



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110632294 A

(43)申请公布日 2019. 12. 31

(21)申请号 201910916308.3

(22)申请日 2019.09.26

(71)申请人 北京丹大生物技术有限公司
地址 100190 北京市通州区中关村科技园
区通州园光机电一体化产业基地嘉创
路5号1号楼301-303室

(72)发明人 周建平 王艳新 周裕军

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
代理人 瞿晓晶

(51) Int. Cl.
G01N 33/543(2006.01)
G01N 33/533(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/577(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称
一种快速检测样品中镉含量的试剂盒

(57)摘要
本发明涉及一种快速检测样品中镉含量的检测试剂盒,属于医学体外免疫检测技术领域。本发明所述试剂盒包括检测卡及质控品;所述检测卡包括底板及位于底板表面的,从加样端起顺序排列的样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸。本发明所述试剂盒具有检测仪器成本低,操作简便,快速,可常温储存运输,实现单人份包装且稳定性好的优点。



1. 一种快速检测样品中镉含量的试剂盒,所述试剂盒包括检测卡及质控品;所述检测卡包括底板及位于底板表面的,从加样端起顺序排列的样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸;

所述样品垫经样品垫处理缓冲液浸泡处理,所述样品垫处理缓冲液包括活性蛋白和表面活性剂;

所述硝酸纤维素膜上包被有:镉特异抗体与荧光微球的偶联物和鸡IgY抗体与荧光微球的偶联物;

所述硝酸纤维素膜上划有检测限和质控线,所述检测线包被有镉偶联半抗原,所述质控线包被有羊抗鸡IgY抗体。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述样品垫处理缓冲液以磷酸缓冲液、TRIS盐酸缓冲液和甘氨酸缓冲液中的一种或多种为基础缓冲液。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述活性蛋白包括牛血清白蛋白、酪蛋白和卵清蛋白中的一种或几种。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述表面活性剂包括吐温20、月桂醚Brij35、Triton-100中的一种或几种。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述镉特异抗体与荧光微球的偶联物和鸡IgY抗体与荧光微球的偶联物的混合体积比为(4~6):1。

6. 根据权利要求1或5所述的试剂盒,其特征在于,所述荧光微球的粒径为100~200nm,采用荧光分光光度仪测定的Ex激发波长Ex为365nm;发射波长Em为610nm。

7. 根据权利要求1或5所述的试剂盒,其特征在于,所述镉特异抗体与荧光微球的偶联物中的镉特异抗体为镉特异鼠单克隆抗体。

8. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述硝酸纤维素膜的制备方法包括:将硝酸纤维素膜在重悬缓冲液中浸泡2~3h、烘干1~2h,得到预处理的硝酸纤维素膜;将镉特异抗体与荧光微球的偶联物和鸡IgY抗体与荧光微球的偶联物分别溶解于重悬缓冲液,喷涂至预处理的硝酸纤维素膜上,烘干;所述重悬缓冲液以pH值为8.5~9.6、50~200mM的碳酸盐缓冲液、TRIS盐酸缓冲液和甘氨酸缓冲液中的一种或多种为基础缓冲液,还包括0.1~1.0g/L的蔗糖、0.1~4g/L的甘露醇和质量百分含量为0.1%的SDS。

9. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述质控品为含镉的缓冲液,所述缓冲液包括以下组分:0.5mmol/L的硝酸缓冲液、质量体积比为0.1%的Tween20、质量百分含量为0.5%的牛血清白蛋白、质量百分含量为0.1%的Proclin300,溶剂为水,pH值为5.2。

10. 根据权利要求1或9所述的试剂盒,其特征在于,所述质控品冻干后保存,所述冻干用冻干缓冲液以pH值为5.2~5.4的硝酸盐缓冲液为基础缓冲液,还包括3~8g/L蔗糖、5~20g/L甘露醇和质量百分含量为0.1%的Proclin300。

一种快速检测样品中镉含量的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及医学免疫体外检测技术领域,具体涉及一种快速检测样品中镉含量的检测试剂盒。

背景技术

[0002] 镉是stromcyer于1817年发现的一种对人体有极大危害的重金属,主要通过食物链在体内富集。镉在人体内长期积累会引起肾小管损伤,影响磷、钙与维生素D的吸收,引发骨质疏松、骨软化和骨折,改变大脑中枢系统的形态学,干扰铁在体内的正常代谢,诱发癌症,损伤雄性生殖系统,影响生育。随着近年来工农业的迅猛发展,环境中重金属污染日趋严重。而对重金属检测分析的质量和速度要求越来越高。

