(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109738626 A
(43)申请公布日 2019.05.10

(21)申请号 201910122186.0

(22)申请日 2019.02.19

(71)申请人 上海复星长征医学科学有限公司
地址 200437 上海市宝山区城银路830号

(72)发明人 陈国锋 景晟

(74)专利代理机构 上海科盛知识产权代理有限公司 31225
代理人 陈亮

(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)

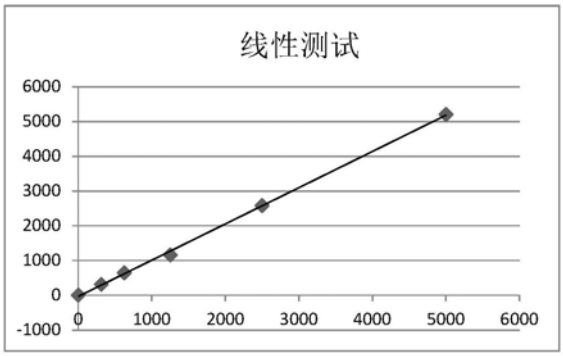
权利要求书2页 说明书15页 附图2页

(54)发明名称

NGAL胶乳免疫比浊法检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及NGAL胶乳免疫比浊法检测试剂盒及其制备方法，该试剂盒由试剂R1、试剂R2、校准品及质控品组成，试剂R1包括缓冲液、抗干扰剂、增敏剂、电解质、防腐剂，试剂R2包括连有NGAL抗体的胶乳微球、缓冲液、稳定剂、防腐剂。与现有技术相比，本发明R1试剂中抗干扰剂的使用，显著提高了其抗干扰能力，扩大了中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白测定试剂盒的适用人群，同时本发明提高的试剂盒检测还具有灵敏度高、特异性强、试剂盒稳定性好，可高效检测尿液、血浆、血清中的NGAL含量，并且检测结果与进口试剂相关良好。



CN 109738626 A

1.NGAL胶乳免疫比浊法检测试剂盒，其特征在于，该试剂盒由试剂R1、试剂R2、校准品及质控品组成，

所述试剂R1包括缓冲液、抗干扰剂、增敏剂、电解质、防腐剂，

所述试剂R2包括连有NGAL抗体的胶乳微球、缓冲液、稳定剂、防腐剂。

2.根据权利要求1所述的NGAL胶乳免疫比浊法检测试剂盒，其特征在于，所述抗干扰剂由表面活性剂聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚与曲拉通按质量比为1:1-5:1复配得到。

3.根据权利要求2所述的NGAL胶乳免疫比浊法检测试剂盒，其特征在于，所述聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚选自聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚L61、L64、F68或F108中一种或多种，在试剂R1中缓冲液中质量含量为0.2%-0.8%。

4.根据权利要求2所述的NGAL胶乳免疫比浊法检测试剂盒，其特征在于，所述曲拉通包括曲拉通X-100或曲拉通X-45中一种或多种，在试剂R1中缓冲液中质量含量为0.15%-0.6%。

5.根据权利要求1所述的NGAL胶乳免疫比浊法检测试剂盒，其特征在于，试剂R1中，

所述缓冲液包括但不限于磷酸盐缓冲液、HEPES缓冲液、MES缓冲液或MOPS缓冲液，浓度为25-150mM，pH值为6.5-9.0，

所述增敏剂为聚乙二醇6000、聚乙二醇8000或聚乙二醇20000中的一种或多种，在试剂R1中缓冲液中质量含量为0.5%-10%，

所述电解质为氯化钠，在试剂R1中缓冲液中质量含量为0.5%-5%，

所述防腐剂为叠氮化钠或Proclin300中的一种或两种，在试剂R1中缓冲液中质量含量为0.02%-2%。

6.根据权利要求1所述的NGAL胶乳免疫比浊法检测试剂盒，其特征在于，试剂R2中，

所述连有NGAL抗体的胶乳微球为NGAL单抗或多抗连接在聚苯乙烯羧基微球，胶乳微球的直径为100-300nm，在试剂R2中缓冲液中质量含量为0.1%～5%，

所述缓冲液液选自磷酸盐缓冲液(PBS)、三羟甲基氨基甲烷缓冲液(Tris)、3-(N-吗啉基)丙磺酸缓冲液(Mops)、2-(N-吗啉)乙磺酸缓冲液(MES)、硼酸盐缓冲液或甘氨酸缓冲液或羟乙基哌嗪乙硫磺酸缓冲液中的一种或多种，pH值为6.5-9.0，

所述稳定剂为甘露醇、牛血清白蛋白、海藻糖中的一种或多种，在试剂R2中缓冲液中质量含量为0.5%-5%，

所述防腐剂为叠氮化钠或Proclin300中的一种或两种，在试剂R2中缓冲液中质量含量为0.02%-2%。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的NGAL胶乳免疫比浊法检测试剂盒，其特征在于，所述试剂R1与所述试剂R2的体积比为3:1。

8.根据权利要求1-6中任一项所述的NGAL胶乳免疫比浊法检测试剂盒，其特征在于，所述校准品为重组或天然NGAL蛋白。

9.根据权利要求1-6中任一项所述的NGAL胶乳免疫比浊法检测试剂盒，其特征在于，所述质控品为重组或天然NGAL蛋白。

10.如权利要求1-9中任一项所述的NGAL胶乳免疫比浊法检测试剂盒的制备方法，其特征在于，该方法采用以下步骤：

I、试剂R1制备：

取纯化水，依次加入缓冲液、抗干扰剂、增敏剂、电解质、防腐剂，每次添加物料需要搅拌至完全溶解，调节pH值至6.5-9.0，并用0.22μm滤膜进行过滤；

II、试剂R2制备：

(1)活化聚苯乙烯胶乳微球：在胶乳微球中加入1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐，20℃-25℃混合活化30min；

(2)偶联抗体：将中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体加入已活化的聚苯乙烯胶乳微球中，20℃-25℃反应2h进行共价偶联；

(3)洗涤除去未偶联成功的抗体：得到的胶乳微球反应液离心去掉上清，除去游离抗体、小分子杂质；

(4)封闭微球上未偶联抗体的羧基位点：得到的胶乳微球中加入牛血清白蛋白，封闭1h；

(5)混合与保存：使用含稳定剂、防腐剂、缓冲液的R2稀释液，将步骤(4)获得的溶液稀释3～15倍，最终得到试剂R2，于4℃保存；

III、校准品及质控品制备：将天然或重组NGAL蛋白用冻干稀释液进行稀释至目标浓度，进行冻干，于4℃保存；

VI、组成试剂盒：

将上述制备的试剂R1和试剂R2按体积比R1:R2＝3:1分装入瓶，与校准品及质控品组成试剂盒。

NGAL胶乳免疫比浊法检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生化技术领域，特别涉及一种灵敏度高、特异性强的胶乳免疫比浊法中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白检测试剂盒的制备方法。

背景技术

[0002] 人类中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase-associatedlipocalin,NGAL)分子量约25kDa，共价结合于中性粒细胞明胶酶。NGAL生理状态下是一种生长因子，主要参与了早期肾脏上皮的发生、生长。在正常组织包括肾脏、肺、胃及结肠的上皮组织中表达量较低。而急性肾功能损伤过程中NGAL水平偏高，能直接从尿液和血液中检测出来，预后将发展成为急性肾功能衰竭。急性肾损伤(AKI)是一种发病率和死亡率均较高的疾病，由于该病发病机理不明，并且缺乏准确可靠的早期诊断标志物。研究证明，诱导AKI后约2h就能在尿中检测到NGAL，而检测出血肌酐的明显改变要3-4天。另外，儿童心脏手术后发生急性肾衰的患者在手术后2h的血、尿NGAL浓度明显升高，而血肌酐明显升高则在1-3d后，NGAL的测定对AKI的早期诊断更加有力，能比传统的肾损伤标志物更灵敏的反应出肾功能状况。

