



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102721819 B

(45) 授权公告日 2014.08.13

(21) 申请号 201210215806.3

(22) 申请日 2012.06.28

(73) 专利权人 广州瑞博奥生物科技有限公司
地址 510663 广东省广州市科学城掬泉路 3
号广州国际企业孵化器 D 区

(72) 发明人 黄若磐 蒋卫东

(74) 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司
44202
代理人 王会龙

(51) Int. Cl.

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102517256 A, 2012.06.27, 全文.

EP 1474445 A1, 2004.11.10, 全文.

WO 2008084003 A1, 2008.07.17, 全文.

CN 102236015 A, 2011.11.09, 权利要求 1、
2, 实施例 1、2.

US 8088730 B2, 2012.01.03, 全文.

US 8044182 B2, 2011.10.25, 全文.

黎明等. 人血清脂联素竞争性酶免疫分析方法
的建立及初步应用. 《中国糖尿病杂志》. 2007,
第 15 卷 (第 11 期), 693-695.

胡小波等. 竞争 ELISA 法快速检测血液中脂
联素的含量. 《南华大学学报 (医学版)》. 2006,
第 34 卷 (第 01 期), 37-43.

审查员 杨冀川

权利要求书 1 页 说明书 7 页
序列表 1 页

(54) 发明名称

一种脂联素的竞争抑制性酶联免疫检测试剂
盒及方法

(57) 摘要

本发明公开了一种脂联素的竞争抑制性酶联
免疫检测试剂盒, 包括: (1) 抗脂联素抗体和包含
脂联素全蛋白局部或者整个肽段且能与所述抗脂
联素抗体发生特异性抗原-抗体反应的脂联素多
肽; (2) 反应剂和检测剂, 用于通过竞争抑制性酶
联免疫检测待测样品中脂联素存在与否并确定
其含量的物质, 所述脂联素多肽为氨基酸序列如
SEQIDNO:1 所示的多肽。本发明还公开了采用该
试剂盒对待测样品中脂联素进行定性和定量的方
法。本发明的方案能直接定性并定量测定人体血
清、血浆和其它生物液体中脂联素, 并具有快速准
确、灵敏度高、高通量、价格低廉等优点, 对多种疾
病的预防和治疗有极大的指导意义。

1. 一种脂联素的竞争抑制性酶联免疫检测试剂盒,其特征在于包括:(1)抗脂联素抗体和包含脂联素全蛋白局部或者整个肽段且能与所述抗脂联素抗体发生特异性抗原-抗体反应的脂联素多肽;(2)反应剂和检测剂,用于通过竞争抑制性酶联免疫检测待测样品中脂联素存在与否并确定其含量的物质;其中,所述脂联素多肽为氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示的多肽。

2. 根据权利要求 1 所述的脂联素的竞争抑制性酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,该试剂盒还包括标准脂联素多肽,所述标准脂联素多肽是由脂联素多肽与 KLH 钥蓝蛋白螯合而成。

3. 根据权利要求 1 所述的脂联素的竞争抑制性酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述标准脂联素多肽通过以下方式制备:用生物素标记脂联素多肽,而后将生物素标记的脂联素多肽置于透析袋中,通过透析出去其中的小分子化合物,再于等摩尔量的 KLH 钥蓝蛋白在室温避光孵育,并立刻置于含 0.1% 叠氮钠的 1×PBS 中透析过夜,而后定量其浓度,冻干保存或在使用时通过倍比稀释制备梯级浓度的标准脂联素多肽。

4. 根据权利要求 1 所述的脂联素的竞争抑制性酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述脂联素多肽标记有生物素,所述反应剂还包括识别生物素标记的链霉亲和素,所述链霉亲和素标记有辣根过氧化物酶。

5. 根据权利要求 2 所述的脂联素的竞争抑制性酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,该试剂盒还包括包被有特异二抗的酶标板,所述特异二抗能与所述抗脂联素抗体发生特异性抗原-抗体反应。

