



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103698535 B

(45) 授权公告日 2016.05.25

(21) 申请号 201310695303.5

CN 102435741 A, 2012.05.02,

(22) 申请日 2013.12.17

CN 1595161 A, 2005.03.16,

(73) 专利权人 南京健安医疗科技有限公司

CN 1719256 A, 2006.01.11,

地址 210000 江苏省南京市浦口高新区新锦湖路3号-1中丹楼A座18层

CN 102121938 A, 2011.07.13,

CN 102692507 A, 2012.09.26,

CN 102901820 A, 2013.01.30,

CN 103389381 A, 2013.11.13,

(72) 发明人 陆上苏

(74) 专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限公司 32224

审查员 舒霏霏

代理人 董建林

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/537(2006.01)

(56) 对比文件

CN 102435741 A, 2012.05.02,

CN 102435738 A, 2012.05.02,

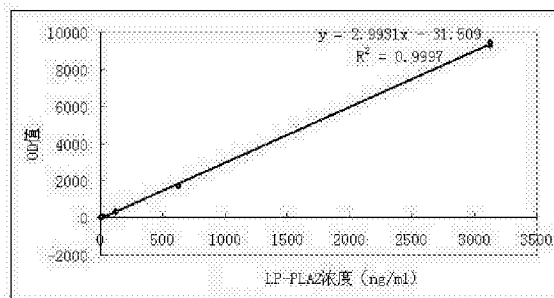
权利要求书1页 说明书11页 附图1页

(54) 发明名称

脂蛋白相关磷脂酶 A2 定量检测试剂盒及制备、操作方法

(57) 摘要

本发明涉及一种体外诊断试剂制备领域,属于生物技术领域,具体涉及一种脂蛋白相关磷脂酶 A2 定量检测试剂盒及制备、操作方法,包含磁分离试剂、酶反应物、底物溶液、稀释液、缓冲液、校准品、质控品和清洗液,所述磁分离试剂为含有标记有抗 Lp-PLA2 单克隆抗体的磁性微球,所述酶反应物为含有碱性磷酸酶标记的抗 Lp-PLA2 单克隆抗体,所述底物溶液为酶促化学发光底物溶液,所述校准品及质控品为含有 Lp-PLA2 抗原的 BSA 蛋白溶液。本发明还包括其制备和操作方法。本发明的有益之处在于:具有更高的检测灵敏度和特异性,并达到了较佳的性能参数;与普通酶联免疫技术相比,缩短了临床检测时间;与化学发光法相比,降低了临床开展本检测的成本。



1. 一种人外周血Lp-PLA2定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤一,磁分离试剂的制备:

(1)制备MES溶液:称取MES、Tris和NaCl,用纯化水溶解,调pH值至4.5-5之间,定容,过滤;

(2)取表面含羧基活性基团的磁微粒,用戊二醛活化,25℃混匀2-4小时,用MES溶液洗涤,磁微粒用MES溶液重悬,加入Lp-PLA2抗体,37℃混匀2-4小时,加入缓冲液于37℃封闭1小时,然后用缓冲液洗涤磁珠,并用缓冲液制成磁分离试剂溶液;

步骤二,酶反应物的制备:

(1)将抗Lp-PLA2抗体溶于PBS溶液中,加入活化剂,20℃放置30-60分钟后加入甘氨酸终止反应,20℃静置3-5分钟,通过层析柱除去活化剂,收集蛋白峰,在活化后的抗体溶液中加入DTT和PBS溶液,混匀后室温放置30-60分钟,通过层析柱除去游离的DTT,收集蛋白峰;

(2)将碱性磷酸酶ALP溶于EDTA和Tris-HCl溶液中,加入Traunt试剂,室温放置40-60分钟,通过层析柱除去活化剂,收集蛋白峰;

(3)将(1)和(2)的溶液按照抗体与碱性磷酸酶分子摩尔比1:1混合,室温放置3-5小时,然后用层析柱分离纯化,收集第一和第二峰,除去未连接的游离抗体和碱性磷酸酶,将产物LP-PLA2-ALP连接物保存在4℃;

将LP-PLA2-ALP连接物用酶反应物稀释液稀释,过滤后4℃保存;

步骤三,底物溶液的制备:

称取Tris、NaCl、Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>和Proclin-300,用纯化水溶解,pH值调整到7.8-8.2之间,加入发光底物后,过滤收集滤液,用纯化水定容,混匀后即得;

步骤四,稀释液的制备:

称取NaCl和BSA,量取Proclin-300加纯化水溶解,混合定容,pH值调制7.2-7.6之间,完全溶解后,过滤,贴好标签于4℃冷库贮存;

步骤五,缓冲液的制备:

取Tris和NaCl,量取Proclin-300用纯化水溶解,混合待完全溶解,调整pH到7.2-7.6之间,称取阻断剂溶于上述溶液中,定容,待完全溶解后,过滤即得;

步骤六,校准品和质控品的制备:

将高纯度Lp-PLA2抗原称重后用稀释液溶解分装制成Lp-PLA2的校准品与质控品,校准品浓度分别为在1ng/mL—1600ng/mL之间按浓度差取6个值;

步骤七,清洗液的制备:

称取Tris和NaCl,称取吐温20加纯化水,完全溶解后与Tris和NaCl混合,量取Proclin-300加纯化水完全溶解后倒入上述混合液中,用纯化水定容,pH调在7.2-7.6之间,过滤即得。

2. 根据权利要求1所述的一种人外周血Lp-PLA2定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤二中所述的酶反应物稀释液配制方法为:Tris、NaCl、叠氮钠,用纯化水溶解,调整pH值至7.5,加入吐温20、BSA,定容,过滤,于4℃保存。

## 脂蛋白相关磷脂酶A2定量检测试剂盒及制备、操作方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种体外诊断试剂制备领域,属于生物技术领域,具体涉及一种测定血清中人脂蛋白磷脂酶A2(Lp-PLA2)含量的试剂盒及制备、操作方法。

