



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104360084 B

(45) 授权公告日 2016.03.30

(21) 申请号 201410736436.7

(22) 申请日 2014.12.05

(73) 专利权人 重庆中元生物技术有限公司
地址 400039 重庆市九龙坡区科园四街
70-1、70-2 号 J 座三层

(72) 发明人 吴勇泉

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所 31219
代理人 张艳 李慧

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(56) 对比文件

CN 103558400 A, 2014.02.05,

US 2002065217 A1, 2002.05.30,

US 7148004 B1, 2006.12.12,

K Bagheri et al..Decreased serum level of soluble-leptin-receptor in patients with systemic lupus erythematosus. 《Iranian Red Crescent Medical Journal》. 2012, 第 14 卷 (第 9 期), 587-593.

王亚男等. 血清可溶性瘦素受体浓度与妊娠期糖尿病的相关性研究. 《解放军医学杂志》. 2014, 第 39 卷 (第 2 期), 125-128.

审查员 肖吉

权利要求书2页 说明书7页

(54) 发明名称

一种离子稳定剂和悬浮稳定剂配合使用的 sOB-R 乳胶增强免疫比浊检测试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及体外诊断试剂领域,特别是涉及一种离子稳定剂和悬浮稳定剂配合使用的 sOB-R 乳胶增强免疫比浊检测试剂盒。本发明提供一种离子稳定剂和悬浮稳定剂配合使用的 sOB-R 乳胶增强免疫比浊检测试剂盒,包括试剂 R1 和试剂 R2,所述试剂 R1 由缓冲液 1、稳定剂 1、防腐剂 1、EDTA、增凝剂和保护剂 1 组成;所述试剂 R2 由交联 sOB-R 抗体的聚苯乙烯胶乳微球、缓冲液 2、稳定剂 2、防腐剂 2、保护剂 2 组成,其中聚苯乙烯胶乳微球与 sOB-R 抗体之间以共价交联方式连接,所述试剂 R2 中的稳定剂 2 采用离子稳定剂和悬浮稳定剂配合使用。本发明采用胶乳增强免疫比浊法,当血液中的 sOB-R 与 sOB-R 抗体反应时,带动了聚苯乙烯胶乳聚集产生一定的浊度,检测更为方便,容易在临床中应用。

1. 一种离子稳定剂和悬浮稳定剂配合使用的 sOB-R 乳胶增强免疫比浊检测试剂盒, 包括试剂 R1 和试剂 R2, 所述试剂 R1 由缓冲液 1、稳定剂 1、防腐剂 1、EDTA、增凝剂和保护剂 1 组成; 所述试剂 R2 由交联 sOB-R 抗体的聚苯乙烯乳胶微球、缓冲液 2、稳定剂 2、防腐剂 2、保护剂 2 组成, 其中聚苯乙烯乳胶微球与 sOB-R 抗体之间以共价交联方式连接, 所述试剂 R2 中的稳定剂 2 采用离子稳定剂和悬浮稳定剂配合使用; 其中离子稳定剂为 NaCl、KCl、Na₂CO₃、Na₂SO₄ 或 K₂SO₄, 悬浮稳定剂为 PEG8000、蔗糖、甘油或葡萄糖;

所述试剂 R1 中缓冲液 1 包括下列组分: 水苏糖、明矾、果糖二磷酸钠、六偏磷酸钠和甘氨酸的水溶液, 且水苏糖、明矾、果糖二磷酸钠、六偏磷酸钠、甘氨酸的总浓度为 3.5 — 7.5g/L, 缓冲液的 pH 值为 7.2 — 7.6, 各组分在缓冲液 1 中的浓度为:

水苏糖	0.8-3g/L;
明矾	0.1-1g/L;
果糖二磷酸钠	0.8-3 g/L;
六偏磷酸钠	0.05-0.5 g/L;
甘氨酸	1.5-2.25g/L;

所述缓冲液 1 的溶剂为水。

2. 如权利要求 1 所述的检测试剂盒, 其特征在于, 所述试剂 R2 中的缓冲液 2 选自 PBS 缓冲液、硼砂缓冲液、GOODS 缓冲液中的一种或几种, 其 pH 为 7.0 ~ 9.0, 浓度为 25 ~ 500mmol/L。

