



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103364568 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 27

(21) 申请号 201310304547. 6

(22) 申请日 2013. 07. 18

(73) 专利权人 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司

地址 300300 天津市东丽区开发区四纬路
10 号

(72) 发明人 刘萍 栾大伟 李克锦

(74) 专利代理机构 天津滨海科纬知识产权代理
有限公司 12211

代理人 韩敏

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101377508 A, 2009. 03. 04, 说明书第 3 页
第 5 行至第 5 页第 4 行, 实施例 1-3.

CN 102998467 A, 2013. 03. 27, 权利要求
1-6, 说明书第 [0010]-[0033] 段, 实施例 1-3.

CN 102680456 A, 2012. 09. 19, 全文.

姜菲菲 等. 国产化学发光试剂检测 4 项血清
肝纤维化标志物对肝纤维化诊断的应用分析.《北
京医学》. 2012, 第 34 卷 (第 3 期),

胡建. Fe₃O₄/Poly (St-AA) 磁性复合高分子
微球的制备及生物学应用.《中国优秀硕士学
位论文全文数据库工程科技 I 辑》. 2009, (第 12
期),

审查员 许珊萍

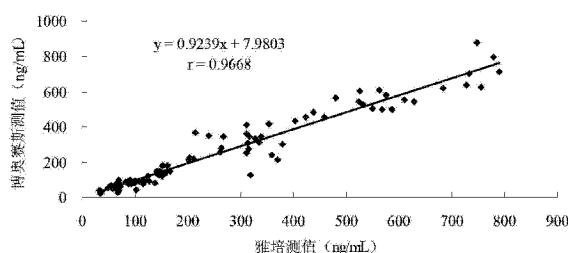
权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种层粘连蛋白纳米磁微粒化学发光免疫定
量检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种层粘连蛋白(LN)纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,所述试剂盒包括:层粘连蛋白校准品;偶联有层粘连蛋白单克隆抗体的纳米磁微粒悬浮液;层粘连蛋白单克隆抗体酶结合物,所用的酶为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶纯度 RZ ≥ 3.0,活性 ≥ 250U/mL;层粘连蛋白质控品;化学发光液 A 液和 B 液;20 倍浓缩洗液;反应管。另外本发明还公开了本发明试剂盒的制备方法。本发明试剂盒与现有试剂盒相比灵敏度高、可测定浓度范围宽、试剂有效期长、操作简单、检测时间短、检测自动化程度高等优点。



1. 一种层粘连蛋白纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:

1) 层粘连蛋白校准品,浓度为 0, 20, 50, 100, 250, 800ng/mL;

2) 偶联有层粘连蛋白单克隆抗体的纳米磁微粒悬浮液,所述的纳米磁微粒是表面包裹带有氨基或羧基活性基团的四氧化三铁,粒径 10-50nm;

3) 层粘连蛋白抗体酶结合物,所用抗体为单克隆抗体,所用的酶为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶纯度 $RZ \geq 3.0$,活性 $\geq 250U/mL$;

4) 层粘连蛋白质控品;质控品包括浓度 35ng/mL 的低值质控品和 500ng/mL 的高值质控品;

5) 化学发光液 A 液和 B 液;A 液为 5mmol/L, pH8.6 的 Tris-HCl 缓冲液,且该缓冲液中含有终浓度 0.7g/L 鲁米诺和终浓度 0.165g/L 对碘酚;B 液为 0.675g/L 过氧化脲;

6) 20 倍浓缩洗液;

7) 反应管,所述的反应管的材料是透明聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯或玻璃;

所述试剂盒的制备方法包括以下步骤:

(1) 层粘连蛋白校准品的配制:

将层粘连蛋白纯品用校准品稀释液配稀释至工作浓度,分别为 0, 20, 50, 100, 250, 800ng/mL;

校准品稀释液成分为牛血清,要求外观为浅黄色呈稍粘稠的液体,无溶血或异物;总蛋白含量不小于 32mg/mL;球蛋白含量不大于 2mg/mL;

(2) 层粘连蛋白质控品的配制:

用校准品稀释液将层粘连蛋白纯品稀释至 35ng/mL 和 500ng/mL, 35ng/mL 为低值质控品, 500ng/mL 为高值质控品;

(3) 纳米磁微粒偶联层粘连蛋白单克隆抗体的制备:

