



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108196043 A

(43)申请公布日 2018.06.22

(21)申请号 201711218422.6

(22)申请日 2017.11.28

(71)申请人 泰州泽成生物技术有限公司

地址 225300 江苏省泰州市中国医药城
泰路西侧、陆家路东侧G59幢62号西半
侧一至四层

(72)发明人 刘振世 季连星 孔晓凯 王赞
石慧 赵颀

(74)专利代理机构 北京联瑞联丰知识产权代理
事务所(普通合伙) 11411

代理人 黄冠华

(51)Int.Cl.

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

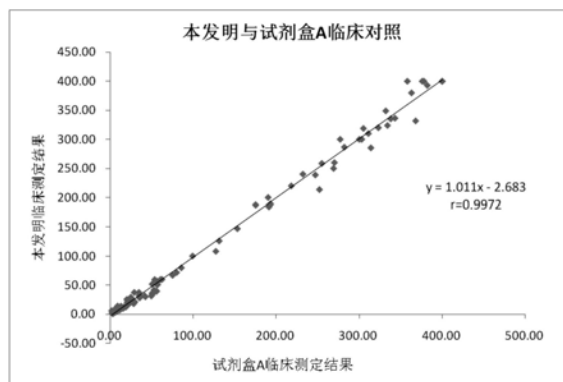
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种检测血清中尿微量白蛋白含量的试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测血清中尿微量白蛋白含量的试剂盒,包括抗试剂A、抗试剂B、磁微粒试剂、校准品、质控品、发光底物液;抗试剂A是碱性磷酸酶标记的尿微量白蛋白衍生物;抗试剂B是FITC标记的尿微量白蛋白多克隆抗体,磁微粒试剂是包被有FITC抗体的羧基磁微粒混,同时还公开了该试剂盒的制备方法。该试剂盒将化学发光技术与免疫磁微粒相结合,提供了一种接近均相的反应体系,并且采用了一步法反应模式,使得检测性能大大提高(灵敏度、精密性、检测范围等),反应时间大大缩短,从开始加样到检测结果,时间少于35min,明显快于同类试剂盒);偶联效率高,结合牢固,且工艺稳定,在提高产品性能的同时,大大降低了产品成本。



1. 一种检测血清中尿微量白蛋白含量的试剂盒,其特征在于,包括:抗试剂A、抗试剂B、磁微粒试剂、校准品、质控品、发光底物液;

其中,所述抗试剂A是碱性磷酸酶标记的尿微量白蛋白衍生物,含BSA的抗试剂A缓冲液;所述碱性磷酸酶标记的尿微量白蛋白衍生物是通过偶联剂将尿微量白蛋白衍生物和碱性磷酸酶偶联后获得,浓度为0.2ug/mL;所述抗试剂A缓冲液为10~100mM的Tris-HCl溶液,pH值为7-8,含有浓度为2-6wt%的PEG-6000、0.7-0.9wt%的氯化钠、0.05-0.1wt%的叠氮钠、0.3wt%的PC-300、0.1-1wt%牛血清白蛋白以及20mM EDTA;

所述抗试剂B是FITC标记的尿微量白蛋白多克隆抗,含BSA的抗试剂B缓冲液;所述FITC标记的尿微量白蛋白抗体是通过偶联剂将尿微量白蛋白抗体和FITC偶联后获得,浓度为1.0ug/mL; ;所述抗试剂B缓冲液为10~100mM的Tris-HCl溶液,pH值为7-8,0.12wt%的ANS、2-6wt%的PEG-6000、0.7-0.9wt%的氯化钠、0.05-0.1wt%的叠氮钠、0.3wt%的PC-300、0.1-1wt%牛血清白蛋白以及20mM EDTA;

所述磁微粒试剂是包被有FITC抗体的羧基磁微粒混悬液;羧基磁微粒用1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺在pH4.5-pH5.5下活化,加磁场,静置使磁微粒与液体分开,弃去上清,用pH7.6的0.01M的PBS缓冲液洗去多余活化剂;加入适量的FITC多克隆抗体,使其浓度为0.5uL/mg磁微粒,在pH7.4-pH7.8下震荡反应,反应结束后加磁场,静置使磁微粒与液体分开,弃去上清,用含有1%牛血清白蛋白的0.01M的PBS缓冲液进行封闭,封闭结束后,加入封闭液以保存磁微粒,使磁微粒的最终浓度为2mg/ml;该磁微粒混悬液置于2-8℃保存,以备使用;

所述校准品和质控品由人源性尿微量白蛋白和缓冲液组成,缓冲液为浓度50-200mM的Tris-HCl溶液,含有浓度为0.1~1wt%的牛血清白蛋白、0.05~0.5wt%的PC-300、5~50mM的乙二胺四乙酸二钠;所述尿微量白蛋白校准品包括人源性尿微量白蛋白浓度分别为0、1.5、6.0、25、100、400ug/ml的一组校准品;

