



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106501536 A

(43)申请公布日 2017.03.15

(21)申请号 201610895010.5

(22)申请日 2016.10.03

(71)申请人 王贤俊

地址 325000 浙江省温州市瓯海娄桥工业
园区森茂路28号

(72)发明人 王贤俊 郑蓓蕾

(51)Int.Cl.

G01N 33/92(2006.01)

G01N 33/544(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书16页 附图2页

(54)发明名称

一种胶乳定向偶联技术检测脂蛋白(a)的试剂盒

(57)摘要

本发明提供一种胶乳定向偶联技术检测脂蛋白(a)的试剂盒,所述试剂盒原理基于胶乳增强免疫比浊法,其特点在于利用抗体定向偶联技术,通过N-羟基琥珀酰亚胺/马来酰亚胺异双功能交联剂分别活化两种粒径的氨基聚苯乙烯胶乳微球,还原法还原抗人脂蛋白(a)单克隆抗体,使活化后的两种粒径的胶乳微球分别与还原后的抗脂蛋白(a)单克隆抗体定向偶联,形成抗人脂蛋白(a)胶乳颗粒,使抗体以Fc区连接微球,Fab区向外伸展,实现与样本抗原高效结合,在37℃恒温,波长为600nm下,测定吸光度,计算出样品脂蛋白(a)含量。与传统方法相比,本试剂盒抗体利用率高,灵敏度高,线性好,能有效控制批间差,值得进一步推广使用。

1. 一种胶乳定向偶联技术检测脂蛋白(a)的试剂盒,以胶乳增强免疫比浊法为基础,运用抗体定向偶联技术,通过N-羟基琥珀酰亚胺/马来酰亚胺异双功能交联剂分别活化两种粒径的氨基聚苯乙烯胶乳微球,还原法还原抗人脂蛋白(a)单克隆抗体,使活化后的两种粒径的胶乳微球分别与还原后的抗人脂蛋白(a)单克隆抗体定向偶联,形成抗人脂蛋白(a)胶乳颗粒。

2. 根据权利要求1所述的抗体定向偶联技术,其特征在于以N-羟基琥珀酰亚胺/马来酰亚胺异双功能交联剂作为两种粒径的氨基聚苯乙烯胶乳微球的活化剂,形成活化态胶乳微球;还原法还原抗人脂蛋白(a)单克隆抗体,使抗体二硫键打开形成游离巯基,与活化态胶乳微球进行偶联,形成稳定的硫醚键,从而实现定向偶联。

3. 根据权利要求1所述的N-羟基琥珀酰亚胺/马来酰亚胺异双功能交联剂,其特征在于包括但不限于4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺酸基琥珀酰亚胺酯钠盐(Sulfo-SMCC),4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺酸基琥珀酰亚胺酯(SMCC),硫代琥珀酰亚胺基4-(p-马来酰亚胺苯基)丁酯(Sulfo-SMPB),琥珀酰亚胺基4-(p-马来酰亚胺苯基)丁酸盐(SMPB),琥珀酰亚胺基-6-[(β-马来酰亚胺丙酰胺基)]己酯(SMPH),m-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基硫代琥珀酰亚胺酯(Sulfo-MBS),N-[κ-马来酰亚胺十一酰氧]-硫代琥珀酰亚胺酯(Sulfo-KMUS),N-[γ-马来酰亚胺丁酰氧]琥珀酰亚胺酯(Sulfo-GMBS),N-[ε-马来酰亚胺乙酰基氧]硫代琥珀酰亚胺酯(Sulfo-EMCS)中的一种或几种,更优选4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺酸基琥珀酰亚胺酯钠盐(Sulfo-SMCC)。

4. 根据权利要求1所述的两种粒径的氨基聚苯乙烯胶乳微球,其特征在于粒径分别选择100-200nm,200-300nm两种规格,更优选粒径分别为110nm和200nm。颗粒比例为20:80-80:20,更优选60:40。

5. 抗人脂蛋白(a)胶乳微球具体制备如下:

1) 氨基聚苯乙烯胶乳微球的活化

分别取浓度均为2.5% (w/v) 的两种粒径的氨基聚苯乙烯胶乳微球与N-羟基琥珀酰亚胺/马来酰亚胺异双功能交联剂,按投料比为1:5(重量比)混合于PBS缓冲液(20mmol/L, PH7.0)中,25℃活化30-60min,高速离心(10000rpm,30min),去除上清液,用PBS缓冲液(20mmol/L, PH7.0)洗涤两次去除多余交联剂,洗涤后用PBS缓冲液(20mmol/L, PH7.0)配成1% (w/v) 混合液,25℃震荡10-20min重悬,获得活化胶乳微球。

2) 抗人脂蛋白(a)单克隆抗体还原

取抗人脂蛋白(a)单克隆抗体与还原剂(1-10mM),按投料比为1:800(重量比)混合于PBS缓冲液(20mmol/L, PH7.0)中,25℃还原30min,通过superdex 200层析分离去除多余还原剂,加入碘乙酰胺0.5mg,37℃封闭巯基30-45min。

3) 活化胶乳微球与还原后的抗体于PBS缓冲液(20mmol/L, PH7.0)中,25℃定向偶联60min,巯基乙醇(10mmol/L)淬灭30min后,高速离心(10000rpm,30min),去除上清液,用PBS缓冲液(20mmol/L, PH7.0)洗涤三次,用PBS缓冲液(20mmol/L, PH7.0)配成1% (w/v) 混合液,25℃震荡30min重悬,获得抗人脂蛋白(a)胶乳颗粒。

6. 根据权利要求5中步骤2)所述的抗人脂蛋白(a)单克隆抗体,其特征在于为鼠抗人脂蛋白(a)单克隆抗体或羊抗人脂蛋白(a)单克隆抗体中的任意一种。

7. 根据权利要求5中步骤2)所述的还原剂,其特征在于包括但不限于二硫苏糖醇

(DTT), β -巯基乙醇 (ME), 三(2-羧乙基)膦 (TCEP) 中的一种或几种, 更优选三(2-羧乙基)膦 (TCEP)。

8. 本发明试剂盒包括试剂1与试剂2, 试剂1与试剂2为4:1。试剂1包括缓冲液、稳定剂和防腐剂, 试剂2包括抗人脂蛋白(a)胶乳微球、缓冲液、保护剂、稳定剂和防腐剂。

