

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610155721.5

[51] Int. Cl.  
G01N 33/68 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 7 月 18 日

[11] 公开号 CN 101000349A

[22] 申请日 2006.12.31

[21] 申请号 200610155721.5

[71] 申请人 王贤理

地址 325011 浙江省温州市经济技术开发区  
高科技园区 27 号小区浙江伊利康公司

[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  
代理人 王洪新

权利要求书 1 页 说明书 8 页

## [54] 发明名称

前白蛋白检测试剂盒

## [57] 摘要

本发明涉及一种测定血清中的前白蛋白(PA)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、抗干扰能力强、适用于各种类型的全自动生化分析仪的特点。本发明提供的技术方案是：前白蛋白检测试剂盒，包括以下成份：a. 一种使样品中 PA 抗原位点充分暴露，有利于与抗 PA 抗体试剂充分结合的 PA 反应剂；b. 一种与人血清中的 PA 抗原高度特异反应性的抗 PA 抗体试剂；c. 一种用来与样品比较，进行结果计算的液体血清型恒定值校准液。所述的 PA 反应剂还包括表面活性剂和反应促进剂。所述的 PA 反应剂与抗 PA 抗体试剂按 3：1 的比例混合，以作为单一试剂使用。

1、前白蛋白检测试剂盒，包括以下成份：

a、一种使样品中 PA 抗原位点充分暴露，有利于与抗 PA 抗体试剂充分结合的 PA 反应剂，包括 5-200mmol/L 缓冲液、0.1%-5%防腐剂、0.1%-1%的稳定剂、0.1-40%电解质和 20%-80%高分子加速剂；

b、一种与人血清中的 PA 抗原高度特异反应性的抗 PA 抗体试剂，包括抗 PA 抗体、0.001%-5%的抗氧化剂和 1%-20%的稳定剂（抗氧化剂和稳定剂的含量均为与抗 PA 抗体的重量百分比），还包括前述 PA 反应剂，该 PA 反应剂与抗 PA 抗体的配比为 5：1-100：1；

c、一种用来与样品比较，进行结果计算的液体血清型恒定值校准液，包括缓冲液 20-100mmol/L、防腐剂 0.01-19mmol/L 和稳定剂 0.1-50mmol/L。

2、根据权利要求 1 所述的前白蛋白检测试剂盒，其特征在于所述的 PA 反应剂还包括 0.1-10%的表面活性剂和 0.1%-0.5%反应促进剂。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的前白蛋白检测试剂盒，其特征在于所述的 PA 反应剂与抗 PA 抗体试剂按 3：1 的比例混合，以作为单一试剂使用。

## 前白蛋白检测试剂盒

### 技术领域

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前白蛋白（PA）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

前白蛋白（PA）是肝细胞合成的一种血清蛋白，电泳时迁移在白蛋白之前，故名前白蛋白，参与血清中甲状腺素和视黄醇的运输，由4个相同的亚基组成，含色氨酸3.15%，分子量54890，消光系数（ $E_{280nm}$ ）13.6，半衰期1.9天。因半衰期很短，被用来观测肝功能受损及营养缺乏的早期诊断指标。

已知测定前白蛋白（PA）的方法有免疫扩散法、免疫电泳法、放射免疫分析法、这些方法都存在着操作繁琐，需要特殊的设备，样品需要预处理，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

本发明所要解决的技术问题是克服上述背景技术的不足，提供一种前白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、抗干扰能力强、适用于各种类型的全自动生化分析仪的特点。

