



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110702894 A

(43)申请公布日 2020.01.17

(21)申请号 201910957755.3

(22)申请日 2019.10.10

(71)申请人 南京欧凯生物科技有限公司

地址 210000 江苏省南京市江北新区浦滨  
路211号扬子科创中心一期A栋11层

(72)发明人 戴瞻

(74)专利代理机构 北京盛凡智荣知识产权代理  
有限公司 11616

代理人 李枝玲

(51)Int.Cl.

G01N 33/52(2006.01)

G01N 33/537(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

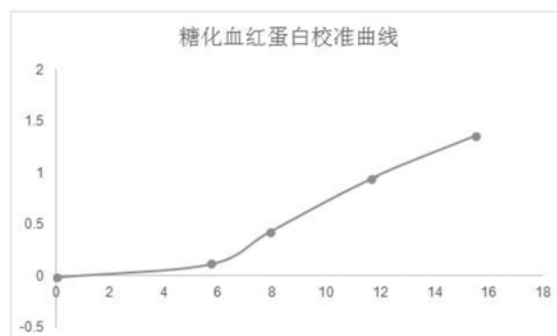
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

### (54)发明名称

一种直接测定糖化血红蛋白含量的检测方法

### (57)摘要

一种直接测定糖化血红蛋白含量的检测方法,包括以下步骤:A、取EDTA抗凝全血样本与溶血剂按照1:100进行稀释;B、先取4 $\mu$ L的溶血样本加入试剂R1中;所述试剂R1含有聚苯乙烯胶乳微球;C、经5min温预后再加入试剂R2;所述试剂R2是鼠抗人HbA1c单克隆抗体、羊抗鼠IgG抗体和甘氨酸缓冲液的混合液;D、免疫反应在600nm~700nm的波长光下,通过全自动生化分析仪读取反应后的吸光度;E、最终根据反应吸光度之间的差值,从校准曲线中直接读取糖化血红蛋白的百分比含量。本发明方法以免疫透射比浊法为检测原理,不需要测定EDTA抗凝全血样本中的总血红蛋白及糖化血红蛋白含量,即可直接确定其中的糖化血红蛋白百分比。



1. 一种直接测定糖化血红蛋白含量的检测方法,其特征在于:所述糖化血红蛋白含量在检测时所用到的试剂包含有试剂R1、试剂R2、溶血剂、聚苯乙烯胶乳微球、鼠抗人HbA1c单克隆抗体、羊抗鼠IgG抗体和甘氨酸缓冲液,所述检测方法包括以下步骤:

- A、取EDTA抗凝全血样本与溶血剂按照1:100进行稀释;
- B、先取4 $\mu$ L的溶血样本加入试剂R1中;所述试剂R1含有聚苯乙烯胶乳微球;
- C、经5min温预后再加入试剂R2;所述试剂R2是鼠抗人HbA1c单克隆抗体、羊抗鼠IgG抗体和甘氨酸缓冲液的混合液;
- D、免疫反应在600nm~700nm的波长光下,通过全自动生化分析仪读取反应后的吸光度;
- E、最终根据反应吸光度之间的差值,从校准曲线中直接读取糖化血红蛋白的百分比含量。

2. 根据权利要求1所述的直接测定糖化血红蛋白含量的检测方法,其特征在于:所述步骤A中的溶血剂为TTAB和H<sub>2</sub>O,所述步骤B中的聚苯乙烯胶乳微球为0.15%,所述步骤C中的鼠抗人HbA1c单克隆抗体浓度为0.01~0.06mg/ml、羊抗鼠IgG抗体浓度为0.01mg/ml~0.20mg/ml;甘氨酸缓冲液浓度为50mmol/l。

3. 根据权利要求2所述的直接测定糖化血红蛋白含量的检测方法,其特征在于:所述鼠抗人HbA1c单克隆抗体浓度为0.06mg/ml、羊抗鼠IgG的浓度为0.12mg/ml。

## 一种直接测定糖化血红蛋白含量的检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于医学免疫类领域,特别属于糖化血红蛋白检测技术领域,涉及一种直接测定糖化血红蛋白含量的检测方法,尤其涉及一种利用全自动生化分析仪可以直接测定糖化血红蛋白百分比含量的检测方法。

