



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108982861 A

(43)申请公布日 2018.12.11

(21)申请号 201810832836.6

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2018.07.26

G01N 33/535(2006.01)

(83)生物保藏信息

CGMCC No. 15791 2018.06.01

CGMCC No. 15792 2018.06.01

(71)申请人 北京普恩光德生物科技开发有限公司

地址 101318 北京市顺义区后沙峪镇裕民大街甲1号4幢

(72)发明人 于晖 李雨心 谷明星 代晓曼

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟 程云

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

(54)发明名称

一种血管扩张型刺激磷蛋白检测试剂盒

(57)摘要

本申请涉及一种血管扩张型刺激磷蛋白检测试剂盒。所述试剂盒包含：包被有VASP单克隆抗体的磁颗粒、含有标记的VASP-P单克隆抗体的酶工作液、裂解液、反应底物。所述试剂盒检测速度快、操作简便、灵敏度高、特异性好。

1. 一种血管扩张型刺激磷蛋白检测试剂盒,其包含:

磁颗粒工作液、

酶工作液、

任选地,裂解液、

任选地,反应底物;

其中,

所述磁颗粒工作液包含:0.15mg/ml至0.3mg/ml包被有VASP单克隆抗体的磁颗粒、缓冲液、氯化钠、表面活性剂、稳定剂、防腐剂;

所述的酶工作液包含:标记的VASP-P单克隆抗体、缓冲液、氯化钠、稳定剂、防腐剂;

所述的裂解液包含:缓冲液、氯化钠、EDTA、NaF、NP40、防腐剂、pH 7至8;

所述标记选自:辣根过氧化物酶标记、碱性磷酸酶标记、放射性标记、免疫荧光标记;

所述的反应底物选自:邻苯二胺、ABTS、四甲基联苯胺、4氨基安替比林、BCIP/NBT;

所述表面活性剂选自:吐温20、吐温80;

所述缓冲液选自:Tris-HCl、PBS;

所述稳定剂选自:山羊血清、小牛血清、BSA、海藻糖;

所述防腐剂选自:Proclin-300、叠氮钠;

优选地,所述VASP-P包含磷酸化的239位丝氨酸;

优选地,所述磁颗粒与所述VASP单克隆抗体的质量比为10:1至40:1,更优选20:1;

优选地,所述包被有VASP单克隆抗体的磁颗粒浓度为0.2mg/ml;

优选地,所述VASP单克隆抗体由2018年6月1日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏号为CGMCC No.15791的杂交瘤细胞所产生,

优选地,所述VASP-P单克隆抗体由2018年6月1日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏号为CGMCC No.15792的杂交瘤细胞所产生。

2. 根据权利要求1所述的血管扩张型刺激磷蛋白检测试剂盒,其中:

所述磁颗粒工作液包含:0.2mg/ml包被有VASP单克隆抗体的磁颗粒、20mM PBS缓冲液、9g/L氯化钠、1ml/L Tween-20、1%BSA、0.5%至2%Proclin-300;

所述的酶工作液包含:1mg/L标记有辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶的VASP-P单克隆抗体、20mM PBS缓冲液、8.0g/L氯化钠、200ml/L小牛血清和0.5%至2%Proclin-300;

所述的裂解液包含:50mM Tris-HCL PH7.6、250mM NaCl、5mM EDTA、50mM NaF、1%NP40、0.5%至2%Proclin 300。

3. 一种VASP单克隆抗体,其由2018年6月1日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏号为CGMCC No.15791的杂交瘤细胞所产生。

4. 一种VASP-P单克隆抗体,其由2018年6月1日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏号为CGMCC No.15792的杂交瘤细胞所产生。

5. 一种杂交瘤细胞,其2018年6月1日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为CGMCC No.15791和/或CGMCC No.15792。

6. 权利要求3所述的VASP单克隆抗体和权利要求4所述的VASP-P单克隆抗体的组合在制备检测装置中的用途;

