



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103645326 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 16

(21) 申请号 201310683802. 2

(22) 申请日 2013. 12. 13

(73) 专利权人 同昕生物技术(北京)有限公司
地址 102206 北京市昌平区生命园路 29 号
创新大厦 A 座 204 室

(72) 发明人 吴凡 焦守恕

(74) 专利代理机构 北京海虹嘉诚知识产权代理
有限公司 11129
代理人 吴泳历

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101441219 A, 2009. 05. 27, 权利要求 1,
说明书第 2 页第 3 段, 第 6 页第 10 行.

CN 102253225 A, 2011. 11. 23, 权利要求 1,
说明书第 0009 段.

CN 1147855 A, 1997. 04. 16, 说明书第 6 页.

CN 101105498 A, 2008. 01. 16, 权利要求 2 和
4.

CN 103048457 A, 2013. 04. 17, 全文.

CN 102692507 A, 2012. 09. 26, 全文.

US 2009/0081703 A1, 2009. 03. 26, 全文.

陈建林等. 脂蛋白相关的磷脂酶 A2 与脑血管
意外的相关研究及其临床应用价值. 《现代中西医
结合杂志》. 2011, 第 20 卷 (第 25 期), 3172-3173.

李青芳等. 脂蛋白相关磷脂酶 A2 与脑梗死患
者颈动脉不稳定粥样斑块的关系. 《实用医学杂
志》. 2009, 第 25 卷 (第 2 期), 224-226.

审查员 李宏悦

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

检测脂蛋白相关磷脂酶 A2 的化学发光酶联
免疫试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了检测脂蛋白相关磷脂酶 A2 的
化学发光酶联免疫试剂盒及其制备方法。本发明
所提供的检测脂蛋白相关磷脂酶 A2 的化学发光
酶联免疫试剂盒, 包括包被有抗脂蛋白相关磷脂
酶 A2 单克隆抗体的化学发光板, 其特征在于: 还
包括样品处理液; 所述样品处理液主要由 A 液和
B 液组成; 所述 A 液含有 7. 5g/L 氯化铵、1. 2g/L
酪蛋白和 1. 2g/L 硬脂酸钠; 所述 B 液含有 0. 5M
Tris-HCl, PH7. 6。为最大限度减低 Lp-PLA2 发光
检测噪音, 本发明的试剂盒中还包括独特的血液
样品处理剂配方, 有助于淬灭非特异性光源, 大大
增强检测光与本底杂光的差别, 增加检测特异性。

CN 103645326 B

1. 一种检测脂蛋白相关磷脂酶 A2 的化学发光酶联免疫试剂盒,包括包被有抗脂蛋白相关磷脂酶 A2 单克隆抗体的化学发光板,其特征在于:还包括样品处理液;所述样品处理液主要由 A 液和 B 液组成;所述 A 液含有 7.5g/L 氯化铵、1.2g/L 酪蛋白和 1.2g/L 硬脂酸钠;所述 B 液含有 0.5M Tris-HCl, pH7.6。

2. 根据权利要求 1 所述的检测脂蛋白相关磷脂酶 A2 的化学发光酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括样品稀释液;所述样品稀释液由如下方法制备得到:将 100ml 山羊血清、20ml 重量百分比浓度为 1% 的硫柳汞、10ml 0.1M 铁氰化钾、0.5ml 吐温 -20、10ml 10mg/ml 的庆大霉素、以及余量为 pH7.40.01M PBS 缓冲液定容至 1000ml,即得到所述样品稀释液。

3. 根据权利要求 2 所述的检测脂蛋白相关磷脂酶 A2 的化学发光酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括浓缩洗涤液;所述浓缩洗涤液由如下方法制备得到:将 2.96g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、29g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、234g NaCl 和 20ml 吐温 -20,加双蒸水定容至 1000ml,即得到浓缩洗涤液。

