



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109738623 A

(43)申请公布日 2019.05.10

(21)申请号 201811637092.9

(22)申请日 2018.12.29

(71)申请人 中拓生物有限公司

地址 276000 山东省临沂市罗庄区创新大厦A座

(72)发明人 解苇生 王飞 刘安娜 隗勇

(74)专利代理机构 济南泉城专利商标事务所  
37218

代理人 王翠翠

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/537(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

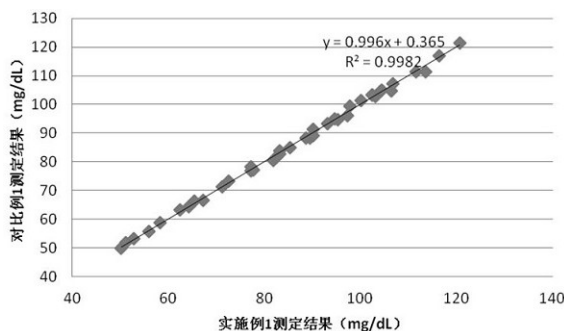
权利要求书2页 说明书9页 附图3页

## (54)发明名称

一种血清α1-酸性糖蛋白测定试剂盒

## (57)摘要

本发明公开了一种血清α1-酸性糖蛋白测定试剂盒,该试剂盒含有试剂R1、试剂R2和校准品,其中试剂R1组成为:缓冲液、氯化钠、聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒;试剂R2组成为:缓冲液、羊抗人α1-酸性糖蛋白抗体、表面活性剂、稳定剂、防腐剂;校准品组成为:缓冲液、α1-酸性糖蛋白抗原、牛血清白蛋白、甘露醇、叠氮钠;同时公开了试剂盒的应用。本发明的α1-酸性糖蛋白为液体双试剂,无需复溶配制,开瓶可以直接使用。通过在试剂R1中加入聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒,提高了磁性纳米粒子的稳定性,抗体在磁性纳米颗粒上形成凝集,大大的提高了试剂的分析灵敏度。试剂R2中加入牛血清白蛋白和甘油,提高了试剂的稳定性。



1. 一种 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白测定试剂盒,其特征在于,该试剂盒含有试剂R1、试剂R2和校准品,其中试剂R1组成为:

|               |               |
|---------------|---------------|
| 缓冲液           | 10~20mmol/L   |
| 氯化钠           | 100~150mmol/L |
| 聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒 | 0.1%-2%       |

试剂R2组成为:

|                         |             |
|-------------------------|-------------|
| 缓冲液                     | 10~20mmol/L |
| 羊抗人 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白抗体 | 20~40mg/ml  |
| 表面活性剂                   | 0.1 ~10 g/L |
| 稳定剂                     | 0.1 ~10 g/L |
| 防腐剂                     | 0.1 ~10 g/L |

校准品组成为:

|                     |               |
|---------------------|---------------|
| 缓冲液                 | 10~500 mmol/L |
| $\alpha 1$ -酸性糖蛋白抗原 | 10~15mg/ml    |
| 牛血清白蛋白              | 0.1~10g/L     |
| 甘露醇                 | 0.1~10g/L     |
| 叠氮钠                 | 0.1~10g/L。    |

2. 根据权利要求1所述的 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白测定试剂盒,其特征在于,所述试剂R1 中的聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒为  $Fe_3O_4$  /PEG 复合纳米粒子,粒径为 20-50nm。

3. 根据权利要求2所述的 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白测定试剂盒,其特征在于,聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒是采用以下方法制备的:

采用共沉淀法进行制备聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒:称取 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 和 $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ ,溶解于去离子水中,机械搅拌10min混匀,然后加入PEG4000溶液,在氮气保护下,快速滴加浓氨水至pH=9,水浴60°C,进行强力搅拌,反应50min,冷却并自然降至室温;之后将最终的反应产物离心分离,用去离子水洗涤至pH=7,用 $AgNO_3$ 滴定至滤液无白色沉淀产生,并将产物用超声分散到去离子水中,即可得到聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒为  $Fe_3O_4$  /PEG 复合纳米粒子,所得纳米粒子的平均粒径为37nm。

4. 根据权利要求1所述的 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白测定试剂盒,其特征在于,所述的 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白抗体种类为多克隆抗体或单克隆抗体。

5. 根据权利要求1所述的 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白测定试剂盒,其特征在于,所述试剂R1的 pH为6.0-8.0,试剂 R2 中的的pH为5.5-8.5,校准品的pH为5.0-7.0。

6. 根据权利要求1所述的 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白测定试剂盒,其特征在于,所述试剂R1 中的缓冲液为磷酸盐溶液、三羟甲基氨基甲烷缓冲液、甘氨酸缓冲液和HEPES缓冲液中的一种或多种;所述试剂R2 中的缓冲液为磷酸盐溶液、三羟甲基氨基甲烷缓冲液、甘氨酸缓冲液和HEPES缓冲液中的一种或多种;所述校准品中的缓冲液为磷酸盐溶液、三羟甲基氨基甲烷缓冲液、甘氨酸缓冲液和HEPES缓冲液中的一种或多种。

7. 根据权利要求1所述的 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白测定试剂盒,其特征在于,所述试剂R2中的稳定剂为牛血清白蛋白、甘油。

8. 根据权利要求1所述的 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白测定试剂盒,其特征在于,所述试剂R2中的表