优选所述检测装置是VASP检测试剂。

7. 权利要求5所述的杂交瘤细胞和权利要求6所述的杂交瘤细胞的组合在制备检测装置中的用途；

优选所述检测装置是VASP检测试剂。

8. 根据权利要求6或7所述的用途,所述的试剂选自:ELISA检测试剂、免疫比浊检测试剂、磁颗粒检测试剂、化学发光检测试剂、免疫荧光检测试剂、放射免疫检测试剂。

9. 一种检测试剂,其包含:

权利要求3所述的VASP单克隆抗体、以及

权利要求4所述的VASP-P单克隆抗体。

10. 一种检测试剂盒,其包含权利要求9所述的检测试剂。

一种血管扩张型刺激磷蛋白检测试剂盒

技术领域

[0001] 本申请属于分子免疫学领域,具体涉及一种血管扩张型刺激磷蛋白(以下简称VASP)检测试剂盒、以及VASP单克隆抗体及其用途。

背景技术

[0002] 随着我国社会经济发展,心脑血管疾病发病率呈逐年增高趋势,其高致残率和高死亡率对人民健康构成严重威胁并给社会带来沉重负担。

[0003] 大量临床试验和医学研究显示心脑血管疾病具有共同的危险因素和病理生理机制,其中血小板活化是发病和病程进展中的关键环节。因此积极抗血小板治疗已成为防治心脑血管疾病的核心策略之一。

[0004] 通过抑制血小板黏附、聚集和释放,抗血小板治疗实现防止血栓形成、降低缺血性心脑血管发生率的目的。现阶段常用的抗血小板药物包括如下几类:环氧化酶(COX)抑制剂、磷酸二酯酶抑制剂、二磷酸腺苷受体拮抗剂、糖蛋白IIb/IIIa拮抗剂、蛋白酶激活受体1拮抗剂、TXA2受体拮抗剂。

[0005] VASP磷酸化检测法基于ADP P2Y₁₂受体途径的活化,是特异性最高的P2Y₁₂受体抑制剂检测方法,不受其他抗血小板药物的影响。因此,一种快速检测VASP磷酸化的方法对评价血小板功能以及对临床指导用药有重要的意义。

[0006] VASP含有380个氨基酸,其结构主要包括3个部分:N端1(Ena/VASP homology 1, EVH1)区域、富含脯氨酸区域(poly-proline region, PPR)、C端2(Ena/VASP homology 2, EVH2)区域。EVH-1主要调节VASP、斑联蛋白、黏着斑蛋白之间的交互作用;VASP的中心区域与前纤维蛋白结合,通过后者与F肌动蛋白相连,PPR参与调节抑制蛋白和白蛋白;EVH2区域则通过影响细胞间的连接方式来调节肌动蛋白的结合,主要参与VASP对细胞运动的调节。VASP主要通过磷酸化进行功能调节,且由于其特殊的空间构成,使得VASP能够参与各类细胞中细胞骨架的调节。VASP含有以下5个明确受磷酸化调控的位点:酪氨酸39(Tyr, Y-39)、丝氨酸157(Ser, S)、S-239、苏氨酸278(Thr, T-278)、S-322。每个位点功能既彼此区别又相互协同,共同解释了VASP的功能作用。

[0007] 腺苷二磷酸通过与血小板膜上的P2Y₁₂受体结合,促进腺苷酸环化酶生成,进而抑制环磷酸腺苷的合成,以促进血小板活化。氯吡格雷的药理机制即作用于血小板膜上P2Y₁₂受体,通过促进VASP磷酸化而抑制血小板的活化。而前述环磷酸腺苷合成阶段,即可检测到VASP磷酸化的具体情况。根据此原理量化检测VASP的磷酸化程度,可据此计算出血小板反应指数。

