(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109187947 A
(43)申请公布日 2019.01.11

(21)申请号 201810875603.4

(22)申请日 2018.08.03

(71)申请人 广州市伊川生物科技有限公司
地址 510000 广东省广州市萝岗区开源大道188号E栋6层、F栋6层

(72)发明人 刘光华 杨玉军 刘秋明 许翠

(74)专利代理机构 北京华仲龙腾专利代理事务所(普通合伙) 11548
代理人 李静

(51)Int.Cl.
G01N 33/531(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)
G01N 21/31(2006.01)

权利要求书2页 说明书13页

(54)发明名称

一种β2微球蛋白测定试剂盒及其检测方法

(57)摘要

本发明提供一种β2微球蛋白(β2-MG)测定试剂盒,包括试剂R1、试剂R2,所述试剂R1包含如下浓度的组分:第一缓冲液、无机盐、促凝剂、防腐剂;所述试剂R2包含如下浓度的组分:第二缓冲液、稳定剂、抗冻剂、无机盐、表面活性剂、封闭剂、乳胶颗粒抗人β2-MG抗体结合乳液、防腐剂。本发明属于生物检测技术领域,本发明提供的β2微球蛋白(β2-MG)测定试剂盒在提高胶乳试剂稳定性的同时兼顾了检测灵敏度和线性范围,显著提高了测定试剂的灵敏度和稳定性,具有良好的抗冻性能,可适用于各类全自动生化分析仪进行分析,适应性好。

CN 109187947 A

1.一种β2微球蛋白测定试剂盒，其特征在于：包括试剂R1、试剂R2，所述试剂R1包含如下浓度的组分：第一缓冲液20～100mmoL/L、无机盐5g/L～30g/L、促凝剂5g/L～20g/L、防腐剂0.1g/L～2g/L；所述试剂R2包含如下浓度的组分：第二缓冲液80～150mmoL/L、稳定剂20g/L～100g/L、抗冻剂5g/L～40g/L、无机盐5g/L～40g/L、表面活性剂5g/L～30g/L、封闭剂5g/L～30g/L、乳胶颗粒抗人β2-MG抗体结合乳液0.02g/L～0.12g/L、防腐剂0.05g/L～2g/L。

2.根据权利要求1所述的β2微球蛋白测定试剂盒，其特征在于：所述试剂R1包含如下浓度的组分：第一缓冲液60～100mmoL/L、无机盐5g/L～20g/L、促凝剂10g/L～20g/L、防腐剂1g/L～2g/L；所述试剂R2包含如下浓度的组分：第二缓冲液80～120mmoL/L、稳定剂60g/L～100g/L、抗冻剂5g/L～20g/L、无机盐5g/L～40g/L、表面活性剂5g/L～30g/L、封闭剂5g/L～30g/L、乳胶颗粒抗人β2-MG抗体结合乳液0.04g/L～0.10g/L、防腐剂0.05g/L～2g/L。

3.根据权利要求2所述的β2微球蛋白测定试剂盒，其特征在于：所述试剂R1包含如下浓度的组分：第一缓冲液80mmoL/L、无机盐10g/L、促凝剂15g/L、防腐剂1.5g/L；所述试剂R2包含如下浓度的组分：第二缓冲液100mmoL/L、稳定剂80g/L、抗冻剂10g/L、无机盐14.5g/L、表面活性剂10g/L、封闭剂20g/L、乳胶颗粒抗人β2-MG抗体结合乳液0.06g/L、防腐剂1.5g/L。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的β2微球蛋白测定试剂盒，其特征在于：所述抗冻剂为甜菜碱。

5.根据权利要求1至3中任一项所述的β2微球蛋白测定试剂盒，其特征在于：所述第一缓冲液为磷酸盐缓冲液，所述第二缓冲液为MOPS缓冲液，所述无机盐为NaCl，所述促凝剂为聚乙二醇6000，所述表面活性剂为Tween-20，所述封闭剂为牛血清白蛋白，所述稳定剂为海藻糖，所述防腐剂为Proclin 300。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的β2微球蛋白测定试剂盒，其特征在于：所述乳胶颗粒抗人β2-MG抗体结合乳液是由羧基化胶乳微球制得，所述羧基化胶乳微球的平均粒径为50～200nm。

7.根据权利要求6所述的β2微球蛋白测定试剂盒，其特征在于：所述乳胶颗粒抗人β2-MG抗体结合乳液的制备方法包括如下步骤：

1)取1～2mL羧基化胶乳微球，加MES缓冲液至4～8mL；

2)加入1～3mL 22g/L的N-羟基丁二酰亚胺和1～3mL8.5g/L的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐进行活化，搅拌均匀后，进行第一次孵育，得到活化的聚苯乙烯胶乳微球颗粒；

3)加入3～6mLMES缓冲液，室温搅拌均匀，以抗人β2-MG单克隆抗体与所述聚苯乙烯胶乳微球颗粒的质量比为(0.01～0.1)：1的比例加入抗人β2-MG单克隆抗体，进行第二次孵育；

4)第二次孵育后，加入1～5mL终止液终止反应，室温下搅拌均匀，即得。

8.根据权利要求6所述的β2微球蛋白测定试剂盒，其特征在于：所述终止液为含20％(W/V)牛血清白蛋白的甘氨酸缓冲液。所述羧基化胶乳微球的平均粒径为108nm；所述第一次孵育的温度为37℃，时间为15～30min；所述第二次孵育的温度为37℃，时间为3～5h。

