



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114252592 A

(43) 申请公布日 2022.03.29

(21) 申请号 202111388930.5

G01N 33/543 (2006.01)

(22) 申请日 2021.11.22

G01N 21/76 (2006.01)

(71) 申请人 广州万孚生物技术股份有限公司
地址 510663 广东省广州市萝岗区科学城
荔枝山路8号

(72) 发明人 秦静 吴晗琪 詹雯雯 王保升

(74) 专利代理机构 广州广典知识产权代理事务
所(普通合伙) 44365

代理人 顾书玲

(51) Int. Cl.

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

权利要求书2页 说明书17页 附图2页

(54) 发明名称

一种可溶性fms样酪氨酸激酶-1检测试剂盒
及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明涉及一种可溶性fms样酪氨酸激酶-1检测试剂盒及其制备方法与应用,发明人采用双抗体夹心法联合磁微粒化学发光技术对可溶性fms样酪氨酸激酶-1进行检测,并发现采用发明人优化后的免疫微磁粒制备方法,制备得到的胎盘生长因子捕获抗体磁微粒与发明人进一步通过特定比例交联剂DTBP、DTT和封闭剂MMTS制备得到的碱性磷酸酶标记的胎盘生长因子检测抗体,所形成的一种可溶性fms样酪氨酸激酶-1化学发光免疫检测试剂盒,能以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具,自动完成检测,同时其检测性能还显著提高,检测灵敏度达到0.97pg/mL,检测线性范围宽,能达到10pg/mL~85000pg/mL。预示其具有广阔检测应用前景。

1. 一种化学发光物标记蛋白的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:
 - (1) 蛋白活化:利用交联剂对蛋白进行活化处理;
 - (2) 化学发光物活化:利用二硫苏糖醇对化学发光标记物进行活化处理;
 - (3) 偶联:将步骤(2)中活化后的化学发光标记物与步骤(1)中活化后的蛋白,混合,孵育,得到化学发光标记物-蛋白偶联物;
 - (4) 封闭:在所述步骤(3)得到的化学发光标记物-蛋白偶联物中加入封闭剂进行封闭,得到化学发光标记物-蛋白偶联终产物;其中,步骤(1)中的交联剂选自SPDP、DTBP、DTSSP、AMAS中的任意一种,步骤(4)中的封闭剂为MMTS。
2. 根据权利要求1所述制备方法,其特征在于,步骤(1)中,蛋白与交联剂使用的质量比为100:(0.5~2.0)。
3. 根据权利要求1-2任一项所述制备方法,其特征在于,步骤(2)中,化学发光标记物选自鲁米诺、异鲁米诺、碱性磷酸酶、三联吡啶钌、吖啶酯中的任意一种。
4. 根据权利要求3所述制备方法,其特征在于,所述化学发光标记物为碱性磷酸酶。
5. 根据权利要求1-4任一项所述制备方法,其特征在于,所述蛋白为抗体,进一步地,为可溶性fms样酪氨酸激酶-1单克隆抗体。
6. 一种根据权利要求1-5任一项所述制备方法获得的化学发光物标记蛋白。
7. 一种权利要求6所述化学发光物标记抗体在制备试剂盒或试剂盒检测试剂中的应用。
8. 一种碱性磷酸酶标记的可溶性fms样酪氨酸激酶-1检测抗体,其特征在于,所述碱性磷酸酶标记的可溶性fms样酪氨酸激酶-1检测抗体根据权利要求5所述制备方法制备得到。
9. 一种可溶性fms样酪氨酸激酶-1化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,包括权利要求8所述碱性磷酸酶标记的可溶性fms样酪氨酸激酶-1检测抗体和可溶性fms样酪氨酸激酶-1捕获抗体磁微粒。
10. 根据权利要求9所述可溶性fms样酪氨酸激酶-1化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述可溶性fms样酪氨酸激酶-1捕获抗体磁微粒中,可溶性fms样酪氨酸激酶-1捕获抗体经过交联剂活化处理,所述交联剂选自BS (PEG)₅、BMPS和BM (PEG)₃中的任意一种。
11. 根据权利要求10所述可溶性fms样酪氨酸激酶-1化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述活化处理中,可溶性fms样酪氨酸激酶-1捕获抗体与交联剂使用的质量比为10³:(0.5~3.0)。
12. 根据权利要求9-11任一项所述可溶性fms样酪氨酸激酶-1化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述磁微粒采用甲苯磺酰基修饰。
13. 根据权利要求12所述可溶性fms样酪氨酸激酶-1化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述甲苯磺酰基化的磁微粒的粒径为0.9μm~1.8μm。
14. 根据权利要求9-13任一项所述可溶性fms样酪氨酸激酶-1化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述可溶性fms样酪氨酸激酶-1捕获抗体磁微粒中,可溶性fms样酪氨酸激酶-1捕获抗体与磁微粒的质量比为1:(10~50)。
15. 一种非疾病诊断目的定量检测可溶性fms样酪氨酸激酶-1的方法,包括如下步骤:

根据权利要求9-14任一项所述可溶性fms样酪氨酸激酶-1化学发光免疫检测试剂盒，建立标准拟合曲线；

获取待测样本，采用权利要求8-12任一项所述可溶性fms样酪氨酸激酶-1化学发光免疫检测试剂盒检测，记录待测样本发光值，代入上述标准拟合曲线中，得到样本中可溶性fms样酪氨酸激酶-1的浓度。

一种可溶性fms样酪氨酸激酶-1检测试剂盒及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,特别是涉及一种可溶性fms样酪氨酸激酶-1检测试剂盒及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] VEGFR-1 (Flt-1) 是血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) 的一种,可溶性fms样酪氨酸激酶-1 (sFlt-1) 是其可溶性形式,因缺乏跨膜区和酪氨酸激酶活性,无信号转导功能,可作为VEGF拮抗剂。可溶性fms样酪氨酸激酶-1 (sFlt-1) 是一种具有酪氨酸激酶活性的糖蛋白,属于Ⅲ型受体酪氨酸激酶家族,是血管内皮生长因子 (VEGF) 和胎盘生长因子 (PLGF) 强有力的抑制物,可与VEGF和PLGF结合使其丧失活性。正常情况下,胎盘血管网的形成是通过VEGF及其拮抗因素(包括sFlt-1) 来维持平衡。子痫前期患者外周血sFlt-1表达异常升高,破坏该平衡,引起血管生成减少,致使内皮细胞激活和损伤。sFlt-1具有阻挠血管生长的作用,有研究表明sFlt-1可能参与了先兆子痫 (PE) 的发生发展。因此,sFlt-1可作为预测子痫前期发生和发展的生物学指标。

[0003] 妊娠期间胎盘是sFlt-1的主要来源。sFlt-1增多伴PLGF下降导致的胎盘血管生成的动态平衡失调,使得滋养细胞对子宫内膜的侵袭不足,从而子宫螺旋小动脉重铸障碍致使胎盘发生缺血缺氧,进一步升高的sFlt-1又导致母体全身血管内皮细胞功能障碍,从而发生子痫前期。子痫前期妊娠妇女血清中sFlt-1的水平升高,PLGF的水平降低,早于疾病的发生。单独测定sFlt-1和PLGF水平来预测子痫前期疾病的发生,符合率不高,效果并不理想,联合测定妊娠妇女中血清sFlt-1和PLGF的比值比单独测sFlt-1和PLGF在诊断子痫前期的发病方面更有参考价值。

