



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106771266 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201710023242.6

(22)申请日 2017.01.12

(71)申请人 广州市丰华生物工程有限公司

地址 510000 广东省广州市经济技术开发区银谊街6号

(72)发明人 冯健明 徐倩 梁琪芬 陈龙

(74)专利代理机构 广州一锐专利代理有限公司

44369

代理人 李新梅 杨昕昕

(51) Int. Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

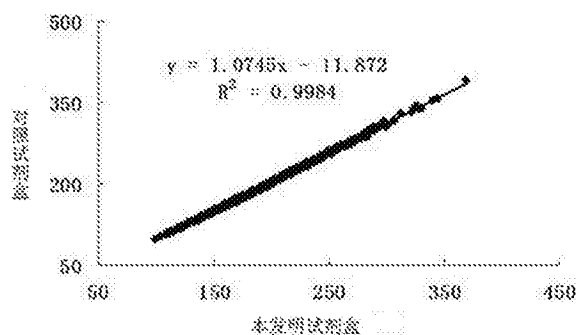
权利要求书3页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

抑制素A定量检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种抑制素A定量检测试剂盒,包括实验缓冲液、增强液、浓缩洗液、标记物、校准品及包被板;实验缓冲液包括体积比为0.1-100%的小牛血清和第一缓冲液;增强液为含0.4-0.6ml/L TritonX-100的水溶液;浓缩洗液包括3-5ml/L Tween-20和第二缓冲液;标记物由抑制素A单克隆抗体与钆系元素离子螯合物按1:1-1:3m/m制得;校准品包括6个浓度的冻干粉,冻干粉由抑制素A抗原和第三缓冲液冷冻干燥而成;包被板为采用包被液、封闭液、反应板制成的包被板,包被液包括0.1-10 μg/mL抑制素A单克隆抗体和第四缓冲液,封闭液为第五缓冲液。本发明还公开一种抑制素A定量检测试剂盒的制备方法。本发明试剂盒可避免化学发光免疫测定法和酶联免疫反应检测时的缺陷,且测定结果准确、可靠。



1. 一种抑制素A定量检测试剂盒,其特征在于,包括实验缓冲液、增强液、浓缩洗液、标记物、校准品及包被板;

所述实验缓冲液包括体积比为0.1-100%的小牛血清和第一缓冲液;

所述增强液为含0.4-0.6ml/L TritonX-100的水溶液;

所述浓缩洗液包括3-5ml/L Tween-20和第二缓冲液;

所述标记物由抑制素A单克隆抗体与镧系元素离子螯合物按1:1-1:3m/m制得;

所述校准品包括6个浓度的冻干粉,所述冻干粉由抑制素A抗原和第三缓冲液冷冻干燥而成;

所述包被板为采用包被液、封闭液、反应板制成的包被板,所述包被液包括0.1-10 μ g/mL抑制素A单克隆抗体和第四缓冲液,所述封闭液为第五缓冲液。

2. 根据权利要求1所述的抑制素A定量检测试剂盒,其特征在于,所述第一缓冲液各组分及浓度为:1-10g/L NaCl,0.1-10‰EDTA,0.1-20‰FPC,0.1-10‰鼠血清,0.1-10‰硫柳汞,0.1-10‰曙红,pH7.0-8.0、5-100mmol/L Tris-HCl,其中,FPC、鼠血清的浓度为体积比,EDTA、硫柳汞、曙红的浓度为质量比;

所述增强液的水溶液包括:0.4-0.6g/L乙酸钠,0.002-0.004g/L β -NTA,0.020-0.030g/L TOPO,0.7-0.9‰冰醋酸,0.5-1.5‰无水乙醇,其中,冰醋酸、无水乙醇的浓度为体积比;

所述第二缓冲液各组分及浓度为:22.4-22.6g/L NaCl,0.4-0.6ml/L FPC,0.07-0.09‰亮蓝母液,pH7.0-8.0、5-100mmol/L Tris-HCl,其中,FPC、亮蓝母液的浓度为体积比;

所述第三缓冲液各组分及浓度为:1-100g/L BSA,0.1-50g/L NaCl,0.1-10g/L NaN₃,0.1-10mL/L硫柳汞,pH7.0-8.0、5-100mmol/L Tris-HCl;

所述第四缓冲液、第五缓冲液为pH7.0-8.0、5-100mmol/L Tris-HCl缓冲液。

3. 根据权利要求2所述的抑制素A定量检测试剂盒,其特征在于,所述小牛血清的浓度为50%,所述TritonX-100的浓度为0.5ml/L,所述Tween-20的浓度为4ml/L,所述抑制素A单克隆抗体与镧系元素离子螯合物的比例为1:1m/m,所述标准品的抑制素A抗原的浓度为0pg/mL、50pg/mL、200pg/mL、600pg/mL、1000pg/mL、2000pg/mL。

4. 根据权利要求3所述的抑制素A定量检测试剂盒,其特征在于,所述第一缓冲液各组分及浓度为:5g/L NaCl,4‰EDTA,10‰FPC,6‰鼠血清,6‰硫柳汞,6‰曙红,pH7.8、50mmol/L Tris-HCl;