[0003] 目前市场上NGAL检测方法有酶免疫法(ELISA)、放射免疫分析法(RIA)、乳胶增强透射免疫比浊法等，但是ELISA和RIA检测法存在操作繁琐，检测时间长；普通透射比浊法存在灵敏度不够；而乳胶增强透射免疫比浊法也存在抗干扰能力弱，特殊血样如乳糜血样等，部分试剂盒甚至能测出负值，不能很好反应特殊体质病人肾功能情况。

[0004] 因此，需要在以往NGAL胶乳免疫比浊法检测试剂盒的制备基础上进行改良，以提高NGAL胶乳免疫比浊法试剂的抗干扰能力，扩大适应人群。

[0005] 中国专利CN102662064A公开了检测中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的免疫比浊试剂盒及制备方法，应用液瓶、抗体悬浮液瓶和标准品瓶放置于盒体内，应用液瓶中装有应用液，其组分：表面活性剂0.01％～1％，防腐剂0.01～0.5％，氯化钠1％～20％，缓冲液20～200mmol/L；抗体悬浮液瓶中装有包被中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体的乳胶悬液，其组分：包被中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体的乳胶0.05％～0.5％，表面活性剂0.01％～1％，防腐剂0.01～0.5％，缓冲液20～200mmol/L；标准品瓶中装有中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品。实现在生化仪上大批量定量检测。但该方法生产的试剂在抗干扰方面表现不足，无法准确测量特殊体质的病人健康状况。

发明内容

[0006] 本发明的目的就是为了克服上述现有技术存在的缺陷而提供一种中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白胶乳免疫比浊法检测试剂盒及其制备方法，该方法制备的试剂盒具有抗干扰能力强可适用检测不同体质病人血样，特别是能准确测定含干扰因子较多的特殊血样。

[0007] 本发明的目的可以通过以下技术方案来实现：

[0008] 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白胶乳免疫比浊测定试剂盒，由试剂R1、试剂R2、校准品及质控品组成，

[0009] 所述试剂R1包括缓冲液、抗干扰剂、增敏剂、电解质、防腐剂，

[0010] 所述试剂R2包括连有NGAL抗体的胶乳微球、缓冲液、稳定剂、防腐剂。

[0011] 所述抗干扰剂由表面活性剂聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚与曲拉通按且在试剂R1中缓冲液中质量比为1:1-5:1复配得到。

[0012] 所述聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚选自聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚L61、L64、F68或F108中一种或多种，且在试剂R1中缓冲液中质量含量为0.2％-0.8％。

[0013] 所述曲拉通包括曲拉通X-100或曲拉通X-45中一种或多种，且在试剂R1中缓冲液中质量含量为0.15％-0.6％。

[0014] 以下是更加优选的技术方案：

[0015] 聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚L61和曲拉通X-45组合比例为4:3。

[0016] 聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚F68和曲拉通X-45组合比例为3:2。

[0017] 聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚F108和曲拉通X-100组合比例为15:6。

[0018] 聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚L68和曲拉通X-45组合比例为5:4。

[0019] 本发明在现有技术的基础上进行改良，特别在表面活性剂使用上，选用抗干扰能力更强的聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚F68、F08等，并通过合理调整曲拉通和聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚的使用比例，达到既可以保证试剂反应灵敏度又可以显著提高试剂抗干扰性能的效果。

[0020] 试剂R1中，

[0021] 所述缓冲液包括但不限于磷酸盐缓冲液、HEPES缓冲液、MES缓冲液或MOPS缓冲液，浓度为25-150mM，pH值为6.5-9.0，作为优选的技术方案，缓冲液的pH值为7.0-8.0。

[0022] 所述增敏剂为聚乙二醇6000、聚乙二醇8000或聚乙二醇20000中的一种或多种，且在试剂R1中缓冲液中质量含量为0.5％-10％，

[0023] 所述电解质为氯化钠，且在试剂R1中缓冲液中质量含量为0.5％-5％，

[0024] 所述防腐剂为叠氮化钠或Proclin300中的一种或两种，且在试剂R1中缓冲液中质量含量为0.02％-2％。

[0025] 试剂R2中，

[0026] 所述连有NGAL抗体的胶乳微球为NGAL单抗或多抗连接在聚苯乙烯羧基微球，胶乳微球的直径为100-300nm，且在试剂R1中缓冲液中质量含量为0.1％～5％，

[0027] 所述缓冲液液选自磷酸盐缓冲液(PBS)、三羟甲基氨基甲烷缓冲液(Tris)、3-(N-吗啉基)丙磺酸缓冲液(Mops)、2-(N-吗啉)乙磺酸缓冲液(MES)、硼酸盐缓冲液或甘氨酸缓冲液或羟乙基哌嗪乙硫磺酸缓冲液中的一种或多种，pH值为6.5-9.0，作为优选的技术方案，缓冲液的pH值为7.5-9.0。

[0028] 所述稳定剂为甘露醇、牛血清白蛋白、海藻糖中的一种或多种，且在试剂R1中缓冲液中质量含量为0.5％-5％，

[0029] 所述防腐剂为叠氮化钠或Proclin300中的一种或两种，且在试剂R1中缓冲液中质量含量为0.02％-2％。

[0030] 所述试剂R1与所述试剂R2的体积比为3:1。

[0031] 所述校准品为重组或天然NGAL蛋白。

[0032] 所述质控品为重组或天然NGAL蛋白。

[0033] 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白胶乳免疫比浊测定试剂盒的制备方法，采用以下步骤：

[0034] I、试剂R1制备：

[0035] 取纯化水，依次加入缓冲液、抗干扰剂、增敏剂、电解质、防腐剂，每次添加物料需要搅拌至完全溶解，调节pH值至6.5-9.0，并用0.22μm滤膜进行过滤；

[0036] II、试剂R2制备：

[0037] (1)活化聚苯乙烯胶乳微球：在胶乳微球中加入1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐，20℃-25℃混合活化30min；

[0038] (2)偶联抗体：将中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体加入已活化的聚苯乙烯胶乳微球中，20℃-25℃反应2h进行共价偶联；

[0039] (3)洗涤除去未偶联成功的抗体：得到的胶乳微球反应液离心去掉上清，除去游离抗体、小分子杂质；

[0040] (4)封闭微球上未偶联抗体的羧基位点：得到的胶乳微球中加入牛血清白蛋白，封闭1h；

[0041] (5)混合与保存：使用含稳定剂、防腐剂、缓冲液的R2稀释液，将步骤(4)获得的溶液稀释3～15倍，最终得到试剂R2，于4℃保存；

[0042] III、校准品及质控品制备：将天然或重组NGAL蛋白用冻干稀释液进行稀释至目标浓度，进行冻干，于4℃保存；

[0043] VI、组成试剂盒：

[0044] 将上述制备的试剂R1和试剂R2按体积比R1:R2＝3:1分装入瓶，与校准品及质控品组成试剂盒。

[0045] 通过在试剂R1中添加聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物和曲拉通复配得到的抗干扰剂，调整其用量比例，能显著提高试剂的抗干扰能力，扩大适用人群的同时保持与现有试剂良好的相关性。曲拉通可以提高试剂灵敏度，并对一定浓度的干扰物发挥作用，但当干扰物浓度较高时，特别是高浓度糜样本时，排除干扰能力较差。聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚F68、F08等，对极微细颗粒有极强的分散作用，对粘稠样本中脂类等具有特殊的抗干扰能力，但较强的分散能力使得胶乳试剂试剂灵敏度下降严重，影响试剂性能。本发明通过合理调整曲拉通和聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚的使用比例，达到既可以保证试剂反应灵敏度又可以显著提高试剂抗干扰性能的效果。

