



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113514449 A

(43) 申请公布日 2021.10.19

(21) 申请号 202110794253.0

(22) 申请日 2018.09.25

(62) 分案原申请数据

201811115981.9 2018.09.25

(71) 申请人 无锡壹闪生物科技有限公司

地址 214100 江苏省无锡市江阴市砂山路  
85号A701、702室

(72) 发明人 奚伟红 史兵伟 廖鸳鸯 朱丹丹

(74) 专利代理机构 北京方圆嘉禾知识产权代理  
有限公司 11385

代理人 戴嵩玮

(51) Int. Cl.

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

空间邻近化学发光法检测血清淀粉样蛋白A  
试剂盒的应用及检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种空间邻近化学发光法检测血清淀粉样蛋白A的试剂盒及其检测方法。试剂盒包括：酶标记物、发光标记物、辅助剂、触发剂和校准品；其中，校准品包括不同浓度SAA抗原的校准品和0.1M磷酸盐稀释液；酶标记物包括过氧化物酶标记的SAA检测抗体和0.05M磷酸盐缓冲液；发光标记物包括9,10-二氢吖啶标记的SAA捕获抗体和0.05M Tris缓冲液；辅助剂包括发光辅助剂和枸橼酸盐缓冲液。本发明采用试剂空间邻近发光分析检测技术，其作为一种真正意义上的均相化学发光技术，无需清洗、无需载体，没有包被过程，检测灵敏度高，特异性强，使得检测结果更真实可信；同时优化了反应时间和反应步骤，使操作更简单。

1. 血清淀粉样蛋白A检测试剂盒在空间邻近化学发光法检测血清淀粉样蛋白A中的应用,其特征在于,所述血清淀粉样蛋白A试剂盒包括:

酶标记物、发光标记物、辅助剂、触发剂和校准品。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,

所述酶标记物的原料组分包括过氧化物酶标记的SAA检测抗体,所述发光标记物的原料组分包括9,10-二氢吖啶标记的SAA捕获抗体;

所述酶标记物的原料组分还包括0.05M磷酸盐缓冲液;

所述酶标记物的制备方法包括:称取5mg HRP溶解于1mL蒸馏水中,之后加入0.2mL新配的0.1M过碘酸钠溶液,室温下避光搅拌20min,将上述溶液装入透析袋中,对1mM pH4.4的醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜;加入20μL 0.2M pH 9.5碳酸盐缓冲液,然后立即加入1mg抗SAA单克隆抗体室温避光轻轻搅拌2h,加新配的4mg/mL硼氢化钠液,混匀,于4℃放置2h,将上述液装入透析袋中,对0.15M pH 7.4PBS透析,4℃过夜;取出透析物,加适量甘油后置于-20℃冰箱保存;

所述发光标记物的原料组分还包括0.05MTris缓冲液;

所述发光标记物的制备方法包括:

将发光底物Acridan用500μL的DMF溶解;

吸取溶解的Acridan 41.3μL,加入0.05M硼酸钠缓冲液708.7μL,再加入250μL抗SAA单克隆抗体,翻转混匀4~5次,室温静置30min;

将标记反应管置于摇床上,于2~8℃下混合过夜,取出加入适量甘油后置于-20℃冰箱保存。

3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,

所述校准品还包括不同浓度SAA抗原的校准品和校准品稀释液;

所述校准品稀释液的制备方法包括:

称取磷酸二氢钾14.1g,NaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 3.0g,加超纯水溶解,Proclin-300 0.5~1mL,混匀后,加超纯水定容至1000mL,得到校准品稀释液,2~8℃储存备用;

所述校准品的制备方法包括:

校准品的浓度为0、15ng/mL、45ng/mL、135ng/mL、400ng/mL、800ng/mL,用上述校准品稀释液将纯化SAA稀释至相应浓度,2~8℃储存备用。

4. 根据权利要求1~3任一项所述的应用,其特征在于,采用所述检测试剂盒在空间邻近化学发光法检测血清淀粉样蛋白A时,包括步骤:

S1:分别加入25μL标准品、25μL过氧化物酶标记的SAA检测抗体和25μL发光标记物至化学发光反应管;

S2:于37℃恒温箱反应15min;

S3:分别加入5μL辅助剂至化学发光反应管,震荡混匀,静置1~2min;之后分别加入触发剂75μL,震荡混匀,立即检测,读取信号值;

