



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104849456 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 19

(21) 申请号 201510251170. 1

(22) 申请日 2015. 05. 18

(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 33/573(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

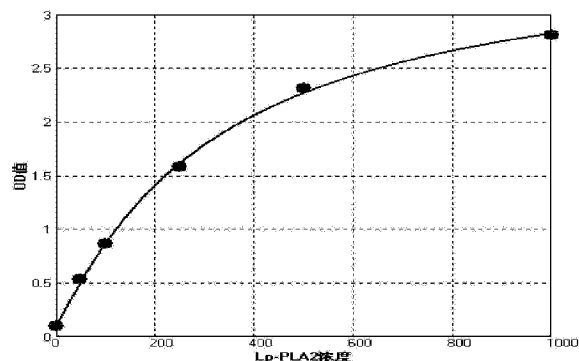
权利要求书2页 说明书11页 附图4页

(54) 发明名称

一种检测脂蛋白磷脂酶 A2 浓度的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,具体涉及一种检测脂蛋白磷脂酶 A2 浓度的试剂盒及其制备方法。所述试剂盒包括包被有抗脂蛋白磷脂酶 A2 特异性抗体的平台载体、脂蛋白磷脂酶 A2 浓度梯度的标准品、脂蛋白磷脂酶 A2 质控品、辣根过氧化物酶标记的抗脂蛋白磷脂酶 A2 抗体、样本缓冲液、底物 A、底物 B、终止液、洗液。本发明由于所用的检测仪器较为简单,均为实验室通常所用仪器,故检测成本较低,利于推广;并且该试剂盒操作简单,一般的实验室技术人员即可实现;同时试剂盒内采用高特异性、高亲和力的抗脂蛋白磷脂酶 A2 特异性抗体、添加独特蛋白稳定剂的标准品稀释液和样本缓冲液配方,大大提高了检测结果的可靠性和准确性,以及试剂盒的稳定性。



1. 一种检测脂蛋白磷脂酶 A2 浓度的试剂盒,其特征在于:包括包被有抗脂蛋白磷脂酶 A2 特异性抗体的平台载体、脂蛋白磷脂酶 A2 浓度梯度的标准品、脂蛋白磷脂酶 A2 质控品、辣根过氧化物酶标记的抗脂蛋白磷脂酶 A2 特异性抗体、样本缓冲液、底物 A、底物 B、终止液、洗液。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述平台载体为 96 孔聚苯乙烯微孔板;所述底物 A 为过氧化氢的柠檬酸盐缓冲液;所述底物 B 为四甲基联苯胺的柠檬酸盐缓冲液;所述终止液为硫酸溶液;所述洗液为含有表面活性剂的磷酸盐缓冲液。

3. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于:所述微孔板上抗脂蛋白磷脂酶 A2 特异性抗体的数量为 0.1-10 $\mu\text{g}/\text{孔}$;脂蛋白磷脂酶 A2 梯度标准品为 6 支、各 0.5ml;所述脂蛋白磷脂酶 A2 质控品为 2 支各 0.5ml;辣根过氧化物酶标记的抗脂蛋白磷脂酶 A2 特异性抗体 10ml、1 支;样本缓冲液 10ml、1 支;底物 A 10ml、1 支;底物 B 10ml、1 支;终止液 10ml、1 支;洗液 10ml、1 支。

4. 根据权利要求 3 所述的试剂盒,其特征在于:所述的抗脂蛋白磷脂酶 A2 特异性抗体为单克隆抗体。

5. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述的脂蛋白磷脂酶 A2 浓度梯度的标准品和脂蛋白磷脂酶 A2 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 1:100-1:2000 稀释而成。

6. 根据权利要求 5 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。

7. 根据权利要求 5 所述的试剂盒,其特征在于:所述的标准品稀释液,是在 PH 6.0-8.0、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蛋白、1-10% 质量分数的抗原稳定剂、0.05-10% 体积分数的表面活性剂、0.1-10mM 的金属离子络合剂以及 0.01-0.5% 质量分数的防腐剂混合而成。

8. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述样本缓冲液是在 PH6.0-7.0、浓度为 10-100mM 的磷酸盐缓冲液中,分别加入 0.1-5mM 的金属离子络合剂、1-10% 质量分数的动物血清蛋白、0.01-1% 质量分数的表面活性剂、0.01-0.5% 质量分数的防腐剂混合而成。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的试剂盒,其特征在于:所述的金属离子络合剂为乙二胺四乙酸二钠或乙二胺四乙酸四钠。

10. 制备如权利要求 1-9 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 特异性抗体的平台载体的制备:将浓度为 6-10mg/ml 特异性的抗脂蛋白磷脂酶 A2 抗体用 10-200mM 磷酸盐缓冲液稀释到浓度为 0.1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$,分别加入到平台载体上,4-8℃ 过夜进行包被;然后用洗液将平台载体清洗至少 3 次;再向平台载体上加入含蛋白保护剂的封闭液进行封闭;弃去封闭液,等待平台载体至干燥后,真空袋封装,4-8℃ 存放;

脂蛋白磷脂酶 A2 浓度梯度标准品和脂蛋白磷脂酶 A2 质控品的制备:脂蛋白磷脂酶 A2 纯品与标准品稀释液按照 1:200000-1:1000 稀释,最后配制成标示浓度为 0-1000ng/ml 的脂蛋白磷脂酶 A2 浓度梯度标准品以及 100-400ng/ml 的脂蛋白磷脂酶 A2 质控品;其中标准

品稀释液是在 pH 6.0-8.0、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、0.1-10mM 金属离子络合剂、0.05-10% 质量分数的表面活性剂、1-10% 质量分数的抗原稳定剂;将得到的脂蛋白磷脂酶 A2 浓度梯度标准品与脂蛋白磷脂酶 A2 质控品每瓶 0.5ml 分装,然后冻干成粉末状,4-8℃ 保存;

辣根过氧化物酶标记的抗脂蛋白磷脂酶 A2 抗体的制备:称取过碘酸钠加入到纯化水中配置得到终浓度为 10-15mg/ml 的过碘酸钠溶液;将终浓度为 10-15mg/ml 的过碘酸钠溶液与浓度为 10-20mg/ml 的辣根过氧化物酶等体积混合得到被过碘酸钠氧化过的辣根过氧化物酶;将抗脂蛋白磷脂酶 A2 抗体与碳酸盐缓冲液等体积混合稀释;将被过碘酸钠氧化好的辣根过氧化物酶与特异性的抗脂蛋白磷脂酶 A2 抗体混合交联;将交联后的产物与硼氢化钠溶液混合置 4℃ 还原 2 小时;再用磷酸钠溶液进行透析,透析后即得脂蛋白磷脂酶 A2 的酶标抗体;将酶标抗体与甘油等体积混匀,-20℃ 保存备用;

样本缓冲液的配制:在 PH6.0-7.0、浓度为 10-100mM 的磷酸盐缓冲液中,分别加入 0.1-3mM 的金属离子络合剂、1-10% 质量分数的蛋白保护剂、0.01-1% 质量分数的表面活性剂、0.01-0.5% 质量分数的防腐剂混合而成;

底物 A:将过氧化氢纯品加入到浓度为 10-100mM 柠檬酸盐缓冲液中,配制成过氧化氢为 20-50% 质量分数的柠檬酸盐混合溶液;

底物 B:将四甲基联苯胺加入到浓度为 10-100mM 柠檬酸盐缓冲液中,配制成四甲基联苯胺为 5-20% 质量分数的柠檬酸盐混合溶液;

终止液:将浓硫酸用纯化水稀释;

洗液:把质量分数为 0.05-1% 的表面活性剂加到 PH6.0-7.0、浓度为 10-100mM 磷酸盐缓冲液中,然后混匀。

一种检测脂蛋白磷脂酶 A2 浓度的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 (Lp-PLA2) 浓度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性介质——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。美国心脏病协会和国家胆固醇教育计划提出, Lp-PLA2 可以作为目前冠心病最好的预测因子,在未来的临床决策中可能成为一个独立的检测指标。因此检测人体 Lp-PLA2 的浓度对于判断动脉粥样硬化炎症水平具有十分重要的参考价值,临床上可用于心脑血管炎症疾病的预测和诊断。

