(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109596843 B
(45)授权公告日 2019.08.16

(21)申请号 201910070560.7

(22)申请日 2019.01.25

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109596843 A

(43)申请公布日 2019.04.09

(73)专利权人 浙江夸克生物科技有限公司
地址 312500 浙江省绍兴市新昌省级高新技术产业园区(江东路1号)

(72)发明人 林耀文 陈青松

(74)专利代理机构 北京精金石知识产权代理有限公司 11470
代理人 宋秀兰

(51)Int.Cl.
G01N 33/68(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)
G01N 33/544(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)

(56)对比文件
CN 103645323 A,2014.03.19,全文.
CN 105510604 A,2016.04.20,
CN 106568978 A,2017.04.19,

审查员 赵晓明

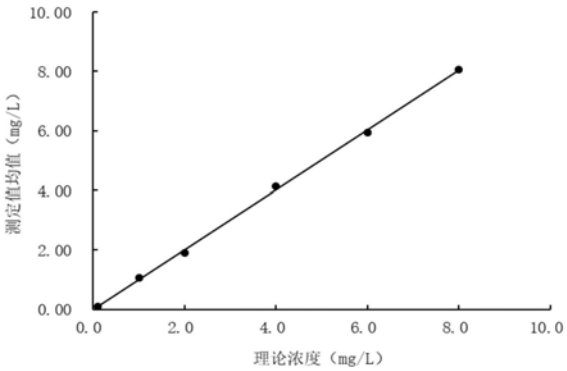
权利要求书1页 说明书11页 附图2页

(54)发明名称

一种血清淀粉样蛋白A的测定试剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种血清淀粉样蛋白A的测定试剂盒,涉及医学生物检测技术领域。该试剂盒包括试剂R1、试剂R2、校准品和质控品,试剂R1包括三羟甲基氨基甲烷、氯化钠、牛血清白蛋白、丙氨酸和蔗糖;试剂R2包括三羟甲基氨基甲烷、抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒、液体生物防腐剂、羧甲基纤维素钠、丙氨酸、蔗糖和月桂基葡糖苷。该试剂盒采用了胶乳免疫比浊技术,可使用全自动生化分析仪同时对大量样本进行检测。线性更好,检测灵敏度、准确度和精密度显著提高,缩短了检测时间,操作简单,经济成本较低。



CN 109596843 B

1.一种血清淀粉样蛋白A的测定试剂盒，其特征在于，所述的试剂盒包括：试剂R1、试剂R2、校准品和质控品；

所述的试剂R1包括：三羟甲基氨基甲烷80-120mmol/L、氯化钠90-110mmol/L、牛血清白蛋白4-6g/L；

所述的试剂R2包括：三羟甲基氨基甲烷80-120mmol/L、抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒400-600mg/L、液体生物防腐剂0.1-0.3mL/L；

所述的校准品包括：淀粉样蛋白A，氯化钠100mmol/L、牛血清白蛋白5g/L、蔗糖6g/L和液体生物防腐剂0.2mL/L；

所述的质控品包括：淀粉样蛋白A 10 mg/L、氯化钠100mmol/L、牛血清白蛋白5g/L、蔗糖6g/L和液体生物防腐剂0.2mL/L；

所述的液体生物防腐剂为Proclin-200、Proclin-300、Proclin500和NaN_3中的一种或多种；

所述的试剂R1还包括丙氨酸1-5g/L和蔗糖5-7g/L；

所述的试剂R2还包括羧甲基纤维素钠0.1-1.0g/L、丙氨酸1-5g/L、蔗糖5-7g/L和月桂基葡糖苷1.2-1.5g/L；

所述的试剂R2中抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒是抗人淀粉样蛋白A抗体包被的甲基丙烯酸缩水甘油酯胶乳颗粒，抗人淀粉样蛋白A抗体与甲基丙烯酸缩水甘油酯胶乳的体积比为1:1-3；

所述的甲基丙烯酸缩水甘油酯胶乳是粒径为50-70nm的甲基丙烯酸缩水甘油酯胶乳和粒径为100-200nm的甲基丙烯酸缩水甘油酯胶乳混合而成，50-70nm的甲基丙烯酸缩水甘油酯胶乳与粒径为100-200nm的甲基丙烯酸缩水甘油酯胶乳的质量比为1:3。

2.根据权利要求1所述的测定试剂盒，其特征在于，所述的试剂R1包括：三羟甲基氨基甲烷100mmol/L、氯化钠100mmol/L、牛血清白蛋白5g/L；

所述的试剂R2包括：三羟甲基氨基甲烷100mmol/L、抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒500mg/L、液体生物防腐剂0.2mL/L；

所述的液体生物防腐剂为Proclin-300。

3.根据权利要求1所述的测定试剂盒，其特征在于，所述的试剂R1还包括丙氨酸3g/L和蔗糖6g/L；

所述的试剂R2还包括羧甲基纤维素钠0.5g/L、丙氨酸3g/L、蔗糖6g/L和月桂基葡糖苷1.3g/L。

4.根据权利要求1所述的测定试剂盒，其特征在于，所述的抗人淀粉样蛋白A抗体与甲基丙烯酸缩水甘油酯胶乳的体积比为1:2。

5.根据权利要求1所述的测定试剂盒，其特征在于，所述的校准品包括淀粉样蛋白A含量分别为0.1mg/L、1.0mg/L、2.0mg/L、4.0mg/L、6.0mg/L、8.0mg/L的六个浓度梯度的标准品。

