



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109541241 A

(43)申请公布日 2019.03.29

(21)申请号 201910070613.5

(22)申请日 2019.01.25

(71)申请人 浙江夸克生物科技有限公司

地址 312500 浙江省绍兴市新昌省级高新技术产业园区(江东路1号)

(72)发明人 陈青松 余法建

(74)专利代理机构 北京精金石知识产权代理有限公司 11470

代理人 宋秀兰

(51) Int. Cl.

G01N 33/92(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/544(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

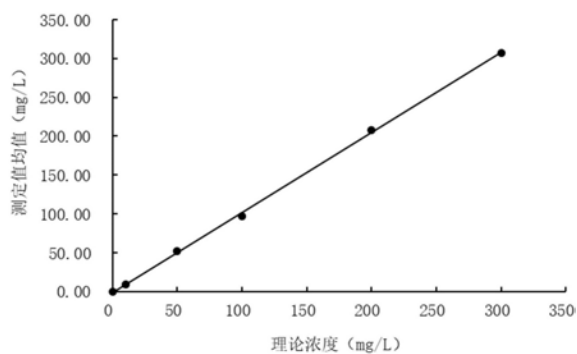
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

一种脂蛋白(a)的测定试剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种脂蛋白(a)的测定试剂盒,涉及医学生物检测技术领域。该试剂盒包括试剂R1、R2、校准品和质控品。试剂R1包括三羟甲基氨基甲烷、氯化钠、聚乙二醇-6000、生物防腐剂和表面活性剂;试剂R2包括三羟甲基氨基甲烷、羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒、二丁基甲苯、甘氨酸、硫酸葡聚糖、生物防腐剂和表面活性剂。该试剂盒采用了胶乳免疫比浊法,使用混合粒径的胶乳试剂,可使用全自动生化分析仪同时对大量样本进行检测,线性好,提高了检测灵敏度、准确度、精密度,缩短了检测时间,操作简单,经济成本较低,且存储时间更长。



1. 一种脂蛋白(a)的测定试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒包括:试剂R1、试剂R2、校准品和质控品;

所述的试剂R1包括:三羟甲基氨基甲烷0.01-0.03mol/L、氯化钠8-10g/L、聚乙二醇-6000 35-45g/L、生物防腐剂0.4-0.6g/L和表面活性剂0.5-2mL/L;

所述的试剂R2包括:三羟甲基氨基甲烷0.01-0.03mol/L、羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒200-240mL/L;

所述的校准品包括:脂蛋白(a)、氯化钠9g/L、聚乙二醇-6000 40g/L、硫酸葡聚糖8g/L、生物防腐剂0.5g/L和表面活性剂1mL/L;

所述的质控品包括:脂蛋白(a) 200mg/L、氯化钠9g/L、聚乙二醇-6000 40g/L、硫酸葡聚糖8g/L、生物防腐剂0.5g/L和表面活性剂1mL/L;

所述的生物防腐剂为NaN₃、苯甲酸钠、Proclin-200、Proclin-300或Proclin500中的一种或几种;

所述的表面活性剂为曲拉通X-100、吐温20或吐温60中的一种或几种。

2. 根据权利要求1所述的测定试剂盒,其特征在于,所述的试剂R1包括:三羟甲基氨基甲烷0.01mol/L、氯化钠9g/L、聚乙二醇-6000 40g/L、生物防腐剂0.5g/L和表面活性剂1mL/L;

所述的试剂R2包括:三羟甲基氨基甲烷0.01mol/L、羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒220mL/L;

所述的生物防腐剂为NaN₃;

所述的表面活性剂为曲拉通X-100。

3. 根据权利要求2所述的测定试剂盒,其特征在于,所述的试剂R2还包括:二丁基甲基甲苯1.0-1.5g/L、甘氨酸2-6g/L、硫酸葡聚糖6-10g/L、生物防腐剂0.4-0.6g/L和表面活性剂0.5-2mL/L。

4. 根据权利要求3所述的测定试剂盒,其特征在于,所述的试剂R2还包括:二丁基甲基甲苯1.3g/L、甘氨酸4g/L、硫酸葡聚糖8g/L、生物防腐剂0.5g/L和表面活性剂1mL/L。

5. 根据权利要求4所述的测定试剂盒,其特征在于,所述的试剂R2中羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒是羊抗人脂蛋白(a)抗体包被的聚甲基丙烯酸甲酯胶乳颗粒,羊抗人脂蛋白(a)抗体与聚甲基丙烯酸甲酯胶乳的体积比为1:1-3;

所述的聚甲基丙烯酸甲酯胶乳是粒径为60-100nm的聚甲基丙烯酸甲酯胶乳和粒径为100-200nm的聚甲基丙烯酸甲酯胶乳混合而成,60-100nm的聚甲基丙烯酸甲酯胶乳与粒径为100-200nm的聚甲基丙烯酸甲酯胶乳的质量比为1:2。

6. 根据权利要求5所述的测定试剂盒,其特征在于,所述的羊抗人脂蛋白(a)抗体与聚甲基丙烯酸甲酯胶乳的体积比为1:2。

7. 根据权利要求6所述的测定试剂盒,其特征在于,所述的校准品包括脂蛋白(a)的含量分别为0mg/L,10mg/L,50mg/L,100mg/L,200mg/L和300mg/L的六个浓度梯度标准品。

8. 一种羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒的制备方法,其特征在于,所述的方法包括以下步骤:

(1) 制备羊抗人脂蛋白(a)抗体溶液:取羊抗人脂蛋白(a)抗体溶于Tris-HCl缓冲液中,pH为7.2,制得浓度为1.0mL/mL的羊抗人脂蛋白(a)抗体溶液;

(2) 制备胶乳微球悬浮液:取聚甲基丙烯酸甲酯胶乳颗粒溶解于Tris-HCl缓冲液中,浓度为1% (w/v),加入聚天冬氨酸和N,N-亚甲基双丙烯酰胺,孵育,离心,弃上清,用Tris-HCl缓冲液洗涤胶乳微球两次,加入Tris-HCl缓冲液,震荡重悬,制得浓度为1% (w/v)的胶乳微球悬浮液;

(3) 制备羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒:将步骤(1)得到的羊抗人脂蛋白(a)抗体溶液和步骤(2)得到的胶乳微球悬浮液混匀,孵育,加入2-羟基乙胺混匀,封闭,离心,弃上清,用Tris-HCl缓冲液洗涤两次,加入Tris-HCl缓冲液,震荡重悬,制得浓度为220mL/L的羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒。

9. 一种脂蛋白(a)的检测方法,其特征在于,所述的检测方法是利用权利要求1-7任意一项所述的测定试剂盒检测人血清中脂蛋白(a)的含量。

10. 根据权利要求9所述的检测方法,其特征在于,所述的检测方法包括以下步骤:

(1) 绘制标准曲线:利用校准品进行多点校准,以校准品的吸光度变化值 $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 为纵坐标,其相应浓度 $C_{\text{标准}}$ 为横坐标绘制标准曲线;

(2) 检测待测样本:将人血清样本和试剂R1混匀,37°C温育5min,加入试剂R2混匀,静置30s,在600nm的波长下检测吸光度 A_1 ,37°C恒温反应5min,结束反应,在600nm的波长下检测吸光度 A_2 ,根据步骤(1)绘制的标准曲线,利用吸光度变化值 $\Delta A = A_2 - A_1$ 计算人血清样本中的脂蛋白(a)的浓度;

(3) 质量控制:用质控品监测操作程序,重复测定,计算相对偏差,相对偏差不超过±15%;

所述的人血清样本、试剂R1和试剂R2的体积比为2:245:33-38;

所述的人血清样本为人的不溶血空腹血清。

一种脂蛋白(a)的测定试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及医学生物检测技术领域,具体涉及一种脂蛋白(a)的测定试剂盒。

背景技术

[0002] 脂蛋白(a) (lipoprotein(a), Lp(a)) 是一种特殊独立的血浆脂蛋白,核心部分为中性脂质和apoB-100分子,其外围包绕着亲水性的apoa,二者以二硫键共价连接;其中apoa是脂蛋白(a)的特征性糖蛋白成分,主要由一种称为Kringle的特征性结构构成,Kringle由80-114个氨基酸残基组成,依靠三个内部二硫键稳定,是1963年挪威遗传学家Berg在研究低密度脂蛋白的遗传学变异时发现的。主要在肝脏合成后分泌入血,在致动脉粥样硬化过程中起着极其重要的作用。脂蛋白(a)与冠心病、钙化性主动脉瓣狭窄、家族性高胆固醇血症、外周血管疾病等密切相关,并已成为公认的冠心病独立预测因子。

[0003] 目前,检测脂蛋白(a)的检测方法有放射免疫法、酶联免疫吸附法、免疫比浊法,但是放射免疫法有放射性污染,酶联免疫吸附法操作复杂、耗时长,对操作者有一定的技能要求,免疫比浊法与纤溶酶原有交叉污染,因此测定的准确度也就比较低,需要进行改进。胶乳颗粒增强比浊法 (particle-enhanced turbidimetric immunoassay, PETIA) 是近年来出现的一种较为稳定、准确的体液蛋白均相免疫比浊检测方法。在 高分子胶乳微球的表面交联单克隆抗体,当交联有抗体的微球与抗原结合后,在短时间内会迅速聚集在一起,改变了反应液的散光性能或透光性能。反应液透光性能(即吸光度)的改变与被测抗原的浓度有较 强的相关性,在一定范围内可以反映被测抗原的浓度。PETIA检测方法的简便快速,灵敏 度高,能更有效地避免许多外界因素的干扰,稳定性和重复性都较好,能较真实地反映被 测物质的含量。

[0004] 目前,中国专利公布CN106501536A公开了一种胶乳定向偶联技术检测脂蛋白(a)的试剂盒,运用抗体定向偶联技术处理脂蛋白(a)单克隆抗体胶乳微球,该试剂盒包括试剂1与试剂2,试剂R1:PBS缓冲液(PH7.0)20-100mmol/L、聚乙二醇8000(PEG 8000)10-30g/L、叠氮钠0.05%;试剂R2:PBS缓冲液(PH7.0)20-100mmol/L、抗人脂蛋白(a)胶乳微球10-15mg/mL、EDTA0.3-0.6g/L、蔗糖25-60mmol/L、叠氮钠0.05%,该试剂盒可保存6个月以上,其检测结果准确度相对偏差 $\geq 3.56\%$,精密度 $CV \geq 2.25\%$,线性相关系数小于 $r^2 \leq 0.9971$ 。中国专利公布CN106093407A公开了一种测定脂蛋白(a)的试剂盒及其制备方法,该试剂盒包括试剂R1和试剂R2,试剂R1包括缓冲液、稳定剂、加速剂、防腐剂、抗人类风湿因子抗体,试剂R2包括缓冲液、表面活性剂、稳定剂、助悬剂、防腐剂、胶乳包被抗人脂蛋白(a)抗体。其检测结果准确度较高,相对偏差 $\geq 0.66\%$,精密度 $CV \geq 2.63\%$ 。