3. 如权利要求 2 所述的检测试剂盒, 其特征在于, 所述 GOODS 缓冲液选自甘氨酸缓冲液、Hepes 缓冲液、MOPS 缓冲液中的一种或几种。

4. 如权利要求 1 所述的检测试剂盒, 其特征在于, 所述试剂 R1 中的稳定剂 1 选自 KCl、NaCl、CaCl₂ 中的一种或多种的组合, 其质量浓度为 0.5% ~ 10%。

5. 如权利要求 1 所述的检测试剂盒, 其特征在于, 所述试剂 R1 中的防腐剂 1 为叠氮钠、硫柳汞或者 ProClin300; 所述试剂 R2 中的防腐剂 2 为叠氮钠、硫柳汞或 ProClin300。

6. 如权利要求 1 所述的检测试剂盒, 其特征在于, 所述试剂 R1 中的增凝剂为 PEG8000 或者葡聚糖。

7. 如权利要求 1 所述的检测试剂盒, 其特征在于, 所述试剂 R2 中的聚苯乙烯乳胶微球的表面官能团为氨基、羧基、酰肼、醛基或环氧基, 聚苯乙烯乳胶微球的粒径在 100 ~ 600nm。

8. 如权利要求 1 所述的检测试剂盒, 其特征在于, 所述聚苯乙烯乳胶微球为表面官能团为羧基的聚苯乙烯乳胶微球。

9. 如权利要求 1 所述的检测试剂盒, 其特征在于, 所述试剂 R2 中的 sOB-R 抗体为鼠抗人 sOB-R 抗体、山羊抗人 sOB-R IgG 抗体或兔抗人 sOB-R IgG 抗体的一种或多种的组合。

10. 如权利要求 1 所述的检测试剂盒, 其特征在于, 所述试剂 R1 中的保护剂 1 为牛血清白蛋白; 所述试剂 R2 中的保护剂 2 为牛血清白蛋白。

11. 如权利要求 1 所述的检测试剂盒, 其特征在于, 所述 EDTA 浓度为 10 ~ 100mmol/L。

12. 如权利要求 1-11 任一权利要求所述的检测试剂盒的制备方法, 包括如下步骤:

(1) 试剂 R1 的制备：

在缓冲液 1 中加入稳定剂 1、增凝剂、防腐剂 1、保护剂 1 和 EDTA，搅拌混合均匀，即得试剂 R1；

(2) 试剂 R2 的制备：

步骤一：将 sOB-R 抗体进行 4℃ 透析，再用缓冲液将 sOB-R 抗体稀释至 2mg/ml，得到 sOB-R 抗体稀释液；将聚苯乙烯乳胶微球用蒸馏水离心、洗涤 3 次；

步骤二：用缓冲液将经过步骤一洗涤后的聚苯乙烯乳胶微球稀释到质量浓度为 1%，再加入质量浓度为 0.01% - 0.1% 的 EDC，在室温下搅拌反应 30min，反应结束后 15000rpm 离心洗涤以除去未反应的 EDC，然后加入步骤一得到的 sOB-R 抗体稀释液，室温下搅拌反应 30min，再加入终止液终止反应，将得到的反应液 15000rpm 离心，用缓冲液 2 洗涤沉淀，重复离心洗涤 3 次，最后加入缓冲液 2、防腐剂 2、稳定剂 2、保护剂 2 搅拌混合均匀即得试剂 R2。

一种离子稳定剂和悬浮稳定剂配合使用的 sOB-R 乳胶增强免疫比浊检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断试剂领域,特别是涉及一种离子稳定剂和悬浮稳定剂配合使用的 sOB-R 乳胶增强免疫比浊检测试剂盒。

