



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104914255 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 16

(21) 申请号 201510263037. 8

G01N 33/543(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 05. 21

G01N 33/531(2006. 01)

(71) 申请人 北京协和洛克生物技术有限责任公司

地址 100142 北京市海淀区恩济庄 18 号院内 4 号楼 2 单元 302 房

(72) 发明人 郑乐民 张立峰 李晓燕 马志军 吴建榕 马奕晶

(74) 专利代理机构 北京同辉知识产权代理事务所(普通合伙) 11357

代理人 刘洪勋 郭丽英

(51) Int. Cl.

G01N 33/92(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

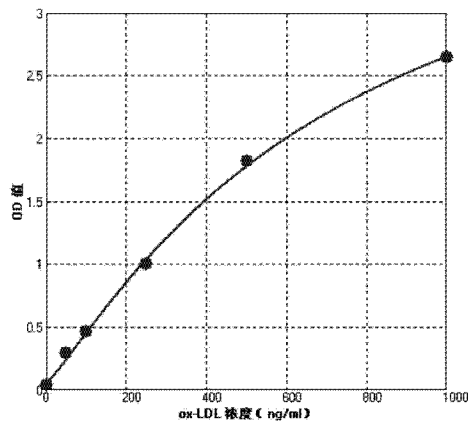
权利要求书2页 说明书11页 附图3页

(54) 发明名称

一种检测样本中氧化低密度脂蛋白浓度的试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明属于体外免疫检测技术领域,具体涉及一种检测样本中氧化低密度脂蛋白浓度的试剂盒及其制备方法。所述试剂盒包括包被有抗氧化低密度脂蛋白单克隆抗体的平台载体、不同浓度氧化低密度脂蛋白浓度梯度标准品、氧化低密度脂蛋白质控品、生物素标记的氧化低密度脂蛋白克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的亲合素、样本缓冲液、底物 A、底物 B、终止液、浓缩洗液。本发明由于所用的检测仪器较为简单,均为通常所用仪器,故检测成本较低,利于推广;并且该试剂盒容易操作,不需要专业的人员即可实现;同时试剂盒内独特的标准品稀释液和样本缓冲液配方,大大提高了检测结果的可靠性和准确性。



1. 一种检测样本中氧化低密度脂蛋白浓度的试剂盒,其特征在于:包括包被有抗氧化低密度脂蛋白单克隆抗体的平台载体、不同浓度氧化低密度脂蛋白浓度梯度标准品、氧化低密度脂蛋白质控品、生物素标记的氧化低密度脂蛋白克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的亲素、样本缓冲液、底物 A、底物 B、终止液、浓缩洗液。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述平台载体为微孔板;所述氧化低密度脂蛋白克隆抗体为氧化低密度脂蛋白单克隆抗体;所述样本缓冲液为含有蛋白保护剂的磷酸盐缓冲液,所述底物 A 为过氧化氢的柠檬酸盐缓冲液;所述底物 B 为四甲基联苯胺的柠檬酸盐缓冲液;所述终止液为硫酸溶液;所述浓缩洗液为含有表面活性剂的磷酸盐缓冲液。

3. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒微孔板上抗氧化低密度脂蛋白单克隆抗体的数量为 1-50 $\mu\text{g}/\text{孔}$;氧化低密度脂蛋白浓度梯度标准品为 6 支、各 2ml;所述氧化低密度脂蛋白质控品为 2 支各 2ml;生物素标记的氧化低密度脂蛋白单克隆抗体 10ml、1 支;辣根过氧化物酶标记的亲素 10ml、1 支;样本缓冲液 10ml、1 支;底物 A 10ml、1 支;底物 B 10ml、1 支;终止液 10ml、1 支;浓缩洗液 10ml、1 支。

4. 根据权利要求 3 所述的试剂盒,其特征在于:所述氧化低密度脂蛋白浓度梯度标准品和氧化低密度脂蛋白质控品都是用氧化低密度脂蛋白纯品与氧化低密度脂蛋白标准品稀释液按照 1:200000-1:1000 稀释而成。

5. 根据权利要求 4 所述的试剂盒,其特征在于:所述的氧化低密度脂蛋白标准品稀释液,是在 pH 7.0-8.0、浓度为 10-100mM 磷酸盐缓冲液中,分别加入 1-10%质量分数的动物血清、0.01-0.5%质量分数的防腐剂、1-10%质量分数的蛋白保护剂、0.05-1%质量分数的表面活性剂混合而成。

6. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述样本缓冲液是在 pH6.0-7.0、浓度为 10-100mM 的磷酸盐缓冲液中,分别加入 0.1-3mM 的金属离子络合剂、1-10%质量分数的蛋白保护剂、0.01-1%质量分数的表面活性剂、0.01-0.5%质量分数的防腐剂混合而成;所述底物 A 是将过氧化氢纯品加入到浓度为 50-100mM 柠檬酸盐缓冲液中配制而成;所述底物 B 是将四甲基联苯胺加入到浓度为 50-100mM 柠檬酸盐缓冲液中配制而成;所述浓缩洗液是把质量分数为 0.05-1%的表面活性剂加到 pH6.0-7.0、浓度为 10-100mM 磷酸盐缓冲液中配制而成。

7. 根据 2-6 任意一项权利要求所述的试剂盒,其特征在于:所述的表面活性剂为曲达通 X-100、吐温 20、布里杰-35、吐温 40、十二烷基磺酸钠、聚乙二醇 2000。

8. 根据权利要求 6 所述的试剂盒,其特征在于:所述的金属离子络合剂为乙二胺四乙酸二钠和乙二胺四乙酸。

9. 根据权利要求 5 所述的试剂盒,其特征在于:所述的蛋白保护剂为牛血清白蛋白、甘油、蔗糖;所述防腐剂为 Proclin 300。

10. 制备如上任意权利要求所述的试剂盒的方法,其特征在于:包括以下步骤,不分前后顺序:

包被有抗氧化低密度脂蛋白单克隆抗体的平台载体的制备:将浓度为 6-10mg/ml 的特异性抗氧化低密度脂蛋白单克隆抗体用浓度为 20-50mM 的磷酸盐缓冲液稀释到浓度为 1-3 $\mu\text{g}/\text{ml}$,加入到平台载体上,4-8 $^{\circ}\text{C}$ 过夜进行包被;然后用浓缩洗液将平台载体清洗至少

3次;再向平台载体上加入含蛋白保护剂的封闭液进行封闭;等待平台载体至干燥后,真空袋封装,4-8℃存放;

氧化低密度脂蛋白浓度梯度标准品和氧化低密度脂蛋白质控品的制备:是用氧化低密度脂蛋白纯品与标准品稀释液按照1:200000-1:1000稀释,最后配制成标示浓度为0-1000ng/ml的氧化低密度脂蛋白浓度梯度标准品以及80-500ng/ml的氧化低密度脂蛋白质控品;其中标准品稀释液是在pH 7.0-8.0、浓度为10-100mM磷酸盐缓冲液中,分别加入1%-4%质量分数的动物血清、0.05-0.5%质量分数的防腐剂、3-5%质量分数的蛋白保护剂、0.1-0.5%质量分数的表面活性剂;将得到的氧化低密度脂蛋白浓度梯度标准品与氧化低密度脂蛋白质控品每瓶500u1分装,然后冻干成粉末状,4-8℃保存;

生物素标记的氧化低密度脂蛋白克隆抗体制备:在偶联前将生物素活化;然后将浓度为1-5mg/ml待标记的氧化低密度脂蛋白抗体用50-100mM碳酸盐缓冲液稀释到浓度为1-2mg/ml,并用稀释后的碳酸盐缓冲液透析6-15h后;将活化后的生物素溶解于二甲基亚砜纯品中待用,把处理后的氧化低密度脂蛋白抗体溶解到于50-100mM碳酸盐缓冲液中,按体积比1:6-1:10混合含有生物素活化的二甲基亚砜和含有氧化低密度脂蛋白抗体的碳酸盐缓冲液,在室温下温育4h后用PBS透析纯化;将所得生物素标记氧化低密度克隆抗体加入0.02%质量分数的NaN₃等体积混合,分装后,4℃避光保存,或者将所得生物素标记氧化低密度克隆抗体加入50%质量分数的甘油,-15--20℃保存备用;

