



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102680676 B

(45) 授权公告日 2015.06.10

(21) 申请号 201110215390.0

(22) 申请日 2011.07.29

(73) 专利权人 南京诺尔曼生物技术有限公司

地址 210029 江苏省南京市雨花台区铁心桥街道马家店工业园区 66-1 号软件楼 5 楼

(72) 发明人 何仕钊

(74) 专利代理机构 北京泛诚知识产权代理有限公司 11298

代理人 杨本良 文琦

(51) Int. Cl.

G01N 33/537(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101377492 A, 2009.03.04, 摘要, 说明书

第 2 页第 2 段, 第 3 页第 2 段, 第 3 页第 4 段至第 4 页第 5 段, 实施例 1, 权利要求 1-10.

WO 2008034750 A1, 2008.03.27, 说明书第 11 页第 12-22 行, 第 19 页第 20-26 行, 第 22 页第 20 行至第 23 页第 5 行.

CN 201654036 U, 2010.11.24, 全文.

WO 2009013053 A1, 2009.01.29, 全文.

WO 2011022628 A1, 2011.02.24, 全文.

WO 2005075986 A2, 2005.08.18, 全文.

JP 2009109301 A, 2009.05.21, 全文.

审查员 胡晓佳

权利要求书1页 说明书8页 附图1页

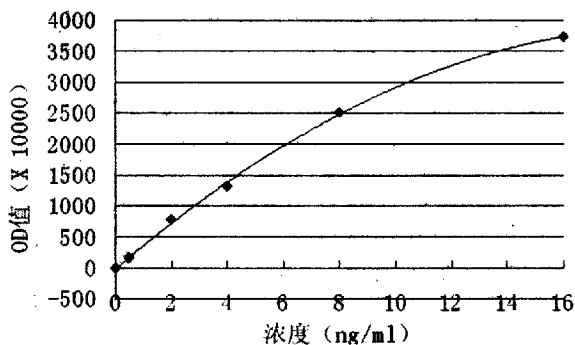
(54) 发明名称

髓过氧化物酶 (myeloperoxidase MPO) 测定试剂盒 (胶乳增强免疫比浊法)

(57) 摘要

本发明涉及一种测定血清中的髓过氧化物酶含量测定的试剂盒。所要解决的技术问题是克服上述背景技术的不足, 提供一种样本无需稀释、操作简单、准确度高、重复性好, 适用于各种类型的全自动生化分析仪以及各种特种蛋白仪的免疫比浊法检测髓过氧化物酶含量的试剂盒。技术方案是: 免疫增强比浊法检测髓过氧化物酶试剂盒, 包括: a、试剂 R1: 缓冲液、防腐剂、加速剂、无机盐、表面活性剂, 其余为纯化水; b、试剂 R2: 缓冲液、结合有抗人的髓过氧化物酶抗体、防腐剂, 乳胶微球直径为 60-150nm; c、参考校准品: 缓冲液, 稳定剂, 防腐剂以及根据浓度需要确定的一定量的重组人髓过氧化物酶纯品, 其余为纯化水。通过以上试剂组合, 建立 MPO 含量的校准曲线, 从而可以实现在全自动生化分析仪或者特定蛋白仪上快速的测定血清中 MPO 的含量。

MPO校准曲线



1. 一种采用胶乳增强免疫比浊法检测人血清中 MPO 含量的试剂盒, 包含试剂 R1, R2 以及校准液; 所述试剂 R1 pH 值为 7.0-8.0 的缓冲液, 所述试剂 R2 为抗人 MPO 抗体胶乳试剂; 所述校准液为含有定量的 MPO 的重组蛋白或者是从人血清中提取出来的天然 MPO, 其特征在于, 所述抗人 MPO 抗体的胶乳试剂的制备包括以下步骤:

步骤 1: 将羧化的胶乳在 pH6.5 的溶液活化;

步骤 2: 洗涤去掉溶液中的碳化二亚胺, 加 pH7.5-9.0 的缓冲液, 加入 MPO 抗体, 在 37 度反应 4 小时;