### 背景技术

[0002] 脂蛋白磷脂酶A2(lipoprotein-associated phospholipase A2,Lp-PLA2),属于磷脂酶超家族,含有441个氨基酸残基,相对分子质量约为45400。Lp-PLA2主要由炎症细胞(如巨噬细胞、淋巴细胞等)分泌,并受炎性介质的调节,目前研究表明Lp-PLA2作用主要是产生二十烷酸类炎性介质,促进血小板聚集、中性粒细胞和单核细胞趋化以及促进白三烯等炎症介质释放,从而促进血栓形成、炎症反应以及促进动脉粥样硬化,被视为一种新的炎症反应标志物,是反映血管炎症的特异性标记物,在促进动脉粥样硬化以及冠心病和卒中的形成等方面发挥重要作用。外周血中Lp-PLA2浓度增加被视为患心脑血管堵塞疾病(如冠心病、中风)的独立危险因子。

[0003] 临床检测人外周血Lp-PLA2浓度能给临床医生提供预防和治疗心脑血管事件的新靶点,为临床疾病的早期干预、临床应用治疗提供新思路新方向。

[0004] 目前用于检测Lp-PLA2的试剂和方法主要是化学发光免疫分析法(CLIA)、酶联免疫吸附法(ELISA)和胶乳增强比浊法。产品存在操作繁琐,数据重复性差以及精确度不足等缺点。

[0005] 化学发光免疫分析法(CLIA)是利用化学发光物质经催化剂催化和氧化剂氧化,形成一个激发态的中间体,这种激发态的中间体回到稳定基态时,发出光子,利用发光信号测量仪测量光子数,从而间接测定Lp-PLA2的浓度。目前市场上有管式和板式两种试剂盒,但此法存在吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺直接标记抗体的发光效率低,标记物不稳定,这种直接标记法属于瞬间发光型,很难保证测试结果的稳定性和重复性,而且需要特殊的检测仪器,不便于常规实验室开展。

[0006] 普通酶联免疫法(ELISA)自动化程度不高,且受人为因素影响较大,重复性差,整个反应测定时间也很长(至少需要40分钟)。胶乳增强比浊法是一种灵敏、简洁、快速的检测方法,但在脂血的抗干扰方面效果不佳,而心血管病人有很大一部分都存在血脂浓度高的情况,检测中容易出现假阳性结果,而且抗凝剂的使用对该方法的影响也比较大。因此迫切需要一种高灵敏度、高特异性,同时方法简便、快速,不容易受其他因素干扰的方法。

[0007] 在20世纪90年代开始推广的磁微粒分离酶联免疫检测技术是一种结合免疫磁微粒分离技术与酶联免疫检测技术建立的新型酶联免疫检测方法。与传统ELISA方法中抗原、抗体的结合反应是在固相表面进行的不一样的是,磁微粒分离酶联免疫检测方法,抗原、抗体的结合反应在近似液相下进行,克服了普通微孔板酶联免疫分析(ELISA)分析精密度差、灵敏度差的缺点,反应快速、彻底,具有灵敏度高,特异性高,操作简便,检测用时少和不易受脂血等外界因素干扰的优点。

## 发明内容

[0008] 为解决现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种脂蛋白相关磷脂酶A2定量检测试剂盒及制备、操作方法,采用该试剂盒进行Lp-PLA2检测具有较高的灵敏度、特异性、操作简便和更短检测时间的优点。

[0009] 为了实现上述目标,本发明采用如下的技术方案:

[0010] 一种人外周血Lp-PLA2定量检测试剂盒,包含磁分离试剂、酶反应物、底物溶液、稀释液、缓冲液、校准品、质控品和清洗液,所述磁分离试剂为含有标记有抗Lp-PLA2单克隆抗体的磁性微球,所述酶反应物为含有碱性磷酸酶标记的抗Lp-PLA2单克隆抗体,所述底物溶液为酶促化学发光底物溶液,所述校准品及质控品为含有Lp-PLA2抗原的BSA蛋白溶液。

[0011] 前述的一种人外周血Lp-PLA2定量检测试剂盒,所述稀释液为含有BSA的溶液。

[0012] 前述的一种人外周血Lp-PLA2定量检测试剂盒,所述缓冲液为含有Tris的溶液。

[0013] 前述的一种人外周血Lp-PLA2定量检测试剂盒,所述清洗液为含有TWEEN-20和Proclin-300的缓冲液。

[0014] 前述的一种人外周血Lp-PLA2定量检测试剂盒,所述的Lp-PLA2试剂盒检测浓度为0.1—1600ng/mL。

[0015] 一种人外周血Lp-PLA2定量检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0016] 步骤一,磁分离试剂的制备

[0017] (1)制备MES溶液;

[0018] (2)取表面含羧基活性基团的磁微粒,加入活化剂,25°C混匀2—4小时,用MES溶液洗涤后用MES溶液重悬,加入Lp-PLA2抗体,37°C混匀2—4小时,加入缓冲液于37°C封闭1小时,然后用缓冲液洗涤磁珠,并用缓冲液制成磁分离试剂溶液;

[0019] 步骤二,酶反应物的制备

[0020] (1)将抗Lp-PLA2抗体溶于PBS溶液中,加入活化剂,20°C放置30—60分钟后加入甘氨酸终止反应,20°C静置3—5分钟,通过层析柱除去活化剂,收集蛋白峰,在活化后的抗体溶液中加入DTT和PBS溶液,混匀后室温放置30—60分钟,通过层析柱除去游离的DTT,收集蛋白峰;

[0021] (2)将碱性磷酸酶ALP溶于EDTA和Tris-HCl溶液中,加入Traunt试剂,室温放置40—60分钟,通过层析柱除去活化剂,收集蛋白峰;

[0022] (3)将(1)和(2)的溶液按照抗体与碱性磷酸酶分子摩尔比1:1混合,室温放置3—5小时,然后用层析柱分离纯化,收集第一和第二峰,除去未连接的游离抗体和碱性磷酸酶,将产物保存在4°C;

[0023] 步骤三,底物溶液的制备

[0024] 称取Tris、NaCl、Na2SO3和Proclin-300,用纯化水溶解,pH值调整到7.8—8.2之间,加入发光底物后,过滤收集滤液,用纯化水定容,混匀后即得;

[0025] 步骤四,稀释液的制备

[0026] 称取NaCl和BSA,量取Proclin-300加纯化水溶解,混合定容,pH值调制7.2—7.6之间,完全溶解后,过滤,贴好标签于4°C冷库贮存;

[0027] 步骤五,缓冲液的制备

[0028] 取Tris和NaCl,量取Proclin-300用纯化水溶解,混合待完全溶解,调整pH到7.2—7.6之间,称取阻断剂溶于上述溶液中定容,待完全溶解后,过滤即得;

