



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101819207 B

(45) 授权公告日 2013. 01. 16

(21) 申请号 201010139390. 2

(22) 申请日 2010. 03. 31

(73) 专利权人 浙江伊利康生物技术有限公司

地址 325011 浙江省温州市温州经济开发区  
高科技园区 27 号小区

(72) 发明人 王贤理 蒙凯 蔡其浩

(74) 专利代理机构 杭州九洲专利事务所有限公  
司 33101

代理人 王洪新

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/539 (2006. 01)

G01N 21/31 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101377492 A, 2009. 03. 04,

蒙凯. 纳米微球增强免疫比浊法测

定  $\alpha_1$ -微球蛋白研究. 《中国民族民间医

药》. 2010, (第 6 期),

罗阳等. 尿  $\beta_2$  微球蛋白压电传感器阵列的  
构建与临床应用. 《中华医院感染学杂志》. 2008,  
第 18 卷 (第 3 期),

汪芝满. 血清  $\beta_2$ -微球蛋白的免疫比浊  
法. 《国际检验医学杂志》. 1991, 第 12 卷 (第 1  
期),

审查员 李煦颖

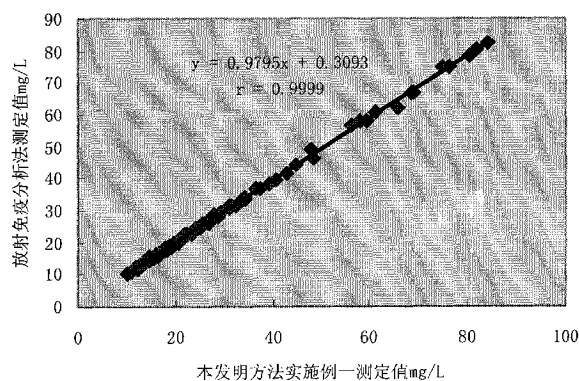
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种纳米微球免疫比浊法检测  $\alpha_1$ -微球蛋白  
的试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种测定血清中的  $\alpha_1$ -微球蛋白的试剂盒。所要解决的技术问题是提供的试剂应具有样本无需稀释、操作简单、准确度高、重复性好,适用于各种类型的全自动生化分析仪的特点。技术方案是:一种纳米微球免疫比浊法检测  $\alpha_1$ -微球蛋白的试剂盒,包括:a、试剂 R<sub>1</sub>:缓冲液、稳定剂、电解质、表面活性剂以及适量防腐剂;b、试剂 R<sub>2</sub>:缓冲液、抗人  $\alpha_1$ -MG 抗体多克隆抗体和纳米微球、适量防腐剂;c、参考校准品:缓冲液、稳定剂、适量防腐剂以及根据浓度需要确定量的重组  $\alpha_1$ -微球蛋白纯品。



1. 一种纳米微球免疫比浊法检测  $\alpha_1$ -微球蛋白的试剂盒,包括试剂  $R_1$ 、试剂  $R_2$  以及参考校准品,其中:

a、试剂  $R_1$ :一种使样本中  $\alpha_1$ -微球蛋白抗原位点充分暴露,有利于与抗  $\alpha_1$ -微球蛋白抗体试剂充分结合的  $\alpha_1$ -微球蛋白溶液,包括 5-200mmol/L 三羟甲基氨基甲烷、0.5-5mmol/L 的乙二胺四乙酸二钠、50-200mmol/L NaCl、0.1-4mmol/L 吐温-20、3-10mmol/L PEG-6000 以及适量广谱杀菌剂,其余为纯化水;

b、试剂  $R_2$ :一种结合有抗人  $\alpha_1$ -微球蛋白抗体的纳米微球溶液,包括 5-200mmol/L 的三羟甲基氨基甲烷、重量比例 0.1%-5% 的抗人  $\alpha_1$ -微球蛋白抗体多克隆抗体和纳米微球,并加入适量防腐剂,纳米微球直径为 50-150nm;

c、参考校准品:一种用来与样本比较,进行结果计算的  $\alpha_1$ -微球蛋白溶液,包括:100-200mmol/L pH 7.0 的 CAPSO、171-180mmol/L 的稳定剂、适量广谱杀菌剂以及根据浓度需要确定量的重组  $\alpha_1$ -微球蛋白纯品,其余为纯化水;所述稳定剂是乙二胺四乙酸二钠、牛血清白蛋白以及氯化钠中的一种或多种的混合。

