



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102998462 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201210473594. 9

(22) 申请日 2012. 11. 20

(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 范利花

(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 李莉华

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

审查员 周露露

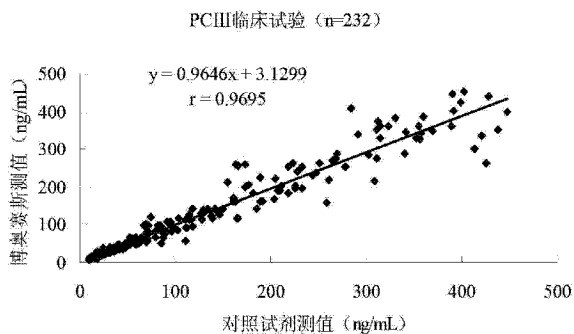
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

III型前胶原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 PC III 型前胶原磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒, 所述试剂盒包括: PC III 校准品, PC III 校准品浓度为 0, 20, 50, 100, 200, 500ng/mL, 校准品稀释液为含有 5% 牛血清的生理盐水溶液; 偶联有链霉亲和素的磁微粒悬浮液; 生物素标记的 PC III 抗体; PC III 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; PC III 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操作简便, 安全无环境污染。此外, 本发明还具有检测样品的浓度范围宽、成本低、稳定性好等优点。



1. PC III型前胶原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)PC III校准品;

PC III校准品浓度为 0, 20, 50, 100, 200, 500ng/mL 梯度浓度,校准品稀释液为含有 5%牛血清的生理盐水溶液;

2) 偶联有链霉亲和素的磁微粒悬浮液,所述的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 1 ~ 2 μ m;

3) 生物素标记的 PC III抗体;

4)PC III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 \geq 3.0,活性 \geq 250U/mL;

5)PC III质控品,所述质控品包括低值质控品和高值质控品,浓度分别是 42.5ng/mL 和 255ng/mL;

6) 化学发光液 A 液和 B 液,发光液 A 液主要成分为 0.7g/L 鲁米诺, B 液主要成分为 0.675g/L 过氧化脲;

7)20 倍浓缩洗液;

8) 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。

2. 一种制备所述权利要求 1 的试剂盒的方法,其特征在于包括以下步骤:

(1)PC III校准品的配制:

将 PC III纯品用含有 5%牛血清的生理盐水溶液稀释成系列梯度,浓度分别为 0, 20, 50, 100, 200, 500ng/mL;

(2)PC III质控品的配制:

将 PC III纯品用含有 50%牛血清的生理盐水溶液分别稀释至低值质控品 42.5ng/mL,高值质控品 255ng/mL;

(3) 磁性颗粒 - 链霉亲和素悬浮液的制备:

取 100mL0.1mol/L 2- 吗啉乙磺酸溶液,依次加入 10mg 磁性颗粒和 3mg 链霉亲和素,搅拌 30min,然后加入 10mg/mL 碳二亚胺盐酸盐溶液 3.5 μ L,反应 1h 后,使用磁力架吸附,静止 10min,移去液体,加入 10mL 0.01mol/L PBS,重复上述过程,共洗涤 3 次,最后用 0.01mol/L PBS 定溶至 1L 即可;

(4) 生物素标记的 PC III抗体的制备

取 0.5mg PC III抗体,用硼酸盐缓冲液在 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 下透析 1 ~ 3h;将透析后的抗体加入 25 μ g 生物素,同时加入二甲基亚砜,最终浓度为 10%,避光反应 3h,缓慢振荡;在上述溶液中加入 250 μ L1mol/L 氯化铵溶液,常温避光反应 30 ~ 60min;用 0.01mol/L PBS 溶液在 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 下透析 2 天,期间换液 3 ~ 5 次;

(5)PC III抗体酶结合物的制备

采用高碘酸钠氧化法将 PC III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 1:8000,并加入 5-20%酶稳定剂,储存于 2 ~ 8 $^{\circ}$ C;