辣根过氧化物酶标记的亲合素的制备:称取过碘酸钠加入到纯净水中配置得到终浓度为10-15mg/ml的过碘酸钠溶液;将终浓度为10-15mg/ml的过碘酸钠溶液与浓度为1-2mg/u1的辣根过氧化物酶等比例混合得到被过碘酸钠氧化过的辣根过氧化物酶;然后将亲合素用浓度为10-100mM的磷酸盐缓冲液溶解透析,透析后的亲合素用碳酸盐缓冲液等体积混合稀释;再将氧化过的辣根过氧化物酶与浓度为1-2mg/ml亲合素等体积混合后在4-8℃透析10-12h;用去离子水溶解硼氢化钠成终浓度为8-12mg/ml,然后按照亲合素-HRP与硼氢化钠溶液体积比1:8-12混合,置于4℃,2h;取等体积的饱和硫酸铵溶液,加入到标记混合溶液中,置于4℃沉淀1h;将得到的产物8000r/min,4℃,离心20min;去掉上清液,用1ml、20mM、pH7.4的PBS复溶沉淀物;将得到的复溶溶液加入到分子筛小柱子中,接取有颜色的部分;该有颜色的部分即为标记好的酶标亲合素,将标记好的酶标亲合素与甘油1:1等体积混合,-15--20℃保存备用。

样本缓冲液的配制:所述样本缓冲液是在pH6.0-7.0、浓度为10-100mM的磷酸盐缓冲液中,分别加入0.1-3mM的金属离子络合剂、1-10%质量分数的蛋白保护剂、0.01-1%质量分数的表面活性剂、0.01-0.5%质量分数的防腐剂混合而成;

底物A:将过氧化氢纯品加入到浓度为10-100mM柠檬酸盐缓冲液中,配制成过氧化氢质量分数为20-50%的柠檬酸盐混合溶液;

底物B:将四甲基联苯胺加入到浓度为10-100mM柠檬酸盐缓冲液中,配制成四甲基联苯胺质量分数为5-20%的柠檬酸盐混合溶液;

终止液:将浓硫酸加水稀释至1M;

浓缩洗液:把质量分数为0.05-1%的表面活性剂加到pH6.0-7.0、浓度为10-100mM磷酸盐缓冲液中,然后混匀。

一种检测样本中氧化低密度脂蛋白浓度的试剂盒及其制备方法

方法

技术领域

[0001] 本发明属于体外免疫检测技术领域,具体涉及一种检测样本中氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)浓度的试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 脂蛋白是血浆胆固醇和甘油三酯的主要载体;低密度脂蛋白(LDL)是一种密度较低($1.019 \sim 1.063\text{g/cm}^3$)的血浆脂蛋白,由磷脂,载脂蛋白(ApO)B多肽链,胆固醇,甘油三酯,碳水化合物等组成,约含25%蛋白质与49%胆固醇及胆固醇酯;氧化低密度脂蛋白(OxLDL)是天然的低密度脂蛋白(LDL)经氧化修饰形成的脂蛋白。

[0003] 近年来人们发现OxLDL与动脉粥样硬化有密切的关系。Ox-LDL促使泡沫细胞的形成,而泡沫细胞的死亡将导致脂类在动脉壁的沉积,这是导致动脉粥样硬化的主要病因之一。最近研究表明,在动脉粥样硬化病灶中发现了OxLDL沉积,在正常动脉壁中没有,此属于动脉粥样硬化病灶的特有成分,因此,患者体内的OxLDL量远高于正常人,其浓度与病变范围呈比例。临床认为健康人体内Ox-LDL的含量为 $200\text{--}500 \mu\text{g/L}$,而当临床检测OxLDL含量大于 $600 \mu\text{g/L}$ 时为异常。因此Ox-LDL的检测对动脉粥样硬化心血管病的预警及早期辅助诊断具有重要意义。

[0004] 目前,在市面上检测OxLDL浓度常用的试剂种类少,检测成本高,操作繁琐,对实验操作人员的技能要求高,不利于该项目检测的大范围推广。

发明内容

[0005] 针对上述技术的不足之处,本发明提供一种操作简便、便于实验人员掌握、涉及实验仪器单一、普及率高、检测成本低、检测结果准确,非常利于大范围推广的氧化低密度脂蛋白(OxLDL)定量检测试剂盒。

[0006] 一种检测样本中氧化低密度脂蛋白浓度的试剂盒,包括包被有抗氧化低密度脂蛋白克隆抗体的平台载体、不同浓度氧化低密度脂蛋白浓度梯度标准品、氧化低密度脂蛋白质控品、生物素标记的氧化低密度脂蛋白克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的亲合素、样本缓冲液、底物A、底物B、终止液、浓缩洗液。

[0007] 进一步的,所述平台载体为微孔板,所述微孔板为96孔聚苯乙烯微孔板;所述抗氧化低密度脂蛋白克隆抗体为抗氧化低密度脂蛋白单克隆抗体;所述氧化低密度脂蛋白克隆抗体为氧化低密度脂蛋白单克隆抗体;所述底物A为过氧化氢的柠檬酸盐缓冲液;所述底物B为四甲基联苯胺的柠檬酸盐缓冲液;所述终止液为硫酸溶液;所述浓缩洗液为含有表面活性剂的磷酸盐缓冲液。

[0008] 进一步的,所述试剂盒微孔板上抗氧化低密度脂蛋白单克隆抗体的数量为 $1\text{--}50 \mu\text{g/孔}$;氧化低密度脂蛋白浓度梯度标准品为6支、各2ml;所述氧化低密度脂蛋白质控品为2支各2ml;生物素标记的氧化低密度脂蛋白单克隆抗体10ml、1支;辣根过氧化物

酶标记的亲素 10ml、1 支；样本缓冲液 10ml、1 支；过氧化氢的柠檬酸盐缓冲液 10ml、1 支；四甲基联苯胺的柠檬酸盐缓冲液 10ml、1 支；硫酸溶液 10ml、1 支；含有表面活性剂的磷酸盐缓冲液 10ml、1 支。

[0009] 进一步的，所述氧化低密度脂蛋白浓度梯度标准品和质控品都是用氧化低密度脂蛋白纯品与标准品稀释液按照 1:200000-1:1000 稀释而成，所述标准品不少于 2 个，所述质控品和所述标准品的区别只是浓度不同，所述质控品的作用是在试剂盒使用过程中起到核准校对的作用，即通过质控品测值是否在质控范围内来对标准品拟合出来的曲线进行核准校对，若质控品测值合格，则可以利用标准曲线来拟合出样本中的氧化低密度脂蛋白浓度值。

[0010] 进一步的，所述的标准品稀释液，是在 pH 7.0-8.0、浓度为 10-100mM 磷酸盐缓冲液中，分别加入 1-10% 质量分数的动物血清、0.01-0.5% 质量分数的防腐剂、1-10% 质量分数的蛋白保护剂、0.05-1% 质量分数的表面活性剂混合而成。

[0011] 进一步的，所述样本缓冲液是在 pH6.0-7.0、浓度为 10-100mM 的磷酸盐缓冲液中，分别加入 0.1-3mM 的金属离子络合剂、1-10% 质量分数的蛋白保护剂、0.01-1% 质量分数的表面活性剂、0.01-0.5% 质量分数的防腐剂混合而成；所述底物 A 是将过氧化氢纯品加入到浓度为 50-100mM 柠檬酸盐缓冲液中配制而成；所述底物 B 是将四甲基联苯胺加入到浓度为 50-100mM 柠檬酸盐缓冲液中配制而成；所述浓缩洗液是把质量分数为 0.05-1% 的表面活性剂加到 pH6.0-7.0、浓度为 10-100mM 磷酸盐缓冲液中配制而成。

