



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118443952 A

(43) 申请公布日 2024.08.06

(21) 申请号 202410676060.9

G01N 33/532 (2006.01)

(22) 申请日 2024.05.29

G01N 21/76 (2006.01)

(71) 申请人 北京豪迈生物工程股份有限公司

地址 101318 北京市顺义区临空经济核心区裕华路28号7号楼一层、三层东侧

(72) 发明人 赵科 李进 杨俊伟

(74) 专利代理机构 重庆商贝知识产权代理事务所(普通合伙) 50323

专利代理师 龙钰

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

权利要求书1页 说明书15页

(54) 发明名称

黑色素瘤糖蛋白B含量检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及生物制药技术领域,尤其是指黑色素瘤糖蛋白B含量检测试剂盒及其制备方法,该试剂盒包括、标准品、黑色素瘤糖蛋白B单克隆抗体I包被的免疫磁珠、酶标记的黑色素瘤糖蛋白B单克隆抗体II、阻断剂、化学发光底物与辅助试剂;所述阻断剂为APS-S100a8/a9联合阻断剂。制备方法,包括以下步骤:S1,制备免疫磁珠;选择磁性纳米颗粒作为载体,并采用小鼠抗人PD-L1单克隆抗体进行包被;S2,制备酶标记抗体:采用碱性磷酸酶标记羊抗小鼠PD-1单克隆抗体。本发明通过加入阻断剂联合先进的磁微粒化学免疫分析方法能有效排除干扰因素,操作简单,灵敏度高,大大提升了磁微粒化学发光免疫分析法的检测准确性。

1. 黑色素瘤糖蛋白B含量检测试剂盒,其特征在于:该试剂盒包括标准品、黑色素瘤糖蛋白B单克隆抗体I包被的免疫磁珠、酶标记的黑色素瘤糖蛋白B单克隆抗体II、阻断剂、化学发光底物与辅助试剂;

所述阻断剂为APS-S100a8/a9联合阻断剂。

2. 根据权利要求1所述的黑色素瘤糖蛋白B含量检测试剂盒,其特征在于:所述黑色素瘤糖蛋白B单克隆抗体I为小鼠抗人PD-L1单克隆抗体;所述黑色素瘤糖蛋白B单克隆抗体II为羊抗小鼠PD-1单克隆抗体。

3. 根据权利要求1所述的黑色素瘤糖蛋白B含量检测试剂盒,其特征在于:所述酶标记采用的生物酶为碱性磷酸酶。

4. 根据权利要求1所述的黑色素瘤糖蛋白B含量检测试剂盒,其特征在于:所述的化学发光底物为酶促化学发光底物溶液,为AMPPD及其类似物或鲁米诺及其衍生物。

5. 根据权利要求1所述的黑色素瘤糖蛋白B含量检测试剂盒,其特征在于:所述辅助试剂包括如下试剂:

抗体稀释缓冲液:PBS+0.5%BSA+0.05% tween20;

洗涤缓冲液:PBS+0.05% tween20;

封闭缓冲液:PBS+2%BSA或PBS+1%HSA;

终止剂: H_2SO_4 。

6. 根据权利要求1-5任意一项所述的黑色素瘤糖蛋白B含量检测试剂盒的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

S1, 制备磁分离试剂;选择磁性纳米颗粒作为载体,并采用小鼠抗人PD-L1单克隆抗体进行包被,然后采用缓冲液进行稀释得到磁分离试剂;

S2, 制备酶标记抗体:采用碱性磷酸酶标记羊抗小鼠PD-1单克隆抗体。

7. 根据权利要求6所述的黑色素瘤糖蛋白B含量检测试剂盒的制备方法,其特征在于:步骤S1中制备磁分离试剂的具体方法如下:

S11, 将磁性纳米颗粒重悬后置于磁力架上磁分离1min后移走上清液;

S12, 加入抗体稀释缓冲液充分重悬磁珠后置于磁力架上磁分离1min后移走上清液,此步重复三次;

S13, 加入,抗体稀释缓冲液充分重悬磁珠后加入APS-S100a8/a9联合阻断剂和EDC混匀,室温避光混匀反应30min,置于磁力架上磁分离1min后移去上清液;

S14, 加入洗涤缓冲液清洗一次,置于磁力架上磁分离1min后移走上清液,加入Binding Buffer后加入GPNMB混匀,室温避光混匀反应3h;