[0003] 目前在我国30个省、市医疗机构临床检验中大范围使用钨舟铅镉元素分析仪测定血镉,此仪器是以钨舟为原子化器(北京博晖创新光电技术股份有限公司),专门检测血镉的原子吸收光谱仪。通过电加热使钨舟内的被测样品原子化,产生大量基态自由原子,从而吸收由空心阴极灯发射出的被测元素的特征谱线,完成测量过程。原子化池透镜玻璃罩会因烟雾吸附而引起污染此时因电磁阀的震动,可能会使污染物掉入钨舟而引起误差,因此大量连续检测时应根据情况随时停下来清理,尤其是大量测定含镉高的样本时。随着钨舟使用次数的增加钨舟逐渐变薄,工作中会因升温过高过快有可能引起样本的飞溅从而导致检测结果的误差,因此当钨舟使用超过10次时,钨舟温度应重新调整或更换新钨舟,同时重做标准曲线;随着元素灯的使用,其发光强度会逐渐降低,稳定性也可能降低,因此不宜做完标准曲线后连续使用次数太多,应每隔10人份即应加入国家标准物质对其灵敏度进行监控,若灵敏度下降或能量值不稳定,应重做标准曲线或更换元素灯。此方法检测存在不能高通量检测样本,需频繁更换元素灯,检测成本高,操作繁琐的缺点。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种快速检测样品中镉含量的检测试剂盒。本发明所述试剂盒具有检测仪器成本低,检测速度快,操作简便,快速,可实现高通量,可常温储存运输,实现单人份包装且稳定性好的优点。

[0005] 本发明提供了一种快速检测样品中镉含量的试剂盒,所述试剂盒包括检测卡及质控品;所述检测卡包括底板及位于底板表面的,从加样端起顺序排列的样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸;

[0006] 所述样品垫经样品垫处理缓冲液浸泡处理,所述样品垫处理缓冲液包括活性蛋白和表面活性剂;

[0007] 所述玻璃纤维膜上包被有:镉特异抗体与荧光微球的偶联物和鸡IgY抗体与荧光微球的偶联物;

[0008] 所述硝酸纤维素膜上划有检测限和质控线,所述检测线包被有镉偶联半抗原,所述质控线包被有羊抗鸡IgY抗体。

[0009] 优选的是,所述样品垫处理缓冲液以磷酸缓冲液、TRIS盐酸缓冲液和甘氨酸缓冲液中的一种或多种为基础缓冲液。

[0010] 优选的是,所述活性蛋白包括牛血清白蛋白、酪蛋白和卵清蛋白中的一种或几种。

[0011] 优选的是,所述表面活性剂包括吐温20、月桂醚Brij35、Txiton-100中的一种或几种。

[0012] 优选的是,所述镉特异抗体与荧光微球的偶联物和鸡IgY抗体与荧光微球的偶联物的混合体积比为(4~6):1。

[0013] 优选的是,所述荧光微球的粒径为100~200nm,采用荧光分光光度仪测定的Ex激发波长Ex为365nm;发射波长Em为610nm。

[0014] 优选的是,所述镉特异抗体与荧光微球的偶联物中的镉特异抗体为镉特异鼠单克隆抗体。

[0015] 优选的是,所述玻璃纤维素膜的制备方法包括:将玻璃纤维素膜在重悬缓冲液中浸泡2~3h、烘干1~2h,得到预处理的玻璃纤维素膜;将镉特异抗体与荧光微球的偶联物和鸡IgY抗体与荧光微球的偶联物分别溶解于重悬缓冲液,喷涂至预处理的玻璃纤维素膜上,烘干;所述重悬缓冲液以pH值为8.5~9.6、50~200mM的碳酸盐缓冲液、TRIS盐酸缓冲液和甘氨酸缓冲液中的一种或多种为基础缓冲液,还包括0.1~1.0g/L的蔗糖、0.1~4g/L的甘露醇和质量百分含量为0.1%的SDS。

[0016] 优选的是,所述质控品为含镉的缓冲液,所述缓冲液包括以下组分:0.5mmol/L的硝酸缓冲液、质量体积比为0.1%的Tween20、质量百分含量为0.5%的牛血清白蛋白、质量百分含量为0.1%的Proclin300,溶剂为水,pH值为5.2。

[0017] 优选的是,所述质控品冻干后保存,所述冻干用冻干缓冲液以pH值为5.2~5.4的硝酸盐缓冲液为基础缓冲液,还包括3~8g/L蔗糖、5~20g/L甘露醇和质量百分含量为0.1%的Proclin300。