(6)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 1‰ Proclin300;

(7) 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 ;

(8) 组装 :将上述试剂组装成盒,储存于 2 ~ 8°C ;

(9) 对采用该方法制得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。

III型前胶原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III型前胶原(PC III)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] 组织中存在五种胶原(I、II、III、IV、V型)。正常肝脏中主要含I、III、IV、V型前胶原,是肝细胞外间质结缔组织增生的主要胶原蛋白。PC III由细胞内合成后分泌到血液中,P III P是PC III降解后的氨基端肽片段,仅有PC III的1/10,分子量45000,肝纤维化时,纤维母细胞合成PC III增加,而降解减少。慢活肝和肝硬化时肝纤维合成代谢旺盛,血清PC III升高,因此有活动性纤维化时,血清PC III升高明显,但陈旧性肝纤维化或晚期肝硬化、肝萎缩时却不一定升高。肝脏在仅有炎症、坏死时,PIIIP也可相应升高。

[0003] (1)PC III血中含量随慢迁肝、慢活肝、到肝硬化(代期)依次升高,无论P III P或PC III血清浓度与肝活检纤维化严重程度呈高度正相关,是诊断肝纤维化和早期诊断肝纤维化的灵敏标志物。

[0004] (2)作为肝纤维化分级的指标。(包括肝炎后、酒精性和其他原因引起的肝硬化);

[0005] (3)作为肝硬化(代偿期)早期治疗和疗效观察的可靠指标;

[0006] (4)肝硬化晚期(失代偿期),血PC III含量可有下降。

[0007] 目前常用的检测III型前胶原(PC III)的方法有放射免疫分析技术(RIA)和酶联免疫分析法(ELISA),但是这两种方法存在诸多不足,例如RIA存在放射性污染、标记物半衰期短、对操作者具有放射性损伤,且操作繁琐,时间长等缺点;而ELISA灵敏度低,检测范围窄;随着标记免疫技术的迅速发展,各种新的检测方法层出不穷,其中磁微粒化学发光免疫检测技术,是当今最为敏感的微量免疫测定法。

[0008] 但是磁微粒化学发光分析方法还没有广泛用于PC III的检测,特别是广泛用于临床。

发明内容

[0009] 本发明要解决的问题是提供PC III的磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法,避免了放射性免疫分析的试剂有效期短、存在放射性污染、操作繁琐等缺点,且解决了灵敏度低,检测范围窄,成本高的缺陷。

[0010] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:PC III型前胶原磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,包括:PC III校准品,PC III校准品浓度为0,20,50,100,200,500ng/mL梯度浓度,校准品稀释液为含有5%牛血清的生理盐水溶液;偶联有链霉亲和素的磁微粒悬浮液;生物素标记的PC III抗体;PC III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 $RZ \geq 3.0$,活性 $\geq 250U/mL$;PC III质控品,所述质控品包括低值质控品和高值质控品,浓度分别是42.5~57.5ng/mL和255~345ng/mL;化学发光液A液和B液;20倍浓缩洗

液；反应管。

[0011] 进一步,所述的发光液 A 液的主要成分为鲁米诺, B 液的主要成分是过氧化脲。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。

[0012] 进一步,所述的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 1-2 μ m。

[0013] 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。

[0014] 试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0015] (1)PC III校准品的配制:将 PC III纯品用含有 5% 牛血清的生理盐水溶液,浓度分别为 0,20,50,100,200,500ng/mL。

[0016] (2)PC III质控品的配制:

[0017] 将 PC III抗原用含有 5% 牛血清的生理盐水溶液分别稀释至低值质控品(QcL)和高值质控品(QcH)的允许范围,分别为 42.5~57.5ng/mL 和 255~345ng/mL。