A、四氧化三铁纳米磁微粒制备

采用沉淀法制备四氧化三铁纳米磁微粒,具体制备方法如下:1) 将 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 和 $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 以摩尔比 2:1 加入到蒸馏水中,剧烈搅拌溶解;2) 在氮气环境下加 0.5M 氨水于上述铁盐溶液中,调 pH9-10,反应温度 $65^\circ C$,反应时间 45min;3) 反应结束后,用蒸馏水洗涤至中性,弃上清,于 $60^\circ C$ 烘干,即得 10-50nm 的四氧化三铁纳米磁微粒;

B、纳米磁珠表面羧基的偶联

采用分散聚合法进行偶联,具体制备方法如下:取上述制备的纳米磁微粒超声分散在 10% PEG8000 溶液中,得磁流体溶液,向磁流体溶液中按体积比 1:10 加入无水乙醇,搅拌 30min 后,移入带有搅拌器,冷凝管,氮气入口的三颈瓶中,加入交联剂 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺;在氮气的保护下,升温至 $60 \pm 1^\circ C$,恒温搅拌 30min,之后依次加入磁流体体积 3% 的过氧化苯甲酰,搅拌速度约为 500rpm,磁流体溶液相同体积的苯乙烯,磁流体溶液体积 25% 的丙烯酸,保持氮气气流,其余条件保持不变,反应 8-10h,所得产物静置,用蒸馏水反复洗涤,再用盐酸调节 pH = 1,浸泡 24h,静置;再用蒸馏水反复洗涤,除去未包覆的 Fe_3O_4 磁粉,把沉淀下来的产品放入真空干燥箱中 $50^\circ C$ 下干燥 24h,得到表面联有羧基的纳米磁微粒;

C、纳米磁微粒单克隆抗体的制备,配制 1L,方法如下:

取 100mL 0.1M MES 缓冲液,加入 10mg 表面联有羧基的纳米磁微粒,室温搅拌 40min,之后加入 3.5mg 层粘连蛋白单克隆抗体,然后加入 5mg/mL EDC 溶液,2-8℃ 反应 1h 后,用 0.01M PBS 缓冲液洗涤 3 次,最后用 0.01M PBS 定容至 1L 即可;

(4) 层粘连蛋白抗体酶结合物的制备

采用改良高碘酸钠氧化法将层粘连蛋白抗体与辣根过氧化物酶进行偶联后,用酶稀释液将其稀释至工作浓度 1:4500,并加入 10% 酶稳定剂,储存于 2 ~ 8℃;

(5) 20 倍浓缩洗液的配制

20 倍浓缩洗液包括 58g/L 磷酸氢二钠,5.92g/L 磷酸二氢钠,180g/L NaCl,10mL/L Tween-20 和 2% Proclin300;

(6) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

A 液为 0.7g/L 鲁米诺,0.165g/L 对碘酚,缓冲液为 pH8.6 的 5mmol/L Tris-HCl,避光保存;B 液为 0.675g/L 过氧化脲,用工艺用水配制;A 液和 B 液在使用前 5min 混合;

(7) 组装:将上述试剂组装成盒,储存于 2 ~ 8℃,每种试剂各一瓶;

(8) 对采用该方法制备的试剂盒进行物理检查,对准确度、剂量-反应曲线的线性、精密度、特异性、灵敏度、质控品的测定值和稳定性进行测定。

一种层粘连蛋白纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒 及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫分析医学领域,具体的,本发明提供了一种层粘连蛋白(LN) 纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 肝纤维化是慢性肝炎向肝硬化发展的必经阶段,当细胞外基质大量形成并在肝脏内沉积时,就形成肝纤维化。目前,临床常规的肝功能试验难以诊断肝纤维化,此外,由于肝纤维化在肝内分布不均匀,而且肝穿刺组织仅占全肝的五万分之一,可造成诊断误差。因此,肝活检的常规染色技术亦难以正确判断何时进行抗肝纤维化的治疗。

[0003] 临床上,血清透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、血清 III 型胶原(PCIII)、血清 IV 型胶原(Collagen IV)的水平可反映肝纤维化程度,这四项血清学指标能反映肝脏纤维化的情况,且可降低活检的医疗费用。