步骤 3: 将步骤 2 所得的液体用 pH7.5-9.0 的固定液固定 6 小时;

步骤 4: 将步骤 3 所得的液体用 pH7.5-9.0 的封闭液体封闭 12 小时;

步骤 5: 将步骤 4 所得的液体离心去上清液, 取沉淀后用含有稳定剂和防腐剂的缓冲液洗涤分散即得。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒, 其特征在于, 所述抗人 MPO 抗体为单克隆抗体。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒, 其特征在于, 步骤 1 所述溶液为含有 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐或 N-羟基琥珀酰亚胺中的一种或者二种。

4. 根据权利要求 1 所述的试剂盒, 其特征在于, 步骤 3 所述溶液含有 6-氨基己酸或甘氨酸。

5. 根据权利要求 1 所述的试剂盒, 其特征在于, 步骤 4 所述溶液含有的稳定剂选自甘氨酸、小牛血清、吐温-20、曲拉通、氯化钠、氯化镁中的一种或者几种。

6. 根据权利要求 5 所述的试剂盒, 其特征在于, 步骤 4 所述溶液含有的甘氨酸、小牛血清的浓度为 0.05-0.5% 质量分数; 吐温-20 或者曲拉通浓度为 0.005-0.01% 体积分数; 氯化镁、氯化钠的浓度为 0.05-0.15% 质量分数。

髓过氧化物酶 (myeloperoxidase MPO) 测定试剂盒 (胶乳增强免疫比浊法)

技术领域：

[0001] 本发明涉及生物技术领域，具体涉及一种采用胶乳增强免疫比浊法测定人血清中髓过氧化物酶含量的试剂盒。

背景技术

[0002] 急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 的发病机制涉及内皮功能失调、炎症反应、易损斑块与斑块破裂、冠状动脉痉挛、血小板聚集与血栓形成、心肌缺血与心肌坏死等一系列因素，其中炎症和氧化应激贯穿于动脉粥样硬化形成并发展至薄纤维帽不稳定斑块的全过程。目前，随着炎症参与 ACS 发病机制的研究不断深入，促炎症介质及抗炎介质在 ACS 发生发展中的作用亦受到关注，而血清髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 是其中较具有代表性的血清炎症标记物。越来越多的研究结果表明，在 ACS 的不稳定斑块中存在大量活化的 MPO 及其氧化产物，而 MPO 及其介导的反应产物具有促进动脉粥样硬化形成的作用，影响粥样斑块的稳定性，并通过放大氧化应激过程引起 ACS。MPO 在 ACS 发生发展中起重要作用，对冠状动脉不稳定性斑块的诊断与评估预后具有特殊意义，可成为治疗的靶标。

[0003] 目前在临床上使用的 MPO 检测方法有：放射免疫法 (IRA)，此法直接可以测血浆，但该法有环境污染以及对操作者有一定放射性辐射；化学发光法，该法较放射免疫法较为敏感，准确，但成本相对昂贵，需要配套的仪器才可以使用；酶免疫法 (ELISA)，存在操作繁琐，标本需要预处理，检测时间长等缺点。而胶乳增强免疫比浊法具有操作简便，快速，检测灵敏度高、特异、定量准确等优点，在临床应用能得到广泛认可。

发明内容

[0004] 本发明的目的是建立一种新的检测方法，通过羊抗人的髓过氧化物酶抗体（或者单抗）与胶乳颗粒偶联，采用胶乳增强比浊法来测定人体血清中 MPO 的含量，运用该方法的试剂应具有不需要预处理标本，操作简单，准确度高，重复性好，且能够在全自动生化分析仪或者特种蛋白仪以及分光光度计上使用。

[0005] 为了解决上述的技术问题，本发明实现了以下技术：

[0006] 1. 一种采用胶乳增强免疫比浊法检测 MPO 含量的试剂盒，其特征在于，包含试剂 R1, R2 以及校准品；所述试剂 R1：PH 值为 6.5-8.0 的缓冲液，所述试剂 R2 为抗人 MPO 抗体胶乳试剂；所述标准品为含有定量的 MPO 的重组蛋白或者是从人血清中提取出来的天然 MPO。

