



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104820097 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 05

(21) 申请号 201510264780. 5

(22) 申请日 2015. 05. 22

(71) 申请人 北京协和洛克生物技术有限责任公司

地址 100142 北京市海淀区恩济庄 18 号院
内 4 号楼 2 单元 302 房

(72) 发明人 郑乐民 张立峰 李晓燕 马志军
吴建榕

(74) 专利代理机构 北京同辉知识产权代理事务
所(普通合伙) 11357

代理人 刘洪勋 郭丽英

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

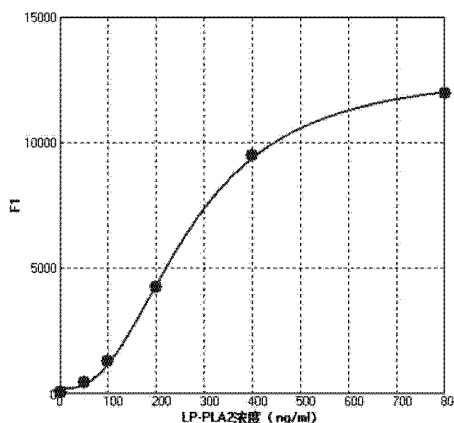
权利要求书2页 说明书8页 附图3页

(54) 发明名称

一种定量检测样本中脂蛋白磷脂酶 A2 浓度的
液态芯片试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明属于体外免疫检测技术领域,具体涉
及一种检测样本中脂蛋白磷脂酶 A2 浓度的试剂
盒及其制备方法。本试剂盒包括包被有抗脂蛋
白磷脂酶 A2 的微球,微孔反应板,脂蛋白磷脂酶
A2 的浓度梯度标准品和质控品、生物素标记的
抗脂蛋白磷脂酶 A2 抗体,链霉亲和素化的藻红
蛋白、含有蛋白保护剂的磷酸盐缓冲液。本发
明所用的检测仪器为 Luminex 的 MAGPIX 和
Luminex 200, 3D, 在此平台上能够实现高通量、
高速度、低成本、准确性高、重复性好地进行
人血浆脂蛋白磷脂酶 A2 浓度的测定,同时能够
自由组合增加检测标记物的种类,从而实现多
种标记物同时检测,增加对心血管疾病诊断的
准确率,有重要的应用前景。



1. 一种定量检测样本中脂蛋白磷脂酶 A2 浓度的液态芯片试剂盒,其特征在于:包括包被有抗脂蛋白磷脂酶 A2 的单克隆抗体的微球、带孔的平台载体、脂蛋白磷脂酶 A2 的梯度浓度标准品、脂蛋白磷脂酶 A2 的质控品、生物素标记的抗脂蛋白磷脂酶 A2 抗体、链霉亲和素化的藻红蛋白、样本缓冲液。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述微球为表面带有荧光色的聚苯乙烯磁微球,带孔的平台载体里面包被有 1000-5000 个微球/孔,而每个微球含有 2×10^{-6} - 5×10^{-5} μ 的抗脂蛋白磷脂酶 A2 的单克隆抗体。

3. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于:所述带孔平台载体为微孔反应板。

4. 根据权利要求 3 所述的试剂盒,其特征在于:所述脂蛋白磷脂酶 A2 的梯度浓度标准品和脂蛋白磷脂酶 A2 的质控品都是用脂蛋白磷脂酶 A2 纯品与自制的标准品稀释液按照 1:200000-1:1000 稀释而成。

5. 根据权利要求书 4 所述的试剂盒,其特征在于:所述脂蛋白磷脂酶 A2 纯品是人血浆提纯的天然脂蛋白磷脂酶 A2 蛋白或大肠杆菌表达的重组脂蛋白磷脂酶 A2 蛋白。

6. 根据权利要求 4 所述的试剂盒,其特征在于:所述的标准品稀释液,是在 PH 7.0-7.4、浓度为 10-100mM 磷酸盐缓冲液中,分别加入 1-10% 质量分数的动物血清、0.01-0.5% 质量分数的防腐剂、1-10% 质量分数的蛋白保护剂、0.05-1% 质量分数的表面活性剂混合而成。

7. 根据权利要求 6 所述的试剂盒,其特征在于:所述生物素标记的抗脂蛋白磷脂酶 A2 抗体为单克隆抗体或者多克隆抗体中的任意一种。

8. 制备如权利要求 1 所述的试剂盒的方法,其特征在于:包括以下步骤,以下步骤不分前后顺序:

包被有抗脂蛋白磷脂酶 A2 的单克隆抗体的微球的制备:将未包被的微球中加入磷酸二氢钠缓冲液、N-羧基琥珀酰亚胺溶液和碳二亚胺溶液进行活化;然后加入特异性的抗脂蛋白磷脂酶 A2 的单克隆抗体 1-125 μ g 在 4-8 $^{\circ}$ C 进行包被;洗涤;再加入含 1-10% 质量分数的动物血清蛋白的封闭液进行封闭;最后在 10-100mM 磷酸盐缓冲液中避光、4-8 $^{\circ}$ C 存放;

脂蛋白磷脂酶 A2 的梯度浓度标准品和脂蛋白磷脂酶 A2 的质控品的制备:先在 PH 7.0-7.4、浓度为 10-100mM 磷酸盐缓冲液中,分别加入 1-10% 质量分数的动物血清、0.01-0.5% 质量分数的防腐剂、1-10% 质量分数的蛋白保护剂、0.05-1% 质量分数的表面活性剂混合而成标准品稀释液;再将纯品与自制的标准品稀释液按照 1:200000-1:1000 稀释而成标示浓度为 0-800ng/ml 的梯度浓度标准品以及 80-300ng/ml 的脂蛋白磷脂酶 A2 质控品;

