



(21) 申请号 202310634624.8

(22) 申请日 2023.05.31

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 116953224 A

(43) 申请公布日 2023.10.27

(73) 专利权人 复旦大学附属华山医院  
地址 200040 上海市静安区乌鲁木齐中路  
12号

专利权人 广东优尼德生物科技有限公司

(72) 发明人 关明 钟铃 周鹏程 徐爱民  
曹国君

(74) 专利代理机构 北京预立生科知识产权代理  
有限公司 11736

专利代理师 朱萍

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 107389946 A, 2017.11.24

CN 114200125 A, 2022.03.18

CN 116087502 A, 2023.05.09

WO 9007114 A1, 1990.06.28

CN 105891507 A, 2016.08.24

CN 104897904 A, 2015.09.09

CN 104897901 A, 2015.09.09

CN 108535485 A, 2018.09.14

刘春娥等. 渔药恩诺沙星完全抗原合成方法及效果的研究. 水产学报. 2005, 第29卷(第04期), 第539页左栏最后四行.

刘春娥等. 渔药恩诺沙星完全抗原合成方法及效果的研究. 水产学报. 2005, (第04期), 第539页左栏最后4行.

注意:

申请人在申请日后补交了实验数据, 但该数据并未包含在本授权公告文档中。

审查员 诸葛瑞鹏

权利要求书1页 说明书11页

(54) 发明名称

一种检测FGF21的发光试剂及其应用

(57) 摘要

本发明属于生物医药领域, 具体涉及一种检测FGF21的发光试剂及其应用。本发明改良了发光试剂的制备方法, 使用本发明所制备得到的发光试剂能准确检测FGF21蛋白, 为临床检测提供了更有效的检测方法和检测产品。具体地, 所述制备方法具体包括磁微球的偶联的步骤和吡啶酯抗体交联的步骤。同时, 本发明提供了所述制备方法所得到的发光试剂的保存溶液, 所述保存溶液有利于发光试剂的长时间稳定保存。

1. 一种用于检测FGF21的发光检测试剂组合物的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括:FGF21特异性抗体包被的表面覆盖羧基的磁微粒的制备步骤,偶联了FGF21特异性抗体的吡啶酯-抗体交联物的制备步骤;

所述FGF21特异性抗体包被的表面覆盖羧基的磁微粒的制备步骤包括:微球活化;微球与FGF21特异性抗体交联;微球清洗及清洗后封闭;

所述微球活化的步骤如下:活化剂为EDC和sulfo-NHS,并使用0.1M MES pH5.0配制,所述EDC的使用量是每mg磁珠添加20 $\mu$ g EDC,所述EDC和sulfoNHS的摩尔比为1:1;

所述微球与FGF21特异性抗体交联的步骤如下:将微球与FGF21特异性抗体加入到pH9.5的NaHCO<sub>3</sub>交联溶液中进行交联,所述FGF21特异性抗体浓度为0.2mg/ml,微球浓度为10mg/ml;

所述微球清洗及清洗后封闭的步骤如下:使用1x TBST以2000rpm/min混合震荡清洗微球,震荡后分离去上清,共清洗5次;清洗后去上清,然后加入乙二醇和脂肪醇聚氧乙烯醚进行封闭,二者终浓度均为1%,封闭需放置于振荡器上以2000rpm/min混合震荡,在室温下进行震荡封闭2小时;

所述偶联了FGF21特异性抗体的吡啶酯-抗体交联物的制备步骤包括:交联,封闭;

所述交联的步骤如下:将吡啶酯和FGF21特异性抗体加入到pH9.5的NaHCO<sub>3</sub>交联溶液中进行交联,溶液中吡啶酯和FGF21特异性抗体的摩尔比为20:1;

所述封闭的步骤如下:使用封闭液进行封闭,所述封闭液为9%甘氨酸、1% BSA、50mM Tris、300mM NaCl,pH8.0。

2. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述FGF21特异性抗体包被的表面覆盖羧基的磁微粒置于保存溶液中保存,所述保存溶液包括缓冲液、还原剂和表面活性剂,所述缓冲液是pH6.4的MOPS,所述还原剂是5mM的Beta ME,所述表面活性剂是0.1% tween20或0.1% tritonX-100。

3. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,偶联了FGF21特异性抗体的吡啶酯-抗体交联物置于保存溶液中保存,所述保存溶液包括缓冲液、还原剂和表面活性剂,所述缓冲液是pH6.4的MOPS,所述还原剂是5mM的Beta ME,所述表面活性剂是0.1% tween20或0.1% tritonX-100。