[0012] 进一步的，所述表面活性剂为曲达通 X-100、吐温 20 (Tween 20)、布里杰-35 (BRIJ-35)、吐温 40、十二烷基磺酸钠、聚乙二醇 2000；所述的防腐剂为 PrOclin 300。

[0013] 进一步的，所述的金属离子络合剂为乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-2Na) 和乙二胺四乙酸 (EDTA)。

[0014] 进一步的，所述的蛋白保护剂为牛血清白蛋白、甘油、蔗糖。

[0015] 制备如上所述的试剂盒的方法，包括以下步骤，所述步骤不分前后顺序：

[0016] 包被有抗氧化低密度脂蛋白单克隆抗体的平台载体的制备：将浓度为 6-10mg/ml 的特异性抗氧化低密度脂蛋白单克隆抗体用浓度为 20-50mmol 的磷酸盐缓冲液稀释到浓度为 1-3mg/ml，加入到平台载体上，4-8℃ 过夜进行包被；然后用浓缩洗液将平台载体清洗至少 3 次；再向平台载体上加入含蛋白保护剂的封闭液（所述封闭液包括蛋白保护剂质量分数 8-12%、蛋白质量分数 1-3%、防腐剂质量分数 0.1-3%、10-50mM 磷酸盐缓冲剂）进行封闭；等待平台载体至干燥后，真空袋封装，4-8℃ 存放；

[0017] 氧化低密度脂蛋白浓度梯度标准品和质控品的制备：是用氧化低密度脂蛋白纯品与标准品稀释液按照 1:200000-1:1000 稀释，最后配制成标示浓度为 0-1000ng/ml 的一浓度梯度标准品以及 80-500ng/ml 的质控品；其中标准品稀释液是在 pH 7.0-8.0、浓度为 10-100mM 磷酸盐缓冲液中，分别加入 1%-4% 质量分数的动物血清、0.1-0.5% 质量分数的防腐剂、3-5% 质量分数的蛋白保护剂、0.1-0.5% 质量分数的表面活性剂；所得到的浓度梯度标准品的浓度分别为 0、50、100、250、500、1000ng/ml，将得到的浓度梯度标准品与质控品每瓶 500ul 分装，然后冻干成粉末状，4-8℃ 保存；

[0018] 生物素标记的氧化低密度脂蛋白克隆抗体制备：在偶联前将生物素活化；然后将浓度为 1-5mg/ml 待标记的氧化低密度脂蛋白抗体用 50-100mM 碳酸盐缓冲液稀释到浓度

为 1-2mg/ml,并用稀释后的碳酸盐缓冲液透析 6-15h 后;将活化后的生物素溶解于二甲基亚砷纯品中待用,把处理后的氧化低密度脂蛋白抗体溶解到于碳酸盐缓冲液中,按体积比 1:6-1:10 混合含有生物素活化的二甲基亚砷和含有氧化低密度脂蛋白抗体的碳酸盐缓冲液,在室温下温育 4h 后用 PBS 透析纯化;将所得生物素标记氧化低密度克隆抗体加入 NaN_3 或者甘油等体积混合,-15--20°C 保存备用;

[0019] 辣根过氧化物酶标记的亲合素的制备:称取过碘酸钠加入到纯净水中配置得到终浓度为 10-15mg/ml 的过碘酸钠溶液;将终浓度为 10-15mg/ml 的过碘酸钠溶液与浓度为 1-2mg/u1 的辣根过氧化物酶等比例混合得到被过碘酸钠氧化过的辣根过氧化物酶;将氧化过的辣根过氧化物酶与浓度为 1-2mg/ml 亲和素等体积混合后在 4-8°C 透析 10-12h;然后在透析液中按 1:8-12 加入 8-12mg/ml 硼氢化钠还原即得酶标亲和素;将所得酶标亲和素与甘油等体积混合,-15--20°C 保存备用;

[0020] 样本缓冲液的配制:所述样本缓冲液是在 PH6.0-7.0、浓度为 10-100mM 的磷酸盐缓冲液中,分别加入 0.1-3mM 的金属离子络合剂、1-10%质量分数的蛋白保护剂、0.01-1%质量分数的表面活性剂、0.01-0.5%质量分数的防腐剂混合而成;

[0021] 底物 A:将过氧化氢纯品加入到浓度为 10-100mM 柠檬酸盐缓冲液中,配制过氧化氢质量分数为 20-50%的柠檬酸盐混合溶液;

[0022] 底物 B:将四甲基联苯胺加入到浓度为 10-100mM 柠檬酸盐缓冲液中,配制四甲基联苯胺质量分数为 5-20%的柠檬酸盐混合溶液;

[0023] 终止液:将浓硫酸加水稀释至 1M;

[0024] 浓缩洗液:把质量分数为 0.05-1%的表面活性剂加到 PH6.0-7.0、浓度为 10-100mM 磷酸盐缓冲液中,然后混匀。

[0025] 磷酸盐缓冲液的简称为 PBS,其为磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠的混合物,是按照实验室常规操作制备而成;辣根过氧化物酶简写 HRP;

[0026] 本发明由于所用的检测仪器较为简单,均为通常所用仪器,故检测成本较低,利于推广;并且该试剂盒容易操作,不需要专业的人员即可实现;同时试剂盒内独特的标准品稀释液和样本缓冲液配方,大大提高了检测结果的可靠性和准确性。

附图说明

[0027] 图 1 为实施例 8 标准曲线图。

[0028] 图 2 为实施例 9 标准曲线图。

[0029] 图 3 为实施例 10 标准曲线图。

[0030] 图 4 为实施例 11 标准曲线图。

[0031] 图 5 为实施例 12 标准曲线图。

[0032] 图 6 为实施例 13 标准曲线图。

具体实施方式

[0033] 下面结合附图对本发明作进一步详细说明。

[0034] 实施例 1:生物素标记的氧化低密度脂蛋白克隆抗体制备

[0035] (1) 生物素的活化

[0036] 生物素在与氧化低密度脂蛋白克隆抗体偶联前必须先活化,具体活化步骤如下:称取生物素 25g 溶解于 30ml 二甲基甲酰胺溶液中,再依次加入 N-琥珀酰亚胺酯 1.5g 和双环己基炭化二亚胺 2.0g,在室温下密闭磁力搅拌 20-24h,使其析出沉淀物;抽滤除去白色沉淀物,并用二甲基甲酰胺滴加洗涤数次,滤液于 0℃ 过夜,若再次析出白色沉淀物时,再经抽滤处理;除去白色沉淀物的滤液加热至 100℃ 左右,抽滤抽去溶剂中的二甲基甲酰胺;获得的固体物用少量己醛洗涤数次,进一步除去双环己基炭化二亚胺和除去溶剂二甲基甲酰胺,最终获得的固体物即为活化的生物素纯品,放在 P205 干燥器中充分干燥;干燥后的纯品固体物用异丙醇重结晶两次,结晶点 202-208℃;结晶活化生物素纯品置干燥器中,4℃ 保存。

[0037] 其中,生物素(国药, TB046301),二甲基甲酰胺(国药, 81007718), N-琥珀酰亚胺酯(苏州昊帆),双环己基炭化二亚胺(国药沪试, 30056326),己醛(Sigma, A11560604),异丙醇(国药沪试, 80109218)

[0038] (2) 氧化低密度脂蛋白克隆抗体的纯化:

[0039] 将浓度为 1mg/ml 待标记的氧化低密度脂蛋白克隆抗体用 50mM 碳酸盐溶液稀释到浓度为 1mg/ml,并用稀释后的碳酸盐缓冲液透析 6h 即可。

[0040] (3) 活化生物素与氧化低密度脂蛋白克隆抗体的偶联

[0041] 具体制备方法如下:

[0042] 1. 将活化生物素按终浓度为 1mg/ml 溶解于二甲基亚砷纯品中;