[0018] 本发明提供了一种快速检测样品中镉含量的检测试剂盒。本发明提供了一种全新的免疫层析方法实现重金属镉的检测,具有检测仪器成本低,操作简便,快速,可常温储存运输,实现单人份包装且稳定性好的优点。对比石墨炉原子吸收光谱测定法,其基体干扰较大且价格昂贵,对实验条件要求严格需要大电流、高电压石墨管为消耗品易损坏,本发明试剂盒应用免疫层析方法,检测快速仅需15min,检测仪器成本低,操作简单,试剂可常温储存;对比生物传感器法,本发明试剂盒的优点为检测仪器成本低,操作简便,快速试剂可常温储存,单人份包装,样本类型为血清、尿液,稳定性好,灵敏度高;对比指示生物法,本发明试剂盒的优点为较高的特异性和灵敏度高;对比酶分析法,本发明试剂盒的优点为较高的特异性和选择性;对比ELISA免疫检测法,本发明试剂盒的优点为检测仪器成本低,操作简便,快速试剂可常温储存,单人份包装,样本类型为血清、尿液,稳定性好,灵敏度高;对比钨舟原子吸收光谱法检测全血中镉元素的方法(北京博晖创新光电技术股份有限公司,授权公告号CN101592597A),原理是通过电加热使钨舟内的被测样品原子化,产生大量基态自由原子,从而吸收由空心阴极灯发射出的被测元素的特征谱线,完成测量过程,本发明试剂盒的优点为免疫层析方法检测血清、尿液的镉元素的含量,检测仪器成本低,可常温储存运输,实现高通量检测,单人份包装。

附图说明

- [0019] 图1为本发明实施例1提供的定标曲线图；
[0020] 图2为本发明比较例1提供的试剂相关性图；
[0021] 图3为本发明提供的试剂盒中检测卡的结构示意图。

具体实施方式

[0022] 本发明提供了一种快速检测样品中镉含量的试剂盒,所述试剂盒包括检测卡及质控品;所述检测卡包括底板及位于底板表面的,从加样端起顺序排列的样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸。本发明所述检测卡如图3所示,其中,1为硝酸纤维素膜,具体为包被NC膜;2为底板,具体为PVC板;3为玻璃纤维膜,具体为微球垫;4为样品垫;5为吸水纸。

[0023] 在本发明中,所述样品垫经样品垫处理缓冲液浸泡处理,所述样品垫处理缓冲液包括活性蛋白和表面活性剂。经样品垫处理缓冲液浸泡处理后,能够减少样品垫对样品的吸附。在本发明中,所述样品垫处理缓冲液以磷酸缓冲液、TRIS盐酸缓冲液和甘氨酸缓冲液中的一种或多种为基础缓冲液。本发明所述样品垫处理缓冲液的使用能够使样品垫保持适当的离子强度,来应对离子强度比较高的样本,纠正个体样本间pH的差异。在本发明中,所述活性蛋白包括牛血清白蛋白、酪蛋白和卵清蛋白中的一种或几种。本发明所述活性蛋白的添加能够封闭样品垫上的活性位点,保证目标检测物都流走充分参与反应。在本发明中,所述表面活性剂包括吐温20、月桂醚Brij35、Txiton-100中的一种或几种。本发明所述表面活性剂能够提高金属离子测定的检测限和灵敏度,增加特异性。在本发明中,所述浸泡处理的时间优选为1~2h,更优选为2h。本发明浸泡处理后,优选将样品垫进行干燥处理,优选于37℃下进行烘干。本发明对样品垫处理缓冲液中各组分的来源没有特殊限定,采用本领域技术人员熟知的常规市售产品即可。

[0024] 在本发明中,所述硝酸纤维素膜上包被有:镉特异抗体与荧光微球的偶联物和鸡IgY抗体与荧光微球的偶联物。在本发明中,所述镉特异抗体与荧光微球的偶联物对样品中重金属镉有特异性识别作用,与镉能够形成免疫复合物,且该免疫复合物沿着硝酸纤维素膜层析至检测区(T),与预包被的镉偶联半抗原结合,其荧光强度与样本中的Cd含量成反比。鸡IgY抗体与荧光微球的偶联物层析至质控区(C),与预包被的羊抗鸡IgY结合。在本发明中,所述镉特异抗体与荧光微球的偶联物和鸡IgY抗体与荧光微球的偶联物的混合体积比优选为4~6:1,更优选为5:1。本发明所述镉特异抗体与荧光微球的偶联物和鸡IgY抗体与荧光微球的偶联物在喷涂至硝酸纤维素膜前,优选调整总质量浓度为0.2%。在本发明中,所述荧光微球的粒径优选为100~200nm,更优选为100nm,采用荧光分光光度仪测定的Ex激发波长Ex为365nm;发射波长Em为610nm。在本发明中,所述荧光微球具有激发和接受波长差距大、干扰性小、检测灵敏度高和重复性好的优点。本发明所述荧光微球优选为常规市售产品。本发明所述镉特异抗体与荧光微球的偶联物和鸡IgY抗体与荧光微球的偶联物的偶联制备方法优选为常规方法。具体的在本发明中,所述镉特异抗体与荧光微球的偶联物和鸡IgY抗体与荧光微球的偶联物的制备方法如下:取两个管①管加入1%荧光微球,EDC10mg/ml,镉特异抗体2~10ug/ml,混匀偶联2小时,8000~14000r/min的速度离心30min,除去上清液,重复操作两次,再加入1%BSA封闭1小时;②管加1%荧光微球,EDC10mg/ml,加入鸡IgY抗体50ug混匀偶联2h,8000~14000r/min的速度离心30min,除去上

