



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101000349 B

(45) 授权公告日 2011.08.24

(21) 申请号 200610155721.5

(22) 申请日 2006.12.31

(73) 专利权人 浙江伊利康生物技术有限公司

地址 325011 浙江省温州市经济技术开发区  
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 33/53 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1752107 A, 2006.03.29, 权利要求 1, 6、  
说明书第 6 页 A 部分第 1 段, 说明书第 7 页 B 部  
分第 2 段.

孙丽凤等. 血清前白蛋白检测及其临床意

义. 《中国实验诊断学》. 2005, 第 9 卷 (第 5  
期), 753.

徐旭等. 血清前白蛋白与白蛋白测定结果  
比较分析及临床应用探讨. 《临床和实验医学杂  
志》. 2002, 第 1 卷 (第 4 期), 234-236.

审查员 周茂新

权利要求书 1 页 说明书 6 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:

1)、PA 反应剂

磷酸盐缓冲液 100mmol/L,聚氧乙烯月桂醚 5%,NaCl 20%,PEG-6000 40%,广谱杀菌剂 3%,溴化己二甲胺 0.3%,乙二胺四乙酸二钠 0.5%,其中,所述百分含量比例均为与 PA 反应剂的重量百分比;

2)、抗 PA 抗体试剂

PA 反应剂 500ml,兔抗人 PA 抗血清 100ml,丁基羟基茴香醚 2%,甘露糖醇 5%,其中,丁基羟基茴香醚和甘露糖醇的含量比例均为与兔抗人 PA 抗血清的重量百分比;

3)、液体血清型 PA 恒定值校准液

缓冲液 CAPSO 100mmol/L,广谱杀菌剂 2mmol/L,乙二胺四乙酸二钠 2mmol/L,牛血清白蛋白 3mmol/L,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,然后用 0.22  $\mu$ m 的滤膜抽滤除菌,放 2-8℃保存。

## 前白蛋白检测试剂盒

### 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

[0002] 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。

[0003] 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

[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。

[0005] 本发明提供的技术方案是:

[0006] 前白蛋白检测试剂盒,包括以下成份:

[0007] 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;

[0008] 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;

[0009] 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。

[0010] 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。

[0011] 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。

[0012] 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

[0013] 前白蛋白检测试剂盒,包括以下成份:

[0014] 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);

[0015] 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。

[0016] 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、聚氧乙烯辛基苯基醚、聚氧乙烷基苯基醚、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。

[0017] 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)。

[0018] 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。

[0019] 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。

[0020] 作为反应促进剂的实例可以是溴化己二甲胺、聚凝胺。

[0021] 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。

[0022] 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;

[0023] 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。

[0024] 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;

[0025] 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。

[0026] 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。

[0027] 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

[0028] 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;其中的防霉剂的实例有丙酸钠、脱氧乙酸等,也可单独使用或几种混合使用。

[0029] 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。

[0030] 可以单独使用或几种混合使用。

[0031] 以上所述的所有生化原料和试剂均可外购获得。

[0032] 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 550-700g/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。

[0033] 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。

[0034] PA 检测试剂的制备实施例:

[0035] 实施例一

[0036] 1、PA 反应剂(R1)

[0037] 磷酸盐缓冲液 100mmol/L

[0038] 聚氧乙烯月桂醚(表面活性剂) 5%

[0039] NaCl(电解质) 20%

[0040] PEG-6000(高分子加速剂) 40%

[0041] 广谱杀菌剂(防腐剂) 3%

[0042] 溴化己二甲胺(反应促进剂) 0.3%

[0043] 乙二胺四乙酸二钠(稳定剂) 0.5%

[0044] 2、抗 PA 抗体试剂(R2)

[0045] 反应剂(样品稀释液) 500ml

[0046] 兔抗人 PA 抗血清 100ml

[0047] 丁基羟基茴香醚(抗氧化剂) 2%

[0048] 甘露糖醇(稳定剂) 5%

[0049] 3、液体血清型 PA 恒定值校准液

[0050] 缓冲液 CAPSO 100mmol/L

[0051] 防腐剂 广谱杀菌剂 2mmol/L

[0052] 稳定剂 乙二胺四乙酸二钠 2mmol/L

[0053] 稳定剂 牛血清白蛋白 3mmol/L.

