



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103592430 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 19

(21) 申请号 201210287286. 7

(22) 申请日 2012. 08. 13

(71) 申请人 张涛

地址 300040 天津市和平区建设路 18 号

(72) 发明人 董京飞 张涛 张建宁 周洲

(74) 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司 11112

代理人 丁业平 张天舒

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书12页 附图4页

(54) 发明名称

用于检测 11- 去氢血栓烷素 B2 的 ELISA 试剂盒

(57) 摘要

本发明提供了一种用于检测 11- 去氢血栓烷素 B2 的 ELISA 试剂盒。所述的 ELISA 试剂盒采用的是双抗体夹心法,其中,所述的 ELISA 试剂盒的捕获抗体为抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体;检测抗体为抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体,并且所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体与所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体的种属源性是不同的。本发明的 ELISA 试剂盒具有以下优点和积极效果:本发明的 ELISA 试剂盒应用两个抗体识别不同的抗原决定簇,检测的特异性更高,抗体-抗原-抗体免疫复合物更加稳定,检测结果的准确度更高。被检测抗原不需进行高度纯化,可直接用于检测。

1. 一种用于检测 11- 去氢血栓烷素 B2 的 ELISA 试剂盒, 所述的 ELISA 试剂盒采用的是双抗体夹心法, 其中,

所述的 ELISA 试剂盒的捕获抗体为抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体, 其中所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体选自鼠、兔、鸡、狗或猴源性的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体;

所述的 ELISA 试剂盒的检测抗体为抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体, 其中所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体选自鼠、兔、鸡、狗或猴源性的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体, 并且所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体与所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体是不同源性的。

2. 根据权利要求 1 所述的 ELISA 试剂盒, 其中, 所述的 ELISA 试剂盒具有包被有抗 IgG 抗体的多孔板, 所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体是作为单独的试剂独立存在于所述的 ELISA 试剂盒中的, 或者是被包被在所述的多孔板上的。

3. 根据权利要求 2 所述的 ELISA 试剂盒, 其中, 当所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体作为单独的试剂独立存在于所述的 ELISA 试剂盒中时, 所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体的使用浓度为 0.2-2 $\mu\text{g/ml}$, 优选为 1 $\mu\text{g/ml}$ 。

4. 根据权利要求 1 所述的 ELISA 试剂盒, 其中, 所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体为鼠抗人 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体。

5. 根据权利要求 1 所述的 ELISA 试剂盒, 其中, 所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体的使用浓度为 0.5-2 $\mu\text{g/ml}$, 优选为 1 $\mu\text{g/ml}$ 。

6. 根据权利要求 1 所述的 ELISA 试剂盒, 其中, 所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体为兔抗人 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体。

7. 根据权利要求 1 所述的 ELISA 试剂盒, 其中, 所述的 ELISA 试剂盒的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶, 相应的显色底物分别为四甲基联苯胺或硝基苯基磷酸二钠。

8. 根据权利要求 1 所述的 ELISA 试剂盒, 其中, 所述的标记酶是结合到抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体上的; 结合有标记酶的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体的使用浓度为 0.5-2 $\mu\text{g/ml}$, 优选为 1 $\mu\text{g/ml}$ 。

9. 根据权利要求 1 所述的 ELISA 试剂盒, 其中, 所述的 ELISA 试剂盒还包括二级抗体, 并且所述的标记酶是结合到所述的二级抗体上的, 其中所述的二级抗体为特异性地识别所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体的抗 IgG 抗体; 所述的结合有标记酶的二级抗体的使用浓度为 0.1-2.5 $\mu\text{g/ml}$, 优选为 1.25 $\mu\text{g/ml}$ 。

10. 根据权利要求 9 所述的 ELISA 试剂盒, 其中, 所述的二级抗体为羊、鸡、狗或猴源性的抗 IgG 抗体。

11. 根据权利要求 1-10 中任意一项所述的 ELISA 试剂盒, 其中, 所述的 ELISA 试剂盒还包括: 稀释液、洗涤液和 / 或 11- 去氢血栓烷素 B2 标准品。

12. 根据权利要求 11 所述的 ELISA 试剂盒, 其中, 所述的稀释液包含: 100mM NaCl, 10mM EDTA 和 1% (重量 / 体积) 牛血清白蛋白; 以及所述的稀释液的 pH 为 7.0-10.0, 优选为 9.6。

13. 根据权利要求 11 所述的 ELISA 试剂盒, 其中, 所述的洗涤液为包含 0.05 体积%的 Tween-20 的磷酸盐缓冲液, 所述的磷酸盐缓冲液的 pH 为 6.0-8.0, 优选为 7.4。

用于检测 11- 去氢血栓烷素 B2 的 ELISA 试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种 ELISA 检测试剂盒, 具体而言, 涉及一种用于检测 11- 去氢血栓烷素 B2 的 ELISA 试剂盒。

背景技术

[0002] 心脑血管疾病在全球范围内已形成流行趋势, 极大地威胁公众健康, 并带来严重的社会负担。近年来, 我国心脑血管疾病发病率上升迅速, 心脑血管疾病一直位于我国疾病谱的前三位。据估计每年由此造成的医疗费用数百亿, 并且一直呈快速增长的趋势。因此, 积极控制危险因素, 特别是选用安全、有效、经济的药物, 是减少死亡、降低医疗费用的关键。其中, 简单有效的预防治疗方法包括应用阿司匹林, 其可以控制 50% 的临床致残或致死率。

[0003] 阿司匹林 (乙酰水杨酸) 已应用百年, 大量的研究奠定了阿司匹林在心脑血管疾病防治中的基石地位, 成为医药史上三大经典药物之一, 被誉为“世界第八大奇迹”。美国最权威的约翰霍普金斯医学院 (John Hopkins University) 预防心肌梗死和脑卒中指南中都把阿司匹林治疗放在首要位置。新近的抗栓试验协作组 (ATC) 汇总分析显示, 阿司匹林使心肌梗死、脑卒中等高危患者的血栓性血管事件减少四分之一, 血栓性血管性疾病死亡减少六分之一。回顾性调查研究也显示, 阿司匹林预防心肌梗死和脑卒中的血栓性血管事件有效率是他汀类降酯药的两倍。

[0004] 阿司匹林的抗栓效果显而易见, 然而仍有部分服用阿司匹林的患者会出现血栓性血管事件。针对这种现象, 一些学者提出了阿司匹林“抵抗” (Aspirin Resistance) 的概念。根据多次美国大规模临床调查, 在服用阿司匹林的患者当中, 有大约 25% 的患者极少或没有达到治疗效果。进一步的研究结果表明, 有阿司匹林抵抗的患者发生心肌梗死和脑卒中的几率是阿司匹林敏感患者的 2-3 倍。近年来, 针对亚洲人群的大规模临床调查研究同样证实了阿司匹林抵抗现象的广泛存在。造成阿司匹林抵抗的原因有很多, 包括个体基因差异、环境因素、服用剂量以及病人是否遵医嘱等。

[0005] 当前医学发展进入了个体化医疗时代, 阿司匹林的治疗应用就是典型代表。对于阿司匹林治疗效果的检测, 不仅可用于证实阿司匹林抵抗患者的存在, 同时能量化患者对于阿司匹林的反应, 以此调节阿司匹林的治疗剂量, 达到个体化治疗的目的。该检测方法通过测量阿司匹林治疗效果, 还可预测心血管事件发生的几率。因此, 测量和监测阿司匹林的治疗效果对于正常及患病人群, 尤其是心脑血管患者来说极其重要。

[0006] 目前通常采用的是 11- 去氢血栓烷素 B2 (11-dehydro-thromboxane B2) 作为分析阿司匹林的疗效的指标, 其原因如下: 处于活化状态的血小板会分泌强效的使血管收缩以及血小板聚集的血栓烷素 A2 (Thromboxane A2)。血栓烷素 A2 是由花生四烯酸 (Arachidonic acid) 通过环氧酶 -1 (Cyclooxygenase-1, COX-1)、血栓素合成酶 (Thromboxane synthase) 转化而来的。血栓烷素 A2 在血浆中半衰期短, 因此会被快速水解成血栓烷素 B2。之后血栓烷素 B2 通过 11- 脱氢酶 (11-dehydrogenase) 被转化成 11- 去