[0008] 迅速、准确地判断患者血小板功能及其对抗血小板药物的反应,将有助于减少药物抵抗的发生,调整个体化抗血小板治疗,进一步降低血栓性及出血性事件的发生。

[0009] Osmancik等通过VASP监测,对不同严重程度的急性心肌梗死患者的氯吡格雷效用进行评估。发现在服用负荷剂量的氯吡格雷后,血流动力学稳定的ST段抬高型心肌梗死患者,其VASP指数有明显的降低,认为患者的血小板功能在服用氯吡格雷后受到有效抑制。但

对于血流动力学不稳定的患者(包括需用升压药物或机械通气支持者),其VASP指数下降程度极为有限。因此,实现了精确评估的作用。

[0010] Grdinic等人通过VASP检测发现,34%的高危经皮冠状动脉介入治疗患者在接受300mg负荷剂量的氯吡格雷后,出现了氯吡格雷抵抗。另有研究发现,支架内血栓的生成与高于50%的VASP指数有极紧密的相关性

[0011] Bonello等通过VASP指数指导干预并观察主要不良心血管事件(major adverse cardiovascular events, MACE事件)的发生情况。该研究还证实了VASP指数评估的高敏感性,可通过此方法对血小板功能进行简单而有效的评测。

[0012] 国内近年也有通过VASP检测氯吡格雷抵抗特异性的研究。结果显示,VASP对中国人群的检测特异性依然是可靠的。

[0013] 目前VASP检测主流产品为stago公司的PLT VASP/P2Y12,需要采用流式细胞仪进行检测,流式细胞技术和操作对人员和机器的要求较高导致花费较为昂贵、Stago公司也提供检测VASP的试剂盒,但反应时间较长,操作繁琐。

[0014] CN1279691A公开了一种VASP抗体,其特异性结合在239丝氨酸位置磷酸化的VASP,是一种由杂交瘤细胞系DSM ACC2330产生的单克隆抗体。

[0015] CN106370839A公开了一种快速检测的量子点免疫层析试纸条。试纸条将磷酸化VASP单克隆抗体和量子点偶联物喷涂在玻璃纤维素膜上得到探针固定垫,VASP单克隆抗体包被在检测膜检测线上,羊抗鼠多克隆抗体包被在检测膜的质控线上。

[0016] 本申请仍然需要一种VASP检测试剂,能够满足检测速度快、操作简便、灵敏度高、特异性好,可以批量生产等特点。

发明内容

[0017] 根据本申请的一些具体实施方案,提供了一种VASP单克隆抗体,其由2018年6月1日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏号为CGMCC No.15791的杂交瘤细胞所产生。

[0018] 根据本申请的一些具体实施方案,提供了另一种VASP-P(磷酸化血管扩张型刺激磷蛋白)单克隆抗体,其由2018年6月1日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏号为CGMCC No.15792的杂交瘤细胞所产生。

[0019] 在一个具体实施方案中,所述VASP-P是在239丝氨酸位置磷酸化的VASP。

[0020] 在一个具体实施方案中,所述VASP-P单克隆抗体识别并特异性结合239丝氨酸位置磷酸化的VASP。

[0021] 根据本申请的一些具体实施方案,提供了一种杂交瘤细胞,其2018年6月1日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏号为CGMCC No.15791。

[0022] 根据本申请的一些具体实施方案,提供了另一种杂交瘤细胞,其2018年6月1日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏号为CGMCC No.15792。

[0023] 根据本申请的一些具体实施方案,提供了本申请的VASP单克隆抗体在制备诊断试剂中的用途。

[0024] 根据本申请的一些具体实施方案,提供了本申请的杂交瘤细胞在制备诊断试剂中的用途。

[0025] 本申请的VASP单克隆抗体或VASP-P单克隆抗体可以单独用于制备检测或诊断试剂,然而优选组合用于制备检测或诊断试剂。

[0026] 在一些具体实施方案中,所述检测或诊断试剂是VASP检测试剂。VASP检测或诊断试剂是指用于定量或定性检测受试者样本中VASP的试剂。VASP检测或诊断试剂可检测人类样本中VASP的存在和/或含量。所述检测或诊断试剂可以是现有技术中任何适当的形式,包括但不限于ELISA检测试剂、免疫比浊检测试剂、磁颗粒检测试剂、化学发光检测试剂、放射免疫检测试剂、免疫荧光检测试剂。

