(71)申请人 威海纽普生物技术有限公司

地址 264200 山东省威海市高区火炬路-  
213-1号创新创业基地C座301

(72)发明人 王鹏浩 宋璐琳 王文亮 刘衍亮  
陈萍萍 孙宁宁

(74)专利代理机构 威海科星专利事务所 37202  
代理人 初姣姣

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

测定脂蛋白相关磷脂酶A2的免疫层析检测  
试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种测定脂蛋白相关磷脂酶A2的免疫层析检测试剂盒,其由免疫层析试纸条和塑料外壳,所述免疫层析试纸条是由底板、样品垫、试剂垫、硝酸纤维素膜和吸收垫组成的试纸条,所述样品垫、试剂垫、硝酸纤维素膜和吸收垫依次交错固定于所述底板上,所述试剂垫包被有鼠抗人Lp-PLA2单克隆抗体标记的彩色荧光微球,硝酸纤维素膜上的检测线包被有鼠抗人Lp-PLA2单克隆抗体,质控线包被有山羊抗鼠多克隆抗体,该试剂盒定性测定分界线浓度为200ng/ml,荧光免疫分析仪检测灵敏度为10ng/ml,线性范围为10-1000ng/ml,采用彩色荧光微球可以快速得到定性结果并稍迟得到定量结果,具有操作简单、反应迅速、灵敏度高、可定性可定量等特点,有助于满足不同检验场景的需求。

1. 一种测定脂蛋白相关磷脂酶A2的免疫层析检测试剂盒,由免疫层析试纸条和塑料外壳组成,所述免疫层析试纸条是由底板、样品垫、试剂垫、硝酸纤维素膜和吸收垫组成,所述样品垫、试剂垫、硝酸纤维素膜和吸收垫依次交错固定于所述底板上,其特征在于所述试剂垫包被有鼠抗人Lp-PLA2单克隆抗体标记的彩色荧光微球,硝酸纤维素膜上的检测线包被有鼠抗人Lp-PLA2单克隆抗体,质控线包被有山羊抗鼠多克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的一种测定脂蛋白相关磷脂酶A2的免疫层析检测试剂盒,其特征在于所述试剂垫的彩色荧光微球的直径范围是180-200nm;所述彩色荧光微球掺杂有稀土镧系元素,为铕(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)中的任意一种或几种的混合物;所述彩色荧光微球掺杂的彩色染料含有氨基或者羟基官能团,为酸性紫1、酸性紫7、酸性蓝25、分散红58中的任意一种或几种的混合物。

3. 根据权利要求1所述的一种测定脂蛋白相关磷脂酶A2的免疫层析检测试剂盒,其特征在于所述试剂垫上彩色微球标记的抗体来源于针对2个不同抗原表位的单克隆抗体细胞株,所述硝酸纤维素膜上的检测线包被的抗体来源于针对2个不同抗原表位的单克隆抗体细胞株。

4. 一种如权利要求1-3中任意一项所述的测定脂蛋白相关磷脂酶A2的免疫层析检测试剂盒的制备方法,其特征在于4个针对不同抗原表位的细胞株采用如下步骤制得:

步骤1:单克隆抗体细胞株的获得:用Lp-PLA2蛋白免疫小鼠,采用标准的单克隆抗体制备方法制备特异性高亲和力的单克隆抗体细胞株,对所获得的单抗细胞株制备的抗体两两配对进行配对筛选,根据配对结果优选出用于试剂盒的4株单抗细胞株,其中2株用于检测,两株用于捕获;

步骤2:调整4株单抗细胞株制备的单克隆抗体的比例,优选出用于最终试剂盒制备的单抗混合物的比例;