所述增强液的水溶液包括:0.5g/L乙酸钠,0.003g/L β -NTA,0.024g/L TOPO,0.8‰冰醋酸,1‰无水乙醇;

所述第二缓冲液各组分及浓度为:22.5g/L NaCl,0.5ml/L FPC,0.08‰亮蓝母液,pH7.8、50mmol/L Tris-HCl;

所述第三缓冲液各组分及浓度为:50g/L BSA,20g/L NaCl,5g/L NaN₃,6mL/L硫柳汞,pH7.8、50mmol/L Tris-HCl;

所述第四缓冲液、第五缓冲液为pH7.8、50mmol/L Tris-HCl缓冲液。

5. 根据权利要求4所述的抑制素A定量检测试剂盒,其特征在于,所述镧系元素为铈元素。

6. 一种抑制素A定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

实验缓冲液的制备方法:在第一缓冲液中加入体积比为0.1-100%的小牛血清;

增强液的制备方法:所述增强液为含0.4-0.6ml/L TritonX-100的水溶液;

浓缩洗液的制备方法:在第二缓冲液中加入3-5ml/L Tween-20;

标记物的制备方法:将抑制素A单克隆抗体和镧系元素离子螯合物按1:1-1:3m/m混合,混合均匀后,28-37℃静置12-48h,将静置后的混合物经Sephacryl S-200层析柱(Φ 1.0×30cm)洗脱,获得标记物;

校准品的制备方法:将抑制素A抗原用第三缓冲液稀释至6个浓度,将该6个浓度的液态校准品进行真空冷冻干燥,获得校准品冻干粉;

包被板的制备方法:包被液包括0.1-10 μ g/ml抑制素A单克隆抗体和第四缓冲液,封闭液为第五缓冲液,在反应板中加入包被液,再用封闭液进行封闭,晾干,获得包被板;

将所述制备的实验缓冲液、增强液、浓缩洗液、标记物、校准品及包被板分装、组装,完成抑制素A定量检测试剂盒的制备。

7. 根据权利要求6所述的抑制素A定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述第一缓冲液各组分及浓度为:1-10g/L NaCl,0.1-10%EDTA,0.1-20%FPC,0.1-10%鼠血清,0.1-10%硫柳汞,0.1-10%曙红,pH7.0-8.0、5-100mmol/L Tris-HCl,其中,FPC、鼠血清的浓度为体积比,EDTA、硫柳汞、曙红的浓度为质量比;

所述增强液的水溶液包括:0.4-0.6g/L乙酸钠,0.002-0.004g/L β -NTA,0.020-0.030g/L TOPO,0.7-0.9%冰醋酸,0.5-1.5%无水乙醇,其中,冰醋酸、无水乙醇的浓度为体积比;

所述第二缓冲液各组分及浓度为:22.4-22.6g/L NaCl,0.4-0.6ml/L FPC,0.07-0.09%亮蓝母液,pH7.0-8.0、5-100mmol/L Tris-HCl,其中,FPC、亮蓝母液的浓度为体积比;

所述第三缓冲液各组分及浓度为:1-100g/L BSA,0.1-50g/L NaCl,0.1-10g/L Na₃N,0.1-10mL/L硫柳汞,pH7.0-8.0、5-100mmol/L Tris-HCl;

所述第四缓冲液、第五缓冲液为pH7.0-8.0、5-100mmol/L Tris-HCl缓冲液。

8. 根据权利要求7所述的抑制素A定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述小牛血清的浓度为50%,所述TritonX-100的浓度为0.5ml/L,所述Tween-20的浓度为4ml/L,所述抑制素A单克隆抗体与镧系元素离子螯合物的比例为1:1m/m,所述标准品的抑制素A抗原的浓度为0pg/mL、50pg/mL、200pg/mL、600pg/mL、1000pg/mL、2000pg/mL。

9. 根据权利要求8所述的抑制素A定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述第一缓冲液各组分及浓度为:5g/L NaCl,4%EDTA,10%FPC,6%鼠血清,6%硫柳汞,6%曙红,pH7.8、50mmol/L Tris-HCl;

所述增强液的水溶液包括:0.5g/L乙酸钠,0.003g/L β -NTA,0.024g/L TOPO,0.8%冰醋酸,1%无水乙醇;

所述第二缓冲液各组分及浓度为:22.5g/L NaCl,0.5ml/L FPC,0.08%亮蓝母液,pH7.8、50mmol/L Tris-HCl;

所述第三缓冲液各组分及浓度为:50g/L BSA,20g/L NaCl,5g/L Na₃N,6mL/L硫柳汞,pH7.8、50mmol/L Tris-HCl;

所述第四缓冲液、第五缓冲液为pH7.8、50mmol/L Tris-HCl缓冲液。

10. 根据权利要求9所述的抑制素A定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述镧系元素为铈元素。

抑制素A定量检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别是涉及一种抑制素A定量检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 抑制素(Inhibin,INH)是转化生长因子 β (TGF- β)超家族成员之一,为 α -亚单位和 β -亚单位通过二硫键连接而成的异质二聚体糖蛋白激素。 β -亚单位又有BA和BB两种形式,与 α -亚单位分别形成抑制素A(INH A, $\alpha\beta$ A)和抑制素B(INH B, $\alpha\beta$ B)。