[0046] 与现有技术相比，本发明试剂盒灵敏度高、特异性强和稳定性好，有较好的临床应用前景。本发明试剂盒制备简单，宜于工业化生产，可高效检测尿液、血浆、血清中的NGAL含量，并且检测结果与进口试剂相关良好，有较大的应用价值。

附图说明

[0047] 图1为试剂盒线性测试图；

[0048] 图2为与进口试剂相关性测试图；

[0049] 图3为血清样本抗干扰测试图；

[0050] 图4为尿液样本抗干扰测试图；

[0051] 图5为试剂稳定性测试图。

具体实施方式

[0052] 下面结合具体实施例对本发明进行详细说明。以下实施例将有助于本领域的技术人员进一步理解本发明，但不以任何形式限制本发明。应当指出的是，对本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进。这些都属于本发明的保护范围。

[0053] 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白胶乳免疫比浊测定试剂盒，由试剂R1、试剂R2、校准品及质控品组成，试剂R1与试剂R2的体积比为3:1。试剂R1包括缓冲液、抗干扰剂、增敏剂、电解质、防腐剂，试剂R2包括连有NGAL抗体的胶乳微球、缓冲液、稳定剂、防腐剂，校准品以及质控品为重组或天然NGAL蛋白。

[0054] 在试剂R1中，

[0055] 使用的抗干扰剂由表面活性剂聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚与曲拉通按在试剂R1中缓冲液中质量比为1:1-5:1复配得到，其中，聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚选自聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚L61、L64、F68或F108中一种或多种，且在试剂R1中缓冲液中质量含量为0.2％-0.8％，曲拉通包括曲拉通X-100或曲拉通X-45中一种或多种，含量为0.15％-0.6％，上述组分根据实际需要，可以选择例如：聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚L61和曲拉通X-45组合比例为4:3、聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚F68和曲拉通X-45组合比例为3:2、聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚F108和曲拉通X-100组合比例为15:6、聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚L68和曲拉通X-45组合比例为5:4。

[0056] 使用的缓冲液可以是磷酸盐缓冲液、HEPES缓冲液、MES缓冲液或MOPS缓冲液，浓度为25-150mM，pH值为6.5-9.0，优选采用的缓冲液的pH值为7.0-8.0。

[0057] 增敏剂为聚乙二醇6000、聚乙二醇8000或聚乙二醇20000中的一种或多种，含量为0.5％-10％，电解质为氯化钠，含量为0.5％-5％，防腐剂为叠氮化钠或Proclin300中的一种或两种，含量为0.02％-2％。

[0058] 试剂R2中，

[0059] 连有NGAL抗体的胶乳微球为NGAL单抗或多抗连接在聚苯乙烯羧基微球，胶乳微球的直径为100-300nm，且在试剂R2中缓冲液中质量含量为0.1％～5％，使用的缓冲液液选自磷酸盐缓冲液(PBS)、三羟甲基氨基甲烷缓冲液(Tris)、3-(N-吗啉基)丙磺酸缓冲液(Mops)、2-(N-吗啉)乙磺酸缓冲液(MES)、硼酸盐缓冲液或甘氨酸缓冲液或羟乙基哌嗪乙硫磺酸缓冲液中的一种或多种，pH值为6.5-9.0，优选采用的缓冲液的pH值为7.5-9.0。

[0060] 稳定剂为甘露醇、牛血清白蛋白、海藻糖中的一种或多种，且在试剂R2中缓冲液中质量含量为0.5％-5％(同上)，防腐剂为叠氮化钠或Proclin300中的一种或两种，且在试剂R2中缓冲液中质量含量为0.02％-2％(同上)。

[0061] 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白胶乳免疫比浊测定试剂盒的制备方法，采用以下步骤：

[0062] I、试剂R1制备：

[0063] 取纯化水，依次加入缓冲液、抗干扰剂、增敏剂、电解质、防腐剂，每次添加物料需

要搅拌至完全溶解，调节pH值至6.5-9.0，并用0.22μm滤膜进行过滤；

[0064] II、试剂R2制备：

[0065] (1)活化聚苯乙烯胶乳微球：在胶乳微球中加入1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐，20℃-25℃混合活化30min；

[0066] (2)偶联抗体：将中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体加入已活化的聚苯乙烯胶乳微球中，20℃-25℃反应2h进行共价偶联；

[0067] (3)洗涤除去未偶联成功的抗体：得到的胶乳微球反应液离心去掉上清，除去游离抗体、小分子杂质；

[0068] (4)封闭微球上未偶联抗体的羧基位点：得到的胶乳微球中加入牛血清白蛋白，封闭1h；

[0069] (5)混合与保存：使用含稳定剂、防腐剂、缓冲液的R2稀释液，将步骤(4)获得的溶液稀释3～15倍，最终得到试剂R2，于4℃保存；

[0070] III、校准品及质控品制备：将天然或重组NGAL蛋白用冻干稀释液进行稀释至目标浓度，进行冻干，于4℃保存；

[0071] VI、组成试剂盒：

[0072] 将上述制备的试剂R1和试剂R2按体积比R1:R2＝3:1分装入瓶，与校准品及质控品组成试剂盒。

[0073] 以下是更加详细的实施案例，通过以下实施案例进一步说明本发明的技术方案以及所能够获得的技术效果。

[0074] 实施例1

[0075] 试剂R1的制备：取995g水，然后依次加入4.8g磷酸二氢纳、22.8g磷酸氢二纳、10.0g聚乙二醇8000、30.0g NaCl、2g聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物L61、1.5g曲拉通X-45(w/w)和0.5g Pr ocl in300，每次添加物料需要搅拌至完全溶解，调节pH至7.4：用0.22μm滤膜过滤，制成1L的试剂R1。

[0076] 制备试剂R2，步骤如下：

[0077] (1)聚苯乙烯胶乳微球的活化：取30g 200nm胶乳微球(100mg/mL)，加入10mL 500mM pH值为7.4的HEPES溶液、4mL新鲜配制的浓度为20mg/mL的EDC溶液，纯化水补足至终体积100mL，充分混匀，室温(20～25℃)混合30min；

[0078] (2)偶联：按微球：抗体质量比＝12:1的比例将NGAL抗体加入上步反应液，室温混合偶联2h；

[0079] (3)洗涤：选择合适的中空纤维柱(mPES/500KD/790cm2，SPECTRUM公司)，用切向流过滤系统(KrosFlo research IIi TFF system，SPECTRUM公司)将步骤(2)中溶液过滤，将反应缓冲液换为保存缓冲液100mM Tris 8.0，控制剪切力值为3000-4500，过滤出5倍步骤(2)体积的100mM的Tris缓冲液洗涤后完成；

[0080] (4)封闭：在步骤(3)的体系中加入20mL 20％牛血清白蛋白溶液，于室温混合1h；

[0081] (5)混合与保存：将步骤(4)获得的胶乳微球初反应液用R2稀释液(含100mM甘氨酸缓冲液，4％牛血清白蛋白、0.5％海藻糖、0.05％叠氮化钠，pH值8.0)稀释至终体积1000mL，即得到试剂R2。

[0082] III、制备NGAL校准品：取995mL水，依次加入100mM Tris缓冲剂、1％氯化钠、0.2％

乙二胺四乙酸二钠、3.0％牛血清白蛋白、0.1％叠氮化钠，每次添加物料需搅拌至完全溶解，调节pH值至8.0，溶液用0.22μm滤膜之后，加入市售NGAL重组抗原5g，得到配制成终浓度为5000ng/mL的NGAL校准品溶液。使用市售的NGAL测定试剂盒(胶乳免疫比浊法)对校准品进行赋值。