面活性剂为曲拉通系列、吐温系列和brij-35中的一种或多种；所述试剂R2中的防腐剂为叠氮钠、proclin300和卡松中的一种或多种。

9. 根据权利要求1所述的 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白测定试剂盒，其特征在于，所述试剂R1与试剂R2的体积比为 1~5:1，优选体积比为 4:1。

10. 一种权利要求1-9之一所述的 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白测定试剂盒的应用，用于非疾病的诊断和治疗目的测定 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白的浓度。

## 一种血清 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白测定试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医学免疫体外诊断试剂领域,特别涉及一种 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白测定试剂盒,还涉及所述 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白测定试剂盒的制备方法和应用。

### 背景技术

[0002]  $\alpha$ 1-酸性糖蛋白( $\alpha$ 1-acidglycoprotein, AAG, 早期称之为乳清类粘蛋白)分子量近4万,含糖约45%,pI为2.7-3.5,包括等分子的己糖、己糖胺和唾液酸,是人类血液中含糖量最高,酸性最强的糖蛋白,由于AAG基因结构及氨基酸序列与视黄醛结合蛋白及 $\beta$ 1-微球蛋白类似,被认为是lipocalin超家族一员。

[0003]  $\alpha$ 1-酸性糖蛋白是主要的急性时相反应蛋白,当受到炎症刺激后,AAG浓度可以迅速升高,是比较敏感的急性期反应的炎症标志物,其对炎症和感染的反应早于体温和白细胞数的变化。AAG又是多种药物的主要结合蛋白,其浓度的变化将影响药物的代谢,因此,测定AAG对指导临床用药有重要意义。AAG主要由肝脏合成,癌细胞也可合成,当肝脏有实质性损伤时,合成减少,导致血中水平的降低,急性胆囊炎、急性胆管炎、胰腺囊肿等所引起的阻塞性黄疸患者AAG均增高,可用于肝细胞性黄疸的鉴别诊断;恶性肿瘤细胞会产生酸性糖蛋白,在肿瘤转移时升高更明显。国内外许多文献报道,肝硬化时 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白下降,而肝癌时 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白上升,所以 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白可以很好的在肝硬化患者中诊断肝癌。临床最常用的肝癌实验室检测指标是甲胎蛋白(AFP),但是AFP的灵敏度只有60%~70%,如果AFP联合AAG检测,可以提高检测灵敏度到90%以上。

[0004] 目前测定 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白(AAG)的方法主要有酶联免疫法和免疫比浊法。酶联免疫法需要手工操作,耗时较长,步骤比较繁琐,价格不菲。免疫比浊法是抗原抗体结合动态测定方法,当抗原与抗体在特殊稀释系统中反应而且比例合适(一般规定抗体过量)时,形成的可溶性免疫复合物,使反应液出现浊度。当抗体浓度固定时,形成的免疫复合物的量随着检样中抗原量的增加而增加,反应液的浊度也随之增加。通过测定反应液的浊度与一系列标准品对照,即可计算出检样中抗原的含量。免疫比浊法不需要昂贵的设备,可广泛的应用于全自动生化分析仪,测定大量标本,因此受到临床广泛推广。但目前市场上线性范围好、灵敏度高的 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白测定试剂盒,样本仅限于尿液,无法检测人血清中 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白(例如CN 105403712 A和CN 105628942 A中所公开的试剂盒),而用于检测人血清中 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白(例如CN 103076456 A中所公开的试剂盒)的试剂盒存在稳定性不好、灵敏度低的问题,本发明所要解决的技术问题是提供一种灵敏度高、线性范围好、稳定性强,能够批量检测血清样本的 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白测定试剂盒。

### 发明内容

[0005] 为了解决上述问题,本发明提供一种 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白测定试剂盒和应用,该试剂盒是一种灵敏度高、线性范围好、稳定性好的液体试剂盒。

[0006] 本发明是通过以下技术方案实现的:

一种 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白测定试剂盒,该试剂盒含有试剂R1、试剂R2和校准品,其中试剂R1组成为:

|               |               |
|---------------|---------------|
| 缓冲液           | 10~20mmol/L   |
| 氯化钠           | 100~150mmol/L |
| 聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒 | 0.1%-2%       |

试剂R2组成为:

|                         |             |
|-------------------------|-------------|
| 缓冲液                     | 10~20mmol/L |
| 羊抗人 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白抗体 | 20~40mg/ml  |
| 表面活性剂                   | 0.1 ~10 g/L |
| 稳定剂                     | 0.1 ~10 g/L |
| 防腐剂                     | 0.1 ~10 g/L |

校准品组成为:

|                     |               |
|---------------------|---------------|
| 缓冲液                 | 10~500 mmol/L |
| $\alpha 1$ -酸性糖蛋白抗原 | 10~15mg/ml    |
| 牛血清白蛋白              | 0.1~10g/L     |
| 甘露醇                 | 0.1~10g/L     |
| 叠氮钠                 | 0.1~10g/L     |

优选地,所述试剂R1 中的聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒为  $Fe_3O_4$  /PEG 复合纳米粒子,粒径为 20-50nm。

[0007] 优选地,聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒是采用以下方法制备的:

采用共沉淀法进行制备聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒:称取 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 和 $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ ,溶解于去离子水中,机械搅拌10min混匀,然后加入PEG4000溶液,在氮气保护下,快速滴加浓氨水至pH=9,水浴60℃,进行强力搅拌,反应50min,冷却并自然降至室温;之后将最终的反应产物离心分离,用去离子水洗涤至pH=7,用 $AgNO_3$ 滴定至滤液无白色沉淀产生,并将产物用超声分散到去离子水中,即可得到聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒为  $Fe_3O_4$  /PEG 复合纳米粒子,所得纳米粒子的平均粒径为37nm。

