



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103487313 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 01

(21) 申请号 201310496604. 5

(22) 申请日 2013. 10. 21

(71) 申请人 上海蓝怡科技有限公司

地址 201100 上海市闵行区友东路 85 号

(72) 发明人 李子樵 李亨芬

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限

公司 31266

代理人 祝莲君 雷芳

(51) Int. Cl.

G01N 1/38 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/96 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书16页

(54) 发明名称

血清或血浆样品稀释液及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种血清或血浆样品稀释液及其用途,具体地,所述血清或血浆样品稀释液包括:
(a) 缓冲溶液;(b) 白蛋白,所述白蛋白的含量为 10~100g/L;(c) 碱金属氯化物;以及(d) 任选的乳化剂,并且所述稀释液 pH 值为 6.0~8.0。本发明的稀释液与现有人阴性混合血清或血浆以及小牛血清类稀释液相比,具有检测结果精密准确、可长期稳定保存的特点。本发明还公开了一种含有本发明稀释液的检测试剂盒以及本发明稀释液在免疫分析法中的用途。

1. 一种血清或血浆样品稀释液,其特征在于,所述稀释液包括:
 - (a) 缓冲溶液;
 - (b) 白蛋白,所述白蛋白的含量为 10 ~ 100g/L;
 - (c) 碱金属氯化物;以及
 - (d) 任选的乳化剂;并且所述稀释液的 pH 值为 6.0 ~ 8.0。
2. 如权利要求 1 所述的稀释液,其特征在于,所述白蛋白选自:血清蛋白、乳清蛋白、卵清蛋白。
3. 如权利要求 1 所述的稀释液,其特征在于,所述白蛋白的含量为 30 ~ 90g/L。
4. 如权利要求 1 所述的稀释液,其特征在于,所述缓冲溶液选自:磷酸缓冲溶液(PB)、磷酸盐缓冲溶液(PBS)、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲溶液(Tris-HCl)或其组合。
5. 如权利要求 1 所述的稀释液,其特征在于,所述碱金属氯化物的含量为 2 ~ 5g/L。
6. 如权利要求 1 所述的稀释液,其特征在于,所述乳化剂含量为 0.08 ~ 0.10wt%,按稀释液的总重量计。
7. 如权利要求 1 所述的稀释液,其特征在于,所述稀释液还包括选自下组的一种或多种组分:
 - (a) 金属离子螯合物;
 - (b) 碱金属硫酸盐;
 - (c) 防腐剂。
8. 如权利要求 1 所述的稀释液,其特征在于,所述稀释液具有以下的一种或多种特性:
 - (a) 所述稀释液在室温下的电导率 ρ 为 $0.55 \times 10^4 \sim 0.75 \times 10^4 \mu\text{S/cm}$;
 - (b) 所述稀释液为待测样本提供的渗透压为 250 ~ 380mOsm/Kg;
 - (c) 所述稀释液的 pH 为 7.2 ~ 7.8。
9. 一种免疫分析方法,其特征在于,所述方法包括使用权利要求 1 所述的稀释液进行血清或血浆样品检测的步骤。
10. 一种检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含权利要求 1 所述的稀释液。

血清或血浆样品稀释液及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物样品检测技术领域,具体涉及一种血清或血浆样品稀释液及其用途。

背景技术

[0002] 目前新型的全自动免疫分析仪因其操作简单,自动化程度高,检测速度快,重复性好,精密度高,可以在不需要分离的条件下,可以分别单独定量测定存在于血清或血浆样本中数十种具有临床意义的微量蛋白质。但是,临床检验中许多免疫学指标由于方法学的局限性(例如全自动免疫分析仪的检测线性范围较窄)和生物学差异性(检测样本中特种蛋白的浓度较高),使得检测结果往往超出线性范围上限,需要进行一定比例稀释才能得到精确的检测结果。自动免疫分析仪检测样本量多,使用的试剂耗量大,因此样本稀释液成为临床医学诊断中最常用的试剂之一。稀释液的选用是否合适会直接影响结果的准确性和可靠性。

[0003] 目前,国内大型医疗单位和医学科研院所使用的进口自动免疫分析仪主要有进口免疫分析仪,其都有配套专用的稀释液。由于这些试剂进口依赖性高,成本昂贵,增加了患者医疗费用,而血液或血浆样本免疫分析又是许多疾病临床诊断的主要依据之一,因此,迫切需要推动进口试剂国产化,节省疾病诊断成本,减轻患者负担。因此研究一种既经济又可靠的国产化自动免疫分析仪配套使用的稀释液意义重大。

[0004] 影响全自动免疫分析仪检测血清或血浆样本中特种蛋白结果的准确度,精密度等的主要因素有:1)抗原抗体反应体系的最适宜 pH 值;2)提供抗原抗体反应的合适的胶体渗透压(即蛋白浓度);3)抗原抗体保持空间结构最佳状态所需的等渗反应环境;4)抗原抗体反应体系中最佳的离子强度等。稀释液对样本进行稀释,势必会改变血清或血浆中原有的体系环境,因此就需要稀释液能维持抗原抗体所需的最佳反应条件。

[0005] 早年有报道,在临床检验中,当进口原装稀释液不足的情况下,有使用蒸馏水或者生理盐水对血清或血浆样本进行稀释后在行检测,但是单纯的蒸馏水或者生理盐水不能提供抗原抗体所需的最佳反应条件,使检测结果偏差较大,往往影响临床疾病诊断。

[0006] 2009 年,刘成忠等报道,采用灭活血清或已知肌酸激酶(CK)浓度值的正常血清进行稀释检测血清中肌酸激酶的浓度,其检测结果较原值无显著性差异,但是在日常工作中用灭活血清对高值血清进行稀释测定易受到要事先准备灭活血清的限制;而用已知 CK 值的正常血清作为稀释液对高值血清 CK 值测定中,检测结果需要把带入的 CK 值扣除掉,因此,操作结果繁琐,在临床检测诊断中有诸多不便。