[0004] 先兆子痫 (PE) 是一种严重的妊娠并发症,其主要临床表现是在孕后20周左右出现高血压和蛋白尿。约有3-5%的妊娠妇女会发生先兆子痫,并能导致产妇、胎儿或新生儿的死亡。先兆子痫的临床症状的程度轻重不一,与血小板减少以及肝脏酶活性升高相关的先兆子痫可表现为血小板减少综合征(溶血,肝脏酶升高,血小板减少)。先兆子痫的发生是由于胎盘释放出血管生成因子从而引起的内皮功能障碍。患先兆子痫女性的血清PLGF和sFlt-1的浓度水平会出现改变。此外,血循环中PLGF和sFlt-1的水平可先于临床症状出现前鉴别正常妊娠和先兆子痫。正常妊娠的前6个月血管性前因子PLGF水平升高并随着妊娠的进展直至终止而逐渐减低。与此相反,抗血管性因子sFlt-1水平在妊娠早期和中期保持稳定,直到妊娠终止期才平稳升高。患先兆子痫的妇女sFlt-1水平高于正常妊娠水平,同时PLGF水平低于正常妊娠水平。测定sFlt-1与PLGF的比值比单独检测sFlt-1或PLGF更有价值。胎盘内皮因子是TGF- β 家族中的一员,其在先兆子痫中被上调并以可溶性的内皮因子形式被释放至母体血循环中。可溶性endoglin已被证实在先兆子痫的重症病例中明显升高。

[0005] 因此检测孕妇血液sFlt-1水平在临床上可用于识别胎盘合体滋养层细胞存在供氧压力。可用于妊娠高血压预测与辅助诊断。

[0006] 传统的胎盘生长因子的测定方法包括酶联免疫吸附法和化学发光法,目前国内检测sFlt-1的方法,大多数为酶联免疫吸附法和荧光层析法。酶联免疫吸附法耗时长,操作繁琐。此外,这两种检测方法检测灵敏度差,检测范围窄,非全自动测试。国外检测sFlt-1方法有电化学发光免疫分析法,但是该方法检测成本高,导致无法适用于资源有限地区的孕查。

发明内容

[0007] 基于此,本发明的目的之一在于提供一种化学发光物标记蛋白的制备方法。

[0008] 包括如下技术方案:

[0009] (1) 蛋白活化:利用交联剂对蛋白进行活化处理;

[0010] (2) 化学发光物活化:利用二硫苏糖醇对化学发光标记物进行活化处理;

[0011] (3) 偶联:将步骤(2)中活化后的化学发光标记物与步骤(1)中活化后的蛋白,混合,孵育,得到化学发光标记物-蛋白偶联物;

[0012] (4) 封闭:在所述步骤(3)得到的化学发光标记物-蛋白偶联物中加入封闭剂进行封闭,得到化学发光标记物-蛋白偶联终产物;

[0013] 其中,步骤(1)中的交联剂选自SPDP、DTBP、DTSSP、AMAS中的任意一种,步骤(4)中的封闭剂为MMTS。

[0014] 本发明的目的之一还在于提供一种根据上述制备方法获得的化学发光物标记蛋白。

[0015] 本发明的目的之一还在于提供上述化学发光物标记抗体在制备试剂盒或试剂盒检测试剂中的应用。

[0016] 本发明的目的之一还在于提供一种根据上述制备方法制备得到的碱性磷酸酶标记的可溶性fms样酪氨酸激酶-1检测抗体。

[0017] 本发明的目的之一还在于提供一种可溶性fms样酪氨酸激酶-1化学发光免疫检测试剂盒。

[0018] 包括如下技术方案:

[0019] 一种可溶性fms样酪氨酸激酶-1化学发光免疫检测试剂盒,其包括上述碱性磷酸酶标记的可溶性fms样酪氨酸激酶-1检测抗体和可溶性fms样酪氨酸激酶-1捕获抗体磁微粒。

[0020] 本发明的目的之一还在于提供一种非疾病诊断目的定量检测可溶性fms样酪氨酸激酶-1的方法。

[0021] 包括如下技术方案:

[0022] 根据上述可溶性fms样酪氨酸激酶-1化学发光免疫检测试剂盒,建立标准拟合曲线;

[0023] 获取待测样本,采用上述可溶性fms样酪氨酸激酶-1化学发光免疫检测试剂盒检测,记录待测样本发光值,代入上述标准拟合曲线中,得到样本中可溶性fms样酪氨酸激酶-1的浓度。

[0024] 本发明的发明人为了解决现有技术中可溶性fms样酪氨酸激酶-1(sFlt-1)检测的灵敏度差,检测范围窄等问题,采用双抗体夹心法联合磁微粒化学发光技术对sFlt-1进行检测,在进行化学发光物标记sFlt-1检测抗体的制备过程中,意外发现采用发明人优化后

的化学发光物标记蛋白的制备方法,特别是当化学发光物为DTT活化后的碱性磷酸酶,使用的蛋白交联剂选自SPDP、DTBP、DTSSP、AMAS中任意一种时,经特定比例反应制备得到的碱性磷酸酶标记的sFlt-1检测抗体与发明人进一步通过特定比例交联剂BS (PEG)₅制备得到的sFlt-1捕获抗体磁微粒,所形成的一种sFlt-1化学发光免疫检测试剂盒,能以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具,自动完成检测,同时其检测性能还显著提高,检测灵敏度达到0.97pg/mL,相对于传统的可溶性fms样酪氨酸激酶-1的检测方法灵敏度至少提高了8倍,检测线性范围宽,能达到10pg/mL~85000pg/mL。预示其具有广阔的应用前景。

附图说明

[0025] 图1为本发明可溶性fms样酪氨酸激酶-1化学发光免疫测定试剂盒的制备流程图示意图。

[0026] 图2为实施例2中经检测系列sFlt-1定标品得到的胎盘生长因子标准曲线图。

[0027] 图3为实施例4中本发明可溶性fms样酪氨酸激酶-1化学发光免疫测定试剂盒与罗氏试剂盒检测结果的相关性分析统计图。

具体实施方式

[0028] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(NewYork:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。实施例中所用到的各种常用化学试剂,均为市售产品。

[0029] 除非另有定义,本发明所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的人员通常理解的含义相同。本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不用于限制本发明。本发明所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0030] 在整个说明书和权利要求书中,以下术语具有与本文明确相关的含义,除非上下文另有明确规定。在本发明中使用的短语“在一个实施方案中”不一定指代相同的实施方案,尽管其可能是。此外,在本发明中使用的短语“在另一实施方案中”不一定指代不同的实施方案,尽管其可能是。因此,如下所述,可以容易地组合本发明的各个实施方案,而不脱离本发明的范围或精神。