2. 权利要求 1 所述的一种纳米微球免疫比浊法检测  $\alpha_1$ -微球蛋白的试剂盒,其中的结合有抗人  $\alpha_1$ -微球蛋白抗体的纳米微球溶液制备方法是:用三羟甲基氨基甲烷缓冲液在室温下稀释重量比例为 1:1 的抗人  $\alpha_1$ -微球蛋白抗体多克隆抗体和纳米微球,将两者混匀后室温振荡吸附 2 小时,加入含 0.1%BSA 缓冲液封闭 1 小时,离心去上清,用三羟甲基氨基甲烷缓冲液稀释至浓度为 0.3%,并加入防腐剂。

## 一种纳米微球免疫比浊法检测 $\alpha_1$ -微球蛋白的试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于测定血清成份的试剂盒,特别是测定血清中的  $\alpha_1$ -微球蛋白( $\alpha_1$ -MG)的试剂盒,可广泛应用在医学及生物化学技术领域。

### 背景技术

[0002]  $\alpha_1$ -微球蛋白( $\alpha_1$ -MG)主要在肝脏和淋巴细胞组织中合成,广泛分布于体液及淋巴细胞膜表面的一种糖蛋白,分子质量 27KD,在血液中  $\alpha_1$ -微球蛋白有游离和与 IgA 结合等等种形式;正常情况下,血液中游离  $\alpha_1$ -微球蛋白可自由通过肾小球滤过,并在近曲小管被重吸收,因此尿中含量极微。而结合 IgA 的  $\alpha_1$ -微球蛋白则不能通过肾小球滤过。由于  $\alpha_1$ -微球蛋白的产生量恒定,较少受肾外因素影响,因此测定  $\alpha_1$ -微球蛋白浓度对肾功能损伤具有早期诊断意义。

[0003] 已知测定  $\alpha_1$ -微球蛋白( $\alpha_1$ -MG)的方法有免疫扩散法、免疫电泳法、放射免疫分析法、酶联免疫法(ELISA 法),这些方法存在着操作繁琐,需要特殊的设备,样本需要预处理,不能进行批量样本分析和不能直接上全自动生化分析仪检测等缺点。

### 发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是克服上述背景技术的不足,提供一种  $\alpha_1$ -微球蛋白检测试剂的改进,所提供的试剂应具有样本无需稀释、操作简单、准确度高、重复性好,适用于各种类型的全自动生化分析仪的特点。

[0005] 本发明提供的技术方案是:

[0006] 一种纳米微球免疫比浊法检测  $\alpha_1$ -微球蛋白的试剂盒,包括试剂  $R_1$ 、试剂  $R_2$  以及参考校准品,其中:

[0007] a、试剂  $R_1$ :一种使样本中  $\alpha_1$ -微球蛋白抗原位点充分暴露,有利于与抗  $\alpha_1$ -微球蛋白抗体试剂充分结合的  $\alpha_1$ -微球蛋白溶液,包括 5-200mmol/L 缓冲液、0.5-5mmol/L 的稳定剂、50-200mmol/L 电解质、0.1-4mmol/L 表面活性剂以及适量防腐剂,其余为纯化水;

[0008] b、试剂  $R_2$ :一种结合有抗人  $\alpha_1$ -微球蛋白抗体的纳米微球溶液,包括 5-200mmol/L 的缓冲液、重量比例 0.1%-5% 的抗人  $\alpha_1$ -MG 抗体多克隆抗体和纳米微球、并加入适量防腐剂,纳米微球直径为 50-150nm;

[0009] c、参考校准品:一种用来与样本比较,进行结果计算的  $\alpha_1$ -微球蛋白溶液,包括:100-200mmol/L pH7.0 的缓冲液、171-180mmol/L 的稳定剂、适量防腐剂以及根据浓度需要确定量的重组  $\alpha_1$ -微球蛋白纯品,其余为纯化水。

