



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106645695 A

(43)申请公布日 2017. 05. 10

(21)申请号 201610503871.4

(22)申请日 2016.06.30

(71)申请人 深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司

地址 518057 广东省深圳市南山区南山街
道兴海路荔山工业区5栋1-4层

(72)发明人 段桂开 黄涛 夏福臻 钱纯亘
申国辉

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法,抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒包括:抗透明带抗体重组蛋白包被的羧基化的磁微粒和抗人免疫球蛋白标记的化学发光标记物。这种抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒能够以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具,完成抗透明带抗体的检测。这种抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒,经过实验,其检测灵敏度达到1U/L,相对于传统的抗透明带抗体的检测方法灵敏度至少提高了10倍,这种抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒的检测精度较高。

1. 一种抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,包括:抗透明带抗体重组蛋白包被的羧基化的磁微粒和抗人免疫球蛋白标记的化学发光标记物。

2. 根据权利要求1所述的抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述抗透明带抗体重组蛋白包被的羧基化的磁微粒中,所述抗透明带抗体重组蛋白与所述羧基化的磁微粒的比例为1:25~35。

3. 根据权利要求1所述的抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述抗人免疫球蛋白标记的化学发光标记物中,所述抗透明带抗体重组蛋白与所述化学发光标记物的比例为50:1~10。

4. 根据权利要求1所述的抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述羧基化的磁微粒的粒径为 $0.05\mu\text{m}$ ~ $1\mu\text{m}$ 。

5. 根据权利要求1所述的抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述化学发光标记物为鲁米诺、异鲁米诺、三联吡啶钌或吖啶酯。

6. 根据权利要求1所述的抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,还包括化学发光底物液,所述化学发光底物液包括A液和B液。

7. 根据权利要求6所述的抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述A液为 H_2O_2 溶液,所述B液为NaOH溶液。

8. 根据权利要求1所述的抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,还包括抗透明带抗体定标品。

9. 根据权利要求8所述的抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述抗透明带抗体定标品为浓度分别为1U/L、10U/L、100U/L、500U/L、1000U/L和2000U/L的抗透明带抗体的溶液。

10. 一种根据权利要求1~9中任一项所述的抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

取羧基化的磁微粒的悬浮液,磁分离去上清后用MES缓冲液重悬,接着加入EDC水溶液,活化羧基化的磁微粒的表面羧基,接着加入抗透明带抗体重组蛋白,室温下混悬2h~10h,磁分离去除上清后用Tris缓冲液重悬,得到抗透明带抗体重组蛋白包被的羧基化的磁微粒;以及取抗人免疫球蛋白,加入碳酸盐缓冲液后混匀,然后加入化学发光标记物后混匀,室温下避光反应1h~2h后除杂,得到抗人免疫球蛋白标记的化学发光标记物。

抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及体外检测领域,尤其涉及一种抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 透明带是一层包绕着卵母细胞及着床前孕卵的非细胞性明胶样酸性糖蛋白膜,主要由3种糖蛋白组成的内含特异性精子受体,其作用是诱发精子顶体反应、精卵识别、结合、穿透和阻止多精子入卵,在正常生理情况下,精子与透明带结合后,依靠精子的酶系统产生局部的溶解作用,受精后透明带恢复完整性,保护受精卵的发育。

[0003] 抗透明带抗体在体内与透明带结合,可以阻止精卵结合,干扰卵子与卵泡细胞间的反应,导致卵细胞和卵子闭锁。抗透明带抗体另一方面会使精子的运动能力下降,影响精子穿过宫颈黏液及上行,并影响精子获能;另外还会对透明带的孕卵产生损伤作用,结果导致不能正常发育而至流产。国内外研究均在不孕妇女中发现较高的透明带抗体检出率。因此抗透明带抗体检测对临床诊断与治疗不孕不育患者也有重要意义。

[0004] 目前临床检测抗透明带抗体的常见方法有酶联免疫吸附法、酶促化学发光法,但这些方法都存在着一些不足之处。

[0005] 一、酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法(ELISA)被广泛应用,但该方法也存在着下述的不足之处:

(1) 使用12×8型、6×8型、8×12型或整板型96孔专用微孔板作为抗原包被用具和反应容器,在使用时只能分成12批次、6批次、8批次或整板一次使用,无法进行独立的、单人份的检测;