[0083] 制备NGAL质控品：取995mL水，依次加入100mM Tris缓冲剂、1％氯化钠、0.2％乙二胺四乙酸二钠、3.0％牛血清白蛋白、0.1％叠氮化钠，每次添加物料需搅拌至完全溶解，调节pH值至8.0，溶液用0.22μm滤膜之后，取500mL加入市售NGAL重组抗原0.26g，得到配制成终浓度为520ng/mL的NGAL质控品溶液，另取500mL加入市售NGAL重组抗原0.085g，得到配制成终浓度为170ng/mL的NGAL质控品溶液使用市售的NGAL测定试剂盒(胶乳免疫比浊法)对校准品进行赋值。

[0084] 组成试剂盒：将制备的R1试剂、R2试剂按体积比R1:R2按照3:1配套组成试剂盒，试剂盒的包装规格为：R1(4×45ml/每瓶)，R2(4×15ml/每瓶)。

[0085] 实施例2

[0086] 试剂R1的制备：取995g水，然后依次加入4.8g磷酸二氢纳、22.8g磷酸氢二纳、10.0g聚乙二醇8000、30.0g NaCl、8g聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物L61、6g曲拉通X-45(w/w)和0.5g Pr ocl in300，每次添加物料需要搅拌至完全溶解，调节pH至7.4：用0.22μm滤膜过滤，制成1L的试剂R1。

[0087] 制备试剂R2，步骤如下：

[0088] (1)聚苯乙烯胶乳微球的活化：取30g 200nm胶乳微球(100mg/mL)，加入10mL 500mM pH值为7.4的HEPES溶液、4mL新鲜配制的浓度为20mg/mL的EDC溶液，纯化水补足至终体积100mL，充分混匀，室温(20～25℃)混合30min；

[0089] (2)偶联：按微球：抗体质量比＝12:1的比例将NGAL抗体加入上步反应液，室温混合偶联2h；

[0090] (3)洗涤：选择合适的中空纤维柱(mPES/500KD/790cm2，SPECTRUM公司)，用切向流过滤系统(KrosFlo research IIi TFF system，SPECTRUM公司)将步骤(2)中溶液过滤，将反应缓冲液换为保存缓冲液100mM Tris 8.0，控制剪切力值为3000-4500，过滤出5倍步骤(2)体积的100mM的Tris缓冲液洗涤后完成；

[0091] (4)封闭：在步骤(3)的体系中加入20mL 20％牛血清白蛋白溶液，于室温混合1h；

[0092] (5)混合与保存：将步骤(4)获得的胶乳微球初反应液用R2稀释液(含100mM甘氨酸缓冲液，4％牛血清白蛋白、0.5％海藻糖、0.05％叠氮化钠，pH值8.0)稀释至终体积1000mL，即得到试剂R2。

[0093] III、制备NGAL校准品：取995mL水，依次加入100mM Tris缓冲剂、1％氯化钠、0.2％乙二胺四乙酸二钠、3.0％牛血清白蛋白、0.1％叠氮化钠，每次添加物料需搅拌至完全溶解，调节pH值至8.0，溶液用0.22μm滤膜之后，加入市售NGAL重组抗原5g，得到配制成终浓度为5000ng/mL的NGAL校准品溶液。使用市售的NGAL测定试剂盒(胶乳免疫比浊法)对校准品进行赋值。

[0094] 制备NGAL质控品：取995mL水，依次加入100mM Tris缓冲剂、1％氯化钠、0.2％乙二胺四乙酸二钠、3.0％牛血清白蛋白、0.1％叠氮化钠，每次添加物料需搅拌至完全溶解，调节pH值至8.0，溶液用0.22μm滤膜之后，取500mL加入市售NGAL重组抗原0.26g，得到配制成

终浓度为520ng/mL的NGAL质控品溶液，另取500mL加入市售NGAL重组抗原0.085g，得到配制成终浓度为170ng/mL的NGAL质控品溶液使用市售的NGAL测定试剂盒(胶乳免疫比浊法)对校准品进行赋值。

[0095] 组成试剂盒：将制备的R1试剂、R2试剂按体积比R1:R2按照3:1配套组成试剂盒，试剂盒的包装规格为：R1(4×45ml/每瓶)，R2(4×15ml/每瓶)。

[0096] 实施例3

[0097] 试剂R1的制备：取995g水，然后依次加入4.8g磷酸二氢纳、22.8g磷酸氢二纳、10.0g聚乙二醇8000、30.0g NaCl、7.5g聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物F68、5g曲拉通X-45(w/w)和0.5g Pr ocl in300，每次添加物料需要搅拌至完全溶解，调节pH至7.4：用0.22μm滤膜过滤，制成1 L的试剂R1。

[0098] 制备试剂R2，步骤如下：

[0099] (1)聚苯乙烯胶乳微球的活化：取30g 200nm胶乳微球(100mg/mL)，加入10mL 500mM pH值为7.4的HEPES溶液、4mL新鲜配制的浓度为20mg/mL的EDC溶液，纯化水补足至终体积100mL，充分混匀，室温(20～25℃)混合30min；

[0100] (2)偶联：按微球：抗体质量比＝12:1的比例将NGAL抗体加入上步反应液，室温混合偶联2h；

[0101] (3)洗涤：选择合适的中空纤维柱(mPES/500KD/790cm2，SPECTRUM公司)，用切向流过滤系统(KrosFlo research IIi TFF system，SPECTRUM公司)将步骤(2)中溶液过滤，将反应缓冲液换为保存缓冲液100mM Tris 8.0，控制剪切力值为3000-4500，过滤出5倍步骤(2)体积的100mM的Tris缓冲液洗涤后完成；

[0102] (4)封闭：在步骤(3)的体系中加入20mL 20％牛血清白蛋白溶液，于室温混合1h；

[0103] (5)混合与保存：将步骤(4)获得的胶乳微球初反应液用R2稀释液(含100mM甘氨酸缓冲液，4％牛血清白蛋白、0.5％海藻糖、0.05％叠氮化钠，pH值8.0)稀释至终体积1000mL，即得到试剂R2。

[0104] III、制备NGAL校准品：取995mL水，依次加入100mM Tris缓冲剂、1％氯化钠、0.2％乙二胺四乙酸二钠、3.0％牛血清白蛋白、0.1％叠氮化钠，每次添加物料需搅拌至完全溶解，调节pH值至8.0，溶液用0.22μm滤膜之后，加入市售NGAL重组抗原5g，得到配制成终浓度为5000ng/mL的NGAL校准品溶液。使用市售的NGAL测定试剂盒(胶乳免疫比浊法)对校准品进行赋值。

[0105] 制备NGAL质控品：取995mL水，依次加入100mM Tris缓冲剂、1％氯化钠、0.2％乙二胺四乙酸二钠、3.0％牛血清白蛋白、0.1％叠氮化钠，每次添加物料需搅拌至完全溶解，调节pH值至8.0，溶液用0.22μm滤膜之后，取500mL加入市售NGAL重组抗原0.26g，得到配制成终浓度为520ng/mL的NGAL质控品溶液，另取500mL加入市售NGAL重组抗原0.085g，得到配制成终浓度为170ng/mL的NGAL质控品溶液使用市售的NGAL测定试剂盒(胶乳免疫比浊法)对校准品进行赋值。