S4:对校准品的浓度和发光值进行logistic四参数拟合,通过样本发光值计算样本浓度。

## 空间邻近化学发光法检测血清淀粉样蛋白A试剂盒的应用及检测方法

[0001] 本申请是申请日为2018年09月25日、申请号为201811115981.9、发明名称为《空间邻近化学发光法检测血清淀粉样蛋白A的试剂盒及其检测方法》的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种空间邻近化学发光法检测血清淀粉样蛋白A的试剂盒及其检测方法。

### 背景技术

[0003] 感染性疾病是临床常见病和多发病,主要是由细菌、病毒和/或真菌等病原体入侵体内引起的炎性反应,多数伴有发热症状。抗菌药物治愈和挽救了众多患者生命的同时,其不合理应用和滥用也导致了众多不良后果,如细菌出现广泛、严重的耐药性。

[0004] 血清淀粉样蛋白是由104个氨基酸组成的多肽,其在天然状态时的相对分子质量约为12000~14000,血清的基因位于第11号染色体是近年发现的一种敏感的炎症标志物,是一种急性期反应蛋白,在急慢性炎症反应时,浓度明显升高,可达正常的1000倍以上;同时,在细菌和病毒感染的早期均可明显升高,创伤、烧伤等应激状态下也会快速增高。

[0005] 血清淀粉样蛋白A(SAA)是一种与心血管疾病发生有密切联系的细胞炎症因子,水平的升高与心血管疾病的发生呈正相关,并且能够早期预测心血管疾病终末事件。已有研究表明:在细菌、真菌、病毒感染、动脉粥样硬化、心血管疾病、急性移植排斥反应、肿瘤等疾病中均可检测到血清SAA升高。与C-反应蛋白(CRP)类似,SAA有助于诊断炎症、并评估其治疗效果,但在某些疾病中,如病毒感染、心血管疾病、移植排斥反应等方面SAA敏感性可高于C-反应蛋白,能为临床诊断提供更好的参考价值。

[0006] SAA联合检测CRP能提高对感染的诊断灵敏度。SAA在病毒感染性疾病中,SAA显著升高,CRP不升高;因此,SAA可以作为诊断病毒感染的敏感指标。SAA联合CRP检测,可鉴别诊断细菌、病毒感染,又能提供新依据,可靠性更强,动态观察疗效并可指导临床用药。SAA联合CRP检测,有利于小儿感染性疾病(新生儿败血症、脓毒症)的早期诊断。

[0007] 目前临床多采用ELISA和散射比浊法,这两种方法线性范围窄,灵敏度低,重复性差。此外,ELISA,需要固相载体(如微孔板),且反应完成后均需要对反应复合物进行清洗,以去除未结合的游离成分。其操作复杂,影响因素多,从而造成检测结果不稳定,重复性不佳。

### 发明内容

[0008] 针对现有技术中的缺陷,本发明目的在于提供一种空间邻近化学发光法检测血清淀粉样蛋白A的试剂盒及其检测方法。该法作为一种真正意义上的均相化学发光技术,无需载体,没有包被、洗涤过程,试剂盒组分少,且灵敏度高、重复性好、操作简单。

[0009] 为实现上述目的,本发明提供的技术方案为:

[0010] 第一方面,本发明提供一种血清淀粉样蛋白A的检测试剂盒,试剂盒包括:酶标记物、发光标记物、辅助剂、触发剂和校准品;其中,酶标记物的原料组分包括过氧化物酶标记的SAA检测抗体,发光标记物的原料组分包括9,10-二氢吡啶标记的SAA捕获抗体。

[0011] 优选地,酶标记物的原料组分还包括0.05M磷酸盐缓冲液;更优选地,制备方法包括:称取5mg HRP溶解于1mL蒸馏水中,之后加入0.2mL新配的0.1M过碘酸钠溶液,室温下避光搅拌20min,将上述溶液装入透析袋中,对1mM pH4.4的醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜;加20μL 0.2M pH 9.5碳酸盐缓冲液,然后立即加入1mg抗SAA单克隆抗体室温避光轻轻搅拌2h,加新配的4mg/mL硼氢化钠液,混匀,于4℃放置2h,将上述液装入透析袋中,对0.15M pH7.4 PBS透析,4℃过夜;取出透析物,加适量甘油置-20℃冰箱保存。

[0012] 优选地,发光标记物的原料组分还包括0.05M Tris缓冲液;更优选地,制备方法包括:发光底物Acridan用500μL的DMF溶解;吸取溶解的Acridan 41.3μL,加入0.05M硼酸钠缓冲液708.7μL,再加入250μL抗SAA单克隆抗体,翻转混匀4~5次,在室温下静置30min;将标记反应管置于摇床上,在2~8℃下混合过夜,取出加入适量甘油置-20℃冰箱保存。