4. 根据权利要求 3 所述的检测脂蛋白相关磷脂酶 A2 的化学发光酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括化学发光底物液;所述化学发光底物液由化学发光底物液 R1 和化学发光底物液 R2 组成;所述化学发光底物液 R1 为 3.0mmol/L 鲁米诺与 0.3mmol/L 对碘苯酚的混合液;化学发光底物液 R2 为 7.5mmol/L 的双氧水。

5. 根据权利要求 4 所述的检测脂蛋白相关磷脂酶 A2 的化学发光酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括标准品溶液;所述标准品溶液为 6 个浓度梯度的脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗原,所述浓度依次为:0ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、250ng/ml、500ng/ml 和 1000ng/ml。

6. 根据权利要求 5 所述的检测脂蛋白相关磷脂酶 A2 的化学发光酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括高值对照液和低值对照液;所述高值对照液或低值对照液由向胎牛血清中添加重组脂蛋白相关磷脂酶 A2 制备得到;所述高值对照的终浓度为 700ng/ml;所述低值对照的终浓度为 300ng/ml。

7. 权利要求 1-6 中任一所述检测脂蛋白相关磷脂酶 A2 的化学发光酶联免疫试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

(1) 制备抗体包被液:0.36g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3.10g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 定容至 1L, pH7.6;

(2) 包被;

(3) 封闭;

其特征在于:还包括制备样品处理液的步骤:将 7.5g 氯化铵、1.2g 酪蛋白和 1.2g 硬脂酸钠,加入纯化水定容 1L,即得到 A 液;pH7.6、0.5M Tris-HCl 溶液为 B 液;将所述 A 液和 B 液分别独立包装,即得到所述样品处理液。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其特征在于:所述包被的条件为 2-8℃、18-24 小时。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其特征在于:所述封闭的条件为 4℃封闭 12 小时。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其特征在于:所述封闭采用的封闭液由如下方法制备得到:向 pH 值为 7.0-7.5、浓度为 10mM 的 Tris 缓冲液中加入质量百分比终浓度 2% 的苏氨酸、质量百分比终浓度 1% 的蔗糖、质量百分比终浓度 0.5% 的 β -巯基乙醇。

检测脂蛋白相关磷脂酶 A2 的化学发光酶联免疫试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及化学发光酶联免疫技术检测领域,尤其涉及检测脂蛋白相关磷脂酶 A2 的化学发光酶联免疫试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 脂蛋白相关磷脂酶 A2 (Lp-PLA2)是磷酸脂酶 A2 超家族中的非钙离子依赖型磷酸脂酶,最初发现其可以降解血小板活化因子,曾被称为血小板活化因子乙酰水解酶。1995年首次被克隆,其编码基因 (PLA2G7),有 12 个外显子,染色体定位于 6p21. 2212,由 441 个氨基酸残基组成的一种丝氨酸脂酶,相对分子质量为 50×10^3 (50kDa)。Lp-PLA2 以生物膜磷脂为天然底物优先作用于氧化磷脂 sn22 位上短脂酰链中的酯键,使水溶性强的磷脂产生游离脂肪酸和溶血磷脂参与磷脂的代谢。

[0003] 循环中 Lp-PLA2 主要来源于血细胞,如单核细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞和肥大细胞受炎症刺激时少量分泌,并受炎性介质的调节,如 $\gamma 2$ 干扰素和脂多糖抑制其分泌,血小板活化因子促进其分泌。联合应用原位杂交和免疫组织化学技术研究发现,兔和人动脉粥样硬化斑块中的巨噬细胞可表达更高水平的 Lp-PLA2mRNA 和蛋白。人血浆中的 Lp-PLA2 与脂蛋白颗粒结合的形式存在,其中 2/3 与低密度脂蛋白 (low density lipop rotein, LDL) 结合,主要是小而密的 LDL 结合,其中带负电荷的 LDL 中的 Lp-PLA2 含量和活性更高,促进内皮细胞趋化因子释放,促进炎症反应。1/3 与高密度脂蛋白 (high density lipop rotein, HDL) 和极低密度脂蛋白 (very low density lipop rotein, VLDL) 结合。Lp-PLA2 与人类 HDL 结合少的原因,可能是由于人 Lp-PLA2 氨基端的高度糖基化阻碍了其 HDL 的结合。