S15, 加入洗涤缓冲液清洗磁珠3次,最后一次移走上清后加入甘氨酸混匀,室温避光混匀反应过夜;

S16, 加入,洗涤缓冲液清洗三次,加入封闭缓冲液并添加联合阻断剂及 $\alpha\beta 1-40$ 抗体和 $\alpha\beta 1-42$ 抗体;混匀后 $4^{\circ}C$ 储存。

8. 根据权利要求6所述的黑色素瘤糖蛋白B含量检测试剂盒的制备方法,其特征在于:所述小鼠抗人PD-L1单克隆抗体采用纳米抗体。

黑色素瘤糖蛋白B含量检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物制药技术领域,尤其是指黑色素瘤糖蛋白B含量检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 神经退行性疾病是一组以进行性神经元丢失和脑功能下降为特征的异质性疾病。伴随着人口老龄化,神经退行性疾病的发病率逐年攀升,给家庭和社会带来了巨大的负担。然而,起有效的防止方法稀少。GPNMB(Glycoprotein Non-Metastatic Melanoma Protein B)是一种膜蛋白,在肿瘤学和免疫学领域引起了广泛的关注。最近的研究表明,GPNMB与帕金森病(Parkinson's Disease,PD)之间存在一定的关系。

[0003] PD是一种神经系统退行性疾病,主要特征是运动障碍、肌肉僵硬和震颤等症状。尽管PD的确切病因仍不清楚,但已确定炎症、氧化应激和神经元的退行性损伤在其发展过程中发挥了重要作用。GPNMB在免疫调节和炎症过程中扮演重要角色。最近的研究发现,在PD患者的大脑组织中,GPNMB的表达水平显著增加。这一发现表明GPNMB可能参与了PD的发病机制。

[0004] 进一步的研究揭示了GPNMB在PD中的潜在作用。GPNMB的过度表达与神经元的退行性损伤和炎症反应有关。它可能通过调节神经元的存活、改善氧化应激和减轻炎症反应来对PD的发展产生影响。

[0005] 黑色素瘤属于一种恶性肿瘤,通常与黑色素细胞异常增生有关。黑色素瘤的抗原种类较多,主要包括MAGE、NY-ESO-9、gp72等,因而在进行GPNMB含量测试时为排除干扰确保检测结果的准确性需要选择合适的检测方法。

[0006] 胶体金免疫层析法因其操作简单、快速,倍受青睐,但其灵敏度较低,对于检测低浓度的物质精确度不高;酶联免疫吸附技术(ELISA)检测时间长、易受干扰、灵敏度有限、对操作人员要求高、定量不精确、检测通量低;而磁微粒化学发光免疫分析法是一种快速、灵敏、抗干扰能力强可重复性较高的检测方法,可以检测极低浓度的物质,但是检测结果受多因素干扰,会出现无法判断或假阳性或者假阴性结果,因此解决干扰问题至关重要。

发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题是提供黑色素瘤糖蛋白B含量检测试剂盒及其制备方法,通过加入阻断剂联合先进的磁微粒化学免疫分析方法学能有效排除干扰因素,操作简单,灵敏度高,大大提升了磁微粒化学发光免疫分析法的检测准确性。

[0008] 为了解决上述技术问题,本发明采用如下技术方案:

[0009] 黑色素瘤糖蛋白B含量检测试剂盒,其特征在于:该试剂盒包括标准品、黑色素瘤糖蛋白B单克隆抗体I包被的免疫磁珠、酶标记的黑色素瘤糖蛋白B单克隆抗体II、阻断剂、化学发光底物与辅助试剂;所述阻断剂为APS-S100a8/a9联合阻断剂。

[0010] 优选的,所述黑色素瘤糖蛋白B单克隆抗体I为小鼠抗人PD-L1单克隆抗体;所述黑

色素瘤糖蛋白B单克隆抗体II为羊抗小鼠PD-1单克隆抗体。

[0011] 优选的,所述酶标记采用的生物酶为碱性磷酸酶。

[0012] 优选的,所述的化学发光底物为酶促化学发光底物溶液,为AMPPD及其类似物或鲁米诺及其衍生物。

[0013] 优选的,所述辅助试剂包括如下试剂:

[0014] 抗体稀释缓冲液:PBS+0.5%BSA+0.05% tween20;

[0015] 洗涤缓冲液:PBS+0.05% tween20;

