(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 109633166 A
(43)申请公布日 2019.04.16

(21)申请号 201811565608.3

(22)申请日 2018.12.20

(71)申请人 北京贝尔生物工程股份有限公司
地址 102612 北京市大兴区黄村芦城工业区创新路99号

(72)发明人 不公告发明人

(74)专利代理机构 北京悦和知识产权代理有限公司 11714
代理人 田昕

(51)Int.Cl.
G01N 33/68(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)
G01N 33/532(2006.01)

权利要求书3页 说明书12页 附图4页

(54)发明名称

一种高灵敏度、宽检测范围的人α1-微球蛋白测定试剂盒

(57)摘要

本发明实施例涉及免疫诊断领域，具体涉及一种高灵敏度、宽检测范围的人α1-微球蛋白测定试剂盒。本发明实施例提供的人α1-微球蛋白测定试剂盒，包括：试剂1、试剂2和不同梯度浓度的人α1-MG校准品；其中，所述试剂2包括只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球和只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球，所述只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径＞只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径。本发明提供的人α1-微球蛋白测定试剂盒，在10min内即可完成单样本的检测，精密度、准确度和抗干扰等各项指标都表现优异，能很好地反应肾小管重吸收功能和肾小球滤过功能，非常适用于临床上的生化分析仪，极大地方便了临床检验。

CN 109633166 A

1.一种人α1-微球蛋白测定试剂盒，包括：试剂1、试剂2和不同梯度浓度的人α1-MG校准品；其中，所述试剂2包括只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球和只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球，所述只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径＞只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径。

2.根据权利要求1所述的人α1-微球蛋白测定试剂盒，其特征在于：只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径大小为150-300nm，终浓度为0.005％-0.1％；只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径大小为60-150nm，终浓度为0.1％-0.4％；标记的人α1-MG单克隆抗体的终浓度为0.003％-0.015％；标记的人α1-MG多克隆抗体的终浓度为0.02％-0.08％；

可选地，只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径大小为223nm，其终浓度为0.015％；只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径大小为123nm，其终浓度为0.2％；标记的人α1-MG单克隆抗体的终浓度为0.003％；标记的人α1-MG多克隆抗体的终浓度为0.045％；

或只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径大小为186nm，其终浓度为0.02％；只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径大小为88nm，其终浓度为0.2％；标记的人α1-MG单克隆抗体的终浓度为0.005％；标记的人α1-MG多克隆抗体的终浓度为0.04％；

或只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径大小为196nm，其终浓度为0.015％；只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径大小为70nm，其终浓度为0.25％；标记的人α1-MG单克隆抗体的终浓度为0.007％；标记的人α1-MG多克隆抗体的终浓度为0.06％；

或只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径大小为196nm，其终浓度为0.018％；只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径大小为83nm，其终浓度为0.22％；标记的人α1-MG单克隆抗体的终浓度为0.005％；标记的人α1-MG多克隆抗体的终浓度为0.065％。

3.根据权利要求1所述的人α1-微球蛋白测定试剂盒，其特征在于：只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球和只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球的质量比为0.05-0.4:1。

4.根据权利要求1所述的人α1-微球蛋白测定试剂盒，其特征在于：试剂1中包括增敏剂；可选地，所述增敏剂包括：葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、聚蔗糖400或多聚赖氨酸中的至少一种；进一步可选地，葡聚糖分子量Mw包括5000、25000、40000、80000、250000、500000、2000000中的至少一种；聚乙烯吡咯烷酮的分子量Mw包括8000、10000、24000、58000中的至少一种；多聚赖氨酸分子量Mw包括2000或5000中的至少一种；

和/或，试剂1中包括促凝剂；可选地，所述促凝剂包括PEG6000、PEG8000或PEG20000中的至少一种；

和/或，试剂2还包括稳定剂；可选地，所述稳定剂包含蛋白质、PEG或糖中的至少一种；进一步可选地，所述蛋白质包括BSA、明胶或酪蛋白中的至少一种；所述糖包括蔗糖、海藻糖或葡萄糖中的至少一种；

和/或，校准品中人α1-MG浓度梯度为：0.00，15.00，30.00，75.00，150.00，300.00mg/L；

和/或，校准品的基质液包括下述组分：磷酸盐缓冲液，EDTA二钠或EDTA二钾，枸橼酸钠，肝素钠或肝素锂，尿素，尿酸，海藻糖，BSA，氯化钠，氯化钾；可选地，校准品的基质液包括下述终浓度的组分：10-50mM的pH值为7.2-7.4磷酸盐缓冲液，2-10mM的EDTA二钠或EDTA二钾、1%-5%枸橼酸钠、0.02%-0.2%肝素钠或肝素锂、0.5%-3%尿素、0.01%-1%尿酸、1%-5%海藻糖、0.2%-1%甘露醇、0.1%-2%BSA、150-300mM氯化钠和50-100mM氯化钾。

5.根据权利要求3所述的人α1-微球蛋白测定试剂盒，其特征在于：

试剂2包括下述组分：只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球、只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球缓冲液、稳定剂、缓冲液、表面活性剂、无机盐和防腐剂；可选地，试剂2包括下述终浓度的组分：0.005%-0.1%只标记有人α1-MG单克隆抗体的、平均粒径为150-300nm的羧基胶乳微球，0.003%-0.015%的标记的人α1-MG单克隆抗体，0.1%-0.4%只标记有人α1-MG多克隆抗体的、平均粒径为60-150nm的羧基胶乳微球，0.02%-0.08%的标记的人α1-MG多克隆抗体，0.2%-6%的稳定剂，20-100mM的缓冲液，0.05%-0.3%的表面活性剂，50-600mM的无机盐和0.05%-0.3%的防腐剂；

和/或，试剂1包括下述组分：缓冲液、促凝剂、增敏剂、BSA、表面活性剂、EDTA、无机盐、防腐剂；可选地，试剂1包括下述终浓度的组分：20-100mM的缓冲液、1.0%-10%的促凝剂、0.2%-5%的增敏剂、0.1%-2%的BSA、0.05%-0.3%的表面活性剂、1-10mM的EDTA、50-600mM的无机盐和0.05%-0.1%的防腐剂。

6.根据权利要求5所述的人α1-微球蛋白测定试剂盒，其特征在于：试剂1或试剂2中的缓冲液相互独立地包括：pH值为5.0-9.0的MES缓冲液、磷酸盐缓冲液、MOPS缓冲液、TAPS缓冲液、硼酸盐缓冲液、Tris-Cl缓冲液和HEPES缓冲液中的至少一种；

和/或，所述试剂1或试剂2中的表面活性剂相互独立地包括：Tween-20、Tween-80或Triton X-100中的至少一种；

和/或，所述试剂1或试剂2中的防腐剂相互独立地包括：ProClin300、硫柳汞钠、苯甲酸钠、Krovin300或Krovin500中的至少一种。

7.根据权利要求1所述的人α1-微球蛋白测定试剂盒，其特征在于：所述人α1-MG单克隆抗体为源于小鼠的特异性单抗；所述人α1-MG多克隆抗体为源于兔或羊的特异性多抗；

和/或，所述羧基胶乳微球为聚苯乙烯羧基胶乳微球。

8.根据权利要求1所述的人α1-微球蛋白测定试剂盒，其特征在于：所述人α1-微球蛋白测定试剂盒用于血清、血浆和尿液的检测。

9.一种人α1-微球蛋白测定试剂盒的制备方法，包括下述步骤：使用权利要求1-8任一项所述的人α1-微球蛋白测定试剂盒的配方制备人α1-微球蛋白测定试剂盒。

10.一种人α1-微球蛋白测定试剂盒的制备方法，包括使用权利要求5所述的人α1-微球蛋白测定试剂盒的配方制备人α1-微球蛋白测定试剂盒的步骤，该步骤包括：

制备试剂1：在合适离子强度的缓冲液中加入增敏剂、促凝剂、BSA、表面活性剂、EDTA、无机盐、防腐剂，充分混匀配制；

制备试剂2：分别用羧基胶乳微球标记人α1-MG的单克隆抗体、用羧基胶乳微球标记人α1-MG的多克隆抗体，再加入包含合适离子强度、pH值的缓冲液，无机盐，稳定剂，表面活性剂和防腐剂的保存液；

制备校准品：用配制的基质液将人α1-MG稀释，溯源后赋值得到系列浓度梯度的校准

品；

可选地，试剂2的制备步骤包括：用活化液稀释相应粒径的羧基胶乳微球至其质量浓度为0.5％-3％，加入质量浓度为0.01％-0.1％的活化剂1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐，室温搅拌，活化羧基；活化结束后，离心、洗涤除去多余的活化剂；再加入标记缓冲液，超声将胶乳微球分散，分别加入α1-MG单克隆抗体、α1-MG多克隆抗体单独标记，室温搅拌，再加入终止液继续搅拌；将最终的反应液离心、洗涤，用保存液分别重悬标好的胶乳微球，将标记单抗的较大粒径微球与标记多抗的较小粒径微球按比例混合得试剂2；所述活化液包括：pH值为4.0-6.0的0.01-0.2M的MES缓冲液、磷酸盐缓冲液或HEPES缓冲液中的至少一种；所述标记缓冲液包括pH值为7.0-8.4的0.01-0.2M的磷酸盐缓冲液、MOPS缓冲液、TAPS缓冲液、硼酸盐缓冲液或Tris-Cl缓冲液中的至少一种。