背景技术

[0002] 可溶性瘦素受体(soluble leptin receptor, sOB-R)是血液循环中最主要的瘦素结合蛋白。天然状态下,人体血液中瘦素结合蛋白有两种大小,分子量为 140kD 和 110kD,经糖苷酶脱糖基后,分子量为 90kD 和 60kD,在人体,可溶性瘦素受体主要来自跨膜瘦素受体的脱落,它在调节瘦素信号功能中具有至关重要的作用。sOB-R 只存在于正常人外周血循环中,脑脊液中尚未发现 sOB-R。生理状态下,sOB-R 均具有明显的昼夜节律,饥饿时,sOB-R 水平升高。健康人体 sOB-R 与高密度脂蛋白(HDL)和脂联素(adiponectin)水平呈正相关,与体重指数(BMI)、瘦素水平、空腹胰岛素及胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)呈负相关。肥胖者体内 sOB-R 水平降低,经低热卡饮食减肥后,sOB-R 水平升高,在实施胃部分切除的减肥者中,sOB-R 水平升高。在代谢综合征患者中,sOB-R 与胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)呈负相关,多囊卵巢综合症患者,sOB-R 水平降低。临床研究发现,严重肾病综合征患者血液中,sOB-R 水平升高,推测这一降低可能是瘦素抵抗的生化指征(marker),是代谢综合征的构成成分之一。

[0003] 越来越多的临床研究也显示,在不同的生理及病理情况下,如 1 型糖尿病、肥胖等患者中,血浆 sOB-R 的水平不同。因此,sOB-R 可能通过增强或减弱瘦素的信号功能,从而在疾病的发生发展中起重要的调节作用。在近期的一项前瞻性研究中调查了 916 例 18 岁的健康青年男性,并在两年后再次调查了其中 91 例受试者,发现 sOB-R 的水平与肥胖的所有基础测量值和新陈代谢风险因子(血压、总的低密度脂蛋白胆固醇、空腹血糖)成负相关,而与高密度脂蛋白胆固醇呈正相关性,这是目前为止第一个前瞻性的较大样本的临床研究,这些结果提示,sOB-R 可能成为代谢综合征和空腹血糖的预警指标。研究还发现血浆 sOB-R 的水平与 2 型糖尿病的风险呈显著负相关,通过校正了 BMI、生活方式、饮食等因素后,发现血浆瘦素水平与 2 型糖尿病的风险没有显著关联性,但 sOB-R 的水平与 2 型糖尿病的风险仍然呈显著负相关。这种关联性不依赖 BMI、瘦素和脂联素水平,提示 sOB-R 是 2 型糖尿病风险独立的负性指标。sOB-R 检测可广泛用于内分泌、消化科、感染科、肿瘤科、新生儿监护室、器官移植科和治疗实验室等。

[0004] 对于 sOB-R 检测,现有检测方法主要有定量检测方法,检测方法有双抗夹心法(ELISA)、放射免疫分析法(RIA)等,其中放射免疫分析法在临床中有一定的限制,目前通常应用 ELISA 方法检测。尽管 ELISA 的灵敏度较高,但其操作复杂,需要较多时间,一般结果为定性或半定量,定量时偏差较大,且线性范围窄,对于样品稀释度不好控制。

发明内容

[0005] 针对现有技术存在的上述不足,本发明所要解决的技术问题是:提供一种制备成本低廉,稳定性好,易于保存,数据重复性好,检测灵敏度高,可广泛应用于临床生化仪的 sOB-R 检测试剂盒。

[0006] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明第一方面提供一种离子稳定剂和悬浮稳定剂配合使用的 sOB-R 乳胶增强免疫比浊检测试剂盒,其特征在于,包括试剂 R1 和试剂 R2,所述试剂 R1 由缓冲液 1、稳定剂 1、防腐剂 1、EDTA、增凝剂和保护剂 1 组成;所述试剂 R2 由交联 sOB-R 抗体的聚苯乙烯胶乳微球、缓冲液 2、稳定剂 2、防腐剂 2、保护剂 2 组成,其中聚苯乙烯胶乳微球与 sOB-R 抗体之间以共价交联方式连接。

[0007] 本技术方案中的防腐剂 1 和 2 是指可以抑制试剂中细菌和微生物污染的一类试剂,对试剂具有防腐杀菌的作用。试剂 R2 中的保护剂一类能够保护胶乳颗粒表面的抗体的试剂。稳定剂 1 和 2 可以保持试剂内的电荷平衡。本技术方案中的 sOB-R 胶乳增强免疫比浊试剂盒,将 sOB-R 抗体交联在聚苯乙烯胶乳微球表面,当血液中的 sOB-R 与 sOB-R 抗体反应时,带动聚苯乙烯胶乳微球聚集产生一定浊度,而浊度与血液中的 sOB-R 含量在一定范围成正比,可以用全自动生化仪在 400-800nm 波长下检测血液中 sOB-R 的含量。

