



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110988358 A

(43)申请公布日 2020.04.10

(21)申请号 201911231893.X

(22)申请日 2019.12.05

(71)申请人 迪瑞医疗科技股份有限公司

地址 130103 吉林省长春市高新区宜居路
3333号

(72)发明人 刘阳 李慧婷 潘晓恒 张瑞
张立媛 夏冬梅 孙成艳

(74)专利代理机构 长春众邦菁华知识产权代理
有限公司 22214

代理人 于晓庆

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/537(2006.01)

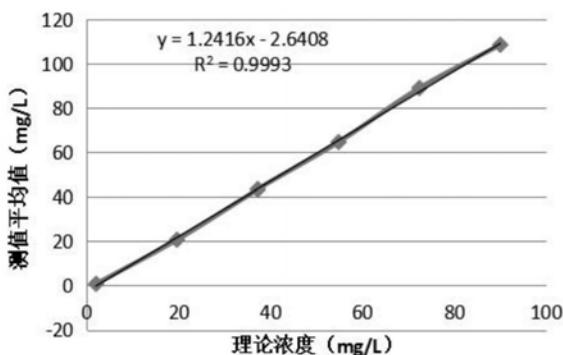
权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

一种高灵敏度人尿液 α 2-巨球蛋白检测试
剂盒

(57)摘要

一种高灵敏度人尿液 α 2-巨球蛋白检测试
剂盒,属于检测试剂盒领域,该试剂盒包括:试剂
R1、试剂R2、校准品和质控品;试剂R1含有缓冲
液、盐、促进剂、抗干扰剂和防腐剂;试剂R2含有
缓冲液、抗血清、稳定剂和防腐剂;校准品含有缓
冲液、血清、稳定剂和防腐剂;质控品含有缓
冲液、血清、稳定剂和防腐剂;抗血清为抗人 α 2-MG
抗血清。血清为人源血清或动物源血清。本发明
通过使用缓冲液复配方法提高了试剂盒的灵敏
性,通过免疫比浊法检测人尿液中 α 2-巨球蛋白
的含量,尿液样本无需人工处理直接上机测试,
试剂中加入抗干扰剂,有效提高试剂灵敏度从而
提高尿液样本测试的准确性,适用于多种全自动
生化分析仪,具有更广泛的通用性。



1. 高灵敏度人尿液 α 2-巨球蛋白检测试剂盒,其特征在于,包括:试剂R1、试剂R2、校准品和质控品;

所述试剂R1含有缓冲液、盐、促进剂、抗干扰剂和防腐剂;

所述试剂R2含有缓冲液、抗血清、稳定剂和防腐剂;

所述校准品含有缓冲液、血清、稳定剂和防腐剂;

所述质控品含有缓冲液、血清、稳定剂和防腐剂;

所述抗血清为抗人 α 2-MG抗血清。

所述血清为人源血清或动物源血清。

2. 根据权利要求1所述的高灵敏度人尿液 α 2-巨球蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述缓冲液为选自PBS、TRIS-HCL、甘氨酸、MES和HEPES中的一种或多种。

3. 根据权利要求1所述的高灵敏度人尿液 α 2-巨球蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述缓冲液浓度为1~500mM。

4. 根据权利要求1所述的高灵敏度人尿液 α 2-巨球蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述盐为NaCl,浓度为0.8%~2.0%。

5. 根据权利要求1所述的高灵敏度人尿液 α 2-巨球蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述促进剂为聚乙二醇,浓度为0.5%~20%。

6. 根据权利要求1所述的高灵敏度人尿液 α 2-巨球蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述抗干扰剂选自GENAPOL (R) X-080、脂肪酸聚氧乙烯酯和聚氧乙烯烷醇酰胺中的一种或多种,浓度为0.01%~0.1%。

7. 根据权利要求1所述的高灵敏度人尿液 α 2-巨球蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述防腐剂为Proclin 300,浓度为0.05%~0.50%。

8. 根据权利要求1所述的高灵敏度人尿液 α 2-巨球蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述稳定剂为BSA,浓度为1%~10%。

一种高灵敏度人尿液 α 2-巨球蛋白检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于检测试剂盒技术领域,具体涉及一种高灵敏度人尿液 α 2-巨球蛋白检测试剂盒。