一种高灵敏度、宽检测范围的人α1-微球蛋白测定试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫诊断领域，具体涉及一种高灵敏度、宽检测范围的人α1-微球蛋白测定试剂盒。

背景技术

[0002] 1975年Ekstron等从慢性镉中毒患者尿液中分离出α1-微球蛋白(即α1-MG)。α1-MG是分子量约为33KDa的糖蛋白，主要由肝细胞和淋巴细胞合成，广泛分布于体液及淋巴细胞膜表面。

[0003] 血浆中α1-MG以游离型或结合型(与IgA结合)存在，结合型α1-MG不易被肾小球滤过，游离型α1-MG可自由通过肾小球，但几乎全被近曲小管上皮细胞以胞饮形式重吸收和代谢，仅微量游离型α1-MG可从尿中排泄。血清中α1-MG浓度存在性别、年龄差异，正常情况下，血清中α1-MG的浓度为10-30mg/L，血清α1-MG与胱抑素C的诊断性能相当。晨尿中浓度为<12mg/L，目前更常检测尿液α1-MG浓度作为诊断近端肾小管损伤标志；与β2-微球蛋白相比，α1-微球蛋白不受恶性肿瘤的影响，酸性尿中不会出现假阴性，检测结果更为可靠。

[0004] 当肾小球滤过功能受损、肾小管受损时，α1-MG在血清、血浆及尿液中的含量明显增高；尿液α1-MG降低提示重度肝功能损害，故临床上要求试剂盒有较高的灵敏度和较宽的检测范围。

[0005] 目前，临床上用于α1-MG检测的主要是免疫透射比浊方法的试剂盒，因试剂灵敏度不够，检测样本多为血清，也有血清、尿液同测的；其试剂盒里单独使用α1-MG多抗或配对的单抗。其缺点为试剂还不能很好地兼顾灵敏度和线性范围，且因校准体系的问题，同一试剂不能同时检测血清、血浆和尿液样本。

[0006] 为方便临床检测，有必要研制一种既能检测血清中α1-MG含量，又能检测血浆和尿液样本中α1-MG含量的高灵敏度、宽检测范围的试剂盒。

[0007] 公开于该背景技术部分的信息仅仅旨在增加对本发明的总体背景的理解，而不应当被视为承认或以任何形式暗示该信息构成已为本领域一般技术人员所公知的现有技术。

发明内容

[0008] 发明目的

[0009] 为解决上述问题，本发明的目的在于提供一种高灵敏度、宽检测范围的人α1-微球蛋白测定试剂盒。本发明提供的人α1-微球蛋白测定试剂盒，在10min内即可完成单样本的检测，精密度、准确度和抗干扰等各项指标都表现优异，能很好地反应肾小管重吸收功能和肾小球滤过功能，既能检测血清中α1-MG含量，又能检测血浆和尿液样本中α1-MG含量，非常适用于临床上的生化分析仪，极大地方便了临床检验。

[0010] 解决方案

[0011] 为实现本发明目的，本发明实施例提供了一种人α1-微球蛋白测定试剂盒，包括：试剂1、试剂2和不同梯度浓度的人α1-MG校准品；其中，所述试剂2包括只标记有人α1-MG单

克隆抗体的羧基胶乳微球和只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球，所述只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径＞只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径。

[0012] 上述α1-微球蛋白测定试剂盒在一种可能的实现方式中，只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径大小为150-300nm，终浓度为0.005％-0.1％(w/v)(该终浓度指的是不包括抗体的羧基胶乳微球本身的终浓度)；只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径大小为60-150nm，终浓度为0.1％-0.4％(w/v)(该终浓度指的是不包括抗体的羧基胶乳微球本身的终浓度)；标记的人α1-MG单克隆抗体的终浓度为0.003％-0.015％(w/v)；标记的人α1-MG多克隆抗体的终浓度为0.02％-0.08％(w/v)。所述终浓度指的是各组分在试剂2中的终浓度。

[0013] 上述α1-微球蛋白测定试剂盒在一种可能的实现方式中，只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径大小为223nm，其终浓度为0.015％(w/v)；只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径大小为123nm，其终浓度为0.2％(w/v)；标记的人α1-MG单克隆抗体的终浓度为0.003％(w/v)；标记的人α1-MG多克隆抗体的终浓度为0.045％(w/v)；

[0014] 或只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径大小为186nm，其终浓度为0.02％(w/v)；只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径大小为 88nm，其终浓度为0.2％(w/v)；标记的人α1-MG单克隆抗体的终浓度为0.005％(w/v)；标记的人α1-MG多克隆抗体的终浓度为0.04％(w/v)；

[0015] 或只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径大小为196nm，其终浓度为0.015％(w/v)；只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径大小为70nm，其终浓度为0.25％(w/v)；标记的人α1-MG单克隆抗体的终浓度为0.007％(w/v)；标记的人α1-MG多克隆抗体的终浓度为0.06％(w/v)；

[0016] 或只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径大小为196nm，其终浓度为0.018％(w/v)；只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径大小为83nm，其终浓度为0.22％(w/v)；标记的人α1-MG单克隆抗体的终浓度为0.005％(w/v)；标记的人α1-MG多克隆抗体的终浓度为0.065％(w/v)。

[0017] 上述α1-微球蛋白测定试剂盒在一种可能的实现方式中，只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球和只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球质量比为 0.05-0.4:1。

[0018] 上述α1-微球蛋白测定试剂盒在一种可能的实现方式中，试剂1中包括增敏剂；可选地，所述增敏剂包括：葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚蔗糖400或多聚赖氨酸中的至少一种；进一步可选地，葡聚糖分子量(Mw)包括5000、25000、40000、80000、 250000、500000、2000000中的至少一种；聚乙烯吡咯烷酮的分子量(Mw)包括8000、 10000、24000、58000中的至少一种；多聚赖氨酸分子量(Mw)包括2000或5000中的至少一种。

[0019] 上述α1-微球蛋白测定试剂盒在一种可能的实现方式中，试剂1中包括促凝剂；可选地，所述促凝剂包括PEG(聚乙二醇)6000、PEG8000或PEG20000中的至少一种。

[0020] 上述α1-微球蛋白测定试剂盒在一种可能的实现方式中，试剂2还包括稳定剂；可选地，所述稳定剂包含蛋白质、PEG或糖中的至少一种；进一步可选地，所述蛋白质包括BSA

(牛血清白蛋白)、明胶或酪蛋白中的至少一种;所述糖包括蔗糖、海藻糖或葡萄糖中的至少一种。

[0021] 上述α1-微球蛋白测定试剂盒在一种可能的实现方式中,校准品为不同梯度浓度的人α1-MG;可选地,人α1-MG浓度梯度为:0.00,15.00,30.00,75.00,150.00,300.00mg/L。

[0022] 上述α1-微球蛋白测定试剂盒在一种可能的实现方式中,校准品的基质液包括下述组分:磷酸盐缓冲液,EDTA(乙二胺四乙酸)二钠或EDTA二钾,枸橼酸钠,肝素钠或肝素锂,尿素,尿酸,海藻糖,BSA,氯化钠,氯化钾;可选地,校准品的基质液包括下述终浓度的组分:10-50mM的磷酸盐缓冲液(pH7.2-7.4),2-10mM的EDTA二钠或EDTA 二钾、1%-5%(w/v)的枸橼酸钠、0.02%-0.2%(w/v)的肝素钠或肝素锂、0.5%-3%(w/v) 尿素、0.01%-1%(w/v)尿酸、1%-5%(w/v)海藻糖、0.2%-1%(w/v)甘露醇、0.1%-2% (w/v)BSA、150-300mM氯化钠和50-100mM氯化钾。所述终浓度指的是各组分在校准品基质液中的终浓度。即本发明提供的校准品基质液中含有一定量的肝素钠、肝素锂、 EDTA二钠、EDTA二钾、枸橼酸钠等抗凝剂、尿液主要物质成分(尿素、尿酸等)、稳定剂和无机盐等。适用于测定人血清、血浆和尿液中的α1-MG含量。

[0023] 上述α1-微球蛋白测定试剂盒在一种可能的实现方式中,试剂2包括下述组分:只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球、只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球缓冲液、稳定剂、缓冲液、表面活性剂、无机盐和防腐剂。

[0024] 上述α1-微球蛋白测定试剂盒在一种可能的实现方式中,试剂2包括下述终浓度的组分:0.005-0.1%(w/v)标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球(平均粒径为 150-300nm)、0.003%-0.015%(w/v)的标记的人α1-MG单克隆抗体,0.1%-0.4%(w/v) 标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球(平均粒径为60-150nm)、0.02%-0.08%(w/v) 的标记的人α1-MG多克隆抗体,0.2%-6%(w/v)的稳定剂、20-100mM的缓冲液、 0.05%-0.3%(w/v)的表面活性剂、50-600mM的无机盐和0.05%-0.3%(w/v)的防腐剂。所述终浓度指的是各组分在试剂2中的终浓度。

