



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104090111 B

(45) 授权公告日 2016.03.23

(21) 申请号 201410122408.6

CN 102707055 A, 2012.10.03,

(22) 申请日 2014.03.30

M. Mahler, et al..Development

(73) 专利权人 北京中航赛维生物科技有限公司
地址 100049 北京市大兴区经济技术开发区
经海二路 29 号院 8 号楼二层

and performance evaluation of novel
chemiluminescence assays for detection of
anti-PR3 and anti-MPO antibodies..《Clinica
Chimica Acta》.2012, 第 413 卷 (第 7-8 期), 第
719-726 页.

(72) 发明人 于大为 杨晓勇

(74) 专利代理机构 北京富天文博兴知识产权代
理事务所 (普通合伙) 11272

审查员 张绚

代理人 刘寿椿

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/537(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

(56) 对比文件

CN 102707055 A, 2012.10.03,

CN 103063845 A, 2013.04.24,

CN 102520176 A, 2012.06.27,

CN 103149350 A, 2013.06.12,

WO 2008008349 A2, 2008.01.17,

CN 102667483 A, 2012.09.12,

权利要求书2页 说明书7页

(54) 发明名称

蛋白酶 3 抗体 (PR3-Ab) 定量测定试剂盒

(57) 摘要

本发明属于临床免疫学检测技术领域,公开了一种蛋白酶 3 抗体 (PR3-Ab) 定量测定试剂盒,包括磁分离试剂、酶标记试剂、校准品、清洗浓缩液、底物溶液以及稳定剂。本发明还公开了上述试剂盒的制备方法。本发明还公开了上述试剂盒的检测方法。本发明制备的试剂盒精确度、灵敏度以及稳定性较好,并且成本低廉,操作简单,具备广阔的应用前景。

1. 一种蛋白酶 3 抗体定量测定试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括磁分离试剂、酶标记试剂、校准品、清洗浓缩液、底物溶液以及稳定剂;

所述磁分离试剂的制备步骤如下:

一、配制磁微粒缓冲液:

1)、量取 800mL 纯化水于容器中,称取 Tris 12.1g 和 NaCl 8.5g 加入容器中,充分搅拌至完全溶解;

2)、称取 BSA 5g,量取新生牛血清 50mL,Proclin300 0.2ml 至容器中,充分搅拌至完全溶解;

3)、调 pH,控制 pH 在 7.9-8.1 之间;

4)、最后用纯化水定容至 1L,用 0.2 μ m 滤器过滤,2-8 $^{\circ}$ C 保存待用;

二、制备磁分离试剂:

1)、取 100mg 含羧基活性基团的磁微粒,用 0.025mol/L, pH4.5-5MES 缓冲液 10mL 混悬;

2)、加入 0.5-1mL 浓度为 10mg/mL 的 EDC 水溶液,室温混悬 30-60min;

3)、磁分离,去上清,用 0.025mol/L, pH4.5-5MES 缓冲液 10mL 重悬;

4)、加入 0.02-0.1mg 的 PR3 抗原,室温混悬 120-240min;

5)、磁分离,去上清,用磁微粒缓冲液重悬到 1mg/mL,完成磁分离试剂的制备;

所述酶标记试剂的制备步骤如下:

一、配制酶标记试剂稀释液:

1)、量取 800mL 纯化水于容器中,称取 Hepes 6.06g、NaCl 8.5g 加入容器中,充分搅拌至完全溶解;

2)、称取 BSA 5g, ZnCl₂ 0.1g、Proclin-300 0.2mL 和 MgCl₂ 0.1g 于容器中,充分搅拌至完全溶解;

3)、调 pH,控制 pH 在 7.5-8.0 之间;

4)、最后用纯化水定容至 1L,2-8 $^{\circ}$ C 保存待用;

二、碱性磷酸酶与 PR3 抗体的偶联

1)、取 1mg PR3 抗体,加入 10mg/mL 的偶联剂 2-IT 溶液 2-4 μ L,室温静置 20min,加入 0.1mol/L 的甘氨酸溶液 10 μ L,室温静置 5min;用 G-25 凝胶柱除盐,收集活化后的 PR3 抗体,2-8 $^{\circ}$ C 保存备用;