一种血清淀粉样蛋白A的测定试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及医学生物检测技术领域，具体涉及一种血清淀粉样蛋白A的测定试剂盒。

背景技术

[0002] 血清淀粉样蛋白A(serum amyloid A，SAA)是一种急性时限反应蛋白，属于载脂蛋白家族中的异质类蛋白质，相对分子量约12000。在急性时限反应中，经IL-1、IL-6和TNF刺激，SAA在肝脏中由被激活的巨噬细胞和纤维母细胞合成，可升高到最初浓度的100-1000倍，但半衰期极短，只有50分钟左右。血清淀粉样蛋白A一个特别重要的特性是其降解产物能以淀粉样蛋白A原纤维的方式沉积在不同的器官中，在慢性炎症疾病中这是一种严重的并发症，血清淀粉样蛋白A升高还见于淀粉样变性病、移植排斥反应、冠心病、动脉粥样硬化、糖尿病肾病等。SAA是反应感染性疾病早期炎症的敏感指标，主要用于炎症的诊断、治疗监测及预后评估。

[0003] 在评价炎症、监控其活动及治疗中，SAA与C反应蛋白(CRP)类似。SAA检测在诊断发生病毒感染、肾移植排斥反应的患者(特别是进行免疫抑制治疗的患者)以及肾上腺皮质激素治疗的囊性纤维化患者方面，比C反应蛋白检测更确凿。研究发现，在患关节炎的案例中，血清淀粉样蛋白A与疾病活动性的关系最密切。对于淀粉样蛋白A淀粉样变性患者，以将血清淀粉样蛋白A水平回复至正常为宗旨的治疗，能改善病情。

[0004] 目前，应用于血清SAA检测的方法包括酶联免疫吸附法、放射性免疫检测法、免疫层析法、免疫散射比浊法、胶乳增强免疫比浊法等。酶联免疫吸附法操作繁琐，耗时，自动化水平低；放射性免疫分析法虽然具有特异性强灵敏度高的特点，但也存在潜在放射性污染，因此也逐渐不被接受；胶乳颗粒增强比浊法(particle-enhanced turbidimetric immunoassay，PETIA)是近年来出现的一种较为稳定、准确的体液蛋白均相免疫比浊检测方法。在高分子胶乳微球的表面交联单克隆抗体，当交联有抗体的微球与抗原结合后，在短时间内会迅速聚集在一起，改变了反应液的散光性能或透光性能。反应液透光性能(即吸光度)的改变与被测抗原的浓度有较强的相关性，在一定范围内可以反映被测抗原的浓度。PETIA检测方法是在均相反应体系中进行抗原、抗体反应及结果的测定，抗原、抗体反应后，直接测定反应液的吸光度值，可用于自动化分析，该方法具有较好的敏感度和特异性，操作简单，省时省力。中国专利公布CN108872592A公开了一种胶乳增强免疫比浊法测定血清淀粉样蛋白A检测试剂盒，该试剂盒有R1和R2两种试剂，但没有校准品和质控品，精密度CV在1.23％以上，线性偏差在1.81％以上。中国专利公告CN106053862B公开了一种血清淀粉样蛋白A(SAA)测定试剂盒，也采用了胶乳免疫比浊技术，但所用胶乳颗粒粒径单一，并未公开其准确度、精密度及其线性。目前已知检测血清淀粉样蛋白A的试剂盒较少，方法也存在较大的缺陷，如测定灵敏度不足，操作繁琐，成本昂贵等，均不利于临床推广使用。

[0005] 本发明为了解决现有技术中存在问题，对血清淀粉样蛋白A的检测试剂的组成成分和检测方法等进行了优化，线性更好，提高了测定结果的准确度、精密度和检测灵敏度

等,更有利于临床推广使用。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种血清淀粉样蛋白A的测定试剂盒及其检验方法。克服了现有技术中存在的问题,提高了测定结果的准确度、精密度和检测灵敏度等。

[0007] 本发明一方面提供了一种血清淀粉样蛋白A的测定试剂盒,所述的试剂盒包括:试剂R1、试剂R2、校准品和质控品;

[0008] 所述的试剂R1包括:三羟甲基氨基甲烷80-120mmol/L、氯化钠90-110mmol/L、牛血清白蛋白4-6g/L;

[0009] 所述的试剂R2包括:三羟甲基氨基甲烷80-120mmol/L、抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒400-600mg/L、液体生物防腐剂0.1-0.3mL/L;

[0010] 所述的校准品包括:淀粉样蛋白A,氯化钠100mmol/L、牛血清白蛋白5g/L、蔗糖6g/L和液体生物防腐剂0.2mL/L;

[0011] 所述的质控品包括:淀粉样蛋白A 10mg/L、氯化钠100mmol/L、牛血清白蛋白5g/L、蔗糖6g/L和液体生物防腐剂0.2mL/L;

[0012] 所述的液体生物防腐剂为Proclin-200、Proclin-300、Proclin500或NaN3中的一种或几种,进一步优选地,所述的液体生物防腐剂为Proclin-300。