[0025] 上述α1-微球蛋白测定试剂盒在一种可能的实现方式中,试剂1包括下述组分:缓冲液、促凝剂、增敏剂、BSA、表面活性剂、EDTA、无机盐、防腐剂;可选地,试剂1 包括下述终浓度的组分:20-100mM的缓冲液、1.0%-10%(w/v)的促凝剂、0.2%-5%(w/v) 的增敏剂、0.1%-2%(w/v)的BSA、0.05%-0.3%(w/v)的表面活性剂、1-10mM的EDTA、 50-600mM的无机盐和0.05%-0.1%w/v的防腐剂。所述终浓度指的是各组分在试剂1中的终浓度。

[0026] 上述α1-微球蛋白测定试剂盒在一种可能的实现方式中,所述试剂1或试剂2中的缓冲液相互独立地包括:pH值为5.0-9.0的MES缓冲液、磷酸盐缓冲液、MOPS缓冲液、 TAPS缓冲液、硼酸盐缓冲液、Tris-Cl缓冲液和HEPES缓冲液中的至少一种。

[0027] 上述α1-微球蛋白测定试剂盒在一种可能的实现方式中,所述试剂1或试剂2中的表面活性剂相互独立地包括:Tween-20、Tween-80或Triton X-100中的至少一种。

[0028] 上述α1-微球蛋白测定试剂盒在一种可能的实现方式中,所述试剂1或试剂2中的防腐剂相互独立地包括:ProClin300、硫柳汞钠、苯甲酸钠、Krovin300或Krovin500中的至少一种。防腐剂可防止试剂受到微生物污染。

[0029] 上述α1-微球蛋白测定试剂盒在一种可能的实现方式中,所述人α1-MG单克隆抗体为源于小鼠的特异性单抗;所述人α1-MG多克隆抗体为源于兔或羊的特异性多抗。人α1-MG

单克隆抗体的纯度≥95%，效价≥1:100000；人α1-MG多克隆抗体的纯度≥95%，效价≥1:10000。

[0030] 上述α1-微球蛋白测定试剂盒在一种可能的实现方式中，所述羧基胶乳微球为聚苯乙烯羧基胶乳微球。

[0031] 上述α1-微球蛋白测定试剂盒在一种可能的实现方式中，所述人α1-微球蛋白测定试剂盒用于血清、血浆和尿液的检测。

[0032] 本发明实施例还提供了一种人α1-微球蛋白测定试剂盒的制备方法，包括下述步骤：使用上述配方制备人α1-微球蛋白测定试剂盒。

[0033] 上述制备方法在一种可能的实现方式中，包括下述步骤：

[0034] 制备试剂1：在合适离子强度的缓冲液中加入增敏剂、促凝剂、BSA、表面活性剂、EDTA、无机盐、防腐剂，充分混匀配制；

[0035] 制备试剂2：分别用平均粒径为150-300nm的羧基胶乳微球标记人α1-MG的单克隆抗体、用平均粒径为60-150nm的羧基胶乳微球标记人α1-MG的多克隆抗体，再加入包含合适离子强度、pH值的缓冲液、无机盐、稳定剂、表面活性剂和防腐剂的保存液；其中，标记人α1-MG的单克隆抗体的羧基胶乳微球和标记人α1-MG的多克隆抗体的羧基胶乳微球在试剂2体系中的终浓度分别为0.005%-0.1%(w/v)和0.1%-0.4%(w/v)，标记的人α1-MG单克隆抗体、多克隆抗体在试剂2体系中的终浓度分别为0.003%-0.015% (w/v)和0.02%-0.08%(w/v)；

[0036] 制备校准品：用配制的基质液将人α1-MG稀释，溯源后赋值得到系列浓度梯度的校准品。

[0037] 上述制备方法在一种可能的实现方式中，试剂2的制备步骤包括：用活化液稀释相应粒径的羧基胶乳微球至其质量浓度为0.5%-3%，加入质量浓度为0.01%-0.1%的活化剂 EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)，室温搅拌，活化羧基；活化结束后，离心、洗涤除去多余的EDC；再加入标记缓冲液，超声将胶乳微球分散，分别加入α1-MG 单克隆抗体、α1-MG多克隆抗体单独标记，室温搅拌，再加入终止液继续搅拌；将最终的反应液离心、洗涤，用保存液分别重悬标好的胶乳微球，将标记单抗的较大粒径微球与标记多抗的较小粒径微球按比例混合得试剂2；

[0038] 其中，试剂2中，只标单抗的羧基胶乳微球和只标多抗的羧基胶乳微球质量比为0.05-0.4:1。

[0039] 上述制备方法在一种可能的实现方式中，所述活化液包括：pH值为4.0-6.0的0.01-0.2M的MES缓冲液、磷酸盐缓冲液或HEPES缓缓冲液中的至少一种。

[0040] 上述制备方法在一种可能的实现方式中，所述标记缓冲液包括pH值为7.0-8.4的0.01-0.2M的磷酸盐缓冲液、MOPS缓冲液、TAPS缓冲液、硼酸盐缓冲液或Tris-Cl缓冲液中的至少一种。

[0041] 本发明实施例还提供了上述人α1-微球蛋白测定试剂盒的使用方法，包括下述步骤：主波长为570nm，加入2μL样本、150μL试剂1后，37℃水浴5min，再加入50μL试剂2，30s后读取吸光度A1，再反应4min后读取吸光度A2，计算两者吸光度的差值⊿A＝A2-A1；用上述人α1-微球蛋白测定试剂盒配套的6个校准品先进行多点定标(Spline或Logit- Log(4P)拟合模型)；样本的浓度(单位为mg/L)可通过其检测时的吸光度变化在定标曲线上计算得到。

[0042] 有益效果

[0043] 1、目前市面上绝大多数胶乳试剂是只采用一种粒径的胶乳微球单独标记相应的兔多抗、羊多抗或配对的鼠单抗，不能很好地兼顾试剂的灵敏度和检测高值。而本发明实施例提供的人α1-微球蛋白测定试剂盒同时使用多抗、单抗，二者分开标记，且单抗标记较大粒径微球以保证试剂盒的灵敏度，多抗标记较小粒径微球以保证试剂在高值区有更宽的检测范围。

[0044] 本发明主要是利用抗原与抗体的特异性反应、借助不同粒径的羧基胶乳微球在反应空间(比色杯等)中凝聚成较大复合物(阻挡光线通过)，使反应液浊度增加来测定样本中α1-MG的浓度。将人α1-MG单抗、人α1-MG多抗分别标记到不同粒径的羧基胶乳微球上，当待测样本中的人α1-MG与试剂中的抗体发生特异性反应，产生网格状的较大抗原-抗体复合物后，会使反应液中的浊度增加。在一定浓度范围内，反应液的浊度增加与抗原-抗体复合物的量成正比，即与样本中α1-MG的浓度成正比。在配套的校准体系、合适的拟合模型下做出试剂的校准曲线，通过测定样本的光强变化可换算出待测α1-MG 的浓度。

[0045] 2、以150-300nm平均粒径的微球标记α1-MG单抗，搭配60-150nm平均粒径的微球标记α1-MG多抗，可进一步提高本发明试剂盒的灵敏度和线性范围。粒径过小的微球不能很好地放大免疫反应的信号；而粒径过大，微球则会因重力作用在长期储存后发生沉降，影响测定结果。

[0046] 3、微球分别标记α1-MG单抗、α1-MG多抗，通过调整二者的浓度和比例，可使单抗、多抗的标记效率各自实现最佳状态，以实现在宽检测范围内有较好的免疫学反应放大信号，从而能很好地兼顾试剂的灵敏度和检测范围。与待测样本反应时，偶联的抗体可与样本中的人α1-MG特异性结合，借助α1-MG自身多样的抗原决定簇和试剂2中特异性抗体的丰富性，可在反应体系中产生占据较大空间的、多重抗原-抗体复合物，合适的反应位点散布更有利于免疫复合物在反应液中产生浊度变化，有效地提高了试剂的灵敏度(功能灵敏度可以达到0.20mg/L)，并可在α1-MG为0.00-300.00mg/L的宽浓度范围内保持很好的线性，扩大了试剂盒的检测范围。

[0047] 4、试剂1中缓冲液、促凝剂、增敏剂等可为免疫反应提供合适的反应条件、在一定程度上控制反应速度、提高试剂的灵敏度，尤其是试剂1中的促凝剂和增敏剂利用其自身的不同大分子量优势可在局部空间内更好地提高抗原抗体的结合效率和结合稳定性，有利于提高试剂的灵敏度；校准品基质液中加入的抗凝剂(肝素钠、肝素锂、EDTA 二钠、EDTA二钾、枸橼酸钠等)有利于血浆样本的检测，加入尿液主要物质成分可更好地测定尿液样本，在一定程度上扩大了该试剂适宜检测的样本类型。