清液,重复操作两次,再加入1%BSA封闭1小时。在本发明中,所述镉特异抗体与荧光微球的偶联物中的镉特异抗体为镉特异鼠单克隆抗体。在本发明中,所述镉特异鼠单克隆抗体的制备方法优选包括以下步骤:1.对小鼠注射抗原蛋白(优选为镉偶联牛血清白蛋白),使小鼠产生免疫反应;2.得到相应的B淋巴细胞;3.将小鼠骨髓瘤细胞与B淋巴细胞融合,再用选择培养基(HAT和HT)进行筛选;4.筛选后细胞为单克隆细胞,既能大量繁殖又能产生专一的抗体;5.对上述杂交瘤细胞进行单克隆化培养和抗体检测,多次筛选后,可以获得稳定分泌单克隆抗体的细胞;6.将杂交瘤细胞在体外大规模培养或注射入小鼠腹腔中进行增殖,产生腹水,纯化后获得大量镉特异鼠单克隆抗体。

[0025] 在本发明中,所述玻璃纤维素膜的制备方法优选包括:将玻璃纤维素膜在重悬缓冲液中浸泡2~3h、烘干1~2h,得到预处理的玻璃纤维素膜;将镉特异抗体与荧光微球的偶联物和鸡IgY抗体与荧光微球的偶联物分别溶解于重悬缓冲液,喷涂至预处理的玻璃纤维素膜上,烘干;所述重悬缓冲液以pH值为8.5~9.6、50~200mM的碳酸盐缓冲液、TRIS盐酸缓冲液和甘氨酸缓冲液中的一种或多种为基础缓冲液,还包括0.1~1.0g/L的蔗糖、0.1~4g/L的甘露醇和质量百分含量为0.1%的SDS。在本发明中,所述重悬缓冲液能够去除未偶联上的蛋白,重悬缓冲液提供合适的pH及离子强度环境,保证最终抗体微球偶联物的活性及抗体不易脱落。在本发明中,所述烘干优选为在45~65℃下烘干2~6h。

[0026] 在本发明中,所述硝酸纤维素膜上划有检测限和质控线,所述检测线包被有镉偶联半抗原,所述质控线包被有羊抗鸡IgY抗体。在本发明中,所述检测线位于离加样端较近的一侧,质控线位于离加样端较远的一侧。在本发明中,所述镉偶联半抗原优选为镉偶联牛血清白蛋白,或镉偶联卵清蛋白。在本发明中,所述镉偶联半抗原的浓度优选为1~4mg/mL,更优选为2mg/mL。本发明对所述镉偶联半抗原的来源没有特殊限定,可以是常规市售产品,如购自北京德奥平生物技术有限公司。在本发明中,所述羊抗鸡IgY抗体的浓度优选为0.5~2mg/mL,更优选为1.5mg/mL。本发明通过在硝酸纤维素膜上分别在检测线位置和质控线位置划膜镉偶联半抗原和羊抗鸡IgY抗体,划膜完成后,本发明优选在45~65℃干燥2~6h。

[0027] 在本发明中,所述质控品为含镉的缓冲液,所述缓冲液能够保证硝酸镉的稳定性避免析出,所述缓冲液优选包括以下组分:0.5mmol/L的硝酸缓冲液、质量体积比为0.1%的Tween20、质量百分含量为0.5%的牛血清白蛋白、质量百分含量为0.1%的Proclin300(防腐剂),溶剂为水,pH值为5.2。本发明所述pH值的选择能够稳定质控品,抑制硝酸镉水解。在本发明中,所述质控品优选冻干后保存,所述冻干用冻干缓冲液以pH值为5.2~5.4的硝酸盐缓冲液为基础缓冲液,还包括3~8g/L蔗糖、5~20g/L甘露醇和质量百分含量为0.1%的Proclin300。本发明所述冻干缓冲液能够保证冻干后成品的稳定性。在本发明中,所述冻干优选为真空冻干,所述真空冻干的时间优选为12~18h。本发明对pH调节方法没有特殊限定,采用本领域技术内容也算熟知的常规pH值调节剂进行调节即可。本发明优选使用制备得到的检测卡,对质控品进行定值,赋值后,再分别进行冻干,制得不同浓度的质控品,便于后续样品的检测。具体的,本发明优选根据国家标准物质进行溯源赋值的校准品,进行质控品浓度定值,不同的浓度配置成冻干缓冲液,真空冻干12~18小时,得到质控品。

[0028] 本发明所述检测卡还包括吸水纸,本发明对所述吸水纸没有特殊限定,采用常规检测卡用市售吸水纸即可。

[0029] 得到样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸后,本发明优选按照常规方法进

行检测卡的制备。如将样品垫,烘干的玻璃纤维膜,烘干的硝酸纤维素膜、吸水纸依次黏贴在底板上;然后切条、装壳过程,即将试剂大板进行裁切,然后装入试剂卡中,加入干燥剂及铝箔袋封口,得到检测卡。