[0031] 此外,如本发明所使用的,术语“或”是包含性的“或”符号,并且等同于术语“和/或”,除非上下文另有明确规定。术语“基于”不是排他性的,并且允许基于未描述的其他因素,除非上下文另有明确规定。此外,在整个说明书中,“一个”、“一种”和“所述/该”的含义包括复数指示物。“在.....中”中的含义包括“在.....中”和“在.....上”。

[0032] 为了便于理解本发明,下面将对本发明进行更全面的描述。本发明可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。相反地,提供这些实施例的目的是使对本发明公开内容的理解更加透彻全面。

[0033] 本发明涉及缩略语和术语定义如下:

[0034] BS (PEG)₅: 聚乙二醇化二(磺基琥珀酰亚胺基) 辛二酸

[0035] sFlt-1: 可溶性fms样酪氨酸激酶-1

- [0036] SPDP:琥珀酰亚胺3-(2-吡啶基二硫基)-丙酸酯
- [0037] MMTS:甲基硫甲磺酸酯
- [0038] BMPS:N-β-马来酰亚胺丙基氧化丁二酰亚胺酯
- [0039] BM(PEG)₃:1,11-双马来酰亚胺基-三乙二醇
- [0040] DTBP:二硫代丙亚氨酸二甲酯二盐酸盐
- [0041] DTSSP:3,3'-二硫双(磺基琥珀酰亚胺丙酸酯)
- [0042] AMAS:N-α-马来酰亚胺氧琥珀酰亚胺酯
- [0043] 以下结合具体实施例对本发明作进一步详细的说明。
- [0044] 本发明的一些实施例提供了一种化学发光物标记蛋白的制备方法,其包括如下步骤:
- [0045] (1) 蛋白活化:利用交联剂对蛋白进行活化处理;
- [0046] (2) 化学发光物活化:利用二硫苏糖醇对化学发光标记物进行活化处理;
- [0047] (3) 偶联:将步骤(2)中活化后的化学发光标记物与步骤(1)中活化后的蛋白,混合,孵育,得到化学发光标记物-蛋白偶联物;
- [0048] (4) 封闭:在所述步骤(3)得到的化学发光标记物-蛋白偶联物中加入封闭剂进行封闭,得到化学发光标记物-蛋白偶联终产物;
- [0049] 其中,步骤(1)中的交联剂选自SPDP、DTBP、DTSSP、AMAS中的任意一种,步骤(4)中的封闭剂为MMTS。
- [0050] 在其中一些实施例中,上述制备方法步骤(1)中的交联剂优先为DTBP。
- [0051] 在其中一些实施例中,上述制备方法步骤(1)中,蛋白与交联剂使用的质量比为100:(0.5~2.0)。进一步优选为,当蛋白与交联剂为使用的质量比为100:1.5,其中,当使用的交联剂为5mg/mL DTBP溶液时,此时DTBP作为抗体活化剂,能最大效率的活化抗体,能大大提高后续抗体与化学发光标记物的偶联效率。从而能提高检测灵敏度。
- [0052] 在其中一些实施例中,步骤(1)中的活化处理时,蛋白与交联剂的使用浓度相等,活化方式为室温孵育1小时。
- [0053] 在其中一些实施例中,步骤(2)中对化学发光标记物的活化处理为使用浓度为5mg/mL的DTT,室温下孵育1h。
- [0054] 在其中一些实施例中,步骤(4)中使用的封闭剂为5mg/mL的MMTS,进一步地,还进行脱盐纯化处理,优选为,用0.01M,pH为7.4的PBS缓冲液回收上述脱盐纯化后的结合物至0.1mg/mL,接着加入等体积的甘油,混匀,得到化学发光标记物标记的蛋白。
- [0055] 在其中一些实施例中,上述制备方法步骤(2)中,化学发光标记物选自吡啶酯、三联吡啶钌、金刚烷、鲁米诺、鲁米诺的衍生物、异鲁米诺、异鲁米诺的衍生物、辣根过氧化物酶及碱性磷酸酶中的一种。当然,在其他实施方式中,经标记物标记的抗体中的标记物不限于上述,还可以是可用于化学发光免疫分析平台的其他物质。
- [0056] 在其中一些实施例中,上述化学发光标记物为碱性磷酸酶。
- [0057] 在其中一些实施例中,上述制备方法步骤(1)中,所述蛋白包括抗原和抗体,进一步地,所述蛋白为抗体,更优选地,为可溶性fms样酪氨酸激酶-1单克隆抗体。
- [0058] 本发明的一些实施例还提供了一种化学发光物标记蛋白,其根据上述制备方法获得。

[0059] 本发明的一些实施例还提供了上述化学发光物标记抗体在制备试剂盒或试剂盒试剂中的应用。

[0060] 本发明的一些实施例还提供了一种碱性磷酸酶标记的可溶性fms样酪氨酸激酶-1检测抗体,其根据上述制备方法制备得到。

[0061] 本发明的一些实施例还提供了一种可溶性fms样酪氨酸激酶-1化学发光免疫检测试剂盒,其包括上述碱性磷酸酶标记的可溶性fms样酪氨酸激酶-1检测抗体和可溶性fms样酪氨酸激酶-1捕获抗体磁微粒。

[0062] 在其中一些实施例中,上述溶性fms样酪氨酸激酶-1化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述可溶性fms样酪氨酸激酶-1捕获抗体磁微粒中,可溶性fms样酪氨酸激酶-1捕获抗体经过交联剂活化处理,所述交联剂选自BS(PEG)₅、BMPS和BM(PEG)₃中的任意一种。

[0063] 在其中一些实施例中,上述可溶性fms样酪氨酸激酶-1捕获抗体磁微粒具体根据如下步骤制备得到:

[0064] (1) 预处理:磁微粒经预处理,得到混合液1;

[0065] (2) 活化:利用交联剂对抗体进行活化处理;

[0066] (3) 偶联:将步骤(2)中活化后的抗体加入步骤(1)得到的混合液1中,得到混合液2,经孵育,得到抗体-磁珠偶联物;

[0067] (4) 封闭:在所述步骤(3)得到的抗体-磁珠偶联物中加入封闭液进行封闭,得到抗体-磁珠偶联的免疫磁微粒终产物;

[0068] 其中,步骤(2)中的交联剂选自BS(PEG)₅、BMPS和BM(PEG)₃中的任意一种;所述活化处理,抗体与交联剂使用的质量比为 10^3 : (0.5~3.0)。进一步优选为,抗体与交联剂使用的质量比为 10^3 :1.5。

[0069] 在其中一些实施例中,上述制备方法步骤(2)中的交联剂优选为BS(PEG)₅,抗体与交联剂BS(PEG)₅使用的质量比为 10^3 :1.5时,通过改变抗体的共轭结构,减小空间位阻,从而使抗体与磁微粒的共价结合更为高效,进而使得制备得到的免疫磁微粒,能够减少,抗体与抗原结合的活性部位阻塞,从而提高抗体的结合抗原活性,进而提升免疫分析方法的稳定性和灵敏度。