[0018] (3)磁性颗粒-链霉亲和素悬浮液的制备

[0019] 取 100mL0.1mol/L 2-吗啉乙磺酸溶液(MES 溶液),依次加入 10mg 磁性颗粒和 3mg 链霉亲和素(SA),搅拌 30min,然后加入 10mg/mL 的 EDC 溶液(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基,又名:碳二亚胺盐酸盐溶液)3.5 μ L,反应 1h 后,使用磁力架吸附,静止 10min,移去液体,加入 10mL 0.01mol/L PBS,重复上述过程,共洗涤 3 次,最后用 0.01mol/L PBS 定溶至 1L 即可。

[0020] (4)生物素-PC III抗体结合物的制备

[0021] 1)取 0.5mgPC III抗体,用硼酸盐缓冲液在 2~8 $^{\circ}$ C 下透析 1~3h。

[0022] 2)将透析后的抗体加入 25 μ g 生物素,同时加入二甲基亚砜(DMSO),其终浓度为 10%,避光反应 3h,缓慢振荡。

[0023] 3)在上述溶液中加入 250 μ L1mol/L 氯化铵溶液,常温避光反应 30~60min。

[0024] 4)用 0.01M PBS 溶液在 2~8 $^{\circ}$ C 下透析 2d,期间换液 3~5 次。

[0025] (5)PC III抗体酶结合物的制备

[0026] 采用高碘酸钠氧化法将 PC III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 1:8000,并加入 5-20% 酶稳定剂,储存于 2~8 $^{\circ}$ C。酶稳定剂是一种可以保持蛋白质在冻干或溶液下保持天然折叠构想的试剂,有利于抗原或抗体的保存,避免外界因素如温度、pH、盐、金属离子及其他污染物影响其稳定性。

[0027] (6)20 倍浓缩洗液的配制

[0028] 按照下述配方配制浓缩洗液,58g/L 磷酸氢二钠,5.92g/L 磷酸二氢钠,180g/L NaCl,10mL/L Tween-20,1‰ Proclin300。

[0029] (7)化学发光液 A 液和 B 液的配制

[0030] 0.7g/L 鲁米诺,0.165g/L 对碘酚,缓冲液为 5mmol/L Tris·HCl (pH8.6);B 液为 0.675g/L 过氧化脲,用工艺用水配制。

[0031] (8)组装:将上述试剂组装成盒,储存于 2~8 $^{\circ}$ C。

[0032] (9)对采用该方法制的试剂盒进行方法学评价。

[0033] 本发明的原理是,本试剂盒采用夹心法原理测定血清或血浆中的 PC III,在亲和

素-磁微粒悬浮液中加入生物素-PC III抗体结合物,通过亲和素和生物素的亲和反应,形成磁微粒-亲和素-生物素-PC III抗体复合物,加入样本和酶后,会通过抗原抗体反应,形成了磁微粒-亲和素-生物素-PC III抗体-PC III-PC III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)。样本的发光值与样本中PC III浓度呈正相关。样本中的PC III浓度依据由校准品PC III浓度和对应的RLU建立的Log(X)-Log(Y)数学模型进行定量,从而检测人血清、血浆中的PC III含量。

[0034] 本试剂盒将化学发光免疫分析和磁微粒技术结合,与以微孔板为固相载体的III型前胶原(PC III)化学发光试剂盒相比,具有以下优势:(1)以磁微粒为固相载体,大大增加了抗体的有效包被量,节约了抗体的用量,从而节约了成本;(2)以磁微粒为固相载体包被抗体,增加了抗原-抗体的接触面积,及发光面积,提高了反应的灵敏度;(3)反应在液相中进行,且利用旋转磁场使磁微粒其搅拌作用,大大缩短了反应时间;(4)在反应过程中引入了生物素-亲和素系统(biotin-avidin system, BAS),它是70年代末发展起来的一种新型反应放大系统,由于具有与标记试剂高亲和力的牢固结合、多级放大效应,使其具有灵敏度高、特异性好、稳定性高的特点,目前已成为广泛用于微量抗原、抗体定性、定量检测及定位观察研究的新技术;(5)本试剂盒与管式化学发光仪配套使用,在样本测定过程中灵活性更好。