[0004] 层粘连蛋白又称板层素,主要存在于基膜结构中,是基膜所特有的非胶原糖蛋白,相对分子质量为 820kDa,由一个 400kD 的 α 链和两条 200kD 左右的 β 链组成。作为基膜的主要结构成分对基膜的组装起关键作用,其主要功能就是在细胞表面形成网络结构并将细胞固定在基膜上。层粘连蛋白与肝纤维化活动程度及门静脉压力呈正相关,慢性活动型肝炎和肝硬变及原发性肝癌时明显增高, LN 也可以反映肝纤维化的进展与严重程度,纤维化后期升高尤为显著。

[0005] 目前,临床领域应用的检测血清 LN 的方法主要有放射免疫测定法、酶联免疫测定法和化学发光免疫测定法等。

[0006] 放射免疫测定法因其存在放射性污染,对操作人员有伤害而限制了其推广应用;

[0007] 酶联免疫测定法具有操作简单、无污染、结果可用仪器测定等优点,但由于敏感性相对较低,所用标记酶与底物可定量测定范围窄,及仪器测定范围窄等缺点,限制了其在微量免疫定量测定中的应用。

[0008] 化学发光免疫测定经过近二十年的发展,已成为较为成熟的技术,避免了放射免疫法的污染性,及酶联免疫法的测定范围窄等缺陷,但目前医疗机构使用化学发光方法检测层粘连蛋白的试剂盒还较少,尤其是利用纳米磁微粒技术生产的试剂盒还没有使用。

[0009] 本发明试剂盒将磁性分离技术、化学发光检测技术与免疫学方法三者相结合综合了化学发光法灵敏度高、线性范围广、测定速度快以及免疫法的特异性高、准确性好等优点,还利用了磁性微粒在磁场可控运动的特点可实现待测物的快速富集及分离结合抗原-抗体与游离抗体的作用,具有更快的检测速度。(2) 使用单克隆抗体,提高了反应的特异性。(3) 在液相反应中,使用发光增强剂,将水分子从发光底物的发光位点排开,同时缩短了发光的达峰时间。

[0010] 本试剂盒用辣根过氧化物酶标记抗体,操作简便,产品易得,相比现有技术无污染、成本低、能耗少、检测范围宽、灵敏度高、试剂盒有效期长(有效期可达两年以上),同时

测值重复性好,适于临床推广。

发明内容

[0011] 本发明要解决的问题是提供层粘连蛋白的化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法,避免了测值重复性差,酶联免疫法灵敏度低,检测范围窄等缺陷。

[0012] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:层粘连蛋白(LN)纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,包括:层粘连蛋白校准品;偶联有层粘连蛋白单克隆抗体的纳米磁微粒悬浮液;层粘连蛋白抗体酶结合物,所述抗体是单克隆抗体,但是与纳米磁微粒偶联的层粘连蛋白单克隆抗体不为同一株;所用的酶为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶纯度 $RZ \geq 3.0$,活性 $\geq 250U/mL$;层粘连蛋白质控品,质控品包括浓度 $35ng/mL$ 的低值质控品和 $500ng/mL$ 的高值质控品;化学发光液 A 液和 B 液,A 液为 $5mmol/L$, $pH8.6$ 的 Tris-HCl 缓冲液,且该缓冲液中含有终浓度 $0.7g/L$ 鲁米诺和终浓度 $0.165g/L$ 对碘酚;B 液为 $0.675g/L$ 过氧化脲;20 倍浓缩洗液;反应管。

[0013] 进一步,所述的纳米磁微粒是表面包裹带有氨基或羧基活性基团的四氧化三铁,粒径 $10-50nm$ 。

[0014] 进一步,所述的反应管的材料是透明聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯或玻璃。

[0015] 试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0016] (1) 层粘连蛋白校准品的配制:

[0017] 将层粘连蛋白纯品用校准品稀释液配稀释至工作浓度,分别为 $0, 20, 50, 100, 250, 800ng/mL$;

[0018] 校准品稀释液成分为牛血清,要求外观为浅黄色呈稍粘稠的液体,无溶血或异物;总蛋白含量不小于 $32mg/mL$;球蛋白含量不大于 $2mg/mL$;

[0019] (2) 层粘连蛋白质控品的配制:

[0020] 用校准品稀释液将层粘连蛋白纯品稀释至 $35ng/mL$ 和 $500ng/mL$; $35ng/mL$ 为低值质控品, $500ng/mL$ 为高值质控品;

[0021] (3) 纳米磁微粒偶联层粘连蛋白单克隆抗体的制备:

[0022] A、四氧化三铁纳米磁微粒制备

[0023] 采用沉淀法制备四氧化三铁纳米磁微粒,具体制备方法如下:1) 将 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 和 $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 以摩尔比 $2:1$ 加入到蒸馏水中,剧烈搅拌溶解;2) 在氮气环境下加 $0.5M$ 氨水于上述铁盐溶液中,调 $pH9-10$,反应温度 $65^\circ C$,反应时间 $45min$;3) 反应结束后,用蒸馏水洗涤至中性,弃上清,于 $60^\circ C$ 烘干,即得 $10-50nm$ 的四氧化三铁纳米磁微粒;

[0024] B、纳米磁珠表面羧基的偶联

[0025] 采用分散聚合法进行偶联,具体制备方法如下:取上述制备的纳米磁微粒超声分散在 $10\%PEG8000$ 溶液中,得磁流体溶液,向磁流体溶液中按体积比 $1:10$ 加入无水乙醇,搅拌 $30min$ 后,移入带有搅拌器,冷凝管,氮气入口的三颈瓶中,加入交联剂 N,N' -亚甲基双丙烯酰胺;在氮气的保护下,升温至 $60 \pm 1^\circ C$,恒温搅拌 $30min$,之后依次加入磁流体体积 3% 的过氧化苯甲酰,搅拌速度约为 $500rpm$,磁流体溶液相同体积的苯乙烯,磁流体溶液体积 25% 的丙烯酸,保持氮气气流,其余条件保持不变,反应 $8-10h$,所得产物静置,用蒸馏水反复洗涤,再用盐酸调节 $pH=1$,浸泡 $24h$,静置;再用蒸馏水反复洗涤,除去未包覆的 Fe_3O_4 磁粉,把

沉淀下来的产品放入真空干燥箱中 50℃ 下干燥 24h, 得到表面联有羧基的纳米磁微粒;

[0026] C、纳米磁微粒单克隆抗体的制备, 配制 1L, 方法如下:

[0027] 取 100mL 0.1M MES 缓冲液, 加入 10mg 表面联有羧基的纳米磁微粒, 室温搅拌 40min, 之后加入 3.5mg 层粘连蛋白单克隆抗体, 然后加入 5mg/mL EDC 溶液, 2-8℃ 反应 1h 后, 用 0.01M PBS 缓冲液洗涤 3 次, 最后用 0.01M PBS 定溶至 1L 即可;

[0028] (4) 层粘连蛋白抗体酶结合物的制备

[0029] 采用改良高碘酸钠氧化法将层粘连蛋白抗体与辣根过氧化物酶进行偶联后, 用酶稀释液将其稀释至工作浓度 1:4500, 并加入 10% 酶稳定剂, 储存于 2 ~ 8℃;

[0030] (5) 20 倍浓缩洗液的配制

[0031] 20 倍浓缩洗液包括 58g/L 磷酸氢二钠, 5.92g/L 磷酸二氢钠, 180g/L NaCl, 10mL/L Tween-20 和 2% Proclin300;

[0032] (6) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

[0033] A 液为 0.7g/L 鲁米诺, 0.165g/L 对碘酚, 缓冲液为 pH8.6 的 5mmol/L Tris-HCl, 避光保存; B 液为 0.675g/L 过氧化脲, 用工艺用水配制; A 液和 B 液在使用前 5min 混合;

[0034] (7) 组装: 将上述试剂组装成盒, 储存于 2 ~ 8℃, 每种试剂各一瓶;

[0035] (8) 对采用该方法制备的试剂盒进行物理检查, 对准确度、剂量 - 反应曲线的线性、精密度、特异性、灵敏度、质控品的测定值和稳定性进行测定。

[0036] 本发明的原理是, 采用双抗体夹心法测定血清或血浆中的 LN, 在 LN- 纳米磁微粒悬浮液中加入样本 / 校准品, 再加入酶标单克隆抗体, 通过抗原抗体反应, 形成磁微粒 - LN - Ab - LN 抗原 - LN 抗体 - HRP 复合物, 用磁场将复合物吸附在试管底部, 清洗掉游离的成分, 加入底物工作液, 在氧化剂作用下, HRP 催化鲁米诺生成处于激发态的氨基邻苯二甲酸离子, 其恢复到基态时, 释放出 425nm 的光子, 于第 5 分钟测定各加样孔的发光值 RLU。样本的 RLU 与样本 LN 浓度呈正相关。样本中的 LN 浓度依据由校准品 LN 浓度和对应的 RLU 建立的 $\text{Log}(X) - \text{Log}(Y)$ 数学模型进行定量, 从而检测人血清、血浆中的 LN 含量。