[0070] 在其中一些实施例中,上述制备方法步骤(1)中,所述混合液1为磁微粒经缓冲液洗涤重悬后,在硫酸铵溶液中分散均匀得到;进一步地,所述硫酸铵溶液浓度为2~5M,pH为8~10。更优选为使用的硫酸铵溶液的浓度为3M,pH为9.5,此时硫酸铵作为反应促进剂,能加快后续磁珠与蛋白的结合速度。

[0071] 在其中一些实施例中,上述制备方法步骤(1)中,所述缓冲液优选为PBS缓冲液和BBS缓冲液;进一步优选为,磁微粒先用0.01M,pH为7.4的PBS缓冲液洗涤,磁分离去上清后再用0.1M,pH为9.5的BBS缓冲液重悬。

[0072] 在其中一些实施例中,上述制备方法步骤(1)中,所述磁微粒采用甲苯磺酰基修饰,即磁微粒具有的活性基团为甲苯磺酰基时,其可以与蛋白质发生偶联,使得偶联后的蛋白质与待检测物结合后能够利用外磁场的作用实现待检测物的高效分离和检测。

[0073] 在其中一些实施例中,上述制备方法步骤(1)中,所述甲苯磺酰基化的磁微粒的粒径为0.9 μ m~1.8 μ m。

[0074] 在其中一些实施例中,上述制备方法步骤(4)中,所述封闭液为含0.5%BSA的

0.05M, pH为7.4的Tris缓冲液。

[0075] 在其中一些实施例中,上述制备方法步骤(4)中,所述抗体-磁珠偶联的免疫磁微粒终产物中,抗体与磁珠的质量比为1:(10~50)。进一步优选为,抗体与磁珠的质量比为1:25。

[0076] 在其中一些实施例中,上述可溶性fms样酪氨酸激酶-1化学发光免疫检测试剂盒还包括可溶性fms样酪氨酸激酶-1定标品,进一步地,所述可溶性fms样酪氨酸激酶-1定标品采用定标缓冲液配制得到,所述定标缓冲液包括45mM~55mM Tris,0.05%~0.15%BSA和0.9%NaCl。优选为,上述定标缓冲液包括50mM Tris,0.1%BSA,0.9%NaCl,pH7.5。

[0077] 在其中一些实施例中,上述盘生长因子化学发光免疫检测试剂盒还包括化学发光底物液,进一步地,优选为APS底物液。

[0078] 本发明的一些实施例还提供了一种非疾病诊断目的定量检测可溶性fms样酪氨酸激酶-1的方法,包括如下步骤:

[0079] 根据上述可溶性fms样酪氨酸激酶-1化学发光免疫检测试剂盒,建立标准拟合曲线;

[0080] 获取待测样本,采用上述可溶性fms样酪氨酸激酶-1化学发光免疫检测试剂盒检测,记录待测样本发光值,代入上述标准拟合曲线中,得到样本中可溶性fms样酪氨酸激酶-1的浓度。

[0081] 在其中一些实施例中,上述待测样本为血清。

[0082] 在其中一些实施例中,上述定量检测方法具体为:取20 μ L-100 μ L的血清样本,加入20 μ L-100 μ L的可溶性fms样酪氨酸激酶-1捕获抗体磁微粒和20 μ L-100 μ L的碱性磷酸酶标记的可溶性fms样酪氨酸激酶-1检测抗体,反应5min-15min后,进行磁分离,接着再加入100 μ L-300 μ L的底物液,混匀后,仪器将反应混合物送入暗室,最后记录发光值。优选为,取50 μ L的血清样本,加入50 μ L的可溶性fms样酪氨酸激酶-1捕获抗体磁微粒和50 μ L的碱性磷酸酶标记的可溶性fms样酪氨酸激酶-1检测抗体,反应10min后,进行磁分离,接着再加入200 μ L的底物液,混匀后,仪器将反应混合物送入暗室,最后记录发光值。

[0083] 实施例1sFlt-1化学发光免疫测定试剂盒的制备

[0084] (1) sFlt-1单克隆抗体包被的甲苯磺酰基化的磁微粒的制备:

[0085] 取含有90mg粒径为0.9 μ m~1.8 μ m的甲苯磺酰基化磁微粒(MagnosphereTM,货号:MS160)的悬浮液,磁分离去上清,用0.01M,pH为7.4的PBS缓冲液洗涤磁微粒,磁分离去上清后用0.1M,pH为9.5的BBS缓冲液重悬,加入4mL的3M,pH为9.5的硫酸铵溶液,分散均匀,得到混合液1,接着在3.6mg的可溶性fms样酪氨酸激酶-1单克隆抗体(广州万孚生物技术股份有限公司,货号:sFlt-1-10#)加入5.4 μ g的BS(PEG)₅(聚乙二醇化二(磺基琥珀酰亚胺基)辛酸,ThermoFisher SCIENTIFIC)活化sFlt-1单克隆抗体,再将活化后抗体加入混合液1中得到混合液2。然后将混合液2放置旋转摇床上进行第一次孵育处理,磁分离上清液后用0.05M,pH为7.4的Tris缓冲液洗涤,去上清液后,接着加入含0.5%的BSA溶液,进行第二次孵育处理,磁分离上清液后用0.05M,pH为7.4的Tris缓冲液洗涤,最后用含0.5%BSA的0.05M,pH为7.4的Tris缓冲液重悬到10mg/mL,得到sFlt-1单克隆抗体包被的甲苯磺酰基化的磁微粒,对应的磁珠母液命名为:sFlt-1-R1-①;保存于4 $^{\circ}$ C备用。

[0086] (2) 碱性磷酸酶标记的sFlt-1单克隆抗体的制备:

[0087] 取含有1.2mg可溶性fms样酪氨酸激酶-1单克隆抗体的溶液(广州万孚生物技术股份有限公司,货号:sFlt-1-12#),离心-去上清后,用0.01M,pH为7.4的PBS缓冲液进行置换原抗体中的液体到5mg/mL,接着加入3.6 μ L浓度为5mg/mL的DTBP(二硫代丙亚氨酸二甲酯二盐酸盐,ThermoFisher SCIENTIFIC),室温下分别孵育1h,活化抗体;然后往72 μ L浓度为20mg/mL碱性磷酸酶中加入2.88 μ L浓度为5mg/mL的DTT(二硫苏糖醇),室温下孵育1h,活化碱性磷酸酶;接着把活化后的抗体和碱性磷酸酶混合在一起,室温下孵育1h,进行交联。最后往上述交联后的混合物中加入6.48 μ L浓度为5mg/mL的MMTS(甲基硫甲磺酸酯,ThermoFisher SCIENTIFIC)进行封闭,接着脱盐纯化,用0.01M,pH为7.4的PBS缓冲液回收上述脱盐纯化后的结合物至0.1mg/mL,接着加入等体积的甘油,混匀,得到碱性磷酸酶标记的可溶性fms样酪氨酸激酶-1单克隆抗体结合物,对应的酶标母液命名为:sFlt-1-R2-①,保存于-20 $^{\circ}$ C备用。

[0088] (3) sFlt-1定标品的制备:

[0089] 用定标品缓冲液(50mM Tris,0.1%BSA,0.9%NaCl,pH7.5)将可溶性fms样酪氨酸激酶-1(R&D Systems,Inc.)配制成浓度为0pg/mL、10pg/mL、50pg/mL、100pg/mL、500pg/mL、1000pg/mL、2500pg/mL、5000pg/mL、8000pg/mL、11000pg/mL,每管0.5mL分装,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0090] 实施例2sFlt-1化学发光免疫测定试剂盒的检测方法

[0091] 本发明试剂盒的检测原理是:包被可溶性fms样酪氨酸激酶-1(sFlt-1)捕获抗体的磁微粒与碱性磷酸酶标记的可溶性fms样酪氨酸激酶-1(sFlt-1)检测抗体和样本、校准品或质控品中的胎盘生长因子结合形成“三明治”复合物。在外加磁场的作用下,将免疫反应形成的复合物与未结合的其他物质分离,清洗复合物后,加入酶促化学发光底物。底物在酶作用下被催化裂解,形成不稳定的激发态中间体,当激发态中间体回到基态时发出光子,形成发光反应,即可使用化学发光仪检测反应的发光强度。同时,发光标记物碱性磷酸酶基本不被消耗,而反应体系中发光剂充分过量,因此发光信号强而稳定,且发光时间较长,在检测范围内,发光强度与样本中的胎盘生长因子的含量成正比,参考标准曲线可计算出样本中sFlt-1浓度。

[0092] 以全自动化学发光免疫分析仪(广州万孚生物技术股份有限公司,型号FC-302)为检测工具,方法学模式为双抗体夹心,即仪器依次加入50 μ L的血清样本,加50 μ L的可溶性fms样酪氨酸激酶-1单克隆抗体包被的甲苯磺酰基化的磁微粒和50 μ L的碱性磷酸酶标记的可溶性fms样酪氨酸激酶-1单克隆抗体,反应10min后,进行磁分离,接着往里面加入200 μ L的底物液,混匀后,仪器将反应混合物送入暗室,最后记录发光值。

[0093] 采用上述方法对实施例1中制备得到的sFlt-1定标品进行检测,得到绘制标准曲线如图2所示。

[0094] 实施例3sFlt-1化学发光免疫测定试剂盒的优化

[0095] (1) sFlt-1单克隆抗体包被的甲苯磺酰基化的磁微粒的制备中抗体活化剂的筛选:

[0096] 参考实施例1所述方法制备得到混合液1,接着分别在3.6mg的可溶性fms样酪氨酸激酶-1单克隆抗体(广州万孚生物技术股份有限公司,货号:sFlt-1-10#)加入5.4 μ g的BS(PEG)₅、5.4 μ g的BMPS(N- β -马来酰亚胺丙基氧化丁二酰亚胺酯,ThermoFisher

SCIENTIFIC) 和5.4 μ g的BM (PEG)₃ (1,11-双马来酰亚胺基-三乙二醇, ThermoFisher SCIENTIFIC) 活化可溶性fms样酪氨酸激酶-1单克隆抗体, 再分别将活化后抗体加入混合液1中得到3种混合液2。然后分别将这3种混合液2放置旋转摇床上进行第一次孵育处理, 磁分离上清液后用0.05M, pH为7.4的Tris缓冲液洗涤, 去上清液后, 接着加入含0.5%的BSA溶液, 进行第二次孵育处理, 磁分离上清液后用0.05M, pH为7.4的Tris缓冲液洗涤, 最后用含0.5%BSA的0.05M, pH为7.4的Tris缓冲液重悬到10mg/mL, 分别得到3个可溶性fms样酪氨酸激酶-1单克隆抗体包被的甲苯黄酰基化的磁微粒(其中, BS (PEG)₅偶联剂对应的磁珠母液命名为:sFlt-1-R1-①; BMPS偶联剂对应的磁珠母液命名为:sFlt-1-R1-②; BM (PEG)₃偶联剂对应的磁珠母液命名为:sFlt-1-R1-③), 保存于4 $^{\circ}$ C备用, 后续分别用这三个磁珠母液, 搭配相应的碱性磷酸酶标记的可溶性fms样酪氨酸激酶-1单克隆抗体, 对试剂的灵敏度、重复性、线性指标进行测试验证, 具体结果请见表3-1。

[0097] 表3-1不同偶联剂磁微粒包被sFlt-1抗体性能验证结果

[0098]

磁珠包被物	样本(pg/mL)	RLU	S/N	重复性	线性
sFlt-1-R1-①	0	704	/	4.22%	r=0.9993
	15	1897	2.69	4.55%	
	1000	134251	190.70	3.67%	
	10000	1123576	1595.99	3.12%	
	40000	3764267	5346.97	3.23%	
	80000	8028921	11404.72	2.06%	
sFlt-1-R1-②	0	799	/	6.89%	r=0.9977
	15	893	1.12	7.16%	
	1000	80232	100.42	6.22%	

[0099]		10000	965367	1208.22	6.45%	r=0.9984
		40000	3048413	3815.29	5.78%	
		80000	7009245	8772.52	5.54%	
	sFlt-1-R1-③	0	1093	/	6.65%	
		15	1132	1.04	6.12%	
		1000	5021	4.59	7.34%	
		10000	35326	32.32	6.52%	
		40000	95435	87.31	6.62%	
		80000	198273	181.40	5.84%	

[0100] 由上表3-1可以得知,sFlt-1-R1-①与sFlt-1-R1-②和sFlt-1-R1-③磁珠包被物比较,sFlt-1-R1-①磁珠包被物的信噪比(S/N)最大,重复性均在5%以内,线性r最优。

[0101] 因此,在sFlt-1单克隆抗体包被的甲苯磺酰基化的磁微粒的制备中,所用到的抗体活化剂优选为BS(PEG)₅。

[0102] (2) sFlt-1单克隆抗体包被的甲苯磺酰基化的磁微粒的制备中抗体活化剂浓度的筛选:

[0103] 参考实施例1所述方法制备得到混合液1,接着分别在1mg的可溶性fms样酪氨酸激酶-1单克隆抗体(广州万孚生物技术股份有限公司,货号:sFlt-1-10#)加入0.8μg的BS(PEG)₅、1.5μg的BS(PEG)₅和3.0μg的BS(PEG)₅活化可溶性fms样酪氨酸激酶-1单克隆抗体,再分别将活化后抗体加入混合液1中得到3种混合液2。然后分别将这3种混合液2放置旋转摇床上进行第一次孵育处理,磁分离上清液后用0.05M,pH为7.4的Tris缓冲液洗涤,去上清液后,接着加入含0.5%的BSA溶液,进行第二次孵育处理,磁分离上清液后用0.05M,pH为7.4的Tris缓冲液洗涤,最后用含0.5%BSA的0.05M,pH为7.4的Tris缓冲液重悬到10mg/mL,分别得到3个可溶性fms样酪氨酸激酶-1单克隆抗体包被的甲苯磺酰基化的磁微粒(其中,0.8μg的BS(PEG)₅偶联剂对应的磁珠母液命名为:sFlt-1-R1-④;1.5μg的BS(PEG)₅偶联剂对应的磁珠母液命名为:sFlt-1-R1-⑤;3.0μg的BS(PEG)₅偶联剂对应的磁珠母液命名为:sFlt-1-R1-⑥),保存于4℃备用,后续分别用这三个磁珠母液,搭配相应的碱性磷酸酶标记的可溶性fms样酪氨酸激酶-1单克隆抗体,对试剂的灵敏度、重复性、线性指标进行测试验证,具体结果请见表3-2。

