



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105527449 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 27

(21) 申请号 201510979774. 8

(22) 申请日 2015. 12. 24

(71) 申请人 山东博科生物产业有限公司

地址 250200 山东省济南市工业南路 51 号
小鸭集团九楼办公楼西厅

(72) 发明人 李静 董雯 谭柏清

(51) Int. Cl.

G01N 33/92(2006. 01)

G01N 33/536(2006. 01)

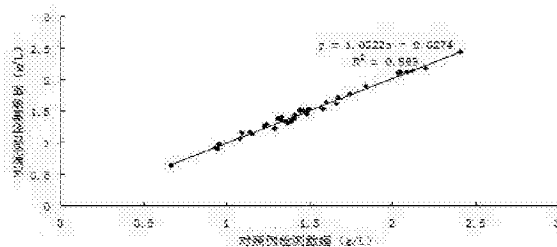
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种载脂蛋白 A1 免疫比浊法检测试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种载脂蛋白 A1 免疫比浊法检测试剂盒,属于临床体外检测试剂技术领域。本发明试剂盒包括试剂 R1、试剂 R2、校准品。通过在试剂 R1 中加入一定量的二氧化硅包覆的磁性纳米颗粒和在试剂 R2 中加入一定量的牛血清白蛋白和 Kathon-CG,有效的提高了试剂盒的稳定性和分析灵敏度,其线性范围也较好,试剂的准确度高,有利于在市场中进一步的推广使用。



1. 一种载脂蛋白A1免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于,它包含试剂R1、试剂R2和校准品,其中试剂R1组成为:100mmol/L pH7.5 Tris缓冲液、0.1%叠氮钠(w/v)、0.1%-2%二氧化硅包覆的磁性纳米颗粒(w/v);试剂R2组成为:100mmol/L pH7.5Tris缓冲液、30ml/L羊抗人ApoA1抗体、20-40g/L 牛血清白蛋白、0.05% Kathon-CG(v/v)。

2. 根据权利要求1所述的一种载脂蛋白A1免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于,所述二氧化硅包覆的磁性纳米颗粒为 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ 复合纳米粒子,粒径为20-50nm。

3. 根据权利要求1所述的一种载脂蛋白A1免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于,所述试剂R1和试剂R2在使用时的体积比例为R1:R2=3:1。

一种载脂蛋白A1免疫比浊法检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及临床体外检测试剂技术领域,特别涉及一种载脂蛋白A1免疫比浊法检测试剂盒。

背景技术

[0002] 脂蛋白中的蛋白部分称为载脂蛋白(Apo)。载脂蛋白在脂蛋白代谢中具有重要的生理功能。Apo是用ABC命名法,目前已经发现很多种类,一般分为5~7类,主要测定其ApoAI,ApoB两种。ApoAI主要由肝脏合成,小肠也可合成,它是高密度脂蛋白胆固醇(HDL-CHOL)的主要结构蛋白,占HDL-CHOL总蛋白的60%~70%,ApoAI的测定可直接反映HDL-CHOL的水平。ApoB也由肝脏合成,是低密度脂蛋白胆固醇(LDL-CHOL)的主要结构蛋白,约占LDL-CHOL总蛋白含量的97%,ApoB的测定可直接反映LDL-CHOL的水平。

[0003] 动脉粥样硬化主要损伤动脉内壁膜,严重累及中膜是脉管壁胆固醇酯大量堆积成粥样硬化斑块,使血管壁纤维增厚和狭窄的一种病理改变。主要侵犯大动脉和中等动脉,如主动脉、冠状动脉和脑动脉,导致某些脏器的局部供血不足,常出现心脑血管疾患,甚至有致命性损害。近年来,心血管疾病患者每年递增,每天全世界大约有5000人死于心脏疾患,其中不少人是由遗传因素决定的。目前,ApoAI和ApoB的测定做为冠心病危险指标的研究和流行病学研究逐渐增加,各医院检验科亦相继开展此项测定。ApoAI,ApoB分别被认为是动脉粥样硬化的保护因素和危险因素。测定其含量和比值对动脉粥样硬化,心血管疾病的判断和预测提供有价值的指标,具有重要的诊断和预防意义。