[0030] 在本发明中,所述检测卡优选还包括卡壳,所述卡壳还包括背卡和上盖,所述背卡设有检测卡卡槽,所述检测卡嵌于所述检测卡卡槽内,所述上盖设有测试窗和加样孔,所述测试窗的位置与所述检测线和质控线的位置相配合,所述加样孔的位置与样品垫的位置相配合。在本发明中,所述卡壳优选为塑料卡壳。

[0031] 在本发明中,所述试剂盒能够检测的样品包括血液样本和尿液样本。当所述样品为血液时,所述试剂盒优选还包括滤血膜。本发明对所述滤血膜的来源没有特殊限定,采用本领域技术人员熟知的常规滤血膜市售产品即可。本发明所述试剂盒的检测方法优选包括以下步骤:取样移液器取100u1血清样本加缓冲液中充分混匀,室温静置5min,取上清。加样:从包装袋中取出试纸卡,用移液器取80u1稀释后的上述样本加到试纸卡的加样孔中。测试。加样后室温静置15min将试纸条放入干式荧光免疫定量分析仪中读取数据。请严格控制时间15min。干式荧光免疫定量分析仪对光学信号进行测量和分析处理,定量得出被测物质的浓度。

[0032] 本发明所述试剂盒应用竞争性免疫层析检测的原理,优选配套免疫定量分析仪使用,标本中的镉与包被在玻璃纤维上的镉特异抗体与荧光微球的偶联物结合,形成“荧光颗粒-抗体-抗原”的免疫复合物,所述免疫复合物再沿着硝酸纤维素膜层析至检测区(T),与检测线上预包被的镉偶联半抗原结合,其荧光强度与样本中的镉含量成反比。鸡IgY抗体与荧光微球的偶联物层析至质控区(C),与质控线上预包被的羊抗鸡IgY抗体结合。免疫分析仪通过采集检测线(T)和质控线(C)条带荧光信号计算T/C信号值,与标准曲线比较即可获得检测样品中的重金属镉的含量。因此,随着样本中的重金属镉残留浓度的增加,检测线显色因受到抑制而逐渐变浅;由于质控线上含羊抗鸡IgY抗体,识别并结合羊抗鸡IgY抗体,因此,无论样本中是否含有重金属镉,对照线都将显色,以示检测产品结果有效。

[0033] 下面结合具体实施例对本发明所述的一种快速检测样品中镉含量的检测试剂盒做进一步详细的介绍,本发明的技术方案包括但不限于以下实施例。

[0034] 实施例1

[0035] 试剂卡的制备:

[0036] 取两个管①管加入1%的100nm荧光微球,EDC10mg/ml,镉特异抗体2.5ug/ml,混匀偶联2小时,8000~14000r/min的速度离心30min,除去上清液,重复操作两次,再加入1%BSA封闭1小时。②管加1%荧光微球EDC10mg/ml,加入鸡IgY抗体50ug混匀偶联2h,8000~14000r/min的速度离心30min,除去上清液,重复操作两次,再加入1%BSA封闭1小时;将制得的标记偶联物离心,使用重悬缓冲液1000mmol tris盐酸缓冲液pH=8.0,蔗糖0.5g/L,甘露醇2g/L,SDS 0.1%;将①和②重悬5:1(体积比)混合,玻璃纤维膜使用重悬缓冲液浸泡2小时后,烘干1小时;使用喷金划膜仪,将含标记的偶联物重悬液喷膜至烘干后的玻璃纤维膜,喷金完成后65℃鼓风干燥箱,烘干2小时;

[0037] 将硝酸纤维素膜(NC膜)裁剪成30~31cm/条。取2个的离心管,标记为C和T,C用于羊抗鸡IgY抗体用包被液的配制,T用于镉偶联半抗原包被液的配制;向T离心管中加入0.8mg/L的镉偶联半抗原(镉-BSA包被抗原),用包被液(50mmol的磷酸盐缓冲液,pH为8.0)

加体积百分比为0.1%的Proclin300防腐剂混匀稀释,至镉偶联BSA(购自北京德奥平生物技术有限公司)浓度为1mg/ml;向C离心管中加入0.8mg/L的羊抗鸡IgY抗体,然后加入包被液,混匀稀释,至羊抗鸡IgY抗体浓度为1mg/ml;在硝酸纤维素膜上分别在T线位置和C线位置划膜偶联物及质控线,划膜完成后65℃鼓风干燥箱,烘干2小时;

[0038] 将样品垫,滤血膜,烘干的玻璃纤维素膜,烘干的硝酸纤维素膜、吸水纸依次黏贴在底板上;将试剂大板进行裁切,然后装入试剂卡中,加入干燥剂及铝箔袋封口,得到检测试纸条;

[0039] 校准曲线制备:

[0040] 分别将浓度为0,12.5,25,50,100,200ng/ml的质控品滴加至检测卡,每个浓度设置3个重复卡,混匀后,静置层析15min后,使用免疫荧光分析仪读取荧光信号值,并计算T/C值,建立定标曲线(图1),其中X轴为质控品浓度,Y轴为T/C值。

[0041] 样本重复性检测:

[0042] 将检测样本滴加于上样孔,每个样品设置10个重复,检测样本为血清样本,由于无法获得天然高值样本,故高值样本为临床血清样本中添加硝酸镉纯品获得。具体检测不同浓度样本数据如表1所示:

[0043] 表1不同浓度样本重复性

样 本 编 号	样本浓度 (ug/ml)										平均值	标准差	CV
	测 定 1	测 定 2	测 定 3	测 定 4	测 定 5	测 定 6	测 定 7	测 定 8	测 定 9	测 定 10			
1	2	2.2	1.9	1.8	2.4	2.6	1.9	1.8	2.5	1.9	2.1	0.301846	14.37%
2	5	4.9	4.8	5.2	3.9	4.8	4.6	5.3	5.7	4.8	4.91111111	0.50111	10.20%
3	10	11.2	10.3	11.5	12.2	9.8	9.4	12.1	10.3	10.5	10.73	0.968447	9.03%
4	15	16.3	15.3	13.8	15.6	16.4	17.2	15.6	18.1	15.3	15.8375	0.734725	4.64%
5	23	24.7	19.9	23.4	25.6	19.9	25.8	25.9	23.4	26.2	23.78	2.347481	9.87%
6	35	36.7	39.8	32.1	30.2	37.6	32.4	30.4	29.5	35.6	33.93	3.515379	10.36%
7	57	55.6	57.3	57.8	58.9	51.3	50.8	49.1	53.2	56.1	54.71	3.373903	6.17%
8	68	65.4	67.2	68.3	70.1	72.1	69.8	63.2	66.9	65.1	67.61	2.647619	3.92%
9	80	79.9	89.1	82.3	87.5	88.8	84.5	79.8	84.2	86.4	84.25	3.652473	4.34%
10	100	99.3	98.4	89.6	101.1	98	95.4	89.9	94.5	99.3	96.55	4.100203	4.25%

[0044]

[0045] 由表1可见,测试整个线性范围内不同浓度的样本,检测结果CV均小于15%,重复性较好,满足测试需求。

[0046] 在[2,200]ng/mL内检测不同浓度样本,结果如下:

[0047] 用接近线性区间上限的高浓度样本和样本稀释液按一定比例混合成至少5个稀释浓度,每个稀释测试3次,分别求出每个稀释检测结果的均值。计算线性回归的相关系数(r)

[0048] 表2在[2,200]ng/mL内检测线性

[0049] 线性比例	2	10	50	100	200
测得值1	2.2	12.1	49.8	100.2	198.3
测得值2	2.4	10.2	52.3	123.3	201.0
测得值3	1.9	13.4	48.9	118.9	212.3
平均值	2.2	11.9	50.3	114.1	203.9
理论值	4.09	12.32	53.45	104.86	207.68
相对偏差	-47.04%	-3.39%	-5.83%	8.84%	-1.84%
绝对偏差	1.92	0.42	3.11	9.27	3.82
相关系数r	0.99796				

[0050] 由表2可知,相关系数大于0.99,符合要求。

[0051] 在正常样本(C₀)中加入接近线性高值(200μg/mL,相对偏差在±10%内)的硝酸镉纯品配制标准溶液,所加入样品C_S与临床样本C₀之间的体积比例为1:19,配制成样本C,分别测量样本C₀和样本C,各测量3次后计算平均值,根据公式(1)计算回收率。

[0052]
$$R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{V \times C_S} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

[0053] 式中:R—回收率

[0054] V—加入样品体积

[0055] V₀—正常样本的体积

[0056] C—混合后的测定浓度

[0057] C₀—正常样本的测定浓度

[0058] C_S—加入样品的浓度

[0059] 表3回收率数据

[0060]		血	混	高
1		7.8	20.1	208.1
2		8.2	18.9	212.2
3		8.6	19.3	198.3
平均值		8.2	19.4	206.2
稀释比例		19	20	1
回收率		113%		

[0061] 由表3可知,回收率在85~115%之间符合要求。由此处得到的试剂准确度复合要求。

[0062] 实施例2

[0063] 试剂卡的制备:

[0064] 取两个管①管加入120nm的1%荧光微球,EDC10mg/ml,镉特异抗体1.5ug/ml,混匀偶联2小时,8000~14000r/min的速度离心30min,除去上清液,重复操作两次,再加入1%BSA封闭1小时。②管加1%荧光微球EDC10mg/ml,加入鸡IgY抗体50ug混匀偶联2h,8000~14000r/min的速度离心30min,除去上清液,重复操作两次,再加入1%BSA封闭1小时;将制