[0008] 优选地,所述的 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白抗体种类为多克隆抗体或单克隆抗体。

[0009] 优选地,所述试剂R1的 pH 为6.0-8.0,试剂 R2 中的pH为5.5-8.5,校准品的pH为5.0-7.0。

[0010] 优选地,所述试剂R1 中的缓冲液为磷酸盐溶液、三羟甲基氨基甲烷缓冲液、甘氨酸缓冲液和HEPES缓冲液中的一种或多种;所述试剂R2 中的缓冲液为磷酸盐溶液、三羟甲基氨基甲烷缓冲液、甘氨酸缓冲液和HEPES缓冲液中的一种或多种;所述校准品中的缓冲液为磷酸盐溶液、三羟甲基氨基甲烷缓冲液、甘氨酸缓冲液和HEPES缓冲液中的一种或多种。

[0011] 优选地,所述试剂R2中的稳定剂为牛血清白蛋白、甘油。

[0012] 优选地,所述试剂R2中的表面活性剂为曲拉通系列、吐温系列和brij-35中的一种或多种;所述试剂R2中的防腐剂为叠氮钠、proclin300和卡松中的一种或多种;

优选地,所述试剂R1与试剂R2的体积比为 1~5:1,更优选体积比为 4:1。

[0013] 上述所述的 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白测定试剂盒的应用,用于非疾病的诊断和治疗目的测定 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白的浓度。

## [0014] 有益效果

1) 本发明的 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白为液体双试剂,无需复溶配制,开瓶可以直接使用。

[0015] 2) 通过在试剂 R1 中加入聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒,利用聚乙二醇进行纳米粒子的表面修饰,提高了磁性纳米粒子的稳定性,还能提高其在水溶液中的分散性和生物相容性和靶向性,可有效避免纳米粒子的团聚及氧化,在静电吸附的作用下与羊抗人 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白抗体结合,从而使抗体在磁性纳米颗粒上形成凝集,大大的提高了试剂的分析灵敏度。

[0016] 3) 试剂 R2中加入牛血清白蛋白和甘油,加入甘油可增加抗体的稳定性;加入BSA可减少抗体由于管壁吸附造成的损失,而且蛋白在高浓度时更不容易降解,进一步提高了试剂的稳定性。

## 附图说明

[0017] 图1为对比例1和实施例1的相关性曲线;

图2实施例1的线性曲线;

图3对比例1的线性曲线;

图4对比例2的线性曲线;

图5实施例1和对比例4、对比例5的稳定性试验。

## 具体实施方式

[0018] 下面对本发明的实施例作详细说明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0019] 本发明试剂盒测定血清中 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白的测试条件为:方法:终点法;主/副波长:340nm/405nm;温度:37°C;校正类型:线性;校准方法:多点定标;反应方向:向上。

[0020] 具体操作如表1所示。

[0021] 表1  $\alpha$ 1-酸性糖蛋白测定试剂操作步骤

|                                     |             |
|-------------------------------------|-------------|
| 样品(标准)                              | 3 $\mu$ L   |
| R1                                  | 240 $\mu$ L |
| 混匀, 37°C孵育3~5分钟                     |             |
| R2                                  | 60 $\mu$ L  |
| 混匀, 延迟0.5分钟, 连续监测2分钟, 计算 $\Delta A$ |             |

计算结果:

$$\text{样品浓度} = \frac{\text{样品} \Delta A}{\text{标准} \Delta A} \times \text{标准浓度}$$

样本要求:

1. 新鲜血清作为样本。

[0022] 2. 4°C或-20°C可稳定10天。

[0023] 实施例 1

一种 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白免疫比浊法检测试剂盒,它包括试剂 R1、试剂 R2、校准品。

[0024] 其中试剂 R1 组成为 :

|               |           |
|---------------|-----------|
| 磷酸盐缓冲液        | 18mmol/L  |
| 氯化钠           | 110mmol/L |
| 聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒 | 1%        |
| pH            | 7.5       |

试剂R2组成为:

|                        |          |
|------------------------|----------|
| 磷酸盐缓冲液                 | 15mmol/L |
| 羊抗人 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白抗体 | 32mg/ml  |
| 曲拉通100                 | 1 g/L    |
| 牛血清白蛋白                 | 1 g/L    |
| 卡松                     | 1 g/L    |
| pH                     | 6.0      |

校准品组成为:

|                    |          |
|--------------------|----------|
| 磷酸盐缓冲液             | 25mmol/L |
| $\alpha$ 1-酸性糖蛋白抗原 | 13mg/ml  |
| 牛血清白蛋白             | 1g/L     |
| 甘露醇                | 1g/L     |
| 叠氮钠                | 1g/L     |
| pH                 | 5.5      |

上述 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白测定试剂的制备方法,包括如下步骤:

(a) 聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒的制备:称取9g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和9g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,溶解于200ml去离子水中,机械搅拌10min混匀,然后加入30% PEG4000溶液,在氮气保护下,快速滴加浓氨水至pH=9,水浴60 $^{\circ}\text{C}$ ,进行强力搅拌,反应50min,冷却并自然降至室温;之后将最终的反应产物离心分离,用去离子水洗涤至pH=7,用44mmol/L的  $\text{AgNO}_3$ 滴定至滤液无白色沉淀产生,并将产物用超声分散到去离子水中,即可得到聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒为 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PEG}$  复合纳米粒子,所得纳米粒子的平均粒径为37nm。