[0029] 步骤六,校准品和质控品的制备

[0030] 将高纯度Lp-PLA2抗原称重后用稀释液溶解分装制成Lp-PLA2的校准品与质控品,校准品浓度分别为在1ng/mL——1600ng/mL之间按浓度差取6个值;

[0031] 步骤七,清洗液的制备

[0032] 称取Tris和NaCl,称取吐温20加纯化水,完全溶解后与Tris和NaCl混合,量取Proclin-300加纯化水完全溶解后倒入上述混合液中,用纯化水定容,PH调在7.2—7.6之间,过滤即得。

[0033] 前述的一种人外周血Lp-PLA2定量检测试剂盒的制备方法,步骤二中所述的酶反应物稀释液配制方法为:Tris、NaCl、叠氮钠,用纯化水溶解,调整pH值至7.5,加入吐温20、BSA,定容,过滤,于4℃保存。

[0034] 一种人外周血Lp-PLA2定量检测试剂盒的操作方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0035] 步骤一,加样与免疫反应

[0036] 在试管中加入Lp-PLA2待测样本、校准品和质控品,然后依次加入酶反应物、磁分离试剂和缓冲液,用多管混匀器轻轻振荡1分钟后,37℃水浴30分钟;

[0037] 步骤二,洗涤

[0038] 反应试管放置在磁分离器上,使磁微粒在磁场中沉降2分钟,缓缓倒转分离器,倒去上清液,并除去黏在管壁上的液滴;

[0039] 步骤三,每支试管加入清洗液,震荡30秒使磁微粒充分混悬,再次使磁微粒在磁场中沉降,去除上清液;

[0040] 步骤四,重复步骤二与步骤三2次;

[0041] 步骤五,加底物溶液

[0042] 每管加入底物溶液。37℃混匀后1分钟内检测;

[0043] 步骤六,读值

[0044] 在分光光度计或发光强度检测仪上读取吸光度或发光强度值。

[0045] 本发明工作原理:磁分离酶联免疫技术采用磁粒为包被固相,37℃孵育后,磁粒在液相中与免疫复合物反应,磁性微粒上结合的Lp-PLA2抗体与酶标抗体分别与Lp-PLA2抗原的不同表位结合,反应形成双抗夹心复合物。在外加磁场中直接沉淀,倒去上清液后清洗沉淀的复合物,然后加入酶促化学发光底物。底物在酶作用下被催化裂解发出光子,形成发光反应,使用发光仪检测反应的发光强度,根据标准曲线即可算出样品中的Lp-PLA2含量。在试剂盒检测范围内,发光强度与样本中的Lp-PLA2浓度成正比。

[0046] 本发明的有益之处在于:本发明Lp-PLA2定量测定试剂盒运用磁微粒分离酶联免疫技术,提供了一种接近均相的反应体系,与现有化学发光法以及普通酶联免疫法相比,本发明试剂盒具有更高的检测灵敏度和特异性,并达到了较佳的性能参数。与普通酶联免疫技术相比,运用本试剂盒可以在1小时内完成所有检测过程,缩短了临床检测时间。与化学发光法相比,本试剂盒不需要特殊的全自动化学发光仪器,可以在普通分光光度计或发光检测仪上开展,极大的降低了临床开展本检测的成本。

## 附图说明

[0047] 图1是本发明的Lp-PLA2校准曲线。

## 具体实施方式

[0048] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明。

[0049] Lp-PLA2定量检测试剂盒的制备实施例一：

[0050] 一磁分离试剂(含有标记有抗Lp-PLA2单克隆抗体的磁性微球)的制备

[0051] (1)0.1mol/L的pH4.5的MES溶液(2-(N-吗啉代)乙磺酸)制备：

[0052] 称取MES19.52g, Tris1.56g, NaCl4.24g于1L烧杯中, 量取950mL纯化水溶解, 调节pH至4.5; 加纯化水定容到1L, 采用孔径0.2 $\mu$ m滤膜过滤除菌, 4 $^{\circ}$ C保存。

[0053] (2)取磁微粒(表面含“羧基COOH-”活性基团)100mg用戊二醛活化, 25 $^{\circ}$ C混匀2小时, 用0.1mol/L MES, pH4.5溶液10mL洗涤3次, 磁微粒用该溶液1mL重悬; 加入2mg Lp-PLA2抗体, 37 $^{\circ}$ C混合均匀2小时; 之后加入等体积0.01mol/L PBS5%BSA(pH7.4)缓冲液于37 $^{\circ}$ 封闭1小时; 最后用10mL含0.5%BSA溶液的0.01mol/LPBS(pH7.4)缓冲液洗涤磁珠3次, 并用该溶液制成磁分离试剂溶液。

[0054] 二酶反应物(含有碱性磷酸酶标记的抗Lp-PLA2单克隆抗体)的制备

[0055] (1)将2.5mg抗Lp-PLA2抗体溶于0.01mol/L PBS PH7.4溶液中; 加入0.1mol/mL活化剂2-liminothiolane  $\cdot$  HCl(2IT)溶液20 $\mu$ L, 20 $^{\circ}$ C放置30分钟后加入甘氨酸终止反应; 20 $^{\circ}$ C静置3分钟; 通过SephadexG25柱子除去活化剂, 收集蛋白峰; 每毫升活化的抗体溶液中加入0.5mL0.05mol/mL DTT(二硫苏糖醇)0.01mol/L PBS PH7.4溶液, 混匀后, 室温放置30分钟; 通过SephadexG25柱子除去游离的二硫苏糖醇, 收集蛋白峰。

[0056] (2)将碱性磷酸酶ALP溶于2mmol/L EDTA20mmol/L Tris-HCLPH8.0溶液中, 溶度5mg/mL, 加入0.10mg/mL Traunt试剂(巯基活化试剂)室温放置40分钟, 通过SephadexG25柱子除去活化剂, 收集蛋白峰;

[0057] (3)将(1)和(2)溶液按照抗体与碱性磷酸酶分子摩尔比1:1混合, 室温放置3小时, 然后用Superdex200凝胶层析柱分离纯化, 收集第一和第二峰, 除去未连接的游离抗体和碱性磷酸酶, 将产物保存在4 $^{\circ}$ C。

[0058] 将上述Lp-PLA2-ALP连接物用酶反应物稀释液稀释到1-5ug/mL, 使用0.2 $\mu$ m过滤器过滤后4 $^{\circ}$ C保存。