[0037] 本专利发明的层粘连蛋白纳米磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒, 具有以下优点:

[0038] (1) 灵敏度高, 本试剂盒的分析灵敏度不高于 10ng/mL。

[0039] (2) 精密性良好, 批内不精密度不高于 5%, 批间不精密度不高于 10%。

[0040] (3) 成本低, 与市场上同类产品比较, 本试剂盒性能良好, 成本低, 具有临床应用价值。

[0041] (4) 稳定性良好, 本产品可在 37℃ 可存放 7 天以上, 在 2 ~ 8℃ 可存放 1 年。

附图说明

[0042] 图 1 是本发明的试剂盒测定层粘连蛋白与医院测定层粘连蛋白的测定结果比较图, 其中纵坐标为本试剂盒测得的层粘连蛋白值, 横坐标为医院测定层粘连蛋白值, 两种方法相关系数 $r=0.9668$, 直线方程 $y=0.9239x+7.9803$ 。

具体实施方式

[0043] 实施例 1: 制备层粘连蛋白纳米磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒

[0044] (1) 层粘连蛋白校准品的配制：

[0045] 将层粘连蛋白纯品(购自 Fitzgerald 公司)用校准品稀释液(成分为牛血清,要求外观为浅黄色呈稍粘稠的液体,无溶血或异物;总蛋白含量不小于 32mg/mL;球蛋白含量不大于 2mg/mL)稀释至工作浓度,分别为 0, 20, 50, 100, 250, 800ng/mL;

[0046] (2) 层粘连蛋白质控品的配制：

[0047] 用校准品稀释液将层粘连蛋白纯品稀释至 35ng/mL 和 500ng/mL, 35ng/mL 为低值质控品, 500ng/mL 为高值质控品;

[0048] (3) 纳米磁微粒偶联层粘连蛋白单克隆抗体的制备：

[0049] A、四氧化三铁纳米磁微粒制备

[0050] 采用沉淀法制备四氧化三铁纳米磁微粒,具体制备方法如下:1)将 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 以摩尔比 2:1 加入到蒸馏水中,剧烈搅拌溶解;2)在氮气环境下加 0.5M 氨水于上述铁盐溶液中,调 pH9-10,反应温度 65℃,反应时间 45min;3)反应结束后,用蒸馏水洗涤至中性,弃上清,于 60℃烘干,即得 10-50nm 的四氧化三铁纳米磁微粒;

[0051] B、纳米磁珠表面羧基的偶联

[0052] 采用分散聚合法进行偶联,具体制备方法如下:取上述制备的纳米磁微粒超声分散在 10%PEG8000 溶液中,得磁流体溶液,向磁流体溶液中按体积比 1:10 加入无水乙醇,搅拌 30min 后,移入带有搅拌器,冷凝管,氮气入口的三颈瓶中,加入交联剂 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺;在氮气的保护下,升温至 $60 \pm 1^\circ\text{C}$,恒温搅拌 30min,之后依次加入磁流体体积 3% 的过氧化苯甲酰,搅拌速度约为 500rpm,磁流体溶液相同体积的苯乙烯,磁流体溶液体积 25% 的丙烯酸,保持氮气气流,其余条件保持不变,反应 8-10h,所得产物静置,用蒸馏水反复洗涤,再用盐酸调节 pH=1,浸泡 24h,静置;再用蒸馏水反复洗涤,除去未包覆的 Fe_3O_4 磁粉,把沉淀下来的产品放入真空干燥箱中 50℃ 下干燥 24h,得到表面联有羧基的纳米磁微粒;

[0053] C、纳米磁微粒单克隆抗体的制备,配制 1L,方法如下:

[0054] 取 100mL 0.1M MES 缓冲液,加入 10mg 表面联有羧基的纳米磁微粒,室温搅拌 40min,之后加入 3.5mg 层粘连蛋白单克隆抗体,然后加入 5mg/mL EDC 溶液,2-8℃ 反应 1h 后,用 0.01M PBS 缓冲液洗涤 3 次,最后用 0.01M PBS 定溶至 1L 即可;

