



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111024963 A

(43)申请公布日 2020.04.17

(21)申请号 201911376170.9

(22)申请日 2019.12.27

(71)申请人 桂林英美特生物技术研究

所
地址 541004 广西壮族自治区桂林市高新
区信息产业园D-02号

(72)发明人 刘红平 肖佳民

(74)专利代理机构 北京中济纬天专利代理有限
公司 11429

代理人 石燕妮

(51)Int.Cl.

G01N 33/92(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种液体稳定、抗冰冻的免疫比浊法载脂蛋
白B单试剂

(57)摘要

本发明公开了一种液体稳定、抗冰冻的免疫比浊法载脂蛋白B单试剂,包括PH值为7.0~8.0的缓冲液20~200mmol/L、经抗体处理液预沉淀并离心处理的ApoB抗体40.0~200.0g/L、聚乙二醇2000~10000 5.0~50.0g/L、丙三醇20.0~200.0g/L、表面活性剂0.5~5.0g/L、防腐剂0.2~2.0g/L,所述抗体处理液包括PH值为7.0~8.0的缓冲液20~200mmol/L、聚乙二醇2000~10000 30.0~80.0g/L、镁盐5.0~30.0g/L、防腐剂0.2~2.0g/L。低温条件下,在一定浓度的聚乙二醇及镁盐的促进作用下,抗体中易沉淀蛋白质加速沉淀,再通过高速离心,去除沉淀,实现单试剂中抗体与非特异性聚乙二醇类增敏剂共存时稳定性的提升,防止试剂冰冻后蛋白析出或沉淀,从而影响试剂的性能。

1. 一种液体稳定、抗冰冻的免疫比浊法载脂蛋白B单试剂,其特征在于,
包括PH值为7.0~8.0的缓冲液20~200mmol/L、经抗体处理液预沉淀并离心处理的ApoB抗体40.0~200.0g/L、聚乙二醇2000~10000 5.0~50.0g/L、丙三醇20.0~200.0g/L、表面活性剂0.5~5.0g/L、防腐剂0.2~2.0g/L,所述抗体处理液包括PH值为7.0~8.0的缓冲液20~200mmol/L、聚乙二醇2000~10000 30.0~80.0g/L、镁盐5.0~30.0g/L、防腐剂0.2~2.0g/L。
2. 如权利要求1所述的液体稳定、抗冰冻的免疫比浊法载脂蛋白B单试剂,其特征在于,所述表面活性剂包括曲拉通X-100、月桂醚35或吐温中的一种。
3. 如权利要求1所述的液体稳定、抗冰冻的免疫比浊法载脂蛋白B单试剂,其特征在于,所述防腐剂包括叠氮钠、Proclin300或乙酸乙酯钠中的一种。
4. 如权利要求1所述的液体稳定、抗冰冻的免疫比浊法载脂蛋白B单试剂,其特征在于,所述缓冲液包括PH在7.0~8.0范围内的磷酸盐缓冲液、N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸缓冲液或Tris-盐酸缓冲液中的一种。
5. 如权利要求1所述的液体稳定、抗冰冻的免疫比浊法载脂蛋白B单试剂,其特征在于,所述镁盐包括硫酸镁、醋酸镁或氯化镁中的一种。

一种液体稳定、抗冰冻的免疫比浊法载脂蛋白B单试剂

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检测技术领域,尤其涉及一种液体稳定、抗冰冻的免疫比浊法载脂蛋白B单试剂。

背景技术

[0002] 载脂蛋白B (ApoB) 主要在肝脏合成,是低密度脂蛋白 (LDL) 的主要结构蛋白,并作为LDL受体的配体,可调节LDL从血浆中的清除速率。血液中ApoB 的测定值直接反应LDL含量。

[0003] ApoB水平高低的临床意义与低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 相似,是各项血脂指标中较好的动脉硬化标志物。在少数情况下,可出现高ApoB血症而 LDL-C正常的情况,提示血液中存在较多小而密的LDL,测定ApoB更有优势。在对高ApoB血症的冠心病患者实施药物干预实验中表明,降低ApoB水平可以减少冠心病发病及促进粥样斑块的消退。此外,ApoB增高也常见于肾病综合征、未控制的糖尿病、活动性肝炎和肝功能低下患者。

[0004] 多种免疫分析技术均可用于载脂蛋白B的检测,如免疫扩散、免疫电泳、酶联免疫法等,这些检测方法成本低、结果易于判断、技术上便于掌握。但方法操作繁琐,费时且灵敏度和精确度差而趋于被淘汰。免疫比浊法克服了上述缺点,是目前最常用的方法。它具有免疫学抗原、抗体结合的特异性,又具有生物化学反应学特点,简单快速、可用于自动化分析,且样本通量大,因此受到临床广泛推广。