9. 根据权利要求8所述的试剂1与试剂2中的缓冲液, 其特征在于包括但不限于Tris-HCL缓冲液, PBS缓冲液, 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液中的一种或几种, 更优选PBS缓冲液。PH范围为6.5-8.5, 更优选PH6.5-7.5。

10. 根据权利要求8所述的试剂1中的稳定剂, 其特征在于包括但不限于聚乙二醇8000, 蔗糖, 甘油, 葡萄糖, 明胶, 氯化钠, 氯化钾, 碳酸钠, 硫酸钠, 硫酸钾中的一种或几种, 更优选聚乙二醇8000。

11. 根据权利要求8所述的试剂2中的保护剂为EDTA。

12. 根据权利要求8所述的试剂2中的稳定剂, 其特征在于包括但不限于聚乙二醇8000, 蔗糖, 甘油, 葡萄糖, 明胶, 氯化钠, 氯化钾, 碳酸钠, 硫酸钠, 硫酸钾中的一种或几种, 更优选蔗糖。

13. 根据权利要求8所述的试剂1与试剂2中的防腐剂, 其特征在于包括但不限于叠氮钠, proclin 300, 硫柳汞中的一种或几种。

14. 本发明脂蛋白(a)检测试剂盒, 浓度为

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
	EDTA	0.3~0.6g/L
	蔗糖	25~60mmol/L
	叠氮钠	0.05%

一种胶乳定向偶联技术检测脂蛋白(a)的试剂盒

技术领域：

[0001] 本发明涉及医学检测及体外诊断领域，具体涉及一种胶乳定向偶联技术检测脂蛋白(a)的试剂盒。

背景技术：

[0002] 脂蛋白(a)是一种特殊独立的血浆脂蛋白，类似低密度脂蛋白(LDL)的脂质，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，其含量的变化在血栓性疾病，肾脏疾病，糖尿病等疾病中具有非常重要的临床意义。

[0003] 目前市场上脂蛋白(a)检测技术常用的方法有如下几种：单向免疫扩散(SRID)、放射免疫测定法(RIA)、荧光免疫测定法(FIA)、时间分辨荧光免疫测定法(TRFIA)、酶联免疫测定法(ELISA)、胶乳颗粒法、颗粒增强透射、免疫比浊法(PETIA)、颗粒增强散射免疫比浊法(PENIA)、胶乳增强免疫透射比浊法等，以胶乳增强免疫比浊法居多。胶乳增强免疫比浊法属于普通免疫比浊技术的衍生技术，克服了普通免疫比浊技术信号量非常有限的缺点，使抗体体积有了数量级上的增长，大幅提升了可检测性，成为一种简便快速，灵敏度高的检测方法，但该方法也存在巨大的技术难点，即抗体连接到胶乳微球上的方向无法控制，使得其活性及稳定性(包括不随时间的改变而发生变化及批间一致性)不能保证。因此，找到一种抗体与胶乳微球间定向偶联的方法，将两者连接的方向可控，是本领域亟需解决的技术问题。

发明内容：

[0004] 鉴于以上技术问题，本发明的目的在于提出一种胶乳定向偶联技术检测脂蛋白(a)的试剂盒，以胶乳增强免疫比浊法为基础，运用抗体定向偶联技术，通过N-羟基琥珀酰亚胺/马来酰亚胺异双功能交联剂分别活化两种粒径的氨基聚苯乙烯胶乳微球，还原法还原抗人脂蛋白(a)单克隆抗体，使活化后的两种粒径的胶乳微球分别与还原后的抗人脂蛋白(a)单克隆抗体定向偶联，形成抗人脂蛋白(a)胶乳颗粒，使抗体以Fc区连接微球，Fab区向外伸展，实现与样本抗原高效结合。

[0005] 本发明的技术方案为：以N-羟基琥珀酰亚胺/马来酰亚胺异双功能交联剂作为两种粒径的氨基聚苯乙烯胶乳微球的活化剂，形成活化态胶乳微球；还原法还原抗人脂蛋白(a)单克隆抗体，使抗体二硫键打开形成游离巯基，与活化态胶乳微球进行偶联，形成稳定的硫醚键，从而实现定向偶联。以此方法为基础制备检测试剂盒，试剂1包括缓冲液、稳定剂和防腐剂，试剂2包括抗人脂蛋白(a)胶乳微球、缓冲液、保护剂、稳定剂和防腐剂。

[0006] 本发明试剂盒所述试剂1与试剂2中的缓冲液包括但不限于Tris-HCL缓冲液，PBS缓冲液，磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液，磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液中的一种或几种，更优选PBS缓冲液。PH范围为6.5-8.5，更优选PH6.5-7.5。

[0007] 本发明试剂盒所述试剂1中的稳定剂包括但不限于聚乙二醇8000，蔗糖，甘油，葡

葡萄糖,明胶,氯化钠,氯化钾,碳酸钠,硫酸钠,硫酸钾中的一种或几种,更优选聚乙二醇8000。

[0008] 本发明试剂盒所述试剂1与试剂2中的防腐剂包括但不限于叠氮钠,proclin 300,硫柳汞中的一种或几种。

[0009] 本发明试剂盒所述试剂2中的保护剂为EDTA。

[0010] 本发明试剂盒所述试剂2中的稳定剂包括但不限于聚乙二醇8000,蔗糖,甘油,葡萄糖,明胶,氯化钠,氯化钾,碳酸钠,硫酸钠,硫酸钾中的一种或几种,更优选蔗糖。

[0011] 进一步地,以上述优选材料配制试剂盒(液体双试剂,R1:R2为4:1),浓度分别为

	试剂 R1:	PBS 缓冲液 (PH7.0)	20~100mmol/L
		聚乙二醇 8000 (PEG 8000)	10~30g/L
[0012]		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
		EDTA	0.3~0.6g/L
[0013]		蔗糖	25~60mmol/L
		叠氮钠	0.05%

[0014] 本发明试剂盒所述试剂2中的抗人脂蛋白(a)胶乳微球具体制备如下:

[0015] 1) 氨基聚苯乙烯胶乳微球的活化

[0016] 分别取浓度均为2.5% (w/v) 的两种粒径的氨基聚苯乙烯胶乳微球与N-羟基琥珀酰亚胺/马来酰亚胺异双功能交联剂,按投料比为1:5(重量比)混合于PBS缓冲液(20mmol/L,PH7.0)中,25℃活化30-60min,高速离心(10000rpm,30min),去除上清液,用PBS缓冲液(20mmol/L,PH7.0)洗涤两次去除多余交联剂,洗涤后用PBS缓冲液(20mmol/L,PH7.0)配成1% (w/v) 混合液,25℃震荡10-20min重悬,获得活化胶乳微球。

[0017] 所述的氨基聚苯乙烯胶乳微球粒径分别选择100-200nm,200-300nm两种规格,更优选粒径分别为110nm和200nm。颗粒比例为20:80-80:20,更优选60:40。

[0018] 所述的N-羟基琥珀酰亚胺/马来酰亚胺异双功能交联剂包括但不限于4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺酸基琥珀酰亚胺酯钠盐(Sulfo-SMCC),4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺酸基琥珀酰亚胺酯(SMCC),硫代琥珀酰亚胺基4-(p-马来酰亚胺苯基)丁酯(Sulfo-SMPB),琥珀酰亚胺基4-(p-马来酰亚胺苯基)丁酸盐(SMPB),琥珀酰亚胺基-6-[(β-马来酰亚胺丙酰胺基)]己酯(SMPH),m-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基硫代琥珀酰亚胺酯(Sulfo-MBS),N-[κ-马来酰亚胺十一酰氧]-硫代琥珀酰亚胺酯(Sulfo-KMUS),N-[γ-马来酰亚胺丁酰氧]琥珀酰亚胺酯(Sulfo-GMBS),N-[ε-马来酰亚胺乙酰基氧]硫代琥珀酰亚胺酯(Sulfo-EMCS)中的一种或几种,更优选4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺酸基琥珀酰亚胺酯钠盐(Sulfo-SMCC)。

[0019] 2) 抗人脂蛋白(a)单克隆抗体还原

[0020] 取抗人脂蛋白(a)单克隆抗体与还原剂(1-10mM),按投料比为1:800(重量比)混合于PBS缓冲液(20mmol/L,PH7.0)中,25℃还原30min,通过superdex 200层析分离去除多余还原剂,加入碘乙酰胺0.5mg,37℃封闭巯基30-45min。

[0021] 所述为鼠抗人脂蛋白(a)单克隆抗体或羊抗人脂蛋白(a)单克隆抗体中的任意一种。

[0022] 所述的还原剂包括但不限于二硫苏糖醇 (DTT), β -巯基乙醇 (ME), 三(2-羧乙基)膦 (TCEP) 中的一种或几种, 更优选三(2-羧乙基)膦 (TCEP)。

[0023] 3) 活化胶乳微球与还原后的抗体于PBS缓冲液 (20mmol/L, PH7.0) 中, 25℃定向偶联60min, 巯基乙醇 (10mmol/L) 淬灭30min后, 高速离心 (10000rpm, 30min), 去除上清液, 用PBS缓冲液 (20mmol/L, PH7.0) 洗涤三次, 用PBS缓冲液 (20mmol/L, PH7.0) 配成1% (w/v) 混合液, 25℃震荡30min重悬, 获得抗人脂蛋白 (a) 胶乳颗粒。

[0024] 本发明试剂盒的检测方法为胶乳增强免疫比浊法, 测试条件及参数如下:

[0025] 1) 检测仪器: 具有600nm波长、37℃恒温装置的生化分析仪。

[0026] 2) 待测样本: 新鲜不溶血血清, 可2-8℃保存。

[0027] 3) 具体检测程序:

加入物	空白管 (B)	校准管 (S)	样品管 (T)
试剂 1 (μL)	224	224	224
蒸馏水 (μL)	4	-	-
[0028] 校准品 (μL)	-	4	-
样 品 (μL)	-	-	4
试剂 2 (μL)	56	56	56
混匀, 在主波长 600nm 下读取吸光度 A_1 , 反应 5 分钟, 读取吸光度值 A_2 , 计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。			

[0029] 4) 校准程序: 多点定标, 采用非线性校准模式。

[0030] 5) 计算结果: 以测定管 ΔA , 根据校准曲线可求得脂蛋白 (a) 含量。

[0031] 本发明的优势在于: 利用两种不同粒径聚苯乙烯胶乳微球, 在提升灵敏度的同时, 具有较好的线性, 提高了产品性能。利用定向偶联方法使抗体连接方向可控, 提高了抗体利用率, 并实现与样本抗原高效结合。降低抗体偶联的随机性后, 大大降低了对批间差异控制的难度。本方法可以通用于各种不同抗体或蛋白质与胶乳微球偶联, 易于形成规模化的工艺。

附图说明:

[0032] 图1为实施例1中的本发明线性相关曲线图, 采用AU480全自动生化分析仪, 对5个梯度浓度的试剂进行测定, 并对测定值进行相关分析。其中X轴表示的是稀释浓度, Y轴表示的是测定值均值。相关系数: $r^2 = 0.9940$, 线性方程为: $y = 1.0394x - 24.5796$ 。

[0033] 图2为实施例2中的本发明线性相关曲线图, 采用AU480全自动生化分析仪, 对5个梯度浓度的试剂进行测定, 并对测定值进行相关分析。其中X轴表示的是稀释浓度, Y轴表示的是测定值均值。相关系数: $r^2 = 0.9956$, 线性方程为: $y = 1.0170x - 8.9948$ 。

[0034] 图3为实施例3中的本发明与市售试剂盒A线性相关图, 分别采用本发明试剂盒与市售试剂盒A, 采用AU480全自动生化分析仪, 对50份样本 (包含正常和异常样本), 按各自参数进行测定。其中X轴表示的是本发明试剂盒的测定值, Y轴表示的是市售试剂盒A的测定值。相关系数: $r^2 = 0.9971$, 线性方程为: $y = 1.000x + 2.016$ 。

[0035] 图4为实施例4中的本发明与市售试剂盒B线性相关图, 分别采用本发明试剂盒与市售试剂盒B, 采用AU480全自动生化分析仪, 对50份样本 (包含正常和异常样本), 按各自参

数进行测定。其中X轴表示的是本发明试剂盒的测定值，Y轴表示的是市售试剂盒B的测定值。相关系数： $r^2=0.9948$ ，线性方程为： $y=1.001x+1.374$ 。

