



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104237498 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 24

(21) 申请号 201310234646. 1

(22) 申请日 2013. 06. 13

(71) 申请人 绍兴圣康生物科技有限公司

地址 312500 浙江省绍兴市新昌县梅渚镇山
头村综合大楼

(72) 发明人 石丽萍

(74) 专利代理机构 北京彭丽芳知识产权代理有
限公司 11407

代理人 彭晓云

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书5页

(54) 发明名称

胶乳增强免疫比浊法胰岛素测定试剂盒制备
方法

(57) 摘要

胶乳增强免疫比浊法胰岛素测定试剂盒制备方法, 涉及胰岛素测定试剂盒技术领域。它的制备步骤: 第一步: 设备准备; 第二步: 生产前清洁及检测; 第三步: 试剂制备; 第四部: 试剂分装; 第五步: 试剂盒组装。它利用抗原抗体反应原理测定胰岛素的含量, 标本中的胰岛素与试剂中相应的胰岛素单克隆抗体乳胶颗粒特异性反应, 结合成抗原抗体复合物, 形成一定的浊度, 浊度的高低在足量抗体存在时与标本中的胰岛素含量成正比, 测定该浊度, 与胰岛素标准曲线比较, 即能得出标本中胰岛素含量, 检测胰岛素含量防止使用过量产生抗药性。

1. 胶乳增强免疫比浊法胰岛素测定试剂盒制备方法,其特征在于它的制备方法:1、生产设备准备:混合容器:容积大于试剂生产体积的高密度聚乙烯桶4只。搅拌器:搅拌涂四氟乙烯的慢速电动搅拌器。称量设备:天平为精度 ± 0.0001 克1台。聚乙烯容器:预称原料用,有密封盖,2只。原料称量用勺、铲。pH计,定标缓冲液,具有温度补偿功能的pH计和相应的定标液。仪器,日立7060全自动生化分析仪。过滤设备,孔径 $5\mu\text{m}$ 专用。标签:用于原材料称量,标明原料名称、重量等。标牌:用于标示:1-混合容器;2-整批待检产品容器。标牌内容:产品代码、产品名称、批号、生产日期、过滤日期和操作者签名。2、生产:生产前准备:所有生产设备必须清洁。生产线清场:生产场地仅放置本批量包装试剂生产用品生产操作者穿戴防护用品:(a)清洁工作服;(b)戴口罩;(c)防护眼镜;(d)乳胶手套或一次性手套;(e)发罩。核对各种生产运行单。测定所用纯化水电导率,应小于 $2.0\mu\text{s/cm}$ 。原料包装的核对:A、名称正确;B、批号为指定使用者;C)原料物态正常。如有不符,向生产车间主任报告。签字,以示原料包装已经核对。预称:所有原料都必须预称,并由第二人核对。预称容器上有下列内容的标签:容器号、原料代码、批号、容器和盖的皮重、原料净重、预称者签名/日期/、核对者签名/日期/。按规定的计算量称取Tris 12.114g,胰岛素单克隆抗体乳胶颗粒2mg并密封容器盖。核对称取的原料量:总重量(原料+容器)=原料净重+皮重。将原料容器上的资料记录到原料记录单上。3、产品配制:混合容器和搅棒的准备;混合容器和搅棒用自来水冲洗5次;混合容器和搅棒再用去离子水冲洗3次;干燥箱烧干密封装袋备用;将电动搅拌机装配到混合容器上;在混合容器上标签,标明产品代码、批号、名称、生产量、日期和操作者。在混合容器A、B中加入生产总量90%的纯化水。在混合容器A中加入Tris 12.114g,搅拌至完全溶解。补纯化水至生产总量1L。然后用1mol/L的NaOH溶液调pH值至8.2(20℃)。用专用滤器将上述混合溶液过滤入另一混合容器C中。在混合容器B中加入胰岛素单克隆抗体乳胶颗粒2mg,搅拌至完全溶解。补纯化水至生产总量200ml。用专用滤器将上述混合溶液过滤入另一混合容器D中。从混合容器C中取出1份100ml样品,从容器D中取出1份16ml样品,作下列过程试剂:a、空白吸光度(37℃,600nm): $< 1.2A$;b、从混合容器中抽样进行半成品抽样全检。4、分装:生产环境:分装过程在十万级净化区内进行,温度10℃-26℃,湿度45%-65%。分装前清场,领取经检测合格的半成品试剂,核对领取的试剂批号是否与计划单一致,检查试剂外观是否正常,如试剂出现混浊、沉淀或颜色变化应停止分装,并报告给生产主管。领取物料:根据生产计划领取要求型号的试剂瓶、配套瓶盖、标签,准备分装工具、设备。分装过程:根据分装机型分装;称瓶重:按计划数量准备瓶,称量每十个试剂瓶的重量,要求用于分装同一批号试剂的瓶子重量相差不超过0.5g,摆瓶:按《分装作业指导书》要求进行。分装:使用蠕动泵进行分装,过程中注意防止交叉污染,且装量不低于标示装量。逐瓶进行检查盖子效果,如有漏液,不得进入下一工序。贴标签:将检查并经过核实的标签贴在试剂瓶上,按《分装作业指导书》操作。检查:检查分装瓶数、试剂装量、漏液情况、贴签情况、记录填写情况。清场:按《清场管理制度》对生产现场进行清场,并填写记录。5、组装:领料:根据生产计划领取组装胰岛素双试剂所需的说明书、纸盒、封签、合格证等物料,纸盒在组装前应先折好成型。半成品检查:将半成品逐瓶检查,执行《分装半成品检查指导书》,由QA负责。组装:执行《组装作业指导书》。将装好的试剂盒合上盖子,贴上封签、合格证,贴的位置要贴正,左右、上下等分距离。组装完成后,QA进行成品取样,每个批号成品试剂取1盒,先进行包装质量的检查、再由QC进行