[0007] 2011 年,余文辉等报道,利用人血浆(HBsAg、HBV-DNA 和抗 HIV-1/HIV-2 呈阴性)自制成 80% 血浆稀释液替代原装进口稀释液进行稀释检测,检测结果与原值无显著性差异,在临床检测中可用。同年戴玉柱等采用混合人阴性血清或等渗的小牛血清作为替代稀释液;2012 年曾庆洋采用男性健康阴性血清替代原装进口稀释液,稀释血清样本后对 HCG 浓度进行检测,都获得良好的检测结果。然而由于人阴性血浆或者血清,来源不稳定,不利于

医疗机构大量检测中随用随取；且不同的检测项目中，人阴性血清的要求标准并非一致，不便于作为通用稀释液。此外，无论是人血清或血浆，还是一定浓度的小牛血清，含有高蛋白，容易滋生细菌，稳定性欠佳，都不利于长期保存；血清或血浆样本粘稠度都较高，采用单纯采用人阴性血清或血浆、小牛血清进行稀释，受检测时间限制，往往难以稀释混合均匀，导致检测结果容易存在一定的偏差。

[0008] 因此提供一种原材料试剂易得且价廉，同时检测结果精确可靠，分散效果良好，可长期稳定保存，并且可通用于不同的临床免疫诊断项目的血清或血浆样本稀释液，对于临床医学诊断具有重要意义。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供一种血清或血浆样品稀释液及其在临床医学诊断中用途。

[0010] 本发明第一方面提供了一种血清或血浆样品稀释液，所述稀释液包括：

[0011] (a) 缓冲溶液；

[0012] (b) 白蛋白，所述白蛋白的含量为 10 ~ 100g/L；

[0013] (c) 碱金属氯化物；以及

[0014] (d) 任选的乳化剂；

[0015] 并且所述稀释液的 pH 值为 6.0 ~ 8.0。

[0016] 在另一优选例中，所述白蛋白选自：血清蛋白、乳清蛋白、卵清蛋白。

[0017] 在另一优选例中，所述血清蛋白选自：人血清白蛋白、牛血清白蛋白、马血清白蛋白或其组合。

[0018] 在另一优选例中，所述白蛋白为冻干粉末状。

[0019] 在另一优选例中，所述白蛋白的含量为 30 ~ 90g/L。

[0020] 在另一优选例中，所述白蛋白含量优选为 45 ~ 75g/L。

[0021] 在另一优选例中，所述缓冲溶液选自：磷酸缓冲溶液(PB)、磷酸盐缓冲溶液(PBS)、三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸缓冲溶液(Tris-HCl) 或其组合。

[0022] 在另一优选例中，所述缓冲溶液的含量为 0.01 ~ 0.2mol/L，优选为 0.01 ~ 0.05mol/L。

[0023] 在另一优选例中，所述碱金属氯化物的含量为 2 ~ 5g/L，优选为 3 ~ 4g/L。

[0024] 在另一优选例中，所述碱金属氯化物选自：NaCl、KCl 或其组合。

[0025] 在另一优选例中，所述乳化剂含量为 0.08 ~ 0.10wt%，按稀释液的总重量计。较佳地，乳化剂含量为 0.09wt%。

[0026] 在另一优选例中，所述乳化剂选自：脂肪醇聚氧乙烯醚。

[0027] 在另一优选例中，所述乳化剂选自：E1005、E1304 或其组合。

[0028] 在另一优选例中，所述稀释液还包括选自下组的一种或多种组分：

[0029] (a) 金属离子螯合物；

[0030] (b) 碱金属硫酸盐；

[0031] (c) 防腐剂。

[0032] 在另一优选例中，所述金属离子螯合物的含量为 0.05 ~ 0.08wt%，按稀释液总重量计，优选为 0.06 ~ 0.07wt%。

- [0033] 在另一优选例中,所述金属离子螯合物选自:EDTA、EDTA 衍生物或其组合。
- [0034] 在另一优选例中,所述 EDTA 衍生物包括:EDTA 碱金属盐、乙二醇-双-(3-氨基-乙醚)N-N'-四乙酸(EGTA)。
- [0035] 在另一优选例中,所述碱金属硫酸盐的含量为 0.2~0.6g/L,优选为 0.3~0.4g/L。
- [0036] 在另一优选例中,所述碱金属硫酸盐选自:Na₂SO₄、K₂SO₄ 或其组合。
- [0037] 在另一优选例中,所述防腐剂的含量为 0.03~0.08wt%,按稀释液总重量计。优选为 0.03~0.05wt%,更优选为 0.04wt%。
- [0038] 在另一优选例中,所述防腐剂选自:叠氮钠、Proclin300、双咪唑烷基脲、异噻唑啉酮、1-羟基吡啶-2-硫酮、乙基汞硫代硫酸钠、对羟基苯甲酸、对羟基苯基酸乙酯、广谱杀菌剂或其组合。
- [0039] 在另一优选例中,所述稀释液由以下组分组成:
- [0040] (a)0.01~0.2mol/L 缓冲溶液;
- [0041] (b)10~100g/L 白蛋白;
- [0042] (c)2~5g/L 碱金属氯化物;
- [0043] (d)0.08~0.10wt% 乳化剂;
- [0044] (e)0.05~0.08wt% 金属离子螯合物;
- [0045] (f)0.2~0.6g/L 碱金属硫酸盐;和
- [0046] (g)0.03~0.05wt% 防腐剂;
- [0047] 其中,质量百分数按稀释液总重量计。
- [0048] 在另一优选例中,所述稀释液具有以下的一种或多种特性:
- [0049] (a)所述稀释液在室温下的电导率 ρ 为 $0.55 \times 10^4 \sim 0.75 \times 10^4 \mu S/cm$;
- [0050] (b)所述稀释液为待测样本提供的渗透压为 250~380mOsm/Kg;
- [0051] (c)所述稀释液的 pH 为 7.2~7.8。
- [0052] 在另一优选例中,所述待测样本为人血清或血浆样品。
- [0053] 本发明第二方面提供了一种免疫分析方法,所述方法包括使用第一方面所述的稀释液进行血清或血浆样品检测的步骤。
- [0054] 在另一优选例中,所述稀释液用于测定血清或血浆样品中的特定蛋白含量,所述特定蛋白为能与抗体发生特异性结合的蛋白。
- [0055] 在另一优选例中,所述特定蛋白包括:血清或血浆中的肿瘤标志物、激素和感染性疾病类的免疫学指标。
- [0056] 本发明第三方面提供了一种检测试剂盒,所述试剂盒包含第一方面所述的稀释液。
- [0057] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括说明书和用于盛装所述稀释液的容器。
- [0058] 应理解,在本发明范围内,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