[0008] 优选的,所述试剂 R1 中的缓冲液 1 选自 Hepes 缓冲液、Tris-HCl 缓冲液、MOPS 缓冲液、PBS 缓冲液、甘氨酸缓冲液、硼砂缓冲液中的一种或多种的组合,其 pH 为 7.0 ~ 9.0,浓度为 25 ~ 500mmol/L;所述试剂 R2 中的缓冲液 2 选自 PBS 缓冲液、硼砂缓冲液、甘氨酸缓冲液、Hepes 缓冲液、GOODS 缓冲液、MOPS 缓冲液中的一种或几种,其 pH 为 7.0 ~ 9.0,浓度为 25 ~ 500mmol/L。

[0009] 本发明试剂 R1 中的缓冲液 1 可使用上述本领域各种常用的缓冲液,但为了使得试剂盒具有更佳的灵敏度和显色效果,本发明中所述试剂 R1 中缓冲液 1 优选为包括下列组分:水苏糖、明矾、果糖二磷酸钠、六偏磷酸钠和甘氨酸的水溶液,且水苏糖、明矾、果糖二磷酸钠、六偏磷酸钠、甘氨酸的总浓度为 3.5 - 7.5g/L,缓冲液的 pH 值为 7.2 - 7.6。

[0010] 优选的,各组分在缓冲液 1 中的浓度为:

[0011]

水苏糖	0.8-3g/L;
明矾	0.1-1g/L;
果糖二磷酸钠	0.8-3 g/L;
六偏磷酸钠	0.05-0.5 g/L;
甘氨酸	1.5-2.25g/L;

[0012] 所述缓冲液 1 的溶剂为水。

[0013] 所述缓冲液 1 可使用本领域各种常用的 pH 调节剂进行 pH 值的调节。

[0014] 优选的,所述试剂 R1 中的稳定剂 1 选自 KCl、NaCl、CaCl₂中的一种或多种的组合,其质量浓度为 0.5% ~ 10%;所述试剂 R2 中的稳定剂 2 采用离子稳定剂和悬浮稳定剂配合使用;其中离子稳定剂为 NaCl、KCl、Na₂CO₃、Na₂SO₄ 或 K₂SO₄,悬浮稳定剂为 PEG8000、蔗糖、甘油或葡萄糖。

[0015] 上述技术方案中稳定剂 1 选自 KCl、NaCl、CaCl₂中的一种或多种的组合,其质量浓度为 0.5% ~ 10%,这样的稳定剂 1 具有价格低廉、原料易得的优点。稳定剂 2 采用离子稳

定剂和悬浮稳定剂配合使用；其中离子稳定剂为 NaCl、KCl、Na₂CO₃、Na₂SO₄ 或者 K₂SO₄，悬浮稳定剂为 PEG8000、蔗糖、甘油或者葡萄糖；其中优选 NaCl 和蔗糖配合使用，这样可以保持体系长期稳定。

[0016] 优选的，所述试剂 R1 中的防腐剂 1 为叠氮钠、硫柳汞或者 ProClin300；所述试剂 R2 中的防腐剂 2 为叠氮钠、硫柳汞或 ProClin300。这样的防腐剂 1 和 2 具有优良的防腐杀菌性能。

[0017] 优选的，所述试剂 R1 中的增凝剂为 PEG8000 或者葡聚糖。

[0018] 更优选的，所述试剂 R1 中的增凝剂为 PEG8000，是由于 PEG8000 属于非离子型水溶性聚合物，在水中的溶解性比较大，可以调节试剂 R1 的粘度，促进抗原和抗体分子结合为复合物。