2)、取 1.5mg 的 ALP,加入 5mg/mL 的 SMCC 溶液 10-20 μ L,室温静置 30min,用 G-25 凝胶柱除盐,收集活化后的 ALP,2-8 $^{\circ}$ C 保存备用;

3)、将上述活化的 PR3 抗体与活化的 ALP 混合,2-8 $^{\circ}$ C 条件下静置 12-24h,用 Superdex200 凝胶纯化柱纯化偶联物,获得 PR3 抗体-ALP 连接物浓溶液,2-8 $^{\circ}$ C 保存备用;

4)、将 PR3 抗体-ALP 连接物浓溶液用酶标记试剂稀释液稀释到 0.02-0.1 μ g/mL,完成酶标记试剂的制备;

所述校准品的制备步骤如下:

一、校准品稀释液的配制:

1)、量取 600mL 纯化水于容器中,称取 200mL 新生牛血清加入容器中,充分搅拌混合均匀;

2)、称取磷酸氢二钾 3.4g、磷酸二氢钾 0.36g、Proclin300 0.02mL 加入容器中,充分搅

拌至完全溶解；

- 3)、调 pH,控制 pH 在 7.0-7.5 之间；
- 4)、最后用纯化水定容至 1L,2-8℃ 保存待用；

二、校准品的配制：用校准品稀释液将 PR3 抗体分别配制为 0、5、20、50、150、300U/mL 共 6 个浓度点；

所述清洗浓缩液的配置步骤如下：

1)、量取 800mL 纯化水于容器中，称取 Tris 12.1g 和 NaCl 8.5g 于容器中，充分搅拌至完全溶解；

2)、称取 Tween-20 5g、Triton X-100 5g，充分搅拌，直至完全混匀；

3)、调 pH,控制 pH 在 7.5-8.0 之间；

4)、最后定容 1000mL,2-8℃ 保存；

所述底物溶液的配置步骤如下：

1)、称取 NaCl 8.87g、Tris 3.72g、Na₂SO₃ 0.003g 和 Proclin-300 0.4ml 于 1L 烧杯中；

2)、用量筒量取 600ml 纯化水于 1L 烧杯中，充分搅拌，直至完全溶解，调 pH,控制其范围在 7.5 - 8.0 之间；

3)、加入 250ml Lumi-Phos530 后，用纯化水定容至 1000ml，混匀后即得；

所述稳定剂的配置步骤如下：

1)、称取乙二胺四乙酸二钠 2.3g 和氯化镁 1.4g 于 1L 烧杯中；

2)、用量筒量取 900ml 纯化水于 1L 烧杯中，充分搅拌，直至完全溶解，调 pH,控制其范围在 7.2 - 7.8 之间；

3)、加入 50ml 甘油后，用纯化水定容至 1000ml，混匀后即得。

蛋白酶 3 抗体 (PR3-Ab) 定量测定试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于临床免疫学检测技术领域,具体涉及一种蛋白酶 3 抗体 (PR3-Ab) 定量测定试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 蛋白酶 3 (PR3) 是中性粒细胞胞浆嗜天青颗粒中的一种丝氨酸蛋白酶,分子量约为 29KDa 的糖蛋白。PR3 能降解多种细胞外基质如弹性蛋白、血红蛋白、IV 型胶原等多种组织成分。此外,蛋白酶 3 通过组织蛋白酶 G 促进血小板活化,并使 C1 抑制剂失活。PR3 抗体是韦格拉肉芽肿病 (WG) 的特异性抗体。尽管其发病机制不清,但是抗 PR3 抗体与韦格拉肉芽肿病发病机制具有一定的相关性。另外,PR3 抗体浓度与其他疾病活性密切相关,可见于原发性系统性脉管炎、慢性炎性肠炎、感染(如 HIV)和其他疾病。韦格纳肉芽肿患者经治疗病情稳定后,该抗体浓度可下降,常被作为判断疗效、估计复发的指标,从而指导临床治疗。PR3 抗体对呼吸道有亲和性,致上下呼吸道坏死,肉芽肿形成。此外,蛋白酶 3 抗体(抗-PR3)在血管炎的发病中也起着重要作用,蛋白酶 3 抗体(抗-PR3)的检测结果在原发性小血管炎患者中检测中具备较高的临床价值。

