



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107037217 B

(45)授权公告日 2018.03.02

(21)申请号 201611030424.8

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2016.11.16

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107037217 A

审查员 肖吉

(43)申请公布日 2017.08.11

(73)专利权人 广州华弘生物科技有限公司

地址 510530 广东省广州市高新技术产业  
开发区科学城伴河路84号自编二栋  
101

(72)发明人 陈立国 邹伟权 张亚丽 李庆祥

母润红 王涛 苏焱

(74)专利代理机构 广州胜沃园专利代理有限公

司 44416

代理人 张帅

权利要求书2页 说明书5页

(54)发明名称

脂蛋白a的酶联免疫试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明属于医疗检测领域,具体涉及一种脂蛋白a的酶联免疫检测试剂盒,其由以下成分组成:(1)包被有抗脂蛋白a抗体的酶标板;(2)脂蛋白a系列标准品;(3)酶标记抗体溶液;(4)稀释液;(5)洗涤液;(6)底物液;(7)显色液;(8)终止液。所述酶标记抗体溶液为含5mg/L的HRP标记的抗脂蛋白a抗体、0.5mg/L的甘油单蓖麻油酸酯和0.5mg/L的BSA的50mmol/L PBS缓冲液,pH值为8.0。

1. 一种脂蛋白a的酶联免疫检测试剂盒,其由以下成分组成:(1)包被有抗脂蛋白a抗体的酶标板;(2)脂蛋白a系列标准品;(3)酶标记抗体溶液;(4)稀释液;(5)洗涤液;(6)底物液;(7)显色液;(8)终止液;

所述酶标记抗体溶液为含5 mg/L的HRP标记的抗脂蛋白a抗体、0.5 mg/L的甘油单蓖麻油酸酯和0.5 mg/L的BSA的50 mmol/L PBS缓冲液,pH值为8.0;

所述底物液为pH值为7.4的磷酸-柠檬酸缓冲液配制的5%过氧化氢溶液,并且溶液中含0.1 mg/L的焦磷酸二氢钠;

所述的酶联免疫检测试剂盒的制备方法,具体步骤如下:

(1)包被有抗脂蛋白a抗体的酶标板的制备:

a、抗体稀释:用pH为8.0的50 mM的Tris-HCl缓冲溶液将抗脂蛋白a单克隆抗体稀释到10  $\mu$ g/ml,得包被液;

b、包被:取微孔板,用洗涤液洗涤3次,加入上述含抗脂蛋白a单克隆抗体的包被液,每孔100  $\mu$ L/孔,4 $^{\circ}$ C孵育12小时;

c、封闭:倾去包被液,置于吸水纸上轻拍几次,去除残液,加入含重量百分比为0.1%的甘油单蓖麻油酸酯、0.5%的BSA和1%蔗糖的浓度为50 mmol/L的Tris-HCl封闭液,其pH为8.0,300  $\mu$ l/孔,室温,1小时;

d、真空干燥,密封,即得包被有抗脂蛋白a抗体的酶标板;

(2)酶标记抗体溶液制备:

a、将10 mg HRP溶于1 mL蒸馏水中并加入新鲜配制的0.06 mol/L NaIO<sub>4</sub> 1 mL,混匀于4 $^{\circ}$ C放置30分钟;

b、加入0.16 mol/L乙二醇水溶液1 mL,室温放置30分钟;

c、加入含5 mg抗脂蛋白a抗体的水溶液2 mL,然后于4 $^{\circ}$ C下,对0.05 mol/L pH 9.6的碳酸缓冲液透析过夜;

d、吸出透析袋内溶液,加入0.5 mL NaBH<sub>4</sub>,4 $^{\circ}$ C下放置2小时;

e、滴加等体积饱和(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液,4 $^{\circ}$ C下放置30分钟;

f、上述溶液2500 rpm离心10分钟,去除上清液,沉淀用少许0.2 mol/L pH 7.4的PBS溶解,并于4 $^{\circ}$ C下对此缓冲液透析过夜;

g、吸出透析袋内溶液,离心除去不溶物,上清液过葡聚糖层析柱,用0.2 mol/L pH7.4的PBS洗脱,收集洗脱液,即为纯化的酶标记抗体;

h、将收集的酶标记抗体除菌过滤,配制成酶标记抗体溶液,具体为含5 mg/L的HRP标记的抗脂蛋白a抗体、0.5 mg/L的甘油单蓖麻油酸酯和0.5 mg/L的BSA的50 mmol/L PBS缓冲液,pH值为8.0;