[0005] 免疫比浊法原理:血清中的载脂蛋白B,可与试剂中特异性抗体结合形成不溶性复合物而产生浊度,浊度的高低与样本中载脂蛋白B的浓度成正比。因此,可在特定波长处,通过多点定标法来测得样本中载脂蛋白B的浓度。

[0006] 现有技术未涉及液体单试剂的配方,主要为未能解决单试剂中特异性抗体与非特异性聚乙二醇类增敏剂共存的稳定性问题。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种液体稳定、抗冰冻的免疫比浊法载脂蛋白B单试剂,通过特殊的处理方法(抗体处理液预沉淀及高速离心处理)去除抗体中易沉淀的相关蛋白质,实现单试剂中抗体与非特异性聚乙二醇类增敏剂共存时稳定性的提升,防止试剂冰冻后蛋白析出或沉淀,从而影响试剂的性能。

[0008] 为实现上述目的,本发明提供了一种液体稳定、抗冰冻的免疫比浊法载脂蛋白B单试剂,包括PH值为7.0~8.0的缓冲液20~200mmol/L、抗体处理液离心处理后的ApoB抗体40.0~200.0g/L、聚乙二醇2000~100005.0~50.0g/L、丙三醇20.0~200.0g/L、表面活性剂0.5~5.0g/L、防腐剂0.2~2.0g/L,所述抗体处理液包括PH值为7.0~8.0的缓冲液20~200mmol/L、聚乙二醇2000~1000030.0~80.0g/L、镁盐5.0~30.0g/L、防腐剂0.2~2.0g/L。

[0009] 其中,所述表面活性剂包括曲拉通X-100、月桂醚35或吐温中的一种。

[0010] 其中,所述防腐剂包括叠氮钠、Proclin300或乙酸乙酯钠中的一种。

[0011] 其中,所述缓冲液包括PH在7.0~8.0范围内的磷酸盐缓冲液、N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸缓冲液或Tris-盐酸缓冲液中的一种。

[0012] 其中,所述镁盐包括硫酸镁、醋酸镁或氯化镁中的一种。

[0013] 本发明的一种液体稳定、抗冰冻的免疫比浊法载脂蛋白B单试剂,通过所述抗体处理液包括PH值为7.0~8.0的缓冲液20~200mmol/L、聚乙二醇2000~1000030.0~80.0g/L、镁盐5.0~30.0g/L、防腐剂0.2~2.0g/L,在2℃~8℃低温条件下预沉淀抗体并高速离心5000rpm~10000rpm离心10min~30min去除沉淀,获得上清ApoB抗体,再与PH值为7.0~8.0的缓冲液20~200mmol/L、聚乙二醇2000~100005.0~50.0g/L、丙三醇20.0~200.0g/L、表面活性剂0.5~5.0g/L、防腐剂0.2~2.0g/L进行配制而成。实现APOB单试剂中抗体与非特异性聚乙二醇类增敏剂共存时稳定性的提升,防止试剂冰冻后蛋白析出或沉淀,从而影响试剂的性能。

具体实施方式

[0014] 下面详细描述本发明的实施例,所述抗体处理液包括PH值为7.0~8.0的缓冲液20~200mmol/L、聚乙二醇2000~1000030.0~80.0g/L、镁盐5.0~30.0g/L、防腐剂0.2~2.0g/L。所述缓冲液包括PH在7.0~8.0范围内的磷酸盐缓冲液(PBS)、N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸缓冲液(HEPES)或Tris-盐酸(Tris-HCL)缓冲液中的一种,在所述抗体处理液中加入所述缓冲液可以为抗体预沉淀提供稳定的离子强度及pH值。所述聚乙二醇2000~10000包括聚乙二醇2000、聚乙二醇4000、聚乙二醇6000、聚乙二醇8000、聚乙二醇10000中的一种,在所述抗体处理液中加入所述聚乙二醇2000~10000可以加速抗体中相关蛋白质的沉淀。所述镁盐包括硫酸镁、醋酸镁或氯化镁中的一种,在所述抗体处理液中加入所述镁盐可以辅助加速抗体中相关蛋白质的沉淀。所述防腐剂包括叠氮钠、Proclin300或乙酸乙酯钠中的一种。在所述抗体处理液中添加所述防腐剂可以防止长菌在贮存内长菌。

[0015] 所述抗体处理液离心处理后得到ApoB抗体,其中离心处理过程为:

[0016] 在未经处理的抗体中,边搅拌边加入1~3倍体积的抗体处理液,在2℃~8℃条件下,平衡1h~5h,再经高速冷冻离心机5000rpm~10000rpm离心10min~30min,取上清备用得到ApoB抗体。

[0017] 所述液体稳定、抗冰冻的免疫比浊法载脂蛋白B单试剂包括PH值为7.0~8.0的缓冲液20~200mmol/L、抗体处理液预沉淀并离心处理的ApoB抗体40.0~200.0g/L、聚乙二醇2000~100005.0~50.0g/L、丙三醇20.0~200.0g/L、表面活性剂0.5~5.0g/L、防腐剂0.2~2.0g/L。所述缓冲液包括PH在7.0~8.0范围内的磷酸盐缓冲液(PBS)、N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸缓冲液(HEPES)或Tris-盐酸(Tris-HCL)缓冲液中的一种,在试剂中加入所述缓冲液可以提供试剂反应稳定的离子和pH条件。所述聚乙二醇2000~10000包括聚乙二醇2000、聚乙二醇4000、聚乙二醇6000、聚乙二醇8000、聚乙二醇10000中的一种,在所述抗体处理液中加入所述聚乙二醇2000~10000可以加速试剂抗体中与样本中载脂蛋白B的反应速度。在试剂中添加丙三醇20.0~200.0g/L可以加强试剂抗冰冻性能。所述表面活性剂包括曲拉通X-100、月桂醚35或吐温中的一种,在试剂中加入所述表面活性剂可以提高样本血清在试剂中的溶解性及反应体系的通透性。所述防腐剂包括叠氮钠、Proclin300或乙酸

乙酯钠中的一种。在试剂中添加所述防腐剂可以防止长菌在贮存内长菌。

[0018] 本发明试剂可通过全自动生化分析仪等分析仪器对样本进行检测,具体采用以下方法:

[0019]

试剂 (uL)	300	300	300	300
纯化水 (uL)	3			
校准品 (uL)		3		
质控品 (uL)			3	
样本 (uL)				3
混匀, 在 37℃ 下孵育 5 分钟后, 读取各管吸光度 (A)				

[0020] 计算方法: $ApoB(g/L) = \frac{\Delta A_{\text{样本}} \times \text{校准品浓度}(g/L)}{\Delta A_{\text{校准品}}}$;

[0021] 其中为了保证测试结果可靠性,要求在样本检测前需通过APOB校准品对试剂检测进行校准。

[0022] 本发明实施例1提供一种液体稳定、抗冰冻的免疫比浊法载脂蛋白B单试剂,包括PH值为7.6的Tris-盐酸(Tris-Hcl)缓冲液50mmol/L、抗体处理液预沉淀并离心处理的ApoB抗体150.0g/L、聚乙二醇4000 30.0g/L、丙三醇100.0g/L、吐温-20 2.0g/L、Proclin300 0.5g/L;所述抗体处理液包括PH值为7.6的Tris- 盐酸(Tris-Hcl)缓冲液50mmol/L、聚乙二醇4000 60.0g/L、氯化镁6.0g/L、Proclin300 0.5g/L。

[0023] 其中所述抗体处理液预沉淀并离心处理的ApoB抗体过程为在未经处理的抗体中,边搅拌边加入3倍体积的抗体处理液,在2℃~8℃条件下,平衡2h,再经高速冷冻离心机10000rpm离心10min,取上清备用得到的ApoB抗体。

[0024] 本发明实施例2提供一种液体稳定、抗冰冻的免疫比浊法载脂蛋白B单试剂,包括PH值为7.2的磷酸盐缓冲液(PBS)缓冲液100mmol/L、抗体处理液预沉淀并离心处理的ApoB抗体75.0g/L、聚乙二醇6000 15.0g/L、丙三醇50.0g/L、月桂醚35 1.0g/L、叠氮钠0.8g/L,所述抗体处理液包括PH值为7.2的磷酸盐缓冲液(PBS)缓冲液100mmol/L、聚乙二醇6000 70.0g/L、醋酸镁20.0g/L、叠氮钠0.8g/L。

[0025] 其中所述抗体处理液预沉淀并离心处理的ApoB抗体的过程为在未经处理的抗体中,边搅拌边加入3倍体积的抗体处理液,在2℃~8℃条件下,平衡2.5h,再经高速冷冻离心机8000rpm离心20min,取上清备用得到的ApoB抗体。