[0007] 2. 所述的 MPO 检测试剂盒中的 R1 试剂主要包含缓冲液，无机盐，加速剂和防腐剂。

[0008] 3. 所述的 MPO 检测试剂盒中 R2 试剂主要包含稳定剂，抗人单（多）克隆抗体胶乳颗粒，缓冲液，稳定剂和防腐剂。其中乳胶微球直径为 60-150nm。

[0009] 4. 试剂 R1 所述的无机盐选自氯化钠，氯化镁，氯化钾一种或几种。缓冲液为：磷

酸盐缓冲液,碳酸盐缓冲液,甘氨酸-氢氧化钠缓冲液。加速剂为聚乙二醇 4000,聚乙二醇 6000,聚乙二醇 8000

[0010] 5. 试剂 R2 所选用的抗体为鼠抗人 MPO 单克隆抗体,羊抗人 MPO 单克隆抗体,兔抗人 MPO 单克隆抗体一种或者几种混合。也可以选鼠抗人 MPO 多克隆抗体,羊抗人 MPO 多克隆抗体,兔抗人 MPO 多克隆抗体其中一种。

[0011] 6. 试剂 R2 中的稳定剂选自小牛白蛋白,甘氨酸,明胶,吐温 20,曲拉通一种或者几种。

[0012] 7. 本发明所述的试剂 R2 为抗人 MPO 抗体胶乳试剂,采用的是抗人的 MPO 抗体与胶乳颗粒相偶联。经过离心(过滤)的方法去掉未反应的偶联剂以及未反应的抗体,在含有稳定剂和防腐剂的缓冲液中分散而成。

[0013] 8. 所述抗人 MPO 抗体的胶乳试剂的制备包括以下步骤。

[0014] 步骤 1:将胶乳在 PH6.5 的溶液中活化。

[0015] 步骤 2:洗涤去掉溶液中的碳化二亚胺,加 PH7.5-9.0 的缓冲液,加入 MPO 抗体,在 37 度反应 4 小时。

[0016] 步骤 3:将步骤 2 所得的液体用 PH7.5-9.0 的固定液固定 6 小时。

[0017] 步骤 4:将步骤 3 所得的液体用 PH7.5-9.0 的封闭液体封闭 12 小时。

[0018] 步骤 5:将步骤 4 所得的液体洗涤去掉未结合抗体,溶液用含有稳定剂和防腐剂的缓冲液洗涤分散即得。

[0019] 9. 作为优选,步骤 1 中所用的缓冲液为 PBS 缓冲液, MES 缓冲液,碳酸盐缓冲液中的任何一种缓冲液,且浓度在 20-100mmol/L, PH 在 5.5-6.5 之间。

[0020] 10. 作为优选,步骤 1 中所用的胶乳可以是羧基化的聚苯乙烯胶乳或者是氨基化的聚苯乙烯胶乳。其孔径在 60nm-150nm 均可。

[0021] 11. 作为优选,步骤 1 中含有 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐或 N-羟基琥珀酰亚胺中的一种或者多种。

[0022] 12. 作为优选,在步骤 2 中,去掉溶液 1 中所含的未反应的物质,采用的是高速冷冻离心机或者超微孔径的过滤膜进行过滤。

[0023] 13. 作为优选,在步骤 5 中,所用的稳定剂是小牛血清白蛋白,明胶,甘氨酸,脱脂奶粉一种或者几种相混合。

[0024] 14、本发明检测的原理是:利用抗原抗体反应,先加入试剂 R1,使血清中的 MPO 的位点暴露,当加入抗人的 MPO 胶乳颗粒溶液,使溶液中的抗原抗体反应形成不溶于溶液的抗原抗体复合物,从而产生一定的浊度,在人血清中 MPO 的含量在一定的范围内 MPO 的含量与浊度成正比。再通过标准曲线进行计算,从而得到 MPO 的含量。