[0055] (4) 层粘连蛋白抗体酶结合物的制备

[0056] 采用改良高碘酸钠氧化法将层粘连蛋白抗体(购自 Fitzgerald 公司)与辣根过氧化物酶进行偶联后,用酶稀释液将其稀释至工作浓度 1:4500,并加入 10% 酶稳定剂,储存于 2 ~ 8℃;

[0057] (5) 20 倍浓缩洗液的配制

[0058] 20 倍浓缩洗液包括 58g/L 磷酸氢二钠, 5.92g/L 磷酸二氢钠, 180g/L NaCl, 10mL/L Tween-20 和 2%Proclin300;

[0059] (6) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

[0060] A 液为 0.7g/L 鲁米诺, 0.165g/L 对碘酚,缓冲液为 pH8.6 的 5mmol/L Tris-HCl,避光保存;B 液为 0.675g/L 过氧化脲,用工艺用水配制;A 液和 B 液在使用前 5min 混合;

[0061] (7) 组装:将上述试剂组装成盒,储存于 2 ~ 8℃,每种试剂各一瓶;

[0062] (8) 对采用该方法制备的试剂盒进行物理检查,对准确度、剂量-反应曲线的线性、精密度、特异性、灵敏度、质控品的测定值和稳定性进行测定。

[0063] 实施例 2 :本发明试剂盒的检查

[0064] (1) 物理检查 :液体组分应澄清,无沉淀或絮状物 ;其他组分应无包装破损。

[0065] (2) 准确性 :试剂盒校准品与国家标准品系列同时进行分析测定,用双对数数学模型拟合,要求两条剂量 - 反应曲线不明显偏离平行(t 检验, $|t| < 2.447$);以层粘连蛋白企业标准品为对照品,用双对数数学模型拟合,试剂盒校准品的实测值与标示值比值的平均值应在 0.90 ~ 1.10 范围内。

[0066] (3) 剂量 - 反应曲线的线性 :用双对数数学模型拟合,剂量 - 反应曲线在 0-800ng/mL 浓度范围内相关系数 r 绝对值不低于 0.9900。

[0067] (4) 分析灵敏度 :试剂盒分析灵敏度不高于 10ng/mL。

[0068] (5) 精密度 :10 孔平行测定高值和低值质控品,计算测定结果的平均浓度($\bar{X}$)与标准差(SD),批内不精密度($CV\%$) = $SD / \bar{X} \times 100\%$;使用 3 批产品进行 3 次试验,计算测定结果的平均浓度($\bar{X}$)与标准差(SD),批间不精密度($CV\%$) = $SD / \bar{X} \times 100\%$,结果应符合批内不精密度($CV\%$) 应不高于 5%;批间不精密度($CV\%$) 应不高于 10%。

[0069] (6) 质控品的测定值 :平行测定 10 孔高值和低值的质控品,用 $\log(X) - \log(Y)$ 数学模型拟合,质控品测值应在允许范围内,低值质控品测值在 35ng/mL,高值质控品测值在 500ng/mL。

[0070] (7) 稳定性 :37℃放置 7 天,测定值应符合上述各项要求。

[0071] 实施例 3 :本发明试剂盒的使用方法

[0072] (1) 将待检试剂盒在室温(18 ~ 25℃)下平衡 30 分钟。

[0073] (2) 配制洗液 :用蒸馏水将浓缩洗液按 1:20 稀释(1mL 洗液加 19mL 蒸馏水)。若浓缩洗液有结晶,可将浓缩洗液置于室温或 37℃,待结晶溶解后再进行稀释。

[0074] (3) 配制发光液 :使用前 5 分钟取适量发光液 A 与发光液 B 等体积混合。

[0075] (4) 将反应管编号,向试管中依次加入 20uL 校准品或血清标本、50uL 磁性颗粒 - 层粘连蛋白抗体悬浮液、75uL 层粘连蛋白抗体酶结合物,37℃下振荡反应 45min,将试管架置于磁分离器上分离 5min,然后倒出上清液,加入 500uL 洗液,充分混匀后,于磁分离器上分离,倒出洗液,重复 3 次,在各管中加入化学发光底物液 100uL,充分混匀,暗置 5min,在管式化学发光仪上测定各管的发光值(RLU),以校准品浓度的 $\log$ 值为横坐标,以发光值的 $\log$ 为纵坐标,绘制标准曲线,根据血清标本的发光值即可计算出层粘连蛋白的浓度。