本发明提供的技术方案是：

前白蛋白检测试剂盒，包括以下成份：

a、一种使样品中PA抗原位点充分暴露，有利于与抗PA抗体试剂充分结合的PA反应剂，包括5-200mmol/L缓冲液、0.1%-5%防腐剂、0.1%-1%的稳定剂、0.1-40%电解质和20%-80%高分子加速剂；

b、一种与人血清中的PA抗原有高度特异反应性的抗PA抗体试剂，包括抗PA抗体、0.001%-5%的抗氧化剂和1%-20%的稳定剂（抗氧化剂和稳定剂的含量均为与抗PA抗体的重量百分比），还包括前述PA反应剂，该PA反应剂与抗PA抗体的配比为5：1-100：1；

c、一种用来与样品比较，进行结果计算的液体血清型恒定值校准液，包括缓冲液20-100mmol/L、防腐剂0.01-19mmol/L和稳定剂0.1-50mmol/L。

所述的PA反应剂还包括0.1-10%的表面活性剂和0.1%-0.5%反应促进剂。

所述的 PA 反应剂与抗 PA 抗体试剂按 3:1 的比例混合,以作为单一试剂使用。

本发明提供的方法是利用抗原抗体反应,加入反应剂(样品稀释液),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,然后加入抗 PA 抗体试剂;高特异反应性的抗 PA 抗体试剂与样本中相应的 PA 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 PA 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,与已知恒定的校准液比较,则可计算出样本中 APOA I、APOB 的含量。本发明方法及试剂操作简单、样本不用预稀释,采用血清型液体恒定值校准液后不需每批更改参数,准确度高、重复性好、抗干扰能力强。并且还适用于各种类型的全自动生化分析仪。

### 具体实施方式

前白蛋白检测试剂盒,包括以下成份:

a、一种使样品中 PA 抗原位点充分暴露,有利于与抗 PA 抗体试剂充分结合的 PA 反应剂(或样品稀释液),包括 5-200mmol/L 缓冲液、0.1%-5%防腐剂、0.1%-1%的稳定剂、0.1-40%电解质、20%-80%高分子加速剂,还可包括 0.1-10%的表面活性剂和 0.1%-0.5%反应促进剂(防腐剂、稳定剂、电解质、高分子加速剂、表面活性剂及反应促进剂的含量比例均为与 PA 反应剂的重量百分比);

作为缓冲液可以是磷酸盐缓冲液、三羟甲基氨基甲烷缓冲液、PIPES 缓冲液、HEPES 缓冲液、TAPS 缓冲液、甘氨酸缓冲液、硼酸缓冲液等,本发明优选磷酸盐缓冲液,缓冲液的 PH 值为 5-10,优选 7.4-8.1。

作为表面活性剂可以是非离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、阴离子表面活性剂或两性离子表面活性剂,这里优选非离子表面活性剂,作为实例有: Theist、Tween 系列、聚氧乙烯月桂醚系列、聚氧乙烯苯基醚、聚氧乙烯辛基苯醚、聚氧乙烯烷基苯基醚、聚氧乙烯壬基苯基醚等,这些表面活性剂可以单独使用,也可以两种或两种以上混合使用,这里不作限制。

作为电解质的实例可以阴离子或阳离子,本发明优选阳离子中的氯化钠(NaCl)。

作为加速剂的实例可以是聚乙二醇 2000、聚乙二醇 4000、聚乙二醇 6000、

聚乙二醇 8000，优选聚乙二醇 6000。

作为防腐剂的实例可以是叠氮钠、乙基汞硫代硫酸钠、对羟基苯甲酸、对羟基苯甲酸乙酯、苯酚、广谱杀菌剂，本发明从环保角度考虑，优选广谱杀菌剂。

作为反应促进剂的实例可以是溴化己二甲胺、聚凝胺。

作为稳定剂的实例可以是乙二胺四乙酸二钠、氯化镁、牛（人）血清白蛋白、乙二醇、甘露糖醇、海藻糖。

b、一种与人血清中的 PA 抗原高度特异反应性的抗 PA 抗体试剂，包括抗 PA 抗体、0.001%-5%的抗氧化剂和 1%-20%的稳定剂（抗氧化剂和稳定剂的含量均为与抗 PA 抗体的重量百分比），还包括前述 PA 反应剂，该 PA 反应剂与抗 PA 抗体的配比为 5：1-100：1；

