



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105223348 A

(43) 申请公布日 2016.01.06

(21) 申请号 201410223824.5

(22) 申请日 2014.05.26

(71) 申请人 北京九强生物技术股份有限公司
地址 100083 北京市海淀区花园东路15号
旷怡大厦5层

(72) 发明人 王恒强 高爱民 刘希

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

权利要求书3页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

人抗凝血酶 III 的胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种人抗凝血酶 III 的胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒。本发明提供的试剂盒包括第一试剂、第二试剂和校准品,其中第一试剂包含电解质、促凝剂、稳定剂、表面活性剂、防腐剂及缓冲液;第二试剂包含抗人抗凝血酶 III 的多克隆抗体包被的胶乳颗粒、稳定剂、表面活性剂、防腐剂及缓冲液;校准品包含防腐剂、电解质、稳定剂、抗凝血酶 III 及缓冲液。本试剂盒特异性强、灵敏度高、均一稳定、快速简便,可用于普通的生化分析仪器。

1. 一种人抗凝血酶 III 的胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒,其包含第一试剂和第二试剂,其中:

第一试剂包含稳定剂、表面活性剂、防腐剂、电解质、促凝剂及缓冲液;

第二试剂包含稳定剂、表面活性剂、防腐剂、电解质、包被有抗人抗凝血酶 III 多克隆抗体的胶乳颗粒、及缓冲液。

2. 根据权利要求 1 所述的人抗凝血酶 III 的胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒,还包含校准品,

所述校准品包含防腐剂、电解质、稳定剂、人抗凝血酶 III 及缓冲液。

3. 根据权利要求 1 所述的人抗凝血酶 III 的胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒,其中:抗人抗凝血酶 III 多克隆抗体源自哺乳动物的 IgG 抗体,优选羊 IgG 抗体或兔 IgG 抗体。

4. 根据权利要求 1 所述的人抗凝血酶 III 的胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒,其中:胶乳颗粒的直径范围为 50 至 250nm、优选 100 至 200nm、更优选 150nm;

胶乳颗粒的浓度为 0.5 至 5mg/mL;

胶乳颗粒为聚苯乙烯胶乳颗粒。

5. 根据权利要求 1 所述的人抗凝血酶 III 的胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒,其中:胶乳颗粒表面修饰有官能团,官能团选自羧基、氨基、羟基、酰肼、氯甲基中的一种,优选羧基。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的人抗凝血酶 III 的胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒,其中:

电解质选自氯化钠、氯化钾、氯化镁、硫酸镁中的一种或几种,优选氯化钠;

电解质浓度在质量百分比 0.1 至 5.0% 之间。

7. 根据权利要求 1 或 2 所述的人抗凝血酶 III 的胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒,其中:

所述稳定剂选自牛血清白蛋白、酪蛋白、鱼皮明胶蛋白、葡萄糖、果糖、甘露糖、壳聚糖、山梨醇、乙二胺四乙酸二钠中的一种或几种;

稳定剂浓度为质量百分比 0.1 至 1%。

8. 根据权利要求 1 所述的人抗凝血酶 III 的胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒,其中:所述促凝剂选自 PEG-4000、PEG-6000、PEG-8000、硫酸葡聚糖钠中的一种,优选 PEG-6000;

促凝剂浓度在质量百分比 2 至 4% 之间。

9. 根据权利要求 1 所述的人抗凝血酶 III 的胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒,其中:所述表面活性剂选自吐温、脂肪醇聚乙二醇醚、聚氧乙烯苯基醚、聚氧乙烯月桂醚中的一种或几种,优选吐温;

表面活性剂浓度在质量百分比 0.1 至 1.0% 之间。

10. 根据权利要求 2 所述的人抗凝血酶 III 的胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒,其中:抗凝血酶 III 在校准品中的含量在 0 至 1000ng/ml 之间。

11. 根据权利要求 2 所述的人抗凝血酶 III 的胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒,其中:抗凝血酶 III 源自人体体液;纯度 $\geq 95\%$ 。

12. 一种人抗凝血酶 III 的胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒,其包含第一试剂、第二试剂和校准品,其中:

第一试剂包含:

稳定剂	质量百分比 0.1 至 1%、
表面活性剂	质量百分比 0.1 至 1.0%、
防腐剂	质量百分比 0.05 至 0.1%、
电解质	质量百分比 0.1 至 5.0%、
促凝剂	质量百分比 2 至 4%、以及
缓冲液	10 至 100 mmol/L, pH 7 至 9;

第二试剂包含:

稳定剂	质量百分比 0.1 至 1%、
表面活性剂	质量百分比 0.1%至 1.0%、
防腐剂	质量百分比 0.05 至 0.1%、
电解质	质量百分比 0.1 至 5.0%、
缓冲液	10 至 100 mmol/L, pH7 至 9、以及

包被有抗人抗凝血酶 III 多克隆抗体的胶乳颗粒,0.5 至 5mg/mL,优选 1mg/mL;其中抗人抗凝血酶 III 多克隆抗体优选 0.6mg/mL,

其中胶乳颗粒为粒径 150nm 的羧基修饰的聚苯乙烯胶乳;

校准品包含:

稳定剂	质量百分比 0.1 至 1%、
防腐剂	质量百分比 0.01%至 0.1%、
电解质	质量百分比 0.1 至 5.0%、
缓冲液	10 至 100 mmol/L, pH 6.5 至 8.0、
人血清基质、以及	
人抗凝血酶 III	0 至 1000ng/ml。

13. 一种人抗凝血酶 III 的胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒,其包含第一试剂、第二试剂和校准品,其中:

第一试剂包含:

BSA	质量百分比 0.2%、
EDTA	20 mmol/L、
叠氮钠	质量百分比 0.1%、
氯化钠	质量百分比 0.9%、
表面活性剂	质量百分比 0.5%、
PEG-6000	质量百分比 4%、以及
Tris-HCl 缓冲液	50 mmol/L, pH7.2;

第二试剂包含：

BSA	质量百分比 0.8%、
吐温 20	质量百分比 0.1%、
叠氮钠	质量百分比 0.1%、
EDTA	20 mmol/L、
氯化钠	质量百分比 0.9%、
甘氨酸-NaOH 缓冲液	150 mmol/L, pH 8.0、以及

包被有羊抗人抗凝血酶 III 多克隆抗体的胶乳颗粒 1mg/mL, 其中羊抗人抗凝血酶 III 多克隆抗体为 0.6mg/mL,

其中胶乳颗粒为粒径 150nm 的羧基修饰的聚苯乙烯胶乳；

校准品包含：

叠氮钠	质量百分比 0.1%、
氯化钠	质量百分比 0.9%、
BSA	质量百分比 1%、
EDTA	20 mmol/L、
Tris-HCl 缓冲液	50 mmol/L, pH 7.2、
人血清基质、以及	
人抗凝血酶 III	分别为 100、200、500、1000ng/mL。

人抗凝血酶 III 的胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及临床检验领域。具体而言,涉及一种利用胶乳增强免疫比浊方法测定样本中人抗凝血酶 III 含量的试剂盒。

背景技术

[0002] 抗凝血酶 (Antithrombin) 简称 AT,血浆源性 AT 简称为 pAT。pAT 是体内重要的天然抗凝蛋白,属于丝氨酸蛋白酶抑制物家族成员。其血浆浓度约为 100 至 150 $\mu\text{g/ml}$ (2 至 3 $\mu\text{mol/L}$)。pAT 由肝脏及血管内皮细胞产生,是一种维生素 K 依赖的、由 432 个氨基酸组成的分子质量为 58kDa 的单链糖蛋白,含 4 个 N 糖基化寡糖链及 3 个二硫键。根据其 135 位的天门冬酰胺是否含糖基可分为含糖基的 α 异构体及无糖基的 β 异构体。由于 α 异构体 135 位的糖基可以阻止与肝素的结合,故其与肝素的亲和力小于 β 异构体。现还通过转基因绵羊获得了重组抗凝血酶,简称 rAT。Masaaki Hirose 等在中国仓鼠卵巢细胞上表达了 rAT,通过成批发酵使其产量达到 1g/L。纯化的 rAT 具有 pAT 的特异活性,减少了糖基量,增强了与肝素的亲和力。