所述发光底物液是含有AMPPD的Tris-HCl溶液,所述Tris-HCl溶液的pH值为8.0~10.0,含有浓度20V%的AMPPD、16wt%的NaCl、0.4wt%的KCl和2.42wt%的Tris。

2. 根据权利要求1所述的检测血清中尿微量白蛋白含量的试剂盒,其特征在于,所述偶联剂选自碳化二亚胺、戊二醛、二异氰酸化合物或二卤化二硝基苯中的一种或多种。

3. 根据权利要求3所述的检测血清中尿微量白蛋白含量的试剂盒,其特征在于,所述FITC抗体选自人血清白蛋白、牛血清白蛋白、牛转铁蛋白和血蓝蛋白中的一种亚型或多种亚型的混合。

4. 根据权利要求1所述的检测血清中尿微量白蛋白含量的试剂盒,其特征在于,所述羧基磁微粒为核壳结构,直径范围为100~4500nm,浓度为1~5mg/mL;所述羧基磁微粒的表面带有由羧基、氨基、羟基、酰肼基或氯甲基的一种或多种修饰的化学基团;所述FITC抗体通过羧基磁微粒携带的基团键合在羧基磁微粒表面。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的检测血清中尿微量白蛋白含量的试剂盒,其特征在于,还包括浓缩洗涤液,所述浓缩洗涤液是含有吐温20的Tris-HCl溶液,pH值为7.4,含有浓度16wt%的NaCl、0.4wt%的KCl、2.42wt%的Tris,使用时用双蒸水15倍稀释。

6. 如权利要求5所述的检测血清中尿微量白蛋白含量的试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

一、磁微粒试剂的制备：

1)、将羧基磁微粒用1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺在pH4.5~pH5.5下进行活化,然后在磁场上静置使羧基磁微粒与液体分开,弃去上清;

2) 用pH7.6的0.01M的PBS缓冲液洗去多余活化剂,然后加入适量的FITC抗体,使FITC抗体的浓度为0.5uL/mg,在pH7.4~pH7.8下震荡反应;

3) 反应结束后在磁场上静置使羧基磁微粒与液体分开,弃去上清,用含有1wt%牛血清白蛋白的0.01M的PBS缓冲液进行封闭;

4) 封闭结束后,加入封闭液以保存磁微粒试剂,使包被有FITC抗体的羧基磁微粒的最终浓度为2mg/mL;该磁微粒混悬液置于2-8℃保存,以备使用;

二、抗试剂A的制备

尿微量白蛋白衍生物的制备

使用SMCC活化剂将尿微量白蛋白进行活化,生成马来酰亚胺-尿微量白蛋白衍生物;马来酰亚胺-尿微量白蛋白衍生物含有可以与-SH基团反应的马来酰亚胺基团,加入含有-SH的碱性磷酸酶,将ALB衍生物与碱性磷酸酶连接在一起,调整至工作浓度为1.0ug/mL;

抗试剂A缓冲液的制备

将9gNaCl、0.5g叠氮钠、3gPC-300、10g牛血清白蛋白和5.84g EDTA溶于900mL双蒸水中,用HCl调整pH7.0-8.0,用双蒸水定容至1000mL;

三、抗试剂B的制备

将1.2gANS、9gNaCl、0.5g叠氮钠、3gPC-300、10g牛血清白蛋白和5.84g EDTA溶于900mL双蒸水中,用HCl调整pH7.0~8.0,用双蒸水定容至1000mL,获得含BSA的缓冲液;

在BSA缓冲液中,25℃条件下,FITC与尿微量白蛋白抗体产生偶联反应,经过蛋白纯化仪纯化,收集包被有FITC的尿微量白蛋白抗体,经过紫外分光光度计检测包被有FITC的尿微量白蛋白抗体的浓度,调整至工作浓度为1.0ug/mL;

四、校准品和质控品的制备

用含有终浓度0.1-1wt%的牛血清白蛋白、0.05-0.5wt%的PC-300、5-50mM的乙二胺四乙酸二钠的BSA缓冲液将人源性尿微量白蛋白纯品配制成浓度为0ug/mL、1.5ug/mL、6.0ug/mL、25ug/mL、100ug/mL、400ug/mL的一系列校准品;

用含有终浓度0.1-1wt%的牛血清白蛋白、0.05-0.5wt%的PC-300、5-50mM的乙二胺四乙酸二钠的BSA缓冲液将人源性尿微量白蛋白纯品配制成浓度为2.5ug/mL、20ug/mL的质控品;