[0003] 目前,在市面上检测 Lp-PLA2 浓度常用的试剂种类,检测成本高,操作繁琐,对实验操作人员的技能要求高,不利于该项目检测的大范围推广。

发明内容

[0004] 针对上述技术的不足之处,本发明提供一种操作简便、便于实验人员掌握、涉及实验仪器单一、普及率高、检测成本低、检测结果准确、试剂稳定性良好,非常利于大范围推广的脂蛋白磷脂酶 A2 (Lp-PLA2) 定量检测试剂盒。

[0005] 一种检测脂蛋白磷脂酶 A2 浓度的试剂盒,包括包被有抗脂蛋白磷脂酶 A2 特异性抗体的平台载体、脂蛋白磷脂酶 A2 浓度梯度的标准品、脂蛋白磷脂酶 A2 质控品、辣根过氧化物酶标记的抗脂蛋白磷脂酶 A2 特异性抗体、样本缓冲液、底物 A、底物 B、终止液、洗液。

[0006] 作为优选方案,所述平台载体为 96 孔聚苯乙烯微孔板;所述底物 A 为过氧化氢的柠檬酸盐缓冲液;所述底物 B 为四甲基联苯胺的柠檬酸盐缓冲液;所述终止液为硫酸溶液;所述洗液为含有表面活性剂的磷酸盐缓冲液。

[0007] 作为优选方案,所述微孔板上抗脂蛋白磷脂酶 A2 特异性抗体的数量为 0.1-10 μ g/孔;脂蛋白磷脂酶 A2 梯度标准品为 6 支、各 0.5ml;所述脂蛋白磷脂酶 A2 质控品为 2 支各 0.5ml;辣根过氧化物酶标记的抗脂蛋白磷脂酶 A2 特异性抗体 10ml、1 支;样本缓冲液 10ml、1 支;底物 A 10ml、1 支;底物 B 10ml、1 支;终止液 10ml、1 支;洗液 10ml、1 支。

[0008] 作为优选方案,所述的抗脂蛋白磷脂酶 A2 特异性抗体为单克隆抗体。

[0009] 作为优选方案,所述的脂蛋白磷脂酶 A2 浓度梯度的标准品和脂蛋白磷脂酶 A2 质控品都是用脂蛋白磷脂酶 A2 纯品与自制的标准品按照 1:100-1:2000 稀释液稀释而成,所述标准品不少于 2 个,所述质控品和所述标准品的脂蛋白磷脂酶 A2 的浓度不同,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 浓度值。

[0010] 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。

[0011] 作为优选方案,所述的标准品稀释液,其中标准品稀释液是在 pH6.0-8.0、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、0.1-10mM 金属离子络合剂、0.05-10%质量分数的表面活性剂、1-10%质量分数的抗原稳定剂混合而成。

[0012] 作为优选方案,所述样本缓冲液是在 pH6.0-7.0、浓度为 10-100mM 的磷酸盐缓冲液中,分别加入 0.1-5mM 的金属离子络合剂、1-10%质量分数的动物血清蛋白、0.01-1%质量分数的表面活性剂、0.01-0.5%质量分数的防腐剂混合而成。

[0013] 优选的,所述的表面活性剂为曲达通 X-100、曲达通 X-705、吐温 20、吐温 40、吐温 60、吐温 80、十二烷基磺酸钠、聚乙二醇 2000。

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

[0015] 作为优选方案,所述的金属离子络合剂为乙二胺四乙酸二钠和乙二胺四乙酸四钠。

[0016] 作为优选方案,所述的抗原稳定剂为抗坏血酸、维生素 E、2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)、还原型谷胱甘肽(GSH)。

[0017] 制备如上所述的试剂盒的方法,包括以下步骤,以下步骤不分前后顺序:

[0018] 包被有抗脂蛋白磷脂酶 A2 特异性抗体的平台载体的制备:将浓度为 6-10mg/ml 特异性的抗脂蛋白磷脂酶 A2 抗体用 10-200mM 磷酸盐缓冲液稀释到浓度为 0.1-10 μ g/ml,分别加入到平台载体上,4-8℃过夜进行包被;然后用洗液将平台载体清洗至少 3 次;再向平台载体上加入含蛋白保护剂的封闭液进行封闭;弃去封闭液,等待平台载体至干燥后,真空袋封装,4-8℃存放;

[0019] 脂蛋白磷脂酶 A2 浓度梯度标准品和脂蛋白磷脂酶 A2 质控品的制备:脂蛋白磷脂酶 A2 纯品与标准品稀释液按照 1:200000-1:1000 稀释,最后配制成标示浓度为 0-1000ng/ml 的脂蛋白磷脂酶 A2 浓度梯度标准品以及 100-400ng/ml 的脂蛋白磷脂酶 A2 质控品;其中标准品稀释液是在 pH 6.0-8.0、浓度为 10-100mM 磷酸盐缓冲液中,分别加入 1%-4%质量分数的动物血清、0.05-0.5%质量分数的防腐剂、3-5%质量分数的蛋白保护剂、0.1-0.5%质量分数的表面活性剂;将得到的脂蛋白磷脂酶 A2 浓度梯度标准品与脂蛋白磷脂酶 A2 质控品每瓶 500 μ l 分装,然后冻干成粉末状,4-8℃保存;

[0020] 辣根过氧化物酶标记的抗脂蛋白磷脂酶 A2 抗体的制备:称取过碘酸钠加入到纯化水中配置得到终浓度为 10-15mg/ml 的过碘酸钠溶液;将终浓度为 10-15mg/ml 的过碘酸钠溶液与浓度为 10-20mg/ml 的辣根过氧化物酶等比例混合得到被过碘酸钠氧化过的辣根过氧化物酶;然后将抗脂蛋白磷脂酶 A2 抗体与碳酸盐缓冲液等体积混合稀释;将被过碘酸

钠氧化好的辣根过氧化物酶与特异性的抗脂蛋白磷脂酶 A2 抗体混合交联 ; 用去离子水溶解硼氢化钠成终浓度为 8-12mg/ml ; 再透析后即得脂蛋白磷脂酶 A2 的酶标抗体, 通过分子筛进行分离纯化 ; 将所得酶标抗体与甘油等体积混合, -15—-20℃ 保存备用 ;

[0021] 样本缓冲液的配制 : 所述样本缓冲液是在 PH6.0-7.0、浓度为 10-100mM 的磷酸盐缓冲液中, 分别加入 0.1-3mM 的金属离子络合剂、1-10% 质量分数的蛋白保护剂、0.01-1% 质量分数的表面活性剂、0.01-0.5% 质量分数的防腐剂混合而成 ;

[0022] 底物 A : 将过氧化氢纯品加入到浓度为 10-100mM 柠檬酸盐缓冲液中, 配制过氧化氢质量分数为 20-50% 的柠檬酸盐混合溶液 ;

[0023] 底物 B : 将四甲基联苯胺加入到浓度为 10-100mM 柠檬酸盐缓冲液中, 配制四甲基联苯胺质量分数为 5-20% 的柠檬酸盐混合溶液 ;

[0024] 终止液 : 将浓硫酸用纯化水进行稀释 ;

[0025] 洗液 : 把质量分数为 0.05-1% 的表面活性剂加到 PH6.0-7.0、浓度为 10-100mM 磷酸盐缓冲液中, 然后混匀。

[0026] 本发明由于所用的检测仪器较为简单, 均为通常所用仪器, 故检测成本较低, 利于推广 ; 并且该试剂盒容易操作, 一般实验室技术人员即可实现 ; 同时试剂盒内采用特异性的 Lp-PLA2 抗体、添加独特蛋白稳定剂的标准品稀释液和样本缓冲液配方, 大大提高了检测结果的可靠性和准确性, 以及试剂盒的稳定性。