9.根据权利要求1至3中任一项所述的β2微球蛋白测定试剂盒，其特征在于：还包括血清标准品。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的β2微球蛋白测定试剂盒的检测方法，其特征在于：包括如下步骤：分离血清样品，向血清样品中加入试剂R1，混匀，孵育3～5min后，加入R2混匀孵育20～30s后，于600nm波长下检测吸光度值A1，5min后，于600nm波长下检测吸光度值A2，通过血清标准品数据建立标准曲线，计算β2微球蛋白的含量。

一种β2微球蛋白测定试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域，尤其涉及一种β2微球蛋白(β2-MG)测定试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] β2微球蛋白(β2-microglobulin，β2-MG)是一种内源性低分子量血清蛋白质，是由淋巴细胞、血小板、多形核白细胞产生的一种小分子球蛋白，分子质量为11800，由99个氨基酸组成的单链多肽，在免疫应答中起重要作用。血清β2-MG极易通过肾小球滤过膜，滤过的β2-MG 99.9％在近端肾小管吸收，并在肾小管上皮细胞中分解破坏，不再返流入血。正常人β2-MG的合成速度和细胞膜释放的量是非常恒定的，从而使β2-MG含量保持稳定水平。β2微球蛋白的升高可反映肾小球滤过功能受损或滤过负荷是否增加的情况，临床上检测血或尿中的β2-MG浓度为临床肾功能测定、肾移植成活、糖尿病肾病、重金属镉、汞中毒以及某些恶性肿瘤的临床诊断提供较早、可靠和灵敏的指标。

[0003] 基于β2-MG的特性和临床应用价值，加之因β2-MG血清浓度较低，测定方法需较高的分析灵敏度及特异性，其检测方法也在不断发展。临床上测定β2-MG的方法有单向免疫扩散法、放射免疫分析法(RIA)、酶联免疫吸附法(ELISA)、时间分辨荧光免疫分析法、胶乳增强免疫比浊法等。单向免疫扩散法、放射免疫分析法、荧光免疫分析法等测定方法都为非均相检测，操作复杂且耗时长，不便广泛临床应用且不适合急诊样本的检测。近年来，应用较多的是胶乳免疫比浊法，此方法为均相测定，具有检测快速精准、灵敏度高、特异性强、精密度好、成本较低，且检测样本量少，可进行少量样本和急诊样本的测定等优点。其基本原理是：将抗体包被在胶乳颗粒上，与相应抗原发生免疫反应后，形成聚集颗粒，在一定波长下，通过测定聚集物所产生的浊度，即可测出标本中被检物的含量。

[0004] 现有胶乳免疫比浊法，部分采用化学偶联法将特异性抗体结合于多种粒径组合的复合胶乳上，虽可兼顾检测灵敏度和线性范围，但胶乳试剂制备操作繁琐，易导致复合胶乳重复性差、稳定性差等。且胶乳试剂制备过程中，多采用超声波处理技术及离心与重悬，操作繁琐，制备时间较长，试剂均一性和稳定性较难控制。此外，β2微球蛋白测定试剂盒属于临床生化诊断试剂盒，

[0005] 需要在低温(2～8℃)状态下贮存及运输，否则会破坏试剂的稳定性，进而影响检测准确性。目前，临床生化诊断试剂盒的冷链运输需要专门的冷链运输工具，包括冷藏车、冷藏船、冷藏集装箱等，但这些运输工具结构复杂，且成本极高，仅仅适合大批量运输，难以满足单个或小批量多次运输的需求。对此，市面上销售的β2微球蛋白测定试剂盒，在小批量运输过程中普遍采用具有隔热、防水、抗震、抗老化和价格低廉等特点的独立泡沫保温箱，添加若干块在-20℃～-30℃预冷的冰袋，再将β2微球蛋白测定试剂盒放入泡沫保温箱内的方式进行贮运或运输。

[0006] 中国专利申请CN 105606822 A公开了一种β2-微球蛋白检测试剂盒，包括试剂R1、试剂R2，所述的试剂R1为含PEG6000和NaCl的缓冲液，所述的试剂R2为β2-微球蛋白抗体致

敏聚苯乙烯胶乳颗粒与缓冲液的混合物，含小牛血清白蛋白和葡萄糖等，但耐候性较差，可能存在贮运或运输过程中试剂盒成分发生冻结进而导致质量受影响的问题。

[0007] 因此，提供一种能够解决抗冻问题而又不影响试剂盒检测性能的β2微球蛋白(β2-MG)测定试剂盒具有重要意义。

发明内容

[0008] 针对现有技术的不足，本发明提供一种β2微球蛋白测定试剂盒，该试剂盒基于胶乳免疫透射比浊法(PETIA)，采用化学偶联法将特异性抗体结合于单一粒径的胶乳颗粒表面，避免了多种粒径组合复合胶乳的重复性差及操作繁琐的问题，同时兼顾了检测灵敏度和线性范围，无需多次超声、离心和重悬即可获得稳定的胶乳试剂。通过特定的制备方法以及添加特定的抗冻剂等优化反应体系，即使β2微球蛋白测定试剂盒的温度低于0℃，甚至低至-20℃贮存1周，也能有效保证其试剂的稳定性，同时其检测灵敏度高、特异性强、精密度好、成本较低，可以实现对β2微球蛋白的准确检测。

[0009] 此外，发明人在对小批量运输过程中的独立泡沫保温箱等贮运或运输方式进行研究发现，这类贮运或运输方式存在以下不足：包装简易，恒温效果差，如果试剂盒的位置放置不是非常合理，运输过程中会因震荡或挤压造成局部与冰袋直接接触，因冰袋在-20℃～-30℃预冷，当冰袋放入泡沫保温箱时，受温度直接传导效应，泡沫保温箱和生化诊断试剂盒瞬时温度会低于0℃，从而极可能导致试剂盒产生冻结，使试剂盒中相关组分受到严重影响而达不到预期要求或变质，影响其使用。因此，具备抗冻性能的β2微球蛋白测定试剂盒，对于保障试剂盒在贮运或运输过程中的质量稳定具有重要意义。