生物素标记抗脂蛋白磷脂酶 A2 抗体:将抗脂蛋白磷脂酶 A2 抗体与生物素按照摩尔比 1:20 混合,再通过纯化得到生物素标记的抗脂蛋白磷脂酶 A2 抗体;

链霉亲和素化藻红蛋白:0.5mg 的链霉亲和素,加入异双功能试剂无水甲醇液,使得异双功能试剂与链霉亲和素的摩尔比为 20,常温反应 60min,加入二巯苏糖醇 (DTT) 使得其终浓度为 25mM,常温反应 30min,同上过葡聚糖凝胶层析,收集蛋白峰,得到巯基化的链霉亲和素;

取 0.75mg/mL 衍生化的荧光藻红蛋白与 0.25mg/mL 巯基化的链霉亲和素按照质量浓度

比是 3:1 混合交联,摇床低速振荡,4-8℃反应过夜;

样本缓冲液的制备:在 10-100mM 磷酸盐缓冲液中,加入 1-10%质量分数的蛋白保护剂,0.01-0.5%质量分数的防腐剂混合而成。

9. 如权利要求 8 所述的试剂盒的制备方法,其特征在于:所述 N-羟基琥珀酰亚胺溶液和碳二亚胺溶液购买于 Pierce 公司,所述动物血清蛋白为牛血清白蛋白。

10. 如权利要求 8 所述的试剂盒的制备方法,其特征在于:所述异双功能试剂为琥珀酰亚胺-4-环己烷-1-碳酸酯或 3-(2-吡啶二巯基)丙酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯中的一种或两者混合物。

一种定量检测样本中脂蛋白磷脂酶 A2 浓度的液态芯片试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于体外免疫检测技术领域,具体涉及一种检测样本中脂蛋白磷脂酶 A2 浓度测定的试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] Lp-PLA2 属于磷脂酶 A2 超家族,是由 441 个氨基酸残基组成的一种丝氨酸酯酶,相对分子量为 45kD。与磷脂酶 A2 家族其余成员不同的是, Lp-PLA2 不需要钙离子维持其催化活性,其具有降解血小板活化因子的活性,因此也被称为血小板活化因子乙酰水解酶 (platelet-activating factor acetylhydrolase, PAF-AH)。血液中 Lp-PLA2 主要由成熟的巨噬细胞和淋巴细胞合成和分泌,在动脉粥样硬化部位大量存在,并可被炎症介质调节。具有活性的 Lp-PLA2 能优先水解氧化磷脂 sn-2 位上短脂酰链中的酯键而生成两种强促炎介质——氧化游离脂肪酸和溶血卵磷脂。这两种炎性介质可作为单核细胞趋化因子,诱导单核细胞的活化,在动脉粥样硬化的发生、发展中具有一定的作用。大量流行病学研究显示 Lp-PLA2 是一种可以预测与冠脉事件有关的动脉粥样硬化和脑中风危险的酶,其作为一种独立的炎性因子,具有促进动脉粥样硬化的作用。

[0003] 目前对于心血管疾病的免疫诊断方法,只能对一种单一的指标进行检测,由于不同指标存在的灵敏度、精确度以及特异性的差别,在临床诊断中经常出现高的假阴性率。本发明在新的技术平台上,通过双抗夹心法对 LP-PLA2 的浓度进行准确定量,同时能够与不同的标志物进行自由组合,达到多种标志物的同时检测,提高心血管疾病检测的准确性,降低临床检测中的假阴性率。

发明内容

[0004] 本发明相对于传统的免疫测定法,旨在提供高通量、快速、准确的可同时检测多种心血管标志物的技术平台和试剂盒。

[0005] 一种定量检测样本中脂蛋白磷脂酶 A2 浓度的液态芯片试剂盒,包括包被有抗脂蛋白磷脂酶 A2 的单克隆抗体的微球、平台载体、脂蛋白磷脂酶 A2 的梯度浓度标准品、脂蛋白磷脂酶 A2 的质控品、生物素标记的抗脂蛋白磷脂酶 A2 抗体、链霉亲和素化的藻红蛋白 (SAPE)、样本缓冲液。

[0006] 作为优选方案,所述微球为表面带有荧光色的聚苯乙烯磁微球,带孔的平台载体里面包被有 1000-5000 个微球/孔,而每个微球含有 2×10^{-6} - 5×10^{-5} μ g 的抗脂蛋白磷脂酶 A2 的单克隆抗体。

[0007] 作为优选方案,所述带孔的平台载体为微孔反应板。

[0008] 作为优选方案,所述脂蛋白磷脂酶 A2 的梯度浓度标准品和脂蛋白磷脂酶 A2 的质控品都是用脂蛋白磷脂酶 A2 纯品与自制的标准品稀释液按照 1:200000-1:1000 稀释而成,所述标准品不少于 2 个,所述质控品和所述标准品的区别只是浓度不同,所述质控品的作

用是在试剂盒使用过程中起到核准校对的作用,即通过质控品测值是否在质控范围内来对标准品拟合出来的曲线进行核准校对,若质控品测值合格,则可以利用标准曲线来拟合出样本中的脂蛋白磷脂酶 A2 的浓度值。