[0004] 人血清或血浆中尿素参考范围为女性:1.20~1.90g/L,男性:1.20~1.76g/L。除冠心病患者ApoA1偏低外,脑血管患者ApoA1也明显低下,ApoA1缺乏症、家族性低 α 脂蛋白血症、鱼眼病等血清中ApoA1和HDL-C极低。家族性高TG血症患者HDL-C往往偏低,但ApoA1不一定低,不增加冠心病的危险。

[0005] 人血清或血浆中载脂蛋白A1与其相对应的羊抗人ApoA1多克隆抗体在液体中结合,形成不溶性免疫复合物,使反应液产生浑浊,浊度高低反映样品中载脂蛋白A1的含量。后者可由校准品所作的剂量/反应曲线算出。该方法是一种无需预处理样本,技术和设备要求不高,而精密度和特异性更高的分析方法。由于该方法不需要昂贵的设备,可以实现自动化,且可测定大量标本,因此受到临床广泛推广。但是普通的载脂蛋白A1免疫比浊法检测试剂稳定性不好,灵敏度也不高,因而限制了其在临床上的推广应用。

发明内容

[0006] 针对于现有技术存在的问题,本发明提供了一种载脂蛋白A1免疫比浊法检测试剂盒,该试剂盒与常规的试剂盒相比,稳定性比常规的检测试剂盒要好,分析灵敏度高,有利于试剂在临床上的推广应用。

[0007] 本发明是通过以下措施实现的:

一种载脂蛋白A1免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于,它包含试剂R1、试剂R2和校准

品,其中试剂R1组成为:100mmol/L pH7.5 Tris缓冲液、0.1%叠氮钠(w/v)、0.1%-2%二氧化硅包覆的磁性纳米颗粒(w/v);试剂R2组成为:100mmol/L pH7.5Tris缓冲液、30ml/L羊抗人ApoA1抗体、20-40g/L 牛血清白蛋白、0.05% Kathon-CG(v/v)。

[0008] 所述二氧化硅包覆的磁性纳米颗粒为 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ 复合纳米粒子,粒径为20-50nm。

[0009] 所述试剂R1和试剂R2在使用时的体积比例为R1:R2=3:1。

[0010] 本发明所使用的二氧化硅包覆的磁性纳米颗粒是采用以下方法制备的:

采用多元醇法制备 Fe_3O_4 纳米粒子,取一定的乙酰丙酮铁和三甘醇加入到回流加热反应装置中,在磁力搅拌和Ar气保护的条件下,将装置缓慢加热至沸腾,并保持回流一段时间。冷却后向反应溶液中加入乙酸乙酯使生成的四氧化三铁纳米粒子产生絮凝,磁性分离黑色产物,清洗数次,分散到乙醇中,即得到稳定的 Fe_3O_4 纳米粒子乙醇胶体溶液。之后将所得 Fe_3O_4 纳米粒子采用Stober水解法制得 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 纳米粒子。所得 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ 复合纳米粒子的粒径为20-50nm。

[0011] 本发明所使用的校准品为久峰润达生物技术有限公司生产的APOA1校准品。

[0012] 本发明的试剂盒在具有双试剂功能的自动生化分析仪上进行,其具体使用方法见图4,加入生理盐水、样本或校准品4 μl ,之后再加入R1试剂450 μl 预孵育5min后读取吸光度A1,之后再加入150 μl 的试剂R2反应5min后,读取吸光度A2,并计算 ΔA 。

[0013] 本发明的有益效果:

本发明提供的载脂蛋白A1免疫比浊法检测试剂盒,通过在试剂R1中加入二氧化硅包覆的磁性纳米颗粒,该磁性纳米颗粒在静电吸附的作用下与羊抗人APOA1抗体结合,从而使抗体在磁性纳米颗粒上形成凝集,大大的提高了试剂的分析灵敏度。同时在试剂R2中加入牛血清白蛋白,解决了抗体在稀溶液中不稳定这一难题,在试验中它能使抗体稳定,且相对地中性,但不会影响抗体的性质,而Kathon-CG是一种新型高效环保型广谱杀菌剂、防腐剂,在该试剂盒中使用Kathon-CG有效解决了BSA长时间保存易发霉的缺点,因此BSA与Kathon-CG共同作用有效地增强了试剂盒的稳定性,却不会对试剂的准确度产生影响,有利于该试剂在市场中进一步的推广。

