



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110618261 A

(43)申请公布日 2019.12.27

(21)申请号 201910794776.8

(22)申请日 2019.08.27

(71)申请人 迪瑞医疗科技股份有限公司

地址 130103 吉林省长春市高新区宜居路
3333号

(72)发明人 李磊 李冬梅 韩美玉 孙成艳
高威 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 刘微

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

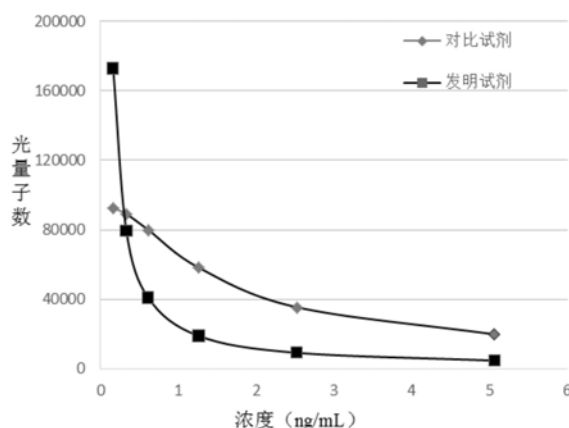
权利要求书2页 说明书13页 附图1页

(54)发明名称

一种定量检测地高辛的化学发光免疫检测
试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,包括试剂R1、R2和R3,其中:试剂R1为包含链霉亲和素磁颗粒的悬浮液;试剂R2为包含化学发光标记物标记的地高辛单克隆抗体的溶液;试剂R3为包含偶联标记物标记的地高辛衍生物的溶液。本发明提供的试剂盒,针对地高辛是小分子物质,采用竞争法原理进行检测,节约时间及成本,具有免疫反应的高度特异性,又具有发光反应的高敏感性,具有灵敏度高、特异性强、线性范围宽、试剂稳定性好、操作简便、容易实现自动化的优点,本发明提供的制备方法,工艺简单,试剂盒有效期长,成本相对较低;方便实现快速检测,对于仪器的要求简单,便于实现全自动化操作。



1. 一种定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,包括试剂R1、R2和R3,其中:

试剂R1为包含链霉亲和素磁颗粒的悬浮液;

试剂R2为包含化学发光标记物标记的地高辛单克隆抗体的溶液;

试剂R3为包含偶联标记物标记的地高辛衍生物的溶液。

2. 根据权利要求1所述的定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,试剂R1中链霉亲和素磁颗粒质量百分比为0.01%~1%。

3. 根据权利要求2所述的定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,试剂R1中链霉亲和素磁颗粒的粒径是0.05~3 μ m。

4. 根据权利要求1所述的定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,试剂R2中地高辛单克隆抗体与化学发光标记物的摩尔比为1:1~1:20。

5. 根据权利要求4所述的定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,试剂R2中化学发光标记物标记的地高辛单克隆抗体的浓度为 ≥ 10 ng/mL。

6. 根据权利要求4所述的定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,试剂R2中所述化学发光标记物为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺或三联吡啶钌。

7. 根据权利要求1所述的定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,试剂R3中地高辛衍生物与偶联标记物的摩尔比为1:1~1:20。

8. 根据权利要求7所述的定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,试剂R3中偶联标记物标记的地高辛衍生物的浓度为 ≥ 5 ng/mL。

9. 根据权利要求7所述的定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,试剂R3中所述地高辛衍生物为地高辛-BSA或地高辛-OVA,所述偶联标记物为生物素。

10. 根据权利要求1-9任一项所述的定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤S1、试剂R1的制备:

将链霉亲和素磁颗粒溶液和TBST溶液混匀后,放置在磁分离器上,直至上清液无混浊,弃上清,留取磁颗粒,清洗后在缓冲液中配成固相试剂;其中,所述的链霉亲和素磁颗粒溶液的浓度为50~100mg/ml;链霉亲和素磁颗粒溶液和TBST溶液的体积比优选为(0.5~1):(5~10);所述的缓冲液为50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300,pH6.5或100mM PBS、0.1%吐温-20、0.1%Proclin300,pH7.2;所述的固相试剂的浓度优选为0.01%~1%;

步骤S2、试剂R2的制备:

将地高辛单克隆抗体放入离心管中离心,然后加入磷酸缓冲液,混匀后加入化学发光标记物溶液离心,将离心管密封后放入避光暗盒中,混匀,加入封闭液,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;其中,所述的地高辛单克隆抗体与化学发光标记物摩尔比为1:1~1:20;所述的化学发光标记物溶液的浓度为2~2.5mg/mL;所述的封闭液为赖氨酸,质量分数为20~25%;所述的缓冲液为50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300,pH6.5或100mM PBS、0.1%吐温-20、0.1%

Proclin300,pH6.0;

步骤S3、试剂R3的制备:

将地高辛衍生物放入离心管中离心,然后加入TRIS缓冲液,混匀后加入偶联标记物溶液离心,混匀后加入封闭液,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;所述的地高辛衍生物与偶联标记物的摩尔比为1:1~1:20;所述的偶联标记物溶液的浓度优选为2-3mg/mL;所述的封闭液优选为赖氨酸,质量分数为20~25%;所述的缓冲液为50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300,pH6.5或100mM PBS、0.1%吐温-20、0.1%Proclin300,pH6.0。