## 一种检测FGF21的发光试剂及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体涉及一种检测FGF21的发光试剂及其应用。

### 背景技术

[0002] 成纤维细胞生长因子21 (FGF21) 是FGF超家族的内分泌物成员,目前鉴定FGF蛋白属于信号分子家族,调节多种细胞类型的生长和分化。FGF蛋白对人生理学和病理学的有重要意义,具体涉及胚胎发生、血管发育和生长、骨骼生长中。FGF家族的大多数成员与细胞活动相关,包括有丝分裂、发育、血管发生和细胞存活。FGF21是代谢疾病如糖尿病的生物标志物,在肥胖受试者、患有非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 的受试者和患有2型糖尿病的受试者中观察到血清水平升高。在骨骼肌、肾脏、心脏以及血管中FGF21表达比肝脏中高约7-10倍。

[0003] 考虑到FGF21在代谢疾病的治疗和发展中的重要作用,本领域仍然需要更高准确度、灵敏度、特异性的检测方法和检测产品。

[0004] 目前常用的ELISA方法操作不方便,孵育时间长,检测灵敏度不够,而化学发光法在检测FGF21时灵敏度、特异性高,检测方便快捷,且能全自动检测。FGF21在血循环中较为特殊,比如与其他蛋白结合、容易降解等,这样就给检测的准确性带来困难,因此也有必要开发一种快速检测方法,同时能够破坏FGF21与其他蛋白的结合,使FGF21游离出来,检测的更准确。

### 发明内容

[0005] 为提供高准确度、灵敏度、特异性的FGF21检测方法和检测产品,本发明改良了发光试剂的制备方法,使用本发明所制备得到的发光试剂能准确检测FGF21蛋白,为临床检测提供了更有效的检测方法和检测产品。并且,本发明的制备方法中抗体使用量低,保证检测效果的同时降低了产品成本。

[0006] 具体地,本发明提供以下技术方案:

[0007] 磁微球的偶联方法

[0008] 第一方面,本发明提供了一种微球的偶联方法,所述方法包括以下步骤:

[0009] 1) 微球活化:取微球,使用EDC和sulfo-NHS进行活化,所述EDC和sulfo-NHS使用0.1M MES pH5.0配制;

[0010] 2) 微球与抗体交联:清洗所述步骤1)得到的活化的微球,在交联液(缓冲液)中与抗体交联;

[0011] 3) 微球清洗:加入1x TBST以2000rpm/min混合震荡,震荡1分钟后分离去上清;

[0012] 4) 清洗后封闭:使用乙二醇和脂肪醇聚氧乙烯醚(AEO)进行封闭。

[0013] 优选地,所述微球包括磁性微球、乳胶微球、纳米微球、蛋白微球。

[0014] 优选地,所述微球是磁性微球。

[0015] 优选地,所述微球是表面覆盖COOH的磁性微球。

[0016] 优选地,所述微球是经过清洗的微球,所述清洗的方法是本领域所熟知的;例如:

使用缓冲液重悬后,放置于振荡器上以2000rpm/min混合震荡,1min为一次清洗;优选地,所述缓冲液是1ml 0.1M MES PH5.0。

[0017] 优选地,所述EDC使用量为5-200 $\mu$ g EDC/mg磁珠;优选地,所述EDC的使用量是每mg磁珠添加20-100 $\mu$ g EDC。具体地,所述20-100包括20、30、40、50、60、70、80、90、100等。

[0018] 更优选地,所述EDC使用量为20 $\mu$ g EDC/mg磁珠。

[0019] 优选地,所述步骤1)中EDC和sulfoNHS的摩尔比为1:0.5-2;

[0020] 更优选地,所述步骤1)中EDC和sulfoNHS的摩尔比包括EDC和sulfoNHS的摩尔比为1:0.5、1:1、1:2等。

[0021] 更优选地,所述步骤1)中EDC和sulfoNHS的摩尔比为1:1-1:2。

[0022] 最优选地,所述步骤1)中EDC和sulfoNHS的摩尔比为1:1。

[0023] 优选地,所述步骤2)中交联液的pH值范围是7.4-9.5;具体地包括7.4、7.5、8、8.5、9、9.5等。

[0024] 优选地,所述步骤2)中交联液包括PBS pH7.4和NaHCO<sub>3</sub> pH9.5。

[0025] 更优选地,所述步骤2)中交联液是NaHCO<sub>3</sub> pH9.5。

[0026] 优选地,所述步骤2)中抗体浓度为0.05-0.5mg/ml。具体地,包括0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5等。更优选地,所述步骤2)中抗体浓度为0.2-0.4mg/ml。