[0010]  $\alpha_1$ -微球蛋白参考校准品的浓度可以是高浓度单点参考校准品,在使用时用生理盐水稀释成多个不同浓度的参考校准品;也可以直接制备成多个不同浓度的参考校准品;这里没有特别的限制,只要制得的  $\alpha_1$ -MG 参考校准品能与样本比较,能够测定样本中  $\alpha_1$ -MG 的含量即可。

[0011] 所述  $\alpha_1$ -微球蛋白试剂溶液中还加入反应促进剂 PEG-6000,浓度为 3-10mmol/L。

[0012] 所述结合有抗人  $\alpha_1$ -微球蛋白抗体的纳米微球溶液的制备方法是：用缓冲液在室温下稀释重量比例为 1 : 1 的抗人  $\alpha_1$ -MG 抗体多克隆抗体和纳米微球，将两者混匀后室温振荡吸附 2 小时，加入含 0.1% BSA 的缓冲液封闭 1 小时，离心去上清，再用缓冲液稀释至浓度为 0.3%，并加入适当防腐剂。

[0013] 抗人  $\alpha_1$ -MG 抗体多克隆抗体和纳米微球包括羊抗人  $\alpha_1$ -MG 抗体多克隆抗体或兔抗人  $\alpha_1$ -MG 抗体多克隆抗体或鼠抗人  $\alpha_1$ -MG 抗体多克隆抗体。

[0014] 所述稳定剂是乙二胺四乙酸二钠、牛血清白蛋白以及氯化钠中的一种或多种的混合。

[0015] 所述缓冲液是三羟甲基氨基甲烷或 CAPSO。

[0016] 所述防腐剂是广谱杀菌剂。

[0017] 本发明检测试剂盒及标准所需主要原料是：

[0018] 1、羊抗人  $\alpha_1$ -MG 抗体多克隆抗体或兔抗人  $\alpha_1$ -MG 抗体多克隆抗体或鼠抗人  $\alpha_1$ -MG 抗体多克隆抗体，可外购或由浙江伊利康生物技术研发中心按常规方法制备；该抗体仅与人  $\alpha_1$ -微球蛋白反应，与其它抗原无免疫交叉反应，效价能够满足本试剂要求。

[0019] 2、纳米微球，市场上有许多商品化的纳米微球可供选择，包括美国 Sigma 公司、德国默克公司、日本 UNF 公司；可选择多种直径的纳米微球，本发明采用了直径为 80 ~ 120nm 的微球，相应的试剂检测主波长为 600nm。

[0020] 3、重组  $\alpha_1$ -微球蛋白纯品（外购，或由浙江伊利康生物技术研发中心制备），用于制备本试剂所需参考校准品。

[0021] 其余生化原料均可外购。

[0022] 试剂 R2 中纳米微球与抗人  $\alpha_1$ -微球蛋白抗体的结合可以采用物理吸附法或化学交联法制备，优选物理吸附法。

[0023] 所述参考校准品中添加的重组人  $\alpha_1$ -微球蛋白纯品，采用人血清或动物血清或其它类似血清基质的液体。

[0024] 本发明的检测原理是：利用抗原抗体反应，试剂 R1 作为样本稀释液加入，解除样本中抗原周围的电子层和水化层，使抗原位点充分暴露，然后加入试剂 R2（抗人  $\alpha_1$ -MG 抗体的纳米微球溶液）； $\alpha_1$ -MG 抗体的纳米微球与样本中相应的  $\alpha_1$ -MG 抗原反应，形成不溶性的抗原-抗体复合物，产生一定的浊度，其浊度高低与样本中的  $\alpha_1$ -MG 含量成正比；在规定波长下测定该不溶性抗原-抗体复合物的吸光度值，与已知浓度的  $\alpha_1$ -MG 参考校准品进行比较，则可计算出样本中  $\alpha_1$ -MG 的含量。