[0003] 抗凝血酶 III (AT-III) 是作为血液中活性凝血因子的最重要的阻碍因子,它控制着血液的凝固和纤维蛋白的溶解。血液中抗凝血酶 III 的水平根据各种疾病、症状而变化。在弥散性血管内凝血 (DIC)、肝疾患、肾病综合征等中降低。血液中的抗凝血酶 III 水平降低可能会导致肝素治疗效果无法呈现。因此,掌握抗凝血酶 III 的活性作为对于此类疾病的监测、病态分析、预后判定以及肝素治疗或使用抗凝血酶 III 浓缩制剂投药时的指标具有重要意义。

[0004] 抗凝血酶 III 水平增高:可导致出血。可见于先天性凝血因子缺乏,如血友病;后天性凝血因子缺乏,如急性肝炎、肾移植、使用抗凝药物等。

[0005] 抗凝血酶 III 水平减低:可导致血栓形成。可见于先天性抗凝血酶 III 缺乏和功能异常,如肺梗塞、深部静脉血栓等血栓性疾病;后天性减低,如 DIC、慢性肝病、心肌梗塞等。

[0006] 抗凝血酶 III 的检测方法较多,传统的包括免疫火箭电泳法、凝胶空斑法、发色底物法等。其中发色底物方法(参见公开号 CN102690862A)是目前最常用的方法。但是该方法需要特殊仪器,且所需时间较长。由于抗凝血酶 III 在人体内减少时具有重要的临床意义,因此开发出一种高灵敏度的检测试剂十分有意义。

发明内容

[0007] 根据本发明的一些具体实施方式,提供了一种人抗凝血酶 III 的胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒,其包含第一试剂和第二试剂,其中:

[0008] 第一试剂包含稳定剂、表面活性剂、防腐剂、电解质、促凝剂及缓冲液;

[0009] 第二试剂包含稳定剂、表面活性剂、防腐剂、电解质、包被有抗人抗凝血酶 III 多克隆抗体的胶乳颗粒、及缓冲液。

[0010] 在一些实施方案中,本发明的试剂盒还可以根据需要包括校准品。校准品用于标

准曲线的绘制。因此,校准品可以自行配制、也可以使用任何市售校准品。在一些具体实施方式中,校准品包含防腐剂、电解质、稳定剂、人抗凝血酶 III 及缓冲液。在一些具体实施方式中,抗凝血酶 III 在校准品中的含量在 0 至 1000ng/ml 之间。在一些具体实施方式中,抗凝血酶 III 源自人的体液并且纯度 $\geq 95\%$;例如从人体体液中天然提取并纯化获得。

[0011] 在一些具体实施方式中,校准品包含四个浓度水平的抗凝血酶 III,其中一个浓度水平不含抗凝血酶 III;其余校准品中分别添加有不同含量的抗凝血酶 III。在一些具体实施方式中,校准品包含质量百分比 0.1 至 1% 的稳定剂、质量百分比 0.01% 至 0.1% 的防腐剂、质量百分比 0.1 至 5.0% 的电解质、10 至 100mmol/L 的 pH6.5 至 8.0 的缓冲液、已知浓度的人抗凝血酶 III 以及人血清基质。人血清基质可以合法收集自医疗机构的健康人血清,经灭活之后去除肝炎、HIV 病毒传播风险;也可以是市售人血清基质。

[0012] 在一些实施方案中,抗人抗凝血酶 III 多克隆抗体源自哺乳动物的 IgG 抗体,优选羊 IgG 抗体、或兔 IgG 抗体。

[0013] 在一些实施方案中,胶乳颗粒的直径范围为 50 至 250nm、优选 100 至 200nm、更优选 150nm。在一些实施方案中,胶乳颗粒在试剂中的浓度为 0.5 至 5mg/mL。

[0014] 在一些实施方案中,胶乳颗粒为聚苯乙烯胶乳颗粒。胶乳颗粒表面修饰有官能团,官能团选自羧基、氨基、羟基、酰肼、氯甲基中的一种;优选羧基。通过这些官能团,将抗体连接至胶乳颗粒上。在一些实施方案中,采用化学交联法将抗体包被到胶乳颗粒表面,其中所用的化学交联剂选自:碳二亚胺 (EDAC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、N-羟基硫代琥珀酰亚胺 (Sulfo-NHS)、酰肼、异氰酸酯中的一种或两种;交联缓冲液是不含氨基的缓冲液,选自 MES、MOPSO、MOPS、HEPES、磷酸盐缓冲液中的一种;交联缓冲液的 pH 在 6.0 至 8.0 之间。