[0025] 15 本发明与现有技术相比,具有如下特点:

[0026] 1) 本发明试剂盒具有较高的检测灵敏度,最低检测能够达到 0.1ng/L,操作简单,快速,从检测到出结果最多只需要 10 分钟,甚至更短。

[0027] 2) 本发明的试剂盒 R2 试剂中的抗体乳剂的制备由于采用的化学偶联法,稳定性好,在 2-8 度至少可以保存 12 个月。而采用物理吸附法的胶乳抗体试剂,批间差异比较大,而且稳定性不好。

[0028] 3) 本发明试剂盒与进口试剂盒对样品中 MPO 含量检测的数据经统计分析,无显著

性差异,检测结果可靠,在临床上可以替代进口试剂或者化学发光试剂,大幅降低成本以及检测时间。

附图说明

[0029] 图一为本发明实施例 1 的校准曲线

[0030] 实施案例

[0031] 本发明公开了一种检测 MPO 含量的试剂盒,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,他们都被视为包括在本发明内。本发明的产品及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围对本文所述的方法和应用程序进行改动或者适当变更与组合,本实现和应用本发明技术。

[0032] 下面以具体的实施例对本发明做进一步说明。

[0033] 一、抗人髓过氧化酶的鼠单克隆抗体的制备

[0034] 1. 杂交瘤细胞

[0035] 1.1 亲本细胞

[0036] 1.1.1 骨髓瘤细胞系

[0037] 融合所用的 Sp2/0 细胞于 2003 年 6 月购自 ATCC (Item number :CRL-1581)。该细胞系为制备杂交瘤常规使用的细胞系,不合成和不分泌免疫球蛋白轻链。Sp2/0 细胞在无菌条件下常规培养在含 15% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液中,放置培养在 37℃ 含 5% CO₂ 培养箱中。引入的细胞系经扩增培养,细胞倍增时间约为 21 小时,细胞以对数方式增殖,增殖快速。将增殖的细胞经洗涤后,重新悬浮在含 7.5% DMSO-20% 胎牛血清冻存液中,细胞浓度为 5×10^6 /ml。将细胞悬液置冷冻管中冻存于液氮中,为亲本细胞的原始细胞库。取其中一支细胞继续扩增培养,同上述方法建立亲本细胞的种子细胞库和工作细胞库。

[0038] 1.1.2 免疫脾脏细胞

[0039] 免疫和制备腹水的 BALB/C 小鼠购自军事科学院动物中心,雌性,6 周龄。每组 3 只动物,抗原为人髓过氧化酶,抗原免疫剂量为 100ug/150u1/ 每只小鼠,经腹腔免疫动物。免疫前断尾取血,分离血清,保存在 -20℃,作为正常对照小鼠的血清。基础免疫过程中抗原和完全佐剂等量混合,加强免疫中抗原与不完全佐剂混合,抗原与佐剂经充分乳化合格后免疫小鼠。第三次加强免疫后三天,断尾取血,用 ELISA 方法检测,对免疫抗原的血清效价最高的小鼠达到 1 : 320000。末次冲击用浓度为 50ug/ml 溶于生理盐水的人髓过氧化酶免疫,免疫后 3 天,于无菌条件下取脾脏分离脾细胞,细胞悬浮在无血清 DMEM 完全培养液中以备细胞融合。

[0040] 1.2 细胞融合和杂交瘤的筛选

[0041] 1.2.1 细胞融合

[0042] 取末次冲击后,无菌条件下分离的脾细胞与 Sp2/0 细胞以 10 : 1 的比例混合,用无血清 DMEM 培养液将混合细胞充分洗涤三次,(1500rpm,5 分钟)。将 1ml 37℃ 预温的 50% PEG 缓慢地加入到细胞混悬液中,边加边轻轻地转动试管,使 PEG 与细胞充分混匀。静止 1 分钟后,再按操作流程缓慢地加入 15ml 无血清培养液,边加边轻轻地转动试管,恢复渗透压。用无血清培养液将融合细胞洗涤两次,再将细胞悬浮在含 15% 胎牛血清的 DMEM 完全