[0003] 临床检测蛋白酶 3 抗体 (PR3-Ab) 的常见方法包括放射免疫分析法以及间接免疫荧光法等。但这些方法都存在着不足之处。放射免疫分析法是利用同位素标记的与未标记的抗原,同抗体发生竞争性抑制反应,是一种在无须采用生物测定方法的情况下用于检测抗原的实验室测定方法。该法极其敏感而又极其特异,但其却需要具备尖端复杂的设备,且成本也不低。同时,还需要特殊的预防措施,因为其要用到放射性物质。因此,如今放射免疫分析法在很大程度上已经被 ELISA 所取代。间接免疫荧光法的基本原理是用特异性的抗体与载玻片中的抗原结合后形成抗原抗体复合物,继用荧光抗体与抗原抗体复合物结合,形成抗原抗体荧光复合物。该方法在分析结果时无法根据分子量的大小区分非特异性识别;操作相对复杂,需要价格较昂贵的荧光显微镜,只能进行定性检测,不能进行定量测定。

发明内容

[0004] 为了克服现有技术的不足,本发明提供了一种具备较佳的准确度、精密度和稳定性的试剂盒。本发明是通过如下技术方案来实现的:

[0005] 一种蛋白酶 3 抗体 (PR3-Ab) 定量测定试剂盒,包括磁分离试剂、酶标记试剂、校准品、清洗浓缩液、底物溶液以及稳定剂;

[0006] 所述磁分离试剂的制备步骤如下:

[0007] 一、配制磁微粒缓冲液,以配制 1L 为例:

[0008] 1)、量取 800mL 纯化水于容器中,称取 Tris 12.1g 和 NaCl 8.5g 加入容器中,充分搅拌至完全溶解;

[0009] 2)、称取 BSA 5g,量取新生牛血清 50mL, Proclin300 0.2 mL 至容器中,充分搅拌至完全溶解;

- [0010] 3)、用 4M 的 HCl 调 pH,控制在 pH 在 7.9-8.1 之间;
- [0011] 4)、最后用纯化水定容至 1L,用 0.2 μ m 滤器过滤,2-8 $^{\circ}$ C 保存待用;
- [0012] 二、制备磁分离试剂:
- [0013] 1)、取 100mg 含羧基(COOH)活性基团的磁微粒,用 0.025mol/L, pH4.5-5 MES 缓冲液 10mL 混悬;
- [0014] 2)、加入 0.5-1mL 浓度为 10mg/mL 的 EDC 水溶液,室温混悬 30-60min;
- [0015] 3)、磁分离,去上清,用 0.025mol/L, pH4.5-5 MES 缓冲液 10mL 重悬;
- [0016] 4)、加入 0.02-0.1mg 的 PR3 抗原,室温混悬 120-240min;
- [0017] 5)、磁分离,去上清,用磁微粒缓冲液重悬到 1mg/mL,完成磁分离试剂的制备。
- [0018] 所述酶标记试剂的制备步骤如下:
- [0019] 一、配制酶标记试剂稀释液,以配制 1L 为例:
- [0020] 1)、量取 800mL 纯化水于容器中,称取 Hepes 6.06g、NaCl 8.5g 加入容器中,充分搅拌至完全溶解;
- [0021] 2)、称取 BSA 5g, ZnCl₂ 0.1g、Proclin-300 0.2mL 和 MgCl₂ 0.1g 于容器中,充分搅拌至完全溶解;
- [0022] 3)、用 4M 的 HCl 调 pH,控制 pH 在 7.5-8.0 之间;
- [0023] 4)、最后用纯化水定容至 1L,2-8 $^{\circ}$ C 保存待用;
- [0024] 二、碱性磷酸酶(ALP)与 PR3 抗体的偶联
- [0025] 1)、取 1mg PR3 抗体,加入 10mg/mL 的偶联剂 2-IT 溶液 2-4 μ L,室温静置 20min,加入 0.1mol/L 的甘氨酸溶液 10 μ L,室温静置 5min;用 G-25 凝胶柱除盐,收集活化后的 PR3 抗体,2-8 $^{\circ}$ C 保存备用;
- [0026] 2)、取 1.5mg 的碱性磷酸酶(ALP),加入 5mg/mL 的 SMCC 溶液 10-20 μ L,室温静置 30min,用 G-25 凝胶柱除盐,收集活化后的 ALP,2-8 $^{\circ}$ C 保存备用;
- [0027] 3)、将上述活化的 PR3 抗体与活化的 ALP 混合,2-8 $^{\circ}$ C 条件下静置 12-24h,用 Supperdex200 凝胶纯化柱纯化偶联物,获得 PR3 抗体-ALP 连接物浓溶液,2-8 $^{\circ}$ C 保存备用。
- [0028] 4)、将 PR3 抗体-ALP 连接物浓溶液用酶标记物稀释液稀释到 0.02-0.1 μ g/mL,完成酶标记试剂的制备。
- [0029] 所述校准品的制备步骤如下:
- [0030] 一、校准品稀释液的配制:
- [0031] 1)、量取 600mL 纯化水于容器中,称取 200mL 新生牛血清加入容器中,充分搅拌混合均匀;
- [0032] 2)、称取磷酸氢二钾 3.4g、磷酸二氢钾 0.36g、Proclin300 0.02 mL 加入容器中,充分搅拌至完全溶解;
- [0033] 3)、用 4M 的 HCl 调 pH,控制 pH 在 7.0-7.5 之间;
- [0034] 4)、最后用纯化水定容至 1L,2-8 $^{\circ}$ C 保存待用。
- [0035] 二、校准品的配制:用校准品稀释液将 PR3 抗体分别配制为 0、5、20、50、150、300U/mL 共 6 个浓度点。
- [0036] 所述清洗浓缩液的配置步骤如下:以配制 1L 为例:
- [0037] 1)、量取 800mL 纯化水于容器中,称取 Tris 12.1g 和 NaCl 8.5g 于容器中,充分搅