具体实施方式

- [0059] 发明人经过广泛深入的研究,意外发现包含特定浓度的白蛋白、缓冲溶液、碱金属

氯化物和乳化剂的血清或血浆样品稀释液与现有的人阴性混合血清或血浆以及小牛血清类稀释液相比,具有检测结果精密准确、可长期稳定保存的特点。在此基础上完成了本发明。

[0060] 本发明中的缓冲溶液、白蛋白、碱金属氯化物和碱金属硫酸盐的含量均按稀释液总体积计。

[0061] 本发明所述“任选的”是指稀释液可以包括该组分也可以不包括该组分。

[0062] 血清或血浆样品稀释液

[0063] 本发明的稀释液的成分主要包括:白蛋白、缓冲溶液和碱金属氯化物,其中,白蛋白可选自包括人血清白蛋白、牛血清白蛋白、马血清白蛋白等在内的血清蛋白,较佳地选自:人血清白蛋白、牛血清白蛋白、马血清白蛋白或其组合,更佳地为牛血清白蛋白。

[0064] 稀释液中白蛋白的含量应与待测血清或血浆样品中的蛋白浓度相匹配,白蛋白含量的过低或过高,容易对稀释液的稀释效果产生不利影响。

[0065] 此外,合适的胶体渗透压(即蛋白浓度)是影响血清或血浆样本中特种蛋白检测结果准确度和精密度的主要因素之一,本发明中,白蛋白的含量优选为 10 ~ 100g/L,更优选为 30 ~ 90g/L,最优选为 45 ~ 75g/L。从而使稀释液为待检样本提供了较佳的抗原抗体反应所需胶体渗透压环境(250 ~ 380mOsm/Kg),从而更好地提高了稀释后样本检测准确度和精密度。白蛋白含量过低,稀释液将不能提供血清样本中原有的胶体渗透压环境,从而导致稀释后样本中的特定蛋白的测定不准确。白蛋白含量过高将提高稀释液的生产成本。

[0066] 本发明的稀释液是采用常规原料进行特定组合而形成的,不同于目前已知的人阴性血浆或者血清,其来源不稳定,不利于医疗机构大量检测中随用随取;且不同的检测项目中,人阴性血清的要求标准并非一致,不便于作为通用稀释液。而本发明的稀释液可通用于不同的临床免疫诊断项目中,可针对不同的人血清样本提供稳定适宜的渗透压,且不会对不同的检测项目(即不同的血清样本)造成干扰,因此具有很高的通用性。

[0067] 本发明中的白蛋白优选以冻干粉的形式加入上述稀释液中,以提高稀释后检测样本的准确度和精密度。

[0068] 缓冲溶液优选为不含钙离子和镁离子的缓冲溶液,一类优选的例子包括:磷酸缓冲溶液(PB)、磷酸盐缓冲溶液(PBS)和三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲溶液(Tris-HCl),由于缓冲溶液的过酸或过碱以及浓度大小都会对反应体系中的荧光产生不利影响,导致检测结果不准确。因此本发明缓冲溶液的含量优选为 0.01 ~ 0.2mol/L,更优选为 0.01 ~ 0.05mol/L。并且通过缓冲溶液 pH 值的调节使得稀释液的 pH 值维持在 6.0 ~ 8.0(更佳地在 7.2 ~ 7.8),从而为抗原抗体反应体系提供了最适宜 pH 值。

[0069] 在本发明中,缓冲溶液可采用常规方法进行制备,例如 0.01M PBS 缓冲液的配制方法包括以下步骤:

[0070] 1. 组份浓度:137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na_2HPO_4 , 2mM KH_2PO_4 ;

[0071] 2. 配制量:1000mL;

[0072] 3. 配制方法:

[0073] 1) 称量下列试剂,置于 1L 烧杯中;

[0074] NaCl 8g; KCl 0.2g; Na_2HPO_4 1.42g; KH_2PO_4 0.27g

[0075] 2) 向烧杯中加入约 800mL 的去离子水,充分搅拌溶解;

[0076] 3) 滴加浓盐酸将 pH 值调节至 7.4, 然后加入去离子水将溶液定容至 1L;

[0077] 4) 高温高压灭菌后, 室温保存。用时随取即可。

[0078] 本发明稀释液中碱金属氯化物的含量优选为 2 ~ 5g/L, 更优选为 3 ~ 4g/L。从而使得稀释液的电导率 ρ 保持在 $0.55 \times 10^4 \sim 0.75 \times 10^4 \mu \text{S/cm}$ 之间, 保证了抗原抗体反应体系所需的最佳离子强度。一类优选的碱金属氯化物包括: NaCl、KCl 或其组合。