氢血栓烷素 B2。而 11- 去氢血栓烷素 B2 在血浆中很难被降解,并且通过肾脏排泄。因此,11- 去氢血栓烷素 B2 可以作为体内血栓烷素生成以及血小板活化的指标。而在不具有阿司匹林抵抗的患者中,阿司匹林可通过将环氧酶 -1 不可逆地酰化,而抑制血栓烷素的合成。因此,测量体内血栓烷素代谢产物,比如 11- 去氢血栓烷素 B2,可以用于判断体内血栓烷素的生成以及分析阿司匹林的疗效。

[0007] 目前现有技术中已出现了用于检测不同个体的接受阿司匹林治疗的反应差异的诊断试剂盒,例如,Cayman 公司等生产的检测试剂盒 (Aspirin Effect Detection Kit)。该类试剂盒所采用的检测原理是:采用竞争性酶联免疫技术检测尿液样品(正常人群尿液中 11- 去氢血栓烷素 B2 的浓度在 0.4-4ng/ml) 中 11- 去氢血栓烷素 B2,从而确认不同个体的接受阿司匹林治疗的反应差异,其中其采用的竞争性酶联免疫技术的原理参见图 1B。该技术所存在的缺陷是:其检测的分光光度值读数偏低,读数之间差异较大,因此容易导致结果的错误率偏高,结果间差异最大可达到 27%。

发明内容

[0008] 为解决上述现有技术中存在的问题,本发明提供了一种用于检测 11- 去氢血栓烷素 B2 的 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay,酶联免疫吸附试验)试剂盒。

[0009] 具体而言,本发明提供:

[0010] (1) 一种用于检测 11- 去氢血栓烷素 B2 的 ELISA 试剂盒,所述的 ELISA 试剂盒采用的是双抗体夹心法,其中,

[0011] 所述的 ELISA 试剂盒的捕获抗体为抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体,其中所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体选自鼠、兔、鸡、狗或猴源性的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体;

[0012] 所述的 ELISA 试剂盒的检测抗体为抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体,其中所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体选自鼠、兔、鸡、狗或猴源性的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体,并且所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体与所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体是不同源性的。

[0013] (2) 根据 (1) 所述的 ELISA 试剂盒,其中,所述的 ELISA 试剂盒具有包被有抗 IgG 抗体的多孔板,所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体是作为单独的试剂独立存在于所述的 ELISA 试剂盒中的,或者是被包被在所述的多孔板上的。

[0014] (3) 根据 (2) 所述的 ELISA 试剂盒,其中,当所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体作为单独的试剂独立存在于所述的 ELISA 试剂盒中时,所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体的使用浓度为 0.2-2 μ g/ml,优选为 1 μ g/ml。

[0015] (4) 根据 (1) 所述的 ELISA 试剂盒,其中,所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体为鼠抗人 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体。

[0016] (5) 根据 (1) 所述的 ELISA 试剂盒,其中,所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体的使用浓度为 0.5-2 μ g/ml,优选为 1 μ g/ml。

[0017] (6) 根据 (1) 所述的 ELISA 试剂盒,其中,所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体为兔抗人 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体。

[0018] (7) 根据 (1) 所述的 ELISA 试剂盒,其中,所述的 ELISA 试剂盒的标记酶为辣根过

氧化物酶或碱性磷酸酶,以及相应的显色底物分别为四甲基联苯胺或硝基苯基磷酸二钠。

[0019] (8) 根据(1)所述的ELISA试剂盒,其中,所述的标记酶是结合到抗11-去氢血栓烷素B2多克隆抗体上的;结合有标记酶的抗11-去氢血栓烷素B2多克隆抗体的使用浓度为0.5-2 μ g/ml,优选为1 μ g/ml。

[0020] (9) 根据(1)所述的ELISA试剂盒,其中,所述的ELISA试剂盒还包括二级抗体,并且所述的标记酶是结合到所述的二级抗体上的,其中所述的二级抗体为特异性地识别所述的抗11-去氢血栓烷素B2多克隆抗体的抗IgG抗体;所述的结合有标记酶的二级抗体的使用浓度为0.1-2.5 μ g/ml,优选为1.25 μ g/ml。

[0021] (10) 根据(9)所述的ELISA试剂盒,其中,所述的二级抗体为羊、鸡、狗或猴源性的抗IgG抗体。

[0022] (11) 根据(1)-(10)中任意一项所述的ELISA试剂盒,其中,所述的ELISA试剂盒还包括:稀释液、洗涤液和/或11-去氢血栓烷素B2标准品。

[0023] (12) 根据(11)所述的ELISA试剂盒,其中,所述的稀释液包含:100mM NaCl,10mM EDTA和1%(重量/体积)牛血清白蛋白;以及所述的稀释液的pH为7.0-10.0,优选为9.6。

[0024] (13) 根据(11)所述的ELISA试剂盒,其中,所述的洗涤液为包含0.05体积%的Tween-20的磷酸盐缓冲液,所述的磷酸盐缓冲液的pH为6.0-8.0,优选为7.4。

[0025] 本发明的ELISA试剂盒与现有技术相比具有以下优点和积极效果:

[0026] 1. 本发明的ELISA试剂盒应用两个抗体识别不同的抗原决定簇,因此增强与被检测抗原的特异性结合,所以检测的特异性更高,通常比其它的酶联免疫方法的敏感性增强2-3倍;抗体-抗原-抗体免疫复合物更加稳定,增加该方法的可重复性。从而相应地克服了传统竞争性酶联免疫检测方法的分光光度计的样品读数偏低,读数之间差异较大导致结果的错误率增高。

[0027] 2. 本发明的ELISA试剂盒检测结果的准确度更高,差异率更低。

[0028] 3. 在应用本发明的ELISA试剂盒时,被检测抗原不需进行高度纯化,可直接用于检测。

[0029] 4. 本发明的ELISA试剂盒的所采用的各组分制备简单,有利于规模化生产。例如,本发明的一个优选实施方案可采用结合有标记酶的抗11-去氢血栓烷素B2抗体检测,降低了检测抗体与标记酶联接的难度。

附图说明

[0030] 图1为两种方法检测11-去氢血栓烷素B2的原理示意图;其中A为根据本发明的双抗体酶联免疫方法,B为现有技术中的竞争性酶联免疫方法。

[0031] 图2为两种方法检测11-去氢血栓烷素B2标准品的分光光度值分布示意图;其中A为现有技术中的竞争性酶联免疫方法,B为根据本发明的双抗体酶联免疫方法。

具体实施方式

[0032] 以下通过具体实施方式的描述并参照附图对本发明作进一步说明,但这并非是对本发明的限制,本领域技术人员根据本发明的基本思想,可以做出各种修改或改进,但是只

要不脱离本发明的基本思想,均在本发明的范围之内。

[0033] 本发明中所述的捕获抗体是指双抗体夹心法 ELISA 试剂盒中的与固相载体相连接的能够特异性识别待测抗原的抗体,当捕获抗体与固相载体连接后,也可称为固相抗体。

[0034] 本发明中所述的检测抗体是指双抗体夹心法 ELISA 试剂盒中的另一个能够特异性识别待测抗原的抗体,其与捕获抗体分别识别待测抗原分子上的不同的抗原决定簇。

[0035] 本发明中所述的二级抗体是指双抗体夹心法 ELISA 试剂盒中的能够特异性识别检测抗体的抗体,其上通常可连接有标记酶(也可称为酶标二抗)。所述的二级抗体可通过测定检测抗体的量而实现对待测抗原的测定。

[0036] 本发明人通过实验发现:虽然双抗体酶联免疫技术(双抗体夹心 ELISA)已经在其它检测中得到了广泛应用,但是在将其应用至检测 11-去氢血栓烷素 B2 的过程中,却存在由于各种未知因素导致抗体与待测抗原的识别度不高、部分抗原抗体非特异性结合等问题,从而导致的检测错误率高。因此目前现有技术中无法有效地利用双抗体酶联免疫技术准确检测待测样品中 11-去氢血栓烷素 B2 的含量。因此,本发明人对(例如)双抗体的选择等方面进行了深入研究,并最终成功地研发出了利用定量酶联免疫技术检测尿液中 11-去氢血栓烷素 B2 含量的试剂盒,从而实现了利用双抗体酶联免疫技术准确检测 11-去氢血栓烷素 B2。