步骤3:单克隆抗体的大量制备:采用标准的腹水生产工艺制备并纯化Lp-PLA2单克隆抗体,分装后保存于-20℃备用。

## 测定脂蛋白相关磷脂酶A2的免疫层析检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医学免疫学中免疫层析技术领域,具体地说是一种能够快速准确的对Lp-PLA2进行同时定性和定量分析的测定脂蛋白相关磷脂酶A2的免疫层析检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 随着对动脉粥样硬化发病机制的深入研究,人们发现在动脉粥样硬化发生、发展的演变过程中,始终都有各种炎症细胞核大量炎症介质的参与,炎症是动脉粥样硬化发展过程中的核心因素。Lp-PLA2是近年来引起广泛关注的一种与动脉粥样硬化心、脑血管疾病密切相关的磷脂酶A2超家族,越来越多的研究表明Lp-PLA2与冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)脑卒中事件的发生关系密切。Lp-PLA2是针对血管内皮炎症即AS严重程度的特异性炎症标记物,可以有效预警、评估心脑血管栓塞性疾病的发生风险,降低心脑血管患者或高危人群突发心梗/脑梗等严重不良事件的发生率,为生命保驾护航。

[0003] 脂蛋白相关磷脂酶A2 (Lp-PLA2) 是目前国际上公认的一种新的炎症反应标志物。血液中的Lp-PLA2主要由巨噬细胞产生,能水解低密度脂蛋白 (LDL) 中氧化的磷脂,其水解产物可促进动脉粥样硬化过程,为反映血管炎症的特异性标志物。Lp-PLA2水平升高还与动脉粥样硬化斑块的破溃相关,因而可用于动脉粥样斑块不稳定性评价。Lp-PLA2水平升高是预测冠心病、心血管事件和卒中风险的一种独立危险因素和预测因子。

[0004] Lp-PLA2检测方法主要有定量检测方法和定性检测方法,定量检测方法有双抗夹心法 (ELISA)、化学发光法、胶乳颗粒增强免疫比浊法、免疫荧光法等,定性方法主要有胶体金免疫层析法。定量方法普遍需要昂贵的仪器,并且获得结果时间都偏长,而Lp-PLA2检测相关的心肌梗死、心衰等疾病迫切需要尽快获得检测结果;而现有的定性检测虽然可以用时较短,但是定性结果容易存在偏差,获得阳性结果的时候也无法获得病情的严重程度。如何能够解决快速获得结果用于心肌梗死等时效性强的诊治以及获得定量结果确定后期的针对性治疗,是目前临床诊断产品研究领域亟需解决的重要问题。

### 发明内容:

[0005] 本发明针对现有检测产品存在的缺点和不足,提出了一种结合了用彩色微球快速定性和荧光微球准确定量的优点,既能满足只需定性但是要求出结果尽可能快,或者缺乏仪器、没有电源等特殊检验场景的需求,又能结合荧光免疫层析分析仪实现需要灵敏度高、准确定量的测定Lp-PLA2指标的测定Lp-PLA2的荧光免疫层析检测试剂盒及其制备方法。

[0006] 本发明可以通过以下措施达到:

[0007] 一种测定脂蛋白相关磷脂酶A2的免疫层析检测试剂盒,由免疫层析试纸条和塑料外壳组成,所述免疫层析试纸条是由底板、样品垫、试剂垫、硝酸纤维素膜和吸收垫组成,所述样品垫、试剂垫、硝酸纤维素膜和吸收垫依次交错固定于所述底板上,所述试剂垫包被有鼠抗人Lp-PLA2单克隆抗体标记的彩色荧光微球,硝酸纤维素膜上的检测线包被有鼠抗人

Lp-PLA2单克隆抗体,质控线包被有山羊抗鼠多克隆抗体。

[0008] 本发明所述试剂垫的彩色荧光微球的直径范围是180-200nm;所述彩色荧光微球掺杂有稀土镧系元素,为铕(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)等镧系元素的任意一种或几种的混合物;所述彩色荧光微球掺杂的彩色染料含有氨基或者羟基官能团,为酸性紫1、酸性紫7、酸性蓝25、分散红58中的任意一种或几种的混合物。

[0009] 本发明所述试剂垫上彩色微球标记的抗体来源于针对2个不同抗原表位的单克隆抗体细胞株,所述硝酸纤维素膜上的检测线包被的抗体来源于针对2个不同抗原表位的单克隆抗体,所述4个单抗细胞株采用如下步骤制得:

[0010] 步骤1:单克隆抗体细胞株的获得:用Lp-PLA2蛋白免疫小鼠,采用标准的单克隆抗体制备方法制备特异性高亲和力的单克隆抗体细胞株,对所获得的单抗细胞株制备的抗体两两配对进行配对筛选,根据配对结果优选出用于试剂盒的4株单抗细胞株,其中2株用于检测,两株用于捕获;