作为抗 PA 抗体的实例可以是羊抗人 PA 抗血清、马抗人 PA 抗血清、鼠抗人 PA 抗血清、兔抗人 PA 抗血清等；这些血清均可外购获得，也可自制。

作为抗氧化剂的实例可以是丁基羟基茴香醚、硫代二丙酸二月桂酯、二丁基羟基甲苯、苯多酚、甘草抗氧化物、磷脂等；

作为抗氧化剂可以先溶解在 10-100ml 丙二醇或乙醇中，然后加入到抗 PA 抗体试剂中。

c、一种用来与样品比较，进行结果计算的液体血清型恒定值校准液，包括缓冲液 20-100mmol/L、防腐剂 0.01-19mmol/L、稳定剂 0.1-50mmol/L。

作为缓冲液的实例有 PBS、Tris、TAPS、HEPPS、CHES、CAPS、CAPSO、POPSO、Tricie、甘氨酸、双甘氨酸、二甘氨酸、硼酸盐等缓冲液等

作为防腐剂的实例有叠氮钠、乙基汞硫代硫酸钠、对羟基苯甲酸、对羟基苯甲酸乙酯、苯酚、广谱杀菌剂等，可以单独使用或几种混合使用；其中的防腐剂的实例有丙酸钠、脱氧乙酸等，也可单独使用或几种混合使用。

作为稳定剂的实例可以是乙二胺四乙酸二钠、氯化镁、牛（人）血清白蛋白、丙三醇、单糖、多糖等可以单独使用或几种混合使用。

可以单独使用或几种混合使用。

以上所述的所有生化原料和试剂均可外购获得。

本发明的 PA 浓度值为：第 1 点：50-200mg/L;优选 150mg/L 第 2 点 250-350g/L;优选 300g/L; 第 3 点 400-500g/L;优选 450g/L; 第 4 点 550-700 g/L; 优选 600g/L。液体血清型恒定值校准液按照确定的 PA 浓度值加入不同量的 PA 抗原（每个试剂盒配置 4 瓶）；PA 抗原可直接外购，或者自制。

以上所述的前白蛋白检测试剂盒中均为双试剂（即试剂盒中包括 PA 反应剂、抗 PA 抗体试剂和液体血清型恒定值 PA 校准液三种成份）；也可将所述的 PA 反应剂与抗 PA 抗体试剂按 3：1 的比例混合，以作为单一试剂使用。

PA 检测试剂的制备实施例：

#### 实施例一

##### 1、PA 反应剂(R1)

|                  |            |
|------------------|------------|
| 磷酸盐缓冲液           | 100 mmol/L |
| 聚氧乙烯月桂醚(表面活性剂)   | 5 %        |
| NaCL (电解质)       | 20%        |
| PEG-6000(高分子加速剂) | 40%        |
| 广谱杀菌剂(防腐剂)       | 3%         |
| 溴化己二甲胺(反应促进剂)    | 0.3%       |
| 乙二胺四乙酸二钠(稳定剂)    | 0.5%       |

##### 2、抗 PA 抗体试剂(R2)

|                |       |
|----------------|-------|
| 反应剂(样品稀释液)     | 500ml |
| 兔抗人 PA 抗血清     | 100ml |
| 丁基羟基茴香醚 (抗氧化剂) | 2%    |
| 甘露糖醇 (稳定剂)     | 5%    |

##### 3、液体血清型 PA 恒定值校准液

|     |       |           |
|-----|-------|-----------|
| 缓冲液 | CAPSO | 100mmol/L |
|-----|-------|-----------|

|     |          |         |
|-----|----------|---------|
| 防腐剂 | 广谱杀菌剂    | 2mmol/L |
| 稳定剂 | 乙二胺四乙酸二钠 | 2mmol/L |
| 稳定剂 | 牛血清白蛋白   | 3mmol/L |
| 防霉剂 | 丙酸钠      | 2mmol/L |

