



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109324181 A

(43)申请公布日 2019.02.12

(21)申请号 201811229346.3

(22)申请日 2018.10.22

(71)申请人 河北特温特生物科技发展有限公司

地址 050000 河北省石家庄市高新区兴安
大街116号8号楼-F单元

(72)发明人 郭耀光 牛海燕

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书25页

(54)发明名称

一种免疫层析用封闭剂组合物、用途、及免疫层析试剂盒的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种免疫层析用封闭剂组合物、用途、及免疫层析试剂盒的制备方法。所述封闭剂组合物包括聚氧乙烯蓖麻油、聚乙烯醇、海藻糖、蔗糖和磷酸缓冲液。采用所述封闭剂和封闭方法对样品垫进行处理,可防止样品垫对目标物质的吸附,促进荧光抗体释放;采用所述封闭剂和封闭方法对荧光抗体进行处理,可有效防止荧光抗体的凝集,保持分散状态,还可防止干扰物质与荧光抗体的非特异性结合从而影响目标物质与荧光抗体的结合。采用本发明所述的免疫层析用封闭剂组合物、用途、及免疫层析试剂盒的制备方法能够提高免疫层析试剂盒的检测准确性和稳定性,可直接对全血样品进行检测,简化测定过程。

1. 一种免疫层析用封闭剂组合物, 其特征在于, 包括: 聚氧乙烯蓖麻油、聚乙烯醇、海藻糖、蔗糖和磷酸缓冲液;

所述聚氧乙烯蓖麻油、聚乙烯醇、海藻糖、蔗糖在所述磷酸缓冲液中的质量浓度百分比为(0.02%~0.55%):(0.05%~0.30%):(1.0%~6%):(10%~20%)。

2. 根据权利要求1所述的免疫层析用封闭剂组合物, 其特征在于, 所述磷酸缓冲液由磷酸盐配制, 其磷酸根浓度为10~100mmol/L, 其pH值为6.0~8.0;

所述磷酸盐包括磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾中的至少一种。

3. 一种权利要求1至2任一项所述封闭剂组合物的用途, 其特征在于, 所述封闭剂组合物用于免疫层析试剂盒制备过程中对样品垫的封闭处理和/或对荧光抗体的封闭处理。

4. 一种免疫层析试剂盒的制备方法, 包括样品垫的封闭、检测膜的制备、荧光抗体的制备, 荧光抗体的封闭, 其特征在于, 所述样品垫的封闭包括以下步骤:

步骤1) 浸泡: 将样品垫放入封闭剂组合物的溶液中浸泡0.5小时~2.0小时;

步骤2) 干燥: 将步骤1) 的样品垫取出, 于20℃~40℃中干燥3小时~7小时;

所述步骤1) 使用的样品垫包括玻璃纤维膜;

所述步骤1) 封闭样品垫所用的封闭剂组合物包括聚氧乙烯蓖麻油、聚乙烯醇、海藻糖、蔗糖和磷酸缓冲液, 聚氧乙烯蓖麻油、聚乙烯醇、海藻糖和蔗糖在所述磷酸缓冲液中的质量浓度百分比为(0.25%~0.55%):(0.05%~0.30%):(1.0%~6%):(10%~20%);

所述磷酸缓冲液的磷酸根浓度为40~100mmol/L, 其pH值为6.0~8.0。

5. 根据权利要求4所述免疫层析试剂盒的制备方法, 其特征在于, 所述磷酸缓冲液的磷酸根浓度为40~80mmol/L, 其pH值为6.5~7.6。

6. 根据权利要求4所述免疫层析试剂盒的制备方法, 其特征在于, 所述磷酸缓冲液的磷酸根浓度为50~70mmol/L, 其pH值为6.8~7.4。

7. 根据权利要求4至6任一项所述免疫层析试剂盒的制备方法, 其特征在于, 荧光抗体的封闭包括: 将洗涤后的荧光抗体悬浮于封闭剂组合物的溶液中进行封闭;

所述荧光抗体包括由抗体和荧光微球偶联得到的荧光抗体;

所述封闭荧光抗体所用的封闭剂组合物包括聚氧乙烯蓖麻油、聚乙烯醇、海藻糖、蔗糖和磷酸缓冲液, 聚氧乙烯蓖麻油、聚乙烯醇、海藻糖和蔗糖在所述磷酸缓冲液中的质量浓度百分比为(0.02%~0.25%):(0.05%~0.30%):(1.0%~6%):(10%~20%);

所述磷酸缓冲液的磷酸根浓度为10~40mmol/L, 其pH值为6.0~8.0。

8. 根据权利要求7所述免疫层析试剂盒的制备方法, 其特征在于, 所述磷酸缓冲液的磷酸根浓度为10~28mmol/L, 其pH值为6.0~7.4。

9. 根据权利要求7所述免疫层析试剂盒的制备方法, 其特征在于, 所述磷酸缓冲液的磷酸根浓度为16~26mmol/L, 其pH值为6.4~7.2。

一种免疫层析用封闭剂组合物、用途、及免疫层析试剂盒的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫层析技术,具体涉及一种免疫层析用封闭剂组合物、用途、及免疫层析试剂盒的制备方法。

