



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107741493 A

(43)申请公布日 2018.02.27

(21)申请号 201710915391.3

(22)申请日 2017.09.30

(71)申请人 湖南海源医疗科技股份有限公司

地址 410000 湖南省长沙市岳麓区谷苑路
229号海凭医疗器械园A4栋5楼

(72)发明人 史丙华 姜志华 陈玲强 王延英

(74)专利代理机构 长沙正奇专利事务所有限责
任公司 43113

代理人 何为 袁颖华

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

(54)发明名称

一种采用免疫竞争比浊法测定尿微量白蛋白的试剂盒

(57)摘要

一种采用免疫竞争比浊法测定尿微量白蛋白的试剂盒,该试剂盒包括抗人白蛋白抗体、人白蛋白标记的乳胶微球及缓冲液,抗人白蛋白抗体和人白蛋白标记的乳胶微球分开装置。其中,所述胶乳微球粒径为80-267nm。使用本试剂盒对人尿液中的微量白蛋白进行测定,线性最大范围达5mg/L-1500mg/L。本试剂盒既能满足临床正常人群的筛查,也能避免抗原过剩引起的勾状效应导致结果被低估甚至假阴性结果的出现。

1. 一种采用免疫竞争比浊法测定尿微量白蛋白的试剂盒,其特征在于,该试剂盒包括分别放置的抗人白蛋白抗体和人白蛋白标记的乳胶微球,该乳胶微球的粒径为80-267nm。

2. 如权利要求1所述的一种采用免疫竞争比浊法测定尿微量白蛋白的试剂盒,其特征在于,该试剂盒还包括缓冲液、氯化钠、吐温-20及防腐剂,与抗人白蛋白抗体一同放置。

3. 如权利要求1或2所述的一种采用免疫竞争比浊法测定尿微量白蛋白的试剂盒,其特征在于,所述人白蛋白标记的乳胶微球是采用化学偶联方法将人白蛋白标记在乳胶微球上。

4. 如权利要求3所述的一种采用免疫竞争比浊法测定尿微量白蛋白的试剂盒,其特征在于,所述乳胶微球的浓度为0.05-0.1g/L。

5. 如权利要求3所述的一种采用免疫竞争比浊法测定尿微量白蛋白的试剂盒,其特征在于,所述人白蛋白的浓度为80mg/L-400mg/L,该人白蛋白为天然人白蛋白或者重组人白蛋白。

6. 如权利要求1或2所述的一种采用免疫竞争比浊法测定尿微量白蛋白的试剂盒,其特征在于,所述抗人白蛋白抗体为鼠抗人白蛋白单克隆抗体、兔抗人白蛋白多克隆抗体、或是鼠抗人白蛋白单克隆抗体和兔抗人白蛋白多克隆抗体的混合物;该抗人白蛋白抗体的浓度为50mg/L-800g/L。

7. 如权利要求2所述的一种采用免疫竞争比浊法测定尿微量白蛋白的试剂盒,其特征在于,所述缓冲液浓度为25-100mmol/L,pH值为6.8-7.8,该缓冲液为硼酸、2-(N-吗啡啉)乙磺酸或[3-(N-玛琳代)丙磺酸。

8. 如权利要求2所述的一种采用免疫竞争比浊法测定尿微量白蛋白的试剂盒,其特征在于,所述氯化钠浓度为0.2mol/L-0.6mol/L。

9. 如权利要求2所述的一种采用免疫竞争比浊法测定尿微量白蛋白的试剂盒,其特征在于,所述吐温-20浓度为2-10ml/L。

10. 如权利要求2所述的一种采用免疫竞争比浊法测定尿微量白蛋白的试剂盒,其特征在于,所述防腐剂的浓度为0.1g/L,防腐剂为叠氮钠或 ProClin300。

一种采用免疫竞争比浊法测定尿微量白蛋白的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及采用免疫竞争比浊法检测尿微量白蛋白的试剂盒。

背景技术

[0002] 免疫比浊法是抗原抗体结合动态测定方法,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(一般规定抗体过量)时,形成的可溶性免疫复合物在稀释系统中的促聚剂(聚乙二醇等)的作用下,自液相析出,形成微粒,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。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浓度。