[0013] 优选地,所述的试剂R1包括:三羟甲基氨基甲烷100mmol/L、氯化钠100mmol/L、牛血清白蛋白5g/L。

[0014] 优选地,所述的试剂R2包括:三羟甲基氨基甲烷100mmol/L、抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒500mg/L、液体生物防腐剂0.2mL/L。

[0015] 优选地,所述的试剂R1还包括丙氨酸1-5g/L和蔗糖5-7g/L;所述的试剂R2还包括羧甲基纤维素钠0.1-1.0g/L、丙氨酸1-5g/L、蔗糖5-7g/L和月桂基葡糖苷1.2-1.5g/L。

[0016] 进一步优选地,所述的试剂R1还包括丙氨酸3g/L和蔗糖6g/L;所述的试剂R2还包括羧甲基纤维素钠0.5g/L、丙氨酸3g/L、蔗糖6g/L和月桂基葡糖苷1.3g/L。

[0017] 优选地,所述的试剂R2中抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒是抗人淀粉样蛋白A抗体包被的甲基丙烯酸缩水甘油酯胶乳颗粒,抗人淀粉样蛋白A抗体与甲基丙烯酸缩水甘油酯胶乳的体积比为1:1-3;进一步优选地,所述的抗人淀粉样蛋白A抗体与甲基丙烯酸缩水甘油酯胶乳的体积比为1:2。

[0018] 优选地,所述的甲基丙烯酸缩水甘油酯胶乳是粒径为50-70nm的甲基丙烯酸缩水甘油酯胶乳和粒径为100-200nm的甲基丙烯酸缩水甘油酯胶乳混合而成,50-70nm的甲基丙烯酸缩水甘油酯胶乳与粒径为100-200nm的甲基丙烯酸缩水甘油酯胶乳的质量比为1:3。

[0019] 优选地,所述的校准品包括淀粉样蛋白A含量分别为0.1mg/L、1.0mg/L、2.0mg/L、4.0mg/L、6.0mg/L、8.0mg/L的六个浓度梯度的标准品。

[0020] 本发明另一方面提供了一种抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒的制备方法,所述的方法包括以下步骤:

[0021] (1)制备抗人血清淀粉样蛋白A抗体溶液:取抗人血清淀粉样蛋白A抗体溶于Tris-HCl缓冲液中,pH为6.8,制得浓度为0.5mg/mL的抗人血清淀粉样蛋白A抗体溶液;

[0022] (2)制备胶乳微球悬浮液:取甲基丙烯酸缩水甘油酯胶乳颗粒溶解于Tris-HCl缓

冲液中，浓度为1％(w/v)，加入聚天冬氨酸和N,N-亚甲基双丙烯酰胺，孵育，离心，弃上清，用Tris-HCl缓冲液洗涤胶乳微球两次，加入Tris-HCl缓冲液，震荡重悬，制得浓度为1％(w/v)的胶乳微球悬浮液；

[0023] (3)制备抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒：将步骤(1)得到的抗人血清淀粉样蛋白A抗体溶液和步骤(2)得到的胶乳微球悬浮液混均，孵育，加入2-羟基乙胺混匀，封闭，离心，弃上清，用Tris-HCl缓冲液洗涤两次，加入Tris-HCl缓冲液，震荡重悬，制得浓度为500mg/L的抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒。

[0024] 本发明另一方面还提供了一种血清淀粉样蛋白A的检测方法，所述的检测方法是利用上述的试剂盒检测人血清中淀粉样蛋白A的含量。

[0025] 具体地，所述的检测方法包括以下步骤：

[0026] (1)绘制标准曲线：利用校准品进行多点校准，以校准品的吸光度变化值ΔA＝$A_{标准}$-$A_{空白}$为纵坐标，其相应浓度C标准为横坐标绘制标准曲线；

[0027] (2)检测待测样本：将人血清样本和试剂R1混均，37℃温育5min，加入试剂R2混匀，静置30s，在600nm的波长下检测吸光度A_1，37℃恒温反应5min，结束反应，在600nm的波长下检测吸光度A_2，根据步骤(1)绘制的标准曲线，利用吸光度变化值ΔA＝A_2-A_1计算人血清样本中的淀粉样蛋白A的浓度；

[0028] (3)质量控制：用质控品监测操作程序，重复测定，计算相对偏差，相对偏差不超过±15％；

[0029] 所述的人血清样本、试剂R1和试剂R2的体积比为1:80:18-22；优选地，所述的人血清样本、试剂R1和试剂R2的体积比为1:80:20；

[0030] 所述的人血清样本为人的不溶血、非黄疸且非脂血血清。

[0031] 另外，胆红素≤300mg/L，血红蛋白≤4.0g/L，甘油三酯≤8.0g/L，抗坏血酸≤500mg/L，对检测结果无明显干扰。

[0032] 与现有技术相比，本发明的积极和有益效果在于：

[0033] 本发明所提供的一种血清淀粉样蛋白A的测定试剂盒，采用了胶乳免疫比浊技术，使用混合粒径的胶乳试剂，线性更好。在反应体系中添加了羧甲基纤维素钠、丙氨酸、蔗糖和月桂基葡糖苷，反应液更为稳定性，提高了检测结果的准确度和精密度。一定量的胆红素、血红蛋白、甘油三酯、抗坏血酸等干扰物对检测结果无明显干扰，检测结果更为准确。以质控品监测操作程序，检测结果更为准确可靠。另外，可使用全自动生化分析仪测定血清淀粉样蛋白，可同时对大量样本进行检测，检测灵敏度高，结果准确，操作简单，经济成本较低。

