



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109061198 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201810939724.0

(22)申请日 2018.08.17

(71)申请人 迪瑞医疗科技股份有限公司

地址 130000 吉林省长春市高新区宜居路  
3333号

(72)发明人 李冬梅 高智玲 高威 孙成艳  
何浩会

(74)专利代理机构 长春众邦菁华知识产权代理  
有限公司 22214

代理人 李外

(51)Int.Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

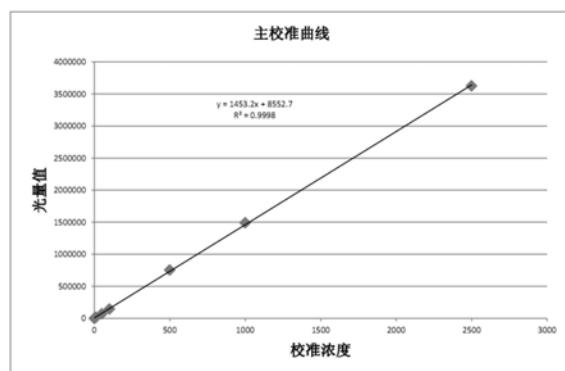
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

抑制素A检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明提供一种抑制素A检测试剂盒及其制备方法，属于免疫诊断技术领域。解决现有的抑制素A检测试剂盒发光反应速度慢，灵敏度低，线性范围窄，成本高的问题。该试剂盒包括：链霉亲和素化磁珠悬浮液、吖啶酯标记的抑制素A抗体和生物素标记抑制素A抗体。本发明还提供一种抑制素A检测试剂盒的制备方法。由于该试剂检测原理为双抗夹心法，分别由吖啶酯标记的抗体及生物素标记进行检测，不仅增加了发光率同时扩大了反应级，大大提高了试剂的特异性及检测速度。



1. 一种抑制素A检测试剂盒,其特征在于,该试剂盒包括:  
链霉亲和素化磁珠悬浮液  
吖啶酯标记的抑制素A抗体  
生物素标记抑制素A抗体。
2. 根据权利要求1所述的一种抑制素A检测试剂盒,其特征在于,所述的链霉亲和素化磁珠悬浮液中的磁珠的粒径为0.05~3μm。
3. 根据权利要求1所述的一种抑制素A检测试剂盒,其特征在于,所述的吖啶酯标记的抑制素A抗体中,吖啶酯与抑制素A抗体的摩尔比为1:(3~20)。
4. 根据权利要求1所述的一种抑制素A检测试剂盒,其特征在于,所述的生物素标记抑制素A抗体中,生物素与抑制素A抗体的摩尔比为1:(5~20)。
5. 根据权利要求1所述的一种抑制素A检测试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒还包括化学发光底物液及清洗液,所述化学发光底物液包括A液和B液。
6. 根据权利要求1所述的一种抑制素A检测试剂盒,其特征在于,所述A液为硝酸溶液,B液为氢氧化钠溶液,所述的清洗液为PB。
7. 根据权利要求1所述的一种抑制素A检测试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒还包括校准品和质控品:校准浓度分别为0pg/mL、10pg/mL、50pg/mL、100pg/mL、500pg/mL、1000pg/mL、2500pg/mL。
  8. 根据权要求1所述的一种抑制素A检测试剂盒的制备方法,其特征在于,该方法包括:  
**步骤一:链霉亲和素化磁珠悬浮液的制备**
    - 1) 将氯化铁和氯化亚铁在水中溶解混匀后,加入氨水,在50~70℃下反应3~5h,得到磁性微球;
    - 2) 将步骤1)得到的磁性微球、PEG4000、氨水和正硅酸乙酯在60~65℃搅拌反应14h~18h,得到改性后的磁性微球;
    - 3) 将步骤2)得到的改性后的磁性微球、氨水、四甲基氢氧化铵TMA和3—氨基丙基三甲氧基硅烷,在室温搅拌反应14h~18h,得表面修饰氨基的磁性微球;
    - 4) 将步骤3)得到修饰氨基的磁性微球和TMA、戊二醛在室温下搅拌反应30~40min,然后在加入SA,37℃搅拌反应14h~18h,在加入谷氨酸和BSA继续反应1~2h,得到链霉亲和素化磁珠悬浮液;  
**步骤二:吖啶酯标记的抑制素A抗体的制备**  
将抑制素A抗体放入离心管中离心,然后加入碳酸缓冲液,混匀后加入吖啶酯溶液离心,将离心管密封后放入避光暗盒中,然后将暗盒放入气浴恒温振荡器中混匀,加入封闭液,放入气浴恒温振荡器中混匀,将封闭好的抗体经过纯化、收集,然后放入缓冲液中稀释,保存;
  - 步骤三:生物素标记抗体的制备**  
取抑制素A抗体,pH6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入已活化的长链碘化生物素,2~8℃反应1~3h,再转入室温继续反应10~30min,最后加入赖氨酸反应10~30min,经纯化,加入等体积甘油和NaN<sub>3</sub>或ProClin300,得到偶联标记物标记的抑制素A抗体。
9. 根据权要求8所述的一种抑制素A检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述的步骤一中氯化铁和氯化亚铁的摩尔比为2:1。