[0079] 由于本发明稀释液具有如上所述的电导率 ρ 、渗透压和 pH 值, 因此对样本进行稀释时, 稀释液可以维持抗原抗体所需的最佳反应条件, 从而确保了血清或血浆样本中特种蛋白检测结果的准确度和精密度。

[0080] 另外, 本发明的稀释液还可以包括一种以上的乳化剂, 以更好地提高检测的准确性。按稀释液的总重量计, 乳化剂含量为 0.08 ~ 0.10wt%, 优选为 0.09%。一类优选的乳化剂包括但不限于: 脂肪醇聚氧乙烯醚。其中, 脂肪醇聚氧乙烯醚包括异构十醇聚氧乙烯醚、异构十三醇聚氧乙烯醚等。

[0081] 本文所述脂肪醇聚氧乙烯醚(AE), 又为聚乙氧基化脂肪醇, 是由脂肪醇与环氧乙烷通过加成反应而制得, 其通式为 $\text{R-O-(C}_2\text{H}_4\text{O)}_n\text{-H}$, R 为饱和或者不饱和的羟基, n 是环氧乙烷的加成数, 也就是乳化剂分子中氧乙烯基的数目。

[0082] 异构十醇聚氧乙烯醚, 即通式中的 R 为 C_{10} , 其中优选为 E1005, 即 R 为 C_{10} 且 $n=5$; 异构十三醇聚氧乙烯醚, 即碳链 R 为 C_{13} , 其中优选为 E1304, 即 R 为 C_{13} 且 $n=4$ 。

[0083] 在不妨碍本发明效果的范围内, 本发明的稀释液可含有适当量的选自下组的一种或多种组分: (a) 金属离子螯合物; (b) 碱金属硫酸盐; (c) 防腐剂。

[0084] 其中, 按稀释液总重量计, 金属离子螯合物的含量优选为 0.05 ~ 0.08wt%, 更优选为 0.06 ~ 0.07wt%。一类优选的金属离子螯合物包括: EDTA、EDTA 衍生物。其中, EDTA 衍生物包括 EDTA 碱金属盐, 如 EDTA 钠盐, 以及乙二醇-双-(3-氨基-乙醚)N-N'-四乙酸(EGTA)。优选 EDTA 钠盐。

[0085] 按稀释液总重量计, 防腐剂的含量优选为 0.03 ~ 0.08wt%, 更优选为 0.03 ~ 0.05wt%, 最佳地为 0.04wt%。一类优选的防腐剂包括: 叠氮钠、Proclin300、双咪唑烷基脲、异噻唑啉酮、1-羟基吡啶-2-硫酮、乙基汞硫代硫酸钠、对羟基苯甲酸、对羟基苯甲酸乙酯、广谱杀菌剂(如四环素类, 氯霉素, 庆大霉素类)。

[0086] 本发明的稀释液与现有的血液稀释剂存在以下区别:

[0087] 现有的血液稀释剂检测的是全血样本, 而本发明的稀释液用于检测血清或者血浆样本, 而非全血样本。现有的血液稀释剂是用于检测全血中的血细胞, 且主要针对于血细胞的计数和分类, 测量血红蛋白参数以及区分白细胞亚型等; 而本发明的稀释液是用于测定血清或者血浆中的特定蛋白的含量。

[0088] 所述特定蛋白为能与抗体发生特异性结合的蛋白, 包括: 血清或血浆中的肿瘤标志物、激素和感染性疾病类的免疫学指标。

[0089] 感染性疾病类的免疫学指标, 也称传染性类的免疫学指标, 例如乙肝表面抗原 HBsAg, 人类免疫缺陷病毒 HIV, 人乳头状瘤病毒 HPV 等。

[0090] 本发明的稀释液可适用于进口自动免疫分析仪, 包括(但不限于): 美国雅培公司的 AXSYM、强生公司的 Vitros Eci、贝克曼-库尔特的 DXI800、法国梅里埃 Vidas 系列、日本东曹 AIA 系列仪器(例如 AIA-2000ST、AIA-360、AIA-600II、AIA-900、AIA-900M、AIA-900L、

AIA-1800ST、AIA-2000LA 等)、罗氏 Modular EVO 免疫分析仪。

[0091] 本发明稀释液的制备方法主要包括以下步骤：

[0092] (1) 将各组分进行混合，得一混合溶液；

[0093] (2) 调节所得混合溶液的 pH 值，即制得本发明的稀释液。

[0094] 本发明的稀释液在制备时，各组分的添加顺序并无特别要求，只需充分混合溶解既可。一类优选的方法包括：

[0095] (1) 配制 0.01-0.2mol/L 缓冲溶液，pH 值为 6.0-8.0；

[0096] (2) 向步骤 (1) 的缓冲液中加入白蛋白，终浓度为 30-90g/L，搅拌，使其充分溶解；

[0097] (3) 加入碱金属氯化物，终浓度为 0.3-4g/L，搅拌，使其充分溶解；

[0098] (4) 加入金属离子螯合物，终浓度为 0.05-0.08wt%，搅拌，使其充分溶解；

[0099] (5) 加入乳化剂，终浓度为 0.08-0.10wt%，搅拌，使其充分混匀；

[0100] (6) 加入防腐剂，终浓度为 0.03-0.05wt%，搅拌，使其充分溶解；

[0101] (7) 用 5M 氢氧化钠溶液或 5M 盐酸溶液调节 pH 值至 7.2-7.8，混匀；

[0102] (8) 室温静置 30min 以上，2℃ -8℃ 保存。

[0103] 与现有技术相比，本发明的主要优点包括：

[0104] (1) 将本发明的稀释液用于检测血清或血浆样本中蛋白，其检测结果准确度高；

[0105] (2) 将本发明的稀释液用于检测血清或血浆样本中蛋白，其检测结果精密度高；

[0106] (3) 本发明的稀释液具有良好的热稳定性；

[0107] (4) 本发明的稀释液可长期稳定保存。

[0108] 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0109] 除非另行定义，文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0110] 血清标本：本发明实施例中所使用的血清标本为糖类抗原 CA19-9 (Carbohydrate Antigen 19-9) 和人绒毛膜促性腺激素-β 亚基 (human Chorionic Gonadotropin, β-HCG) 的血清标本 (由上海颀桥医院提供)。