一种定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及体外检测技术领域,尤其涉及一种定量检测地高辛化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 地高辛(Digoxin,或DIG)是一种从洋地黄中提取出来的中效强心苷类药物,为白色结晶或结晶性粉末,无臭,味苦。在治疗时,对心脏的作用表现为正性肌力作用,减慢心率,抑制心脏传导,适用于低输出量型充血性心力衰竭、心房颤动、心房扑动、阵发性室上性心动过速。这种积极的正性肌力作用使地高辛成为治疗心衰控制快速心室率临床首选的有效药物。

[0003] 然而,地高辛有效血药浓度窄,未服药病人 $<0.5\text{ng/ml}$,根据2008年ESC急慢性心力衰竭诊断治疗指南推荐地高辛的治疗范围为 $0.6\sim 1.2\text{ng/m}$ 。此外,地高辛安全范围窄,治疗指数低,药动学、药效学个体差异大,且有治疗剂量与中毒剂量在一定程度上相互重叠的药动学特性,容易发生中毒反应。因此,地高辛是临床上需要做血药浓度监测的主要药物之一。在临床治疗过程中及时监测地高辛的血药浓度是调整给药方案、预防药物中毒的主要方法。

[0004] 地高辛血药浓度常用监测方案主要包括液相-质谱联用分析法、放射免疫、酶联免疫吸附分析法和化学发光免疫法。其中,液相-质谱联用分析法所需仪器昂贵、操作繁琐、灵敏度较差、检测耗时较长,因此其临床应用受到限制;放射免疫分析法有检测时间较长,抗原标记物半衰期短,易受代谢物的干扰,存在不同程度的放射性污染等缺点,较难用于临床的即时测定;酶联免疫吸附分析法缺点主要是人为因素干扰检测结果,孵育时间长,酶稳定性降低,影响检测结果准确性。

[0005] 化学发光免疫测定(CLIA)是继酶免技术、放免技术、荧光免疫技术和时间分辨荧光免疫技术之后发展的一项新兴免疫测定技术。由于它既具有免疫反应的高度特异性,又具有发光反应的高敏感性,近年来已被国内外临床实验室及科研单位广泛应用于各种激素、特种蛋白及药物的监测和分析。该方法具有灵敏度高、特异性强、线性范围宽、操作简便、试剂稳定性好、操作简便、容易实现自动化的优点,是理想的临床微量生化检验分析手段。

[0006] 目前我国获准上市的临床检测地高辛(DIG)试剂盒检测原理主要以酶联免疫法(ELISA)和辣根过氧化物酶联合鲁米诺类化合物化学发光。虽然价格便宜但灵敏度和检测的可靠性得不到保证,而国外的检测系统价格昂贵难以普及。因此,需要开发出一种检测的灵敏度和精密度都很高,对于仪器的要求简单、方便,实现快速检测的地高辛(DIG)试剂盒。

发明内容

[0007] 本发明针对上述技术问题,提供一种定量检测地高辛化学发光免疫检测试剂盒,

定量检测血清或血浆中的地高辛 (DIG), 灵敏度高、重复性好、成本低, 为临床医师调整患者剂量从而获得最佳治疗效果提供有用信息, 具有广泛市场前景。

[0008] 为了实现上述目的, 本发明提供的技术方案如下:

[0009] 本发明首先提供了一种定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒, 包括试剂 R1、R2 和 R3, 其中:

[0010] 试剂 R1 为包含链霉亲和素磁颗粒的悬浮液;

[0011] 试剂 R2 为包含化学发光标记物标记的地高辛单克隆抗体的溶液;

[0012] 试剂 R3 为包含偶联标记物标记的地高辛衍生物的溶液;

[0013] 优选地, 试剂 R1 中链霉亲和素磁颗粒质量百分比为 0.01%~1%。

[0014] 优选地, 试剂 R1 中链霉亲和素磁颗粒的粒径是 0.05~3 μ m。

[0015] 优选地, 试剂 R2 中地高辛单克隆抗体与化学发光标记物的摩尔比为 1:1~1:20。

[0016] 优选地, 试剂 R2 中化学发光标记物标记的地高辛单克隆抗体的浓度为 ≥ 10 ng/mL。

[0017] 优选地, 试剂 R2 中所述化学发光标记物为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺或三联吡啶钡。

[0018] 优选地, 试剂 R3 中地高辛衍生物与偶联标记物的摩尔比为 1:1~1:20。

[0019] 优选地, 试剂 R3 中偶联标记物标记的地高辛衍生物的浓度为 ≥ 5 ng/mL。

[0020] 优选地, 试剂 R3 中所述地高辛衍生物为地高辛-BSA 或地高辛-OVA, 所述偶联标记物为生物素。

[0021] 本发明还提供了上述的定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒的制备方法, 包括如下步骤:

[0022] 步骤 S1、试剂 R1 的制备:

[0023] 将链霉亲和素磁颗粒溶液和 TBST 溶液混匀后, 放置在磁分离器上, 直至上清液无混浊, 弃上清, 留取磁颗粒, 清洗后在缓冲液中配成固相试剂; 其中, 所述的链霉亲和素磁颗粒溶液的浓度为 50~100 mg/ml; 链霉亲和素磁颗粒溶液和 TBST 溶液的体积比优选为 (0.5~1):(5~10); 所述的缓冲液为 50 mM MES、0.05% 吐温-20、0.05% Proclin300, pH6.5 或 100 mM PBS、0.1% 吐温-20、0.1% Proclin300, pH7.2; 所述的固相试剂的浓度优选为 0.01%~1%;

[0024] 步骤 S2、试剂 R2 的制备:

[0025] 将地高辛单克隆抗体放入离心管中离心, 然后加入磷酸缓冲液, 混匀后加入化学发光标记物溶液离心, 将离心管密封后放入避光暗盒中, 混匀, 加入封闭液, 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; 其中, 所述的地高辛单克隆抗体与化学发光标记物摩尔比为 1:1~1:20; 所述的化学发光标记物溶液的浓度为 2~2.5 mg/mL; 所述的封闭液为赖氨酸, 质量分数为 20~25%; 所述的缓冲液为 50 mM MES、0.05% 吐温-20、0.05% Proclin300, pH6.5 或 100 mM PBS、0.1% 吐温-20、0.1% Proclin300, pH6.0;

[0026] 步骤 S3、试剂 R3 的制备:

[0027] 将地高辛衍生物放入离心管中离心, 然后加入 TRIS 缓冲液, 混匀后加入偶联标记物溶液离心, 混匀后加入封闭液, 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; 所述的地高辛衍生物与偶联标记物的摩尔比为 1:1~1:20; 所述的偶联标记物溶液的浓度优选为 2~3 mg/mL; 所述的封闭液优选为赖氨酸, 质量分数为 20~25%; 所述的缓

冲液为50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300,pH6.5或100mM PBS、0.1%吐温-20、0.1%Proclin300,pH6.0。

[0028] 与现有技术相比,本发明的技术效果:

[0029] 本发明提供的定量检测地高辛化学发光免疫检测试剂盒,针对地高辛是小分子物质,该试剂盒以链霉亲和素磁颗粒作为固相载体,竞争法原理进行检测,结合发光强度和灵敏度都较高的化学发光物质对DIG进行标记,采用过氧化氢化学发光体系,以竞争法实现对DIG的定量检测,该试剂盒选择吖啶酯为化学发光免疫分析系统的标记材料,该材料有激发态回到基态时产生的能量跃迁为直接化学发光,不需要酶的参与,节约时间及成本;采用链霉亲和素磁珠与生物素标记的类似物可以牢牢的结合在一起,减少非特异性吸附,提高测试样本的准确度,抗干扰能力强。采用化学发光免疫测定方法,既具有免疫反应的高度特异性,又具有发光反应的高敏感性,该方法具有灵敏度高、特异性强、线性范围宽、试剂稳定性好、操作简便、容易实现自动化的优点,可配套全自动化学发光免疫分析仪进行检测,并直接给出数值,减少人为操作误差,并且实现无人值守,缩短了临床检测所需的时间,同时检测精度较高,试剂与仪器配套组成封闭系统,系统误差小。

[0030] 本发明提供的定量检测地高辛化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,吖啶酯标记工艺简单,标记物发光稳定,试剂盒有效期长,成本相对较低;且发光为闪光型,发光快速集中且强大,方便实现快速检测,检测的灵敏度和精密度都很高,对于仪器的要求简单,便于实现全自动化操作;其次,吖啶酯发光系统较为简单,碱性-过氧化氢就可以直接发光,不需要增强剂或者催化剂,干扰因素少,本底极低,信噪比很高。

附图说明

[0031] 为了更清楚地说明本申请实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明中记载的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0032] 图1为本发明实施例1制备的试剂盒及对比试剂测试的标准曲线对比图。

具体实施方式

[0033] 为了使本领域的技术人员更好地理解本发明的技术方案,下面将结合附图对本发明作进一步的详细介绍。显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。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。

[0034] 本发明首先提供了一种定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒,包括试剂R1、R2和R3,其中:

[0035] 试剂R1为包含链霉亲和素磁颗粒的悬浮液;

[0036] 试剂R2为包含化学发光标记物标记的地高辛单克隆抗体的溶液;

[0037] 试剂R3为包含偶联标记物标记的地高辛衍生物的溶液;

[0038] 优选地,试剂R1中链霉亲和素磁颗粒质量百分比为0.01%~1%,更优选为

0.072%。试剂R1中链霉亲和素磁颗粒的粒径是0.05~3 μ m,更优选为3 μ m。当链霉亲和素磁颗粒的粒径低于0.05 μ m时,抗原或者抗体与磁珠结合率低,可能导致整体光量子数偏低;当链霉亲和素磁颗粒的粒径高于3 μ m时,非特异性结合效果明显,会导致试剂盒的灵敏度降低。

[0039] 优选地,试剂R2中地高辛单克隆抗体与化学发光标记物的摩尔比为1:1~1:20,更优选为1:5。试剂R2中化学发光标记物标记的地高辛单克隆抗体的浓度为 ≥ 10 ng/mL。试剂R2中所述化学发光标记物为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺或三联吡啶钌,更优选为吖啶酯。

[0040] 优选地,试剂R3中地高辛衍生物与偶联标记物的摩尔比为1:1~1:20,更优选为1:10。试剂R3中偶联标记物标记的地高辛衍生物的浓度为 ≥ 5 ng/mL。试剂R3中所述地高辛衍生物为地高辛-BSA或地高辛-OVA,所述偶联标记物为生物素。

[0041] 本发明还提供了上述的定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0042] 步骤S1、试剂R1的制备:

[0043] 将链霉亲和素磁颗粒溶液和TBST溶液混匀后,放置在磁分离器上,直至上清液无混浊,弃上清,留取磁颗粒,清洗后在缓冲液中配成固相试剂;其中,所述的链霉亲和素磁颗粒溶液的浓度为50~100mg/mL;链霉亲和素磁颗粒溶液和TBST溶液的体积比优选为(0.5~1):(5~10);所述的混匀时间优选为10~15min;所述的缓冲液为50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300,pH6.5或100mM PBS、0.1%吐温-20、0.1%Proclin300,pH7.2;所述的固相试剂的浓度优选为0.01%~1%,更优选为0.05%;所述的链霉亲和素磁颗粒溶液的来源为商购,选自安捷伦公司,货号PL6827-1006。