[0009] 作为优选方案,所述脂蛋白磷脂酶 A2 纯品是人血浆提纯的天然脂蛋白磷脂酶 A2 蛋白或大肠杆菌表达的重组脂蛋白磷脂酶 A2 蛋白。

[0010] 作为优选方案,所述的标准品稀释液,是在 pH 7.0-7.4、浓度为 10-100mM 磷酸盐缓冲液中,分别加入 1-10%质量分数的动物血清、0.01-0.5%质量分数的防腐剂、1-10%质量分数的蛋白保护剂、0.05-1%质量分数的表面活性剂混合而成。

[0011] 作为优选方案,所述样本缓冲液是在 10-100mM 的磷酸盐缓冲液中,分别加入 1-10%质量分数的蛋白保护剂、0.01-0.5%质量分数的防腐剂混合而成。

[0012] 作为优选方案,所述生物素标记的抗脂蛋白磷脂酶 A2 抗体为单克隆抗体或者多克隆抗体中的任意一种。

[0013] 作为优选方案,所述表面活性剂为曲达通 X-100、吐温 20、布里杰 -35、吐温 40、吐温 60、吐温 80、十二烷基磺酸钠、斯盘 20、烷基酚聚氧乙烯 4 醚、聚乙二醇 2000、聚乙二醇 4000。

[0014] 作为优选方案,所述的防腐剂为 Proclin 300、叠氮钠、硫柳汞、硫酸庆大霉素。

[0015] 作为优选方案,所述的蛋白保护剂为牛血清白蛋白、牛 γ 蛋白、海藻糖、甘油、蔗糖。

[0016] 制备所述试剂盒的方法,包括以下制备过程,所述制备过程不分先后:

[0017] 包被有抗脂蛋白磷脂酶 A2 的单克隆抗体的微球的制备:将未包被的微球中加入磷酸二氢钠缓冲液、N-羟基琥珀酰亚胺溶液和碳二亚胺溶液进行活化,然后加入特异性的抗脂蛋白磷脂酶 A2 的单克隆抗体 1-125 μ g 在 4-8 $^{\circ}$ C 进行包被;洗涤三次;再加入含 1-10%质量分数的动物血清蛋白的封闭液进行封闭;最后在 10-100mM 磷酸盐缓冲液中避光、4-8 $^{\circ}$ C 存放;

[0018] 脂蛋白磷脂酶 A2 梯度浓度标准品和脂蛋白磷脂酶 A2 质控品的制备:先在 PH 7.0-7.4、浓度为 10-100mM 磷酸盐缓冲液中,分别加入 1-10%质量分数的动物血清、0.01-0.5%质量分数的防腐剂、1-10%质量分数的蛋白保护剂、0.05-1%质量分数的表面活性剂混合而成标准品稀释液;再将纯品与自制的标准品稀释液按照 1:200000-1:1000 稀释而成标示浓度为 0-800ng/ml 的梯度浓度标准品以及 80-300ng/ml 的脂蛋白磷脂酶 A2 质控品;

[0019] 生物素标记抗脂蛋白磷脂酶抗体:将抗脂蛋白磷脂酶抗体与生物素按照摩尔比 1:20 混合,再通过纯化得到生物素标记的抗脂蛋白磷脂酶抗体;

[0020] 链霉亲和素化藻红蛋白:0.5mg 的链霉亲和素,加入异双功能试剂无水甲醇液,使得异双功能试剂与链霉亲和素的摩尔比为 20,常温反应 60min,加入二硫苏糖醇 (DTT) 使其终浓度为 25mM,常温反应 30min,同上过葡聚糖凝胶层析,收集蛋白峰,得到巯基化的链霉亲和素;

[0021] 取 0.75mg/mL 衍生化的荧光藻红蛋白与 0.25mg/mL 巯基化的链霉亲和素按照质量浓度比是 3:1 混合交联,摇床低速振荡,4-8 $^{\circ}$ C 反应过夜;

[0022] 样本缓冲液的制备:在 10-100mM 磷酸盐缓冲液中,加入 1-10%质量分数的蛋白保

护剂,0.01-0.5%质量分数的防腐剂混合而成。

[0023] 作为优选方案,所述 N- 羟基琥珀酰亚胺溶液和碳二亚胺溶液购买于 Pierce 公司,所述动物血清蛋白为牛血清白蛋白。

[0024] 作为优选方案,所述异双功能试剂为琥珀酰亚胺 -4- 环己烷 -1- 碳酸酯或 3-(2- 吡啶二巯基) 丙酸 N- 羟基琥珀酰亚胺酯中的一种或两者混合物。

[0025] 本发明基于 Luminex xMAP 技术平台,把直径为 6.5 μm 的聚苯乙烯小磁球用荧光染色的方法进行编码,通过调节两种荧光染料的不同配比获得最多可达 100 种具有不同特征荧光谱的微球,然后将每种编码微球共价交联上针对特定检测物的抗原、抗体或核酸探针等捕获分子。检测时微球被微量液体传送系统排成单列通过两束激光,一束判定颗粒的颜色从而决定被测物的特异性(定性);另一束测定微粒上的荧光标记强度对被检测物定量,所得的数据经电脑处理后可以直接用来判断结果。该技术具有自由组合、高通量、高速度、低成本、准确性高、重复性好、灵敏度高、线性范围广、无需洗涤、操作简便的优点。在临床诊断中引进液态芯片技术和产品,将极大地提高检测效率和降低检测成本。

[0026] 本发明所用的检测仪器为 Luminex 的 MAGPIX 和 Luminex 200, 3D, 在此平台上能够实现高通量、高速度、低成本、准确性高、重复性好地进行人血浆脂蛋白磷脂酶 A2 浓度的测定,同时能够自由组合增加检测标记物的种类,从而实现多种标记物同时检测,增加对心血管疾病诊断的准确率,有重要的应用前景。