[0027] 更优选地,所述步骤2)中抗体浓度为0.2mg/ml。

[0028] 优选地,所述步骤3)中清洗步骤进行一次或多次,更优选地,共清洗5次;

[0029] 优选地,所述乙二醇和脂肪醇聚氧乙烯醚(AEO)各自独立地终浓度为1%。

[0030] 优选地,所述封闭的步骤是去上清后加入乙二醇和脂肪醇聚氧乙烯醚(AEO),使二者终浓度均为1%,放置于振荡器上以2000rpm/min混合震荡,震荡进行2小时,在封闭条件室温下进行。

[0031] 优选地,所述抗体包括特异性结合任意蛋白的抗体,其结构是本领域所公知的。

[0032] 更优选地,本发明抗体是靶向FGF21蛋白的抗体;其具有特异性结合FGF21的能力。

[0033] 另一方面,本发明提供了以上偶联方法制备得到的免疫磁微球(或简称“磁珠”、“磁微球”)及其在检测FGF21中的应用。具体地,所述免疫磁微球也即偶联了抗体的磁微球。

[0034] 另一方面,本发明提供了包含以上所述免疫磁微球的试剂盒及其在检测FGF21中的应用。

[0035] 吡啶酯抗体交联方法

[0036] 另一方面,本发明还提供了吡啶酯和抗体的交联方法,所述方法包括以下步骤:

[0037] 1) 交联:取吡啶酯和抗体加入到交联溶液中,交联溶液为NaHCO<sub>3</sub> pH9.5,,溶液中吡啶酯和抗体的摩尔比为20:1。

[0038] 2) 封闭:使用封闭液进行封闭,所述封闭液为9%甘氨酸、1%bsa、50mM tris、300mM NaCl,pH8.0。

[0039] 优选地,所述吡啶酯包括但不限于Me-DMAE-NHS、NSP-DMAE-NHS、ME-AE-NHS、DMAE-NHS、NSP-DMAE-NHS、NSP-SA-NHS。具体地,在本发明具体实施例中以NSP-DMAE-NHS为例证明了本发明方法适用于各种吡啶酯。

[0040] 优选地,所述抗体包括特异性结合任意蛋白的抗体,其结构是本领域所公知的。

[0041] 更优选地,本发明抗体是靶向FGF21蛋白的抗体;其具有特异性结合FGF21的能力。

[0042] 另一方面,本发明提供了前述吡啶酯和抗体的交联方法所制备得到的吡啶和抗体的交联物(制备产物)及其在检测FGF21中的应用。

[0043] 另一方面,本发明提供了包含以上所述吡啶和抗体的交联物的试剂盒及其在检测FGF21中的应用。

#### [0044] 发光试剂的制备方法

[0045] 另一方面,本发明提供了一种制备方法,所述制备方法制备的是检测FGF21的发光试剂,所述方法包括:

[0046] 步骤1、前述磁微球的偶联方法,和;

[0047] 步骤2、吡啶酯和抗体的交联方法,

[0048] 优选地,以上步骤1和步骤2中的抗体包括特异性结合任意蛋白的抗体,其结构是本领域所公知的;更优选的,所述抗体都特异性结合FGF21。

[0049] 更具体地,所述检测FGF21发光试剂的制备方法包括以下步骤:

[0050] 步骤1、磁微球的偶联:

[0051] 1) 微球活化:取磁性微球,使用EDC和sulfo-NHS进行活化,所述EDC和sulfo-NHS使用0.1M MES pH5.0配制;

[0052] 2) 微球与抗体交联:清洗所述步骤1)得到的活化的微球,在交联液(缓冲液)中与抗体交联;

[0053] 3) 微球清洗:加入1x TBST以2000rpm/min混合震荡,震荡1分钟后分离去上清,共清洗5次;

[0054] 4) 清洗后封闭:使用乙二醇和脂肪醇聚氧乙烯醚(AEO)进行封闭。

[0055] 步骤2、吡啶酯和抗体的交联

[0056] 1) 交联:取吡啶酯和抗体加入到交联溶液中,交联溶液为50mM tris中加入300mM NaCl、调节pH值为9.0,溶液中吡啶酯和抗体的摩尔比为20:1。