[0019] 优选的，所述试剂 R2 中的聚苯乙烯乳胶微球的表面官能团为氨基、羧基、酰肼、醛基或环氧基，聚苯乙烯乳胶微球的粒径在 100 ~ 600nm。

[0020] 更优选的，所述聚苯乙烯乳胶微球为表面官能团为羧基的聚苯乙烯胶乳微球。这是由于聚苯乙烯胶乳微球表面为羧基的官能团很容易被 EDC 活化，从而快速与 sOB-R 抗体结合，增加偶联效果，保证测试结果的稳定性及准确性。

[0021] 优选的，所述试剂 R2 中的 sOB-R 抗体为鼠抗人 sOB-R 抗体、山羊抗人 sOB-R IgG 抗体或兔抗人 sOB-R IgG 抗体的一种或多种的组合。

[0022] 优选的，所述试剂 R1 中的保护剂 1 为牛血清白蛋白；所述试剂 R2 中的保护剂 2 为牛血清白蛋白。本技术方案中的保护剂 1 和 2 可以保护聚苯乙烯胶乳颗粒表面的 sOB-R 抗体的活性。

[0023] 优选的，所述 EDTA 的浓度为 10 ~ 100mmol/L。

[0024] 本发明第二方面提供所述 sOB-R 乳胶增强免疫比浊检测试剂盒的制备方法，包括如下步骤：

[0025] (1) 试剂 R1 的制备：

[0026] 在缓冲液 1 中加入稳定剂 1、增凝剂、防腐剂 1、保护剂 1 和 EDTA，搅拌混合均匀，即得试剂 R1；

[0027] (2) 试剂 R2 的制备：

[0028] 步骤一：将 sOB-R 抗体进行 4℃ 透析，再用缓冲液将 sOB-R 抗体稀释至 2mg/ml，得到 sOB-R 抗体稀释液；将聚苯乙烯胶乳微球用蒸馏水离心、洗涤 3 次；

[0029] 步骤二：用缓冲液将经过步骤一洗涤后的聚苯乙烯胶乳微球稀释到质量浓度为 1%，再加入质量浓度为 0.01% - 0.1% 的 EDC，在室温下搅拌反应 30min，反应结束后 15000rpm 离心洗涤以除去未反应的 EDC，然后加入步骤一得到的 sOB-R 抗体稀释液，室温下搅拌反应 30min，再加入终止液终止反应，将得到的反应液 15000rpm 离心，用缓冲液 2 洗涤沉淀，重复离心洗涤 3 次，最后加入缓冲液 2、防腐剂、稳定剂、保护剂搅拌混合均匀即得试剂 R2。

[0030] 本发明第三方面提供所述 sOB-R 乳胶增强免疫比浊检测试剂盒在 sOB-R 含量检测领域的用途。

[0031] 与现有检测技术相比，本发明具有如下有益效果：

[0032] 1. 采用胶乳增强免疫比浊法，当血液中的 sOB-R 与 sOB-R 抗体反应时，带动了聚苯

乙烯胶乳聚集产生一定的浊度,而浊度与血液中的 sOB-R 含量在一定范围内成正比,可以在 400 ~ 800nm 的波长下进行检测,检测更为方便,容易在临床中应用。

[0033] 2. 聚苯乙烯胶乳微球的表面官能团为氨基、羧基、酰肼或者环氧基等,其表面的官能团可以和抗体表面的氨基等结合形成共价偶联结构,使 sOB-R 抗体牢固的结合在胶乳微球表面,保证了 R2 的稳定性,延长了试剂有效期。

[0034] 3. 采用粒径为 100 ~ 600nm 的大颗粒聚苯乙烯胶乳颗粒,具有较大的粒径,增加了血液中 sOB-R 和 sOB-R 抗体反应时的浊度,从而增加测试反应的灵敏度、缩短了反应时间。

[0035] 4. 试剂 R2 中采用离子稳定剂和悬浮稳定剂结合使用,使试剂的电荷平衡状态,提高了 sOB-R 胶乳增强免疫比浊试剂盒的稳定性,使得 sOB-R 胶乳增强免疫比浊试剂盒的稳定性可达 18 个月。

具体实施方式

[0036] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0037] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围;在本发明说明书和权利要求书中,除非文中另外明确指出,单数形式“一个”、“一”和“这个”包括复数形式。