[0044] 步骤S2、试剂R2的制备:

[0045] 将地高辛单克隆抗体放入离心管中离心,优选在室温下离心10~30s,保证抗体位于离心管底部位置,然后加入磷酸缓冲液,混匀后加入化学发光标记物溶液离心,所述的离心温度优选为室温,离心时间优选为0.5~3min;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 $^{\circ}$ C)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,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;其中,所述的地高辛单克隆抗体与化学发光标记物摩尔比为1:1~1:20,更优选为1:5;所述的化学发光标记物溶液的浓度为2~2.5mg/mL;所述的封闭液为赖氨酸,质量分数为20~25%;所述的缓冲液为50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300,pH6.5或100mM PBS、0.1%吐温-20、0.1%Proclin300,pH6.0;

[0046] 步骤S3、试剂R3的制备:

[0047] 将地高辛衍生物放入离心管中离心,确保抗体位于离心管底部位置,优选在室温下离心10~30s,然后加入TRIS缓冲液,混匀后加入偶联标记物溶液离心,用离心机室温条件下离心30s,2~8 $^{\circ}$ C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(25 $^{\circ}$ C),所述的封闭时间优选为1~2h,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;所述的地高辛衍生物与偶联标记物的摩尔比为1:1~1:20,更优选为1:10;所述的偶联标记物溶液的浓度优选为2~3mg/mL;所述的封闭液优选为赖氨酸,质量分数为20~25%;所述的缓冲液为50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300,pH6.5或100mM PBS、0.1%吐温-20、0.1%Proclin300,pH6.0。

[0048] 此外,本发明的试剂盒还包括化学发光底物液,所述化学发光底物液包括A液和B液;所述A液为过氧化氢和硝酸溶液,B液为氢氧化钠溶液。

[0049] 本发明的试剂盒还包括地高辛(DIG)校准品。所述地高辛(DIG)校准品优选为将DIG纯品用标准品稀释液配制成浓度分别为0.00ng/mL、0.5ng/mL、1.0ng/mL、2.0ng/mL、4.0ng/mL和5.0ng/mL的地高辛(DIG)标准溶液。

[0050] 本发明的定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒用于检测地高辛(DIG)时,利用迪瑞医疗公司的全自动化学发光免疫分析仪(CM180)对地高辛(DIG)校准品进行检测,绘制标准曲线,内置于电脑软件;然后根据需求测试临床样本,根据样本的光量子数计算地高辛(DIG)的浓度;最后对本发明的试剂盒的性能(灵敏度、线性、抗干扰/特异性)进行评价。下面结合具体实施例对本发明做进一步详细的描述。

[0051] 实施例1定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0052] (1) 试剂R1的制备

[0053] 取浓度100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液0.5mL(50mg),链霉亲和素磁颗粒的粒径是0.05 μ m,加入10mL的TBST溶液充分混匀10min,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒。重复清洗3次后使用50mM MES、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液中配成磁珠浓度为0.05%的固相试剂,2~8℃保存。

[0054] (2) 试剂R2的制备

[0055] 将250 μ g地高辛单克隆抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入PBS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5mL 2mg/mL吡啶酯DMF溶液,用离心机室温条件下离心0.5min。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2h。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。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪上进行纯化(葡聚糖凝胶G25预装柱),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。使用时将纯化后的地高辛抗体浓溶液用50mM MES、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为20ng/mL,2~8℃保存。

[0056] (3) 试剂R3的制备

[0057] 将500 μ g地高辛衍生物地高辛-OVA放入离心管中,保证地高辛衍生物位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入TRIS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入2mL 2mg/mL生物素的DMF溶液,用离心机室温条件下离心30s。8℃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。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪(葡聚糖凝胶G250柱)纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的生物素-地高辛衍生物溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的生物素-地高辛衍生物浓溶液用50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液稀释至终浓度10ng/mL,2~8℃保存。

[0058] 实施例2定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0059] (1) 试剂R1的制备

[0060] 取浓度100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液0.72mL(72mg),链霉亲和素磁颗粒的粒径是3 μ m,加入15mL的TBST溶液充分混匀15min,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒。重复清洗3次后使用100mM PBS、0.1%吐温-20、0.1%Proclin300,pH7.2的缓冲液中配成磁珠浓度为0.072%的固相试剂,2~8℃保存。

[0061] (2) 试剂R2的制备

[0062] 将500 μ g地高辛单克隆抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心30s)后加入TRIS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入1mL 2.5mg/mL吡啶酯DMF溶液,用离心机室温条件下离心45s。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 $^{\circ}$ C),混匀3.5h。加入2mL 25%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25 $^{\circ}$ C),中速混匀,封闭时间为1.5h。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪上进行纯化(葡聚糖凝胶G25预装柱),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 $^{\circ}$ C保存。使用时将纯化后的地高辛抗体浓溶液用100mM PBS、0.1%吐温-20、0.1%Proclin300,pH6.0的缓冲液稀释至终浓度为40ng/mL,2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0063] (3) 试剂R3的制备