[0015] 在一些实施方案中,第一试剂和第二试剂中的电解质选自氯化钠、氯化钾、氯化镁、硫酸镁中的一种或几种;优选氯化钠。电解质在试剂中的浓度在 0.1 至 5.0% 之间。

[0016] 在一些实施方案中,稳定剂选自牛血清白蛋白、酪蛋白、鱼皮明胶蛋白、葡萄糖、果糖、甘露糖、壳聚糖、山梨醇、乙二胺四乙酸二钠中的一种或几种;稳定剂浓度为 0.1 至 1%。

[0017] 在一些实施方案中,所述促凝剂选自 PEG-4000、PEG-6000、PEG-8000、硫酸葡聚糖钠中的一种,优选 PEG-6000;促凝剂浓度在 2 至 4% 之间。

[0018] 在一些实施方案中,表面活性剂选自吐温、脂肪醇聚乙二醇醚、聚氧乙烯苯基醚、聚氧乙烯月桂醚中的一种或几种;优选吐温。表面活性剂浓度在质量百分比 0.1 至 1.0% 之间。

[0019] 本发明提供一种人抗凝血酶 III 的胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒,其包含第一试剂、第二试剂和校准品,其中:

[0020] 第一试剂包含:

[0021]

稳定剂	质量百分比 0.1 至 1%、
表面活性剂	质量百分比 0.1 至 1.0%、
防腐剂	质量百分比 0.05 至 0.1%、
电解质	质量百分比 0.1 至 5.0%、

[0022]

促凝剂	质量百分比 2 至 4%、以及
缓冲液	10 至 100 mmol/L, pH7 至 9;

[0023] 第二试剂包含：

[0024]

稳定剂	质量百分比 0.1 至 1%、
表面活性剂	质量百分比 0.1%至 1.0%、
电解质	质量百分比 0.1 至 5.0%、
防腐剂	质量百分比 0.05 至 0.1%、
缓冲液	10 至 100 mmol/L, pH7 至 9、以及

[0025] 包被有抗人抗凝血酶 III 多克隆抗体的胶乳颗粒, 0.5 至 5mg/mL, 优选 1mg/mL ;其中抗人抗凝血酶 III 多克隆抗体优选 0.6mg/mL,

[0026] 其中胶乳颗粒为粒径 150nm 的羧基修饰聚苯乙烯胶乳；

[0027] 校准品包含：

[0028]

稳定剂	质量百分比 0.1 至 1%、
防腐剂	质量百分比 0.01%至 0.1%、
电解质	质量百分比 0.1 至 5.0%、
缓冲液	10 至 100 mmol/L, pH 6.5 至 8.0、
人抗凝血酶 III	0 至 1000ng/ml、以及
人血清基质。	

[0029] 根据本发明的一个具体实施方案, 提供了一种人抗凝血酶 III 的胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒, 其包含第一试剂、第二试剂和校准品, 其中：

[0030] 第一试剂包含：

[0031]

BSA	质量百分比 0.2%、
EDTA	20 mmol/L、
叠氮钠	质量百分比 0.1%、
氯化钠	质量百分比 0.9%、
表面活性剂	质量百分比 0.5%、
PEG-6000	质量百分比 4%、以及
Tris-HCl 缓冲液	50 mmol/L, pH7.2;

[0032] 第二试剂包含：

[0033]

BSA	质量百分比 0.8%、
吐温 20	质量百分比 0.1%、
叠氮钠	质量百分比 0.1%、
EDTA	20 mmol/L、
氯化钠	质量百分比 0.9%、
甘氨酸-NaOH 缓冲液	150 mmol/L, pH 8.0、以及

[0034] 包被有抗人抗凝血酶 III 多克隆抗体的胶乳颗粒 1mg/mL, 其中羊抗人抗凝血酶 III 多克隆抗体为 0.6mg/mL,

[0035] 其中胶乳颗粒为粒径 150nm 的羧基修饰聚苯乙烯胶乳;

[0036] 校准品包含:

[0037]