附图说明

[0034] 图1为实施例12中的线性相关图；

[0035] 图2为实施例13中的线性相关图；

[0036] 图3为实施例14中的线性相关图。

具体实施方式

[0037] 以下实施例的说明只是用于帮助理解本发明的方法及其核心思想。应当指出，对

于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以对本发明进行若干改进和修饰，这些改进和修饰也落入本发明权利要求的保护范围内。对所公开的实施例的下述说明，使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的，本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下，在其它实施例中实现。因此，本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例中，而是可以应用于符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的更宽的范围。虽然在本发明的实施或测试中可以使用与本发明中所述相似或等价的任何方法和材料，本文在此处列举优选的方法和材料。

[0038] 除非另外定义，本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解的相同意义。

[0039] 实施例1：抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒的制备

[0040] (1)制备抗人血清淀粉样蛋白A抗体溶液：取抗人血清淀粉样蛋白A抗体溶于Tris-HCl缓冲液中，pH为6.8，制得浓度为0.5mg/mL的抗人血清淀粉样蛋白A抗体溶液；

[0041] (2)制备胶乳微球悬浮液：按照质量比为1:3的比例，分别取粒径为50-70nm和100-200nm两种规格的甲基丙烯酸缩水甘油酯胶乳颗粒溶解于Tris-HCl缓冲液中，浓度为1％(w/v)，再依次加入浓度为15mg/mL的聚天冬氨酸和13mg/mL的N,N-亚甲基双丙烯酰胺，在室温孵育45分钟，高速离心(12000rpm，30min)，弃上清，用相同体积的Tris-HCl缓冲液洗涤胶乳微球两次，去除多余的交联剂，洗涤后，再将胶乳微球溶于Tris-HCl缓冲液中，25℃震荡15min重悬，制得浓度为1％(w/v)的胶乳微球悬浮液；

[0042] (3)制备抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒：将步骤(1)得到的抗人血清淀粉样蛋白A抗体溶液和步骤(2)得到的胶乳微球悬浮液按照体积比为1:1的比例混合均匀，37℃孵育3小时，再加入3μl/mL的2-羟基乙胺混匀，在37℃封闭30分钟，高速离心(12000rpm，30min)，弃上清，用相同体积的Tris-HCl缓冲液洗涤两次，去除未结合的抗体，加入Tris-HCl缓冲液，25℃震荡15min重悬，制得浓度为500mg/L的抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒。

[0043] 实施例2：抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒的制备

[0044] 与实施例1相比，仅步骤(3)中抗人血清淀粉样蛋白A抗体溶液和胶乳微球悬浮液的比例不同，本实施例中体积比为1:2。

[0045] 实施例3：抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒的制备

[0046] 与实施例1相比，仅步骤(3)中抗人血清淀粉样蛋白A抗体溶液和胶乳微球悬浮液的比例不同，本实施例中体积比为1:3。

[0047] 实施例4：血清淀粉样蛋白A的测定试剂盒

[0048] 血清淀粉样蛋白A的测定试剂盒具体配制成分如下：

[0049] 试剂R1：三羟甲基氨基甲烷80mmol/L、氯化钠90mmol/L、牛血清白蛋白6g/L；

[0050] 试剂R2：三羟甲基氨基甲烷80mmol/L、抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒400mg/L、液体生物防腐剂0.3mL/L；

[0051] 校准品：淀粉样蛋白A含量分别为0.1mg/L、1.0mg/L、2.0mg/L、4.0mg/L、6.0mg/L、8.0mg/L的六个浓度梯度，氯化钠100mmol/L、牛血清白蛋白5g/L、蔗糖6g/L和液体生物防腐剂0.2mL/L；

[0052] 质控品：淀粉样蛋白A 10mg/L、氯化钠100mmol/L、牛血清白蛋白5g/L、蔗糖6g/L和

液体生物防腐剂0.2mL/L；

[0053] 其中，所述的液体生物防腐剂为Proclin-200、Proclin-300、Proclin500和NaN_3中的一种或多种；所用抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒由实施例2制得。

[0054] 实施例5：血清淀粉样蛋白A的测定试剂盒

[0055] 与实施例4相比，仅试剂R1和试剂R2不同。

[0056] 试剂R1：三羟甲基氨基甲烷100mmol/L、氯化钠100mmol/L、牛血清白蛋白5g/L；

[0057] 试剂R2：三羟甲基氨基甲烷100mmol/L、抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒500mg/L、液体生物防腐剂0.2mL/L。

[0058] 实施例6：血清淀粉样蛋白A的测定试剂盒

[0059] 与实施例4相比，仅试剂R1和试剂R2不同。

[0060] 试剂R1：三羟甲基氨基甲烷120mmol/L、氯化钠110mmol/L、牛血清白蛋白4g/L；

[0061] 试剂R2：三羟甲基氨基甲烷120mmol/L、抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒600mg/L、液体生物防腐剂0.1mL/L。