(2) 定量测定所用的试剂种类较多,每一种检测试剂都要用试剂瓶来盛装,并且每使用一种试剂时都需要更换吸液嘴来分别加注到微孔板的微孔中,不但试剂瓶种类多,加注试剂的操作也极为繁琐;

(3) 缺少对检测信息的相应标注,只能通过查看试剂盒外包装盒的标识才能了解或知悉检测试剂的生产批号及有效期信息,而且所知悉的信息在检测过程中不受控,具有很大的随意性;

(4) 检测试剂在检测过程中处于开放的空间,容易引起各种试剂之间的交叉污染而影响检测结果的准确性;

(5) 检测过程多采用手工操作,试剂或样本的加量不很精确,操作过程极为繁琐和复杂,容易发生操作差错,检测结果的准确度和精密度较差;

(6) 在检测项目成套试剂的数量配置及使用上均为项目数×48/96人份,如果需要检测10个项目,则试剂的配置及使用数须为10×48/96人份,如果只有一份样本需要检测10个不同的项目,也需要配置10×48/96人份的试剂,存在着不够经济合理的缺点。

[0006] 二、化学发光法

化学发光法按发光原理可分为直接化学发光和酶促化学发光。

[0007] 酶促化学发光主要有辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶两种,但都有一定的局限性,辣根过氧化物酶主要缺点为:鲁米诺在没有辣根过氧化物酶存在情况下,也会被H₂O₂氧化自身发光,本底相对较高,影响信噪比,反应动力学复杂,影响因素多,结果不够稳定,要得到灵敏度高且平台期长的底物不容易。碱性磷酸酶主要缺点为:底物达到平台期的时间长,底物成本高,导致检测成本高,患者负担重。

[0008] 吡啶酯作为标记物的直接化学发光相比酶促化学发光具有明细优势,主要表现在:反应不需要催化剂,只要碱性环境即可进行,反应迅速,背景发光低,信噪比高,干扰因素少,试剂稳定性好,可以两点定标,体系简单,激发液成本低,吡啶酯易与蛋白质联结,且联结后光子产率不减少。

发明内容

[0009] 基于此,有必要提供一种检测灵敏度较高的抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。

[0010] 一种抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒,包括:抗透明带抗体重组蛋白包被的羧基化的磁微粒和抗人免疫球蛋白标记的化学发光标记物。

[0011] 在一个实施例中,所述抗透明带抗体重组蛋白包被的羧基化的磁微粒中,所述抗透明带抗体重组蛋白与所述羧基化的磁微粒的比例为1:25~35。

[0012] 在一个实施例中,所述抗人免疫球蛋白标记的化学发光标记物中,所述抗人免疫球蛋白与所述化学发光标记物的比例为50:1~10。

[0013] 在一个实施例中,所述羧基化的磁微粒的粒径为0.05 μ m~1 μ m。

[0014] 在一个实施例中,所述化学发光标记物为鲁米诺、异鲁米诺、三联吡啶钌或吡啶酯。

[0015] 在一个实施例中,还包括化学发光底物液,所述化学发光底物液包括A液和B液。

[0016] 在一个实施例中,所述A液为H₂O₂溶液,所述B液为NaOH溶液。

[0017] 在一个实施例中,还包括抗透明带抗体定标品。

[0018] 在一个实施例中,所述抗透明带抗体定标品为浓度分别为1U/L、10U/L、100U/L、500U/L、1000U/L和2000U/L的抗透明带抗体的溶液。

[0019] 一种上述的抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

取羧基化的磁微粒的悬浮液,磁分离去上清后用MES缓冲液重悬,接着加入EDC水溶液,活化羧基化的磁微粒的表面羧基,接着加入抗透明带抗体重组蛋白,室温下混悬2h~10h,磁分离去除上清后用Tris缓冲液重悬,得到抗透明带抗体重组蛋白包被的羧基化的磁微粒;以及

取抗人免疫球蛋白,加入碳酸盐缓冲液后混匀,然后加入化学发光标记物后混匀,室温下避光反应1h~2h后除杂,得到抗人免疫球蛋白标记的化学发光标记物。

[0020] 这种抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒能够以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具,完成抗透明带抗体的检测这种抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒,经过实验,其检测灵敏度达到1U/L,相对于传统的抗透明带抗体的检测方法灵敏度至少提高了10倍,这种抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒的检测精度较高。

[0021]