五、发光底物液的制备

将200mL AMPPD、160gNaCl、4gKCl、24.2g三羟甲基氨基甲烷溶于900mL双蒸水中,用HCl调整pH8.0~10.0,用双蒸水定容至1000mL;

六、浓缩洗涤液的制备

将160NaCl、4gKCl、24.2g三羟甲基氨基甲烷、1mL吐温20溶于900mL双蒸水中,用HCl调整至pH7.4,用双蒸水定容至1000mL,使用时用双蒸水15倍稀释。

一种检测血清中尿微量白蛋白含量的试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物化学技术领域,具体涉及一种采用免疫竞争法、磁微粒化学发光法测定 人体中尿微量白蛋白 (ALB) 含量的试剂盒。

背景技术

[0002] 微量白蛋白尿是指在尿中出现微量白蛋白。白蛋白是一种血液中的正常蛋白质,但在生 理条件下尿液中仅出现极少量白蛋白。微量白蛋白尿反映肾脏异常渗漏蛋白质。当 一名患者 有高血压或糖尿病或同时患有这两种疾病(经常同时发生)时,肾脏血管会发生 病变改变了肾 脏滤过蛋白质(尤其是白蛋白)的功能,这使得蛋白质渗漏到尿中。微量白蛋白尿是糖尿病影 响肾脏受损的早期征象,为糖尿病肾病。

[0003] 人体代谢正常情况下,尿中的白蛋白极少,如果在体检后发现尿中的微量白蛋白 在 20mg/L-200mg/L范围内,就属于微量白蛋白尿,如果患者能够经过规范的修复肾单位, 逆转 纤维化治疗,尚可彻底修复肾小球,消除蛋白尿,尿常规尿蛋白的显示为阴性。而当尿 中微 量白蛋白超过200mg/L时,肾病患者已有大量白蛋白漏出,可能出现低蛋白血症,肾病 发展 离不可逆期只有一步之遥,尿常规测试尿蛋白阳性,如果不及时进行医治,就会进入 尿毒症 期。

[0004] 目前已知的尿微量白蛋白测定方法有放射免疫法(RIA)、酶联免疫吸附法 (ELISA)、胶乳增强比浊法等。放射免疫法步骤繁琐,试剂价格昂贵,需使用配套的仪器且 存在放射性 污染。酶联免疫吸附法存在检测时间长、操作复杂、重复性差、不适于急诊和临 床病人及时 诊断的需要。胶乳增强免疫比浊法操作简单、快速,但是灵敏度低、低值重复性 差。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服现有的尿微量白蛋白测定方法检测时间长、操作 复杂、重复性差、不适于急诊和临床病人及时诊断的需要的缺陷,提供一种检测血清中尿 微量白蛋 白含量的试剂盒。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明提供了如下的技术方案:

[0007] 本发明的试剂盒包括抗试剂A、抗试剂B、磁微粒试剂、校准品、质控品、发光底物液 和浓缩洗液;

[0008] 其中,所述抗试剂A是碱性磷酸酶标记的尿微量白蛋白衍生物,含BSA的抗试剂A缓 冲液;所述碱性磷酸酶标记的尿微量白蛋白衍生物是通过偶联剂将尿微量白蛋白衍生物和 碱 性磷酸酶偶联后获得,浓度为0.2ug/mL;所述抗试剂A缓冲液为10~100mM的Tris-HCl 溶液,pH值为7-8,含有浓度为2-6wt%的PEG-6000、0.7-0.9wt%的氯化钠、0.05-0.1wt% 的叠氮钠、0.3wt%的PC-300、0.1-1wt%牛血清白蛋白以及20mM EDTA;

[0009] 所述抗试剂B是FITC标记的尿微量白蛋白多克隆抗,含BSA的抗试剂B缓冲液;所 述FITC标记的尿微量白蛋白抗体是通过偶联剂将尿微量白蛋白抗体和FITC偶联后获得,

浓度为1.0ug/mL;所述抗试剂B缓冲液为10~100mM的Tris-HCl溶液,pH值为7-8,0.12wt%的ANS、2-6wt%的PEG-6000、0.7-0.9wt%的氯化钠、0.05-0.1wt%的叠氮钠、0.3wt%的PC-300、0.1-1wt%牛血清白蛋白以及20mM EDTA;

[0010] 所述磁微粒试剂是包被有FITC抗体的羧基磁微粒混悬液;所述磁微粒试剂是包被有 FITC抗体的磁微粒混悬液。根据使用量取羧基磁微粒,用1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二 亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)在酸性条件下(PH4.5-PH5.5)进行活化,活化完成后,加磁场,静置使磁微粒与液体分开,弃去上清,用PH7.6的0.01M的PBS缓冲液 洗去多余活化剂;加入适量的FITC多克隆抗体,使其浓度为0.5ul/mg磁微粒,在弱碱性 条件下(PH7.4-PH7.8)震荡反应,反应结束后加磁场,静置使磁微粒与液体分开,弃去上 清,用含有1%牛血清白蛋白的0.01M的PBS缓冲液进行封闭,封闭结束后,加入封闭液以 保存磁微粒,使磁微粒的最终浓度为2mg/ml;该磁微粒混悬液置于2-8℃保存,以备使用;