[0003] 目前,对于人抑制素A,检测试剂盒主要采用化学发光免疫测定法,对于人抑制素B,检测试剂盒主要采用酶联免疫反应。利用化学发光免疫测定法检测时,化学发光的发射强度依赖于各种环境因素,在不同的环境体系中,发射强度和时间的曲线有较大的差别,因此,需严格控制外界的各种因素。利用酶联免疫反应检测时,反应步骤繁琐,反应时间长,且酶反应易受各种干扰因素的干扰,反应的特异性和灵敏度低。

[0004] 对于抑制素A的检测,如何制备一种避免上述缺陷的试剂盒,是目前抑制素A检测亟待解决的问题之一。

发明内容

[0005] 本发明主要解决的技术问题是提供一种抑制素A定量检测试剂盒及其制备方法,可利用时间分辨免疫荧光测定技术进行抑制素A的检测,避免化学发光免疫测定法和酶联免疫反应检测时的缺陷。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明提供一种抑制素A定量检测试剂盒,包括实验缓冲液、增强液、浓缩洗液、标记物、校准品及包被板;实验缓冲液包括体积比为0.1-100%的小牛血清和第一缓冲液;增强液为含0.4-0.6ml/L TritonX-100的水溶液;浓缩洗液包括3-5ml/L Tween-20和第二缓冲液;标记物由抑制素A单克隆抗体与镧系元素离子螯合物按1:1-1:3m/m制得;校准品包括6个浓度的冻干粉,冻干粉由抑制素A抗原和第三缓冲液冷冻干燥而成;包被板为采用包被液、封闭液、反应板制成的包被板,包被液包括0.1-10 μ g/mL抑制素A单克隆抗体和第四缓冲液,封闭液为第五缓冲液。

[0007] 其中,第一缓冲液各组分及浓度为:1-10g/L NaCl,0.1-10%EDTA,0.1-20%FPC,0.1-10%鼠血清,0.1-10%硫柳汞,0.1-10%曙红,pH7.0-8.0、5-100mmol/L Tris-HCl,其中,FPC、鼠血清的浓度为体积比,EDTA、硫柳汞、曙红的浓度为质量比;增强液的水溶液包括:0.4-0.6g/L乙酸钠,0.002-0.004g/L β -NTA,0.020-0.030g/L TOP0,0.7-0.9%冰醋酸,0.5-1.5%无水乙醇,其中,冰醋酸、无水乙醇的浓度为体积比;第二缓冲液各组分及浓度为:22.4-22.6g/L NaCl,0.4-0.6ml/L FPC,0.07-0.09%亮蓝母液,pH7.0-8.0、5-100mmol/L Tris-HCl,其中,FPC、亮蓝母液的浓度为体积比;第三缓冲液各组分及浓度为:1-100g/L BSA,0.1-50g/L NaCl,0.1-10g/L NaN₃,0.1-10ml/L硫柳汞,pH7.0-8.0、5-100mmol/L Tris-HCl;第四缓冲液、第五缓冲液为pH7.0-8.0、5-100mmol/L Tris-HCl缓冲液。

[0008] 其中,小牛血清的浓度为50%,TritonX-100的浓度为0.5ml/L,Tween-20的浓度为4ml/L,抑制素A单克隆抗体与镧系元素离子螯合物的比例为1:1m/m,标准品的抑制素A抗原的浓度为0pg/mL、50pg/mL、200pg/mL、600pg/mL、1000pg/mL、2000pg/mL。

[0009] 其中,第一缓冲液各组分及浓度为:5g/L NaCl,4‰EDTA,10‰FPC,6‰鼠血清,6‰硫柳汞,6‰曙红,pH7.8、50mmol/L Tris-HCl;增强液的水溶液包括:0.5g/L乙酸钠,0.003g/Lβ-NTA,0.024g/L TOPO,0.8‰冰醋酸,1‰无水乙醇;第二缓冲液各组分及浓度为:22.5g/L NaCl,0.5ml/L FPC,0.08‰亮蓝母液,pH7.8、50mmol/L Tris-HCl;第三缓冲液各组分及浓度为:50g/L BSA,20g/L NaCl,5g/L NaN₃,6mL/L硫柳汞,pH7.8、50mmol/L Tris-HCl;第四缓冲液、第五缓冲液为pH7.8、50mmol/L Tris-HCl缓冲液。