[0064] 将750 μ g地高辛衍生物地高辛-BSA放入离心管中,保证地高辛衍生物位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入磷酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5mL 3mg/mL生物素的DMF溶液,用离心机室温条件下离心45s。4 $^{\circ}$ C混匀6小时。加入3mL 25%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(23 $^{\circ}$ C),中速混匀,封闭时间为2h。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪(葡聚糖凝胶G250柱)纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的生物素-地高辛衍生物溶液放置于2~8 $^{\circ}$ C保存。使用时将纯化后的生物素-地高辛衍生物浓溶液用100mM PBS、0.1%吐温-20、0.1%Proclin300,pH6.0的缓冲液稀释至终浓度20ng/mL,2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0065] 实施例3定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0066] (1) 试剂R1的制备

[0067] 取浓度100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液0.5mL(50mg),链霉亲和素磁颗粒的粒径是0.05 μ m,加入10mL的TBST溶液充分混匀10min,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒。重复清洗3次后使用50mM MES、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液中配成磁珠浓度为0.05%的固相试剂,2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0068] (2) 试剂R2的制备

[0069] 将250 μ g地高辛单克隆抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入PBS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5mL 2mg/mL吡啶酯DMF溶液,用离心机室温条件下离心30s。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 $^{\circ}$ C),混匀4h。加入1mL 20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25 $^{\circ}$ C),中速混匀,封闭时间为1h。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪上进行纯化(葡聚糖凝胶G25预装柱),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 $^{\circ}$ C保存。使用时将纯化后的地高辛(DIG)抗体浓溶液用50mM MES、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为10ng/mL,2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0070] (3) 试剂R3的制备

[0071] 将500 μ g地高辛衍生物地高辛-BSA放入离心管中,保证地高辛衍生物位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入TRIS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入2mL 2mg/mL生物素的DMF溶液,用离心机室温条件下离心30s。2~8 $^{\circ}$ C混匀4h。加入1mL 20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25 $^{\circ}$ C),中速混匀,封闭时间为1h。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪(葡聚糖凝胶G250柱)纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的生物素-地高辛衍生物溶液放置于2~8 $^{\circ}$ C保存。使用时将纯化后的生物素-地高辛衍生物浓溶液用50mM MES、

0.05%吐温-20、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为5ng/mL,2~8℃保存。

[0072] 实施例4定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0073] (1) 试剂R1的制备

[0074] 取浓度100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液1mL (50mg),链霉亲和素磁颗粒的粒径是0.05μm,加入5mL的TBST溶液充分混匀15min,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒。重复清洗3次后使用50mM MES、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液中配成磁珠浓度为0.01%的固相试剂,2~8℃保存。

[0075] (2) 试剂R2的制备

[0076] 将250μg地高辛单克隆抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心10s)后加入PBS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入2.5mL 2mg/mL鲁米诺DMF溶液,用离心机室温条件下离心1min。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2h。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。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪上进行纯化(葡聚糖凝胶G25预装柱),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。使用时将纯化后的地高辛(DIG)抗体浓溶液用50mM MES、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为10ng/mL,2~8℃保存。

[0077] (3) 试剂R3的制备

[0078] 将500μg地高辛衍生物地高辛-OVA放入离心管中,保证地高辛衍生物位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入TRIS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入0.2mL 2.5mg/mL生物素的DMF溶液,用离心机室温条件下离心30s。2~8℃混匀2h。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。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪(葡聚糖凝胶G250柱)纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的生物素-地高辛衍生物溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的生物素-地高辛衍生物浓溶液用50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为10ng/mL,2~8℃保存。

[0079] 实施例5定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0080] (1) 试剂R1的制备

[0081] 取浓度100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液0.5mL (50mg),链霉亲和素磁颗粒的粒径是0.05μm,加入5mL的TBST溶液充分混匀10min,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒。重复清洗3次后使用50mM MES、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液中配成磁珠浓度为1%的固相试剂,2~8℃保存。

[0082] (2) 试剂R2的制备

[0083] 将2500μg地高辛单克隆抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心30s)后加入PBS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入1mL 2.5mg/mL异鲁米诺DMF溶液,用离心机室温条件下离心3min。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4h。加入1mL 25%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1.5h。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪上进行纯化(葡聚糖凝胶G25预装柱),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。使用时将纯化后的地高辛(DIG)抗体浓溶液用50mM MES、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为20ng/mL,2~8℃保存。

[0084] (3) 试剂R3的制备

[0085] 将500 μ g地高辛衍生物地高辛-BSA放入离心管中,保证地高辛衍生物位于离心管底部位置(离心机室温离心10s)后加入TRIS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入2mL 2.5mg/mL生物素的DMF溶液,用离心机室温条件下离心1min。2~8℃混匀3h。加入1mL 25%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。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪(葡聚糖凝胶G250柱)纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的生物素-地高辛衍生物溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的生物素-地高辛衍生物浓溶液用50mM MES、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为10ng/mL,2~8℃保存。

[0086] 实施例6定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0087] (1) 试剂R1的制备

[0088] 取浓度100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液0.5mL (50mg),链霉亲和素磁颗粒的粒径是0.05 μ m,加入5mL的TBST溶液充分混匀10min,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒。重复清洗3次后使用100mM PBS、0.1%吐温-20、0.1%Proclin300,pH7.2的缓冲液中配成磁珠浓度为1%的固相试剂,2~8℃保存。

[0089] (2) 试剂R2的制备

[0090] 将2500 μ g地高辛单克隆抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心30s)后加入PBS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入1mL 2.5mg/mL三联吡啶钌DMF溶液,用离心机室温条件下离心3min。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4h。加入1mL 25%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。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪上进行纯化(葡聚糖凝胶G25预装柱),用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的地高辛(DIG)抗体浓溶液用100mM PBS、0.1%吐温-20、0.1%Proclin300,pH6.0的缓冲液稀释至终浓度为30ng/mL,2~8℃保存。