[0011] 所述校准品和质控品由人源性尿微量白蛋白和缓冲液组成,缓冲液为浓度50-200mM的 Tris-HCl溶液,含有浓度为0.1~1wt%的牛血清白蛋白、0.05~0.5wt%的PC-300、5~50mM 的乙二胺四乙酸二钠;所述尿微量白蛋白校准品包括人源性尿微量白蛋白浓度分别为0、1.5、6.0、25、100、400ug/ml的一组校准品。

[0012] 所述发光底物液是含有AMPPD的Tris-HCl溶液,所述Tris-HCl溶液的pH值为8.0~10.0,含有浓度20V%的AMPPD、16wt%的NaCl、0.4wt%的KCl和2.42wt%的Tris;

[0013] 进一步的,所述偶联剂选自碳化二亚胺、戊二醛、二异氰酸化合物或二卤化二硝基苯中 的一种或多种。

[0014] 进一步的,所述FITC抗体选自人血清白蛋白、牛血清白蛋白、牛转铁蛋白和血蓝蛋白 中的一种或多种。

[0015] 进一步的,所述羧基磁微粒为核壳结构,直径范围为100~4500nm,浓度为1~5mg/mL; 所述羧基磁微粒的表面带有由羧基、氨基、羟基、酰肼基或氯甲基的一种或多种修饰的 化学 基团;所述FITC抗体通过羧基磁微粒携带的基团键合在羧基磁微粒表面。

[0016] 进一步的,所述浓缩洗涤液是含有吐温20的Tris-HCl溶液,pH值为7.4,含有浓度 16wt% 的NaCl、0.4wt%的KCl、2.42wt%的Tris,使用时用双蒸水15倍稀释。

[0017] 本发明的试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0018] 一、磁微粒试剂的制备:

[0019] 1)、将羧基磁微粒用1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 在pH4.5~pH5.5下进行活化,然后在磁场上静置使羧基磁微粒与液体分开,弃去上 清;

[0020] 2)用pH7.6的0.01M的PBS缓冲液洗去多余活化剂,然后加入适量的FITC抗体,使 FITC抗体的浓度为0.5uL/mg,在pH7.4~pH7.8下震荡反应;

[0021] 3)反应结束后在磁场上静置使羧基磁微粒与液体分开,弃去上清,用含有1wt%牛 血清 白蛋白的0.01M的PBS缓冲液进行封闭;

[0022] 4)封闭结束后,加入封闭液以保存磁微粒试剂,使包被有FITC抗体的羧基磁微粒 的最 终浓度为2mg/mL;该磁微粒混悬液置于2-8℃保存,以备使用;

[0023] 二、抗试剂A的制备

[0024] 尿微量白蛋白衍生物的制备

[0025] 使用SMCC活化剂将尿微量白蛋白进行活化,生成马来酰亚胺-尿微量白蛋白衍生物;马来酰亚胺-尿微量白蛋白衍生物含有可以与-SH基团反应的马来酰亚胺基团,加入含有-SH的碱性磷酸酶,将ALB衍生物与碱性磷酸酶连接在一起;

[0026] 抗试剂A缓冲液的制备

[0027] 将9gNaCl、0.5g叠氮钠、3gPC-300、10g牛血清白蛋白和5.84g EDTA溶于900mL双蒸水中,用HCl调整PH7.0-8.0,用双蒸水定容至1000mL;

[0028] 三、抗试剂B的制备

[0029] 将1.2gANS、9gNaCl、0.5g叠氮钠、3gPC-300、10g牛血清白蛋白和5.84g EDTA溶于900mL双蒸水中,用HCl调整pH7.0~8.0,用双蒸水定容至1000mL,获得含BSA的缓冲液;

[0030] 在BSA缓冲液中,25℃条件下,FITC与尿微量白蛋白抗体产生偶联反应,经过蛋白纯化仪纯化,收集包被有FITC的尿微量白蛋白抗体,经过紫外分光光度计检测包被有FITC的尿微量白蛋白抗体的浓度,调整至工作浓度为1.4ug/mL;

[0031] 四、校准品和质控品的制备

[0032] 用含有终浓度0.1-1wt%的牛血清白蛋白、0.05-0.5wt%的PC-300、5-50mM的乙二胺四乙酸二钠的BSA缓冲液将人源性尿微量白蛋白纯品配制成浓度为0ug/mL、1ug/mL、2.5ug/mL、10ug/mL、20ug/mL、40ug/mL的一系列校准品;