背景技术

[0002] α 2-巨球蛋白(α 2-macroglobulin, α 2-MG或AMG)是血浆中分子量最大的蛋白质。分子量约为65.2万~80万,含糖量约8%,由4个亚单位组成。它与淋巴网状系统细胞的发育和功能有密切联系。

[0003] α 2-MG最突出的特性是能与多种分子和离子结合。特别是它能与不少蛋白水解酶结合而影响这些酶的活性。如与许多肽链内切酶(包括丝氨酸、巯基、羧基蛋白水解酶和一些金属蛋白水解酶)的结合。这些蛋白水解酶有纤维蛋白溶酶、胃蛋白酶、糜蛋白酶、胰蛋白酶及组织蛋白酶D等。研究表明, α 2-MG与蛋白水解酶相互作用可使 α 2-MG的分子构象发生变化,当酶处于复合物状态时,酶的活性部位没有失活,但不容易作用于大分子底物,若底物为分子量小的蛋白质,即使有其它抗蛋白酶的存在,也能被 α 2-MG-蛋白酶复合物所催化而水解。这样, α 2-MG起到有选择地保护某些蛋白酶活性的作用,这在免疫反应中可能具有重要意义。 α 2-MG是由肝细胞与单核吞噬细胞系统中合成,半寿期约5天,但当与蛋白水解酶结合成为复合物后其清除率加速。

[0004] 血尿是肾脏疾病中常见的临床症状之一,病因繁多,鉴定血尿的出血部位对诊断和治疗非常重要,主要分为肾小球性血尿和非肾小球性血尿。以往常用尿红细胞形态学检查及测定尿中红细胞平均体积来鉴别两者,但因留置标本等外界因素及检测者的主观意识,往往造成一定局限性。近年来有报道尿 α 2-MG对鉴别两者有重要意义。

[0005] 正常情况下,分子量<4万的蛋白质可自由通过肾小球基底膜,几乎全部有肾近曲小管重吸收并分解代谢,分子量>25万的蛋白质几乎不被肾小球滤过膜滤过。 α 2-MG正常情况下不能被肾小球基底膜滤过,故其在尿中含量甚微。只有当肾小球基底膜严重受损或血液成分进入尿中时,尿中 α 2-MG才升高。因此尿 α 2-MG作为鉴别血尿部位和糖尿病肾病的一项敏感指标,供临床医生在鉴别血尿的出血部位时参考,故而急需开发一种高灵敏度尿液 α 2-巨球蛋白检测试剂盒。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种高灵敏度人尿液 α 2-巨球蛋白检测试剂盒。

[0007] 本发明为解决技术问题所采用的技术方案如下:

[0008] 本发明的高灵敏度人尿液 α 2-巨球蛋白检测试剂盒,包括:试剂R1、试剂R2、校准品和质控品;

[0009] 所述试剂R1含有缓冲液、盐、促进剂、抗干扰剂和防腐剂;

[0010] 所述试剂R2含有缓冲液、抗血清、稳定剂和防腐剂;

[0011] 所述校准品含有缓冲液、血清、稳定剂和防腐剂;

- [0012] 所述质控品含有缓冲液、血清、稳定剂和防腐剂；
- [0013] 所述抗血清为抗人 α 2-MG抗血清。
- [0014] 所述血清为人源血清或动物源血清。
- [0015] 作为优选的实施方式，所述缓冲液为选自PBS、TRIS-HCL、甘氨酸、MES和HEPES中的一种或多种。
- [0016] 作为优选的实施方式，所述缓冲液浓度为1~500mM。
- [0017] 作为优选的实施方式，所述盐为NaCl，浓度为0.8%~2.0%。
- [0018] 作为优选的实施方式，所述促进剂为聚乙二醇，浓度为0.5%~20%。
- [0019] 作为优选的实施方式，所述抗干扰剂选自GENAPOL (R) X-080、脂肪酸聚氧乙烯酯和聚氧乙烯烷醇酰胺中的一种或多种，浓度为0.01%~0.1%。
- [0020] 作为优选的实施方式，所述防腐剂为Proclin 300，浓度为0.05%~0.50%。
- [0021] 作为优选的实施方式，所述稳定剂为BSA，浓度为1%~10%。
- [0022] 本发明的有益效果是：本发明的一种高灵敏度人尿液 α 2-巨球蛋白检测试剂盒，主要通过使用缓冲液复配方法提高了试剂盒的灵敏性，该试剂为液体即用型。本发明的试剂盒是通过免疫比浊法检测人尿液中 α 2-巨球蛋白的含量，尿液样本不需要人工处理，直接上机测试，试剂中加入抗干扰剂，有效提高试剂灵敏度从而提高尿液样本测试的准确性，适用于多种全自动生化分析仪，具有更广泛的通用性。