[0062] 实施例7：血清淀粉样蛋白A的测定试剂盒

[0063] 与实施例4相比，仅试剂R1和试剂R2不同。

[0064] 试剂R1：三羟甲基氨基甲烷100mmol/L、氯化钠100mmol/L、牛血清白蛋白5g/L、丙氨酸1g/L和蔗糖7g/L；

[0065] 试剂R2：三羟甲基氨基甲烷100mmol/L、抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒500mg/L、液体生物防腐剂0.2mL/L、羧甲基纤维素钠0.1g/L、丙氨酸1g/L、蔗糖7g/L和月桂基葡糖苷1.2g/L。

[0066] 实施例8：血清淀粉样蛋白A的测定试剂盒

[0067] 与实施例4相比，仅试剂R1和试剂R2不同。

[0068] 试剂R1：三羟甲基氨基甲烷100mmol/L、氯化钠100mmol/L、牛血清白蛋白5g/L、丙氨酸3g/L和蔗糖6g/L；

[0069] 试剂R2：三羟甲基氨基甲烷100mmol/L、抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒500mg/L、液体生物防腐剂0.2mL/L、羧甲基纤维素钠0.5g/L、丙氨酸3g/L、蔗糖6g/L和月桂基葡糖苷1.3g/L。

[0070] 实施例9：血清淀粉样蛋白A的测定试剂盒

[0071] 与实施例4相比，仅试剂R1和试剂R2不同。

[0072] 试剂R1：三羟甲基氨基甲烷100mmol/L、氯化钠100mmol/L、牛血清白蛋白5g/L、丙氨酸5g/L和蔗糖5g/L；

[0073] 试剂R2：三羟甲基氨基甲烷100mmol/L、抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒500mg/L、液体生物防腐剂0.2mL/L、羧甲基纤维素钠1.0g/L、丙氨酸5g/L、蔗糖5g/L和月桂基葡糖苷1.5g/L。

[0074] 实施例10：血清淀粉样蛋白A的测定试剂盒

[0075] 与实施例8相比，仅所用的抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒不同，本实施例中所用的抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒由实施例1制得。

[0076] 实施例11：血清淀粉样蛋白A的测定试剂盒

[0077] 与实施例8相比，仅所用的抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒不同，本实施例中所用

的抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒由实施例3制得。

[0078] 对比例1:一种胶乳增强免疫比浊法测定血清淀粉样蛋白A检测试剂盒

[0079] 中国专利公布CN108872592A所述的实施例4试剂盒。

[0080] 对比例2:一种检测血清淀粉样蛋白的试剂盒及其用途

[0081] 中国专利公布CN106353507A所述的一种检测血清淀粉样蛋白的试剂盒

[0082] 实施例12:血清淀粉样蛋白A的检测

[0083] 利用全自动生化分析仪按照以下步骤进行检测:

[0084] (1)绘制标准曲线:利用校准品进行多点校准,以校准品的吸光度变化值ΔA=$A_{标准}-A_{空白}$为纵坐标,其相应浓度C标准为横坐标绘制标准曲线;

[0085] (2)检测待测样本:取人血清样本3μl和240μl试剂R1,混均,37℃温育5min,加入54μl试剂R2混匀,静置30s,在600nm的波长下检测吸光度A_1,37℃恒温反应5min,结束反应,在600nm的波长下检测吸光度A_2,根据步骤(1)绘制的标准曲线,利用吸光度变化值ΔA=A_2-A_1计算人血清样本中的淀粉样蛋白A的浓度,所述的人血清样本为人的不溶血、非黄疸且非脂血血清;

[0086] (3)质量控制:用质控品监测操作程序,重复测定,计算相对偏差,相对偏差不超过±15%。

[0087] A.精密度检测:同一样品中连续抽取20次,按照上述步骤进行测定,计算测定值的平均值、标准差(SD)和变异系数(CV),CV=(标准差/平均值)*100%,结果见表1,CV通常用于衡量一项测定方法的精密度,CV值越小,表示该测定方法的结果精密度越好。对于临床化学检验项目而言,CV小于5%的方法精密度公认是可以接受的。

[0088] 表1:精密度检测结果:

[0089]

试剂盒	平均值(mg/L)	标准差(SD)	变异系数(CV)
实施例4	7.51	0.09	1.20%
实施例5	7.63	0.08	1.05%
实施例6	7.58	0.12	1.58%
实施例7	7.68	0.07	0.91%
实施例8	7.61	0.05	0.66%
实施例9	7.67	0.07	0.91%

[0090]

实施例10	7.55	0.07	0.93%
实施例11	7.58	0.1	1.32%
对比例1	176.80	2.18	1.23%
对比例2	102.10	2.13	2.37%

[0091] 表1中CV值≤1.58%,表明本发明提供的试剂盒精密度较高,其中实施例8所述的试剂盒精密度最高。

[0092] B.准确度检测:用血清淀粉样蛋白A抗原含量为10mg/L的质控品进行测定,重复5次,取均值,计算相对偏差(CB),检测结果见表2。对于临床化学检验项目而言,相对偏差不超过±15%,被认为具有优良的准确度。

[0093] 表2:准确度检测结果

[0094]

试剂盒	测定均值（mg/L）	标准值（mg/L）	相对偏差（CB）
实施例 4	9.87	10.0	-1.30%
实施例 5	10.08	10.0	0.80%
实施例 6	10.10	10.0	1.00%
实施例 7	10.07	10.0	0.70%
实施例 8	10.04	10.0	0.40%
实施例 9	9.94	10.0	-0.60%
实施例 10	9.92	10.0	-0.80%
实施例 11	10.07	10.0	0.70%
对比例 1	208	210.7	-1.28%