[0043] 2. 将待偶联而已经纯化的氧化低密度脂蛋白克隆抗体按浓度 1mg/ml 溶解于 0.1mol/L pH9.0 的碳酸氢钠溶液中;

[0044] 3. 将活化生物素与待偶联的氧化低密度脂蛋白克隆抗体溶液按 1:6 混合,在室温下温育 4h;

[0045] 4. 在 4℃ 下用 0.1mol/L, pH7.2 的 PBS 透析 24h,其中换液 4 次,以除去未结合的游离生物素;

[0046] 5. 加入 50% 质量分数重蒸甘油于已结合有生物素的氧化低密度脂蛋白克隆抗体溶液中,置 -20℃ 保存。

[0047] 其中,二甲基亚砷(国药沪试, 30072418),碳酸氢钠(国药沪试, 10018960),PBS(磷酸氢二钠国药沪试, 10020328,磷酸二氢钠国药沪试, 20040718,氯化钠国药沪试, 10019318),Na₃(Acros, C190381000),重蒸甘油(国药沪试, 10010618)

[0048] 实施例 2:生物素标记的氧化低密度脂蛋白克隆抗体制备

[0049] 该实施例里面制备步骤与实施例 1 基本相同,不同的是:

[0050] 步骤(3)中的第 5 步,加入 50% 质量分数重蒸甘油于已结合有生物素的氧化低密度脂蛋白克隆抗体溶液中,置 -15℃ 保存。

[0051] 实施例 3:生物素标记的氧化低密度脂蛋白克隆抗体制备

[0052] 该实施例里面制备步骤与实施例 1 基本相同,不同的是:

[0053] (2) 氧化低密度脂蛋白克隆抗体的纯化:

[0054] 将浓度为 5mg/ml 待标记的氧化低密度脂蛋白克隆抗体用 100mM 碳酸盐溶液稀释到浓度为 2mg/ml,并用稀释后的碳酸盐缓冲液透析 15h 即可。

[0055] (3) 活化生物素与氧化低密度脂蛋白克隆抗体的偶联

[0056] 具体制备方法如下：

[0057] 1. 将活化生物素按终浓度为 5mg/ml 溶解于二甲基亚砷纯品中；

[0058] 2. 将待偶联而已经纯化的氧化低密度脂蛋白克隆抗体按浓度 5mg/ml 溶解于 0.05mol/L pH9.0 的碳酸氢钠溶液中；

[0059] 3. 将活化生物素与待偶联的氧化低密度脂蛋白克隆抗体溶液按 1:10 混合,在室温下温育 4h；

[0060] 4. 在 4℃ 下用 0.05mol/L, pH7.2 的 PBS 透析 24h, 其中换液 4 次, 以除去未结合的游离生物素；

[0061] 5. 加入 0.02% 质量分数 NaN_3 于已结合有生物素的氧化低密度脂蛋白克隆抗体溶液中, 分装后, 4℃ 避光保存。

[0062] 实施例 4: 辣根过氧化物酶标记亲和素的制备

[0063] (1) 称取辣根过氧化物酶: 称取辣根过氧化物酶 (HRP) 约 2mg, 用 100uL 去离子水溶解得到终浓度为 1mg/uL 的辣根过氧化物酶；

[0064] (2) 称取过碘酸钠: 称取一定量的过碘酸钠, 去离子水溶解成终浓度为 10mg/ml；

[0065] (3) 将上述 (1)、(2) 步骤制得的 100uL HRP 溶液和 100uL 过碘酸钠混匀, 4℃, 反应 30min, 得到被氧化的辣根过氧化物酶；

[0066] (4) 将纯乙二醇用纯净水稀释 10 倍, 取 100uL 加入步骤 (3) 氧化的 HRP 溶液中, 室温, 反应 30min, 终止辣根过氧化物酶继续被氧化；

[0067] (5) 称取亲和素 1mg, 将亲和素用浓度为 10mM 的磷酸盐缓冲液溶解透析 10h, 得到浓度为 1mg/ml 的亲和素；

[0068] (6) 将透析过的亲和素用 40mM, pH9.6 的碳酸盐 (CB) 缓冲液等体积混合稀释；

[0069] (7) 将氧化好的 HRP 溶液与步骤 (6) 得到的经过碱性化的亲和素等体积混合, 然后一起加入透析袋中, 在 20mM CB, pH9.6, 4-8℃ 中透析 10h；

[0070] (8) 将交联好的亲和素-HRP 取出；

[0071] (9) 称取硼氢化钠: 称取一定量的硼氢化钠, 用去离子水溶解成终浓度 8mg/ml, 按照亲和素-HRP 与硼氢化钠溶液体积比 1:8 混合, 置于 4℃, 2h；

[0072] (10) 取等体积的饱和硫酸铵溶液, 加入到标记混合溶液中, 置于 4℃ 沉淀 1h；

[0073] (11) 将步骤 (9) 得到的产物 8000r/min, 4℃, 离心 20min; 去掉上清液, 用 1ml、20mM、pH7.4 的 PBS 复溶沉淀物；

[0074] (12) 将步骤 (10) 得到的复溶溶液加入到分子筛小柱子中, 接取有颜色的部分; 该有颜色的部分即为标记好的酶标亲和素, 将标记好的酶标亲和素与甘油 1:1 等体积混合, -20℃ 保存备用。

[0075] 其中, HRP (国药沪试, 64007360), 过碘酸钠 (国药沪试, 80117316), 乙二醇 (国药沪试, 10009818), 硼氢化钠 (国药沪试, 80115860), 硫酸铵 (国药沪试, 10002917)

[0076] 实施例 5:

[0077] 与实施例 1 基本相同, 不同的是:

[0078] (2) 称取过碘酸钠: 称取一定量的过碘酸钠, 去离子水溶解成终浓度为 15mg/ml；

[0079] (5) 称取亲和素 2mg, 将亲和素用浓度为 10mM 的磷酸盐缓冲液溶解透析 10h, 得到浓度为 2mg/ml 的亲和素；

[0080] (9) 称取硼氢化钠:称取一定量的硼氢化钠,用去离子水溶解成终浓度 8mg/ml,按照亲和素-HRP 与硼氢化钠溶液体积比 1:12 混合,置于 4℃,2h;

[0081] 实施例 6:

[0082] 通过以下方法制备该试剂盒:

[0083] 包被有抗氧化低密度脂蛋白单克隆抗体的微孔板的制备:将浓度为 6mg/ml 的特异性的抗氧化低密度脂蛋白单克隆抗体用 PH 值为 7.4 的 20mM 磷酸钠缓冲液稀释到浓度为 1 μg/ml,加入到 96 孔聚苯乙烯微孔板的凹孔中,1ug/孔,4℃包被过夜;移去包被液,然后用浓缩洗液洗板机将微孔板洗三次;再向微孔板凹孔中加入 300ul/孔的磷酸钠缓冲液,所述磷酸钠缓冲液 PH 为 7.4、浓度为 10mM,且其中含 1%质量分数的牛血清白蛋白,室温封闭 6 小时;甩去凹孔中的封闭液,37℃烤干 4 小时,真空袋封装,4℃存放;

[0084] 氧化低密度脂蛋白浓度梯度标准品和氧化低密度脂蛋白质控品的制备:用含有 1%质量分数的新生牛血清、0.01%质量分数的 PrOclin300、1%质量分数的牛血清白蛋白、0.05%质量分数的 Triton X-100 的 10mM 磷酸钠缓冲溶液 (PH7.0) 将氧化低密度脂蛋白纯品配制成标示浓度为 0、50、100、250、500、1000ng/ml 的一浓度梯度标准品以及 80、500ng/ml 的氧化低密度脂蛋白质控品;然后用冻干机冻干成粉末状,4℃保存;

[0085] 生物素标记的氧化低密度脂蛋白克隆抗体制备:与实施例 1 相同;

