(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106290926 A
(43)申请公布日 2017.01.04

(21)申请号 201610661812.X

(22)申请日 2016.08.13

(71)申请人 山东博科生物产业有限公司
地址 250200 山东省济南市章丘市明书经济开发区(经十东路与明埠路交界山东博科产业园)

(72)发明人 甘宜梧 谭柏清 董雯 李静 王慧娟

(51)Int.Cl.
G01N 33/92(2006.01)
G01N 33/552(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)

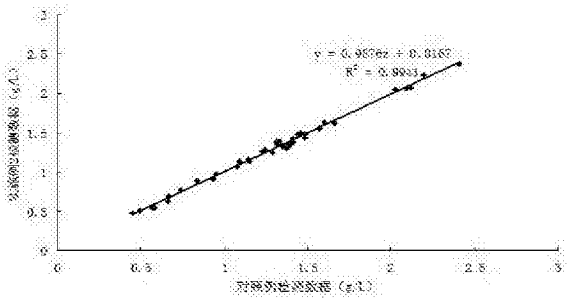
权利要求书1页 说明书5页 附图4页

(54)发明名称

一种载脂蛋白B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B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。



CN 106290926 A

1.一种载脂蛋白B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ApoB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所述的试剂盒，其特征在于，所述二氧化硅包覆的磁性纳米颗粒为Fe_3O_4/SiO_2复合纳米粒子，粒径为20-50nm。

3.根据权利要求1所述的试剂盒，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B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B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ApoA1，ApoB两种；ApoA1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%，ApoA1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] 载脂蛋白B(Apo B)是一类在分子量、免疫性和代谢上具有多态性的蛋白质，依其分子量及所占百分比可分为B100、B48、B74、B26及少量B50；在正常情况下，以Apo B100和Apo B48较为重要；Apo B100主要分布于血浆VLDL、IDL和LDL中，占这三类脂蛋白中蛋白含量的25%、60%、95%。而ApoB48则分布于CM中，占其蛋白含量的5%。正常情况下人血清或血浆中ApoB参考范围为女性：0.75～1.50g/L，男性：0.60～1.00g/L。

[0004] 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，ApoA1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；ApoA1，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。

[0005] ApoB为LDL的主要结构蛋白，ApoB浓度水平与动脉粥样硬化程度有关；在使用总胆固醇和甘油三酯来过筛冠心病的危险时，除检测脂蛋白(a)与载脂蛋白A1之外，同时检测ApoB能对各种脂蛋白失调提供更多的信息，也可以替代低密度脂蛋白胆固醇检测。

[0006] 人血清或血浆中载脂蛋白B与其相对应的羊抗人ApoB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B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B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

[0007] 针对现有技术存在的问题，本发明提供了一种载脂蛋白B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好，分析灵敏度高，有利于在临床上推广应用。

[0008] 本发明是通过以下措施实现的：

一种载脂蛋白B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ApoB抗体、20-40g/L 牛血清白蛋白、0.05% Kathon-CG(v/v)。

[0009] 所述二氧化硅包覆的磁性纳米颗粒为Fe_3O_4/SiO_2复合纳米粒子，粒径为20-50nm。

[0010] 所述试剂R1和试剂R2在使用时的体积比例为R1:R2=3:1。

[0011] 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Fe_3O_4/SiO_2复合纳米粒子的粒径为20-50nm。

[0012] 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APOB校准品。

[0013] 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，其具体使用方法如图4所示：

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

[0014] 本发明的有益效果：

本发明提供的载脂蛋白B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APOB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

[0015] 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；

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；

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 具体使用方法；

图5 实施例1-4线性相关验证实验检测结果；

图6 稳定性验证实验检测结果；

图7 分析灵敏度实验结果。

具体实施方式

[0016] 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。

[0017] 实施例1

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

[0018] 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APOB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4μl，之后再加入R1试剂450μl预孵育5min后读取吸光度A1，之后再加入150μl的试剂R2反应5min后，读取吸光度A2，并计算ΔA。

[0019] 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APOB校准品。

[0020] 实施例2

一种载脂蛋白B免疫比浊法检测试剂盒，它包括试剂R1、试剂R2、校准品。

[0021] 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APOB抗体	30ml/L
牛血清白蛋白	20g/L
Kathon-CG	0.05%(v/v)。