[0059] 酶反应物稀释液配置方法: Tris12.5g, 氯化钠8.5g, 叠氮钠1g, 加纯化水至600mL, 调整pH值至7.5。加吐温201mL, BSA10g, 加纯化水定容至1L。用0.2 $\mu$ m过滤器过滤, 于4 $^{\circ}$ C保存。

[0060] 三底物溶液(酶促化学发光底物溶液)的制备

[0061] 称取Tris2.4g、NaCl6.4g、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>0.002g和Proclin-3000.2mL于1000mL烧杯中; 量筒量取700mL纯化水于烧杯中, 充分搅拌, 直至完全溶解, pH值调整到7.8; 加入250mL发光底物鲁米诺(Luminol-Phos)后, 用0.2 $\mu$ m滤器过滤收集滤液, 用纯化水定容至1L, 混匀后即得。

[0062] 四稀释液的制备

[0063] 称取NaCl9.0g和BSA60g于1L的烧杯中; 用移液器将Proclin-300量取0.5mL加10mL

纯化水溶解,倒入上述烧杯中;最后定容1L,pH值调至7.2;待完全溶解后,用0.2 $\mu$ m滤器过滤,贴好标签于4 $^{\circ}$ C冷库贮存(有效期1年)。

#### [0064] 五缓冲液的制备

[0065] 取Tris1.56g和NaCl4.24g于1L烧杯中,取0.2mL Proclin-300于10mL纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入上述1L烧杯中;取800mL纯化水于上述1L容器中,充分搅拌直至完全溶解,调整pH到7.2;称取阻断剂(优选Mak33)0.9g溶于上述溶液中;最后定容至1L,完全溶解后,用0.2 $\mu$ m滤器过滤即得。

#### [0066] 六校准品与质控品的制备

[0067] 将高纯度Lp-PLA2抗原称重后用稀释液溶解分装制成Lp-PLA2的校准品与质控品。校准品浓度分别为1.5ng/mL,6ng/mL,24ng/mL,96ng/mL,384ng/mL,1536ng/mL,质控品浓度分别为6ng/mL,384ng/mL。

#### [0068] 七清洗液的制备

[0069] 称取Tris12.5g和NaCl325.5g于1000mL烧杯中;称取5g吐温20于100mL容器中加20mL水使其完全溶解后,倒入烧杯中;用移液器将Proclin-300量取0.2mL于盛有10mL纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入烧杯中;用量筒量取800mL纯化水于烧杯中,充分搅拌,直至完全溶解,溶液PH调至7.2;最后用纯化水定容1000mL,完全溶解后用0.2 $\mu$ m孔径的过滤器过滤即得。

#### [0070] Lp-PLA2定量检测试剂盒的制备实施例二:

##### [0071] 一磁分离试剂(含有标记有抗Lp-PLA2单克隆抗体的磁性微球)的制备

##### [0072] (1)0.1mol/L的pH4.5的MES溶液(2-(N-吗啉代)乙磺酸)制备:

[0073] 称取MES19.52g,Tris1.56g,NaCl4.24g于1L烧杯中,量取950mL纯化水溶解,调节pH至4.5;加纯化水定容到1L,采用孔径0.2 $\mu$ m滤膜过滤除菌,4 $^{\circ}$ C保存。

[0074] (2)取磁微粒(表面含“羧基COOH-”活性基团)100mg用戊二醛活化,25 $^{\circ}$ C混匀3小时,用0.1mol/L MES,pH4.5溶液10mL洗涤3次,磁微粒用该溶液1mL重悬;加入2mg Lp-PLA2抗体,37 $^{\circ}$ C混合均匀3小时;之后加入等体积0.01mol/L PBS5%BSA(pH7.4)缓冲液于37 $^{\circ}$ 封闭1小时;最后用10mL含0.5%BSA溶液的0.01mol/LPBS(pH7.4)缓冲液洗涤磁珠3次,并用该溶液制成磁分离试剂溶液。

##### [0075] 二酶反应物(含有碱性磷酸酶标记的抗Lp-PLA2单克隆抗体)的制备

[0076] (1)将2.5mg抗Lp-PLA2抗体溶于0.01mol/L PBS PH7.4溶液中;加入0.1mol/mL活化剂2-lminothiolane·HCl(2IT)溶液20 $\mu$ L,20 $^{\circ}$ C放置45分钟后加入甘氨酸终止反应;20 $^{\circ}$ C静置4分钟;通过SephadexG25柱子除去活化剂,收集蛋白峰;每毫升活化的抗体溶液中加入0.5mL0.05mol/mL DTT(二硫苏糖醇)0.01mol/L PBS PH7.4溶液,混匀后,室温放置45分钟;通过SephadexG25柱子除去游离的二硫苏糖醇,收集蛋白峰。

[0077] (2)将碱性磷酸酶ALP溶于2mmol/L EDTA20mmol/L Tris-HCLPH8.0溶液中,溶度5mg/mL,加入0.10mg/mL Traunt试剂(巯基活化试剂)室温放置50分钟,通过SephadexG25柱子除去活化剂,收集蛋白峰;

[0078] (3)将(1)和(2)溶液按照抗体与碱性磷酸酶分子摩尔比1:1混合,室温放置4小时,然后用Superdex200凝胶层析柱分离纯化,收集第一和第二峰,除去未连接的游离抗体和碱性磷酸酶,将产物保存在4 $^{\circ}$ C。

[0079] 将上述Lp-PLA2-ALP连接物用酶反应物稀释液稀释到1-5ug/mL,使用0.2μm过滤器过滤后4℃保存。

[0080] 酶反应物稀释液配置方法:Tris12.5g,氯化钠8.5g,叠氮钠1g,加纯化水至600mL,调整pH值至7.5。加吐温201mL,BSA10g,加纯化水定容至1L。用0.2μm过滤器过滤,于4℃保存。

[0081] 三底物溶液(酶促化学发光底物溶液)的制备

[0082] 称取Tris2.4g、NaCl6.4g、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>0.002g和Proclin-3000.2mL于1000mL烧杯中;量筒量取700mL纯化水于烧杯中,充分搅拌,直至完全溶解,pH值调整到8.0;加入250mL发光底物鲁米诺(Luminol-Phos)后,用0.2μm过滤器过滤收集滤液,用纯化水定容至1L,混匀后即得。