[0095] 表2中相对偏差均不超过±1.30％，表明本发明提供的试剂盒准确度较高，其中实施例8所述的试剂盒准确度最高。

[0096] C.稳定性检测：在2-8℃储存条件下，分别在0个月、6个月和12个月对血清淀粉样蛋白A抗原含量为4.0mg/L的同一标准品样本进行测定，每个样本测定10次，取均值，结果见表3。

[0097] 表3：稳定性检测结果

[0098]

试剂盒	0 个月	6 个月	12 个月
实施例 4	4.12	4.11	4.14

[0099]

实施例 5	4.09	4.10	4.12
实施例 6	3.92	3.90	3.91
实施例 7	4.04	4.06	4.09
实施例 8	4.03	4.04	4.04
实施例 9	3.95	3.96	3.93
实施例 10	4.07	4.07	4.09
实施例 11	4.06	4.08	4.10

[0100] 由表3可以看出，检测值差异较小，表明本发明提供的试剂盒稳定性较好，在2-8℃下储存至少可以稳定12个月以上，其中实施例8所述的试剂盒稳定性最好。

[0101] D.线性检测：利用实施例8所述的试剂盒检测六个浓度梯度的标准品，每个梯度浓度检测3次，取平均值，对测定值的平均值和标准品的理论浓度作回归分析，X轴表示理论浓度，Y轴表示测定值均值。一般$R^2 \geq 0.9900$被认为具有良好的线性，结果见图1。

[0102] 得到的线性回归方程为：$y=0.9728x+0.0672$，相关系数：$R^2=0.9975$。结果表明，本发明提供的试剂盒具有良好的线性相关关系。

[0103] 实施例13：血清淀粉样蛋白A的检测

[0104] 与实施例12相比，区别仅在于，步骤(2)检测待测样本：加入60μl试剂R2。

[0105] A.精密度检测：与实施例12中所述的方法相同，结果见表4。

[0106] 表4：精密度检测结果：

[0107]

试剂盒	平均值（mg/L）	标准差（SD）	变异系数（CV）
实施例 4	7.68	0.09	1.17%
实施例 5	7.58	0.07	0.92%
实施例 6	7.57	0.11	1.45%
实施例 7	7.64	0.07	0.92%
实施例 8	7.62	0.04	0.52%
实施例 9	7.66	0.06	0.78%
实施例 10	7.59	0.07	0.92%

[0108]

实施例 11	7.66	0.08	1.04%
对比例 1	176.80	2.18	1.23%
对比例 2	102.10	2.13	2.37%

[0109] 表4中CV值≤1.45%，表明本发明提供的试剂盒精密度较高，其中实施例8所述的试剂盒精密度最高。

[0110] B.准确度检测：与实施例12中所述的方法相同，结果见表5。

[0111] 表5：准确度检测结果

[0112]

试剂盒	测定均值（mg/L）	标准值（mg/L）	相对偏差（CB）
实施例 4	9.89	10.0	-1.10%
实施例 5	10.09	10.0	0.90%
实施例 6	10.10	10.0	1.00%
实施例 7	10.06	10.0	0.60%
实施例 8	9.98	10.0	-0.20%
实施例 9	9.94	10.0	-0.60%
实施例 10	9.95	10.0	-0.50%
实施例 11	10.08	10.0	0.80%
对比例 1	208	210.7	-1.28%

[0113] 表5中相对偏差均不超过±1.10%，表明本发明提供的试剂盒准确度较高，其中实施例8所述的试剂盒准确度最高。

[0114] C.稳定性检测：与实施例12中所述的方法相同，结果见表6。

[0115] 表6：稳定性检测结果

[0116]

试剂盒	0个月	6个月	12个月
实施例4	4.09	4.11	4.13
实施例5	4.06	4.07	4.09
实施例6	3.94	3.94	3.92
实施例7	4.03	4.02	4.05
实施例8	4.01	4.02	4.04
实施例9	3.97	3.96	3.94
实施例10	3.95	3.94	3.92

实施例11	4.06	4.08	4.09

[0117] 由表6可以看出，检测值差异较小，表明本发明提供的试剂盒稳定性较好，在2-8℃下储存至少可以稳定12个月以上，其中实施例8所述的试剂盒稳定性最好。

[0118] D.线性检测：与实施例12中所述的方法相同，结果见图2。

[0119] 得到的线性回归方程为：y＝1.0037x+0.002，相关系数：R^2＝0.9993。结果表明，本发明提供的试剂盒具有良好的线性相关关系。

[0120] 实施例14：血清淀粉样蛋白A的检测

[0121] 与实施例12相比，区别仅在于，步骤(2)检测待测样本：加入66μl试剂R2。

[0122] A.精密度检测：与实施例12中所述的方法相同，结果见表7。

[0123] 表7：精密度检测结果：

[0124]

试剂盒	平均值(mg/L)	标准差(SD)	变异系数(CV)
实施例4	7.48	0.09	1.20%
实施例5	7.51	0.08	1.07%
实施例6	7.59	0.10	1.32%
实施例7	7.67	0.07	0.91%
实施例8	7.60	0.06	0.79%
实施例9	7.64	0.07	0.92%
实施例10	7.56	0.08	1.06%
实施例11	7.57	0.10	1.32%
对比例1	176.80	2.18	1.23%
对比例2	102.10	2.13	2.37%

