



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106645694 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(21)申请号 201610845853.4

(22)申请日 2016.09.24

(71)申请人 济南博鑫生物技术有限公司

地址 250200 山东省济南市章丘明水经济
开发区济王路北侧

(72)发明人 李敏 王进 谭柏清 王美丽

(51)Int.Cl.

G01N 33/536(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

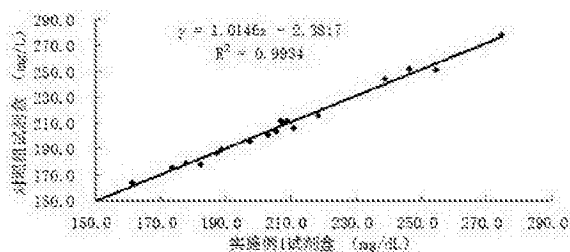
权利要求书1页 说明书3页 附图3页

(54)发明名称

一种纤维结合蛋白检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种纤维结合蛋白检测试剂盒,采用免疫透射比浊法检测血浆纤维结合蛋白,属于临床体外检测技术领域。本发明试剂盒包括试剂R,通过将试剂R的缓冲液更换为pH 7.8的磷酸盐缓冲液,同时添加10mmol/L的EDTA-Na₂,提高了试剂盒的稳定性,线性范围较好,有利于在市场中进一步推广使用。



1. 一种纤维结合蛋白检测试剂盒, 包含试剂R, 其特征在于所述试剂组成如下: 20mmol/L pH为7.8 的磷酸盐缓冲液、2mg/mL羊抗人纤维结合蛋白抗体、2%聚乙二醇6000、2%乳胶颗粒、10mmol/L EDTA- Na_2 、50mmol/L氯化钠、10mmol/L叠氮钠。

2. 根据权利要求1所述的纤维结合蛋白检测试剂盒, 其特征在于试剂R缓冲液为25℃, pH为7.8的磷酸盐缓冲液。

3. 根据权利要求1所述的纤维结合蛋白检测试剂盒, 其特征在于所述胶乳颗粒为聚苯乙烯, 粒径为80-160nm。

4. 根据权利要求1所述的纤维结合蛋白检测试剂盒, 其特征在于所述稳定剂为EDTA- Na_2 (乙二胺四乙酸二钠)。

5. 根据权利要求1所述的纤维结合蛋白检测试剂盒, 其特征在于, 使用全自动生化分析仪采用终点法进行测定, 检测主波长为340nm。

一种纤维结合蛋白检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及临床体外检测技术领域,特别涉及一种纤维结合蛋白免疫比浊法检测试剂盒。

背景技术

[0002] 纤维结合蛋白(Fibronectin, Fn)是一组广泛分布于血浆和多种细胞表面的 高分子糖蛋白,具有调节巨噬细胞、嗜中性粒细胞趋化、促进细胞之间及其与基质之间的粘附等生理作用,它们与多种疾病的发生、发展有密切关系。

[0003] 纤维结合蛋白是由两个几乎相同的亚单位以二硫键连接而成的具有非免疫性调理素作用且具有多种生物活性的一种高分子糖蛋白。血浆纤维结合蛋白测定有助于脑血栓与脑出血的鉴别诊断,动态观察脑血管疾病患者血浆纤维结合蛋白含量有助于检测病情恢复和疗效。肺心病患者急性期血浆纤维结合蛋白明显下降,恶化期极度降低,缓解期逐步恢复。呼吸衰竭、肺部感染和酸碱失调者血浆纤维结合蛋白均明显降低。早期肝硬化、爆发性肝衰竭和失代偿期肝硬化血浆纤维结合蛋白则明显降低,急性肝炎和慢性迁延性肝炎血浆纤维结合蛋白正常或偏低。尿毒症和严重肾功能受损患者血浆纤维结合蛋白显著低于慢性肾盂肾炎,也显著低于肾功能尚正常的慢性肾炎。血浆纤维结合蛋白降低越明显,尿素氮和肌酐增高越显著,愈后越差。原发性血小板减少性紫癜病人的纤维结合蛋白增加而血小板不增加者出血也明显减轻,说明Fn在止血过程中起重要作用。