[0083] 四稀释液的制备

[0084] 称取NaCl9.0g和BSA60g于1L的烧杯中;用移液器将Proclin-300量取0.5mL加10mL纯化水溶解,倒入上述烧杯中;最后定容1L,pH值调至7.4;待完全溶解后,用0.2μm过滤器过滤,贴好标签于4℃冷库贮存(有效期1年)。

[0085] 五缓冲液的制备

[0086] 取Tris1.56g和NaCl4.24g于1L烧杯中,取0.2mL Proclin-300于10mL纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入上述1L烧杯中;取800mL纯化水于上述1L容器中,充分搅拌直至完全溶解,调整pH到7.4;称取阻断剂(优选Mak33)0.9g溶于上述溶液中;最后定容至1L,完全溶解后,用0.2μm过滤器过滤即得。

[0087] 六校准品与质控品的制备

[0088] 将高纯度Lp-PLA2抗原称重后用稀释液溶解分装制成Lp-PLA2的校准品与质控品。校准品浓度分别为1ng/mL,5ng/mL,25ng/mL,125ng/mL,625ng/mL,1250ng/mL,质控品浓度分别为5ng/mL,525ng/mL。

[0089] 七清洗液的制备

[0090] 称取Tris12.5g和NaCl325.5g于1000mL烧杯中;称取5g吐温20于100mL容器中加20mL水使其完全溶解后,倒入烧杯中;用移液器将Proclin-300量取0.2mL于盛有10mL纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入烧杯中;用量筒量取800mL纯化水于烧杯中,充分搅拌,直至完全溶解,溶液PH调至7.4;最后用纯化水定容1000mL,完全溶解后用0.2μm孔径的过滤器过滤即得。

[0091] Lp-PLA2定量检测试剂盒的制备实施例三:

[0092] 一磁分离试剂(含有标记有抗Lp-PLA2单克隆抗体的磁性微球)的制备

[0093] (1)0.1mol/L的pH4.5的MES溶液(2-(N-吗啉代)乙磺酸)制备:

[0094] 称取MES19.52g,Tris1.56g,NaCl4.24g于1L烧杯中,量取950mL纯化水溶解,调节pH至4.5;加纯化水定容到1L,采用孔径0.2μm滤膜过滤除菌,4℃保存。

[0095] (2)取磁微粒(表面含“羧基COOH-”活性基团)100mg用戊二醛活化,25℃混匀4小时,用0.1mol/L MES,pH4.5溶液10mL洗涤3次,磁微粒用该溶液1mL重悬;加入2mg Lp-PLA2抗体,37℃混合均匀4小时;之后加入等体积0.01mol/L PBS5%BSA(pH7.4)缓冲液于37°封闭1小时;最后用10mL含0.5%BSA溶液的0.01mol/LPBS(pH7.4)缓冲液洗涤磁珠3次,并用该溶液制成磁分离试剂溶液。

[0096] 二酶反应物(含有碱性磷酸酶标记的抗Lp-PLA2单克隆抗体)的制备

[0097] (1)将2.5mg抗Lp-PLA2抗体溶于0.01mol/L PBS PH7.4溶液中;加入0.1mol/mL活化剂2-lminothiolane·HCl(2IT)溶液20 $\mu$ L,20 $^{\circ}$ C放置60分钟后加入甘氨酸终止反应;20 $^{\circ}$ C静置5分钟;通过SephadexG25柱子除去活化剂,收集蛋白峰;每毫升活化的抗体溶液中加入0.5mL0.05mol/mL DTT(二硫苏糖醇)0.01mol/L PBS PH7.4溶液,混匀后,室温放置60分钟;通过SephadexG25柱子除去游离的二硫苏糖醇,收集蛋白峰。

[0098] (2)将碱性磷酸酶ALP溶于2mmol/L EDTA20mmol/L Tris-HCLPH8.0溶液中,溶度5mg/mL,加入0.10mg/mL Traunt试剂(巯基活化试剂)室温放置60分钟,通过SephadexG25柱子除去活化剂,收集蛋白峰;

[0099] (3)将(1)和(2)溶液按照抗体与碱性磷酸酶分子摩尔比1:1混合,室温放置5小时,然后用Superdex200凝胶层析柱分离纯化,收集第一和第二峰,除去未连接的游离抗体和碱性磷酸酶,将产物保存在4 $^{\circ}$ C。

[0100] 将上述Lp-PLA2-ALP连接物用酶反应物稀释液稀释到1-5ug/mL,使用0.2 $\mu$ m过滤器过滤后4 $^{\circ}$ C保存。

[0101] 酶反应物稀释液配置方法:Tris12.5g,氯化钠8.5g,叠氮钠1g,加纯化水至600mL,调整pH值至7.5。加吐温201mL,BSA10g,加纯化水定容至1L。用0.2 $\mu$ m过滤器过滤,于4 $^{\circ}$ C保存。

[0102] 三底物溶液(酶促化学发光底物溶液)的制备

[0103] 称取Tris2.4g、NaCl6.4g、Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>0.002g和Proclin-3000.2mL于1000mL烧杯中;量筒量取700mL纯化水于烧杯中,充分搅拌,直至完全溶解,pH值调整到8.2;加入250mL发光底物鲁米诺(Luminol-Phos)后,用0.2 $\mu$ m滤器过滤收集滤液,用纯化水定容至1L,混匀后即得。

[0104] 四稀释液的制备

[0105] 称取NaCl9.0g和BSA60g于1L的烧杯中;用移液器将Proclin-300量取0.5mL加10mL纯化水溶解,倒入上述烧杯中;最后定容1L,pH值调至7.6;待完全溶解后,用0.2 $\mu$ m滤器过滤,贴好标签于4 $^{\circ}$ C冷库贮存(有效期1年)。

[0106] 五缓冲液的制备

[0107] 取Tris1.56g和NaCl4.24g于1L烧杯中,取0.2mL Proclin-300于10mL纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入上述1L烧杯中;取800mL纯化水于上述1L容器中,充分搅拌直至完全溶解,调整pH到7.6;称取阻断剂(优选Mak33)0.9g溶于上述溶液中;最后定容至1L,完全溶解后,用0.2 $\mu$ m滤器过滤即得。

[0108] 六校准品与质控品的制备

[0109] 将高纯度Lp-PLA2抗原称重后用稀释液溶解分装制成Lp-PLA2的校准品与质控品。校准品浓度分别为2ng/mL,7ng/mL,24.5ng/mL,85.75ng/mL,300ng/mL,1050ng/mL,质控品浓度分别为7ng/mL,1050ng/mL。