具体实施方式：

[0036] 以下通过实施例具体阐明本发明，仅作为说明本发明具体内容而不用于限制本发明范围。

[0037] 实施例1. 脂蛋白(a)检测试剂盒的配制(1)

[0038] 抗人脂蛋白(a)胶乳微球的配制与技术方案中的所提到的过程相同。

[0039] 脂蛋白(a)检测试剂盒具体成分配制如下：

	试剂 R1:	PBS 缓冲液 (PH7.0)	20mmol/L
		聚乙二醇 8000 (PEG 8000)	10g/L
		叠氮钠	0.05%
[0040]	试剂 R2:	PBS 缓冲液 (PH7.0)	20mmol/L
		抗人脂蛋白 (a) 胶乳微球	10mg/ml
		EDTA	0.3g/L
		蔗糖	25mmol/L
		叠氮钠	0.05%

[0041] 1) 精密度测定: 同一样品中连续抽取20次进行测定, 计算测定值的均数、标准差和变异系数, $CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$

[0042] 表1精密度检测结果

次数	样品检测结果 (mg/L)
1	72.60
2	73.92
3	70.39
[0043] 4	71.07
5	72.99
6	75.39
7	74.00
8	73.67

9	71.06
10	75.39
11	71.16
12	74.09
13	74.83
14	72.93
15	72.19
16	70.68
17	72.59
18	73.61
19	70.19
20	71.29
均值	72.70
SD=1.65	CV=2.27%

[0044] 变异系数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。表1中CV值小于3%, 表明本发明试剂盒具有优良的精密度。

[0046] 2) 准确度测定: 用同一质控品, 重复测定3次, 取平均值, 与质控品靶值相对偏差应在±15%范围内。

[0047] 表2准确度检测结果

测定值 (mg/L)	267.25
	264.33
	258.24
均值	263.27
靶值: 250	相对偏差 CB:5.31%

[0049] 表2中相对偏差CB=5.31%, 处于±15%范围内, 表明本发明试剂盒具有优良的准确度。

[0050] 3) 线性测定: 使用去离子水将试剂稀释成5个梯度浓度, 每个梯度浓度检测3次, 取平均值, 对测定值与预期值作回归分析, 计算r值和相对偏差 (结果见图1, 单位mg/L)。

[0051] 表3线性相关检测结果

稀释浓度	150.00	250.00	500.00	750.00	1000.00
测定值	145.43	258.82	481.21	726.97	1029.39
	141.58	245.57	475.60	718.65	1064.05
	146.31	236.52	463.73	710.31	1050.75
均值	144	247	474	719	1048
绝对偏差	13.10	11.69	21.62	36.36	33.20
相对偏差	-9.98%	-4.97%	4.37%	4.82%	-3.27%

[0053] 通过表3得到相关系数: $r^2=0.9940$, 线性方程为: $y=1.0394x-24.5796$, 结果表明本发明试剂盒相关性良好, 具有很好的特异性和准确性。

[0054] 4) 稳定性测定: 将本发明试剂盒分别放置在室温和4℃冰箱, 以新鲜配制的900mg/L人脂蛋白(a)标准品替代样品, 每隔1个月测定1次, 记录出现凝集所需时间, 结果见表4。结

果表明,试剂盒在4℃冰箱放置至少6个月以上不会有明显活性丧失,但不宜在室温存放。

[0055] 表4稳定性检测结果

	室温下	出现凝集的时间 (min)	4℃下	出现凝集的时间 (min)
	新配制	1	新配制	1
[0056]	存放 1 个月	2	存放 1 个月	1
	存放 2 个月	2	存放 2 个月	1
	存放 3 个月	不凝集	存放 3 个月	2
	存放 4 个月	不凝集	存放 4 个月	2
[0057]	存放 5 个月	不凝集	存放 5 个月	2
	存放 6 个月	不凝集	存放 6 个月	2

[0058] 5) 特异性测定:选取进行干扰实验测定,分别取4份质控,其中一份做为对照,其他三份分别加入3种潜在干扰物:胆红素、甘油三酯、血红蛋白,用本发明试剂盒进行测定,均无抑制效果,表明该试剂盒有良好特异性,结果如表5所示:

[0059] 表5特异性检测结果

[0060]

模拟干扰物	加入浓度	测定值	对照组测定值	准确 (CB%)
胆红素	1.03mg/dl	246mg/L	250mg/L	-1.6%
三酰甘油	11.3mg/dl	257mg/L	250mg/L	2.8%
血红蛋白	5.0g/L	258mg/L	250mg/L	3.2%

[0061] 实施例2. 脂蛋白 (a) 检测试剂盒的配制 (2)

[0062] 抗人脂蛋白 (a) 胶乳微球的配制与技术方案中的所提到的过程相同。

[0063] 脂蛋白 (a) 检测试剂盒具体成分配制如下:

	试剂 R1:	PBS 缓冲液 (PH7.0)	100mmol/L
		聚乙二醇 8000 (PEG 8000)	30g/L
		叠氮钠	0.05%
[0064]	试剂 R2:	PBS 缓冲液 (PH7.0)	100mmol/L
		抗人脂蛋白 (a) 胶乳微球	15mg/ml
		EDTA	0.6g/L
		蔗糖	60mmol/L
		叠氮钠	0.05%

[0065] 1) 精密度测定:同一样品中连续抽取20次进行测定,计算测定值的均数、标准差和

变异系数, $CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$

[0066] 表6精密度检测结果

次数	样品检测结果 (mg/L)
1	74.89
2	77.67
3	71.38
4	75.14
5	75.87
6	75.33
7	75.86
8	76.53
9	75.02
10	75.33
11	77.06
12	76.02
13	76.12
14	74.94
15	75.82
16	75.92
17	72.71
18	71.80
19	77.79
20	76.35
均值	75.38
SD=1.70	CV=2.25%

[0069] 变异系数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。表6中CV值小于3%,表明本发明试剂盒具有优良的精密度。

[0070] 2) 准确度测定:用同一质控品,重复测定3次,取平均值,与质控品靶值相对偏差应在±15%范围内。

[0071] 表7准确度检测结果

测定值 (mg/L)	277.25
	269.57
	268.06
均值	271.63
靶值: 250	相对偏差 CB:8.65%

[0073] 表7中相对偏差CB=8.65%,处于±15%范围内,表明本发明试剂盒具有优良的准确度。

[0074] 3) 线性测定:使用去离子水将试剂稀释成5个梯度浓度,每个梯度浓度检测3次,取平均值,对测定值与预期值作回归分析,计算r值和相对偏差(结果见图2,单位mg/L)。