[0027] 实际上,本申请的VASP单克隆抗体或VASP-P单克隆抗体或杂交瘤细胞可以用于制备任何基于抗原-抗体相互作用的检测试剂。在一些具体实施方案中,所述检测或诊断试剂可以体现为液体形式、干粉、冻干粉形式、颗粒形式、多孔板形式或其它本领域公知的形式。

[0028] 根据本申请的一些具体实施方案,提供了一种VASP检测试剂,其包含一种本申请的VASP单克隆抗体和/或VASP-P单克隆抗体的组合。

[0029] 根据本申请的一些具体实施方案,提供了一种VASP检测试剂盒,其包含本申请VASP单克隆抗体和VASP-P单克隆抗体的组合。

[0030] 根据本申请的一些具体实施方案,提供了一种VASP检测试剂盒,其包含:

[0031] 包被有本发明的一种抗VASP蛋白单克隆抗体的磁珠、

[0032] 酶工作液、

[0033] 裂解液、

[0034] 酶反应底物。

[0035] 在一些具体实施方案中,所述酶工作液包含:包被有VASP单克隆抗体的磁颗粒、缓冲液、氯化钠、表面活性剂、稳定剂、防腐剂。

[0036] 在一些具体实施方案中,所述标记选自辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、放射性标记、免疫荧光标记。

[0037] 在一些具体实施方案中,所述表面活性剂选自:吐温20、吐温80。

[0038] 在一些具体实施方案中,所述稳定剂选自:山羊血清、小牛血清、BSA、海藻糖。

[0039] 在一些具体实施方案中,所述防腐剂选自:Proclin-300、叠氮钠。

[0040] 在一些具体实施方案中,本申请的VASP检测试剂盒还可以根据需要包含裂解液、反应底物。

[0041] 在一些具体实施方案中,裂解液包含盐、表面活性剂、稳定剂、防腐剂和缓冲成分,pH在5-8之间,优选6-7。

[0042] 在一些具体实施方案中,裂解液可以配制成浓缩型。

[0043] 所述反应底物根据标记而改变,例如当使用辣根过氧化物酶时,适合的底物包括但不限于邻苯二胺(OPD)、ABTS、四甲基联苯胺(TMB)或4-氨基安替比林等。当使用碱性磷酸酶时,适合的底物包括但不限于BCIP/NBT。

[0044] 在一个具体实施方案,本申请的VASP检测试剂盒包含:包被有VASP单克隆抗体的磁颗粒,酶工作液,裂解液,反应底物;其中所述酶工作液包含标记有辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶的VASP-P单克隆抗体、5.8g/L磷酸氢二钠、0.59g/L磷酸二氢钠、8.0g/L氯化钠、200ml/L小牛血清和适量Proclin-300,Proclin-300为常用生物防腐剂,根据供应商推荐确定其用量,例如0.5%至2%的范围。

[0045] 所述裂解液包含50mM Tris-HCL (PH7.6)、250mM NaCL、5mM EDTA、50mM NaF、1% NP40、1%Proclin 300。

具体实施方式

[0046] 为了使本申请易于理解,下面结合具体实施例进一步阐述本申请。以下提供了本申请实施方式中所使用的具体材料及其来源。但是,应当理解的是,这些仅仅是示例性的,并不意图限制本申请。与如下试剂和仪器的类型、型号、品质、性质或功能相同或相似的材料均可以用于实施本申请。

[0047] 实施例1:单克隆抗体的获得

[0048] 1. 动物免疫

[0049] 为了产生VASP单克隆抗体,选取6周龄、体重约20g的雌性Balb/c小鼠。初次免疫,取20-50 μ g的VASP肽 (Ser239磷酸化) 和VASP加完全福氏佐剂皮下多点注射。第14和28天分别进行第二次和第三次免疫剂量同上,加福氏不完全佐剂腹腔内注射,融合前3天加强免疫,剂量20-50 μ g为宜。3天后,取脾融合。通常,制备鼠科来源的单克隆抗体,可参考《抗体》手册中描述的方法 (Harlow和Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp.726, 1988) 或Kohler和Milstein描述的制备杂交瘤的技术 (*Nature*, 256:495-497, 1975)。