附图说明

[0027] 图 1 为实施例 3 标准曲线图。

[0028] 图 2 为实施例 4 标准曲线图。

[0029] 图 3 为实施例 5 标准曲线图。

[0030] 图 4 为实施例 6 标准曲线图。

[0031] 图 5 为实施例 7 标准曲线图。

[0032] 图 6 为实施例 8 标准曲线图。

具体实施方式

[0033] 下面结合附图对本发明作进一步详细说明。

[0034] 实施例 1:

[0035] 本发明脂蛋白磷脂酶 A2(LP-PLA2) 浓度液态芯片检测试剂盒的操作使用方法如下:

[0036] 1. 将标准品和质控品用去离子水复溶混匀,分别向微孔板中加入标准品 50 μl /孔、质控和样本各 10 μl 和 40 μl 样本缓冲液/孔;

[0037] 2. 将包被抗体的磁微粒稀释 25 倍,然后分别向微孔板中加入 50 μl 磁微粒,常温振荡反应 120min;

[0038] 3. 用洗板机洗板两次;

[0039] 4. 向微孔板中加入生物素标记的单克隆抗体 25 μl /孔,放在摇床上室温反应 60min;

[0040] 5. 向微孔板中加入链霉亲和素化的藻红蛋白 25 μl /孔,放在摇床上室温反应

30min ;

[0041] 6. 用洗板机洗板两次 ;

[0042] 7. 向微孔板中加入 150 μ l/ 孔的鞘液, 常温振荡 10min ;

[0043] 8. 利用 Luminex 200 读取各反应孔的荧光值 ;

[0044] 9. 将标准品的浓度值和荧光值进行二次曲线回归拟合出标准曲线, 再将样本的荧光值带入标准曲线中, 即可得出样本中 LP-PLA2 的浓度值。

[0045] 实施例 2 :

[0046] 通过以下方法制备该试剂盒链霉亲和素化的藻红蛋白 :

[0047] 藻红蛋白的链霉亲和素化 :

[0048] 1) 藻红蛋白的脱盐处理

[0049] 已纯化的 R-PE 一般保存在 60% 饱和度的硫酸氢缓冲液中, 使用前须离心去除上清液, 并重悬于 50mmol/L PBS 中, 使用脱盐柱去除硫酸氢。

[0050] 2) 藻红蛋白的衍生化

[0051] 取 4.5mg 藻红蛋白溶于 1.0mL 磷酸盐缓冲液中, 加入 10 μ L 3-(2-吡啶二巯基) 丙酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (SPDP) 无水甲醇溶液 (4mg/mL), 使得 SPDP 与藻红蛋白摩尔比约为 10, 常温反应 120min, 经葡聚糖凝胶层析脱盐, 磷酸盐缓冲液平衡和洗脱, 收集藻红蛋白溶液峰。

[0052] 3) 链霉亲和素的巯基化

[0053] 取 0.5mg 的链霉亲和素, 加入上述 SMCC 无水甲醇液, 使得 SMCC 与链霉亲和素的摩尔比约为 20, 常温反应 60min, 加入二硫苏糖醇 (DTT) 使得其终浓度为 25mM, 常温反应 30min, 同上过葡聚糖凝胶层析, 收集蛋白峰。

[0054] 4) 藻红蛋白与链霉亲和素的交联

[0055] 取 0.75mg/mL 衍生化的荧光藻红蛋白与 0.25mg/mL 巯基化的链霉亲和素等量混合, 摇床低速振荡, 4 $^{\circ}$ C 反应过夜。

[0056] 5) 交联反应的终止

[0057] 将交联好的加入 20mg/ml 的碘乙酸钠 60 μ l, 反应 30min, 终止反应。最后将藻红蛋白标记制品溶于磷酸盐缓冲液中, 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0058] 实施例 3 :

[0059] 通过以下方法制备该试剂盒 :

[0060] 分别包被有抗脂蛋白磷脂酶 A2 的单克隆抗体的微球的制备 : 取未包被的微球 5.0×10^6 个, 加入 60 μ L 的 pH 值为 6.2 的 100mM 磷酸二氢钠缓冲液、20 μ L 的 25mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺溶液和 20 μ L 的 25mg/mL 碳二亚胺溶液进行活化, 然后加入特异性的单克隆抗体 25 μ g 进行包被 ; 再加入含 1% 质量分数的牛血清白蛋白的封闭液进行封闭 ; 最后在 10mM 的磷酸盐缓冲液中避光、4 $^{\circ}$ C 存放 ;

[0061] 脂蛋白磷脂酶 A2 的浓度梯度标准品和质控品的制备 : 用含有 1% 质量分数的新生牛血清、0.01% Proclin300、1% 牛血清白蛋白、0.05% Triton X-100 的 10mM 磷酸钠缓冲溶液 (PH7.0) 分别将标志物的纯品配制成分示浓度为 0、50、100、200、400、800ng/ml 的浓度梯度标准品以及 80、300ng/ml 的质控品 ; 然后制成冻干粉, 4 $^{\circ}$ C 保存 ;

[0062] 生物素标记抗脂蛋白磷脂酶抗体 : 将抗脂蛋白磷脂酶抗体与生物素按照摩尔比

1:20 混合,再通过纯化得到生物素标记的抗脂蛋白磷脂酶抗体;

[0063] 链霉亲和素化的藻红蛋白的制备:与实施例 1 相同;