[0033] 用含有终浓度0.1-1wt%的牛血清白蛋白、0.05-0.5wt%的PC-300、5-50mM的乙二胺四乙酸二钠的BSA缓冲液将人源性尿微量白蛋白纯品配制成浓度为2.5ug/mL、20ug/mL的质控品;

[0034] 五、发光底物液的制备

[0035] 将200mL AMPPD、160gNaCl、4gKCl、24.2g三羟甲基氨基甲烷溶于900mL双蒸水中,用HCl调整PH8.0~10.0,用双蒸水定容至1000mL;

[0036] 六、浓缩洗涤液的制备

[0037] 将160NaCl、4gKCl、24.2g三羟甲基氨基甲烷、1mL吐温20溶于900mL双蒸水中,用HCl调整至PH7.4,用双蒸水定容至1000mL,使用时用双蒸水15倍稀释。

[0038] 本发明的技术原理如下:

[0039] 测样本、校准品或质控品中的ALB与碱性磷酸酶(AP)标记的尿微量白蛋白衍生物竞争结合异硫氰酸荧光素(FITC)标记的ALB单克隆抗体,随后加入连有抗FITC抗体的磁微粒,通过抗FITC抗体与FITC的特异性结合使抗原抗体免疫复合物结合在磁微粒上。在外加磁场的作用下,将免疫反应形成的复合物与未结合的其他物质分离,清洗复合物后,加入酶促化学发光底物。底物在酶作用下被催化裂解,形成不稳定的激发态中间体,当激发态中间体回到基态时发出光子,形成发光反应,即可使用化学发光仪检测反应的发光强度。在检测范围内,发光强度与样本中的尿微量白蛋白的含量成正比,使用改良的四参数Logistic方程拟合可计算出样本中尿微量白蛋白浓度。

[0040] 本发明的主要创新之处在于:

[0041] 1、该试剂盒将化学发光技术与免疫磁微粒相结合,提供了一种接近均相的反应体系,并且采用了一步法反应模式,使得检测性能大大提高(灵敏度、精密性、检测范围等),反应时间大大缩短(从开始加样到检测结果,时间少于35min,明显快于同类试剂盒);

[0042] 2、发明了一种新的FITC抗体与磁微粒偶联方法,该方法偶联效率高,结合牢固,且

工艺稳定,在提高产品性能的同时,大大降低了产品成本。

[0043] 3、试剂盒中抗试剂A、抗试剂B、磁微粒试剂、校准品、质控品、发光底物液和浓缩洗液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。

附图说明

[0044] 附图用来提供对本发明的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与本发明的实施例一起用于解释本发明,并不构成对本发明的限制。在附图中:

[0045] 图1是本发明试剂盒与市售试剂盒A临床测定结果的对照图。

具体实施方式

[0046] 以下对本发明的优选实施例进行说明,应当理解,此处所描述的优选实施例仅用于说明和解释本发明,并不用于限定本发明。

[0047] 实施例

[0048] 1、样本采集

[0049] 采用正确医用技术收集尿样(严重血尿的样本不能用于测定),收集后的样本在室温放置不可超过8小时;如果不在8小时内检测需将样本放置于2-8℃的冰箱中;若需72小时以上保存或运输,则应冻存于-20℃以下,避免反复冻融。使用前回复到室温,轻轻摇动混匀。

[0050] 2、实验前准备

[0051] ①取一瓶浓缩洗液用蒸馏水进行15倍稀释;

[0052] ②将恒温箱或水浴锅温度调至37℃,待温度稳定后使用;

[0053] ③将磁微粒混悬液充分混匀至无肉眼可见沉淀。

[0054] 3实验方法

[0055] ①取出一定量的反应容器(平底试管),编号。根据实验要求分别加入15uL校准品/质控品/临床样本;

[0056] ②每孔分别加入抗试剂A 30uL、抗试剂B 30uL;

[0057] ③将反应容器内溶液混合均匀,37℃温育15分钟;

[0058] ④每孔分别加入摇匀的磁微粒试剂30uL;

[0059] ⑤将反应容器内溶液混合均匀,37℃温育5分钟;

[0060] ⑥取出反应容器,使用磁分离及洗涤设备,将反应容器中磁微粒用洗液洗涤3次;

[0061] ⑦洗涤完成后倒去洗液,每孔加发光底物液200uL,震荡;

[0062] ⑧化学发光检测仪器检测发光强度;