### 背景技术

[0002] 糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin,HbA1c)是人体血液中红细胞内的血红蛋白与血糖结合的产物。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,所以可以观测到120天之前的血糖浓度,糖化血红蛋白可以稳定可靠地反映出检测前120天内的平均血糖水平,且受抽血时间,是否空腹,是否使用胰岛素等因素干扰不大。

[0003] 糖化血红蛋白于1958年被使用色谱法首次从其它类型的血红蛋白中分离出来,并于1968 年被分类为一种糖蛋白。1975年研究者们得到了生成糖化血红蛋白的反应式。根据每个糖化位点和反应参与物,总的糖化血红蛋白分成若干个亚组分。糖化血红蛋白天然(非糖化)血红蛋白是A0(2 $\alpha$ 、2 $\beta$ 链)。亚组分(HbA1a1、HbA1a2、HbA1b和HbA1c)因血红蛋白 $\beta$ 链-N末端缬氨酸的游离氨基与不同碳水化合物糖基化而形成;这些亚组分总称为HbA1。除了血红蛋白 $\beta$ 链的N末端缬氨酸外,血红蛋白分子内其他游离氨基也参与糖基化( $\alpha$ 链N末端缬氨酸、赖氨酸 $\epsilon$ -氨基)。相对于HbA1,所有 $\beta$ -链N末端和其他游离氨基糖基化的血红蛋白被称作总糖化血红蛋白。除基本的成人血红蛋白A0外,在健康人里发现少量的胎儿血红蛋白HbF(2 $\alpha$ 、2 $\gamma$ 链)和血红蛋白A2(2 $\alpha$ 、2 $\delta$ 链)。缬氨酸在 $\delta$ 链N末端,以类似的方式糖基化,例如,通过与葡萄糖的共价键形成HbA2c。亲和层析测定的糖化血红蛋白作为总糖化血红蛋白。

[0004] 常用的测定糖化血红蛋白百分比的方法有离子交换层析、高效液相色谱、免疫法、酶法等。其中离子交换层析、高效液相色谱法需要特定的仪器,价格昂贵,不适用于中小型医院的使用。酶法检测糖化血红蛋白是利用氧化还原反应,需要多种酶的参与。而临床上常使用的免疫学方法有两种,一种是需要单独测定血液样本中的总血红蛋白和糖化血红蛋白的浓度,并且随后计算糖化血红蛋白与总血红蛋白的比值的免疫竞争抑制法,另一种是可以直接测定糖化血红蛋白百分比的胶乳凝集法。这些检测方法操作复杂、耗时,且需要特殊的仪器,成本较高,市场上也存在其它检测方法,但是普遍存在测定准确度低的缺陷。

[0005] 因此,如何解决上述问题,是本领域技术人员着重要研究的内容。

### 发明内容

[0006] 为克服上述现有技术中的不足,本发明目的在于提供一种直接测定糖化血红蛋白含量的方法;

[0007] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明提供一种直接测定糖化血红蛋白含量的检测方法,所述糖化血红蛋白含量在检测时所用到的试剂包含有试剂R1、试剂R2、溶血剂、聚苯乙烯胶乳微球、鼠抗人HbA1c单克隆抗体、羊抗鼠IgG抗体和甘氨酸缓冲液,所述检测方

法包括以下步骤：

[0008] A、取EDTA抗凝全血样本与溶血剂按照1:100进行稀释；

[0009] B、先取4 $\mu$ L的溶血样本加入试剂R1中；所述试剂R1含有聚苯乙烯胶乳微球；

[0010] C、经5min温预后再加入试剂R2；所述试剂R2是鼠抗人HbA1c单克隆抗体、羊抗鼠IgG抗体和甘氨酸缓冲液的混合液；

[0011] D、免疫反应在600nm~700nm的波长光下，通过全自动生化分析仪读取反应后的吸光度；

[0012] E、最终根据反应吸光度之间的差值，从校准曲线中直接读取糖化血红蛋白的百分比含量。

[0013] 上述方案中，有关内容解释如下：

[0014] 1、上述方案中，所述步骤A中的溶血剂为TTAB和H<sub>2</sub>O，所述步骤B中的聚苯乙烯胶乳微球为0.15%，所述步骤c中的鼠抗人HbA1c单克隆抗体浓度为0.01~0.06mg/ml、羊抗鼠IgG抗体浓度为0.01mg/ml~0.20mg/ml；甘氨酸缓冲液浓度为50mmol/l。