[0110] 七清洗液的制备

[0111] 称取Tris12.5g和NaCl325.5g于1000mL烧杯中;称取5g吐温20于100mL容器中加20mL水使其完全溶解后,倒入烧杯中;用移液器将Proclin-300量取0.2mL于盛有10mL纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入烧杯中;用量筒量取800mL纯化水于烧杯中,充分搅拌,直至完全溶解,溶液PH调至7.6;最后用纯化水定容1000mL,完全溶解后用0.2 $\mu$ m孔径的过滤器过滤即得。

[0112] Lp-PLA2定量检测试剂盒的制备实施例四：

[0113] 一磁分离试剂(含有标记有抗Lp-PLA2单克隆抗体的磁性微球)的制备

[0114] (1)0.1mol/L的pH5的MES溶液(2-(N-吗啉代)乙磺酸)制备：

[0115] 称取MES19.52g, Tris1.56g, NaCl4.24g于1L烧杯中, 量取950mL纯化水溶解, pH调节至5.0; 加纯化水定容到1L, 采用孔径0.2 $\mu$ m滤膜过滤除菌, 4 $^{\circ}$ C保存。

[0116] (2)取磁微粒(表面含“羧基COOH-”活性基团)100mg用戊二醛活化, 25 $^{\circ}$ C混匀3小时, 用0.1mol/L MES, pH5溶液10mL洗涤3次, 磁微粒用该溶液1mL重悬; 加入2mg Lp-PLA2抗体, 37 $^{\circ}$ C混合均匀3小时; 之后加入等体积0.01mol/L PBS5%BSA(pH7.4)缓冲液于37 $^{\circ}$ 封闭1小时; 最后用10mL含0.5%BSA溶液的0.01mol/L PBS(pH7.4)缓冲液洗涤磁珠3次, 并用该溶液制成磁分离试剂溶液。

[0117] 二酶反应物(含有碱性磷酸酶标记的抗Lp-PLA2单克隆抗体)的制备

[0118] (1)将2.5mg抗Lp-PLA2抗体溶于0.01mol/L PBS PH7.4溶液中; 加入0.1mol/mL活化剂2-liminothiolane/HCl(2IT)溶液20 $\mu$ L, 20 $^{\circ}$ C放置30分钟后加入甘氨酸终止反应; 20 $^{\circ}$ C静置3分钟; 通过SephadexG25柱子除去活化剂, 收集蛋白峰; 每毫升活化的抗体溶液中加入0.5mL0.05mol/mL DTT(二硫苏糖醇)0.01mol/L PBS PH7.4溶液, 混匀后, 室温放置30分钟; 通过SephadexG25柱子除去游离的二硫苏糖醇, 收集蛋白峰。

[0119] (2)将碱性磷酸酶ALP溶于2mmol/L EDTA20mmol/L Tris-HCLPH8.0溶液中, 溶度5mg/mL, 加入0.10mg/mL Traunt试剂(巯基活化试剂)室温放置1小时, 通过SephadexG25柱子除去活化剂, 收集蛋白峰;

[0120] (3)将(1)和(2)溶液按照抗体与碱性磷酸酶分子摩尔比1:1混合, 室温放置3小时, 然后用Superdex200凝胶层析柱分离纯化, 收集第一和第二峰, 除去未连接的游离抗体和碱性磷酸酶, 将产物保存在4 $^{\circ}$ C。

[0121] 将上述Lp-PLA2-ALP连接物用酶反应物稀释液稀释到1-5ug/mL, 使用0.2 $\mu$ m过滤器过滤后4 $^{\circ}$ C保存。

[0122] 酶反应物稀释液配置方法: Tris12.5g, 氯化钠8.5g, 叠氮钠1g, 加纯化水至600mL, 调整pH值至7.5。加吐温201mL, BSA10g, 加纯化水定容至1L。用0.2 $\mu$ m过滤器过滤, 于4 $^{\circ}$ C保存。

[0123] 三底物溶液(酶促化学发光底物溶液)的制备

[0124] 称取Tris2.4g、NaCl6.4g、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>0.002g和Proclin-3000.2mL于1000mL烧杯中; 量筒量取700mL纯化水于烧杯中, 充分搅拌, 直至完全溶解, pH值调整到7.8; 加入250mL发光底物鲁米诺(Luminol-Phos)后, 用0.2 $\mu$ m滤器过滤收集滤液, 用纯化水定容至1L, 混匀后即得。

[0125] 四稀释液的制备

[0126] 称取NaCl9.0g和BSA60g于1L的烧杯中; 用移液器将Proclin-300量取0.5mL加10mL纯化水溶解, 倒入上述烧杯中; 最后定容1L, pH值调至7.2; 待完全溶解后, 用0.2 $\mu$ m滤器过滤, 贴好标签于4 $^{\circ}$ C冷库贮存(有效期1年)。

[0127] 五缓冲液的制备

[0128] 取Tris1.56g和NaCl4.24g于1L烧杯中, 取0.2mL Proclin-300于10mL纯化水的烧杯中完全溶解后, 倒入上述1L烧杯中; 取800mL纯化水于上述1L容器中, 充分搅拌直至完全溶解, 调整pH到7.2; 称取阻断剂(优选Mak33)0.9g溶于上述溶液中; 最后定容至1L, 完全溶

解后,用0.2 $\mu$ m滤器过滤即得。

[0129] 六校准品与质控品的制备

[0130] 将高纯度Lp-PLA2抗原称重后用稀释液溶解分装制成Lp-PLA2的校准品与质控品。校准品浓度分别为1ng/mL, 20ng/mL, 100ng/mL, 200ng/mL, 500ng/mL, 1500ng/mL, 质控品浓度分别为20ng/mL, 500ng/mL。

[0131] 七清洗液的制备

[0132] 称取Tris12.5g和NaCl325.5g于1000mL烧杯中;称取5g吐温20于100mL容器中加20mL水使其完全溶解后,倒入烧杯中;用移液器将Proclin-300量取0.2mL于盛有10mL纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入烧杯中;用量筒量取800mL纯化水于烧杯中,充分搅拌,直至完全溶解,溶液PH调至7.2;最后用纯化水定容1000mL,完全溶解后用0.2 $\mu$ m孔径的过滤器过滤即得。