附图说明

[0022] 图1为一实施方式的抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒的制备方法的流程图；

图2为实施例3得到的抗透明带抗体标准曲线图。

[0023]

具体实施方式

[0024] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂，下面结合附图和具体实施例对本发明的具体实施方式做详细的说明。在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明。但是本发明能够以很多不同于在此描述的其它方式来实施，本领域技术人员可以在不违背本发明内涵的情况下做类似改进，因此本发明不受下面公开的具体实施的限制。

[0025] 一实施方式的抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒，包括：抗透明带抗体重组蛋白包被的羧基化的磁微粒和抗人免疫球蛋白标记的化学发光标记物。

[0026] 优选的，抗透明带抗体重组蛋白包被的羧基化的磁微粒中，抗透明带抗体重组蛋白与羧基化的磁微粒的比例为1:25~35。

[0027] 优选的，抗人免疫球蛋白标记的化学发光标记物中，抗人免疫球蛋白与化学发光标记物的比例为50:1~10。

[0028] 优选的，羧基化的磁微粒的粒径为0.05 μ m~1 μ m。

[0029] 化学发光标记物可以为鲁米诺、异鲁米诺、三联吡啶钌或吖啶酯。其中，化学发光标记物优选为吖啶酯。

[0030] 在其他的实施例中，上述抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒还包括化学发光底物液。

[0031] 化学发光底物液包括A液和B液。A液可以为H₂O₂溶液，B液可以为NaOH溶液。

[0032] 本实施例中，A液为浓度为0.1mol/L的H₂O₂溶液，B液为浓度为0.25mol/L的NaOH溶液。

[0033] 在其他的实施例中，上述抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒还包括抗透明带抗体定标品。

[0034] 抗透明带抗体定标品为浓度分别为1U/L、10U/L、100U/L、500U/L、1000U/L和2000U/L的抗透明带抗体的溶液。

[0035] 具体的，抗透明带抗体定标品可以采用标准品缓冲液将抗透明带抗体配制成浓度分别为1U/L、10U/L、100U/L、500U/L、1000U/L和2000U/L的抗透明带抗体的溶液。

[0036] 这种抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒用于抗透明带抗体检测时，利用全自动化学发光免疫分析仪对抗透明带抗体定标品进行检测，绘制标准曲线，内置于电脑软件；接着测试实际样本，根据样本发光值计算样本浓度；最后对抗透明带抗体全自动化学发光免疫分析系统进行性能（灵敏度、线性、精密度、干扰性）的评价。

[0037] 这种抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒能够以全自动化学发光免疫分析仪

为检测工具,完成抗透明带抗体的检测这种抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒,经过实验,其检测灵敏度达到1U/L,相对于传统的抗透明带抗体的检测方法灵敏度至少提高了10倍,这种抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒的检测精度较高。

[0038] 此外,这种抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒还具有以下优点:

1、选择吖啶酯作为标记材料,并应用于化学发光免疫分析系统,该发光体系为直接化学发光,与传统的酶促化学发光相比,该反应不需要酶的参与,更加节约成本;

2、选用吖啶酯的化学发光免疫分析系统线性范围宽,能达到1U/L~ 1000U/L,而传统的抗透明带抗体的检测方法的检线性范围为20U/L~ 1000U/L;

3、吖啶酯化学发光免疫分析系统重复性高,批内及批间差均在5%以内,这是其它化学发光免疫分析系统难以达到的;

4、化学发光免疫分析系统已实现样本的定量,通过内置标准曲线到测试软件,只需测试样本就可直接得到样本的浓度值;

5、化学发光免疫分析系统可以实现全自动化,试剂及样本的添加全有仪器完成,操作更加简便,减少了人为的误差。

[0039] 如图1所示的上述抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

取羧基化的磁微粒的悬浮液,磁分离去上清后用MES缓冲液重悬,接着加入EDC水溶液,活化羧基化的磁微粒的表面羧基,接着加入抗透明带抗体重组蛋白,室温下混悬2h~10h,磁分离去除上清后用Tris缓冲液重悬,得到抗透明带抗体重组蛋白包被的羧基化的磁微粒。

[0040] MES(2-(N-吗啡啉)乙磺酸)缓冲液的浓度为0.02M,pH为5.5。

[0041] Tris缓冲液的浓度为0.1M并且含有2%BSA,pH为8.0。

[0042] EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺)水溶液的浓度为10mg/mL~20mg/mL,EDC与羧基化的磁微粒的比例为0.05:0.1~1。