[0004] 目前实验研究及流行病学研究结果揭示了 Lp-PLA2 生成多种促炎产物,参与从动脉粥样斑块形成到斑块不稳定的各个阶段,具有促进炎症反应作用,可能成为新的心脑事件独立预测因子。血浆 Lp-PLA2 测量是一个有价值的方法,可用来鉴别或预测具有心脑血管疾病高风险事件的个体。

[0005] 目前为止,没有见到利用 Lp-PLA2 与心脑血管疾病之间的相关关系来制备检测人 Lp-PLA2 的水平试剂盒的报道。

发明内容

[0006] 本发明根据上述领域存在的空白和需求,提供了检测脂蛋白相关磷脂酶 A2 的化学发光酶联免疫试剂盒及其制备方法。

[0007] 本发明的一个目的是提供检测脂蛋白相关磷脂酶 A2 的化学发光酶联免疫试剂盒。

[0008] 本发明所提供的检测脂蛋白相关磷脂酶 A2 的化学发光酶联免疫试剂盒,包括包被有抗脂蛋白相关磷脂酶 A2 单克隆抗体的化学发光板,还包括样品处理液;所述样品处理

液主要由 A 液和 B 液组成 ; 所述 A 液含有 7.5g/L 氯化铵、1.2g/L 酪蛋白和 1.2g/L 硬脂酸钠 ; 所述 B 液含有 0.5M Tris-HCl, PH7.6。

[0009] 所述试剂盒还包括样品稀释液 ; 所述样品稀释液由如下方法制备得到 : 将 100ml 山羊血清、20ml 重量百分比浓度为 1% 的硫柳汞、10ml 0.1M 铁氰化钾、0.5ml 吐温 -20、10ml 10mg/ml 的庆大霉素、以及余量为 PH7.40.01M PBS 缓冲液定容至 1000ml, 即得到所述样品稀释液。

[0010] 所述试剂盒还包括浓缩洗涤液 ; 所述浓缩洗涤液由如下方法制备得到 : 将 2.96g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、29g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、234g NaCl 和 20ml 吐温 -20, 加双蒸水定容至 1000ml, 即得到浓缩洗涤液。

[0011] 所述试剂盒还包括化学发光底物液 ; 所述化学发光底物液由化学发光底物液 R1 和化学发光底物液 R2 组成 ; 所述化学发光底物液 R1 为 3.0mmol/L 鲁米诺与 0.3mmol/L 对碘苯酚的混合液 ; 化学发光底物液 R2 为 7.5mmol/L 的双氧水。

[0012] 所述试剂盒还包括标准品溶液 ; 所述标准品溶液为 6 个浓度梯度的脂蛋白相关磷脂酶 A2 抗原, 所述浓度依次为 : 0ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、250ng/ml、500ng/ml 和 1000ng/ml。

[0013] 所述试剂盒还包括高值对照液和低值对照液 ; 所述高值对照液或低值对照液由向胎牛血清中添加重组脂蛋白相关磷脂酶 A2 制备得到 ; 所述高值对照的终浓度为 700ng/ml ; 所述低值对照的终浓度为 300ng/ml。

[0014] 本发明的另一个目的是提供所述检测脂蛋白相关磷脂酶 A2 的化学发光酶联免疫试剂盒的制备方法。

[0015] 本发明所提供的所述检测脂蛋白相关磷脂酶 A2 的化学发光酶联免疫试剂盒的制备方法, 包括如下步骤 :

[0016] (1) 制备抗体包被液 : 0.36g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3.10g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 定容至 1L, pH7.6 ;

[0017] (2) 包被 ;

[0018] (3) 封闭 ;