[0016] 封闭缓冲液:PBS+2%BSA或PBS+1%HSA;

[0017] 终止剂:H₂SO₄。

[0018] 根据上述任意一项所述的黑色素瘤糖蛋白B含量检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0019] S1,制备免疫磁珠;选择磁性纳米颗粒作为载体,并采用小鼠抗人PD-L1单克隆抗体进行包被,然后采用抗体稀释缓冲液进行稀释得到磁分离试剂;

[0020] S2,制备酶标记抗体:采用碱性磷酸酶标记羊抗小鼠PD-1单克隆抗体。

[0021] 优选的,步骤S1中制备磁分离试剂的具体方法如下:

[0022] S11,将磁性纳米颗粒重悬后置于磁力架上磁分离1min后移走上清液;

[0023] S12,加入抗体稀释缓冲液充分重悬磁珠后置于磁力架上磁分离1min后移走上清液,此步重复三次;

[0024] S13,加入,抗体稀释缓冲液充分重悬磁珠后加入APS-S100a8/a9联合阻断剂和EDC混匀,室温避光混匀反应30min,置于磁力架上磁分离1min后移去上清液;

[0025] S14,加入洗涤缓冲液清洗一次,置于磁力架上磁分离1min后移走上清液,加入Binding Buffer后加入GPNMB混匀,室温避光混匀反应3h;

[0026] S15,加入洗涤缓冲液清洗磁珠3次,最后一次移走上清后加入甘氨酸混匀,室温避光混匀反应过夜;

[0027] S16,加入,洗涤缓冲液清洗三次,加入封闭缓冲液并添加联合阻断剂及Aβ1-40抗体和Aβ1-42抗体;混匀后4°C储存。

[0028] 优选的,所述小鼠抗人PD-L1单克隆抗体采用纳米抗体。

[0029] 本发明的有益效果:

[0030] 1、本发明通过抗体与磁珠偶联形成复合物特异性捕捉抗原,以磁场作用富集磁珠—抗体—抗原复合物,从而将抗原从样本中分离,该方法具有特异性高、省时和安全无毒等特点,可明显提高检出率,为病原的检测提供了一种可靠和高效的样品前处理方法。

[0031] 2、本发明相较于现有技术本发明采用磁性纳米颗粒作为载体制备免疫磁珠,其粒径分布范围窄、磁靶向性低和晶型稳定且成分单一,基于Nb和BMPs研制的免疫磁珠,富集率高达90%以上,对于试剂盒的测试结果更加精确和稳定。

[0032] 3、本发明采用APS-S100a8/a9联合阻断剂,研究表明,黄芪多糖能够增敏阻断剂的阻断作用,在检测的过程中能高效清除样品中黑色素瘤的干扰抗原。

[0033] 4、本发明采用阻断剂联合先进的磁微粒化学免疫分析方法学能有效排除干扰因素,操作简单,灵敏度高,大大提升了磁微粒化学发光免疫分析法的检测准确性。

具体实施方式

[0034] 为了便于本领域技术人员的理解,下面结合实施例对本发明作进一步的说明,实施方式提及的内容并非对本发明的限定。

[0035] 实施例1

[0036] 1、小鼠抗人PD-L1单克隆抗体的纳米抗体的制备:

[0037] 1.1小鼠的免疫:选取健康成年小鼠,将重组蛋白PD-L1与弗氏佐剂按1:1的比例混匀,按6-7 μ g/Kg采用背部皮下多点注射的方式免疫小鼠,共免疫四次,免疫间隔为2周。之后采集小鼠外周血,用于构建噬菌体展示文库。

[0038] 1.2鼠源淋巴细胞的分离:按照本技术领域常规程序从采集的驼源抗凝全血中分析淋巴细胞,每 2.5×10^6 个活细胞加入1mL RNA分离试剂,取1mL进行RNA提取,其余-80 $^{\circ}$ C保存。

[0039] 1.3总RNA提取:按照本技术领域常规程序提取总RNA,用RNase-free水调整浓度到1 μ g/ μ L。

[0040] 1.4反转录合成cDNA:

[0041] 根据逆转录试剂盒说明书(Roche公司的transcripor first stand cDNA synthesis KIT)以1.3步骤获得的RNA为模板进行逆转录cDNA。

[0042] 1.5抗体可变区基因扩增:将反转录得到的cDNA作为模版进行PCR反应。扩增共进行两轮,第一轮PCR的引物序列如下:

[0043] CALL001:GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG

[0044] CALL002:GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC

[0045] PCR反应条件及程序为:95 $^{\circ}$ C5min;95 $^{\circ}$ C30s,57 $^{\circ}$ C30s,72 $^{\circ}$ C30s,30cycles;72 $^{\circ}$ C7min

[0046] 使用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收700bp左右的条带,最终用水调整核酸浓度至5ng/ μ l。

[0047] 第二轮PCR的引物序列如下:

[0048] VHH-Back:GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG

[0049] VHH-For:CTAGTGC GGCCGCTGGAGACGGTGACCTGGGT

[0050] PCR反应条件及程序为:95 $^{\circ}$ C5min;95 $^{\circ}$ C30s,55 $^{\circ}$ C30s,72 $^{\circ}$ C30s,15cycles;72 $^{\circ}$ C7min

[0051] 使用PCR产物回收试剂盒纯化PCR产物。

[0052] 1.6载体构建

[0053] 将pMES4与第二次PCR产物分别进行PstI、BstEII双酶切,取1.5 μ g酶切后载体和450ng酶切后的第二次PCR产物,加15 μ L T4 DNA连接酶,补充缓冲液和水至150 μ L总体积,16 $^{\circ}$ C过夜连接并回收连接产物。使用PCR产物回收试剂盒进行产物回收,20 μ L水洗脱。

[0054] 1.7电转化及库容测定

[0055] 取10 μ L纯化后的连接产物,加入到含有50 μ L大肠杆菌TG1感受态细胞的预冷电转杯中置入电转仪(美国BTX的ECM630电转仪)进行电转化,取出电转杯,复苏并培养转化子。随机挑选克隆,进行菌落PCR鉴定。根据PCR阳性率推算库容(库容量=克隆数 \times 稀释倍数 \times [阳性率]PCR鉴定 \times 10)。

[0056] 引物序列如下:

[0057] MP57:TTATGCTTCCGGCTCGTATG

[0058] GIII:CCACAGACAGCCCTCATAG

[0059] 1.8噬菌体扩增

[0060] 取复苏的菌液接种至YT-AG培养基中,37°C200rpm培养到培养物OD600=0.5。取出1010ml菌液加入4×10VCSM13,37°C静止感染30min。4000rpm,常温离心10min,去净上清。用2×YT-AK(含氨苄青霉素和卡那霉素)培养基重悬菌体,37°C200rpm培养过夜。离心取上清40ml管中,加入10ml PEG/NaCl(20%/2.5M)溶液充分混合,离心弃上清,沉淀用1ml冰PBS洗涤离心,取上清250μl预冷的PEG/NaCl,充分混匀并洗涤重悬。

[0061] 测定噬菌体滴度:将TG1培养至OD600=0.4,用LB培养基梯度稀释噬菌体,取倍比稀释的噬菌体TG1培养物混合培养,次日观察培养板中噬菌斑形成情况,对噬菌斑数在30-300的稀释梯度平板进行计数并按照下列公式计算噬菌体滴度(pfu)。

[0062] 噬菌体滴度(pfu/ml) = 稀释倍数 × 噬菌斑数目 × 100

[0063] 1.9纳米抗体筛选

[0064] 通过ELISA方法以重组PD-L1抗原筛选阳性克隆。以重组PD-L1抗原包被ELISA板,5%BSA封闭,PBST洗涤。每孔加入100μl噬菌体上清液,37°C放置1h。弃上清,加入HRP标记的小鼠抗M13的二抗,37°C放置1h。弃上清,加入TMB溶液,室温孵育5min,每孔加入2M硫酸终止液,用酶标仪450nm读数。

[0065] 挑选噬菌体ELSIA结果阳性的克隆,提取质粒。用Vector NTI软件对测序结果进行分析,登录IMGT(http://www.imgt.org/IMGT_vquest),对抗体轻链和重链基因进行分析,以确定可变区的框架区(framework regions,FR)和互补决定区(complementarity determining regions,CDR)。

[0066] 2、抗PD-L1纳米抗体的制备

[0067] 2.1纳米抗体原始菌株TG1扩增及纳米抗体重组质粒转化大肠杆菌BL21(DE3)将含有纳米抗体核酸的原始菌株TG1甘油菌,按照1:1000比例接种于5mL新鲜的LB-A培养基,37°C,200rpm过夜培养。次日,使用Plasmid mini kit(OMEGA)按照说明书提取质粒。经验证后将上述质粒1μl转化于100μl感受态细胞中,轻轻混匀,在冰上放置30min,42°C水浴热击90s,冰浴冷却3min。向离心管加入600μlLB培养基,37°C振荡培养60min。取上清100μl,用三角涂布器涂布在LB-A平板上,37°C倒置培养过夜。