内在质量的检查,执行《产品最终放行检验规范》。按《清场管理制度》清场,并填写生产记录。做好半成品、成品的入、出库手续。如半成品不能及时组装出库,应按半成品贮存要求贮存。

胶乳增强免疫比浊法胰岛素测定试剂盒制备方法

技术领域：

[0001] 本发明涉及胰岛素测定试剂盒技术领域，具体涉及胶乳增强免疫比浊法胰岛素测定试剂盒制备方法。

背景技术：

[0002] 胰岛素是由胰岛 β 细胞受内源性或外源性物质如葡萄糖、乳糖、核糖、精氨酸、胰高血糖素等的刺激而分泌的一种蛋白质激素。胰岛素是机体内唯一降低血糖的激素，同时促进糖原、脂肪、蛋白质合成。外源性胰岛素主要用来糖尿病治疗，糖尿病患者早期使用胰岛素和超强抗氧化剂如（注射用硫辛酸、口服虾青素等）有望出现较长时间的蜜月期，胰岛素注射不会有成瘾和依赖性。

[0003] 极少数病者有胰岛素抗药性，每日胰岛素需要量超过 200U，历时 48 小时以上，同时无酮症酸中毒及其他内分泌病引起的继发性糖尿病者称为胰岛素抗药性。所以对试剂胰岛素含量测定是很有必要的。

发明内容：

[0004] 本发明的目的是提供胶乳增强免疫比浊法胰岛素测定试剂盒制备方法，它利用抗原抗体反应原理测定胰岛素的含量，标本中的胰岛素与试剂中相应的胰岛素单克隆抗体乳胶颗粒特异性反应，结合成抗原抗体复合物，形成一定的浊度，浊度的高低在足量抗体存在时与标本中的胰岛素含量成正比，测定该浊度，与胰岛素标准曲线比较，即能得出标本中胰岛素含量，检测胰岛素含量防止使用过量产生抗药性。