附图说明

- [0023] 图1为实施例1的校准曲线图。
- [0024] 图2为实施例2的校准曲线图。
- [0025] 图3为实施例3的校准曲线图。
- [0026] 图4为线性范围图。

具体实施方式

- [0027] 本发明的高灵敏度人尿液 α 2-巨球蛋白检测试剂盒，主要包括：试剂R1、试剂R2、校准品和质控品。其中，
 - [0028] 试剂R1由缓冲液、盐、促进剂、抗干扰剂和防腐剂组成。
 - [0029] 试剂R2含有缓冲液、抗血清、稳定剂和防腐剂。
 - [0030] 校准品含有缓冲液、血清、稳定剂和防腐剂。
 - [0031] 质控品含有缓冲液、血清、稳定剂和防腐剂。
 - [0032] 抗血清为抗人 α 2-MG抗血清。
 - [0033] 血清为人源血清或动物源血清。
 - [0034] 优选的，缓冲液为选自PBS、TRIS-HCL、甘氨酸、MES和HEPES中的一种或多种。
 - [0035] 优选的，缓冲液浓度为1~500mM。
 - [0036] 优选的，盐为NaCl，浓度为0.8%~2.0%。
 - [0037] 优选的，促进剂为聚乙二醇，浓度为0.5%~20%。
 - [0038] 优选的，抗干扰剂选自GENAPOL (R) X-080、脂肪酸聚氧乙烯酯和聚氧乙烯烷醇酰胺中的一种或多种，浓度为0.01%~0.1%。

[0039] 优选的,防腐剂为Proclin 300,浓度为0.05%~0.50%。

[0040] 优选的,稳定剂为BSA,浓度为1%~10%。

[0041] 下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0042] 在本发明中所使用的术语,一般具有本领域普通技术人员通常理解的含义,除非另有说明。下面结合具体实施例并参照数据进一步详细描述本发明。应理解,该实施例只是为了举例说明本发明,而非以任何方式限制本发明的范围。

[0043] 在以下实施例中,未详细描述的各种过程和方法是本领域中公知的常规方法。下述实例中所用的材料、试剂、装置、仪器、设备等,如无特殊说明,均可从商业途径获得。

[0044] 下面结合具体实施例对本发明进一步说明:

[0045] 实施例1: α 2-MG试剂盒的制备

[0046] 试剂R1为含有PBS的缓冲液,pH=7.3±0.05 (25±0.5°C)。

[0047] 试剂R2为含有BSA的缓冲液,pH=7.3±0.05 (25±0.5°C)。

[0048] 试剂R1的组成及pH如下表所示。

[0049]	PBS	150mM
	TRIS	20mM
	NaCl	1%
	聚乙二醇	10%
	GENAPOL (R) X-080	0.05%
	Proclin300	0.1%
	pH	7.3±0.05 (25±0.5°C)

[0050] 试剂R2的组成如下表所示。

[0051]	PBS	150mM
	抗血清	5%
	BSA	0.1%
	Proclin300	0.1%
	pH	7.3±0.05 (25±0.5°C)

[0052] 校准品的制备:向其中加入一定量的血清,使浓度在100mg/L,使用0.22um的滤膜过滤后即可得到校准品。

[0053] 校准品的组成及pH如下表所示。

[0054]	PBS	150mM
	BSA	0.5%
	Proclin300	0.1%
	pH	7.3±0.05 (25±0.5°C)

[0055] 质控品的制备:向其中加入一定量的血清,使低值浓度在35mg/L,高值浓度在55mg/L,使用0.22um的滤膜过滤后即可得到质控品。

[0056] 质控品的组成及pH如下表所示。

[0057]	PBS	150mM
	BSA	0.5%
	Proclin300	0.1%
	pH	7.3±0.05 (25±0.5°C)