6. 一种脂联素的竞争抑制性酶联免疫检测方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤一、制备脂联素的竞争抑制性酶联免疫检测试剂盒,该试剂盒包括:(1)抗脂联素抗体和包含脂联素全蛋白局部或者整个肽段且能与所述抗脂联素抗体发生特异性抗原-抗体反应的脂联素多肽;(2)反应剂和检测剂,用于通过竞争抑制性酶联免疫检测待测样品中脂联素存在与否并确定其含量的物质。

步骤二、通过竞争抑制性酶联免疫检测待测样品中脂联素存在与否并确定其含量;

其中,所述脂联素多肽为氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示的多肽。

7. 根据权利要求 5 所述的脂联素的竞争抑制性酶联免疫检测方法,其特征在于,该试剂盒还包括标准脂联素多肽,所述标准脂联素多肽是由脂联素多肽与 KLH 钥蓝蛋白螯合而成,包括如下步骤:用生物素标记脂联素多肽,而后将生物素标记的脂联素多肽置于透析袋中,通过透析出去其中的小分子化合物,再于等摩尔量的 KLH 钥蓝蛋白在室温避光孵育,并立刻置于含 0.1% 叠氮钠的 1×PBS 中透析过夜,而后定量其浓度,冻干保存或在使用时通过倍比稀释制备梯级浓度的标准脂联素多肽。

8. 根据权利要求 1 所述的脂联素的竞争抑制性酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:该试剂盒还包括包被有特异二抗的酶标板,所述特异二抗能与所述抗脂联素抗体发生特异性抗原-抗体反应;所述脂联素多肽标记有生物素,所述反应剂还包括识别生物素标记的链霉亲和素,所述链霉亲和素标记有辣根过氧化物酶。

一种脂联素的竞争抑制性酶联免疫检测试剂盒及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学技术领域,尤其涉及一种脂联素的竞争抑制性酶联免疫检测试剂盒及采用该试剂盒对待测样品中脂联素进行定性和定量的方法。

技术背景

[0002] 肥胖症是由多种因素引起的慢性代谢性疾病,也是心血管疾病、糖尿病及其它一些慢性病的主要诱因。研究表明,肥胖病例与高血压、糖尿病等疾病发生及发展呈正相关,即其发病率均呈现明显上升的趋势。多方面的研究已证实,脂联素(Adiponectin or ACRP30)是导致肥胖症发生的相关生物活性分子。

[0003] 脂联素是体内脂肪细胞分泌的一种特异性蛋白质,由 244 个氨基酸组成,分子量为 30kDa;血浆中含大量脂联素,大约占血浆蛋白的 0.01%,其含量约 5-10 $\mu\text{g/ml}$ 。脂联素是调节脂肪代谢途径的重要肽类激素,作为胰岛素增强子,脂联素也影响糖类代谢。研究证实,肥胖和冠心病病人脂联素量明显下降;脂联素也能抑制内皮细胞粘附分子的表达以及血管平滑肌细胞的增殖和迁移,而内皮细胞和血管平滑肌细胞在调节血压的过程中扮演着重要的角色。

[0004] 人们对脂联素的深入研究又发现,肥胖与癌症发病密切相关。体外实验表明,脂联素可以抑制细胞增殖和诱导白血病细胞的凋亡,而且,应用小鼠实验模型又进一步证实,它可以抑制肿瘤的生长。其机制可能是由于脂联素抑制血管内皮细胞的增殖、迁移和存活,从而抑制新生血管的生成,抑制肿瘤的继续发展。另外,研究也表明,脂联素抑制巨噬细胞产生 $\text{TNF2}\alpha$,而 $\text{TNF2}\alpha$ 有促进雌激素合成和促进血管发生的作用,从而对恶性肿瘤的发病起到巨大的调节作用。