[0005] 为了解决背景技术所存在的问题，本发明是采用以下制备方法：1、生产设备准备：混合容器：容积大于试剂生产体积的高密度聚乙烯桶 4 只。搅拌器：搅拌涂四氟乙烯的慢速电动搅拌器。称量设备：天平为精度 ± 0.0001 克 1 台。聚乙烯容器：预称原料用，有密封盖，2 只。原料称量用勺、铲。pH 计，定标缓冲液，具有温度补偿功能的 pH 计和相应的定标液。仪器，日立 7060 全自动生化分析仪。过滤设备，孔径 $5\mu\text{m}$ 专用。标签：用于原材料称量，标明原料名称、重量等。标牌：用于标示：1- 混合容器；2- 整批待检产品容器。标牌内容：产品代码、产品名称、批号、生产日期、过滤日期和操作者签名。

[0006] 2、生产：生产前准备：所有生产设备必须清洁。生产线清场：生产场地仅放置本批量包装试剂生产用品生产操作者穿戴防护用品：(a) 清洁工作服；(b) 戴口罩；(c) 防护眼镜；(d) 乳胶手套或一次性手套；(e) 发罩。核对各种生产运行单。测定所用纯化水电导率，应小于 $2.0\mu\text{s}/\text{cm}$ 。原料包装的核对：A、名称正确；B、批号为指定使用者；C) 原料物态正常。如有不符，向生产车间主任报告。签字，以示原料包装已经核对。预称：所有原料都必须预称，并由第二人核对。预称容器上有下列内容的标签：容器号、原料代码、批号、容器和盖的皮重、原料净重、预称者签名 / 日期 /、核对者签名 / 日期 /。按规定的计算量称取 Tris 12.114g，胰岛素单克隆抗体乳胶颗粒 2mg 并密封容器盖。核对称取的原料量：总重量（原料 + 容器）= 原料净重 + 皮重。将原料容器上的资料记录到原料记录单上。

[0007] 3、产品配制：混合容器和搅棒的准备；混合容器和搅棒用自来水冲洗5次；混合容器和搅棒再用去离子水冲洗3次；干燥箱烧干密封装袋备用；将电动搅拌机装配到混合容器上；在混合容器上标签，标明产品代码、批号、名称、生产量、日期和作者。在混合容器A、B中加入生产总量90%的纯化水。在混合容器A中加入Tris12.114g，搅拌至完全溶解。补纯化水至生产总量1L。然后用1mol/L的NaOH溶液调pH值至8.2(20℃)。用专用滤器将上述混合溶液过滤入另一混合容器C中。在混合容器B中加入胰岛素单克隆抗体乳胶颗粒2mg，搅拌至完全溶解。补纯化水至生产总量200ml。用专用滤器将上述混合溶液过滤入另一混合容器D中。从混合容器C中取出1份100ml样品，从容器D中取出1份16ml样品，作下列过程试剂：a、空白吸光度(37℃,600nm)：< 1.2A；b、从混合容器中抽样进行半成品抽样全检。

[0008] 4、分装：生产环境：分装过程在十万级净化区内进行，温度10℃-26℃，湿度45%-65%。分装前清场，领取经检测合格的半成品试剂，核对领取的试剂批号是否与计划单一致，检查试剂外观是否正常，如试剂出现混浊、沉淀或颜色变化应停止分装，并报告给生产主管。领取物料：根据生产计划领取要求型号的试剂瓶、配套瓶盖、标签，准备分装工具、设备。分装过程：根据分装机型分装；称瓶重：按计划数量准备瓶，称量每十个试剂瓶的重量，要求用于分装同一批号试剂的瓶子重量相差不超过0.5g，摆瓶：按《分装作业指导书》要求进行。分装：使用蠕动泵进行分装，过程中注意防止交叉污染，且装量不低于标示装量。逐瓶进行检查盖子效果，如有漏液，不得进入下一工序。贴标签：将检查并经过核实的标签贴在试剂瓶上，按《分装作业指导书》操作。检查：检查分装瓶数、试剂装量、漏液情况、贴签情况、记录填写情况。清场：按《清场管理制度》对生产现场进行清场，并填写记录。