按照确定的 PA 恒定值浓度将相应的 PA 抗原加入上述液体血清型 PA 恒定值校准液中（一般根据不同 PA 恒定值浓度，配置 4 瓶液体血清型 PA 恒定值校准液），然后用 0.22  $\mu$  m 的滤膜抽滤除菌，放 2-8℃ 保存。

也可将(R1)与(R2)按 3：1 的比例混合，以作为单一试剂使用。

## 实施例二

### 1、PA 反应剂 (R1)

|                  |         |
|------------------|---------|
| 磷酸盐缓冲液           | 5mmol/L |
| 聚氧乙烯月桂醚(表面活性剂)   | 0.1%    |
| NaCL (电解质)       | 0.1%    |
| PEG-6000(高分子加速剂) | 20%     |
| 广谱杀菌剂(防腐剂)       | 0.1%    |
| 聚凝胺(反应促进剂)       | 0.1%    |
| 乙二胺四乙酸二钠(稳定剂)    | 0.1%    |

### 2、抗 PA 抗体试剂(R2)

|                |        |
|----------------|--------|
| 反应剂(样品稀释液)     | 5000ml |
| 羊抗人 PA 抗血清     | 100ml  |
| 丁基羟基茴香醚 (抗氧化剂) | 0.001% |
| 氯化镁 (稳定剂)      | 1%     |

### 3、液体血清型恒定值 PA 校准液

|     |       |          |
|-----|-------|----------|
| 缓冲液 | CAPSO | 20mmol/L |
|-----|-------|----------|

|     |        |             |
|-----|--------|-------------|
| 防腐剂 | 广谱杀菌剂  | 0.01mmol/L  |
| 稳定剂 | 丙三醇    | 0.1mmol/L   |
| 稳定剂 | 牛血清白蛋白 | 0.01mmol/L. |
| 防霉剂 | 脱氧乙酸   | 0.01mmol/L  |

按照确定的 PA 恒定值浓度将相应的 PA 抗原加入上述液体血清型 PA 恒定值校准液中（一般根据不同 PA 恒定值浓度，配置 4 瓶液体血清型 PA 恒定值校准液），然后用 0.22  $\mu$  m 的滤膜抽滤除菌，放 2-8℃ 保存。

也可将(R1)与(R2)按 3：1 的比例混合，以作为单一试剂使用。

### 实施例三

#### 1、PA 反应剂(R1)

|                  |            |
|------------------|------------|
| 磷酸盐缓冲液           | 200 mmol/L |
| 聚氧乙烯月桂醚(表面活性剂)   | 10%        |
| NaCL (电解质)       | 40%        |
| PEG-6000(高分子加速剂) | 80%        |
| 广谱杀菌剂(防腐剂)       | 5%         |
| 聚凝胺(反应促进剂)       | 0.5%       |
| 乙二胺四乙酸二钠(稳定剂)    | 1%         |

#### 2、抗 PA 抗体试剂(R2)

|               |        |
|---------------|--------|
| 反应剂(样品稀释液)    | 5000ml |
| 鼠抗人 PA 抗血清    | 50ml   |
| 二丁基羟基甲苯(抗氧化剂) | 5%     |
| 丙三醇（稳定剂）      | 20%    |

#### 3、液体血清型恒定值 PA 校准液

|     |       |           |
|-----|-------|-----------|
| 缓冲液 | CAPSO | 100mmol/L |
|-----|-------|-----------|

|     |          |          |
|-----|----------|----------|
| 防腐剂 | 广谱杀菌剂    | 19mmol/L |
| 稳定剂 | 乙二胺四乙酸二钠 | 45mmol/L |
| 稳定剂 | 牛血清白蛋白   | 5mmol/L. |
| 防霉剂 | 丙酸钠      | 19mmol/L |