附图说明

[0014] 图1实施例2准确度验证实验检测结果与对照组检测结果相关性。

[0015] 图2实施例3准确度验证实验检测结果与对照组检测结果相关性。

[0016] 图3实施例4准确度验证实验检测结果与对照组检测结果相关性。

图4试剂盒的使用方法。

具体实施方式

[0017] 为了更好的理解本发明,下面结合具体实施例来进一步详细说明。

[0018] 实施例1

一种常规的载脂蛋白A1免疫比浊法检测试剂盒,它包括试剂R1、试剂R2、校准品。

[0019] 其中试剂R1组成为:

pH 7.5 Tris缓冲液	100 mmol/L
叠氮钠	0.1%(w/v)

聚乙二醇6000	0.5%(v/v)
----------	-----------

试剂R2组成为：

pH7.5 Tris缓冲液	100 mmol/L
---------------	------------

羊抗人APOA1抗体	30ml/L
------------	--------

本实施例描述的试剂盒,在使用时,其测定方法是采用具有双试剂功能的东芝120自动分析仪,操作如下:

加入生理盐水、样本或校准品4 μ l,之后再加入R1试剂450 μ l预孵育5min后读取吸光度A1,之后再加入150 μ l的试剂R2反应5min后,读取吸光度A2,并计算 ΔA 。

[0020] 本实施例所使用的校准品为久峰润达生物技术有限公司生产的APOA1校准品。

[0021] 实施例2

一种载脂蛋白A1免疫比浊法检测试剂盒,它包括试剂R1、试剂R2、校准品。

[0022] 其中试剂R1组成为:

pH 7.5 Tris缓冲液	100 mmol/L
----------------	------------

叠氮钠	0.1%(w/v)
-----	-----------

聚乙二醇6000	0.5%(v/v)
----------	-----------

二氧化硅包覆的磁性纳米颗粒	0.1%(w/v)
---------------	-----------

试剂R2组成为:

pH7.5 Tris缓冲液	100 mmol/L
---------------	------------

羊抗人APOA1抗体	30ml/L
------------	--------

牛血清白蛋白	20g/L
--------	-------

Kathon-CG	0.05%(v/v)
-----------	------------

具体测定方法同实施例1。

[0023] 实施例3

一种载脂蛋白A1免疫比浊法检测试剂盒,它包括试剂R1、试剂R2、校准品。

[0024] 其中试剂R1组成为:

pH 7.5 Tris缓冲液	100 mmol/L
----------------	------------

叠氮钠	0.1%(w/v)
-----	-----------

聚乙二醇6000	0.5%(v/v)
----------	-----------

二氧化硅包覆的磁性纳米颗粒	1%(w/v)
---------------	---------

试剂R2组成为:

pH7.5 Tris缓冲液	100 mmol/L
---------------	------------

羊抗人APOA1抗体	30ml/L
------------	--------

牛血清白蛋白	30g/L
--------	-------

Kathon-CG	0.05%(v/v)
-----------	------------

具体测定方法同实施例1。

[0025] 实施例4

一种载脂蛋白A1免疫比浊法检测试剂盒,它包括试剂R1、试剂R2、校准品。

[0026] 其中试剂R1组成为:

pH 7.5 Tris缓冲液	100 mmol/L
----------------	------------

叠氮钠	0.1%(w/v)
聚乙二醇6000	0.5%(v/v)
二氧化硅包覆的磁性纳米颗粒	2%(w/v)
试剂R2组成为:	
pH7.5 Tris缓冲液	100 mmol/L
羊抗人APOA1抗体	30ml/L
牛血清白蛋白	40g/L
Kathon-CG	0.05%(v/v)

具体测定方法同实施例1。

[0027] 对上述实施例1-4中制得的试剂盒分析性能进行实验验证。

[0028] 准确度验证实验:

将实施例2、3、4的试剂盒作为实验组,市场上获得认可的一种准确度优异的载脂蛋白A1试剂盒(长春某公司生产)作为对照组进行对比实验,对40个样本进行检测,检测的结果如图1-图3。

[0029] 通过图1-图3的检测数据可知,实施例2、3、4检测试剂盒与对照检测试剂盒的检测结果相关性分别为0.9945、0.9949、0.9952,相关性比较好,表明本发明的试剂盒与市场上获得认可的具有优异准确度的载脂蛋白A1检测试剂盒有高度一致性,证明本发明试剂盒添加的其他各种成分对其准确性不会造成影响,试剂盒依然保持较好的准确度。

[0030] 线性相关性验证实验:

找到载脂蛋白A1高值样本为2.50g/L,用生理盐水进行系列稀释,配制6个不同浓度的样本,依次为2.5g/L、2.0g/L、1.5g/L、1.0g/L、0.5g/L、0g/L浓度的样本,每个浓度水平各样本分别测定三次,分别取其平均值。分别利用实施例1、2、3、4的试剂进行检测。检测结果如表1所示。

[0031] 表1 实施例1-4线性相关验证实验检测结果

理论浓度(g/L)	实施例1检测结果(g/L)	实施例2检测结果(g/L)	实施例3检测结果(g/L)	实施例4检测结果(g/L)
0.00	0.14	0.15	0.17	0.12
0.50	0.48	0.5	0.49	0.50
1.00	1.00	0.98	1.01	0.99
1.50	1.48	1.5	1.47	1.45
2.00	1.96	2.05	2.04	2.02
2.50	2.56	2.49	2.49	2.52
相关系数r	0.9992	0.9994	0.9995	0.9994

上述检测结果显示,实施例1-4检测结果相关性均大于0.999,这说明本发明试剂具有更好的线性相关性。

[0032] 稳定性验证实验:

在2℃~8℃、无腐蚀性气体的避光环境中贮存试剂,检测四种实施例试剂的稳定性。四种试剂每月选取同一样本测定其吸光度三次,取平均值,与新鲜的实施例1试剂检测结果进行对比,从而确定试剂的稳定时间。检测数据如表2。

[0033] 表2 稳定性验证实验检测结果

时间	实施例1试剂检测结果	实施例2试剂检测结果	实施例3试剂检测结果	实施例4试剂检测结果	新鲜的实施例1试剂检测结果
12个月	1.38657	1.38606	1.38687	1.38698	1.38781

13个月	1.28568	1.28587	1.28646	1.28632	1.28682
14个月	1.29656	1.29668	1.29654	1.29674	1.29664
15个月	1.38326	1.38399	1.38387	1.38355	1.38406
16个月	0.76975	1.37966	1.37967	1.38008	1.37987
17个月	0.22621	1.38734	1.38686	1.38691	1.38729
18个月	0.06663	1.29826	1.29757	1.29811	1.29843
19个月	0.00332	1.38453	1.38432	1.38463	1.38457
20个月	0.00041	1.39685	1.39596	1.39623	1.39635
21个月	0.00006	1.37374	1.37421	1.37417	1.37461
22个月	0.00000	1.39284	1.39314	1.39321	1.39358
23个月	0.00000	1.38263	1.38198	1.38167	1.38265
24个月	0.00000	1.28178	1.28213	1.28121	1.28235
25个月	0.00000	0.66357	0.66443	0.66500	1.37232
26个月	0.00000	0.19365	0.18932	0.19397	1.37328

实验结果显示,实施例1试剂在2℃~8℃、无腐蚀性气体的避光环境中贮存15个月稳定,而实施例2、3、4试剂在2℃~8℃、无腐蚀性气体的避光环境中贮存24个月稳定,说明在试剂中加入牛血清白蛋白和Kathon-CG,二者共同作用有效的提高了载脂蛋白A1检测试剂盒的稳定性。

[0034] 分析灵敏度验证实验:

用本发明载脂蛋白A1试剂盒测试已知浓度在1.6g/L的样本,记录吸光度差值。分别利用实施例1、2、3、4的试剂进行检测。检测结果如表3所示。

[0035] 表3 分析灵敏度实验结果

理论浓度(g/L)	实施例1检测结果 ΔA	实施例2检测结果 ΔA	实施例3检测结果 ΔA	实施例4检测结果 ΔA
1.6	1.0976	1.3258	1.3259	1.3257

通过检测数据可知,实施例2、3、4检测试剂盒的吸光度差值均比实施例1的高,说明在试剂中加入二氧化硅包覆的磁性纳米颗粒在静电吸附的作用下与羊抗人APOA1抗体结合,从而使抗体在磁性纳米颗粒上形成凝集,扩大了响应信号,大大的提高了试剂的分析灵敏度。

[0036] 综合以上分析,本发明提供的载脂蛋白A1免疫比浊法检测试剂盒,在试剂R1中通过加入一定量的二氧化硅包覆的磁性纳米颗粒和在试剂R2中加入一定量的牛血清白蛋白和Kathon-CG 能够有效的提高试剂盒的稳定性和分析灵敏度,线性范围较好,试剂的准确度也较好。因此,本发明提供的载脂蛋白A1免疫比浊法检测试剂盒有利于在市场中进一步的推广使用。