[0015] 2、上述方案中，所述鼠抗人HbA1c单克隆抗体浓度为0.06mg/ml、羊抗鼠IgG的浓度为0.12mg/ml。

[0016] 本发明的检测原理：本发明采用全自动生化分析仪为测试平台，以免疫透射比浊法为检测原理，可溶性抗原与特异性的抗体反应形成免疫复合物，当光线通过反应悬液时发生吸光度的变化并由全自动生化分析仪检测到，吸光度变化的多少与测试样品中的糖化血红蛋白百分比含量成一定比例。在本发明中，利用抗原抗体反应直接测定总血红蛋白中糖化血红蛋白的百分比含量，样品中总血红蛋白和HbA1c与聚苯乙烯胶乳微球有相同的非特异性吸附而固相化，当加入HbA1c的特异性单克隆抗体后形成聚苯乙烯胶乳微球-HbA1c-鼠抗人HbA1c单克隆抗体的复合物，此复合物由于羊抗鼠IgG抗体而形成凝集，凝集量与聚苯乙烯胶乳微球表面固相化的HbA1c量成一定比例关系。

[0017] 由于上述技术方案运用，本发明与现有技术相比具有的有益效果如下：

[0018] 本发明的测定方法以免疫透射比浊法为检测原理，不需要单独测定血液样本中的总血红蛋白及糖化血红蛋白含量即可直接确定其中的糖化血红蛋白百分比含量，直接使用双试剂，简化了反应测试操作步骤，节约试剂成本。且又可以利用全自动生化分析仪，降低检测成本。

## 附图说明

[0019] 图1是不同百分比的糖化血红蛋白校准品的校准曲线（每个点代表了一种百分比的校准品，其中X轴表示糖化血红蛋白的百分比含量，Y轴表示吸光度值）；

[0020] 图2是本发明的一个实施例的糖化血红蛋白试剂和现有技术中的一个糖化血红蛋白试剂测定样本的相关图（其中X轴表示本试剂的测定结果，Y轴表示现有技术中的一个试剂的测定结果）。

## 具体实施方式

[0021] 以下由特定的具体实施例结合附图说明本发明的实施方式，熟悉此技术的人士可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点及功效。

[0022] 实施例1:

[0023] 一种直接测定糖化血红蛋白含量的检测方法,所述糖化血红蛋白含量在检测时所用到的试剂包含有试剂R1、试剂R2、溶血剂、聚苯乙烯胶乳微球、鼠抗人HbA1c单克隆抗体、羊抗鼠IgG抗体和甘氨酸缓冲液,其中:溶血剂为TTAB和H<sub>2</sub>O;聚苯乙烯胶乳微球浓度为0.15%,悬浮在浓度为10mmol/l的Tris-Gly Buffer中;鼠抗人HbA1c单克隆抗体浓度为0.06mg/ml、羊抗鼠IgG的浓度为0.12mg/ml,混合在浓度为50mmol/l的Tris-Gly Buffer中;全血样本的用量为10 $\mu$ l,溶血液的用量为1000 $\mu$ l,试剂R1用量为150 $\mu$ l,试剂R2的用量分别为 50 $\mu$ l。

[0024] 所述检测方法包括以下步骤:

[0025] A、取EDTA抗凝全血样本与溶血剂按照1:100进行稀释;

[0026] B、先取4 $\mu$ L的溶血样本加入试剂R1中;所述试剂R1含有聚苯乙烯胶乳微球;

[0027] C、经5min温预后再加入试剂R2;所述试剂R2是鼠抗人HbA1c单克隆抗体、羊抗鼠IgG 抗体和甘氨酸缓冲液的混合液;

[0028] D、免疫反应在600nm~700nm的波长光下,通过全自动生化分析仪读取反应后的吸光度;

[0029] E、最终根据反应吸光度之间的差值,从校准曲线中直接读取糖化血红蛋白的百分比含量。

[0030] 所述步骤A中的溶血剂为TTAB和H<sub>2</sub>O,所述步骤B中的聚苯乙烯胶乳微球浓度为0.15%,所述步骤c中的鼠抗人HbA1c单克隆抗体浓度为0.01~0.06mg/ml、羊抗鼠IgG抗体浓度为 0.01mg/ml~0.20mg/ml。

