



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110568181 A

(43)申请公布日 2019.12.13

(21)申请号 201910868069.9

(22)申请日 2019.09.12

(71)申请人 苏州普瑞斯生物科技有限公司

地址 215000 江苏省苏州市高新区锦峰路8号

(72)发明人 袁嘉扬 单以朗

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

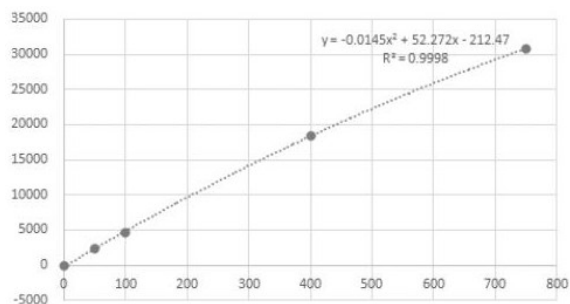
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及生物技术领域,涉及一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒,尤其涉及一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒的制备方法,公开了包括试剂R1和试剂R2的组分和浓度,所述试剂R2包括反应液、保存液以及微量白蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物。本发明的优点是:经多次研发实验后,我司采用微量白蛋白单克隆抗体1:2连接生物素,与链霉亲和素二者1:1混合反应,可明显改善重复性和灵敏度,线性范围可做到5.0-800mg/L。



1. 一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒, 其特征在于: 包括试剂R1和试剂R2, 所述试剂R1的各组分及浓度包括:

第一缓冲液 A	0.8-3.2 g/L
第一缓冲液 B	8.75-24.31 g/L
氯化钠	5.8-20.0 g/L
PEG 6000	40-120 g/L
第一防腐剂	0.8-2.0 ml/L

所述试剂R2包括反应液、保存液以及微量白蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物, 其中所述反应液由第二缓冲液构成, 所述保存液由N,N-二羟乙基甘氨酸、第一稳定剂以及第二防腐剂构成, 所述微量白蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物由生物素、链霉亲和素、微量白蛋白单克隆抗体以及1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成, 各组分的浓度包括:

第二缓冲液	8.05-27.30 g/L
N,N-二羟乙基甘氨酸	1.26-9.83 g/L
第一稳定剂	0.5-2.0 g/L
第二防腐剂	0.8-2.0 ml/L
生物素	5-20 g/L
链霉亲和素	5-20 g/L
微量白蛋白单克隆抗体	0.05-3.0 g/L

1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 0.005-0.3g/L。

2. 根据权利要求1所述的一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒, 其特征在于: 所述试剂R1中的第一缓冲液A和第一缓冲液B包括PBS缓冲液、HEPES缓冲液、MES缓冲液、Tris缓冲液、甘氨酸缓冲体系中的一种或几种。

3. 根据权利要求1所述的一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒, 其特征在于: 所述试剂R1中的第一防腐剂包括叠氮钠、Proclin-950、Proclin-300中的一种。

4. 根据权利要求1所述的一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒, 其特征在于: 所述试剂R2中的第二缓冲液包括PBS缓冲液、HEPES缓冲液、甘氨酸缓冲体系、MES缓冲液、MOPS0缓冲液、Tris缓冲液中的一种或几种。

5. 根据权利要求1所述的一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒, 其特征在于: 所述试剂R2中的稳定剂包括牛血清白蛋白、酪蛋白、甘露醇中的一种或几种。

6. 根据权利要求1所述的一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于:所述试剂R2的第二防腐剂包括叠氮钠、Proclin-950、Proclin-300中的一种。

7. 根据权利要求1所述的一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于:所述试剂R1的pH在6.80-8.00之间,所述试剂R2的pH在6.30-8.50之间。

8. 根据权利要求1所述的一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于:所述生物素结合微量白蛋白单克隆抗体比例为1:1-3:1之间,所述链霉亲和素结合生物素-微量白蛋白单克隆抗体比例为0.5:1-4:1之间。

9. 如权利要求1-8中任一一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:A)、试剂R1制备:

在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200-300rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入第一缓冲液A和第一缓冲液B,搅拌至物料完全溶解、溶液清澈透明、配液罐底部无沉淀,之后投入氯化钠,待物料完全溶解后再按照上述投料方式依次投入PEG 6000和第一防腐剂,投料完成后,继续搅拌至全部物料完全溶解,溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值并定容至最终体积;

溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

B)、试剂R2制备:

B1反应液的配置:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200-300rpm,使搅拌保持匀速状态。边搅拌边投入MES,搅拌至物料完全溶解,清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值到4.50-6.50之间,并定容至最终体积;

溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

B2保存液的配制:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200-300rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入N,N-二羟乙基甘氨酸,搅拌至物料完全溶解,之后投入稳定剂,待物料完全溶解后再投入第二防腐剂,待清澈透明,配液罐底部无沉淀,调节pH值到6.30-8.50之间,并定容至最终体积;

溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放备用,进行标识;

B3抗体偶联物的制备:将微量白蛋白单克隆抗体以反应液稀释到0.05-3.0g/L的浓度,与生物素按1:1-3的比例结合透析过夜后,再与链霉亲和素按1:0.5-4的比例混匀,将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以反应液溶解到0.005-0.3g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入牛血清白蛋白封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14000rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,将制备好的R2装入成品罐中,并定容至终浓度,进行标识。

一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,涉及一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒,尤其涉及一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒的制备方法。

背景技术

[0002] 微量白蛋白是指在人体尿中出现的微量白蛋白,白蛋白是一种血液中的正常蛋白质,但在生理条件下尿液中仅出现极少量白蛋白。正常情况下,尿液中微量白蛋白的浓度不超过20mg/L,当尿液的微量白蛋白浓度达到20-200mg/L时则为微量白蛋白尿,反映人体肾脏异常渗漏蛋白质。微量白蛋白的检测是早期发现肾病最敏感、最可靠的诊断指标。通过尿液微量白蛋白的检测结果,结合发病情况、症状以及病史陈述可以较为准确地诊断病情。而定期检测尿液微量白蛋白,可对肾病的预防及早期治疗起到积极作用。

[0003] 现有技术中检测微量白蛋白的临床使用的方法主要有免疫比浊法和放射免疫扩散法等,其中免疫比浊法是抗原抗体结合动态测定方法,操作相对简单、成本低,在生化分析仪上使用较为广泛。免疫比浊法可分为免疫透射比浊法和免疫散射比浊法。其基本原理是:当抗原与抗体在特殊稀释系统中反应而且比例合适(一般抗体过量)时,形成的可溶性免疫复合物在稀释系统中在高分子促聚剂(聚乙二醇等)的作用下聚合析出直径为340nm-700nm的颗粒,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。当入射光照射不同浊度的反应液时可被不同程度的吸收、反射和折射,通过测定反应液的浊度与一系列标准品对照,即可得出检样中抗原的含量。在普通的免疫透射比浊法或免疫散射比浊法中,少量的小的抗原抗体复合物极难形成浊度,除非放置较长时间,但检测的灵敏度会较低,而加大抗体抗原的用量又会增加检测成本,而且不符合微量化的要求。

发明内容

[0004] 本发明的目的是:针对上述不足,提供一种改善重复性和灵敏度的微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒及其制备方法。

[0005] 为达到上述目的,本发明采用的技术方案是:

[0006] 一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒,包括试剂R1和试剂R2,所述试剂R1的各组分及浓度包括:

	第一缓冲液 A	0.8-3.2 g/L
	第一缓冲液 B	8.75-24.31 g/L
[0007]	氯化钠	5.8-20.0 g/L
	PEG 6000	40-120 g/L
	第一防腐剂	0.8-2.0 ml/L

[0008] 所述试剂R2包括反应液、保存液以及微量白蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物,其中所述反应液由第二缓冲液构成,所述保存液由N,N-二羟乙基甘氨酸、第一稳定剂以及第二防腐剂构成,所述微量白蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物由生物素、链霉亲和素、微量白蛋白单克隆抗体以及1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成,各组分的浓度包括:

	第二缓冲液	8.05-27.30 g/L
	N,N-二羟乙基甘氨酸	1.26-9.83 g/L
	第一稳定剂	0.5-2.0 g/L
	第二防腐剂	0.8-2.0 ml/L
[0009]	生物素	5-20 g/L
	链霉亲和素	5-20 g/L
	微量白蛋白单克隆抗体	0.05-3.0 g/L

1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 0.005-0.3 g/L。

[0010] 所述试剂R1中的第一缓冲液A和第一缓冲液B包括PBS缓冲液、HEPES缓冲液、MES缓冲液、Tris缓冲液、甘氨酸缓冲体系中的一种或几种。

[0011] 所述试剂R1中的第一防腐剂包括叠氮钠、Proclin-950、Proclin-300中的一种。

[0012] 所述试剂R2中的第二缓冲液包括PBS缓冲液、HEPES缓冲液、甘氨酸缓冲体系、MES缓冲液、MOPS0缓冲液、Tris缓冲液中的一种或几种。

[0013] 所述试剂R2中的稳定剂包括牛血清白蛋白、酪蛋白、甘露醇中的一种或几种。

[0014] 所述试剂R2的第二防腐剂包括叠氮钠、Proclin-950、Proclin-300中的一种。

[0015] 所述试剂R1的pH在6.80-8.00之间,所述试剂R2的pH在6.30-8.50之间。

[0016] 所述生物素结合微量白蛋白单克隆抗体比例为1:1-3:1之间,所述链霉亲和素结合生物素-微量白蛋白单克隆抗体比例为0.5:1-4:1之间。

[0017] 一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:A)、试剂R1制备:

[0018] 在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200-300rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入第一缓冲液A和第一缓冲液B,搅拌至物料完全溶解、溶液清澈透明、配液罐底部无沉淀,之后投入氯化钠,待物料完全溶解后再按照上述投料方式依次投入PEG 6000和第一防腐剂,投料完成后,继续搅拌至全部物料完全溶解,溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值并定容至最终体积;

[0019] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0020] B)、试剂R2制备:

[0021] B1反应液的配置:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200-300rpm,使搅拌保持匀速状态。边搅拌边投入MES,搅拌至物料完全溶解,清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值到4.50-6.50之间,并定容至最终体积;

[0022] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0023] B2保存液的配制:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200-300rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入N,N-二羟乙基甘氨酸,搅拌至物料完全溶解,之后投入稳定剂,待物料完全溶解后再投入第二防腐剂,待清澈透明,配液罐底部无沉淀,调节pH值到6.30-8.50之间,并定容至最终体积;

[0024] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放备用,进行标识;

[0025] B3抗体偶联物的制备:将微量白蛋白单克隆抗体以反应液稀释到0.05-3.0g/L的浓度,与生物素按1:1-3的比例结合透析过夜后,再与链霉亲和素按1:0.5-4的比例混匀,将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以反应液溶解到0.005-0.3g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入牛血清白蛋白封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14000rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,将制备好的R2装入成品罐中,并定容至终浓度,进行标识。

[0026] 与现有技术相比,本发明所达到的技术效果是:经多次研发实验后,我司采用微量白蛋白单克隆抗体1:2连接生物素,与链霉亲和素二者1:1混合反应,可明显改善重复性和灵敏度,线性范围可做到5.0-800mg/L。

附图说明

[0027] 图1是本发明实施例4中直接使用微量白蛋白单克隆抗体定标曲线图。其中X轴表示标准品浓度,Y轴表示d0D。

[0028] 图2是本发明实施例5中使用微量白蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物的定标曲线图。其中X轴表示标准品浓度,Y轴表示d0D。

具体实施方式

[0029] 下面结合附图及实施例对本发明作进一步描述:

[0030] 实施例一:

[0031] 本发明的一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒,包括试剂R1和试剂R2,所述试剂R1的各组分及浓度包括:作为第一缓冲液A的二水合磷酸二氢钠,其浓度为0.8g/L、作为第一缓冲液B的十二水合磷酸氢二钠,其浓度为8.75g/L、氯化钠,其浓度为5.8g/L、PEG 6000,其浓度为40g/L、作为第一防腐剂的Proclin-950,其浓度为0.8ml/L;

[0032] 所述试剂R2包括反应液、保存液以及微量白蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物,其中所述反应液由第二缓冲液构成,所述保存液由N,N-二羟乙基甘氨酸、作为第一稳定剂的牛血清白蛋白以及作为第二防腐剂的Proclin-950构成,所述微量白蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物由生物素、链霉亲和素、微量白蛋白单克隆抗体以及1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成,各组分的浓度包括:作为第二缓冲液的2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物,其浓度为8.05g/L、N,N-二羟乙基甘氨酸,其浓度为1.26g/L、作为第一稳定剂的牛血清白蛋白,其浓度为0.5g/L、作为第二防腐剂的Proclin-950,其浓度为0.8ml/L、生物素,其浓度为5g/L、链霉亲和素,其浓度为5g/L、微量白蛋白单克隆抗体,其浓度为0.05g/L、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,其浓度为0.005g/L。

[0033] 所述试剂R1的pH在6.80,所述试剂R2的pH在6.30。

[0034] 所述生物素结合微量白蛋白单克隆抗体比例为2:1之间,所述链霉亲和素结合生物素-微量白蛋白单克隆抗体比例为1:1之间。

[0035] 一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:A)、试剂R1制备:

[0036] 在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入二水合磷酸二氢钠和十二水合磷酸氢二钠,搅拌至物料完全溶解、溶液清澈透明、配液罐底部无沉淀,之后投入氯化钠,待物料完全溶解后再按照上述投料方式依次投入PEG 6000和Proclin-950,投料完成后,继续搅拌至全部物料完全溶解,溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值至6.80并定容至最终体积;

[0037] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0038] B)、试剂R2制备:

[0039] B1反应液的配置:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物,搅拌至物料完全溶解,清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值到4.50之间,并定容至最终体积;

[0040] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0041] B2保存液的配制:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至200rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入N,N-二羟乙基甘氨酸,搅拌至物料完全溶解,之后投入牛血清白蛋白,待物料完全溶解后再投入Proclin-950,待清澈透明,配液罐底部无沉淀,调节pH值到6.30,并定容至最终体积;

[0042] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放备用,进行标识;

[0043] B3抗体偶联物的制备:将微量白蛋白单克隆抗体以反应液稀释到0.05g/L的浓度,

与生物素按1:2的比例结合透析过夜后,再与链霉亲和素按1:1的比例混匀,将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以反应液溶解到0.005g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入牛血清白蛋白封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14000rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,将制备好的R2装入成品罐中,并定容至终浓度,进行标识。

[0044] 实施例二:

[0045] 本发明的一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒,包括试剂R1和试剂R2,所述试剂R1的各组分及浓度包括:作为第一缓冲液A的二水合磷酸二氢钠,其浓度为2.5g/L、作为第一缓冲液B的十二水合磷酸氢二钠,其浓度为16g/L、氯化钠,其浓度为14g/L、PEG 6000,其浓度为80g/L、作为第一防腐剂的Proclin-300,其浓度为1.4ml/L;

[0046] 所述试剂R2包括反应液、保存液以及微量白蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物,其中所述反应液由第二缓冲液构成,所述保存液由N,N-二羟乙基甘氨酸、作为第一稳定剂的酪蛋白以及作为第二防腐剂的Proclin-300构成,所述微量白蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物由生物素、链霉亲和素、微量白蛋白单克隆抗体以及1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成,各组分的浓度包括:作为第二缓冲液的2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物,其浓度为18g/L、N,N-二羟乙基甘氨酸,其浓度为5g/L、作为第一稳定剂的酪蛋白,其浓度为1.3g/L、作为第二防腐剂的Proclin-300,其浓度为1.4ml/L、生物素,其浓度为14g/L、链霉亲和素,其浓度为14g/L、微量白蛋白单克隆抗体,其浓度为2g/L、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,其浓度为0.1g/L。

