



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105606822 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 25

(21) 申请号 201610050627. 7

(22) 申请日 2016. 01. 26

(71) 申请人 宁波天康生物科技有限公司

地址 315177 浙江省宁波市鄞州区古林镇鄞
县大道(古林段) 878 号

(72) 发明人 陆雪龙 宋高峰 李清华 周裕国

(74) 专利代理机构 北京维正专利代理有限公司
11508

代理人 林乐飞

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

β 2- 微球蛋白检测试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种 β 2- 微球蛋白检测试剂盒, 所述的试剂盒包括试剂 R1、试剂 R2, 所述的试剂 R1 为的缓冲液; 所述的试剂 R2 为 β 2- 微球蛋白抗体致敏聚苯乙烯胶乳颗粒与缓冲液的混合物。1. 本发明的试剂盒具有检测简单而快速、灵敏度高、准确性好、抗干扰能力强及生产成本低的优点。2. 本发明采用的 β 2- 微球蛋白检测方法为胶乳增强免疫比浊法, 该方法使得 β 2- 微球蛋白的检测更为经济、方便和快速, 适用于绝大多数医院的自动生化分析仪, 特别是对急诊能够实现快速定量检测。

1. 一种 β 2-微球蛋白检测试剂盒,所述的试剂盒包括试剂R1、试剂R2,所述的试剂R1为的缓冲液;

所述的试剂R2为 β 2-微球蛋白抗体致敏聚苯乙烯胶乳颗粒与缓冲液的混合物,所述试剂R2的制备步骤包括:

步骤(1):在带有羧基的聚苯乙烯胶乳颗粒中加入乙基二甲基胺丙基碳化二亚胺,得到激活的胶乳颗粒;

步骤(2):将步骤(1)激活的胶乳颗粒和 β 2-微球蛋白抗体混合,待反应结束后再加入葡萄糖封闭胶乳微球上未反应的基团,得到偶联抗体的胶乳微球即 β 2-微球蛋白抗体致敏聚苯乙烯胶乳颗粒,置于缓冲液中。

2. 根据权利要求1所述的 β 2-微球蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述 β 2-微球蛋白抗体致敏聚苯乙烯胶乳颗粒在试剂R2中的浓度为0.08~0.28克/100ml。

3. 根据权利要求1所述的 β 2-微球蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述试剂R1中的缓冲液为PBS缓冲液、Tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、硼酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液、柠檬酸-磷酸盐缓冲液、碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液、2-吗啉乙磺酸缓冲液、氯化铵缓冲液中至少一种。

4. 根据权利要求1所述的 β 2-微球蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述试剂R2中的缓冲液为PBS缓冲液、Tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、硼酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液、柠檬酸-磷酸盐缓冲液、碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液、2-吗啉乙磺酸缓冲液、氯化铵缓冲液中至少一种。

5. 根据权利要求1所述的 β 2-微球蛋白检测试剂盒,其特征在于:步骤(1)中乙基二甲基胺丙基碳化二亚胺:聚苯乙烯胶乳颗粒的重量比为0.5~5:100。

6. 根据权利要求1所述的 β 2-微球蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述 α 1-微球蛋白抗体包括多克隆抗体或单克隆抗体。

7. 根据权利要求1所述的 β 2-微球蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述步骤(1)中的聚苯乙烯胶乳颗粒其平均粒径在0.01~0.2mm之间。

β2-微球蛋白检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明是属于医学免疫领域,涉及一种免疫检测试剂,进一步说,本发明涉及β2-微球蛋白检测试剂盒。

背景技术

[0002] β2-微球蛋白主要是用于肾功能评价及用作非特异性肿瘤标志物,尿液浓度增高血清水平正常则是由于肾小管重吸收减少,见于肾小管疾病如Fanconi综合症、Lowe综合症、慢性铬中毒、急性肾小管坏死、胱氨酸尿症、肾移植、急性或慢性肾盂肾炎,而膀胱炎正常;血清水平增高尿液浓度正常则由于肾小球病过滤率降低,见于急性或慢性肾炎;血清水平和尿液水平浓度均升高则见于生成增多并超过肾小管重吸收能力,见于恶性肿瘤如肝细胞癌、肺癌、胃及结肠癌、多发性骨髓瘤、恶性淋巴瘤、慢性淋巴白血病。