得的标记偶联物离心,使用重悬缓冲液50mmol碳酸盐缓冲液PH=8.5,蔗糖1.0g/L,甘露醇4g/L,SDS 0.1%;重悬5:1混合,玻璃纤维素膜使用重悬缓冲液浸泡2小时后,烘干1小时;使用喷金划膜仪,将含标记的偶联物重悬液喷膜至烘干后的玻璃纤维素膜,喷金完成后65℃鼓风干燥箱,烘干2小时;

[0065] T线为镉偶联BSA浓度为1mg/ml;C线为羊抗鸡IgY抗体,浓度为1mg/ml;在硝酸纤维素膜上分别在T线位置和C线位置划膜偶联物及质控线,划膜完成后65℃鼓风干燥箱,烘干2小时;

[0066] 将样品垫,滤血膜,烘干的金标垫,烘干的硝酸纤维素膜、吸水纸依次黏贴在底板上;将试剂大板进行裁切,然后装入试剂卡中,加入干燥剂及铝箔袋封口,得到检测试纸条;

[0067] 校准曲线制备:

[0068] 分别将浓度为0,12.5,25,50,100,200ng/ml的质控品滴加至检测卡,每个浓度设置3个重复卡,混匀后,静置层析15min后,使用免疫荧光分析仪读取荧光信号值,并计算T/C值,建立定标曲线,其中X轴为质控品浓度,Y轴为T/C值。

[0069] 校准曲线制备同实施例1。

[0070] 重复检测两水平的质控品的重复性:

[0071] 表4两水平质控品重复性

质控	样本浓度 (ng/ml)										平均值	标准差	CV
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
[0072] 1	62.5	65.9	60	67	56	68	58	62.9	60.5	73	63.28	5.188	8.2%
2	119	130	126	100	123	131	133	117	125	127	123.2	9.481	7.7%

[0073] 用接近线性区间上限的高浓度样本和样本稀释液按一定比例混合成至少5个稀释浓度,每个稀释测试3次,分别求出每个稀释检测结果的均值。计算线性回归的相关系数(r)

[0074] 表5线性范围内不同水平检测

[0075] 线性比例	2	10	50	100	200
测得值1	1.8	11.2	51.2	98.3	187.9
测得值2	2.5	12.8	48.9	113.2	198.3
测得值3	2.1	12.1	50.8	123.2	208.3
平均值	2.1	12.0	50.3	111.6	198.2
理论值	4.59	12.58	52.49	102.38	202.16
相对偏差	-53.56%	-4.32%	-4.17%	8.97%	-1.98%
绝对偏差	2.46	0.54	2.19	9.19	3.99
相关系数r	0.99789				

[0076] 相关系数大于0.99符合要求。

[0077] 比较例1

[0078] 目前在我国30个省、市医疗机构临床检验中大范围使用,此仪器是以钨舟为原子化器(北京博晖创新光电技术股份有限公司),专门检测血镉的原子吸收光谱仪。通过电加热使钨舟内的被测样品原子化,产生大量基态自由原子,从而吸收由空心阴极灯发射出的

被测元素的特征谱线,完成测量过程。钨舟使用时间不可太久,一般200次左右就会出现积碳现象,影响加样的准确性。不宜做完标准曲线后连续使用次数太多,应每隔10人份即应使用国家标准物质对其灵敏度进行监控;

[0079] 样品结果的相关性:分别用钨舟镉元素分析仪和本发明实验方法对76份实际人血样品测定血镉,同时带与被测样品相近浓度值的标准物质做质控。钨舟镉元素分析仪测定值范围为28~197 $\mu\text{g/L}$,本实验方法测定值范围为27.9~188 $\mu\text{g/L}$ 。

[0080] 以下为两种方法测定血镉的数据对比

[0081] 表6与钨舟镉元素分析仪测定镉数据对比

[0082]

样本编号	试验试剂	对照试剂
1	27.9	29.3
2	35.7	30.1
3	37.3	33.3
4	45.3	39.9
5	33.2	42.8
6	55.7	46.4
7	50.3	55.3
8	39.8	57.1
9	66.8	59.5
10	59.9	58.3
11	75.3	55.9
12	70.3	61.2
13	68.9	67.3
14	82.3	73.3

[0083]	15	75.3	77.8
	16	87.6	79.8
	17	73.2	85.9
	18	86.5	89.6
	19	98.6	99.7
	20	97.7	100.9
	21	113.2	109.7
	22	112.6	120.3
	23	125	128.3
	24	128.7	137.8
	25	129.3	145.3
	26	180.3	150.3
	27	178.5	158.6
	28	165.3	168.9
	29	187.9	176.9
30	188.5	193.2	

[0084] 线性相关性大于0.9,符合临床要求。

[0085] 如表6所示。本发明实验方法与钨舟镉元素分析仪测定镉数据相关系数大于0.9,且可实现快速、高通量、单人份包装,试剂常温保存稳定性好,重复性高。

[0086] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,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,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