(3)标准品、稀释液、洗涤液、底物液、显色液和终止液,按照本领域常规的溶液配制方法制备。

2. 根据权利要求1所述的酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述脂蛋白a系列标准品的脂蛋白a含量为:0、10、50、100、200、400和600 mg/L的50 mmol/L PBS缓冲液,并且每升标准品溶液中含有5g BSA和10g蔗糖。

3. 根据权利要求1所述的酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述稀释液为50 mmol/L pH 7.4的PBS缓冲液;所述洗涤液为50 mmol/L pH 7.4的PBS配制的0.05%吐温20溶液。

4. 根据权利要求1所述的酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述显色液为四甲基联苯胺(TMB)的甲醇溶液,浓度为0.5mg/ml;所述终止液为3mol/L硫酸。

## 脂蛋白a的酶联免疫试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于医疗检测领域,具体涉及一种用于检测磷酸化脂蛋白(a)的酶联免疫试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 动脉粥样硬化(atherosclerosisAS)是指有动脉壁增厚、变硬及弹性降低,并以动脉内膜形成粥样斑块为特征的病变。目前对于其发病原因尚未完全确定,可能与年龄、性别、血脂异常、高血压、吸烟、糖尿病、肥胖、感染等因素有关。高胆固醇浓度,脂蛋白a是AS的一个主要的危险因子。

[0003] 脂蛋白(a)是人血浆中的一类特别的脂蛋白颗粒,最早由Kare Berg于1963年发现,主要由低密度脂蛋白颗粒和富含糖链的高度亲水的apo(a)组成;其中每个apo(a)分子通过一个二硫键和一分子的apoB-100共价交联。Apo(a)由三个完全不同的结构组成:未激活的蛋白酶区域、一个拷贝的K5环饼和多拷贝的K4环饼区。

[0004] 研究表明,人血浆中Lp(a)浓度的升高与心血管功能的紊乱及脑血管疾病相关,血浆中Lp(a)浓度的升高通常预示着早期的冠状动脉和梗死风险的增加,同时由于Lp(a)基本浓度具有高度的遗传性,因此,Lp(a)是早期冠心病(CHD)的重要预示因子,对其进行检测对于心血管疾病的预测具有重要意义。

[0005] 目前,已知的检测脂蛋白(a)浓度的方法有免疫比浊法、放射免疫法、荧光免疫测定法等检测方法,但上述测定方法的操作比较复杂,检测用时长或者灵敏度较低等缺点,不适合做常规检测。

### 发明内容

[0006] 本发明的第一方面是提供一种脂蛋白a的酶联免疫检测试剂盒,其由以下成分组成:(1)包被有抗脂蛋白a抗体的酶标板;(2)脂蛋白a系列标准品;(3)酶标记抗体溶液;(4)稀释液;(5)洗涤液;(6)底物液;(7)显色液;(8)终止液。

[0007] 所述脂蛋白a系列标准品的脂蛋白a含量为:0、10、50、100、200、400和600mg/L的50mmol/L PBS缓冲液,并且每升标准品溶液中含有5gBSA和10g蔗糖。

[0008] 所述酶标记抗体溶液为含5mg/L的HRP标记的抗脂蛋白a抗体、0.5mg/L的甘油单蓖麻油酸酯和0.5mg/L的BSA的50mmol/L PBS缓冲液,pH值为8.0。

[0009] 所述稀释液为50mmol/L的PBS(pH7.4)缓冲液;

[0010] 所述洗涤液为50mmol/L的PBS(pH7.4)配制的0.05%吐温20溶液。

[0011] 所述底物液为磷酸-柠檬酸缓冲液(pH7.4)配制的5%过氧化氢溶液,并且溶液中0.1mg/L的焦磷酸二氢钠;

[0012] 所述显色液为四甲基联苯胺(TMB)的甲醇溶液,浓度为0.5mg/ml;

[0013] 所述终止液为3mol/L硫酸。

[0014] 本发明的第二方面是提供所述试剂盒的制备方法,具体步骤如下:

[0015] (1) 包被有抗脂蛋白a抗体的酶标板的制备:

[0016] a、抗体稀释:用pH为8.0的50mM的Tris-HCl缓冲溶液将抗脂蛋白a单克隆抗体稀释到10 $\mu$ g/ml,得包被液;

[0017] b、包被:取微孔板,用洗涤液洗涤3次,加入上述含抗脂蛋白a单克隆抗体的包被液,每孔100 $\mu$ L/孔,4 $^{\circ}$ C孵育12小时;

[0018] c、封闭:倾去包被液,置于吸水纸上轻拍几次,去除残液,加入含重量百分比为0.1%的甘油单蓖麻油酸酯、0.5%的BSA和1%蔗糖的浓度为50mmol/L的Tris-HCl封闭液,其pH为8.0,300 $\mu$ l/孔,室温,1小时;

[0019] d、真空干燥,密封,即得包被有抗脂蛋白a抗体的酶标板。

[0020] (2) 酶标记抗体溶液制备:

[0021] a、将10mg HRP溶于1ml蒸馏水中并加入新鲜配制的0.06mol/L NaIO<sub>4</sub>1ml,混匀于4 $^{\circ}$ C放置30分钟;

[0022] b、加入0.16mol/L乙二醇水溶液1ml,室温放置30分钟;

[0023] c、加入含5mg抗脂蛋白a抗体的水溶液2ml,然后于4 $^{\circ}$ C下,对0.05mol/L碳酸缓冲液(pH9.6)透析过夜;

[0024] d、吸出透析袋内溶液,加入0.5ml NaBH<sub>4</sub>,4 $^{\circ}$ C下放置2小时;

[0025] e、滴加等体积饱和(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液,4 $^{\circ}$ C下放置30分钟;

[0026] f、上述溶液2500rpm离心10分钟,去除上清液,沉淀用少许0.2mol/L pH7.4的PBS溶解,并于4 $^{\circ}$ C下对此缓冲液透析过夜;

[0027] g、吸出透析袋内溶液,离心除去不溶物,上清液过葡聚糖层析柱,用0.2mol/L pH7.4的PBS洗脱,收集洗脱液,即为纯化的酶标记抗体;

[0028] h、将收集的酶标记抗体除菌过滤,配制成酶标记抗体溶液,具体为含5mg/L的HRP标记的抗脂蛋白a抗体、0.5mg/L的甘油单蓖麻油酸酯和0.5mg/L的BSA的50mmol/L PBS缓冲液,pH值为8.0。

[0029] (3) 标准品、稀释液、洗涤液、底物液、显色液和终止液,按照本领域常规的溶液配制方法制备。

## 具体实施方式

[0030] 下面将进一步的来举例说明本发明。需要指出的是,以下说明仅仅是对本发明要求保护的技术方案的举例说明,并非对这些技术方案的任何限制。本发明的保护范围以所附权利要求书记载的内容为准。

[0031] 实施例1

[0032] (1) 包被有抗脂蛋白a抗体的酶标板的制备:

[0033] a、抗体稀释:用pH为8.0的50mM的Tris-HCl缓冲溶液将抗脂蛋白a单克隆抗体稀释到10 $\mu$ g/ml,得包被液;

[0034] b、包被:取微孔板,用洗涤液洗涤3次,加入上述含抗脂蛋白a单克隆抗体的包被液,每孔100 $\mu$ L/孔,4 $^{\circ}$ C孵育12小时;

[0035] c、封闭:倾去包被液,置于吸水纸上轻拍几次,去除残液,加入含重量百分比为0.1%的甘油单蓖麻油酸酯、0.5%的BSA和1%蔗糖的浓度为50mmol/L的Tris-HCl封闭液,

其pH为8.0,300 $\mu$ l/孔,室温,1小时;

[0036] d、真空干燥,密封,即得包被有抗脂蛋白a抗体的酶标板。

[0037] (2) 酶标记抗体溶液制备:

[0038] a、将10mg HRP溶于1ml蒸馏水中并加入新鲜配制的0.06mol/L NaIO<sub>4</sub>1ml,混匀于4 $^{\circ}$ C放置30分钟;

[0039] b、加入0.16mol/L乙二醇水溶液1ml,室温放置30分钟;

[0040] c、加入含5mg抗脂蛋白a抗体的水溶液2ml,然后于4 $^{\circ}$ C下,对0.05mol/L碳酸缓冲液(pH9.6)透析过夜;