[0048] 5、本发明实施例中提供的高灵敏度、宽检测范围的人α1-微球蛋白测定试剂盒，所用的聚苯乙烯胶乳微球为羧基修饰，其活化后可与抗体氨基形成共价的肽键，抗体可牢固地结合于胶乳微球表面；试剂2中合适的缓冲体系及稳定剂等则更进一步保证了人α1- 微球蛋白测定试剂盒的稳定性。

[0049] 6、本发明实施例中提供的高灵敏度、宽检测范围的人α1-微球蛋白测定试剂盒，在10min内即可完成单样本的检测，具有灵敏度高(可达0.20mg/L)、检测范围宽(在α1-MG 为0.00-300.00mg/L的梯度浓度范围内保持良好的线性，线性相关系数R≥0.9900)、精密度好、准确度好和抗干扰能力强等特点，可在一套校准体系下同时用于测定血清、血浆和尿液

中α1-MG的浓度，应用于临床能很好地反应肾小管重吸收功能和肾小球滤过功能。本发明实施例中提供的高灵敏度、宽检测范围的人α1-微球蛋白测定试剂盒，反应后不产生沉淀、不发生附着，适用于临床生化分析仪，便于生化分析仪清洗。

附图说明

[0050] 一个或多个实施例通过与之对应的附图中的图片进行示例性说明，这些示例性说明并不构成对实施例的限定。在这里专用的词“示例性”意为“用作例子、实施例或说明性”。这里作为“示例性”所说明的任何实施例不必解释为优于或好于其它实施例。

[0051] 图1A是本发明实施例1的人α1-微球蛋白测定试剂盒的定标曲线及其线性分析结果。

[0052] 图1B是本发明实施例2的人α1-微球蛋白测定试剂盒的定标曲线及其线性分析结果。

[0053] 图1C是本发明实施例3的人α1-微球蛋白测定试剂盒的定标曲线及其线性分析结果。

[0054] 图1D是本发明实施例4的人α1-微球蛋白测定试剂盒的定标曲线及其线性分析结果。

[0055] 图2是本发明实施例3的人α1-微球蛋白测定试剂盒与对照试剂检测临床血清样本的相关性。

[0056] 图3是本发明实施例3的人α1-微球蛋白测定试剂盒与对照试剂检测临床尿液样本的相关性。

[0057] 图4是本发明实施例3的人α1-微球蛋白测定试剂盒同时检测40例临床血清及其对应的肝素抗凝的血浆样本的相关性。

[0058] 图5是本发明实施例3的人α1-微球蛋白测定试剂盒同时检测40例临床血清及其对应的EDTA抗凝的血浆样本的相关性。

具体实施方式

[0059] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将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。除非另有其它明确表示，否则在整个说明书和权利要求书中，术语“包括”或其变换如“包含”或“包括有”等等将被理解为包括所陈述的元件或组成部分，而并未排除其它元件或其它组成部分。

[0060] 另外，为了更好的说明本发明，在下文的具体实施方式中给出了众多的具体细节。本领域技术人员应当理解，没有某些具体细节，本发明同样可以实施。在一些实施例中，对于本领域技术人员熟知的原料、元件、方法、手段等未作详细描述，以便于凸显本发明的主旨。

[0061] 实施例1-4中使用的人α1-MG单克隆抗体购自北京阿匹斯生物技术有限公司(其纯度≥95％，效价≥1:100000)，多克隆抗体购自桂林英美特生物技术有限公司(其纯度≥95％，效价≥1:10000)，聚苯乙烯羧基胶乳微球购自日本JSR。

[0062] 实施例1

[0063] 一种人α1-微球蛋白测定试剂盒，包括试剂1、试剂2和不同梯度浓度的人α1-MG校准品；其中，

[0064] 试剂1包括下述终浓度的组分：50mM PBS缓冲液(pH7.4)，1.5％(w/v)的BSA，3％(w/v)的PEG6000，1.5％(w/v)的Mw为40000的葡聚糖，150mM的NaCl，0.05％ (w/v)的Tween-20，0.1％(w/v)的Krovin300，2mM的EDTA；

[0065] 试剂2包括下述终浓度的组分：只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球(平均粒径为223nm，微球终浓度为0.015％(w/v))、0.003％(w/v)的标记的人α1-MG单克隆抗体、只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球(平均粒径为123nm，微球终浓度为0.2％(w/v))、0.045％(w/v)的标记的人α1-MG多克隆抗体、50mM PBS缓冲液 (pH7.2)、100mM氯化铵、1％(w/v)BSA、5％(w/v)蔗糖、0.05％(w/v)Tween-20、 0.1％(w/v)的ProClin300。

[0066] 校准品：含0.00、15.00、30.00、75.00、150.00、300.00mg/L六个浓度梯度的人α1-MG，校准品基质液包括下述终浓度的组分：20mM的磷酸盐缓冲液(pH7.2)、5mM的EDTA 二钠、2％(w/v)的枸橼酸钠、0.05％(w/v)的肝素钠、1.5％(w/v)的尿素、0.03％(w/v) 的尿酸、2％(w/v)的海藻糖、0.2％(w/v)的甘露醇、0.5％(w/v)BSA、150mM的氯化钠、100mM的氯化钾。

[0067] 上述人α1-微球蛋白测定试剂盒的制备方法，包括下述步骤：

[0068] 制备试剂1：向50mM PBS缓冲液(pH7.4)中加入终浓度为1.5％(w/v)的BSA、终浓度为3％(w/v)的PEG6000、终浓度为1％(w/v)的葡聚糖80000、终浓度为150mM 的NaCl、终浓度为1.5％(w/v)的葡聚糖(Mw40000)、终浓度为0.05％(w/v)的Tween-20、终浓度为0.1％(w/v)的Krovin300、终浓度为2mM的EDTA，用0.22μm滤膜过滤后得试剂1。

[0069] 制备试剂2：用50mM MES缓冲液(pH5.0)稀释相应粒径的羧基胶乳微球(223nm、-COOH量0.06-0.10mmol/g；123nm、-COOH量0.15-0.22mmol/g)至其质量浓度为1％，分别加入质量浓度为0.02％和0.04％的活化剂EDC，在室温搅拌20min，活化羧基；活化结束后，15000g离心、洗涤除去多余的EDC；再加入标记缓冲液(50mM Hepes，pH7.6)，超声将胶乳微球分散，分别加入α1-MG单克隆抗体(标223nm微球)、α1-MG多克隆抗体(标123nm微球)单独标记，室温搅拌1h，再加入终止液继续搅拌10min；将最终的反应液以15000g离心，用50mM PBS缓冲液洗涤1次，用相应体积的保存液分别重悬标好胶乳(223nm微球终浓度为0.015％(w/v)、123nm微球终浓度为0.2％(w/v)，标记的人α1-MG单克隆抗体终浓度为0.003％(w/v)，标记的人α1-MG多克隆抗体的终浓度为 0.045％(w/v))，搅拌混匀，保存液的组分为：50mM PBS缓冲液(pH7.2)、100mM氯化铵、1％(w/v)BSA、5％(w/v)蔗糖、0.05％(w/v)Tween-20、0.1％(w/v)的ProClin300，得试剂2。

[0070] 制备校准品：用上述成分的校准品基质液将人血清中提取的α1-MG或体外表达的α1-MG做稀释，进行溯源后赋值得到系列浓度的校准品(α1-MG的系列浓度为0.00，15.00，30.00，75.00，150.00，300.00mg/L)。

[0071] 实施例2

[0072] 一种人α1-微球蛋白测定试剂盒，包括试剂1、试剂2和不同梯度浓度的人α1-MG校准品；其中，

[0073] 试剂1包括下述终浓度的组分：20mM MOPS缓冲液(pH7.4)，0.5％(w/v)的BSA，2％

(w/v)的PEG8000,150mM的NH_4Cl,3%(w/v)的Mw为5000的多聚赖氨酸,0.05% (w/v)的Tween-20,0.1%(w/v)的Krovin500,5mM的EDTA;

[0074] 试剂2包括下述终浓度的组分:只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球(平均粒径为186nm,微球终浓度为0.02%(w/v))、0.005%(w/v)的标记的人α1-MG单克隆抗体、只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球(平均粒径为88nm,微球终浓度为0.2%(w/v))、0.04%(w/v)的标记的人α1-MG多克隆抗体、50mM HEPES缓冲液 (pH 7.4)、150mM氯化钾、0.1%(w/v)明胶、4%(w/v)蔗糖、0.5%(w/v)海藻糖、 0.05%(w/v)Tween-20、0.1%(w/v)的ProClin300。

[0075] 校准品:含0.00、15.00、30.00、75.00、150.00、300.00mg/L六个浓度梯度的人α1-MG,校准品基质液包括下述终浓度的组分:10mM的磷酸盐缓冲液(pH7.4)、3mM的EDTA 二钾、1%(w/v)的枸橼酸钠、0.1%(w/v)的肝素锂、1%(w/v)的尿素、0.05%(w/v) 的尿酸、1.5%(w/v)海藻糖、0.4%(w/v)甘露醇、1%(w/v)BSA、300mM氯化钠、 50mM氯化钾。