[0035] 本专利发明的生长素(PC III)磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒,具有以下优点:(1)反应快速,可在40分钟内判断检测结果;操作简便,无污染。(2)灵敏度高,本试剂盒的分析灵敏度不高于10ng/mL。(3)特异性强,透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)的交叉反应系数小于1%。(4)精密度良好,精密度不高于10%。(5)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。(6)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。

附图说明

[0036] 图1是本发明的博奥赛斯化学发光试剂盒测定PC III与放免试剂盒测定PC III的测定结果比较图,其中纵坐标为博奥赛斯测得的PC III值,横坐标为放免试剂盒测定PC III值,两种方法相关系数(r)=0.9945,直线方程 $y=0.9646x+3.1299$

具体实施方式

[0037] 实施例1:制备III型前胶原(PC III)磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒I

[0038] (1)PC III校准品的配制:将PC III纯品用含有5%牛血清的生理盐水溶液,浓度分别为0,20,50,100,200,500ng/mL。

[0039] (2)PC III质控品的配制:

[0040] 将PC III抗原用含有5%牛血清的生理盐水溶液配制低值质控品和高质质控品,QcL配制浓度42.5ng/mL,QcH配制浓度255ng/mL。

[0041] (3)磁性颗粒-链霉亲和素悬浮液的制备

[0042] 取100mL0.1mol/L 2-吗啉乙磺酸溶液(MES溶液),依次加入10mg磁性颗粒和3mg

链酶亲和素(SA),搅拌 30min,然后加入 10mg/mL 的 EDC 溶液(1-乙基-(3-二甲氨基丙基,又名:碳二亚胺盐酸盐溶液)3.5uL,反应 1h 后,使用磁力架吸附,静置 10min,移去液体,加入 10mL 0.01mol/L PBS,重复上述过程,共洗涤 3 次,最后用 0.01mol/L PBS 定溶至 1L 即可。

[0043] (4) 生物素-PC III 抗体结合物的制备

[0044] 1) 取 0.5mg PC III 抗体,用硼酸盐缓冲液在 2~8℃ 下透析 3h。

[0045] 2) 将透析后的抗体加入 25ug 生物素,同时加入二甲基亚砜(DMSO),其终浓度为 10%,避光反应 3h,缓慢振荡。

[0046] 3) 在上述溶液中加入 250uL 1mol/L 氯化铵溶液,常温避光反应 30min。

[0047] 4) 用 0.01M PBS 溶液在 2~8℃ 下透析 2d,期间换液 3 次。

[0048] (5) PC III 抗体酶结合物的制备

[0049] 采用高碘酸钠氧化法将 PC III 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 1:8000,并加入 5% 酶稳定剂,储存于 2~8℃,酶稳定剂使用 SurModics In Vitro Technologies 的蛋白稳定剂产品。

[0050] (6) 20 倍浓缩洗液的配制

[0051] 按照下述配方配制浓缩洗液,58g/L 磷酸氢二钠,5.92g/L 磷酸二氢钠,180g/L NaCl,10mL/L Tween-20,1‰ Proclin300。

[0052] (7) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

[0053] 0.7g/L 鲁米诺,0.165g/L 对碘酚,缓冲液为 5mmol/L Tris·HCl (pH8.6);B 液为 0.675g/L 过氧化脲,用工艺用水配制。

[0054] (8) 组装:将上述试剂组装成盒,储存于 2~8℃。

[0055] (9) 对采用该方法制的的试剂盒的进行物理检查,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。

[0056] 说明:

[0057] 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。

[0058] 2) 准确性:试剂盒校准品与企业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 PC III 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。