背景技术

[0002] 免疫诊断是应用免疫学的理论、技术和方法诊断疾病和测定免疫状态,是确定疾病的病因和病变部位,机体免疫状态是否正常的重要方法。免疫诊断包括放射免疫、酶联免疫、化学发光等。免疫诊断广泛应用于医院、血站、体检中心,主要用于肝炎检测、性病检测、肿瘤检测、孕检等,在现代医学领域发挥越来越大的作用。

[0003] 免疫层析技术是一种快速诊断技术,其原理是将特异性的抗原或者抗体先固定于高分子膜的某一区带,使用时将固定有特异性抗原或者抗体的高分子膜的一端浸入样品中,被测样品依靠毛细管作用沿高分子膜向前移动,当移动至固定有特异性抗原或者抗体的区域时,样品中抗体或者抗原与之发生特异性结合,然后再使用染色或者荧光检测等方法测定浓度,从而实现疾病的诊断。

[0004] 免疫层析技术中需要使用到多种膜,可分为两类,一类是用于吸附抗原或者抗体的检测膜,主要有硝酸纤维素膜(NC膜)、醋酸纤维素膜、尼龙膜、聚偏氟乙烯膜(PVDF)等;另一类是样品垫,常用的主要有玻璃纤维膜。这些膜的表面特性不同,例如亲水性、疏水性、对蛋白质的吸附特性、对其他有机物质的吸附特性。免疫层析中,一方面要求检测膜对抗原或者抗体具有较好的吸附性,而对其他物质的吸附尽量低,以降低干扰,提高精度;另一方面要求样品垫对目标物质的吸附力越小越好,利于目标物质转移到检测膜,完成检测;对其他物质的吸附力越大越好,防止其他物质进入检测膜,干扰测定。因此需要对这些膜的表面性质进行调节和控制。这种改变免疫层析中使用的膜表面吸附特性的过程,称之为“封闭”。

[0005] 目前,针对检测膜的封闭技术研究较多,主要方法有两类:一类是先在检测膜上固定抗原或者抗体,然后用有机高分子物质与表面活性剂结合进行封闭处理;另一类是先在检测膜上固定抗原或者抗体,再用牛血清蛋白、酪蛋白或者各种血清蛋白单独处理或者与表面活性剂相结合处理。但是上述方法并不太适合对样品垫的封闭,而检测膜与样品垫的组成物质不同,其表面特性也有较大差别,检测膜的封闭剂和封闭方法并不适合于样品垫的封闭过程,存在封闭过度或者封闭不足的问题。荧光抗体是免疫层析的重要组成部分,其表面也需要进行处理,以保持荧光抗体与样品垫和检测膜之间的相互作用力处于合理的范围内,满足免疫检测的要求。

[0006] 综上所述,目前免疫层析试剂盒制备技术中用于对样品垫和荧光抗体的封闭剂和封闭方法,存在封闭过度或者封闭不足的问题,导致在免疫层析试剂盒在使用过程中样品垫预先吸附的荧光抗体释放率低,或者吸附去除其他物质的能力不足,使免疫层析试剂盒的特异性降低,检测精度下降。因此,需要发明一种免疫层析用封闭剂组合物、用途、及免疫层析试剂盒的制备方法。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于,提供一种免疫层析用封闭剂组合物、用途、及免疫层析试剂盒的制备方法,使用该封闭剂组合物以及试剂盒制备方法对样品垫和荧光抗体进行封闭,能够提高样品垫对其他物质的吸附,从而减少其对检测的干扰,有利于预先吸附在样品垫上的荧光抗体的释放,提高免疫层析试剂盒的特异性和检测精度,还能用于荧光抗体的保存。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明提供一种封闭剂组合物,所述封闭剂组合物包括聚氧乙烯蓖麻油、聚乙烯醇、海藻糖、蔗糖和磷酸缓冲液。

[0009] 所述聚氧乙烯蓖麻油、聚乙烯醇、海藻糖、蔗糖在所述磷酸缓冲液中的质量浓度百分比为(0.02%~0.55%):(0.05%~0.30%):(1.0%~6%):(10%~20%)。

[0010] 所述聚氧乙烯蓖麻油包括EL-16、EL-20、EL-40、EL-80聚氧乙烯蓖麻油。进一步优选的,所述氧乙烯蓖麻油包括EL-16聚氧乙烯蓖麻油,其分子量为3000。

[0011] 所述聚乙烯醇包括分子量为6000~16000的聚乙烯醇。进一步优选的,所述聚乙烯醇包括分子量为9000~10000的聚乙烯醇。

[0012] 所述磷酸缓冲液由磷酸盐配制,其磷酸根浓度为10mmol/L至100mmol/L,pH值为6.0至8.0;所述磷酸盐包括磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾中的至少一种。

[0013] 所述封闭剂组合物包括用于封闭免疫层析中样品垫的封闭剂组合物。

[0014] 所述用于封闭免疫层析中样品垫的封闭剂组合物包括聚氧乙烯蓖麻油、聚乙烯醇、海藻糖、蔗糖和磷酸缓冲液。所述聚氧乙烯蓖麻油、聚乙烯醇、海藻糖、蔗糖在所述磷酸缓冲液中的质量浓度百分比为(0.25%~0.55%):(0.05%~0.30%):(1.0%~6%):(10%~20%)。

[0015] 进一步地,所述用于封闭免疫层析中样品垫的封闭剂组合物中聚氧乙烯蓖麻油、聚乙烯醇、海藻糖、蔗糖在所述磷酸缓冲液中的质量浓度百分比为(0.35%~0.50%):(0.10%~0.20%):(2.0%~5%):(12%~18%)。