拌至完全溶解；

[0038] 2)、称取 Tween-20 5g、Triton X-100 5g,充分搅拌,直至完全混匀；

[0039] 3)、用 4M 的 HCl 调 pH,控制 pH 在 7.5-8.0 之间；

[0040] 4)、最后定容 1000mL,2-8℃保存。

[0041] 所述底物溶液的配置步骤如下:以配制 1L 为例：

[0042] 1)、称取 NaCl 8.87g、Tris 3.72g、Na₂SO₃ 0.003g 和 Proclin-300 0.4ml 于 1L 烧杯中；

[0043] 2)、用量筒量取 600ml 纯化水于 1L 烧杯中,充分搅拌,直至完全溶解,调 PH,控制其范围在 7.5 - 8.0 之间；

[0044] 3)、加入 250ml Lumi-Phos 530 后,用纯化水定容至 1000ml,混匀后即得。

[0045] 所述稳定剂的配置步骤如下:以配制 1L 为例：

[0046] 1)、称取乙二胺四乙酸二钠 2.3g 和氯化镁 1.4g 于 1L 烧杯中；

[0047] 2)、用量筒量取 900ml 纯化水于 1L 烧杯中,充分搅拌,直至完全溶解,调 pH,控制其范围在 7.2 - 7.8 之间；

[0048] 3)、加入 50ml 甘油后,用纯化水定容至 1000ml,混匀后即得。

[0049] 本发明的主要创新之处主要在于：

[0050] 1、本发明试剂盒提供了一种接近均相的反应体系,与该试剂盒现有间接法 ELISA 技术相比,本发明试剂盒具有更高的检测灵敏度和线性范围,并且样本不需要稀释,反应过程只需要一步清洗,在出结果时间上大大缩短,实验操作简便可靠,并达到了较佳的性能参数。并且竞争法相对间接法试剂工作浓度要低很多,大大降低了试剂成本。

[0051] 2、本发明公开了一种测定蛋白酶 3 抗体 (PR3-Ab) 的新技术,使得反应过程更加快速可靠,实验数据灵敏有效,在提高产品性能的同时,并且大大降低了产品成本；