[0086] 辣根过氧化物酶标记的亲合素的制备:与实施例 4 相同。

[0087] 样本缓冲液的制备:向 10mM 磷酸钠缓冲液 (PH6.0) 中分别添加 0.1mM EDTA 二钠、1%质量分数的牛血清白蛋白、0.01%质量分数的吐温 20、0.01%质量分数的 PrOclin 300,充分混匀。

[0088] 底物 A、底物 B、终止液和浓缩洗液的制备

[0089] 底物 A:向 10mM 柠檬酸钠缓冲液 (PH4.0) 中添加 20%质量分数的过氧化氢,充分混匀;

[0090] 底物 B:向 10mM 柠檬酸钠缓冲液 (PH4.0) 中添加 5%的四甲基联苯胺,充分混匀;

[0091] 终止液:将浓硫酸加水稀释至 1M 的硫酸溶液;

[0092] 浓缩洗液:向 10mM 磷酸钠缓冲液 (PH6.0) 中加入 0.05%吐温 20,充分混匀。

[0093] 实施例 7:

[0094] 通过以下方法制备该试剂盒:

[0095] 包被有抗氧化低密度脂蛋白单克隆抗体的微孔板的制备:将浓度为 10mg/ml 的特异性的抗氧化低密度脂蛋白单克隆抗体用 PH 值为 7.4 的 50mM 磷酸钠缓冲液稀释到浓度为 3 μg/ml,加入到 96 孔聚苯乙烯微孔板的凹孔中,50ug/孔,8℃包被过夜;移去包被液,然后用浓缩洗液洗板机将微孔板洗三次;再向微孔板凹孔中加入 300ul/孔的磷酸钠缓冲液,所述磷酸钠缓冲液 PH 为 7.4、浓度为 10mM,且其中含 1%质量分数的牛血清白蛋白,室温封闭 6 小时;甩去凹孔中的封闭液,37℃烤干 4 小时,真空袋封装,8℃存放;

[0096] 氧化低密度脂蛋白浓度梯度标准品和氧化低密度脂蛋白质控品的制备:用含有 10%质量分数的新生牛血清、0.5%质量分数的 PrOclin300、10%质量分数的牛血清白蛋白、1%质量分数的 Triton X-100 的 100mM 磷酸钠缓冲溶液 (PH8.0) 将氧化低密度脂蛋白纯品配制成标示浓度为 0、50、100、250、500、1000ng/ml 的一浓度梯度标准品以及 120、300ng/ml 的氧化低密度脂蛋白质控品;然后用冻干机冻干成粉末状,4℃保存;

- [0097] 生物素标记的氧化低密度脂蛋白克隆抗体制备 :与实施例 2 相同 ;
- [0098] 辣根过氧化物酶标记的亲生素的制备 :与实施例 5 相同。
- [0099] 样本缓冲液的制备 :向 100mM 磷酸钠缓冲液 (PH7.0) 中分别添加 3mM EDTA、10% 质量分数的蔗糖、1% 质量分数的吐温 40、0.5% 质量分数的 Proclin 300, 充分混匀。
- [0100] 底物 A、底物 B、终止液和浓缩洗液的制备
- [0101] 底物 A :向 100mM 柠檬酸钠缓冲液 (PH4.0) 中添加 50% 质量分数的过氧化氢, 充分混匀 ;
- [0102] 底物 B :向 100mM 柠檬酸钠缓冲液 (PH4.0) 中添加 20% 的四甲基联苯胺, 充分混匀 ;
- [0103] 终止液 :将浓硫酸加水稀释至 1M 的硫酸溶液 ;
- [0104] 浓缩洗液 :向 100mM 磷酸钠缓冲液 (PH7.0) 中加入 1% 吐温 40, 充分混匀。
- [0105] 实施例 8 :
- [0106] 与实施例 6 基本相同, 不同的是 :
- [0107] 包被有抗氧化低密度脂蛋白单克隆抗体的微孔板的制备 :将浓度为 8mg/ml 的特异性的抗氧化低密度脂蛋白单克隆抗体用 PH 值为 7.4 的 30mM 磷酸钠缓冲液稀释到浓度为 1 μ g/ml, 加入到 96 孔聚苯乙烯微孔板的凹孔中, 25 μ g/ 孔, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜 ;移去包被液, 然后用洗板机将微孔板洗三次 ;再向微孔板凹孔中加入含 1% 牛血清白蛋白的 PH7.4 的 10mM 磷酸钠缓冲液 :300 μ l/ 孔, 室温封闭 6 小时 ;甩去凹孔中的封闭液, 37 $^{\circ}$ C 烤干 4 小时, 真空袋封装, 4 $^{\circ}$ C 存放 ;
- [0108] 氧化低密度脂蛋白浓度梯度标准品和质控品的制备 :用含有 1% 新生牛血清、0.05% Proclin300、3% 牛血清白蛋白、0.1% 曲达通 X-100 的 20mM 磷酸钠缓冲溶液 (PH7.4) 将氧化低密度脂蛋白纯品配制成标示浓度为 0、50、100、250、500、1000ng/ml 的一浓度梯度标准品以及 120、300ng/ml 的质控品 ;然后用冻干机冻干成粉末状, 4 $^{\circ}$ C 保存 ;
- [0109] 样本缓冲液的制备 :向 10mM 磷酸盐缓冲液 (PH6.4) 中分别添加 :1mM EDTA 二钠、1% 质量分数的牛血清白蛋白、0.1% 质量分数的 Tween 20、0.1% 质量分数的布里杰 -35 和 0.05% Proclin 300, 充分混匀。
- [0110] 如附图 1 所示为本实施例的标准曲线图。
- [0111] 实施例 9 :
- [0112] 与实施例 6 基本相同, 不同的是 :
- [0113] 氧化低密度脂蛋白浓度梯度标准品和质控品的制备 :用含有 2% 山羊血清、0.1% 叠氮钠、1% 牛 γ 蛋白、0.1% Tween 20 的 20mM 磷酸钠缓冲溶液 (PH7.4) 将氧化低密度脂蛋白配制成标示浓度为 0、50、100、250、500、1000ng/ml 的一浓度梯度标准品以及 120、300ng/ml 的质控品 ;然后用冻干机冻干成粉末状, 4 $^{\circ}$ C 保存 ;
- [0114] 样本缓冲液的制备 :向 20mM 柠檬酸钠缓冲液 (PH4.5) 中分别添加 :0.5mM EDTA 四钠、2% 牛血清白蛋白、0.05% Triton X-100、0.2% BRIJ-35 和 0.05% Proclin 300, 充分混匀。
- [0115] 如附图 2 所示为本实施例的标准曲线图。
- [0116] 实施例 10 :
- [0117] 与实施例 7 基本相同, 不同的是 :

[0118] 氧化低密度脂蛋白浓度梯度标准品和质控品的制备：

[0119] 用含有 1% 马血清、0.1% 叠氮钠、3% 牛血清白蛋白、0.1% Tween 80 的 20mM 磷酸钠缓冲溶液 (PH7.4) 将氧化低密度脂蛋白纯品配制成标示浓度为 0、50、100、250、500、1000ng/ml 的一浓度梯度标准品以及 120、300ng/ml 的质控品；然后用冻干机冻干成粉末状，4℃ 保存；

[0120] 样本缓冲液的制备：向 15mM 磷酸盐缓冲液 (PH6.4) 中分别添加：0.1mM EDTA 二钠、1% 牛 γ 蛋白、0.1% Triton X-100、0.15% BRIJ-35 和 0.1% 叠氮钠，充分混匀。

[0121] 如附图 3 所示为本实施例的标准曲线图。

[0122] 实施例 11：

[0123] 与实施例 7 基本相同，不同的是：

[0124] 氧化低密度脂蛋白浓度梯度标准品和质控品的制备：用含有 1.5% 猪血清、0.1% PrOclin 300、1.5% 牛血清白蛋白、0.1% SDS 的 20mM 磷酸缓冲溶液 (PH7.4) 将氧化低密度脂蛋白纯品配制成标示浓度为 0、50、100、250、500、1000ng/ml 的一浓度梯度标准品以及 120、300ng/ml 的质控品；然后用冻干机冻干成粉末状，4℃ 保存；