[0050] 2. 细胞融合

[0051] 制备饲养细胞层:取一只未免疫的Balb/c小鼠,6周,拉颈处死,浸泡在75%酒精内,5min,用无菌剪刀剪开皮肤,暴露腹膜,用无菌注射器注入6ml预冷的培养液 (严禁刺破肠管),反复冲洗,吸出冲洗液,冲洗液放入10ml离心管,1200rpm/分离6min,用20%胎牛血清 (FCS) 的培养液混悬,调整细胞数至 1×10^5 /ml,加入96孔板,100 μ l/孔,放入37 $^{\circ}$ C CO₂孵箱培养。

[0052] 制备免疫脾细胞:取免疫好的Balb/c小鼠,拉颈处死,无菌取脾脏,用10ml不完全培养液洗一次,脾脏研碎,过200目细胞筛,将脾细胞转移至10ml离心管中,800rpm离心10min,细胞用10ml培养液洗2次,细胞计数,取 1×10^8 脾淋巴细胞悬液备用。

[0053] 制备骨髓瘤细胞SP2/0:取对数生长骨髓瘤细胞离心,用无血清培养液洗2次,计数,取得 5×10^7 细胞备用。

[0054] 细胞融合:将骨髓瘤细胞与脾细胞按1:10的比例混合在一起,在50ml离心管中用无血清不完全培养液洗1次,离心,1200rpm,8min;弃上清,用吸管吸净残留液体,以免影响聚乙二醇 (PEG) 浓度。轻轻弹击离心管底,使细胞沉淀略松动。

[0055] 加入37 $^{\circ}$ C预温的1ml 45%PEG (分子量4000) 溶液,边加边轻微摇动。37 $^{\circ}$ C水浴作用90s。加37 $^{\circ}$ C预温的不完全培养液以终止PEG作用,每隔2min分别加入1ml、2ml、3ml、4ml、5ml和6ml。离心,800rpm,6min。充上清,用含20%小牛血清HAT选择培养液重悬。将上述细胞,加到已有饲养细胞层的96孔板内,每孔加100 μ l。将培养板置37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养。

[0056] 3. 杂交瘤细胞的筛选

[0057] 脾细胞和骨髓瘤细胞融合后5天,形成多种细胞的混合体,补加HAT培养基100 μ l,第10天换HT培养基培养。杂交瘤细胞布满孔底1/5面积时,即可采用间接ELISA法检测培养上清,筛选阳性克隆。以VASP重组抗原包被酶标板 (5 μ g/ml) 100 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C过夜,将酶标板孔

中的液体倒尽,加入PBST,重复洗涤三次;加入封闭液200 μ l/孔进行封闭,置于37 $^{\circ}$ C,1小时。洗涤封闭液,加入100 μ l细胞培养上清,阳性对照选小鼠的免疫血清,阴性对照选SP2/0培养上清,空白为洗涤液,于37 $^{\circ}$ C静置2h。加入HRP标记羊抗鼠二抗(1:5000)100 μ l/孔,于37 $^{\circ}$ C静置60min。加入PBST,重复洗涤三次;加入底物反应液100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C置暗处反应10分钟。加入H₂SO₄(2mol/L)50 μ l/孔,终止反应。酶标仪检测450nm吸光度值。

[0058] 4. 杂交瘤的克隆化

[0059] 筛选得到的阳性克隆,采用有限稀释法对杂交瘤克隆化,克隆前1天制备饲养细胞层,将要克隆的杂交瘤细胞用不完全培养基从培养孔内轻轻吹干,计数。调整细胞为5个细胞/ml。取准备的饲养细胞层的细胞培养板,每孔加入稀释细胞100 μ l。孵育于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂孵箱中。在第7天换液,以后每3天换液1次。9天可见细胞克隆形成,ELISA法检测检测抗体效价。并将阳性克隆再次克隆化,直至细胞阳性率达100%,即可定株;扩大培养定株的细胞。