[0047] 所述试剂R1的pH在7.4,所述试剂R2的pH在7.50。

[0048] 所述生物素结合微量白蛋白单克隆抗体比例为1:1之间,所述链霉亲和素结合生物素-微量白蛋白单克隆抗体比例为4:1之间。

[0049] 一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:A)、试剂R1制备:

[0050] 在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至250rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入二水合磷酸二氢钠和十二水合磷酸氢二钠,搅拌至物料完全溶解、溶液清澈透明、配液罐底部无沉淀,之后投入氯化钠,待物料完全溶解后再按照上述投料方式依次投入PEG 6000和Proclin-300,投料完成后,继续搅拌至全部物料完全溶解,溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值至7.4并定容至最终体积;

[0051] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0052] B)、试剂R2制备:

[0053] B1反应液的配置:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至250rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物,搅拌至物料完全溶解,清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值到5.50之间,并定容至最终体积;

[0054] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0055] B2保存液的配制:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至250rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入N,N-二羟乙基甘氨酸,搅拌至物料完全溶

解,之后投入酪蛋白,待物料完全溶解后再投入Proclin-300,待清澈透明,配液罐底部无沉淀,调节pH值到7.5,并定容至最终体积;

[0056] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放备用,进行标识;

[0057] B3抗体偶联物的制备:将微量白蛋白单克隆抗体以反应液稀释到2.0g/L的浓度,与生物素按1:1的比例结合透析过夜后,再与链霉亲和素按1:4的比例混匀,将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以反应液溶解到0.2g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入牛血清白蛋白封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14000rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,将制备好的R2装入成品罐中,并定容至终浓度,进行标识。

[0058] 实施例三:

[0059] 本发明的一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒,包括试剂R1和试剂R2,所述试剂R1的各组分及浓度包括:作为第一缓冲液A的二水合磷酸二氢钠,其浓度为3.2g/L、作为第一缓冲液B的十二水合磷酸氢二钠,其浓度为24.31g/L、氯化钠,其浓度为20.0g/L、PEG 6000,其浓度为120g/L、作为第一防腐剂的叠氮钠,其浓度为2.0ml/L;

[0060] 所述试剂R2包括反应液、保存液以及微量白蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物,其中所述反应液由第二缓冲液构成,所述保存液由N,N-二羟乙基甘氨酸、第一稳定剂以及作为第二防腐剂的叠氮钠构成,所述微量白蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物由生物素、链霉亲和素、微量白蛋白单克隆抗体以及1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成,各组分的浓度包括:作为第二缓冲液的2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物,其浓度为27.30g/L、N,N-二羟乙基甘氨酸,其浓度为9.83g/L、作为第一稳定剂的甘露醇,其浓度为2.0g/L、作为第二防腐剂的叠氮钠,其浓度为2.0ml/L、生物素,其浓度为20g/L、链霉亲和素,其浓度为20g/L、微量白蛋白单克隆抗体,其浓度为3.0g/L、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,其浓度为0.3g/L。

[0061] 所述试剂R1的pH在8.00,所述试剂R2的pH在8.50。

[0062] 所述生物素结合微量白蛋白单克隆抗体比例为3:1之间,所述链霉亲和素结合生物素-微量白蛋白单克隆抗体比例为0.5:1之间。

[0063] 一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:A)、试剂R1制备:

[0064] 在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至300rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入二水合磷酸二氢钠和十二水合磷酸氢二钠,搅拌至物料完全溶解、溶液清澈透明、配液罐底部无沉淀,之后投入氯化钠,待物料完全溶解后再按照上述投料方式依次投入PEG 6000和叠氮钠,投料完成后,继续搅拌至全部物料完全溶解,溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值至8.00并定容至最终体积;

[0065] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0066] B)、试剂R2制备:

[0067] B1反应液的配置:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至300rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物,搅拌至物料

完全溶解,清澈透明,配液罐底部无沉淀,调整PH值到6.50之间,并定容至最终体积;

[0068] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放在成品罐中,进行标识;

[0069] B2保存液的配制:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌器转速至300rpm,使搅拌保持匀速状态,边搅拌边投入N,N-二羟乙基甘氨酸,搅拌至物料完全溶解,之后投入甘露醇,待物料完全溶解后再投入叠氮钠,待清澈透明,配液罐底部无沉淀,调节pH值到8.50之间,并定容至最终体积;

[0070] 溶解完的配液按照微孔过滤器操作规程,通过微孔滤膜过滤,过滤后的溶液存放备用,进行标识;

[0071] B3抗体偶联物的制备:将微量白蛋白单克隆抗体以反应液稀释到3.0g/L的浓度,与生物素按1:3的比例结合透析过夜后,再与链霉亲和素按1:0.5的比例混匀,将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以反应液溶解到0.3g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入牛血清白蛋白封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14000rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,将制备好的R2装入成品罐中,并定容至终浓度,进行标识。

[0072] 实施例四:

[0073] 直接使用微量白蛋白单克隆抗体,使用标准品进行定标,结果如表1所示,定标曲线如图1所示。

[0074] 表1:直接使用微量白蛋白单克隆抗体定标结果:

[0075]	校准品浓度(mg/L)	dOD		均值
	0.0	-5	-21	-13
	50.0	2314	2318	2316
	100.0	4328	4320	4324
	400.0	15420	14234	14827
	750.0	15287	15292	15290

[0076] 线性范围可做到5.0-400.0mg/L,浓度大于400.0mg/L时出现hook效应。

[0077] 其精密度CV:

[0078]

1	365.8	334.4	249.7
2	414.5	328.0	257.4
3	319.3	326.4	237.7
4	385.2	316.3	259.2
5	329.2	340.1	271.7

[0079]

6	355.2	309.0	274.9
7	379.7	319.7	221.2
8	370.2	326.0	265.7
9	319.7	316.0	213.2
10	310.9	370.2	277.4
均值	355.0	328.6	252.8
SD	34.20	17.25	22.31
CV	9.63%	5.25%	8.82%

[0080] 精密度CV较大,基本>5%。

[0081] 实施例五:

[0082] 使用微量白蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物,使用标准品进行定标,结果如表2所示,定标曲线如图2所示。

[0083] 表2:使用微量白蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物定标结果

[0084]

校准品浓度 (mg/L)	dOD		均值
0.0	-5	-21	-13
50.0	2314	2318	2316
100.0	4628	4620	4624
400.0	18514	18483	18499
750.0	30787	30792	30790

[0085] 线性范围可做到5.0-800.0mg/L。

[0086] 其精密度CV:

[0087]

1	365.8	334.4	249.7
2	363.6	326.0	253.7
3	348.2	345.1	260.7
4	366.5	321.0	254.4
5	381.2	324.0	238.0
6	362.5	337.1	260.7
7	363.2	337.1	254.7
8	352.3	330.1	260.4
9	349.3	330.7	245.7
10	362.9	333.4	251.2
均值	361.6	331.9	252.9
SD	9.72	7.12	7.24
CV	2.69%	2.14%	2.86%

[0088] 精密度CV明显改善,3%以内。

[0089] 综上所述,与现有技术相比,本发明所达到的技术效果是:经多次研发实验后,我司采用微量白蛋白单克隆抗体1:2连接生物素,与链霉亲和素二者1:1混合反应,可明显改善重复性和灵敏度,线性范围可做到5.0-800mg/L。

[0090] 上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点,其目的在于让熟悉此项技术的人士能够了解本发明的内容并据以实施,并不能以此限制本发明的保护范围。凡根据本发明精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