附图说明

[0027] 图 1 为实施例 5 标准曲线图。

[0028] 图 2 为实施例 6 标准曲线图。

[0029] 图 3 为实施例 7 标准曲线图。

[0030] 图 4 为实施例 8 标准曲线图。

[0031] 图 5 为实施例 9 标准曲线图。

[0032] 图 6 为实施例 10 标准曲线图。

[0033] 图 7 为实施例 11 标准曲线图。

[0034] 图 8 为实施例 12 标准曲线图。

具体实施方式

[0035] 下面结合附图对本发明作进一步详细说明。

[0036] 实施例 1、抗脂蛋白磷脂酶 A2 鼠单克隆抗体的制备

[0037] 1 杂交瘤细胞

[0038] 1.1 亲本细胞

[0039] 1.1.1 骨髓瘤细胞系

[0040] 融合所用的细胞系为制备杂交瘤常规使用的 Sp2/0 细胞系, Sp2/0 细胞在无菌条件下常规培养在含 15% 胎牛血清的 IMDM 完全培养液中, 放置培养在 37℃、含 5% 二氧化碳培养箱中。

[0041] 1.1.2 免疫脾脏细胞

[0042] 用脂蛋白磷脂酶 A2 纯品蛋白免疫 BALB/C 小鼠, 免疫剂量为 30mg-60mg/ 每只小

鼠,经皮下免疫动物。免疫前眼球取血,分离血清,保存在 -20°C ,作为正常对照小鼠的血清。基础免疫过程中抗原和完全佐剂等量混合,加强免疫中抗原与不完全佐剂混合,抗原与佐剂经充分乳化合格后免疫小鼠。第三次加强免疫后七天,眼球取血,用 ELISA 方法检测,抗血清 OD 值达到 2.0。取阳性小鼠用浓度为 50mg/ml 溶于生理盐水的脂蛋白磷脂酶 A2 蛋白冲击免疫,免疫后 3 天,于无菌条件下取脾脏分离脾细胞,细胞悬浮在无血清 IMDM 完全培养液中以备细胞融合。

[0043] 1.2 细胞融合和杂交瘤的筛选

[0044] 1.2.1 细胞融合

[0045] 取 1.1.2 中末次免疫冲击后,无菌条件下分离的脾细胞与 Sp2/0 细胞以 10:1 的比例混合,用无血清 IMDM 培养液将混合细胞充分洗涤三次,(1000 转 / 分钟,5 分钟)。将脾细胞和 sp2/0 细胞轻微振荡使之混匀后,将 1ml 37°C 预温的 50% PEG 缓慢地加入到细胞混悬液中,边加边轻轻地转动试管,使 PEG 与细胞充分混匀。静置 1 分钟后,再缓慢地加入 37°C 预热的 15ml 无血清培养液,边加边轻轻地转动试管,恢复渗透压。800 转 / 分钟,离心融合细胞 5 分钟。用无血清培养液将融合细胞洗涤两次,再将细胞悬浮在含 15% 胎牛血清、10% 白介素 6、HAT 的 IMDM 完全培养液中。调整细胞浓度,将细胞加入到 96 孔细胞培养板中,细胞数量为 $1 \times 10^5 / 0.1\text{ml}$ / 每孔。同时在其中的一孔中加入 Sp2/0 细胞作为 HAT 筛选时的对照细胞。将细胞培养板放置培养在 37°C 含 5% 二氧化碳培养箱中。

[0046] 1.2.2 杂交瘤细胞的筛选

[0047] 培养的第五天,在无菌条件下,将培养板的培养液换成含有 15% 胎牛血清、10% 白介素 -6 和 HT 的 IMDM 完全培养液,每孔 200ul 进行培养。在融合 7 天时可以见到杂交瘤的生长。待培养孔中的杂交瘤细胞生长到约占 1/3 孔时,在无菌条件下吸取 0.1ml 培养液,用 ELISA 间接法测定杂交瘤分泌免疫球蛋白的情况。我们用 ELISA 间接法 (1ug/ml 包被脂蛋白磷脂酶 A2 抗原,100ul / 孔 4°C 包被过夜;检测抗体采用辣根酶标记的羊抗鼠 IgG 1:1 万稀释) 从分泌免疫球蛋白的杂交瘤中筛选到 40 株对抗原呈阳性反应的细胞株。

[0048] 1.3 杂交瘤细胞的克隆

[0049] 采用有限稀释法分别对这些与脂蛋白磷脂酶 A2 呈阳性反应的杂交瘤细胞株进行了 3 次克隆,选取 ELISA 筛选阳性率达到 100% 的的细胞株且 450nm OD 值大于 2.5。其中 2-D5 和 10-C2 这两株杂交瘤细胞与抗原反应有较高的灵敏度和较好的特异性,而且进一步检测表明他们识别的表位不同,选择这两株抗体进行纯化。

[0050] 2 抗体的制备

[0051] 2.1 抗体上清的收集

[0052] 将上述两个细胞株进行驯化,最后培养于含有 10% 胎牛血清的 IMDM 完全培养基中进行扩增,并检测其灵敏度和特异性。然后进行大量培养,待细胞量达到 90% 的条件下,收集上清。

[0053] 2.2 抗体的分离纯化

[0054] 取收集的细胞上清置于离心管中,于高速低温离心机中,12000rpm 离心 10min,收集上清。然后将上清直接过 Protein A 柱子纯化。先用结合缓冲液平衡 Protein A 层析柱。然后加入混合有结合缓冲液的预处理抗体原液,经结合、洗涤和洗脱收集洗脱样品后,将样品放在 0.02PB, pH7.4 的缓冲液透析过夜,透析液再离心 12000rpm, 20min。取上清即为纯化

抗体,并为可以满足用于制备试剂盒的抗体。

[0055] 2.3 抗体的鉴定

[0056] 用 SDS-PAGE、WESTERN-BLOTTING 和 ELISA 的方法对纯化好的抗体进行鉴定,结果表明抗体保留原有的特异性,纯度大于 95%。

[0057] 2.4 抗体的保存

[0058] 纯化的抗体采用低温保存,把抗体分成小包装,置于 $-20^{\circ}\text{C} \sim -80^{\circ}\text{C}$,保存过程中避免反复冻融。经快速活性鉴定,抗体活性可以保存一年效价不变。

[0059] 实施例 2、本发明试剂盒的操作使用方法如下:

[0060] 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、质控和样本各 20 μl /孔和样本缓冲液 80 μl /孔,放在振荡反应器上室温反应 60min;

[0061] 2. 用洗板机洗板四次,拍干;

[0062] 3. 向微孔板中加入酶结合物 100 μl /孔,放在振荡反应器上室温反应 60min;

[0063] 4. 用洗板机洗板四次,拍干;

[0064] 5. 底物 A、底物 B 等体积混匀后,向微孔板中加入 100 μl /孔, 37°C 反应 30min;

[0065] 6. 向微孔板中加入终止液 100 μl /孔;

[0066] 7. 利用酶标仪在 450nm 处读取各反应孔的 OD 值;

[0067] 8. 将标准品各点的浓度值和对应的 OD 值进行二次曲线回归拟合出标准曲线,再将样本的 OD 值带入标准曲线中,即可得出样本中 Lp-PLA2 的对应浓度值。

[0068] 实施例 3、通过以下方法制备该试剂盒:

[0069] 包被有抗脂蛋白磷脂酶 A2 单克隆抗体的微孔板的制备:将浓度为 6mg/ml 特异性的抗脂蛋白磷脂酶 A2 单克隆抗体用 PH 值为 7.4 的 10mM 磷酸钠缓冲液稀释到浓度为 0.1 $\mu\text{g/ml}$,加入到 96 孔聚苯乙烯微孔板的凹孔中,100 μl /孔, 4°C 包被过夜;移去包被液,然后用洗板机将微孔板洗三次;再向微孔板凹孔中加入含 1% 质量分数牛血清白蛋白的 PH7.4 的 10mM 磷酸钠缓冲液:300 μl /孔,室温封闭 6 小时;甩去凹孔中的封闭液, 37°C 烤干 4 小时,真空袋封装, 4°C 存放;