[0016] 更进一步地,所述用于封闭免疫层析中样品垫的封闭剂组合物中聚氧乙烯蓖麻油、聚乙烯醇、海藻糖、蔗糖在所述磷酸缓冲液中的质量浓度百分比为(0.40%~0.45%):(0.12%~0.15%):(3.0%~4.5%):(13%~16%)。

[0017] 所述用于封闭免疫层析中样品垫的封闭剂组合物中的磷酸缓冲液的磷酸根浓度为40mmol/L至100mmol/L,其pH值为6.0至8.0。

[0018] 进一步地,所述用于封闭免疫层析中样品垫的封闭剂组合物的磷酸缓冲液的磷酸根浓度为40mmol/L至80mmol/L,其pH值为6.5至7.6。

[0019] 更进一步地,所述用于封闭免疫层析中样品垫的封闭剂组合物的磷酸缓冲液的磷酸根浓度为50mmol/L至70mmol/L,其pH值为6.8至7.4。

[0020] 所述封闭剂组合物包括用于封闭免疫层析中荧光抗体的封闭剂组合物。

[0021] 所述用于封闭免疫层析中荧光抗体的封闭剂组合物包括聚氧乙烯蓖麻油、聚乙烯醇、海藻糖、蔗糖和磷酸缓冲液。所述聚氧乙烯蓖麻油、聚乙烯醇、海藻糖、蔗糖在所述磷酸缓冲液中的质量浓度百分比为(0.02%~0.25%):(0.05%~0.30%):(1.0%~6%):(10%~20%)。

[0022] 进一步地,所述用于封闭免疫层析中荧光抗体的封闭剂组合物中聚氧乙烯蓖麻

油、聚乙烯醇、海藻糖、蔗糖在所述磷酸缓冲液中的质量浓度百分比为(0.05%~0.20%):(0.10%~0.25%):(2.0%~5%):(12.5%~18.5%)。

[0023] 更进一步地,所述用于封闭免疫层析中荧光抗体的封闭剂组合中聚氧乙烯蓖麻油、聚乙烯醇、海藻糖、蔗糖在所述磷酸缓冲液中的质量浓度百分比为(0.08%~0.13%):(0.16%~0.22%):(3.0%~4.5%):(13%~15.5%)。

[0024] 所述用于封闭免疫层析中荧光抗体的封闭剂组合中的磷酸缓冲液的磷酸根浓度为10mmol/L至40mmol/L,其pH值为6.0至8.0。

[0025] 进一步地,所述用于封闭免疫层析中荧光抗体的封闭剂组合物的磷酸缓冲液的磷酸根浓度为10mmol/L至28mmol/L,其pH值为6.0至7.4。

[0026] 更进一步地,所述用于封闭免疫层析中荧光抗体的封闭剂组合物的磷酸缓冲液的磷酸根浓度为16mmol/L至26mmol/L,其pH值为6.4至7.2。

[0027] 所述免疫层析用样品垫包括玻璃纤维膜。

[0028] 所述荧光抗体是将免疫层析中使用的抗体偶联到荧光微球上得到的,所述抗体也可以替换为抗原等其他特异性蛋白质,所述用于荧光抗体的封闭剂组合物及其封闭方法也适用于类似“荧光抗原”,或者其他“荧光特异性蛋白质”等物质。

[0029] 所述聚氧乙烯蓖麻油属于表面活性剂,其作用是调节样品垫与荧光抗体之间的吸附作用力。使荧光抗体在制备免疫层析试剂盒时吸附到样品垫上而不脱落,而在使用免疫层析试剂盒时,使荧光抗体从样品垫上解吸下来,随液体移动到检测膜上,并在检测膜移动至相应位置,从而实现免疫层析试剂盒的检测功能。

[0030] 所述聚乙烯醇的作用是对样品垫的玻璃纤维表面的非特异性吸附位点进行封闭,防止待目标物质被样品垫非特异性吸附,导致目标物质减少,检测结果就会比真实值低,降低检测的准确度。还可以改变荧光抗体的荧光微球表面特性,防止荧光抗体的凝集,从而保持分散;同时还可以防止待检样本中其他物质与荧光抗体的非特异性结合,影响荧光抗体和目标物质的结合。

[0031] 所述海藻糖和蔗糖属于糖类,是蛋白质的保护剂,可以防止免疫层析试剂盒的生产、运输及使用过程中的高温操作对荧光抗体稳定性的影响。

[0032] 所述封闭剂组合物用于制备免疫层析试剂盒过程中对样品垫的封闭处理和/或对荧光抗体的封闭处理。

[0033] 为了解决上述样品垫封闭过程中的技术问题,本发明还提供一种免疫层析试剂盒的制备方法,包括样品垫的封闭、荧光抗体的制备,荧光抗体的封闭。

[0034] 所述样品垫的封闭方法包括以下步骤:步骤1)浸泡:将样品垫放入封闭剂组合物的溶液中浸泡0.5小时~2.0小时;步骤2)干燥:将步骤1)的样品垫取出,于20℃~40℃中干燥3小时~7小时。