[0075] 表8线性相关检测结果

[0076]

稀释浓度	150.00	250.00	500.00	750.00	1000.00
测定值	151.35	256.71	480.58	721.69	1039.35
	144.33	260.08	500.29	721.62	1032.58

	141.77	268.52	482.01	717.36	1031.84
均值	146	262	488	720	1035
绝对偏差	2.26	16.52	11.87	33.52	26.61
相对偏差	-1.58%	-6.74%	2.38%	4.45%	-2.64%

[0077] 通过表8得到相关系数： $r^2=0.9956$ ，线性方程为： $y=1.0170x-8.9948$ ，结果表明本发明试剂盒相关性良好，具有很好的特异性和准确性。

[0078] 4) 稳定性测定：将本发明试剂盒分别放置在室温和4℃冰箱，以新鲜配制的900mg/L人脂蛋白(a)标准品替代样品，每隔1个月测定1次，记录出现凝集所需时间，结果见表9。结果表明，试剂盒在4℃冰箱放置至少6个月以上不会有明显活性丧失，但不宜在室温存放。

[0079] 表9稳定性检测结果

[0080]

室温下	出现凝集的时间 (min)	4℃下	出现凝集的时间 (min)
新配制	1	新配制	1
存放1个月	1	存放1个月	1
存放2个月	2	存放2个月	1
存放3个月	不凝集	存放3个月	1
存放4个月	不凝集	存放4个月	2
存放5个月	不凝集	存放5个月	2
存放6个月	不凝集	存放6个月	3

[0081] 5) 特异性测定：选取进行干扰实验测定，分别取4份质控，其中一份做为对照，其他三份分别加入3种潜在干扰物：胆红素、甘油三酯、血红蛋白，用本发明试剂盒进行测定，均无抑制效果，表明该试剂盒有良好特异性，结果如表10所示：

[0082] 表10特异性检测结果

	模拟干扰物	加入浓度	测定值	对照组测定值	准确(CB%)
[0083]	胆红素	1.03mg/dl	246mg/L	250mg/L	-1.6%
	三酰甘油	11.3mg/dl	253mg/L	250mg/L	1.2%

[0084]	血红蛋白	5.0g/L	244mg/L	250mg/L	-2.4%
--------	------	--------	---------	---------	-------

[0085] 实施例3. 本发明试剂盒与市售试剂盒A的性能指标比较：

[0086] 本发明脂蛋白(a)检测试剂盒的配制：

[0087] 抗人脂蛋白(a)胶乳微球的配制与技术方案中的所提到的过程相同。

[0088] 脂蛋白(a)检测试剂盒具体成分配制如下：

	试剂 R1:	PBS 缓冲液 (PH7.0)	60mmol/L
		聚乙二醇 8000 (PEG 8000)	20g/L
		叠氮钠	0.05%
[0089]	试剂 R2:	PBS 缓冲液 (PH7.0)	60mmol/L
		抗人脂蛋白 (a) 胶乳微球	12.5mg/ml
		EDTA	0.45g/L
		蔗糖	42.5mmol/L
		叠氮钠	0.05%

[0090] 对照的市售试剂盒A,其信息如下:

[0091] 产品名称:脂蛋白a (Lpa) 测定试剂盒(上海聚创医药科技有限公司)

[0092] 方法:乳胶增强比浊法

[0093] 剂型:液体双试剂(4:1)

[0094] 试剂成份:

试剂 1:

磷酸盐甘氨酸缓冲液 100mmol/L

表面活性剂 20 mmol/L

[0095] 试剂 2:

磷酸盐甘氨酸缓冲液 100mmol/L

表面活性剂 20 mmol/L

抗人脂蛋白 (a) -IgG 的致敏乳胶颗粒悬液 适量

[0096] 分析方法:6点标准曲线定标法,即试剂R1,试剂R2用量分别为240 μ l和60 μ l,样本用量4 μ l。240 μ l试剂R1加入4 μ l样本,于37 $^{\circ}$ C反应5min后加入60 μ l试剂R2,在测定波长600nm下,立即读取各管吸光度A1读数,37 $^{\circ}$ C反应5min后读取读取各管吸光度A2读数, $\Delta A = A2 - A1$ 。

样品管吸光度 ΔA_u

[0097] $Lpa = \frac{\text{样品管吸光度} \Delta A_u}{\text{校准管吸光度} \Delta A_s} \times \text{标准品浓度 (mg/L)}$

校准管吸光度 ΔA_s

[0098] 检测仪器:AU480

[0099] 市售试剂盒A按说明书操作。

[0100] 1) 精密度测定:同一样品中连续抽取20次进行测定,计算测定值的均数、标准差和

变异系数, $CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$

[0101] 表11精密度检测结果

次数	本发明试剂盒检测结果 (mg/L)	市售试剂盒 A 检测结果 (mg/L)
1	220.21	222.66
2	216.35	236.32
3	226.87	221.89
4	214.22	214.74
5	212.37	230.12
6	225.12	224.69
7	219.85	211.78
8	227.18	230.64
9	211.33	225.78
10	215.69	217.83
11	224.79	221.75
12	210.67	216.81
13	217.39	228.58
14	210.57	223.71
15	239.68	237.62
16	235.85	217.81
17	225.77	222.32
18	217.96	214.99
19	223.14	223.84
20	218.99	239.64
均值	220.70	224.18
	SD=7.97 CV=3.61%	SD=7.77 CV=3.46%

[0104] 变异系数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。表11中CV值小于5%, 表明本发明试剂盒与市售试剂盒A同样具有较好的精密度。

[0105] 2) 准确度测定: 用同一质控品, 重复测定3次, 取平均值, 与质控品靶值相对偏差应在±15%范围内。

[0106] 表12准确度检测结果

	本发明试剂盒	市售试剂盒 A
测定值 (mg/L)	246.41	371.24
	262.52	359.51
	272.79	370.88
均值	260.57	367.21
	靶值: 250 相对偏差 CB: 4.23%	靶值: 350 相对偏差 CB: 4.92%