[0025] 试剂R1的配制,量取配制体积等体积的纯化水,选取磷酸盐缓冲液,其终浓度为18mmol/L,按配制体积计算并称取适量的磷酸盐加入,调节pH至7.5,按配制体积计算并称取适量的聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒,终浓度为1%;按配制体积计算并称取适量的氯化钠,终浓度为110mmol/L,搅拌均匀即为试剂R1。

[0026] (b) 试剂R2的配制,量取配制体积等体积的纯化水,选取磷酸盐缓冲液,其终浓度为15mmol/L,按配制体积计算并称取适量的磷酸盐加入,调节pH至6.0,按配制体积计算并称取适量的羊抗人 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白抗体,终浓度为32mg/ml;按配制体积计算并称取适量的牛血清白蛋白、卡松等,搅拌均匀即为试剂R2。

[0027] (c) 校准品的配制,量取配制体积等体积的纯化水,选取磷酸盐缓冲液,其终浓度为25mmol/L,按配制体积计算并称取适量的磷酸盐加入,调节pH至5.5,按配制体积计算并称取适量的纯品 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白抗原,终浓度为13mg/ml;按配制体积计算并称取适量的牛血清白蛋白、甘露醇、叠氮钠等,搅拌均匀即为校准品。

## [0028] 实施例2

试剂 R1 组成为：

|               |           |
|---------------|-----------|
| 磷酸盐缓冲液        | 20mmol/L  |
| 氯化钠           | 110mmol/L |
| 聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒 | 1%        |
| pH            | 7.5       |

试剂R2组成为：

|                        |          |
|------------------------|----------|
| 磷酸盐缓冲液                 | 15mmol/L |
| 羊抗人 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白抗体 | 30mg/ml  |
| 吐温-20                  | 1 g/L    |
| 牛血清白蛋白                 | 1 g/L    |
| proclin300             | 1 g/L    |
| pH                     | 6.0      |

校准品组成为：

|                    |          |
|--------------------|----------|
| 磷酸盐缓冲液             | 25mmol/L |
| $\alpha$ 1-酸性糖蛋白抗原 | 13mg/ml  |
| 牛血清白蛋白             | 1g/L     |
| 甘露醇                | 1g/L     |
| 叠氮钠                | 1g/L     |
| pH                 | 5.5      |

制备方法同实施例1。

## [0029] 实施例3

试剂 R1 组成为：

|               |           |
|---------------|-----------|
| 磷酸盐缓冲液        | 20mmol/L  |
| 氯化钠           | 110mmol/L |
| 聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒 | 1.5%      |
| pH            | 7.5       |

试剂R2组成为：

|                        |          |
|------------------------|----------|
| 磷酸盐缓冲液                 | 15mmol/L |
| 羊抗人 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白抗体 | 32mg/ml  |
| TritonX-100            | 1 g/L    |
| 牛血清白蛋白                 | 1 g/L    |
| proclin300             | 1 g/L    |
| pH                     | 6.0      |

校准品组成为：

|                    |          |
|--------------------|----------|
| 磷酸盐缓冲液             | 25mmol/L |
| $\alpha$ 1-酸性糖蛋白抗原 | 13mg/ml  |
| 牛血清白蛋白             | 1g/L     |
| 甘露醇                | 1g/L     |

|     |      |
|-----|------|
| 叠氮钠 | 1g/L |
| pH  | 5.5  |

制备方法同实施例1。

#### [0030] 对比例1

进口朗道 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白测定试剂盒

对比例2

专利CN 103076456 A所采用的的 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白测定试剂盒

试剂R1组成为：

|          |        |
|----------|--------|
| TRIS缓冲液  | 100mM  |
| 氯化钠      | 8.5g/L |
| 乙二醇聚氧乙烯醚 | 40g/L  |
| 乙二胺四乙酸二钠 | 7g/L   |
| 叠氮钠      | 3g/L   |
| 吐温20     | 2g/L   |
| pH       | 7.5    |

试剂R2组成为：

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| 羊抗人 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白抗体 | 20% (w/v) |
| TRIS缓冲液                | 40mM      |
| 氯化钠                    | 8.5g/L    |
| 叠氮钠                    | 7g/L      |
| pH                     | 8.0       |

对比例3

与实施例1中 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白测定试剂盒的区别仅在于试剂1不含有聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒,其它与实施例1相同。

#### [0031] 对比例4

与实施例1中 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白测定试剂盒的区别仅在于试剂2不含有牛血清白蛋白,其它与实施例 1 相同。

#### [0032] 对比例5

与实施例1中 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白测定试剂盒的区别仅在于试剂2中的不含有甘油,其它与实施例 1 相同。

#### [0033] 性能验证

试验一

将实施例1和对比例1进行相关性试验,试验方案为:实施例1和对比例1,同时检测了40个临床血清样本,检测结果如表2所示,对检测结果进行相关性分析,计算相关系数 $r$ ;以对比对比例1检测结果作为靶值,分别计算40对数据的相对偏差(Bias%)。要求 $r$ 不小于0.990,相对偏差不超过 $\pm 10\%$ 。