[0070] 脂蛋白磷脂酶 A2 浓度梯度标准品和质控品的制备:用含有 0.1mM 的乙二胺四乙酸二钠、0.01% 质量分数的 Proclin300、1% 质量分数的牛血清白蛋白、0.05% 质量分数的 Triton X-100、1% 质量分数的抗坏血酸的 10mM 磷酸钠缓冲溶液 (PH6.0) 将脂蛋白磷脂酶 A2 纯品配制成为标示浓度为 0、50、100、250、500、1000ng/ml 的浓度梯度标准品以及 100、400ng/ml 的质控品;然后用冻干机冻干成粉末状, 4°C 保存;

[0071] 辣根过氧化物酶标记的抗脂蛋白磷脂酶 A2 单克隆抗体的制备:

[0072] (1) 先称取 2mg 辣根过氧化物酶溶解于 0.2ml 蒸馏水中,得到浓度为 5mg/ml 的辣根过氧化物酶。

[0073] (2) 于上液中加入 0.2ml 新配的 10mg/ml 的 NaIO_4 溶液,室温下避光搅拌 20 分钟。

[0074] (3) 将步骤 (2) 得到溶液装入透析袋中,对 10mM PH4.4 的磷酸钠缓冲液透析, 4°C 过夜。

[0075] (4) 在步骤 (3) 得到的溶液中等体积加入 0.2M PH9.5 碳酸钠缓冲液,使以上醛化好的辣根过氧化物酶 PH 升高到 9.0 $\sim$ 9.5,然后立即加入 10mg 特异性的抗脂蛋白磷脂酶 A2 抗体,室温避光轻轻搅拌 2 小时。

- [0076] (5) 向反应体系加入 0.2ml 新配的 4mg/ml NaBH_4 溶液, 置 4℃ 混匀 2 小时。
- [0077] (6) 将上述反应体系装入透析袋中, 对 0.15M PH7.4PBS 透析, 4℃ 过夜。
- [0078] (7) 将透析袋中的酶标抗体与甘油等体积混匀, -20℃ 保存备用;
- [0079] (8) 将酶标抗体用含 1% 牛血清白蛋白的 20mM PBS 缓冲液按照 1:2000 的比例进行稀释待用。
- [0080] 样本缓冲液的制备: 向 10mM 磷酸钠缓冲液 (PH6.0) 中分别添加: 0.1mM EDTA 二钠、1% 牛血清白蛋白、0.01% Tween 20 和 0.01% Proclin 300, 充分混匀。
- [0081] 底物 A: 向 10mM 柠檬酸钠缓冲液 (PH4.0) 中添加 20% 质量分数的过氧化氢, 充分混匀;
- [0082] 底物 B: 向 10mM 柠檬酸钠缓冲液 (PH4.0) 中添加 5% 质量分数的四甲基联苯胺, 充分混匀;
- [0083] 终止液: 1M 的硫酸溶液;
- [0084] 洗液: 向 10mM 磷酸钠缓冲液 (PH6.0) 中加入 0.05% 质量分数吐温 20, 充分混匀;
- [0085] 实施例 4、通过以下方法制备该试剂盒:
- [0086] 包被有抗脂蛋白磷脂酶 A2 单克隆抗体的微孔板的制备: 将浓度为 10mg/ml 特异性的抗脂蛋白磷脂酶 A2 单克隆抗体用 PH 值为 7.4 的 200mM 磷酸钠缓冲液稀释到浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$, 加入到 96 孔聚苯乙烯微孔板的凹孔中, 100 μl /孔, 4℃ 包被过夜; 移去包被液, 然后用洗板机将微孔板洗三次; 再向微孔板凹孔中加入含 1% 质量分数的牛血清白蛋白的 PH7.4 的 200mM 磷酸钠缓冲液: 300 μl /孔, 室温封闭 6 小时; 甩去凹孔中的封闭液, 37℃ 烤干 4 小时, 真空袋封装, 4℃ 存放;
- [0087] 脂蛋白磷脂酶 A2 浓度梯度标准品和质控品的制备: 用含有 10mM 的乙二胺四乙酸二钠、0.5% 质量分数的 Proclin300、10% 质量分数的牛血清白蛋白、10% 质量分数的 Triton X-100、10% 质量分数的抗坏血酸的 10mM 磷酸钠缓冲溶液 (PH6.0) 将脂蛋白磷脂酶 A2 纯品配制成标示浓度为 0、50、100、250、500、1000ng/ml 的浓度梯度标准品以及 100、400ng/ml 的质控品; 然后用冻干机冻干成粉末状, 4℃ 保存;
- [0088] 辣根过氧化物酶标记的抗脂蛋白磷脂酶 A2 单克隆抗体的制备:
- [0089] (1) 先称取 2mg 辣根过氧化物酶溶解于 0.2ml 蒸馏水中, 得到浓度为 5mg/ml 的辣根过氧化物酶。
- [0090] (2) 于上液中加入 0.2ml 新配的 10mg/ml 的 NaIO_4 溶液, 室温下避光搅拌 20 分钟。
- [0091] (3) 将步骤 (2) 得到溶液装入透析袋中, 对 10mM PH4.4 的磷酸钠缓冲液透析, 4℃ 过夜。
- [0092] (4) 在步骤 (3) 得到的溶液中等体积加入 0.2M PH9.5 碳酸钠缓冲液, 使以上醛化好的辣根过氧化物酶 PH 升高到 9.0 ~ 9.5, 然后立即加入 10mg 特异性的抗脂蛋白磷脂酶 A2 抗体, 室温避光轻轻搅拌 2 小时。
- [0093] (5) 向反应体系加入 0.2ml 新配的 4mg/ml NaBH_4 溶液, 置 4℃ 混匀 2 小时。
- [0094] (6) 将上述反应体系装入透析袋中, 对 0.15M PH7.4PBS 透析, 4℃ 过夜。
- [0095] (7) 将透析袋中的酶标抗体与甘油等体积混匀, -20℃ 保存备用;
- [0096] (8) 将酶标抗体用含 1% 牛血清白蛋白的 20mM PBS 缓冲液按照 1:2000 的比例进行稀释待用。

[0097] 样本缓冲液的制备：向 100mM 磷酸钠缓冲液 (PH7.0) 中分别添加：3mM EDTA 二钠、10%质量分数的牛血清白蛋白、1%质量分数的 Tween 20 和 0.5%质量分数的 Proclin 300,充分混匀。

[0098] 底物 A：向 100mM 柠檬酸钠缓冲液 (PH4.0) 中添加 50%质量分数的过氧化氢,充分混匀；

[0099] 底物 B：向 100mM 柠檬酸钠缓冲液 (PH4.0) 中添加 20%质量分数的四甲基联苯胺,充分混匀；

[0100] 终止液：1M 的硫酸溶液；

[0101] 洗液：向 100mM 磷酸钠缓冲液 (PH6.0) 中加入 1%质量分数吐温 20,充分混匀；

[0102] 实施例 5、通过以下方法制备该试剂盒：

[0103] 与实施例 3 基本相同,不同的是：

[0104] 脂蛋白磷脂酶 A2 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、0.05%质量分数的 Proclin300、3%质量分数的牛血清白蛋白、0.1%质量分数的 Triton X-100、10mM 的抗坏血酸的 20mM 磷酸钠缓冲溶液 (PH7.4) 将脂蛋白磷脂酶 A2 纯品配制成标示浓度为 0、50、100、250、500、1000ng/ml 的浓度梯度标准品以及 150、300ng/ml 的质控品；然后用冻干机冻干成粉末状,4℃保存；

[0105] 样本缓冲液的制备：向 10mM 柠檬酸钠缓冲液 (PH6.4) 中分别添加：1mM EDTA 二钠、1%牛血清白蛋白、0.1% Tween 20、0.1% BRIJ-35 和 0.05% Proclin 300,充分混匀。

[0106] 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 2 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 15%,说明该试剂盒检测准确率高。

[0107] 表 1 质控品、样本检测结果

[0108]

检测结果	靶值 (范围) ng/ml	OD 值	检测值 (ng/ml)	偏差 (要求小于 15%)
质控 1	80 (64-96)	0.294	82.7	3.37%
质控 2	300 (240-360)	0.995	298.2	-0.61%
样本 1	100	0.357	101.1	1.13%
样本 2	400	1.263	389.4	-2.65%