[0010] 发明人通过大量实验筛选出适合β2微球蛋白测定试剂盒的抗冻剂，使试剂盒在低于0℃，甚至在-20℃的低温下贮存1周，也能有效保证试剂盒中试剂的稳定性。同时该检测试剂盒的检测灵敏度高、特异性强、精密度好、成本较低，可以实现对β2微球蛋白的准确检测。

[0011] 本发明的目的将通过下面的详细描述来进一步体现和说明。

[0012] 本发明提供一种β2微球蛋白测定试剂盒，包括试剂R1、试剂R2，所述试剂R1包含如下浓度的组分：第一缓冲液20～100mmoL/L、无机盐5g/L～30g/L、促凝剂5g/L～20g/L、防腐剂0.1g/L～2g/L；所述试剂R2包含如下浓度的组分：第二缓冲液80～150mmoL/L、稳定剂20g/L～100g/L、抗冻剂5g/L～40g/L、无机盐5g/L～40g/L、表面活性剂5g/L～30g/L、封闭剂5g/L～30g/L、乳胶颗粒抗人β2-MG抗体结合乳液0.02g/L～0.12g/L、防腐剂0.05g/L～2g/L。

[0013] 优选地，试剂R1与试剂R2的体积比为4:1。

[0014] 优选地，所述试剂R1包含如下浓度的组分：第一缓冲液60～100mmoL/L、无机盐5g/L～20g/L、促凝剂10g/L～20g/L、防腐剂1g/L～2g/L；所述试剂R2包含如下浓度的组分：第二缓冲液80～120mmoL/L、稳定剂60g/L～100g/L、抗冻剂5g/L～20g/L、无机盐5g/L～40g/L、表面活性剂5g/L～30g/L、封闭剂5g/L～30g/L、乳胶颗粒抗人β2-MG抗体结合乳液0.04g/L～0.10g/L、防腐剂0.05g/L～2g/L。

[0015] 更优选地，所述试剂R1包含如下浓度的组分：第一缓冲液80mmoL/L、无机盐10g/L、促凝剂15g/L、防腐剂1.5g/L；所述试剂R2包含如下浓度的组分：第二缓冲液100mmoL/L、稳

定剂80g/L、抗冻剂10g/L、无机盐14.5g/L、表面活性剂10g/L、封闭剂20g/L、乳胶颗粒抗人β2-MG抗体结合乳液0.06g/L、防腐剂1.5g/L。

[0016] 优选地，所述抗冻剂为甜菜碱。通过加入一定量的甜菜碱，在起到抗冻效果的同时，不会对β2微球蛋白测定试剂盒的检测性能造成影响或干扰。

[0017] 优选地，所述第一缓冲液为磷酸盐缓冲液(PBS)，所述第二缓冲液为MOPS缓冲液，所述无机盐为NaCl，所述促凝剂为聚乙二醇6000，所述表面活性剂为Tween-20，所述封闭剂为牛血清白蛋白(BSA)，所述稳定剂为海藻糖，所述防腐剂为Proclin 300。

[0018] 优选地，所述乳胶颗粒抗人β2-MG抗体结合乳液是由羧基化胶乳微球制得，所述羧基化胶乳微球的平均粒径为50～200nm；更优选地，所述羧基化胶乳微球的平均粒径为108nm。

[0019] 优选地，所述乳胶颗粒抗人β2-MG抗体结合乳液的制备方法包括如下步骤：

[0020] 1)取1～2mL羧基化胶乳微球，加2-吗啉乙磺酸缓冲液(MES缓冲液)至4～8mL；

[0021] 2)加入1～3mL 22g/L的N-羟基丁二酰亚胺(NHS)和1～3mL8.5g/L的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)进行活化，搅拌均匀后，进行第一次孵育，得到活化的聚苯乙烯胶乳微球颗粒；

[0022] 3)加入3～6mLMES缓冲液，室温搅拌均匀，以抗人β2-MG单克隆抗体与所述聚苯乙烯胶乳微球颗粒的质量比为(0.01～0.1)：1的比例加入抗人β2-MG单克隆抗体，进行第二次孵育；4)第二次孵育后，加入1～5mL终止液终止反应，室温下搅拌均匀，即得。

[0023] 优选地，所述终止液为含20％(W/V)牛血清白蛋白的甘氨酸缓冲液。

[0024] 优选地，所述第一次孵育的温度为37℃，时间为15～30min；所述第二次孵育的温度为37℃，时间为3～5h。

[0025] 优选地，本发明提供的β2微球蛋白测定试剂盒，还包括血清标准品。

[0026] 相应地，本发明还提供β2微球蛋白测定试剂盒的检测方法，包括如下步骤：分离血清样品，向血清样品中加入试剂R1，混匀，孵育3～5min后，加入R2混匀孵育20～30s后，于600nm波长下检测吸光度值A1，5min后，于600nm波长下检测吸光度值A2，通过血清标准品数据建立标准曲线，计算β2微球蛋白的含量。

[0027] 与现有技术相比，本发明的有益效果包括：

[0028] (1)本发明提供一种β2微球蛋白测定试剂盒，采用胶乳免疫比浊法，用化学偶联法将特异性抗体结合于单一粒径的胶乳颗粒表面，通过特定的制备方法和优化反应体系，无需多次离心和重悬，无需超声波处理，即可获得稳定的胶乳试剂，同时兼顾了检测灵敏度和线性范围，显著提高了测定试剂的灵敏度和稳定性，可适用于各类全自动生化分析仪进行分析，适应性好。