[0035] 所述步骤1)使用的样品垫包括玻璃纤维膜。

[0036] 所述步骤1)封闭样品垫所用的封闭剂组合物包括聚氧乙烯蓖麻油、聚乙烯醇、海藻糖、蔗糖和磷酸缓冲液,聚氧乙烯蓖麻油、聚乙烯醇、海藻糖和蔗糖在所述磷酸缓冲液中的质量浓度百分比为(0.25%~0.55%):(0.05%~0.30%):(1.0%~6%):(10%~20%)。

[0037] 所述磷酸缓冲液的磷酸根浓度为40mmol/L至100mmol/L,其pH值为6.0至8.0。

[0038] 进一步地,所述步骤1)的样品垫的浸泡时间为0.5小时~1.5小时。更进一步地,所述步骤1)的样品垫的浸泡时间为1.0小时。

[0039] 进一步地,所述步骤2)的样品垫的干燥温度为30℃~40℃小时。更进一步地,所述步骤2)的样品垫的干燥温度为37℃。

[0040] 进一步地,所述步骤2)的样品垫的干燥时间为4小时~6小时。更进一步地,所述步骤2)的样品垫的干燥时间为5.0小时。

[0041] 为了解决上述荧光抗体封闭过程中的技术问题,本发明提供的免疫层析试剂盒的制备方法还包括一种荧光抗体封闭方法,所述荧光抗体封闭方法包括以下步骤:将洗涤后的荧光抗体悬浮于封闭剂组合物的溶液中进行封闭。

[0042] 所述荧光抗体包括由抗体和荧光微球偶联得到的荧光抗体。

[0043] 所述封闭荧光抗体所用的封闭剂组合物包括聚氧乙烯蓖麻油、聚乙烯醇、海藻糖、蔗糖和磷酸缓冲液,聚氧乙烯蓖麻油、聚乙烯醇、海藻糖和蔗糖在所述磷酸缓冲液中的质量浓度百分比为(0.02%~0.25%):(0.05%~0.30%):(1.0%~6%):(10%~20%)。

[0044] 所述磷酸缓冲液的磷酸根浓度为10mmol/L至40mmol/L,其pH值为6.0至8.0。

[0045] 所述抗体和荧光微球经偶联后得到的荧光抗体经离心,然后将上清液倒掉,以去掉未结合的抗体,再进行所述的封闭处理。

[0046] 所述荧光抗体的悬浮方法包括使用超声处理,使其完全分散。

[0047] 本发明的效果

[0048] 本发明的免疫层析用封闭剂组合物、用途以及荧光免疫层析试剂盒制备方法的好处是:①可以对样品垫进行封闭,防止目标物质被样品垫非特异性吸附,提高检测的准确度;②使样品垫与荧光抗体之间的吸附作用力适当,提高荧光抗体的解吸率,降低检测限,提高检测精度;③可直接对全血样本检测,简化了检测过程;④可以改变荧光抗体表面特性,防止荧光抗体的凝集;⑤防止待检样本中其他物质与荧光抗体的非特异性结合,提高准确度。

具体实施方式

[0049] 为了进一步了解本发明,下面结合实施例对本发明的技术方案进行描述,但是应当理解,这些描述只是为进一步说明本发明的特征和优点,而不是对本发明权利要求的限定。

[0050] 实施例1

[0051] 将本发明的封闭剂组合物及样品垫的封闭方法应用于胎盘生长因子荧光免疫层析试剂盒制备及测试结果如下。

[0052] 胎盘生长因子(placenta growth factor,简称PLGF)免疫层析试剂盒是用于定性或者定量检测血液样品中胎盘生长因子,用来评估胎盘功能不全,以及对由此引起的子痫前期进行预测、鉴别和治疗检测。胎盘生长因子免疫层析试剂盒主要由样品垫、检测膜和吸水垫组成。

[0053] 样品垫为玻璃纤维膜,其上涂布有偶联荧光微球的胎盘生长因子单克隆抗体。

[0054] 检测膜为硝酸纤维素膜,检测膜上喷涂含有胎盘生长因子单克隆抗体的检测线;还有质控线,涂布有羊抗鼠IgG多克隆抗体。

[0055] 胎盘生长因子免疫层析试剂盒的生产中所用的原料及生产方法,除本实施例特别指出外,均使用本领域技术人员所知的常规原材料和方法。

[0056] 作为样品垫的玻璃纤维膜采用本发明的封闭剂组合物进行封闭处理,在不同的制备过程中使用的封闭剂组合物各组分的质量浓度百分比如下表所示:

[0057]

编号	质量浓度百分比 (聚氧乙烯蓖麻油:聚乙烯醇: 海藻糖:蔗糖)	缓冲液组成	缓冲液浓度 (mmol/L)	缓冲液 pH 值
A ₁	0.25% : 0.05% : 1.0% : 10%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	40	6
A ₂	0.55% : 0.30% : 6.0% : 20%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	100	8
A ₃	0.35% : 0.10% : 2.0% : 12%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	90	6.5
A ₄	0.50% : 0.20% : 5.0% : 18%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	80	7.6
A ₅	0.40% : 0.14% : 4.5% : 13%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	50	6.8
A ₆	0.41% : 0.15% : 4.0% : 16%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	70	7.4
A ₇	0.45% : 0.12% : 3.0% : 14%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	60	7.0

[0058] 作为样品垫的玻璃纤维膜采用本发明所述的样品垫封闭方法进行处理,封闭方法步骤为:步骤1) 浸泡:将样品垫放入封闭剂组合物的溶液中浸泡一定的时间;步骤2) 干燥:将步骤1) 的样品垫取出,在一定温度下中干燥一定时间。