[0005] 目前市面上已知的检测血清脂蛋白(a)的试剂盒较少,且存在较大的缺陷,如灵敏度不足、准确度和精密度较低、线性较差、保存时间较短、操作繁琐、成本昂贵等,均不利于临床推广使用。因此,亟需提供一种检测灵敏度、准确度和精密度高、线性好、保存时间长的脂蛋白(a)测定试剂盒。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种脂蛋白(a)的测定试剂盒及其检验方法。克服了现有技术中存在的问题,提高了测定结果的准确度和精密度等。

[0007] 本发明一方面提供了一种脂蛋白(a)的测定试剂盒,所述的试剂盒包括:试剂R1、试剂R2、校准品和质控品;

[0008] 所述的试剂R1包括:三羟甲基氨基甲烷0.01-0.03mol/L、氯化钠8-10g/L、聚乙二醇-6000 35-45g/L、生物防腐剂0.4-0.6g/L和表面活性剂0.5-2mL/L;

[0009] 所述的试剂R2包括:三羟甲基氨基甲烷0.01-0.03mol/L、羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒200-240mL/L;

[0010] 所述的校准品包括:脂蛋白(a)、氯化钠9g/L、聚乙二醇-600040g/L、硫酸葡聚糖8g/L、生物防腐剂0.5g/L和表面活性剂1mL/L;

[0011] 所述的质控品包括:脂蛋白(a) 200mg/L、氯化钠9g/L、聚乙二醇-6000 40g/L、硫酸葡聚糖8g/L、生物防腐剂0.5g/L和表面活性剂1mL/L;

[0012] 所述的生物防腐剂为NaN₃、苯甲酸钠、Proclin-200、Proclin-300或Proclin500中的一种或几种;优选地,所述的生物防腐剂为NaN₃;

[0013] 所述的表面活性剂为曲拉通X-100、吐温20或吐温60中的一种或几种;优选地,所述的表面活性剂为曲拉通X-100。

[0014] 优选地,所述的试剂R1包括:三羟甲基氨基甲烷0.01mol/L、氯化钠9g/L、聚乙二醇-6000 40g/L、生物防腐剂0.5g/L和表面活性剂1mL/L。

[0015] 优选地,所述的试剂R2包括:三羟甲基氨基甲烷0.01mol/L、羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒220mL/L;进一步优选地,所述的试剂R2还包括:二丁基甲基甲苯1.0-1.5g/L、甘氨酸2-6g/L、硫酸葡聚糖6-10g/L、生物防腐剂0.4-0.6g/L和表面活性剂0.5-2mL/L;更进一步优选地,所述的试剂R2还包括:二丁基甲基甲苯1.3g/L、甘氨酸4g/L、硫酸葡聚糖8g/L、生物防腐剂0.5g/L和表面活性剂1mL/L。

[0016] 优选地,所述的试剂R2中羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒是羊抗人脂蛋白(a)抗体包被的聚甲基丙烯酸甲酯胶乳颗粒,羊抗人脂蛋白(a)抗体与聚甲基丙烯酸甲酯胶乳的体积比为1:1-3;进一步优选地,所述的羊抗人脂蛋白(a)抗体与聚甲基丙烯酸甲酯胶乳的体积比为1:2。

[0017] 优选地,所述的聚甲基丙烯酸甲酯胶乳是粒径为60-100nm的聚甲基丙烯酸甲酯胶乳和粒径为100-200nm的聚甲基丙烯酸甲酯胶乳混合而成,60-100nm的聚甲基丙烯酸甲酯胶乳与粒径为100-200nm的聚甲基丙烯酸甲酯胶乳的质量比为1:2。

[0018] 优选地,所述的校准品包括脂蛋白(a)的含量为0mg/L,10mg/L,50mg/L,100mg/L,200mg/L和300mg/L的6个梯度的标准品。

[0019] 本发明另一方面提供了一种羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒的制备方法,所述的方法包括以下步骤:

[0020] (1) 制备羊抗人脂蛋白(a)抗体溶液:取羊抗人脂蛋白(a)抗体溶于Tris-HCl缓冲液中,pH为7.2,制得浓度为1.0mL/mL的羊抗人脂蛋白(a)抗体溶液;

[0021] (2) 制备胶乳微球悬浮液:取聚甲基丙烯酸甲酯胶乳颗粒溶解于Tris-HCl缓冲液中,浓度为1% (w/v),加入聚天冬氨酸和N,N-亚甲基双丙烯酰胺,孵育,离心,弃上清,用

Tris-HCl缓冲液洗涤胶乳微球两次,加入Tris-HCl缓冲液,震荡重悬,制得浓度为1% (w/v)的胶乳微球悬浮液;

[0022] (3) 制备羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒:将步骤(1)得到的羊抗人脂蛋白(a)抗体溶液和步骤(2)得到的胶乳微球悬浮液混匀,孵育,加入2-羟基乙胺混匀,封闭,离心,弃上清,用Tris-HCl缓冲液洗涤两次,加入Tris-HCl缓冲液,震荡重悬,制得浓度为220mL/L的羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒。

[0023] 本发明另一方面提供了一种脂蛋白(a)的检测方法,所述的检测方法是利用上述的测定试剂盒检测人血清中脂蛋白(a)的含量。

[0024] 具体地,所述的检测方法包括以下步骤:

[0025] (1) 绘制标准曲线:利用校准品进行多点校准,以校准品的吸光度变化值 $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 为纵坐标,其相应浓度C标准为横坐标绘制标准曲线;

[0026] (2) 检测待测样本:将人血清样本和试剂R1混匀,37°C温育5min,加入试剂R2混匀,静置30s,在600nm的波长下检测吸光度 A_1 ,37°C恒温反应5min,结束反应,在600nm的波长下检测吸光度 A_2 ,根据步骤(1)绘制的标准曲线,利用吸光度变化值 $\Delta A = A_2 - A_1$ 计算人血清样本中的脂蛋白(a)的浓度;

[0027] (3) 质量控制:用质控品监测操作程序,重复测定,计算相对偏差,相对偏差不超过±15%;

[0028] 所述的人血清样本、试剂R1和试剂R2的体积比为2:245:33-38;优选地,所述的人血清样本、试剂R1和试剂R2的体积比为2:245:35。

[0029] 所述的人血清样本为人的不溶血空腹血清。

[0030] 另外,胆红素 $\leq 300\mu\text{mol/L}$,血红蛋白 $\leq 4.0\text{g/L}$,甘油三酯 $\leq 10\text{mmol/L}$,对检测结果无明显干扰。

[0031] 与现有技术相比,本发明的积极和有益效果在于:

[0032] 本发明所提供的一种脂蛋白(a)测定试剂盒,采用了胶乳免疫比浊技术,使用混合粒径的胶乳试剂,线性更好。在反应体系中添加了二丁基甲基甲苯、甘氨酸、硫酸葡聚糖,反应液更为稳定性,提高了检测结果的准确度和精密度,试剂盒存储时间更长。一定量的胆红素、血红蛋白、甘油三酯等干扰物对检测结果无明显干扰。以质控品监测操作程序,检测结果更为准确可靠。另外,可使用全自动生化分析仪测定脂蛋白(a),可同时对大量样本进行检测,检测灵敏度高,结果准确,操作简单,经济成本较低。

附图说明

[0033] 图1为实施例12中的线性相关图;

[0034] 图2为实施例13中的线性相关图;

[0035] 图3为实施例14中的线性相关图。

具体实施方式

[0036] 以下实施例的说明只是用于帮助理解本发明的方法及其核心思想。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的前提下,还可以对本发明进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也落入本发明权利要求的保护范围内。对所公开的实施

例的下述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例中,而是可以应用于符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的更宽的范围。虽然在本发明的实施或测试中可以使用与本发明中所述相似或等价的任何方法和材料,本文在此处列举优选的方法和材料。

[0037] 除非另外定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解相同意义。

[0038] 实施例1:羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒的制备

[0039] (1) 制备羊抗人脂蛋白(a)抗体溶液:取羊抗人脂蛋白(a)抗体溶于Tris-HCl缓冲液中,pH为7.2,制得浓度为1.0mL/mL的羊抗人脂蛋白(a)抗体溶液;

[0040] (2) 制备胶乳微球悬浮液:按照质量比为1:2的比例,分别取粒径为60-100nm和100-200nm两种规格的聚甲基丙烯酸甲酯胶乳颗粒溶解于Tris-HCl缓冲液中,浓度为1% (w/v),再依次加入浓度为18mg/mL的聚天冬氨酸和10mg/mL的N,N-亚甲基双丙烯酰胺,在室温孵育45分钟,高速离心(12000rpm,30min),弃上清,用相同体积的Tris-HCl缓冲液洗涤胶乳微球两次,去除多余的交联剂,洗涤后,再将胶乳微球溶于Tris-HCl缓冲液中,25℃震荡15min重悬,制得浓度为1% (w/v)的胶乳微球悬浮液;

[0041] (3) 制备羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒:将步骤(1)得到的羊抗人脂蛋白(a)抗体溶液和步骤(2)得到的胶乳微球悬浮液按照体积比为1:1的比例混合均匀,37℃孵育3小时,再加入4μl/mL的2-羟基乙胺混匀,在37℃封闭30分钟,高速离心(12000rpm,30min),弃上清,用相同体积的Tris-HCl缓冲液洗涤两次,去除未结合的抗体,加入Tris-HCl缓冲液,25℃震荡15min重悬,制得浓度为220mL/L的羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒。

[0042] 实施例2:羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒的制备

[0043] 与实施例1相比,仅步骤(3)中羊抗人脂蛋白(a)抗体溶液和胶乳微球悬浮液的比例不同,本实施例中体积比为1:2。

[0044] 实施例3:羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒的制备

[0045] 与实施例1相比,仅步骤(3)中羊抗人脂蛋白(a)抗体溶液和胶乳微球悬浮液的比例不同,本实施例中体积比为1:3。

[0046] 实施例4:脂蛋白(a)的测定试剂盒

[0047] 脂蛋白(a)的测定试剂盒具体配制成分如下:

[0048] 试剂R1:三羟甲基氨基甲烷0.02mol/L、氯化钠8g/L、聚乙二醇-6000 35g/L、生物防腐剂0.4g/L和表面活性剂0.5mL/L;

[0049] 试剂R2:三羟甲基氨基甲烷0.02mol/L、羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒200mL/L;

[0050] 校准品:脂蛋白(a)含量分别为0mg/L,10mg/L,50mg/L,100mg/L,200mg/L和300mg/L的六个浓度梯度,氯化钠9g/L、聚乙二醇-6000 40g/L、硫酸葡聚糖8g/L、生物防腐剂0.5g/L和表面活性剂1mL/L;