[0059] 3) 剂量-反应曲线的线性:用双读数数学模型拟合,剂量-反应曲线在 0-500ng/mL 浓度范围内相关系数 r 绝对值不低于 0.9900。

[0060] 4) 分析灵敏度:试剂盒分析灵敏度不高于 10ng/mL。

[0061] 5) 精密度:精密度(CV%) 应不高于 10%。

[0062] 6) 质控品的测定值:平行测定 10 孔高值和低值的质控品,用 $\text{Log}(X) - \text{Log}(Y)$ 数学模型拟合,质控品测值应在允许范围内,QcL 和 QcH 的允许范围分别为 42.5~57.5ng/mL 和 255~345ng/mL。

[0063] 7) 特异性:

[0064] 交叉反应符合下表要求:

	交叉反应因子	浓度	测定值
[0065]	透明质酸 (HA)	2000ng/mL	<20ng/mL
	层粘连蛋白 (LN)	2000ng/mL	<20ng/mL

[0066] 8) 稳定性 :37℃放置 7 天,测定值应符合上述各项要求。

[0067] 实施例 2 :制备III型前胶原(PC III)磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒II

[0068] (1)PC III校准品的配制 :将 PC III纯品用含有 5% 牛血清的生理盐水溶液,浓度分别为 0, 20, 50, 100, 200, 500ng/mL。

[0069] (2)PC III质控品的配制 :

[0070] 将PC III抗原用含有 5% 牛血清的生理盐水溶液配制低值质控品和高质质控品,QcL 配制浓度为 57.5ng/mL, QcH 配制浓度为 345ng/mL。

[0071] (3)磁性颗粒-链霉亲和素悬浮液的制备

[0072] 取 100mL0.1mol/L 2- 吗啉乙磺酸溶液(MES 溶液),依次加入 10mg 磁性颗粒和 3mg 链霉亲和素(SA),搅拌 30min,然后加入 10mg/mL 的 EDC 溶液(1- 乙基-(3- 二甲基氨基丙基,又名 :碳二亚胺盐酸盐溶液)3.5uL,反应 1h 后,使用磁力架吸附,静止 10min,移去液体,加入 10mL 0.01mol/L PBS,重复上述过程,共洗涤 3 次,最后用 0.01mol/L PBS 定溶至 1L 即可。

[0073] (4)生物素-PC III抗体结合物的制备

[0074] 1)取 0.5mgPC III抗体,用硼酸盐缓冲液在 2~8℃下透析 1h。

[0075] 2)将透析后的抗体加入 25ug 生物素,同时加入二甲基亚砜(DMSO),其终浓度为 10%,避光反应 3h,缓慢振荡。

[0076] 3)在上述溶液中加入 250uL1mol/L 氯化铵溶液,常温避光反应 60min。

[0077] 4)用 0.01M PBS 溶液在 2~8℃下透析 2d,期间换液 5 次。

[0078] (5)PC III抗体酶结合物的制备

[0079] 采用高碘酸钠氧化法将 PC III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 1:8000,并加入 5% 酶稳定剂,储存于 2~8℃,酶稳定剂使用 SurModics In Vitro Technologies 的蛋白稳定剂产品。

[0080] (6)20 倍浓缩洗液的配制

[0081] 按照下述配方配制浓缩洗液,58g/L 磷酸氢二钠,5.92g/L 磷酸二氢钠,180g/L NaCl,10mL/L Tween-20,1‰ Proclin300。

[0082] (7)化学发光液 A 液和 B 液的配制

[0083] 0.7g/L 鲁米诺,0.165g/L 对碘酚,缓冲液为 5mmol/L Tris·HCl (pH8.6);B 液为 0.675g/L 过氧化脲,用工艺用水配制。

[0084] (8)组装 :将上述试剂组装成盒,储存于 2~8℃。

[0085] (9)对采用该方法制的的试剂盒的进行物理检查,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。

[0086] 实施例 3 :制备III型前胶原(PC III)磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒III

[0087] (1)PC III校准品的配制 :将 PC III纯品用含有 5% 牛血清的生理盐水溶液,浓度分别为 0, 20, 50, 100, 200, 500ng/mL。