[0111] 参照样品种：选自日本东曹免疫分析仪配套专用稀释液 CA19-9 样本稀释液 (批号：1450770) 和 β-HCG 样本稀释液 (批号：C853591)。

[0112] 在实施例和对比例中，均采用日本东曹 AIA-2000ST 型全自动免疫分析仪进行血清或血浆检测分析。

[0113] 分别采用参照样品种、对比例稀释液和实施例稀释液对不同浓度的糖类抗原 CA19-9 和 β-HCG 的血清标本进行倍比稀释，然后采用荧光磁微粒酶免法 (具体方法参照文献“改良荧光磁微粒酶免分析法检测三种肿瘤标志物及应用，标记免疫分析与临床。2008, 15(5): 306 ~ 307 转 287”) 进行测定，评价各稀释液的性能。

[0114] 本发明以下实施例、对比例中的血清或血浆稀释液通过常规方法，将各组分进行

混合来制备。

[0115] 下列实施例与对比例中的终浓度均为按稀释液总重量计的质量百分数。

[0116] 实施例 1

[0117] 稀释液中各组分与含量如表 1 所示：

[0118] 表 1

[0119]

0.1M 磷酸盐缓冲溶液 (PBS)	100ml
牛血清白蛋白 (BSA)	20g
氯化钠	3.5g
EDTA·二钠	6.5mg
脂肪醇聚氧乙烯	终浓度为 0.08wt%

[0120]

NaN ₃	终浓度为 0.04wt%
pH	7.4

[0121] 实施例 2

[0122] 稀释液中各组分与含量如表 2 所示：

[0123] 表 2

[0124]

0.1M 磷酸盐缓冲溶液 (PBS)	100ml
牛血清白蛋白 (BSA)	90g
氯化钠	3.5g
EDTA·二钠	6.5mg
脂肪醇聚氧乙烯	终浓度为 0.10wt%
NaN ₃	终浓度为 0.04wt%
pH	7.4

[0125] 对比例 1

[0126] 稀释液中各组分与含量如表 3 所示：

[0127] 表 3

[0128]

0.01M 磷酸盐缓冲溶液 (PBS)	100ml
牛血清白蛋白 (BSA)	5g
氯化钠	3.5g
EDTA·二钠	6.5mg
脂肪醇聚氧乙烯	终浓度为 0.09wt%
NaN ₃	终浓度为 0.04wt%
pH	7.4

[0129] 对比例 2

[0130] 稀释液中各组分与含量如表 4 所示：

[0131] 表 4

[0132]

0.01M 磷酸盐缓冲溶液 (PBS)	100ml
牛血清白蛋白 (BSA)	130g
氯化钠	3.5g
EDTA·二钠	6.5mg
脂肪醇聚氧乙烯	终浓度为 0.09wt%
NaN ₃	终浓度为 0.04wt%
pH	7.4

[0133] 对比例 3

[0134] 稀释液中各组分与含量如表 5 所示：

[0135] 表 5

[0136]

0.2M 磷酸盐缓冲溶液 (PBS)	100ml
牛血清白蛋白 (BSA)	90g
氯化钠	3.5g
EDTA·二钠	6.5mg
NaN ₃	终浓度为 0.04wt%
pH	7.4

[0137] 对比例 4

[0138] 选自志愿者的正常人阴性混合血清,包括:CA19-9 人阴性混合血清(至少十例人血清混合)和 β -HCG 人阴性混合血清(至少十例人血清混合)。

[0139] 准确度测定

[0140] 准确度的检测方法是采用上海市药监局提供的标准检测及计算方法进行测定和计算。

[0141] 准确度即测定值与真值的差异程度。选取 AIA-2000ST 免疫分析仪 CA19-9 (1-400U/ml) 以及 β -HCG (0.5-400mIU/ml) 检测线性范围内的阳性血清,采用 AIA-2000ST 免疫分析仪,分别对 CA19-9 以及 β -HCG 阳性血清样本进行 10 次重复测定,取平均值得到各阳性血清中检测项目的浓度值,结果为:CA19-9 浓度真值为 265.8U/ml, β -HCG 浓度真值为 331.6mIU/ml。采用实施例 1、实施例 2 和对比例稀释液,对阳性血清样本自动进行 50 倍、100 倍以及 200 倍稀释后自动检测血清样本中 β -HCG 或 CA19-9 浓度,每个稀释度重复检测 3 次。检测结果为稀释后 3 次检测浓度均值乘以稀释倍数后的终浓度值,检测数据如表 6,表 7 所示:

[0142] 表 6

[0143]

检测项目		CA19-9 (U/ml)				B-HCG (mIU/ml)			
		实施例1	实施例2	对比例1	对比例2	实施例1	实施例2	对比例1	对比例2
50倍	测定结果	262.9	264.4	230.6	261.1	327.6	325.4	369.8	322.8
	与真值偏差	1.09%	-0.53%	-13.24%	1.77%	-1.21%	-1.87%	11.52%	-2.65%
100倍	测定结果	258.6	271.8	224.8	277.1	325.4	329.7	377.2	345.9
	与真值偏差	2.71%	2.26%	-15.43%	4.25%	-1.87%	-0.57%	13.75%	4.31%
200倍	测定结果	256	275.9	213.3	280.6	321.4	337.8	385.9	349.6
	与真值偏差	3.69%	3.80%	-19.75%	5.57%	-3.08%	1.87%	16.38%	5.43%