叠氮钠	质量百分比 0.1%、
氯化钠	质量百分比 0.9%、
BSA	质量百分比 1%、
EDTA	20 mmol/L、
Tris-HCl 缓冲液	50 mmol/L, pH 7.2、
人血清基质、以及	
人抗凝血酶 III	分别为 100、200、500、1000ng/mL。

[0038] 本发明试剂盒, 采用胶乳增强免疫比浊法定量检测抗凝血酶 III。其原理是: 利用化学交联法将特异性羊抗人抗凝血酶 III 多克隆抗体包被到胶乳粒子表面, 当被测样本中有抗凝血酶 III 抗原时发生抗原抗体免疫反应, 形成抗原-抗体-胶乳颗粒复合物, 保持反应体系中抗体过量时, 形成的复合物可与邻近的胶乳颗粒连接, 最终交织成网状引起反应体系浊度的显著变化, 此时反应体系浊度的变化与被测样本中抗凝血酶 III 的量成正比关系, 测定此浊度在 570nm 波长处的吸光度, 对照校准曲线即可求出样本中抗凝血酶 III 的含量。

[0039] 本发明的试剂盒特异性强、灵敏度高、均一稳定使用简便的特点, 适合产业化, 便于临床推广。

附图说明

[0040] 图 1 为本发明试剂盒的灵敏度。

[0041] 图 2 为本发明试剂盒的线性图。

[0042] ◆均值; ■均值 +2.6SD; ▲均值 -2.6SD。

[0043] 图 3 为本发明试剂盒与发色底物方法试剂盒检测临床样本的相关性比较。

具体实施方式

[0044] 以下实施例是对本发明的说明和进一步解释,而不是对本发明的限制,在本发明的精神和权利保护范围内所做的任何修改,都落入本发明的保护范围内。

[0045] 实施例 1:亲和纯化法制备羊抗人抗凝血酶 III 多克隆抗体

[0046] 具体步骤如下所述:

[0047] (1) 每个免疫实验中使用 8 至 10 只羊,在免疫开始前,收集动物血清。从这些血清中纯化的 IgG 抗体作为对照。

[0048] (2) 将 0.1mg 高度纯化的人抗凝血酶 III 抗原(来自 Fitzgerald)溶解在 pH7.8 的磷酸盐缓冲液中,用弗氏完全佐剂乳化,注射到羊的肌肉中,每 4 周重复注射。在注射起始后 10 周,收集血清,并且通过氯化铵沉淀,初步分离来自血清的 IgG 抗体组分。

[0049] (3) 羊抗人抗凝血酶 III 的多克隆抗体的纯化:

[0050] 制备亲和纯化所用的分离柱:按照产品说明,将 10mg 高度纯化的人抗凝血酶 III 抗原固定在 HITRAP NHS- 活性 HP 柱(来自 Amersham Pharmacia Biotech)上;

[0051] 上样及洗脱:将初步分离的 IgG 组分在磷酸盐缓冲液中稀释至 2mg/mL,将 200mL 的抗体稀释液流过柱子,然后用 50mL 的磷酸盐缓冲液冲洗柱子;再用 35mL pH3.2 的 0.1M 柠檬酸缓冲液洗脱抗体;

[0052] 透析纯化:将上述洗脱的抗体用磷酸盐缓冲液透析,并且使用具有 50000 道尔顿的截留分子量的 Amicon Centircon 离心过滤装置浓缩至 3mg/mL,即为亲和纯化的羊抗人抗凝血酶 III 多克隆抗体。

[0053] 实施例 2:制备 R2 试剂

[0054] (1) 抗体交联到胶乳表面:将 0.5mg 上述制备的多克隆抗体用 5mL 0.1M 磷酸盐缓冲液(pH7.8)稀释后,加入表面修饰羧基、直径 150nm 的聚苯乙烯胶乳溶液(Merck),再加入 5mg EDAC,在 37°C 反应 6 小时,加入 0.5mL 0.1M 的甘氨酸缓冲液(pH8.5)搅拌 1h 终止反应;

[0055] (2) 胶乳清洗:离心去掉上清以清除多余的抗体、交联剂及交联反应的副产物等,底部沉淀即为包被好的胶乳。用 20mL 50mM 的甘氨酸-NaOH 缓冲液洗涤 3 次。