[0003] 由于不需要分离,免疫比浊法检测方便,更加有利于自动化分析,已被广泛应用于临床检验中的基于透射比浊的全自动生化分析仪及各种类型的基于散射比浊的特种蛋白分析仪,但是该方法分析灵敏度低,存在钩状效应:钩状的顶点为一定抗体条件下,抗原与抗体反应所产生浊度的最大值,也就是此抗体浓度条件下测定抗原浓度所允许的最大值,超过该值,就是所谓的过量抗原反应。以抗原浓度极值为分界线,左侧为沉淀或凝集的反应区亦称之为“正相”反应区,而右侧为沉淀或凝集的抑制区亦称之为“反相”反应区。现有的免疫比浊方法及商业化的试剂盒,大多以反应区设计的“正相”分析方法,这种方法,限定了分析范围,不仅如此,当抗原过量时,由于使用反应区的校准曲线,会得到低于实际值的所谓“假阴性”结果。

[0004] 尿微量白蛋白测定反映早期肾病、肾损伤情况。病理性增高见于糖尿病肾病、高血压、妊娠子痫前期。在早期尿微量白蛋白阶段是肾病发生的早期信号和预兆,此时肾脏损害处在尚可逆转的时期,如能及时治疗,可以终止或逆转肾病的发展进程。尿微量白蛋白检测可作为全身性或局部炎症反应的肾功能指标,如尿路感染等原因引起的肾脏早期病变;急性胰腺炎并发症的预测指标;服用对肾功能有影响的药物者也可检测尿微量白蛋白,便于早期观察肾功能情况及早采取措施。

[0005] 目前,市面上采用普通比浊法、或者乳胶增强比浊法来测定尿液中微量白蛋白的含量,其中普通比浊的检测范围为25mg/L-600mg/L,乳胶增强比浊法的范围2mg/L-300mg/L,以上二种方法,当样本中人白蛋白的浓度超过3000mg/L时,试剂盒测出来的值往往会低于100mg/L,但是由于临床样本的浓度范围相对较广,其浓度为2mg/L-10g/L,且由于一般免疫比浊法都存在钩状效应,所以在临床上应用都不是很理想。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于,针对上述现有技术的不足,提供一种能够满足临床应用上正常人群的筛查(最低值能测到20mg/L以下)也能满足高浓度的患者漏诊(不出现钩状效应)的采用免疫竞争比浊法测定尿微量白蛋白的试剂盒。

[0007] 为达上述目的,本发明采用的技术方案为:一种采用免疫竞争比浊法测定尿微量

白蛋白的试剂盒,该试剂盒包括分开放置的抗人白蛋白抗体和人白蛋白标记的乳胶微球,该乳胶微球的粒径为80-267nm。

[0008] 所述人白蛋白标记的乳胶微球是采用化学偶联方法将人白蛋白标记在乳胶微球上。其中,所述乳胶微球的粒径为80-267nm,浓度为0.05-0.1g/L;所述人白蛋白的浓度为80mg/L-400mg/L,该人白蛋白为天然人白蛋白或者重组人白蛋白。

[0009] 该人白蛋白标记的乳胶微球的具体制备过程如下:

[0010] 1) 乳胶微球的活化:采用0.05g/L-0.4g/L的1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐或0.04g/L-0.3g/L的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐对0.05-0.1g/L的乳胶微球(粒径为80-267nm)进行活化,离心,去上清液,沉淀用25mmol/L的HEPS(pH6.5)或者25mmol/L的MOPS缓冲液缓冲进行复溶。

[0011] 2) 蛋白偶联:将人白蛋白浓度稀释到80mg/L-400mg/L后加入到活化的乳胶微球中,反应2-3小时。

[0012] 3) 多余蛋白的去除:将偶联后的乳胶微球溶液,采用10000r/min以上离心5-20分钟,去除上清,沉淀用25mmol/L的[3-(N-吗琳代)丙磺酸(pH7.5)缓冲液或者25mmol/L且pH值为7.5的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液进行复溶保存。

[0013] 所述抗人白蛋白抗体为鼠抗人白蛋白单克隆抗体、兔抗人白蛋白多克隆抗体、或是鼠抗人白蛋白单克隆抗体和兔抗人白蛋白多克隆抗体的混合物。该抗人白蛋白抗体的浓度为50mg/L-800g/L,按照试剂盒的线性要求进行调整。