[0013] 优选地,辅助剂的组分包括发光辅助剂和pH 6.0枸橼酸盐缓冲液;更优选地,制备方法包括:称取枸橼酸1.82g,枸橼酸钠10.45g,加纯水溶解并定容至1000mL,在枸橼酸盐缓冲液中加入适量的发光辅助剂,混匀后分装,每瓶10mL置于4℃冰箱保存备用。

[0014] 优选地,触发剂选用0.05M pH 8.0 Tris-HCl缓冲液;更优选地,制备方法包括:称取Tris 6.06g,氯化钠9g,加适量纯水溶解,再加入浓HCl 2.1mL混匀。上述溶液中加入吐温-20 2mL混匀后定容至1000mL,混匀后分装,每瓶200mL置于4℃冰箱保存备用。

[0015] 优选地,校准品包括不同浓度SAA抗原的校准品和0.1M磷酸盐缓冲液;更优选地,制备方法包括:配制校准品稀释液:称取磷酸二氢钾14.1g,磷酸二氢钠(2H<sub>2</sub>O) 3.0g,加适量超纯水溶解,Proclin-3000 0.5~1mL,混匀后,加超纯水定容至1000mL,即为校准品稀释液,2~8℃储存备用;配制校准品:校准品的浓度为0、15ng/mL、45ng/mL、135ng/mL、400ng/mL、800ng/mL,用校准品稀释液将纯化血清淀粉样蛋白A稀释至相应浓度,2~8℃储存备用。

[0016] 本发明试剂盒采用双抗体夹心法检测人血清中血清淀粉样蛋白A(SAA)的含量。将样本、辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗SAA单克隆抗体、9,10-二氢吡啶(Acridan)标记的抗SAA单克隆抗体一起反应,形成抗原抗体夹心复合物,使得辣根过氧化物酶与9,10-二氢吡啶(Acridan)在空间上得以相互接近,加入发光辅助剂及触发剂,产生闪光型化学发光;而未结合的游离的HRP标记抗体和Acridan标记抗体则不发光。样本中的SAA含量越高,测定的发光值(RLU)越大。所以,在一定浓度范围内,发光值与样本浓度成正相关,通过已知浓度的校准品及其发光值绘制工作曲线,即可根据样本的发光值计算出样本中SAA的含量。

[0017] 第二方面,本发明提供的检测试剂盒在空间邻近化学发光法检测血清淀粉样蛋白A中的应用。

[0018] 第三方面,本发明提供的上述检测试剂盒在空间邻近化学发光法检测血清淀粉样蛋白A时的方法,包括步骤:

[0019] S1:分别加入25μL标准品、25μL过氧化物酶标记的SAA检测抗体和25μL发光标记物至反应管;

[0020] S2:于37℃恒温箱反应15min;S3:分别加入5μL辅助剂至反应管,震荡混匀,静置1~2min;之后分别加入触发剂75μL,震荡混匀,立即检测,读取信号值;

[0021] S4:对校准品的浓度和发光值进行logistic四参数拟合,通过样本发光值计算样本浓度。

[0022] 本发明提供的技术方案,具有如下的有益效果:

[0023] (1)与传统的化学发光技术需要以微孔板或磁微粒作为载体包被抗体或抗原相比,本发明提供的试剂盒和检测方法中无需载体,没有包被、洗涤过程,是一种真正意义上的均相化学发光技术。

[0024] (2)传统的酶促化学发光技术在待测分析物先后与捕获抗体和酶标记的检测抗体相结合后必须清洗2~3次,以去除未结合的或者结合不牢固的非特异性物质;而本发明是待测分析物与两个特异性抗体的结合后,通过辅助剂作用消除发光干扰,加入触发剂产生发光信号整个过程无需洗涤。

[0025] (3)传统的酶促化学发光技术需要酶催化底物,5~10分钟左右检测发光值;而本发明是闪光型化学发光,在加入触发剂后立即产生发光信号。

[0026] (4)本发明提供的试剂盒组分少,生产过程简单,生产成本降低,易于放大生产;且检测过程便捷,易于实现全自动化。

[0027] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

## 具体实施方式

[0028] 下面将结合本发明实施例,对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述。以下实施例仅用于更加清楚地说明本发明的技术方案,因此只是作为示例,而不能以此来限制本发明的保护范围。

[0029] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,数据为三次重复实验的平均值或平均值±标准差。