[0029] (2)本发明试剂盒特地添加了抗冻剂甜菜碱，并调整其用量为5～40g/L，有效提高了试剂的稳定性，解决了现有β2微球蛋白测定试剂盒的耐候性较差的问题。使β2微球蛋白测定试剂盒在温度低于0℃，甚至低至-20℃贮存1周，也能有效保证其试剂的稳定性，同时其检测灵敏度高、特异性强、精密度好、成本较低，可以实现对β2微球蛋白的准确检测。

[0030] (3)本发明试剂盒可在具备有400-800nm波长的全自动生化分析仪上检测血液中β2微球蛋白的含量，检测方法的重复性好，快速精准，自动化程度高，大大提高工作效率，且对检测样本的用量要求少，可适用于少量样本和急诊样本的测定。

具体实施方式

[0031] 下面通过具体实施例对本发明做进一步的详细说明。

[0032] 本发明中，所涉及的组分或材料均为常规市售产品，或可通过本领域的常规技术手段获得。本发明中的浓度，除非明确指出，均指质量浓度。

[0033] 实施例一 乳胶颗粒抗人β2-MG抗体结合乳液的制备

[0034] 乳胶颗粒抗人β2-MG抗体结合乳液的制备方法包括如下步骤：

[0035] 1)取2mL粒径为108nm且固含量为5％的羧基化胶乳微球，加MES缓冲液至5mL；

[0036] 2)加入1mL 22g/L的N-羟基丁二酰亚胺和1mL 8.5g/L的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐进行活化，搅拌均匀后，进行第一次孵育，温度为37℃，时间为20min，得到活化的聚苯乙烯胶乳微球颗粒；

[0037] 3)加入3mLMES缓冲液，室温搅拌均匀，以抗人β2-MG单克隆抗体与所述聚苯乙烯胶乳微球颗粒的质量比为0.035:1的比例加入抗人β2-MG单克隆抗体，进行第二次孵育，温度为37℃，时间为4h；

[0038] 4)第二次孵育后，加入2mL含20％BSA的甘氨酸缓冲液作为终止液终止反应，室温下搅拌3h，即得，4℃保存备用。

[0039] 实施例二 乳胶颗粒抗人β2-MG抗体结合乳液的制备

[0040] 乳胶颗粒抗人β2-MG抗体结合乳液的制备方法包括如下步骤：

[0041] 1)取1.5mL粒径为108nm且固含量为5％的羧基化胶乳微球，加MES缓冲液至5mL；

[0042] 2)加入2mL22g/L的N-羟基丁二酰亚胺和2mL 8.5g/L的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐进行活化，搅拌均匀后，进行第一次孵育，温度为37℃，时间为20min，得到活化的聚苯乙烯胶乳微球颗粒；

[0043] 3)加入5mLMES缓冲液，室温搅拌均匀，以抗人β2-MG单克隆抗体与所述聚苯乙烯胶乳微球颗粒的质量比为0.08:1的比例加入抗人β2-MG单克隆抗体，进行第二次孵育，温度为37℃，时间为4h；

[0044] 4)第二次孵育后，加入5mL含20％BSA的甘氨酸缓冲液作为终止液终止反应，室温下搅拌3h，即得，4℃保存备用。

[0045] 实施例三β2微球蛋白测定试剂盒及检测方法

[0046] β2微球蛋白测定试剂盒包括试剂R1、试剂R2；试剂R1与试剂R2的体积比为4:1。

[0047] R1：磷酸盐缓冲液80mmoL/L、NaCl 10g/L、聚乙二醇6000 15g/L、Proclinc 300 1.5g/L；

[0048] R2：MOPS缓冲液100mmoL/L、海藻糖80g/L、实施例一制得的乳胶颗粒抗人β2-MG抗体结合乳液0.06g/L、NaCl 14.5g/L、Tween-20 10g/L、牛血清白蛋白(BSA)20g/L、甜菜碱10g/L、Proclin 300 1.5g/L。

[0049] β2微球蛋白测定试剂盒的检测方法，包括如下步骤：分离血清样品，向血清样品中加入试剂R1，混匀，孵育4min后，加入R2混匀孵育30s后，于600nm波长下检测吸光度值A1，5min后，于600nm波长下检测吸光度值A2，通过血清标准品数据建立标准曲线，计算β2微球蛋白的含量。

[0050] 实施例四β2微球蛋白测定试剂盒及检测方法

[0051] β2微球蛋白测定试剂盒包括试剂R1、试剂R2；试剂R1与试剂R2的体积比为4:1。

[0052] R1:磷酸盐缓冲液60mmoL/L、NaCl 8g/L、聚乙二醇6000 10g/L、Proclinc 300 1g/L;

[0053] R2:MOPS缓冲液80mmoL/L、海藻糖60g/L、实施例二制得的乳胶颗粒抗人β2-MG抗体结合乳液0.08g/L、NaCl 20g/L、Tween-20 15g/L、牛血清白蛋白(BSA)15g/L、甜菜碱15g/L、Proclin 300 1g/L。

[0054] β2微球蛋白测定试剂盒的检测方法,包括如下步骤:分离血清样品,向血清样品中加入试剂R1,混匀,孵育4min后,加入R2混匀孵育25s后,于600nm波长下检测吸光度值A1,5min后,于600nm波长下检测吸光度值A2,通过血清标准品数据建立标准曲线,计算β2微球蛋白的含量。