[0043] 优选的,抗透明带抗体重组蛋白包被的羧基化的磁微粒中,抗透明带抗体重组蛋白与羧基化的磁微粒的比例为1:25~35。

[0044] 优选的,羧基化的磁微粒的粒径为0.05 μ m~1 μ m。

[0045] 取抗人免疫球蛋白,加入碳酸盐缓冲液后混匀,然后加入化学发光标记物后混匀,室温下避光反应1h~2h后除杂,得到抗人免疫球蛋白标记的化学发光标记物。

[0046] 碳酸盐缓冲液浓度为0.1M,pH为9.0~9.5,

除杂的操作为离心脱盐柱脱盐,具体操作为:先分别用纯净水及TBS缓冲液(40 mM Tris-HCl,0.5% BSA,1% NaCl,pH 8.0)处理离心脱盐柱,最后加入得到的抗透明带抗体重组蛋白包被的羧基化的磁微粒的溶液,最后收集离心管中的液体。

[0047] 优选的,抗人免疫球蛋白标记的化学发光标记物中,抗透明带抗体重组蛋白与化学发光标记物的比例为50:1~10。

[0048] 化学发光标记物可以为鲁米诺、异鲁米诺、三联吡啶钌或吖啶酯。其中,化学发光标记物优选为吖啶酯。

[0049] 得到的抗透明带抗体重组蛋白包被的羧基化的磁微粒和抗人免疫球蛋白标记的化学发光标记物组合即可得到上述抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒。

[0050] 这种抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒在使用时,还需要化学发光底物液和

抗透明带抗体定标品。

[0051] 化学发光底物液和抗透明带抗体定标品可以自行配制得到。

[0052] 化学发光底物液包括A液和B液。A液可以为H₂O₂溶液，B液可以为NaOH溶液。

[0053] 本实施例中，A液为浓度为0.1mol/L的H₂O₂溶液，B液为浓度为0.25mol/L的NaOH溶液。

[0054] 具体的，抗透明带抗体定标品可以采用标准品缓冲液将抗透明带抗体配制成浓度分别为1U/L、10U/L、100U/L、500U/L、1000U/L和2000U/L的抗透明带抗体的溶液。

[0055] 这种抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒的制备方法简单方便，制得的抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒的检测灵敏度较高，具有良好的应用前景。

[0056]

以下为具体实施例。

[0057] 实施例1：抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒的制备

(1) 抗透明带抗体重组蛋白包被的羧基化的磁微粒的制备：

取含有50mg粒径为0.05 μ m~1 μ m的羧基化的磁微粒(MagnaBind21353)悬浮液，磁分离去上清，用0.02 M，pH为5.5 MES缓冲液重悬，加入1mL新配置的10mg/mL的EDC水溶液，活化磁珠表面羧基，加入4mg抗透明带抗体重组蛋白(biorbyt, 货号orb48780)，室温下混悬6h，磁分离，去除上清，用含2%BSA的0.1M，pH为8.0的Tris缓冲液重悬到1mg/mL，得到抗透明带抗体重组蛋白包被的羧基化的磁微粒，每瓶5mL分装保存于4℃备用。

[0058] (2) 抗人免疫球蛋白标记的吖啶酯的制备：

取50 μ L浓度为25mg/mL的抗人免疫球蛋白，加入150 μ L浓度为0.1M、pH为9.0~9.5的碳酸盐缓冲液，混匀，然后加入1.5 μ L浓度为5mg/mL的吖啶酯溶液混匀，室温下避光反应，1.5h后取出，用2mL的zeba离心脱盐柱脱盐处理，脱盐过程中首先分别用纯净水及TBS缓冲液进行处理，最后加入得到的抗人免疫球蛋白标记的吖啶酯溶液，收集离心管中的液体至保存管得到抗人免疫球蛋白标记的吖啶酯，每瓶5mL分装保存于4℃备用。

[0059] (3) 抗透明带抗体定标品的制备：

用标准品缓冲液(40 mM Tris-HCl, 0.5% BSA, 1% NaCl, pH 8.0)将抗透明带抗体配置成浓度为0U/L、10U/L、100U/L、500U/L、1000U/L和2000U/L，每瓶0.5 mL分装冻干，4℃保存备用。

