



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110672834 A

(43)申请公布日 2020.01.10

(21)申请号 201910916128.5

(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)

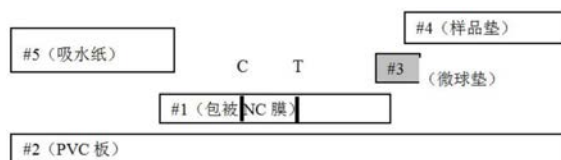
权利要求书1页 说明书11页 附图2页

(54)发明名称

一种快速检测样品中铅含量的试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种快速检测样品中铅含量的检测试剂盒,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前处理简单、无需消解、经济、快速、便捷等优势,能实现常温保存、快速、高通量、低仪器成本、操作简便、单人份随时检测,大大提高临床使用简便性。



1. 一种快速检测样品中铅含量的试剂盒,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:铅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,所述检测线包被有铅偶联半抗原,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三乙醇胺缓冲液、硼酸硼砂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,所述活性蛋白包括胎牛血清、马血清白蛋白和牛血清白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S9、S13和Tween80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,所述铅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(4~7):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80~220nm。

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

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1~2h、烘干1~2h,得到预处理的硝酸纤维素膜;将铅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5.5~6.8、50~200mM的磷酸盐缓冲液、硼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0.5~3g/L的蔗糖和质量百分含量为0.1%的S9。

9. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述质控品为含铅的缓冲液,所述缓冲液包括以下组分:0.5mM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4.8~5.0。

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4.5~4.8的0.5mM的硝酸缓冲液为基础缓冲液,还包括5~10g/L海藻糖、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铅含量的试剂盒

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 铅含量的检测试剂盒。

背景技术

[0002] 铅(lead,Pb),是一种具有蓄积性、多亲和性的重金属离子,可造成人 体造血、消化、神经和免疫等系统的损害。重金属铅是具有持续毒性的有害 物质,在自然环境中很难通过生物、化学等方法降解。当重金属铅通过饮食 进入人体后,会在人体内富集引起中毒,人体铅慢性中毒表现为食欲不振、贫血、腹泻、消瘦、关节疼痛等;铅损伤是国际上公认的危害儿童神经系统 发育的第一杀手,当儿童体内血铅含量超过100 μ g/L时,相应的智力指数就 会下降10~20分。特别是婴幼儿吸收铅后,将有超过30%保留在体内,影响 婴幼儿的生长和智力发育,并损伤其认知功能神经行为和学习记忆等脑功 能,严重者造成痴呆。重金属铅已列为全球环境监测计划(GEMS)中的食 品污染物必测项目。因此,建立准确有效的铅测定方法具有重要的实际意义 和应用价值。

[0003] 传统的铅检测方法可以分为三类,分别为物理检测法、化学检测法和生 物检测法。检测技术包含光谱检测、电泳仪、液相色谱检测、双硫脲对比法 等,这些检测方法检测的在检测的准确度上有一定的优势,准确性极高,但 是检测过程复杂、费用高,在实际应用领域难以展开。在血铅检测方面钨舟 铅镉元素分析仪与石墨炉原子吸收分光光度计测定法较为常用;石墨炉原子 吸收分光光度计配有自动进样器,样品测定结果准确,精密度好,但是对实 验室条件要求严格,需大电流、高电压,石墨炉输入功率4000VA,输入电 压380V,石墨管为消耗品易损坏,适于条件较好的实验室使用。

[0004] 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元素分 析仪测定血铅,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),专门检测血铅的原子吸收光谱仪。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,尤其是大量测定含铅高的样本时,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

[0005] 本发明的目的在于提供一种快速检测样品中铅含量的检测试剂盒。本发 明所述

试剂盒具有前处理简单、无需消解、经济、快速、便捷等优势,能实现常温保存、快速、高通量、低仪器成本、操作简便、单人份随时检测,稳定性高,大大提高临床使用简便性。

[0006] 本发明提供了一种快速检测样品中铅含量的试剂盒,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;

