



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102692507 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 16

(21) 申请号 201110215386. 4

(22) 申请日 2011. 07. 29

(73) 专利权人 南京诺尔曼生物技术有限公司  
地址 210029 江苏省南京市雨花台区铁心桥街道马家店工业园区 66-1 号软件楼 5 楼

mindy L..Performance characteristics of an immunoturbidimetric assay for lipoprotein-associated phospholipase A2. 《Clinica Chimica Acta》. 2009, 第 406 卷第 66-70.

审查员 陈伟潘

(72) 发明人 何仕钊

(74) 专利代理机构 北京泛诚知识产权代理有限公司 11298

代理人 杨本良 文琦

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2007/0281323 A1, 2007. 12. 06, 全文.

CN 102121938 A, 2011. 07. 13, 全文.

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

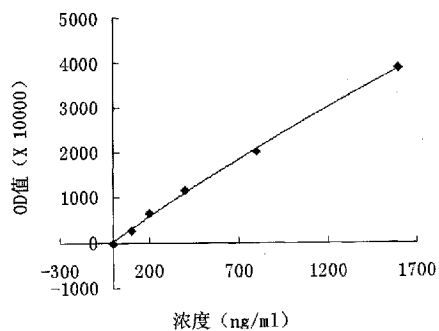
(54) 发明名称

脂蛋白相关磷脂酶 A2 (LPPLA2) 测定试剂盒 (胶乳增强免疫比浊法)

(57) 摘要

本发明涉及一种测定血清中脂蛋白相关磷脂酶 A2 (LP-PLA2) 含量测定的试剂盒。所要解决的技术问题是提供一种适用于全自动生化分析仪以及特定蛋白仪使用的脂蛋白相关磷脂酶 A2 含量的试剂盒。技术方案是:脂蛋白相关磷脂酶 A2 试剂盒,包括;a、试剂 R1:缓冲液、防腐剂、加速剂、表面活性剂,其余为纯化水;b、试剂 R2:缓冲液、结合有抗人的脂蛋白相关磷脂酶 A2 的乳胶微球;c、校准品:缓冲液,稳定剂,防腐剂以及根据浓度需要确定的一定量的重组脂蛋白相关磷脂酶 A2 纯品,其余为纯化水。通过以上试剂组合,建立脂蛋白相关磷脂酶 A2 含量的校准曲线,在仪器上快速的测定血清中脂蛋白相关磷脂酶 A2 的含量与酶联免疫方法测定的结果有很好的符合性。

LP-PLA2校准曲线



1. 一种采用胶乳增强免疫比浊法检测人血清中 LP-PLA2 含量的试剂盒,其特征在于,包含试剂 R1、R2 以及标准品;所述试剂 R1pH 值为 6.0-8.0 的缓冲液,所述试剂 R2 为抗人 LP-PLA2 抗体胶乳试剂;所述标准品为含有定量的 LP-PLA2 的重组蛋白或者是从人血清中提取出来的天然 LP-PLA2。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述抗人 LP-PLA2 抗体的胶乳试剂的制备为化学包被,包括以下步骤:

步骤 1:将羧化的胶乳在 pH6.5 的溶液活化;

步骤 2:洗涤去掉溶液中的碳化二亚胺,加 pH7.5-9.0 的缓冲液,加入 LP-PLA2 抗体,在 37 度反应 4 小时;

步骤 3:将步骤 2 所得的液体用 pH7.5-9.0 的固定液固定 6 小时;

步骤 4:将步骤 3 所得的液体用 pH7.5-9.0 的封闭液体封闭 12 小时;

步骤 5:将步骤 4 所得的液体离心去上清液,取沉淀后用含有稳定剂和防腐剂的缓冲液洗涤分散即得。

3. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于,步骤 1 所述溶液为含有 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐或 N-羟基琥珀酰亚胺中的一种或者二种。

4. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于,步骤 3 所述液体含有 6-氨基己酸或甘氨酸。

5. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于,步骤 4 所述液体含有的稳定剂选自甘氨酸、小牛血清、吐温-20、曲拉通、氯化钠、氯化镁中的一种或者几种。

6. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于,步骤 4 所述液体含有的甘氨酸、小牛血清的浓度为 0.05-0.5%质量分数;吐温-20 或者曲拉通浓度为 0.005-0.01%体积分数;氯化镁、氯化钠的浓度为 0.05-0.15%质量分数。