[0014] 上述提及的人白蛋白、鼠抗人白蛋白单克隆抗体和兔抗人白蛋白多克隆抗体皆为市购产品。

[0015] 所述试剂盒中还包括浓度为25-100mmol/L且pH值为6.8-7.8的缓冲液、0.2mol/L-0.6mol/L的氯化钠,2-10ml/L的吐温-20,0.1g/L的防腐剂。其中,该缓冲液为硼酸、2-(N-吗啡啉)乙磺酸或[3-(N-吗琳代)丙磺酸;该防腐剂为叠氮钠或ProClin 300。

[0016] 本试剂盒的检测原理为:乳胶微球颗粒与被测抗原物质相同或相似的抗原,与一定量的对应的抗体发生抗原抗体反应,形成不容性的免疫复合物,在全自动生化仪上表现为形成一定的吸光度变化值。当被测物中含有此种抗原时,由于竞争原理,样本中的检测物和偶联的人白蛋白都会有抗体进行反应,由于被测物没有标记物,因此反应后所形成的吸光度变化值与无被测物质时相比下降,在竞争法中吸光度的变化值与被测物质抗原含量负相关,使用已知浓度的标准品绘制标准曲线,则可根据被测标本的反应吸光度变化计算出其含量。

[0017] 基于以上实验原理,试剂盒中人白蛋白标记的乳胶微球只需与抗人白蛋白抗体分开放置即可。

[0018] 本发明具有以下有益效果:

[0019] 1. 使用本试剂盒对人尿液中的微量白蛋白进行测定,线性范围为15mg/L-800mg/L。如果有特殊要求,试剂盒的线性做到为5mg/L-1500mg/L,既能满足临床正常人群的筛查,也能满足患者治疗水平的监控。

[0020] 2. 本发明的试剂盒由于采用竞争法,因而能避免勾状效应出现,有效避免了临床结果被低估甚至假阴性结果的出现。

[0021] 3. 本试剂盒的生产工艺比较简便,采用的是偶联蛋白,而不是抗体,生产工艺跟生

产成本相对偶联抗体的较低。

具体实施方式

[0022] 本发明的试剂盒由下述组分构成(以1L为例)：

[0023] 1. 试剂1:人白蛋白标记的乳胶微球；

[0024] 成分:乳胶微球的浓度0.05-0.1g/L,粒径80-267nm;人白蛋白(天然人白蛋白或者重组人白蛋白),稀释到80mg/L-400mg/L。

[0025] 具体制备过程如下：

[0026] 1) 乳胶微球活化:采用0.05g/L-0.4g/L的1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐或0.04g/L-0.3g/L的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐对乳胶微球进行活化,离心,去上清液,沉淀用25mmol/L的HEPS(pH6.5)或者25mmol/L的MOPS缓冲液缓冲进行复溶。

[0027] 2) 蛋白偶联:将人白蛋白加入到活化的乳胶微球中,反应2-3小时。

[0028] 3) 多余蛋白的去除:将偶联后的乳胶微球溶液采用10000r/min以上离心5-20分钟,去除上清,沉淀用25mmol/L的[3-(N-吗琳代)丙磺酸缓冲液(pH7.5)或者25mmol/L 2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液(pH7.5)进行复溶保存。

[0029] 2. 试剂2:抗人白蛋白抗体、缓冲液、氯化钠、吐温-20及防腐剂；

[0030] 抗人白蛋白抗体为鼠抗人白蛋白单克隆抗体、兔抗人白蛋白多克隆抗体、或是鼠抗人白蛋白单克隆抗体和兔抗人白蛋白多克隆抗体的混合物。抗人白蛋白抗体的浓度为50mg/L-800g/L,按照试剂盒的线性要求进行调整；