[0051] 质控品:脂蛋白(a)200mg/L、氯化钠9g/L、聚乙二醇-6000 40g/L、硫酸葡聚糖8g/L、生物防腐剂0.5g/L和表面活性剂1mL/L;

[0052] 其中,所述的生物防腐剂为NaN₃、苯甲酸钠、Proclin-200、Proclin-300或

Proclin500中的一种或几种;所述的表面活性剂为曲拉通X-100、吐温20或吐温60中的一种或几种。所用羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒由实施例2制得。

[0053] 实施例5:脂蛋白(a)的测定试剂盒

[0054] 与实施例4相比,仅试剂R1和试剂R2不同。

[0055] 试剂R1:三羟甲基氨基甲烷0.01mol/L、氯化钠9g/L、聚乙二醇-6000 40g/L、生物防腐剂0.5g/L和表面活性剂1mL/L;

[0056] 试剂R2:三羟甲基氨基甲烷0.01mol/L、羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒220mL/L。

[0057] 实施例6:脂蛋白(a)的测定试剂盒

[0058] 与实施例4相比,仅试剂R1和试剂R2不同。

[0059] 试剂R1:三羟甲基氨基甲烷0.03mol/L、氯化钠10g/L、聚乙二醇-6000 45g/L、生物防腐剂0.6g/L和表面活性剂2mL/L;

[0060] 试剂R2:三羟甲基氨基甲烷0.03mol/L、羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒240mL/L。

[0061] 实施例7:脂蛋白(a)的测定试剂盒

[0062] 与实施例5相比,仅试剂R2不同。

[0063] 试剂R2:三羟甲基氨基甲烷0.01mol/L、羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒220mL/L、二丁基甲基甲苯1.0g/L、甘氨酸6g/L、硫酸葡聚糖6g/L、生物防腐剂0.4g/L和表面活性剂0.5mL/L。

[0064] 实施例8:脂蛋白(a)的测定试剂盒

[0065] 与实施例5相比,仅试剂R2不同。

[0066] 试剂R2:三羟甲基氨基甲烷0.01mol/L、羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒220mL/L、二丁基甲基甲苯1.3g/L、甘氨酸4g/L、硫酸葡聚糖8g/L、生物防腐剂0.5g/L和表面活性剂1mL/L。

[0067] 实施例9:脂蛋白(a)的测定试剂盒

[0068] 与实施例5相比,仅试剂R2不同。

[0069] 试剂R2:三羟甲基氨基甲烷0.01mol/L、羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒220mL/L、二丁基甲基甲苯1.5g/L、甘氨酸2g/L、硫酸葡聚糖10g/L、生物防腐剂0.6g/L和表面活性剂2mL/L。

[0070] 实施例10:脂蛋白(a)的测定试剂盒

[0071] 与实施例8相比,区别仅在于,所用的羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒由实施例1制得。

[0072] 实施例11:脂蛋白(a)的测定试剂盒

[0073] 与实施例8相比,区别仅在于,所用的羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒由实施例3制得。

[0074] 对比例1:一种胶乳定向偶联技术检测脂蛋白(a)的试剂盒

[0075] 中国专利公布CN106501536A所述的试剂盒。

[0076] 对比例2:一种测定脂蛋白(a)的试剂盒及其制备方法

[0077] 中国专利公布CN106093407A所述的试剂盒。

[0078] 实施例12:脂蛋白(a)的检测

[0079] 利用全自动生化分析仪按照以下步骤进行检测:

[0080] (1) 绘制标准曲线:利用校准品进行多点校准,以校准品的吸光度变化值 $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 为纵坐标,其相应浓度C标准为横坐标绘制标准曲线;

[0081] (2) 检测待测样本:取人血清样本2 μ l和245 μ l试剂R1,混均,37 $^{\circ}$ C温育5min,加入33 μ l试剂R2混匀,静置30s,在600nm的波长下检测吸光度 A_1 ,37 $^{\circ}$ C恒温反应5min,结束反应,在600nm的波长下检测吸光度 A_2 ,根据步骤(1)绘制的标准曲线,利用吸光度变化值 $\Delta A = A_2 - A_1$ 计算人血清样本中的脂蛋白(a)的浓度,所述的人血清样本为人的不溶血空腹血清;

[0082] (3) 质量控制:用质控品监测操作程序,重复测定,计算相对偏差,相对偏差不超过 $\pm 15\%$ 。

[0083] A. 精密度检测:同一样品中连续抽取20次,按照上述步骤进行测定,计算测定值的平均值、标准差(SD)和变异系数(CV), $CV = (\text{标准差}/\text{平均值}) * 100\%$,结果见表1,CV通常用于衡量一项测定方法的精密度,CV值越小,表示该测定方法的结果精密度越好。对于临床化学检验项目而言,CV小于5%的方法精密度公认是可以接受的。

[0084] 表1:精密度检测结果:

[0085]

试剂盒	平均值 (mg/L)	标准差 (SD)	变异系数 (CV)
实施例4	175.61	5.13	2.92%
实施例5	176.02	3.69	2.10%
实施例6	176.15	4.16	2.36%
实施例7	176.28	2.94	1.67%
实施例8	176.42	2.31	1.31%
实施例9	176.60	3.22	1.82%
实施例10	176.54	4.67	2.65%
实施例11	176.46	3.85	2.18%
对比例1	75.38	1.7	2.25%
对比例2	115.9	3.05	2.63%