[0052] 3、试剂盒中的磁分离试剂,酶标记物,校准品、清洗液浓缩液等组份均是该反应体系下的最优配方,给该试剂盒的使用效期及检测性能提供了有力保障。

[0053] 4、本发明试剂盒的精确度、灵敏度以及稳定性均优于市场同类产品,并且成本低廉,操作简单,应用前景广阔。

具体实施方式

[0054] 以下将采用具体的实施例来对本发明作进一步的解释,但是不应当看作是对本发明创新精神的限制。

[0055] 实施例 1、磁分离试剂的制备：

[0056] 一、磁微粒缓冲液配制过程,以配制 1L 为例：

[0057] 1、量取 800mL 纯化水于容器中,称取 Tris 12.1g 和 NaCl 8.5g 加入容器中,充分搅拌至完全溶解；

[0058] 2、称取 BSA 5g,量取新生牛血清 50mL,Proclin300 0.2 mL 至容器中,充分搅拌至完全溶解；

[0059] 3、用 4M 的 HCl 调 pH,控制在 pH 在 7.9-8.1 之间；

[0060] 4、最后用纯化水定容至 1L,用 0.2um 滤器过滤,2-8℃保存待用；

[0061] 二、磁分离试剂的制备过程

[0062] 1、取含羧基(COOH)活性集团的磁微粒,每克(g)磁微粒(干重)羧基含量不低于0.3毫摩尔(mmol),具有超顺磁性,直径在0.5-2 μ m之间;

[0063] 2、PR3抗原:可以为天然抗原或重组抗原,纯度应超过95%;

[0064] 3、2-吗啉乙磺酸(MES)、碳二亚胺(EDC)、TRIS、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes)和其他试剂应达到化学纯;

[0065] 4、取100mg磁微粒,用0.025mol/L, pH4.5-5 MES缓冲液10mL混悬;

[0066] 5、加入0.5-1mL新鲜配制的浓度为10mg/mL的EDC水溶液,室温混悬30-60min;

[0067] 6、磁分离,去上清,用0.025mol/L, pH4.5-5 MES缓冲液10mL重悬;

[0068] 7、加入0.02-0.1mg的PR3抗原,室温混悬120-240min;

[0069] 8、磁分离,去上清,用磁微粒缓冲液重悬到1mg/mL,完成磁分离试剂的制备。

[0070] 实施例2:酶标记试剂的制备:

[0071] 一、酶标记试剂稀释液配制过程,以配制1L为例:

[0072] 1、量取800mL纯化水于容器中,称取Hepes 6.06g、NaCl 8.5g加入容器中,充分搅拌至完全溶解;

[0073] 2、称取BSA 5g, ZnCl₂ 0.1g、Proclin-300 0.2mL和MgCl₂ 0.1g于容器中,充分搅拌至完全溶解;

[0074] 3、用4M的HCl调pH,控制pH在7.5-8.0之间;

[0075] 4、最后用纯化水定容至1L,2-8 $^{\circ}$ C保存待用;

[0076] 二、碱性磷酸酶(ALP)与PR3抗体的偶联

[0077] 1、PR3抗体,购自北京久峰润达生物技术有限公司,纯度超过95%;

[0078] 2、碱性磷酸酶纯度应超过95%,比活性应超过1000U/mg,浓度超过5mg/mL;

[0079] 3、取1mg PR3抗体,加入10mg/mL的偶联剂2-IT(2-亚胺四氢噻吩)溶液2-4 μ L,室温静置20min,加入0.1mol/L的甘氨酸溶液10 μ L,室温静置5min;用G-25凝胶柱除盐,收集活化后抗体,2-8 $^{\circ}$ C保存备用;

[0080] 4、取1.5mg的ALP溶液,加入5mg/mL的SMCC溶液10-20 μ L,室温静置30min,用G-25凝胶柱除盐,收集活化后ALP,2-8 $^{\circ}$ C保存备用;

[0081] 5、将上述活化的PR3抗体与活化的ALP混合,2-8 $^{\circ}$ C条件下静置12-24h,用Superdex200凝胶纯化柱纯化偶联物,获得PR3抗体-ALP连接物浓溶液,2-8 $^{\circ}$ C保存备用。

[0082] 6、将PR3抗体-ALP连接物浓溶液用酶标记物稀释液稀释到0.02-0.1 μ g/mL,完成酶标记试剂的制备。

[0083] 实施例3、校准品的制备:

[0084] 一、校准品稀释液的配制:

[0085] 1、量取600mL纯化水于容器中,称取200mL新生牛血清加入容器中,充分搅拌混合均匀;