[0144] 由表 6 结果可知,采用本发明的样本稀释液,其血清样本稀释的检测浓度值与血清样本浓度真值的偏差在 $\pm 6\%$ 以内,其准确度较高;而对比例 1 中牛血清白蛋白浓度过低,血清样本稀释的检测浓度值与真值的偏差大于 $\pm 10\%$,偏差较大导致临床诊断结果的失误。此外,更高浓度的牛血清白蛋白浓度并无提高其反应准确度。

[0145] 表 7

检测项目		CA19-9 (U/ml)		B-HCG检测结果 (mIU/ml)		
稀释液		实施例1	对比例4	实施例2	对比例4	
稀释倍数						
[0146]	50倍	测定结果	262.7	268.1	323.9	334.3
			266.2	280.9	330.4	349.7
			259.9	284.4	328.6	353.8
	均值	262.9	277.8	327.6	345.9	
	与真值偏差	1.07%	4.51%	1.19%	5.18%	
100倍	测定结果	252.1	273.7	329.8	350.2	
[0147]			269.3	296.0	321.6	359.7
			254.4	281.4	318.7	364.4
		均值	258.6	283.7	323.4	358.1
	与真值偏差	2.71%	6.73%	2.48%	7.99%	
	200倍	测定结果		265.2	288.0	332.9
			249.9	299.3	318.1	380.1
			253.0	281.9	313.3	364.8
均值		256.0	289.7	321.4	366.8	
与真值偏差		3.67%	9.00%	3.07%	10.61%	

[0148] 从表 7 可以看出,正常人阴性血清稀释液(对比例 4)与本发明稀释液相比,其与真值的偏差明显高于本发明稀释液与真值的偏差,且稀释倍数越大,其偏差即越大,即测试的准确度越低。

[0149] 检测精密度

[0150] 精密度的检测方法是采用上海市药监局提供的标准检测及计算方法进行测定和计算。

[0151] 精密度是指对同一份样本稀释后重复测定,每次测定结果和均值的接近程度,用于考核一种稀释液的分析内、分析间以及批内与批间变异的指标。该指标反应了一种稀释液在测定中的重复性的好坏。

[0152] ①分析内精密度

[0153] 分析内精密度试验,是指在同一次分析测定中,测定结果的变异情况。采用 AIA-2000ST 免疫分析仪,分别对 CA19-9 以及 β -HCG 阳性血清样本进行 10 倍稀释,然后进行多次分析内精密度的测定($n=10$),即同一血清样本在同一次试验中重复测定 10 次浓度值的平均值(X)和标准差(SD),变异系数($CV\%$)= $SD/X*100\%$ 。检测结果为稀释后测定浓度乘以稀释倍数后的终浓度值,结果如表 8 所示:

[0154] 表 8

[0155]

检测项目	CA19-9 (U/ml)				β-HCG (mIU/ml)			
	实施例1	实施例2	对比例3	对比例4	实施例1	实施例2	对比例3	对比例4
平均浓度	263.7	266.8	272.6	265.5	1762.1	1788.8	1790.4	1802.7
标准偏差	4.8	5.2	12.8	21.3	41.6	49.3	88.4	174.5
变异系数 (CV%)	1.82	1.95	4.69	8.02	2.36	2.76	4.94	9.68

[0156]

[0157] 从表 8 可以看出本发明的稀释液进行样本稀释后的变异系数与对比例 3 和 4 稀释液相比, 变异系数在 3% 范围内, 而对比例 4 的变异系数都远超过了 5%, 因此表明本发明稀释液的分析内精密度明显要优于对比实施例中的稀释液精密度。同时, 本发明的稀释液进行样本稀释后的变异系数要远远小于对比例 3 中的变异系数, 说明乳化剂的添加能显著提高样本稀释液的检测精密度。

[0158] ②分析间精密度

[0159] 分析间精密性试验, 是指在不同次的分析测定中, 测定结果的变异情况。采用 AIA-2000ST 免疫分析仪, 分别对 CA19-9 以及 β-HCG 阳性血清样本进行 50 倍稀释, 然后进行测定 (n=10), 即同一血清样本在同一次试验中重复测定 10 次浓度值的平均值 (X) 和标准差 (SD), 变异系数 (CV%) = SD/X*100%, 同一试验每天做一次, 重复做 3 天, 计算其变异系数 (CV%)。检测结果为稀释后测定浓度乘以稀释倍数后的终浓度值, 结果如表 9-1 和表 9-2 所示:

[0160] 表 9-1

[0161]

检测项目	CA19-9 (U/ml)											
	实施例1			实施例2			对比例3			对比例4		
稀释液												
测定次数	第1次	第2次	第3次	第1次	第2次	第3次	第1次	第2次	第3次	第1次	第2次	第3次
平均浓度	190.9	179.2	186.4	188.3	175.6	192.4	177.9	199.4	172.3	160.7	177.9	214.3
总均浓度	185.5			185.4			183.2			184.3		
标准偏差	5.9			8.8			14.3			27.4		
变异系数 (CV%)	3.18			4.72			7.81			14.8		

[0162] 表 9-2

[0163]

检测项目	β -HCG (mIU/ml)											
	实施例1			实施例2			对比例3			对比例4		
稀释液	第1次	第2次	第3次	第1次	第2次	第3次	第1次	第2次	第3次	第1次	第2次	第3次
测定次数	第1次	第2次	第3次	第1次	第2次	第3次	第1次	第2次	第3次	第1次	第2次	第3次
平均浓度	271.4	283.1	296.1	277.2	280.9	289.5	270.3	310.9	283.1	332.3	270.0	257.9
总均浓度	283.5			282.5			288.1			286.7		
标准偏差	12.4			6.3			20.8			39.9		
变异系数 (CV%)	4.36			2.23			7.22			13.92		