[0063] ⑨采用四参数拟合方式,以校准品浓度值为X轴,以校准品发光强度值为Y轴,建立定标曲线。根据待测样本的发光强度值回算相应的浓度值。

[0064] 将本发明试剂盒按照方法学鉴定,可达到如下指标:

[0065] 标准曲线线性: $R > 0.9900$ 最低检测限(如图1所示):

[0066] 最低检测限 $\leq 0.07\mu\text{g/mL}$ 。

[0067] 表1为临床标本的检测结果,可知本发明试剂盒的最低检测限为 $\leq 0.07\mu\text{g/mL}$,由表2临床标本检测结果的正确度可知本发明试剂盒的添加回收率为,85%-115%,由表3可

知,本 发明试剂盒的变异系数 $CV \leq 8\%$,由表4可知,本发明试剂盒的变异系数 $\leq 15\%$,由表5可知,本发明试剂盒的线性稀释: R 大于0.9900。

[0068] 表1:临床标本的检测结果

[0069]

最低检测限	校准品 A	RLU	校准品 A	RLU	校准品 A	RLU	校准品 A	RLU
	管 1	8823030	管 6	8730245	管 11	8613481	管 16	8736970
	管 2	8464306	管 7	8435375	管 12	8295268	管 17	8084047
	管 3	8413877	管 8	8367734	管 13	8284447	管 18	8375516
	管 4	8590982	管 9	8296948	管 14	8090541	管 19	8131605
	管 5	8153299	管 10	8305798	管 15	8216776	管 20	8302919
	平均值 M	8388914.39	RLU SD	221042.04	CV	2.63%	最低检测限	0.59

[0070] 表2:临床标本检测结果的正确度

准确度	参考物质	目标浓度 ug/ml	拟合浓度 ug/ml	RLU1	RLU2	AVERAGE	回收率	范围内?
(无国标品)	90B+10F	41.35	42.20	1258741	1211181	1234961	102%	是

[0072] 表3重复性质控品测定值

重复性质控品测定值	质控 1	RLU	浓度 $\mu\text{g/mL}$	质控 2	RLU	浓度 $\mu\text{g/mL}$	
	管 1	4181195	5.76	管 1	764526	111.05	
	管 2	3961817	6.51	管 2	783558	107.90	
	管 3	3996432	6.39	管 3	796306	105.86	
	管 4	4003387	6.36	管 4	799051	105.43	
	管 5	3998462	6.38	管 5	782989	107.99	
	管 6	3987471	6.42	管 6	793308	106.34	
	管 7	4187807	5.74	管 7	805566	104.41	
	管 8	4112218	5.99	管 8	792295	106.50	
	管 9	4080968	6.09	管 9	796376	105.85	
	管 10	4154766	5.85	管 10	807184	104.16	
	质控 1 拟合浓度 M		6.15	质控 2 拟合浓度 M		106.55	
	质控 1 拟合浓度 SD		0.30	质控 2 拟合浓度 SD		2.02	
	质控 1 拟合浓度 CV		4.83%	质控 2 拟合浓度 CV		1.89%	
	质控 1 拟合浓度偏差		2.5%	质控 1 拟合浓度偏差		6.55%	
范围内?		是	范围内?		是		

[0074] 表4本发明试剂盒的批间差

批间差	质控 1	RLU	浓度 $\mu\text{g/mL}$	质控 2	RLU	浓度 $\mu\text{g/mL}$
-----	------	-----	---------------------	------	-----	---------------------

[0076]

管 1	4181195	5.76	管 1	764526	111.05
管 2	3961817	6.51	管 2	783558	107.90
管 3	3996432	6.39	管 3	796306	105.86
管 4	4003387	6.36	管 4	799051	105.43
管 5	3998462	6.38	管 5	782989	107.99
管 6	3987471	6.42	管 6	793308	106.34
管 7	4187807	5.74	管 7	805566	104.41
管 8	4112218	5.99	管 8	792295	106.50
管 9	4080968	6.09	管 9	796376	105.85
管 10	4154766	5.85	管 10	807184	104.16
管 1	3940965	6.59	管 1	761673	111.53
管 2	4140191	5.89	管 2	785802	107.54
管 3	4031216	6.26	管 3	790103	106.85
管 4	3975204	6.46	管 4	806478	104.27
管 5	3955384	6.54	管 5	795379	106.01
管 6	3999876	6.37	管 6	769766	110.17
管 7	4052998	6.19	管 7	788657	107.08
管 8	4142739	5.89	管 8	778301	108.76
管 9	4078772	6.10	管 9	791601	106.61
管 10	4092412	6.05	管 10	768731	110.34
管 1	3951886	6.55	管 1	782931	108.00
管 2	3998799	6.38	管 2	796376	105.85
管 3	3953785	6.54	管 3	781146	108.29
管 4	3977072	6.46	管 4	808541	103.95
管 5	4004782	6.36	管 5	806904	104.21
管 6	4035105	6.25	管 6	805602	104.41
管 7	3933218	6.62	管 7	771441	109.89
管 8	4006326	6.35	管 8	799598	105.34
管 9	4002758	6.36	管 9	799892	105.30
管 10	4169606	5.80	管 10	796221	105.88
质控 1 拟合浓度 M		6.25	质控 2 拟合浓度 M		106.86
质控 1 拟合浓度 SD		0.27	质控 2 拟合浓度 SD		2.16
质控 1 拟合浓度 CV		4.30%	质控 2 拟合浓度 CV		2.02%
质控 1 拟合浓度偏差		0.22%	质控 1 拟合浓度偏差		6.86%
范围内?		是	范围内?		是