[0009] 5、组装：领料：根据生产计划领取组装胰岛素双试剂所需的说明书、纸盒、封签、合格证等物料，纸盒在组装前应先折好成型。半成品检查：将半成品逐瓶检查，执行《分装半成品检查指导书》，由QA负责。组装：执行《组装作业指导书》。将装好的试剂盒合上盖子，贴上封签、合格证，贴的位置要贴正，左右、上下等分距离。组装完成后，QA进行成品取样，每个批号成品试剂取1盒，先进行包装质量的检查、再由QC进行内在质量的检查，执行《产品最终放行检验规范》。按《清场管理制度》清场，并填写生产记录。做好半成品、成品的入、出库手续。如半成品不能及时组装出库，应按半成品贮存要求贮存。

[0010] 本发明工作原理：本试剂盒采用的技术原理是利用抗原抗体反应原理测定胰岛素的含量。标本中的胰岛素与试剂中相应的胰岛素单克隆抗体乳胶颗粒特异性反应，结合成抗原抗体复合物，形成一定的浊度，浊度的高低在足量抗体存在时与标本中的胰岛素含量成正比，测定该浊度，与胰岛素标准曲线比较，即能得出标本中胰岛素含量。免疫比浊测定中抗原浓度与吸光度之间的线性主要取决于抗体活性、反应体系和抗体抗原的比例三个方面，所以反应体系的研究包括样本及试剂的上样量、稀释倍数，反应时间，测定波长等等反应条件

[0011] 本发明具有以下有益效果：它利用抗原抗体反应原理测定胰岛素的含量，标本中的胰岛素与试剂中相应的胰岛素单克隆抗体乳胶颗粒特异性反应，结合成抗原抗体复合物，形成一定的浊度，浊度的高低在足量抗体存在时与标本中的胰岛素含量成正比，测定该浊度，与胰岛素标准曲线比较，即能得出标本中胰岛素含量，检测胰岛素含量防止使用过量产生抗药性。

具体实施方式：

[0012] 本具体实施方式采用以下技术方案：它包含 1、生产设备准备：混合容器：容积大于试剂生产体积的高密度聚乙烯桶 4 只。搅拌器：搅拌涂四氟乙烯的慢速电动搅拌器。称量设备：天平为精度 ± 0.0001 克 1 台。聚乙烯容器：预称原料用，有密封盖，2 只。原料称量用勺、铲。pH 计，定标缓冲液，具有温度补偿功能的 pH 计和相应的定标液。仪器，日立 7060 全自动生化分析仪。过滤设备，孔径 $5\mu\text{m}$ 专用。标签：用于原材料称量，标明原料名称、重量等。标牌：用于标示：1- 混合容器；2- 整批待检产品容器。标牌内容：产品代码、产品名称、批号、生产日期、过滤日期和操作者签名。

[0013] 2、生产：生产前准备：所有生产设备必须清洁。生产线清场：生产场地仅放置本批量包装试剂生产用品生产操作者穿戴防护用品：(a) 清洁工作服；(b) 戴口罩；(c) 防护眼镜；(d) 乳胶手套或一次性手套；(e) 发罩。核对各种生产运行单。测定所用纯化水电导率，应小于 $2.0\mu\text{s}/\text{cm}$ 。原料包装的核对：A、名称正确；B、批号为指定使用者；C) 原料物态正常。如有不符，向生产车间主任报告。签字，以示原料包装已经核对。预称：所有原料都必须预称，并由第二人核对。预称容器上有下列内容的标签：容器号、原料代码、批号、容器和盖的皮重、原料净重、预称者签名 / 日期 /、核对者签名 / 日期 /。按规定的计算量称取 Tris 12.114g，胰岛素单克隆抗体乳胶颗粒 2mg 并密封容器盖。核对称取的原料量：总重量（原料 + 容器）= 原料净重 + 皮重。将原料容器上的资料记录到原料记录单上。

