



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107490680 A

(43)申请公布日 2017.12.19

(21)申请号 201610401788.6

(22)申请日 2016.06.09

(71)申请人 常州博闻迪医药科技有限公司

地址 213025 江苏省常州市戚墅堰区东方
东路167号

(72)发明人 李亚星 刘凤鸣 刘冰

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种血液糖化血红蛋白酶联免疫检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种血液糖化血红蛋白酶联免疫检测方法。这种检测方法，包括：(1)酶联免疫检测试剂盒的制备；(2)将待检测血液样本放入酶联免疫检测试剂盒，读取样本糖化血红蛋白的免疫检测结果a以及糖化血红蛋白对应的标准比对品免疫检测结果b；(3)相同待检测血液样本放入酶联免疫检测试剂盒，读取样本血红蛋白的免疫检测结果c以及血红蛋白对应的标准比对品免疫检测结果d；(4)计算得出比值A=a/b，比值B=c/d；(5)计算糖化血红蛋白的含量=A/B。本发明检测的灵敏度高，特异性强，且可以定量，解决了传统的糖化血红蛋白定量检测方法操作步骤繁琐，检测时间长的问题，同时解决了糖化血红蛋白定性检测准确性低的问题。

1. 一种糖化血红蛋白酶联免疫检测方法,包括如下步骤:

(1) 制备酶联免疫检测试剂盒,其中包括标准比对品的制备,所述标准比对品为不与血红蛋白、抗血红蛋白抗体、糖化血红蛋白以及抗糖化血红蛋白抗体发生免疫性结合反应的物质;

(2) 将待检测血液样本放入酶联免疫检测试剂盒,以标准比对品作为参比品,与糖化血红蛋白进行免疫检测反应,读取样本糖化血红蛋白的免疫检测结果a以及糖化血红蛋白对应的标准比对品免疫检测结果b;

(3) 将与步骤(2)中同一种待检测血液样本放入酶联免疫检测试剂盒,以与步骤(2)中同一种标准比对品作为参比品,与血红蛋白进行免疫检测反应,读取样本血红蛋白的免疫检测结果c以及血红蛋白对应的标准比对品免疫检测结果d;

(4) 计算得出比值A=a/b,比值B=c/d;

(5) 计算糖化血红蛋白的含量=A/B。

2. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于:所述检测方法所用原料包括标准比对品、抗血红蛋白的抗体、抗糖化血红蛋白的抗体、包被载体、酶标记物、显色液、分析缓冲液及浓缩洗涤液。

3. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于:所述标准比对品为兔IgG、驴IgG、马IgG、羊IgG、鼠IgG的一种或两种或两种以上。

4. 如权利要求1所述的血液糖化血红蛋白的检测方法,其特征在于:所述抗血红蛋白抗体为抗血红蛋白单克隆抗体和抗血红蛋白多克隆抗体的一种或两种。

5. 如权利要求1所述的血液糖化血红蛋白的检测方法,其特征在于:所述抗糖化血红蛋白抗体为抗糖化血红蛋白单克隆抗体、抗糖化血红蛋白多克隆抗体、抗血红蛋白单克隆抗体、抗血红蛋白多克隆抗体的一种或两种或两种以上。

6. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于:所述载体为微孔板。

一种血液糖化血红蛋白酶联免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测分析技术领域,尤其涉及一种血液糖化血红蛋白酶联免疫检测方法。

背景技术

[0002] 糖化血红蛋白(HbA1c)是血液葡萄糖通过非酶作用,经细胞膜与红细胞内血红蛋白-链颤氨酸结合形成的产物,其合成速率与红细胞所处环境中糖的浓度成正比,是人体血液中红细胞内的血红蛋白与血糖结合的产物。

[0003] 血糖和血红蛋白的结合生成糖化血红蛋白是不可逆反应,并与血糖浓度成正比,且保持120天左右。血糖是从食物中的碳水化合物分解而来的血液中的单糖,通常仅指葡萄糖,血糖测试结果反映的是即刻的血糖水平。所以糖化血红蛋白较血糖测定更有临床意义,被誉为糖尿病病情监测的“金标准”,在临床检测中进行日常检测作为血糖控制的指标。