[0059] 在不同的制备过程中使用的封闭方法参数如下表所示:

编号	浸泡时间 (小时)	干燥温度 (°C)	干燥时间 (小时)
B ₁	0.5	30	4
B ₂	1.5	40	3
B ₃	1.0	37	5
B ₄	2.0	20	6
B ₅	2.0	26	7

[0062] 分别使用本领域技术人员知晓的常规方法和本实施例所述的封闭剂组合物及样品垫的封闭方法,处理样品垫,然后采用本领域技术人员知晓的常规方法制备胎盘生长因子荧光免疫层析试剂盒。

[0063] 使用上述条件制备的胎盘生长因子荧光免疫层析试剂盒对胎盘生长因子 (PLGF) 固定浓度的标准品 (100pg/mL) 进行测定,计算各试剂盒的性能参数如下:

[0064] 准确度测定:取PLGF固定浓度的标准品 (100pg/mL),随机选取3个批次的PLGF试剂条,加入标准品,在同一台分析仪上检测,重复测定三次,计算相对偏差,相对偏差越小,则表明测定结果约准确;

[0065] 批内精密度测试:取低浓度和高浓度质控品,用同一批试剂条,在同一台分析仪上检测,每个水平重复15次,计算变异系数,变异系数越小则表明批内精密度越高,产品质量约稳定;

[0066] 批间精密度测试:取三个不同批次的试剂条,用固定浓度的测试品测试,使用同一台分析仪检测,计算三个批号的试剂条的平均值,和总平均值,计算极差,极差越小则表明批间精密度越高,产品质量约稳定。

[0067] 采用常规方法制备的试剂盒使用的测定对象是血清,而使用本发明所述的封闭剂组合物及其封闭方法对样品垫进行预处理,检测对象是全血样品。

[0068] 因所选择的封闭剂组合物的组成比例和封闭方法条件较多,两类条件再排列组合后,产生的结果很多,故将部分条件的排列组合得到的试剂盒的测定结果列在下表所示:

[0069]

测定条件	待测样品形态	相对偏差	批内精密度	批间精密度
常规方法所得试剂盒	血清	13.8%	13.2%	12.9%
A ₁ B ₁	全血	9.3%	10.9%	11.6%
A ₂ B ₂	全血	9.9%	11.4%	10.9%
A ₃ B ₃	全血	9.6%	11.2%	11.0%
A ₄ B ₄	全血	9.0%	9.7%	9.5%
A ₅ B ₅	全血	10.0%	11.2%	10.6%

[0070]

A ₆ B ₁	全血	9.9%	11.1%	10.5%
A ₇ B ₃	全血	9.2%	10.8%	10.6%
A ₇ B ₄	全血	8.2%	10.2%	10.4%
A ₇ B ₂	全血	8.8%	10.1%	9.6%
A ₆ B ₂	全血	8.6%	9.6%	9.3%
A ₆ B ₃	全血	7.9%	10.4%	10.2%
A ₆ B ₄	全血	8.3%	10.0%	10.0%
A ₅ B ₂	全血	8.3%	9.8%	9.7%
A ₅ B ₃	全血	8.0%	10.6%	9.2%
A ₅ B ₄	全血	9.0%	10.5%	9.8%
A ₄ B ₁	全血	10.0%	11.4%	11.0%
A ₄ B ₃	全血	8.8%	9.9%	9.4%
A ₃ B ₅	全血	9.8%	11.3%	10.7%
A ₃ B ₁	全血	10.1%	10.9%	10.6%
A ₃ B ₂	全血	9.4%	11.0%	11.1%

[0071] 从表中的测定结果可以看出,使用本发明所述封闭剂组合物及封闭方法处理后的玻璃纤维膜作为样品垫制备的胎盘生长因子免疫层析试剂盒的测定结果的相对偏差在8.2%~10.1%之间,小于采用常规方法制备的胎盘生长因子免疫层析试剂盒的测定结果

的相对偏差13.8%，表明使用本发明所述封闭剂组合物及封闭方法处理后的玻璃纤维膜作为样品垫制备的胎盘生长因子免疫层析试剂盒的测定结果的准确度更高；使用本发明所述的封闭剂组合物及封闭方法处理后的玻璃纤维膜作为样品垫制备的胎盘生长因子免疫层析试剂盒的测定结果的批内精密度在9.6%~11.4%之间，批间精密度在9.2%~11.6%之间，比采用常规方法制备的胎盘生长因子免疫层析试剂盒的测定结果更稳定，表明使用本发明所述封闭剂组合物及封闭方法处理后的玻璃纤维膜作为样品垫制备的胎盘生长因子免疫层析试剂盒的测定结果重复性更好，产品质量更稳定。

[0072] 实施例2

[0073] 将本发明的封闭剂组合物及荧光抗体的封闭方法应用于胎盘生长因子荧光免疫层析试剂盒制备及测试结果如下。

[0074] 胎盘生长因子免疫层析试剂盒的基本介绍如实施例1所述。

[0075] 胎盘生长因子免疫层析试剂盒的生产中所用的原料及生产方法，除本实施例特别指出外，均使用本领域技术人员所知的常规原材料和方法。

[0076] 采用常规方法，将抗体和荧光微球经偶联后得到荧光抗体，而后经离心，然后将上清液倒掉，以去掉未结合的抗体，再进行封闭处理。

[0077] 使用本发明的封闭剂组合物对荧光抗体进行封闭处理，在不同的制备过程中使用的封闭剂组合物各组分的质量浓度百分比如下表所示：

[0078]