[0091] (3) 试剂R3的制备

[0092] 将500 μ g地高辛衍生物地高辛-BSA放入离心管中,保证地高辛衍生物位于离心管底部位置(离心机室温离心30s)后加入TRIS缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5mL 2mg/mL生物素的DMF溶液,用离心机室温条件下离心3min。2~8℃混匀4h。加入1mL 25%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1.5h。将封闭好的抗体使用AKTA纯化仪(葡聚糖凝胶G250柱)纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的生物素-地高辛衍生物溶液放置于2~8℃保存。使用时将纯化后的生物素-地高辛衍生物浓溶液用100mM PBS、0.1%吐温-20、0.1%Proclin300,pH6.0的缓冲液稀释至终浓度为5ng/mL,2~8℃保存。

[0093] 实施例7定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒的性能评价

[0094] 检验方法:以迪瑞医疗公司全自动化学发光免疫分析仪(CM180)为检测仪器,方法学为竞争法。第一步孵育:将150 μ L的血清样本和50 μ L试剂R2(吡啶酯标记的地高辛单克隆抗体)一起孵育,反应形成复合体,复合体的量取决于样本中分析物浓度;第二步孵育:添加50 μ L试剂R3(生物素标记的地高辛衍生物)及40 μ L试剂R1(链霉亲和素磁颗粒)后,形成地高辛衍生物-生物素-链霉亲和素磁珠复合体。孵育进行磁分离。仪器将反应物送入暗室,一次加入A液($H_2O_2+HNO_3$ 溶液)和B液(NaOH溶液)进行反应,最后记录光量子数,通过浓度-光量子

数定标曲线得到最后的检测结果,样本中地高辛含量与光量子数成反比。

[0095] 以下为实施例1制备的试剂盒评价数据,实施例2~3在样本不变的情况下,检测效果接近,不再赘述。

[0096] (1) 最低检出限

[0097] 平行测定零值一级校准品或样本稀释液20次,记录其光量子数,计算平均值M和标准差SD,并计算M-2SD的值,测定相邻浓度一级校准品3次,记录其光量子数,取平均值。根据零值一级校准品和相邻浓度一级校准品之间的浓度-光量子数结果进行两点线性回归拟合出一次方程,将M-2SD所对应的光量子数带入方程,所得浓度即为最低检出限,检测结果见表1,最低检出限小于0.5ng/mL。

[0098] 表1试剂盒最低检出限测试数据

[0099]

测定次数	零值一级校准品	相邻浓度一级校准品
Rep1	1200346	107116
Rep2	1202421	106984
Rep3	1097431	107231
Rep4	1198765	/
Rep5	1163498	/
Rep6	1200654	/
Rep7	1206547	/
Rep8	1208649	/
Rep9	1199876	/
Rep10	1253369	/
Rep11	1205877	/
Rep12	1241043	/
Rep13	1299874	/
Rep14	1180036	/
Rep15	1209657	/
Rep16	1097423	/
Rep17	1190721	/
Rep18	1110036	/
Rep19	1189974	/
Rep20	1170547	/
测定均值	1191337	107110
样品	一级校准品-1	一级校准品-2
浓度 (ng/mL)	0.00	0.25
标准差 (SD)	48764	/
M-2SD	1093809	/
最低检出限 (ng/mL)	0.0450	/

[0100] (2) 线性范围

[0101] 将接近线性范围上限的高值样本用蛋白溶液按一定比例稀释至少5个浓度,其中低值浓度的样本须接近线性范围的下限。对每一浓度样本均重复检测3次,计算平均值,将

测定浓度的平均值与理论浓度或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 ,结果显示,线性范围为 $0.3\text{ng/mL}\sim 5.0\text{ng/mL}$,线性相关系数 $r\geq 0.999$ 。图1为实施例1制备的试剂盒和对比试剂(地高辛检测试剂盒(电化学发光法)-罗氏诊断产品(上海)有限公司)测试得到的DIG标准曲线图。测试结果见表2。

[0102] 表2 DIG线性测试数据

[0103]	理论值 (ng/mL)	L6	L5	L4	L3	L2	L1	相关系数 (r)
		0.16	0.31	0.63	1.25	2.50	5.00	
	测定值 (ng/mL)	0.16	0.33	0.61	1.26	2.52	5.06	1.0000
	发明试剂光 量子数	172849	79430	41031	18990	9295	4728	0.9999
	对比试剂光 量子数	92564	89136	80068	58292	35509	19924	0.9981

[0104] 由表2 DIG线性测试数据及图1可以看出,发明试剂与对比试剂相比具有更宽的线性范围,以及更高的线性线性相关系数,并且在低值范围内具有更高的分析灵敏度,进而可以保证在检测范围内提供更准确的检验结果。

[0105] (3) 重复性

[0106] 采用实施例1制备的试剂盒,对低值样本($0.25\text{ng/mL}\pm 0.05\text{ng/mL}$)和高值样本($2.5\text{ng/mL}\pm 0.5\text{ng/mL}$)两个样本,分别重复测定10次,计算10次测量结果的平均值 M 和标准差 SD ,按公式(1)计算变异系数 $CV=SD/M\times 100\%$,结果如表3所示,变异系数(CV) $\leq 4.0\%$ 。