[0076] 实施例 4 :本试剂盒的方法学评价结果

[0077] 检测范围 :范围为 0-800ng/mL,对于浓度大于 800ng/mL 的标本应先进行稀释后再进行测定。

[0078] 灵敏度 :<10ng/mL。

[0079] 精密度 :小于 5%。

[0080] 准确性 :回收率的平均值在 0.90 ~ 1.10 范围内。

[0081] 质控品测值 :QcL 和 QcH 的测值均在允许范围内,低值质控品测值在 35ng/mL,高值质控品测值在 500ng/mL。

[0082] 稳定性 :将试剂盒中各试剂组分于 37℃下放置 7d,稳定性良好。

[0083] 实施例 5 :本试剂盒的临床对比实验

[0084] 本专利发明的试剂盒已进行了临床考核,本次临床试验的样本总数 112 例,先经医院测试后,再用本专利发明的试剂盒(化学发光)进行测定,结果表明,直线方程为 $y=0.9239x+7.9803$,相关系数 $r=0.9668$ 。可见本方法制备的试剂盒与医院测值有较好的一致性。以 SPSS13.0 统计分析软件对相关系数进行 t 检验(检验水准 $\alpha=0.05$), $P<0.001$,两种方法测定的层粘连蛋白值的相关密切程度是显著性的,可见两种方法测定的层粘连蛋白值密切相关,说明试剂盒的诊断能力较强,可推广临床应用。

[0085] 为了确定本试剂盒的临床参考值,对 712 份正常人血清、血浆样本采用本试剂盒进行了检测,结果表明本试剂盒的参考值(参考范围)为 0-130ng/mL。

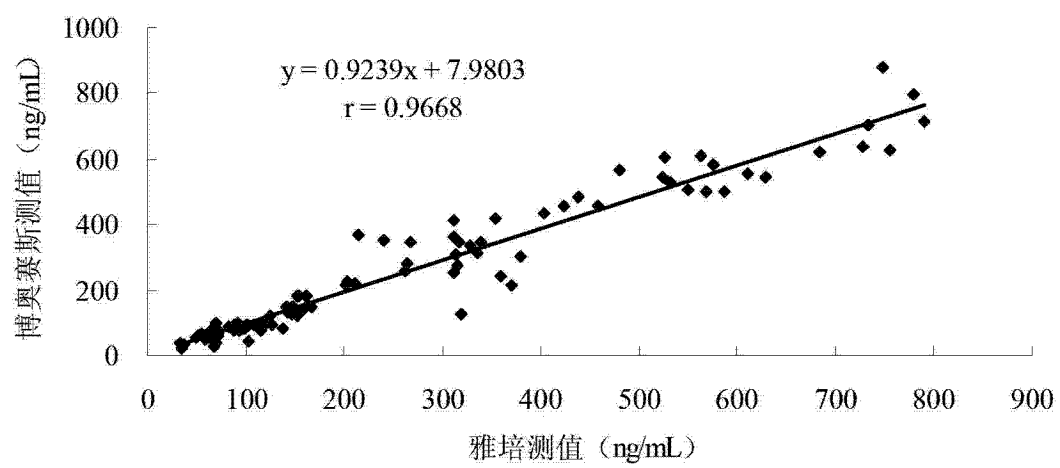


图 1

专利名称(译)	一种层粘连蛋白纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN103364568B	公开(公告)日	2015-05-27
申请号	CN201310304547.6	申请日	2013-07-18
[标]申请(专利权)人(译)	博奥赛斯(天津)生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	博奥赛斯(天津)生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	博奥赛斯(天津)生物科技有限公司		
[标]发明人	刘萍 栾大伟 李克锦		
发明人	刘萍 栾大伟 李克锦		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
代理人(译)	韩敏		
其他公开文献	CN103364568A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种层粘连蛋白(LN)纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,所述试剂盒包括:层粘连蛋白校准品;偶联有层粘连蛋白单克隆抗体的纳米磁微粒悬浮液;层粘连蛋白单克隆抗体酶结合物,所用的酶为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶纯度RZ≥3.0,活性≥250U/mL;层粘连蛋白质控品;化学发光液A液和B液;20倍浓缩洗液;反应管。另外本发明还公开了本发明试剂盒的制备方法。本发明试剂盒与现有试剂盒相比灵敏度高、可测定浓度范围宽、试剂有效期长、操作简单、检测时间短、检测自动化程度高等优点。