[0106] 组成试剂盒：将制备的R1试剂、R2试剂按体积比R1:R2按照3:1配套组成试剂盒，试剂盒的包装规格为：R1(4×45ml/每瓶)，R2(4×15ml/每瓶)。

[0107] 实施例4

[0108] 试剂R1的制备：取995g水，然后依次加入4.8g磷酸二氢纳、22.8g磷酸氢二纳、

10.0g聚乙二醇8000、30.0g NaCl、7.5g聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物F108、3g曲拉通X-100(w/w)和0.5g Pr ocl in300,每次添加物料需要搅拌至完全溶解,调节pH至7.4:用0.22μm滤膜过滤,制成l L的试剂R1。

[0109] 制备试剂R2,步骤如下:

[0110] (1)聚苯乙烯胶乳微球的活化:取30g 200nm胶乳微球(100mg/mL),加入10mL 500mM pH值为7.4的HEPES溶液、4mL新鲜配制的浓度为20mg/mL的EDC溶液,纯化水补足至终体积100mL,充分混匀,室温(20～25℃)混合30min;

[0111] (2)偶联:按微球:抗体质量比＝12:1的比例将NGAL抗体加入上步反应液,室温混合偶联2h;

[0112] (3)洗涤:选择合适的中空纤维柱(mPES/500KD/790cm2,SPECTRUM公司),用切向流过滤系统(KrosFlo research IIi TFF system,SPECTRUM公司)将步骤(2)中溶液过滤,将反应缓冲液换为保存缓冲液100mM Tris 8.0,控制剪切力值为3000-4500,过滤出5倍步骤(2)体积的100mM的Tris缓冲液洗涤后完成;

[0113] (4)封闭:在步骤(3)的体系中加入20mL 20％牛血清白蛋白溶液,于室温混合1h;

[0114] (5)混合与保存:将步骤(4)获得的胶乳微球初反应液用R2稀释液(含100mM甘氨酸缓冲液,4％牛血清白蛋白、0.5％海藻糖、0.05％叠氮化钠,pH值8.0)稀释至终体积1000mL,即得到试剂R2。

[0115] III、制备NGAL校准品:取995mL水,依次加入100mM Tris缓冲剂、1％氯化钠、0.2％乙二胺四乙酸二钠、3.0％牛血清白蛋白、0.1％叠氮化钠,每次添加物料需搅拌至完全溶解,调节pH值至8.0,溶液用0.22μm滤膜之后,加入市售NGAL重组抗原5g,得到配制成终浓度为5000ng/mL的NGAL校准品溶液。使用市售的NGAL测定试剂盒(胶乳免疫比浊法)对校准品进行赋值。

[0116] 制备NGAL质控品:取995mL水,依次加入100mM Tris缓冲剂、1％氯化钠、0.2％乙二胺四乙酸二钠、3.0％牛血清白蛋白、0.1％叠氮化钠,每次添加物料需搅拌至完全溶解,调节pH值至8.0,溶液用0.22μm滤膜之后,取500mL加入市售NGAL重组抗原0.26g,得到配制成终浓度为520ng/mL的NGAL质控品溶液,另取500mL加入市售NGAL重组抗原0.085g,得到配制成终浓度为170ng/mL的NGAL质控品溶液使用市售的NGAL测定试剂盒(胶乳免疫比浊法)对校准品进行赋值。

[0117] 组成试剂盒:将制备的R1试剂、R2试剂按体积比R1:R2按照3:1配套组成试剂盒,试剂盒的包装规格为:R1(4×45ml/每瓶),R2(4×15ml/每瓶)。

[0118] 实施例5

[0119] 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白胶乳免疫比浊测定试剂盒,由试剂R1、试剂R2、校准品及质控品组成,试剂R1与试剂R2的体积比为3:1。试剂R1包括缓冲液、抗干扰剂、增敏剂、电解质、防腐剂,试剂R2包括连有NGAL抗体的胶乳微球、缓冲液、稳定剂、防腐剂,校准品以及质控品为重组NGAL蛋白。

[0120] 在试剂R1中,

[0121] 使用的抗干扰剂由表面活性剂聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚L61与曲拉通X-100按在试剂R1中缓冲液中质量比为1:1复配得到,聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚L61与曲拉通在试剂R1中缓冲液中质量含量为0.2％。

[0122] 使用的缓冲液为磷酸盐缓冲液，浓度为25mM，pH值为6.5，增敏剂为聚乙二醇6000，在试剂R1中缓冲液中质量含量为0.5％，电解质为氯化钠，在试剂R1中缓冲液中质量含量为0.5％，防腐剂为叠氮化钠，在试剂R1中缓冲液中质量含量为0.02％。

[0123] 试剂R2中，

[0124] 连有NGAL抗体的胶乳微球为NGAL单抗或多抗连接在聚苯乙烯羧基微球，胶乳微球的直径为100nm，且在试剂R2中缓冲液中质量含量为0.1％，使用的缓冲液液为磷酸盐缓冲液(PBS)，pH值为6.5，稳定剂为甘露醇，在试剂R2中缓冲液中质量含量为0.5％-5％，防腐剂为叠氮化钠，且在试剂R2中缓冲液中质量含量为0.02％。

[0125] 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白胶乳免疫比浊测定试剂盒的制备方法，采用以下步骤：

[0126] I、试剂R1制备：

[0127] 取纯化水，依次加入缓冲液、抗干扰剂、增敏剂、电解质、防腐剂，每次添加物料需要搅拌至完全溶解，调节pH值至6.5，并用0.22μm滤膜进行过滤；

[0128] II、试剂R2制备：

[0129] (1)活化聚苯乙烯胶乳微球：在胶乳微球中加入1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐，20℃混合活化30min；

[0130] (2)偶联抗体：将中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体加入已活化的聚苯乙烯胶乳微球中，20℃反应2h进行共价偶联；

[0131] (3)洗涤除去未偶联成功的抗体：得到的胶乳微球反应液离心去掉上清，除去游离抗体、小分子杂质；

[0132] (4)封闭微球上未偶联抗体的羧基位点：得到的胶乳微球中加入牛血清白蛋白，封闭1h；

[0133] (5)混合与保存：使用含稳定剂、防腐剂、缓冲液的R2稀释液，将步骤(4)获得的溶液稀释3倍，最终得到试剂R2，于4℃保存；

[0134] III、校准品及质控品制备：将天然或重组NGAL蛋白用冻干稀释液进行稀释至目标浓度，进行冻干，于4℃保存；

[0135] VI、组成试剂盒：

[0136] 将上述制备的试剂R1和试剂R2按体积比R1:R2＝3:1分装入瓶，与校准品及质控品组成试剂盒。

[0137] 实施例6

[0138] 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白胶乳免疫比浊测定试剂盒，由试剂R1、试剂R2、校准品及质控品组成，试剂R1与试剂R2的体积比为3:1。试剂R1包括缓冲液、抗干扰剂、增敏剂、电解质、防腐剂，试剂R2包括连有NGAL抗体的胶乳微球、缓冲液、稳定剂、防腐剂，校准品以及质控品为重组或天然NGAL蛋白。

[0139] 在试剂R1中，

[0140] 使用的抗干扰剂由表面活性剂聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚L61与曲拉通X-45按在试剂R1中缓冲液中质量比为4:3复配得到，聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚L61在试剂R1中缓冲液中质量含量为0.8％，曲拉通X-45含量为0.6％。

[0141] 使用的缓冲液为HEPES缓冲液，pH值为7.0，增敏剂为聚乙二醇6000、聚乙二醇8000

的混合物，在试剂R1中缓冲液中质量含量为2％，电解质为氯化钠，含量为2％，防腐剂为叠氮化钠，含量为0.5％。

[0142] 试剂R2中，

[0143] 连有NGAL抗体的胶乳微球为NGAL单抗或多抗连接在聚苯乙烯羧基微球，胶乳微球的直径为200nm，在试剂R2中缓冲液中质量含量为2％，使用的缓冲液液为三羟甲基氨基甲烷缓冲液(Tris)，pH值为7.5。