[0003] 诊断方法:β2MG的测定一般采用RIA法、ELISA法与CLIA法、乳胶免疫比浊法等,但在临床上多采用乳胶免疫比浊法

血清(含β2mG)+试剂(乳胶抗人β2mG抗体)—————抗原抗体复合物

产生浊度变化,在一定的波长下检测,其浊度的变化与其含量成正相关。

[0004] 目前抗体与乳胶的连接通常使用化学偶联法,其作为R2试剂,非常容易发生聚结,使得试剂质量随着存放时间的延长而下降。使试剂的稳定性差。

发明内容

[0005] 本发明根据R2试剂稳定性不佳,提供了一种方法来克服现有技术的不足,使得其保持质量稳定,提供了一种灵敏度高,稳定性好的β2-微球蛋白检测试剂盒。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供了如下技术方案:

一种β2-微球蛋白检测试剂盒,所述的试剂盒包括试剂R1、试剂R2,所述的试剂R1为的缓冲液;

所述的试剂R2为β2-微球蛋白抗体致敏聚苯乙烯胶乳颗粒与缓冲液的混合物,所述试剂R2的制备步骤包括:

步骤(1):在带有羧基的聚苯乙烯胶乳颗粒中加入乙基二甲基胺丙基碳化二亚胺,得到激活的胶乳颗粒;

步骤(2):将步骤(1)激活的胶乳颗粒和β2-微球蛋白抗体混合,待反应结束后再加入葡萄糖封闭胶乳微球上未反应的基团,得到偶联抗体的胶乳微球即β2-微球蛋白抗体致敏聚苯乙烯胶乳颗粒,置于缓冲液中。

[0007] 作为本发明的进一步优选:所述β2-微球蛋白抗体致敏聚苯乙烯胶乳颗粒在试剂R2中的浓度为0.08~0.28克/100ml。

[0008] 作为本发明的进一步优选:所述试剂R1中的缓冲液为PBS缓冲液、Tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、硼酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液、柠檬酸-磷酸盐缓冲液、碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液、2-吗啉乙磺酸缓冲液、氯化铵缓冲液中至少一种。

[0009] 作为本发明的进一步优选:所述试剂R2中的缓冲液为PBS缓冲液、Tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、硼酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液、柠檬酸-磷酸盐缓冲液、碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液、2-吗啉乙磺酸缓冲液、氯化铵缓冲液中至少一种。

[0010] 作为本发明的进一步优选:步骤(1)中乙基二甲基胺丙基碳化二亚胺:聚苯乙烯胶乳颗粒的重量比为0.5~5:100。

[0011] 作为进一步优选:所述 α 1-微球蛋白抗体包括多克隆抗体或单克隆抗体。

[0012] 作为进一步优选:所述步骤(1)中的聚苯乙烯胶乳颗粒其平均粒径在0.01~0.2 μ m之间。本发明所述试剂盒所采用的检测原理为胶乳增强免疫透射比浊法,其原理是 β 2-微球蛋白抗体的胶乳颗粒,与 β 2-微球蛋白发生免疫反应后,形成聚集颗粒,在一定波长下,通过测定聚集物形成所产生的浊度,即可测出 β 2-微球蛋白的含量。

[0013] 本发明的优点和有益效果:

1.本发明的试剂盒具有检测简单而快速、灵敏度高、准确性好、抗干扰能力强及生产成本低的优点。

[0014] 2.本发明采用的 β 2-微球蛋白检测方法为胶乳增强免疫比浊法,该方法使得 β 2-微球蛋白的检测更为经济、方便和快速,适用于绝大多数医院的自动生化分析仪,特别是对急诊能实现快速定量检测。

具体实施方式

[0015] 下面通过实施例进一步详细描述本发明,但本发明不仅仅局限于以下实施例。

[0016] 实施例1: β 2-微球蛋白检测试剂盒的制备

本发明的试剂盒涉及试剂的主要材料如下:

1. β 2-微球蛋白抗体:多克隆抗体(市售)。

[0017]