[0004] 目前临幊上测定糖化血红蛋白的主要检测方法有高效液相色谱、电泳法、亲和层析法等。

[0005] 离子交换高效液相色谱分析法,它是在经典液相层析法基础上,引进了气相层析的理论具有气相层析的全部优点。测试前需要采用专用仪器对血样中的血红蛋白和糖化血红蛋白进行分离,测试时需使用大型色谱分析设备进行检测,故检测必须在医院由专人进行,难以满足糖化血红蛋白即时检测的需求。

[0006] 电泳法,相比于非糖化血红蛋白,因糖化而变化的总电荷和糖化血红蛋白的等电点变化是琼脂糖凝胶或者pH梯度5.0~6.5的凝胶等电聚焦电泳分离的基础。琼脂糖凝胶电泳的血红蛋白亚组分分辨率很小,而等电聚焦可以更好地使亚组分分离。可能由于试验的自动化程度不足,重要性已经下降。

[0007] 亲和层析法,将血样本中的血红蛋白加到层析柱后,所有的糖化血红蛋白(HbA1和旁链糖化的血红蛋白;总糖化血红蛋白)与硼酸结合而非糖化血红蛋白通过层析柱可被测量。在加入高浓度也包含顺式-羟基的多羟基复合物,例如山梨醇后,糖化血红蛋白与硼酸的结合被替换而从柱子上洗脱下来。亲和层析法对经翻译以后修饰的血红蛋白和病理血红蛋白的影响相对不敏感。利用亲和层析法,仅能测定总糖化血红蛋白。广泛使用的亲和层析方法,也仅是用经验算法从总糖化血红蛋白值计算出“标准的HbA1c”,因此存在定量无法精准的问题。

发明内容

[0008] 为解决上述技术问题,本发明采用酶联免疫技术,具体的技术方案为:

一种糖化血红蛋白酶联免疫检测方法,包括如下步骤:

(1)制备酶联免疫检测试剂盒,其中包括标准比对品的制备,所述标准比对品为不与血红蛋白、抗血红蛋白抗体、糖化血红蛋白以及抗糖化血红蛋白抗体发生免疫性结合反应的物质;

(2) 将待检测血液样本放入酶联免疫检测试剂盒,以标准比对品作为参比品,与糖化血红蛋白进行免疫检测反应,读取样本糖化血红蛋白的免疫检测结果a以及糖化血红蛋白对应的标准比对品免疫检测结果b;

(3) 将与步骤(2)中同一种待检测血液样本放入酶联免疫检测试剂盒,以与步骤(2)中同一种标准比对品作为参比品,与血红蛋白进行免疫检测反应,读取样本血红蛋白的免疫检测结果c以及血红蛋白对应的标准比对品免疫检测结果d;

(4) 计算得出比值A=a/b,比值B=c/d;

(5) 计算糖化血红蛋白的含量=A/B。

[0009] 进一步地,所述检测方法所用原料包括标准比对品、抗血红蛋白抗体、抗糖化血红蛋白抗体、包被载体、酶标记物、显色液、分析缓冲液及浓缩洗涤液。

[0010] 进一步地,所述标准比对品为兔IgG、驴IgG、马IgG、羊IgG、鼠IgG的一种或两种或两种以上。

[0011] 进一步地,所述抗血红蛋白抗体为抗血红蛋白单克隆抗体和抗血红蛋白多克隆抗体的一种或两种。

[0012] 进一步地,所述抗糖化血红蛋白抗体为抗糖化血红蛋白单克隆抗体、抗糖化血红蛋白多克隆抗体、抗血红蛋白单克隆抗体、抗血红蛋白多克隆抗体的一种或两种或两种以上。

[0013] 进一步地,所述载体为微孔板。

具体实施方式

[0014]

实施例1:糖化血红蛋白酶联免疫检测试剂盒的制备方法

该糖化血红蛋白酶联免疫检测试剂盒制备方法包括以下步骤:

步骤一,制备包被有标准比对品的载体

载体为微孔板,包被载体通过以下方法制备:标准比对品选用兔IgG,用包被缓冲液稀释,取待包被载体,将经过稀释的标准比对品负载于载体上,包被结束后,吸去包被缓冲液,再加入封闭缓冲液,置于37℃封闭2小时或4℃封闭过夜;弃去封闭液,室温18~25℃干燥3~4小时后加入干燥剂密封包装,得到标准比对品包被载体,所述包被缓冲液为pH7.2~7.4、10mmol/L磷酸盐溶液,标准比对品的稀释浓度为1ug/mL;稀释的标准比对品在载体上的包被量可为每孔100ul;包被的条件可置于37℃包被2小时或4℃包被过夜;封闭缓冲液为pH7.2~7.4、10mmol/L PBST溶液,内含1%BSA及1~10%蔗糖;封闭缓冲液的加入量可为每孔300ul;封闭后包被载体的干燥环境相对湿度小于30%;

步骤二,制备包被有血红蛋白多克隆抗体的载体:

载体为微孔板,包被载体通过以下方法制备:血红蛋白多克隆抗体用包被缓冲液稀释,取待包被载体,将经过稀释的血红蛋白多克隆抗体负载于载体上,包被结束后,吸去包被缓冲液,再加入封闭缓冲液,置于37℃封闭2小时或4℃封闭过夜;弃去封闭液,室温18~25℃干燥3~4小时后加入干燥剂密封包装,得到血红蛋白多克隆抗体包被载体,所述包被缓冲液为pH7.2~7.4、10mmol/L磷酸盐溶液,血红蛋白多克隆抗体I的稀释浓度为1ug/mL;稀释的血红蛋白多克隆抗体在载体上的包被量可为每孔100ul;包被的条件可置于37℃包被2小时

或4℃包被过夜；封闭缓冲液为pH7.2~7.4、10mmol/L PBST溶液，内含1%BSA及1~10%蔗糖；封闭缓冲液的加入量可为每孔300uL；封闭后包被载体的干燥环境相对湿度小于30%；

步骤三，制备包被有糖化血红蛋白单克隆抗体的载体：

载体为微孔板，包被载体通过以下方法制备：糖化血红蛋白单克隆抗体用包被缓冲液稀释，取待包被载体，将经过稀释的糖化血红蛋白单克隆抗体负载于载体上，包被结束后，吸去包被缓冲液，再加入封闭缓冲液，置于37℃封闭2小时或4℃封闭过夜；弃去封闭液，室温18~25℃干燥3~4小时后加入干燥剂密封包装，得到糖化血红蛋白单克隆抗体包被载体，所述包被缓冲液为pH7.2~7.4、10mmol/L磷酸盐溶液，糖化血红蛋白单克隆抗体的稀释浓度为1ug/mL；稀释的糖化血红蛋白单克隆抗体在载体上的包被量可为每孔100uL；包被的条件可置于37℃包被2小时或4℃包被过夜；封闭缓冲液为pH7.2~7.4、10mmol/L PBST溶液，内含1%BSA及1~10%蔗糖；封闭缓冲液的加入量可为每孔300uL；封闭后包被载体的干燥环境相对湿度小于30%；

步骤四，制备血红蛋白单克隆抗体酶标记物：

用于标记的酶为碱性磷酸酶，酶标记抗体的制备方法为：采用戊二醛交联法将血红蛋白单克隆抗体与碱性磷酸酶偶联，用pH7.2、10mmol/L PBS缓冲液充分透析，在透析后的结合物溶液中加入等体积的甘油，-20℃以下保存；标记好的血红蛋白单克隆抗体酶结合物可用20%胎牛血清稀释液稀释至工作浓度，置于4℃保存至有效期，胎牛血清稀释液为pH7.4、20mmol/L PBST溶液，内含20%胎牛血清、1~10%蔗糖、0.01%食品红；