[0041] d、吸出透析袋内溶液,加入0.5ml NaBH<sub>4</sub>,4 $^{\circ}$ C下放置2小时;

[0042] e、滴加等体积饱和(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液,4 $^{\circ}$ C下放置30分钟;

[0043] f、上述溶液2500rpm离心10分钟,去除上清液,沉淀用少许0.2mol/L pH7.4的PBS溶解,并于4 $^{\circ}$ C下对此缓冲液透析过夜;

[0044] g、吸出透析袋内溶液,离心除去不溶物,上清液过葡聚糖层析柱,用0.2mol/L pH7.4的PBS洗脱,收集洗脱液,即为纯化的酶标记抗体;

[0045] h、将收集的酶标记抗体除菌过滤,配制成酶标记抗体溶液,具体为含5mg/L的HRP标记的抗脂蛋白a抗体、0.5mg/L的甘油单蓖麻油酸酯和0.5mg/L的BSA的50mmol/L PBS缓冲液,pH值为8.0。

[0046] (3) 标准品、稀释液、洗涤液、底物液、显色液和终止液,按照本领域常规的溶液配制方法制备。

[0047] 所述步骤1和2所采用的抗脂蛋白a抗体为配对的单克隆抗体,所述抗体购自上海康朗生物科技公司。

[0048] 所述脂蛋白a系列标准品的脂蛋白a含量为:0、10、50、100、200、400和600mg/L的50mmol/L PBS缓冲液,并且每升标准品溶液中含有5g BSA和10g蔗糖。

[0049] 所述酶标记抗体溶液为含5mg/L的HRP标记的抗脂蛋白a抗体、0.5mg/L的甘油单蓖麻油酸酯和0.5mg/L的BSA的50mmol/L PBS缓冲液,pH值为8.0。

[0050] 所述稀释液为50mmol/L的PBS (pH7.4) 缓冲液;

[0051] 所述洗涤液为50mmol/L的PBS (pH7.4) 配制的0.05%吐温20溶液。

[0052] 所述底物液为磷酸-柠檬酸缓冲液 (pH7.4) 配制的5%过氧化氢溶液,并且溶液中0.1mg/L的焦磷酸二氢钠;

[0053] 所述显色液为四甲基联苯胺 (TMB) 的甲醇溶液,浓度为0.5mg/ml;

[0054] 所述终止液为3mol/L硫酸。

[0055] 实施例2试剂盒灵敏度测定

[0056] 分别配制脂蛋白a标准品不同浓度的PBS缓冲液,浓度分别为0.1、0.2、0.5、1和2mg/L,采用实施例1制备的试剂盒进行检测,以对照缓冲液作为空白对照,具体检测方法如下:

[0057] a) 抗原-抗体反应:在包被酶标板的微孔中分别加入50 $\mu$ l标准品溶液和稀释液,37 $^{\circ}$ C水浴保温50分钟。清洗缓冲液洗板操作5次。

[0058] b) 将HRP标记的抗脂蛋白a抗体溶液加入各孔,每孔100 $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C水浴保温50分钟。重复洗板操作5次。

[0059] c) 显色反应:每孔依次加入底物溶液,显色液各50 $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C水浴保温20分钟,每孔再加入50 $\mu$ l反应终止液结束反应。

[0060] d) 比色:用酶标仪在450nm测定OD值并记录。

[0061] e) 制作标准曲线:以标准品浓度为横坐标,标准品测定的OD值为纵坐标,作出标准曲线;计算标准曲线回归系数 $R^2$ ,当 $R^2 > 0.99$ 时本次测定有效;

[0062] 计算脂蛋白a标准品与空白对照的比值,当比值大于2时,说明试剂盒可以测定该浓度的脂蛋白a标准品,最低浓度即为试剂盒的灵敏度,平行试验五次取平均值,具体结果如下:

[0063]

	标准品吸光度 (OD)	空白对照吸光度 (OD)
0.1mg/L	0.045	0.017
0.5mg/L	0.229	0.012

[0064] 结果表明本发明实施例1制备的试剂盒其灵敏度可以达到0.1mg/L。

[0065] 实施例3试剂盒稳定性考察

[0066] 将实施例1制备的试剂盒在20 $^{\circ}$ C分别放置6个月和12个月,按照实施例2的方法测定试剂盒的灵敏度以及标准品各浓度的吸光度,并对数据进行回归分析,计算 $R^2$ 值。