[0025] 本发明提供的试剂操作简单、样本不用预稀释，采用重组人  $\alpha_1$ -微球蛋白纯品的人血清或其它类似血清基质的  $\alpha_1$ -微球蛋白参考校准品与样本比较，进行结果计算。本试剂为液体双试剂，具有特异性好，灵敏度高，准确性好及抗干扰能力强等优点，可用于检测体液中  $\alpha_1$ -微球蛋白的浓度，适用于临床全自动生化分析仪。

#### 附图说明

[0026] 图 1 是用实施例 1 进行检测所得  $\alpha_1$ -MG 的测定值与通过放射免疫分析法所得的  $\alpha_1$ -MG 测得值的相互关系示意图。

[0027] 图 2 是用实施例 2 进行检测所得  $\alpha_1$ -MG 的测定值与通过放射免疫分析法所得的

$\alpha_1$ -MG 测得值的相互关系示意图。

[0028] 图 3 是用实施例 3 进行检测所得  $\alpha_1$ -MG 的测定值与通过放射免疫分析法所得的  $\alpha_1$ -MG 测得值的相互关系示意图。

### 具体实施方式

[0029]  $\alpha_1$ -MG 检测试剂的制备实施例：

[0030] 实施例一

[0031] 1、 $\alpha_1$ -MG 溶液（试剂  $R_1$ ）

[0032] 三羟甲基氨基甲烷（缓冲液） 50mmol/L

[0033] 吐温 -20（表面活性剂） 0.5mmol/L

[0034] NaCl（电解质） 100mmol/L

[0035] PEG-6000（反应促进剂） 4mmol/L

[0036] 广谱杀菌剂（防腐剂） 3mmol/L

[0037] 乙二胺四乙酸二钠（稳定剂） 5mmol/L

[0038] 其余为纯化水

[0039] 2、抗人  $\alpha_1$ -MG 抗体溶液（试剂  $R_2$ ）

[0040] 用 100mmol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲液（pH 7.0）在室温下稀释羊抗人  $\alpha_1$ -MG 抗体多克隆抗体和 150nm 纳米微球（抗体和微球的重量比例为 1 : 1），将两者混匀后室温振荡吸附 2 小时（即本领域技术人员已公知的物理吸附法），加入含 0.1% BSA 的三羟甲基氨基四烷缓冲液封闭 1 小时，离心去上清，用 100mmol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲液稀释至浓度为 0.3%，并加入防腐剂；获得  $\alpha_1$ -微球蛋白检测试剂盒试剂（ $R_2$ ）。

[0041] 3、血清型  $\alpha_1$ -MG 溶液（参考校准品）

[0042] CAPSO（缓冲液） 100mmol/L

[0043] 广谱杀菌剂（防腐剂） 2mmol/L

[0044] 乙二胺四乙酸二钠（稳定剂） 2mmol/L

[0045] 牛血清白蛋白（稳定剂） 3mmol/L

[0046] 氯化钠（稳定剂） 166mmol/L

[0047] 其余为纯化水

[0048] 按照需要的  $\alpha_1$ -MG 参考校准品浓度将相应的重组  $\alpha_1$ -微球蛋白纯品 90mg/L 加入上述缓冲液中，制备得 90mg/L 浓度的  $\alpha_1$ -微球蛋白参考校准品。

[0049] 采用本实施例试剂进行具体检测，所得  $\alpha_1$ -MG 的测定值与通过放射免疫分析法所得的  $\alpha_1$ -MG 测得值进行比较（参见图 1，并进行回归分析），相关性  $r = 0.9999$  ( $y = 0.9795x + 0.3093$ )；显示出本实施例与放射免疫分析法具有良好的相关性。