[0068] 2.2纳米抗体的诱导表达

[0069] 挑取上述单克隆菌落于LB-A培养基中,37°C振荡培养过夜。次日,取该菌液按照1:100比例加入100ml新鲜LB-A培养基,37°C振荡培养3h至菌液OD600=0.8左右,加入终浓度为1mMIPTG,30°C诱导过夜。第三日,8000rpm,离心10min收集菌体,加入1.5mL的预冷TES缓冲液重悬沉淀。冰浴2min后,轻柔振荡30s,重复此循环6次。加3.0mlTES/4(将TES用水稀释4倍),轻柔振荡30s后,冰浴静置2min,同样重复振荡和静置步骤共6次。9000rpm,4°C离心10min,收集上清即为周质提取物。

[0070] 2.3纳米抗体的纯化和鉴定

[0071] 将IMAC Sepharose(GE公司)重悬后,取2ml加入到重力柱内,静置30min,使sepharose自然沉降于重力柱底部,流出保存缓冲液。加入2倍柱体积的硫酸镍溶液(0.1M),

按照约8s/滴的流速流出硫酸镍溶液；加入10倍柱体积的平衡缓冲液平衡并洗涤sepharose,流速维持不变；将样品使用平衡缓冲液2倍稀释后,加入重力柱中,调节流速为6s/滴,收集穿透液；加入10倍柱体积洗涤缓冲液洗涤sepharose,维持流速不变,收集洗涤液；加入3倍柱体积的洗脱缓冲液,流速维持在6s/滴,收集含有目的蛋白的洗脱液；最后依次加入10倍柱体积的平衡缓冲液、10倍柱体积的纯水和10倍柱体积的20%乙醇洗涤sepharose,并最终保留4ml的20%乙醇保存层析柱。将上述收集的样品分别进行SDS-PAGE检测得到纯化后的纳米抗体。

[0072] 实施例2

[0073] 制备免疫磁珠：

[0074] 选择磁性纳米颗粒作为载体,并采用小鼠抗人PD-L1单克隆抗体进行包被。

[0075] 磁性纳米颗粒选择中科雷鸣(北京)科技有限公司的Mag1100号产品多聚赖氨酸修饰的氧化铁磁性纳米颗粒(PLL@Fe₂O₃)。

[0076] 组装试剂盒：

[0077] 标准品、黑色素瘤糖蛋白B单克隆抗体I包被的免疫磁珠、酶标记的黑色素瘤糖蛋白B单克隆抗体II、阻断剂、化学发光底物与辅助试剂。

[0078] 其中,阻断剂为APS-S100a8/a9联合阻断剂,由黄芪多糖与S100a8/a9经肽链修饰结合而成；黑色素瘤糖蛋白B单克隆抗体I为小鼠抗人PD-L1单克隆抗体；黑色素瘤糖蛋白B单克隆抗体II为羊抗小鼠PD-1单克隆抗体；酶标记采用的生物酶为碱性磷酸酶；化学发光底物为酶促化学发光底物溶液,为AMPPD及其类似物或鲁米诺及其衍生物。

[0079] 实施例3

[0080] 上述试剂盒的使用

[0081] 3.1、制备磁分离试剂

[0082] 3.1.1、将上述磁性纳米颗粒重悬后取1ml于15ml离心管中,置于磁力架上磁分离1min后小心移走上清液。

[0083] 3.1.2、加入10ml抗体稀释缓冲液(PBS+0.5%BSA+0.05% tween20)充分重悬磁珠后置于磁力架上磁分离1min后小心移走上清,此步重复三次。

[0084] 3.1.3、加入10ml抗体稀释缓冲液(PBS+0.5%BSA+0.05% tween20)充分重悬磁珠后加入1mlAPS-S100a8/a9联合阻断剂和1ml EDC(二氯乙烷)混匀,室温避光混匀反应30min,置于磁力架上磁分离1min后小心移走上清液。