[0104] 表3-2不同浓度的BS(PEG)₅偶联剂磁微粒包被sFlt-1抗体性能验证结果

磁珠包被物	样本(pg/mL)	RLU	S/N	重复性	线性
[0105] sFlt-1-R1-④	0	684	/	4.23%	r=0.9982
	15	1594	2.33	4.35%	
	1000	126690	185.22	4.67%	
	10000	1026848	1501.24	3.52%	
	40000	3302251	4827.85	3.83%	
	80000	7452618	10895.64	3.66%	
sFlt-1-R1-⑤	0	709	/	4.22%	r=0.9993
	15	1914	2.70	4.36%	
	1000	135575	191.22	4.02%	
	10000	1132507	1597.33	3.45%	
	40000	3792200	5348.66	2.78%	
	80000	8089846	11410.22	2.54%	
[0106] sFlt-1-R1-⑥	0	823	/	4.34%	r=0.9992
	15	2263	2.75	4.12%	
	1000	158123	192.13	3.34%	
	10000	1314964	1597.77	3.52%	
	40000	4365212	5304.02	2.62%	
	80000	9387508	11406.45	2.84%	

[0107] 由表3-2可以得知,sFlt-1-R1-④与sFlt-1-R1-⑤和sFlt-1-R1-⑥磁珠包被物比较,sFlt-1-R1-⑤和sFlt-1-R1-⑥磁珠包被物的信噪比(S/N)、重复性和线性性能差不多,但均比sFlt-1-R1-④的性能优,最后优先sFlt-1-R1-⑤。

[0108] 因此,在胎盘生长因子单克隆抗体包被的甲苯磺酰基化的超顺磁性微粒中,所用到的抗体和抗体活化剂BS(PEG)₅的质量比优选10³:1.5。

[0109] (3) 碱性磷酸酶标记的sFlt-1单克隆抗体的制备中交联剂的筛选:

[0110] 取1.2mg的可溶性fms样酪氨酸激酶-1单克隆抗体(广州万孚生物技术股份有限公司,货号:sFlt-1-12#),用0.01M,pH为7.4的PBS缓冲液进行置换原抗体中的液体到5mg/mL,接着分别加入3.6 μ L浓度为5mg/mL的DTBP、3.6 μ L浓度为5mg/mL的SPDP(琥珀酰亚胺3-(2-吡啶基二硫基)-丙酸酯,ThermoFisher SCIENTIFIC)、3.6 μ L浓度为5mg/mL的DTSSP(3,3'-二硫双(磺基琥珀酰亚胺丙酸酯),ThermoFisher SCIENTIFIC)和3.6 μ L浓度为5mg/mL的AMAS(N- α -马来酰亚胺氧琥珀酰亚胺酯,ThermoFisher SCIENTIFIC),室温下分别孵育1h,活化抗体;然后往72 μ L浓度为20mg/mL碱性磷酸酶中加入2.88 μ L浓度为5mg/mL的DTT,室温下孵育1h,活化碱性磷酸酶;接着把活化后的抗体和碱性磷酸酶混合在一起,室温下孵育1h,进行交联。最后往上述交联后的混合物中加入6.48 μ L浓度为5mg/mL的MMTS进行封闭,接着脱盐纯化,用0.01M,pH为7.4的PBS缓冲液回收上述脱盐纯化后的结合物至0.1mg/mL,接着加入等体积的甘油,混匀,得到碱性磷酸酶标记的可溶性fms样酪氨酸激酶-1单克隆抗体结合物(其中,DTBP交联剂对应的酶标母液命名为:sFlt-1-R2-①;SPDP交联剂对应的磁珠母液命名为:sFlt-1-R2-②;DTSSP交联剂对应的磁珠母液命名为:sFlt-1-R2-③;AMAS交联剂对应的磁珠母液命名为:sFlt-1-R2-④),保存于-20 $^{\circ}$ C备用,后续分别用这三个酶标母液,搭配相应的可溶性fms样酪氨酸激酶-1单克隆抗体包被的甲苯磺酰基化的磁微粒,对试剂的灵敏度、重复性、线性指标进行测试验证,具体结果请见表3-3。

[0111] 表3-3不同交联剂碱性磷酸酶标记sFlt-1抗体性能验证结果

[0112]

酶标记物	样本(pg/mL)	RLU	S/N	重复性	线性
sFlt-1-R2-①	0	704	/	4.25%	r=0.9993
	15	1897	2.69	4.55%	
	1000	134251	190.70	3.67%	
	10000	1123576	1595.99	3.12%	
	40000	3764267	5346.97	3.23%	
	80000	8028921	11404.72	2.06%	
sFlt-1-R2-②	0	811	/	6.88%	r=0.9967
	15	921	1.14	7.21%	
	1000	89342	110.16	6.72%	
	10000	934714	1152.55	6.87%	
	40000	3054297	3766.09	6.22%	
	80000	7226172	8910.20	5.36%	
sFlt-1-R2-③	0	1011	/	7.03%	r=0.9958

[0113]		15	1042	1.03	8.62%	r=0.9952
		1000	7902	7.82	8.13%	
		10000	88275	87.31	7.61%	
		40000	297648	294.41	7.02%	
		80000	730298	722.35	5.72%	
	sFlt-1-R2-④	0	1211	/	8.12%	
		15	1372	1.13	7.66%	
		1000	85456	70.57	7.53%	
		10000	996353	822.75	7.21%	
		40000	2853903	2356.65	6.62%	
		80000	7024774	5800.80	5.42%	

[0114] 由上表3-3可以得知,sFlt-1-R2-①与sFlt-1-R2-②、sFlt-1-R2-③和sFlt-1-R2-④酶标记物比较,sFlt-1-R2-①酶标记物的信噪比(S/N)最大,重复性均在5%以内,线性r最优。

[0115] 因此,在碱性磷酸酶标记的可溶性fms样酪氨酸激酶-1单克隆抗体制备中,所用到的交联剂优选为DTBP和DTT,封闭剂为MMTS。

[0116] (4) 碱性磷酸酶标记的sFlt-1单克隆抗体的制备中交联剂浓度的筛选:

[0117] 取1.2mg的可溶性fms样酪氨酸激酶-1单克隆抗体(广州万孚生物技术股份有限公司,货号:sFlt-1-12#),用0.01M,pH为7.4的PBS缓冲液进行置换原抗体中的液体到5mg/mL,接着分别加入1.2 μ L、2.4 μ L、3.6 μ L和4.8 μ L浓度为5mg/mL的DTBP,室温下分别孵育1h,活化抗体;然后往72 μ L浓度为20mg/mL碱性磷酸酶中加入2.88 μ L浓度为5mg/mL的DTT,室温下孵育1h,活化碱性磷酸酶;接着把活化后的抗体和碱性磷酸酶混合在一起,室温下孵育1h,进行交联。最后往上述交联后的混合物中加入6.48 μ L浓度为5mg/mL的MMTS进行封闭,接着脱盐纯化,用0.01M,pH为7.4的PBS缓冲液回收上述脱盐纯化后的结合物至0.1mg/mL,接着加入等体积的甘油,混匀,得到碱性磷酸酶标记的可溶性fms样酪氨酸激酶-1单克隆抗体结合物(其中,2.4 μ L浓度为5mg/mL的DTBP交联剂对应的酶标母液命名为:sFlt-1-R2-⑤;3.6 μ L浓度为5mg/mL的DTBP交联剂对应的酶标母液命名为:sFlt-1-R2-⑥;4.8 μ L浓度为5mg/mL的DTBP交联剂对应的酶标母液命名为:sFlt-1-R2-⑦),保存于-20 $^{\circ}$ C备用,后续分别用这三个酶标母液,搭配相应的可溶性fms样酪氨酸激酶-1单克隆抗体包被的甲苯磺酰基化的磁微粒,对试剂的灵敏度、重复性、线性指标进行测试验证,具体结果请见表3-4。

[0118] 表3-4不同浓度的DTBP交联剂碱性磷酸酶标记sFlt-1抗体性能验证结果

酶标记物	样本(pg/mL)	RLU	S/N	重复性	线性
sFlt-1-R2-⑤	0	697	/	4.26%	r=0.9988
	15	1638	2.35	4.43%	
	1000	129098	185.22	4.67%	
	10000	1063176	1525.36	4.02%	
	40000	3425752	4915.00	3.53%	
	80000	7482118	10734.75	3.26%	
sFlt-1-R2-⑥	0	711	/	3.99%	r=0.9996
	15	1920	2.70	4.21%	
	1000	135815	191.02	3.72%	
	10000	1137116	1599.32	3.37%	
sFlt-1-R2-⑦	40000	3903601	5490.30	3.22%	r=0.9996
	80000	8116527	11415.65	2.36%	
	0	745	/	4.11%	
	15	2034	2.73	4.32%	
	1000	143129	192.12	4.14%	
	10000	1190972	1598.62	3.63%	
	40000	4092367	5493.11	3.02%	
	80000	8508906	11421.35	2.52%	

[0121] 由表3-4可以得知,sFlt-1-R2-⑤、sFlt-1-R2-⑥和sFlt-1-R2-⑦酶标记物比较,sFlt-1-R2-⑥和sFlt-1-R2-⑦磁珠包被物的信噪比(S/N)、重复性和线性性能差不多,但均比sFlt-1-R2-⑤的性能优,最后优选sFlt-1-R2-⑥。

[0122] 因此,在碱性磷酸酶标记的胎盘生长因子单克隆抗体制备中,所用到的抗体和交联剂SPDP的质量比优选为100:1.5。

[0123] 实施例4sF1t-1化学发光免疫测定试剂盒性能评价

[0124] 采用实施例2中的方法对可溶性fms样酪氨酸激酶-1定标品进行检测,得到绘制标准曲线如图2所示。

[0125] 接着测试实际样本,根据样本发光值计算样本浓度。

[0126] (1)灵敏度的检测:

[0127] 参照CLSI EP17-A文件推荐实验方案,计算可溶性fms样酪氨酸激酶-1化学发光免疫测定试剂盒的灵敏度,求得的灵敏度为0.97pg/mL。

[0128] (2)线性的检测:

[0129] 对浓度为0pg/mL、15pg/mL、100pg/mL、500pg/mL、1000pg/mL、5000pg/mL、10000pg/mL、20000pg/mL、40000pg/mL、86000pg/mL定标品做了线性分析,计算线性相关系数, $r=0.9993$,另外,该试剂盒对可溶性fms样酪氨酸激酶-1样本检测的线性范围为10pg/mL~85000pg/mL。

[0130] (3)精密度的检测:

[0131] 取浓度为200pg/mL和40000pg/mL两个可溶性fms样酪氨酸激酶-1样本,每个样本各测试10次,用三批试剂盒进行检测,计算试剂盒批内及批间差,结果表明该试剂盒批内差小于5%,批间差小于10%,具体结果见下表4所示。

[0132] (4)干扰性实验:

[0133] 取混合血清分别添加干扰物包括:胆红素(10mg/dL)、血红蛋白(500mg/dL)、甘油三酯(1000mg/dL),添加质量比按照1:20进行,分别测定混合血清和添加了各种干扰物后混合血清的测值。计算二者之间的偏差,以 $\pm 10\%$ 为可接受范围,具体结果见下表4所示。结果表明,干扰性均达到NCCLS的文件标准,可用于临床实验室可溶性fms样酪氨酸激酶-1状况的准确评估。

[0134] 表4sF1t-1化学发光免疫测定试剂盒检测结果

检测指标		结果
灵敏度		0.97pg/mL
线性相关系数		$r=0.9993$
线性范围		10pg/mL~85000pg/mL
[0135] 批内精密度	低值样本	CV=3.34%
	高值样本	CV=2.63%
批间精密度	低值样本	CV=4.83%
	高值样本	CV=4.66%
干扰实验	胆红素	Bias=-3.72%
	血红蛋白	Bias=-4.31%
	甘油三酯	Bias=-3.12%

[0136] (5)临床性能的检测:

[0137] 取128例临床样本用本发明实施例的试剂盒进行检测,测定发光值,并根据标准曲

线(如图2所示),计算出浓度。

[0138] 同时使用罗氏公司的可溶性fms样酪氨酸激酶-1检测试剂盒(电化学发光法)对上述临床样本进行浓度测定。

[0139] 将本发明实施例中制备的试剂盒的检测浓度与罗氏公司的可溶性fms样酪氨酸激酶-1检测试剂盒(电化学发光法)的浓度测定结果进行分析对比,临床相关性结果如图3所示,其中可溶性fms样酪氨酸激酶-1临床相关性为 $R^2=0.9757$,说明本发明试剂盒与罗氏试剂盒具有良好的相关性。

[0140] 实施例5sF1t-1化学发光免疫测定试剂盒的对比实验

[0141] 分别用化学发光检测方法和传统的酶联免疫吸附法(R&D Systems, Inc., 货号: DVR100C)对浓度为0pg/mL和15pg/mL的可溶性fms样酪氨酸激酶-1样本进行测试,两种方法检测灵敏度相比,数据如下表5-1所示:

[0142] 表5-1

[0143]

测试次数	化学发光检测 (RLU)	酶联免疫吸附法 (OD)
1	747	0.033
2	717	0.035
3	752	0.044
4	707	0.057
5	757	0.024
6	797	0.044
7	675	0.032
8	705	0.035
9	760	0.042
10	675	0.033
11	733	0.049
12	708	0.053
13	707	0.046
14	741	0.053
15	687	0.036
16	720	0.036
17	700	0.044
18	665	0.042
19	649	0.038
20	674	0.034