[0088] (2) PC III质控品的配制：

[0089] 将PC III抗原用含有5%牛血清的生理盐水溶液配制低值质控品和高质质控品，QcL配制浓度为50.2ng/mL之间，QcH配制浓度为305ng/mL。

[0090] (3) 磁性颗粒-链霉亲和素悬浮液的制备

[0091] 取100mL 0.1mol/L 2-吗啉乙磺酸溶液(MES溶液)，依次加入10mg磁性颗粒和3mg链霉亲和素(SA)，搅拌30min，然后加入10mg/mL的EDC溶液(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)，又名：碳二亚胺盐酸盐溶液)3.5uL，反应1h后，使用磁力架吸附，静止10min，移去液体，加入10mL 0.01mol/L PBS，重复上述过程，共洗涤3次，最后用0.01mol/L PBS定溶至1L即可。

[0092] (4) 生物素-PC III抗体结合物的制备

[0093] 1) 取0.5mg PC III抗体，用硼酸盐缓冲液在2~8℃下透析2h。

[0094] 2) 将透析后的抗体加入25ug生物素，同时加入二甲基亚砜(DMSO)，其终浓度为10%，避光反应3h，缓慢振荡。

[0095] 3) 在上述溶液中加入250uL 1mol/L氯化铵溶液，常温避光反应50min。

[0096] 4) 用0.01M PBS溶液在2~8℃下透析2d，期间换液4次。

[0097] (5) PC III抗体酶结合物的制备

[0098] 采用高碘酸钠氧化法将PC III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1:8000，并加入20%酶稳定剂，储存于2~8℃，酶稳定剂使用SurModics In Vitro Technologies的蛋白稳定剂产品，。

[0099] (6) 20倍浓缩洗液的配制

[0100] 按照下述配方配制浓缩洗液，58g/L磷酸氢二钠，5.92g/L磷酸二氢钠，180g/L NaCl，10mL/L Tween-20，1‰ Proclin300。

[0101] (7) 化学发光液A液和B液的配制

[0102] 0.7g/L鲁米诺，0.165g/L对碘酚，缓冲液为5mmol/L Tris·HCl (pH8.6)；B液为0.675g/L过氧化脲，用工艺用水配制。

[0103] (8) 组装：将上述试剂组装成盒，储存于2~8℃。

[0104] (9) 对采用该方法制的的试剂盒的进行物理检查，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。

[0105] 实施例4 本发明试剂盒的使用方法

[0106] 1) 将待检试剂盒在室温(18~25℃)下平衡30分钟。

[0107] 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。

[0108] 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。

[0109] 4) 将反应管编号，向试管中依次加入10-50uL校准品或血清标本、100uL磁性颗粒-链霉亲和素悬浮液、100uL生物素-PC III抗体结合物、100uL PC III酶结合物，37℃下振荡反应10-30min，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200-400uL，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 PC III 的浓度。

[0110] 实施例 5 本试剂盒的方法学评价结果

[0111]

项目	质检标准	结果
		合格/不合格
物理检查	液体组分澄清, 无沉淀或絮状物	合格

[0112]

精密度	QcL	浓度值	42.5~57.5ng/mL	合格	
		精密度	CV<10%	合格	
	QcH	浓度值	255~345ng/mL	合格	
		精密度	CV<10%	合格	
特异性		C1 (HA 2000ng/mL)	<20ng/mL	合格	
		C2 (LN 2000ng/mL)	<20ng/mL	合格	
分析灵敏度			<10ng/mL	合格	
校准品线性			r>0.99	合格	
准确性		定值结果	实测值/理论值平均值在 0.9-1.1 之间	合格	
		平行判定	t <2.447, 两条直线不 偏离平行	合格	
稳定性	物理检查		液体组分澄清, 无沉淀或 絮状物	合格	
	精密度	QcL	浓度值	42.5~57.5ng/mL	合格
			精密度	CV<10%	合格
		QcH	浓度值	255~345ng/mL	合格
			精密度	CV<10%	合格
	特异性		C1 (HA 2000ng/mL)	<20ng/mL	合格
			C2 (LN 2000ng/mL)	<20ng/mL	合格
	分析灵敏度			<10ng/mL	合格
	校准品线性			r>0.99	合格
	准确性		定值结果	实测值/理论值平均值在 0.9-1.1 之间	合格
			平行判定	t <2.447, 两条直线不 偏离平行	合格