[0085] 3.1.4、加入10ml洗涤缓冲液(PBS+0.05% tween20)清洗一次,置于磁力架上磁分离1min后小心移走上清液,加入10ml Binding Buffer后加入1.5mg GPNMB混匀,室温避光混匀反应3h。

[0086] 3.1.5、加入10ml洗涤缓冲液(PBS+0.05% tween20)清洗磁珠3次,最后一次移走上清后加入5ml甘氨酸混匀,室温避光混匀反应过夜。

[0087] 3.1.6、加入10ml洗涤缓冲液(PBS+0.05% tween20)清洗三次,加入10ml封闭缓冲液(PBS+2%BSA或PBS+1%HSA)并按照10mg/L添加联合阻断剂及0.03ng/mL A β 1-40抗体和0.05ng/mL A β 1-42抗体。混匀后4℃储存。

[0088] 3.2酶标记抗体的制备

[0089] 3.2.1、用TRIS缓冲液将AP(碱性磷酸酶)配成浓度为1.0-5.0mg/mL的AP溶液。

[0090] 3.2.2、将羊抗小鼠PD-1单克隆抗体和AP溶液分别进行活化,将活化后的AP溶液和羊抗小鼠PD-1单克隆抗体抗体按摩尔比1:(1-3)混匀,在1M氯化镁溶液作用下,进行偶联反应,得到偶联产物。

[0091] 3.2.3、将所述偶联物加入到分离纯化仪内,使用pH为7.5的Tris缓冲液作为流动相,流动速度为1ml/min,收集25-45min的分离产物,得到AP标记的抗GPNMB。

[0092] 实施例4 (添加阻断剂)

[0093] 收集96例正常人样本和经过PET-CT检查和临床表现为帕金森的46例患者的血液样本,已验证添加阻断剂试剂盒的检测准确效果,以正常人参考范围为0-125pg/mL,大于125pg/mL为阳性进行判断。用本试剂盒进行测试,结果见下表,本表为本发明的试剂盒的检测结果与PET-CT检查及临床符合率统计表。

[0094] 表1本试剂盒检测结果与PET-CT检查结果的对比

本发明分析方法	PET-CT 结果		合计
	阳性	阴性	
阳性	44 (a)	2 (b)	46
阴性	2 (c)	48 (d)	50
合计	46	50	96
阴性符合率 (E)	$X=a/(a+c)*100\%$		95.65%
阳性符合率	$Y=d/(b+d)*100\%$		96.00%
总符合率	$Z=(a+d)/(a+b+c+d)*100\%$		95.8%

[0096] 本发明的试剂盒(添加阻断剂)与传统ELISA试剂盒的灵敏度对比实验,本发明的试剂盒灵敏度远远高于传统ELISA试剂盒。其测试结果如下表

[0097] 表2本试剂盒灵敏度

浓度pg/mL	0	100	500	2500	5000	10000
发光值	9561	144447	719871	3401173	6998744	12947783

[0099] 表3零点发光值

零点发光值	9647	9577	9854	9321	9754
	10078	9689	9770	10363	9658
	10421	10144	10335	9932	10445
	9752	9806	9964	9529	10012
零点发光值均值 M	9902.60				
零点标准偏差 SD	316.01				
M+2SD	10534.63				
灵敏度 pg/mL	25.68				

[0101] 表4传统ELISA试剂盒灵敏度

[0102]	浓度 pg/mL	0	313	1250	2500	5000	10000
	OD 值	0.014	0.032	0.168	0.833	1.547	2.879

[0103] 表5零点吸光度

[0104]	零点 OD 值	0.009	0.015	0.016	0.023	0.017
		0.019	0.011	0.018	0.014	0.011
		0.015	0.016	0.016	0.018	0.015
		0.010	0.011	0.015	0.017	0.023
	零点 OD 值均值 M	0.015				
	零点标准偏差 SD	0.004				
	M+2SD	0.023				
	灵敏度 pg/mL	156				

[0105] 分别用本发明试剂盒(添加阻断剂)和传统ELISA试剂,对血清样本及血浆样本进行检测,比对数据如下:

[0106] 表6本试剂盒和传统ELISA试剂检测结果对比

[0107]	血浆样本	本试剂盒测值 pg/mL	ELISA 试剂盒测试 pg/mL
	1	24.52	162.52
	2	26.37	131.91
	3	40.97	120.48
	4	46.15	157.95
	5	42.91	156.01
	6	66.98	168.01

[0108]