[0007] 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;

[0008] 所述硝酸纤维素膜上包被有:铅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;

[0009] 所述硝酸纤维素膜上划有检测限和质控线,所述检测线包被有铅偶联半抗原,所述质控线包被有羊抗鸡IgY抗体。

[0010] 优选的是,所述样品垫处理缓冲液以三乙醇胺缓冲液、硼酸硼砂缓冲液和甘氨酸缓冲液中的一种或多种为基础缓冲液。

[0011] 优选的是,所述活性蛋白包括胎牛血清、马血清白蛋白和牛血清白蛋白中的一种或几种。

[0012] 优选的是,所述表面活性剂包括S9、S13和Tween80中的一种或几种。

[0013] 优选的是,所述铅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(4~7):1。

[0014] 优选的是,所述荧光微球的粒径为80~220nm。

[0015] 优选的是,所述铅特异抗体与荧光微球的偶联物中的铅特异抗体为铅特异鼠单克隆抗体。

[0016] 优选的是,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1~2h、烘干1~2h,得到预处理的硝酸纤维素膜;将铅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5.5~6.8、50~200mM的磷酸盐缓冲液、硼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0.5~3g/L的蔗糖和质量百分含量为0.1%的S9。

[0017] 优选的是,所述质控品为含铅的缓冲液,所述缓冲液包括以下组分:0.5mM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4.8~5.0。

[0018] 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4.5~4.8的0.5mM的硝酸缓冲液为基础缓冲液,还包括5~10g/L海藻糖、5~20g/L甘露醇和质量百分含量为0.1%的Proclin300。

[0019] 本发明提供了一种快速检测样品中铅含量的检测试剂盒。本发明提供了一种全新免疫学方法学实现血液中铅含量的检测试剂盒,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。对比微分电位溶出测定方法:基体干扰大,操作复杂;本发明所述试剂盒的优点为免疫层析方法对血液中铅含量的检测,检测仪器成本低,避免复杂前处理过程,检测快速15min,可实现高通量检测,单人份包装,稳定性好,重复性高;对比石墨炉原子吸收光谱测定方法,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,本发明试剂盒检测仪器成本低,操作简单,试剂可常温储存;对比 钨舟原子吸收光谱法检测全血中铅元素的方法(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 测血液样本、尿液样本中的铅元素的含量,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

- [0020] 图1为本发明实施例1提供的定标曲线图;
[0021] 图2为本发明比较例1提供的试剂相关性图;
[0022] 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

[0023] 本发明提供了一种快速检测样品中铅含量的试剂盒,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。

[0024] 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优选以三 乙醇胺缓冲液、硼酸硼砂缓冲液和甘氨酸缓冲液中的一种或多种为基础缓冲 液。本发明采用这几种缓冲液提供缓冲能力,能够纠正个体样本间pH的差 异。在本发明中,所述活性蛋白优选包括胎牛血清、马血清白蛋白 和牛血清 白蛋白中的一种或几种。本发明所述活性蛋白可以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S9(Tetronic 1307)、S13(TRITON X-45N 10.4426)和Tween80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,还可改善样本在玻璃纤维膜上的分散性。在本发明中,所述浸泡处理的 时间优选为1~2h,更优选为1h。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。

[0025] 在本发明中,所述硝酸纤维素膜上包被有:铅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,所述铅特异抗体与荧 光微球的偶联物对样品 中重金属铅有特异性识别作用,与铅形成免疫复合 物,沿着硝酸纤维素膜层析至检测区 (T),与预包被的铅偶联半抗原结合,其荧光强度与样本中的pb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,所述铅特 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~ 7:1,更优选为6:1。本发明所述铅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80~220nm,更优选为120nm。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。在本发明中,所述铅特异抗体与荧光微球的偶联物中的铅特异抗体为铅特异鼠单克隆抗体。在本发明中,所述铅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(优选为铅偶联牛血清白蛋白),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,纯化后获得大量铅特异鼠单克隆抗体。