[0026] 本发明实施例3提供一种液体稳定、抗冰冻的免疫比浊法载脂蛋白B单试剂,包括PH值为7.0的N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸缓冲液(HEPES)缓冲液 50mmol/L、抗体处理液预沉淀并离心处理的ApoB抗体75.0g/L、聚乙二醇8000 10.0g/L、丙三醇80.0g/L、吐温-20 2.0g/L、Proclin300 0.5g/L;所述抗体处理液包括PH值为7.0的HEPES缓冲液50mmol/L、聚乙二醇8000 30.0g/L、醋酸镁20.0g/L、Proclin300 0.5g/L。

[0027] 其中所述抗体处理液预沉淀并离心处理的ApoB抗体的过程为在未经处理的抗体中,边搅拌边加入3倍体积的抗体处理液,在2℃~8℃条件下,平衡4h,再经高速冷冻离心机8000rpm离心20min,取上清备用得到的ApoB抗体。

[0028] 其中,所述表面活性剂包括曲拉通X-100、月桂醚35或吐温中的一种,可以提高样本血清在试剂中的溶解性及反应体系的通透性。所述防腐剂包括叠氮钠、Proclin300或乙酸乙酯钠中的一种,可以防止长菌在贮存内长菌。在试剂中添加丙三醇20.0~200.0g/L可以加强试剂抗冰冻性能。在一定浓度的聚乙二醇及镁盐的促进作用下,去除抗血清或抗体中的不稳定及易沉淀蛋白,提升抗体的稳定性。

[0029] 将实施例1、实施例2和实施例3的单试剂37℃放置7天的稳定性负荷实验、反复3次冰冻复融实验以及在4至8℃贮存温度下保存12个月的贮存稳定性实验中,试剂未见沉淀析出现象,试剂外观、灵敏度和准确度、线性范围的性指标均无明显变化,当按照本发明公开的测定方法进行检测时,试剂的检测范围可覆盖[0.20~2.00]g/L,满足临床需求。

[0030] 本发明的一种液体稳定、抗冰冻的免疫比浊法载脂蛋白B单试剂,通过所述抗体处理液包括PH值为7.0~8.0的缓冲液20~200mmol/L、聚乙二醇2000~1000030.0~80.0g/L、镁盐5.0~30.0g/L、防腐剂0.2~2.0g/L,在2℃~8℃低温条件下预沉淀抗体并高速离心5000rpm~10000rpm离心10min~30min去除沉淀,获得上清ApoB抗体,再与PH值为7.0~8.0的缓冲液20~200mmol/L、聚乙二醇2000~100005.0~50.0g/L、丙三醇20.0~200.0g/L、表面活性剂0.5~5.0g/L、防腐剂0.2~2.0g/L进行配制而成。实现APOB单试剂中抗体与非特异性聚乙二醇类增敏剂共存时稳定性的提升,防止试剂冰冻后蛋白析出或沉淀,从而影响试剂的性能。

[0031] 以上所揭露的仅为本发明一种较佳实施例而已,当然不能以此来限定本发明之权利范围,本领域普通技术人员可以理解实现上述实施例的全部或部分流程,并依本发明权利要求所作的等同变化,仍属于发明所涵盖的范围。

专利名称(译)	一种液体稳定、抗冰冻的免疫比浊法载脂蛋白B单试剂		
公开(公告)号	CN111024963A	公开(公告)日	2020-04-17
申请号	CN201911376170.9	申请日	2019-12-27
[标]发明人	刘红平 肖佳民		
发明人	刘红平 肖佳民		
IPC分类号	G01N33/92 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/92 G01N2333/775		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种液体稳定、抗冰冻的免疫比浊法载脂蛋白B单试剂，包括PH值为7.0~8.0的缓冲液20~200mmol/L、经抗体处理液预沉淀并离心处理的ApoB抗体40.0~200.0g/L、聚乙二醇2000~10000 5.0~50.0g/L、丙三醇20.0~200.0g/L、表面活性剂0.5~5.0g/L、防腐剂0.2~2.0g/L，所述抗体处理液包括PH值为7.0~8.0的缓冲液20~200mmol/L、聚乙二醇2000~10000 30.0~80.0g/L、镁盐5.0~30.0g/L、防腐剂0.2~2.0g/L。低温条件下，在一定浓度的聚乙二醇及镁盐的促进作用下，抗体中易沉淀蛋白质加速沉淀，再通过高速离心，去除沉淀，实现单试剂中抗体与非特异性聚乙二醇类增敏剂共存时稳定性的提升，防止试剂冰冻后蛋白析出或沉淀，从而影响试剂的性能。

试剂 (uL)	300	300	300	300
纯化水 (uL)	3			
校准品 (uL)		3		
质控品 (uL)			3	
样本 (uL)				3
混匀，在 37°C 下孵育 5 分钟后，读取各管吸光度 (A)				