[0010] 其中,镧系元素为铕元素。

[0011] 为解决上述技术问题,本发明提供一种抑制素A定量检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:实验缓冲液的制备方法:在第一缓冲液中加入体积比为0.1-100%的小牛血清;增强液的制备方法:增强液为含0.4-0.6ml/L TritonX-100的水溶液;浓缩洗液的制备方法:在第二缓冲液中加入3-5ml/L Tween-20;标记物的制备方法:将抑制素A单克隆抗体和镧系元素离子螯合物按1:1-1:3m/m混合,混合均匀后,28-37℃静置12-48h,将静置后的混合物经Sephacryl S-200层析柱(Φ1.0×30cm)洗脱,获得标记物;校准品的制备方法:将抑制素A抗原用第三缓冲液稀释至6个浓度,将该6个浓度的液态校准品进行真空冷冻干燥,获得校准品冻干粉;包被板的制备方法:包被液包括0.1-10μg/mL抑制素A单克隆抗体和第四缓冲液,封闭液为第五缓冲液,在反应板中加入包被液,再用封闭液进行封闭,晾干,获得包被板;将制备的实验缓冲液、增强液、浓缩洗液、标记物、校准品及包被板分装、组装,完成抑制素A定量检测试剂盒的制备。

[0012] 其中,第一缓冲液各组分及浓度为:1-10g/L NaCl,0.1-10‰EDTA,0.1-20‰FPC,0.1-10‰鼠血清,0.1-10‰硫柳汞,0.1-10‰曙红,pH7.0-8.0、5-100mmol/L Tris-HCl,其中,FPC、鼠血清的浓度为体积比,EDTA、硫柳汞、曙红的浓度为质量比;增强液的水溶液包括:0.4-0.6g/L乙酸钠,0.002-0.004g/Lβ-NTA,0.020-0.030g/L TOPO,0.7-0.9‰冰醋酸,0.5-1.5‰无水乙醇,其中,冰醋酸、无水乙醇的浓度为体积比;第二缓冲液各组分及浓度为:22.4-22.6g/L NaCl,0.4-0.6ml/L FPC,0.07-0.09‰亮蓝母液,pH7.0-8.0、5-100mmol/L Tris-HCl,其中,FPC、亮蓝母液的浓度为体积比;第三缓冲液各组分及浓度为:1-100g/L BSA,0.1-50g/L NaCl,0.1-10g/L NaN₃,0.1-10mL/L硫柳汞,pH7.0-8.0、5-100mmol/L Tris-HCl;第四缓冲液、第五缓冲液为pH7.0-8.0、5-100mmol/L Tris-HCl缓冲液。

[0013] 其中,小牛血清的浓度为50%,TritonX-100的浓度为0.5ml/L,Tween-20的浓度为4ml/L,抑制素A单克隆抗体与镧系元素离子螯合物的比例为1:1m/m,标准品的抑制素A抗原的浓度为0pg/mL、50pg/mL、200pg/mL、600pg/mL、1000pg/mL、2000pg/mL。

[0014] 其中,第一缓冲液各组分及浓度为:5g/L NaCl,4‰EDTA,10‰FPC,6‰鼠血清,6‰硫柳汞,6‰曙红,pH7.8、50mmol/L Tris-HCl;增强液的水溶液包括:0.5g/L乙酸钠,0.003g/Lβ-NTA,0.024g/L TOPO,0.8‰冰醋酸,1‰无水乙醇;第二缓冲液各组分及浓度为:22.5g/L NaCl,0.5ml/L FPC,0.08‰亮蓝母液,pH7.8、50mmol/L Tris-HCl;第三缓冲液各组分及浓度为:50g/L BSA,20g/L NaCl,5g/L NaN₃,6mL/L硫柳汞,pH7.8、50mmol/L Tris-HCl;第四缓冲液、第五缓冲液为pH7.8、50mmol/L Tris-HCl缓冲液。

[0015] 其中,镧系元素为铕元素。

[0016] 本发明的有益效果是:区别于现有技术的情况,本发明的抑制素A定量检测试剂盒包括实验缓冲液、增强液、浓缩洗液、标记物、校准品及包被板,通过上述各部分可对抑制素A进行定量检测,具体为采用时间分辨免疫荧光测定技术进行测定,在测定时,可避免化学发光免疫测定法和酶联免疫反应检测时的缺陷,且测定结果准确、可靠。

附图说明

[0017] 图1是本发明抑制素A定量检测试剂盒剂量-反应标准曲线;

[0018] 图2是本发明抑制素A定量检测试剂盒热稳定性测试中荧光值走势图;

[0019] 图3是本发明抑制素A定量检测试剂盒与对照试剂盒样本检测线性相关性图。

具体实施方式

[0020] 本发明抑制素A定量检测试剂盒包括实验缓冲液、增强液、浓缩洗液、标记物、校准品及包被板,上述各部分的制备方法具体如下。

[0021] 实验缓冲液的制备:在含5g/L NaCl、4‰EDTA、10‰FPC、6‰鼠血清、6‰硫柳汞、6‰曙红的pH7.8、50mmol/L的Tris-HCl溶液中加入体积比为50%的小牛血清,混合均匀。

[0022] 增强液的制备:将0.5g/L乙酸钠、0.003g/L β -NTA、0.024g/L TOPO、0.8‰冰醋酸、1‰无水乙醇、0.5ml/L TritonX-100配制成水溶液,配制成的水溶液即增强液。其中, β -NTA为 β -萘甲酰三氟丙酮,TOPO为三正辛基氧化磷。