## 脂蛋白相关磷脂酶 A2 (LPPLA2) 测定试剂盒 (胶乳增强免疫比浊法)

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种采用胶乳增强免疫比浊法测定人血清中脂蛋白相关磷脂酶 A2 含量的试剂盒。

### 背景技术

[0002] 脂蛋白相关磷脂酶 A2 (Lp-PLA2) 属于磷脂酶 A2 超家族,主要由炎症细胞 (如巨噬细胞、淋巴细胞等) 分泌。Lp-PLA2 是由 441 个氨基酸组成的蛋白质,分子量为 45kDa,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。LP-PLA2 具有降解血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF) 的活性,因此也被称为血小板活化因子乙酰水解酶 (platelet-activating factor acetylhydro-lase, PAF-AH)。血小板活化因子有促进血小板聚集、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,从而促进血栓形成和炎症反应。而 LP-PLA2 能将 PAF 水解为无活性的溶血 PAF,故能减少炎症和血栓的形成,具有抗炎和抗动脉粥样硬化作用。脂蛋白相关磷脂酶 A2 除水解 PAF 外,还能水解 Sn-2 位含有多不饱和脂肪酰基的氧化磷脂,循环中低密度脂蛋白 low density lipoprotein, LDL) 相关 Lp-PI A2 复合物经管腔进入内膜,在内膜 LDL 被氧化,LDL 上的卵磷脂变成氧化卵磷脂。Lp-PLA2 随即水解氧化卵磷脂生成溶血卵磷脂和氧化型游离脂肪酸。后二者是促炎介质,能刺激粘附因子和细胞因子的产生,从而促进单核细胞由管腔向内膜聚集。单核细胞在内膜聚集后衍生为巨噬细胞,巨噬细胞吞噬氧化型 LDL 变成泡沫细胞。泡沫细胞聚集成动脉粥样硬化性斑块,脆弱斑块的破裂,易导致血栓形成和心血管事件的发生。因此,Lp-PLA2 同时又具有促动脉粥样硬化形成的作用。尽管 Lp-PLA2 能水解 PAF 而抗炎,但其在血浆中占优势的作用是水解氧化卵磷脂生成大量溶血卵磷脂和氧化型游离脂肪酸,而后二者又表现出很强的促动脉粥样硬化形成的作用,临床及实验室的研究结果均证实了这一点。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的是建立一种新的检测方法,通过单抗人的脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗体 (或者单抗) 与胶乳颗粒偶联,采用胶乳增强比浊法来测定人体血清中 LP-PLA2 的含量,运用该方法的试剂应具有不需要预处理标本,操作简单,准确度高,重复性好,且能够在全自动生化分析仪或者特种蛋白仪以及分光光度计上使用。

[0004] 为了解决上述的技术问题,本发明实现了以下技术:

[0005] 1. 一种采用胶乳增强免疫比浊法检测 LP-PLA2 含量的试剂盒,其特征在于,包含试剂 R1, R2 以及校准品;所述试剂 R1 :pH 值为 6.5-8.0 的缓冲液,所述试剂 R2 为抗人 LP-PLA2 抗体胶乳试剂;所述校准品为含有定量的 LP-PLA2 的重组蛋白或者是从人血清中提取出来的天然 LP-PLA2。

[0006] 2. 所述的 LP-PLA2 检测试剂盒中的 R1 试剂主要包含缓冲液,无机盐,加速剂和防

腐剂。

[0007] 3. 所述的 LP-PLA2 检测试剂盒中 R2 试剂主要包含稳定剂, 抗人单(多)克隆抗体胶乳颗粒, 缓冲液, 稳定剂和防腐剂。其中乳胶微球直径为 60-300nm。

[0008] 4. 试剂 R1 所述的无机盐选自氯化钠, 氯化镁, 氯化钾一种或几种。缓冲液为: 磷酸盐缓冲液, 碳酸盐缓冲液, 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液。加速剂为聚乙二醇 4000, 聚乙二醇 6000, 聚乙二醇 8000。