[0060] 5. 杂交瘤细胞的保藏

[0061] 将能够分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞于2018年6月1日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)(北京市朝阳区北辰西路1号院3号,邮编100101)。保藏号分别为CGMCC No.15791(编号VASP-6A9,VASP杂交瘤细胞株)和CGMCC No.15792(编号VASP-12G3,VASP杂交瘤细胞株)。

[0062] 实施例2. 单克隆抗体的制备

[0063] 将已保藏的二株杂交瘤细胞分别以 1×10^7 的细胞浓度注射于BALB/c小鼠腹腔,10天后分别收集腹水。通过以下步骤分别纯化两株单克隆抗体:

[0064] 1. 收集所得的腹水以2500rpm离心,取上清。加等体积的PBS(pH7.4)与1/2体积的饱和硫酸铵,4 $^{\circ}$ C、静置30min;

[0065] 2. 以3000rpm,4 $^{\circ}$ C,离心20min;

[0066] 3. 去沉淀,上清加等体积的饱和硫酸铵,静置30min;

[0067] 4. 以3000rpm,4 $^{\circ}$ C,离心20min;

[0068] 5. 取沉淀,加5ml生理盐水与5ml饱和硫酸铵静置30min;

[0069] 6. 以3000rpm,4 $^{\circ}$ C,离心20min;

[0070] 7. 沉淀加5ml生理盐水与5ml 0.02M的PBS(PH7.4);

[0071] 8. 加8倍柱体积的PB缓冲液平衡Protein G凝胶柱(购自GE);

[0072] 9. 将第7步中的混合液加到凝胶柱中;

[0073] 10. 使用10倍柱体积的PB缓冲液洗脱杂蛋白;

[0074] 11. 用0.2M pH2.8甘氨酸缓冲液洗脱抗体并收集;

[0075] 12. 使用再生液清洗柱子;

[0076] 13. 加平衡液(按GE推荐的)平衡柱子。

[0077] 实施例3. 检测试剂的制备

[0078] 1. 制备偶联有VASP抗体的磁微粒:

[0079] 将磁颗粒摇匀后取出放入小瓶内,用0.05M MES(10.67g MES纯化水定容至1000ml)清洗磁颗粒,清洗后加入EDC室温活化30分钟;

[0080] 根据磁颗粒的量按照磁颗粒和抗体的比例(质量比)10:1、20:1和40:1分别加入

VASP抗体,离心管室温偶联过夜;

[0081] 磁分离吸出反应液分别加入PBST清洗(5.8g磷酸氢二钠十二水、0.59g磷酸二氢钠二水、9g氯化钠、0.5ml Tween-20,纯化水定容至1000ml)2次,磁分离吸出洗液;

[0082] 再加入磁颗粒稀释液(5.8g磷酸氢二钠十二水、0.59g磷酸二氢钠二水、9g氯化钠、10g BSA、1ml Tween-20、1ml Proclin300,纯化水定容至1000ml)制成磁颗粒工作液(贮存液),备用。

[0083] 2. 酶标记抗体的制备:

[0084] (1) 称取1mg辣根过氧化物酶(HRP,购自Sigma)溶解于300 μ l蒸馏水中。

[0085] (2) 于上液中加入0.6 μ l新配的0.1M NaIO₄溶液,室温下避光搅拌20分钟。

[0086] (3) 将上述溶液装入透析袋中,使用1mM PH4.4的醋酸钠缓冲液透析,4 $^{\circ}$ C过夜。

[0087] (4) 加20 μ l 1M PH9.5碳酸盐缓冲液,使HRP的PH升高到9.0至9.5,然后立即加入5mg本申请的VASP-P单克隆抗体(在1ml 0.01M碳酸盐缓冲液中),室温避光轻轻搅拌2小时。