[0026] 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1~2h、烘干1~2h,得到预处理的玻璃纤维素膜;将铅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5.5~6.8、50~200mM的磷酸盐缓冲液、硼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0.5~3g/L的蔗糖和质量百分含量为0.1%的S9。在本发明中,所述重悬缓冲液的有益效果是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,能够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。

[0027] 在本发明中,所述硝酸纤维素膜上划有检测限和质控线,所述检测线包被有铅偶联半抗原,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段较近的一侧,质控线位于离加样端较远的一侧。在本发明中,所述铅偶联半抗原优选为铅偶联牛血清白蛋白,或铅偶联卵清蛋白。在本发明中,所述铅偶联半抗原的浓度优选为0.5~5ug/mL,更优选为1ug/mL。本发明对所述铅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0.5~2ug/mL,更优选为1.5ug/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铅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。

[0028] 在本发明中,所述质控品为含铅的缓冲液,所述缓冲液能够保证硝酸铅的稳定性避免析出,优选包括以下组分:0.5mM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(用作防腐剂),溶剂为水,pH值为4.8~5.0。本发明所述pH值的选择能够稳定质控品,抑制硝酸铅水解。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4.5~4.8的硝酸盐缓冲液为基础缓冲液,还包括5~10g/L海藻糖、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。

[0029] 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。

[0030] 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。

[0031] 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。

[0032] 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。(尿液样本优选加稀释液室温静置5min处理,稀释液优选为甘氨酸50~200mmol缓冲液,0.9%的氯化钠、0.1%的S13、0.05%的防腐剂proclin300。由于不同类型的样本在检测时存在不同的检测环境,且样本中复杂的蛋白成分会与包被在试纸条上的抗体、荧光标记物不同程度结合,可干扰检测结果,导致检测线出现非特异的、非常严重的假信号,即假阳性,故本发明优选对样品进行前处理操作。当所述样品为血液时,所述试剂盒优选还包括滤血膜。本发明血液样本中包括全血,血清,血浆,加滤血膜的作用就是可以全血,率掉血细胞的作用。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。具体的,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20ul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80ul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。

[0033] 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,标本中的铅与包被在玻璃纤维上的铅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),与预包被的铅偶联半抗原结合,其荧光强度与样本中的铅含量成反比。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。因此,随着样本中的重金属铅残留浓度的增加,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铅,对照线都将显色,以示检测产品结果有效。

[0034] 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铅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。

[0035] 实施例1

[0036] 试剂卡的制备:

[0037] 使用粒径为100nm的荧光微球;取两个管①管加入1%的荧光微球,EDC10mg/ml,铅特异抗体3ug/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100mmol 硼酸缓冲液pH=6.8),蔗糖2g/L,吐温200.1%;重悬后分别按5:1混合终至质量体积分数为0.2%,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;

[0038] 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用于铅偶联半抗原包被液的配制;向T离心管中加入0.5mg/L的铅偶联半抗原(铅-BSA包被抗原),用包被液(50mmol的硼酸缓冲液,pH为7.0,加0.1%的proclin300防腐剂)混匀稀释,至铅偶联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0.5mg/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;

[0039] 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;

[0040] 校准曲线制备:

[0041] 分别将浓度为0,62.5,125,250,500,1000ng/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。

[0042] 样本重复性检测:

[0043] 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,由于重金属铅代谢过程,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铅纯品获得(解释数据中高值样本的来源)。具体线性范围内不同水平的样本重复性数据如表1所示:

[0044] 表1不同样本重复性

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	20.1	21.2	22.3	19.8	18.9	20.6	21.1	19.7	21.3	17.9	20.29	1.287072	6.34%
2	50.6	51.8	49.8	52.3	52.9	48.9	49.1	55.7	52.6	56.8	52.05	2.642074	5.08%
3	100.2	108.4	110.2	99.8	98.9	100.5	107.8	109.2	97.3	95.8	102.81	5.452716	5.30%
4	201.9	210.2	219.3	198.3	197.3	201.4	205	210.3	197.9	197.9	203.95	7.273735	3.57%
5	280	289.2	298.1	288.9	300.1	279.8	289.1	301.2	305	310.3	294.17	10.34387	3.52%
6	310	319.3	320.9	324.4	350.1	300.5	304.2	321.3	325.1	329	320.48	13.99586	4.37%
7	450	451.1	465	472.1	473.6	460.2	451.9	461.8	423.5	435.1	454.43	15.79902	3.48%