[0038] 当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0039] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组 DNA 技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明,具体可参见 Sambrook 等 MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989 and Third edition,2001;Ausubel 等, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley&Sons, New York,1987 and periodic updates; the series METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego;Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego,1998;METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, Chromatin(P. M. Wassarman and A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego,1999; 和 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, Chromatin Protocols(P. B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa,1999 等。

[0040] 实施例 1

[0041] R1 试剂的制备:

[0042] 称取 1.9g 水苏糖、0.5g 明矾、1.9g 果糖二磷酸钠、0.3g 六偏磷酸钠、1.8g 甘氨酸、20g NaCl、50g PEG8000、0.5g 叠氮钠、25g 牛血清白蛋白和 14.2g EDTA 溶于 0.8L 蒸馏水中,调节 pH 至 7.4,定容至 1L 即得试剂 R1。

[0043] R2 试剂的制备:

[0044] 在鼠抗人 sOB-R 抗体中加入 pH 为 7.4、浓度为 100mmol/L 的 PBS 缓冲液进行 4℃ 透析,中间换水 3 次后完成透析,采用 100mmol/L 的 PBS 缓冲液将鼠抗人 sOB-R 抗体稀释至浓度为 2mg/ml 的鼠抗人 sOB-R 抗体稀释液;将表面官能团为羧基的聚苯乙烯胶乳微球用蒸馏水洗涤。

[0045] 再用 pH 为 7.4、浓度为 100mmol/L 的 PBS 缓冲液将上述洗涤过的聚苯乙烯胶乳微球稀释到质量浓度为 1%。向 1L 上述胶乳稀释液中加入 0.01g 的 EDC,在室温下搅拌反应 30min,反应结束后离心并用 PBS 缓冲液洗涤出去未反应的 EDC,然后加入步骤上述得到的鼠抗人 sOB-R 抗体稀释液,室温下搅拌反应 1h 后,再加入 50g 牛血清白蛋白终止反应,将得到的反应液于 15000rpm 的转速下用蒸馏水洗涤 3 次,再加入缓冲液 2 (25mM 甘氨酸缓冲液 pH7.4)、50g 牛血清白蛋白、0.5g 叠氮钠、40g NaCl 和 75g 蔗糖,定容至 1L,搅拌混合均匀即得试剂 R2。

[0046] 将实施例所制备的试剂用贝克曼 AU480 全自动生化仪进行测试,测试波长为 570nm,副波长 800nm,取样本或校准品 20ul,再加入 150ul 的试剂 R1,37℃ 恒温 5min,然后加入试剂 R2,20s 后读取吸光度 A1,37℃ 孵育 4 分 40 秒后读取吸光度 A2,则反映吸光度 $\Delta A = A2 - A1$;首先使用标准品进行多点定标,并用样条函数进行计算,得到定标曲线。将样本通过吸光度变化,与标准曲线进行对比即可得到样本中 sOB-R 浓度。对上述实施例进行了分析灵敏度、准确度、精密性以及稳定性等验证,验证结果如下:

[0047] 实施例 1 制备的 sOB-R 检测试剂盒进行性能测试,主要测试其分析灵敏度、最低检出限、准确度、重复性、稳定性及抗干扰性等。

[0048] 1) 最低检测限:采用 5% BSA 生理盐水溶液作为空白样本,空白样本应不含被测物。在生化分析仪上连续重复检测 20 次,记录检测结果。结果显示其最低检测限为 0.1pg/mL。

[0049] 2) 准确性:选择合适浓度的常规检测样本,向常规样本中加入不同量的定值标准品制作成回收样本,定值样本用去离子水作为溶剂;在常规样本中加入同样量的去离子水制作成基础样本,加入的定值标准品的量不超过总体积的 1/10,每个重复 3 次检测取其均值为回收浓度。结果显示平均回收率为 100.1%,准确度较高。

[0050] 3) 重复性:每天做 2 批试验,每批取同一浓度的血清样本做 2 次测定,记录试验结果,连续测定 20 天,结果显示 $CV_{\text{批内}}$ 为 1.35%, $CV_{\text{批间}}$ 为 2.14%, $CV_{\text{天间}}$ 为 2.53%,总精密密度为 3.01%,重复性较好。