[0108] 表12中本发明试剂盒相对偏差CB=4.23%, 处于±15%范围内, 表明本发明试剂盒较市售试剂盒A具有更好的准确度。

[0109] 3) 线性测定: 分别采用本发明试剂盒与市售试剂盒A, 采用AU480全自动生化分析仪, 对50份样本(包含正常和异常样本), 按各自参数进行测定, 并对测定值进行相关分析(结果见图3, X轴表示的是本发明试剂盒的测定值, Y轴表示的是市售试剂盒A的测定值)。相关系数: $r^2=0.9971$, 线性方程为: $y=1.000x+2.016$, 结果表明本发明试剂盒与市售试剂盒

A相关性良好。

[0110] 表13线性相关检测结果

[0111]

样本号	本发明试剂盒检测结果 (mg/L)	市售试剂盒 A 检测结果 (mg/L)
1	256.23	248.21
2	157.17	140.15
3	248.46	259.44
4	47.17	50.16
5	241.25	250.25
6	139.22	143.21
7	140.22	148.22
8	125.42	130.45
9	150.21	163.22
10	257.52	270.53
11	53.64	60.62
12	60.18	63.19
13	126.14	130.15
14	220.56	203.58

[0112]

15	70.49	74.5
16	160.11	155.12
17	122.43	145.44
18	716.23	726.28
19	47.16	54.21
20	273.52	259.54
21	429.19	432.21
22	184.31	190.35
23	119.14	120.17
24	40.48	51.51
25	126.62	138.62
26	321.22	338.24
27	154.52	130.54
28	240.41	258.44
29	162.61	174.59
30	258.24	230.21
31	810.73	814.74
32	52.43	58.45
33	88.34	90.32
34	113.74	120.72
35	208.33	210.31
36	270.11	281.14
37	211.19	200.21
38	624.56	626.54
39	117.35	109.36
40	254.28	250.29
41	825.62	833.64
42	524.49	510.51
43	735.17	750.18
44	319.31	303.32
45	322.45	315.16
46	79.81	90.78
47	170.47	182.46
48	70.29	72.32
49	622.17	638.18
50	60.51	69.49

[0113] 实施例4. 本发明检测试剂盒与市售试剂盒B的性能指标比较:

[0114] 本发明脂蛋白(a)检测试剂盒的配制:

[0115] 抗人脂蛋白(a)胶乳微球的配制与技术方案中的所提到的过程相同。

[0116] 脂蛋白(a)检测试剂盒具体成分配制如下:

	试剂 R1:	PBS 缓冲液 (PH7.0)	60mmol/L
		聚乙二醇 8000 (PEG 8000)	20g/L
		叠氮钠	0.05%
[0117]	试剂 R2:	PBS 缓冲液 (PH7.0)	60mmol/L
		抗人脂蛋白 (a) 胶乳微球	12.5mg/ml
		EDTA	0.45g/L
		蔗糖	42.5mmol/L
		叠氮钠	0.05%

[0118] 对照的市售试剂盒B,其信息如下:

[0119] 产品名称:脂蛋白a检测试剂盒(日本协和)

[0120] 方法:乳胶比浊法

[0121] 剂型:液体双试剂(4:1)

[0122] 试剂成份:

[0123] 试剂1:缓冲液

[0124] 试剂2:抗人Lp(a)(山羊)抗体耐受性乳胶

[0125] 分析方法:多点定标,即试剂R1,试剂R2用量分别为280 μ l和70 μ l,样本用量3 μ l。280 μ l试剂R1加入3 μ l样本,于37 $^{\circ}$ C反应5min后加入70 μ l试剂R2,在测定波长600nm下,立即读取各管吸光度A1读数,37 $^{\circ}$ C反应10min后读取读取各管吸光度A2读数, $\Delta A=A2-A1$ 。

[0126] 检测仪器:AU480

[0127] 市售试剂盒B按说明书操作。

[0128] 1) 精密度测定:同一样品中连续抽取20次进行测定,计算测定值的均数、标准差和变异系数, $CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$

[0129] 表14精密度检测结果

次数	本发明试剂盒检测结果 (mg/L)	市售试剂盒 B 检测结果 (mg/L)
1	174.58	189.39
2	169.57	197.52
3	180.32	195.34
4	175.66	190.51
5	180.12	188.55
6	178.36	178.99
7	174.51	185.36
8	179.36	189.63
9	164.22	187.52
10	177.33	179.55
11	184.47	190.37
12	176.35	185.22
13	177.52	183.94
14	172.67	188.96
15	182.39	194.37
16	187.33	193.24
17	168.34	188.24
18	175.21	179.51
19	177.37	180.37
20	172.69	184.21
均值	174.58	189.39
	SD=5.44 CV=3.08%	SD=5.40 CV=2.89%

[0130]

[0131] 变异系数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。表14中CV值小于5%, 表明本发明试剂盒与市售试剂盒B同样具有较好的精密度。

[0132] 2) 准确度测定: 用同一质控品, 重复测定3次, 取平均值, 与质控品靶值相对偏差应在±15%范围内。

[0133] 表15准确度检测结果

	本发明试剂盒	市售试剂盒 B
测定值 (mg/L)	260.27	311.94
	254.32	319.52

[0134]

	262.14	290.74
均值	258.91	307.40
	靶值: 250	靶值: 300
	相对偏差 CB: 3.56%	相对偏差 CB: 2.47%

[0135]

[0136] 表15中本发明试剂盒相对偏差CB=3.56%, 处于±15%范围内, 表明本发明试剂盒与市售试剂盒B同样具有较好的准确度。

[0137] 3) 线性测定: 分别采用本发明试剂盒与市售试剂盒B, 采用AU480全自动生化分析仪, 对50份样本(包含正常和异常样本), 按各自参数进行测定, 并对测定值进行相关分析(结果见图4, X轴表示的是本发明试剂盒的测定值, Y轴表示的是市售试剂盒B的测定值)。相关系数: $r^2=0.9948$, 线性方程为: $y=1.001x+1.374$, 结果表明本发明试剂盒与市售试剂盒