[0014] 3、产品配制：混合容器和搅棒的准备；混合容器和搅棒用自来水冲洗 5 次；混合容器和搅棒再用去离子水冲洗 3 次；干燥箱烧干密封袋备用；将电动搅拌机装配到混合容器上；在混合容器上标签，标明产品代码、批号、名称、生产量、日期和操作者。在混合容器 A、B 中加入生产总量 90% 的纯化水。在混合容器 A 中加入 Tris 12.114g，搅拌至完全溶解。补纯化水至生产总量 1L。然后用 1mol/L 的 NaOH 溶液调 pH 值至 8.2 (20℃)。用专用滤器将上述混合溶液过滤入另一混合容器 C 中。在混合容器 B 中加入胰岛素单克隆抗体乳胶颗粒 2mg，搅拌至完全溶解。补纯化水至生产总量 200ml。用专用滤器将上述混合溶液过滤入另一混合容器 D 中。从混合容器 C 中取出 1 份 100ml 样品，从容器 D 中取出 1 份 16ml 样品，作下列过程试剂：a、空白吸光度 (37℃, 600nm)： $< 1.2A$ ；b、从混合容器中抽样进行半成品抽样全检。

[0015] 4、分装：生产环境：分装过程在十万级净化区内进行，温度 10℃ -26℃，湿度 45% -65%。分装前清场，领取经检测合格的半成品试剂，核对领取的试剂批号是否与计划单一致，检查试剂外观是否正常，如试剂出现混浊、沉淀或颜色变化应停止分装，并报告给生产主管。领取物料：根据生产计划领取要求型号的试剂瓶、配套瓶盖、标签，准备分装工具、设备。分装过程：根据分装机型分装；称瓶重：按计划数量准备瓶，称量每十个试剂瓶的重量，要求用于分装同一批号试剂的瓶子重量相差不超过 0.5g，摆瓶：按《分装作业指导书》要求进行。分装：使用蠕动泵进行分装，过程中注意防止交叉污染，且装量不低于标示装量。逐瓶进行检查盖子效果，如有漏液，不得进入下一工序。贴标签：将检查并经过核实的标签贴在试剂瓶上，按《分装作业指导书》操作。检查：检查分装瓶数、试剂装量、漏液情况、贴签情况、记录填写情况。清场：按《清场管理制度》对生产现场进行清场，并填写记录。

[0016] 5、组装：领料：根据生产计划领取组装胰岛素双试剂所需的说明书、纸盒、封签、

合格证等物料,纸盒在组装前应先折好成型。半成品检查:将半成品逐瓶检查,执行《分装半成品检查指导书》,由 QA 负责。组装:执行《组装作业指导书》。将装好的试剂盒合上盖子,贴上封签、合格证,贴的位置要贴正,左右、上下等分距离。组装完成后,QA 进行成品取样,每个批号成品试剂取 1 盒,先进行包装质量的检查、再由 QC 进行内在质量的检查,执行《产品最终放行检验规范》。按《清场管理制度》清场,并填写生产记录。做好半成品、成品的入、出库手续。如半成品不能及时组装出库,应按半成品贮存要求贮存

[0017] 本发明工作原理:本试剂盒采用的技术原理是利用抗原抗体反应原理测定胰岛素的含量。标本中的胰岛素与试剂中相应的胰岛素单克隆抗体乳胶颗粒特异性反应,结合成抗原抗体复合物,形成一定的浊度,浊度的高低在足量抗体存在时与标本中的胰岛素含量成正比,测定该浊度,与胰岛素标准曲线比较,即能得出标本中胰岛素含量。免疫比浊测定中抗原浓度与吸光度之间的线性主要取决于抗体活性、反应体系和抗体抗原的比例三个方面,所以反应体系的研究包括样本及试剂的上样量、稀释倍数,反应时间,测定波长等等反应条件

[0018] 实施例:

[0019] 1.1 样本要求

[0020] 血清采血后应及时分离,不溶血血清。样品 2-8℃可稳定 7 天,-20℃可稳定一个月(冷冻样品只可复溶一次,不可反复冻溶)