[0023] 浓缩洗液的制备:在含22.5g/L NaCl、0.5ml/L FPC、0.08‰亮蓝母液的pH7.8、50mmol/L的Tris-HCl溶液中加入4ml/L Tween-20,混合均匀。

[0024] 标记物的制备:将抑制素A单克隆抗体按照1:1m/m加入Eu-DTTA-Na瓶中,充分混匀,置于35℃静置30h,将静置后的混合物过Sephacryl S-200层析柱(Φ 1.0×30cm),用50mmol/L、pH7.8的Tris-HCl缓冲液洗脱,获得标记物。此制备的标记物为母液,之后按1:30-1:50稀释使用。其中,混合比例1:1为质量比,Eu-DTTA-Na为Eu³⁺-N₂-[P-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠。

[0025] 校准品的制备:以抑制素A抗原标准物质为参比,将抑制素A抗原用缓冲液稀释成0pg/mL、50pg/mL、200pg/mL、600pg/mL、1000pg/mL、2000pg/mL6个浓度的液态校准品,将该液态校准品进行真空冷冻干燥,获得冻干粉校准品。其中,缓冲液为含50g/L BSA、25g/L NaCl、8g/L NaN₃、8mL/L硫柳汞的pH7.8、50mmol/L的Tris-HCl溶液。

[0026] 包被板的制备:将抑制素A单克隆抗体用缓冲液稀释至4 μ g/mL,其中,缓冲液为pH7.8、50mmol/L Tris-HCl缓冲液,用4 μ g/mL的抑制素A单克隆抗体在反应板上进行包被,将反应板洗涤1次,然后再用封闭液进行封闭,最后将反应板甩干、晾干,真空包装,2-8℃保存备用。对于上述缓冲液,还可为50mmol/L、pH9.6的碳酸缓冲液、20mmol/L、pH4.5的磷酸盐缓冲液或50mmol/L、pH4.5的柠檬酸盐缓冲液。

[0027] 对上述制备的实验缓冲液、增强液、浓缩洗液、Eu³⁺标记抑制素A抗体、校准品进行分装,对上述制备的抑制素A抗体包被的包被板进行铝箔袋封装,其中,标记物按500 μ L/瓶或1.1ml/瓶进行分装,校准品以500 μ L/瓶或1.0ml/瓶进行冷冻干燥。将分装、封装好的物品进行组装,即得本发明试剂盒。对于组装前的物品,需抽出3份进行特异性、精密性、灵敏度

及稳定性检测,检测合格后才能组装。

[0028] 对于上述制备的试剂盒,其使用方法具体为:将试剂及所需数量的包被板平衡至室温(20-25℃);将40ml浓缩洗液和960ml蒸馏水在干净的容器中混合,作为工作洗涤液备用;向校准品和标记物中加入相应体积的纯化水,具体地,半自动:校准品和标记物均加入0.5ml纯化水,全自动:校准品加入1.0ml纯化水,标记物加入1.1ml纯化水,加入纯化水后,充分溶解,轻轻混匀;将标记物用实验缓冲液按体积比1:30加入洁净的一次性容器中并混匀;按照25ul/孔加入校准品和样本,按照100μl/孔加入实验缓冲液,加贴封片;包被板在室温下,用振荡器缓慢振荡孵育1.5小时,孵育结束后,用洗板机洗涤4次,拍干;向每孔中加入100μl已配好的铈标记物工作液,混匀,加贴封片;包被板在室温下,用振荡器缓慢振荡孵育1.5小时,孵育结束后,用洗板机洗涤6次,拍干;洗涤完成后,向每孔中加入增强液100μl,于室温下缓慢振荡5分钟后上机检测,在30分钟内完成检测。在实际应用中,可将检测结果按规定数据进行曲线拟合分析,转入唐氏综合症风险评估软件,获得胎儿出生缺陷的发生机率。

[0029] 综上所述,本发明试剂盒采取镧系离子中的铈作为示踪物,利用其独特的荧光特性,如:荧光衰变时间长、激发光和发射光之间的Stokes位移较大和荧光光带窄,采用波长分辨和时间延迟技术以及解离-增强技术,可最大程度消除背景荧光的干扰,使得检测结果更加可靠,同时具有敏感性高、重复性好、特异性强、定量范围宽、检测速度快、标记物稳定等特点。

[0030] 下面详细阐述本发明试剂盒的性能特点。

[0031] 如图1所示,图1是本发明抑制素A定量检测试剂盒剂量-反应标准曲线,标注曲线的绘制具体为:将抑制素A校准品浓度值与相应反应孔测定的荧光值用LOG-LOG_B数学模型进行拟合,绘制标准曲线。在试剂盒的测量范围内,剂量-反应标准曲线线性相关系数应不低于0.9900,而图1所示,剂量-反应标准曲线线性相关系数达到0.998。

[0032] 如表1所示,表1为本发明试剂盒灵敏度测试,具体为,将试剂盒校准品A点重复检测20次,计算其荧光值均值(\bar{X})和标准偏差(SD),求得 $\bar{X}+2SD$ 相对应的浓度值,结果不高于5.0pg/mL。

[0033] 表1本发明试剂盒灵敏度测试

[0034]