[0056] (3) 胶乳悬浮:将 20mL 150mmol/L pH8.0 的甘氨酸-NaOH 缓冲液(其中添加有 0.9%氯化钠、20mM EDTA、0.8% BSA、0.1%吐温 20、0.1%叠氮钠)加入到上述沉淀,使得胶乳颗粒浓度为 1mg/mL,其中抗体浓度 0.6mg/mL;超声波处理 4min 保证胶乳颗粒处于均一稳定的悬浮状态,获得均一的乳白色胶乳悬浮液,即为 R2 试剂。

[0057] 实施例 3:制备 R1 试剂

[0058] 在 50mM pH7.2 的 Tris-HCl 缓冲液中,添加 0.9%氯化钠、4% PEG-6000、0.2% BSA、20mM EDTA、0.5% Tween-20、0.1%叠氮钠,搅拌均匀并调节 pH 至 8.0,即为 R1 试剂。

[0059] 实施例 4:制备校准品

[0060] 在 pH7.250mM Tris-HCl 缓冲液的预处理人血清基质中,加入浓度分别为 100、200、500、1000ng/mL 的抗凝血酶 III 纯品(Fitzgerald,纯度 \geq 95%),搅拌均匀,作为抗凝血酶 III 多点校准品。预处理的人血清基质中还包含 0.9%氯化钠、1% BSA、50mM EDTA、0.1%叠氮钠。

[0061] 测试例:试剂盒的性能检测

[0062] 测试例 1. 试剂盒用法(以日立 7080 生化分析仪为例):

[0063] 测定波长为 570nm, 首先加入 150 μ L R1 试剂, 37 $^{\circ}$ C 反应 30 秒; 其后加入 10 μ L 校准品, 再反应 60 秒; 其后加入 750 μ L R2 试剂, 测定反应第 10 秒、70 秒的吸光度值 (A1、A2), 计算吸光度差值 $\Delta A = A2 - A1$ 。每管重复测定 2 次。将各校准品管 2 次测得的吸光度差值 ΔA 为纵坐标, 对应的浓度为横坐标, 制作“浓度 - 吸光度差值”校准曲线。取待测样本, 同法测定样本的吸光度差值, 将其代入校准曲线, 即可计算出待测样本中的抗凝血酶 III 含量。

[0064] 测试例 2. 灵敏度检测:

[0065] 以生理盐水为空白样本, 稀释人血清样本, 配制浓度分别为 5、10、20、40、80ng/mL 的样本, 用上述 R1、R2 和校准品组成的试剂盒, 按照 1 所述的方法测定 40 次, 计算均值和标准差 (SD)。以样本浓度 $-2.6SD$ 大于空白 $+2.6SD$ 的样本浓度作为抗凝血酶 III 检测试剂盒的灵敏度 (见图 1)。如下表 1 所示, 本发明试剂盒的灵敏度能达到 10ng/mL。

[0066] 表 1. 本发明试剂盒灵敏度检测

[0067]

	0ng/mL	5ng/mL	10ng/mL	20ng/mL	40ng/mL	80ng/mL
1	2.5	3.4	14.0	22.8	40.4	82.2
2	1.3	7.4	10.0	21.6	41.4	77.2
3	0.8	9.4	11.7	17.7	39.3	78.4
4	3.7	3.3	9.9	20.7	38.5	80.5
5	2.7	6.3	10.8	21.5	40.4	79.2
6	1.5	7.3	9.4	19.8	41.5	78.4
7	2.6	4.4	12.1	20.6	39.5	82.5
8	0.6	5.3	14.4	22.7	40.7	81.5
9	1.6	7.1	9.5	22.5	38.4	77.4
10	1.3	8.3	12.9	21.6	39.3	79.2
均值	1.85	6.20	11.45	21.13	39.94	79.63
SD	0.97	2.06	1.84	1.57	1.11	1.92
均值 +2.6SD	4.38	11.56	16.23	25.22	42.82	84.62
均值 -2.6SD	-0.68	0.83	6.66	17.04	37.05	74.63

[0068] 测试例 3. 线性范围检测:

[0069] 抗凝血酶 III 浓度约 1000ng/mL 的样本,用生理盐水做 100 个不同比例的稀释,按照 1 所述的方法检测各浓度,每个浓度的样本重复测定 3 次,将测定浓度的平均值与理论浓度进行回收率分析,结果均显示偏差小于 40% (见表 2),证明线性能达到 1000ng/mL,见图 2。