[0058] 实施例2: α 2-MG试剂盒的制备

[0059] 试剂R1为含有TRIS-HCL的缓冲液, pH=7.5±0.05 (25±0.5°C)。

[0060] 试剂R2为含有BSA的缓冲液, pH=7.5±0.05 (25±0.5°C)。

[0061] 试剂R1的组成及pH如下表所示。

[0062]	TRIS-HCL	300mM
	PBS	20mM
	NaCl	1.5%
	聚乙二醇	10%
	GENAPOL (R) X-080	0.05%
	Proclin300	0.1%
	pH	7.5±0.05 (25±0.5°C)

[0063] 试剂R2的组成及pH如下表所示。

[0064]	TRIS-HCL	300mM
	抗血清	5%
	BSA	0.2%
	Proclin 300	0.1%

[0065]	pH	7.5±0.05(25±0.5°C)
--------	----	--------------------

[0066] 校准品的制备:向其中加入一定量的血清,使浓度在100mg/L,使用0.22um的滤膜过滤后即可得到校准品。

[0067] 校准品的组成及pH如下表所示。

[0068]	TRIS-HCL	300mM
	BSA	0.5%
	Proclin300	0.1%
	pH	7.5±0.05 (25±0.5°C)

[0069] 质控品的制备:向其中加入一定量的血清,使低值浓度在35mg/L,高值浓度在55mg/L,使用0.22um的滤膜过滤后即可得到质控品。

[0070] 质控品的组成及pH如下表所示。

[0071]	TRIS-HCL	300mM
	BSA	0.5%
	Proclin300	0.1%
	pH	7.5±0.05 (25±0.5°C)

[0072] 实施例3: α 2-MG试剂盒的制备

[0073] 试剂R1为含有HEPES的缓冲液, pH=7.3±0.05 (25±0.5°C)。

[0074] 试剂R2为含有BSA的缓冲液, pH=7.3±0.05 (25±0.5°C)。

[0075] 试剂R1的组成及pH如下表所示。

[0076]

HEPES	200mM
TRIS	10mM
NaCl	1.2%
聚乙二醇	8%
脂肪酸聚氧乙烯酯	0.02%
Proclin300	0.1%
pH	7.3±0.05 (25±0.5°C)

[0077] 试剂R2的组成及pH如下表所示。

[0078]

HEPES	200mM
抗血清	5%
BSA	0.2%
Proclin300	0.1%
pH	7.3±0.05 (25±0.5°C)

[0079] 校准品的制备:向其中加入一定量的血清,使浓度在100mg/L,使用0.22um的滤膜过滤后即可得到校准品。

[0080] 校准品的组成及pH如下表所示。

[0081]

HEPES	200mM
BSA	0.5%
Proclin300	0.1%
pH	7.3±0.05 (25±0.5°C)

[0082] 质控品的制备:向其中加入一定量的血清,使低值浓度在35mg/L,高值浓度在55mg/L,使用0.22um的滤膜过滤后即可得到质控品。

[0083] 质控品的组成及pH如下表所示。

[0084]

HEPES	200mM
BSA	0.5%
Proclin300	0.1%
pH	7.3±0.05 (25±0.5°C)

[0085] 实施例4制作校准曲线

[0086] 按实施例1配制的试剂R1和试剂R2、校准品制作标准曲线。

[0087] 1、打开仪器预热15分钟,在全自动生化分析仪上添加项目,设置项目参数,登记试剂位,放置R1和R2试剂,测试试剂余量,保证试剂R1和试剂R2≥15mL/瓶。

[0088] 2、取出校准品,用校准品和纯水按照以下浓度配制校准液,0mg/L,6.25mg/L,12.5mg/L,25mg/L,50mg/L,100mg/L用全自动生化分析仪对校准样本进行检测,将吸光度变化和对应样本浓度采取对数线性方程作出标准曲线,如图1所示。