[0011] 步骤2:调整4株单抗细胞株制备的单克隆抗体的比例,优选出用于最终试剂盒制备的单抗混合物的比例;

[0012] 步骤3:单克隆抗体的大量制备:采用标准的腹水生产工艺制备并纯化Lp-PLA2单克隆抗体,分装后保存于-20℃备用

[0013] 本发明所述试剂垫采用如下步骤制得:将玻璃纤维膜浸泡于含1.5% Triton X-100,2.0% BSA,pH7.5的200mM Tris-HCL处理液中,4℃浸泡3小时,然后取出37℃烘箱烘干4小时,备用,将玻璃纤维膜在Bio-DotXYZ3050三维喷点平台上,用Bio-Jet Quanti300非接触式微量喷头将鼠抗人Lp-PLA2单克隆抗体标记彩色荧光微球喷到玻璃纤维膜,37℃烘干2小时。

[0014] 本发明中试剂垫上的鼠抗人Lp-PLA2单克隆抗体标记的彩色荧光微球采用如下步骤制得:

[0015] 步骤1:彩色荧光微球的醛基化:取2mg彩色荧光微球,用100mM,pH9.5的碳酸盐缓冲液,采用离心法洗涤3遍,离心速度为12000rpm,时间为15分钟,最后重悬于100μl的上述碳酸盐缓冲液中,加入200μl醛基化的葡聚糖,混匀,室温下暗反应4小时,采用同样的离心法洗涤和重悬到100μl的上述碳酸盐缓冲液中,置于4℃备用;

[0016] 步骤2:制备鼠抗人Lp-PLA2单克隆抗体标记的彩色荧光微球,将1mg用于检测的鼠抗人Lp-PLA2单克隆抗体用上述碳酸盐缓冲液于4℃透析过夜,然后与上述醛基化的彩色荧光微球混合,4℃反应过夜;然后,加入硼氢化钠至终浓度5mM,4℃反应4小时;再加入等体积的封闭液(150mM Tris-HCL,pH7.5,含2%BSA,8%蔗糖),4℃封闭过夜;然后用150mM Tris-HCL,pH7.5的缓冲液采用离心法洗涤3遍,重悬于100μl的200mM Tris-HCL缓冲液中(含0.9%NaCl,2%BSA,0.5%Tween 20),4℃避光保存备用。

[0017] 本发明所述包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜通过以下步骤制得:

[0018] 步骤1:分别用包被稀释液将鼠抗人Lp-PLA2单克隆抗体和山羊抗鼠多克隆抗体调整浓度到2-8mg/ml,膜液量为1-2μl/cm,将它们分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被,检测线和质控线间隔为3-7mm,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。

[0019] 本发明所述样品垫通过以下步骤制得:将玻璃纤维膜浸泡于含有1.5% Triton X-100,2.5% BSA,0.2M Tris缓冲液,pH7.5的处理液中,于4℃浸泡4个小时,然后置于烘箱中,

37℃烘干2小时。

[0020] 本发明在使用的过程中,首先将检测试剂盒及样本平衡至室温,取出试纸卡,平放;然后精确吸取25 $\mu$ l血清样本,样本为全血时吸取50 $\mu$ l样本,加入到样本孔中,再立即在下部的缓冲液孔中加入100 $\mu$ l样本稀释液,样本稀释液采用生理盐水或PBS;5-8分钟后,肉眼观察检测线和质控线颜色变化,即可获得定性结果;设置好荧光免疫层析分析仪的相关参数,15-30分钟内,进行检测获得定量结果。

[0021] 本发明提供一种使用彩色荧光微球,采用免疫层析技术制备的Lp-PLA2定性和定量免疫层析检测试剂盒,对于同一个试剂盒,可以极短时间内获得定性结果并随后获得准确定量的结果,同时满足了先期获得初步结果和后面获得准确定量结果的需求,并且可以应用于条件比较差,没有仪器或者电源的检验场景,具有操作简便、结果快速、测量准确、适合不同检验场景等优点。