[0133] Lp-PLA2定量检测试剂盒的制备实施例五:

[0134] 一磁分离试剂(含有标记有抗Lp-PLA2单克隆抗体的磁性微球)的制备

[0135] (1)0.1mol/L的pH5的MES溶液(2-(N-吗啉代)乙磺酸)制备:

[0136] 称取MES19.52g, Tris1.56g, NaCl4.24g于1L烧杯中,量取950mL纯化水溶解, pH调节至5.0;加纯化水定容到1L,采用孔径0.2 $\mu$ m滤膜过滤除菌,4 $^{\circ}$ C保存。

[0137] (2)取磁微粒(表面含“羧基COOH-”活性基团)100mg用戊二醛活化,25 $^{\circ}$ C混匀5小时,用0.1mol/L MES, pH5溶液10mL洗涤3次,磁微粒用该溶液1mL重悬;加入2mg Lp-PLA2抗体,37 $^{\circ}$ C混合均匀5小时;之后加入等体积0.01mol/L PBS5%BSA(pH7.4)缓冲液于37 $^{\circ}$ 封闭1小时;最后用10mL含0.5%BSA溶液的0.01mol/L PBS(pH7.4)缓冲液洗涤磁珠3次,并用该溶液制成磁分离试剂溶液。

[0138] 二酶反应物(含有碱性磷酸酶标记的抗Lp-PLA2单克隆抗体)的制备

[0139] (1)将2.5mg抗Lp-PLA2抗体溶于0.01mol/L PBS PH7.4溶液中;加入0.1mol/mL活化剂2-lminothiolane • HCl(2IT)溶液20 $\mu$ L,20 $^{\circ}$ C放置60分钟后加入甘氨酸终止反应;20 $^{\circ}$ C静置5分钟;通过SephadexG25柱子除去活化剂,收集蛋白峰;每毫升活化的抗体溶液中加入0.5mL0.05mol/mL DTT(二硫苏糖醇)0.01mol/L PBS PH7.4溶液,混匀后,室温放置60分钟;通过SephadexG25柱子除去游离的二硫苏糖醇,收集蛋白峰。

[0140] (2)将碱性磷酸酶ALP溶于2mmol/L EDTA20mmol/L Tris-HCL PH8.0溶液中,溶度5mg/mL,加入0.10mg/mL Traunt试剂(巯基活化试剂)室温放置1小时,通过SephadexG25柱子除去活化剂,收集蛋白峰;

[0141] (3)将(1)和(2)溶液按照抗体与碱性磷酸酶分子摩尔比1:1混合,室温放置4小时,然后用Superdex200凝胶层析柱分离纯化,收集第一和第二峰,除去未连接的游离抗体和碱性磷酸酶,将产物保存在4 $^{\circ}$ C。

[0142] 将上述Lp-PLA2-ALP连接物用酶反应物稀释液稀释到1-5ug/mL,使用0.2 $\mu$ m过滤器过滤后4 $^{\circ}$ C保存。

[0143] 酶反应物稀释液配置方法:Tris12.5g,氯化钠8.5g,叠氮钠1g,加纯化水至600mL,调整pH值至7.5。加吐温201mL,BSA10g,加纯化水定容至1L。用0.2 $\mu$ m过滤器过滤,于4 $^{\circ}$ C保存。

[0144] 三底物溶液(酶促化学发光底物溶液)的制备

[0145] 称取Tris2.4g、NaCl6.4g、Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>0.002g和Proclin-3000.2mL于1000mL烧杯中；量筒量取700mL纯化水于烧杯中，充分搅拌，直至完全溶解，pH值调整到8.2；加入250mL发光底物鲁米诺(Luminol-Phos)后，用0.2 $\mu$ m滤器过滤收集滤液，用纯化水定容至1L，混匀后即得。

[0146] 四稀释液的制备

[0147] 称取NaCl9.0g和BSA60g于1L的烧杯中；用移液器将Proclin-300量取0.5mL加10mL纯化水溶解，倒入上述烧杯中；最后定容1L，pH值调至7.6；待完全溶解后，用0.2 $\mu$ m滤器过滤，贴好标签于4 $^{\circ}$ C冷库贮存(有效期1年)。

[0148] 五缓冲液的制备

[0149] 取Tris1.56g和NaCl4.24g于1L烧杯中，取0.2mL Proclin-300于10mL纯化水的烧杯中完全溶解后，倒入上述1L烧杯中；取800mL纯化水于上述1L容器中，充分搅拌直至完全溶解，调整pH到7.6；称取阻断剂(优选Mak33)0.9g溶于上述溶液中；最后定容至1L，完全溶解后，用0.2 $\mu$ m滤器过滤即得。

[0150] 六校准品与质控品的制备

[0151] 将高纯度Lp-PLA<sub>2</sub>抗原称重后用稀释液溶解分装制成Lp-PLA<sub>2</sub>的校准品与质控品。校准品浓度分别为10ng/mL, 30ng/mL, 90ng/mL, 270ng/mL, 810ng/mL, 1620ng/mL, 质控品浓度分别为30ng/mL, 810ng/mL。

[0152] 七清洗液的制备

[0153] 称取Tris12.5g和NaCl325.5g于1000mL烧杯中；称取5g吐温20于100mL容器中加20mL水使其完全溶解后，倒入烧杯中；用移液器将Proclin-300量取0.2mL于盛有10mL纯化水的烧杯中完全溶解后，倒入烧杯中；用量筒量取800mL纯化水于烧杯中，充分搅拌，直至完全溶解，溶液PH调至7.6；最后用纯化水定容1000mL，完全溶解后用0.2 $\mu$ m孔径的过滤器过滤即得。

[0154] 将本发明所得的Lp-PLA<sub>2</sub>定量检测试剂盒进行如下操作：

[0155] 步骤一，加样与免疫反应

[0156] 在试管中加入45 $\mu$ l LPPLA<sub>2</sub>待测样本、校准品和质控品，然后依次加入60 $\mu$ L酶反应物、30 $\mu$ L磁分离试剂和60 $\mu$ L缓冲液。用多管混匀器轻轻振荡1分钟后，37 $^{\circ}$ C水浴30分钟；