[0005] 综上所述,脂联素的有效测定至少对于下列领域具有积极意义:1. 肥胖症的检测;2. 与肥胖相关癌症的早期筛选鉴定;3. 心血管类疾病及糖尿病监测;4. 本身及其类似物作为新的抗癌剂。目前,常见的脂联素临床检测及诊断主要是用酶联免疫法,即夹心法和标记法来检测脂联素,但各存在适用和技术方面的问题和难点。

[0006] 有鉴于此,研发出一种能直接定性并定量测定人体血清、血浆和其它生物液体中脂联素的免疫诊断试剂盒,同时具有快速准确、灵敏度高、高通量、价格低廉等优点,对多种疾病的预防和治疗有极大的指导意义。

发明内容

[0007] 针对现有技术的不足,本发明所要解决的技术问题在于提供一种能直接定性并定量测定人体血清、血浆和其它生物液体中脂联素的竞争抑制性酶联免疫检测试剂盒,具有快速准确、灵敏度高、高通量、价格低廉等优点,对多种疾病的预防和治疗有极大的指导意义。

[0008] 为了解决上述技术问题,本发明提供的一种脂联素的竞争抑制性酶联免疫检测试剂盒,包括:(1)抗脂联素抗体和包含脂联素全蛋白局部或者整个肽段且能与所述抗脂联

素抗体发生特异性抗原-抗体反应的脂联素多肽;(2)反应剂和检测剂,用于通过竞争抑制性酶联免疫检测待测样品中脂联素存在与否并确定其含量的物质。

[0009] 优选地,所述脂联素多肽为氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示的多肽:

[0010] 脂联素多肽:NH₂-CTGWMAGIPGHPGHNG (SEQ ID NO:1)。

[0011] 优选地,该试剂盒还包括标准脂联素多肽,所述标准脂联素多肽是由脂联素多肽与 KLH 钥蓝蛋白整合而成。更优地,所述标准脂联素多肽通过以下方式制备:用生物素标记脂联素多肽,而后将生物素标记的脂联素多肽置于透析袋中,通过透析出去其中的小分子化合物,再于等摩尔量的 KLH 钥蓝蛋白在室温避光孵育,并立刻置于含 0.1% 叠氮钠的 1×PBS 中透析过夜,而后定量其浓度,冻干保存或在使用时通过倍比稀释制备梯级浓度的标准脂联素多肽。

[0012] 优选地,所述脂联素多肽标记有生物素,所述反应剂还包括识别生物素标记的链霉亲和素,所述链霉亲和素标记有辣根过氧化物酶。

[0013] 优选地,该试剂盒还包括包被有特异二抗的酶标板,所述特异二抗能与所述抗脂联素抗体发生特异性抗原-抗体反应。更优地,所述酶标板为 96 孔酶标板,所述特异二抗一般为针对免疫动物的种属特异二抗。

[0014] 另外,本发明还提供了一种脂联素的竞争抑制性酶联免疫检测方法,包括如下步骤:

[0015] 步骤一、制备脂联素的竞争抑制性酶联免疫检测试剂盒,该试剂盒包括:(1)抗脂联素抗体和包含脂联素全蛋白局部或者整个肽段且能与所述抗脂联素抗体发生特异性抗原-抗体反应的脂联素多肽;(2)反应剂和检测剂,用于通过竞争抑制性酶联免疫检测待测样品中脂联素存在与否并确定其含量的物质。

[0016] 步骤二、通过竞争抑制性酶联免疫检测待测样品中脂联素存在与否并确定其含量。

[0017] 优选地,所述脂联素多肽为氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示的多肽:

[0018] 脂联素多肽:NH₂-CTGWMAGIPGHPGHNG (SEQ ID NO:1)。

[0019] 优选地,该试剂盒还包括标准脂联素多肽,所述标准脂联素多肽是由脂联素多肽与 KLH 钥蓝蛋白整合而成。更优地,所述标准脂联素多肽通过以下方式制备:用生物素标记脂联素多肽,而后将生物素标记的脂联素多肽置于透析袋中,通过透析出去其中的小分子化合物,再于等摩尔量的 KLH 钥蓝蛋白在室温避光孵育,并立刻置于含 0.1% 叠氮钠的 1×PBS 中透析过夜,而后定量其浓度,冻干保存或在使用时通过倍比稀释制备梯级浓度的标准脂联素多肽。

[0020] 优选地,所述脂联素多肽标记有生物素,所述反应剂还包括识别生物素标记的链霉亲和素,所述链霉亲和素标记有辣根过氧化物酶。

[0021] 该试剂盒还包括包被有特异二抗的酶标板,所述特异二抗能与所述抗脂联素抗体发生特异性抗原-抗体反应。更优地,所述酶标板为 96 孔酶标板,所述特异二抗一般为针对免疫动物的种属特异二抗。

[0022] 从原理上讲,在本发明的一个具体方案中,用种属特异二抗包被酶标微孔板,洗涤封闭后,加抗脂联素抗体,进行室温温育反应,再洗涤之后,加入生物素标记的脂联素多肽和正常的标准脂联素多肽(未用生物素标记)为标准结合反应组。同时,样品测定反应组也

混合加入生物素标记的脂联素肽和待检测样品。这样,各反应组内混合物均与已结合在二抗上的高度特异性的抗脂联素抗体发生分子相互竞争结合反应,至竞争结合反应完成后,充分洗涤,只有通过抗原-抗体特异结合反应而完全结合在抗脂联素抗体的生物素标记脂联素多肽与辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素形成强结合复合物,经最后洗涤并紧接着加入酶显色底物,最终经酶催化反应。这样,反应显色的强度与二抗-脂联素抗体-生物素标记的脂联素多肽-辣根过氧化物酶链霉亲和素形成的复合物成正比,而与标准脂联素多肽及样品中脂联素量成反比。根据确定加入标准脂联素多肽的已知浓度,绘制出每次实验测定的标准曲线,由此,计算出样品中相应脂联素的实际量。

[0023] 相比于现有技术,本发明是充分结合抗原抗体反应的特异性和酶反应的快速及敏感性,建立和发展起的一种可以精确测定脂联素的酶免疫检测方法,通过采用能竞争结合抗脂联素抗体配体的脂联素多肽,结合竞争抑制性酶联免疫检测的优点,能直接定性并定量测定人体血清、血浆和其它生物液体中脂联素的竞争抑制性酶联免疫检测试剂盒,它具有快速准确、灵敏度高、高通量、价格低廉等优点,对多种疾病的预防和治疗有极大的指导意义。

具体实施方式

[0024] 为使本发明更加容易理解,下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。

[0025] 实施例 1:待测样品中脂联素的检测试验

[0026] 本实施例中采用的设置有 1 个 96 酶标板由美国瑞博奥生物科技有限公司生产,每个孔板内已包被种属特异二抗,而后依次进行如下各步骤的操作:

[0027] 1、加样

[0028] 撕开酶标板上的保护膜,将 100 μ l 经样品稀释液 A 稀释过的样品加入孔板内,然后放在摇床上室温下摇动 1 至 2 小时,或者亦可在 4 $^{\circ}$ C 下反应 12-18 小时。

[0029] 2、洗膜

[0030] 洗涤液清洗:从孔板内吸出样品,用 300 μ l 1 倍的洗涤液清洗,之后放在摇床上室温摇动 5 分钟,再重复此清洗步骤两次。也可以直接使用洗板机洗涤。

[0031] 3、配制生物素标记的脂联素多肽工作液

[0032] 短暂离心生物素标记脂联素多肽离心管,将 5 μ l 的生物素标记脂联素多肽加入到 5 ml 的样品稀释液 A 中,上下吹打均匀。最终生物素标记脂联素多肽的浓度应为 10ng/ml。