7	76.31	176.59
8	69.98	175.55
9	83.57	122.40
10	103.69	167.02
11	102.96	172.41
12	82.83	132.72
13	94.75	164.92
14	112.67	147.05
15	132.06	156.42
16	144.20	132.84
17	175.22	141.64
18	97.28	122.08
19	218.49	143.38
20	173.22	149.36
21	200.81	171.73
22	138.37	148.35
23	115.77	125.42
24	175.36	174.24
25	186.32	208.54
26	252.51	235.67
27	500.43	540.34
28	827.52	900.25
29	411.75	384.26
30	524.17	601.27
31	315.77	284.37
32	764.22	728.39
33	661.39	704.26
34	322.64	401.25
血清样本	本试剂盒测值 pg/mL	ELISA 试剂盒测试 pg/mL
1	23.82	161.07
2	31.80	152.77
3	46.68	184.44
4	46.68	149.24
5	55.67	174.95
6	60.33	184.51
7	67.16	164.90
8	69.82	154.75
9	96.66	150.68

	10	95.11	173.50
	11	98.38	140.95
	12	113.18	134.68
	13	107.79	151.44
	14	129.26	136.71
	15	102.98	156.52
	16	127.28	187.68
	17	107.35	188.61
	18	107.81	157.58
	19	92.06	175.00
	20	131.54	187.41
	21	228.02	162.44
[0109]	22	128.95	171.97
	23	254.27	152.94
	24	217.58	153.77
	25	200.47	241.25
	26	505.36	485.23
	27	405.88	423.22
	28	355.68	400.25
	29	899.54	941.33
	30	398.14	410.23
	31	741.22	754.97
	32	658.33	660.37
	33	255.74	356.84
	34	311.58	325.61

[0110] 实施例5

[0111] 收集96例正常人样本和经过PET-CT检查和临床表现为帕金森的46例患者的血液样本,已验证不添加阻断剂试剂盒的检测准确效果,以正常人参考范围为0-125pg/mL,大于125pg/mL为阳性进行判断。用试剂盒(不加阻断剂)进行测试,结果见下表,本表为本发明的试剂盒的检测结果与PET-CT检查及临床符合率统计表。

[0112] 表7试剂盒(不加阻断剂)检测结果与PET-CT检查结果的对比

[0113]	本发明分析方法	PET-CT 结果	合计
--------	---------	-----------	----

	阳性	阴性	
	36 (a)	10 (b)	46
	12 (c)	38 (d)	50
[0114]	合计	48	96
	阴性符合率 (E)	$X=a/(a+c)*100\%$	78.26%
	阳性符合率	$Y=d/(b+d)*100\%$	76.0%
	总符合率	$Z=(a+d)/(a+b+c+d)*100\%$	77.1%

[0115] 分别用本发明组成试剂盒(不加阻断剂)和传统ELISA试剂,对血清样本及血浆样本进行检测,比对数据如下:

[0116] 表8试剂盒(不加阻断剂)和传统ELISA试剂检测结果对比

血浆样本	试剂盒(不加阻断剂)测值 pg/mL	ELISA 试剂盒测试 pg/mL
1	121.61	162.52
2	121.12	131.91
3	125.507	120.48
4	118.764	157.95
5	129.768	156.01
6	128.447	168.01
7	114.72	176.59
8	112.865	175.55
9	120.048	122.4
10	169.663	167.02
11	177.269	172.41
[0117]	12	142.862
	13	171.861
	14	151.586
	15	171.284
	16	132.367
	17	139.718
	18	117.481
	19	138.036
	20	137.69
	21	166.982
	22	159.386
	23	136.327
	24	177.653

[0118]

25	193.56	208.54
26	231.316	235.67
27	582.816	540.34
28	969.128	900.25
29	419.789	384.26
30	558.836	601.27
31	298.707	284.37
32	801.102	728.39
33	728.31	704.26
34	376.573	401.25
血清样本	试剂盒（不加阻断剂）测值 pg/mL	ELISA 试剂盒测试 pg/mL
1	102.18	161.07
2	112.185	152.77
3	111.059	184.44
4	115.156	149.24
5	120.279	174.95
6	112.961	184.51
7	106.367	164.9
8	111.283	154.75
9	137.208	150.68
10	190.011	173.5
11	127.913	140.95
12	129.81	134.68
13	149.836	151.44
14	135.806	136.71
15	144.423	156.52
16	201.058	187.68
17	194.351	188.61
18	162.521	157.58
19	187.507	175
20	179.278	187.41
21	159.954	162.44
22	169.253	171.97
23	159.362	152.94
24	155.486	153.77