[0031] 所述鼠抗人HbA1c单克隆抗体浓度为0.06mg/ml、羊抗鼠IgG的浓度为0.12mg/ml。

[0032] 本实施例中,如将所述羊抗鼠IgG的浓度改为0.005mg/ml或0.007mg/ml及两者之间的其它值,也同样能够得到合格的糖化血红蛋白检测试剂。

[0033] 实施例2

[0034] 糖化血红蛋白试剂性能评估实施:

[0035] 准备测定用糖化血红蛋白检测试剂,如前述实施例所述的试剂、高值质控物和低值质控物、全自动生化分析仪。取具有溯源性的高值质控物、低值质控物各一份,对每份质控物进行10次检测,将检测结果计算平均值、标准差和变异系数。结果见表1:

[0036] 表1

[0037]

序号	低值质控物	高值质控物
1	5.63	9.73
2	5.65	9.77
3	5.61	9.76
4	5.62	9.75
5	5.64	9.77
6	5.62	9.79
7	5.61	9.77
8	5.65	9.74
9	5.6	9.77

10	5.59	9.77
均值	5.62	9.76
SD	0.02	0.02
CV	0.36%	0.18%

[0038] 由表1中的变异系数可知,本发明提供的糖化血红蛋白检测方法具有较高的精密  
度。

[0039] 实施例3

[0040] 糖化血红蛋白百分比含量检测准确度验证:

[0041] 取具有溯源性的临床全血样本,用试剂分别进行检测,与靶值进行对照。结果见表  
2:

[0042] 表2

序号	对比值	测试值
1	4.8	4.53
2	5.1	4.75

[0043]

[0044]

3	5.3	4.89
4	5.5	5.1
5	5.9	5.57
6	6.2	5.48
7	6.5	5.93
8	7	6.53
9	7.4	7.14
10	7.6	7.33
11	8	7.5
12	8.2	7.94
13	8.6	8.07
14	9.3	8.86
15	9.8	8.98
16	10.1	9.4
17	10.4	9.83
18	11.8	11.03
19	12	10.73
20	12.7	11.36
21	12.9	12.03
22	13.4	12.76
23	6	5.75
24	8	8.26
25	10.6	10.83
26	10.9	10.87
27	8.8	9.43
28	9.5	10.36
29	8.2	8.61
30	6.5	6.34
31	7.9	8.47

[0045]

32	6.4	6.57
33	12.1	12.66
34	5.9	6.08
35	5.2	5.18
36	4.8	4.79
37	5.7	5.86
38	11	11.56
39	5	5.06
40	7.1	7.32
41	6.2	6.11
42	9.7	10.13
43	4.9	5.13
44	5.7	6.02
45	6.5	6.83
46	8.6	8.98
47	13	14.04
48	6.7	7.21
49	7.6	8.07
50	11.9	12.76

[0046] 由表2可知：本发明提供的糖化血红蛋白检测试剂与对比厂家的糖化血红蛋白检测试剂测试样本结果具有高度的一致性。

[0047] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效，而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下，对上述实施例进行修饰或改变。因此，举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变，仍应由本发明的权利要求所涵盖。