B相关性良好。

[0138] 表16线性相关检测结果

样本号	本发明试剂盒检测结果 (mg/L)	市售试剂盒 B 检测结果 (mg/L)
1	77.05	79.96
2	185.24	178.22
3	99.68	85.36
4	70.49	74.5
5	287.96	283.42
6	440.21	429.39
7	65.22	70.67
8	42.18	50.33
9	189.28	173.22
10	228.21	239.58
11	68.37	60.62
12	78.28	73.19
13	339.58	347.69
14	472.39	489.33
15	668.29	674.5
16	397.53	374.63
17	678.16	669.56
18	560.34	551.96
19	98.56	101.47
20	229.54	239.54
21	871.33	869.32
22	325.69	340.71
23	281.33	290.34
24	693.21	690.22
25	417.55	442.11
26	39.56	38.24
27	80.63	87.54
28	89.32	98.25
29	67.24	74.59
30	110.21	130.21
31	452.54	449.36
32	154.21	158.45
33	244.39	251.21
34	178.57	180.72
35	364.29	374.32
36	228.36	231.14

[0139]

[0140]

37	69.81	70.21
38	339.73	326.54
39	124.56	109.36
40	229.81	250.29
41	667.68	697.21
42	220.31	210.51
43	397.54	450.18
44	330.25	303.32
45	64.14	75.16
46	334.53	290.78
47	78.99	82.46
48	791.33	772.32
49	325.36	338.18
50	88.25	69.49