[0076] 上述人α1-微球蛋白测定试剂盒的制备方法,包括下述步骤:

[0077] 制备试剂1:向20mM MOPS缓冲液(pH7.4)中加入终浓度为0.5%(w/v)的BSA、终浓度为2%(w/v)的PEG8000、终浓度为150mM的NH_4Cl、终浓度为3%(w/v)的多聚赖氨酸(Mw5000)、终浓度为0.05%(w/v)的Tween-20、终浓度为0.1%(w/v)的 Krovin500、终浓度为5mM的EDTA,用0.22μm滤膜过滤后得试剂1。

[0078] 制备试剂2:用50mM HEPES缓冲液(pH6.0)稀释相应粒径的羧基胶乳微球(186nm、-COOH量0.07-0.11mmol/g;88nm、-COOH量0.14-0.21mmol/g)至其质量浓度为1%,分别加入质量浓度为0.03%和0.05%的活化剂EDC,在室温搅拌20min,活化羧基;活化结束后,15000g离心、洗涤除去多余的EDC;再加入标记缓冲液(50mM MOPS,pH7.4),超声将胶乳微球分散,分别加入α1-MG单克隆抗体(标186nm微球)、α1-MG多克隆抗体(标88nm微球)单独标记,室温搅拌1h,再加入终止液继续搅拌10min;将最终的反应液以15000g离心,用50mM PBS缓冲液(pH7.4)洗涤1次,用相应体积的保存液分别重悬标好胶乳(186nm微球终浓度为0.02%(w/v)、88nm微球终浓度为0.2%(w/v),标记的人α1-MG单克隆抗体终浓度为0.005%(w/v),标记的人α1-MG多克隆抗体的终浓度为0.04%(w/v)),搅拌混匀,保存液的组分为:50mM HEPES缓冲液(pH 7.4)、150mM 氯化钾、0.1%(w/v)明胶、4%(w/v)蔗糖、0.5%(w/v)海藻糖、0.05%(w/v)Tween-20、 0.1%(w/v)的ProClin300,得试剂2。

[0079] 制备校准品:用上述成分的校准品基质液将人血清中提取的α1-MG或体外表达的α1-MG做稀释,进行溯源后赋值得到系列浓度的校准品(α1-MG的系列浓度为0.00,15.00,30.00,75.00,150.00,300.00mg/L)。

[0080] 实施例3

[0081] 一种人α1-微球蛋白测定试剂盒,包括试剂1、试剂2和不同梯度浓度的人α1-MG校准品;其中,

[0082] 试剂1包括下述终浓度的组分:100mM Tris-Cl缓冲液(pH8.0),0.25%(w/v)的BSA,1%(w/v)的PEG20000,0.5%(w/v)的Mw为500000葡聚糖,50mM的KCl,0.05% (w/v)的Tween-80,0.1%(w/v)的ProClin300,5mM的EDTA;

[0083] 试剂2包括下述终浓度的组分:只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球(平均粒径为196nm,微球终浓度为0.015%(w/v))、0.007%(w/v)的标记的人α1-MG单克隆抗

体、只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球(平均粒径为70nm,微球终浓度为0.25%(w/v))、0.06%(w/v)的标记的人α1-MG多克隆抗体、50mM MOPS(pH 7.2)、50mM氯化镁、0.2%(w/v)明胶、0.2%(w/v)BSA、3%(w/v)蔗糖、1%(w/v) 葡萄糖、0.05%(w/v)Tween-20、0.1%(w/v)的ProClin300。

[0084] 校准品:含0.00、15.00、30.00、75.00、150.00、300.00mg/L六个浓度梯度的人α1-MG,校准品基质液包括下述终浓度的组分:30mM的磷酸盐缓冲液(pH7.3)、5mM的EDTA 二钾、3%(w/v)的枸橼酸钠、0.1%(w/v)的肝素锂、2%(w/v)的尿素、0.04%(w/v) 的尿酸、1%(w/v)海藻糖、0.5%(w/v)甘露醇、1.5%(w/v)BSA、300mM氯化钠、100mM氯化钾。

[0085] 上述人α1-微球蛋白测定试剂盒的制备方法,包括下述步骤:

[0086] 制备试剂1:向100mM Tris-Cl缓冲液(pH8.0)中加入终浓度为0.25%(w/v)的BSA、终浓度为1%(w/v)的PEG20000、终浓度为0.5%(w/v)的葡聚糖(Mw500000)、终浓度为50mM的KCl、终浓度为0.05%(w/v)的Tween-80、终浓度为0.1%(w/v)的 ProClin300、终浓度为5mM的EDTA,用0.22μm滤膜过滤后得试剂1。

[0087] 制备试剂2:用30mM MES缓冲液(pH5.0)稀释相应粒径的羧基胶乳微球(196nm、-COOH量0.06-0.09mmol/g;70nm、-COOH量0.15-0.22mmol/g)至其质量浓度为1%,分别加入质量浓度为0.02%和0.06%的活化剂EDC,在室温搅拌20min,活化羧基;活化结束后,15000g离心、洗涤除去多余的EDC;再加入标记缓冲液(50mM PBS,pH7.4),超声将胶乳微球分散,分别加入α1-MG单克隆抗体(标196nm微球)、α1-MG多克隆抗体(标70nm微球)单独标记,室温搅拌1h,再加入终止液继续搅拌10min;将最终的反应液以15000g离心,用50mM PBS缓冲液(pH7.4)洗涤1次,用相应体积的保存液分别重悬标好胶乳(196nm微球终浓度为0.015%(w/v)、70nm微球终浓度为0.25%(w/v),标记的人α1-MG单克隆抗体终浓度为0.007%(w/v),标记的人α1-MG多克隆抗体的终浓度为0.06%(w/v)),搅拌混匀,保存液的组分为:50mM MOPS(pH 7.2)、50mM氯化镁、0.2%(w/v)明胶、0.2%(w/v)BSA、3%(w/v)蔗糖、1%(w/v)葡萄糖、0.05%(w/v)Tween-20、0.1%(w/v)的ProClin300,得试剂2。

[0088] 制备校准品:用上述成分的校准品基质液将人血清中提取的α1-MG或体外表达的α1-MG做稀释,进行溯源后赋值得到系列浓度的校准品(α1-MG的系列浓度为0.00,15.00,30.00,75.00,150.00,300.00mg/L)。

[0089] 实施例4

[0090] 一种人α1-微球蛋白测定试剂盒,包括试剂1、试剂2和不同梯度浓度的人α1-MG校准品;其中,

[0091] 试剂1包括下述终浓度的组分:20mM Hepes缓冲液(pH7.2),1%(w/v)的BSA, 3%(w/v)的PEG8000,1%(w/v)的Mw为24000的PVP,0.05%(w/v)的Trinton X-100, 0.1%(w/v)的ProClin300,100mM $MgCl_2$,3mM的EDTA;

[0092] 试剂2包括下述终浓度的组分:只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球(平均粒径为196nm,微球终浓度为0.018%(w/v))、0.005%(w/v)的标记的人α1-MG单克隆抗体、只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球(平均粒径为83nm,微球终浓度为0.22%(w/v))、0.065%(w/v)的标记的人α1-MG多克隆抗体、50mM TAPS缓冲液(pH8.0)、100mM氯化胺、0.2%(w/v)明胶、4%(w/v)蔗糖、0.5%(w/v)葡萄糖、 1%(w/v)海藻糖、0.05%(w/v)Tween-20、0.1%(w/v)的ProClin300。

[0093] 校准品:含0.00、15.00、30.00、75.00、150.00、300.00mg/L六个浓度梯度的人α1-MG,校准品基质液包括下述终浓度的组分:50mM的磷酸盐缓冲液(pH7.2)、10mM的EDTA 二钠、5%(w/v)的枸橼酸钠、0.02%(w/v)的肝素锂、1.8%(w/v)的尿素、0.03%(w/v) 的尿酸、3%(w/v)海藻糖、1%(w/v)甘露醇、0.2%(w/v)BSA、150mM氯化钠、 100mM氯化钾。

[0094] 上述人α1-微球蛋白测定试剂盒的制备方法,包括下述步骤:

[0095] 制备试剂1:向20mM Hepes缓冲液(pH7.2)中加入终浓度为1%(w/v)的BSA、终浓度为3%(w/v)的PEG8000、终浓度为1%(w/v)的PVP(Mw24000)、终浓度为 100mM $MgCl_2$、终浓度为0.05%(w/v)的Trinton X-100、终浓度为0.1%(w/v)的ProClin300、终浓度为3mM的EDTA,用0.22μm滤膜过滤后得试剂1。