#### 附图说明:

[0022] 附图1是本发明中试纸条的结构示意图。

[0023] 附图2是本发明中实施例1的单克隆抗体配对筛选结果示意图。

[0024] 附图3是本发明中实施例2的定性检测分析结果示意图。

[0025] 附图4是本发明中实施例2的定量检测准确度分析结果示意图。

[0026] 附图标记:PVC板1、样品垫2、结合垫3、硝酸纤维素膜4、吸水垫5。

#### 具体实施方式:

[0027] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步的说明:

[0028] 如附图1所示,本发明首先提出了一种定性和定量测定Lp-PLA2的免疫层析检测试剂盒,该试剂盒包括免疫层析试纸条和塑料外壳,所述免疫层析试纸条是由底板1、样品垫2、试剂垫3、硝酸纤维素膜4和吸收垫5组成的试纸条,所述样品垫2、试剂垫3、硝酸纤维素膜4和吸收垫5依次交错固定于所述底板1上,所述试剂垫3包被有鼠抗人Lp-PLA2单克隆抗体标记的彩色荧光微球,硝酸纤维素膜4上的检测线包被有鼠抗人Lp-PLA2单克隆抗体,质控线包被有山羊抗鼠多克隆抗体。

[0029] 本发明所述试剂垫3的彩色荧光微球的直径优选是180-200nm;所述彩色荧光微球优选掺杂有稀土镧系元素,为铕(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)等镧系元素的任意一种或几种的混合物;所述彩色荧光微球优选掺杂的彩色染料含有氨基或者羟基官能团,为酸性紫1、酸性紫7、酸性蓝25分散红58等任意一种或几种的混合物。

[0030] 本发明所述的试剂盒制备方案参照前述发明内容并不仅仅限于上述具体方案,所有在此基础上进行的可以预见的微调都视同为与本发明内容相同。

[0031] 实施例1:

[0032] 本发明中试剂垫上的彩色荧光微球结合的鼠抗人Lp-PLA2单克隆抗体通过以下措施制得:

[0033] 1、单克隆抗体细胞株的获得:用Lp-PLA2蛋白免疫小鼠,采用标准的单克隆抗体制备方法制备至少100株以上的特异性高亲和力的单克隆抗体细胞株,对所获得的单抗细胞株制备相应的抗单克隆体,用96孔板,ELISA的方法两两配对,对100多株单克隆抗体进行初

筛,选取10对反应最好的抗体对,共计13株细胞株,其中用于试剂垫5株,用于硝酸纤维素膜8株。进一步用上述13株单克隆抗体,根据初筛结果参考前述试剂盒制备方案,制备40组检测试剂盒,根据显色时间、显色强度、背景噪音程度等对其进一步筛选,优选获得用于试剂垫和硝酸纤维素膜的单抗细胞株各2株(附图2)。

[0034] 2、单抗混合物的确定:调整4株单抗细胞株制备的单克隆抗体的比例,最终优选出用于最终试剂盒制备的单抗混合物的比例。

[0035] 3、单克隆抗体的大量制备:采用标准的腹水生产工艺制备并纯化Lp-PLA2单克隆抗体,分装后保存于-20℃备用。

[0036] 实施例2:彩色微球定性试验和荧光免疫测定准确度试验

[0037] 选用上述试剂盒以及荧光免疫层析分析仪(型号:NEO-007),

[0038] 荧光免疫分析仪参数的设定:在荧光免疫分析仪上设定好试剂盒工艺参数后,取上述组装好的试剂盒,分别用10、25、100、200、400、600、800、1000ng/ml的Lp-PLA2校准品,用试剂盒进行测定,得到各校准品的荧光强度值,将结果输入到分析仪的参数中,完成分析仪的参数最终设定。

[0039] 主要检测材料:200份临床样本由相关医院获得,采用德赛诊断系统的脂蛋白相关磷脂酶A2测定试剂盒进行定值,其中血清样本100份,全血样本100份,Lp-PLA2含量分布区间为10-1000ng/mL之间。

[0040] 检测方法:

[0041] 步骤1:将检测试剂盒及样本平衡至室温,取出试纸卡,平放;