[0064] 样本缓冲液的制备:向 10mM 磷酸缓冲液 (PH7.4) 中分别添加:1%质量分数的牛血清白蛋白和 0.01%质量分数的 Proclin 300,充分混匀。

[0065] 如附图 1 所示为本实施例的标准曲线图,表 1 为采用实施例 1 所述的方法检测本实施例质控品、样本的检测结果,其中样本 1、2 来源于人体血浆,从表 1 可以看出质控品 1 和质控品 2 的检测值在对应的靶值范围内,所以可以确定质控品可控,结果可信;而样本 1、2 的检测值偏差与其对应的靶值相比,偏差小于 10%,说明该试剂盒检测准确率高。

[0066] 表 1 质控品、样本检测结果

[0067]

检测结果	靶值 ng/ml	荧光强度	检测值 (ng/ml)	偏差 (要求小于 10%)
质控 1	80	1997.0	83.5	4.38%
质控 2	300	8764.54	311.2	3.73%
样品 1	63.4	1027.42	65.7	3.63%
样品 2	121.0	4521.83	119.2	-1.49%

[0068] 实施例 4:

[0069] 通过以下方法制备该试剂盒:

[0070] 分别包被有抗脂蛋白磷脂酶 A2 的单克隆抗体的微球的制备:取未包被的微球 5.0×10^6 个,加入 60 μ L 的 pH 值为 6.2 的 100mM 磷酸二氢钠缓冲液、20 μ L 的 25mg/mL N-羧基琥珀酰亚胺溶液和 20 μ L 的 25mg/mL 碳二亚胺溶液进行活化,然后加入特异性的单克隆抗体 25 μ g 进行包被;再加入含 10%质量分数的牛血清白蛋白的封闭液进行封闭;最后在 100mM 的磷酸盐缓冲液中避光、8 $^{\circ}$ C 存放;

[0071] 脂蛋白磷脂酶 A2 的浓度梯度标准品和质控品的制备:用含有 10%质量分数的新生牛血清、0.5%质量分数的 Proclin300、10%牛血清白蛋白、1%质量分数的 Triton X-100 的 100mM 磷酸钠缓冲溶液 (PH7.4) 分别将标志物的纯品配制成标示浓度为 0、50、100、200、400、800ng/ml 的浓度梯度标准品以及 80、300ng/ml 的质控品;然后制成冻干粉,4 $^{\circ}$ C 保存;

[0072] 生物素标记抗脂蛋白磷脂酶抗体:与实施例 3 相同;

[0073] 链霉亲和素化的藻红蛋白的制备:与实施例 2 相同;

[0074] 样本缓冲液的制备:向 100mM 磷酸缓冲液 (PH7.4) 中分别添加:10%质量分数的牛血清白蛋白和 0.5%质量分数的 Proclin 300,充分混匀。

[0075] 如附图 2 所示为本实施例的标准曲线图,表 2 为采用实施例 1 所述的方法检测本实施例质控品、样本的检测结果,其中样本 1、2 来源于人体血浆,从表 2 可以看出质控品 1 和质控品 2 的检测值在对应的靶值范围内,所以可以确定质控品可控,结果可信;而样本 1、2 的检测值偏差与其对应的靶值相比,偏差小于 10%,说明该试剂盒检测准确率高。

[0076] 表 2 质控品、样本检测结果

[0077]

检测结果	靶值 ng/ml	荧光强度	检测值 (ng/ml)	偏差 (要求小于 10%)
质控 1	80	728.03	81.7	2.13%
质控 2	300	6570.82	306.2	2.07%
样品 1	63.4	430.41	62.9	-0.79%
样品 2	121.0	1884.30	124.3	2.73%

[0078] 实施例 5：

[0079] 与实施例 3 基本相同，不同的是：

[0080] 脂蛋白磷脂酶 A2 的浓度梯度标准品和质控品的制备：用含有 2% 新生牛血清、0.05% Proclin300、5% 牛血清白蛋白、0.15% Triton X-100 的 20mM 磷酸钠缓冲溶液 (PH7.4) 分别将标志物的纯品配制成标示浓度为 0、50、100、200、400、800ng/ml 的一浓度梯度标准品以及 80、300ng/ml 的质控品；然后制成冻干粉，4℃ 保存；

[0081] 样本缓冲液的制备：向 100mM 磷酸缓冲液 (PH7.4) 中分别添加：1% 牛血清白蛋白和 0.05% Proclin 300，充分混匀。

[0082] 如附图 3 所示为本实施例的标准曲线图，表 3 为采用实施例 1 所述的方法检测本实施例质控品、样本的检测结果，其中样本 1、2 来源于人体血浆，从表 3 可以看出质控品 1 和质控品 2 的检测值在对应的靶值范围内，所以可以确定质控品可控，结果可信；而样本 1、2 的检测值偏差与其对应的靶值相比，偏差小于 10%，说明该试剂盒检测准确率高。

[0083] 表 3 质控品、样本检测结果

[0084]

检测结果	靶值 ng/ml	荧光强度	检测值 (ng/ml)	偏差 (要求小于 10%)
质控 1	80	1445.55	85.5	6.88%
质控 2	300	8548.65	298.2	-0.60%
样品 1	63.4	653.49	66.6	5.05%
样品 2	121.0	4300.72	125.3	3.55%

[0085] 实施例 6：

[0086] 与实施例 3 基本相同，不同的是：

[0087] 分别包被有抗脂蛋白磷脂酶 A2 的单克隆抗体的磁珠的制备：取未包被的微球 5.0×10^6 个，加入 60 μ l 的 pH 值为 6.2 的 100mM 磷酸二氢钠缓冲液、20 μ l 的 25mg/mL N-羧基琥珀酰亚胺溶液和 20 μ l 的 25mg/mL 碳二亚胺溶液进行活化，然后加入特异性的单克隆抗体 50 μ g 进行包被；再加入含牛血清白蛋白的封闭液进行封闭；最后在磷酸盐缓冲液中避光、4℃ 存放；