[0060]

实施例2：抗透明带抗体化学发光免疫检测方法

以全自动化学发光免疫分析仪(YHLO, 货号iFlash3000)为检测工具，方法学模式为间接免疫法，即仪器依次加入50 μ L的样品、50 μ L的抗透明带抗体重组蛋白包被的羧基化的磁微粒以及50 μ L的抗透明带抗体处理液，反应20 min后，再加50 μ L的抗人免疫球蛋白吖啶酯，反应20 min后，进行磁分离，仪器将反应混合物送入暗室，依次加入发光底物A液(H₂O₂)及B液(NaOH)进行发光反应，最后记录发光值。

[0061]

实施例3：抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒性能评价

采用实施例2中的方法对抗透明带抗体定标品进行检测，得到绘制标准曲线如图2所示。

[0062] 接着对接着测试实际样本,根据样本发光值计算样本浓度。

[0063] 灵敏度的检测:

参照CLSI EP17-A 文件推荐实验方案,计算抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒的灵敏度,求得的灵敏度为1U/L。

[0064] 线性的检测:

对浓度为1U/L、10U/L、100U/L、500U/L、1000U/L和2000U/L 标准品做线性分析,计算线性相关系数, $r=0.9996$,另外,该试剂盒对抗透明带抗体样品检测的线性范围为1U/L ~ 1000U/L。

[0065] 精密度测定:

取浓度为50U/L及500U/L两个抗透明带抗体样品,每个样本每个浓度各做3个平行,用三批试剂盒进行检测,计算试剂盒批内及批间差,结果表明该试剂盒批内及批间差均小于5%。

[0066] 干扰性实验:

取混合血清分别添加干扰物包括:结合胆红素、游离胆红素、血红蛋白、抗坏血酸、甘油酯,添加比例按照 1:20进行,分别测定混合血清及添加了各种干扰物后混合血清的测值,计算二者之间的偏差,以 $\pm 10\%$ 为可接受范围。结果表明,干扰性均达到 NCCLS 的文件标准,可用于临床实验室抗透明带抗体 状况的准确评估。

[0067]

实施例4、抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒的对比实验

分别用化学发光检测方法和传统的酶联免疫吸附法对浓度为0、50U/L的抗透明带抗体样品做检测,两种方法检测灵敏度相比,数据如下表所示:

测试次数	化学发光检测	酶联免疫吸附法检测
	(RLU)	(OD)
1	1235	0.039
2	1212	0.033
3	1190	0.041
4	1168	0.035
5	1147	0.042
6	1126	0.037
7	1105	0.044
8	1085	0.038
9	1065	0.045
10	1046	0.040
11	1027	0.047
12	1008	0.041
13	990	0.048
14	971	0.042
15	954	0.050
16	936	0.044
17	919	0.051
18	902	0.045
19	886	0.052

由上表可以看出,化学发光检测方法的灵敏度较酶联免疫吸附法提高了10倍以上。

[0068]