[0019] 其特征在于 : 还包括制备样品处理液的步骤 : 将 7.5g 氯化铵、1.2g 酪蛋白和 1.2g 硬脂酸钠, 加入纯化水定容 1L, 即得到 A 液 ; PH7.6、0.5M Tris-HCl 溶液为 B 液 ; 将所述 A 液和 B 液分别独立包装, 即得到所述样品处理液。

[0020] 所述包被的条件为 2-8°C、18-24 小时。

[0021] 所述封闭的条件为 4°C 封闭 12 小时。

[0022] 所述封闭采用的封闭液由如下方法制备得到 : 向 PH 值为 7.0-7.5、浓度为 10mM 的 Tris 缓冲液中加入质量百分比终浓度 2% 的苏氨酸、质量百分比终浓度 1% 的蔗糖、质量百分比终浓度 0.5% 的 β -巯基乙醇。

[0023] 本发明采用抗 Lp-PLA2 单克隆抗体包被空白化学发光板, 得到检测 Lp-PLA2 的化学发光酶联免疫试剂盒的核心部件化学发光板。使用时, 可按照常规化学发光酶联免疫检测的方法配置其它所需试剂与上述化学发光板配合使用。本发明优选提供试剂盒盒内还放置有其它盛装着化学发光酶链免疫反应所需试剂的部分或全部试剂瓶的试剂盒方案, 便于检测反应。该试剂盒可用于鉴别或预测具有心脑血管疾病高风险事件的个体。从实施例可以看出, 本发明试剂盒对于 Lp-PLA2 的最低检测限可低至 0.1ng/mL。

[0024] 为最大限度减低 Lp-PLA2 发光检测噪音,本发明的试剂盒中还包括独特的血液样品处理剂配方,有助于淬灭非特异性光源,大大增强检测光与本底杂光的差别,增加检测特异性。

具体实施方式

[0025] 本发明的检测脂蛋白相关磷脂酶 A2 化学发光酶联免疫试剂盒包括:

[0026] 化学发光板(包被有抗脂蛋白相关磷脂酶 A2 单克隆抗体的 96 微孔或 48 微孔的化学发光板)、样品处理液(A 液 +B 液)、其它盛装着化学发光酶链免疫反应所需试剂的试剂瓶——(抗 Lp-PLA2 酶结合物、标准品 6 瓶、Lp-PLA2 高值对照、Lp-PLA2 低值对照、样品稀释液、化学发光底物液 R1、化学发光底物液 R2、洗涤液(20x 浓缩)各 1 瓶)、说明书一份,不干胶纸片 2 张。

[0027] 抗脂蛋白相关磷脂酶 A2 单克隆抗体(Lp-PLA2 单克隆抗体)购自天津胜发生物技术有限公司。

[0028] 实施例 1、检测脂蛋白相关磷脂酶 A2 的化学发光酶联免疫试剂盒制备及其检测方法

[0029] 一、制备检测脂蛋白相关磷脂酶 A2 的化学发光酶联免疫试剂盒

[0030] 1、样本处理液的配制

[0031] 样品处理液配方:由 A 液和 B 液组成,其中 A 液为 7.5g 氯化铵,1.2g 酪蛋白,1.2g 硬脂酸钠,加入纯化水定容 1L,即 A 液中含有 7.5g/L 氯化铵、1.2g/L 酪蛋白和 1.2g/L 硬脂酸钠;B 液为 0.5M Tris-HCl 溶液(PH7.6)。

[0032] 2、包被抗 Lp-PLA2 单克隆抗体为化学发光反应板

[0033] 以下抗体包被液的配方为:

[0034] 0.36g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3.10g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 定容至 1L, pH7.6。

[0035] 酶标板选乳白色不透明聚苯乙烯 96 孔化学发光酶标板(英国 Porvair, 96 孔板)。

[0036] 抗体检测板的最佳制备条件为,使用包被单克隆抗体以最佳包被抗体浓度进行包被,用 50mM pH 值为 7.6 的磷酸盐缓冲液配制成包被浓度为 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的 Lp-PLA2 单抗包被液,并将包被液负载于微孔板($100 \mu\text{l}/\text{孔}$), $2-8^\circ\text{C}$ 包被 18-24 小时。