[0057] 2) 封闭:使用封闭液进行封闭,所述封闭液为9%甘氨酸、1%bsa、50mM tris、300mM NaCl,pH8.0。

[0058] 另一方面,本发明提供了以上制备方法所制备得到的发光试剂及其在检测FGF21中的应用。

[0059] 另一方面,本发明提供了包含以上制备方法所制备得到的发光试剂的试剂盒及其在检测FGF21中的应用。

[0060] 优选地,所述试剂盒中还可以包含以下任意一种或多种产品:待检测抗原的标准品(质控品)、免疫磁微球的保存溶液、样品收集和处理试剂反应容器(反应孔)、磁分离设备和洗涤设备。

#### [0061] 使用方法

[0062] 另一方面,本发明提供了FGF21发光试剂的使用方法,所述方法包括以下步骤:

[0063] 1) 加入上述步骤1、前述磁微球的偶联方法制备得到的磁珠与样本混合、孵育;所述磁微球稀释在本发明所述保存溶液中使用;

[0064] 2) 清洗;

[0065] 3) 加入上述步骤2、吡啶酯和抗体的交联方法交联所得到的抗体混合、孵育;所述交联物在本发明所述保存溶液中使用;

- [0066] 4) 去除磁珠,加入发光预激发液,振荡混匀,再加入100 $\mu$ l激发液,立即读取发光信号值。
- [0067] 优选地,所述孵育的步骤是37度孵育10分钟。
- [0068] 优选地,所述清洗的步骤是以下操作进行一次或多次:去除上清,加入500 $\mu$ l清洗液,振荡混匀;优选地,清洗三次;
- [0069] 优选地,所述磁微球稀释的稀释浓度是10-100mg/L,最优选地,50mg/L;
- [0070] 优选地,所述交联物的稀释浓度是0.1-0.5mg/L,最优选地,0.2mg/L。
- [0071] 保存溶液
- [0072] 另一方面,本发明提供了发光试剂的保存溶液,所述保存溶液包括缓冲液、还原剂和表面活性剂,所述缓冲液包括pbs pH 7.4、mops pH 6.4或mes pH 5.0中任意一种或多种;所述还原剂包括DTT、beta-ME或GSSG中任意一种或多种;所述表面活性剂包括tween20、tween80、tritonX-100或SDS/NP40中任意一种或多种。
- [0073] 另一方面,本发明提供了以上保存溶液在保存发光试剂中的应用,所述发光试剂是吡啶酯、抗体和微球的偶联产物。
- [0074] 优选地,所述发光试剂中吡啶酯包括Me-DMAE-NHS、NSP-DMAE-NHS、ME-AE-NHS、DMAE-NHS、NSP-DMAE-NHS、NSP-SA-NHS在内的发光物质。
- [0075] 优选地,所述抗体包括特异性结合任意蛋白的抗体,其结构是本领域所公知的。
- [0076] 优选地,所述微球包括磁性微球(磁珠)、乳胶微球、纳米微球、蛋白微球(BSA-NS)。
- [0077] 优选地,所述微球是磁性微球。
- [0078] 优选地,所述微球是表面覆盖COOH的磁性微球。
- [0079] 如本发明所述“磁性微球”亦可称为磁性高分子微球、磁微球、磁珠、磁性聚合物微球;按照其内部结构分类包括核壳式、反核壳式、夹心式、弥散式;其中应用的磁性物质可以是纯铁粉、羰基铁、磁性矿、正铁酸盐、铁钴合金等;其骨架材料可以是:高分子载体骨架材料如氨基酸聚合物如蛋白质、肽类、酶类等;多糖类如阿拉伯胶、淀粉、右旋糖酐、琼脂糖等,其他高分子聚合物如聚丙烯、聚乙烯、硅酮等。
- [0080] 本发明中所述“交联”、“偶联”是相同含义,可以互相替换。

## 具体实施方式

[0081] 下面结合实施例对本发明做进一步的说明,以下所述,仅是对本发明的较佳实施例而已,并非对本发明做其他形式的限制,任何熟悉本专业的技术人员可能利用上述揭示的技术内容加以变更为同等变化的等效实施例。凡是未脱离本发明方案内容,依据本发明的技术实质对以下实施例所做的任何简单修改或等同变化,均落在本发明的保护范围内。

[0082] 对比例一、FGF21发光试剂的制备

[0083] 步骤一、磁珠微球的交联

[0084] 1) 微球活化:

[0085] 取10mg表面覆盖COOH的磁性微球(粒径1-3微米),磁分离1分钟后去上清,使用1ml 0.1M MES PH5.0重悬后,放置于振荡器上以2000rpm/min混合震荡,1min为一次清洗。清洗3次后,重悬于1ml 0.1M MES PH5.0中。使用两步法活化,先加入20 $\mu$ l的10mg/mL EDC溶液,再加入28 $\mu$ l的10mg/mL sulfo-NHS溶液。

[0086] 其中EDC溶液和sulfo-NHS溶液使用0.1M MES pH5.0配制,现配现用。

[0087] EDC使用量为20 $\mu$ g EDC/mg磁珠(也即每mg磁珠添加20 $\mu$ g EDC)。EDC和sulfoNHS的摩尔比范围为1:1。

[0088] 2) 微球与FGF21抗体交联:

[0089] 清洗活化后的微球,在交联液中与FGF21特异性抗体抗体(由香港优尼德诊断有限公司采购)交联,交联液是NaHCO<sub>3</sub> pH9.5,交联液中抗体浓度为0.2mg/ml、微球浓度为10mg/ml。所述清洗与步骤1)中的清洗方式相同。

[0090] 3) 微球清洗:加入1x TBST(0.1M Tris、150mM NaCl,0.05% Tween20(v/v),pH7.4)后,放置于振荡器上以2000rpm/min混合震荡,1min为一次清洗。每次清洗后磁板吸附,弃上清液,共清洗5次。

[0091] 4) 清洗后封闭:去上清后加入乙二醇和脂肪醇聚氧乙烯醚(AEO)使二者终浓度均为1%,放置于振荡器上以2000rpm/min混合震荡,震荡进行2小时,在封闭条件室温下进行。

[0092] 5) 完成封闭后的交联了FGF21特异性抗体磁珠,按50mg/L的浓度稀释到实施例二中所述FGF21发光试剂保存液中。

[0093] 步骤二、吡啶酯抗体交联

[0094] 1) 交联:取吡啶酯(NSP-DMAE-NHS)和FGF21特异性抗体加入到交联溶液中,FGF21特异性抗体浓度为1mg/ml,交联溶液为NaHCO<sub>3</sub> pH9.5,溶液中吡啶酯和抗体的摩尔比为20:1。放置于振荡器上以2000rpm/min混合震荡后,室温放置1小时。

[0095] 2) 封闭:交联结束后,加入1ml封闭液,室温下放置于振荡器上以2000rpm/min混合震荡1小时。封闭液为9%甘氨酸、1%bsa、50mM tris、300mM NaCl,pH8.0。

[0096] 封闭结束后,偶连吡啶酯的FGF21特异性抗体,按200ng/ml(0.2毫克每升[mg/l])浓度稀释到实施例二中所述FGF21发光试剂保存液中,即为检测抗体。

[0097] 对比例二

[0098] 与对比例一的区别仅在于,EDC使用量为5 $\mu$ g EDC/mg磁珠。

[0099] 对比例三

[0100] 与对比例一的区别仅在于,EDC使用量为40 $\mu$ g EDC/mg磁珠。

[0101] 对比例四

[0102] 与对比例一的区别仅在于,EDC使用量为100 $\mu$ g EDC/mg磁珠。

[0103] 对比例五

[0104] 与对比例一的区别仅在于,EDC使用量为200 $\mu$ g EDC/mg磁珠。

[0105] 对比例六

[0106] 与对比例一的区别仅在于,EDC和sulfoNHS的摩尔比为1:2。

[0107] 对比例七

[0108] 与对比例一的区别仅在于,EDC和sulfoNHS的摩尔比为2:1。

[0109] 对比例八

[0110] 与对比例一的区别仅在于,微球抗体交联液的缓冲液为mops pH 6.4。

[0111] 对比例九

[0112] 与对比例一的区别仅在于,微球抗体交联液的缓冲液为pbs pH 7.4。

[0113] 对比例十

- [0114] 与对比例一的区别仅在于,抗体浓度为0.05mg/ml。  
 [0115] 对比例十一  
 [0116] 与对比例一的区别仅在于,抗体浓度为0.1mg/ml。  
 [0117] 对比例十二  
 [0118] 与对比例一的区别仅在于,抗体浓度为0.3mg/ml。  
 [0119] 对比例十三  
 [0120] 与对比例一的区别仅在于,抗体浓度为0.4mg/ml。  
 [0121] 对比例十四  
 [0122] 与对比例一的区别仅在于,清洗时静置3分钟,不振荡。  
 [0123] 对比例十五  
 [0124] 与对比例一的区别仅在于,封闭液单用Tris。  
 [0125] 对比例十六  
 [0126] 与对比例一的区别仅在于,封闭液Tirs加1% BSA。  
 [0127] 对比例十七  
 [0128] 与对比例一的区别仅在于,封闭步骤静置不振荡。  
 [0129] 表1、对比例汇总