[0109] 实施例 6、通过以下方法制备该试剂盒：

[0110] 与实施例 3 基本相同,不同的是：

[0111] 脂蛋白磷脂酶 A2 浓度梯度标准品和质控品的制备：用含有 2%山羊血清、0.1%叠氮钠、1%牛 γ 蛋白、0.1% Tween 20、5mM 维生素 E 的 20mM 磷酸钠缓冲溶液 (PH7.4) 将脂蛋白磷脂酶 A2 纯品配制成标示浓度为 0、50、100、250、500、1000ng/ml 的一浓度梯度标准品以及 150、300ng/ml 的质控品；然后用冻干机冻干成粉末状,4℃保存；

[0112] 样本缓冲液的制备：向 20mM 柠檬酸钠缓冲液 (PH4.5) 中分别添加：0.5mM EDTA 四钠、2%牛血清白蛋白、0.05% Triton X-100、0.2% BRIJ-35 和 0.05% Proclin 300,充分混匀。

[0113] 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 2 所述的方法检测本

实施例质控品、样本的结果,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 15%,说明该试剂盒检测准确率高。

[0114] 表 2 质控品、样本检测结果

[0115]

检测结果	靶值 (范围) ng/ml	OD 值	检测值 (ng/ml)	偏差 (要求小于 15%)
质控 1	80 (64-96)	0.349	77.4	-3.25%
质控 2	300 (240-	1.234	298.3	-0.57%

[0116]

	360)			
样本 1	100	0.453	103.8	3.80%
样本 2	400	1.666	418.6	4.65%

[0117] 实施例 7、通过以下方法制备该试剂盒:

[0118] 与实施例 4 基本相同,不同的是:

[0119] 脂蛋白磷脂酶 A2 浓度梯度标准品和质控品的制备:用含有 1% 马血清、0.1% 叠氮钠、3% 牛血清白蛋白、0.1% Tween 80、5mM BHT 的 20mM 磷酸钠缓冲溶液 (PH7.4) 将脂蛋白磷脂酶 A2 纯品配制成标示浓度为 0、50、100、250、500、1000ng/ml 的一浓度梯度标准品以及 150、300ng/ml 的质控品;然后用冻干机冻干成粉末状,4℃ 保存;

[0120] 样本缓冲液的制备:向 15mM 柠檬酸钠缓冲液 (PH5.0) 中分别添加:0.1mM EDTA 二钠、1% 牛 γ 蛋白、0.1% Triton X-100、0.15% BRIJ-35 和 0.1% 叠氮钠,充分混匀。

[0121] 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 2 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 15%,说明该试剂盒检测准确率高。

[0122] 表 3 为质控品、样本检测结果

[0123]

检测结果	靶值 (范围) ng/ml	OD 值	检测值 (ng/ml)	偏差 (要求小于 15%)
质控 1	80 (64-96)	0.587	80.2	0.25%
质控 2	300 (240- 360)	1.926	304.0	1.33%
样本 1	100	0.699	95.2	-4.80%
样本 2	400	2.328	410.3	2.57%

[0124] 实施例 8、通过以下方法制备该试剂盒:

[0125] 与实施例 4 基本相同,不同的是:

[0126] 脂蛋白磷脂酶 A2 浓度梯度标准品和质控品的制备:用含有 1.5% 猪血清、0.1% Proclin 300、1.5% 牛血清白蛋白、0.1% SDS、2mM GSH 的 20mM 磷酸钠缓冲溶液 (PH7.4) 将脂蛋白磷脂酶 A2 纯品配制成标示浓度为 0、50、100、250、500、1000ng/ml 的一浓度梯度标准

品以及 150、300ng/ml 的质控品 ;然后用冻干机冻干成粉末状,4℃保存 ;

[0127] 样本缓冲液的制备 :向 20mM 柠檬酸钠缓冲液 (PH4.8) 中分别添加 :0.2mM EDTA 二钠、3%牛血清白蛋白、0.1% Tween 20、0.15% SDS 和 0.1% Proclin 300,充分混匀。

[0128] 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 2 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 15%,说明该试剂盒检测准确率高。

[0129] 表 4 为质控品、样本检测结果

[0130]

检测结果	靶值 (范围) ng/ml	OD 值	检测值 (ng/ml)	偏差 (要求小于 15%)
质控 1	80 (64-96)	0.512	79.3	-0.88%
质控 2	300 (240- 360)	1.689	284.0	-5.33%
样本 1	100	0.635	97.6	-2.40%
样本 2	400	2.079	390.4	-2.40%

[0131] 实施例 9、通过以下方法制备该试剂盒 :

[0132] 与实施例 4 基本相同,不同的是 :

[0133] 脂蛋白磷脂酶 A2 浓度梯度标准品和质控品的制备 :用含有 1.5% 鼠血清、0.1% 叠氮钠、3%牛血清白蛋白、0.1% Tween 60、10mM 抗坏血酸的 15mM 磷酸钠缓冲溶液 (PH7.2) 将脂蛋白磷脂酶 A2 纯品配制成标示浓度为 0、50、100、250、500、1000ng/ml 的一浓度梯度标准品以及 150、300ng/ml 的质控品 ;然后用冻干机冻干成粉末状,4℃保存 ;

[0134] 样本缓冲液的制备 :向 50mM 柠檬酸钠缓冲液 (PH4.2) 中分别添加 :0.5mM EDTA 二钠、4.5%牛血清白蛋白、0.1% Span-20、0.15% Tween 20 和 0.1% Proclin 300,充分混匀。

[0135] 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 2 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 15%,说明该试剂盒检测准确率高。

[0136] 表 5 为质控品、样本检测结果

[0137]

检测结果	靶值 (范围) ng/ml	OD 值	检测值 (ng/ml)	偏差 (要求小于 15%)
质控 1	80 (64-96)	0.469	78.8	-1.50%
质控 2	300 (240- 360)	1.385	295.5	-1.50%
样本 1	100	0.554	96.6	-3.40%
样本 2	400	1.789	416.6	4.15%

[0138] 实施例 10、通过以下方法制备该试剂盒 :

[0139] 与实施例 3 基本相同,不同的是 :

[0140] 脂蛋白磷脂酶 A2 浓度梯度标准品和质控品的制备 :用含有 2% 山羊血清、0.1% 叠

氮钠、1%牛 γ 蛋白、0.1% Tween 20、5mM BHT 的 20mM/L 磷酸钠缓冲溶液 (PH7.4) 将脂蛋白磷脂酶 A2 纯品配制成标示浓度为 0、50、100、250、500、1000ng/ml 的一浓度梯度标准品以及 150、300ng/ml 的质控品 ;然后用冻干机冻干成粉末状,4℃保存 ;

[0141] 样本缓冲液的制备 :向 20mM/L 柠檬酸钠缓冲液 (PH4.5) 中分别添加 :0.5mM/L EDTA 四钠、2%牛血清白蛋白、0.05% Triton X-100、0.2% BRIJ-35 和 0.05% Proclin 300, 充分混匀。

[0142] 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 2 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 15%,说明该试剂盒检测准确率高。

[0143] 表 6 质控品、样本检测结果。

[0144]

检测结果	靶值 (范围) ng/ml	OD 值	检测值 (ng/ml)	偏差 (要求小于 15%)
质控 1	80 (64-96)	0.349	77.4	-3.25%
质控 2	300 (240- 360)	1.234	298.3	-0.57%
样本 1	100	0.453	103.8	3.80%
样本 2	400	1.666	418.6	4.65%

[0145] 实施例 11、通过以下方法制备该试剂盒 :

[0146] 与实施例 3 基本相同,不同的是 :

[0147] 脂蛋白磷脂酶 A2 浓度梯度标准品和质控品的制备 :用含有 3.5%绵羊血清、0.1% Proclin300、5% 甘油、0.2% NP-4(烷基酚聚氧乙烯 (4) 醚) 的 20mM/L 磷酸钠缓冲溶液 (PH7.4) 将脂蛋白磷脂酶 A2 纯品配制成标示浓度为 0、50、100、250、500、1000ng/ml 的一浓度梯度标准品以及 150、300ng/ml 的质控品 ;然后用冻干机冻干成粉末状,4℃保存 ;