[0055] 对比例1β2微球蛋白测定试剂盒

[0056] β2微球蛋白测定试剂盒包括试剂R1、试剂R2;试剂R1与试剂R2的体积比为4:1。

[0057] R1:磷酸盐缓冲液80mmoL/L、NaCl 10g/L、聚乙二醇6000 15g/L、Proclinc 300 1.5g/L;

[0058] R2:MOPS缓冲液100mmoL/L、海藻糖80g/L、实施例一制得的乳胶颗粒抗人β2-MG抗体结合乳液0.06g/L、NaCl 14.5g/L、Tween-20 10g/L、牛血清白蛋白(BSA)20g/L、Proclin 300 1.5g/L。

[0059] 对比例1与实施例三相比,试剂R2不含甜菜碱。

[0060] 对比例2β2微球蛋白测定试剂盒

[0061] β2微球蛋白测定试剂盒包括试剂R1、试剂R2;试剂R1与试剂R2的体积比为4:1。

[0062] R1:磷酸盐缓冲液80mmoL/L、NaCl 10g/L、聚乙二醇6000 15g/L、Proclinc 300 1.5g/L;R2:MOPS缓冲液100mmoL/L、海藻糖80g/L、实施例一制得的乳胶颗粒抗人β2-MG抗体结合乳液0.06g/L、NaCl 14.5g/L、Tween-20 10g/L、牛血清白蛋白(BSA)20g/L、乙二醇10g/L、Proclin 300 1.5g/L。

[0063] 对比例2与实施例三相比,试剂R2中用乙二醇替代甜菜碱。

[0064] 实施例六本发明试剂盒的准确度分析

[0065] 试验仪器:日立7170全自动生化分析仪

[0066] 检测样本:40例随机血清样本和一份β2-MG血清样本(靶值为6.52mg/L)

[0067] 对照试剂盒:国家食品药品监督管理局已批准上市的某知名厂家β2微球蛋白检测试剂盒(胶乳免疫比浊法)(包括试剂R1和R2,但成分与本发明不同,以下简称为对照试剂)

[0068] 将本发明实施例三、对比例1、对比例2的检测试剂同时放入2～8℃(正常存放条件为2～8℃)、-20℃冷冻1天、-20℃冷冻7天进行抗冻试验,分别同时定标后同时测定40例血清样品,以考察试剂盒中组分和性能的稳定性,结果如表1-3所示。

[0069] 表1实施例三在不同条件下保存7天后的样品检测结果(单位:mg/L)

[0070]

样品序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
未冷冻	2.14	1.42	1.82	4.89	2.20	2.39	2.09	2.66	1.46	5.02
冷冻1天	2.09	1.31	1.75	5.48	2.11	2.24	2.00	2.55	1.31	4.90
冷冻7天	2.21	1.54	1.79	5.18	2.08	2.40	1.92	2.36	1.48	5.01
样品序号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
未冷冻	2.33	6.49	2.17	1.52	2.09	2.81	1.47	1.26	7.65	2.19
冷冻1天	2.18	6.52	2.02	1.42	1.94	2.79	1.28	1.25	7.60	2.09
冷冻7天	2.28	6.23	2.23	1.57	1.14	2.74	1.48	1.45	7.46	2.05
样品序号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
未冷冻	1.72	2.43	1.58	5.58	16.16	2.14	3.49	6.89	1.71	1.35
冷冻1天	1.57	2.31	1.49	5.59	15.11	2.01	3.82	6.81	1.67	1.45
冷冻7天	1.64	2.48	1.42	5.48	14.83	2.18	3.75	6.82	1.54	1.40
样品序号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
未冷冻	1.65	1.24	3.41	2.62	12.20	7.58	2.11	2.38	1.44	8.13
冷冻1天	1.59	1.36	3.50	2.66	12.08	7.62	2.05	2.25	1.34	8.15
冷冻7天	1.67	1.25	3.45	2.34	11.24	7.46	2.08	2.18	1.38	8.02

[0071] 表2对比例1在不同条件下保存7天后的样品检测结果(单位:mg/L)

[0072]

样品序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
未冷冻	2.19	1.47	1.76	4.94	2.13	2.21	1.96	2.55	1.31	4.89
冷冻 1 天	1.72	0.89	0.96	2.86	1.23	1.77	0.86	2.00	0.81	3.21
冷冻 7 天	1.59	0.82	1.03	2.49	1.42	1.65	0.93	1.99	0.81	3.15
样品序号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
未冷冻	2.12	6.55	2.01	1.40	1.96	2.73	1.26	1.27	7.52	2.27
冷冻 1 天	1.64	3.79	1.61	0.84	0.94	2.26	0.79	0.78	5.68	1.53
冷冻 7 天	1.59	3.42	1.43	0.81	0.85	2.02	0.66	0.79	5.32	1.54
样品序号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
未冷冻	1.60	2.38	1.65	4.96	16.25	2.22	3.59	6.78	1.86	1.58
冷冻 1 天	0.84	1.70	0.81	2.69	9.53	1.23	2.26	4.52	1.15	0.93
冷冻 7 天	0.71	1.66	0.84	2.52	9.21	1.16	1.71	4.49	1.05	0.89
样品序号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
未冷冻	1.69	1.26	3.52	2.59	12.25	7.62	2.41	2.44	1.51	8.18
冷冻 1 天	1.01	0.81	2.49	1.83	7.53	5.56	1.89	1.56	0.86	5.56
冷冻 7 天	0.99	0.83	2.53	1.76	7.46	5.49	1.78	1.46	0.92	5.46

[0073] 表3对比例2在不同条件下保存7天后的样品检测结果(单位:mg/L)

[0074]