[0130]

对比例	EDC 使用量	EDC 和 sulfo NHS 的摩尔比	微球抗体交联夜的缓冲液	抗体浓度	清洗后封闭步骤
一	20 $\mu$ g EDC/mg 磁珠	1:1	NaHCO <sub>3</sub> ph9.5	0.2mg/ml	封闭液加入乙二胺和 AEO, 清洗和封闭都充分振荡
二	5 $\mu$ g EDC/mg 磁珠				
三	40 $\mu$ g EDC/mg 磁珠				



[0131]	四	100 $\mu$ g EDC/mg 磁珠			
	五	200 $\mu$ g EDC/mg 磁珠			
	六		1:2		
	七		2:1		
	八			mops ph6.4	
	九			pbs ph7.4	
	十				0.05mg/ml
	十一				0.1mg/ml
	十二				0.3mg/ml
	十三				0.4mg/ml
	十四				清洗时静置 3 分
	十五				封闭液单用 Tris
	十六				封闭液 Tirs 加 1% BSA
	十七				封闭步骤静置不振荡

[0132] 实施例一、FGF21化学发光试剂盒的优化

[0133] 以上对比例一至十五所制备得到的FGF21化学发光试剂盒统一在菲鹏开放式全自动生化分析仪IncreCare Shine i1910上进行测定。测试样本包括空白样本、不同浓度FGF21校准品:30pg/ml、60pg/ml、120pg/ml、240pg/ml、480pg/ml、960pg/ml、1920pg/ml。

[0134] 上机测试程序为:

[0135] 1、分别取50 $\mu$ l样本,50 $\mu$ l交联了FGF21特异性抗体的磁珠(以上步骤一、磁珠微球的交联制备得到的磁珠),加入到发光专用反应管中,混匀后37度孵育10分钟。

[0136] 2、孵育完成后按仪器固定清洗步骤对磁珠进行清洗:首先磁分离,去除上清,加入500 $\mu$ l清洗液,振荡混匀。重复上述步骤三次。再磁分离,去除上清。

[0137] 3、在发光管中加入100 $\mu$ l吡啶酯偶连FGF21特异性抗体的检测抗体(以上步骤二、吡啶酯抗体交联所得到的抗体),与磁珠混匀,孵育10分钟,按上一步骤所述,由仪器固定清洗步骤清洗三次。

[0138] 4、清洗完成后磁分离,去除上清保留磁珠,加入100 $\mu$ l发光预激发液(采购于南京仁迈生物科技有限公司),振荡混匀,再加入100 $\mu$ l激发液(采购于南京仁迈生物科技有限公司),立即读取发光信号值。

[0139] 1)EDC使用量的优化

[0140] 不同浓度EDC使用量制备的微球,检测不同浓度FGF21校准品获得的信号值汇总如表2所示(对比例一到对比例五)。

[0141] 表2、不同浓度EDC使用量制备得到的检测试剂的对比

FGF21 校准品浓度	对比例一 20 $\mu$ g EDC/mg 磁珠	对比例二 5 $\mu$ g EDC/mg 磁珠	对比例三 40 $\mu$ g EDC/mg 磁珠	对比例四 100 $\mu$ g EDC/mg 磁珠	对比例五 200 $\mu$ g EDC/mg 磁珠
0 pg/ml	336	278	1136	2864	4314
30pg/ml	4830	619	5329	5898	6836
60pg/ml	8554	763	9347	10184	11346
120pg/ml	14974	1070	17864	18676	19837
240pg/ml	28424	1728	32605	33845	35346
480pg/ml	53535	2842	60321	62446	64786
960pg/ml	91941	4889	113760	116866	119861
1920pg/ml	172849	8435	193865	199463	216378

[0142] 如表2所示,本发明使用不同浓度EDC使用量制备微球对不同浓度FGF21校准品进行测试。在低浓度EDC条件下(对比例二5 $\mu$ g EDC/mg磁珠),校准曲线的发光值低,试剂灵敏度低。随着EDC浓度的升高,试剂信号也越来越高,灵敏度提高,但同时试剂背景(0pg/ml)的信号也越来越高,信噪比下降,而且会导致试剂特异性下降,因此本发明优选对比例一、对比例三、对比例四;进一步优选对比例一。