[0022] 具体测定方法同实施例1。

[0023] 实施例3

一种载脂蛋白B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APOB抗体	30ml/L
牛血清白蛋白	30g/L
Kathon-CG	0.05%(v/v)。

[0025] 具体测定方法同实施例1。

[0026] 实施例4

一种载脂蛋白B免疫比浊法检测试剂盒，它包括试剂R1、试剂R2、校准品。

[0027] 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APOB抗体	30ml/L
牛血清白蛋白	40g/L
Kathon-CG	0.05%(v/v)。

[0028] 具体测定方法同实施例1。

[0029] 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。

[0030] 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B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。

[0031] 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0.9970、0.9967、0.9963，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B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。

[0032] 线性相关性验证实验：

找到载脂蛋白B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；检测结果如图5所示。

[0033] 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。

[0034] 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；检测数据如图6。

[0035] 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B检测试剂盒的稳定性。

[0036] 分析灵敏度验证实验

用本发明载脂蛋白B试剂盒测试已知浓度在0.92g/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。检测结果如图7所示。

[0037] 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APOB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。

[0038] 综合以上分析，本发明提供的载脂蛋白B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B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。

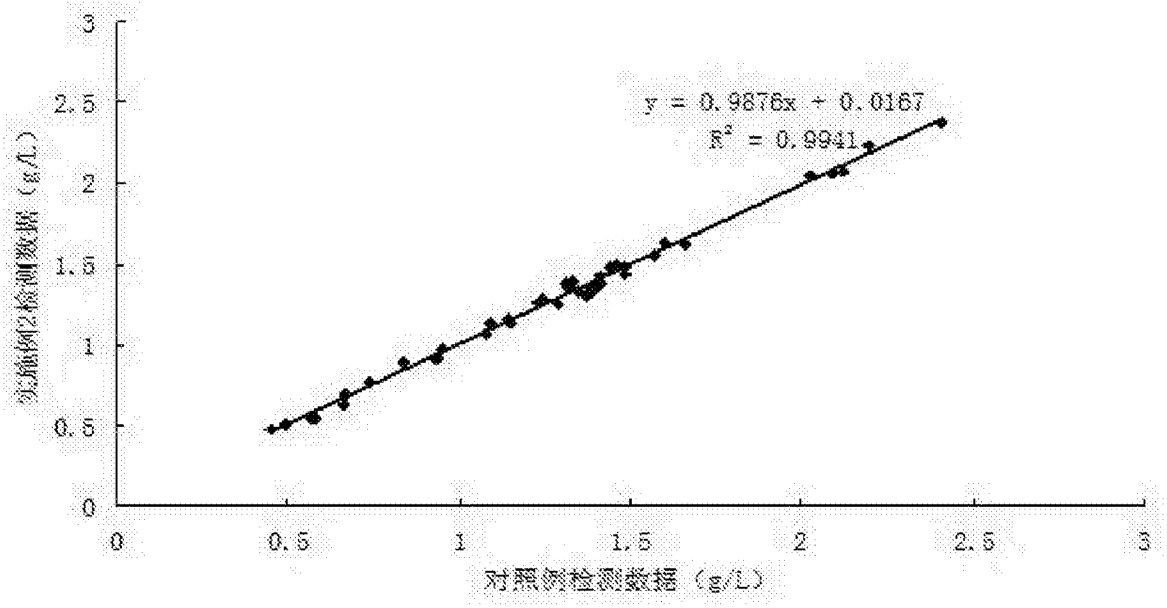

y = 0.9876x + 0.0167
R² = 0.9941
实施例2检测数据（g/L）
对照例检测数据（g/L）
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3