[0125] 表7中CV值≤1.32%，表明本发明提供的试剂盒精密度较高，其中实施例8所述的试剂盒精密度最高。

[0126] B.准确度检测：与实施例12中所述的方法相同，结果见表8。

[0127] 表8：准确度检测结果

[0128]

试剂盒	测定均值（mg/L）	标准值（mg/L）	相对偏差（CB）
实施例 4	9.89	10.0	-1.10%

[0129]

实施例 5	10.09	10.0	0.90%
实施例 6	10.12	10.0	1.20%
实施例 7	10.06	10.0	0.60%
实施例 8	9.97	10.0	-0.30%
实施例 9	10.05	10.0	0.50%
实施例 10	9.94	10.0	-0.60%
实施例 11	10.07	10.0	0.70%
对比例 1	208	210.7	-1.28%

[0130] 表8中相对偏差均不超过±1.20%，表明本发明提供的试剂盒准确度较高，其中实施例8所述的试剂盒准确度最高。

[0131] C.稳定性检测：与实施例12中所述的方法相同，结果见表9。

[0132] 表9:稳定性检测结果

[0133]

试剂盒	0个月	6个月	12个月
实施例4	4.11	4.12	4.15
实施例5	3.96	3.96	3.92
实施例6	3.93	3.90	3.89
实施例7	4.05	4.05	4.08
实施例8	4.04	4.03	4.06
实施例9	3.94	3.95	3.91
实施例10	3.95	3.96	3.92
实施例11	4.07	4.08	4.10

[0134] 由表9可以看出,检测值差异较小,表明本发明提供的试剂盒稳定性较好,在2-8℃下储存至少可以稳定12个月以上,其中实施例8所述的试剂盒稳定性最好。

[0135] D.线性检测:与实施例12中所述的方法相同,结果见图3。

[0136] 得到的线性回归方程为:y=1.0062x+0.0031,相关系数:R^2=0.9985。结果表明,本发明提供的试剂盒具有良好的线性相关关系。

[0137] 实施例15:干扰试验

[0138] 选择四种潜在干扰物,胆红素、血红蛋白、甘油三酯和抗坏血酸,在质控品中分别加入250mg/L、300mg/L、350mg/L的胆红素;3.5g/L、4.0g/L、4.5g/L的血红蛋白;7.5g/L、8.0g/L、8.5g/L的甘油三酯;450mg/L、500mg/L、550mg/L的抗坏血酸,对照组为不加任何干扰物的质控品,利用实施例8所述的试剂盒和实施例13所述的检测方法进行测定,每个样本测定5次,取均值,结果见表10。

[0139] 表10:干扰物试验结果

[0140]

组别		浓度均值（mg/L）	相对偏差（CB）
对照组		10.02	0.20%
胆红素（mg/L）	250	10.65	6.50%
	300	10.97	9.70%
	350	11.68	16.80%
血红蛋白（g/L）	3.5	9.61	-3.90%
	4.0	9.06	-9.40%
	4.5	8.27	-17.30%
甘油三酯（g/L）	7.5	9.54	-4.60%
	8.0	8.86	-11.40%
	8.5	8.15	-18.50%
抗坏血酸(mg/L)	450	10.59	5.90%
	500	11.13	11.30%
	550	11.88	18.80%

[0141] 由表10可以看出,胆红素≤300mg/L,血红蛋白≤4.0g/L,甘油三酯≤8.0g/L,抗坏血酸≤500mg/L,对检测结果无明显干扰。

[0142] 综上，本发明提供的试剂盒的可检测结果准确度高、精密度高、稳定性好、线性好。其中利用实施例8所述的试剂盒和实施例13所述的检测方法进行检测，检测结果最佳。

[0143] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

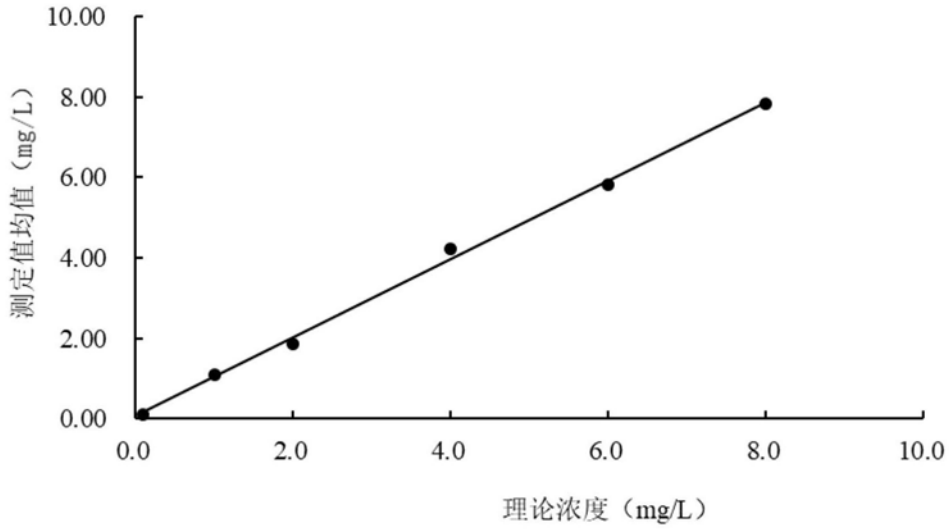

10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
测定值均值（mg/L）
0.0
2.0
4.0
6.0
8.0
10.0
理论浓度（mg/L）