[0125] 样本缓冲液的制备：向 20mM 磷酸盐缓冲液 (PH7.4) 中分别添加：0.2mM EDTA 二钠、3% 牛血清白蛋白、0.1% Tween 20、0.15% SDS 和 0.1% PrOclin 300，充分混匀。

[0126] 如附图 4 所示为本实施例的标准曲线图。

[0127] 实施例 12：

[0128] 与实施例 7 基本相同，不同的是：

[0129] 氧化低密度脂蛋白浓度梯度标准品和质控品的制备：用含有 5% 鸡血清、0.3% 硫柳汞、8% 海藻糖、0.5% PEG4000 (聚乙二醇 4000) 的 20mM/L 磷酸钠缓冲溶液 (PH7.8) 将氧化低密度脂蛋白纯品配制成标示浓度为 0、50、100、250、500、1000ng/ml 的一浓度梯度标准品以及 150、500ng/ml 的质控品；然后用冻干机冻干成粉末状，4℃ 保存；

[0130] 样本缓冲液的制备：向 35mM/L 柠檬酸钠缓冲液 (PH4.5) 中分别添加：0.05% EDTA 四钠、3% 甘油、0.1% PEG4000 (聚乙二醇 4000)、0.15% BRIJ-35 和 0.01% 硫酸庆大霉素，充分混匀。

[0131] 如附图 5 所示为本实施例的标准曲线图。

[0132] 实施例 13：

[0133] 与实施例 6 基本相同，不同的是：

[0134] 氧化低密度脂蛋白浓度梯度标准品和质控品的制备：用含有 1.5% 鼠血清、0.1% 叠氮钠、3% 牛血清白蛋白、0.1% Tween 60 的 15mM 磷酸钠缓冲溶液 (PH7.2) 将氧化低密度脂蛋白纯品配制成标示浓度为 0、50、100、250、500、1000ng/ml 的一浓度梯度标准品以及 150、500ng/ml 的质控品；然后用冻干机冻干成粉末状，4℃ 保存；

[0135] 样本缓冲液的制备：向 50mM 柠檬酸钠缓冲液 (PH4.2) 中分别添加：0.5mM EDTA 二钠、4.5% 牛血清白蛋白、0.1% Span-20、0.15% Tween 20 和 0.1% PrOclin 300，充分混匀。

[0136] 终止液：2M 的硫酸溶液；

[0137] 浓缩洗液：向 0.2M 磷酸钠盐缓冲液 (PH7.4) 中加入 1% Tween60，充分混匀；

[0138] 如附图 6 所示为本实施例的标准曲线图。

[0139] 实施例 14：

[0140] 本发明氧化低密度脂蛋白 (OxLDL) 定量检测试剂盒的操作使用方法如下：

[0141] 1. 将标准品和质控品用去离子水复溶混匀, 分别向微孔板中加入标准品 100ul/孔、质控和样本各 10ul 和 90ul 样本缓冲液 / 孔, 放在摇床上室温反应 45min ;

[0142] 2. 用浓缩洗液通过洗板机洗板三次, 拍干 ;

[0143] 3. 向微孔板中加入生物素标记的抗体 100ul/ 孔, 放在摇床上室温反应 45min ;

[0144] 4. 用洗液通过洗板机洗板三次, 拍干 ;

[0145] 5. 向微孔板中加入酶标的亲和素 100ul/ 孔, 放在摇床上室温反应 30min ;

[0146] 6. 用洗液通过洗板机洗板三次, 拍干 ;

[0147] 7. 底物 A、底物 B 等体积混匀, 向微孔板中加入 100ul/ 孔, 37℃ 反应 15min ;

[0148] 8. 向微孔板中加入终止液 100ul/ 孔 ;

[0149] 9. 利用酶标仪在 450nm 处读取各反应孔的 OD 值 ;

[0150] 10. 将标准品的浓度值和 OD 值进行二次曲线回归拟合出标准曲线, 再将样本的 OD 值带入标准曲线中, 即可得出样本中 OxLDL 的浓度值。

[0151] 分别将实施例 8-13 得到的质控品与样品按照实施例 14 所述的方法操作, 依次对应表 1-6 的检测结果,

[0152] 表 1 实施例 8 质控品、样本检测结果

[0153]

检测结果	靶值 (范围) ng/ml	OD 值	检测值 (ng/ml)	偏差 (要求小于 15%)
质控 1	120 (96-144)	1.279	121.87	1.56%
质控 2	300 (240-360)	1.657	298.7	-0.4%
样本 1	100	1.168	99.9	-0.1%
样本 2	400	1.735	405.4	1.35%

[0154] 从表 1 可以看出, 质控品 1 和质控品 2 的检测值在对应的靶值范围内, 所以可以确定质控品可控, 结果可信 ; 而样本 1、2 的检测值偏差与其对应的靶值相比, 偏差小于 15%, 说明该试剂盒检测准确率高, 其中样本 1、2 来自于人体血浆。

[0155] 表 2 实施例 9 质控品、样本检测结果

[0156]

检测结果	靶值 (范围) ng/ml	OD 值	检测值 (ng/ml)	偏差 (要求小于 15%)
质控 1	120 (96-144)	0.594	123.2	2.67%
质控 2	300 (240-360)	1.169	301.5	0.5%
样本 1	100	0.517	104.8	4.8%
样本 2	400	1.395	406.5	1.63%

[0157] 从表 2 可以看出, 质控品 1 和质控品 2 的检测值在对应的靶值范围内, 所以可以确定质控品可控, 结果可信 ; 而样本 1、2 的检测值偏差与其对应的靶值相比, 偏差小于 15%, 说明该试剂盒检测准确率高, 其中样本 1、2 来自于人体血浆。

[0158] 表 3 实施例 10 质控品、样本检测结果

[0159]

检测结果	靶值 (范围) ng/ml	OD 值	检测值 (ng/ml)	偏差 (要求小于 15%)
质控 1	120 (96-144)	0.571	122.8	2.3%
质控 2	300 (240-360)	1.2	300.2	0.06%
样本 1	100	0.491	104.5	4.5%
样本 2	400	1.458	407.6	1.9%

[0160] 从表 3 可以看出,质控品 1 和质控品 2 的检测值在对应的靶值范围内,所以可以确定质控品可控,结果可信;而样本 1、2 的检测值偏差与其对应的靶值相比,偏差小于 15%,说明该试剂盒检测准确率高,其中样本 1、2 来自于人体血浆。

[0161] 表 4 实施例 11 质控品、样本检测结果

[0162]

检测结果	靶值 (范围) ng/ml	OD 值	检测值 (ng/ml)	偏差 (要求小于 15%)
质控 1	120 (96-144)	0.589	122.4	2.0%
质控 2	300 (240-360)	1.273	300.1	0.03%
样本 1	100	0.47	98.0	-2.0%
样本 2	400	1.536	403.7	0.925%

[0163] 从表 4 可以看出,质控品 1 和质控品 2 的检测值在对应的靶值范围内,所以可以确定质控品可控,结果可信;而样本 1、2 的检测值偏差与其对应的靶值相比,偏差小于 15%,说明该试剂盒检测准确率高,其中样本 1、2 来自于人体血浆。

[0164] 表 5 实施例 12 质控品、样本检测结果

[0165]

检测结果	靶值 (范围) ng/ml	OD 值	检测值 (ng/ml)	偏差 (要求小于 15%)
质控 1	150 (120-180)	0.734	152.3	1.53%
质控 2	500 (400-600)	1.782	499.0	0.2%
样本 1	100	0.517	107.5	7.5%
样本 2	400	1.587	404.4	1.1%

[0166] 从表 5 可以看出,质控品 1 和质控品 2 的检测值在对应的靶值范围内,所以可以确定质控品可控,结果可信;而样本 1、2 的检测值偏差与其对应的靶值相比,偏差小于 15%,说明该试剂盒检测准确率高,其中样本 1、2 来自于人体血浆。