图1

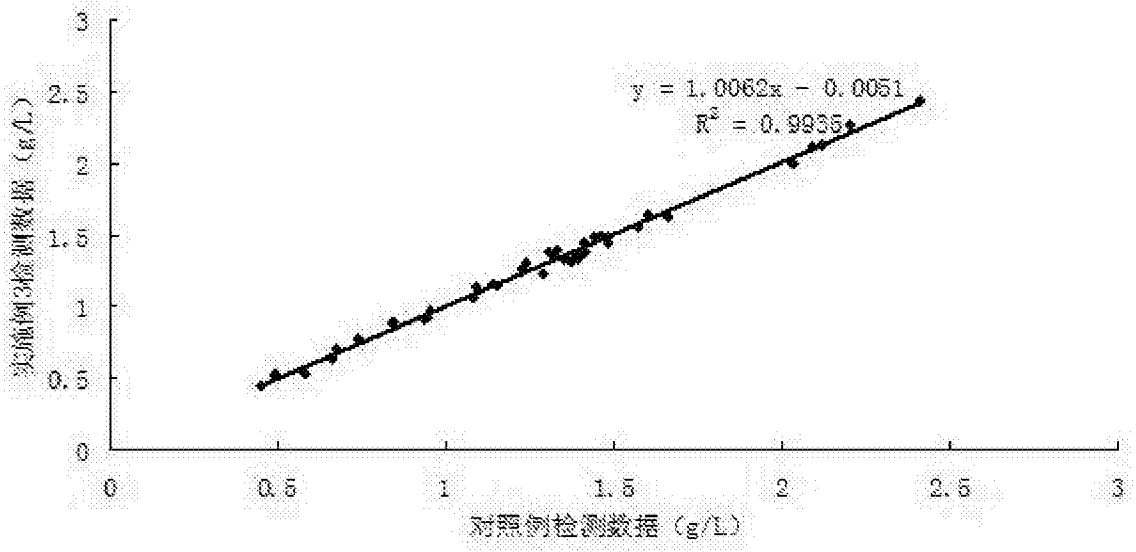

y = 1.0062x - 0.0051
R² = 0.9935
实施例3检测数据（g/L）
对照例检测数据（g/L）
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3

图2

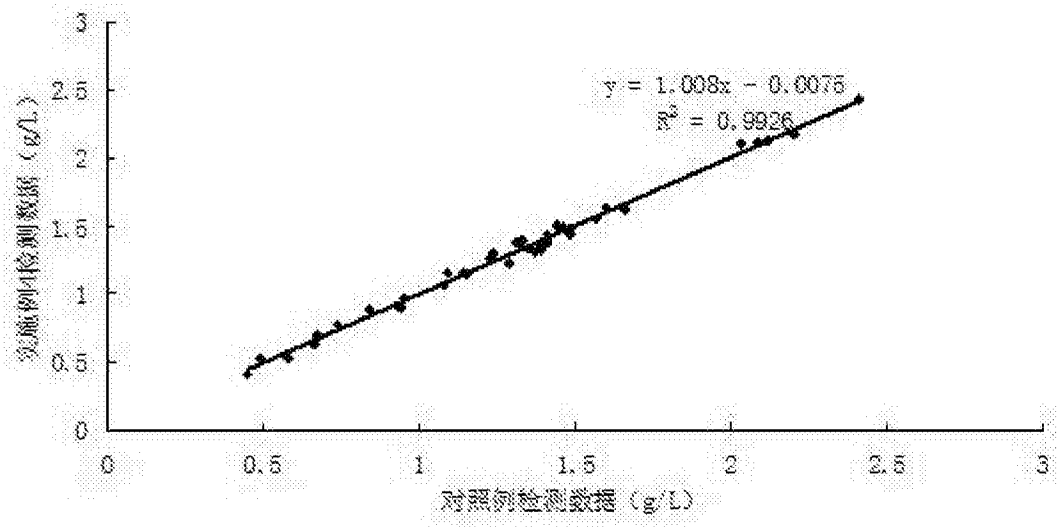

y = 1.008x - 0.0075
R² = 0.9926
实施例检测数据（g/L）
对照例检测数据（g/L）
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3