[0033] 4、配制不同浓度的标准品工作液

[0034] 短暂离心脂联素多肽标准品离心管,将 10 μ l 的脂联素多肽标准品加入 990 μ l 的脂联素多肽工作液,获得 1000ng/ml 的标准品并用脂联素多肽工作液按 10 倍稀释,分别获得 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml, 100pg/ml, 10pg/ml, 0pg/ml 的标准品工作液。

[0035] 5、配制样品工作液

[0036] 所用样品取自 35 至 72 岁治疗前肝癌患者血清,将样品血清用样品稀释液 A 稀释 2 倍(根据不同样品浓度可按不同倍数稀释),同样将 10 μ l 的样品用脂联素多肽工作液按 4 倍稀释,保证脂联素多肽工作液的浓度为 10ng/ml。

[0037] 6、配制阳性对照工作液

[0038] 短暂离心正对照离心管,加入 103 μ l 样品稀释液 B 和 2 μ l 10 \times 生物素标记脂联素多肽。

[0039] 7、加入标准品,样品和阳性对照

[0040] 加入 100 μ l 不同梯度的标准品,样品和阳性对照于微孔板上,设两个重复。用保护膜盖住微孔板放在摇床上室温条件下摇动 2.5 小时,亦可在 4 $^{\circ}$ C 下反应 12-18 小时。而后从微孔板内吸出反应液,重复步骤 2 的洗膜步骤。

[0041] 8、加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素

[0042] 向每个方格加入 100 μ l 稀释过的辣根过氧化物酶标记的抗生物素蛋白链菌素,然后放在摇床上室温条件下摇动 1 至 2 小时,亦可在 4 $^{\circ}$ C 下反应 12-18 小时。而后从方格内吸出辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素,重复步骤 2 的洗膜步骤。

[0043] 其中,辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素商购自美国宝德公司公司(产品号 554066),使用前,需要用封闭液进行 20,000 倍稀释。

[0044] 另外,需要说的是,在本实施的步骤 1 至步骤 4 中,用到如下溶液,其成分可配制方法如下:

[0045] 样品稀释液(20 \times PBS):氯化钾 16g,氯化钠 640g,磷酸二氢钾 16g,磷酸氢二钠 92g,溶解于 2.6L 纯化水后,再加纯化水至 4 升。

[0046] 样品稀释液 A(20 \times PBS):氯化钾 16g,氯化钠 640g,磷酸二氢钾 16g,磷酸氢二钠 92g,溶解于 2.6L 纯化水后,加入 1.8% 叠氮钠,再用纯化水定容至 4 升。

[0047] 样品稀释液 B(5 \times PBS):氯化钾 4g,氯化钠 160g,磷酸二氢钾 4g,磷酸氢二钠 23g,溶解于 2.6L 纯化水后,再用纯化水定容至 4 升。

[0048] 封闭液的配制方法如下:先将 20 \times PBS 稀释成 1 \times PBS(20 \times PBS 200ml,纯化水 3800ml),然后配制 10% 牛血清白蛋白(牛血清白蛋白 400g,1 \times PBS 加至 4 升),最后配制封闭液(10% 牛血清白蛋白 4 升,酪蛋白 4 升,混匀)。

[0049] 20 \times 洗涤液(20 \times TBS)配分如下:2M 三羟甲基氨基甲烷缓冲液(pH7.5) 800ml,5M 氯化钠 4800ml(氯化钠 1461g,纯化水 3.3 升,溶解后纯化水加至 5 升),混匀后,纯化水加至 8 升,吐温 160ml。使用时,将 20 \times 洗涤液倍比稀释即可。

[0050] 另外,标准脂联素多肽的制备通过肽段 NH₂-CTGWMAGIPGHPGHNG 与 KLH 钥蓝蛋白整合,此肽段定位于脂联素的第 36 至 51 个氨基酸,由吉尔生化(上海)有限公司合成。