[0021] 1.2 波长

[0022] 胶乳增强免疫比浊法原理是光线通过免疫浊度试剂时光线偏折而散射,从而使透射光减弱。这就决定了主波长和吸光度呈反比,所以波长的选择决定了灵敏度的大小。

[0023] 胰岛素测定试剂盒在 600nm 波长下检测数据与康特胰岛素试剂盒相关性最高,全自动生化分析仪可以方便检测,故选择 600nm 为本产品的测试波长。

[0024] 1.3 样品试剂比

[0025] 试剂量的多少决定反应体积中有效抗体的浓度,而样本试剂比会影响试剂的线性范围。

[0026]

R1 (μ l)	R2 (μ l)	加样量 (μ l)	线性 1 (0.0)	线性 2 (10.0)	线性 3 (25.0)	线性 4 (50.0)	线性 5 (100.0)	y
200	40	5	0.00	7.51	19.39	36.95	83.58	0.99820
200	40	8	0.00	8.82	23.14	47.63	95.89	0.99995
200	40	10	0.00	8.43	21.21	45.62	92.48	0.99980

[0027] 结论:通过以上试验数据可知,当血清样品加样量为 8 微升时,线性情况最好。

[0028] 1.4 反应时间

[0029] 胰岛素试剂反应时间为 4 分钟,读取 R2 加入后 0min-4min 的吸光度变化值 ΔA ,以 ΔA 值计算样本结果。

[0030] 胰岛素试剂也按照康特试剂的反应时间测试,观察胰岛素试剂反应 4 分钟的结果。

[0031] 按照读取固定两点(即 R2 加入后 0min-4min)的吸光度变化值 ΔA 进行结果计算,

故选择 4 分钟为反应时间。

[0032] 1.5 结果计算

[0033] 两点定标,采用线性计算模式,如 LINEAR 等处理,以测定管 ΔA 可求得 INS 含量。

[0034] 1.6 参考值 (参考范围)

[0035] 正常参考值范围 3.0-23.0uIU/mL。

[0036] 1.7 校准方法 :建议使用胰岛素校准品每批对产品进行校准。

[0037] 1.8 质量控制方法 :

[0038] 每批均应放置质控品与被检样本同时测试,当质控结果超标时需重新进行确认检测。

[0039] 按以上参数参考文献要求设置,通过性能实验证明,该参数可以保证产品测试性能正常。

专利名称(译)	胶乳增强免疫比浊法胰岛素测定试剂盒制备方法		
公开(公告)号	CN104237498A	公开(公告)日	2014-12-24
申请号	CN201310234646.1	申请日	2013-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	绍兴圣康生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	绍兴圣康生物科技有限公司		
[标]发明人	石丽萍		
发明人	石丽萍		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/74 G01N33/54313		
代理人(译)	彭晓云		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

胶乳增强免疫比浊法胰岛素测定试剂盒制备方法，涉及胰岛素测定试剂盒技术领域。它的制备步骤：第一步：设备准备；第二步：生产前清洁及检测；第三步：试剂制备；第四步：试剂分装；第五步：试剂盒组装。它利用抗原抗体反应原理测定胰岛素的含量，标本中的胰岛素与试剂中相应的胰岛素单克隆抗体乳胶颗粒特异性反应，结合成抗原抗体复合物，形成一定的浊度，浊度的高低在足量抗体存在时与标本中的胰岛素含量成正比，测定该浊度，与胰岛素标准曲线比较，即能得出标本中胰岛素含量，检测胰岛素含量防止使用过量产生抗药性。

R1	R2	加样量	线性1	线性2	线性3	线性4	线性5	
(μ l)	(μ l)	(μ l)	(0.0)	(10.0)	(25.0)	(50.0)	(100.0)	y
200	40	5	0.00	7.51	19.39	36.95	83.58	0.99820
200	40	8	0.00	8.82	23.14	47.63	95.89	0.99995
200	40	10	0.00	8.43	21.21	45.62	92.48	0.99980