[0164]

[0165] 从表 9-1 和表 9-2 可以看出,本发明的稀释液进行样本稀释后的变异系数与对比例稀释液相比,变异系数在 5% 范围内,而对比例稀释液的变异系数远远超过了 5%,因此表明本发明稀释液的分析间精密度高。

[0166] 此外,本发明的稀释液进行样本稀释后的变异系数要远远小于对比例 3 中的变异系数,说明乳化剂的添加能显著提高样本稀释液的检测精密密度。

[0167] 同时,本发明的稀释液可同时适用于糖类抗原 CA19-9 和人绒毛膜促性腺激素- β 亚基(β -HCG)的血清标本,因此具有很好的通用性。

[0168] 虽然人阴性混合血清中的主要成分包括血清白蛋白,然而本发明的稀释液与其相比,表现出更高的准确度和精密密度。

[0169] ③批间精密密度

[0170] 批间精密密度测定,即将同一例血清样本在同一次试验中分别用实施例 1、实施例 2 和对比例稀释液进行 200 倍稀释后测定($n=3$),即每个批号重复 10 次,计算 30 次回算浓度值的平均值(X)和标准差(SD),变异系数($CV\%$)= $SD/X*100\%$ 。试验结果如表 10-1 和表 10-2 所示:

[0171] 表 10-1

[0172]

项目 重复 孔数	CA19-9 (U/ml)					
	实施例1			对比例4		
	第1批	第2批	第3批	第1批	第2批	第3批
1	8273.5	7962.1	8333.6	9635.2	11166.1	9709.3
2	8133.9	8110.1	8127.8	7432.9	8911.3	8267.8
3	8463.7	8345.6	7749.8	9366.1	7732.6	8653.2
4	7986.4	7866.4	7924.7	8432.4	8700.4	8207.1
5	7854.1	8136.9	8120.0	8642.7	9632.2	8642.5
6	8223.4	7948.1	8349.6	8164.4	8048.5	7391.4
7	8577.2	8099.7	8364.7	7677.3	8761.4	8210.0
8	7976.3	8222.4	7739.9	8501.5	9109.0	11075.5
9	8219.5	7764.5	8008.1	7434.7	8167.8	7666.7
10	7714.4	7696.8	7646.3	10610.6	9842.6	8145.7
平均值	8064.6			8731.3		
标准差	246.0			1019.3		
CV%	3.05			11.67		

[0173]

[0174] 表 10-2

[0175]

项目 重复 孔数	β-HCG (mIU/ml)					
	实施例2			对比例4		
	第1批	第2批	第3批	第1批	第2批	第3批
1	36486.1	35220.3	34698.1	38372.8	32663.6	44169.3
2	34892.9	34963.3	34691.5	41002.3	39415.1	39193.3
3	35102.4	36879.4	35786.8	43224.6	43384.6	35201.7
4	33997.7	35988.8	33894.2	39743.8	44003.5	34183.6
5	33994.6	34659.7	35875.6	46994.5	37823.5	41175.5
6	34100.7	37999.1	34982.2	44381.1	38614.3	39201.1
7	32873.5	34555.7	35439.9	37653.7	34614.8	45176.1
8	34796.6	35356.6	33120.6	41298.6	41669.9	42162.4
9	33261.2	35789.0	34869.9	44552.0	39824.5	37188.8
10	34665.5	36852.1	36762.8	31487.6	48968.0	33169.7
平均值	35085.2			40017.1		
标准差	1177.8			4339.4		
CV%	3.36			10.84		

[0176] 从表 10-1 和表 10-2 可以看出,本发明的稀释液进行样本稀释后的变异系数与对比例稀释液相比,变异系数在 5% 范围内,而对比例稀释液的变异系数远远超过了 5%。因此表明本发明稀释液的批间精密度高。

[0177] 同时,本发明的稀释液可同时适用于糖类抗原 CA19-9 和人绒毛膜促性腺激素-β 亚基(β-HCG)的血清标本,因此具有很好的通用性,并且都表现出较高的准确度和精密度。

[0178] 实施例 5 稳定性检测

[0179] ①热稳定性检测

[0180] 将本发明稀释液(实施例 1 及实施例 2)与对比例 4 稀释液(正常人阴性血清)置于 37℃ 恒温箱中,分别于第 7 天、第 15 天以及第 30 天对当天收集的一例新鲜阳性血清样本进行 50 倍稀释,后检测其浓度(n=3),即每个稀释做三个重复。同时采用日本东曹公司进口原装试剂盒及配套稀释液(参照样品)对当天的血清样本进行 10 次重复测定,取平均值得到各例阳性血清样本的浓度真值,检测浓度为 CA19-9 分别为为 3520.6U/ml、678.8U/ml 以及 13145.9U/ml;β-HCG 分别为 898.6mIU/ml、1524.3mIU/ml 以及 16998.4mIU/ml。

[0181] 以本发明稀释液的检测结果与血清样本浓度真值进行对比。检测结果如表 11-1 和表 11-2 所示:

[0182] 表 11-1

[0183]

检测项目	CA19-9 (U/ml)								
	第7天 (真值: 3520.6)			第15天 (真值: 678.8)			第30天 (真值: 13145.9)		
	实施例1	实施例2	对比例4	实施例1	实施例2	对比例4	实施例1	实施例2	对比例4
1	3486.1	3522.3	2884.1	646.4	689.5	608.2	13872.0	13566.8	9689.3
2	3489.2	3433.6	3091.5	665.3	677.6	573.5	11643.9	12921.6	10230.4
3	3514.2	3600.9	3367.8	679.8	674.3	532.7	12578.8	13670.8	8896.4
平均值	3496.5	3518.9	3114.5	663.8	680.5	571.5	12698.2	13386.4	9605.4
偏差	-0.68%	-0.05%	-11.53%	-2.21%	0.25%	-15.81%	-3.41%	1.83%	-26.93%