[0086] 2、称取磷酸氢二钾3.4g、磷酸二氢钾0.36g、Proclin300 0.02 mL加入容器中,充分搅拌至完全溶解;

[0087] 3、用4M的HCl调pH,控制pH在7.0-7.5之间;

[0088] 4、最后用纯化水定容至1L,2-8 $^{\circ}$ C保存待用。

[0089] 二、校准品的配制:

[0090] 1、用校准品稀释液将 PR3 抗体分别配制为 0、5、20、50、150、300U/mL 共 6 个浓度点。

[0091] 实施例 4 :清洗浓缩液的制备 :

[0092] 清洗浓缩液配制过程,以配制 1L 为例 :

[0093] 1、量取 800mL 纯化水于容器中,称取 Tris 12.1g 和 NaCl 8.5g 于容器中,充分搅拌至完全溶解 ;

[0094] 2、称取 Tween-20 5g 、Triton X-100 (聚乙二醇辛基苯基醚) 5g,充分搅拌,直至完全混匀 ;

[0095] 3、用 4M 的 HCl 调 pH,控制 pH 在 7.5-8.0 之间 ;

[0096] 4、最后定容 1000mL,2-8℃ 保存。

[0097] 实施例 5 :底物溶液的制备 :

[0098] 底物溶液配制步骤,配制 1L :

[0099] 1、称取 NaCl 8.87g、Tris 3.72g、Na₂SO₃ 0.003g 和 Proclin-300 0.4ml 于 1L 烧杯中 ;

[0100] 2、用量筒量取 600ml 纯化水于 1L 烧杯中,充分搅拌,直至完全溶解,调 PH,控制其范围在 7.5 - 8.0 之间 ;

[0101] 3、加入 250ml Lumi-Phos 530 后,用纯化水定容至 1000ml,混匀后即得。

[0102] 实施例 6 稳定剂的制备 :

[0103] 1、称取乙二胺四乙酸二钠 2.3g 和氯化镁 1.4g 于 1L 烧杯中 ;

[0104] 2、用量筒量取 900ml 纯化水于 1L 烧杯中,充分搅拌,直至完全溶解,调 pH,控制其范围在 7.2 - 7.8 之间 ;

[0105] 3、加入 50ml 甘油后,用纯化水定容至 1000ml,混匀后即得。

[0106] 实施例 7

[0107] 本发明试剂盒的测试方法如下 :

[0108] 1、检测管内依次加入 20 μL 样本(或标准品)、50 μL 磁分离试剂、50 μL 酶标记试剂以及稳定剂 2 μL,混合均匀,37±0.5℃ 条件下反应 10 min ;

[0109] 2、检测管放至磁分离器上,静置 2 分钟 ;倒出上清液 ;

[0110] 3、清洗浓缩液用纯化水稀释 15 倍后(即为清洗液)使用,加 300 μL 清洗液至检测管中,置混匀器上振荡混匀 30s。

[0111] 4、再重复步骤 2、3、2 两遍。

[0112] 5、加 150 μL 底物溶液至检测管中混匀后进行检测。

[0113] 实施例 8

[0114] 本发明实施例 1-6 制备的试剂盒的分析性能评价 :

[0115] (1) 灵敏度评价

[0116] 检测“0”浓度样本,重复检测 20 次,计算相对发光强度(RLU)的平均值(M)和标准差(SD),并计算 M-2SD 值,根据零浓度校准品和相邻校准品之间的浓度-RLU 进行两点回归拟合得出一次方程,将 M-2SD 值带入上述方程中,求出对应的浓度值,即为最低检测限。本方法的灵敏度不大于 0.5U/mL。其中,A 点发光值参见表 1 :

[0117] 表 1

[0118]

PR3-Ab-STD-A(RLU)				
1265232	1228894	1269800	1251389	1273230
1249972	1269500	1252731	1232217	1266477
1237916	1246698	1265126	1234221	1256504
1249249	1254351	1260601	1267274	1268400