[0045]

[0046]

8	600	599.8	567.9	583.7	610.2	600.8	610.3	620	612.9	604.7	601.03	15.21987	2.53%
9	800	789.1	821.9	830.1	786.3	790.3	810.2	839.2	798.5	825.1	808.94444	20.10933	2.49%
10	980	923.4	934.4	935.7	1000.1	932	945.3	956.2	998.2	980.3	961.1	29.32128	3.05%

[0047] 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10%,重复性较好,满足测试需求。

[0048] 在[10,1000]ng/mL内检测不同浓度样本,结果如下:

[0049] 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)

[0050] 表2线性区间内不同梯度检测

[0051]

线性比例	10	50	100	500	1000
测得值1	12.3	64.3	120.3	531.3	968.9
测得值2	9.8	55.9	120.3	520.3	978.3
测得值3	10.5	58.3	113.2	510.2	978.2
平均值	10.9	59.5	117.9	520.6	975.1
理论值	23.98	62.84	111.42	500.02	985.78
相对偏差	-54.68%	-5.32%	5.85%	4.12%	-1.08%
绝对偏差	13.11	3.34	6.52	20.58	10.64
相关系数r	0.99943				

[0052] 由表2可知,相关系数大于0.99,满足要求。

[0053] 在正常样本(C₀)中加入接近线性高值(200μg/mL,相对偏差在±10%内)的硝酸铅纯品配制标准溶液,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。

[0054]
$$R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{V \times C_s} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

[0055] 式中:R—回收率

[0056] V—加入样品体积

[0057] V₀—正常样本的体积

[0058] C—混合后的测定浓度

[0059] C₀—正常样本的测定浓度

[0060] C_s—加入样品的浓度

[0061] 表3回收试验数据表

[0062]

	血	混	高
1	57.8	100.2	998.2
2	60.3	102.4	989.2
3	61.2	103.5	997.5

平均值	59.8	102.0	995.0
稀释比例	19	20	1
回收率	91%		

[0063] 由表3可知,回收率在85~115%之间符合要求。试剂准确度合格,不受 样本基质的影响

[0064] 实施例2

[0065] 试剂卡的制备:

[0066] 使用粒径为120nm的荧光微球,①管加入1%荧光微球,EDC10mg/ml, 铅特异抗体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(80mmol缓冲液甘氨酸、PH=6.0), 蔗糖0.5-3.0g/L,吐温200.1%;重悬后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;

[0067] T线为铅偶联马血清白蛋白浓度为1mg/ml;C线为羊抗鸡IgY抗体,浓 度为1mg/ml;在硝酸纤维膜上分别在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;

[0068] 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;

[0069] 校准曲线制备:

[0070] 分别将浓度为0,62.5,125,250,500,1000ng/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。

[0071] 校准曲线制备同实施例1。

[0072] 表4两水平重复性数据表

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			
[0073] 1	109	110	112	123	113	108	109	118	119	98	112	7.028	6.3%
2	402	413	378	424	432	420	417	389	416	445	413.7	19.63	4.7%

[0074] 由表4可见两水平重复性CV即变异系数不大于15%符合要求。

[0075] 表5线性区间不同梯度检测数据表

[0076] 线性比例	10	50	100	500	1000
测得值1	9.9	48.9	120.3	490.9	1000.3
测得值2	9.8	55.9	109.3	519.2	978.3
测得值3	10.5	46.8	130.2	487.3	978.2