[0144] 2) EDC和sulfoNHS的摩尔比的优化

[0145] 不同EDC和sulfoNHS的摩尔比条件制备的微球,检测不同浓度FGF21校准品获得的信号值汇总如表3所示(对比例一、对比例六、对比例七)

[0146] 表3、不同EDC和sulfoNHS的摩尔比制备得到的检测试剂的对比

FGF21 校准品浓度	对比例一 EDC 和 sulfo NHS 摩尔比为 1:1	对比例六 EDC 和 Sulfo NHS 摩尔比为 1:2	对比例七 EDC 和 Sulfo NHS 摩尔比为 2:1
0 pg/ml	336	225	6948
30pg/ml	4830	4462	10992
60pg/ml	8554	7974	14237
120pg/ml	14974	14028	20123
240pg/ml	28424	26732	32654
480pg/ml	53535	50391	54827
960pg/ml	91941	86635	89392
1920pg/ml	172849	163893	163347

[0148] 如表3所示,本发明使用不同EDC和sulfo NHS摩尔比条件制备的微球对不同浓度FGF21校准品进行测试。EDC和sulfo NHS摩尔比在1:1和1:2条件下,校准品的反应度高,试剂空白背景低;EDC和sulfo NHS摩尔比2:1条件下,虽然校准品信号高,但试剂空白背景高,会导致试剂特异性下降。因此本发明优选对比例一、对比例六;进一步优选对比例一。

[0149] 3) 交联液的优化

[0150] 不同交联液条件制备的微球,检测不同浓度FGF21校准品获得的信号值(对比例一、对比例八、对比例九)。

[0151] 表4、不同交联液制备得到的检测试剂的对比

FGF21 校准品浓度	对比例一	对比例八	对比例九
	交联液 NaHCO <sub>3</sub> pH9.5	交联液 mops ph6.4	交联液 PBS pH 7.4
0 pg/ml	336	352	364
30pg/ml	4830	2310	3295
60pg/ml	8554	3947	5736
120pg/ml	14974	6737	9929
240pg/ml	28424	12465	18753
480pg/ml	53535	23747	35137
960pg/ml	91941	40638	60373
1920pg/ml	172849	75392	113263

[0152] 如表4所示,本发明使用不同交联液条件制备的微球对不同浓度FGF21校准品进行测试。对比例八为业内常规方案,在FGF21这个项目中,对比例九测试校准品获得的信号值比常规方案提高了约50%,对比例一获得的信号值比常规方案提高了近一倍,同时空白背景没有显著变化,说明在对比例九和对比例一条件下试剂灵敏度能够得到显著提升而特异性不会受到影响。因此本发明优选对比例一、对比例九;进一步优选对比例一。

[0154] 4) FGF21特异性抗体浓度的优化

[0155] 不同浓度的FGF21特异性抗体偶连制备的微球,检测不同浓度FGF21校准品获得的信号值(对比例一、对比例十到对比例十三):

[0156] 表5、不同浓度的FGF21特异性抗体偶连制备得到的检测试剂的对比

FGF21 校准品浓度	对比例一 0.2mg/ml	对比例十 0.05mg/ml	对比例十一 0.1mg/ml	对比例十二 0.3mg/ml	对比例十三 0.4mg/ml
0 pg/ml	336	320	356	451	638
30pg/ml	4830	1614	3197	5732	7066
60pg/ml	8554	2686	5551	10092	11953

120pg/ml	14974	4538	9621	17364	20453
240pg/ml	28424	8462	18113	33387	38157
480pg/ml	53535	15683	33769	62837	69939
960pg/ml	91941	26083	58162	104361	110476
1920pg/ml	172849	50031	109461	178384	188290

[0157] 如表5所示,本发明使用不同浓度的FGF21特异性抗体制备的微球对不同浓度FGF21校准品进行测试。随着抗体浓度从0.05mg/m升高到0.1mg/ml,再升高到0.2mg/ml,校准品的信号又非常明显的提升。但随着抗体浓度继续升高,信号提升的幅度并不明显,考虑到试剂成本。本发明优选对比例一、对比例十二、对比例十三;进一步优选对比例一。

[0160] 4) 清洗、封闭工艺的优化

[0161] 不同清洗、封闭工艺制备的FGF21微球,检测不同浓度FGF21校准品获得的信号值(对比例一、对比例十到对比例十三):