[0037] 具体而言,本发明提供了一种用于检测 11-去氢血栓烷素 B2 的 ELISA 试剂盒,所述的 ELISA 试剂盒采用的是双抗体夹心法,其中,所述的 ELISA 试剂盒的捕获抗体(capturing antibody)为抗 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体,其中所述的抗 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体选自鼠、兔、鸡、狗或猴源性的抗 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体;所述的 ELISA 试剂盒的检测抗体(detecting antibody)为抗 11-去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体,其中所述的抗 11-去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体选自鼠、兔、鸡、狗或猴源性的抗 11-去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体,并且所述的抗 11-去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体与所述的抗 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体的种属源性是不同的。

[0038] 优选的是,本发明所述的用于检测 11-去氢血栓烷素 B2 的 ELISA 试剂盒,其包括:

[0039] 多孔板,所述的多孔板上包被有抗 IgG 抗体;

[0040] 捕获抗体:抗 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体,其中所述的抗 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体特异性地识别所述的抗 IgG 抗体;

[0041] 检测抗体:抗 11-去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体;以及

[0042] 标记酶和相应的显色底物;

[0043] 其中,所述的抗 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体是作为单独的试剂独立存在于所述的 ELISA 试剂盒中的,或者被包被在所述的多孔板上;

[0044] 所述的抗 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体选自鼠、兔、鸡、狗或猴源性的抗 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体;

[0045] 所述的抗 11-去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体选自鼠、兔、鸡、狗或猴源性的抗 11-去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体,并且所述的抗 11-去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体与所述的抗 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体的种属源性是不同的;以及

[0046] 所述的抗 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体与所述的抗 11-去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体分别针对不同的 11-去氢血栓烷素 B2 的抗原决定簇。

[0047] 优选的是,所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体被包被在所述的多孔板上的,其中所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体是通过与所述的抗 IgG 抗体特异性地结合而被包被在所述的多孔板上的。而当所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体作为单独的试剂独立存在于所述的 ELISA 试剂盒中时,所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体溶液的使用浓度为 0.2-2 $\mu\text{g/ml}$, 优选为 1 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0048] 优选的是,所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体为鼠抗人 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体。

[0049] 优选的是,所述的抗 IgG 抗体为羊抗鼠 IgG 抗体。

[0050] 优选的是,所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体的使用浓度为 0.5-2 $\mu\text{g/ml}$, 优选为 1 $\mu\text{g/ml}$; 所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体优选为兔抗人 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体。

[0051] 优选的是,所述的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶,以及所述的显色底物分别为四甲基联苯胺或硝基苯基磷酸二钠。

[0052] 优选的是,所述的标记酶是结合到抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体上的; 结合有标记酶的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体的使用浓度为 0.5-2 $\mu\text{g/ml}$, 优选为 1 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0053] 优选的是,所述的 ELISA 试剂盒还包括二级抗体,并且所述的标记酶是结合到所述的二级抗体上的,其中所述的二级抗体为特异性地识别所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体的抗 IgG 抗体; 所述的结合有标记酶的二级抗体的使用浓度为 0.2-2.5 $\mu\text{g/ml}$, 优选为 1 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0054] 优选的是,所述的二级抗体为羊、鸡、狗或猴种属源性的抗 IgG 抗体。

[0055] 优选的是,所述的 ELISA 试剂盒还包括: 稀释液、洗涤液和 / 或 11- 去氢血栓烷素 B2 标准品。

[0056] 优选的是,所述的稀释液包含: 100mM NaCl, 10mM EDTA 和 1% (重量 / 体积) 牛血清白蛋白; 以及所述的稀释液 pH 为 7.0-10.0, 优选为 9.6。

[0057] 优选的是,所述的洗涤液为包含 0.05 体积%的 Tween-20 的磷酸盐缓冲液, 所述的磷酸盐缓冲液的 pH 为 6.0-8.0, 优选为 7.4。

[0058] 本发明的 ELISA 试剂盒的基本应用原理是特异性抗体酶联免疫吸附试验, 基本原理采用的是双抗体夹心 ELISA 法, 该方法利用双抗体与被检测抗原分子上的两个抗原决定簇结合, 形成固相抗体 - 抗原 - 酶标抗体免疫复合物。双抗体分别以抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体为捕获抗体和以抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体为检测抗体。所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体选自鼠、兔、鸡、狗、猴种属源性的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体, 所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体选自鼠、兔、鸡、狗、猴种属源性的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体, 并且所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体与所述的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体的种属源性是不同的, 以及分别针对不同的 11- 去氢血栓烷素 B2 的抗原决定簇。其中捕获抗体优选使用鼠抗人抗 11- 去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体, 主要原因是鼠源性抗体识别单一抗原决定簇, 特异性高, 有利于从样品中结合待测的抗原; 检测抗体优选使用兔抗人抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体, 识别多个抗原决定簇, 可增强抗原抗体的结合, 提高检测的效率。测量复合物中的标记酶作用于加入的底物后生成

有色物质量,即可确定待测抗原含量。

[0059] 例如,本发明人通过摸索以下各条件来确定合适的酶联免疫反应条件:

[0060] 1. 捕获抗体

[0061] 本发明采用的捕获抗体为抗 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体,捕获抗体的作用是捕获待测样品(例如,尿液样品)中的 11-去氢血栓烷素 B2,其捕获原理是通过抗原抗体的特异性结合。本发明对捕获抗体的要求是能够捕获抗原分子 11-去氢血栓烷素 B2 上的抗原决定簇,从而使二者能够有效的特异性结合,因此,满足可与抗原分子特异性结合的抗体,包括鼠、兔、鸡、狗或猴等种属源性的抗 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体均可采用为捕获抗体。其中,优选使用鼠抗人 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体,主要原因是鼠源性抗体识别单一抗原决定簇的特异性高,有利于从样品中结合待测的抗原。

[0062] 捕获抗体的制备步骤可包括:通过对实验动物注射纯化的抗原分子 11-去氢血栓烷素 B2,使其致敏产生特异性抗 11-去氢血栓烷素 B2 抗体的淋巴细胞,从实验动物的脾脏分离得到上述步骤得到的产生一种抗 11-去氢血栓烷素 B2 抗体(即具有一种抗原决定簇的抗体)的淋巴细胞。应用细胞杂交技术使取自脾脏的骨髓瘤细胞与上述步骤得到的淋巴细胞二者融合,得到杂种的骨髓瘤细胞。用这种来源于单个融合细胞培养增殖的细胞群,可制备抗一种抗原决定簇的特异性的抗 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体。然后通过蛋白纯化过程获得纯化的反应抗体。捕获抗体可以通过商购途径获得,也可以自行制备。

[0063] 在本发明的试剂盒中,捕获抗体的使用浓度的范围优选为:0.2-2 μ g/ml,其中更优选的浓度为 1 μ g/ml。在前期实验中,本发明人通过比较在同样反应条件下测定 20ng/ml 11-去氢血栓烷素 B2 标准品,来摸索捕获抗体的优选浓度。具体实施步骤为:在捕获抗体浓度 0.2-2 μ g/ml 的区间内,选取 4 种抗体浓度(以鼠抗人抗 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体为例),分别为 0.2 μ g/ml、0.5 μ g/ml、1 μ g/ml、2 μ g/ml。将 4 种浓度的捕获抗体分别加入反应孔中 4 $^{\circ}$ C 下过夜。在所有的反应孔中加入 20ng/ml 11-去氢血栓烷素 B2 标准品,未结合的标准品被洗涤液洗脱。接下来在所有的反应孔中按顺序加入同样浓度的检测抗体(1Bg/ml)及显色酶。洗涤液将非特异性结合的检测抗体洗脱。最后通过分解显色底物在分光光度计下读取显色反应的读数。在其他条件跟步骤相同的情况下,分别使用以上 4 种浓度的捕获抗体检测 20ng/ml 11-去氢血栓烷素 B2 标准品,得到的读数区间分别为 0.894 ~ 0.965, 1.132 ~ 1.196, 1.303 ~ 1.385, 1.318 ~ 1.394。通过比较以上数据可以看出,检测同样浓度的 11-去氢血栓烷素 B2 标准品(20ng/ml),在其他条件步骤相同的情况下,捕获抗体浓度为 1 μ g/ml 时显色反应的读数较浓度为 0.2 μ g/ml 和 0.5 μ g/ml 时高(差别 > 0.15),这样可提高待测样品检测的准确度和灵敏度。同时,比较捕获抗体浓度为 1 μ g/ml 和 2 μ g/ml,显色反应的读数接近(差别 < 0.02)。所以在这种情况下,选择使用浓度为 1 μ g/ml 的捕获抗体可以大大节省抗体的使用量。