[0088] (5) 加0.05ml新配的4mg/ml NaBH₄液,混匀,再置4 $^{\circ}$ C2小时。

[0089] (6) 将上述液装入透析袋中,对0.15M PH7.4PBS透析,4 $^{\circ}$ C过夜。

[0090] (7) 加入等体积的甘油,-20 $^{\circ}$ C保存,最终辣根过氧化物酶标抗体浓度为1mg/ml。

[0091] 3. 采用棋盘法(矩阵法)确定最佳包被抗体与酶标记抗体的工作浓度:

[0092] 使用步骤1中包被的磁颗粒(磁颗粒与抗体比例分别为10:1、20:1和40:1)、步骤2的酶标抗体(工作浓度分别为:1:250、1:500和1:1000稀释)进行实验。确定最终磁颗粒与抗体偶联比例为20:1,包被磁颗粒浓度为0.2mg/ml。

[0093] 4. 酶工作液的配制:

[0094] 将2步骤中制备的辣根过氧化物酶的单克隆抗体,以1:500的比例溶于:5.8g/L磷酸氢二钠、0.59g/L磷酸二氢钠、9.0g/L氯化钠、1.0%牛血清白蛋白、1.0%酪蛋白、1.0g/L酶稳定剂和1ml/L Proclin-300。辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体的终浓度为1mg/L。

[0095] 5. 裂解缓冲液的制备:

[0096] 50mM Tris-HCL(PH7.6);250mM NaCl;5mM EDTA;50mM NaF;1%NP40;1%Proclin 300。

[0097] 6. 酶反应底物的制备:

[0098] 化学发光液A含鲁米诺和发光增强剂,化学发光液B含有过氧化物和发光增强剂。

[0099] 7. 将上述各试剂组装成试剂盒,根据需要还可以在试剂盒中并入使用说明书、反应杯、配套磁架等工具。

[0100] 8. 根据需要,还可以在试剂盒中并入以下中的一种或多种:

[0101] (1) 20倍浓缩洗液:其包含0.05%吐温20和磷酸盐缓冲液;

[0102] (2) 样本前处理试剂:PGE1干粉(前列腺素E1),使用时用水稀释;PGE1+ADP干粉,使用时用水稀释。

[0103] 测试例1.本公开VASP化学发光试剂盒的使用方法

[0104] 1. 实验前准备

[0105] 自4 $^{\circ}$ C冰箱中取出试剂盒,均应平衡到室温(18-25 $^{\circ}$ C)。

[0106] 2. 试验方法

[0107] (1) 样本前处理:取一瓶PGE1和一瓶ATP+PGE1分别用双蒸水溶解后,分别取10 μ l加

入10 μ l全血样本(即10 μ l PGE1+10 μ l全血、10 μ l [ATP+PGE1]+10 μ l全血),混匀,室温孵育10min。

[0108] (2) 加样温育:取足够数量的反应板或反应杯,固定于框架上,记录各孔位置。处理好的待测样本立即加入样本孔中,再分别加入50 μ l裂解缓冲液,50 μ l包被磁颗粒工作液和50 μ l酶工作液,充分混匀,于37 $^{\circ}$ C下温育10min。

[0109] (3) 清洗:

[0110] 手工清洗:将反应板或反应杯放置在配套磁架上静止吸附2分钟,吸出反应液,移去磁架,每孔加入300 μ l洗涤液,混匀磁颗粒,将反应板或反应杯放置在配套磁架上静止吸附2分钟,吸出洗涤液,重复冲洗3次;

[0111] 配套仪器清洗:按照仪器操作说明,设置好程序,将磁颗粒置于相应磁架上,静止吸附后吸出反应液,离开磁架,每孔加入400 μ l清洗液,震荡混匀后将磁颗粒置于磁架上静止吸附,吸出清洗液,重复操作3次。