2.胶乳:采用直径为80~200nm带羧基基团的聚苯乙烯胶乳颗粒(市售)进行实验。

[0018]

本实施例的主要试剂的配制如下:

试剂R1:含2.5%PEG6000(聚乙二醇6000)、95mmol/LNaCl的磷酸盐缓冲液,该试剂为无色透明溶液。

[0019]

试剂R2:用抗人 β 2-微球蛋白抗体致敏粒径为120nm的聚苯乙烯胶乳颗粒。该试剂为乳白色溶液。具体步骤如下:

1.取1ml(100mg/ml)胶乳,用0.02M(mol/L),pH5.0的MES溶液(2-吗啉乙磺酸缓冲液)洗涤3次,超声分散;

2.然后加入0.22ml用0.02M,pH5.0的MES溶液新鲜配制的EDAC(配制的溶液中EDAC的浓度为10mg/ml)混合完全,室温混和15min;

3.然后用0.05M,pH5.0的MES溶液洗涤2次,0.1M,pH7.5的磷酸盐溶液洗涤1次,超声分散备用;

4.取2ml抗体(2mg/ml)溶液,加入0.3ml用0.02M,pH7.5的磷酸盐溶液配制,室温混合15min,

5. 然后加入0.32ml10%BSA(小牛血清白蛋白)溶液,4℃混合4h;

6. 再加入0.4ml10%葡萄糖溶液,4℃混合过夜;

7. 然后用0.015M,pH7.5的甘氨酸溶液洗涤3次,再加入0.015M,pH7.5的甘氨酸溶液(含1%BSA,0.2%NaN₃,15%蔗糖,0.01%EDTA-Na₂,0.01%trtonX-100的甘氨酸缓冲液)至胶乳(结合抗体以后的胶乳重量)终浓度为0.18%(质量体积比即0.18克/100ml)。

[0020]

实施例2:β₂-微球蛋白的测定

检测工具:日立7060型自动分析仪。

[0021] 分析方法:两点终点法;主波长:570nm,副波长:700nm;样品量:2ul(微升);R1:200ul;R2:50ul;反应方向:上升;测定温度:37℃;样品与R1混匀后,于第10秒读取吸光度A₁;于3~5min时加入R2,于5min后读取吸光度A₂。反应吸光度的计算为A₂与A₁的差值。

[0022] 计算方法:多点定标,根据吸光度与参考血清的值作剂量/响应曲线,样品含量可根据其吸光度值在剂量/响应曲线上算出。

[0023]

实施例3:β₂-微球蛋白检测试剂盒性能评价

1. 分析灵敏度评估

采用5%牛血清白蛋白溶液作为空白样本,空白样本应不含被测物。在生化分析仪上连续检测20次,计算20次结果的均值与标准差SD。以空白均值加两倍标准差(+2SD)作为报告方法的检测限。从表1可见,灵敏度为0.053mg/L。

[0024] 表1

测定次数	均值 (mg/L)	SD	X+2SD
20	0.021	0.016	0.053

2. 高值线性评估

将1份低值血清(0.5mg/L)和1份高值血清(25mg/L)按9:1、4:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:9(样本顺序编号为1~6号),制备出6个不同浓度样本,每个样本重复测定2次,从表2可见,本发明检测试剂盒的最高检测范围可达到20.1mg/L,判定依据 $r^2 \geq 0.990$ 。

[0025] 表2

样本号	理论值 (mg/L)	实测值 (mg/L)
1	2.95	2.86
2	5.40	5.43
3	10.13	10.5
4	12.75	12.70
5	16.83	16.23
6	20.1	19.89

3. 精密度评估

使用2个不同β₂-微球蛋白含量的人血清样品,测定本发明检测试剂盒的批内精密度。使用3个批号试剂盒分别测定1个人血清样品20次,计算本发明检测试剂盒的批间相对极差。结果表明,本发明检测试剂盒的批内精密度为3.8%和1.38%(见表3),而批间相对极差为2.43%(见表4)。

[0026] 表3

批间精密度	批号 1	批号 2	批号 3
测定次数	20	20	20
测定平均值 (mg/L)	1.60	1.53	1.68
三批测定平均 值(mg/L)	1.64		
相对极差 (%)	4.87		