10. 根据权要求8所述的一种抑制素A检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述的步骤二中的封闭液为赖氨酸。

## 抑制素A检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫诊断技术领域,具体涉及一种抑制素A检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 抑制素是由女性卵巢的颗粒细胞和男性睾丸的塞尔托利细胞分泌的异二聚体糖蛋白激素。抑制素选择性地抑制垂体促卵泡激素(FSH)的分泌,同时在生殖腺还进行自身的旁分泌活动。经过完全处理的抑制素分子的分子量大约是32kD,它包括两个不同的链(α和β),这两个链通过双硫键共价连接。前体是一个α亚单位的高分子量形式也出现在流动滤泡液和血清中。此外,还出现了游离α亚单位形式,它不与β亚单位相连接,并且是缺乏抑制素的生物活性的。抑制素A(INH-A/Inhibin A)包括一个α亚单位和一个βA亚单位。一些已经发表的报告指出抑制素A可以用于人体生理生殖学的研究,对抑制素A的测定可以作为监控卵巢功能的内分泌指标。

[0003] 免疫分析中,抗原-抗体免疫复合物的分离往往比较繁琐、费时,常常是信噪比低的原因,目前检测抑制素A的试剂盒普遍存在检测低限灵敏度不高、线性范围较窄的问题。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是为了解决现有的抑制素A检测试剂盒发光反应速度慢,灵敏度低,线性范围窄,成本高的问题,而提供一种抑制素A检测试剂盒及其制备方法。

[0005] 本发明首先提供一种抑制素A检测试剂盒,该试剂盒包括:

[0006] 链霉亲和素化磁珠悬浮液

[0007] 叶啶酯标记的抑制素A抗体

[0008] 生物素标记抑制素A抗体

[0009] 优选的是,所述的链霉亲和素化磁珠悬浮液中的磁珠的粒径为0.05~3μm。

[0010] 优选的是,所述的叶啶酯标记的抑制素A抗体中,叶啶酯与抑制素A抗体的摩尔比为1:(3~20)。

[0011] 优选的是,所述的生物素标记抑制素A抗体中,生物素与抑制素A抗体的摩尔比为1:(5~20)。

[0012] 优选的是,所述的试剂盒还包括化学发光底物液及清洗液,所述化学发光底物液包括A液和B液。

[0013] 优选的是,所述A液为硝酸溶液,B液为氢氧化钠溶液,所述的清洗液为PB。

[0014] 优选的是,所述的试剂盒还包括校准品和质控品:校准浓度分别为0pg/mL,10pg/mL、50pg/mL、100pg/mL、500pg/mL、1000pg/mL、2500pg/mL。

[0015] 本发明还提供一种抑制素A检测试剂盒的制备方法,该方法包括:

[0016] 步骤一:链霉亲和素化磁珠悬浮液的制备

[0017] 1) 将氯化铁和氯化亚铁在水中溶解混匀后,加入氨水,在50~70℃下反应3~5h,得到磁性微球;

[0018] 2) 将步骤1) 得到的磁性微球、PEG4000、氨水和正硅酸乙酯在60~65℃搅拌反应14h~18h, 得到改性的磁性微球;