- [0089] 按实施例2配制的试剂R1和试剂R2、校准品作标准曲线,如图2所示。
- [0090] 按实施例3配制的试剂R1和试剂R2、校准品作标准曲线,如图3所示。
- [0091] 实施例5性能检测
- [0092] 1、线性评价
- [0093] 用实施例1制备的试剂对线性进行评价,将接近线性范围上限的高值样本(尿液样本)按一定比例稀释为至少5种浓度,其中低值浓度的样本须接近线性范围的下限。对每一浓度样本均重复检测2次,计算平均值,将结果平均值和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合,并计算线性相关系数r,如表1和图4所示,检测限可达2mg/L以下。
- [0094] 表1线性评价结果

理论浓度 (mg/L)	测量值 1	测量值 2	平均值	绝对偏差	相对偏差
2.00	0.75	0.77	0.76	0.92	/
19.60	21.41	19.97	20.69	-1.00	/
37.20	43.53	43.12	43.33	-0.22	-0.50%
54.80	64.27	64.86	64.57	/	-1.27%
72.40	88.78	89.18	88.98	/	1.99%
90.00	107.11	109.89	108.50	/	-0.55%

- [0095] [0096] 2、重复性评价
- [0097] 用实施例1制备的试剂进行重复性评价,对2个不同浓度的样品($35 \pm 10 \text{ mg/L}$ 与 $55 \pm 10 \text{ mg/L}$)分别重复测定10次,如表2所示,计算10次测定结果的平均值(M)和标准差(SD),根据下列公式得出变异系数。
- [0098] $CV = SD/M \times 100\%$
- [0099] 式中:
- [0100] CV: 变异系数;
- [0101] SD: 10次测量结果的标准差;
- [0102] M: 10次测量结果的平均值。
- [0103] 表2重复性评价

序号	重复性样品 1	重复性样品 2
	(浓度为 38.5mg/L)	(浓度为 59.8mg/L)
[0104]	1 44.79	62.90
	2 45.47	61.74
	3 45.36	63.23
	4 46.44	62.84
	5 46.67	62.97
	6 45.30	63.68
	7 47.01	63.95
	8 47.12	63.36
	9 46.84	63.42
	10 47.35	65.33
	M 46.24	63.34
	SD 0.92	0.92
	CV 1.98%	1.45%

[0105] 从表2中可以看出,本发明检测结果重复性CV均小于5%,符合要求。

[0106] 3、稳定性评价

[0107] 加速稳定性:将实施例1制备的试剂R1和试剂R2分别放置于37℃恒温箱(加速试剂)和4℃冰箱(冷藏试剂)中,分别于第3天、第7天、第11天和第14天取出加速试剂与冷藏试剂同时进行测试。分别测试正常/异常水平样本或高/低值质控品,重复测试3次,取平均值,加速试剂测试结果均值与冷藏试剂测试结果比较,计算相对偏差(%)。结果如表3所示。

[0108] 表3稳定性评价结果

测值 加速时间	质控品理论值 (mg/L)	4℃冷藏试剂 (mg/L)	37℃加速试剂 (mg/L)	相对偏差 (%)
------------	------------------	------------------	-------------------	-------------

[0110]	第 3 天	38.5	39.83	40.69	2.17%
		59.8	60.65	60.97	0.54%
	第 7 天	38.5	39.26	40.08	4.74%
		59.8	57.89	59.75	3.21%
	第 11 天	38.5	33.78	35.77	5.88%
		59.8	53.16	56.92	7.07%
	第 14 天	38.5	35.48	33.16	6.55%
		59.8	56.29	53.22	5.46%

[0111] 注:加速试剂从恒温箱中取出后,和冷藏试剂放置至相同时间再进行测试。

[0112] 4、机载稳定性评价

[0113] 将实施例1制备的试剂R1和试剂R2开瓶后,放置在全自动生化分析仪内,分别测试高/低质控品,并于第7天、第14天、第21天、第28天、第35天取出开瓶试剂与未开瓶的对照试剂同时进行测试。重复测试3次,取平均值,开瓶试剂测试结果均值与对照试剂测试结果比较,计算相对偏差(%),结果如表4所示。

[0114] 表4机载稳定性评价结果

放置时间\测值	质控品理论值 (mg/L)	对照试剂 (mg/L)	开瓶试剂 (mg/L)	相对偏差 (%)
第 7 天	38.5	37.25	38.05	2.15%
	59.8	58.64	59.21	0.97%
第 14 天	38.5	37.33	37.46	0.35%
	59.8	58.15	57.55	-1.03%
第 21 天	38.5	38.42	37.91	-1.33%
	59.8	58.66	58.91	0.43%
第 28 天	38.5	38.21	38.64	1.13%
	59.8	59.46	60.12	1.11%
第 35 天	38.5	38.05	39.04	2.60%