#### [0034] 表2相关性对比实验结果

| 样本号    | 对比例 1<br>(mg/dL) | 实施例 1<br>(mg/dL) | 实施例 1 与对比例<br>1 相对偏差% |
|--------|------------------|------------------|-----------------------|
| 1      | 106.4            | 104.8            | 1.53                  |
| 2      | 67.3             | 66.7             | 0.90                  |
| 3      | 102.5            | 103.2            | -0.68                 |
| 4      | 83.2             | 82.7             | 0.60                  |
| 5      | 65.4             | 66.2             | -1.21                 |
| 6      | 90.2             | 91.3             | -1.20                 |
| 7      | 77.2             | 78.4             | -1.53                 |
| 8      | 89.5             | 88.4             | 1.24                  |
| 9      | 77.3             | 76.9             | 0.52                  |
| 10     | 64.2             | 64.5             | -0.47                 |
| 11     | 97.3             | 96.2             | 1.14                  |
| 12     | 100.2            | 101.4            | -1.18                 |
| 13     | 103.1            | 102.9            | 0.19                  |
| 14     | 88.6             | 88.2             | 0.45                  |
| 15     | 111.6            | 111.4            | 0.18                  |
| 16     | 81.9             | 80.6             | 1.61                  |
| 17     | 97.8             | 99.3             | -1.51                 |
| 18     | 95.3             | 94.6             | 0.74                  |
| 19     | 50.2             | 49.8             | 0.80                  |
| 20     | 113.5            | 111.5            | 1.79                  |
| 21     | 83.2             | 83.8             | -0.72                 |
| 22     | 71.2             | 71.4             | -0.28                 |
| 23     | 58.3             | 58.9             | -1.02                 |
| 24     | 102.5            | 103.4            | -0.87                 |
| 25     | 85.4             | 84.9             | 0.59                  |
| 26     | 51.2             | 51.8             | -1.16                 |
| 27     | 82.5             | 81.7             | 0.98                  |
| 28     | 90.2             | 89.2             | 1.12                  |
| 29     | 104.3            | 104.6            | -0.29                 |
| 30     | 55.9             | 55.7             | 0.36                  |
| 31     | 62.5             | 63.2             | -1.11                 |
| 32     | 94.6             | 94.9             | -0.32                 |
| 33     | 104.5            | 105.1            | -0.57                 |
| 34     | 116.4            | 116.9            | -0.43                 |
| 35     | 106.8            | 107.2            | -0.37                 |
| 36     | 120.7            | 121.3            | -0.49                 |
| 37     | 52.9             | 53.2             | -0.56                 |
| 38     | 93.2             | 93.4             | -0.21                 |
| 39     | 72.5             | 73.2             | -0.96                 |
| 40     | 77.7             | 77.3             | 0.52                  |
| 相关系数 R |                  | 0.9982           |                       |

通过表2和图1的检测数据可知,实施例1 检测试剂盒与对比例1检测试剂盒的检测结果相关性分别为 0.9982,相关性比较好,表明本发明的试剂盒与市场上获得认可的具有优异准确度的 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白测定试剂盒有高度一致性,因此本发明提供的实施例1检测试剂与的进口检测试剂相关性良好,完全可以替代进口试剂。

#### [0035] 试验二

取 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白150 mg/dL的高值质控,并进行稀释,配制6个不同浓度的样本,依次

为150 mg/dL、120 mg/dL、90 mg/dL、60 mg/dL、30 mg/dL、0mg/dL浓度的样本,用实施例1和对比例1的试剂进行检测。每个浓度水平各样本分别测定三次,分别取其平均值。检测结果如表所示:

表3 线性相关验证实验检测结果

| 理论浓度 (mg/dL) | 实施例 1 检测结果 | 对比例 1 检测结果 | 对比例 2 检测结果 |
|--------------|------------|------------|------------|
| 0            | 0.12       | 0.08       | 0.23       |
| 30           | 30.2       | 29.8       | 29.2       |
| 60           | 59.6       | 60.3       | 62.1       |
| 90           | 91.6       | 89.7       | 88.9       |
| 120          | 119.7      | 121.5      | 118.6      |
| 150          | 152.3      | 149.6      | 152.9      |
| 相关系数 r       | 0.9997     | 0.9998     | 0.9991     |

由表3和图2、3、4可以看出,上述检测结果显示,实施例 1和对比例1、2检测结果相关性均大于 0.990,但实施例1与对比例1具有更好的线性相关性,说明本发明试剂具有更好的线性相关性,线性范围较广,符合临床病例样本的要求,对于临床检验有重要意义。

#### [0036] 试验三

对实施例1和对比例4、5提供的 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白测定试剂进行稳定性试验,试验方案为:对实施例1和对比例4、5提供的试剂,一起放入 37℃水浴箱中,每天检测靶值为 $105 \pm 10.5$  mg/dL的质控品,并监测质控品测定值的变化。

[0037] 表4试剂热稳定性验证结果

| 时间 (天) | 实施例 1 试剂 | 对比例 4 试剂 | 对比例 5 试剂 |
|--------|----------|----------|----------|
| 1      | 105.9    | 106.2    | 105.3    |
| 2      | 106.2    | 103.8    | 104.6    |
| 3      | 105.3    | 102.2    | 103.9    |
| 4      | 105.7    | 99.1     | 102.8    |
| 5      | 105.4    | 95.8     | 97.8     |
| 6      | 105.6    | 90.3     | 94.2     |
| 7      | 105.7    | 87.2     | 92.1     |
| 8      | 105.8    | 83.4     | 89.2     |
| 9      | 104.9    | 80.4     | 86.3     |
| 10     | 105.4    | 78.2     | 85.1     |