[0067] 本实施例中对比例设定如下:

[0068] 对比例1:试剂盒的制备方法同实施例1,区别仅在于酶标记抗体溶液为含5mg/L的HRP标记的抗脂蛋白a抗体和1mg/L的BSA的50mmol/L PBS缓冲液,pH值为8.0。

[0069] 对比例2:试剂盒的制备方法同实施例1,区别仅在于酶标记抗体溶液为含5mg/L的HRP标记的抗脂蛋白a抗体、0.5mg/L的吐温20和0.5mg/L的BSA的50mmol/L PBS缓冲液,pH值为8.0。

[0070] 对比例3:试剂盒的制备方法同实施例1,区别仅在于酶标板制备过程中,步骤c的封闭液组成为含1%的BSA和1%蔗糖的浓度为50mmol/L的Tris-HCl。

[0071] 对比例4:试剂盒的制备方法同实施例1,区别仅在于酶标板制备过程中,步骤c的封闭液组成为含0.1%的甘油单蓖麻油酸酯和2%蔗糖的浓度为50mmol/L的Tris-HCl。

[0072] 具体结果如下:

[0073]

	实施例 1	对比例 1	对比例 2	对比例 3	对比例 4
灵敏度 (6 个月)	0.1 mg/L	1mg/L	0.5mg/L	1mg/L	1mg/L
线性方程的 $R^2$ 值 (6 个月)	0.99	0.81	0.91	0.86	0.82

[0074]

灵敏度 (12 个月)	0.1 mg/L	2mg/L	1mg/L	2mg/L	1mg/L
线性方程的 R <sup>2</sup> 值 (12 个月)	0.98	0.69	0.78	0.73	0.75

[0075] 另外,在4℃下保存36个月后,试剂盒灵敏度及线性良好,与刚制备的试剂盒无明显差别。

[0076] 实施例4

[0077] 应用本发明实施例1制备的酶联免疫定量检测试剂盒的质量检测精密度:随机抽取50盒不同批次试剂盒,用同一份动脉粥样硬化患者血清按说明书操作步骤进行重复测定。计算每次测定结果,求出均值、SD和变异系数CV。精密度试验结果显示批间CV小于2%;结果如下:

[0078]

	平均值	SD	批间CV
正常血清	217.4mg/L	1.3	0.59%
高脂血清	489.2mg/L	5.2	1.06%

[0079] 本发明内容仅仅举例说明了要求保护的一些具体实施方案,其中一个或多个技术方案中所记载的技术特征可以与任意的一个或多个技术方案相组合,这些经组合而得到的技术方案也在本申请保护范围内,就像这些经组合而得到的技术方案已经在本发明公开内容中具体记载一样。

专利名称(译)	脂蛋白a的酶联免疫试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107037217B</a>	公开(公告)日	2018-03-02
申请号	CN201611030424.8	申请日	2016-11-16
[标]申请(专利权)人(译)	广州华弘生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州华弘生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州华弘生物科技有限公司		
[标]发明人	陈立国 邹伟权 张亚丽 李庆祥 母润红 王涛 苏焱		
发明人	陈立国 邹伟权 张亚丽 李庆祥 母润红 王涛 苏焱		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/6893		
代理人(译)	张帅		
审查员(译)	肖吉		
其他公开文献	CN107037217A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明属于医疗检测领域，具体涉及一种脂蛋白a的酶联免疫检测试剂盒，其由以下成分组成：(1)包被有抗脂蛋白a抗体的酶标板；(2)脂蛋白a系列标准品；(3)酶标记抗体溶液；(4)稀释液；(5)洗涤液；(6)底物液；(7)显色液；(8)终止液。所述酶标记抗体溶液为含5mg/L的HRP标记的抗脂蛋白a抗体、0.5mg/L的甘油单蓖麻油酸酯和0.5mg/L的BSA的50mmol/L PBS缓冲液，pH值为8.0。

	实施例1	对比例1	对比例2	对比例3	对比例4
灵敏度(6个月)	0.1 mg/L	1mg/L	0.5mg/L	1mg/L	1mg/L
线性方程的R <sup>2</sup> 值 (6个月)	0.99	0.81	0.91	0.86	0.82