[0116]		59.8	58.77	58.19	-0.99%
--------	--	------	-------	-------	--------

[0117] 从表3和表4可以看出,本发明试剂在37℃高温环境下可稳定14天,4℃开封条件下可以稳定35天,说明稳定性很好。

[0118] 5、试剂灵敏度评价

[0119] 用实施例1制备的试剂对灵敏度进行评价,测试(6±2)mg/L的样本计算吸光度变化,换算为6mg/L的吸光度变化值,结果如表5所示。

[0120] 表5灵敏度评价结果

[0121]	浓度	灵敏度1	灵敏度2	灵敏度3
	6mg/L	0.058	0.055	0.059

[0122] 6、尿液样本评价

[0123] 用实施例1制备的试剂与市售尿 α 2-巨球蛋白检测试剂盒同时检测新鲜尿液样本,对测定结果进行相关性分析, $R^2=0.9962$,表明在尿液样本测定方面有较好的相关性。

[0124] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应该指出:对于本技术领域的技术人员来应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例只是说明发明原理和优选实施方式,在不脱离发明范围的前提下本发明还会有各种改进,这些改进和润饰都落入要求保护的本发明内。

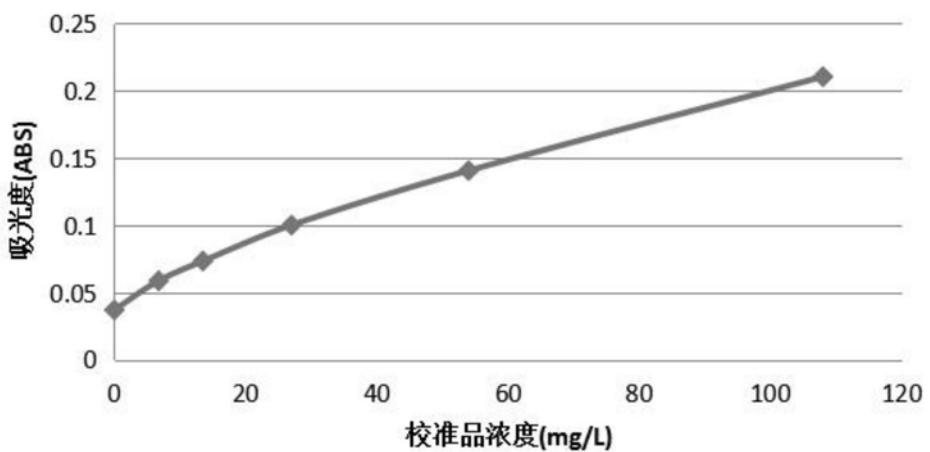


图1

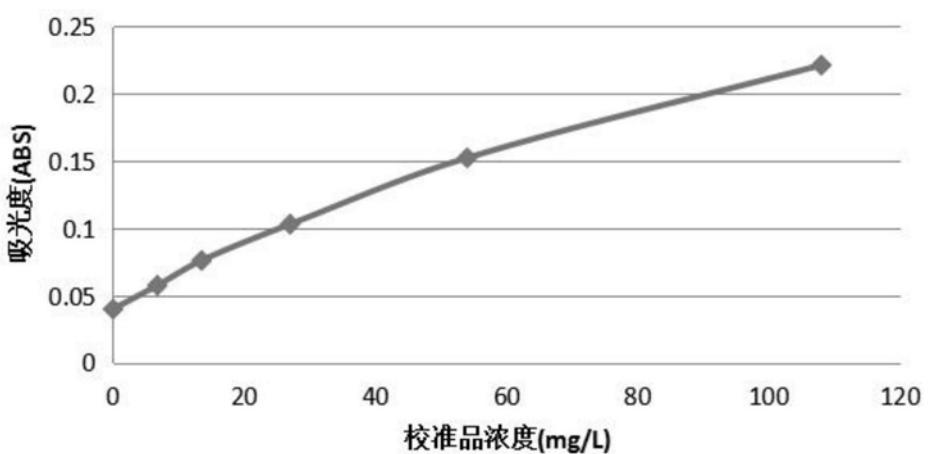


图2

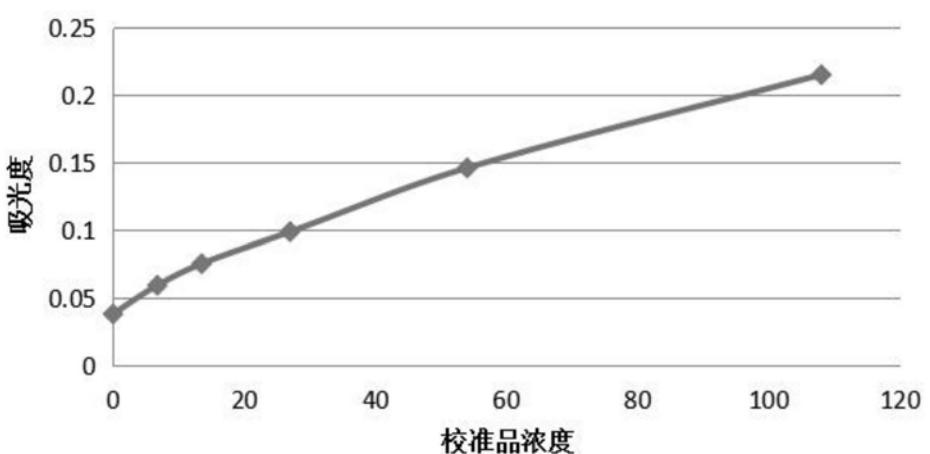