[0037] 加入封闭液, $300 \mu\text{l}/\text{孔}$, 4°C 封闭 12 小时,随后弃去封闭液拍干,室温干燥 4 小时。干燥后的化学发光板,迅速真空封口包装,将封装好的板存于 $2-8^\circ\text{C}$ 。所述封闭采用的封闭液配方为:pH 值为 7.0-7.5,浓度为 10mM 的 Tris 缓冲液中加入质量百分比终浓度 2% 的苏氨酸、质量百分比终浓度 1% 的蔗糖、质量百分比终浓度 0.5% 的 β -巯基乙醇。

[0038] 3、标准品的制备:将重组全长 Lp-PLA2 抗原(美国 abnova 公司)用蛋白稳定剂(北京科跃中楷生物技术有限公司)稀释成 6 个梯度浓度,分别是:0ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、250ng/ml、500ng/ml 和 1000ng/ml。

[0039] 4、样品稀释液、浓缩洗涤液的配制:

[0040] A、样品稀释液

[0041] 山羊血清 100ml (Biotopped, 100ml/瓶)

[0042] 1%(重量比)硫柳汞 20ml (EYSIN, 1kg)

[0043] 0.1M 铁氰化钾 10ml (acros, 100g/瓶)

- [0044] 吐温 -200.5ml (amres, 500ml/ 瓶)
- [0045] 10mg/ml 庆大霉素 10ml (sigma, 500mg/ 瓶)
- [0046] 加 0.01M PBS (PH7.4) 定容至 1000ml, 过滤除菌, 4℃ 保存。
- [0047] B、洗涤液 (20 倍浓缩)
- [0048] $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. 96g (北京化学试剂公司, 500g/ 瓶)
- [0049] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 29g (北京化学试剂公司, 500g/ 瓶)
- [0050] NaCl 234g (北京化学试剂公司, 500g/ 瓶)
- [0051] 吐温 -20 20ml (amres, 500ml/ 瓶)
- [0052] 加双蒸水定容至 1000ml, 过滤除菌, 4℃ 保存。
- [0053] 5、化学发光底物的制备
- [0054] 化学发光体系由发光剂 (鲁米诺, sigma)、增强剂 (对碘苯酚, dily) 及双氧水 (上海实验试剂有限公司) 构成。化学发光底物液由化学发光底物液 R1 和化学发光底物液 R2 组成。
- [0055] 化学发光底物液 R1 为 3.0mmol/L 鲁米诺与 0.3mmol/L 对碘苯酚的混合液, 化学发光底物液 R2 为 7.5mmol/L 的双氧水。
- [0056] 6、高值对照和低值对照的制备
- [0057] 胎牛血清 (gibco, 500ml/ 瓶) 中添加一定量的重组 Lp-PLA2 抗原蛋白 (美国 abnova 公司), 高值对照的终浓度为 700ng/ml, 低值对照的终浓度为 300ng/ml, 过滤除菌。
- [0058] 二、试剂盒的应用及测操作程序
- [0059] (1) 平衡: 从冷藏环境中取出试剂及样品, 置于室温 (18-25℃) 平衡约 30 分钟。
- [0060] (2) 样品处理: 将样品处理液中的 A 液和 B 液混合, 然后取充分混匀的待检全血样本 25 μl 加入 200 μl 样品处理液中, 震荡混匀。
- [0061] (3) 配液: 将浓缩洗涤液用蒸馏水作 20 倍稀释成工作浓度洗涤液, 如产生结晶, 应待其于室温溶解后再稀释。
- [0062] (4) 加样: 取 96 孔化学发光酶标板, 预设置空白、低值对照、高值对照各 3 孔。每孔中先加入 50 μl 样品稀释液 (空白对照每孔加入 100 μl 样品稀释液); 然后低、高值对照孔加入 50 μl 低、高值对照, 其余孔按设定各加入 50 μl 待测样品; 加样完毕后用不干胶封片封盖反应板, 37℃ 振荡孵育 60 分钟。
- [0063] (5) 洗板: 甩去板孔中的液体, 在吸水纸上拍干; 用工作浓度洗涤液洗板 6 次, 最后拍干。
- [0064] (6) 加酶结合物: 每孔加入 100 μl 酶结合物 (辣根过氧化酶标记的羊抗人 Lp-PLA2 抗体), 用不干胶封片封盖反应板, 37℃ 孵育 30 分钟。
- [0065] (7) 洗板: 同 (5)。
- [0066] (8) 加底物: 每孔先后加入化学发光底物液 R1、化学发光底物液 R2 各 50 μl , 避光显色至少 2 分钟。
- [0067] (9) 测定: 加发光底物液后 2 ~ 30 分钟在化学发光仪上读出各孔相对发光度 (RLU)。用所获得的每个浓度的标准品溶液的发光强度平均值 (B) 除以第一个标准溶液 (0 标准) 的发光强度值 (B0) 再乘以 100%, 即百分发光值。计算公式为: 百分发光值 (%) = $(B/B0) \times 100\%$ 。