[0031] 缓冲液:浓度为25-100mmol/L且pH值为6.8-7.8,该缓冲液为硼酸、2-(N-吗啡啉)乙磺酸或[3-(N-吗琳代)丙磺酸；

[0032] 氯化钠:浓度为0.2mol/L-0.6mol/L；

[0033] 吐温-20:浓度为2-10ml/L；

[0034] 防腐剂:浓度0.1g/L,该防腐剂为叠氮钠或ProClin 300。

[0035] 试剂1与试剂2分开放置。本说明书中是以人白蛋白标记的乳胶微球作为试剂1,当然也可将人白蛋白标记的乳胶微球作为试剂2,则另外的组分就为试剂1。

[0036] 实施例1

[0037] 试剂1:人白蛋白标记的乳胶微球,胶乳微球粒径80nm,乳胶微球浓度0.1g/L,人白蛋白浓度400mg/L;试剂2:兔抗人白蛋白多克隆抗体浓度600mg/L,硼酸浓度25mmol/L(pH 7.5),氯化钠浓度0.2mol/L,吐温-20浓度2ml/L,叠氮钠浓度0.1g/L。样本试剂比例即样本(人尿):试剂1:试剂2为:20:240:80。全自动生化仪具体测定参数为:测定仪器AU640,样品试剂比例:20:240:80,校准品拟合方式spline,波长600nm,读点为12-27。

[0038] 定标结果见如下表1,依此可绘制定标曲线。

[0039] 表1校准品定标结果值

[0040]

校准品浓度mg/L	30	60	160	640	1200
吸光度变化值	-0.0361	-0.1682	-0.3349	-0.6024	-0.6931

[0041] 1) 样本稀释验证:

[0042] 把浓度为15.00mg/L的低值样本和浓度为823mg/L的高值样本按照下表2中的不同比例混合,计算出稀释以后的相对偏差和绝对偏差,结果见下表2。

[0043] 表2低值与高值样本混比稀释后的偏差值

高值样本: 低值样本 (体积比)		理论值 (mg/L)	测定值 (mg/L)	相对偏差	绝对偏差 (mg/L)
0	10	15	13.24		-1.58
1	9	163.5	155.6	4.19%	
2	8	312	328.3	-4.79%	
3	7	460.5	475.0	-2.35%	
[0044]	4	609	572.7	6.88%	
	5	757.5	787.9	-2.88%	
	6	906	929.3	-1.37%	
	7	1054.5	1060.6	0.65%	
	8	1203	1214.5	0.32%	
	9	1351.5	1340.1	2.12%	
	10	1500	1547.1	-1.77%	

[0045] 以上表可知,该试剂盒在15mg/L-1500mg/L的范围内,在0-30mg/L的绝对偏差 \leq 5mg/L,30.01mg/L-1500mg/L的相对偏差 \leq 10%,满足GB/T 26124-2011临床化学体外诊断试剂(盒)中线性范围的要求。

[0046] 2) 抗原过剩样本验证

[0047] 采用天然人白蛋白作为样本,其浓度分别为10mg/L、100mg/L、500mg/L、1000mg/L、2000mg/L、5000mg/L、10000mg/L、100000mg/L,检测后样本浓度见下表3。

[0048] 表3不同浓度的人白蛋白样本的检测结果

[0049]

序号	样本理论浓度	样本测定浓度
1	10mg/L	9.0mg/L
2	100mg/L	95.6mg/L
3	500mg/L	524.2mg/L
4	1000mg/L	967.7mg/L
5	2000mg/L	171.6mg/L
6	5000mg/L	2161.4mg/L
7	10000mg/L	2509.2mg/L
8	100000mg/L	3055.3mg/L

[0050] 由上表3可知,当样本浓度高于1500mg/L,测定的值都会大于1500mg/L,不会出现假阴性。

[0051] 3) 最低检测限验证:

[0052] 用纯化水当样本进行检测,重复测定10次,最低检测限度为:平均值+2*标准差,结

果见表4。

[0053] 表4最低检测限度验证 (纯化水做为样本)

[0054]

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
结果	5.6	-0.6	7.8	5.7	4.5	6.5	2.9	-1.4	5.6	2.5

[0055] 由表4可知,标准差=3.91,平均值=3.03,最低检测限为 $3.91+2*3.03=9.97$ 。

[0056] 实施例2

[0057] 试剂1:人白蛋白标记的乳胶微球,胶乳微球粒径152nm,乳胶浓度0.05g/L,人白蛋白浓度80mg/L;试剂2:兔抗人白蛋白多抗体,抗体亲和纯化,抗体浓度为200mg/L,氯化钠浓度0.6mol/L,吐温-20浓度10ml/L,ProClin 300浓度0.1g/L。样本试剂比例即样本(人尿):试剂1:试剂2为:20:240:80。全自动生化仪具体测定参数为:测定仪器AU640,样品试剂比例:20:240:80,校准品拟合方式spline,波长600nm,读点为12-27。

[0058] 定标结果如下表1,依此可绘制定标曲线。

[0059] 表1校准品定标结果值

[0060]