平均值	10.1	50.5	119.9	499.1	985.6
理论值	17.64	56.82	105.80	497.62	987.38
相对偏差	-42.94%	-11.07%	13.36%	0.31%	-0.18%
绝对偏差	7.58	6.29	14.13	1.52	1.78
相关系数r	0.99978				

[0077] 相关系数大于0.99符合要求。

[0078] 比较例1

[0079] 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元素分析仪测定血铅,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),专门检测血铅的原子吸收光谱仪。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人份即应加入国家标准物质对其灵敏度进行监控;本发明实验方法可实现快速、高通量、单人份包装,稳定性好,重复性高。

[0080] 样品结果的相关性:分别用钨舟铅元素分析仪和本发明方法对76份实际人血样品进行血铅测定,同时带与被测样品相近浓度值的标准物质做质控。本实验方法测定值范围为27.9~470 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

[0081] 表6与钨舟铅元素分析仪测定铅数据对比

[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	66.8	59.5
6	59.9	58.3
7	75.3	65.2
8	70.3	61.2
9	87.6	79.8
10	73.2	85.9
11	86.5	89.6
12	97.7	100.9
13	113.2	109.7
14	128.7	137.8

[0083]	15	180.3	150.3
	16	187.9	176.9
	17	200.3	203.5
	18	210.3	206.2
	19	250.3	256.3
	20	263.1	269.2
	21	276.2	286.2
	22	290.3	295.3
	23	320.3	312.1
	24	335.4	42.1
	25	365	372.5
	26	395.2	401.2
	27	420.2	430.2
	28	421.3	432.1
29	435.6	445.2	
30	455.6	460.2	

[0084] 线性相关性大于0.9,符合临床要求,如表6所示本发明实验方法与钨舟铅元素分析仪测定铅数据相关系数大于0.9,结果可信且可实现快速、高通量、单人份包装,试剂常温保存稳定性好,重复性高。