步骤五，制备分析缓冲液，分析缓冲液为pH7.4、10mmol/L PBST缓冲液，内含1%BSA；

步骤六，制备浓缩洗涤液，浓缩洗涤液为pH7.2~7.4、20mmol/L PBS缓冲液，内含1%吐温；

步骤七，组装糖化血红蛋白酶联免疫检测试剂盒，将包被载体、酶标记物、显色液、分析缓冲液及浓缩洗涤液组装成糖化血红蛋白酶联免疫检测试剂盒。

[0015] 本发明提供的糖化血红蛋白酶联免疫检测试剂盒及制备方法，采用双抗体夹心反应模式，可以对人血样本中的糖化血红蛋白进行专一的定量检测。具有灵敏度高、检测范围宽、稳定性好、操作简便快速无污染等优点。本发明与其他开放式全自动酶联免疫检测平台相结合，可以有效缩短检测时间，降低检测成本和人力花费。项目开发的产品市场前景广阔，经济和社会效益显著；与免疫比浊等方法相比较，本发明简化了操作步骤，缩短了检测时间、大大提高了测定的灵敏度和准确性。

[0016] 本发明使用的血红蛋白单克隆抗体，血红蛋白多克隆抗体及糖化血红蛋白单克隆抗体具有高度特异性，得到的糖化血红蛋白酶联免疫检测试剂盒及制备方法可以取代其他试剂盒来进行糖化血红蛋白的定量检测。

[0017] 实施例2：糖化血红蛋白酶联免疫检测试剂盒的检测方式

以下给出采用实施例中制备的酶联免疫检测试剂盒检测临床样本中糖化血红蛋白的具体操作方法：

(1)、样本处理，待测样本为血浆时，用EDTA抗凝管取血2mL，1500r/min离心10分钟，收集上清液；待测样本为血清时，用普通管或促凝管取血2mL，4℃下放置30分钟后，1500r/min离心10分钟，收集上清液；

(2)、样本检测，将样本、分析缓冲液分别加到固相有兔IgG，血红蛋白多克隆抗体及糖

化血红蛋白单克隆抗体的微孔板中,反应30min后,样本中的血红蛋白及糖化血红蛋白分别与固相抗体特异性结合,洗去游离成分,加入酶标记物避光反应30min,洗去游离成分,加入显色液,避光反应5min后测定各孔吸光值;

(4)、读取样本糖化血红蛋白检测孔吸光值a、糖化血红蛋白对应的兔IgG比对孔吸光值b、样本血红蛋白检测孔吸光值c以及血红蛋白对应的兔IgG比对孔吸光值d;

(5)、计算得出比值A=a/b,比值B=c/d;

(6)、计算糖化血红蛋白的含量=A/B。

[0018] 实施例3:试剂盒性能评估试验

1.准确性试验

取同一患者抗凝全血标本,用同一批次的试剂盒重复检测3次,计算出相对偏差B值为0.02%,符合产品设计要求;

2.重复性试验

取同一患者抗凝全血标本,用同一批次的试剂盒同时检测20次,计算出变异系数CV值为11.13%,符合产品设计要求。

[0019] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,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。

专利名称(译)	一种血液糖化血红蛋白酶联免疫检测方法		
公开(公告)号	CN107490680A	公开(公告)日	2017-12-19
申请号	CN201610401788.6	申请日	2016-06-09
[标]申请(专利权)人(译)	常州博闻迪医药科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	常州博闻迪医药科技有限公司		
[标]发明人	李亚星 刘凤鸣 刘冰		
发明人	李亚星 刘凤鸣 刘冰		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种血液糖化血红蛋白酶联免疫检测方法。这种检测方法，包括：(1)酶联免疫检测试剂盒的制备；(2)将待检测血液样本放入酶联免疫检测试剂盒，读取样本糖化血红蛋白的免疫检测结果a以及糖化血红蛋白对应的标准比对品免疫检测结果b；(3)相同待检测血液样本放入酶联免疫检测试剂盒，读取样本血红蛋白的免疫检测结果c以及血红蛋白对应的标准比对品免疫检测结果d；(4)计算得出比值A=a/b，比值B=c/d；(5)计算糖化血红蛋白的含量=A/B。本发明检测的灵敏度高，特异性强，且可以定量，解决了传统的糖化血红蛋白定量检测方法操作步骤繁琐，检测时间长的问题，同时解决了糖化血红蛋白定性检测准确性低的问题。