[0088] 脂蛋白磷脂酶 A2 的浓度梯度标准品和质控品的制备：用含有 2% 新生牛血清、0.05% Proclin300、5% 牛血清白蛋白、0.10% Triton X-100 的 20mM 磷酸钠缓冲溶液 (PH7.4) 分别将标志物的纯品配制成标示浓度为 0、50、100、200、400、800ng/ml 的一浓度梯度标准品以及 80、300ng/ml 的质控品；然后制成冻干粉，4℃ 保存；

[0089] 样本缓冲液的制备：向 100mM 磷酸缓冲液 (PH7.4) 中分别添加：1% 牛血清白蛋白和 0.05% Proclin 300，充分混匀。

[0090] 如附图 4 所示为本实施例的标准曲线图,表 4 为采用实施例 1 所述的方法检测本实施例质控品、样本的检测结果,其中样本 1、2 来源于人体血浆,从表 4 可以看出质控品 1 和质控品 2 的检测值在对应的靶值范围内,所以可以确定质控品可控,结果可信;而样本 1、2 的检测值偏差与其对应的靶值相比,偏差小于 10%,说明该试剂盒检测准确率高。

[0091] 表 4 质控品、样本检测结果

[0092]

检测结果	靶值 ng/ml	荧光强度	检测值 (ng/ml)	偏差 (要求小于 10%)
质控 1	80	872.61	81.1	1.37%
质控 2	300	8294.37	294.3	-1.90%
样品 1	63.4	574.23	67.3	6.15%
样品 2	121.0	2190.25	120.1	-0.74%

[0093] 实施例 7:

[0094] 与实施例 6 基本相同,不同的是:

[0095] 分别包被有抗脂蛋白磷脂酶 A2 的单克隆抗体的磁珠的制备:取未包被的微球 5.0×10^6 个,加入 60 μ L 的 pH 值为 6.2 的 100mM 磷酸二氢钠缓冲液、20 μ l 的 25mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺溶液和 20 μ l 的 25mg/mL 碳二亚胺溶液进行活化,然后加入特异性的单克隆抗体 100 μ g 进行包被;再加入含牛血清白蛋白的封闭液进行封闭;最后在磷酸盐缓冲液中避光、4 $^{\circ}$ C 存放;

[0096] 脂蛋白磷脂酶 A2 的浓度梯度标准品和质控品的制备:用含有 2% 新生牛血清、0.05% Proclin300、5% 牛血清白蛋白、0.10% Triton X-100 的 20mM 磷酸钠缓冲溶液 (PH7.4) 分别将标志物的纯品配制成标示浓度为 0、50、100、200、400、800ng/ml 的一浓度梯度标准品以及 80、300ng/ml 的质控品;然后制成冻干粉,4 $^{\circ}$ C 保存;

[0097] 样本缓冲液的制备:向 100mM 磷酸缓冲液 (PH7.4) 中分别添加:1% 牛血清白蛋白和 0.05% Proclin 300,充分混匀。

[0098] 如附图 5 所示为本实施例的标准曲线图,表 5 为采用实施例 1 所述的方法检测本实施例质控品、样本的检测结果,其中样本 1、2 来源于人体血浆,从表 5 可以看出质控品 1 和质控品 2 的检测值在对应的靶值范围内,所以可以确定质控品可控,结果可信;而样本 1、2 的检测值偏差与其对应的靶值相比,偏差小于 10%,说明该试剂盒检测准确率高。

[0099] 表 5 质控品、样本检测结果

[0100]

检测结果	靶值 ng/ml	荧光强度	检测值 (ng/ml)	偏差 (要求小于 10%)
质控 1	80	774.76	78.8	-1.50%
质控 2	300	7581.97	307.3	2.43%
样品 1	63.4	496.28	60.6	-4.42%
样品 2	121.0	1933.84	127.1	5.04%

[0101] 实施例 8:

[0102] 与实施例 6 基本相同,不同的是:

[0103] 分别包被有抗脂蛋白磷脂酶 A2 的单克隆抗体的磁珠的制备:取未包被的微球 5.0×10^6 个,加入 $60 \mu\text{l}$ 的 pH 值为 6.2 的 100mM 磷酸二氢钠缓冲液、 $20 \mu\text{l}$ 的 25mg/mL N- 羟基硫代琥珀酰亚胺溶液和 $20 \mu\text{l}$ 的 25mg/mL 碳二亚胺溶液进行活化,然后加入特异性的单克隆抗体 125 μg 进行包被;再加入含牛血清白蛋白的封闭液进行封闭;最后在磷酸盐缓冲液中避光、 4°C 存放;

[0104] 脂蛋白磷脂酶 A2 的浓度梯度标准品和质控品的制备:用含有 2% 新生牛血清、0.05% Proclin300、5% 牛血清白蛋白、0.10% Triton X-100 的 20mM 磷酸钠缓冲溶液 (PH7.4) 分别将标志物的纯品配制成标示浓度为 0、50、100、200、400、800ng/ml 的一浓度梯度标准品以及 80、300ng/ml 的质控品;然后制成冻干粉, 4°C 保存;