[0086] 表1中CV值 $\leq 2.92\%$,表明本发明提供的试剂盒精密度较高,其中实施例8所述的试剂盒精密度最高。

[0087] B. 准确度检测:用脂蛋白(a)抗原含量为200mg/L的质控品进行测定,重复5次,取均值,检测结果见表2。对于临床化学检验项目而言,相对偏差(CB)不超过 $\pm 15\%$,被认为具有优良的准确度。

[0088] 表2:准确度检测结果

试剂盒	测定均值 (mg/L)	标准值 (mg/L)	相对偏差 (CB)	
实施例 4	198.71	200.0	-0.64%	
实施例 5	201.78	200.0	0.89%	
实施例 6	201.21	200.0	0.61%	
实施例 7	201.24	200.0	0.62%	
实施例 8	200.86	200.0	0.43%	
实施例 9	201.17	200.0	0.58%	
实施例 10	198.69	200.0	-0.66%	
实施例 11	202.34	200.0	1.17%	
对比例 1	259.0	250.0	3.56%	
[0089]				
[0090]	对比例 2	194.7	196.0	0.66%

[0091] 表2中相对偏差均不超过±1.17%，表明本发明提供的试剂盒准确度较高，其中实施例8所述的试剂盒准确度最高。

[0092] C. 稳定性检测：在2-8℃储存条件下，分别在0个月、6个月和12个月对脂蛋白(a)抗原含量为100mg/L的同一标准品样本进行测定，每个样本测定10次，取均值，结果见表3。

[0093] 表3：稳定性检测结果

[0094]

试剂盒	0个月	6个月	12个月
实施例4	95.73	95.67	95.48
实施例5	103.87	103.91	104.25
实施例6	96.14	96.21	96.84
实施例7	102.53	102.71	103.54
实施例8	101.86	102.34	103.26
实施例9	97.34	97.12	96.65
实施例10	98.75	98.36	97.66
实施例11	103.21	103.74	104.35

[0095] 由表3可以看出，检测值差异较小，表明本发明提供的试剂盒稳定性较好，在2-8℃下储存至少可以稳定12个月以上，其中实施例8所述的试剂盒稳定性最好。

[0096] D. 线性检测：利用实施例8所述的试剂盒检测六个浓度梯度的标准品，每个梯度浓度检测3次，取平均值，对测定值的平均值和标准品的理论浓度作回归分析，X轴表示理论浓度，Y轴表示测定值均值。一般 $R^2 \geq 0.9900$ 被认为具有良好的线性，结果见图1。

[0097] 得到的线性回归方程为： $y = 1.0166x + 0.8921$ ，相关系数： $R^2 = 0.9981$ 。结果表明，本发明提供的试剂盒具有良好的线性相关关系。

[0098] 实施例13：脂蛋白(a)的检测

[0099] 与实施例12相比，区别仅在于，步骤(2)检测待测样本：加入35μl试剂R2。

[0100] A. 精密度检测：与实施例12中所述的方法相同，结果见表4。

[0101] 表4：精密度检测结果：

[0102]

试剂盒	平均值 (mg/L)	标准差 (SD)	变异系数 (CV)
-----	------------	----------	-----------

实施例4	175.96	4.97	2.82%
实施例5	176.51	3.16	1.79%
实施例6	175.66	5.11	2.91%
实施例7	176.30	2.87	1.63%
实施例8	176.41	1.95	1.11%
实施例9	176.59	3.84	2.17%
实施例10	176.45	4.18	2.37%
实施例11	176.63	3.29	1.86%
对比例1	75.38	1.7	2.25%
对比例2	115.9	3.05	2.63%

[0103] 表4中CV值 $\leq 2.91\%$,表明本发明提供的试剂盒精密度较高,其中实施例8所述的试剂盒精密度最高。

[0104] B. 准确度检测:与实施例12中所述的方法相同,结果见表5。

[0105] 表5:准确度检测结果

[0106]

试剂盒	测定均值 (mg/L)	标准值 (mg/L)	相对偏差 (CB)
实施例4	198.96	200.0	-0.52%
实施例5	202.03	200.0	1.02%
实施例6	201.24	200.0	0.62%
实施例7	201.26	200.0	0.63%
实施例8	199.38	200.0	-0.31%
实施例9	199.12	200.0	-0.44%
实施例10	201.19	200.0	0.59%
实施例11	198.07	200.0	-0.97%
对比例1	259.0	250.0	3.56%
对比例2	194.7	196.0	0.66%

[0107] 表5中相对偏差均不超过 $\pm 1.02\%$,表明本发明提供的试剂盒准确度较高,其中实施例8所述的试剂盒准确度最高。

[0108] C. 稳定性检测:与实施例12中所述的方法相同,结果见表6。

[0109] 表6:稳定性检测结果

[0110]

试剂盒	0个月	6个月	12个月
实施例4	96.13	95.88	95.46
实施例5	103.45	103.72	104.55
实施例6	96.76	96.33	96.01
实施例7	101.98	102.35	102.97
实施例8	99.54	99.36	99.10
实施例9	98.45	98.12	97.95
实施例10	102.81	102.97	103.22

实施例11	103.44	103.56	103.87
-------	--------	--------	--------

[0111] 由表6可以看出,检测值差异较小,表明本发明提供的试剂盒稳定性较好,在2-8℃下储存至少可以稳定12个月以上,其中实施例8所述的试剂盒稳定性最好。

[0112] D. 线性检测:与实施例12中所述的方法相同,结果见图2。

[0113] 得到的线性回归方程为: $y=1.0306x-0.9979$,相关系数: $R^2=0.9994$ 。结果表明,本发明提供的试剂盒具有良好的线性相关关系。