由表4和图5可以看出,与对比例1相似,本发明提供的实施例1试剂在37℃水浴条件下10天内基本无变化,稳定性较好;而对比例4、5试剂在37℃水浴条件下10天内变化明显。实施例1的试剂盒稳定性优于对比实施例4、5试剂盒的稳定性,说明本发明牛血清白蛋白和甘油同时加入,对抗体有保护作用,可以协同提高 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白测定试剂盒的稳定性。

#### [0038] 试验四

用本发明 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白测定试剂盒测试已知浓度在42.3 mg/dL 的样本,记录吸光度差值。分别利用实施例 1和对比例2、3的试剂进行检测。检测结果如表5所示。

[0039] 表5 分析灵敏度检测结果

| 理论浓度       | 实施例1检测结果 $\Delta A$ | 对比例1检测结果 $\Delta A$ | 对比例2检测结果 $\Delta A$ | 对比例3检测结果 $\Delta A$ |
|------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 42.3 mg/dL | 0.053               | 0.062               | 0.025               | 0.017               |

通过检测数据可知,实施例 1 检测试剂盒的吸光度差值均比对比例 2、3 的高,说明在试剂中加入的聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒与羊抗人 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白结合后,使抗体在磁性纳米颗粒上形成凝集,扩大了响应信号,增强了反应的灵敏度,提高了检测试剂盒的分析灵敏度。

[0040] 本文中所描述的具体实施例仅仅是对本发明精神作举例说明。本发明所属技术领域的技术人员可以对所描述的具体实施例做各种修改或补充或采用类似的方式替代,但并不会偏离本发明的精神或者超越所附权利要求书所定义的范围。