[0068] (10) 以 Lp-PLA2 标准品溶液的浓度 (ng/mL) 的半对数值为 x 轴, 百分发光值为 Y 轴, 绘制标准曲线图。用同样的办法计算样品溶液的百分发光值, 相对应每一个样品的浓度则可从标准曲线上读出样本中 Lp-PLA2 的含量。本发明中检测结果的分析也可以采用回归方程法, 计算出样品溶液浓度。本发明中检测结果的分析还可以利用计算机专业软件, 此法更便于大量样品的快速分析。

[0069] 实施例 2、含有样品处理液的试剂盒与不含有样品处理液的试剂盒比较

[0070] 实验组: 样品经本发明样品处理液处理

[0071] 对照组: 样品未经处理。

[0072] 以上述实验组和对照组进行对比试验。对正常对照样本 100 例, 患心脑血管疾病样本 100 例采用实验组和对照组进行平行检测, 检测方法参见上述实施例 1, 检测程序和结果判断严格按照各试剂说明书进行。检测结果如表 1、表 2 和表 3 所示:

[0073] 表 1 对照组试剂盒测定结果

[0074]

| 组别 | 例数 | + | - | 阳性率 (%) |
|-------|-----|----|-----|---------|
| 正常对照组 | 358 | 23 | 335 | 6.42% |
| 患病样本组 | 254 | 64 | 190 | 25.20% |

[0075] 表 2 实验组试剂盒测定结果

[0076]

| 组别 | 例数 | + | - | 阳性率 (%) |
|-------|-----|----|-----|---------|
| 正常对照组 | 358 | 25 | 333 | 6.98% |
| 患病样本组 | 254 | 69 | 185 | 27.17% |

[0077] 表 3 实验组和对照组试剂盒测定结果比较

| | | 对照组试剂盒 | | 合计 |
|--------|---|--------|-----|-----|
| | | + | - | |
| 实验组试剂盒 | + | 85 | 9 | 94 |
| | - | 2 | 516 | 518 |
| 合计 | | 87 | 525 | 612 |

[0079] 表 1-3 所述数据表明, 本发明试剂盒与对照组试剂盒的阳性符合率为 90.4%, 阴性符合率为 99.6%, 两种检验方法的符合率为 98.2%。经验证, 对照试剂盒检出 2 份假阳性、9 份假阴性, 而本发明试剂盒检测结果与临床结果完全相符。