[0114] 实施例14:脂蛋白(a)的检测

[0115] 与实施例12相比,区别仅在于,步骤(2)检测待测样本:加入38 μ l试剂R2。

[0116] A. 精密度检测:与实施例12中所述的方法相同,结果见表7。

[0117] 表7:精密度检测结果:

试剂盒	平均值 (mg/L)	标准差 (SD)	变异系数 (CV)
实施例 4	176.65	5.17	2.93%
实施例 5	176.19	3.63	2.06%
实施例 6	176.66	4.72	2.67%
实施例 7	176.28	2.94	1.67%
实施例 8	176.40	2.39	1.35%
实施例 9	177.21	3.51	1.98%
实施例 10	176.09	4.52	2.57%
实施例 11	176.61	3.84	2.17%
对比例 1	75.38	1.7	2.25%
对比例 2	115.9	3.05	2.63%

[0120] 表7中CV值 $\leq 2.93\%$,表明本发明提供的试剂盒精密度较高,其中实施例8所述的试剂盒精密度最高。

[0121] B. 准确度检测:与实施例12中所述的方法相同,结果见表8。

[0122] 表8:准确度检测结果

[0123]

试剂盒	测定均值 (mg/L)	标准值 (mg/L)	相对偏差 (CB)
实施例4	198.72	200.0	-0.64%
实施例5	198.33	200.0	-0.83%
实施例6	201.23	200.0	0.61%
实施例7	198.75	200.0	-0.63%
实施例8	200.96	200.0	0.48%
实施例9	201.09	200.0	0.55%
实施例10	198.86	200.0	-0.57%
实施例11	198.01	200.0	-1.00%
对比例1	259.0	250.0	3.56%
对比例2	194.7	196.0	0.66%

[0124] 表8中相对偏差均不超过 $\pm 1.00\%$,表明本发明提供的试剂盒准确度较高,其中实施例8所述的试剂盒准确度最高。

[0125] C.稳定性检测:与实施例12中所述的方法相同,结果见表9。

[0126] 表9:稳定性检测结果

[0127]

试剂盒	0个月	6个月	12个月
实施例4	105.09	105.18	105.36
实施例5	97.63	97.54	97.31
实施例6	104.49	104.62	104.74
实施例7	98.68	98.58	98.56
实施例8	101.75	101.82	102.06
实施例9	102.56	102.66	102.79
实施例10	102.87	102.76	102.98
实施例11	103.07	103.22	103.54

[0128] 由表9可以看出,检测值差异较小,表明本发明提供的试剂盒稳定性较好,在2-8℃下储存至少可以稳定12个月以上,其中实施例8所述的试剂盒稳定性最好。

[0129] D.线性检测:与实施例12中所述的方法相同,结果见图3。

[0130] 得到的线性回归方程为: $y=1.0053x+1.3572$,相关系数: $R^2=0.9978$ 。结果表明,本发明提供的试剂盒具有良好的线性相关关系。

[0131] 实施例15:干扰试验

[0132] 选择三种潜在干扰物,胆红素、血红蛋白、甘油三酯,在质控品中分别加入320 μ mol/L、340 μ mol/L、360 μ mol/L的胆红素;3.0g/L、5.0g/L、7.0g/L的血红蛋白;8mmol/L、10mmol/L、12mmol/L的甘油三酯。对照组为不加任何干扰物的质控品,利用实施例8所述的试剂盒和实施例13所述的检测方法进行测定,每个样本测定5次,取均值,结果见表10。

[0133] 表10:干扰物试验结果

组别		浓度均值 (mg/L)	相对偏差 (CB)
对照组		301.16	0.39%
胆红素 (μ mol/L)	320	293.12	-2.29%
	340	276.64	-7.79%
	360	251.39	-16.20%
血红蛋白 (g/L)	3.0	306.58	2.19%
	4.0	331.77	10.59%
	4.5	347.29	15.76%
甘油三酯(mmol/L)	7.5	310.62	3.54%
	8.0	329.86	9.95%
	8.5	355.18	18.39%

[0134] 由表10可以看出,胆红素 $\leq 300\mu$ mol/L,血红蛋白 ≤ 4.0 g/L,甘油三酯 ≤ 10 mmol/L,对检测结果无明显干扰。

[0135] 综上,本发明提供的试剂盒的可检测结果准确度高、精密度高、稳定性好、线性好。其中利用实施例8所述的试剂盒和实施例13所述的检测方法进行检测,检测结果最佳。