[0112] (4) 加发光液:每孔加入50 μ l化学发光液A和50 μ l化学发光液B,充分混匀。

[0113] (5) 测定:将加了发光液的反应板或反应杯置化学发光仪下测定RLU值。

[0114] (6) 计算:

$$[0115] \quad PRI = \frac{RLU(PGE1) - RLU(PGE1 + ADP)}{RLU(PGE1) - RLU(BLANK)} \times 100\%$$

[0116] 测试例2. 本公开VASP化学发光试剂盒的性能指标

[0117] 1. 检测重复性:

[0118] 表1. VASP磁微粒化学发光试剂盒样本检测重复性

样本	样本 1	样本 2	样本 3
n	10	10	10
\bar{X} (PRI)	39.31%	76.33%	93.44%
SD	1.59	0.90	0.66
CV	4.0%	1.2%	0.7%

[0120] 2. 变异系数:

[0121] 批内变异系数CV不超过8%;

[0122] 批间变异系数CV不超过10%。

[0123] 表2. 不同批次样品检出的符合率、重复性检测结果

		检测结果	检测结果	检测结果	
		20160316B 批次	20160317B 批次	20160318B 批次	
[0124]	准确度(样本符合率)	96.2%	96.2%	96.2%	
	重复性	样本 1	3.44	3.41	4.28
	(CV%)	样本 2	0.50	0.53	0.57

[0125] 3. 采用本申请试剂盒通过临床样本验证后, PRI (血小板反应性指数) $\geq 55\%$ 为阴性, PRI $\leq 55\%$ 为阳性。

[0126] 本申请的试剂盒与已上市试剂盒(CY-QUANTVASP/P2Y12、BIOCYTEX)同时检测53例样本,数据下表所示:

[0127] 表3.与Stago公司VASP试剂盒检测样本符合率

	阴性样本	阳性样本
[0128] 符合率	92%	100%
总符合率	96.2%	

[0129] 4.操作所消耗的时间:

[0130] 使用本申请的VASP检测试剂盒总体反应时间为30分钟,而是上市检测试剂盒的反应总时间为75分钟。

[0131] 5.稳定性:试剂盒在37℃条件下存放0天、3天、6天、8天后参数检测。试剂盒在4℃条件下存放6个月、12个月、14个月后参数检测。

[0132] 表4.37℃稳定性

		检测结果	检测结果	检测结果	检测结果
		0天	3天	6天	8天
[0133] 准确度(样本符合率)		96.2%	96.2%	94.3%	94.3%
重复性 (CV%)	样本1	3.14	3.65	3.94	5.92
	样本2	0.40	0.46	0.81	1.37

[0134] 表5.长期稳定性

		检测结果	检测结果	检测结果
		6个月	12个月	14个月
[0135] 准确度(样本符合率)		98.1%	96.2%	94.3%
重复性 (CV%)	样本1	3.31	4.13	6.20
	样本2	0.29	0.44	1.41

专利名称(译)	一种血管扩张型刺激磷蛋白检测试剂盒		
公开(公告)号	CN108982861A	公开(公告)日	2018-12-11
申请号	CN201810832836.6	申请日	2018-07-26
[标]申请(专利权)人(译)	北京普恩光德生物科技开发有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京普恩光德生物科技开发有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京普恩光德生物科技开发有限公司		
[标]发明人	于晖 李雨心 谷明星 代晓曼		
发明人	于晖 李雨心 谷明星 代晓曼		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/535 G01N33/6893 G01N2800/32		
代理人(译)	程伟 程云		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本申请涉及一种血管扩张型刺激磷蛋白检测试剂盒。所述试剂盒包含：包被有VASP单克隆抗体的磁颗粒、含有标记的VASP-P单克隆抗体的酶工作液、裂解液、反应底物。所述试剂盒检测速度快、操作简便、灵敏度高、特异性好。

$$PRI = \frac{RLU(PGE1) - RLU(PGE1 + ADP)}{RLU(PGE1) - RLU(BLANK)} \times 100\%$$