[0107] 表3 DIG重复性测试数据

[0108]	测定次数	低值样本 (ng/mL)	高值样本 (ng/mL)
	Rep1	0.25	2.51
	Rep2	0.26	2.53
	Rep3	0.24	2.55
	Rep4	0.23	2.54
	Rep5	0.25	2.49
	Rep6	0.26	2.53
	Rep7	0.24	2.55
	Rep8	0.25	2.49
	Rep9	0.25	2.54
	Rep10	0.24	2.55
	测定均值 M (ng/mL)	0.25	2.53
	SD	0.01	0.02
	CV	3.8%	0.9%

[0109] (4) 批间差

[0110] 采用三批实施例1方法制备的试剂盒分别检测低值样本($0.25\text{ng/mL}\pm 0.05\text{ng/mL}$)和高值样本($2.5\text{ng/mL}\pm 0.5\text{ng/mL}$)两个样本,各重复10次,计算30次测量结果的平均值 M 和

标准差SD,按公式(2)计算变异系数 $CV=SD/M \times 100\%$,结果如表4所示,三个批号的试剂盒之间的批间变异系数 $CV \leq 6.0\%$ 。

[0111] 表4 DIG批间差测试数据

测定次数	低值样本(ng/mL)			高值样本(ng/mL)		
	第一批	第二批	第三批	第一批	第二批	第三批
Rep1	0.25	0.25	0.26	2.51	2.50	2.58
Rep2	0.26	0.26	0.25	2.53	2.58	2.63
Rep3	0.24	0.25	0.24	2.55	2.57	2.62
Rep4	0.23	0.24	0.25	2.54	2.61	2.67
Rep5	0.25	0.27	0.27	2.49	2.63	2.64
Rep6	0.26	0.24	0.28	2.53	2.49	2.59
Rep7	0.24	0.28	0.24	2.55	2.64	2.55
Rep8	0.25	0.24	0.23	2.49	2.61	2.69
Rep9	0.25	0.25	0.25	2.54	2.68	2.51
Rep10	0.24	0.26	0.26	2.55	2.55	2.49
测定均值 M (ng/mL)	0.25			2.57		
标准差 (SD)	0.01			0.06		
批间变异系 数(CV)	5.1%			2.3%		

[0112] (5) 热稳定性

[0114] 将实施例1制备的试剂盒在2~8℃和37℃条件下放置14天,分别测试生理盐水、校准品(6个浓度)和临床样品(4个),计算其光量子数衰减率,结果见表5。

[0115] 表5热稳定性测试数据

[0116]

测试样本说明	理论浓度 (ng/mL)	DIG 高温稳定性数据								
		零时间 2~8℃		14 天 2~8℃			14 天 37℃			
		平均光量子数	CV	平均光量子数	CV	与零时间比 光子数衰减率	平均光量子数	CV	与零时间光子数 衰减率	与 2~8℃ 14 光子数衰减率
生理盐水	0.00	1178373	1.19%	1130276	6.13%	-4.08%	1210639	1.09%	2.74%	7.11%
DIG 校准-1	0.00	1286591	1.90%	1214445	4.10%	-5.61%	1142300	1.12%	-11.21%	-5.94%
DIG 校准-2	0.50	97475	4.12%	107116	1.87%	9.89%	100689	0.83%	3.30%	-6.00%
DIG 校准-3	1.00	46215	0.57%	47230	2.67%	2.20%	48754	1.69%	5.49%	3.23%
DIG 校准-4	2.00	21070	0.81%	19622	3.58%	-6.87%	19155	0.31%	-9.09%	-2.38%
DIG 校准-5	4.00	8898	0.76%	9460	1.06%	6.32%	8805	0.09%	-1.05%	-6.93%
DIG 校准-6	5.00	4972	1.21%	4781	5.65%	-3.85%	4590	0.24%	-7.69%	-4.00%
平均衰减率				校准平均衰减		-2.35%	校准平均衰减		-5.70%	-7.11%
DIG 临床-1	0.74	33707	5.29%	32372	3.00%	-3.96%	33039	0.27%	-1.98%	2.06%
DIG 临床-2	1.01	23258	0.41%	22778	0.23%	-2.06%	22538	1.32%	-3.09%	-1.05%
DIG 临床-3	2.36	9833	1.40%	9336	0.88%	-5.05%	10027	0.19%	1.97%	7.40%
DIG 临床-4	3.47	7243	1.76%	6769	1.62%	-6.54%	7107	0.50%	-1.87%	5.00%
DIG 临床-5	4.72	5296	1.12%	4994	1.83%	-5.71%	5148	1.48%	-2.79%	3.10%
平均衰减率				临床平均衰减		-4.67%	临床平均衰减		-1.55%	3.30%

[0117] 结果显示,试剂盒在2~8℃和37℃条件下放置14天后的光子数衰减率 $\leq \pm 10\%$ 。

[0118] (6) 抗干扰 (对应下述结论给出实验方法和数据结果)

[0119] 在血清样本中分别加胆红素65mg/dL、血红蛋白1.0g/dL、甘油三酯1500mg/L、RF1500mg/dL和生物素100mg/mL作为实验样本,另设不加干扰物的稀释液作为对照样本,根据公式(1)得出干扰率。

[0120]

$$\text{干扰率} = \frac{(C_{\text{测}} - C_{\text{对}})}{C_{\text{对}}} \times 100\% \quad (1)$$

[0121] 式中:

[0122] C测——干扰样本中分析物测试浓度;

[0123] C对——对照样本中分析物测试浓度。

[0124] 表6抗干扰测试数据

[0125]