[0144] 稳定剂为牛血清白蛋白，在试剂R2中缓冲液中质量含量为1％，防腐剂为叠氮化钠，在试剂R2中缓冲液中质量含量为0.5％。

[0145] 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白胶乳免疫比浊测定试剂盒的制备方法，采用以下步骤：

[0146] I、试剂R1制备：

[0147] 取纯化水，依次加入缓冲液、抗干扰剂、增敏剂、电解质、防腐剂，每次添加物料需要搅拌至完全溶解，调节pH值至7.0，并用0.22μm滤膜进行过滤；

[0148] II、试剂R2制备：

[0149] (1)活化聚苯乙烯胶乳微球：在胶乳微球中加入1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐，20℃混合活化30min；

[0150] (2)偶联抗体：将中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体加入已活化的聚苯乙烯胶乳微球中，20℃反应2h进行共价偶联；

[0151] (3)洗涤除去未偶联成功的抗体：得到的胶乳微球反应液离心去掉上清，除去游离抗体、小分子杂质；

[0152] (4)封闭微球上未偶联抗体的羧基位点：得到的胶乳微球中加入牛血清白蛋白，封闭1h；

[0153] (5)混合与保存：使用含稳定剂、防腐剂、缓冲液的R2稀释液，将步骤(4)获得的溶液稀释5倍，最终得到试剂R2，于4℃保存；

[0154] III、校准品及质控品制备：将天然或重组NGAL蛋白用冻干稀释液进行稀释至目标浓度，进行冻干，于4℃保存；

[0155] VI、组成试剂盒：

[0156] 将上述制备的试剂R1和试剂R2按体积比R1:R2＝3:1分装入瓶，与校准品及质控品组成试剂盒。

[0157] 实施例7

[0158] 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白胶乳免疫比浊测定试剂盒，由试剂R1、试剂R2、校准品及质控品组成，试剂R1与试剂R2的体积比为3:1。试剂R1包括缓冲液、抗干扰剂、增敏剂、电解质、防腐剂，试剂R2包括连有NGAL抗体的胶乳微球、缓冲液、稳定剂、防腐剂，校准品以及质控品为天然NGAL蛋白。

[0159] 在试剂R1中，

[0160] 使用的抗干扰剂由表面活性剂聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚F68与曲拉通X-45按在试剂R1中缓冲液中质量比为5:4复配得到，其中，聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚F68在试剂R1中缓冲液中质量含量为0.5％，曲拉通X-45的含量为0.4％。

[0161] 使用的缓冲液为MES缓冲液，浓度为100mM，pH值为8.0，增敏剂为聚乙二醇20000，

含量为6％，电解质为氯化钠，含量为3％，防腐剂为Proclin300，含量为1％。

[0162] 试剂R2中，

[0163] 连有NGAL抗体的胶乳微球为NGAL单抗或多抗连接在聚苯乙烯羧基微球，胶乳微球的直径为300nm，且在试剂R2中缓冲液中质量含量为4％，使用的缓冲液液为2-(N-吗啉)乙磺酸缓冲液(MES)，pH值为8.0。

[0164] 稳定剂为海藻糖，在试剂R2中缓冲液中质量含量为4％，防腐剂为Proclin300，在试剂R2中缓冲液中质量含量为1％。。

[0165] 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白胶乳免疫比浊测定试剂盒的制备方法，采用以下步骤：

[0166] I、试剂R1制备：

[0167] 取纯化水，依次加入缓冲液、抗干扰剂、增敏剂、电解质、防腐剂，每次添加物料需要搅拌至完全溶解，调节pH值至8.0，并用0.22μm滤膜进行过滤；

[0168] II、试剂R2制备：

[0169] (1)活化聚苯乙烯胶乳微球：在胶乳微球中加入1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐，25℃混合活化30min；

[0170] (2)偶联抗体：将中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体加入已活化的聚苯乙烯胶乳微球中，25℃反应2h进行共价偶联；

[0171] (3)洗涤除去未偶联成功的抗体：得到的胶乳微球反应液离心去掉上清，除去游离抗体、小分子杂质；

[0172] (4)封闭微球上未偶联抗体的羧基位点：得到的胶乳微球中加入牛血清白蛋白，封闭1h；

[0173] (5)混合与保存：使用含稳定剂、防腐剂、缓冲液的R2稀释液，将步骤(4)获得的溶液稀释3～15倍，最终得到试剂R2，于4℃保存；

[0174] III、校准品及质控品制备：将天然或重组NGAL蛋白用冻干稀释液进行稀释至目标浓度，进行冻干，于4℃保存；

[0175] VI、组成试剂盒：

[0176] 将上述制备的试剂R1和试剂R2按体积比R1:R2＝3:1分装入瓶，与校准品及质控品组成试剂盒。

[0177] 实施例8

[0178] 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白胶乳免疫比浊测定试剂盒，由试剂R1、试剂R2、校准品及质控品组成，试剂R1与试剂R2的体积比为3:1。试剂R1包括缓冲液、抗干扰剂、增敏剂、电解质、防腐剂，试剂R2包括连有NGAL抗体的胶乳微球、缓冲液、稳定剂、防腐剂，校准品以及质控品为天然NGAL蛋白。

[0179] 在试剂R1中，

[0180] 使用的抗干扰剂由表面活性剂聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚F108与曲拉通X-100按在试剂R1中缓冲液中质量比为5:1复配得到，聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚F108在试剂R1中缓冲液中质量含量为0.8％，曲拉通X-100含量为0.16％。

[0181] 使用的缓冲液为MOPS缓冲液，浓度为150mM，pH值为9.0，增敏剂为聚乙二醇8000，含量为10％，电解质为氯化钠，含量为5％，防腐剂为Proclin300，含量为2％。

[0182] 试剂R2中，

[0183] 连有NGAL抗体的胶乳微球为NGAL单抗或多抗连接在聚苯乙烯羧基微球，胶乳微球的直径为300nm，且在试剂R2中缓冲液中质量含量为5％，使用的缓冲液液为甘氨酸缓冲液与羟乙基哌嗪乙硫磺酸缓冲液的混合物，pH值为9.0，稳定剂为牛血清白蛋白，在试剂R2中缓冲液中质量含量为5％，防腐剂为Proclin300，在试剂R2中缓冲液中质量含量为2％。

[0184] 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白胶乳免疫比浊测定试剂盒的制备方法，采用以下步骤：

[0185] I、试剂R1制备：

[0186] 取纯化水，依次加入缓冲液、抗干扰剂、增敏剂、电解质、防腐剂，每次添加物料需要搅拌至完全溶解，调节pH值至9.0，并用0.22μm滤膜进行过滤；

[0187] II、试剂R2制备：

[0188] (1)活化聚苯乙烯胶乳微球：在胶乳微球中加入1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐，25℃混合活化30min；

[0189] (2)偶联抗体：将中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体加入已活化的聚苯乙烯胶乳微球中，25℃反应2h进行共价偶联；