[0004] 目前,血浆纤维结合蛋白的检测主要有乳胶凝集试验、酶免疫分析法和单向免疫扩散法,这些方法检测时间较长,实验条件不易控制,精密度较低,不适合大批量标本的处理及自动化检测。本发明提供一种用免疫透射比浊法检测纤维结合蛋白的试剂盒,优化其反应体系,使其操作简单、重复性好、稳定性好、可进行批量样本全自动化检测,从而有利于在市场中进一步推广使用。

发明内容

[0005] 本发明旨在提供一种稳定性好的用于检测纤维结合蛋白的试剂盒,该试剂盒采用免疫透射比浊法,与常规的试剂盒相比,稳定性和线性相关性好,有利于试剂在临床上推广应用。

[0006] 基本原理:

以免疫透射比浊法为测定原理,当样本与试剂混合后,样本中的纤维结合蛋白与羊抗人纤维结合蛋白抗体发生特异性结合,形成不溶性的抗原-抗体复合物,使溶液产生浊度,在340nm波长下检测,该浊度的高低在一定量抗体存在时与抗原的含量成正比。通过与同样处理的校准液比较,计算未知样本中纤维结合蛋白的含量。

[0007] 发明是通过以下步骤得到的:

一种纤维结合蛋白检测试剂盒,其特征在于,它包含试剂R。试剂组成如下:20mmol/L pH为7.8 的磷酸盐缓冲液、2mg/mL羊抗人纤维结合蛋白抗体、2%聚乙二醇6000、2%乳胶颗

粒、10mmol/L EDTA-Na₂、50mmol/L氯化钠、10mmol/L叠氮钠。

[0008] 所述的纤维结合蛋白检测试剂盒,其特征在于试剂R缓冲液为25℃,pH为7.8的磷酸盐缓冲液。

[0009] 所述的纤维结合蛋白检测试剂盒,其特征在于所述胶乳颗粒为聚苯丙烯,粒径为80-160nm。

[0010] 所述的纤维结合蛋白检测试剂盒,其特征在于所述稳定剂为EDTA- Na₂(乙二胺四乙酸二钠)。

[0011] 所述的纤维结合蛋白检测试剂盒检测纤维结合蛋白的检测方法是:使用全自动生化分析仪利用终点法进行测定,检测主波长为340nm。

[0012] 本发明的试剂盒在具有双试剂功能的全自动生化分析仪上进行,其具体使用方法如下:

加入生理盐水、样本或校准品3μl,再加入300μl 的试剂R,预孵育5min后读取吸光度A₁,再反应5min后读取吸光度A₂,并计算ΔA。

[0013] 本发明的有益效果:

- 1) 采用新的缓冲体系,改善了试剂的稳定性;
- 2) 添加EDTA-Na₂,增强了试剂稳定性,而且不会对试剂的准确度产生影响;
- 3) 试剂准确度和稳定性好,价格便宜,使用方便,有利于该试剂在市场中进一步推广。

附图说明

[0014] 图1实施例1试剂与对照组试剂的相关性曲线图;

图2实施例1试剂与对照组试剂效期稳定性曲线图;

图3 实施例1试剂与对照组试剂对比检测结果;

图4 实施例1试剂与对照组试剂线性相关验证实验检测结果;

图5 实施例1试剂与对照组试剂稳定性验证实验检测结果。

具体实施方式

[0015] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步说明:

实施例1

一种常规的纤维结合蛋白检测试剂盒,它包括试剂R。

[0016] 试剂R组成为:

20mmol/L 磷酸盐缓冲液	pH为7.8
羊抗人纤维结合蛋白抗体	2mg/mL
聚乙二醇6000	2%
乳胶颗粒	2%
EDTA-Na ₂	10mmol/L
氯化钠	50mmol/L
叠氮钠	10mmol/L。

[0017] 本实施例所述试剂R配置时需先配制磷酸缓冲液,调到适当pH值后,再添加其它物质。本实施例所述试剂盒在使用时,其测定方法是采用迈瑞800全自动生化分析仪,利用终

点法进行测定,检测主波长为340nm,操作如下:

加入生理盐水、样本或校准品3 μ l,再加入300 μ l 的试剂R,预孵育5min后读取吸光度A1,再反应5min后读取吸光度A2,并计算 ΔA 。

[0018] $\Delta A = A_2 - A_1$

纤维结合蛋白含量(mg/L) = (ΔA 测定 $\div$ ΔA 标准) $\times$ C标准

测定:检测样本 ΔA 标准:标准品。

[0019] 实施例2

准确度验证试验:将实施例1的纤维结合蛋白检测试剂作为实验组,市场上获得认可的一种准确度好、稳定性好的纤维结合蛋白检测试剂作为对照组进行检测,对20个临床血清样本进行检测,检测结果如图3所示。获得了两种试剂的相关性曲线(如图1所示),结果表明,两组试剂盒的相关系数为0.9967,说明两者相关性比较好。证明本发明试剂盒添加及更改的组分对其准确性不会造成影响,试剂盒依然保持较好的准确度。

[0020] 实施例3

线性相关性验证试验:选取纤维结合蛋白含量为360mg/L的高值样本,用生理盐水进行系列稀释,配制6个不同浓度的样本,浓度依次为360mg/dL、288mg/dL、216mg/dL、144mg/dL、72mg/dL、0mg/dL。分别利用实施例1试剂及对照组试剂进行检测,每个浓度的样本分别测定三次,分别取平均值,检测结果如图4所示。

[0021] 如图4所示,实施例1与对照组试剂检测结果相关系数均大于0.990,且实施例1试剂检测结果的相关系数略大于对照组试剂检测结果的相关系数,这表明本发明试剂具有更好的线性相关性。

[0022] 实施例4

稳定性验证实验:在2 $^{\circ}$ C $\sim$ 8 $^{\circ}$ C、无腐蚀性气体的避光环境中贮存试剂,检测实施例1及对照组试剂的稳定性。每月1号分别用两组试剂测定同一混合血清样本,测定三次取平均值,检测数据如图5所示。

[0023] 实验结果显示,实施例1试剂在2 $^{\circ}$ C $\sim$ 8 $^{\circ}$ C、无腐蚀性气体的避光环境中贮存15个月稳定,而对照组试剂在2 $^{\circ}$ C $\sim$ 8 $^{\circ}$ C、无腐蚀性气体的避光环境中贮存12个月后开始不稳定,说明本发明试剂更换缓冲液及添加EDTA-Na₂后稳定性增强。

[0024] 综上所述,本发明提供的纤维结合蛋白检测试剂盒,将试剂R的缓冲液更换为pH 7.8的磷酸盐缓冲液,同时添加10mmol/L的EDTA-Na₂,提高了试剂盒的稳定性,线性范围较好,试剂的准确度也较好。因此,本发明提供的纤维结合蛋白检测试剂盒有利于在市场中进一步推广使用。