[0064] 2. 检测抗体

[0065] 本发明采用的检测抗体为抗 11-去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体,检测抗体的作用是与捕获抗体上的抗原分子 11-去氢血栓烷素 B2 相结合,从而检测待测样品中的 11-去氢血栓烷素 B2。本发明对检测抗体的要求是能够检测与抗原分子 11-去氢血栓烷素 B2 上的抗原决定簇上相结合的,因此,满足可与抗原分子特异性结合的抗体,包括鼠、兔、鸡、狗、猴等种属源性的抗 11-去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体均可采用为检测抗体。其中,优选使用兔抗人

11- 去氢血栓烷 B2 多克隆抗体, 主要原因是兔源性抗体能够识别多个抗原决定簇, 可增强抗原抗体的结合, 提高检测的效率。

[0066] 需要特别说明的是, 捕获抗体和检测抗体虽然同为抗 11- 去氢血栓烷素 B2 抗体, 但是不能采用同一种属的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 抗体。原因在于: 采用不同种属的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 抗体是为了使检测抗体能够结合到与捕获抗体不同的抗原位点上, 从而检测不同的抗原表位, 以及当采用同一种属的抗体时, 带有显色反应酶的抗体可同时与捕获及检测抗体相结合, 致使显色反应不具有特异性, 无法确定待测抗原的量。因此, 在选择捕获抗体和检测抗体时, 需要选取来自于不同种属的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 抗体。

[0067] 检测抗体的制备步骤如下: 通过对实验动物注射纯化的抗原分子 11- 去氢血栓烷素 B2, 使其致敏后血浆中产生对抗原分子特异性的反应抗体, 然后通过蛋白纯化过程从血清中获得纯化的反应抗体。所得到抗 11- 去氢血栓烷 B2 多克隆抗体, 能够识别多个抗原决定簇, 可增强抗原抗体的结合。检测抗体可以通过商购途径获得, 也可以自行制备。

[0068] 在本发明的试剂盒中, 检测抗体的浓度范围为: 0.5-2 μ g/ml, 其中优选的浓度为 1 μ g/ml。具体的摸索方法与捕获抗体相似, 所不同的仅是改变检测抗体的具体浓度。

[0069] 3. 二级抗体

[0070] 本发明的试剂盒还可包含二级抗体, 本发明中满足可特异性地识别检测抗体的抗体均可作为二级抗体。

[0071] 其中, 二级抗体可采用抗免疫球蛋白 IgG 多克隆抗体, 该抗 IgG 抗体能够与检测抗体上的 FC 段结合, 因此能够识别检测抗体, 而检测抗体的抗原识别位点位于可变区, 因此上述两个识别位点是不重叠的。包括羊、鸡、狗、猴等种属源性的抗免疫球蛋白 IgG 抗体均适用。

[0072] 4. 显色反应

[0073] 本发明的显色反应的原理是通过标记酶与显色底物发生反应, 从而通过颜色的变化而测定待测样品中 11- 去氢血栓烷素 B2 抗原分子的量。对用于显色反应的酶而言, 希望其能够有效分解对应的显色底物。其中, 优选使用 (例如) 辣根过氧化物酶 (Horse peroxidase, HRP) 或碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, AP), 其相应的显色底物分别可以是: 四甲基联苯胺 (tetramethylbenzidine, TMB) 或硝基苯基磷酸二钠 (p-Nitrophenyl phosphate, disodium salt, pNPP)。同时本领域技术人员应当理解, 满足与辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶反应条件的显色底物均可应用到本发明中。

[0074] 标记酶可结合在检测抗体或二级抗体上。其中, 标记酶可采用氰基硼氢化钠 (Sodium cyanoborohydride) 的方法结合到检测抗体或二级抗体上, 例如可参见 (例如) Thermo 公司的显色反应酶联试剂盒。显色底物的浓度范围可以是 0.1-1g/L, 其中优选的浓度可以是 0.4g/L。显色反应条件是在常规室温下放置在摇床上反应 15-30 分钟。

[0075] 在本发明的试剂盒中, 带有标记酶的抗 11- 去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体, 浓度范围可以是 0.5-2 μ g/ml, 其中优选的浓度可以是 1 μ g/ml。

[0076] 在本发明的试剂盒中, 带有标记酶的二级抗体, 浓度范围是 0.1-2.5 μ g/ml, 其中优选的浓度是 1 μ g/ml。而带有标记酶的二级抗体可以通过商购途径获得 (例如可购自 Thermo 公司), 也可以自行制备。其中结合方法的步骤可参见 (例如) Thermo 公司的显色反应酶联试剂盒。

[0077] 5. 可特异性地识别捕获抗体的抗免疫球蛋白 IgG 抗体

[0078] 本发明所使用的可特异性地识别捕获抗体的抗免疫球蛋白 IgG 的抗体的作用是分别与酶标板和捕获抗体相连接,从而将捕获抗体固定到多孔板或酶标板上,所采用的原理是抗体与抗体之间的结合。本发明中满足可特异性地识别捕获抗体的抗免疫球蛋白 IgG 抗体,包括羊、鸡、狗、猴等种属源性的抗免疫球蛋白抗体均适用。

[0079] 抗 IgG 多克隆抗体的制备步骤可包括:通过对实验动物注射纯化的免疫球蛋白,使其致敏产生对免疫球蛋白特异性的抗体。收集致敏的实验动物的血浆后,然后通过抗体纯化过程获得纯化的免疫球蛋白抗体。抗 IgG 抗体可以通过商购途径获得,也可以自行制备。

[0080] 在本发明的试剂盒中,采用的是包被有可特异性地识别捕获抗体的抗免疫球蛋白 IgG 抗体的多孔板(例如,包被有可特异性地识别捕获抗体的抗免疫球蛋白 IgG 抗体的酶标板),上述多孔板可通过商购途径获得,也可以自行包被,包被方法为本领域常用方法,例如将其在 4℃ 下放置于多孔板上的反应孔中过夜,之后将未与多孔板有效结合的抗体可通过洗涤液洗脱。其中在包被的过程中,所述的抗 IgG 抗体的浓度范围是 0.2-2 μg/ml,优选的浓度是 0.4 μg/ml。优选采用的是羊抗鼠抗免疫球蛋白 IgG 抗体。

[0081] 6. 稀释液

[0082] 在本发明的试剂盒中,稀释液的作用是用于稀释标准对照物、待测样品及反应抗体。在本发明的试剂盒中,由于需要抗原抗体特异性结合反应的原因,希望稀释液的离子浓度和酸碱度适中,其中酸碱度 pH7.0-10.0 均可。

[0083] 例如,本发明人对于以下 4 种酶联反应稀释溶液进行了对比实验:

[0084] (1) 稀释液 1:100mM NaCl,10mM EDTA,1% (重量/体积)牛血清白蛋白,pH7.4;

[0085] (2) 稀释液 2:100mM NaCl,10mM EDTA,1% (重量/体积)牛血清白蛋白,pH9.6;

[0086] (3) 稀释液 3:50mM Tris,150mM NaCl,pH7.4;

[0087] (4) 稀释液 4:50mM Tris,150mM NaCl,pH9.6;