[0019] 3) 将步骤2) 得到的改性的磁性微球、氨水、四甲基氢氧化铵TMA和3—氨基丙基三甲氧基硅烷, 在室温搅拌反应14h~18h, 得表面修饰氨基的磁性微球;

[0020] 4) 将步骤3) 得到修饰氨基的磁性微球和TMA、戊二醛在室温下搅拌反应30~40min, 然后在加入SA, 37℃搅拌反应14h~18h, 在加入谷氨酸和BSA继续反应1~2h, 得到链霉亲和素化磁珠悬浮液;

[0021] 步骤二: 叶啶酯标记的抑制素A抗体的制备

[0022] 将抑制素A抗体放入离心管中离心, 然后加入碳酸缓冲液, 混匀后加入叶啶酯溶液离心, 将离心管密封后放入避光暗盒中, 然后将暗盒放入气浴恒温振荡器中混匀, 加入封闭液, 放入气浴恒温振荡器中混匀, 将封闭好的抗体经过纯化、收集, 然后放入缓冲液中稀释, 保存;

[0023] 步骤三: 生物素标记抗体的制备

[0024] 取抑制素A抗体, pH6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入已活化的长链碘化生物素, 2~8℃反应1~3h, 再转入室温继续反应10~30min, 最后加入赖氨酸反应10~30min, 经纯化, 加入等体积甘油和NaN<sub>3</sub>或ProClin300, 得到偶联标记物标记的抑制素A抗体。

[0025] 优选的是, 所述的步骤一中氯化铁和氯化亚铁的摩尔比为2:1。

[0026] 优选的是, 所述的步骤二中的封闭液为赖氨酸。

[0027] 本发明的有益效果

[0028] 本发明首先提供一种抑制素A检测试剂盒及其制备方法, 该试剂盒以链霉亲和素化磁珠悬浮液作为免疫反应与分离的固相载体, 亲和素化的磁性微粒子主要用于与生物素标记的抗体相连, 通过免疫反应使其能够捕获靶物质形成免疫复合物, 在外加磁场的作用下, 免疫复合物被滞留下来, 实现了分离, 从而清除了样品中基质的干扰, 降低了背景值。而且, 与微孔板的免疫分析相比, 磁性微粒子的介入, 不但使反应试剂的用量减少了约1/2, 并大大的缩短了反应时间, 更重要的是降低了背景值, 提高了灵敏度及适用性。同时该试剂盒引入了亲和素-生物素系统, 该系统具有高灵敏度、高特异性、高稳定性和适用性等特点。生物素易与蛋白质和核酸类等生物大分子结合, 再和生物素衍生物结合, 将信号多级放大, 能保持大分子物质的原有生物活性。亲和素与生物素间的结合具有极高的亲和力, 其反应呈高度专一性, 不增加非特异性干扰, 也不会因反应试剂浓度高低受影响, 同时酸、碱、变性剂及有机溶剂均不会影响亲和素与生物素的结合力, 增加了试剂整体的稳定性。由于该试剂检测原理为双抗夹心法, 分别由叶啶酯标记的抗体及生物素标记进行检测, 不仅增加了发光率同时扩大了反应级, 大大提高了试剂的特异性及检测速度, 为临床对于检测抑制素A相关的疾病和科学的研究提供一定的技术支持。

## 附图说明

[0029] 图1为本发明实施例1抑制素A检测试剂盒剂量反应校准曲线。

## 具体实施方式

[0030] 本发明首先提供一种抑制素A检测试剂盒, 该试剂盒包括:

[0031] 链霉亲和素化磁珠悬浮液

[0032] 叶啶酯标记的抑制素A抗体

[0033] 生物素标记抑制素A抗体

[0034] 按照本发明，所述的链霉亲和素化磁珠悬浮液中的磁珠的粒径为0.05~3μm，更优选为1μm。

[0035] 按照本发明，所述的叶啶酯标记的抑制素A抗体中，叶啶酯与抑制素A抗体标记的摩尔比优选为1:(3~20)，更优选为1:(3~5)。

[0036] 按照本发明，所述的生物素标记抑制素A抗体中，生物素与抑制素A抗体的标记的摩尔比优选为1:(5~20)，更优选为1:(5~10)。

[0037] 按照本发明，所述的试剂盒还包括化学发光底物液及清洗液，所述化学发光底物液包括A液和B液；所述A液优选为硝酸溶液，B液优选为氢氧化钠溶液，清洗液为PB。