测定值	$\bar{X}+2SD$	灵敏度
-----	---------------	-----

[0035]

605	603	585	601	604	596	589	603	587	594	611.59	2.0
572	581	566	593	588	584	571	579	586	589		

[0036] 本发明试剂盒特异性测试,具体为:与 10^8 pg/ml促甲状腺激素(hTSH)的交叉反应率不高于1%;与 10^8 pg/ml黄体生成素(hLH)的交叉反应率不高于1%;与 10^8 pg/ml催乳素(PRL)的交叉反应率不高于1%;与 10^8 pg/ml绒毛膜促性腺激素(hCG)的交叉反应率不高于1%;与 2×10^7 pg/ml甲胎蛋白(hAFP)的交叉反应率不高于1%。

[0037] 如表2所示,表2为本发明试剂盒准确性测试,测试结果具体为:以企业校准品为对

照,本发明校准品B、C点的实测浓度与标示浓度绝对偏差的绝对值均 $\leq 6\text{pg/ml}$,本发明校准品D-F点的实测浓度与标示浓度相对偏差的绝对值 $\leq 20\%$ 。

[0038] 表2本发明试剂盒准确性测试

[0039]

校准点	B	C	D	E	F
标示值	50	200	600	1000	2000
测定值	51.61	201.81	598.71	995.66	1993.91
偏差	1.59	1.84	0.22%	0.44%	0.31%

[0040] 如表3所示,表3为本发明试剂盒批内不精密度测试,具体为:一次实验中分别测定在标准曲线范围内高、中、低3种不同浓度的质控品,各测定20个平行孔,计算测定结果的平均值(\bar{X})标准差(SD),批内不精密度($CV\%$) = $SD \times 100\% / \bar{X}$,结果应符合批内不精密度($CV\%$)应不超过15.0%。

[0041] 表3本发明试剂盒批内不精密度测试

[0042]

质控点	测量值					\bar{X}	SD	CV%
C1	794.61	797.31	822.01	798.81	794.01	808.19	8.68	1.07%
	814.41	820.01	808.41	811.61	807.91			
	810.81	799.11	808.51	812.31	809.11			
	816.91	802.21	821.11	801.31	813.31			
C2	399.11	405.31	401.51	398.51	409.11	404.66	4.50	1.11%
	399.81	401.51	402.21	412.41	399.11			

[0043]

	406.91	409.71	405.91	409.21	402.31			
	410.21	404.51	410.11	399.01	406.71			
C3	155.41	153.41	153.21	155.51	153.91	153.94	1.39	0.90%
	153.81	151.51	155.61	153.11	156.21			
	153.21	153.21	153.71	155.41	152.71			
	151.41	153.61	155.11	155.71	152.91			

[0044] 如表4所示,表4为本发明试剂盒批间不精密度测试,具体为:用三批试剂盒分别测定低值质控品,每批试剂盒各测10孔,计算30次测定结果的平均值(\bar{X})与标准差(SD),批间不精密度($CV\%$) = $SD \times 100\% / \bar{X}$,结果应符合批间不精密度($CV\%$)应不超过20.0%。

[0045] 表4表4为本发明试剂盒批间不精密度测试

[0046]

批次	测量值					\bar{X}	SD	CV%
第一批	411.21	409.21	405.61	399.91	400.21	404.05	4.69	1.16%
	399.31	399.61	404.31	408.11	398.21			
第二批	407.51	411.71	405.31	411.91	406.31			
	400.21	399.31	405.11	411.71	397.41			
第三批	399.01	400.11	404.81	407.21	401.01			
	399.61	406.61	410.21	399.71	401.01			

[0047] 如表5所示,表5为本发明校准品不精密度测试,具体为:取同一批号校准品20套,再从每套校准品(零值除外)中对各浓度校准品各取1孔(每个浓度的校准品点20孔)进行检测,计算测定结果的平均值(\bar{X})与标准差(SD),计算校准品瓶间标准差与校准品均一性CV。校准品中B点、C点的不精密度(CV)应不超过20.0%,D点、E点、F点的不精密度(CV)应不超过15.0%。

[0048] 表5本发明校准品不精密度测试

[0049]

校准点	测量值					\bar{X}	SD	CV%
B	49.21	49.01	49.21	49.61	50.81	50.08	0.75	1.50%
	50.71	51.31	49.81	50.51	51.21			

[0050]

	49.51	49.01	50.01	50.11	49.81			
	49.11	50.41	50.71	50.91	50.51			
C	199.31	201.41	201.71	198.41	201.81	200.86	2.17	1.08%
	199.51	201.81	197.71	204.01	198.91			
	202.41	200.11	203.01	204.11	199.31			
	200.91	199.71	205.21	197.41	200.41			
D	595.71	588.31	596.81	600.61	612.01	602.46	8.83	1.47%
	596.81	616.41	597.91	612.51	606.11			
	616.01	612.91	592.81	608.71	600.81			
	589.71	596.41	593.91	608.11	606.51			
E	1005.31	1004.71	987.51	1002.41	994.81	1004.96	9.74	0.97%
	1001.41	993.91	1006.41	1018.11	1001.21			
	999.31	1019.01	1008.21	1017.61	1010.51			
	1017.51	1020.91	995.41	994.61	1000.21			
F	2028.61	2050.51	2035.71	2029.51	1970.01	2006.89	25.44	1.27%
	2018.51	2028.51	1995.01	1966.01	2003.71			
	1988.81	1995.91	2010.31	1980.51	2009.71			
	1992.31	2055.71	2005.31	1996.51	1976.51			