培养液中。调整细胞浓度,将细胞加入到 96 孔细胞培养板中,细胞数量为 $1 \times 10^5/0.1\text{ml}$ /每孔。同时在其中的一孔中加入 Sp2/0 细胞作为 HAT 筛选时的对照细胞。将细胞培养板放置培养在 37°C 含 5% CO_2 培养箱中。

[0043] 1.2.2 杂交瘤细胞的筛选

[0044] 于培养的第二天,在无菌条件下,在培养板的每孔中再加入 0.1ml 含 2X HAT 的 15% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液,对杂交瘤进行筛选。在融合 7 天时可以见到杂交瘤的生长。镜检 96 孔细胞培养板,融合率达到 56%。

[0045] 待培养孔中的杂交瘤细胞生长到约占 1/3 孔时,在无菌条件下吸取 0.1ml 培养液,用双抗体夹心法测定杂交瘤分泌免疫球蛋白的情况。我们用 ELISA 的方法从分泌免疫球蛋白的 518 个杂交瘤中筛选到 20 株对抗原呈阳性反应的细胞株。包被抗原人髓过氧化酶,包被抗原量为 $2\mu\text{g}/\text{ml}$, $50\mu\text{l}$ /每孔, 4°C 孵育过夜。

[0046] 1.3 杂交瘤细胞的克隆

[0047] 采用有限稀释法分别对这些与人髓过氧化酶呈阳性反应的杂交瘤细胞株进行了 3 次克隆,选取 ELISA 筛选阳性率达到 100% 的细胞株且 OD450 最高的细胞株。其中 6-C8 和 20-G6 这两株杂交瘤细胞不仅对抗原有特异反应,进一步的检测表明他们识别的表位不同。这两株杂交瘤细胞在体外培养半年抗体分泌特性稳定。

[0048] 2. 杂交瘤细胞分泌抗体特性的鉴定。

[0049] 2.1 抗体类和亚类鉴定

[0050] 用亚类鉴定药盒 (SUB-ISOTYPING KIT, American Qualex) 检测对抗原有特异性且分泌量较高的杂交瘤 (6-C8 和, 20-G6) 所分泌抗体的类和亚类。亚类鉴定表明这两株抗体亚类为 IgG2a 和 IgG1。

[0051] 2.2 抗体特异性鉴定

[0052] 抗体特异性鉴定实验结果表明我们所制备的这些抗体,具有较好的特异性。ELISA 测定有较高的 OD 值。因此选定这两株抗体作为制备试剂的候选抗体。

[0053] 2.3 抗体亲和力测定

[0054] 按照 Heyningen, V Van 的方法 (Methods in Enzymology, 1986, Vol. 121, 472-481) 检测抗体的亲和力。抗体分子能特异地结合抗原,其结合强度被称之为抗体的亲和力。测定的基本原理是测量下述反应达到平衡时不同组分的含量。 $\text{Ab} + \text{Ag} = \text{AbAg}$ 。

[0055] 在此系统中,抗体的亲和常数 K 定义为: $K = [\text{AbAg}]/[\text{Ab}][\text{Ag}]$ 抗体的亲和常数可以通过测量在不同抗体稀释度下结合和游离的标记抗原的量来推算。在一定的条件下,抗体的亲和常数相当于抗体结合抗原最大量一半时的浓度。用酶联免疫吸附分析试验测定辣根过氧化物酶标记人髓过氧化酶抗原结合到不同稀释抗体上的量。

[0056] 待测抗体按以下浓度稀释:起始浓度为 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ($3.33 \times 10^{-8}\text{M}$),然后倍比稀释,直至抗体浓度为 $0.0016\text{ng}/\text{ml}$ ($1.04 \times 10^{-10}\text{M}$)。按常规方法将抗体包被于 96 孔板上,然后依次加入人髓过氧化酶抗原 (1 微克/毫升) 和底物显色液。终止反应后,用酶标仪 OD450 读光吸收值。结果表明:

[0057] 抗体 6-C8:结合抗原最大浓度一半的抗体浓度约为 $4. \times 10^{-9}\text{M}$ 。所以该抗体的表观亲和常数约为 $4 \times 10^{-9}\text{M}$ 。抗体 20-G6 结合抗原最大浓度一半的抗体浓度约为 $8.3 \times 10^{-9}\text{M}$ 。所以抗体 20-G6 的表观亲和常数约为 $8 \times 10^{-9}\text{M}$ 。

[0058] 3. 细胞库的建立

[0059] 在克隆和扩增的同时及时地将细胞株冻存在液氮罐中。细胞按照原始细胞库, 种子细胞库和生产细胞库三级管理办法保存。每株细胞均做备份分别冻存在不同的液氮罐中。

[0060] 4. 抗 Capap-GST 抗体的制备

[0061] 4.1 制备腹水及腹水的收集

[0062] 我们将 6-C8 和, 20-G6 两个细胞株的生产细胞经复苏后, 培养于含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液中进行扩增。于两周前给小鼠腹腔注射降植烷 (0.5ml/只)。然后将扩增的杂交瘤细胞接种于用降植烷处理过的 BALB/C 小鼠腹腔内, 每只小鼠腹腔内注射 0.5×10^7 细胞 /ml。7 天后小鼠开始产生腹水。我们采用多次采集的方法收集腹水。最多从小鼠中可以获得 10ml 左右的腹水。

[0063] 4.2 抗体的分离纯化

[0064] 取小鼠腹水置于离心管中, 于高速低温离心机中, 12000rpm 离心 10min, 吸弃上层浑浊液, 取中间层上清, 保存在 EP 管中。

[0065] 预处理所收集的腹水后, 直接过 Protein A 柱子纯化。先用结合缓冲液平衡 Protein A 层析柱。然后加入混合有结合缓冲液的预处理抗体原液, 经结合、洗涤和洗脱收集洗脱样品后, 将样品放在 0.02PB, pH7.4 的缓冲液透析过夜, 透析液再离心 12000rpm, 20min。取上清即为纯化抗体, 并为可以满足用于制备试剂盒的抗体。每只小鼠平均得到抗体 5 ~ 10mg。

[0066] 4.3. 抗体的鉴定

[0067] 用 SDS-PAGE、WESTERN-BLOTTING 和 ELISA 的方法对纯化好的抗体进行鉴定, 结果表明抗体保留原有的特异性, 纯度大于 95%。

[0068] 4.4 抗体的保存

[0069] 纯化的抗体采用低温保存, 把抗体分成小包装, 置于 $-20^{\circ}\text{C} \sim -80^{\circ}\text{C}$, 保存过程中避免反复冻融。经快速活性鉴定, 抗体活性可以保存一年效价不变。

[0070] 二、MPO 试剂 R2 即抗人 MPO 抗体胶乳试剂的制备

[0071] 1: 将 2g 孔径大小为 80nm 的羧基化的胶乳加入到 50ml 的含有 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 200mg/L 的 PH7.0 的 0.4mol/L 的 MES 缓冲液中, 反应 2 小时。

[0072] 2: 将反应液分成 25ml/管, 在转速为 16000 转 / 分的高速冷冻离心机中离心 30 分钟后, 去掉上清液, 每管加浓度为 0.4mol/L 的磷酸盐缓冲液 5ml 混匀。继续在速为 16000 转 / 分的高速冷冻离心机中离心 30 分钟后, 去掉上清液, 每管加浓度为 0.4mol/L 的磷酸盐缓冲液 25ml 混匀。