[0050] 实施例二

[0051] 1、 $\alpha_1$ -MG 溶液（试剂  $R_1$ ）

[0052] 三羟甲基氨基甲烷（缓冲液） 100mmol/L

[0053] 吐温 -20（表面活性剂） 4mmol/L

[0054] NaCl（电解质） 60mmol/L

[0055] PEG-6000（反应促进剂） 8mmol/L

- [0056] 广谱杀菌剂（防腐剂） 0.1mmol/L  
[0057] 乙二胺四乙酸二钠（稳定剂） 0.5mmol/L  
[0058] 其余为纯化水

[0059] 2、抗人  $\alpha_1$ -MG 抗体溶液（试剂 R<sub>2</sub>）

[0060] 用 150mmol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲液（pH7.4）在室温下稀释羊抗人  $\alpha_1$ -MG 抗体多克隆抗体和 50nm 纳米微球（抗体和微球的重量比例为 1 : 1），将两者混匀后室温振荡吸附 2 小时（即本领域技术人员已公知的物理吸附法），加入含 0.1% BSA 的三羟甲基氨基四烷缓冲液封闭 1 小时，离心去上清，用 100mmol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲液稀释至浓度为 4%，并加入适当的本领域技术人员已知的防腐剂。获得  $\alpha_1$ -微球蛋白检测试剂盒试剂 2(R<sub>2</sub>)。

[0061] 3、血清型  $\alpha_1$ -MG 溶液（参考校准品）

- [0062] CAPSO（缓冲液） 100mmol/L  
[0063] 乙二胺四乙酸二钠（稳定剂） 3mmol/L  
[0064] 牛血清白蛋白（稳定剂） 3mmol/L  
[0065] 氯化钠（稳定剂） 166mmol/L  
[0066] 广谱杀菌剂（防腐剂） 5mmol/L

[0067] 其余为纯化水

[0068] 按照需要的  $\alpha_1$ -MG 参考校准品浓度将相应的重组  $\alpha_1$ -微球蛋白纯品 80mg/L 加入上述缓冲液中，制备得 80mg/L 浓度的  $\alpha_1$ -微球蛋白参考校准品。

[0069] 采用本实施例试剂进行具体检测，所得  $\alpha_1$ -MG 的测定值与通过放射免疫分析法所得的  $\alpha_1$ -MG 测得值进行比较（参见图 2，并进行回归分析），相关性  $r = 0.9992$  ( $y = 1.0106X - 0.4244$ )；显示出本实施例与放射免疫分析法具有良好的相关性。

[0070] 实施例三

[0071] 1、 $\alpha_1$ -MG 溶液（试剂 R<sub>1</sub>）

- [0072] 三羟甲基氨基甲烷（缓冲液） 200mmol/L  
[0073] 吐温-20（表面活性剂） 2mmol/L  
[0074] NaCl（电解质） 200mmol/L  
[0075] PEG-6000（反应促进剂） 5mmol/L  
[0076] 广谱杀菌剂（防腐剂） 3mmol/L  
[0077] 乙二胺四乙酸二钠（稳定剂） 2mmol/L

[0078] 其余为纯化水

[0079] 2、抗人  $\alpha_1$ -MG 抗体溶液（试剂 R<sub>2</sub>）

[0080] 用 200mmol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲液（pH 7.4）在室温下稀释羊抗人  $\alpha_1$ -MG 抗体多克隆抗体和 100nm 纳米微球（抗体和微球的重量比例为 1 : 1），将两者混匀后室温振荡吸附 2 小时（即本领域技术人员已公知的物理吸附法），加入含 0.1% BSA 的三羟甲基氨基四烷缓冲液封闭 1 小时，离心去上清，用 100mmol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲液稀释至浓度为 2%，并加入适当的本领域技术人员已知的防腐剂。获得  $\alpha_1$ -微球蛋白检测试剂盒试剂 2(R<sub>2</sub>)。

[0081] 3、血清型  $\alpha_1$ -MG 溶液（参考校准品）

- [0082] CAPSO (缓冲液) 200mmol/L  
 [0083] 乙二胺四乙酸二钠 (稳定剂) 0.5mmol/L  
 [0084] 牛血清白蛋白 (稳定剂) 5mmol/L  
 [0085] 氯化钠 (稳定剂) 166mmol/L  
 [0086] 广谱杀菌剂 (防腐剂) 2mmol/L  
 [0087] 其余为纯化水