[0070] 表 2. 本发明试剂盒线性范围检测

稀释比例	理论浓度 [ng/mL]	测量浓度 [ng/mL]	回收率 [%]
0/100	0.0	0.0	
1/100	10.0	12.4	124.0%
2/100	20.0	23.8	119.0%
3/100	30.0	32.5	108.3%
5/100	50.0	54.3	108.6%
10/100	100.0	102.7	102.7%
20/100	200.0	208.2	104.1%
40/100	400.0	404.5	101.1%
60/100	600.0	618.5	103.1%
80/100	800.0	814.2	101.8%
100/100	1000.0	1012.6	101.3%

[0073] 测试例 4. 本发明试剂盒与发色底物试剂盒检测临床样本的相关性比较

[0074] 用本发明的试剂盒与发色底物试剂盒 (来源于上海太阳生物技术有限公司, CN102690862A, 试剂批号 20130912P)。对 120 例病人样本分别稀释 1000 倍后同时进行检测,检测结果见图 3,以发色底物方法检测的样本抗凝血酶 III 结果为横坐标,以本发明试剂盒检测的抗凝血酶 III 结果为纵坐标作回归分析,相关方程为 $Y = 0.9804X + 8.4869$,相关系数 $R^2 = 0.987$,经过统计学处理结果表明,本发明方法同发色底物试剂盒方法对于临床样本测值的相关性良好。

[0075] 本申请的试剂盒能应用于全自动生化分析仪。对比试剂盒为发色底物法,试剂均为干粉状态,使用时需要复溶,且样本需要经过复杂且繁琐的前处理过程,手工操作,无法在全自动生化分析仪上简便的完成实验。