[0113] 实施例 6 :本试剂盒的临床对比实验

[0114] 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 108 例,先以 PC III放射性免疫试剂盒测试后,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 $y=0.9646x+3.1299$,相关系数为 $R=0.9695$ 。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 统计分析软件对两种方法的 PC III 测值进行 t 检验(检验水准 $\alpha = 0.05$), $P = 0.839 > 0.05$, 两种方法测定的 PC III 值无统计学差异, 可见两种方法测定的 PC III 值密切相关。灵敏度(真阳性率)为 95.06%、特异性(真阴性率)为 98.68%, 都较高; 而假阳性率(误诊率)为 1.32%、假阴性率(漏诊率)为 4.94%, 都较低, 可见本试剂盒的测量值与实际值(原测值)的符合程度良好。粗一致性反映试剂盒诊断病人与非病人的能力, 本试剂盒的粗一致性为 97.41%, 接近于 1, 说明试剂盒的诊断能力较强。

[0115] 为了确定本试剂盒的临床参考值, 对 467 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: $0 \sim 120 \text{ng/mL}$ 。

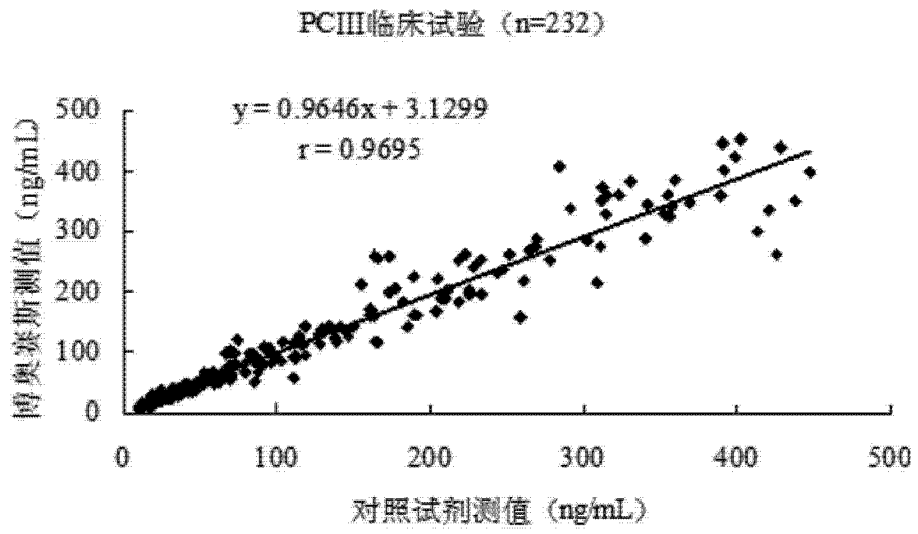


图 1

专利名称(译)	III型前胶原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	CN102998462B	公开(公告)日	2014-12-10
申请号	CN201210473594.9	申请日	2012-11-20
[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 范利花		
发明人	刘萍 范利花		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
代理人(译)	李莉华		
审查员(译)	周露露		
其他公开文献	CN102998462A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种PCIII型前胶原磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒，所述试剂盒包括：PCIII校准品，PCIII校准品浓度为0，20，50，100，200，500ng/mL，校准品稀释液为含有5%牛血清的生理盐水溶液；偶联有链霉亲和素的磁微粒悬浮液；生物素标记的PCIII抗体；PCIII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；PCIII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操作简便，安全无环境污染。此外，本发明还具有检测样品的浓度范围宽、成本低、稳定性好等优点。

PCIII临床试验 (n=232)