[0096] 制备试剂2:用100mM HEPES缓冲液(pH6.0)稀释相应粒径的羧基胶乳微球(196nm、-COOH量0.06-0.09mmol/g;83nm、-COOH量0.25-0.38mmol/g)至其质量浓度为1%,分别加入质量浓度为0.02%和0.05%的活化剂EDC,在室温搅拌20min,活化羧基。活化结束后,15000g离心、洗涤除去多余的EDC;再加入标记缓冲液(50mM硼酸盐缓冲液,pH7.6),超声将胶乳微球分散,分别加入α1-MG单克隆抗体(标196nm微球)、α1-MG 多克隆抗体(标83nm微球)单独标记,室温搅拌1h,再加入终止液继续搅拌10min;将最终的反应液以15000g离心,用50mM PBS缓冲液(pH7.4)洗涤1次,用相应体积的保存液分别重悬标好胶乳(196nm微球终浓度为0.018%(w/v)、83nm微球终浓度为 0.22%(w/v),标记的人α1-MG单克隆抗体终浓度为0.005%(w/v),标记的人α1-MG多克隆抗体的终浓度为0.065%(w/v)),搅拌混匀,保存液的组分为:50mM TAPS缓冲液 (pH8.0)、100mM氯化胺、0.2%(w/v)明胶、4%(w/v)蔗糖、0.5%(w/v)葡萄糖、 1%(w/v)海藻糖、0.05%(w/v)Tween-20、0.1%(w/v)的ProClin300,得试剂2。

[0097] 制备校准品:用上述成分的校准品基质液将人血清中提取的α1-MG或体外表达的α1-MG做稀释,进行溯源后赋值得到系列浓度的校准品(α1-MG的系列浓度为0.00,15.00,30.00,75.00,150.00,300.00mg/L)。

[0098] 效果例1

[0099] 对实施例1-4制备得到的人α1-微球蛋白测定试剂盒,用日立7180全自动生化仪进行测试,参数和步骤如下:测试主波长570nm,先加入样本2μL,再加入150μL试剂1, 37℃孵育约5min后,加入50μL试剂2,约30s后读取吸光度A1,再反应约4min后读取吸光度A2,计算两者吸光度的差值⊿A=A2-A1;

[0100] 对实施例1-4的人α1-微球蛋白测定试剂盒使用配套的6个校准品进行多点定标,得到定标曲线并进行线性分析,结果分别如图1A-图1D所示(图1A、1B、1C、1D)。其中,横坐标为定标液浓度,纵坐标为各浓度定标液对应的吸光度差值。样本的浓度(单位为mg/L)可通过其检测时的吸光度变化在定标曲线上计算得到。

[0101] 对上述4个实施例的人α1-微球蛋白测定试剂盒进行性能评测试验(使用方法同上述测试方法,日立7180型全自动生化仪):

[0102] (1)空白检测限:试剂盒测定零值人α1-微球蛋白标品在波长570nm处的吸光度值3次,取其均值,结果见表1;

[0103] (2)功能灵敏度:试剂盒重复测试人α1-MG含量为0.20mg/L的尿液样本20次,分别计算测定浓度的平均值和标准差,再计算变异系数(CV),结果见表1;用人α1-MG 含量为

0.20mg/L的血清、血浆样本或人α1-微球蛋白纯品进行灵敏度测试，测得的变异系数CV值在可接受的范围内；

[0104] (3)准确度：按1:9的体积比将高值人α1-微球蛋白纯品(200mg/L)加入到低值人α1-微球蛋白纯品(10mg/L)中，用试剂盒进行测试，对高值人α1-微球蛋白纯品、低值人α1-微球蛋白纯品和混合后样本各重复检测3次，取其浓度均值，计算回收率，结果见表1；

[0105] (4)精密度：试剂盒重复测试人α1-MG含量为(60.00±10.00)mg/L的血清样本10次，分别计算测定浓度的平均值和标准差，再计算变异系数(CV)，结果见表1；用人α1-MG含量为(60.00±10.00)mg/L的尿液、血浆样本或人α1-微球蛋白纯品进行精密度测试，测得的变异系数CV值在可接受的范围内；

[0106] (5)线性：用校准品基质液将线性高值人α1-MG纯品(400.00±40.00)mg/L在[0.20-300.00]mg/L范围内稀释出6个浓度样本(这6个浓度分别为0.20mg/L、4.00mg/L、20.00mg/L、60mg/L、150.00mg/L、300.00mg/L)，每个样本重复测定3次，取其均值。以稀释样本的理论浓度值为x轴，实测浓度值为y轴，建立直线方程，计算其线性相关系数R，结果见表1；

[0107] (6)抗干扰：试剂盒检测500mg/dL的血红蛋白、30mg/L的胆红素、3000mg/dL的甘油三酯和500IU/mL的抗类风湿因子(RF)样本各3次，取其测定浓度的均值，结果见表1。

[0108] 从表1结果可知，本发明参数范围内制备的试剂盒均具备较好的空白检测限、功能灵敏度、准确度、精密度和线性。

[0109] 表1

[0110]

实施例 / 性能	1	2	3	4
空白吸光度（0，Abs）	-45	-33	-31	-19
功能灵敏度（0.20mg/L，CV）	15.46%	12.68%	18.02%	10.58%
准确度（回收率）	98.19%	97.32%	102.41%	98.82%
精密度（CV）	2.14%	1.98%	2.25%	2.03%
线性（0.20-300.00mg/L，R）	0.9989	0.9981	0.9974	0.9985
抗干扰 1：500mg/dL 血红蛋白	0.02	0.01	0.02	0.02
抗干扰 2：30mg/dL 胆红素	0.04	0.02	0.03	0.05
抗干扰 3：3000mg/dL 甘油三酯	0.06	0.04	0.03	0.05
抗干扰 4：500IU/mL 抗 RF	0.03	0.02	0.04	0.06

[0111] 效果例2

[0112] 检测临床样本的性能评价

[0113] 实施例3的试剂(试剂盒的使用方法同上述测试方法)与对照试剂(日本电化生研株式会社的α1-微球蛋白试剂盒，使用方法参照其说明书)同时检测40例临床血清样本，评价二者的相关性，结果如图2所示(其中大于200mg/L的测值，对照试剂是先将样本稀释10倍后检测，测得数值乘以10)。横、纵坐标分别为对照试剂、实施例3的试剂的检测结果，单位均为mg/L。

[0114] 实施例3的试剂与对照试剂同时检测40例临床尿液样本，评价二者的相关性，结果

如图3所示(其中大于200mg/L的测值,对照试剂是先将样本稀释10倍后检测,测得数值乘以10)。其中,横、纵坐标分别为对照试剂、实施例3的试剂的检测结果,单位均为mg/L。

[0115] 实施例3的试剂同时检测40例临床血清及其对应的肝素抗凝血浆样本,评价二者的相关性,结果如图4所示。其中,横、纵坐标分别为血清、肝素抗凝血浆样本的检测结果,单位均为mg/L。

[0116] 实施例3的试剂同时检测40例临床血清及其对应的EDTA抗凝血浆样本,评价二者的相关性,结果如图5所示。其中,横、纵坐标分别为血清、EDTA抗凝的血浆样本的检测结果,单位均为mg/L。

[0117] 实施例3的试剂同时检测40例临床血清及其对应的枸橼酸钠抗凝血浆样本,评价二者的相关性。

[0118] 临床样本相关性的结果表明,本发明提供的人α1-微球蛋白测定试剂盒能很好地满足临床血清、尿液样本的检测;通过与血清样本的比对,还能很好地检测肝素抗凝、EDTA抗凝和枸橼酸钠抗凝的血浆样本;且本发明提供的人α1-微球蛋白测定试剂盒有更高的灵敏度和更宽的检测范围,能更好地满足临床需求。

[0119] 最后应说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

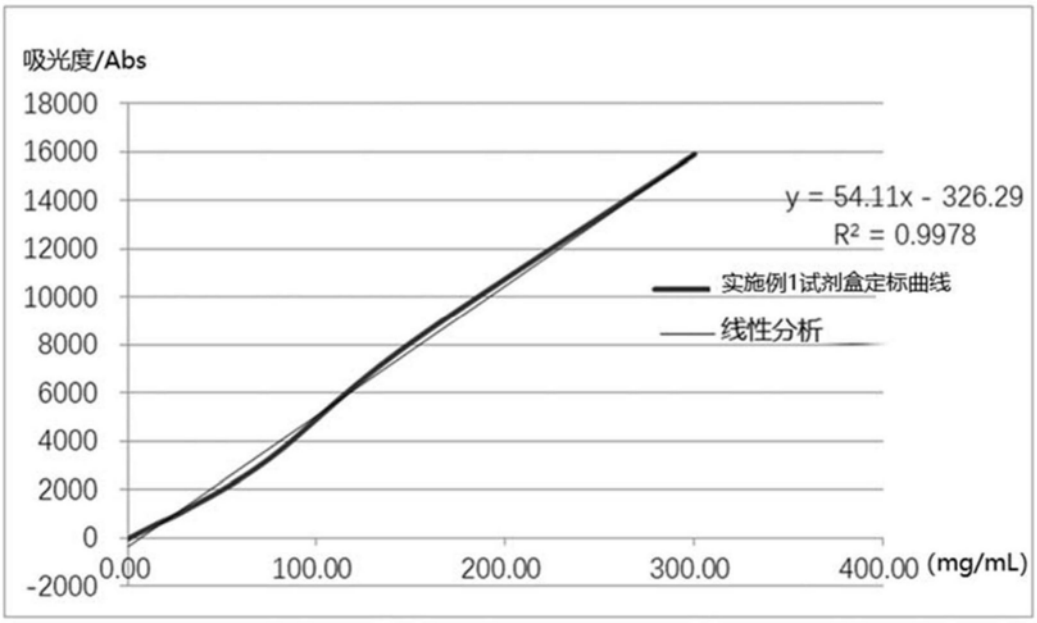

吸光度/Abs
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
0.00
100.00
200.00
300.00
400.00
(mg/mL)
y = 54.11x - 326.29
R² = 0.9978
实施例1试剂盒定标曲线
线性分析