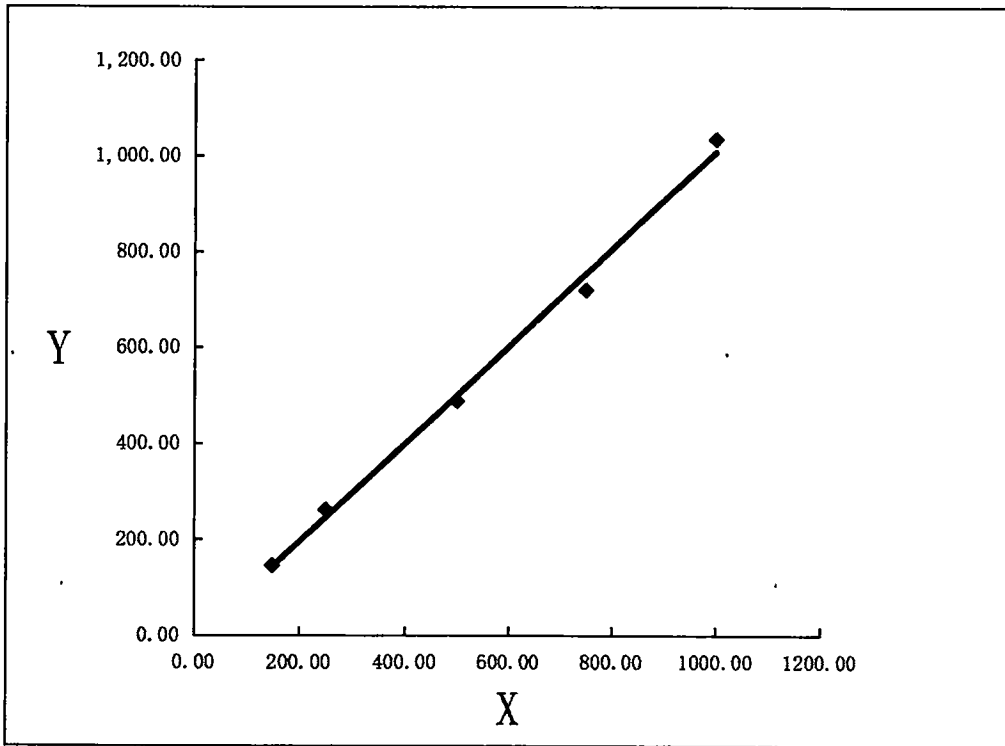


图1

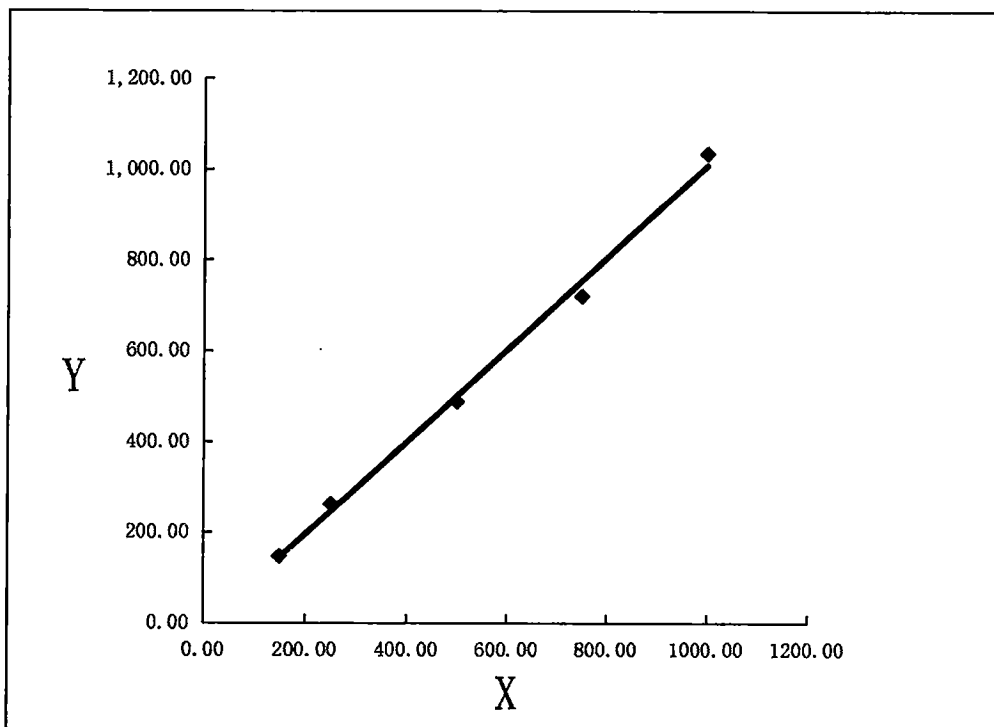


图2

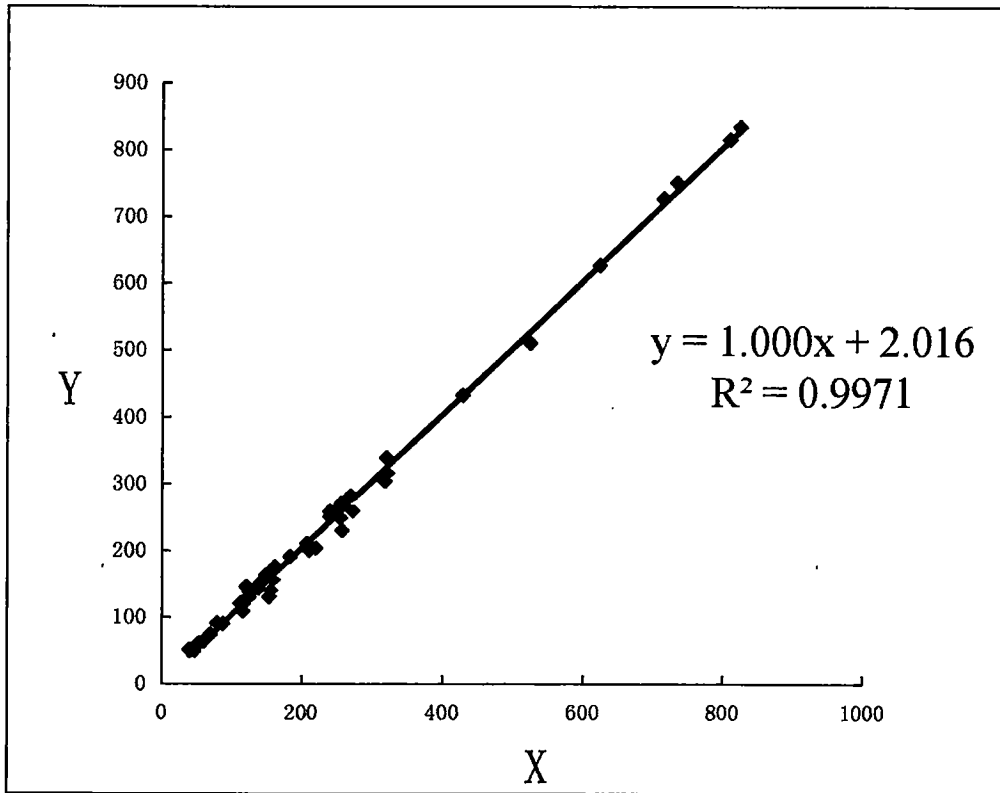


图3

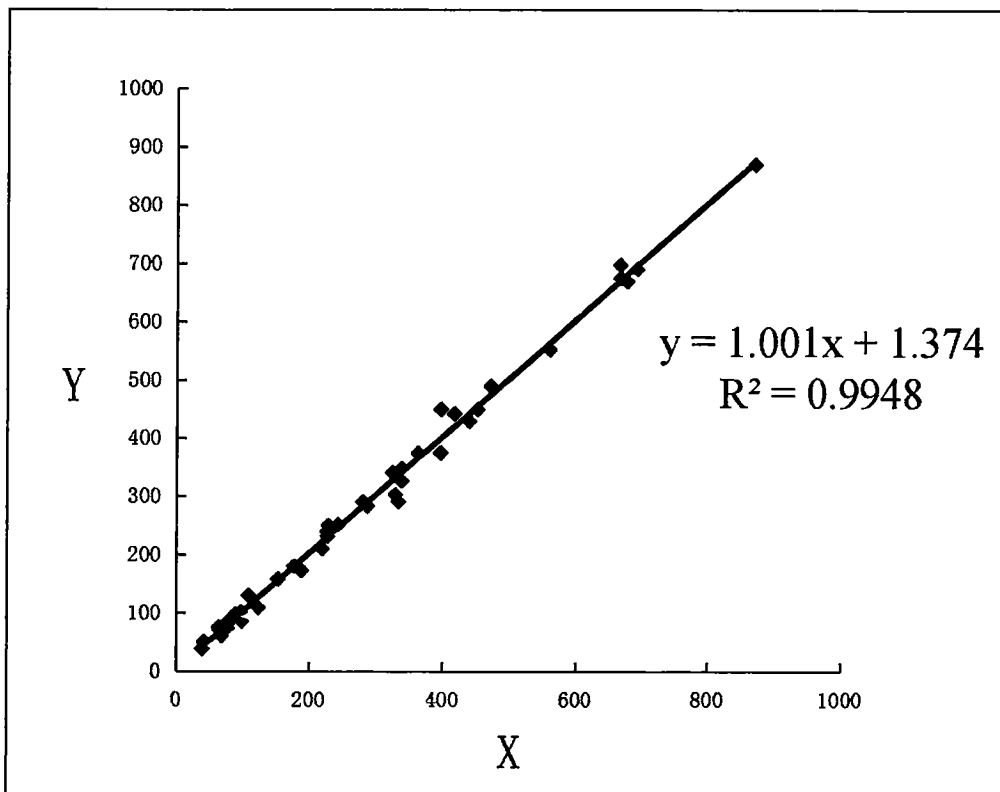


图4

专利名称(译)	一种胶乳定向偶联技术检测脂蛋白(a)的试剂盒		
公开(公告)号	CN106501536A	公开(公告)日	2017-03-15
申请号	CN201610895010.5	申请日	2016-10-03
[标]申请(专利权)人(译)	王贤俊		
申请(专利权)人(译)	王贤俊		
当前申请(专利权)人(译)	王贤俊		
[标]发明人	王贤俊 郑蓓蕾		
发明人	王贤俊 郑蓓蕾		
IPC分类号	G01N33/92 G01N33/544 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/92 G01N33/531 G01N33/54313 G01N33/544		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种胶乳定向偶联技术检测脂蛋白(a)的试剂盒，所述试剂盒原理基于胶乳增强免疫比浊法，其特点在于利用抗体定向偶联技术，通过N-羧基琥珀酰亚胺/马来酰亚胺异双功能交联剂分别活化两种粒径的氨基聚苯乙烯胶乳微球，还原法还原抗人脂蛋白(a)单克隆抗体，使活化后的两种粒径的胶乳微球分别与还原后的抗脂蛋白(a)单克隆抗体定向偶联，形成抗人脂蛋白(a)胶乳颗粒，使抗体以Fc区连接微球，Fab区向外伸展，实现与样本抗原高效结合，在37°C恒温，波长为600nm下，测定吸光度，计算出样品脂蛋白(a)含量。与传统方法相比，本试剂盒抗体利用率高，灵敏度高，线性好，能有效控制批间差，值得进一步推广使用。

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