[0136] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

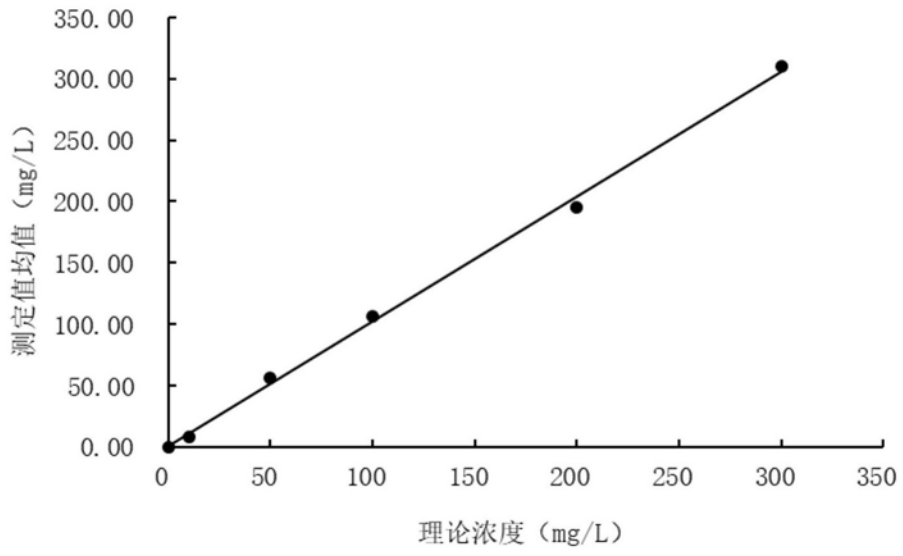


图1

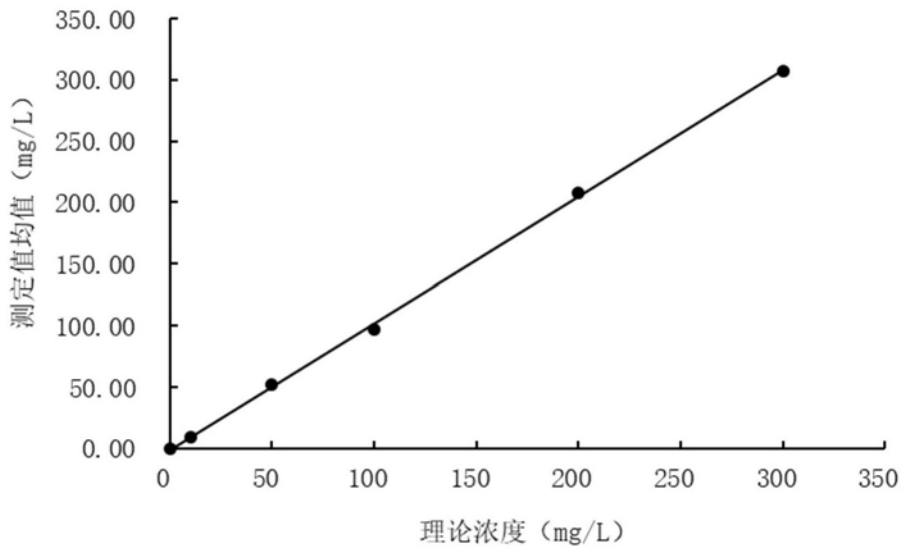


图2

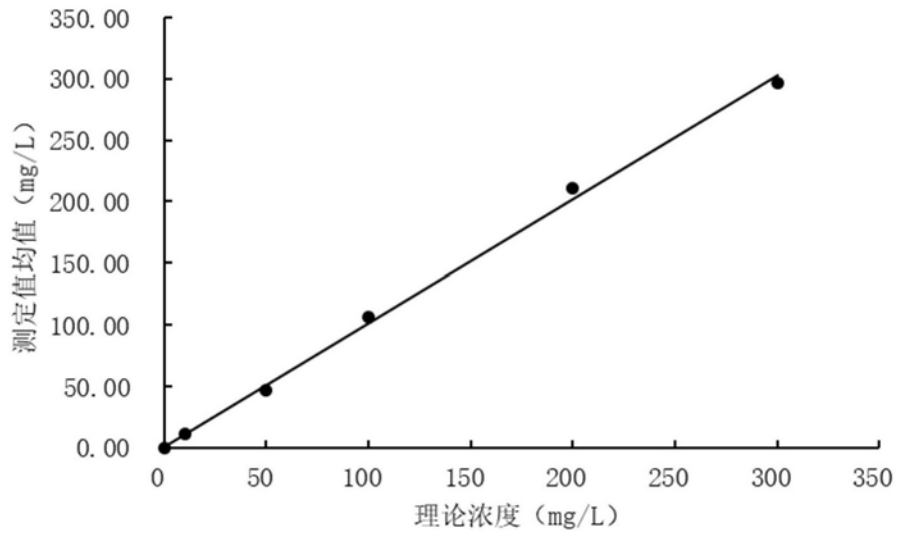


图3

专利名称(译)	一种脂蛋白(a)的测定试剂盒		
公开(公告)号	CN109541241A	公开(公告)日	2019-03-29
申请号	CN201910070613.5	申请日	2019-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	浙江夸克生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	浙江夸克生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	浙江夸克生物科技有限公司		
[标]发明人	陈青松		
发明人	陈青松 余法建		
IPC分类号	G01N33/92 G01N33/543 G01N33/544 G01N33/531		
代理人(译)	宋秀兰		
其他公开文献	CN109541241B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种脂蛋白(a)的测定试剂盒，涉及医学生物检测技术领域。该试剂盒包括试剂R1、R2、校准品和质控品。试剂R1包括三羟甲基氨基甲烷、氯化钠、聚乙二醇-6000、生物防腐剂和表面活性剂；试剂R2包括三羟甲基氨基甲烷、羊抗人脂蛋白(a)抗体胶乳颗粒、二丁基甲苯、甘氨酸、硫酸葡聚糖、生物防腐剂和表面活性剂。该试剂盒采用了胶乳免疫比浊法，使用混合粒径的胶乳试剂，可使用全自动生化分析仪同时对大量样本进行检测，线性好，提高了检测灵敏度、准确度、精密密度，缩短了检测时间，操作简单，经济成本较低，且存储时间更长。