图1A

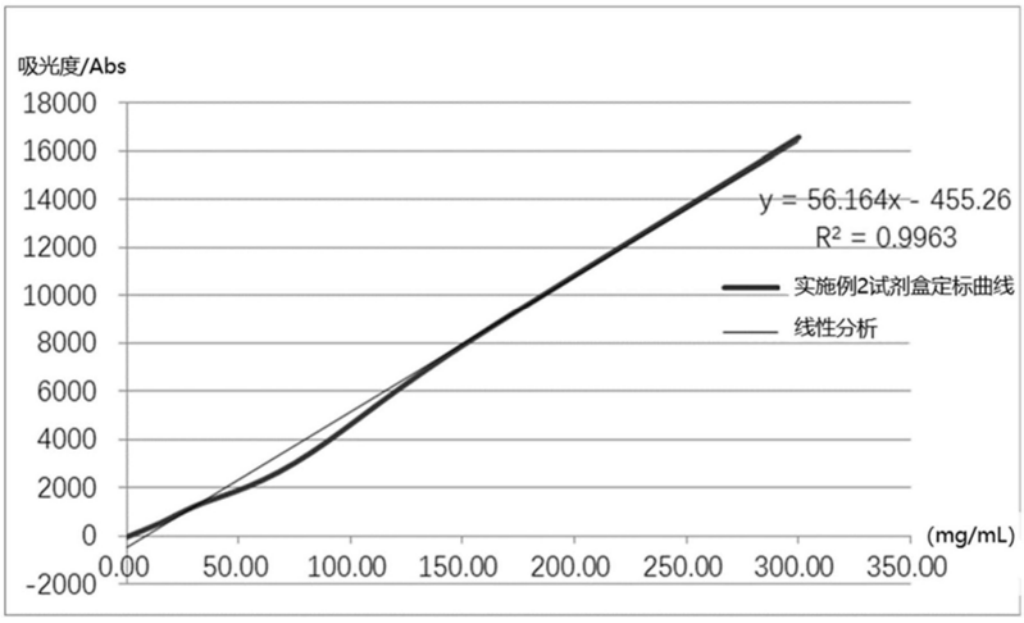

吸光度/Abs
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
0.00
50.00
100.00
150.00
200.00
250.00
300.00
350.00
(mg/mL)
y = 56.164x - 455.26
R² = 0.9963
实施例2试剂盒定标曲线
线性分析

图1B

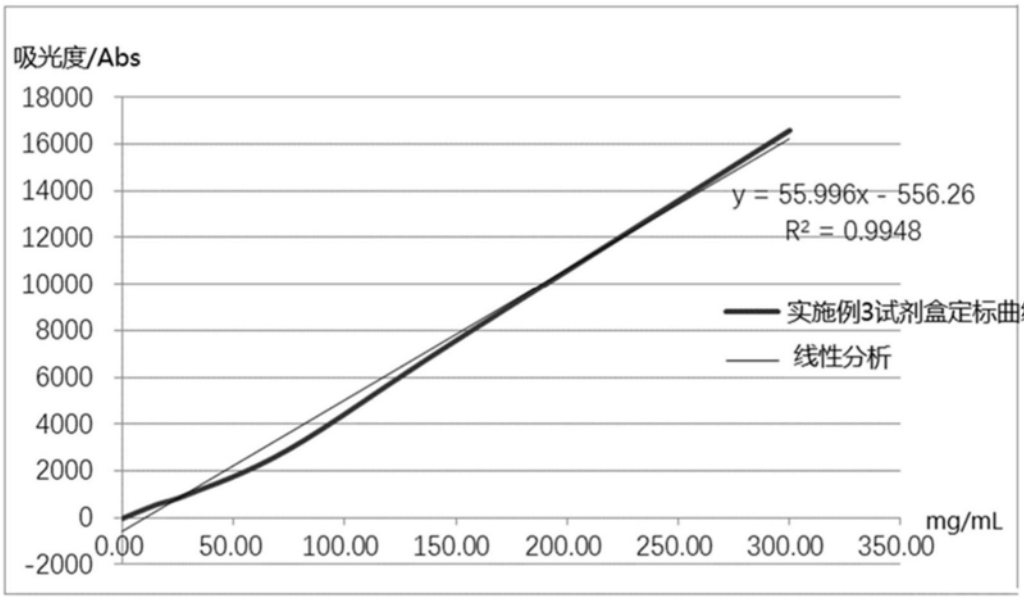

吸光度/Abs
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
0.00
50.00
100.00
150.00
200.00
250.00
300.00
350.00
mg/mL
y = 55.996x - 556.26
R² = 0.9948
实施例3试剂盒定标曲线
线性分析

图1C

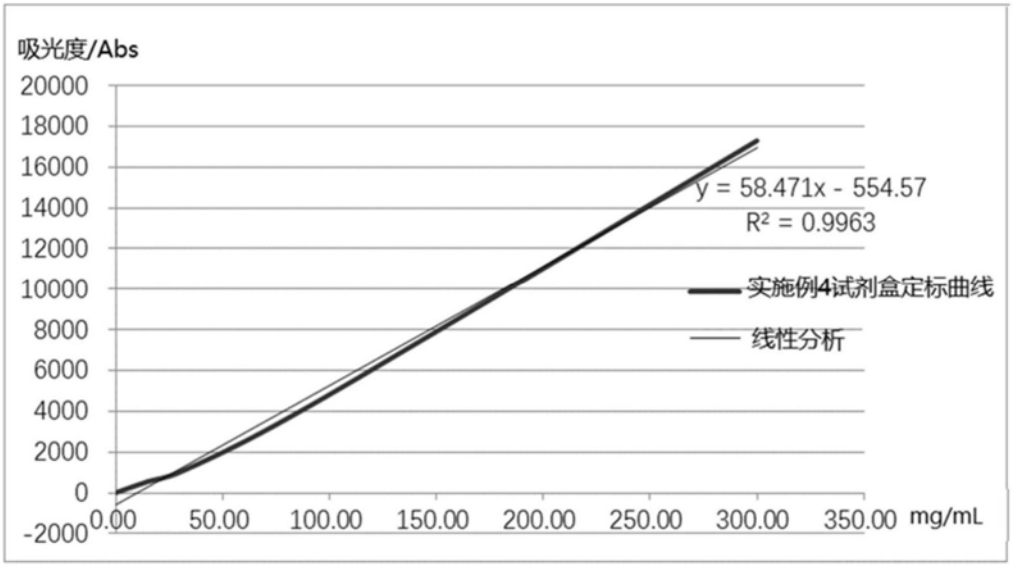

吸光度/Abs
20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
0.00
50.00
100.00
150.00
200.00
250.00
300.00
350.00
mg/mL
y = 58.471x - 554.57
R² = 0.9963
实施例4试剂盒定标曲线
线性分析

图1D

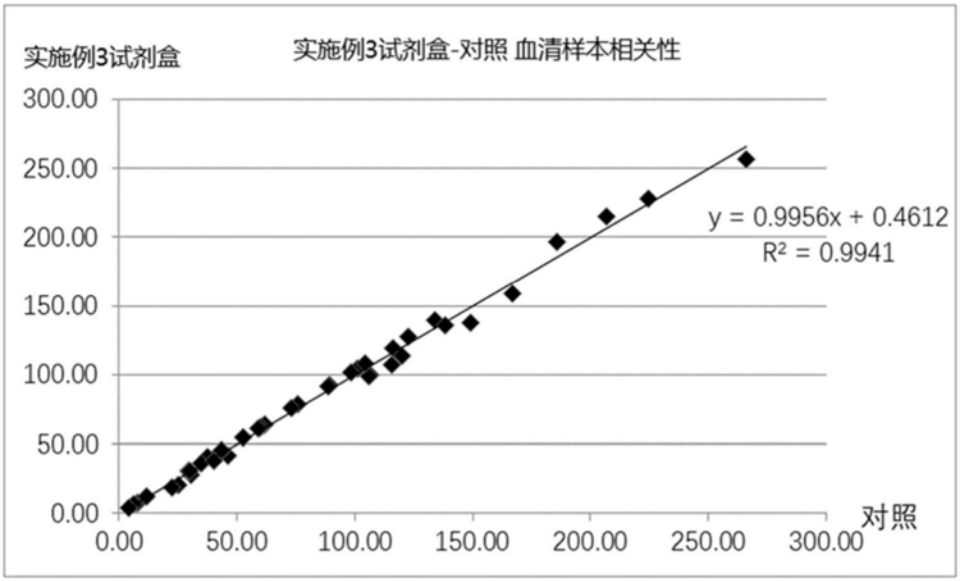

实施例3试剂盒
实施例3试剂盒-对照 血清样本相关性
300.00
250.00
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
y = 0.9956x + 0.4612
R² = 0.9941
0.00
50.00
100.00
150.00
200.00
250.00
300.00
对照