[0190] (3)洗涤除去未偶联成功的抗体：得到的胶乳微球反应液离心去掉上清，除去游离抗体、小分子杂质；

[0191] (4)封闭微球上未偶联抗体的羧基位点：得到的胶乳微球中加入牛血清白蛋白，封闭1h；

[0192] (5)混合与保存：使用含稳定剂、防腐剂、缓冲液的R2稀释液，将步骤(4)获得的溶液稀释3～15倍，最终得到试剂R2，于4℃保存；

[0193] III、校准品及质控品制备：将天然或重组NGAL蛋白用冻干稀释液进行稀释至目标浓度，进行冻干，于4℃保存；

[0194] VI、组成试剂盒：

[0195] 将上述制备的试剂R1和试剂R2按体积比R1:R2＝3:1分装入瓶，与校准品及质控品组成试剂盒。

[0196] 实施例9

[0197] 本发明NGAL测定试剂盒的性能试验

[0198] 检测工具：迪瑞AU680型全自动生化分析仪。

[0199] 分析方法：两点终点法。主波长：570nm；副波长：无。取实施例2制得的试剂R1 150μl，加入3μl血清样本，于37℃孵育5min后加入试剂R2 50μl，读取吸光度A1，反应5min后读取吸光度A2，最终反应吸光度的计算为A2与A1的差值。

[0200] 校准模式：多点非线性。反应方向：上升。

[0201] 计算方法：根据吸光度与校准品的不同浓度做出校准曲线。测试血清样本获得吸光度，根据校准曲线计算得到样本含量。

[0202] 参考范围：0～5000ng/mL。

[0203] I、本发明试剂盒的线性测试

[0204] 将实施例4制备的NGAL校准品用水分别稀释至0ng/mL、312.5ng/mL、625ng/mL、1250ng/mL、2500ng/mL、5000ng/mL，并用实施例2制备的试剂R1、试剂R2测试校准曲线。如图

1所示，图中X轴表示理论值(ng/mL)，Y轴表示实测值(ng/mL)，R^2＝0.9992，Y＝1.0431X-35.071。说明本发明试剂盒在浓度0～5000ng/mL范围内线性关系良好。

[0205] II、本发明试剂盒与进口对照试剂盒的灵敏度与相关性试验

[0206] 将实施例4试剂盒与进口对照试剂盒(胶乳免疫比浊法)分别测试不同浓度校准品，吸光度对比如表1所示。说明本发明试剂盒具有较高的灵敏度。

[0207] 表1

[0208]

校准品浓度（IU/mL）	自配试剂吸光度	对照试剂吸光度
0.00	0.00013	0.00271
312.5	0.015	0.012
625.00	0.027	0.021
1250.00	0.175	0.158
2500.00	0.241	0.211

[0209]

5000.00	0.387	0.305

[0210] 将实施例4试剂盒与进口对照试剂盒(胶乳免疫比浊法)分别测试校准曲线。并测试60例不同浓度临床血清样本，检测结果如图2所示，两者的线性相关系数R2＝0.992，相关性良好。

[0211] III、本发明试剂盒的批间差测试

[0212] 依照实施例4所述的实验方法，重复制备三批次NGAL试剂盒，分别测试不同浓度校准品，吸光度对比如表2所示。结果说明本发明使用NGAL胶乳免疫比浊试剂盒批间差小，重复性好。

[0213] 表2

[0214]

校准品浓度(ng/mL)	第一批吸光度	第二批吸光度	第三批吸光度
0	0.00023	0.00019	0.00024
312.5	0.014	0.015	0.018
625	0.028	0.027	0.024
1250	0.165	0.154	0.162
2500	0.251	0.255	0.249

[0215] IV、本发明试剂盒的抗干扰测试

[0216] 取体检正常的健康人血液样本和尿液样本(样本来源于上海复旦大学附属中山医院)添加重组NGAL抗原制成浓度600ng/mL样本，分别精密量取高浓度干扰物与血清及尿液混合，制成不同干扰物浓度的混合样本(如表3所示)，每个样本重复测定3次，取其平均值。干扰度的计算方法为：

[0217] 干扰度＝加干扰物样本均值/未加干扰物样本均值×100％

[0218] 干扰度在90%～110%之间为可接受干扰范围。

[0219] 表3

[0220]

样本	干扰因子	浓度
正常血清	游离胆红素（F-bil）	260mg/L
	结合胆红素（C-Bil)	300mg/L
	乳糜（Chyle）	2400FTU
	血红蛋白（HB）	8g/L
	类风湿因子（RF）	600IU/L

[0221]

	抗环血酸（VC）	9g/L
正常尿液	游离胆红素（F-bil）	260mg/L
	结合胆红素（C-Bil)	300mg/L
	血红蛋白（HB）	8g/L
	抗环血酸（VC）	9g/L
	葡萄糖（Glucose）	7g/L
	氯化钠（NaCl）	30g/L
	氯化钾（KCl）	25g/L
	尿素（Urea）	55g/L
	尿酸（Uric Acid）	3g/L
	肌酐（Creatinine）	7g/L
	肌酸（Creatine）	3g/L

[0222] 结果说明：如图3和图4所示，所示与未添加干扰物样本相比，添加后测值均能控制在±5%以内，同时与之前发明相比本试剂盒可接受的干扰物更高，抗干扰能力更强。

[0223] V、本发明试剂盒的效期稳定性测试

[0224] 在2～8℃储存条件下，将实施例2配制好的试剂盒分别于0月、3月、6月、9月、12月、14月对同一高值质控品(500ng/mL)和血低值质控品(170ng/mL)进行检测，每个样本测定5次取平均值(结果如图5所示)。结果说明本发明试剂盒可在2～8℃条件下稳定储存一年。

[0225] 从上述实施例可知本发明研究制备的NGAL测定试剂盒抗干扰能力强、线性好、稳定性好、批间差小等优点，可进行大批量工业化生产，有较好的临床应用前景。

[0226] 上述的对实施例的描述是为便于该技术领域的普通技术人员能理解和使用发明。熟悉本领域技术的人员显然可以容易地对这些实施例做出各种修改，并把在此说明的一般

原理应用到其他实施例中而不必经过创造性的劳动。因此，本发明不限于上述实施例，本领域技术人员根据本发明的揭示，不脱离本发明范畴所做出的改进和修改都应该在本发明的保护范围之内。

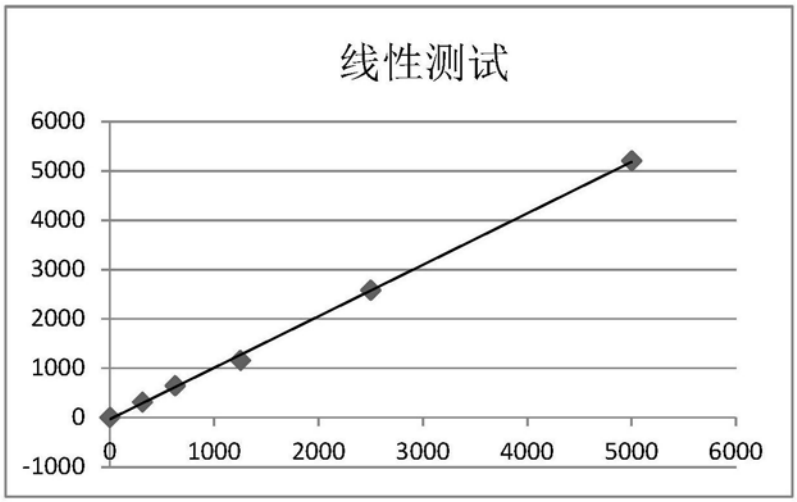

线性测试
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
-1000
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000