[0085] 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。

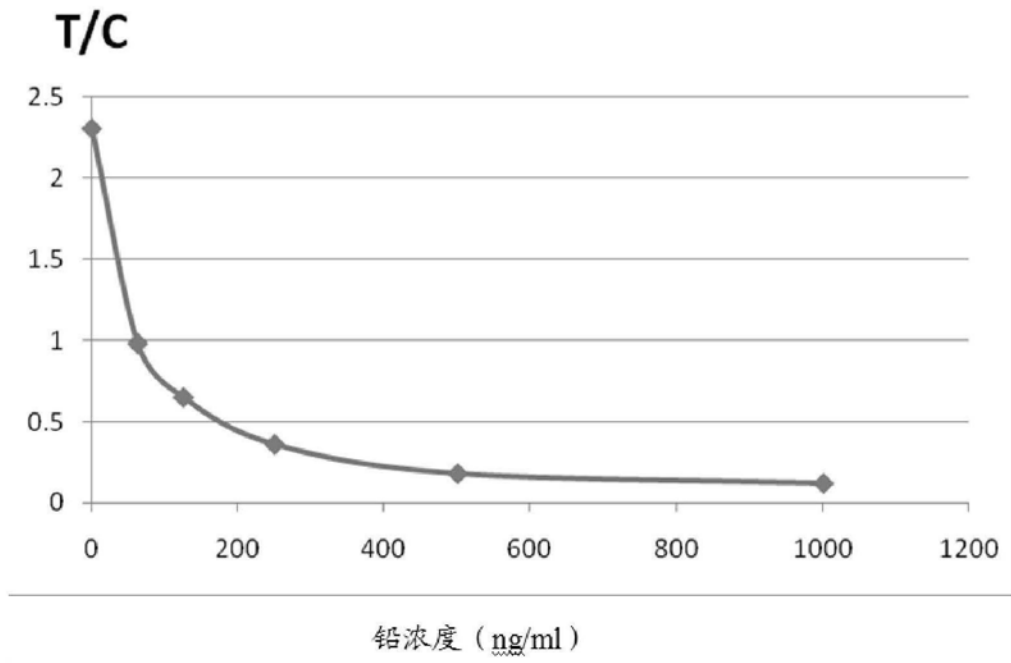


图1

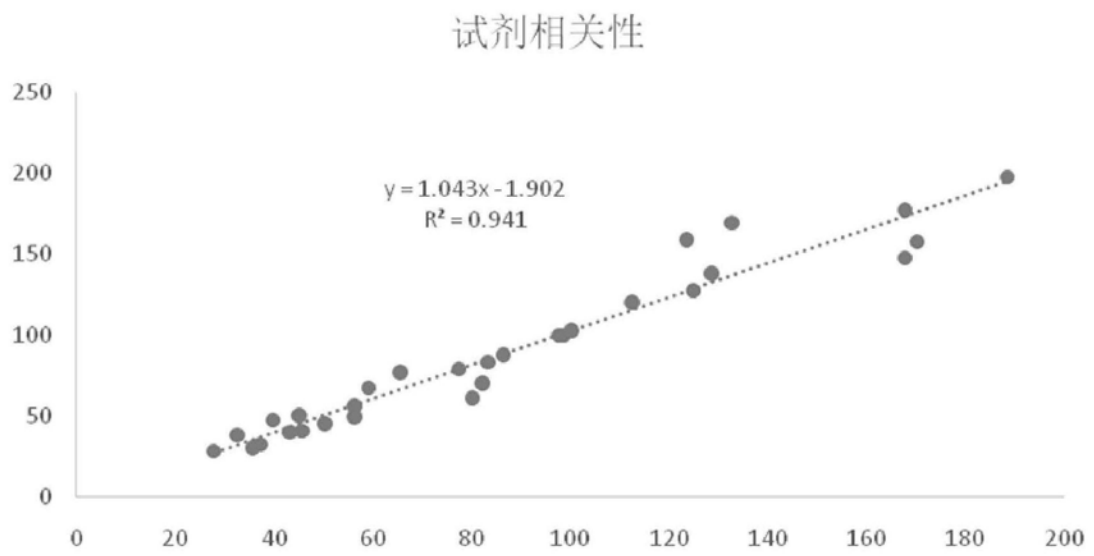


图2

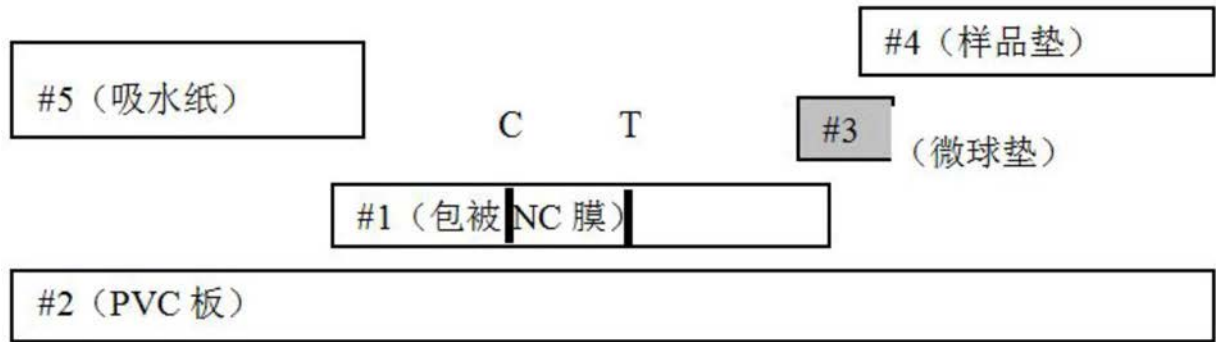


图3

专利名称(译)	一种快速检测样品中铅含量的试剂盒		
公开(公告)号	CN110672834A	公开(公告)日	2020-01-10
申请号	CN201910916128.5	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铅含量的检测试剂盒，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前处理简单、无需消解、经济、快速、便捷等优势，能实现常温保存、快速、高通量、低仪器成本、操作简便、单人份随时检测，大大提高临床使用简便性。