图2

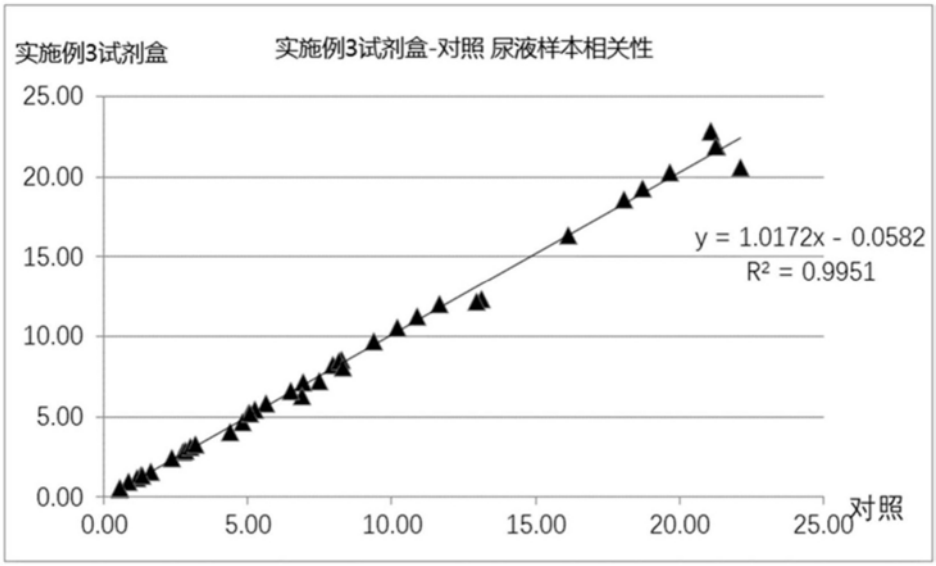

实施例3试剂盒
实施例3试剂盒-对照 尿液样本相关性
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
y = 1.0172x - 0.0582
R² = 0.9951
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
对照

图3

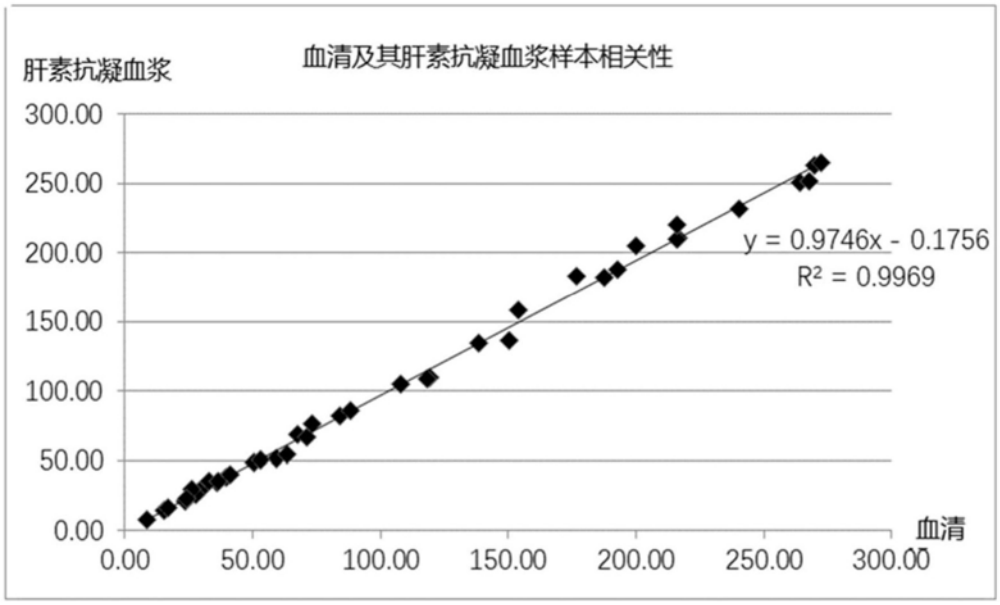

血清及其肝素抗凝血浆样本相关性
肝素抗凝血浆
300.00
250.00
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
0.00
50.00
100.00
150.00
200.00
250.00
300.00
血清
y = 0.9746x - 0.1756
R² = 0.9969

图4

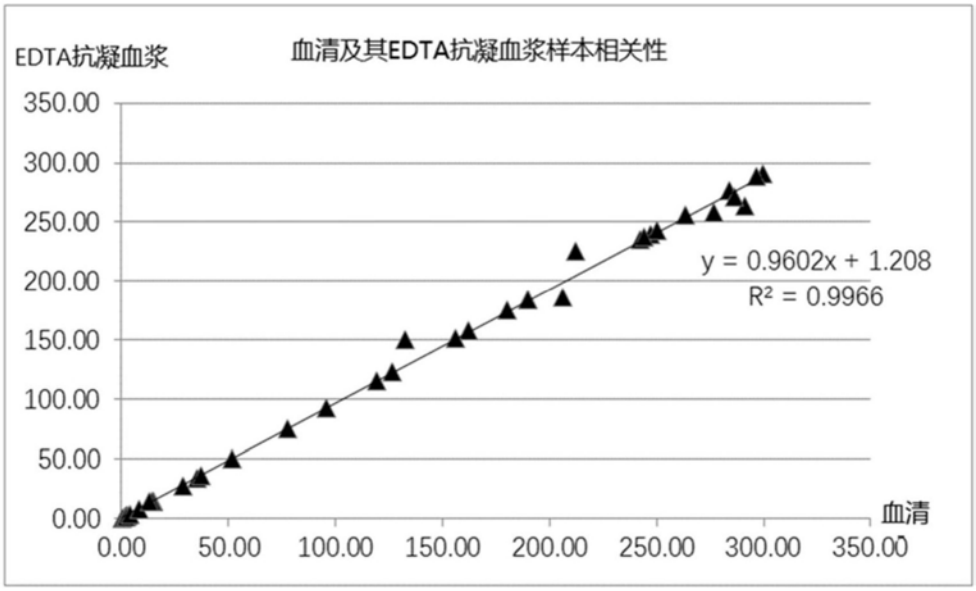
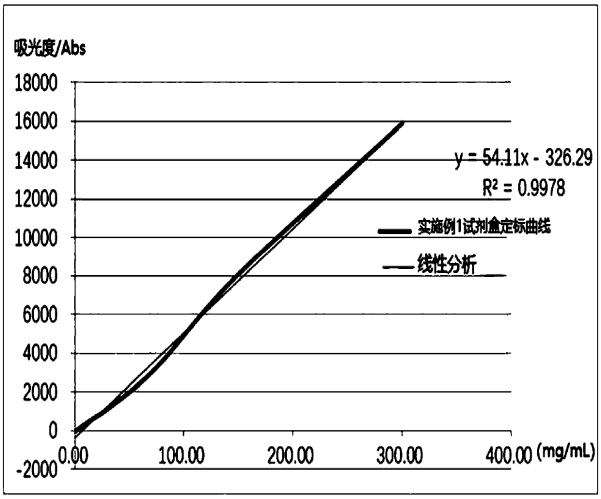

血清及其EDTA抗凝血浆样本相关性
EDTA抗凝血浆
350.00
300.00
250.00
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
0.00
50.00
100.00
150.00
200.00
250.00
300.00
350.00
血清
y = 0.9602x + 1.208
R² = 0.9966

图5

专利名称(译)	一种高灵敏度、宽检测范围的人α1-微球蛋白测定试剂盒		
公开(公告)号	CN109633166A	公开(公告)日	2019-04-16
申请号	CN201811565608.3	申请日	2018-12-20
[标]发明人	不公告发明人		
发明人	不公告发明人		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/5432 G01N33/532 G01N33/68		
代理人(译)	田昕		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明实施例涉及免疫诊断领域，具体涉及一种高灵敏度、宽检测范围的人α1-微球蛋白测定试剂盒。本发明实施例提供的人α1-微球蛋白测定试剂盒，包括：试剂1、试剂2和不同梯度浓度的人α1-MG校准品；其中，所述试剂2包括只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球和只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球，所述只标记有人α1-MG单克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径＞只标记有人α1-MG多克隆抗体的羧基胶乳微球的平均粒径。本发明提供的人α1-微球蛋白测定试剂盒，在10min内即可完成单样本的检测，精密度、准确度和抗干扰等各项指标都表现优异，能很好地反应肾小管重吸收功能和肾小球滤过功能，非常适用于临床上的生化分析仪，极大地方便了临床检验。