[0030] 本发明提供一种血清淀粉样蛋白A的检测试剂盒,试剂盒包括:酶标记物、发光标记物、辅助剂、触发剂和校准品;其中,酶标记物的原料组分包括过氧化物酶标记的SAA检测抗体和0.05M磷酸盐缓冲液;发光标记物的原料组分包括9,10-二氢吡啶标记的SAA捕获抗体和0.05M Tris缓冲液;辅助剂的原料组分包括发光辅助剂和pH 6.0枸橼酸盐缓冲液;触发剂选用0.05M pH 8.0Tris-HCl缓冲液;校准品包括不同浓度SAA抗原的校准品和0.1M校准品稀释液。

### [0031] 一、校准品的制备

[0032] (1)配制校准品稀释液:称取磷酸二氢钾14.1g,磷酸二氢钠( $2H_2O$ ) 3.0g,加超纯水溶解,Proclin-3000.5~1mL,混匀后,加超纯水定容至1000mL,得到校准品稀释液,2~8℃储存备用。

[0033] (2)配制校准品:校准品的浓度为0、15ng/mL、45ng/mL、135ng/mL、400ng/mL、800ng/mL,用校准品稀释液将纯化血清淀粉样蛋白A稀释至相应浓度,2~8℃储存备用。

### [0034] 二、酶标记物的制备

[0035] (1)称取5mg HRP溶解于1mL蒸馏水中,于上液中加入0.2mL新配的0.1M过碘酸钠溶液,室温下避光搅拌20min,将上述溶液装入透析袋中,对1mMpH4.4的醋酸钠缓冲液透析,4

℃过夜。

[0036] (2) 加20 $\mu$ L 0.2M pH 9.5碳酸盐缓冲液, 然后立即加入1mg抗SAA单克隆抗体室温避光轻轻搅拌2h, 加新配的4mg/mL硼氢化钠液, 混匀, 于4℃放置2h, 将上述液装入透析袋中, 对0.15M pH 7.4PBS透析, 4℃过夜。

[0037] (3) 取出透析物, 加适量甘油置-20℃冰箱保存。

[0038] 三、发光标记物的制备

[0039] (1) 将发光底物Acridan用500 $\mu$ L的DMF溶解。

[0040] (2) 吸取溶解的Acridan41.3 $\mu$ L, 加入0.05M硼酸钠缓冲液708.7 $\mu$ L, 再加入250 $\mu$ L抗SAA单克隆抗体, 翻转混匀4~5次, 在室温下静置30min。

[0041] (3) 将标记反应管置于摇床上, 在2~8℃下混合过夜, 取出加入适量甘油置-20℃冰箱保存。

[0042] 四、辅助剂的制备

[0043] 称取枸橼酸1.82g, 枸橼酸钠10.45g, 加纯水溶解并定容至1000mL, 在枸橼酸盐缓冲液中加入发光辅助剂, 混匀后分装, 置于4℃冰箱保存备用; 其中, 更优选每瓶装10mL。

[0044] 五、触发剂的制备

[0045] 称取Tris 6.06g, 氯化钠9g, 加适量纯水溶解, 再加入浓HCl 2.1mL混匀; 之后加入吐温-202mL, 混匀后定容至1000mL, 分装, 置于4℃冰箱保存备用; 其中, 更优选每瓶装200mL。

[0046] 本发明还提供了一种采用血清淀粉样蛋白A检测试剂盒在空间邻近化学发光法检测血清淀粉样蛋白A时的方法, 包括步骤:

[0047] S1: 分别加入25 $\mu$ L标准品、25 $\mu$ L过氧化物酶标记的SAA检测抗体和25 $\mu$ L发光标记物至化学发光反应管。

[0048] S2: 于37℃恒温箱反应15min。

[0049] S3: 分别加入5 $\mu$ L辅助剂至化学发光反应管, 震荡混匀, 静置1~2min; 之后分别加入触发剂75 $\mu$ L, 震荡混匀, 立即检测, 读取信号值。

[0050] S4: 对校准品的浓度和发光值进行logistic四参数拟合, 通过样本发光值计算样本浓度。

[0051] 下面结合具体实施例对本发明提供的技术方案作进一步说明。

[0052] 实施例一

[0053] 本实施例提供一种血清淀粉样蛋白A的检测试剂盒, 包括: 酶标记物、发光标记物、辅助剂、触发剂和校准品; 其中, 校准品包括不少于6个不同浓度SAA抗原的校准品和0.1M磷酸盐缓冲液; 酶标记物包括过氧化物酶标记的SAA检测抗体和0.05M磷酸盐缓冲液; 发光标记物包括9, 10-二氢吡啶标记的SAA捕获抗体和0.05M Tris缓冲液; 辅助剂的组分包括发光辅助剂和pH 6.0枸橼酸盐缓冲液; 触发剂选用0.05M pH 8.0Tris-HCl缓冲液。