样本号	1	2	3	平均值	干扰率
对照样本	0.58	0.51	0.52	0.54	/
实验样本(胆红素)	0.52	0.56	0.56	0.55	1.86%
实验样本(血红蛋白)	0.5	0.59	0.57	0.55	3.11%
实验样本(甘油三酯)	0.54	0.52	0.54	0.53	-0.62%
实验样本(类风湿因子)	0.52	0.56	0.56	0.55	1.86%
实验样本(生物素)	0.59	0.56	0.5	0.55	2.48%

[0126] 结果如表6所示:干扰率结果在 $\pm 5\%$ 范围内,说明检测结果不受黄疸(胆红素 $< 65\text{mg/dL}$)、溶血(血红蛋白 $< 1.0\text{g/dL}$)、高脂血症(甘油三酯 $< 1500\text{mg/dL}$)、类风湿因子(1500M/mL)和生物素($< 100\text{mg/mL}$)的影响,试剂盒抗干扰能力强。

[0127] 以上只通过说明的方式描述了本发明的某些示范性实施例,毋庸置疑,对于本领领域的普通技术人员,在不偏离本发明的精神和范围的情况下,可以用各种不同的方式对所描述的实施例进行修正。因此,上述附图和描述在本质上是说明性的,不应理解为对本发明权利要求保护范围的限制。

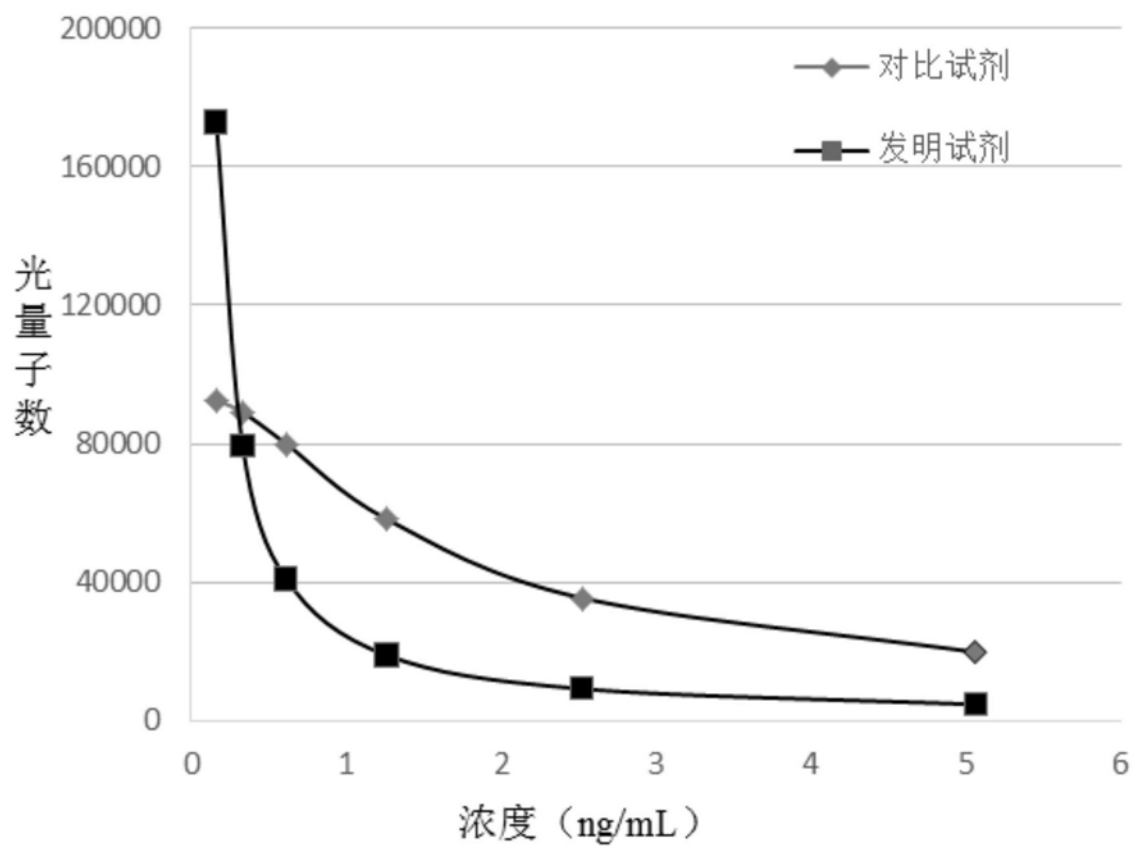


图1

专利名称(译)	一种定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN110618261A	公开(公告)日	2019-12-27
申请号	CN201910794776.8	申请日	2019-08-27
[标]发明人	李磊 李冬梅 韩美玉 孙成艳 高威 何浩会		
发明人	李磊 李冬梅 韩美玉 孙成艳 高威 何浩会		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/531 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/54326 G01N33/9453		
代理人(译)	刘微		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种定量检测地高辛的化学发光免疫检测试剂盒，其特征在于，包括试剂R1、R2和R3，其中：试剂R1为包含链霉亲和素磁颗粒的悬浮液；试剂R2为包含化学发光标记物标记的地高辛单克隆抗体的溶液；试剂R3为包含偶联标记物标记的地高辛衍生物的溶液。本发明提供的试剂盒，针对地高辛是小分子物质，采用竞争法原理进行检测，节约时间及成本，具有免疫反应的高度特异性，又具有发光反应的高敏感性，具有灵敏度高、特异性强、线性范围宽、试剂稳定性好、操作简便、容易实现自动化的优点，本发明提供的制备方法，工艺简单，试剂盒有效期长，成本相对较低；方便实现快速检测，对于仪器的要求简单，便于实现全自动化操作。