[0042] 步骤2:精确吸取25 $\mu$ l血清样本,样本为全血时吸取50 $\mu$ l样本,加入到样本孔中,再立即在下部的缓冲液孔中加入100 $\mu$ l样本稀释液,样本稀释液采用生理盐水或PBS;

[0043] 步骤3:8分钟后,肉眼观察检测线和质控线颜色变化,获得定性结果;

[0044] 步骤4:设置好荧光免疫层析分析仪的相关参数,15-30分钟内,进行检测获得定量结果。

[0045] 试验结果分析:

[0046] 临床样本检测试剂制备完成后,按检测方法对所有临床样本进行检测,并分析检测结果。

[0047] 试验结果:

[0048] 1、如附图3所示,对定性结果进行分析,参照Lp-PLA2的参考范围,拟定200ng/ml为分界线,以下为阴性,以上为阳性。数据分析显示,试验系统确定阴性和阳性的样本数目与商业化试剂盒的检测结果一致性超过91.50%,表明所制备的检测试剂盒性能良好,能够满足快速检测的定性检测需求。

[0049] 2、如附图4所示,对定量结果进行分析,以实验系统的检测值为Y轴,以对照系统的测验值为X轴,绘制散点图,并进行相关性分析。临床样本检测对200份临床定值样本检测,样本平均偏差值小于18%,最大偏差小于30%, $R^2 > 0.97$ ,一致性系数 $> 0.90$ 。检测结果表明制备的检测试剂盒性能良好,适合用于临床检测,能够满足客户对准确定量检测的需求。

[0050] 本发明提供一种使用彩色荧光微球,采用免疫层析技术制备的Lp-PLA2定性和定量免疫层析检测试剂盒,该试剂盒定性测定分界线浓度为200ng/ml,荧光免疫分析仪检测灵敏度为10ng/ml,线性范围为10-1000ng/ml,采用彩色荧光微球可以快速得到定性结果并

稍迟得到定量结果,具有操作简单、反应迅速、灵敏度高等特点,有助于满足不同检验场景的需求。

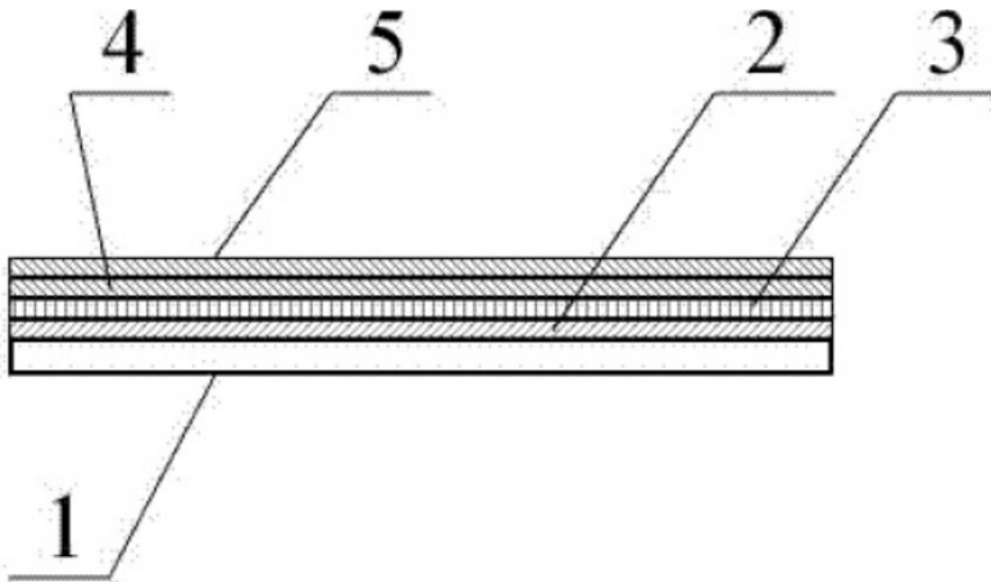


图1

		捕获抗体							
		7A3	<b>10G5</b>	19B2	3F4	<b>8D6</b>	15G3	9H5	7C11
检测抗体	17E4	-	++	+	++	++	+	++	+++
	<b>7F5</b>	+++	+++	+	-	+++	++	+	++
	11G2	++	+	+++	+	-	+++	—	+
	<b>4A5</b>	+	+++	+	++	+++	-	++	++
	2F11	-	++	-	+++	++	+	+++	+