[0038] 按照本发明，所述的试剂盒还包括校准品和质控品，所述的质控品制备方法同校准品，所述校准品可通过以下方法制备得到：

[0039] ①校准品缓冲液的组成：由0.1mol/L的PB、0.15mol/L的氯化钠、1%的牛血清白蛋白及0.05%的Tween-20组成，pH值6.5，2~8℃存放备用；

[0040] ②取抑制素A抗原用①步所得校准品缓冲液分别配制成浓度为0pg/mL、10pg/mL、50pg/mL、100pg/mL、500pg/mL、1000pg/mL、2500pg/mL的校准品，等量分装成浓度分别为0pg/mL、10pg/mL、50pg/mL、100pg/mL、500pg/mL、1000pg/mL、2500pg/mL的7瓶校准品。

[0041] 本发明还提供一种抑制素A检测试剂盒的制备方法，该方法包括：

[0042] 步骤一：链霉亲和素化磁珠悬浮液的制备

[0043] 1) 将氯化铁和氯化亚铁在水中溶解混匀后，加入氨水，在50~70℃下反应3~5h，得到磁性微球；所述的氯化铁和氯化亚铁的摩尔比优选为2:1；

[0044] 2) 将步骤1)得到的磁性微球洗涤后重新分散于50%乙醇中再依次加入0.5%PEG4000、0.1%氨水和0.1%正硅酸乙酯在60~65℃搅拌反应14h~18h，得到改性的磁性微球；所述的PEG4000、氨水和正硅酸乙酯的体积比优选为1:5:1；

[0045] 3) 将步骤2)得到的改性的磁性微球用超纯水和无水乙醇交替洗涤后重悬于50%乙醇中再分别加入0.05%的氨水、0.5%的四甲基氢氧化铵TMA和2.5%的3-氨基三甲氧基硅烷，在室温搅拌反应14h~18h，得表面修饰氨基的磁性微球；所述的氨水、四甲基氢氧化铵TMA和3-氨基三甲氧基硅烷的体积比优选为5:2:4；

[0046] 4) 将步骤3)得到修饰氨基的磁性微球用PBS缓冲液清洗并重悬再加入0.1%TMA、2.5%戊二醛在室温下搅拌反应30~40min，之后用碳酸缓冲液清洗并重悬超声分散后按20ug/mg磁性微球加入SA，37℃搅拌反应14h~18h，在加入0.1%谷氨酸和1%BSA继续反应1~2h，PBS缓冲液含0.05%的Tween-20洗涤3次后重悬于1%BSA中超声分散即得SA磁性微球，加入磁微粒保存液(含有0.5%BSA的Tris缓冲液)，2~8℃保存，得到链霉亲和素化磁珠。所述的TMA、戊二醛、SA、谷氨酸、BSA的体积比优选为2:3:10:1:1；

[0047] 步骤二：叶啶酯标记的抑制素A抗体的制备

[0048] 将抑制素A抗体放入离心管中离心，优选在室温下离心10s~30s，保证抗体位于离心管底部位置，然后加入碳酸缓冲液，混匀后加入叶啶酯溶液离心，所述的离心温度优选为室温，离心时间优选为0.5min~3min；将离心管密封后放入避光暗盒中，然后将暗盒放入气

浴恒温振荡器(25℃)中混匀,所述的混匀时间优选为2~4h,加入封闭液,放入气浴恒温振荡器中混匀封闭,所述的封闭时间优选为1~2h,将封闭好的抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化、用PB缓冲液洗脱,收集,然后放入缓冲液中稀释,保存;

[0049] 所述的抑制素A抗体的质量(μg):吖啶酯溶液的体积(μl)优选为100:1;所述的吖啶酯溶液的浓度优选为2mg/mL;所述的封闭液优选为赖氨酸,质量分数优选为20%;所述的缓冲液为50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300, pH6.5;