[0077] 表5本发明试剂盒的线性稀释率

[0078]

	稀释比例	浓度 µg/ml	RLU1	RLU2	RLU3	AVERAGE	相关系数 r	范围内?
线性	1	400	88388	87201	89520	88369.67	R=0.9985	是
	1/2	200	415148	402514	409880	409180.7		
	1/8	50	1372574	1398025	1381201	1383933		
	1/32	12.5	2931629	2998520	3060201	2996783		
	1/128	3.125	5419116	5596020	5499014	5504717		
	1/512	0.78	9267022	9302014	9362015	9310350		

[0079] 将120份血清样本测值与市售尿微量白蛋白检测试剂盒A对比,比较本发明试剂盒与市售尿微量白蛋白试剂盒检测结果的相关性。结果见表6,附图1中显示本发明的试剂盒与市售尿微量白蛋白检测试剂盒A对照的线性方程为 $y=1.011x-2.683$, $R=0.9972$

[0080] 表6本发明的试剂盒与市售尿微量白蛋白检测试剂盒A对照

[0081]

序号	试剂盒 A	比对结果	序号	试剂盒 A	比对结果	序号	试剂盒 A	比对结果
1	35.10	28.29	41	2.56	2.48	81	16	12.53

2	50.10	36.34	42	15.60	11.83	82	10.2	8.79
3	300.00	300.00	43	127.00	108.41	83	6.9	5.30
4	334.00	323.93	44	24.42	29.28	84	6.19	4.51
5	27.90	18.26	45	190.00	200.00	85	53.2	59.74
6	11.20	8.50	46	314.00	285.34	86	193	183.17
7	16.00	11.54	47	4.98	3.82	87	34.24	37.67
8	382.00	392.90	48	305.00	318.75	88	56.40	56.77
9	85.40	80.00	49	2.69	2.30	89	20.00	20.58
10	49.20	31.56	50	5.57	4.18	90	28.60	37.65
11	311.00	310.00	51	269.00	250.00	91	12.50	14.01
12	11.00	7.28	52	52.40	42.04	92	19.60	25.58
13	18.20	13.63	53	56.70	51.14	93	2.77	2.37
14	55.70	39.77	54	27.20	20.83	94	6.85	7.25
15	7.64	5.62	55	56.20	50.79	95	11.50	8.05
16	2.50	1.70	56	378.00	400.00	96	2.10	3.43
17	4.57	3.71	57	12.60	11.44	97	5.60	9.32
18	254.80	258.57	58	21.90	18.33	98	4.00	4.26
19	3.43	2.29	59	252.00	213.57	99	5.50	3.82
20	332.00	348.96	60	376.00	400.00	100	153.00	147.29
[0082] 21	18.50	12.41	61	343.00	336.46	101	8.83	6.41
22	368.00	331.79	62	400.00	400.00	102	5.63	4.78
23	24.10	20.33	63	79.70	71.91	103	62.00	60.00
24	21.20	16.80	64	247.00	238.74	104	175.00	187.67
25	1.39	6.14	65	34.50	32.52	105	29.30	21.34
26	338.00	335.22	66	2.93	3.17	106	2.98	2.93
27	41.10	31.85	67	2.50	1.04	107	13.20	11.37
28	74.90	67.07	68	2.50	1.55	108	232.00	240.10
29	277.00	300	69	191.00	184.63	109	3.78	2.07
30	4.53	3.54	70	23.20	19.65	110	2.50	1.92
31	8.27	6.49	71	11.70	8.44	111	2.64	2.62
32	303.00	300.00	72	323.00	320.00	112	5.25	4.96
33	15.10	10.23	73	7.35	5.00	113	218.00	220.00
34	8.97	8.08	74	400.00	400.00	114	4.08	3.94
35	8.55	14.21	75	2.74	2.62	115	7.17	6.37
36	50.50	34.50	76	50.21	52.01	116	363.00	380.00
37	358.00	400.00	77	282.00	286.55	117	25.33	27.02
38	2.50	1.48	78	131.00	86.24	118	3.42	3.66
39	35.10	28.29	79	270.00	260.00	119	5.33	6.01
40	50.10	36.34	80	42.00	30.15	120	99.01	100.35