[0009] 5. 试剂 R2 所选用的抗体为鼠抗人 LP-PLA2 单克隆抗体, 羊抗人 LP-PLA2 单克隆抗体, 兔抗人 LP-PLA2 单克隆抗体一种或者几种混合。也可以选鼠抗人 LP-PLA2 多克隆抗体, 羊抗人 LP-PLA2 多克隆抗体, 兔抗人 LP-PLA2 多克隆抗体其中一种。

[0010] 6. 试剂 R2 中的稳定剂选自小牛白蛋白, 甘氨酸, 明胶, 吐温 20, 曲拉通一种或者几种。

[0011] 7. 本发明所述的试剂 R2 为抗人 LP-PLA2 抗体胶乳试剂, 采用的是抗人的 LP-PLA2 抗体与胶乳颗粒相偶联。经过离心(过滤)的方法去掉未反应的偶联剂以及未反应的抗体, 在含有稳定剂和防腐剂的缓冲液中分散而成。

[0012] 8. 所述抗人 LP-PLA2 抗体的胶乳试剂的制备包括以下步骤。

[0013] 步骤 1: 将胶乳在 pH6.5 的溶液中活化。

[0014] 步骤 2: 洗涤去掉溶液中的碳化二亚胺, 加 pH7.5-9.0 的缓冲液, 加入 LP-PLA2 抗体, 在 37 度反应 4 小时。

[0015] 步骤 3: 将步骤 2 所得的液体用 pH7.5-9.0 的固定液固定 6 小时。

[0016] 步骤 4: 将步骤 3 所得的液体用 pH7.5-9.0 的封闭液体封闭 12 小时。

[0017] 步骤 5: 将步骤 4 所得的液体洗涤去掉未结合抗体, 溶液用含有稳定剂和防腐剂的缓冲液洗涤分散即得。

[0018] 9. 作为优选, 步骤 1 中所用的缓冲液为 PBS 缓冲液, MES 缓冲液, 碳酸盐缓冲液中的任何一种缓冲液, 且浓度在 20-100mmol/L, pH 在 5.5-6.5 之间。

[0019] 10. 作为优选, 步骤 1 中所用的胶乳可以是羧基化的聚苯乙烯胶乳或者是氨基化的聚苯乙烯胶乳。其孔径在 60nm-150nm 均可。

[0020] 11. 作为优选, 步骤 1 中含有 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐或 N-羟基琥珀酰亚胺中的一种或者多种。

[0021] 12. 作为优选, 在步骤 2 中, 去掉溶液 1 中所含的未反应的物质, 采用的是高速冷冻离心机或者超微孔径的过滤膜进行过滤。

[0022] 13. 作为优选, 在步骤 5 中, 所用的稳定剂是小牛血清白蛋白, 明胶, 甘氨酸, 脱脂奶粉一种或者几种相混合。

[0023] 本发明检测的原理是: 利用抗原抗体反应, 先加入试剂 R1, 使血清中的 LP-PLA2 的位点暴露, 当加入抗人的 LP-PLA2 胶乳颗粒溶液, 使溶液中的抗原抗体反应形成不溶于溶液的抗原抗体复合物, 从而产生一定的浊度, 在人血清中 LP-PLA2 的含量在一定的范围内 LP-PLA2 的含量与浊度成正比。再通过标准曲线进行计算, 从而得到 LP-PLA2 的含量。

[0024] 本发明与现有技术相比, 具有如下特点:

[0025] 1) 本发明试剂盒具有较高的检测灵敏度, 最低检测能够达到 0.1ng/L, 操作简单, 快速, 从检测到出结果最多只需要 10 分钟, 甚至更短。

[0026] 2) 本发明的试剂盒 R2 试剂中的抗体乳胶的制备由于采用的化学偶联法,稳定性好,在 2-8 度至少可以保存 12 个月。而采用物理吸附法的胶乳抗体试剂,批间差异比较大,而且稳定性不好。

[0027] 3) 本发明试剂盒与进口试剂盒对样品中 LP-PLA2 含量检测的数据经统计分析,无显著性差异,检测结果可靠,在临床上可以替代进口试剂或者化学发光试剂,大幅降低成本以及检测时间。

#### 附图说明

[0028] 图 1 为本发明实施例 1 的校准曲线

[0029] 实施案例

[0030] 本发明公开了一种检测 LP-PLA2 含量的试剂盒,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,他们都被视为包括在本发明内。本发明的产品及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围对本文所述的方法和 应用进行改动或者适当变更与组合,本实现和应用本发明技术。