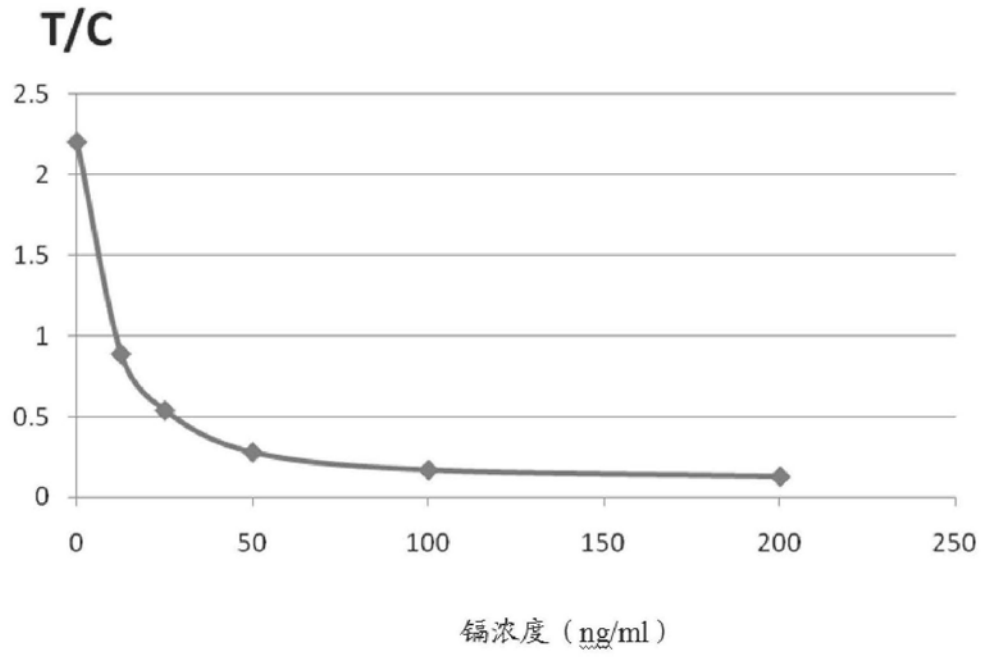


图1

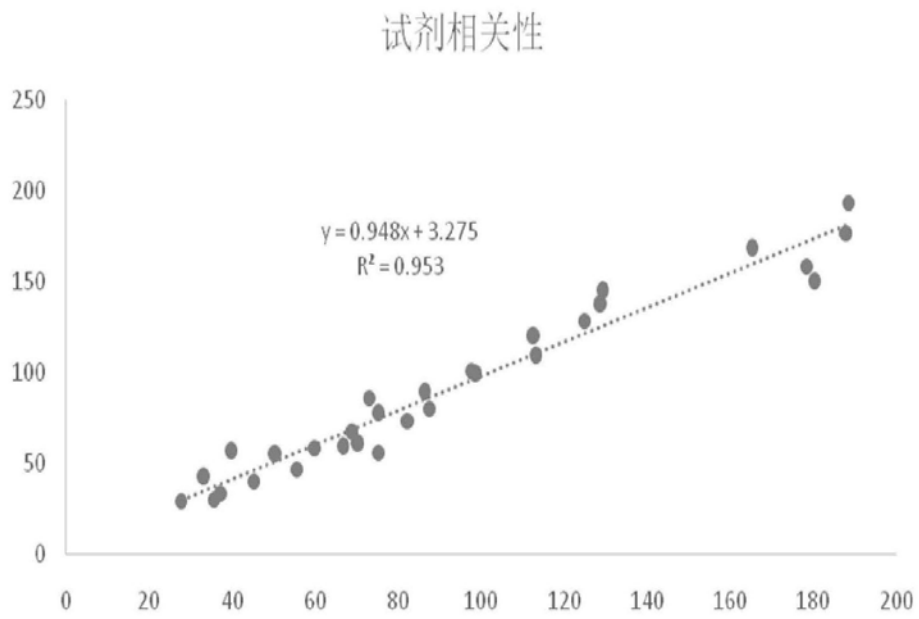


图2



图3

专利名称(译)	一种快速检测样品中镉含量的试剂盒		
公开(公告)号	CN110632294A	公开(公告)日	2019-12-31
申请号	CN201910916308.3	申请日	2019-09-26
[标]发明人	周建平 王艳新 周裕军		
发明人	周建平 王艳新 周裕军		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/533 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种快速检测样品中镉含量的检测试剂盒，属于医学体外免疫检测技术领域。本发明所述试剂盒包括检测卡及质控品；所述检测卡包括底板及位于底板表面的，从加样端起顺序排列的样品垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸。本发明所述试剂盒具有检测仪器成本低，操作简便，快速，可常温储存运输，实现单人份包装且稳定性好的优点。