[0119]	25	222.339	241.25
	26	480.141	485.23
	27	437.599	423.22
	28	365.261	400.25
	29	874.642	941.33
	30	375.48	410.23
	31	696.304	754.97
	32	631.362	660.37
	33	355.75	356.84
	34	318.469	325.61

[0120] 实施例6

[0121] 收集96例正常人样本和经过PET-CT检查和临床表现为帕金森的46例患者的血液样本,已验证不添加黄芪多糖试剂盒的检测准确效果,以正常人参考范围为0-125pg/mL,大于125pg/mL为阳性进行判断。用试剂盒(不添加黄芪多糖)进行测试,结果见下表,本表为试剂盒(不添加黄芪多糖)的检测结果与PET-CT检查及临床符合率统计表。

[0122] 表9试剂盒(不添加黄芪多糖)检测结果与PET-CT检查结果的对比

本发明分析方法	PET-CT 结果		合计
	阳性	阴性	
阳性	38 (a)	8 (b)	46
阴性	8 (c)	42 (d)	50
合计	46	50	96
阴性符合率 (E)	$X=a/(a+c)*100\%$		82.61%
阳性符合率	$Y=d/(b+d)*100\%$		84.0%
总符合率	$Z=(a+d)/(a+b+c=d)*100\%$		83.3%

[0124] 分别用试剂盒(不添加黄芪多糖)和传统ELISA试剂,对血清样本及血浆样本进行检测,比对数据如下:

[0125] 表9本试剂盒和传统ELISA试剂检测结果对比

[0126]

血浆样本	试剂盒（不添加黄芪多糖）测值 pg/mL	ELISA 试剂盒测试 pg/mL
1	89.1	162.52
2	95.629	131.91
3	95.311	120.48
4	94.424	157.95
5	82.534	156.01
6	87.943	168.01
7	88.534	176.59
8	83.386	175.55
9	126.096	122.4
10	173.593	167.02
11	163.827	172.41
12	135.865	132.72
13	154.388	164.92
14	143.451	147.05
15	165.467	156.42
16	124.191	132.84
17	143.757	141.64
18	111.072	122.08
19	140.619	143.38
20	139.603	149.36
21	186.452	171.73
22	141.798	148.35
23	124.37	125.42
24	170.289	174.24
25	201.176	208.54
26	251.222	235.67
27	510.297	540.34
28	928.82	900.25
29	352.472	384.26
30	616.572	601.27
31	287.391	284.37
32	732.7	728.39
33	709.049	704.26

34	401.967	401.25
血清样本	试剂盒（不添加黄芪多糖）测值 pg/mL	ELISA 试剂盒测试 pg/mL
1	94.432	161.07
2	98.342	152.77
3	92.563	184.44
4	94.671	149.24
5	86.052	174.95
6	98.456	184.51
7	88.365	164.9
8	82.215	154.75
9	165.178	150.68
10	168.916	173.5
11	151.107	140.95
12	132.434	134.68
13	140.159	151.44
14	143.764	136.71
15	170.806	156.52
16	175.734	187.68
17	178.807	188.61
18	141.876	157.58
19	183.655	175
20	202.878	187.41
21	178.613	162.44
22	177.758	171.97
23	153.574	152.94
24	162.293	153.77
25	221.538	241.25
26	508.821	485.23
27	385.307	423.22
28	403.84	400.25
29	890.732	941.33
30	421.33	410.23
31	795.08	754.97
32	666.685	660.37
33	330.231	356.84
34	347.182	325.61

[0127]

[0128]

[0129] 上述测试结果表明,本发明的试剂盒能够检测出更低含量的样本,测试灵敏度远

远高于现有技术。

[0130] 添加阻断剂的试剂盒在临床符合率及灵敏度方面明显提高。

[0131] 尤其是本发明中采用添加了黄芪多糖的联合阻断剂的试剂盒在临床符合率及灵敏度方面性能更优。

[0132] 本实施例中的所有技术特征均可根据实际需要而进行外观修改。

[0133] 上述实施例为本发明较佳的实现方案,除此之外,本发明还可以其它方式实现,在不脱离本技术方案构思的前提下任何显而易见的替换均在本发明的保护范围之内。