[0144]	Mean	724	0.040	
	SD	57	0.008	
	M+2*SD	837	0.057	
	15pg/mL	1	1888	0.077
		2	1869	0.073
		3	1889	0.072
		Mean	1882	0.074
灵敏度 (pg/mL)	0.97	7.47		

[0145] 由上表可以看出,化学发光检测方法的灵敏度较酶联免疫吸附法提高约8倍。

[0146] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

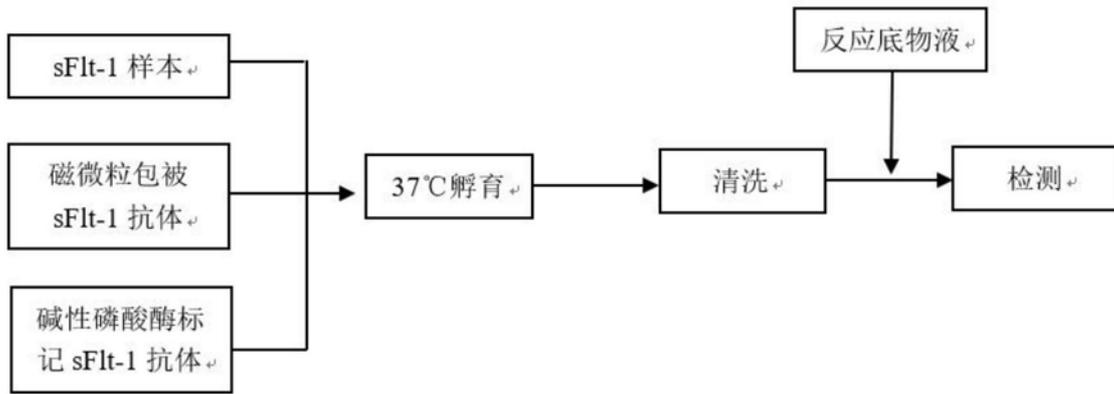


图1

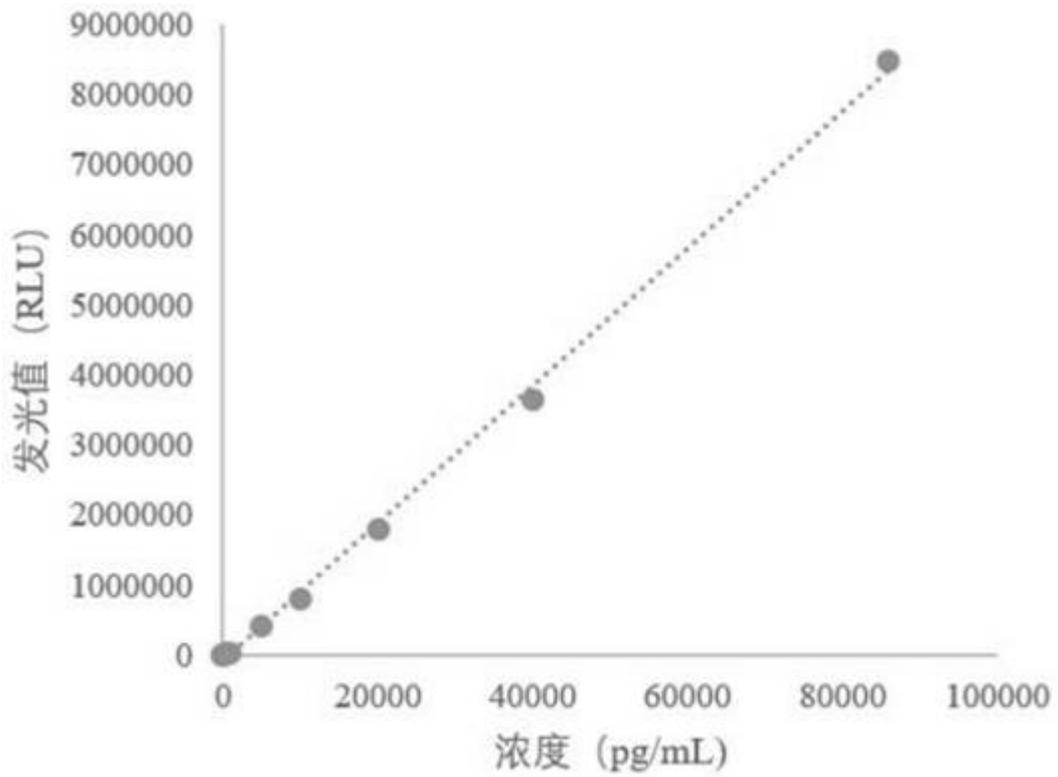


图2

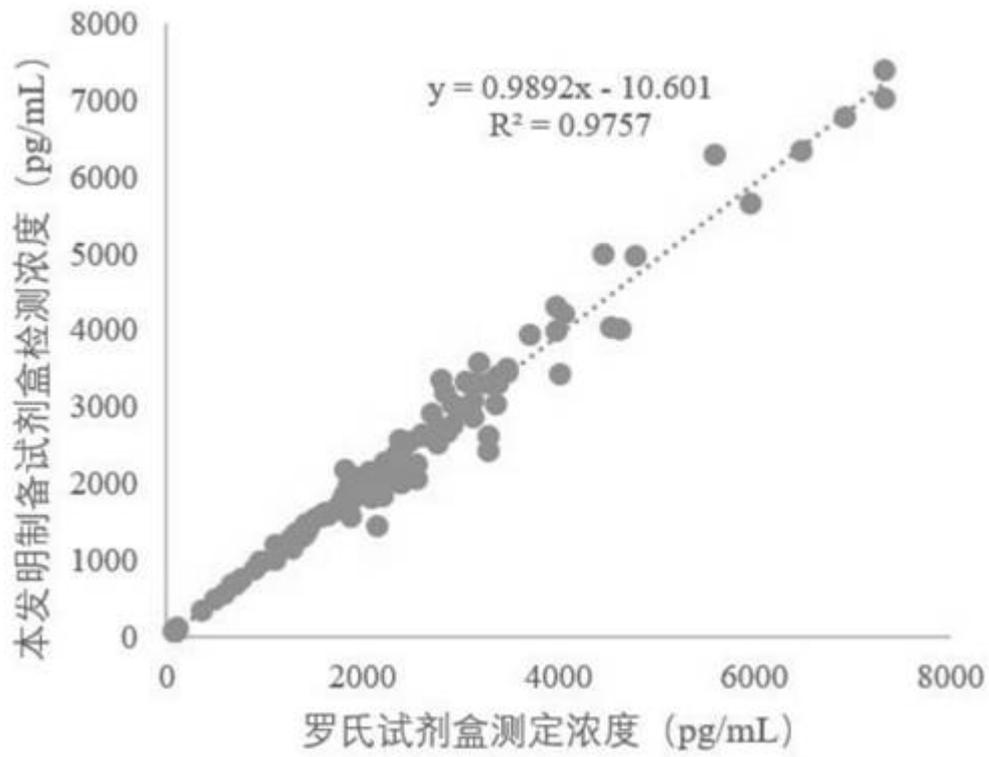


图3