编号	质量浓度百分比 (聚氧乙烯蓖麻油:聚乙烯醇: 海藻糖:蔗糖)	缓冲液组成	缓冲液浓度 (mmol/L)	缓冲液 pH 值
C ₁	0.02% : 0.05% : 1.0% : 10%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	10	6
C ₂	0.25% : 0.30% : 6.0% : 20%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	40	8
C ₃	0.05% : 0.10% : 2.0% : 12.5%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	10	6
C ₄	0.20% : 0.25% : 5.0% : 18.5%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	28	7.4
C ₅	0.10% : 0.19% : 3.0% : 13.5%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	20	6.8
C ₆	0.08% : 0.20% : 4.2% : 15%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	16	6.7
C ₇	0.13% : 0.18% : 4.5% : 16%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	26	7.0

[0079] 采用本发明所述的荧光抗体封闭方法对荧光抗体进行处理，封闭方法包括以下步骤：将洗涤后的荧光抗体使用超声处理，使其完全分散，悬浮于本发明的封闭剂组合物的溶液中进行封闭。

[0080] 分别使用常规方法和本实施例所述的封闭剂组合物及荧光抗体的封闭方法，处理荧光抗体，然后采用本领域技术人员知晓的常规方法制备胎盘生长因子荧光免疫层析试剂盒。

[0081] 使用实施例1所述PLGF标准固定浓度的标准品(100pg/mL)及测试方法对上述条件制备的胎盘生长因子荧光免疫层析试剂盒进行测试。

[0082] 本实施例中试剂盒使用的测定对象是血清。

[0083] 得到的试剂盒的测定结果列在下表所示：

[0084]

测定条件	相对偏差	批内精密度	批间精密度
常规方法	13.8%	13.2%	12.9%
C ₁	10.0%	9.8%	11.4%
C ₂	8.7%	10.1%	11.1%
C ₃	9.6%	10.2%	10.2%
C ₄	8.9%	10.3%	10.4%
C ₅	9.0%	10.9%	10.8%
C ₆	9.9%	10.5%	10.9%
C ₇	8.8%	9.9%	10.3%

[0085] 从表中的测定结果可以看出,使用本发明所述封闭剂组合物及封闭方法处理后的荧光抗体制备的胎盘生长因子免疫层析试剂盒的测定结果的相对偏差在8.8%~10.0%之间,小于采用常规方法制备的胎盘生长因子免疫层析试剂盒的相对偏差13.8%,表明使用本发明所述封闭剂组合物及封闭方法处理后的荧光抗体制备的胎盘生长因子免疫层析试剂盒的测定结果更准确;使用本发明所述的封闭剂组合物及封闭方法处理后的荧光抗体制备的胎盘生长因子免疫层析试剂盒的测定结果的批内精密度在9.8%~10.9%之间,批间精密度在10.2%~11.4%之间,比采用常规方法制备的胎盘生长因子免疫层析试剂盒的测定结果更稳定,表明使用本发明所述封闭剂组合物及封闭方法处理后的荧光抗体制备的胎盘生长因子免疫层析试剂盒的测定结果重复性更好。

[0086] 实施例3

[0087] 将本发明的封闭剂组合物及样品垫的封闭方法和荧光抗体的封闭保存方法应用于胎盘生长因子荧光免疫层析试剂盒制备及测试结果如下。

[0088] 胎盘生长因子免疫层析试剂盒的基本介绍如实施例1所述。

[0089] 胎盘生长因子免疫层析试剂盒的生产中所用的原料及生产方法,除本实施例特别指出外,均使用本领域技术人员所知的常规原材料和方法。

[0090] 作为样品垫的玻璃纤维膜采用本发明的封闭剂组合物进行封闭处理,在不同的制备过程中使用的封闭剂组合物各组分的质量浓度百分比如下表所示:

[0091]

编号	质量浓度百分比 (聚氧乙烯蓖麻油:聚乙烯醇: 海藻糖:蔗糖)	缓冲液组成	缓冲液浓度 (mmol/L)	缓冲液 pH 值
A ₁	0.25% : 0.05% : 1.0% : 10%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	40	6
A ₂	0.55% : 0.30% : 6.0% : 20%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	100	8
A ₃	0.35% : 0.10% : 2.0% : 12%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	90	6.5
A ₄	0.50% : 0.20% : 5.0% : 18%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	80	7.6
A ₅	0.40% : 0.14% : 4.5% : 13%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	50	6.8
A ₆	0.41% : 0.15% : 4.0% : 16%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	70	7.4
A ₇	0.45% : 0.12% : 3.0% : 14%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	60	7.0

[0092] 作为样品垫的玻璃纤维膜采用本发明所述的样品垫封闭方法进行处理,封闭方法步骤为:步骤1)浸泡:将样品垫放入封闭剂组合物的溶液中浸泡一定的时间;步骤2)干燥:将步骤1)的样品垫取出,在一定温度下中干燥一定时间。

[0093] 在不同的制备过程中使用的封闭方法参数如下表所示:

[0094]