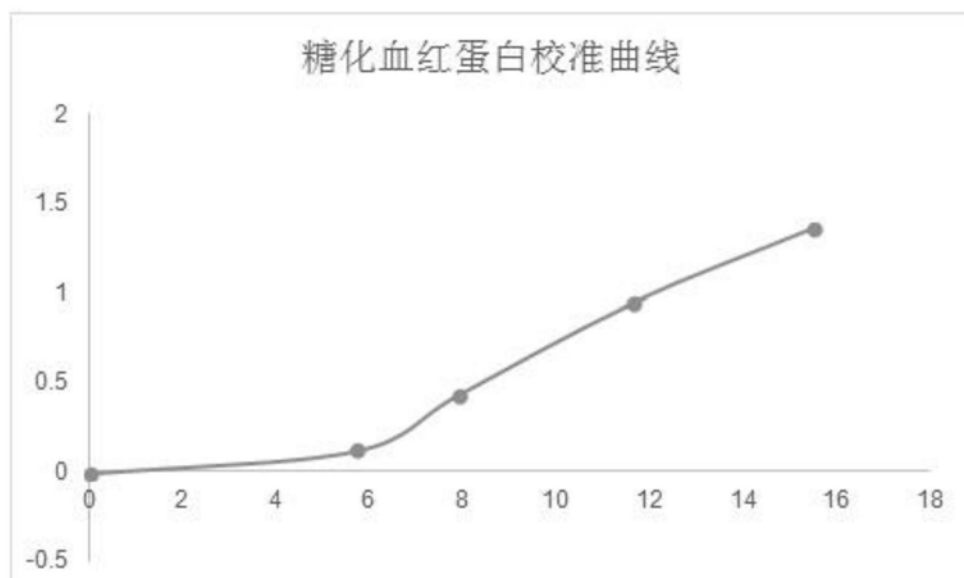


图1

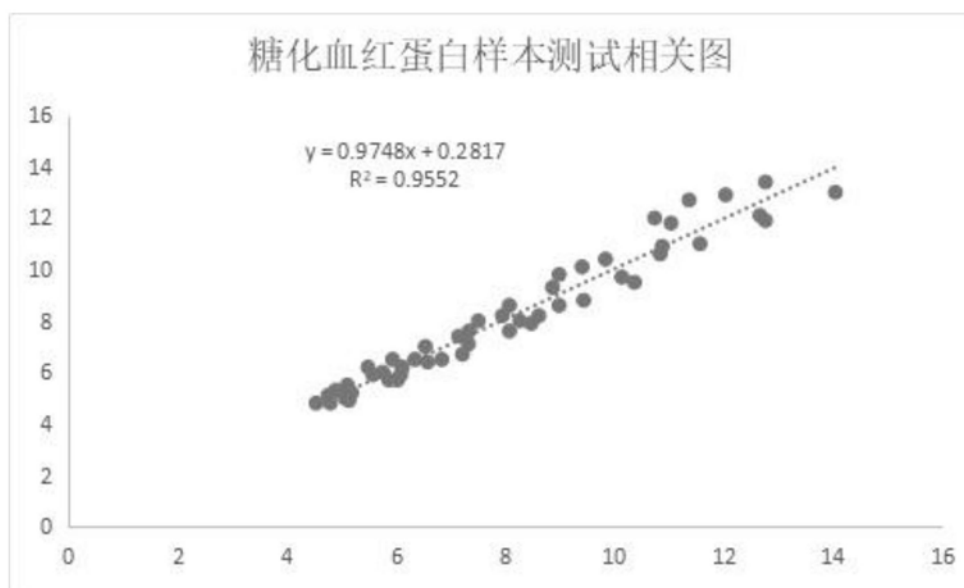


图2

专利名称(译)	一种直接测定糖化血红蛋白含量的检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110702894A</a>	公开(公告)日	2020-01-17
申请号	CN201910957755.3	申请日	2019-10-10
[标]发明人	戴瞻		
发明人	戴瞻		
IPC分类号	G01N33/52 G01N33/537 G01N21/31		
CPC分类号	G01N21/31 G01N33/52 G01N33/5375		
代理人(译)	李枝玲		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

一种直接测定糖化血红蛋白含量的检测方法，包括以下步骤：A、取EDTA抗凝全血样本与溶血剂按照1:100进行稀释；B、先取4 $\mu$ L的溶血样本加入试剂R1中；所述试剂R1含有聚苯乙烯胶乳微球；C、经5min温预后再加入试剂R2；所述试剂R2是鼠抗人HbA1c单克隆抗体、羊抗鼠IgG抗体和甘氨酸缓冲液的混合液；D、免疫反应在600nm~700nm的波长光下，通过全自动生化分析仪读取反应后的吸光度；E、最终根据反应吸光度之间的差值，从校准曲线中直接读取糖化血红蛋白的百分比含量。本发明方法以免疫透射比浊法为检测原理，不需要测定EDTA抗凝全血样本中的总血红蛋白及糖化血红蛋白含量，即可直接确定其中的糖化血红蛋白百分比。

糖化血红蛋白校准曲线