样品序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
未冷冻	2.10	1.43	1.75	4.91	2.16	2.30	1.99	2.62	1.43	4.95
冷冻1天	1.95	1.06	1.36	3.17	1.35	1.25	1.21	2.09	1.08	3.66
冷冻7天	1.89	1.00	1.32	3.07	1.24	1.16	1.03	2.07	1.01	3.70
样品序号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
未冷冻	2.23	6.58	2.11	1.45	1.95	2.77	1.36	1.30	7.55	2.23
冷冻1天	1.95	4.03	1.45	1.01	1.47	2.56	1.00	0.95	6.18	1.62
冷冻7天	1.89	3.87	1.29	0.97	1.39	2.37	0.98	0.89	6.20	1.55
样品序号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
未冷冻	1.65	2.33	1.62	5.52	16.22	2.18	3.56	6.88	1.69	1.46
冷冻1天	1.19	2.02	1.05	3.46	10.87	1.63	3.09	5.23	1.38	1.09
冷冻7天	1.17	2.01	0.96	3.39	9.88	1.56	3.01	5.19	1.22	1.02
样品序号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
未冷冻	1.63	1.30	3.39	2.55	12.15	7.59	2.34	2.40	1.48	8.2
冷冻1天	1.12	1.00	2.88	2.04	9.65	6.06	2.01	2.06	1.11	6.21
冷冻7天	1.15	0.96	2.63	1.93	9.59	5.94	1.95	1.99	1.06	5.94

[0075] 从表1-3可知，未冷冻时，实施例三、对比例1、对比例2的40例样品检测结果平均值分别为3.55mg/L、3.52mg/L、3.53mg/L，三者检测结果基本相当，说明本实施例中甜菜碱的加入不会对正常检测造成影响或干扰；经-20℃冷冻处理1天后，实施例三的检测结果平均值为3.48mg/L，对比例1的检测结果平均值为2.27mg/L，对比例2的检测结果平均值为2.64mg/L；经-20℃冷冻处理7天后，实施例三的检测结果平均值为3.43mg/L，对比例1的检测结果平均值为2.18mg/L，对比例2的检测结果平均值为2.54mg/L。

[0076] 对比例1经-20℃冷冻处理1天后的样品检测结果均显著下降，平均下降幅度达到了35.51％；对比例2由于含有一定量的乙二醇，起到一定的抗冻作用，经-20℃冷冻处理1天后的样品检测结果平均下降幅度为25.21％，较对比例1有所改善，但仍不理想；而实施例三由于含有一定量的甜菜碱作为抗冻剂，经-20℃冷冻处理1天后的样品检测结果平均下降幅度仅为1.97％，属于合理范围，且较对比例1、对比例2有明显改善；经-20℃冷冻处理7天后的

[0077] 实施例三、对比例1、对比例2的样品检测结果平均下降幅度分别为3.38％、38.07％和28.05％，与经-20℃冷冻处理1天后的样品检测结果无明显差异，可能原因：试剂在-20℃冷冻处理1天后至7天内，试剂均处于稳定状态，试剂组分变化较小。平均下降幅度＝(未冷冻时的均值－冷冻一定天数的均值)/未冷冻时的均值。

[0078] 以上结果表明，添加乙二醇的对比例2试剂抗冻性能好于未添加乙二醇的对比例1，添加甜菜碱的实施例三试剂抗冻性能好于未添加甜菜碱的对比例1和添加乙二醇的对比例2，可见，甜菜碱作为本发明试剂盒成分的抗冻剂显著增强了试剂的抗冻能力，在试剂冷链运输过程中能有效保证试剂的稳定性。

[0079] 用实施例三、对比例1、对比例2的试剂盒和对照试剂盒按各自的检测方法分别同时定标后同时一份β2-MG血清样本(靶值为6.52mg/L)，结果如表4所示。

[0080] 表4β2-MG血清样本检测结果(单位:mg/L)

[0081]

检测试剂	样本靶值	检测次数			平均值	相对偏差(%)
实施例三	6.52	6.54	6.43	6.49	6.49	0.46
对比例 1		6.43	6.36	6.51	6.43	1.38
对比例 2		6.43	6.48	6.45	6.45	1.07
对照试剂		6.51	6.36	6.57	6.48	0.61

[0082] 结果显示,根据实施例三、对比例1、对比例2、对照试剂检测结果计算出的相对偏差分别为0.46%、1.38%、1.07%、0.61%,表明本发明所述方法检测结果与对照试剂盒结果无明显差异,具有较高准确度(符合度),而且实施例三为最优的选择。

[0083] 实施例七 本发明试剂及方法的灵敏度分析

[0084] 试验仪器:日立7170全自动生化分析仪

[0085] 检测样本:1份纯化水、1份浓度为1.65mg/L的β2-MG低值样本

[0086] 用实施例三的试剂和对照试剂(某厂家β2微球蛋白检测试剂盒)用各自的检测方法同时定标同时对每份待测样本重复检测20次,记录吸光度数值,计算平均值和标准偏差(SD);水的吸光度平均值加上2SD作为最低检出限对应的吸光度值,由于吸光度与浓度的关系基本为线性关系,可以通过和1.65mg/L样本的吸光度平均值比较计算出最低检测限的浓度,即灵敏度。检测结果见表5。

[0087] 表5实施例三试剂盒与对照试剂盒灵敏度分析结果(单位:mg/L)

[0088]

检测次数	实施例三试剂检测结果		对照试剂检测结果	
	水的吸光度差值	低值样本(1.65 mg/L)吸光度差值	水的吸光度差值	低值样本(1.65 mg/L)吸光度差值
1	10	790	11	559
2	19	821	14	589
3	9	767	11	613
4	15	845	16	622
5	18	766	18	523
6	19	881	14	601
7	14	714	11	632
8	9	747	16	553
9	13	806	14	613