校准品浓度mg/L	5	15	60	240	480	800
吸光度变化值	-0.0317	-0.1289	-0.3349	-0.4824	-0.5628	-0.6281

[0061] 1) 样本稀释验证:

[0062] 把样本浓度为5.00mg/L的低值样本和样本浓度为800.00mg/L的高值样本按下表2中的不同比例混合,计算出稀释以后的相对偏差和绝对偏差,结果见下表2。

[0063] 表2低值与高值样本混比稀释后的偏差值

高值样本: 低值样本 (体积比)		理论值 (mg/L)	测定值 (mg/L)	相对偏差	绝对偏差 (mg/L)
0	10	5	5.20		3.88
1	9	84.5	87.49	-0.93%	
2	8	164	158.29	3.64%	
3	7	243.5	257.70	-6.55%	
[0064]	4	323	330.54	-3.47%	
	5	402.5	379.93	4.31%	
	6	482	506.64	-6.74%	
	7	561.5	534.57	3.20%	
	8	641	657.96	-4.47%	
	9	720.5	685.65	3.08%	
	10	800	839.89	-6.99%	

[0065] 以上可以看出,该试剂盒在15mg/L-1500mg/L的范围内,在0-30mg/L的绝对偏差 ≤ 5 mg/L,30.01mg/L-1500mg/L的相对偏差 $\leq 10\%$,满足GB/T 26124-2011临床化学体外诊断

试剂(盒)中线性范围的要求。

[0066] 2) 抗原过剩样本验证

[0067] 采用天然人白蛋白作样本,分别配制成浓度为10mg/L、100mg/L、500mg/L、1000mg/L、2000mg/L、5000mg/L、10000mg/L、100000mg/L,检测后样本浓度见下表3。

[0068] 表3不同浓度的天然人白蛋白检测结果

[0069]

序号	理论浓度	测定浓度 (mg/L)
1	10mg/L	9.6
2	100mg/L	103.8
3	500mg/L	459.2
4	1000mg/L	956.7
5	2000mg/L	1536.1
6	5000mg/L	2906.7
7	10000mg/L	3514.5
8	100000mg/L	3928.7

[0070] 以上表可知,当样本浓度高于800mg/L时,测定的值都会大于800mg/L,不会出现假阴性。

[0071] 3) 最低检测限验证:

[0072] 表4最低检测限度验证 (纯化水做为样本)

[0073]

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
结果 (mg/L)	0.6	1.7	3.2	-0.4	0.8	1.3	0.4	2.7	0.4	2.1

[0074] 由上表可知,标准差=1.28,平均值=1.13,最低检测限为 $1.28+2*1.13=3.55$ 。

专利名称(译)	一种采用免疫竞争比浊法测定尿微量白蛋白的试剂盒		
公开(公告)号	CN107741493A	公开(公告)日	2018-02-27
申请号	CN201710915391.3	申请日	2017-09-30
[标]发明人	史丙华 姜志华 陈玲强 王延英		
发明人	史丙华 姜志华 陈玲强 王延英		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/54346 G01N33/532		
代理人(译)	何为		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种采用免疫竞争比浊法测定尿微量白蛋白的试剂盒，该试剂盒包括抗人白蛋白抗体、人白蛋白标记的乳胶微球及缓冲液，抗人白蛋白抗体和人白蛋白标记的乳胶微球分开装置。其中，所述胶乳微球粒径为80-267nm。使用本试剂盒对人尿液中的微量白蛋白进行测定，线性最大范围达5mg/L-1500mg/L。本试剂盒既能满足临床正常人群的筛查，也能避免抗原过剩引起的钩状效应导致结果被低估甚至假阴性结果的出现。

高值样本: (体积比)	低值样本	理论值 (mg/L)	测定值 (mg/L)	相对偏差	绝对偏差 (mg/L)
0	10	15	13.24		-1.58
1	9	163.5	155.6	4.19%	
2	8	312	328.3	-4.79%	
3	7	460.5	475.0	-2.35%	
4	6	609	572.7	6.88%	
5	5	757.5	787.9	-2.88%	
6	4	906	929.3	-1.37%	
7	3	1054.5	1060.6	0.65%	
8	2	1203	1214.5	0.32%	
9	1	1351.5	1340.1	2.12%	
10	0	1500	1547.1	-1.77%	