图1

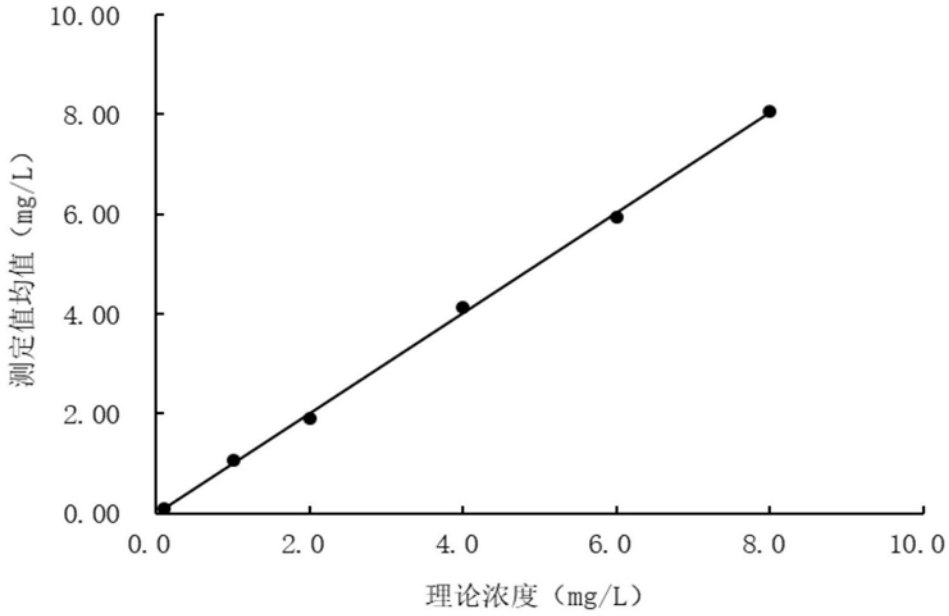

10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
测定值均值（mg/L）
0.0
2.0
4.0
6.0
8.0
10.0
理论浓度（mg/L）

图2

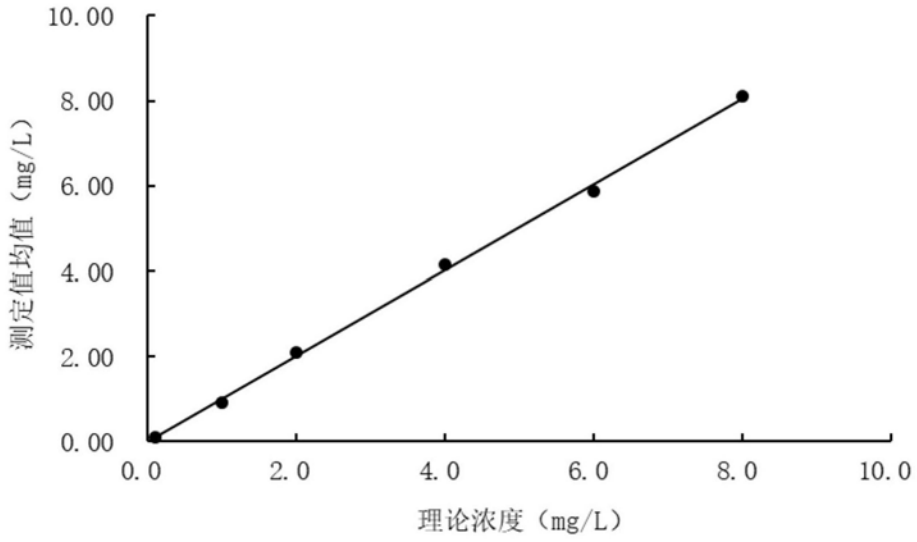


图3

专利名称(译)	一种血清淀粉样蛋白A的测定试剂盒		
公开(公告)号	CN109596843B	公开(公告)日	2019-08-16
申请号	CN201910070560.7	申请日	2019-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	浙江夸克生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	浙江夸克生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	浙江夸克生物科技有限公司		
[标]发明人	林耀文 陈青松		
发明人	林耀文 陈青松		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/544 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54313 G01N33/544 G01N33/68 G01N2333/4737		
代理人(译)	宋秀兰		
审查员(译)	赵晓明		
其他公开文献	CN109596843A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种血清淀粉样蛋白A的测定试剂盒，涉及医学生物检测技术领域。该试剂盒包括试剂R1、试剂R2、校准品和质控品，试剂R1包括三羟甲基氨基甲烷、氯化钠、牛血清白蛋白、丙氨酸和蔗糖；试剂R2包括三羟甲基氨基甲烷、抗人淀粉样蛋白A抗体胶乳颗粒、液体生物防腐剂、羧甲基纤维素钠、丙氨酸、蔗糖和月桂基葡糖苷。该试剂盒采用了胶乳免疫比浊技术，可使用全自动生化分析仪同时对大量样本进行检测。线性更好，检测灵敏度、准确度和精密度显著提高，缩短了检测时间，操作简单，经济成本较低。