[0088] 在实验中,本发明人通过比较在同样反应条件下测定 20ng/ml 11-去氢血栓烷素 B2 标准品,来摸索优选的稀释液。具体实施步骤为:将稀释于 4 种稀释液的捕获抗体 (1 μg/ml) 分别置入反应孔中 4℃ 下过夜。然后在所有的反应孔中加入 20ng/ml 11-去氢血栓烷素 B2 标准品,未结合的标准品被洗涤液洗脱。接下来在所有的反应孔中,按顺序加入稀释于 4 种稀释液的检测抗体 (1 μg/ml) 及显色酶。洗涤液将非特异性结合的检测抗体洗脱。最后通过分解显色底物,在分光光度计下读取显色反应的读数。在其他条件跟步骤相同的情况下,分别使用以上 4 种不同的稀释液检测 20ng/ml 11-去氢血栓烷素 B2 标准品,其检测 20ng/ml 11-去氢血栓烷素 B2 标准品的读数区间分别为 1.152 ~ 1.236,1.297 ~ 1.365,0.953 ~ 1.042,1.035 ~ 1.128。从上述结果可以看出,采用第二种稀释液,对于测量同样浓度 (20ng/ml) 11-去氢血栓烷素 B2 标准品,较其余三种稀释液反应孔读数最高 (差别 > 0.10),这样可提高待测样品检测的准确度和灵敏度。实验结果同时说明,碱性溶液环境 (pH9.6) 能增强抗原抗体之间的结合,从而提高抗体对待测抗原分子的识别。

[0089] 7. 洗涤液

[0090] 在本发明的试剂盒中,洗涤液用于洗脱反应孔中未结合的样品,标准对照物或抗体。在本发明的试剂盒中,由于有部分抗原抗体非特异性结合的原因,对洗涤液的要求是

能减少抗原抗体非特异性结合,提高抗体特异性识别能力。其中,优选使用含有 0.05 体积% Tween-20 的磷酸盐缓冲液作为本发明试剂盒的洗涤液,所述的磷酸盐缓冲液的 pH 为 6.0-8.0,优选为 7.4。

[0091] 以下通过实施例的方式进一步解释或说明本发明内容,但这些实施例不应被理解为对本发明保护范围的限制。

[0092] 以下实施例中,捕获抗体采用的是小鼠抗人抗 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体;检测抗体采用的是兔抗人抗 11-去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体;但是本发明不限于此,也可采用本发明所列举的其它种属源性的捕获或检测抗体。

[0093] 在以下实施例中,经标准对照或稀释处理的待测样品置于吸附有 11-去氢血栓烷素 B2 抗体的反应孔中。实验通过测量反应抗体的结合量来计算样品中 11-去氢血栓烷素 B2 的含量:根据测量不同浓度 11-去氢血栓烷素 B2 标准物得出的数值,可推算出计算未知样品浓度的计算公式。

[0094] 实施例 1

[0095] 1.1 实验用试剂盒

[0096] 所述的用于检测 11-去氢血栓烷素 B2 的 ELISA 试剂盒包含:

[0097] 包被有抗 IgG 抗体的多孔板:采用的是包被有羊抗鼠 IgG 抗体的 96 孔酶标板。可由实验人员自行包被。包被方法可以是(例如)将羊抗鼠 IgG 抗体(浓度为 0.4 μ g/ml,可购自 Thermo 公司)在 4 $^{\circ}$ C 下放置于反应孔中过夜,每孔加 100 μ l。通过用 PBS 溶液(配方如下:8gNaCl,0.2g KCl,1.44g Na_2HPO_4 ,0.24g KH_2PO_4 ,1000ml 水,pH7.4)洗涤 3 次,从而除去未与酶标板连接的多余的羊抗鼠 IgG 抗体。

[0098] 捕获抗体:采用的是鼠抗人 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体,可由 CD Bioscience 公司制备,终浓度为 1 μ g/ml。

[0099] 检测抗体:采用的是兔抗人 11-去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体,可由 CD Bioscience 公司制备,终浓度为 1 μ g/ml。

[0100] 标记酶:采用的是辣根过氧化物酶,所述的辣根过氧化物酶是结合在二级抗体抗兔抗免疫球蛋白 IgG 抗体上的,可购自(例如)Thermo 公司,浓度为 1mg/ml。

[0101] 显色底物:采用的是四甲基联苯胺(TMB),浓度为 0.3mg/ml,可购自(例如)Sigma 公司。

[0102] 洗涤液:采用的是 10mM K_2HPO_4 ,2mM KH_2PO_4 ,150mM NaCl,0.05%(体积%) Tween-20, pH7.6。

[0103] 稀释液:采用的是 100mM NaCl,10mM EDTA,1%(重量/体积)牛血清白蛋白, pH9.6。

[0104] 11-去氢血栓烷 B2 标准品:浓度为 200ng/ml,可购自(例如)Enzo 公司。

[0105] 其中,所述的洗涤液、稀释液、11-去氢血栓烷 B2 标准品可直接包含在所述的试剂盒中,也可由实验人员自行配制。

[0106] 1.2 实验步骤

[0107] 1.2.1 待测样品的制备

[0108] 取待测者的尿液样品各 1ml,3000rpm 离心 5 分钟,以去除不溶沉淀物。取上清,加入稀释液进行稀释,其中尿液样品与稀释液的体积比为 1:5。稀释后的尿液样品可直接进

行测量,或者置于 -20°C 冰柜,可稳定保存三个月。

[0109] 1.2.2 标准对照的制备

[0110] 取出 8 个样品管。第一个样品管加入 $900\ \mu\text{l}$ 稀释液以及 200ng/ml 11-去氢血栓烷 B2 标准品 $100\ \mu\text{l}$, 稀释至 20ng/ml , 混合均匀。其余 7 个样品管加入 $500\ \mu\text{l}$ 稀释液。从第一个样品管中取出 $500\ \mu\text{l}$, 加入到第二个样品管中, 混合均匀。以同样的方式配置好第 3 个到第 8 个样品管, 以对 11-去氢血栓烷 B2 标准品进行系列稀释(终浓度分别为 20ng/ml ; 10ng/ml ; 5ng/ml ; 2.5ng/ml ; 1.25ng/ml ; 0.625ng/ml ; 0.3125ng/ml ; 0.15625ng/ml)。

[0111] 1.2.3 反应程序

[0112] 将鼠抗人 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体与稀释液混匀, 其中鼠抗人 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体与稀释液的体积比为 $1:500$, 之后加入包被有羊抗鼠 IgG 抗体的 96 孔酶标板的反应孔中, 每孔加 $100\ \mu\text{l}$, 4°C 下过夜。通过用 PBS 溶液(配方如下: 8g NaCl , 0.2g KCl , $1.44\text{g Na}_2\text{HPO}_4$, $0.24\text{g KH}_2\text{PO}_4$, 1000ml 水, $\text{pH}7.4$) 洗涤 3 次, 从而除去未与酶标板连接的多余的鼠抗人 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体。

[0113] 将 $100\ \mu\text{l}$ 稀释好的标准对照或者待测样品分别加入到 96 孔板的相应反应孔中, 每个标准对照或待测样品需加两份。盖上塑料盖膜, 在室温下进行反应, 在摇床上轻微混匀样品, 持续一小时。倒去反应样品, 于干净纸巾上弹去反应孔中残留样品。加入 $300\ \mu\text{l}$ 洗涤液, 洗去未吸附的标准对照及待测样品, 重复三到五次。

[0114] 在每个反应孔中加入 $100\ \mu\text{l}$ 已稀释的兔抗人 11-去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体, 在摇床上室温反应持续一小时。倒去反应样品, 于干净纸巾上弹去反应孔中残留样品。加入 $300\ \mu\text{l}$ 洗涤液, 洗去未吸附的反应抗体, 重复三到五次。

[0115] 在每个反应孔中加入 $100\ \mu\text{l}$ 辣根过氧化物酶 (HRP) 连接的抗兔免疫球蛋白 IgG 抗体, 在摇床上室温反应持续一小时。