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

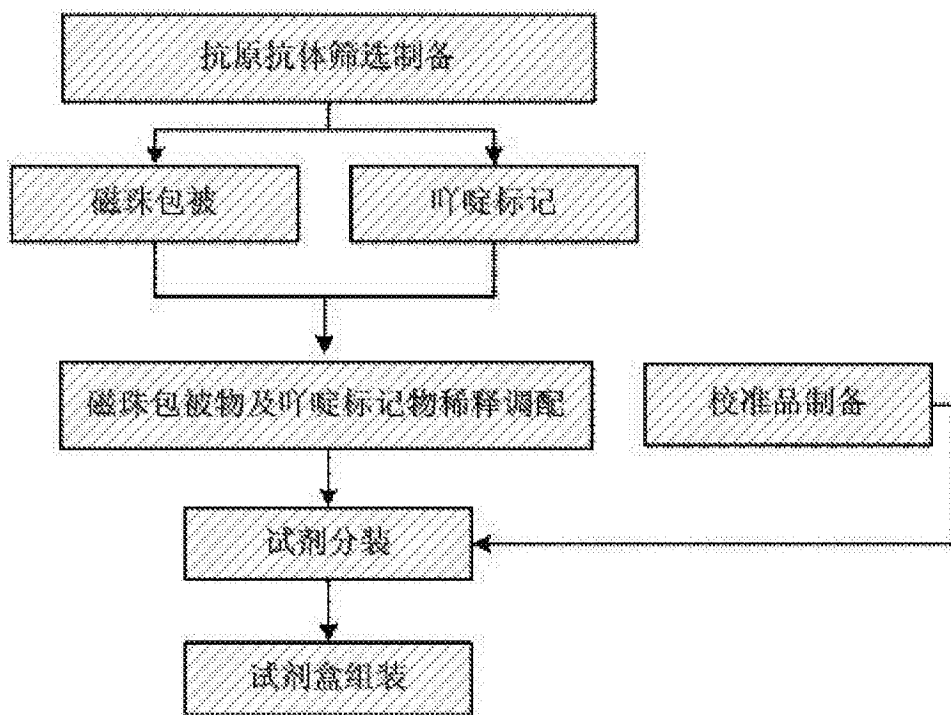


图1

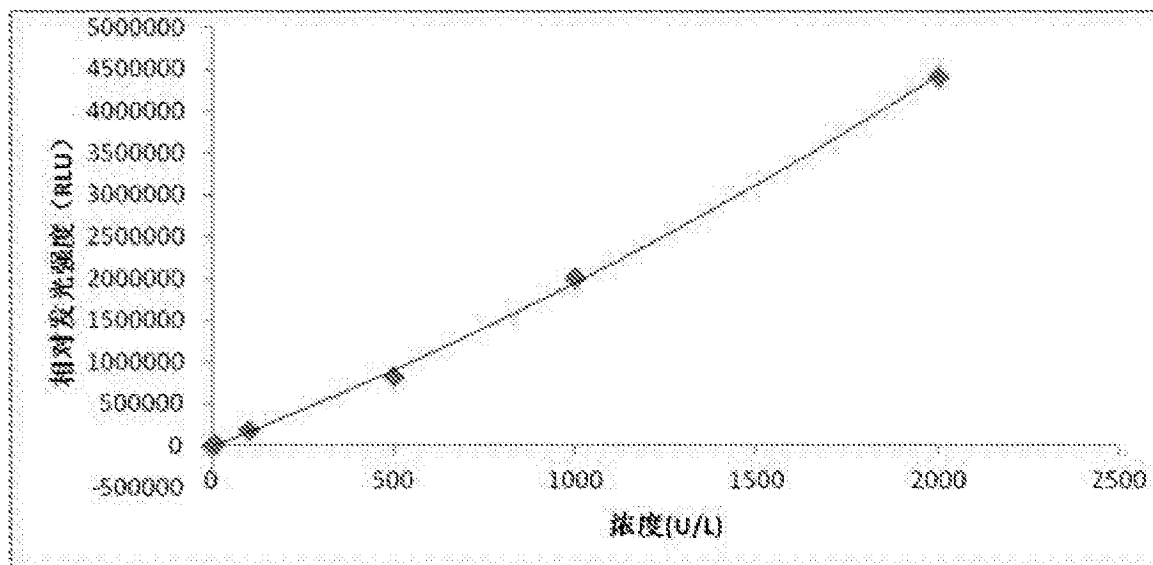


图2

专利名称(译)	抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN106645695A	公开(公告)日	2017-05-10
申请号	CN201610503871.4	申请日	2016-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司		
[标]发明人	段桂开 黄涛 夏福臻 钱纯亘 申国辉		
发明人	段桂开 黄涛 夏福臻 钱纯亘 申国辉		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54326 G01N33/54346		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法，抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒包括：抗透明带抗体重组蛋白包被的羧基化的磁微粒和抗人免疫球蛋白标记的化学发光标记物。这种抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒能够以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具，完成抗透明带抗体的检测这种抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒，经过实验，其检测灵敏度达到1U/L，相对于传统的抗透明带抗体的检测方法灵敏度至少提高了10倍，这种抗透明带抗体化学发光免疫检测试剂盒的检测精度较高。

测试次数	化学发光检测	酶联免疫吸附法检测
	<RLU>	<OD>
1	1235	0.039
2	1212	0.033
3	1190	0.041
4	1168	0.035
5	1147	0.042
6	1126	0.037
7	1105	0.044
8	1085	0.038
9	1065	0.045
10	1046	0.040
11	1027	0.047
12	1008	0.041
13	990	0.048
14	971	0.042
15	954	0.050
16	936	0.044
17	919	0.051
18	902	0.045
19	886	0.052