[0050] 步骤三:生物素标记抗体的制备

[0051] 取抑制素A抗体,pH6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入已活化的长链碘化生物素,2~8℃反应1~3h,再转入室温继续反应10~30min,最后加入赖氨酸反应10~30min,经纯化,加入等体积甘油和0.1%NaN3或0.1%ProClin300,得到偶联标记物标记的抑制素A抗体。

[0052] 所述的制素A抗体、已活化的长链碘化生物素和赖氨酸的摩尔比优选为1:15:100;所述的已活化的长链碘化生物素的来源为商购,选自Thermo公司。

[0053] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细的描述。

[0054] 实施例1

[0055] (1) 制备链霉亲和素化磁珠悬浮液

[0056] 按照摩尔比2:1称取氯化铁和氯化亚铁,在超纯水中溶解混匀后加入氨水至终浓度为0.5%,60℃搅拌反应4h,得到磁性微球;

[0057] 将得到的磁性微球用超纯水洗涤后重新分散于50%乙醇中再依次加入1mL 0.5%的PEG4000,5mL 0.1%的氨水和1mL 0.1%的正硅酸乙酯,60℃搅拌反应16h,获得改性的磁性微球;

[0058] 将以上改性的磁性微球用超纯水和无水乙醇交替洗涤后重悬于50%乙醇中再分别加入5mL 0.05%的氨水、2mL 0.5%的四甲基氢氧化铵TMA和4mL 2.5%的3-氨基三甲氧基硅烷,室温搅拌反应16h,即得表面修饰氨基的磁性微球;

[0059] 取8mg该氨基磁性微球用PBS缓冲液清洗并重悬再加入2mL 0.1%TMA和3mL 2.5%的戊二醛,室温搅拌反应30min之后用碳酸缓冲液清洗并重悬超声分散后按20ug/mg磁性微球加入SA,37℃搅拌反应16h,然后分别加入1mL 0.1%的谷氨酸和1mL 1%的BSA继续反应1h,PBS缓冲液含0.05%的tween-20洗涤3次后重悬于1%BSA中超声分散即得SA磁性微球,加入磁微粒保存液(含有0.5%BSA的Tris缓冲液),磁珠终浓度为0.072%,2~8℃保存。

[0060] (2) 吖啶酯标记的抑制素A抗体的制备

[0061] 将500ug抑制素A抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入碳酸缓冲溶液,充分混匀,加入5uL吖啶酯后用离心机室温条件下离心0.5分钟,将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,之后将暗盒放入气浴恒温振荡器(25℃),混匀4小时,加入1mL 20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封闭时间为1h,将封闭好的抗体上葡聚糖凝胶G50柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分步收集,将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存;将抑制素A抗体标记的浓溶液用100mM,pH6.5 TRIS缓冲液稀释至终浓度为0.2ug/ml,2~8℃保存。

[0062] (3) 生物素标记抗体的制备

[0063] 取500ug抑制素A抗体,用pH6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入15倍摩尔比已活化

的长链磺化生物素(Sulfo-NHS-LC-Biotin),2~8℃反应2h,再转入室温继续反应30min,,最后加入100倍摩尔比的赖氨酸反应30min,反应液用脱盐柱纯化,加入等体积甘油和0.1%NaN<sub>3</sub>或0.1%ProClin300。

[0064] 图1为本发明实施例1制备得到的抑制素A检测试剂盒剂量反应校准曲线;图中具体相关参数如表1所示:即将校准品浓度为0pg/mL,10pg/mL、50pg/mL、100pg/mL、500pg/mL、1000pg/mL、2500pg/mL作标准曲线,得到相关方程为:y=1453x+8552.线性相关系数r大于0.999。

[0065] 表1

[0066]

校准点	校准品浓度	光量
1	0	622
2	10	14507
3	50	72533
4	100	145066
5	500	755328
6	1000	1490656
7	2500	3626640

[0067] 实施例2

[0068] (1) 制备链霉亲和素化磁珠悬浮液

[0069] 按照摩尔比2:1称取氯化铁和氯化亚铁,在超纯水中溶解混匀后加入氨水至终浓度为0.5%,60℃搅拌反应3h,得到磁性微球;