[0116] 加入 $100\ \mu\text{l}$ 显色底物四甲基联苯胺 (TMB), 在室温下反应持续三十分钟。在测量数据前轻微摇匀样品, 以使每个反应孔中显色均匀一致。用光谱读取仪(可得自 Thermo Scientific 公司)于波长 460nm 读取数据。

[0117] 1.3 实验结果

[0118] 1.3.1 标准曲线的绘制

[0119] 根据标准对照的读取数据, 画出标准曲线, 结果参见图 2B。

[0120] 1.3.2 待测样品的测量结果

[0121] 根据 1.3.1 绘制的标准曲线的方程式和待测样品的 OD 值计算出待测样品中 11-去氢血栓烷素 B2 的含有量。

[0122] 采用该试剂盒测量 14 位待测者的尿液样品, 检测结果的数值分布范围为 $0.21\text{--}2.89\text{ng/ml}$ 。

[0123] 1.4 准确度测量

[0124] 采用该检测方法测量具有不同标称浓度的标准物(分别为 0.1ng/ml ; 0.5ng/ml ; 2ng/ml ; 5ng/ml ; 10ng/ml), 每个标称浓度检测三次, 得到检测浓度, 计算得到该检测浓度与标称浓度的差异, 其中检测浓度与标称浓度的差异的计算公式为: $((\text{检测浓度} - \text{标称浓度}) / \text{标称浓度}) \times 100\%$ 。结果显示, 检测结果与实际浓度的差异仅在 $2\text{--}9.2\%$ 之间。

[0125] 实施例 2

[0126] 2.1 实验用试剂盒

[0127] 所述的用于检测 11-去氢血栓烷素 B2 的 ELISA 试剂盒包含：

[0128] 包被有抗 IgG 抗体的多孔板：采用的是包被有羊抗鼠 IgG 抗体的 96 孔酶标板。可由实验人员自行包被，包被方法如实施例 1 中所述。

[0129] 捕获抗体：采用的是鼠抗人 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体，可由 CD Bioscience 公司制备，终浓度为 $1\mu\text{g/ml}$ 。

[0130] 检测抗体：采用的是兔抗人 11-去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体，可由 CD Bioscience 公司制备，终浓度为 $1\mu\text{g/ml}$ 。

[0131] 标记酶：采用的是辣根过氧化物酶，可购自 Thermo 公司，并且所述的辣根过氧化物酶是结合在所述的兔抗人 11-去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体上的，将二者结合采用的方法是（例如）Thermo 公司的显色反应酶联接试剂盒。

[0132] 显色底物：采用的是四甲基联苯胺（TMB），浓度为 0.3mg/ml ，可购自（例如）Sigma 公司。

[0133] 洗涤液：采用的是 $10\text{mM K}_2\text{HPO}_4$ ， $2\text{mM KH}_2\text{PO}_4$ ， 150mM NaCl ， 0.05% （体积%）Tween-20，pH7.6。

[0134] 稀释液：采用的是 100mM NaCl ， 10mM EDTA ， 1% （重量/体积）牛血清白蛋白，pH9.6。

[0135] 11-去氢血栓烷 B2 标准品：浓度为 200ng/ml ，可购自（例如）Enzo 公司。

[0136] 其中，所述的洗涤液、稀释液、11-去氢血栓烷 B2 标准品可直接包含在所述的试剂盒中，也可由实验人员自行配制。

[0137] 2.2 实验步骤

[0138] 2.2.1 待测样品的制备

[0139] 取待测者的尿液样品各 1ml ， 3000rpm 离心 5 分钟，以去除不溶沉淀物。取上清，加入稀释液进行稀释，其中尿液样品与稀释液的体积比为 $1:5$ 。稀释后的尿液样品可直接进行测量，或者置于 -20°C 冰柜，可稳定保存三个月。

[0140] 2.2.2 标准对照的制备

[0141] 取出 8 个样品管。第一个样品管加入 $900\mu\text{l}$ 稀释液以及 200ng/ml 11-去氢血栓烷 B2 标准品 $100\mu\text{l}$ 稀释至 20ng/ml ，混合均匀。其余 7 个样品管加入 $500\mu\text{l}$ 稀释液。从第一个样品管中取出 $500\mu\text{l}$ ，加入到第二个样品管中，混合均匀。以同样的方式配置好第 3 个到第 8 个样品管，以对 11-去氢血栓烷 B2 标准品进行系列稀释。

[0142] 2.2.3 反应程序

[0143] 将鼠抗人 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体与稀释液混匀，其中鼠抗人 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体与稀释液的体积比为 $1:500$ ，之后加入包被有羊抗鼠抗 IgG 抗体的 96 孔酶标板的反应孔中，每孔加 $100\mu\text{l}$ ， 4°C 下过夜。通过用 PBS 溶液（配方如下： 8g NaCl ， 0.2g KCl ， $1.44\text{g Na}_2\text{HPO}_4$ ， $0.24\text{g KH}_2\text{PO}_4$ ， 1000ml 水，pH7.4）洗涤 3 次，从而除去未与酶标板连接的多余的鼠抗人 11-去氢血栓烷素 B2 单克隆抗体。

[0144] 将 $100\mu\text{l}$ 稀释好的标准对照或者待测样品分别加入到 96 孔板的相应反应孔中，每个标准对照或待测样品需加两份。盖上塑料盖膜，在室温下进行反应，在摇床上轻微混匀样品，持续一小时。倒去反应样品，于干净纸巾上弹去反应孔中残留样品。加入 $300\mu\text{l}$ 洗

涤液,洗去未吸附的标准对照及待测样品,重复三到五次。

[0145] 在每个反应孔中加入 100 μ l 已稀释的带有辣根过氧化物酶 (HRP) 的兔抗人 11-去氢血栓烷素 B2 多克隆抗体,在摇床上室温反应持续一小时。倒去反应样品,于干净纸巾上弹去反应孔中残留样品。加入 300 μ l 洗涤液,洗去未吸附的反应抗体,重复三到五次。

[0146] 在每个反应孔中加入 100 μ l 辣根过氧化物酶 (HRP) 连接的抗兔免疫球蛋白 IgG 抗体,在摇床上室温反应持续一小时。

[0147] 加入 100 μ l 显色底物四甲基联苯胺 (TMB),在室温下反应持续三十分钟。在测量数据前轻微摇匀样品,以使每个反应孔中显色均匀一致。用光谱读取仪(可得自 Thermo Scientific 公司)于波长 460nm 读取数据。

[0148] 2.3 实验结果

[0149] 根据标准对照的读取数据,画出标准曲线。之后可根据方程式和待测样品的 OD 值计算出待测样品中 11-去氢血栓烷素 B2 的含有量。

[0150] 2.4 准确度测量

[0151] 可应用该试剂盒,根据与实施例 1 的“1.4 准确度测量”中相同的方法测量标准物。结果显示,检测结果间的差异仅在 3.4-10.2%之间。

[0152] 比较例 1

[0153] 使用位于美国安阿伯 (Ann Arbor) 市的 Cayman Chemical 公司生产的检测试剂盒 (Aspirin Effect-Detection Kit),货号为 519510。实验步骤按照该试剂盒附录。

[0154] 根据标准对照的读取数据,画出标准曲线,结果参见图 2A。之后可根据方程式和待测样品的 OD 值计算出待测样品中 11-去氢血栓烷素 B2 的含有量。