[0051] 4) 稳定性:取 sOB-R 检测试剂盒进行常规贮存稳定性试验,2-8℃ 放置分别按时间 2,4,6,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20 个月进行检测;开盖稳定性试验分别按 2-8℃ 放置 0 天、7 天、14 天、16 天、18 天、20 天、22 天、24 天、26 天、28 天、30 天、32 天进行测定。结果显示 sOB-R 检测试剂盒贮存于 2-8℃、避光环境中,有效期为 18 个月。开盖贮存于 2-8℃、避光环境中,有效期为 30 天。

[0052] 实施例 2

[0053] R1 试剂的制备：

[0054] 称取 1.9g 水苏糖、0.5g 明矾、1.9g 果糖二磷酸钠、0.3g 六偏磷酸钠、1.8g 甘氨酸、9g NaCl、15g PEG8000、0.5g 叠氮钠、5g 牛血清白蛋白和 14.5g EDTA 溶于 0.8L 蒸馏水中，调节 pH 至 7.4，定容至 1L 即得试剂 R1。

[0055] R2 试剂的制备：

[0056] 在鼠抗人 sOB-R 抗体中加入 pH 为 7.4、浓度为 100mmol/L 的 PBS 缓冲液进行 4℃ 透析，中间换水 3 次后完成透析，采用 100mmol/L 的 PBS 缓冲液将鼠抗人 sOB-R 抗体稀释至浓度为 2mg/ml 的鼠抗人 sOB-R 抗体稀释液；将表面官能团为羧基的聚苯乙烯胶乳微球用蒸馏水洗涤。

[0057] 再用 pH 为 7.4、浓度为 100mmol/L 的 PBS 缓冲液将上述洗涤过的聚苯乙烯胶乳微球稀释到质量浓度为 1%。向 1L 上述胶乳稀释液中加入 0.01g 的 EDC，在室温下搅拌反应 30min，反应结束后离心并用 PBS 缓冲液洗涤出去未反应的 EDC，然后加入步骤上述得到的鼠抗人 sOB-R 抗体稀释液，室温下搅拌反应 1h 后，再加入 50g 牛血清白蛋白终止反应，将得到的反应液于 15000rpm 的转速下用蒸馏水洗涤 3 次，再加入缓冲液 2 (25mM 甘氨酸缓冲液 pH7.4)、50g 牛血清白蛋白、0.5g 叠氮钠、9g NaCl 和 80g 蔗糖，定容至 1L，搅拌混合均匀即得试剂 R2。

[0058] 将实施例所制备的试剂用贝克曼 AU480 全自动生化仪进行测试，测试波长为 570nm，副波长 800nm，取样本或校准品 20ul，再加入 150ul 的试剂 R1，37℃ 恒温 5min，然后加入试剂 R2，20s 后读取吸光度 A1，37℃ 孵育 4 分 40 秒后读取吸光度 A2，则反映吸光度 $\Delta A = A2 - A1$ ；首先使用标准品进行多点定标，并用样条函数进行计算，得到定标曲线。将样本通过吸光度变化，与标准曲线进行对比即可得到样本中 sOB-R 浓度。对上述实施例进行了分析灵敏度、准确度、精密性以及稳定性等验证，验证结果如下：

[0059] 采用与实施例 1 相同的检测方法，验证其检测限为 0.1pg/ml，准确度（回收率）99.80%，精密度（CV）3.05%，稳定性 18 个月。

[0060] 根据其测试结果可知，本发明所提供的检测试剂盒，具有较好的分析灵敏度、准确度、精密性和稳定性。

[0061] 实施例 3

[0062] R1 试剂的制备：

[0063] 称取 1.8g 甘氨酸、9g NaCl、15g PEG8000、0.5g 叠氮钠、5g 牛血清白蛋白和 14.5g EDTA 溶于 0.8L 蒸馏水中，调节 pH 至 7.4，定容至 1L 即得试剂 R1。