[0031] 一、LP-PLA2 试剂 R2 即抗人 LP-PLA2 抗体胶乳试剂的制备

[0032] 1:将 2g 孔径大小为 80nm 的羧基化的胶乳加入到 50ml 的含有 1-(3- 二甲基氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺 200mg/L 的 pH6.0 的 0.4mol/L 的 MES 缓冲液中,反应 30 分钟。

[0033] 2:将反应液分成 25ml/ 管,在转速为 16000 转 / 分的高速冷冻离心机中离心 30 分钟后,去掉上清液,每管加浓度为 0.4mol/L 的磷酸盐缓冲液 5ml 混匀。继续在速为 16000 转 / 分的高速冷冻离心机中离心 30 分钟后,去掉上清液,每管加浓度为 0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液 25ml 混匀。

[0034] 3:每管加入羊抗人 LP-PLA2 抗体 25mg,在 37 度反应 6 小时。

[0035] 4:向每管中加入还有 10g/L 的 6- 氨基己酸 pH 8.0 的磷酸盐缓冲液 10ml。

[0036] 5:每管液体加小牛白蛋白 0.8g,摇匀反应 12 小时。

[0037] 6:将所得的液体通过 2 次离心,转速为 16000 转 / 分,洗涤去掉未结合抗体,溶液用含有 0.5g/L 的明胶和 0.2g/L 小牛白蛋白和 0.05% 的曲拉通以及 0.1g/L 叠氮钠的 0.05mol/L PBS 缓冲液分散即可。

[0038] 二、LP-PLA2 试剂 R1 即样品缓冲液的制备

[0039]

磷酸二氢钠	2.86g/L
磷酸氢二钠	28.65g/L
氯化钠	6.87g/L
氯化镁	0.34g/L
聚乙二醇 6000	16g/L
叠氮钠	1.5g/L
纯水	1L

[0040] 三、LP-PLA2 试剂中校准品的制备

[0041]

1) 校准品稀释液

磷酸二氢钠	2.86g/L
磷酸氢二钠	28.65g/L
氯化钠	9g/L
小牛白蛋白	50g/L
叠氮钠	2.5g/L
稳定剂	10g/L

[0042] 2) 按照需要的 LP-PLA2 参考校准品浓度将相应的重组 LP-PLA2 纯品 1.6mg 加入校准品稀释液 1ml 的缓冲液中, 制备得到 1600ng/ml 浓度的 LP-PLA2 校准品在使用的时候在用缓冲液按照比例稀释成多个浓度。

[0043] 四、LP-PLA2 测定方法 ( 日立 7060 全自动生化分析仪 )

[0044] 校准品浓度 :1600ng/ml 800ng/ml 400ng/ml 200ng/ml 100ng/ml 0ng/ml

[0045] 测定波长 :主波长 :340nm 副波长 :800nm

[0046] 试剂比例 :R1:R2:S = 200ul:50ul:10ul

[0047] 校准方式 :spline

[0048] 读点方式 :在试剂 R1 与样品加入, 反应 5 分钟, 读点 A1, 然后加入 R2 后, 反应 5 分钟, 再读点 A2, 计算吸光度的变化。

[0049] 校准曲线见图 1

[0050] 五、本发明所述试剂盒的分析性能评估

[0051] 1. 灵敏度测定

[0052] 用本发明所述的试剂盒对空白样本 ( 含有 5% 牛血清的生理盐水 ) 重复测定 20 次, 最低检测限度为空白的均值浓度加上二个标准差, 得到最低检测限度为 5ng/ml。

[0053] 2. 线性范围。

[0054] 2. 线性评估

[0055] 取浓度将近 1600ng/ml (1340.5ng/ml) 的临床血清标本, 进行稀释, 至少稀释 6 个点, 每个点重复测定 3 次, 根据式 (1), (2), (3) 计算出直线方程  $y = a+bx$  :

[0056] 
$$b = \frac{n \sum X_i Y_i - \sum X_i \cdot \sum Y_i}{n \sum X_i^2 - (\sum X_i)^2} \dots\dots\dots (1)$$