图3

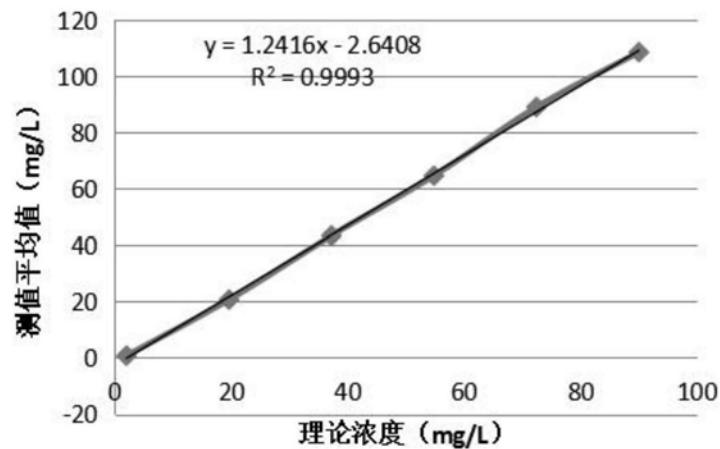


图4

专利名称(译)	一种高灵敏度人尿液 α 2-巨球蛋白检测试剂盒		
公开(公告)号	CN110988358A	公开(公告)日	2020-04-10
申请号	CN201911231893.X	申请日	2019-12-05
[标]发明人	刘阳 李慧婷 潘晓恒 张瑞 张立媛 夏冬梅 孙成艳		
发明人	刘阳 李慧婷 潘晓恒 张瑞 张立媛 夏冬梅 孙成艳		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/537		
CPC分类号	G01N33/5375 G01N33/6893 G01N2800/347		
代理人(译)	于晓庆		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

一种高灵敏度人尿液 α 2-巨球蛋白检测试剂盒，属于检测试剂盒领域，该试剂盒包括：试剂R1、试剂R2、校准品和质控品；试剂R1含有缓冲液、盐、促进剂、抗干扰剂和防腐剂；试剂R2含有缓冲液、抗血清、稳定剂和防腐剂；校准品含有缓冲液、血清、稳定剂和防腐剂；质控品含有缓冲液、血清、稳定剂和防腐剂；抗血清为抗人 α 2-MG抗血清。血清为人源血清或动物源血清。本发明通过使用缓冲液复配方法提高了试剂盒的灵敏性，通过免疫比浊法检测人尿液中 α 2-巨球蛋白的含量，尿液样本无需人工处理直接上机测试，试剂中加入抗干扰剂，有效提高试剂灵敏度从而提高尿液样本测试的准确性，适用于多种全自动生化分析仪，具有更广泛的通用性。