[0070] 将得到的磁性微球用超纯水洗涤后重新分散于50%乙醇中再依次加入1mL 0.5%的PEG4000,5mL 0.1%的氨水和1mL 0.1%的正硅酸乙酯,60℃搅拌反应14h,获得改性的磁性微球;

[0071] 将以上改性的磁性微球用超纯水和无水乙醇交替洗涤后重悬于50%乙醇中再分别加入5mL 0.05%的氨水、2mL 0.5%的四甲基氢氧化铵TMA和4mL 2.5%的3-氨基三甲氧基硅烷,室温搅拌反应14h,即得表面修饰氨基的磁性微球;

[0072] 取8mg该氨基磁性微球用PBS缓冲液清洗并重悬再加入2mL 0.1%TMA和3mL 2.5%的戊二醛,室温搅拌反应35min之后用碳酸缓冲液清洗并重悬超声分散后按20ug/mg磁性微球加入SA,37℃搅拌反应14h,然后分别加入1mL 0.1%的谷氨酸和1mL 1%的BSA继续反应1.5h,PBS缓冲液含0.05%的tween-20洗涤3次后重悬于1%BSA中超声分散即得SA磁性微球,加入磁微粒保存液(含有0.5%BSA的Tris缓冲液),磁珠终浓度为0.072%,2~8℃保存。

[0073] (2) 叶啶酯标记的抑制素A抗体的制备

[0074] 将500ug抑制素A抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心10s)后加入碳酸缓冲溶液,充分混匀,加入5uL叶啶酯后用离心机室温条件下离心2分钟,将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,之后将暗盒放入气浴恒温振荡器(25℃),混匀2小时,加入1mL 20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封闭时间为2h,将封闭好的抗体上葡聚糖凝胶G50柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分步收集,将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存;将抑制素A抗体标记的浓溶液用100mM,pH6.5TRIS缓冲液稀释至终

浓度为0.2ug/ml,2~8℃保存。

[0075] (3)生物素标记抗体的制备

[0076] 取500ug抑制素A抗体,用pH6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入15倍摩尔比已活化的长链磺化生物素(Sulfo-NHS-LC-Biotin),2~8℃反应3h,再转入室温继续反应10min,,最后加入100倍摩尔比的赖氨酸反应10min,反应液用脱盐柱纯化,加入等体积甘油和0.1%NaN<sub>3</sub>或0.1%ProClin300。

[0077] 实施例3

[0078] (1)制备链霉亲和素化磁珠悬浮液

[0079] 按照摩尔比2:1称取氯化铁和氯化亚铁,在超纯水中溶解混匀后加入氨水至终浓度为0.5%,60℃搅拌反应5h,得到磁性微球;

[0080] 将得到的磁性微球用超纯水洗涤后重新分散于50%乙醇中再依次加入1mL 0.5%的PEG4000,5mL 0.1%的氨水和1mL 0.1%的正硅酸乙酯,60℃搅拌反应18h,获得改性的磁性微球;

[0081] 将以上改性的磁性微球用超纯水和无水乙醇交替洗涤后重悬于50%乙醇中再分别加入5mL 0.05%的氨水、2mL 0.5%的四甲基氢氧化铵TMA和4mL 2.5%的3-氨基三甲氧基硅烷,室温搅拌反应18h,即得表面修饰氨基的磁性微球;

[0082] 取8mg该氨基磁性微球用PBS缓冲液清洗并重悬再加入2mL 0.1%TMA和3mL 2.5%的戊二醛,室温搅拌反应40min之后用碳酸缓冲液清洗并重悬超声分散后按20ug/mg磁性微球加入SA,37℃搅拌反应18h,然后分别加入1mL 0.1%的谷氨酸和1mL 1%的BSA继续反应1h,PBS缓冲液含0.05%的tween-20洗涤3次后重悬于1%BSA中超声分散即得SA磁性微球,加入磁微粒保存液(含有0.5%BSA的Tris缓冲液),磁珠终浓度为0.072%,2~8℃保存。