[0105] 样本缓冲液的制备:向 100mM 磷酸缓冲液 (PH7.4) 中分别添加:1% 牛血清白蛋白和 0.05% Proclin 300,充分混匀。

[0106] 如附图 6 所示为本实施例的标准曲线图,表 6 为采用实施例 1 所述的方法检测本实施例质控品、样本的检测结果,其中样本 1、2 来源于人体血浆,从表 6 可以看出质控品 1 和质控品 2 的检测值在对应的靶值范围内,所以可以确定质控品可控,结果可信;而样本 1、2 的检测值偏差与其对应的靶值相比,偏差小于 10%,说明该试剂盒检测准确率高。

[0107] 表 6 质控品、样本检测结果

[0108]

检测结果	靶值 ng/ml	荧光强度	检测值 (ng/ml)	偏差 (要求小于 10%)
质控 1	80	2702.92	85.3	6.63%
质控 2	300	9787.10	310.2	3.40%
样品 1	63.4	1637.37	61.1	-3.63%
样品 2	121.0	4195.83	118.8	-1.82%

[0109] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

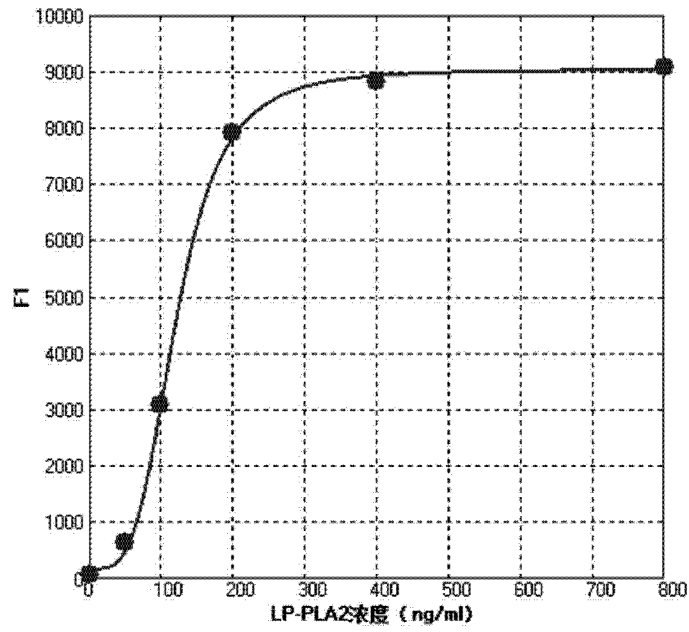


图 1

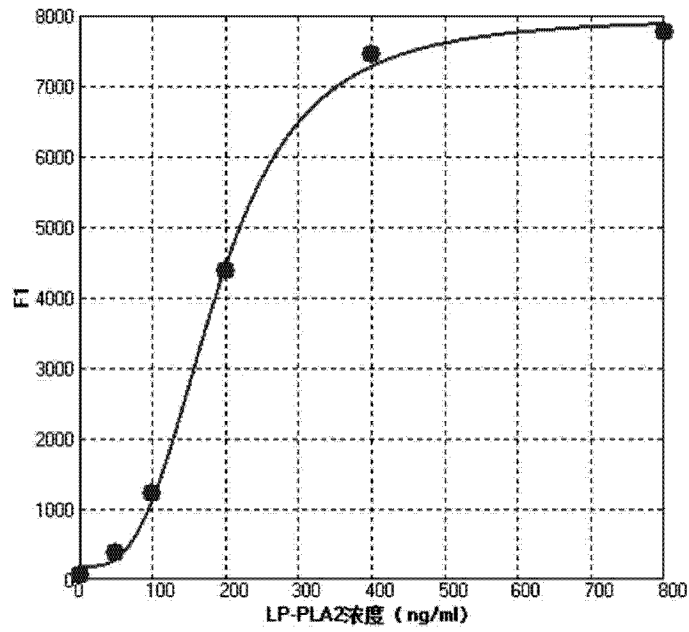


图 2

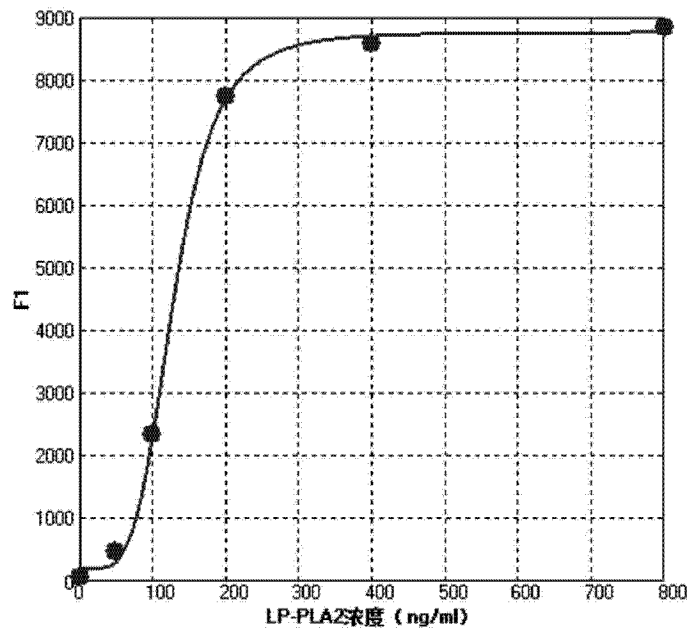


图 3

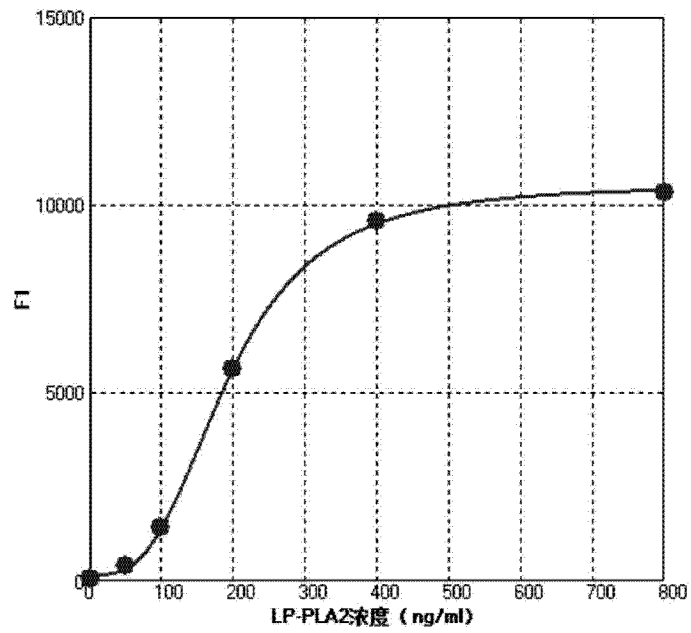


图 4

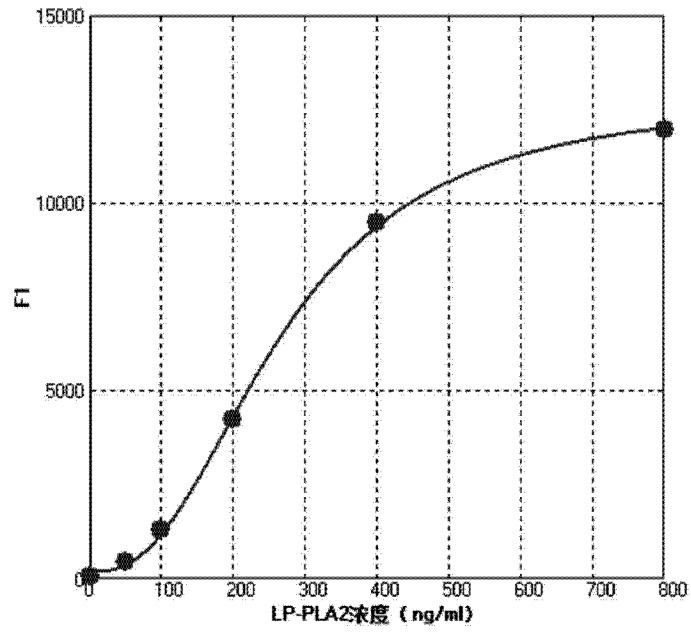


图 5

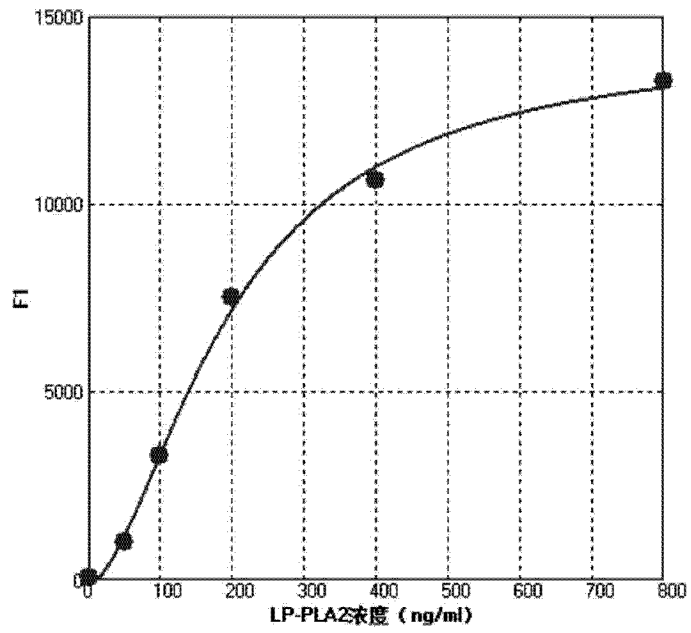


图 6