[0089]

10	11	811	9	635
11	17	774	12	499
12	11	848	15	574
13	10	841	12	573
14	12	768	17	607
15	11	816	15	615
16	18	841	16	535
17	12	818	16	567
18	13	817	17	579
19	11	795	11	613
20	16	749	12	567
平均值	13.4	800.75	13.85	583.45
SD	3.38	41.41	2.56	37.29
灵敏度	0.042		0.054	

[0090] 结果显示，本发明实施例三的灵敏度为0.042mg/L，对照试剂盒的灵敏度为0.054mg/L，表明本发明试剂盒具有较高的检测灵敏度。

[0091] 灵敏度＝(水吸光度差值平均值+2SD)*样本浓度/样本吸光度差值平均值。

[0092] 实施例八：本发明试剂及方法的精密度分析：

[0093] 试验仪器：日立7170全自动生化分析仪；

[0094] 检测样本：1份临床血清样本(2.26mg/L低值样本)、1份β2-MG血清样本(5.23mg/L高值样本)；

[0095] 用实施例三的试剂和检测方法对每份待测样本重复检测10次，检测结果见表6。

[0096] 表6实施例三的精密度分析结果(单位：mg/L)

[0097]

检测次数		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值	标准差	CV（%）
实施例三	低值	2.33	2.29	2.29	2.22	2.3	2.27	2.22	2.21	2.26	2.26	2.27	0.04	1.76
	高值	5.27	5.12	5.17	5.32	5.24	5.26	5.27	5.29	5.22	5.31	5.25	0.06	1.14
对照试剂	低值	2.28	2.3	2.23	2.25	2.21	2.21	2.24	2.23	2.22	2.34	2.25	0.04	1.78
	高值	5.22	5.12	5.26	5.24	5.24	5.28	5.35	5.29	5.22	5.11	5.23	0.07	1.34

[0098] 结果显示，本发明的精密度：CV低值为1.76、CV高值为1.14，均小于等于10％，而对照试剂CV低值为1.78、CV高值为1.34，表明本发明所述方法具有较高的精密度。

[0099] 实施例九：本发明试剂及方法的线性分析：

[0100] 试验仪器：日立7170全自动生化分析仪

[0101] 检测样本：高β2-MG血清样本(18mg/L)

[0102] 将高β2-MG血清样本(18mg/L)用校准品稀释液稀释成6个不同浓度，分别为0mg/L、1.125mg/L、5.0mg/L、8.0mg/L、11.0mg/L、15.0mg/L，采用实施例三的检测方法对上述样品的每个浓度进行检测，每个浓度检测三次，计算相关系数R值，实施例三的检测结果见表7。

[0103] 表7实施例三的线性分析结果(单位：mg/L)

[0104]

理论值(mg/L)	检测值(mg/L)			检测平均值(mg/L)
0.0	0.00	0.00	0.00	0.00
1.125	1.36	1.12	1.37	1.28
5.0	5.28	5.39	4.96	5.21
8.0	8.93	8.81	8.78	8.84
11.0	12.59	12.39	12.53	12.50
15.0	15.98	15.91	16.87	16.25
18.0	18.43	19.51	19.22	19.05
回归方程式	$y = 1.0741 x + 0.217$			
R^2	$R^2 = 0.9984$			

[0105] 结果显示,根据实施例三检测结果得到的回归方程为y＝1.0741x+0.217,相关系数R2＝0.9984,表明本发明试剂在0mg/L～18mg/L范围内具有良好的线性度。

[0106] 实施例十:本发明试剂及方法的稳定性分析:

[0107] 不同检测试剂的加速稳定性考察:

[0108] 试验仪器:日立7170全自动生化分析仪;

[0109] 检测样本:40例随机血清样本;

[0110] 将2～8℃、-20℃冷冻1天、-20℃冷冻7天的本发明实施例三检测试剂进行37度加速破坏性实验,以考察其组分的稳定性,结果如表8-9所示。

[0111] 表8未冷冻的实施例三经加速破坏性实验1周后的样品检测结果(单位:mg/L)

[0112]

	样品序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2~8℃	未加速	1.97	4.33	1.55	1.62	2.48	2.49	1.74	1.35	1.98	1.28
	加速 1 周	1.93	4.19	1.50	1.53	2.35	2.41	1.70	1.25	1.93	1.27
	样品序号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	未加速	2.13	1.93	4.88	5.14	5.91	6.74	4.21	7.62	1.81	2.87
	加速 1 周	2.14	2.02	5.08	5.32	6.18	6.80	4.33	7.53	1.79	2.82
	样品序号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	未加速	4.86	5.22	1.59	2.38	1.95	2.92	5.02	2.05	2.89	4.31
	加速 1 周	4.84	5.19	1.54	2.36	1.89	2.88	4.93	2.19	2.79	4.32
	样品序号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	未加速	1.76	7.32	2.56	1.43	1.77	2.52	10.74	2.39	3.62	2.33
	加速 1 周	1.69	7.28	2.50	1.36	1.69	2.39	9.55	2.24	3.45	2.26

[0113] 表9经-20℃冷冻的实施例三经加速破坏性实验1周后的样品检测结果(单位:mg/L)

[0114]