[0083] (2)吖啶酯标记的抑制素A抗体的制备

[0084] 将500ug抑制素A抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心30s)后加入碳酸缓冲溶液,充分混匀,加入5uL吖啶酯后用离心机室温条件下离心3分钟,将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,之后将暗盒放入气浴恒温振荡器(25℃),混匀3小时,加入1mL 20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封闭时间为2h,将封闭好的抗体上葡聚糖凝胶G50柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分步收集,将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存;将抑制素A抗体标记的浓溶液用100mM,pH6.5 TRIS缓冲液稀释至终浓度为0.2ug/ml,2~8℃保存。

[0085] (3)生物素标记抗体的制备

[0086] 取500ug抑制素A抗体,用pH6.5的TRIS缓冲液透析纯化后加入15倍摩尔比已活化的长链磺化生物素(Sulfo-NHS-LC-Biotin),2~8℃反应1h,再转入室温继续反应30min,最后加入100倍摩尔比的赖氨酸反应20min,反应液用脱盐柱纯化,加入等体积甘油和0.1%NaN<sub>3</sub>或0.1%ProClin300。

[0087] 下面对实施例制备得到的试剂盒进行性能评估

[0088] ①最低检测限检测

[0089] 用零浓度校准品或样本稀释液作为样本进行检测,重复测定20次,得出20次检测结果的RLU值(相对发光值),计算其平均值(M)和标准差(SD),得出M+2SD,根据零浓度校准品和相邻校准品之间的浓度—RLU值结果进行两点回归拟合得出一次方程,将M+2SD的RLU

值带入上述方程,求出对应的浓度值,即为最低检测限,结果应符合应小于1.0pg/mL。结果如表2所示:

[0090] 表2. 最低检测限数据

测定次数	一级校准品A	一级校准品B
Rep1	622	14507
Rep2	682	15129
Rep3	710	
Rep4	649	
Rep5	841	
Rep6	634	
Rep7	719	
Rep8	728	
Rep9	746	
Rep10	681	
Rep11	645	
Rep12	671	/
Rep13	804	
Rep14	675	
Rep15	689	
Rep16	806	
Rep17	795	
Rep18	809	
Rep19	673	
Rep20	758	

[0091]

[0092]	测定均值	716.85	14818
	样品	一级校准品A	一级校准品B
	浓度 (pg/ml)	0.00	10.00
	标准差 (SD)	66.08	/
	均值+2SD	849.00	/
	最低检测限 (pg/mL)	0.0937	

[0093] ②线性检测

[0094] 将接近线性范围上限的高值样本按比例稀释为至少5种浓度,其中低值浓度样本须接近线性范围的下限。按照试剂盒说明书进行操作,将每一浓度的样本重复检测2次,计算平均值,将结果平均值和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合,并计算线性相关系数r,结果应符合线性范围为 $1.0\text{ng/mL} \sim 2500\text{ng/mL}$ ,线性相关系数r应 $\geq 0.9900$ 。结果如表3所示:

[0095] 表3.线性数据

〔0096〕

理论值	L6	L5	L4	L3	L2	L1	相关系数 (r)
	0.8	4	20	100	500	2500	
测定值	0.91	3.97	21.57	96.52	479.21	2501.74	0.9999
	0.92	3.67	21.69	96.68	477.54	2501.06	
	0.90	3.87	21.24	96.54	471.26	2504.97	
测定均值	0.91	3.84	21.50	96.58	476.00	2502.59	

[0097] ③重复性检测

[0098] 用浓度分别为 $150\text{ng/mL} \pm 30\text{ng/mL}$ 和 $800\text{ng/mL} \pm 160\text{ng/mL}$ 的样本重复检测10次，计算10次测量结果的平均值 $\bar{X}$ 和标准差SD，根据公式(2)计算变异系数(CV)，结果应符合变异系数(CV)应 $\leqslant 8.0\%$ 。

[0100] 式中:CV—变异系数;

[0101] SD—测量结果的标准差:

[0102]  $\bar{Y}$ —测量结果的平均值。

[0103] 结果如表4所示。

[0104] 表4 重复性数据

[0105]