[0051] 标准脂联素多肽的制备方法:按照 Thermo Scientific 公司生产的生物素标记脂联素多肽。将脂联素多肽置于透析袋中,于 1 \times PBS 中透析过夜去除小分子化合物如 Tris,甘氨酸。EZ-Link[®] Sulfo-NHS-LC-Biotin(Thermo Cat#21435)与等量脂联素多肽在室温避光孵育半个小时,立即置于含 0.1% 叠氮钠的 1 \times PBS 中透析过夜,次日以 BCA Protein Assay Kit(Pierce Cat#23225)测出生物素标记脂联素多肽浓度,分装冻干。

[0052] 抗脂联素抗体的制备方法:将乳化好的脂联素多肽 200 μ g 免疫新西兰兔,隔 10 至 14 天再用相同剂量进行第二次免疫,再隔 7 至 10 天用减半剂量免疫,从新西兰兔耳缘静脉采少量血清进行 ELISA 实验检测抗体效价,如效价达到 1:100000 以上则进行心脏采血,采用 GE 亲和层析柱 HiTrap Protein A HP(Cat#17-0403-01)与 HiTrap Protein G HP(Cat#17-0404-01)串联纯化血清制成冻干干粉抗体。当然在本发明的其他实施例中也会

根据需要采用其他本领域内常用的抗体制备技术制备抗脂联素抗体。

[0053] 种属特异二抗AffiniPure Goat anti-rabbit IgG(H+L) (Cat#111-005-003) 购自 Jackson Immuno 公司。

[0054] 9、检测

[0055] 加入 100 μ l 的 TMB One-Step 底物反应液于室温下孵育 0.5 小时,再加入 50 μ l 的终止液。于酶标仪 450nm 滤光片进行读数。将数值代入生物分析软件 SigmaPlot, 以 X 轴为标准品浓度, Y 轴为吸光值求出样品血清中脂联素的浓度。

[0056] 酶标板 OD450 检测结果如表一所示:

[0057] 表一

[0058]

	标准品1	标准品2
Assay A 稀释液	0.098	0.08
生物素	0.943	0.898
10000	0.279	0.257
1000	0.401	0.364
100	0.636	0.645
10	0.792	0.8
1	0.854	0.87
0.1	0.866	0.862

[0059] 空白对照 Assay A 稀释液 OD450 为 0.098 和 0.08, 阳性对照生物素为 0.943 和 0.898。脂联素实际测定量的计算根据取测定及标准组 OD450 平均读值, 包括阳性和样品以及空白读值, 以标准品浓度为 X 轴, 吸光度百分比为 Y 轴, 使用 Sigma Plot 或 Fourparameter Logistic 回归模型软件, 绘制标准曲线, 由此确定出脂联素实际量。

[0060] 计算公式: 吸收度的百分比 = (B - 空白 OD 值) / (BO - 空白 OD 值)

[0061] B = 样品或标准 OD 值 BO = 零标准 OD 值(总结合物)

[0062] 得出结果如表二所示:

[0063] 表二

稀释度	浓度
10000	21.5
1000	35.2
100	66.3
10	85
1	92.9
0.1	93.2

[0065] 结果表明灵敏度测试中脂联素最低检测剂量为 2.47ng/ml 或 93 pM, 线性度为 1 至 100 ng/ml。

[0066] 代入肝癌病人血清数据; 以标准品浓度为 X 轴, 吸光度百分比为 Y 轴, 使用 Sigma Plot 或 Fourparameter Logistic 回归模型软件, 得出肝癌病人血清中脂联素含量。

[0067] 肝癌病人血清 OD450 数据如表三所示:

[0068] 表三

[0069]