[0041] 尽管对本发明已作出了详细的说明并引证了一些具体实施例,但是对本领域熟练技术人员来说,只要不离开本发明的精神和范围可作各种变化或修正是显然的。

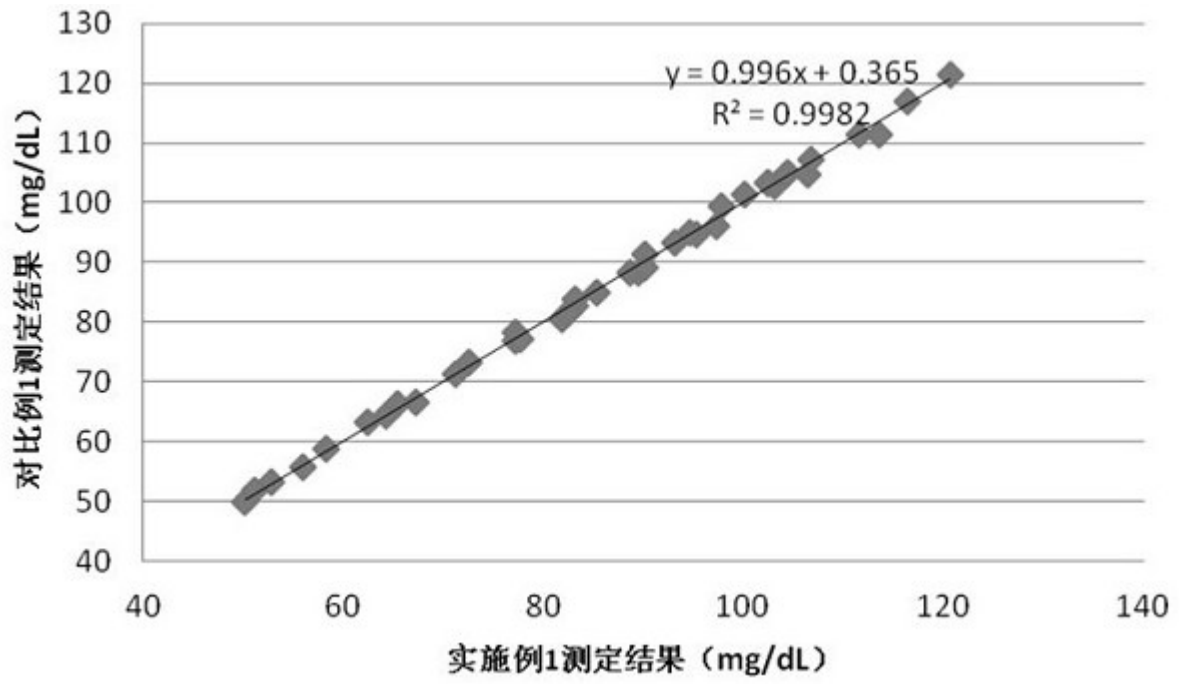


图1

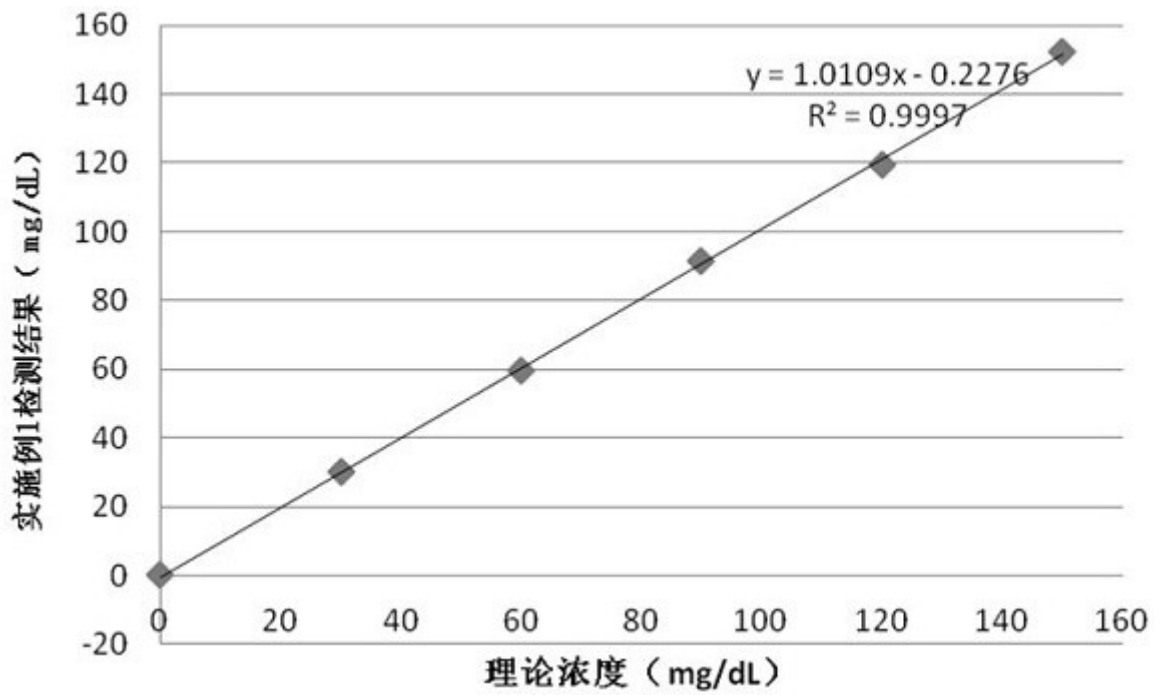


图2

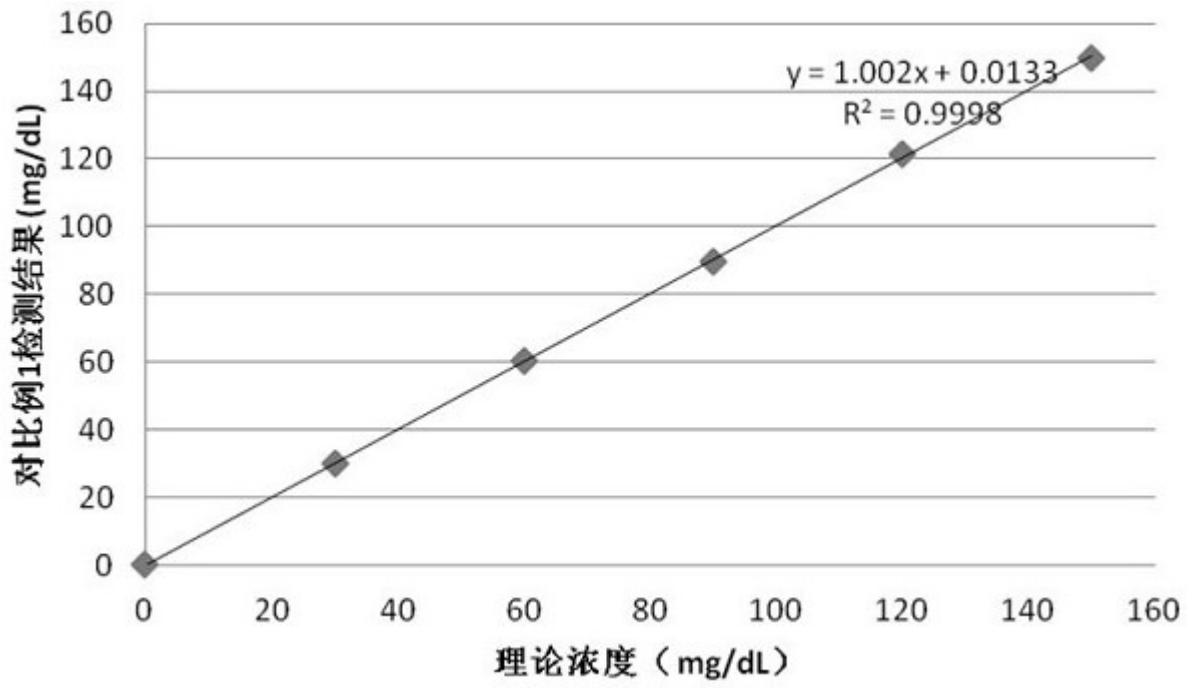


图3

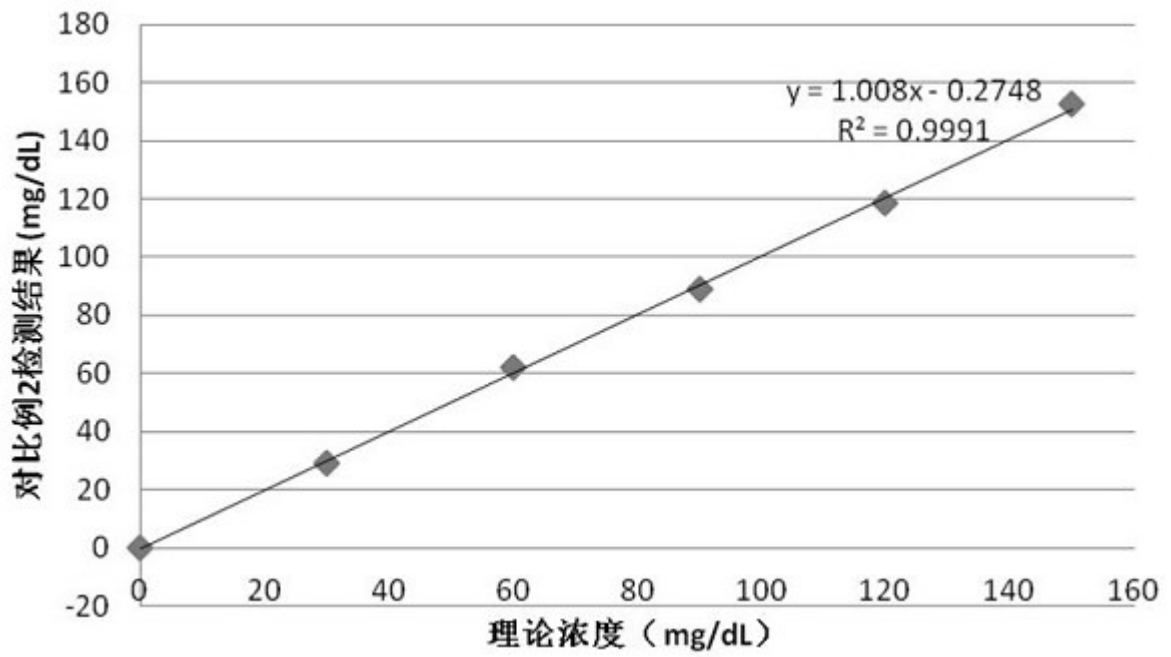


图4

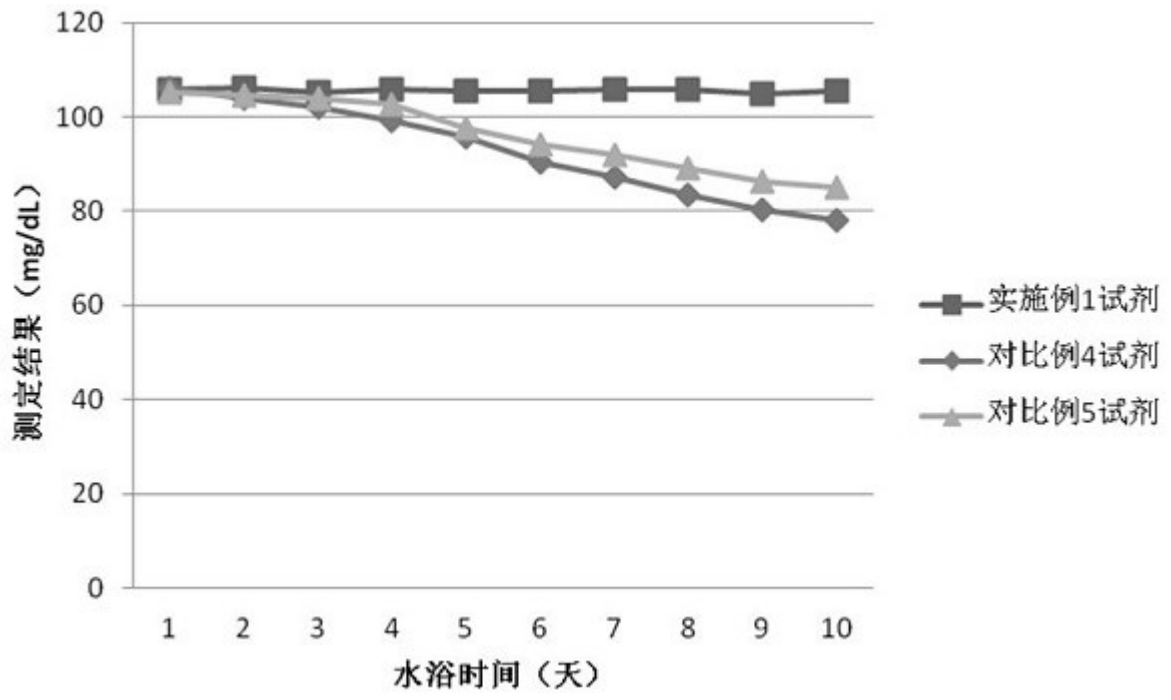


图5

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种血清α1-酸性糖蛋白测定试剂盒                              |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN109738623A</a>                   | 公开(公告)日 | 2019-05-10 |
| 申请号            | CN201811637092.9                               | 申请日     | 2018-12-29 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 中拓生物有限公司                                       |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 中拓生物有限公司                                       |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 中拓生物有限公司                                       |         |            |
| [标]发明人         | 王飞<br>刘安娜<br>隗勇                                |         |            |
| 发明人            | 解菁生<br>王飞<br>刘安娜<br>隗勇                         |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 G01N33/531 G01N33/537 G01N33/577     |         |            |
| 代理人(译)         | 王翠翠  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明公开了一种血清α1-酸性糖蛋白测定试剂盒，该试剂盒含有试剂R1、试剂R2和校准品，其中试剂R1组成为：缓冲液、氯化钠、聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒；试剂R2组成为：缓冲液、羊抗人α1-酸性糖蛋白抗体、表面活性剂、稳定剂、防腐剂；校准品组成为：缓冲液、α1-酸性糖蛋白抗原、牛血清白蛋白、甘露醇、叠氮钠；同时公开了试剂盒的应用。本发明的α1-酸性糖蛋白为液体双试剂，无需复溶配制，开瓶可以直接使用。通过在试剂R1中加入聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒，提高了磁性纳米粒子的稳定性，抗体在磁性纳米颗粒上形成凝集，大大的提高了试剂的分析灵敏度。试剂R2中加入牛血清白蛋白和甘油，提高了试剂的稳定性。