[0064] R2 试剂的制备：

[0065] 在鼠抗人 sOB-R 抗体中加入 pH 为 7.4、浓度为 100mmol/L 的 PBS 缓冲液进行 4℃ 透析，中间换水 3 次后完成透析，采用 100mmol/L 的 PBS 缓冲液将鼠抗人 sOB-R 抗体稀释至浓度为 2mg/ml 的鼠抗人 sOB-R 抗体稀释液；将表面官能团为羧基的聚苯乙烯胶乳微球用蒸馏水洗涤。

[0066] 再用 pH 为 7.4、浓度为 100mmol/L 的 PBS 缓冲液将上述洗涤过的聚苯乙烯胶乳微球稀释到质量浓度为 1%。向 1L 上述胶乳稀释液中加入 0.01g 的 EDC，在室温下搅拌反应 30min，反应结束后离心并用 PBS 缓冲液洗涤出去未反应的 EDC，然后加入步骤上述得到的鼠抗人 sOB-R 抗体稀释液，室温下搅拌反应 1h 后，再加入 50g 牛血清白蛋白终止反应，将得

到的反应液于 15000rpm 的转速下用蒸馏水洗涤 3 次,再加入缓冲液 2(25mM 甘氨酸缓冲液 pH7.4)、50g 牛血清白蛋白、0.5g 叠氮钠、9g NaCl 和 80g 蔗糖,定容至 1L,搅拌混合均匀即得试剂 R2。

[0067] 将实施例所制备的试剂用贝克曼 AU480 全自动生化仪进行测试,测试波长为 570nm,副波长 800nm,取样本或校准品 20u1,再加入 150u1 的试剂 R1,37℃恒温 5min,然后加入试剂 R2,20s 后读取吸光度 A1,37℃孵育 4 分 40 秒后读取吸光度 A2,则反映吸光度 $\Delta A = A2 - A1$;首先使用标准品进行多点定标,并用样条函数进行计算,得到定标曲线。将样本通过吸光度变化,与标准曲线进行对比即可得到样本中 sOB-R 浓度。对上述实施例进行了分析灵敏度、准确度、精密性以及稳定性等验证,验证结果如下:

[0068] 采用与实施例 1 相同的检测方法,验证其检测限为 3pg/ml,准确度(回收率)100.80%,精密度(CV)4.05%,稳定性 12 个月。

[0069] 综上所述,本发明有效克服了现有技术中的种种缺点而具高度产业利用价值。

[0070] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

专利名称(译)	一种离子稳定剂和悬浮稳定剂配合使用的sOB-R乳胶增强免疫比浊检测试剂盒		
公开(公告)号	CN104360084B	公开(公告)日	2016-03-30
申请号	CN201410736436.7	申请日	2014-12-05
[标]申请(专利权)人(译)	重庆中元生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	重庆中元生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	重庆中元生物技术有限公司		
[标]发明人	吴勇泉		
发明人	吴勇泉		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54313		
代理人(译)	张艳 李慧		
审查员(译)	肖吉		
其他公开文献	CN104360084A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及体外诊断试剂领域，特别是涉及一种离子稳定剂和悬浮稳定剂配合使用的sOB-R乳胶增强免疫比浊检测试剂盒。本发明提供一种离子稳定剂和悬浮稳定剂配合使用的sOB-R乳胶增强免疫比浊检测试剂盒，包括试剂R1和试剂R2，所述试剂R1由缓冲液1、稳定剂1、防腐剂1、EDTA、增凝剂和保护剂1组成；所述试剂R2由交联sOB-R抗体的聚苯乙烯胶乳微球、缓冲液2、稳定剂2、防腐剂2、保护剂2组成，其中聚苯乙烯胶乳微球与sOB-R抗体之间以共价交联方式连接，所述试剂R2中的稳定剂2采用离子稳定剂和悬浮稳定剂配合使用。本发明采用胶乳增强免疫比浊法，当血液中的sOB-R与sOB-R抗体反应时，带动了聚苯乙烯胶乳聚集产生一定的浊度，检测更为方便，容易在临床中应用。

水苏糖	0.8-3g/L;
明矾	0.1-1g/L;
果糖二磷酸钠	0.8-3 g/L;
六偏磷酸钠	0.05-0.5 g/L;
甘氨酸	1.5-2.25g/L;