	1	2	3	4	5	6
A	0.491	0.487	0.489	0.49	0.425	0.381
B	0.393	0.398	0.438	0.397	0.352	0.391
C	0.524	0.54	0.442	0.436	0.393	0.375
D	0.489	0.49	0.405	0.383	0.345	0.359
E	0.438	0.397	0.508	0.486	0.329	0.334
F	0.442	0.436	0.503	0.546	0.403	0.404

[0070] 通过 Sigma Plot 或 Fourparameter Logistic 回归模型软件转换后数据 :测定范围在 36.6 到 65.3 之间,平均值为 49.5,结果如图表四所示 :

[0071] 表四

[0072]

	1	2	3
A	59.2	46.3	39.6
B	45.9	61.2	36.6
C	65.3	65.2	47.2
D	56.4	49.8	46.8
E	46.3	45	40
F	49.3	46.9	45.3

[0073] 第二批肝癌病人血清 OD450 数据如图表五所示 :

[0074]

	1	2	3	4	5	6
A	0.325	0.346	0.39	0.396	0.367	0.342
B	0.4	0.4	0.371	0.366	0.356	0.35
C	0.39	0.397	0.368	0.381	0.349	0.362
D	0.342	0.34	0.297	0.304	0.394	0.389
E	0.299	0.287	0.26	0.252	0.308	0.298
F	0.348	0.345	0.266	0.274	0.315	0.308

[0075] 通过 Sigma Plot 或 Fourparameter Logistic 回归模型软件转换后数据 :测定范围在 26.3 到 57.7 之间,平均值为 39,结果如表六所示 :

[0076] 表六

[0077]

	1	2	3
A	35.3	43.3	39.2
B	43.7	40.1	39
C	42.8	40.1	39.3
D	38.3	32.3	57.7
E	31.7	26.3	42.8
F	39.1	28.2	43.2

[0078] 结果表明试剂盒批内差异小于 10% (根据同一病人血清样品在不同微孔板的比较), 批间差异小于 15% (根据同一种疾病所取样品在不同批次试剂盒中脂联素浓度平均值的比较)。

[0079] 应当说明的是, 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制, 尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明, 本领域的普通技术人员应当理解, 可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换, 而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

<110> 广州瑞博奥生物科技有限公司
<120> 一种脂联素的竞争抑制性酶联免疫检测试剂盒及方法
<160> 1
<210> 1
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 1
CTGWMAGIPGHPGHNG

专利名称(译)	一种脂联素的竞争抑制性酶联免疫检测试剂盒及方法		
公开(公告)号	CN102721819B	公开(公告)日	2014-08-13
申请号	CN201210215806.3	申请日	2012-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	广州瑞博奥生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州瑞博奥生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州瑞博奥生物科技有限公司		
[标]发明人	黄若馨 蒋卫东		
发明人	黄若馨 蒋卫东		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/53 G01N33/531		
代理人(译)	王会龙		
其他公开文献	CN102721819A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种脂联素的竞争抑制性酶联免疫检测试剂盒，包括：
 (1) 抗脂联素抗体和包含脂联素全蛋白局部或者整个肽段且能与所述抗脂联素抗体发生特异性抗原-抗体反应的脂联素多肽；(2) 反应剂和检测剂，用于通过竞争抑制性酶联免疫检测待测样品中脂联素存在与否并确定其含量的物质，所述脂联素多肽为氨基酸序列如SEQIDNO:1所示的多肽。本发明还公开了采用该试剂盒对待测样品中脂联素进行定性和定量的方法。本发明的方案能直接定性并定量测定人体血清、血浆和其它生物液体中脂联素，并具有快速准确、灵敏度高、高通量、价格低廉等优点，对多种疾病的预防和治疗有极大的指导意义。

	标准品1	标准品2
Assay A 稀释液	0.098	0.08
生物素	0.943	0.898
10000	0.279	0.257
1000	0.401	0.364
100	0.636	0.645
10	0.792	0.8
1	0.854	0.87
0.1	0.866	0.862