[0167] 表 6 实施例 13 质控品、样本检测结果

[0168]

检测结果	靶值 (范围) ng/ml	OD 值	检测值 (ng/ml)	偏差 (要求小于 15%)
质控 1	150 (120-180)	0.685	154.1	2.73%
质控 2	500 (400-600)	1.769	493.5	-1.30%
样本 1	100	0.514	112.3	-12.3%
样本 2	400	1.497	390.8	-2.3%

[0169] 从表 6 可以看出,质控品 1 和质控品 2 的检测值在对应的靶值范围内,所以可以确定质控品可控,结果可信;而样本 1、2 的检测值偏差与其对应的靶值相比,偏差小于 15%,说明该试剂盒检测准确率高,其中样本 1、2 来自于人体血浆。

[0170] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

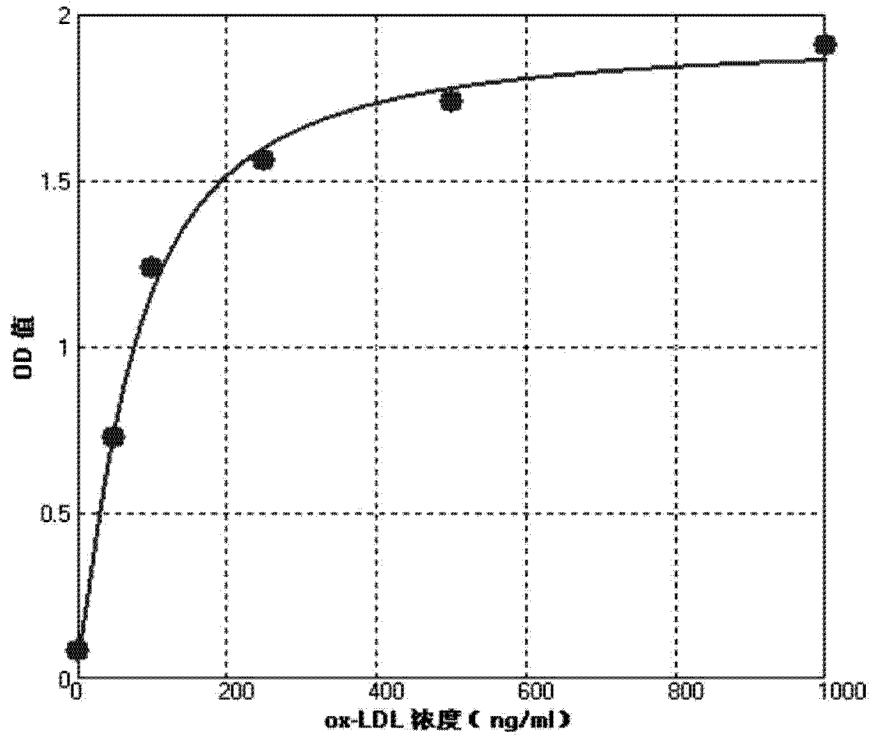


图 1

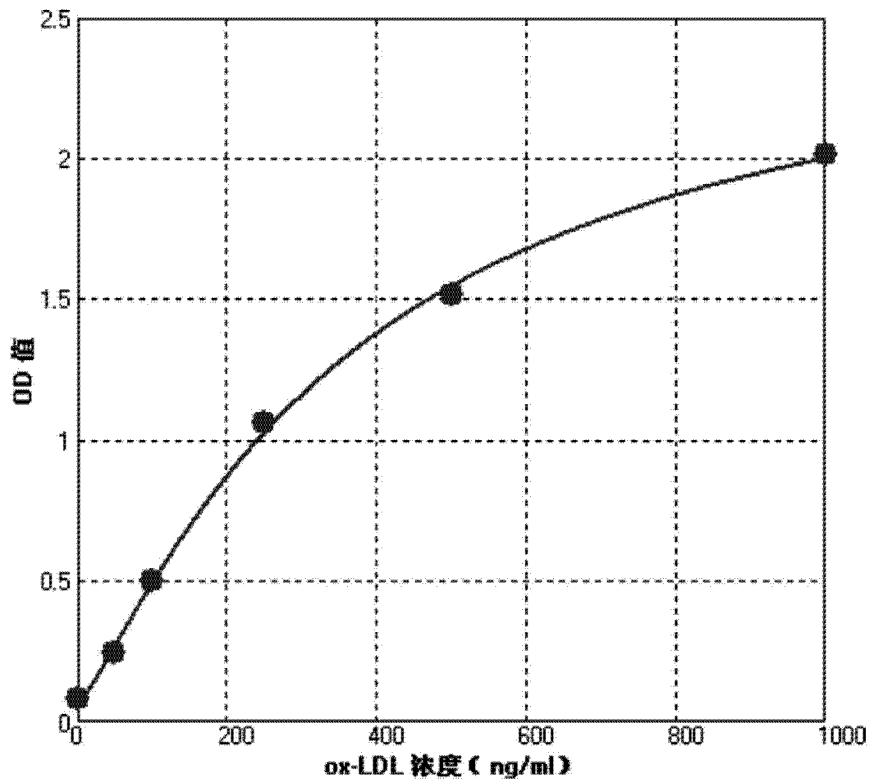


图 2

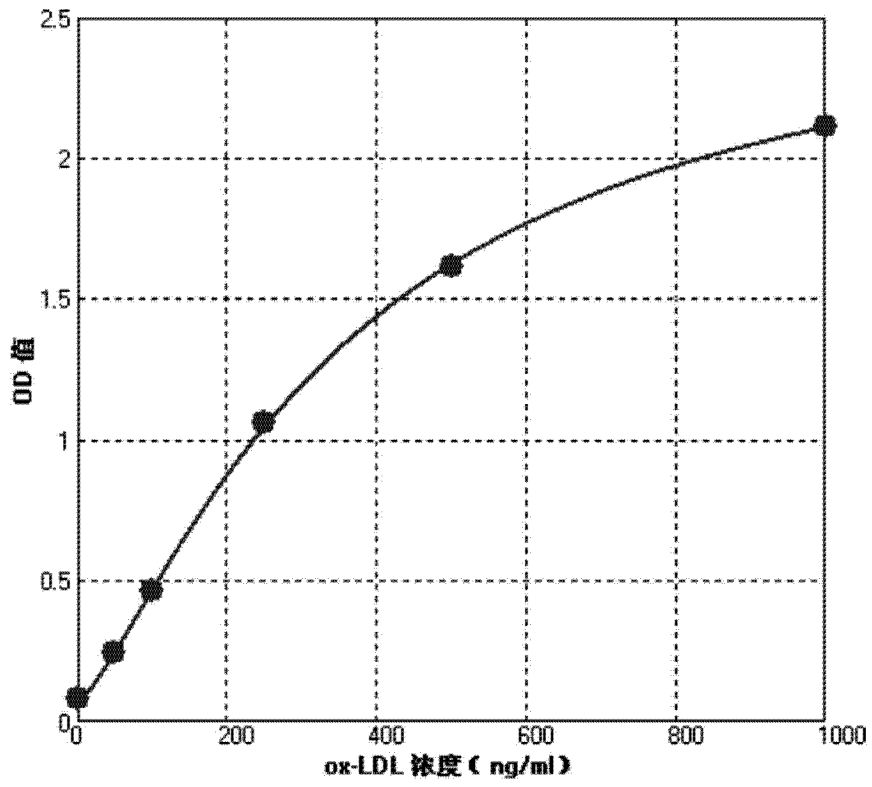


图 3

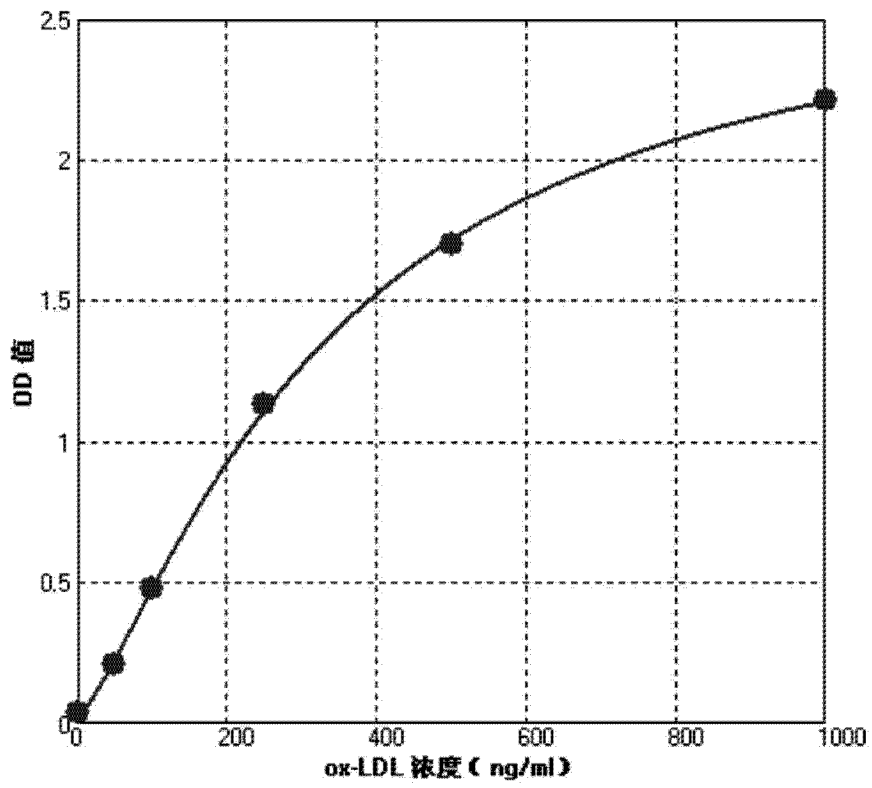


图 4

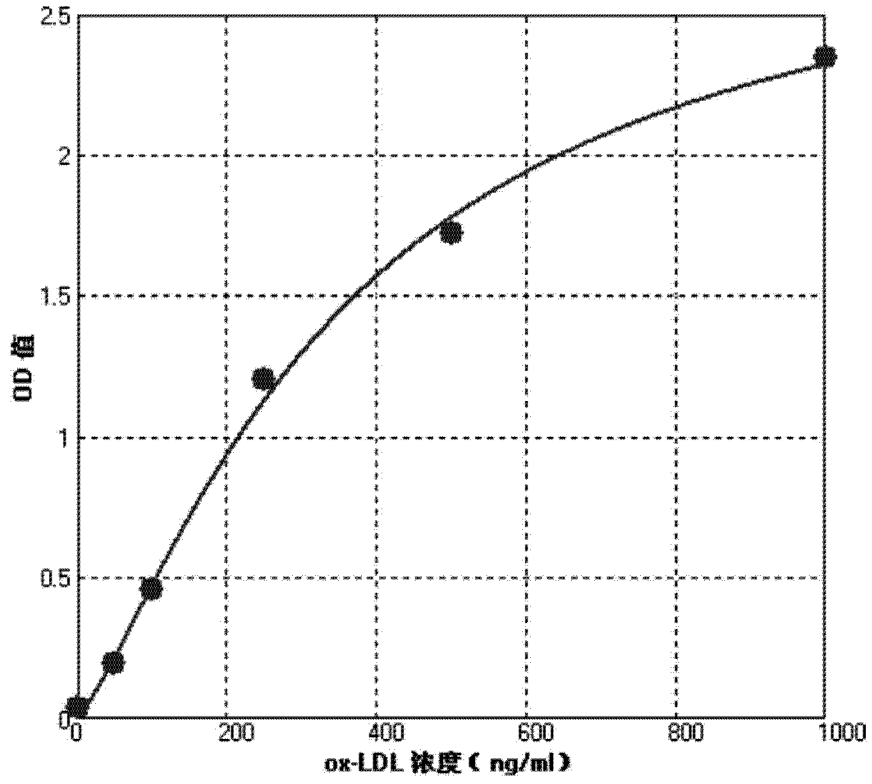


图 5

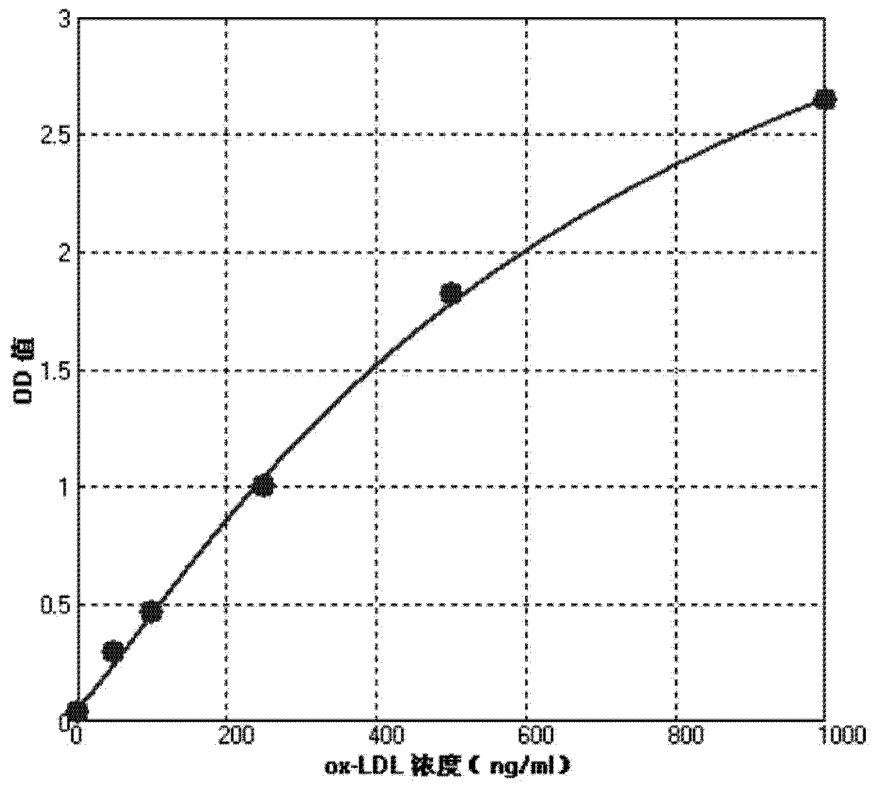


图 6

专利名称(译)	一种检测样本中氧化低密度脂蛋白浓度的试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN104914255A	公开(公告)日	2015-09-16
申请号	CN201510263037.8	申请日	2015-05-21
[标]申请(专利权)人(译)	北京协和洛克生物技术有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	北京协和洛克生物技术有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京协和洛克生物技术有限责任公司		
[标]发明人	郑乐民 张立峰 李晓燕 马志军 吴建榕 马奕晶		
发明人	郑乐民 张立峰 李晓燕 马志军 吴建榕 马奕晶		
IPC分类号	G01N33/92 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/531		
代理人(译)	刘洪勋 郭丽英		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于体外免疫检测技术领域，具体涉及一种检测样本中氧化低密度脂蛋白浓度的试剂盒及其制备方法。所述试剂盒包括包被有抗氧化低密度脂蛋白单克隆抗体的平台载体、不同浓度氧化低密度脂蛋白浓度梯度标准品、氧化低密度脂蛋白质控品、生物素标记的氧化低密度脂蛋白克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的亲合素、样本缓冲液、底物A、底物B、终止液、浓缩洗液。本发明由于所用的检测仪器较为简单，均为通常所用仪器，故检测成本较低，利于推广；并且该试剂盒容易操作，不需要专业的人员即可实现；同时试剂盒内独特的标准品稀释液和样本缓冲液配方，大大提高了检测结果的可靠性和准确性。