[0083] 最后应说明的是：以上所述仅为本发明的优选实施例而已，并不用于限制本发明，尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明，对于本领域的技术人员来说，其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分技术特征进行等同替换。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。

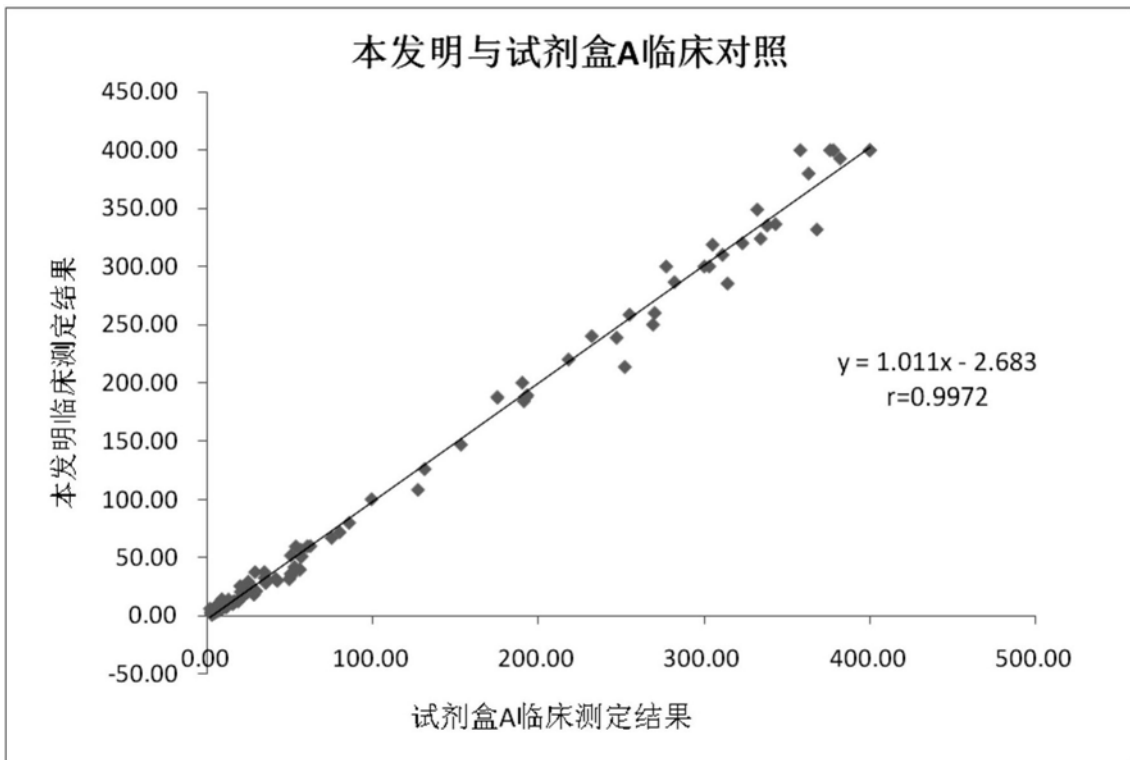


图1

专利名称(译)	一种检测血清中尿微量白蛋白含量的试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN108196043A	公开(公告)日	2018-06-22
申请号	CN201711218422.6	申请日	2017-11-28
[标]申请(专利权)人(译)	泰州泽成生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	泰州泽成生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	泰州泽成生物技术有限公司		
[标]发明人	刘振世 季连星 孔晓凯 王赞 石慧 赵颢		
发明人	刘振世 季连星 孔晓凯 王赞 石慧 赵颢		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/543 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/54326 G01N33/558		
代理人(译)	黄冠华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测血清中尿微量白蛋白含量的试剂盒，包括抗试剂A、抗试剂B、磁微粒试剂、校准品、质控品、发光底物液；抗试剂A是碱性磷酸酶标记的尿微量白蛋白衍生物；抗试剂B是FITC标记的尿微量白蛋白多克隆抗体，磁微粒试剂是包被有FITC抗体的羧基磁微粒混，同时还公开了该试剂盒的制备方法。该试剂盒将化学发光技术与免疫磁微粒相结合，提供了一种接近均相的反应体系，并且采用了一步法反应模式，使得检测性能大大提高(灵敏度、精密性、检测范围等)，反应时间大大缩短，从开始加样到检测结果，时间少于35min,明显快于同类试剂盒)；偶联效率高，结合牢固，且工艺稳定，在提高产品性能的同时，大大降低了产品成本。