[0148] 样本缓冲液的制备 :向 15mM/L 柠檬酸钠缓冲液 (PH4.2) 中分别添加 :0.02% EDTA 二钠、1%牛 γ 蛋白、0.1% PEG2000(聚乙二醇 2000)、0.1% BRIJ-35 和 0.01% 硫柳汞,充分混匀。

[0149] 如附图 7 所示为本实施例的标准曲线图,表 7 为采用实施例 2 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 7 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 15%,说明该试剂盒检测准确率高。

[0150] 表 7 质控品、样本检测结果

[0151]

检测结果	靶值 (范围) ng/ml	OD 值	检测值 (ng/ml)	偏差 (要求小于 15%)
质控 1	100 (80-120)	0.698	93.6	-6.40%
质控 2	500 (400- 600)	1.095	444.5	-11.10%
样本 1	100	0.728	99.8	-0.20%
样本 2	400	1.445	394.8	-1.30%

[0152] 实施例 12、通过以下方法制备该试剂盒：

[0153] 与实施例 3 基本相同，不同的是：

[0154] 脂蛋白磷脂酶 A2 浓度梯度标准品和质控品的制备：用含有 5% 鸡血清、0.3% 硫柳汞、8% 海藻糖、0.5% PEG4000 (聚乙二醇 4000) 的 20mM/L 磷酸钠缓冲溶液 (PH7.8) 将脂蛋白磷脂酶 A2 纯品配制成标示浓度为 0、50、100、250、500、1000ng/ml 的一浓度梯度标准品以及 100、500ng/ml 的质控品；然后用冻干机冻干成粉末状，4℃ 保存；

[0155] 样本缓冲液的制备：向 35mM/L 柠檬酸钠缓冲液 (PH4.5) 中分别添加：0.05% EDTA 四钠、3% 甘油、0.1% PEG4000 (聚乙二醇 4000)、0.15% BRIJ-35 和 0.01% 硫酸庆大霉素，充分混匀。

[0156] 如附图 8 所示为本实施例的标准曲线图，表 8 为采用实施例 2 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 8 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 15%，说明该试剂盒检测准确率高。

[0157] 表 8 质控品、样本检测结果

[0158]

检测结果	靶值 (范围) ng/ml	OD 值	检测值 (ng/ml)	偏差 (要求小于 15%)
质控 1	100 (80-120)	0.334	90.3	-9.70%
质控 2	500 (400- 600)	1.258	505.7	1.14%
样本 1	100	0.334	90.5	-9.50%
样本 2	400	0.997	341.5	-14.63%