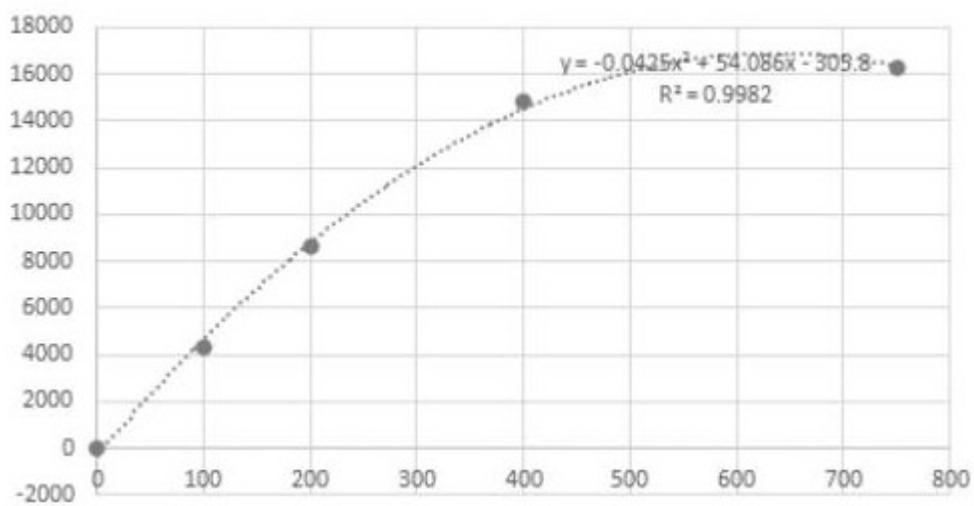


图1

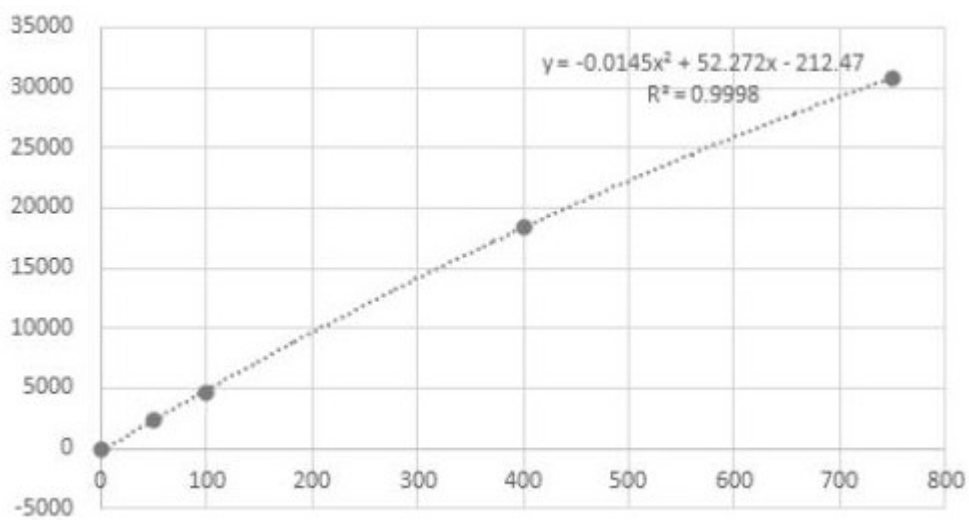


图2

专利名称(译)	一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN110568181A	公开(公告)日	2019-12-13
申请号	CN201910868069.9	申请日	2019-09-12
[标]发明人	袁嘉扬		
发明人	袁嘉扬 单以朗		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物技术领域，涉及一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒，尤其涉及一种微量白蛋白免疫比浊法检测试剂盒的制备方法，公开了包括试剂R1和试剂R2的组分和浓度，所述试剂R2包括反应液、保存液以及微量白蛋白单克隆抗体-生物素-链霉亲和素的抗体偶联物。本发明的优点是：经多次研发实验后，我司采用微量白蛋白单克隆抗体1:2连接生物素，与链霉亲和素二者1:1混合反应，可明显改善重复性和灵敏度，线性范围可做到5.0-800mg/L。