[0157] 步骤二，洗涤

[0158] 反应试管放置在磁分离器上(所有试管都要求与磁分离器接触)，使磁微粒在磁场中沉降2分钟，缓缓倒转分离器，倒去上清液，并除去黏在管壁上的液滴。

[0159] 步骤三，每支试管加入200 $\mu$ L清洗液，震荡30秒使磁微粒充分混悬，再次使磁微粒在磁场中沉降，去除上清液。

[0160] 步骤四，重复步骤二和步骤三2次；

[0161] 步骤五，加底物溶液

[0162] 每管加入200 $\mu$ L底物溶液。37 $^{\circ}$ C混匀后1分钟内检测；

[0163] 步骤六，读值

[0164] 在分光光度计或发光强度检测仪上读取吸光度或发光强度值。

[0165] 检测结果：

[0166] 以本试剂实施例1为例制备出脂蛋白相关磷脂酶A<sub>2</sub>定量试剂盒，并以此检测200例盲样标本，得到以下试剂盒检测结果：

[0167] 分析灵敏度:对20次零校准品的测定,取其2倍的平均偏差,其在标准曲线上对应的浓度即为分析灵敏度;本发明试剂盒分析灵敏度为0.1ng/mL。

[0168] 精密性:同时评价批内和批间不精密性:每天做2个批次的测试,每批测试时,对同一样品作双份测量,共做20天。评估结束时共有40对,即80个测试结果。从40批次测量中双份结果的差值求出批内精密性。从所有80个数据计算出批间精密性。

[0169] 本发明试剂盒:批内精密性CV% $\leq$ 10.0%;批间精密性CV% $\leq$ 15.0%;

[0170] 线性范围:取本试剂实施例1,每点重复检测3次,得出本试剂盒标准曲线为: $y=2.9931x-31.509$ ,线性相关 $R^2=0.9997$ 。本发明试剂盒线性范围为0.1-3500ng/mL。图1为Lp-PLA2校准曲线。

[0171] 又以本试剂盒与市售酶联免疫法试剂盒分别检测同一批40例标本,得出以下值,显示出了两者良好的相关性,见表1:

[0172] 表140个样本ELISA法检测结果与本发明的检测结果对比

样本序号	本发明实施例1测定值 (ng/ml)	市售酶联免疫法测定值 (ng/ml)	样本序号	本发明实施例1测定值 (ng/ml)	市售酶联免疫法测定值 (ng/ml)
1	356	350	21	1432	1445
2	484	480	22	1028	1022
3	165	168	23	643	644
4	205	199	24	755	748
5	71	73	25	320	328
6	28	27	26	434	441
7	163	166	27	281	277
8	204	204	28	93	95
[0173] 9	97	99	29	29	29
10	232	230	30	409	411
11	688	693	31	367	362
12	704	699	32	787	779
13	408	412	33	612	610
14	384	376	34	489	493
15	79	81	35	313	310
16	146	143	36	28	30
17	189	193	37	66	69
18	677	672	38	241	237
19	196	199	39	301	296
20	174	171	40	443	440

[0174] 以上所述的仅是本发明的优选实施方案,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以作为若干的改进和调整,这些改进的调整也应视为本发明的保护范围。

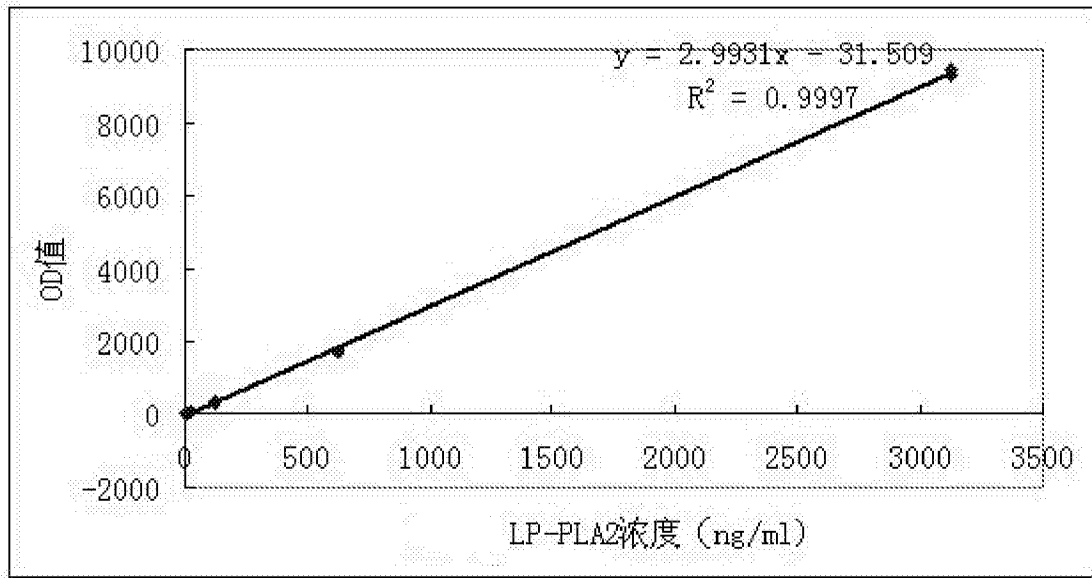


图1

专利名称(译)	脂蛋白相关磷脂酶A2定量检测试剂盒及制备、操作方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103698535B</a>	公开(公告)日	2016-05-25
申请号	CN201310695303.5	申请日	2013-12-17
[标]申请(专利权)人(译)	陆上苏		
申请(专利权)人(译)	陆上苏		
当前申请(专利权)人(译)	南京健安医疗科技有限公司		
[标]发明人	陆上苏		
发明人	陆上苏		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N33/92		
代理人(译)	董建林		
其他公开文献	CN103698535A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种体外诊断试剂制备领域，属于生物技术领域，具体涉及一种脂蛋白相关磷脂酶A2定量检测试剂盒及制备、操作方法，包含磁分离试剂、酶反应物、底物溶液、稀释液、缓冲液、校准品、质控品和清洗液，所述磁分离试剂为含有标记有抗Lp-PLA2单克隆抗体的磁性微球，所述酶反应物为含有碱性磷酸酶标记的抗Lp-PLA2单克隆抗体，所述底物溶液为酶促化学发光底物溶液，所述校准品及质控品为含有Lp-PLA2抗原的BSA蛋白溶液。本发明还包括其制备和操作方法。本发明的有益之处在于：具有更高的检测灵敏度和特异性，并达到了较佳的性能参数；与普通酶联免疫技术相比，缩短了临床检测时间；与化学发光法相比，降低了临床开展本检测的成本。