[0051] 如图2所示,图2是本发明抑制素A定量检测试剂盒热稳定性测试中荧光值走势图,热稳定性测试(加速破坏测试)具体为:试剂盒在37℃进行烘烤,烘烤3天,在烘烤过程中检测试剂盒的性能指标。根据图2所示数值,说明本发明试剂盒具有良好的热稳定性。

[0052] 如图3所示,图3是本发明抑制素A定量检测试剂盒与对照试剂盒样本检测线性相关性图,即本发明试剂盒与对照试剂盒临床样本相关性分析,具体为,检测400例孕母血清样本,两种试剂盒的线性回归方程为 $y = 1.0745x - 11.872$, $R^2 = 0.9984$ 。根据图3所示,本发明试剂盒与对照试剂盒的检测结果一致。其中,对照试剂盒为BECKMAN COULTER公司的抑制素A定量检测试剂盒。

[0053] 以上所述,本发明试剂盒线性范围宽、灵敏度高、特异性强、准确性好、精密性好、热稳定性好。

[0054] 以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书及附图内容所作的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

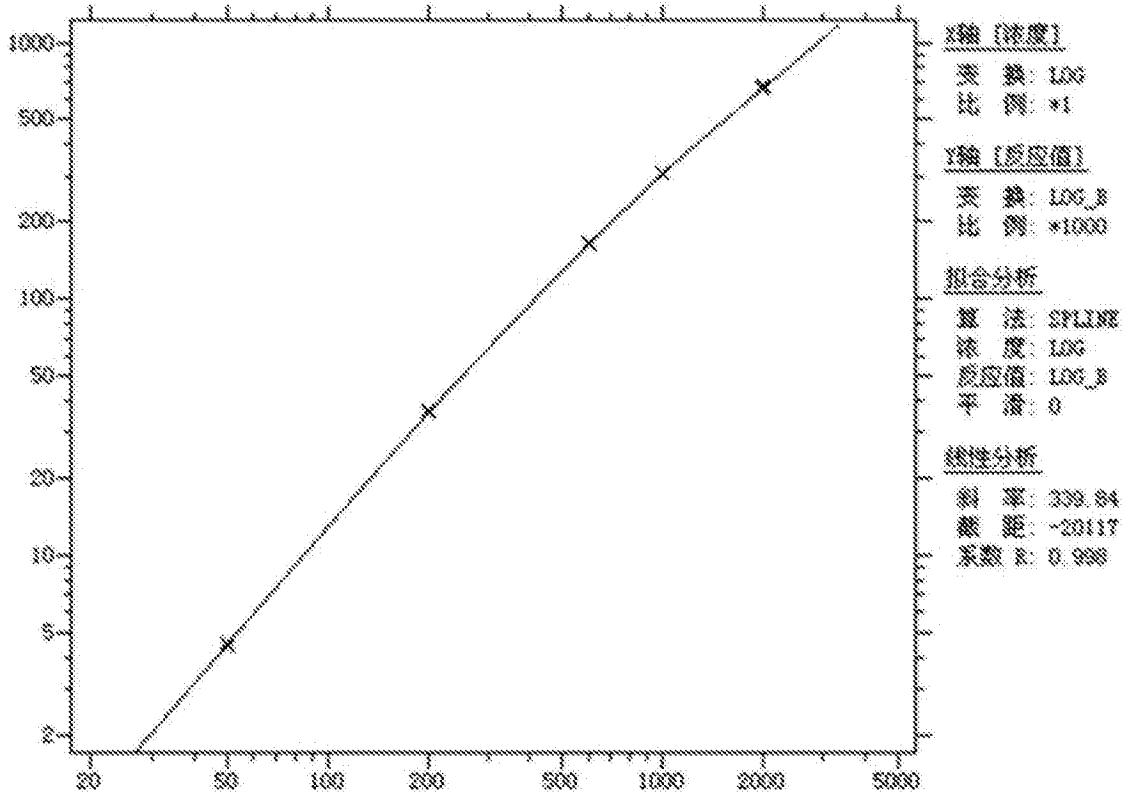


图1

37℃稳定性

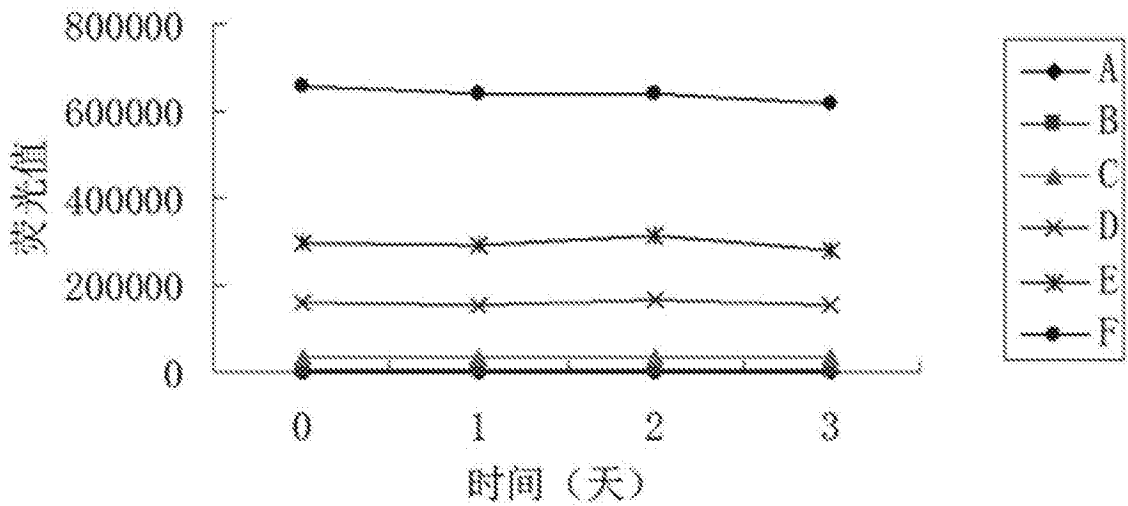


图2

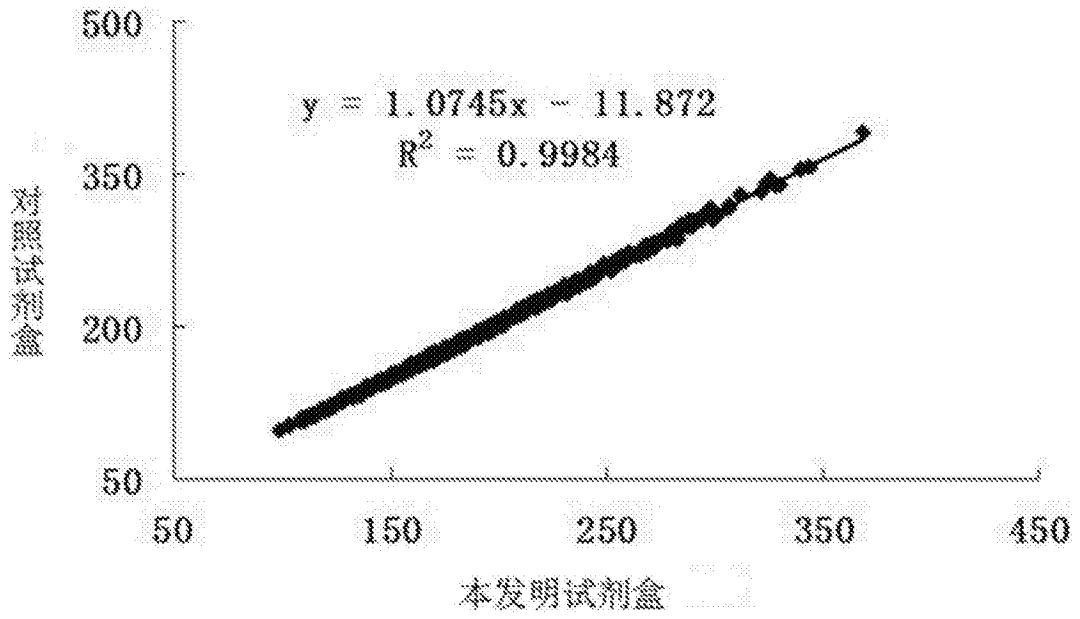


图3

专利名称(译)	抑制素A定量检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN106771266A	公开(公告)日	2017-05-31