[0088] 按照需要的  $\alpha$  1-MG 参考校准品浓度将相应的重组  $\alpha$  1-微球蛋白纯品 100mg/L 加入上述缓冲液中,制备得 100mg/L 浓度的  $\alpha$  1-微球蛋白参考校准品。

[0089] 采用本实施例试剂进行具体检测,所得  $\alpha$  1-MG 的测定值与通过放射免疫分析法所得的  $\alpha$  1-MG 测得值进行比较 (参见图 3,并进行回归分析);相关性  $r = 0.9994$  ( $y = 1.0017x - 0.1985$ );显示出本实施例与放射免疫分析法具有良好的相关性。

[0090] 本发明的测定条件及步骤:

[0091]

| 加入物                                                                                 | 空白管 (B) | 校准管/样品管 (S/T) |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------------|
| 蒸馏水 ( $\mu$ l)                                                                      | 2       | —             |
| 校准液/样品 ( $\mu$ l)                                                                   | —       | 2             |
| R1 ( $\mu$ l)                                                                       | 240     | 240           |
| 混匀, 37℃ 孵育 5 分钟;                                                                    |         |               |
| R2 ( $\mu$ l)                                                                       | 60      | 60            |
| 混匀, 37℃ 孵育 10 秒, 读取吸光度 A1, 再置 37℃ 孵育 5 分钟, 在 600nm 读取各管吸光度 A2; $\Delta A = A2 - A1$ |         |               |

[0093] 结果的计算:

[0094] 
$$\alpha 1\text{-MG (mg/L)} = CS \times \frac{\Delta A_T}{\Delta A_S} \quad (\text{mg/L})$$

[0095] 式中:

[0096]  $\Delta A_T$  待测样品平均每分钟吸光度变化值

[0097]  $\Delta A_S$  校准液平均每分钟吸光度变化值

[0098] CS 校准液中  $\alpha$  1-MG 的浓度

[0099] 尚需补充的是:本文中凡未特别标明的比例均为重量比。

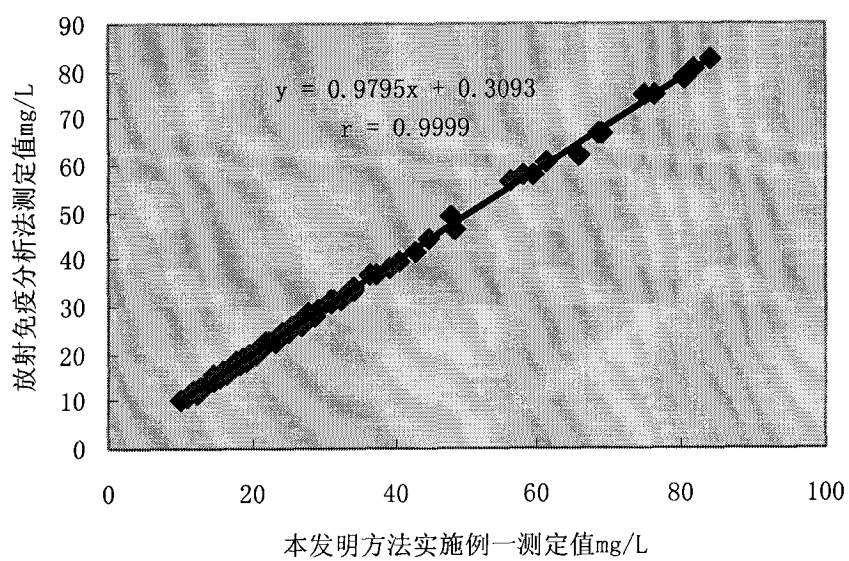


图 1

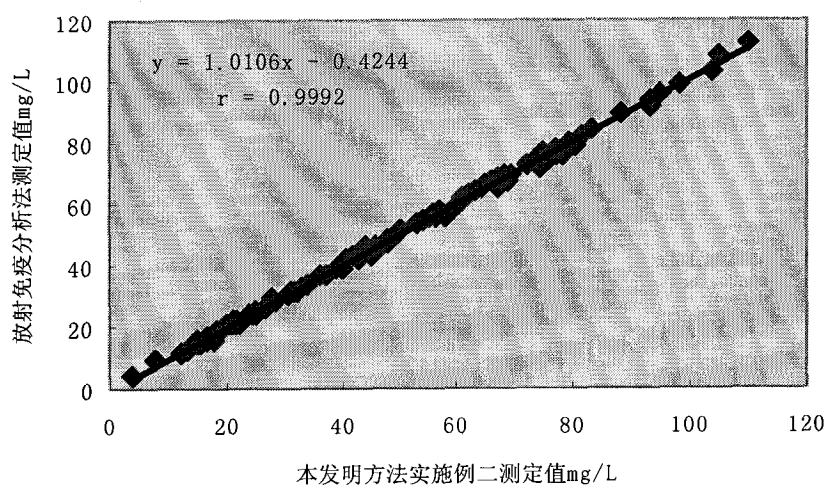


图 2

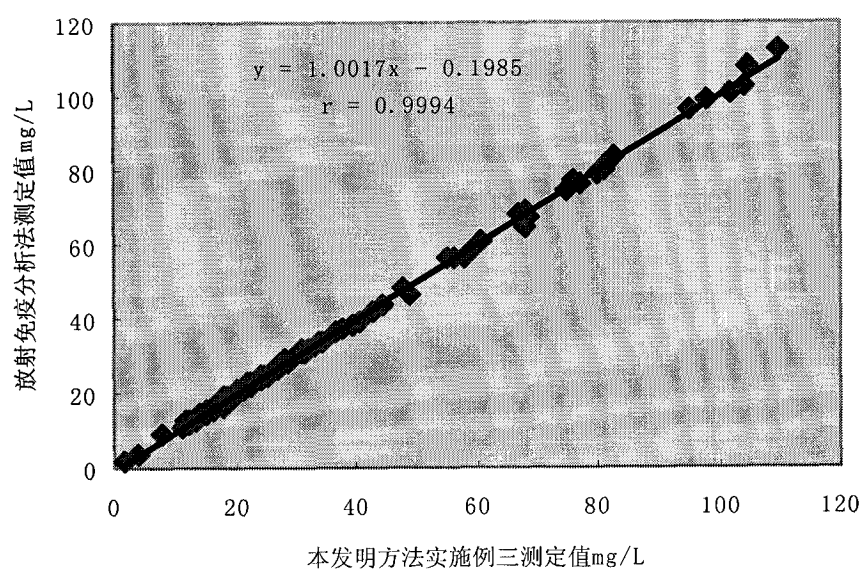


图 3

|                |                                                |         |            |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种纳米微球免疫比浊法检测α1-微球蛋白的试剂盒                       |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN101819207B</a>                   | 公开(公告)日 | 2013-01-16 |
| 申请号            | CN201010139390.2                               | 申请日     | 2010-03-31 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 浙江伊利康生物技术有限公司                                  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 浙江伊利康生物技术有限公司                                  |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 浙江伊利康生物技术有限公司                                  |         |            |
| [标]发明人         | 王贤理<br>蒙凯<br>蔡其浩                               |         |            |
| 发明人            | 王贤理<br>蒙凯<br>蔡其浩                               |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/68 G01N33/531 G01N33/539 G01N21/31      |         |            |
| 代理人(译)         | 王洪新                                            |         |            |
| 其他公开文献         | CN101819207A                                   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

# 摘要(译)

本发明涉及一种测定血清中的α1-微球蛋白的试剂盒。所要解决的技术问题是提供的试剂应具有样本无需稀释、操作简单、准确度高、重复性好，适用于各种类型的全自动生化分析仪的特点。技术方案是：一种纳米微球免疫比浊法检测α1-微球蛋白的试剂盒，包括：a、试剂R1：缓冲液、稳定剂、电解质、表面活性剂以及适量防腐剂；b、试剂R2：缓冲液、抗人α1-MG抗体多克隆抗体和纳米微球、适量防腐剂；c、参考校准品：缓冲液、稳定剂、适量防腐剂以及根据浓度需要确定量的重组α1-微球蛋白纯品。