[0054] 一、校准品的制备

[0055] (1) 配制校准品稀释液: 称取磷酸二氢钾14.1g, 磷酸二氢钠(2H<sub>2</sub>O) 3.0g, 加超纯水溶解, Proclin-3000.8mL, 混匀后, 加超纯水定容至1000mL, 得到校准品稀释液, 4℃储存备用。

[0056] (2) 配制校准品: 校准品的浓度为0、15ng/mL、45ng/mL、135ng/mL、400ng/mL、

800ng/mL,用校准品稀释液将纯化血清淀粉样蛋白A稀释至相应浓度,4℃储存备用。

#### [0057] 二、酶标记物的制备

[0058] (1)称取5mg HRP溶解于1mL蒸馏水中,于上液中加入0.2mL新配的0.1M过碘酸钠溶液,室温下避光搅拌20min,将上述溶液装入透析袋中,对1mMpH4.4的醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜;

[0059] (2)加20μL 0.2MpH 9.5碳酸盐缓冲液,然后立即加入1mg抗SAA单克隆抗体室温避光轻轻搅拌2h,加新配的4mg/mL硼氢化钠液,混匀,于4℃放置2h,将上述液装入透析袋中,对0.15MpH 7.4PBS透析,4℃过夜;

[0060] (3)取出透析物,加适量甘油置-20℃冰箱保存。

#### [0061] 三、发光标记物的制备

[0062] (1)将发光底物Acridan用500μL的DMF溶解;

[0063] (2)吸取溶解的Acridan41.3μL,加入0.05M硼酸钠缓冲液708.7μL,再加入250μL抗SAA单克隆抗体,翻转混匀5次,在室温下静置30min;

[0064] (3)将标记反应管置于摇床上,在4℃下混合过夜,取出加入适量甘油置-20℃冰箱保存。

#### [0065] 四、辅助剂的制备

[0066] 称取枸橼酸1.82g,枸橼酸钠10.45g,加纯水溶解并定容至1000mL,在枸橼酸盐缓冲液中加入发光辅助剂,混匀后分装,每瓶10mL置于4℃冰箱保存备用。

#### [0067] 五、触发剂的制备

[0068] 称取Tris 6.06g,氯化钠9g,加适量纯水溶解,再加入浓HCl 2.1mL混匀;之后加入吐温-202mL,混匀后定容至1000mL,分装,每瓶200mL置于4℃冰箱保存备用。

#### [0069] 实施例二

[0070] 本实施例提供一种采用血清淀粉样蛋白A检测试剂盒在空间邻近化学发光法检测血清淀粉样蛋白A时的方法,包括步骤:

[0071] S1:分别加入25μL标准品、25μL过氧化物酶标记的SAA检测抗体和25μL发光标记物至化学发光反应管。

[0072] S2:于37℃恒温箱反应15min。

[0073] S3:分别加入5μL辅助剂至化学发光反应管,震荡混匀,静置1~2min;之后分别加入触发剂75μL,震荡混匀,立即检测,读取信号值。

[0074] S4:对校准品的浓度和发光值进行logistic四参数拟合,通过样本发光值计算样本浓度。

[0075] 本发明采用空间邻近化学发光法检测血清淀粉样蛋白A,灵敏度可达到1mg/L。SAA检测结果对病毒感染的诊断有较高的临床意义,结果显示:99%Echo-30病毒性脑膜炎、97%麻疹、95%腮腺炎的SAA结果都显著升高,而CRP结果有56%的患儿急性期为正常。

[0076] 当然,除了实施例一和实施例二列举的情况,制备过程中的其他条件和参数等也是可以的。

[0077] 申请人经过创造性劳动后发现:本发明提供的检测方法作为一种真正意义上的均相化学发光技术,无需载体,没有包被、洗涤过程,试剂盒组分少,且灵敏度高、重复性好、操作简单。

[0078] 需要注意的是,除非另有说明,本申请使用的技术术语或者科学术语应当为本发明所属领域技术人员所理解的通常意义。除非另外具体说明,否则在这些实施例中阐述的部件和步骤的相对步骤、数字表达式和数值并不限制本发明的范围。在这里示出和描述的所有示例中,除非另有规定,任何具体值应被解释为仅仅是示例性的,而不是作为限制,因此,示例性实施例的其他示例可以具有不同的值。

[0079] 在本发明的描述中,需要理解的是,术语“第一”、“第二”仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此,限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。在本发明的描述中,“多个”的含义是两个以上,除非另有明确具体的限定。

[0080] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围,其均应涵盖在本发明的保护范围当中。