表4

	样本 1	样本 2
测定次数	20	20
平均值(mg/L)	1.54	2.88
最小值(mg/L)	1.47	2.82
最大值(mg/L)	1.60	2.91
标准差(SD)	0.06	0.04
变异系数(CV%)	3.8	1.38

4. 准确性(回收实验)评估

选择合适浓度的常规检测样本,分为体积相同的3份。在其中2份样本中加入不同量的待测物标准,制成2个不同加入浓度的回收样本,计算加入的待测物的浓度。在另一份样本中加入同样量的无被测物的溶剂,制成基础样本。对回收样本和基础样本进行3次重复测定分析,取其均值进行计算。(见表5)

表5

	测定浓度 (mg/L)	加入浓度 (mg/L)	回收浓度 (mg/L)	回收率(%)
基础样本	0.5			
分析样本 1	1.65	1.0	0.98	98
分析样本 2	2.78	1.8	1.89	105

5. 干扰试验

在同一份人血清样品中分别加入不同含量的干扰物质后进行测定。加入干扰物质后的测定值除以加入干扰物质前的测定值即为回收率,试验结果表明胆红素、血红蛋白、甘油三酯以及类风湿性因子的不同浓度以下时,对检测结果无显著干扰(以 β 2-微球蛋白的回收率在90%~110%之间为准)。(见表6)。

[0027] 表6

胆红素	添加量 (mg/dl)	0	10	20	30	40	50
	回收率 (%)	99	98	101	97	99	92
血红蛋白	添加量 (mg/dl)	0	150	300	450	600	750
	回收率 (%)	98	101	99	98	103	108
甘油三酯	添加量 (mg/dl)	0	250	500	750	1000	1250
	回收率 (%)	98	99	96	96	92	91
类风湿因子	添加量 (m/ml)	0	100	200	300	400	500
	回收率 (%)	99	98	98	100	105	109

通过上述试验,本发明的优点和有益效果:

1. 本发明的试剂盒具有检测简单而快速、灵敏度高、准确性好、抗干扰能力强及生产成本低的优点。

[0028] 2. 本发明采用的 β 2-微球蛋白检测方法为胶乳增强免疫比浊法,该方法使得 β 2-微球蛋白的检测更为经济、方便和快速,适用于绝大多数医院的自动生化分析仪,特别是对急诊能实现快速定量检测。

[0029] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,本发明的保护范围并不仅限于上述实施例,凡属于本发明思路下的技术方案均属于本发明的保护范围。应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理前提下的若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

专利名称(译)	β2-微球蛋白检测试剂盒		
公开(公告)号	CN105606822A	公开(公告)日	2016-05-25
申请号	CN201610050627.7	申请日	2016-01-26
[标]发明人	陆雪龙 宋高峰 李清华 周裕国		
发明人	陆雪龙 宋高峰 李清华 周裕国		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N33/531 G01N33/577		
代理人(译)	林乐飞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种β2-微球蛋白检测试剂盒，所述的试剂盒包括试剂R1、试剂R2，所述的试剂R1为的缓冲液；所述的试剂R2为β2-微球蛋白抗体致敏聚苯乙烯胶乳颗粒与缓冲液的混合物。1.本发明的试剂盒具有检测简单而快速、灵敏度高、准确性好、抗干扰能力强及生产成本低的优点。2.本发明采用的β2-微球蛋白检测方法为胶乳增强免疫比浊法，该方法使得β2-微球蛋白的检测更为经济、方便和快速，适用于绝大多数医院的自动生化分析仪，特别是对急诊能实现快速定量检测。

胆红素	添加量 (mg/dl)	0	10	20	30	40	50
	回收率 (%)	99	98	101	97	99	92
血红蛋白	添加量 (mg/dl)	0	150	300	450	600	750
	回收率 (%)	98	101	99	98	103	108
甘油三酯	添加量 (mg/dl)	0	250	500	750	1000	1250
	回收率 (%)	98	99	96	96	92	91
类风湿因子	添加量 (im/ml)	0	100	200	300	400	500
	回收率 (%)	99	98	98	100	105	109