[0054] 防霉剂 丙酸钠 2mmol/L

[0055] 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。

[0056] 也可将(R1)与(R2)按 3:1 的比例混合,以作为单一试剂使用。

## [0057] 实施例二

## [0058] 1、PA 反应剂 (R1)

[0059] 磷酸盐缓冲液 5mmol/L

[0060] 聚氧乙烯月桂醚 (表面活性剂) 0.1%

[0061] NaCl (电解质) 0.1%

[0062] PEG-6000 (高分子加速剂) 20%

[0063] 广谱杀菌剂 (防腐剂) 0.1%

[0064] 聚凝胺 (反应促进剂) 0.1%

[0065] 乙二胺四乙酸二钠 (稳定剂) 0.1%

## [0066] 2、抗 PA 抗体试剂 (R2)

[0067] 反应剂 (样品稀释液) 5000ml

[0068] 羊抗人 PA 抗血清 100ml

[0069] 丁基羟基茴香醚 (抗氧化剂) 0.001%

[0070] 氯化镁 (稳定剂) 1%

## [0071] 3、液体血清型恒定值 PA 校准液

[0072] 缓冲液 CAPSO 20mmol/L

[0073] 防腐剂 广谱杀菌剂 0.01mmol/L

[0074] 稳定剂 丙三醇 0.1mmol/L

[0075] 稳定剂 牛血清白蛋白 0.01mmol/L.

[0076] 防腐剂 脱氧乙酸 0.01mmol/L

[0077] 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  $\mu\text{m}$  的滤膜抽滤除菌, 放 2-8℃ 保存。

[0078] 也可将 (R1) 与 (R2) 按 3:1 的比例混合, 以作为单一试剂使用。

## [0079] 实施例三

## [0080] 1、PA 反应剂 (R1)

[0081] 磷酸盐缓冲液 200mmol/L

[0082] 聚氧乙烯月桂醚 (表面活性剂) 10%

[0083] NaCl (电解质) 40%

[0084] PEG-6000 (高分子加速剂) 80%

[0085] 广谱杀菌剂 (防腐剂) 5%

[0086] 聚凝胺 (反应促进剂) 0.5%

[0087] 乙二胺四乙酸二钠 (稳定剂) 1%

## [0088] 2、抗 PA 抗体试剂 (R2)

[0089] 反应剂 (样品稀释液) 5000ml

[0090] 鼠抗人 PA 抗血清 50ml

[0091] 二丁基羟基甲苯 (抗氧化剂) 5%

[0092] 丙三醇 (稳定剂) 20%

## [0093] 3、液体血清型恒定值 PA 校准液

- [0094] 缓冲液 CAPSO 100mmol/L  
 [0095] 防腐剂 广谱杀菌剂 19mmol/L  
 [0096] 稳定剂 乙二胺四乙酸二钠 45mmol/L  
 [0097] 稳定剂 牛血清白蛋白 5mmol/L  
 [0098] 防腐剂 丙酸钠 19mmol/L

[0099] 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。

[0100] 也可将 (R1) 与 (R2 按 3:1 的比例混合，以作为单一试剂使用。

[0101] 以下描述测定的具体操作步骤：

[0102] 一、双试剂基本操作：

[0103]

| 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> 。 |     |     |     |

[0104] （仪器：具有 340nm 波长，37℃ 恒温装置的生化分析仪）

[0105] 结果计算：

[0106]

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

[0107] 式中：ΔA<sub>u</sub> 以空白管吸光度为对照的样品管吸光度

[0108] ΔA<sub>s</sub> 以空白管吸光度为对照的校准管吸光度

[0109] C<sub>s</sub> 校准液中 PA 的浓度

[0110] 二、单试剂基本操作：

[0111]

| 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。 |     |     |     |

[0112] (仪器: 具有 340nm 波长, 37℃恒温装置的生化分析仪)

[0113] 结果计算:

[0114]

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

[0115] 式中:  $\Delta A_u$  以空白管吸光度为对照的样品管吸光度

[0116]  $\Delta A_s$  以空白管吸光度为对照的校准管吸光度

[0117]  $C_s$  校准液中 PA 的浓度

[0118] 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="#">CN101000349B</a>                   | 公开(公告)日 | 2011-08-24 |
| 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)  | 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         | G01N33/53 G01N33/68                            |         |            |
| 代理人(译)         | 王洪新                                            |         |            |
| 其他公开文献         | CN101000349A                                   |         |            |
| 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。

| 加入物                                                        | 空白管 | 校准管 | 样品管 |
|------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| RI (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>1</sub> 。 |     |     |     |