图2

定性分析结果				
	试验系统(阴性)	试验系统(阳性)	总和	一致率
对照系统(阴性)	102	10	200	91.50%
对照系统(阳性)	7	81		

图3

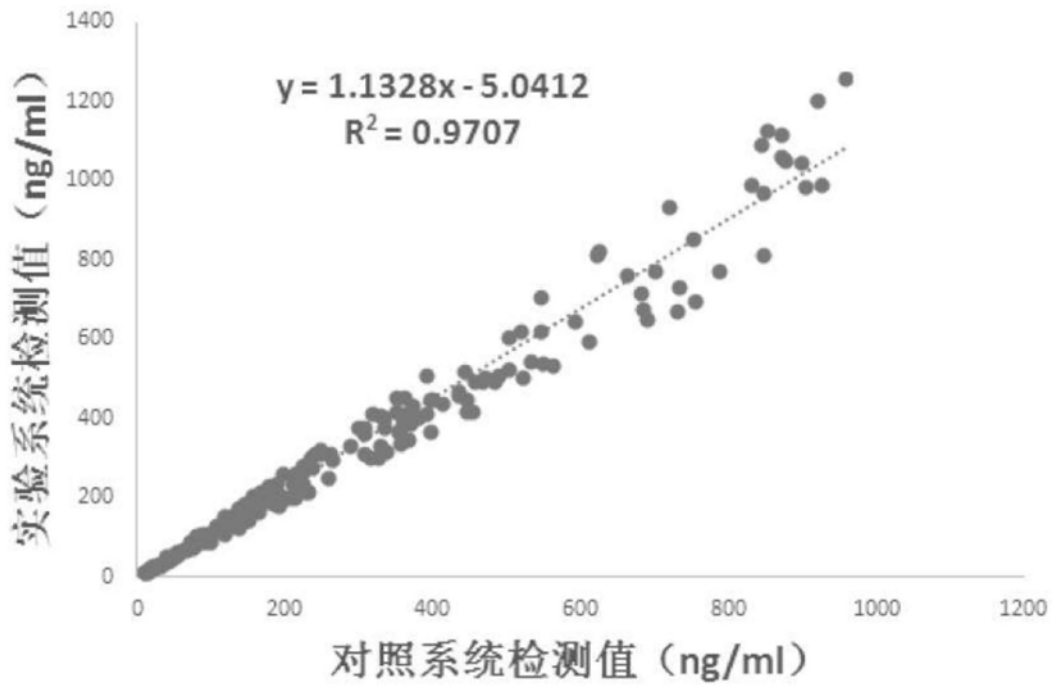


图4

专利名称(译)	测定脂蛋白相关磷脂酶A2的免疫层析检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109001449A</a>	公开(公告)日	2018-12-14
申请号	CN201810708123.9	申请日	2018-07-02
[标]申请(专利权)人(译)	威海纽普生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	威海纽普生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	威海纽普生物技术有限公司		
[标]发明人	王鹏浩 王文亮 陈萍萍 孙宁宁		
发明人	王鹏浩 宋璐琳 王文亮 刘衍亮 陈萍萍 孙宁宁		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种测定脂蛋白相关磷脂酶A2的免疫层析检测试剂盒，其由免疫层析试纸条和塑料外壳，所述免疫层析试纸条是由底板、样品垫、试剂垫、硝酸纤维素膜和吸收垫组成的试纸条，所述样品垫、试剂垫、硝酸纤维素膜和吸收垫依次交错固定于所述底板上，所述试剂垫包被有鼠抗人Lp-PLA2单克隆抗体标记的彩色荧光微球，硝酸纤维素膜上的检测线包被有鼠抗人Lp-PLA2单克隆抗体，质控线包被有山羊抗鼠多克隆抗体，该试剂盒定性测定分界线浓度为200ng/ml，荧光免疫分析仪检测灵敏度为10ng/ml，线性范围为10-1000ng/ml，采用彩色荧光微球可以快速得到定性结果并稍迟得到定量结果，具有操作简单、反应迅速、灵敏度高、可定性可定量等特点，有助于满足不同检验场景的需求。