按照确定的 PA 恒定值浓度将相应的 PA 抗原加入上述液体血清型 PA 恒定值校准液中（一般根据不同 PA 恒定值浓度，配置 4 瓶液体血清型 PA 恒定值校准液），然后用 0.22 μm 的滤膜抽滤除菌，放 2-8℃ 保存。

也可将(R1)与(R2 按 3：1 的比例混合，以作为单一试剂使用。

以下描述测定的具体操作步骤：

#### 一、双试剂基本操作：

| 加入物                                                         | 空白管 | 校准管 | 样品管 |
|-------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| R1 (μl)                                                     | 210 | 210 | 210 |
| 生理盐水 (μl)                                                   | 5   | ——  | ——  |
| 校准液 (μl)                                                    | ——  | 5   | ——  |
| 待测样品 (μl)                                                   | ——  | ——  | 5   |
| 混匀，37℃ 孵育 5 分钟                                              |     |     |     |
| 试剂 2 (μl)                                                   | 70  | 70  | 70  |
| 混匀，37℃ 孵育 5 分钟，在波长 340nm 处以空白管调零，读取各管的吸光度值 A <sub>i</sub> 。 |     |     |     |

（仪器：具有 340nm 波长，37℃ 恒温装置的生化分析仪）

结果计算：

$$\text{样本中 PA 含量 (mg/L)} = \frac{\Delta A_u}{\Delta A_s} \times C_s \text{ (mg/L)}$$

式中：ΔA<sub>u</sub> 以空白管吸光度为对照的样品管吸光度

ΔA<sub>s</sub> 以空白管吸光度为对照的校准管吸光度

$C_s$  校准液中 PA 的浓度

## 二、单试剂基本操作：

| 加入物       | 空白管 | 校准管 | 样品管 |
|-----------|-----|-----|-----|
| R (μl)    | 500 | 500 | 500 |
| 蒸馏水 (μl)  | 10  | ——  | ——  |
| 校准液 (μl)  | ——  | 10  | ——  |
| 待测样品 (μl) | ——  | ——  | 10  |

混匀，37℃孵育 5 分钟，在波长 340nm 处以空白管调零，读取各管的吸光度值 A。

（仪器：具有 340nm 波长，37℃恒温装置的生化分析仪）

## 结果计算：

$$\text{样本中 PA 含量 (mg/L)} = \frac{\Delta A_u}{\Delta A_s} \times C_s \text{ (mg/L)}$$

式中： $\Delta A_u$  以空白管吸光度为对照的样品管吸光度

$\Delta A_s$  以空白管吸光度为对照的校准管吸光度

$C_s$  校准液中 PA 的浓度

储存及稳定性：本发明提供的试剂盒在 2~8℃避光保存可稳定一年。

|                |                                                |         |            |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 前白蛋白检测试剂盒                                      |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN101000349A</a>                   | 公开(公告)日 | 2007-07-18 |
| 申请号            | CN200610155721.5                               | 申请日     | 2006-12-31 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 王贤理                                            |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 王贤理                                            |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 王贤理                                            |         |            |
| [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 G01N33/53                            |         |            |
| 代理人(译)         | 王洪新                                            |         |            |
| 其他公开文献         | CN101000349B                                   |         |            |
| 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前白蛋白(PA)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、抗干扰能力强、适用于各种类型的全自动生化分析仪的特点。本发明提供的技术方案是：前白蛋白检测试剂盒，包括以下成份：a.一种使样品中PA抗原位点充分暴露，有利于与抗PA抗体试剂充分结合的PA反应剂；b.一种与人血清中的PA抗原有高度特异反应性的抗PA抗体试剂；c.一种用来与样品比较，进行结果计算的液体血清型恒定值校准液。所述的PA反应剂还包括表面活性剂和反应促进剂。所述的PA反应剂与抗PA抗体试剂按3:1的比例混合，以作为单一试剂使用。

$$\text{样本中PA含量 (mg/L)} = \frac{\Delta A_s}{\Delta A_{11}} \times C_s \text{ (mg/L)}$$