-20℃冷冻1天	样品序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	未加速	2.03	4.21	1.58	1.51	2.34	2.32	1.75	1.38	1.98	1.24
	加速1周	1.95	4.07	1.54	1.51	2.28	2.13	1.79	1.36	2.03	1.27
	样品序号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	未加速	2.11	2.03	5.04	5.24	6.04	6.78	4.19	7.52	1.78	2.92
	加速1周	2.11	2.00	5.06	5.23	6.11	6.66	4.34	7.51	1.65	2.89
	样品序号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	未加速	4.95	5.31	1.49	2.41	1.90	2.91	4.98	2.08	2.83	4.19
	加速1周	4.86	5.16	1.50	2.28	1.86	2.79	4.73	2.11	2.74	4.14
	样品序号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	未加速	1.71	7.29	2.58	1.34	1.82	2.45	10.72	2.31	3.63	2.38
	加速1周	1.66	7.14	2.54	1.19	1.72	2.53	10.22	2.25	3.46	2.16
-20℃冷冻7天	样品序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	未加速	2.03	4.19	1.49	1.46	2.42	2.42	1.73	1.29	2.09	1.35
	加速1周	1.91	4.03	1.35	1.41	2.59	2.23	1.69	1.22	1.97	1.24
	样品序号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	未加速	2.07	1.85	4.91	5.26	5.98	6.61	4.18	7.36	1.77	2.91
	加速1周	1.93	1.99	4.98	5.14	5.96	6.56	4.29	7.18	1.56	2.71
	样品序号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	未加速	4.89	5.39	1.42	2.36	1.93	2.87	4.95	2.23	2.86	4.25
	加速1周	4.76	5.02	1.33	2.29	1.88	2.69	4.76	2.18	2.76	4.19
	样品序号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	未加速	1.65	7.19	2.51	1.35	1.80	2.36	10.79	2.32	3.67	2.40
	加速1周	1.54	7.05	2.41	1.27	1.73	2.40	9.14	2.19	3.39	2.29

[0115] 从表8-9可知，未加速时，2～8℃、-20℃冷冻1天、-20℃冷冻7天的实施例三的40例样品检测结果平均值分别为3.34mg/L、3.33mg/L、3.31mg/L，三者结果无明显差异；经37度加速破坏性实验1周后，2～8℃、-20℃冷冻1天、-20℃冷冻7天的实施例1的检测结果平均值分别为3.29mg/L、3.26mg/L、3.18mg/L，较未加速时，检测结果平均值下降幅度分别为1.50％、2.20％、3.93％，均小于10％，属于合理范围。平均下降幅度＝(未加速时的均值－加速1周的均值)/未加速时的均值。

[0116] 以上结果表明，实施例三由于含有一定量的甜菜碱作为抗冻剂，经-20℃冷冻1天、-20℃冷冻7天，再经破坏性实验1周后的样品检测结果均未发生明显变化，且与2～8℃的检测结果基本相当，属于合理范围。可见，一定量的甜菜碱的添加不仅增强了本发明试剂盒成分的抗冻性，也能有效的保证试剂的稳定性。

[0117] 以上内容是结合具体的优选实施方式对本发明所作的进一步详细说明，不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干简单推演或替换，都应当视为属于本发明的保护范围。

专利名称(译)	一种β2微球蛋白测定试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN109187947A	公开(公告)日	2019-01-11
申请号	CN201810875603.4	申请日	2018-08-03
[标]发明人	刘光华 杨玉军 刘秋明 许翠		
发明人	刘光华 杨玉军 刘秋明 许翠		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543 G01N21/31		
CPC分类号	G01N33/531 G01N21/31 G01N33/54313 G01N33/54393 G01N2021/3185		
代理人(译)	李静		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种β2微球蛋白(β2-MG)测定试剂盒，包括试剂R1、试剂R2，所述试剂R1包含如下浓度的组分：第一缓冲液、无机盐、促凝剂、防腐剂；所述试剂R2包含如下浓度的组分：第二缓冲液、稳定剂、抗冻剂、无机盐、表面活性剂、封闭剂、乳胶颗粒抗人β2-MG抗体结合乳液、防腐剂。本发明属于生物检测技术领域，本发明提供的β2微球蛋白(β2-MG)测定试剂盒在提高胶乳试剂稳定性的同时兼顾了检测灵敏度和线性范围，显著提高了测定试剂的灵敏度和稳定性，具有良好的抗冻性能，可适用于各类全自动生化分析仪进行分析，适应性好。

样品序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
未冷冻	2.14	1.42	1.82	4.89	2.20	2.39	2.09	2.66	1.46	5.02
冷冻 1 天	2.09	1.31	1.75	5.48	2.11	2.24	2.00	2.55	1.31	4.90
冷冻 7 天	2.21	1.54	1.79	5.18	2.08	2.40	1.92	2.36	1.48	5.01
样品序号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
未冷冻	2.33	6.49	2.17	1.52	2.09	2.81	1.47	1.26	7.65	2.19
冷冻 1 天	2.18	6.52	2.02	1.42	1.94	2.79	1.28	1.25	7.60	2.09
冷冻 7 天	2.28	6.23	2.23	1.57	1.14	2.74	1.48	1.45	7.46	2.05
样品序号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
未冷冻	1.72	2.43	1.58	5.58	16.16	2.14	3.49	6.89	1.71	1.35
冷冻 1 天	1.57	2.31	1.49	5.59	15.11	2.01	3.82	6.81	1.67	1.45
冷冻 7 天	1.64	2.48	1.42	5.48	14.83	2.18	3.75	6.82	1.54	1.40
样品序号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
未冷冻	1.65	1.24	3.41	2.62	12.20	7.58	2.11	2.38	1.44	8.13
冷冻 1 天	1.59	1.36	3.50	2.66	12.08	7.62	2.05	2.25	1.34	8.15
冷冻 7 天	1.67	1.25	3.45	2.34	11.24	7.46	2.08	2.18	1.38	8.02