专利名称(译)	一种定量检测样本中脂蛋白磷脂酶A2浓度的液态芯片试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN104820097A	公开(公告)日	2015-08-05
申请号	CN201510264780.5	申请日	2015-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	北京协和洛克生物技术有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	北京协和洛克生物技术有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京协和洛克生物技术有限责任公司		
[标]发明人	郑乐民 张立峰 李晓燕 马志军 吴建榕		
发明人	郑乐民 张立峰 李晓燕 马志军 吴建榕		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/573 G01N33/531 G01N2800/32		
代理人(译)	刘洪勋 郭丽英		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于体外免疫检测技术领域，具体涉及一种检测样本中脂蛋白磷脂酶A2浓度的试剂盒及其制备方法。本试剂盒包括包被有抗脂蛋白磷脂酶A2的微球，微孔反应板，脂蛋白磷脂酶A2的浓度梯度标准品和质控品、生物素标记的抗脂蛋白磷脂酶A2抗体，链霉亲和素化的藻红蛋白、含有蛋白保护剂的磷酸盐缓冲液。本发明所用的检测仪器为Luminex的MAGPIX和Luminex 200,3D，在此平台上能够实现高通量、高速度、低成本、准确性高、重复性好地进行人血浆脂蛋白磷脂酶A2浓度的测定，同时能够自由组合增加检测标记物的种类，从而实现多种标记物同时检测，增加对心血管疾病诊断的准确率，有重要的应用前景。