[0080] 实施例 3、试剂盒灵敏度和准确度试验

[0081] 一、试剂盒灵敏度实验

[0082] 1、对零标准溶液进行 20 次检测, 测定结果的平均值加上 3 倍标准差作为试剂盒的最低检测限。

[0083] 表 4 零标准测定结果统计表 ng/mL

[0084]

| | | | | | | | | |
|-----|------|------|------|------|------|------|-------|------|
| 样品号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 测定值 | 0.06 | 0.07 | 0.08 | 0.06 | 0.07 | 0.05 | 0.06 | 0.05 |
| 样品号 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| 测定值 | 0.04 | 0.05 | 0.08 | 0.08 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.07 |
| 样品号 | 17 | 18 | 19 | 20 | 平均值 | 标准差 | 最低检测限 | |
| 测定值 | 0.06 | 0.07 | 0.04 | 0.06 | 0.06 | 0.01 | 0.1 | |

[0085] 由表 4 可知,试剂盒的最低检测限为 0.1ng/mL。

[0086] 二、标准品精密度试验:

[0087] 制作三批试剂盒,每批抽取 10 个试剂盒,测定 250ng/mL 标准品溶液的发光强度值,计算变异系数。

[0088] 实验设 3 次重复,结果如表 5 所示,表明变异系数范围在 5.2%-15.1% 之间,符合精密度小于或等于 20% 的要求。

[0089] 表 5 标准可重复性试验 (CV%)

[0090]

| | | | | | | | | | | |
|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|-----|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 01 批 | 11.6 | 13.2 | 8.9 | 5.2 | 12.7 | 14.8 | 10.8 | 9.5 | 6.6 | 7.8 |
| 02 批 | 6.9 | 10.4 | 11.7 | 5.8 | 7.7 | 11.3 | 12.5 | 15.1 | 5.9 | 10.3 |
| 03 批 | 12.2 | 10.3 | 9.6 | 8.7 | 11.5 | 7.9 | 10.7 | 11.2 | 6.4 | 9.6 |

[0091] 三、样本精密度和准确度试验

[0092] 1、样品精密度试验

[0093] 从三批试剂盒 (01 批、02 批、03 批) 中每批抽取 3 个试剂盒,用低值对照进行实验,每个实验重复 5 次,分别计算变异系数,结果表明变异系数均小于 20%。

[0094] 2、样本准确度试验

[0095] 用实施例 1 中所述的试剂盒检测高、低值对照,每个做 4 个平行,分别计算准确度 (准确度 = 实测值 / 添加值)。回收率均在 90%-110% 之间。

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 检测脂蛋白相关磷脂酶A2的化学发光酶联免疫试剂盒及其制备方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN103645326B | 公开(公告)日 | 2015-09-16 |
| 申请号 | CN201310683802.2 | 申请日 | 2013-12-13 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 同昕生物技术(北京)有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 同昕生物技术(北京)有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 同昕生物技术(北京)有限公司 | | |
| [标]发明人 | 吴凡 焦守恕 | | |
| 发明人 | 吴凡 焦守恕 | | |
| IPC分类号 | G01N33/68 G01N33/531 | | |
| CPC分类号 | G01N33/573 G01N33/92 G01N2333/916 | | |
| 其他公开文献 | CN103645326A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了检测脂蛋白相关磷脂酶A2的化学发光酶联免疫试剂盒及其制备方法。本发明所提供的检测脂蛋白相关磷脂酶A2的化学发光酶联免疫试剂盒，包括包被有抗脂蛋白相关磷脂酶A2单克隆抗体的化学发光板，其特征在于：还包括样品处理液；所述样品处理液主要由A液和B液组成；所述A液含有7.5g/L氯化铵、1.2g/L酪蛋白和1.2g/L硬脂酸钠；所述B液含有0.5M Tris-HCl, PH7.6。为最大限度减低Lp-PLA2发光检测噪音，本发明的试剂盒中还包括独特的血液样品处理剂配方，有助于淬灭非特异性光源，大大增强检测光与本底杂光的差别，增加检测特异性。

| | | 对照组试剂盒 | | 合计 |
|--------|---|--------|-----|-----|
| | | + | · | |
| 实验组试剂盒 | + | 85 | 9 | 94 |
| | · | 2 | 516 | 518 |
| 合计 | | 87 | 525 | 612 |