[0057] 
$$|a| = \frac{|\sum Y_i - b \sum X_i|}{n} \dots\dots\dots (2)$$

[0058] 
$$r = \frac{n \sum X_i Y_i - \sum X_i \cdot \sum Y_i}{\sqrt{[n \cdot \sum X_i^2 - (\sum X_i)^2][n \cdot \sum Y_i^2 - (\sum Y_i)^2]}} \dots\dots\dots (3)$$

[0059] 式中 :b—回归线的斜率 ;

[0060] |a|—回归线截距的绝对值 ;

- [0061]  $r$ —回归系数；
- [0062]  $X_i$ —测定管溶液的浓度；
- [0063]  $Y_i$ —3次重复测定的与测定管溶液浓度对应的吸光度均值；
- [0064]  $i$ —1, 2, 3, …… $n$ ；
- [0065]  $n$ —测定样本数。
- [0066] 经计算得出,在 0.1ng/ml 到 1340ng/ml 的范围内,本试剂盒能达到很好的线性。
- [0067] 3. 与酶联免疫方法的试剂盒测定结果的相关性。
- [0068] 通过测定 100 例标本(其中阳性血清 70 例,阴性血清 30 例)本试剂盒与酶联免疫方法的试剂盒的相关系数  $R^2 = 0.987$ , 相关方程为:  $Y = 0.932X - 6.237$ 。

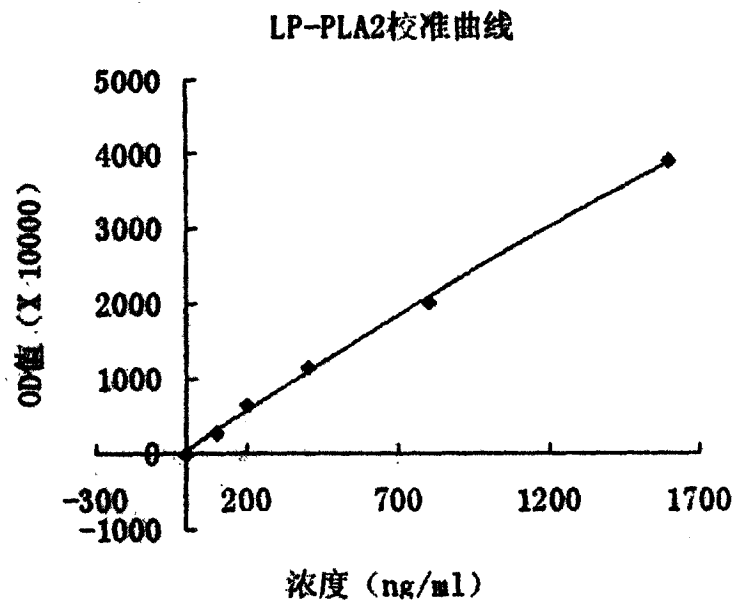


图 1

专利名称(译)	脂蛋白相关磷脂酶A2(LPPLA2)测定试剂盒(胶乳增强免疫比浊法)		
公开(公告)号	<a href="#">CN102692507B</a>	公开(公告)日	2015-09-16
申请号	CN201110215386.4	申请日	2011-07-29
[标]申请(专利权)人(译)	南京诺尔曼生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京诺尔曼生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京诺尔曼生物技术有限公司		
[标]发明人	何仕钊		
发明人	何仕钊		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
代理人(译)	文琦		
其他公开文献	CN102692507A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种测定血清中脂蛋白相关磷脂酶A2(Lp-PLA2)含量测定的试剂盒。所要解决的技术问题是提供一种适用于全自动生化分析仪以及特定蛋白仪使用的脂蛋白相关磷脂酶A2含量的试剂盒。技术方案是：脂蛋白相关磷脂酶A2试剂盒，包括；a、试剂R1：缓冲液、防腐剂、加速剂、表面活性剂，其余为纯化水；b、试剂R2：缓冲液、结合有抗人的脂蛋白相关磷脂酶A2的乳胶微球c、校准品：缓冲液，稳定剂，防腐剂以及根据浓度需要确定的一定量的重组脂蛋白相关磷脂酶A2纯品，其余为纯化水。通过以上试剂组合，建立脂蛋白相关磷脂酶A2含量的校准曲线，在仪器上快速的测定血清中脂蛋白相关磷脂酶A2的含量与酶联免疫方法测定的结果有很好的符合性。