编号	浸泡时间(小时)	干燥温度(°C)	干燥时间(小时)
B ₁	0.5	30	4
B ₂	1.5	40	3
B ₃	1.0	37	5
B ₄	2.0	20	6
B ₅	2.0	26	7

[0095] 使用本发明的封闭剂组合物对荧光抗体进行封闭处理,在不同的制备过程中使用的封闭剂组合物各组分的质量浓度百分比如下表所示:

[0096]

编号	质量浓度百分比 (聚氧乙烯蓖麻油:聚乙烯醇: 海藻糖:蔗糖)	缓冲液组成	缓冲液浓度 (mmol/L)	缓冲液 pH 值
C ₁	0.02% : 0.05% : 1.0% : 10%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	10	6
C ₂	0.25% : 0.30% : 6.0% : 20%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	40	8
C ₃	0.05% : 0.10% : 2.0% : 12.5%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	10	6.0
C ₄	0.20% : 0.25% : 5.0% : 18.5%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	28	7.4
C ₅	0.10% : 0.19% : 3.0% : 13.5%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	20	6.8
C ₆	0.08% : 0.20% : 4.2% : 15%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	16	6.7
C ₇	0.13% : 0.18% : 4.5% : 16%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	26	7.0

[0097] 采用本发明所述的荧光抗体封闭方法对荧光抗体进行处理,封闭方法包括以下步骤:将洗涤后的荧光抗体使用超声处理,使其完全分散,悬浮于本发明的封闭剂组合物的溶液中进行封闭。

[0098] 分别使用本领域技术人员知晓的常规方法和本实施例所述的封闭剂组合物及样品垫的封闭方法,处理样品垫。分别使用常规方法和本实施例所述的封闭剂组合物及荧光抗体的封闭方法,处理荧光抗体,然后采用本领域技术人员知晓的常规方法制备胎盘生长因子荧光免疫层析试剂盒。

[0099] 使用实施例1所述PLGF标准固定浓度的标准品(100pg/mL)及测试方法对上述条件制备的胎盘生长因子荧光免疫层析试剂盒进行测试。

[0100] 本实施例中试剂盒使用的测定对象是血清。

[0101] 因所选择的封闭剂组合物的组成比例、封闭方法、保存方法条件较多,三类条件再排列组合后,产生的结果很多,故将部分条件的排列组合得到的试剂盒的测定结果列在下表所示:

[0102]

测定条件	待测样品形态	相对偏差	批内精密度	批间精密度
常规方法	血清	13.8%	13.2%	12.9%

[0103]

A ₁ B ₁ C ₆	全血	7.6%	9.9%	9.5%
A ₂ B ₂ C ₇	全血	6.9%	9.4%	9.8%
A ₃ B ₃ C ₁	全血	6.4%	9.7%	9.2%
A ₄ B ₄ C ₂	全血	7.1%	10.1%	10.8%
A ₅ B ₅ C ₃	全血	6.6%	9.6%	9.7%
A ₆ B ₁ C ₄	全血	6.7%	9.9%	9.9%
A ₇ B ₃ C ₅	全血	6.2%	9.3%	9.0%
A ₇ B ₄ C ₆	全血	5.6%	8.6%	8.7%
A ₇ B ₂ C ₇	全血	4.8%	8.7%	8.9%
A ₆ B ₂ C ₁	全血	7.2%	9.3%	9.4%
A ₆ B ₃ C ₂	全血	6.8%	9.5%	9.7%
A ₆ B ₄ C ₃	全血	7.5%	10.0%	9.5%
A ₅ B ₂ C ₄	全血	6.9%	9.8%	9.1%
A ₅ B ₃ C ₅	全血	5.1%	9.4%	8.8%
A ₅ B ₄ C ₆	全血	4.9%	8.4%	8.6%
A ₄ B ₁ C ₇	全血	7.0%	9.7%	9.8%
A ₄ B ₃ C ₁	全血	6.9%	9.8%	9.3%
A ₃ B ₅ C ₂	全血	7.4%	9.5%	10.1%
A ₃ B ₁ C ₃	全血	6.9%	10.4%	9.6%
A ₃ B ₂ C ₄	全血	7.0%	10.2%	9.9%

[0104] 从表中的测定结果可以看出,使用本发明所述的封闭剂组合物、封闭方法和保存方法处理后的样品垫和荧光抗体制备的胎盘生长因子免疫层析试剂盒的测定结果的相对偏差在4.8%~7.6%之间,比采用常规方法制备的胎盘生长因子免疫层析试剂盒的测定结果的相对偏差13.8%更小,表明使用本发明所述的封闭剂组合物、封闭方法和保存方法处理后的样品垫和荧光抗体制备的胎盘生长因子免疫层析试剂盒的测定结果更准确;使用本发明所述的封闭剂组合物、封闭方法和保存方法处理后的样品垫和荧光抗体制备的胎盘生长因子免疫层析试剂盒的批内精密度和批间精密度分别在8.4%~10.4%之间和8.6%~10.8%之间,比采用常规方法制备的胎盘生长因子免疫层析试剂盒的测定结果更稳定。

[0105] 采用本发明的封闭剂组合物及方法制备的胎盘生长因子免疫层析试剂盒的测定结果的相对偏差低,意味着测定结果更加准确,能够提高临床诊断的正确性,尤其是处于诊断标准附近的样品。例如,对相同血液样品(PLGF实际浓度约为90pg/mL)进行多次测定,采