[0073] 3, 每管加入羊抗人 MPO 抗体 200mg, 在 37 度反应 6 小时。

[0074] 4: 向每管中加入还有 5g/L 的 6-氨基己酸 PH8.0 的磷酸盐缓冲液 10ml。

[0075] 5: 每管液体加小牛白蛋白 0.8g, 摇匀反应 12 小时。

[0076] 6: 将所得的液体通过 2 次离心, 转速为 16000 转 / 分, 洗涤去掉未结合抗体, 溶液用含有 0.5g/L 的明胶和 0.2g/L 小牛白蛋白和 0.05% 的曲拉通以及 0.1g/L 叠氮钠的 0.4mol/L PBS 缓冲液分散即可。

[0077] 三、MPO 试剂 R1 即样品缓冲液的制备

[0078]

磷酸二氢钠	2.86g/L
磷酸氢二钠	28.65g/L
氯化钠	6.87g/L
氯化镁	0.34g/L
聚乙二醇 6000	30g/L
叠氮钠	1.5g/L
纯水	1L

[0079] 四 MPO 试剂中校准品的制备

[0080] 1) 校准品稀释液

[0081]

磷酸二氢钠	2.86g/L
磷酸氢二钠	28.65g/L
氯化钠	9g/L
小牛白蛋白	50g/L
叠氮钠	2.5g/L

[0082]

稳定剂 10g/L

[0083] 2) 按照需要的 MPO 参考校准品浓度将相应的重组 MPO 纯品 320ng 加入校准品稀释液 20ml 的缓冲液中, 制备得到 16ng/ml 浓度的 MPO 校准品在使用的时候在用缓冲液按照比例稀释成多个浓度。

[0084] 五 MPO 测定方法 (日立 7060 全自动生化分析仪)

[0085] 校准品浓度 :16ng/ml 8ng/ml 2ng/ml 0.5ng/ml 0ng/ml

[0086] 测定波长 :主波长 :600nm 副波长 :800nm

[0087] 试剂比例 :R1 : R2 : S = 200ul : 50ul : 25ul

[0088] 校准方式 :spline

[0089] 读点方式 :在试剂 R1 与样品加入, 反应 5 分钟, 读点 A1, 然后加入 R2 后, 反应 5 分钟, 再读点 A2, 计算吸光度的变化。

[0090] 校准曲线见图 1

[0091] 六本发明所述试剂盒的分析性能评估

[0092] 1. 灵敏度测定

[0093] 用本发明所述的试剂盒对空白样本 (含有 5% 牛血清的生理盐水) 重复测定 20 次, 最低检测限度为空白的均值浓度加上二个标准差, 得到最低检测限度为 0.1ng/ml。

[0094] 2. 线性评估

[0095] 取浓度将近 50ng/ml (43.2ng/ml) 的临床血清标本, 进行稀释, 至少稀

释 6 个点, 每个点重复测定 3 次, 根据式 (1), (2), (3) 计算出直线方程 $y = a+bx$:

$$b = \frac{n \sum X_i Y_i - \sum X_i \cdot \sum Y_i}{n \sum X_i^2 - (\sum X_i)^2} \dots\dots\dots$$

$$\dots \cdot |a| = \frac{|\sum Y_i - b \sum X_i|}{n} \dots\dots\dots$$

$$\dots \cdot r = \frac{n \sum X_i Y_i - \sum X_i \cdot \sum Y_i (2)}{\sqrt{[n \cdot \sum X_i^2 - (\sum X_i)^2][n \cdot \sum Y_i^2 - (\sum Y_i)^2]}} \dots\dots\dots (3)$$

- [0096] 式中 :b- 回归线的斜率 ;
- [0097] |a|- 回归线截距的绝对值 ;
- [0098] r- 回归系数 ;
- [0099] X_i - 测定管溶液的浓度 ;
- [0100] Y_i -3 次重复测定的与测定管溶液浓度对应的吸光度均值 ;
- [0101] i -1,2,3, …… , n ;
- [0102] n- 测定样本数。
- [0103] 测定数据 (见表 1) 表 1

[0104]