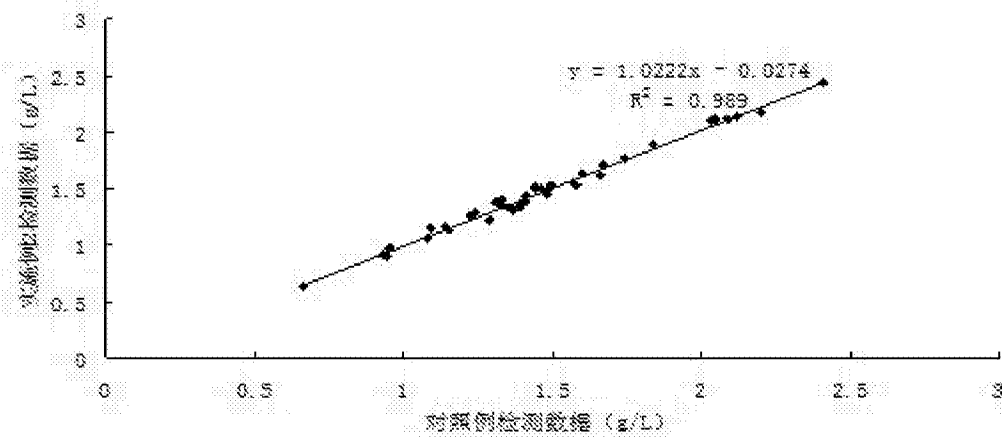


图1

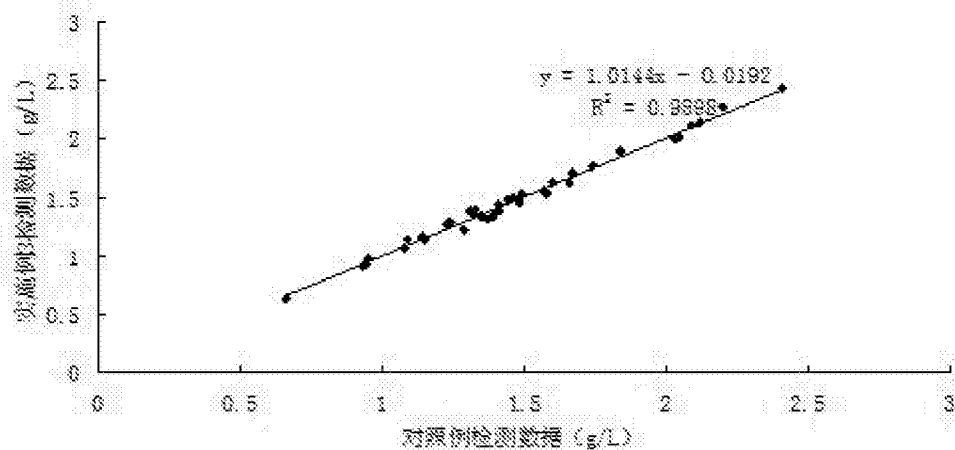


图2

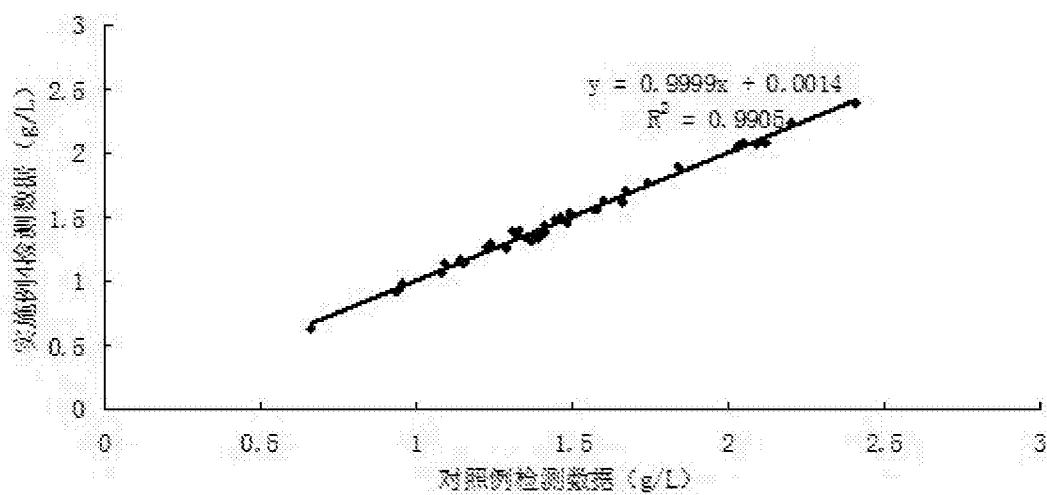


图3

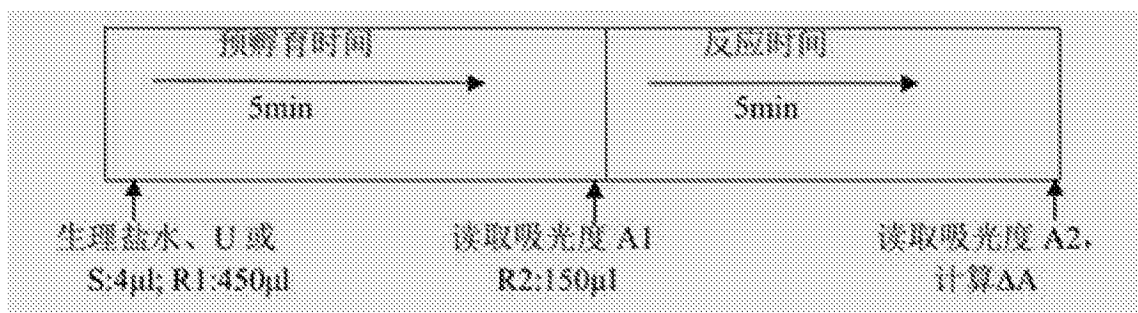


图4

专利名称(译)	一种载脂蛋白A1免疫比浊法检测试剂盒		
公开(公告)号	CN105527449A	公开(公告)日	2016-04-27
申请号	CN201510979774.8	申请日	2015-12-24
[标]申请(专利权)人(译)	济南鑫贝西生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	山东博科生物产业有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	山东博科生物产业有限公司		
[标]发明人	李静 董雯 谭柏清		
发明人	李静 董雯 谭柏清		
IPC分类号	G01N33/92 G01N33/536		
CPC分类号	G01N33/92 G01N33/536 G01N2333/775		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种载脂蛋白A1免疫比浊法检测试剂盒，属于临床体外检测试剂技术领域。本发明试剂盒包括试剂R1、试剂R2、校准品。通过在试剂R1中加入一定量的二氧化硅包覆的磁性纳米颗粒和在试剂R2中加入一定量的牛血清白蛋白和Kathon-CG，有效的提高了试剂盒的稳定性和分析灵敏度，其线性范围也较好，试剂的准确度高，有利于在市场中进一步的推广使用。