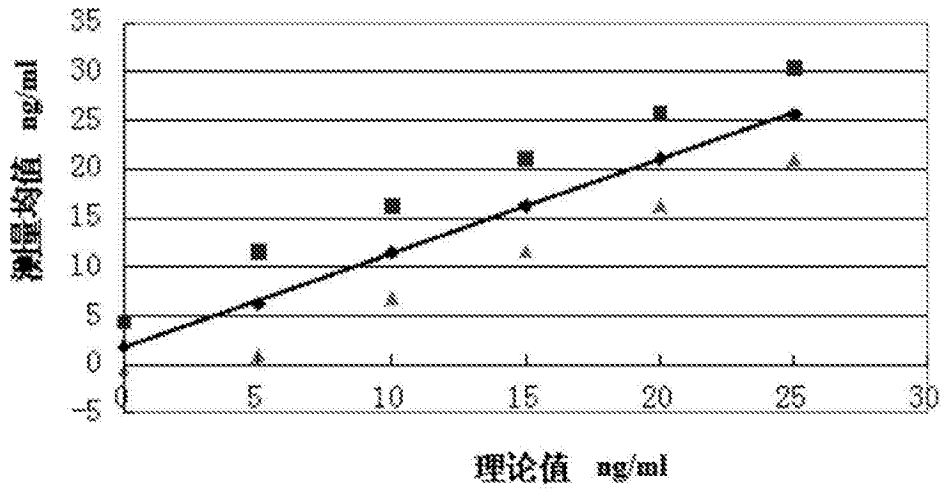


图 1

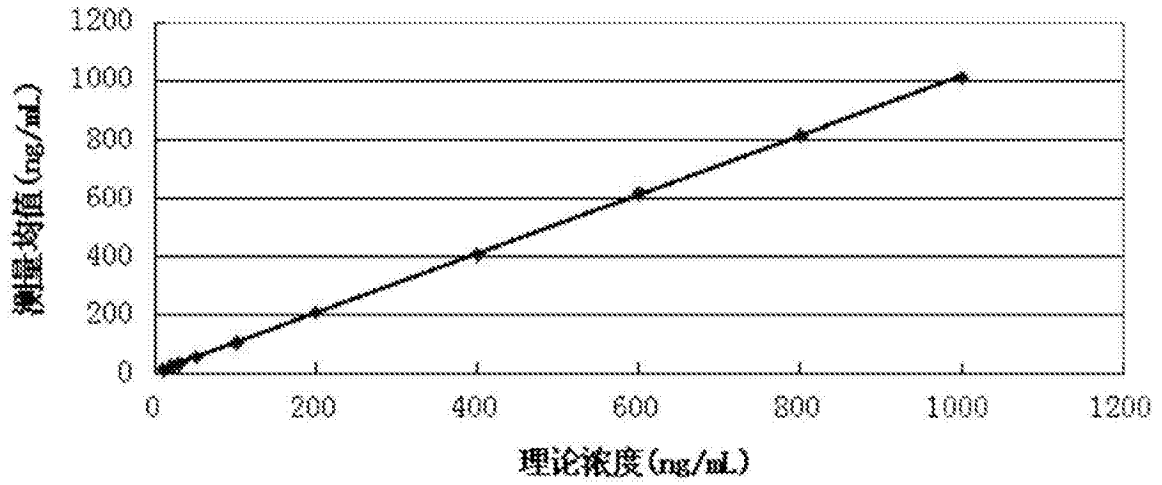


图 2

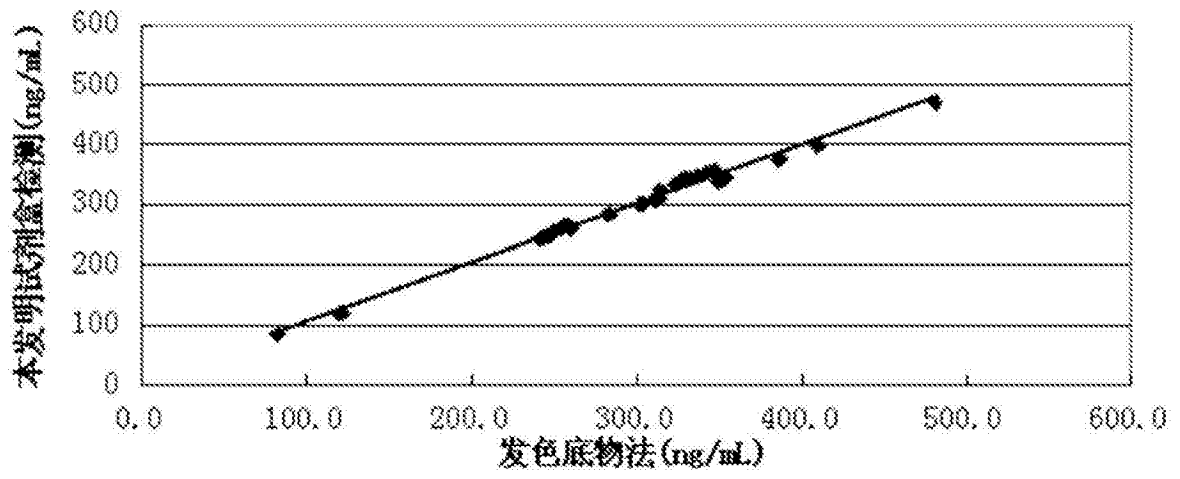


图 3

专利名称(译)	人抗凝血酶III的胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒		
公开(公告)号	CN105223348A	公开(公告)日	2016-01-06
申请号	CN201410223824.5	申请日	2014-05-26
[标]申请(专利权)人(译)	北京九强生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京九强生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京九强生物技术股份有限公司		
[标]发明人	王恒强 高爱民 刘希		
发明人	王恒强 高爱民 刘希		
IPC分类号	G01N33/531 G01N21/31		
代理人(译)	程伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)	稳定剂	质量百分比 0.1 至 1%、
<p>本发明涉及一种人抗凝血酶III的胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒。本发明提供的试剂盒包括第一试剂、第二试剂和校准品，其中第一试剂包含电解质、促凝剂、稳定剂、表面活性剂、防腐剂及缓冲液；第二试剂包含抗人抗凝血酶III的多克隆抗体包被的胶乳颗粒、稳定剂、表面活性剂、防腐剂及缓冲液；校准品包含防腐剂、电解质、稳定剂、抗凝血酶III及缓冲液。本试剂盒特异性强、灵敏度高、均一稳定、快速简便，可用于普通的生化分析仪器。</p>	表面活性剂	质量百分比 0.1 至 1.0%、
	防腐剂	质量百分比 0.05 至 0.1%、
	电解质	质量百分比 0.1 至 5.0%、