测定次数	重复性样本1	重复性样本2
Rep1	148.27	824.03

Rep2	142.12	841.48
Rep3	146.17	815.82
Rep4	143.08	830.46
Rep5	145.94	824.42
Rep6	146.00	843.20
Rep7	144.94	825.47
Rep8	148.47	847.90
Rep9	141.99	834.58
Rep10	149.74	842.49
测定均值	145.67	832.99
SD	2.69	10.56
CV	1.84%	1.27%

[0106] 由检测结果显示本发明所涉及试剂盒检测线性相关系数 $r \geq 0.9999$ ,即线性检测合格;最低检测限是0.0937pg/mL;重复性检测结果符合变异系数(CV)应 $\leq 8.0\%$ 要求,即重复性检测合格。本试剂盒具有灵敏度高、线性范围广、稳定性好的特点。

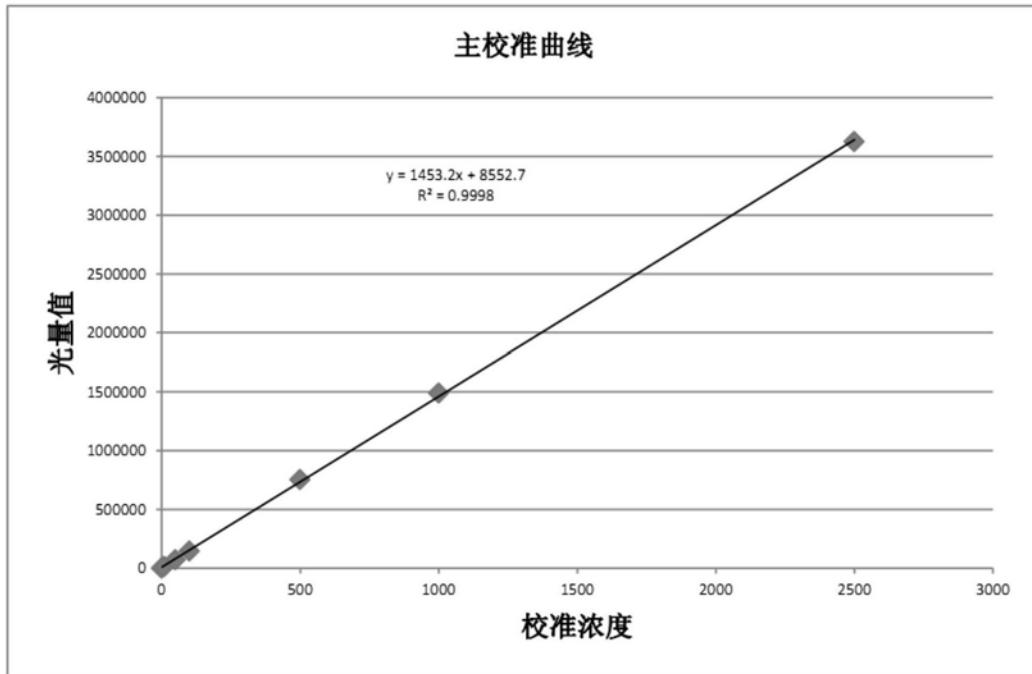


图1

专利名称(译)	抑制素A检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109061198A</a>	公开(公告)日	2018-12-21
申请号	CN201810939724.0	申请日	2018-08-17
[标]发明人	李冬梅 高智玲 高威 孙成艳 何浩会		
发明人	李冬梅 高智玲 高威 孙成艳 何浩会		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/531 G01N33/543		
代理人(译)	李外		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

## 摘要(译)

本发明提供一种抑制素A检测试剂盒及其制备方法，属于免疫诊断技术领域。解决现有的抑制素A检测试剂盒发光反应速度慢，灵敏度低，线性范围窄，成本高的问题。该试剂盒包括：链霉亲和素化磁珠悬浮液、吖啶酯标记的抑制素A抗体和生物素标记抑制素A抗体。本发明还提供一种抑制素A检测试剂盒的制备方法。由于该试剂检测原理为双抗夹心法，分别由吖啶酯标记的抗体及生物素标记进行检测，不仅增加了发光率同时扩大了反应级，大大提高了试剂的特异性及检测速度。