[0162] 表6、不同清洗、封闭工艺的制备得到的检测试剂的对比

FGF21 校准品浓度	对比例一 封闭液加入乙二醇和 AEO, 清洗和封闭都充分振荡	对比例十四 清洗时静置 3 分钟, 不振荡	对比例十五 封闭液单用 Tris	对比例十六 封闭液 Tirs 加 1% BSA	对比例十七 封闭步骤静置不振荡
0 pg/ml	336	1520	4864	3347	838
30pg/ml	4830	4483	8077	6771	5228
60pg/ml	8554	8362	11037	10238	8826
120pg/ml	14974	22374	16486	16311	15937
240pg/ml	28424	28974	26937	28799	28947
480pg/ml	53535	53865	46837	53776	57287
960pg/ml	91941	218437	77634	88372	89476
1920pg/ml	172849	172635	144132	163761	168373

[0164] 如表6所示,本发明优化了FGF21微球制备的清洗和封闭工艺,与传统Tris,或Tirs+BSA封闭工艺相比,加入乙二醇+AEO并且在清洗和封闭过程充分振荡,微球空白信号从4864,或3347非常显著的降低到了336,降低幅度达到10倍,因此能够极大程度的提高试剂的信噪比,从而提高试剂灵敏度和特异性。

[0165] 5) FGF21化学发光试剂盒的cv值检测

[0166] 取各个对比例所制备的FGF21化学发光试剂,按以上上机测试程序检测120pg/ml FGF21校准品,测试20次,计算CV值, CV值计算方式如下。

[0167]  $CV = SD/M \times 100\%$

[0168] 式中:

[0169] CV—变异系数

[0170] SD—10次测量结果的标准差

[0171] M—10次测量结果的平均值

[0172] cv值统计于表7,根据数据可知,本发明所提供的发光试剂制备方法所制备得到的发光试剂具有最好的cv值,可准确、稳定的检测FGF21蛋白。

[0173] 表7、cv值统计

	cv
对比例一	3%
对比例二	15%
对比例三	3%
对比例四	3%
对比例五	6%
对比例六	3%
对比例七	11%
对比例八	8%
对比例九	8%
对比例十	24%
对比例十一	8%
对比例十二	4%
对比例十三	4%
对比例十四	85%

对比例十五	4%
对比例十六	4%
对比例十七	16%

[0175] 实施例二、FGF21发光试剂的保存溶液

[0176] 配制保存溶液,所述保存溶液包括缓冲液、还原剂和表面活性剂,所述缓冲液为 pbs pH 7.4、50mM mops pH 6.4或50mM MES pH 5.0;所述还原剂为5mM DTT、5mM beta-ME或5mM GSSG;所述表面活性剂为0.1% tween20、0.1% tween80、0.1% tritonX-100,0.1% SDS或0.1% NP40。

[0177] 表8、本发明所测试的保存液及37度稳定性结果

[0178]	缓冲液	还原剂	表面活性剂	37度3天平 均回收率	37度7天 平均回收	37度14天 平均回收	
					率	率	
	保存液 1	PBS	\	\	97%	83%	66%
	保存液 2	MOPS	\	\	97%	88%	85%
	保存液 3	MES	\	\	93%	89%	84%
	保存液 4	MOPS	DTT		93%	78%	60%
	保存液 5	MOPS	Beta ME		95%	90%	88%
	保存液 6	MOPS	GSSG		93%	77%	61%
[0179]	保存液 7	MOPS	\	Tween 20	97%	93%	90%
	保存液 8	MOPS	\	Tween 80	96%	94%	88%
	保存液 9	MOPS	\	Triton X 100	97%	94%	90%
	保存液 10	MOPS	\	SDS	88%	83%	77%
	保存液 11	MOPS		NP40	93%	88%	82%
	保存液 12	MOPS	Beta ME	Tween 20	97%	96%	94%
	保存液 13	MOPS	Beta ME	Triton X 100	98%	95%	94%

[0180] 取以上保存液制备FGF21发光试剂,按实施例一中所述检测方法,检测不同浓度FGF21校准品的信号值。然后将发光试剂保存到37度进行加速破坏试验,在保存第3、7、14天后(时间长度),检测FGF21校准品各水平的信号值与初始信号值进行对比获得回收率,并计算平均回收率(表8)。根据检测的对比可知,其中保存液2,保存液5,保存液7,保存液9,保存液12,及保存液13的稳定性好,进一步优选保存液12,保存液13的稳定性最好。最终选用保存液12作为FGF21发光试剂保存液。