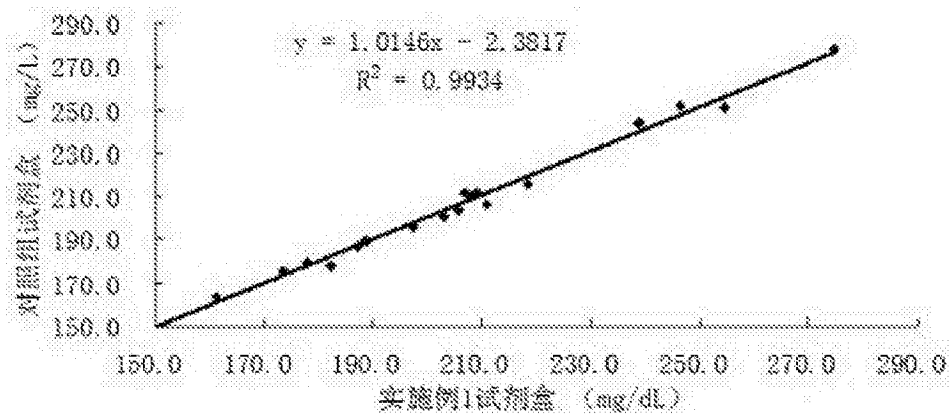


图1

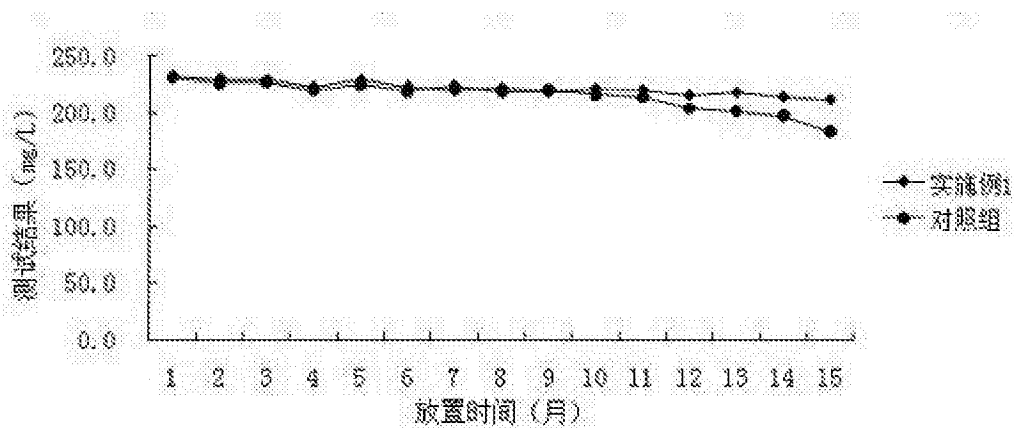


图2

实施例 1 试剂与市场认可的纤维结合蛋白检测试剂对比检测结果

样本号	实施例 1 试剂 (mg/L)	对照组试剂 (mg/L)	相对偏差 (%)
1	173.5	175.3	-1.02%
2	210.8	206.2	2.24%
3	274.7	278.2	-1.24%
4	203.0	201.0	0.97%
5	218.5	215.9	1.21%
6	129.3	127.4	1.50%
7	238.9	243.8	-2.02%
8	182.2	178.8	1.94%
9	205.7	203.9	0.87%
10	177.9	179.3	-0.81%
11	207.7	210.3	-1.23%
12	188.5	189.3	-0.46%
13	254.6	251.3	1.34%
14	161.4	163.8	-1.42%
15	140.5	142.8	-1.55%
16	187.5	187.2	0.15%
17	209.1	211.8	-1.27%
18	197.3	195.8	0.75%
19	206.8	211.4	-2.18%
20	246.3	251.7	-2.12%
相关系数 R	0.9967		

图3

实施例 1 试剂线性相关验证实验检测结果

理论浓度 (mg/L)	实施例 1 试剂 (mg/L)	对照组试剂 (mg/L)
0	-0.2	0.1
72	71.2	72.3
144	147.7	140.2
216	219.9	222.5
288	285.6	282.6
360	354.7	352.8
相关系数 R	0.9997	0.9994

图4

实施例 1 试剂稳定性验证实验检测结果

时间	实施例 1 试剂 (mg/L)	对照组试剂 (mg/L)
1 个月	232.8	230.7
2 个月	230.1	226.4
3 个月	229.2	226.8
4 个月	223.1	220.2
5 个月	229.0	225.0
6 个月	223.1	219.1
7 个月	219.7	223.2
8 个月	221.9	218.6
9 个月	218.5	220.2
10 个月	221.6	216.4
11 个月	220.2	214.1
12 个月	215.6	204.0
13 个月	217.9	201.9
14 个月	214.6	197.3
15 个月	211.7	183.2

图5

专利名称(译)	一种纤维结合蛋白检测试剂盒		
公开(公告)号	CN106645694A	公开(公告)日	2017-05-10
申请号	CN201610845853.4	申请日	2016-09-24
[标]申请(专利权)人(译)	济南博鑫生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	济南博鑫生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	济南博鑫生物技术有限公司		
[标]发明人	李敏 王进 谭柏清 王美丽		
发明人	李敏 王进 谭柏清 王美丽		
IPC分类号	G01N33/536 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/536 G01N33/68		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种纤维结合蛋白检测试剂盒，采用免疫透射比浊法检测血浆纤维结合蛋白，属于临床体外检测技术领域。本发明试剂盒包括试剂R，通过将试剂R的缓冲液更换为pH 7.8的磷酸盐缓冲液，同时添加10mmol/L的EDTA-Na₂，提高了试剂盒的稳定性，线性范围较好，有利于在市场中进一步推广使用。