图1

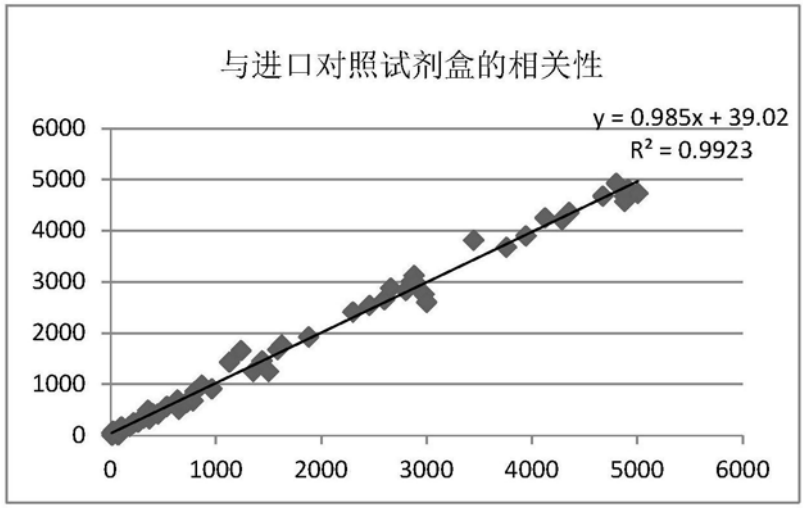

与进口对照试剂盒的相关性
y = 0.985x + 39.02
R² = 0.9923
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000

图2

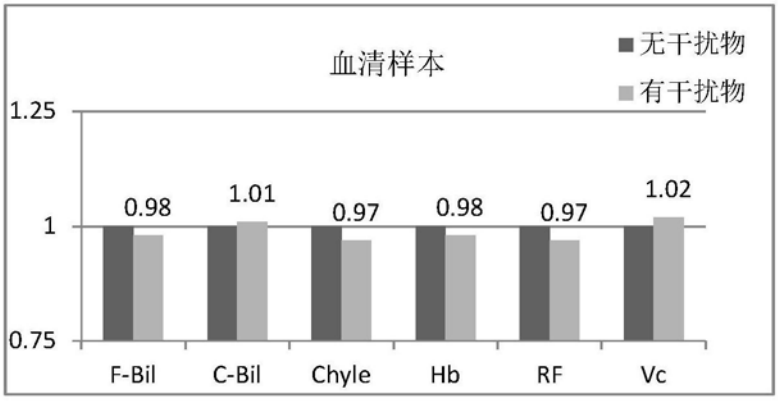

血清样本
无干扰物
有干扰物
1.25
1
0.75
0.98
1.01
0.97
0.98
0.97
1.02
F-Bil
C-Bil
Chyle
Hb
RF
Vc

图3

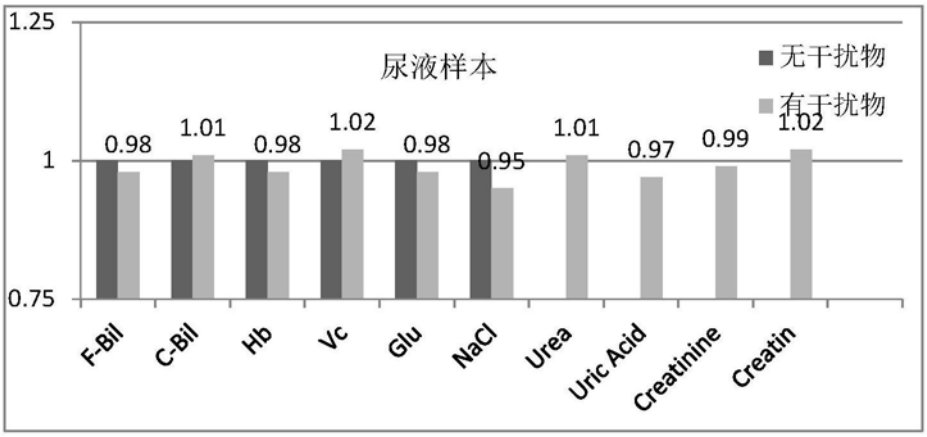

1.25
1
0.75
尿液样本
无干扰物
有干扰物
0.98
1.01
0.98
1.02
0.98
0.95
1.01
0.97
0.99
1.02
F-Bil
C-Bil
Hb
Vc
Glu
NaCl
Urea
Uric Acid
Creatinine
Creatin

图4

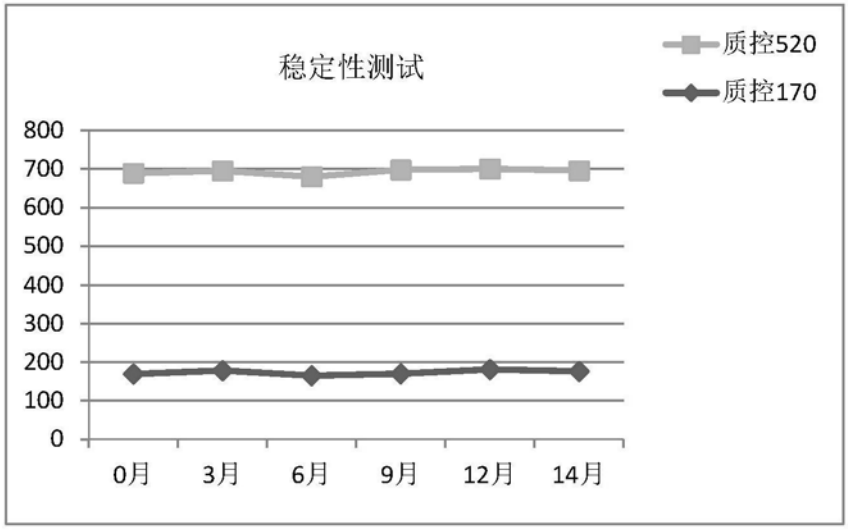
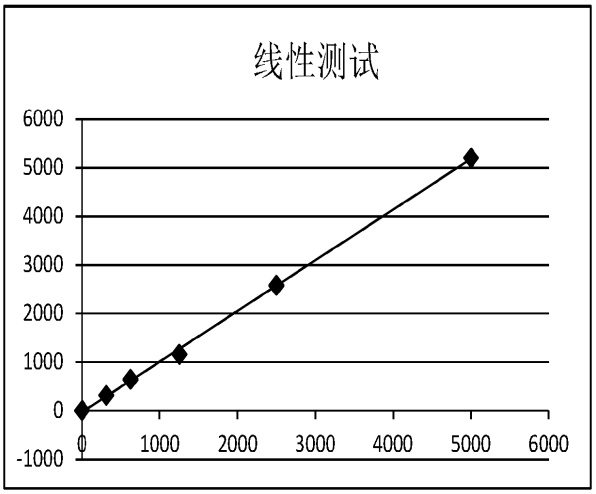

稳定性测试
质控520
质控170
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0月
3月
6月
9月
12月
14月

图5

专利名称(译)	NGAL胶乳免疫比浊法检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN109738626A	公开(公告)日	2019-05-10
申请号	CN201910122186.0	申请日	2019-02-19
[标]申请(专利权)人(译)	上海复星长征医学科学有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海复星长征医学科学有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海复星长征医学科学有限公司		
[标]发明人	陈国锋 景晟		
发明人	陈国锋 景晟		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543		
代理人(译)	陈亮		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及NGAL胶乳免疫比浊法检测试剂盒及其制备方法，该试剂盒由试剂R1、试剂R2、校准品及质控品组成，试剂R1包括缓冲液、抗干扰剂、增敏剂、电解质、防腐剂，试剂R2包括连有NGAL抗体的胶乳微球、缓冲液、稳定剂、防腐剂。与现有技术相比，本发明R1试剂中抗干扰剂的使用，显著提高了其抗干扰能力，扩大了中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白测定试剂盒的适用人群，同时本发明提高的试剂盒检测还具有灵敏度高、特异性强、试剂盒稳定性好，可高效检测尿液、血浆、血清中的NGAL含量，并且检测结果与进口试剂相关良好。