[0184] 表 11-2

[0185]

检测项目	β -HCG (mIU/ml)								
	第7天 (真值: 898.6)			第15天 (真值: 1524.3)			第30天 (真值: 16998.4)		
	实施例1	实施例2	对比例4	实施例1	实施例2	对比例4	实施例1	实施例2	对比例4
1	873.1	879.1	813.6	1467	1574.4	1342	15550.6	18863.3	12709.3
2	858.9	880.2	808.4	1446.8	1522.4	1439.8	17691.1	16420.4	10779.6
3	850.6	869.9	787.8	1500.9	1498.1	1074.5	16425.8	17994.7	15234.4
平均值	860.9	876.4	803.3	1471.6	1531.6	1285.4	16555.8	17759.5	12907.8
偏差	-4.20%	-2.47%	-10.61%	-3.46%	0.48%	-15.67%	-2.60%	4.48%	-24.06%

[0186] 从表 11-1 和表 11-2 可以看出,本发明稀释液在放置 30 天后进行样本稀释的结果测定值与参照样品的偏差都在 $\pm 0.5\sim 5\%$ 范围内,而对比例稀释液与血清样本浓度真值的偏差则高达 24%,而与血清样本浓度真值的偏差值越小,表明稀释液稳定性越好,因此本发明稀释液的热稳定性好。

[0187] ②长期保存稳定性检测

[0188] 将本发明稀释液(实施例 1 及实施例 2)和对比例 4 稀释液(正常人阴性血清)置于 4℃中长期保存,分别于 6 个月后、12 个月后对新鲜阳性血清样本进行 50 倍稀释,后检测其浓度(n=3),即每个稀释做三个重复。同时采用日本东曹公司进口原装试剂盒及配套稀释液(参照样品)对当天的血清样本进行 10 次重复测定,取平均值得到各例阳性血清样本的浓度真值,检测浓度为 CA19-9 分别为 606.8U/ml 以及 4704.6U/ml ; β -HCG 分别为 664.9mIU/ml 以及 1052.7mIU/ml。

[0189] 以本发明稀释液的检测结果与血清样本浓度真值进行对比。检测结果如表 12-1 和表 12-2 所示:

[0190] 表 12-1

[0191]

检测项目 重复孔数	CA19-9 (U/ml)					
	第6月 (真值: 606.8)			第12月 (真值: 4704.6)		
	实施例1	实施例2	对比例4	实施例1	实施例2	对比例4
1	577.9	596.3	541.4	4438.3	4688.2	3410.3
2	584.2	587.4	507.6	4564.9	4701.4	3909.8
3	575.4	578.2	545.3	4500.7	4696.5	3561.8
平均值	579.2	587.3	531.4	4501.3	4695.4	3627.3
偏差	-4.55%	-3.21%	-12.42%	-4.32%	-0.20%	-22.90%

[0192] 表 12-2

[0193]

检测项目 重复孔数	B-HCG (mIU/ml)					
	第6月 (真值: 664.9)			第12月 (真值: 1052.7)		
	实施例1	实施例2	对比例4	实施例1	实施例2	对比例4
1	659.2	679.1	619.4	1025.1	1088.6	786.8
2	643.7	671.1	554.4	994.6	1045.2	769.6
3	650.6	659.8	611.7	990.5	993.3	808.5
平均值	651.2	670.0	595.2	1003.4	1042.4	788.3
偏差	-2.06%	0.77%	-10.49%	-4.68%	-0.98%	-25.12%

[0194] 从表 12-1 和表 12-2 可以看出,本发明稀释液在放置 12 个月以后进行样本稀释的结果测定值与血清样本浓度真值的偏差仅在 $\pm 0.8\text{--}5\%$ 范围内,而对比例稀释液与参照样品的偏差则高达 25%,而与参照样品的偏差值越小,表明稀释液稳定性越好,因此本发明的稀释液的长期保存的稳定性高。

[0195] 同时,本发明的稀释液可同时适用于糖类抗原 CA19-9 和人绒毛膜促性腺激素- β 亚基(β -HCG)的血清标本,因此具有很好的通用性。

[0196] 虽然人阴性混合血清中的成分主要包括血清白蛋白,然而本发明的稀释液与其相比,表现出更高的热稳定性和长期保存的特点。

[0197] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

专利名称(译)	血清或血浆样品稀释液及其用途		
公开(公告)号	CN103487313A	公开(公告)日	2014-01-01
申请号	CN201310496604.5	申请日	2013-10-21
[标]申请(专利权)人(译)	上海蓝怡科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海蓝怡科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海蓝怡科技有限公司		
[标]发明人	李子樵 李亨芬		
发明人	李子樵 李亨芬		
IPC分类号	G01N1/38 G01N33/531 G01N33/96		
代理人(译)	雷芳		
其他公开文献	CN103487313B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种血清或血浆样品稀释液及其用途，具体地，所述血清或血浆样品稀释液包括：(a)缓冲溶液；(b)白蛋白，所述白蛋白的含量为10~100g/L；(c)碱金属氯化物；以及(d)任选的乳化剂，并且所述稀释液pH值为6.0~8.0。本发明的稀释液与现有人阴性混合血清或血浆以及小牛血清类稀释液相比，具有检测结果精密准确、可长期稳定保存的特点。本发明还公开了一种含有本发明稀释液的检测试剂盒以及本发明稀释液在免疫分析法中的用途。

0.1M 磷酸盐缓冲溶液 (PBS)	100ml
牛血清白蛋白 (BSA)	20g
氯化钠	3.5g
EDTA·二钠	6.5mg
脂肪醇聚氧乙烯	终浓度为 0.08wt%