测定值	理论值
43.2	37.4
21.6	22.9
10.8	10.1
5.4	5.8
2.7	2.2
0	0.1

[0105] 检测结果 : $R = 0.993$, 表明当血清中髓过氧化物酶的浓度在 0.1-16ng/ml 范围内, 本试剂盒有良好的线性。

[0106] 3. 精密度测定

[0107] 通过 2 个不同浓度的髓过氧化物酶血清来测定本发明所述的批内精密度以及批间精密度。结果表明。本发明的试剂盒批内精密度为 7.2% 和 3.8% (见表 2), 批间精密度为 9.1% 和 5.8% (见表 3)。

[0108] 表 2

[0109]

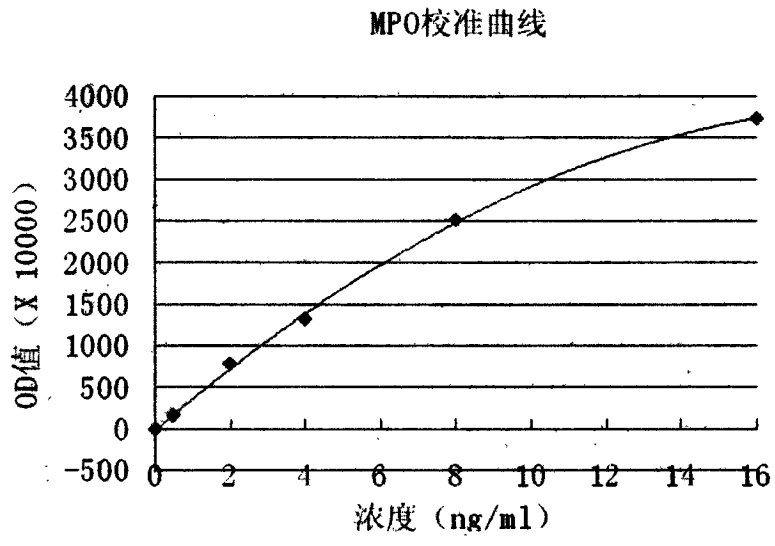
样品浓度	0.81ng/ml	16ng/ml
测定均值	0.76ng/ml	16.7ng/ml

标准差	0.0253	0.4031
批内精密度	7.2%	3.8%

[0110] 表 3

[0111]

样品浓度	0.81ng/ml	16ng/ml
测定均值	0.77ng/ml	15.9ng/ml
标准差	0.0324	0.4398
批间精密度	9.1%	5.8%



专利名称(译)	髓过氧化物酶(myeloperoxidase MPO)测定试剂盒(胶乳增强免疫比浊法)		
公开(公告)号	CN102680676B	公开(公告)日	2015-06-10
申请号	CN201110215390.0	申请日	2011-07-29
[标]申请(专利权)人(译)	南京诺尔曼生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京诺尔曼生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京诺尔曼生物技术有限公司		
[标]发明人	何仕钊		
发明人	何仕钊		
IPC分类号	G01N33/537 G01N33/531		
代理人(译)	文琦		
审查员(译)	胡晓佳		
其他公开文献	CN102680676A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种测定血清中的髓过氧化物酶含量测定的试剂盒。所要解决的技术问题是克服上述背景技术的不足，提供一种样本无需稀释、操作简单、准确度高、重复性好，适用于各种类型的全自动生化分析仪以及各种特种蛋白仪的免疫比浊法检测髓过氧化物酶含量的试剂盒。技术方案是：免疫增强比浊法检测髓过氧化物酶试剂盒，包括；a、试剂R1：缓冲液、防腐剂、加速剂、无机盐、表面活性剂，其余为纯化水；b、试剂R2：缓冲液、结合有抗人的髓过氧化物酶抗体、防腐剂，乳胶微球直径为60-150nm；c、参考校准品：缓冲液，稳定剂，防腐剂以及根据浓度需要确定的一定量的重组人髓过氧化物酶纯品，其余为纯化水。通过以上试剂组合，建立MPO含量的校准曲线，从而可以实现在全自动生化分析仪或者特定蛋白仪上快速的测定血清中MPO的含量。

MPO校准曲线