图3

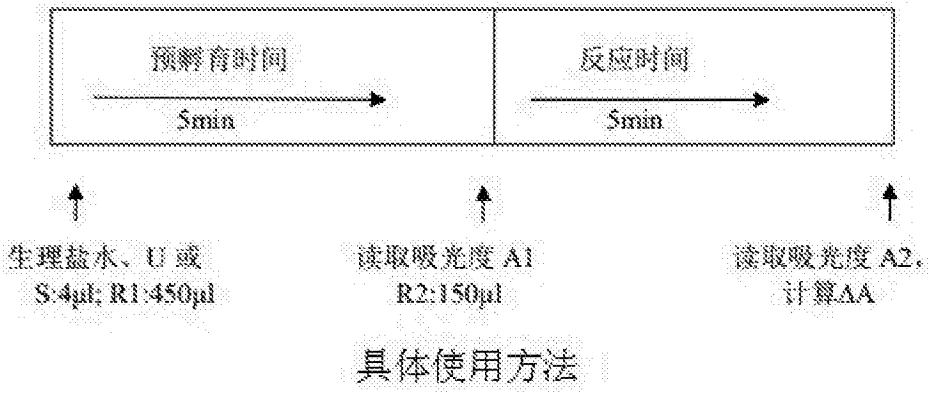

预孵育时间
5min
反应时间
5min
生理盐水、U 或
S:4μl; R1:450μl
读取吸光度 A1
R2:150μl
读取吸光度 A2，
计算ΔA
具体使用方法

图4

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	0.17	0.15	0.14	0.13
0.50	0.50	0.5	0.49	0.49
1.00	1.00	0.99	0.98	0.99
1.50	1.50	1.46	1.51	1.51
2.00	2.03	2.03	2.02	2.05
2.50	2.44	2.53	2.45	2.48
相关系数 r	0.9993	0.9995	0.9995	0.9993

实施例 1-4 线性相关验证实验检测结果

图5

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	1.51342	1.51247	1.51687	1.51698	1.51262
13 个月	1.42568	1.42587	1.42646	1.42632	1.42697
14 个月	1.65656	1.65668	1.65654	1.65674	1.65258
15 个月	1.38326	1.38399	1.38387	1.38355	1.38406
16 个月	0.96965	1.31966	1.31967	1.31008	1.31247
17 个月	0.32626	1.12734	1.12686	1.12691	1.12458
18 个月	0.06689	1.42826	1.42757	1.42811	1.42586
19 个月	0.00132	1.51453	1.51432	1.51463	1.51463
20 个月	0.00081	1.47685	1.47596	1.47623	1.47526
21 个月	0.00005	1.37374	1.37421	1.37417	1.37461
22 个月	0.00000	1.49284	1.49314	1.49321	1.49356
23 个月	0.00000	1.33263	1.33198	1.33167	1.33235
24 个月	0.00000	1.20178	1.20213	1.20121	1.20235
25 个月	0.00000	0.96357	0.96443	0.96500	1.35272
26 个月	0.00000	0.39365	0.38932	0.39397	1.77488

稳定性验证实验检测结果

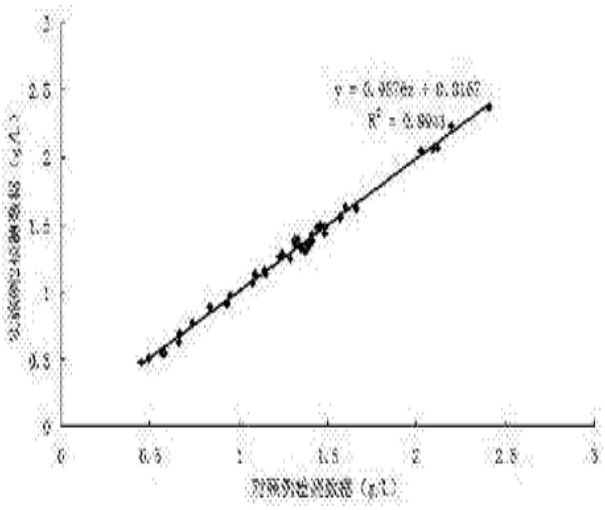
图6

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
0.92	0.9776	1.2541	1.2564	1.2554

分析灵敏度实验结果

图7

专利名称(译)	一种载脂蛋白B免疫比浊法检测试剂盒		
公开(公告)号	CN106290926A	公开(公告)日	2017-01-04
申请号	CN201610661812.X	申请日	2016-08-13
[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	甘宜梧 谭柏清 董雯 李静 王慧娟		
发明人	甘宜梧 谭柏清 董雯 李静 王慧娟		
IPC分类号	G01N33/92 G01N33/552 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/92 G01N33/531 G01N33/552		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种载脂蛋白B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。