[0155] 根据图 2A 中可以看出,采用传统竞争性酶联免疫检测方法测量标准物,其分光光度计的样品读数偏低,读数之间差异较大,往往导致结果的错误率增高。

[0156] 之后可应用该试剂盒,根据与实施例 1 的“1.4 准确度测量”中相同的方法测量标准物,结果显示,结果间差异最大达到 27%。

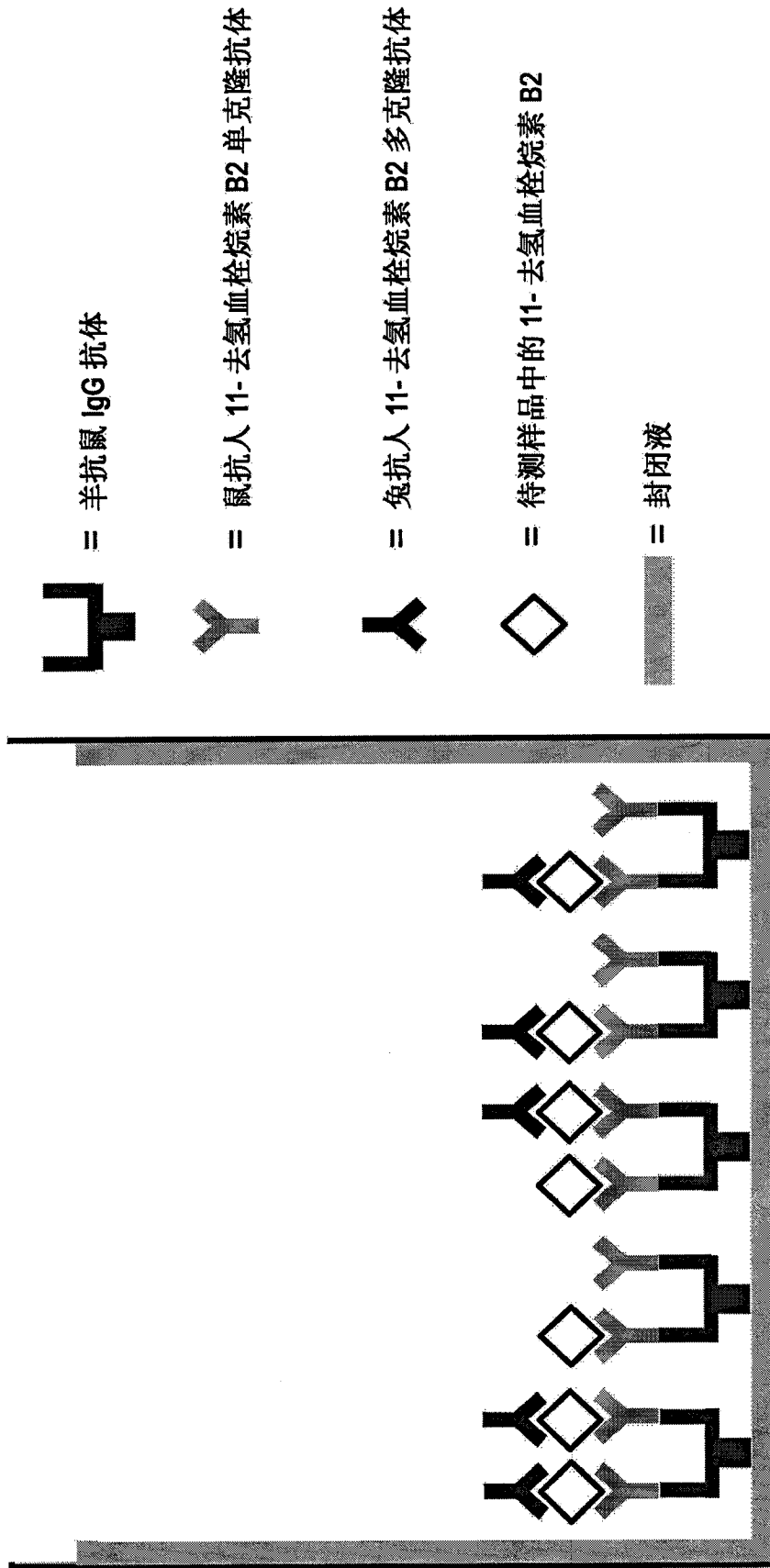


图 1A

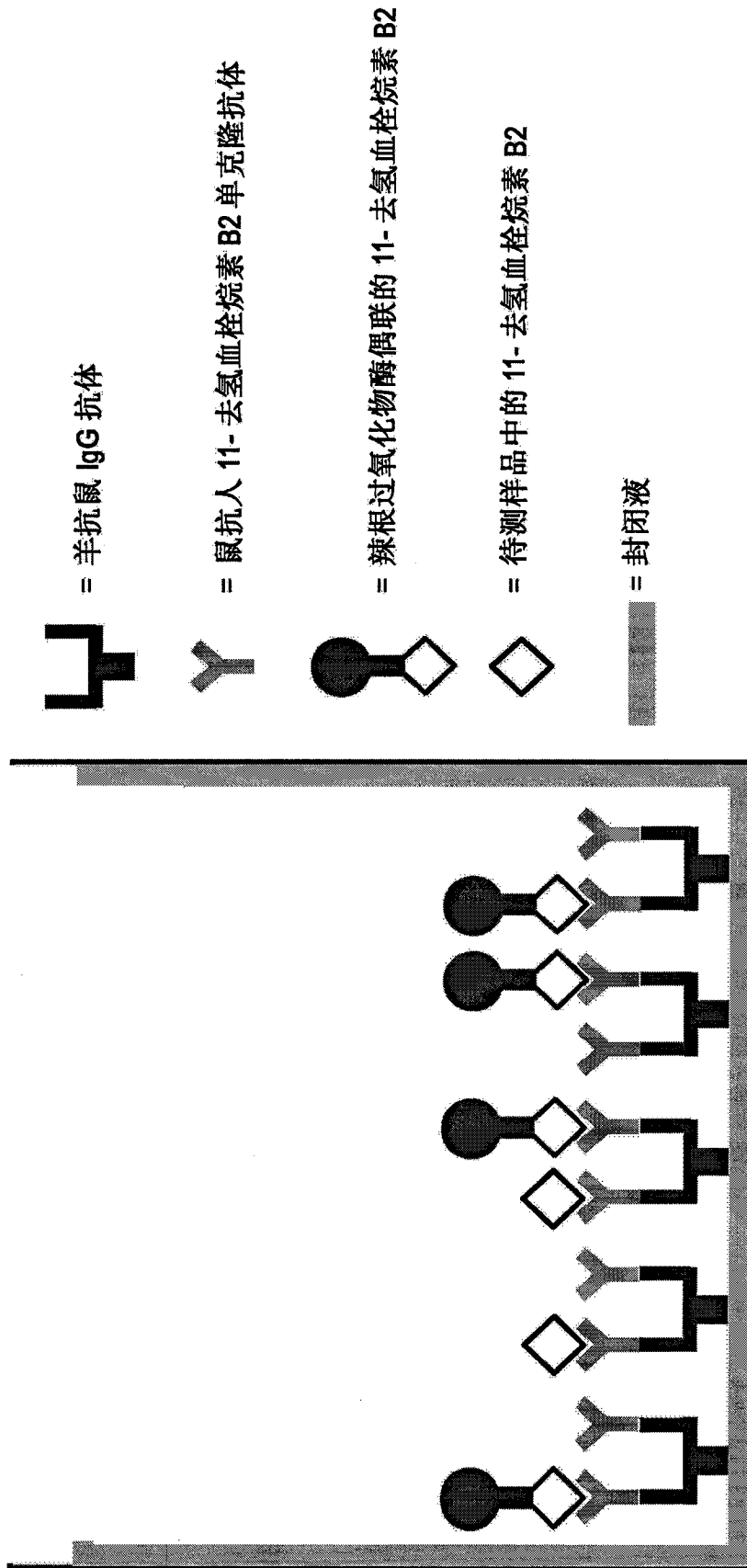


图 1B

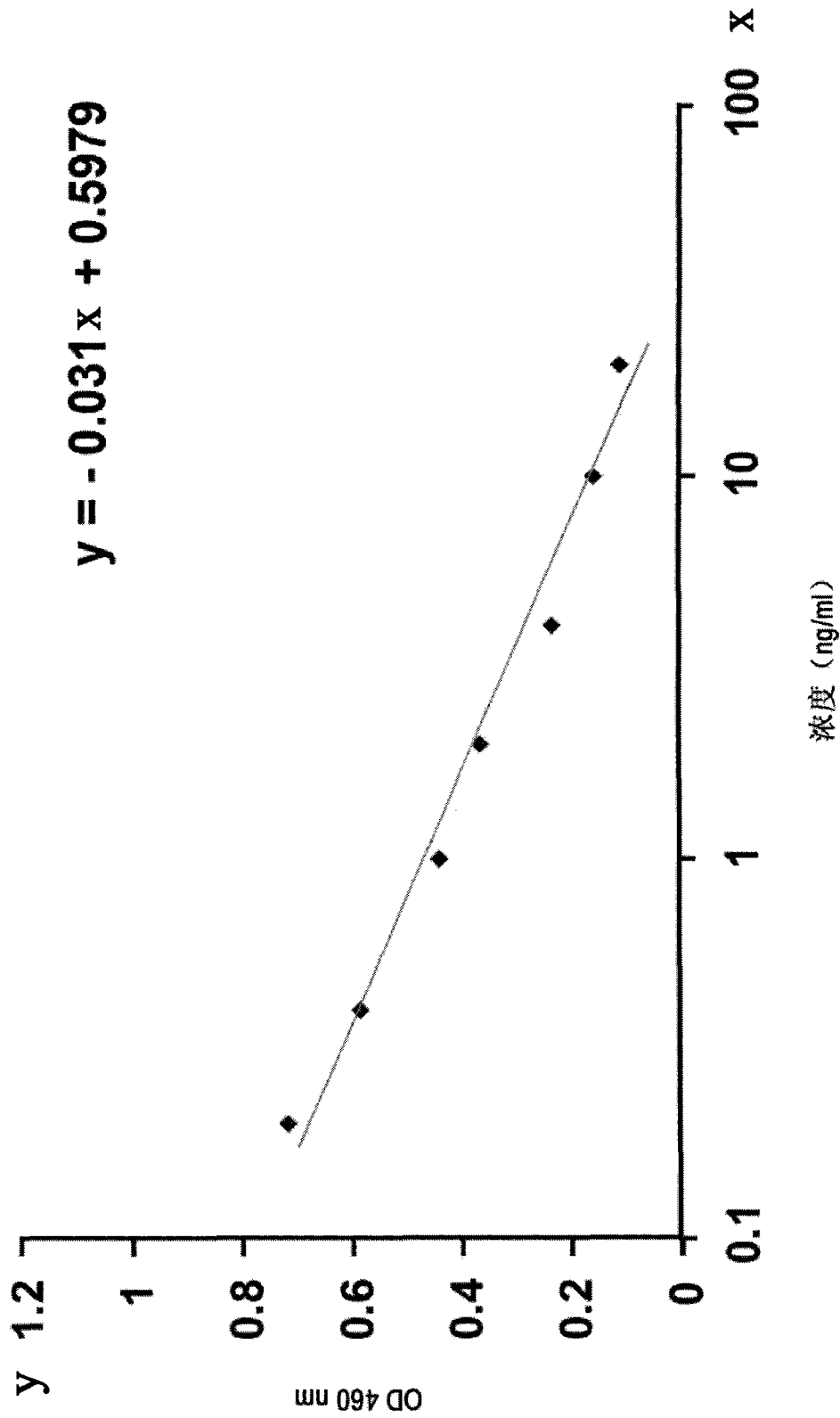


图 2A

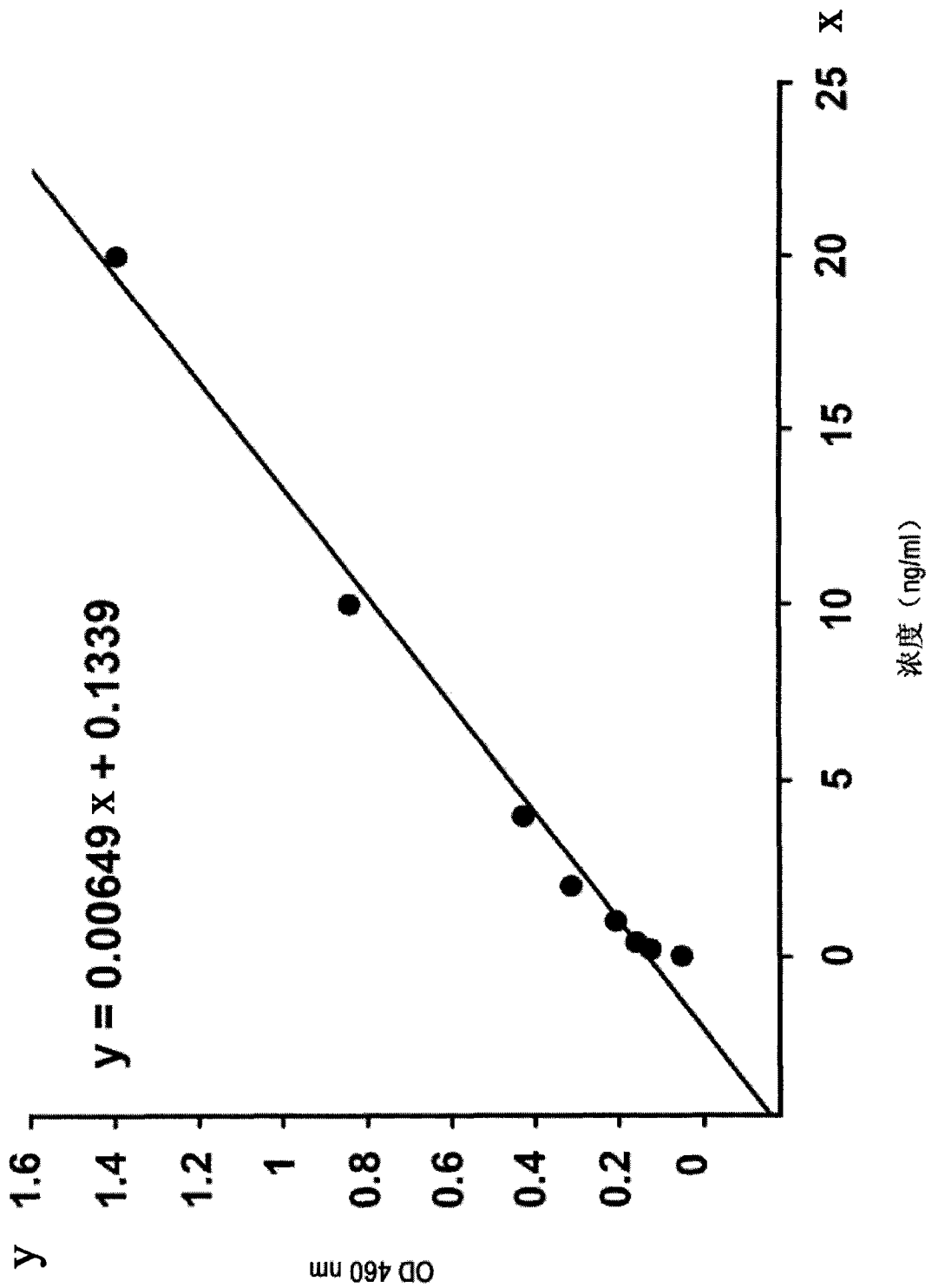


图 2B

专利名称(译)	用于检测11-去氢血栓烷素B2的ELISA试剂盒		
公开(公告)号	CN103592430A	公开(公告)日	2014-02-19
申请号	CN201210287286.7	申请日	2012-08-13
[标]申请(专利权)人(译)	张涛		
申请(专利权)人(译)	张涛		
当前申请(专利权)人(译)	张涛		
[标]发明人	董京飞 张涛 张建宁 周洲		
发明人	董京飞 张涛 张建宁 周洲		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53 G01N2500/00 G01N2800/226		
代理人(译)	丁业平 张天舒		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种用于检测11-去氢血栓烷素B2的ELISA试剂盒。所述的ELISA试剂盒采用的是双抗体夹心法，其中，所述的ELISA试剂盒的捕获抗体为抗11-去氢血栓烷素B2单克隆抗体；检测抗体为抗11-去氢血栓烷素B2多克隆抗体，并且所述的抗11-去氢血栓烷素B2多克隆抗体与所述的抗11-去氢血栓烷素B2单克隆抗体的种属源性是不同的。本发明的ELISA试剂盒具有以下优点和积极效果：本发明的ELISA试剂盒应用两个抗体识别不同的抗原决定簇，检测的特异性更高，抗体-抗原-抗体免疫复合物更加稳定，检测结果的准确度更高。被检测抗原不需进行高度纯化，可直接用于检测。