[0119] A 点发光均值 $X=1254989$ [0120] $SD=13639$ [0121] $X-2SD=1227711$

[0122] B 点发光值参见表 2。

[0123] B 点发光均值 $X=786502$

[0124] 表 2

PR3-Ab-STD-B(RLU)
784417
788587

[0125] 计算得到灵敏度 $=0.291U/mL$ 。

[0126] (2) 精密度评价

[0127] ①分析内精密度

[0128] 将实施例中的试剂盒分别测定低、中、高三种不同浓度的血清,10 孔平行测定,结果参见表 3,得出批内变异系数为 2.87% ~ 4.19%。

[0129] 表 3 分析内精密度测试

测定血清浓度(U/mL)	测定次数	分析内 CV(%)
4.33	10	4.19
68.79	10	3.90
204.85	10	2.87

[0130] ②分析间精密度

[0131] 将实施例的试剂盒取三批,每批试剂盒均测定低、中、高三种不同浓度的血清,10 孔平行测定。每份血清得到 30 个浓度测值,参见表 4,统计分析间变异系数,为 4.13% ~ 6.74%。

[0132] 表 4 分析间精密度测试

[0133]

测定血清浓度 (U/mL)	测定次数	分析间 CV(%)
4.33	30	6.74
68.79	30	5.44
204.85	30	4.13

[0134] (3) 准确度评价

[0135] 在 2 例混合血清样本中添加不同量人 PR3-Ab 标准品,形成 3 个浓度水平的血清添加样本,添加物体积小于总体积的 10%。检测样本浓度,按下述公式计算回收率。本方法血清基质回收率在 90-110% 之间。数据参见表 5。

[0136]

$$R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{V \times C_s} \times 100\%$$

[0137] R:回收率;

[0138] V:加入标准溶液的体积;

[0139] V₀:人源样品的体积;

[0140] C:人源样品加入标准溶液后的检测浓度;

[0141] C₀:人源样品的检测浓度;[0142] C_s:标准溶液的浓度。

[0143] 表 5 准确度评价—添加回收实验数据

[0144]

样品浓度 (U/mL)	添加浓度(U/mL)	添加后终浓度 (U/mL)	测定平均值 (U/mL)	回收率(%)
3.87	20	23.87	22.57	94.6%
	80	83.87	86.57	103.2%
	200	203.87	191.07	93.7%
8.99	20	28.99	31.08	107.2%
	80	88.99	82.42	92.6%
	200	208.99	216.72	103.7%

[0145] (4) 试剂盒特异性评价

[0146] 取 1 份 PR3-Ab 含量为 0 的样本,加入人血清白蛋白,使样本中人血清白蛋白浓度为 5000ng/mL,使用该试剂盒对该样本进行检测,测定样本中的 PR3-Ab 含量。结果见表 6,本法与人血清白蛋白无交叉反应。

[0147] 表 6 特异性实验

交叉反应物	实验浓度 (ng/mL)	PR3-Ab 测定浓度(U/mL)
人血清白蛋白	5000	< 0.5

[0148] (5) 热稳定性评价

[0149] 对试剂盒分别进行 4℃ 12 个月和 37℃ 7 天的稳定性实验,结果表明试剂盒标准品发光强度的变化、批内和批间精密度、准确性等指标均在正常范围之内,试剂盒有效期可达 24 个月;而不添加稳定剂的同类试剂盒的有效期仅为 12 个月左右。

专利名称(译)	蛋白酶3抗体(PR3-Ab)定量测定试剂盒		
公开(公告)号	CN104090111B	公开(公告)日	2016-03-23
申请号	CN201410122408.6	申请日	2014-03-30
[标]申请(专利权)人(译)	北京中航赛维生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京中航赛维生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京中航赛维生物科技有限公司		
[标]发明人	于大为 杨晓勇		
发明人	于大为 杨晓勇		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/5375 G01N33/573		
代理人(译)	刘寿椿		
审查员(译)	张绚		
其他公开文献	CN104090111A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于临床免疫学检测技术领域，公开了一种蛋白酶3抗体(PR3-Ab)定量测定试剂盒，包括磁分离试剂、酶标记试剂、校准品、清洗浓缩液、底物溶液以及稳定剂。本发明还公开了上述试剂盒的制备方法。本发明还公开了上述试剂盒的检测方法。本发明制备的试剂盒精确度、灵敏度以及稳定性较好，并且成本低廉，操作简单，具备广阔的应用前景。