申请号	CN201710023242.6	申请日	2017-01-12
[标]申请(专利权)人(译)	广州市丰华生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州市丰华生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州市丰华生物工程有限公司		
[标]发明人	冯健明 徐倩 梁琪芬 陈龙		
发明人	冯健明 徐倩 梁琪芬 陈龙		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/74 G01N33/531 G01N2333/655		
代理人(译)	李新梅 杨昕昕		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种抑制素A定量检测试剂盒，包括实验缓冲液、增强液、浓缩洗液、标记物、校准品及包被板；实验缓冲液包括体积比为0.1-100%的小牛血清和第一缓冲液；增强液为含0.4-0.6ml/L TritonX-100的水溶液；浓缩洗液包括3-5ml/L Tween-20和第二缓冲液；标记物由抑制素A单克隆抗体与镧系元素离子螯合物按1:1-1:3m/m制得；校准品包括6个浓度的冻干粉，冻干粉由抑制素A抗原和第三缓冲液冷冻干燥而成；包被板为采用包被液、封闭液、反应板制成的包被板，包被液包括0.1-10µg/mL抑制素A单克隆抗体和第四缓冲液，封闭液为第五缓冲液。本发明还公开一种抑制素A定量检测试剂盒的制备方法。本发明试剂盒可避免化学发光免疫测定法和酶联免疫反应检测时的缺陷，且测定结果准确、可靠。