[0159] 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。

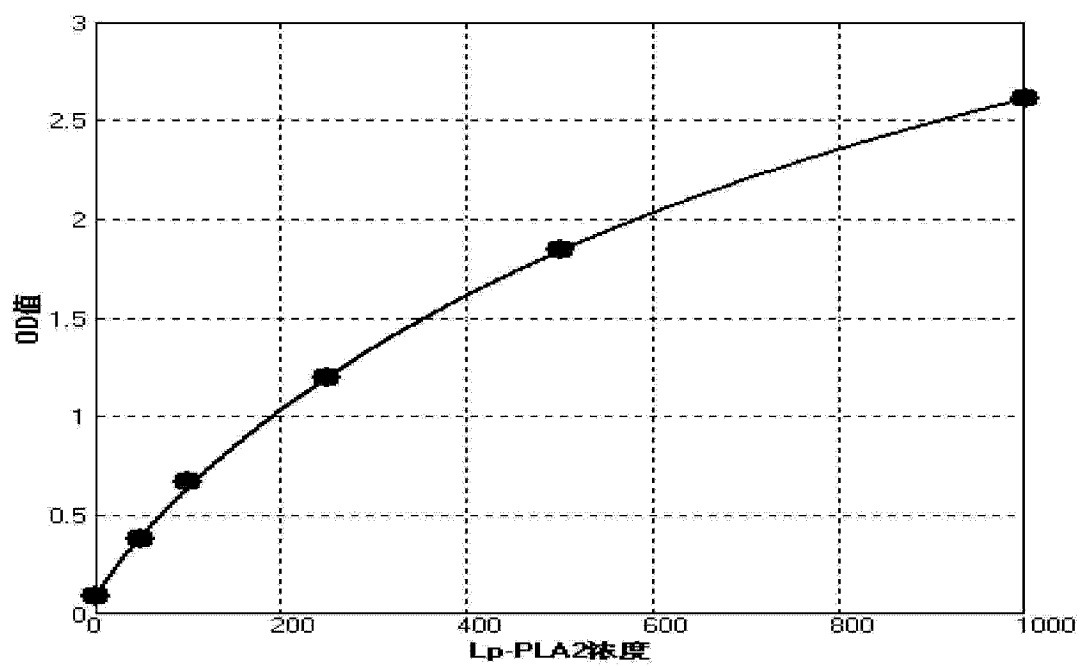


图 1

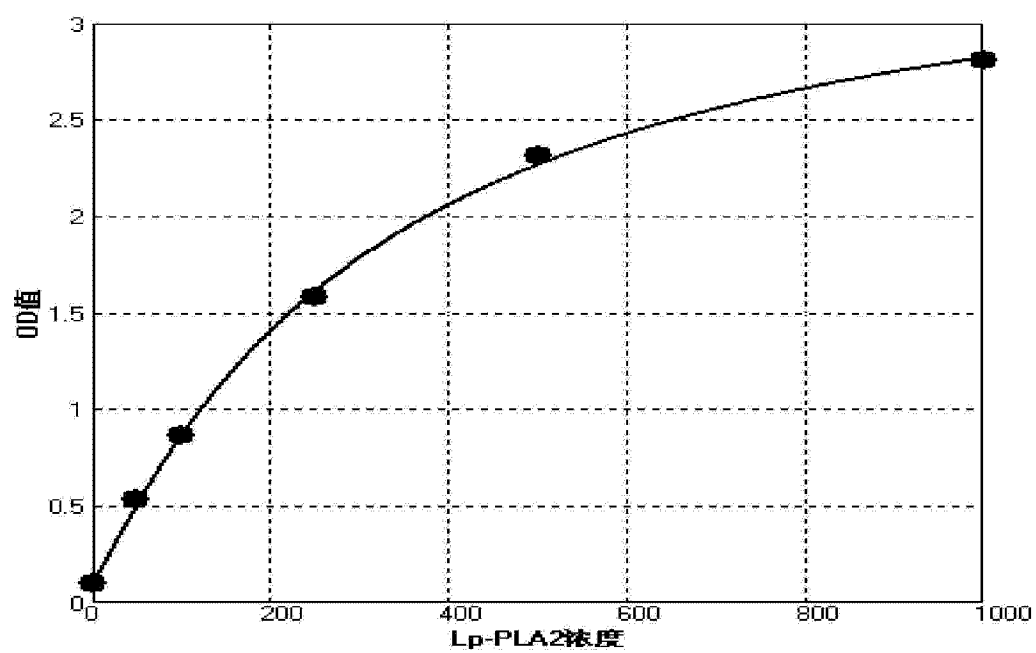


图 2

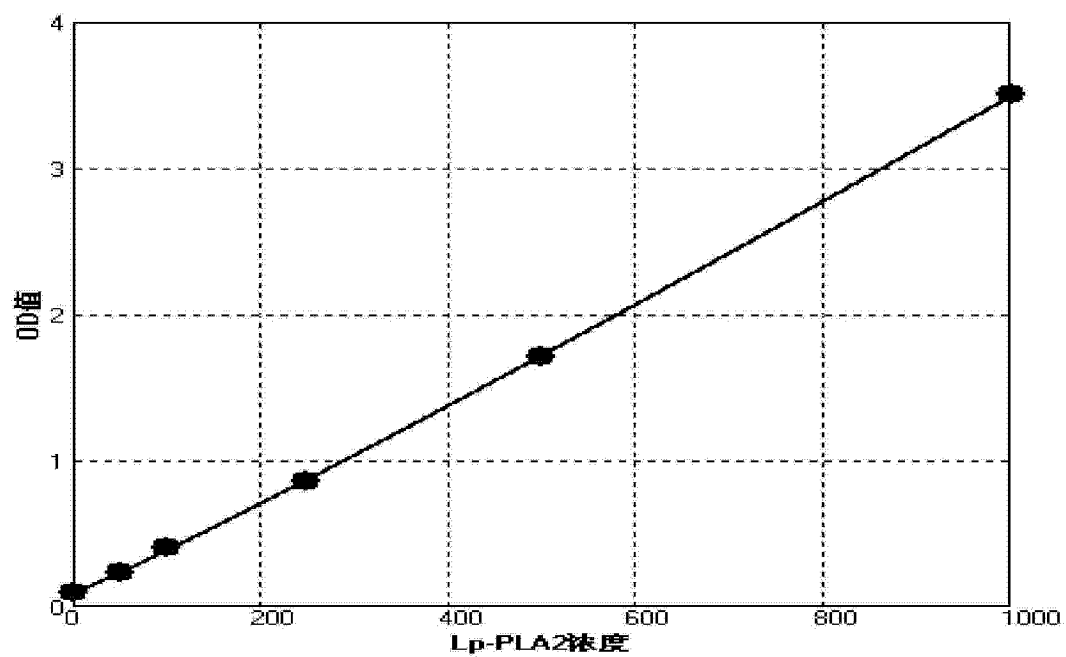


图 3

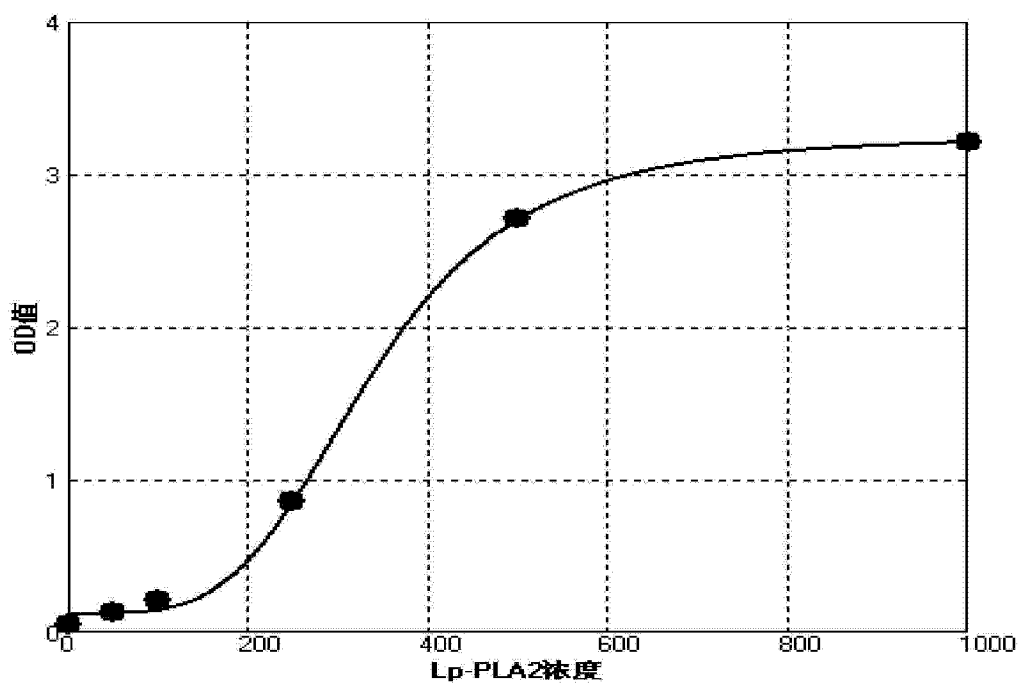


图 4

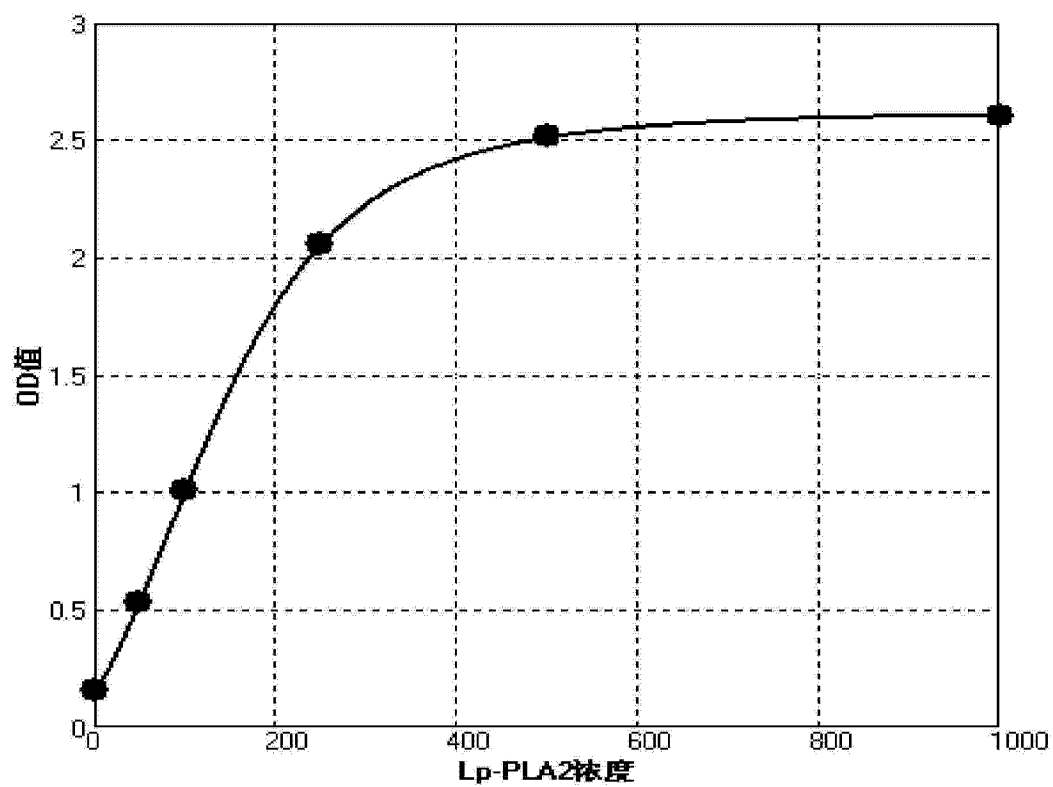


图 5

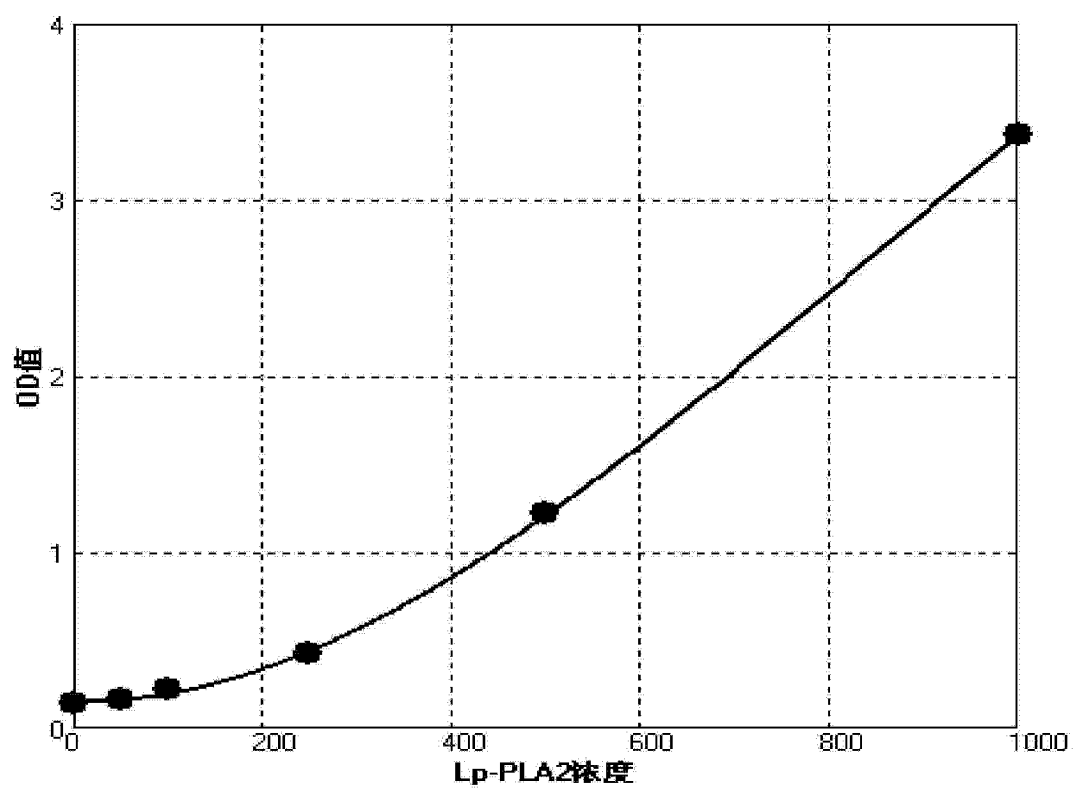


图 6

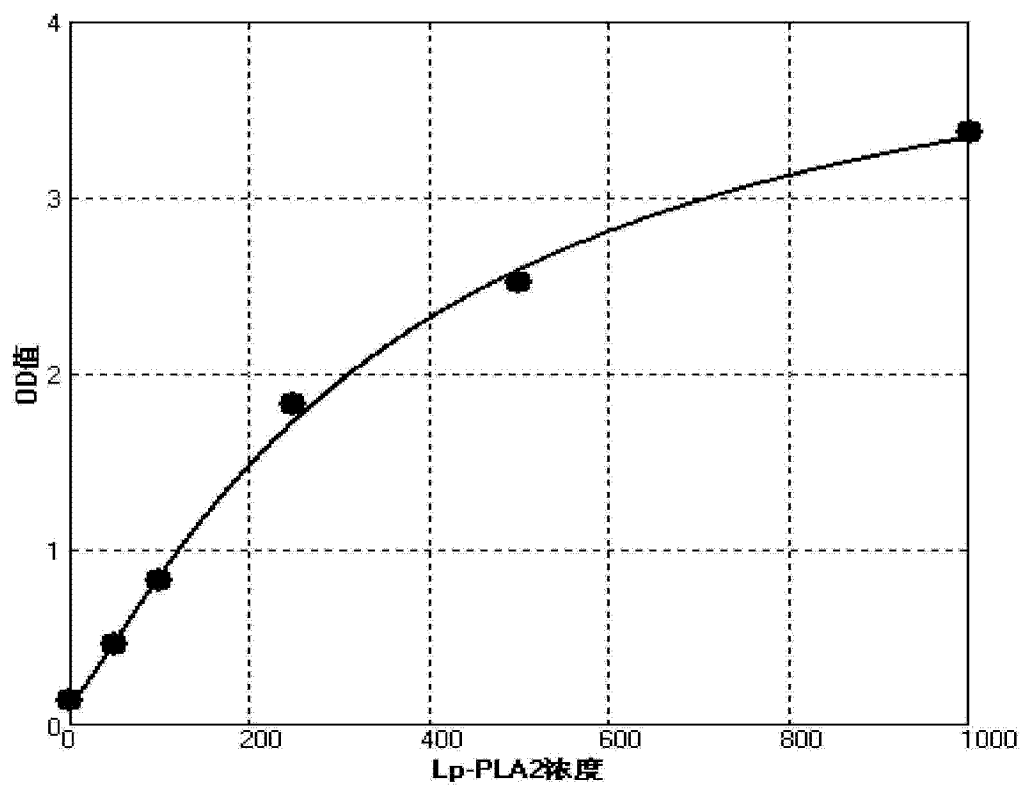


图 7

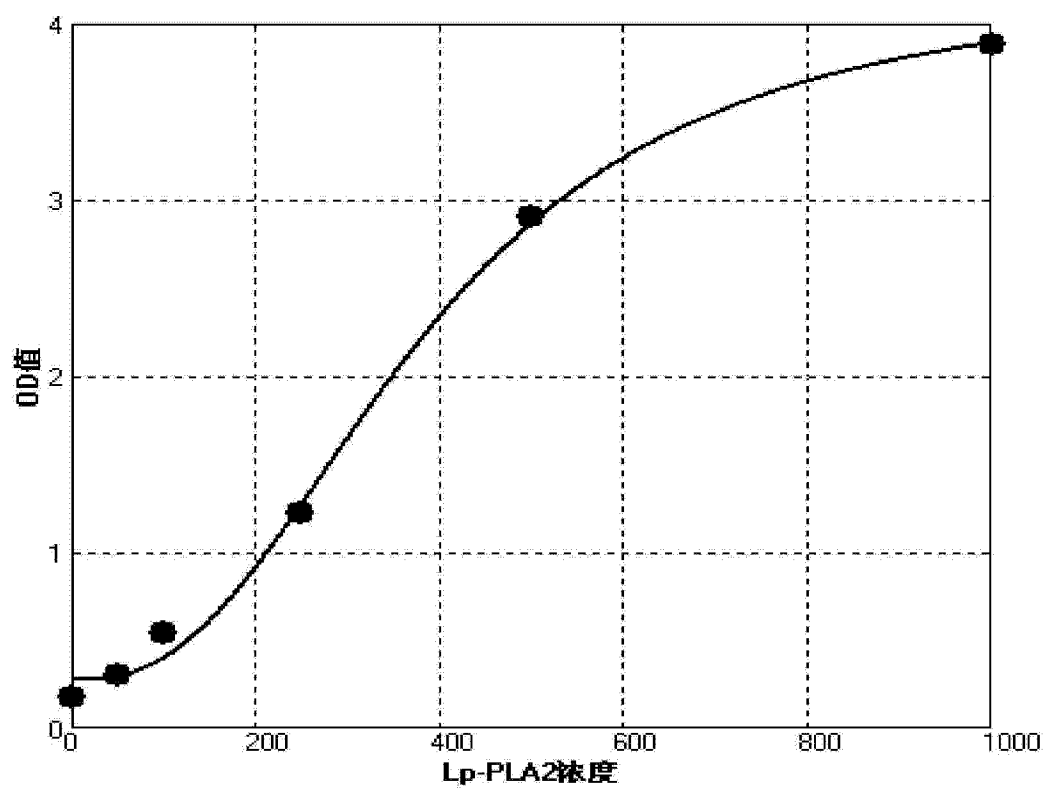


图 8

专利名称(译)	一种检测脂蛋白磷脂酶A2浓度的试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN104849456A	公开(公告)日	2015-08-19
申请号	CN201510251170.1	申请日	2015-05-18
[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	G01N33/573 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/573 G01N33/535 G01N2333/916 G01N2800/323		
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，具体涉及一种检测脂蛋白磷脂酶A2浓度的试剂盒及其制备方法。所述试剂盒包括包被有抗脂蛋白磷脂酶A2特异性抗体的平台载体、脂蛋白磷脂酶A2浓度梯度的标准品、脂蛋白磷脂酶A2质控品、辣根过氧化物酶标记的抗脂蛋白磷脂酶A2抗体、样本缓冲液、底物A、底物B、终止液、洗液。本发明由于所用的检测仪器较为简单，均为实验室通常所用仪器，故检测成本较低，利于推广；并且该试剂盒操作简单，一般的实验室技术人员即可实现；同时试剂盒内采用高特异性、高亲和力的抗脂蛋白磷脂酶A2特异性抗体、添加独特蛋白稳定剂的标准品稀释液和样本缓冲液配方，大大提高了检测结果的可靠性和准确性，以及试剂盒的稳定性。