用本发明所述的封闭剂组合物及方法制备的胎盘生长因子免疫层析试剂盒的测定结果几乎全部在83.2~96.8pg/mL(以标准偏差为7.6%计算),依此作为诊断依据得出的诊断结果全部正确(正常人群的PLGF参考值 ≥ 100 pg/mL,如果孕妇检测数值低于100,说明胎盘发育有问题)。若采用现有技术的方法(以标准偏差为13.8%计算)制备的胎盘生长因子免疫层析试剂盒对上述血液样品进行多次测定,其显示的PLGF浓度范围为77.6~102.4pg/mL,如果检测结果显示为102pg/mL,则不正常的结果被诊断成了正常的结果,产生假阴性的结果,容易造成误诊。

[0106] 综上所述,本发明的的封闭剂组合物及方法制备的胎盘生长因子免疫层析试剂盒的测定结果准确度更高,可快速的为医生提供更加精准更加可靠的诊断依据,让医生更加迅速的为病人提供准确可靠的医治方案。

[0107] 子痫前期,是孕妇和围产儿死亡的主要原因,PLGF为子痫前期的诊断标志物,如果能够在发病初期及时准确的观测到孕妇PLGF浓度,尽快的采取医治手段,就能够避免出现危险。

[0108] 实施例4

[0109] 将本发明的封闭剂组合物及样品垫的封闭方法应用于心肾两项荧光免疫层析试剂盒制备及测试结果如下。

[0110] 心肾两项免疫层析试剂盒是用于定性或者定量检测血液样品中B型钠尿肽(BNP)和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL),用辅助诊断心力衰竭、急性肾损伤,以及对急性心肾综合征的早起诊断。心肾两项免疫层析试剂盒主要由样品垫、检测膜和吸水垫组成。

[0111] 样品垫为玻璃纤维膜,其上涂布有偶联荧光微球的BNP单克隆抗体和偶联荧光微球的NGAL单克隆抗体。

[0112] 检测膜为硝酸纤维素膜,检测膜上喷涂含有BNP单克隆抗体的检测线和喷涂含有NGAL单克隆抗体的检测线,还有质控线,涂布有羊抗鼠IgG多克隆抗体。

[0113] 心肾两项免疫层析试剂盒的生产中所用的原料及生产方法,除本实施例特别指出外,均使用本领域技术人员所知的常规原材料和方法。

[0114] 作为样品垫的玻璃纤维膜采用本发明的封闭剂组合物进行封闭处理,在不同的制备过程中使用的封闭剂组合物各组分的质量浓度百分比如下表所示:

[0115]

编号	质量浓度百分比 (聚氧乙烯蓖麻油:聚乙烯醇: 海藻糖:蔗糖)	缓冲液组成	缓冲液浓度 (mmol/L)	缓冲液 pH 值
A ₁	0.25% : 0.05% : 1.0% : 10%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	40	6
A ₂	0.55% : 0.30% : 6.0% : 20%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	100	8

[0116]

A ₃	0.35% : 0.10% : 2.0% : 12%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	90	6.5
A ₄	0.50% : 0.20% : 5.0% : 18%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	80	7.6
A ₅	0.40% : 0.14% : 4.5% : 13%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	50	6.8
A ₆	0.41% : 0.15% : 4.0% : 16%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	70	7.4
A ₇	0.45% : 0.12% : 3.0% : 14%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	60	7.0

[0117] 作为样品垫的玻璃纤维膜采用本发明所述的样品垫封闭方法进行处理,封闭方法步骤为:步骤1)浸泡:将样品垫放入封闭剂组合物的溶液中浸泡一定的时间;步骤2)干燥:将步骤1)的样品垫取出,在一定温度下中干燥一定时间。

[0118] 在不同的制备过程中使用的封闭方法参数如下表所示:

[0119]

编号	浸泡时间(小时)	干燥温度(°C)	干燥时间(小时)
B ₁	0.5	30	4
B ₂	1.5	40	3
B ₃	1.0	37	5
B ₄	2.0	20	6
B ₅	2.0	26	7

[0120] 分别使用本领域技术人员知晓的常规方法和本实施例所述的封闭剂组合物及样品垫的封闭方法,处理样品垫,然后采用本领域技术人员知晓的常规方法制备心肾两项荧光免疫层析试剂盒。

[0121] 使用上述条件制备的心肾两项荧光免疫层析试剂盒,对固定浓度的标准品的B型钠尿肽(BNP,1667pg/mL)和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL,300ng/mL)进行测定,测定结果经实施例1所述的计算方法得到各试剂盒的性能参数。

[0122] 因所选择的封闭剂组合物的组成比例和封闭方法条件较多,两类条件再排列组合后,产生的结果很多,故将部分条件的排列组合得到的试剂盒的测定结果列在下表所示:

[0123]

测定条件	待测样品形态	BNP 相对偏差	BNP 批内精密度	BNP 批间精密度	NGAL 相对偏差	NGAL 批内精密度	NGAL 批间精密度
常规方法	血清	13.1%	13.4%	12.0%	13.6%	13.5%	12.2%
A ₁ B ₁	全血	9.9%	11.6%	10.9%	10.6%	11.4%	11.1%
A ₂ B ₂	全血	10.0%	11.2%	10.8%	11.0%	11.0%	11.7%
A ₃ B ₃	全血	10.3%	11.7%	10.7%	9.1%	10.7%	10.6%
A ₄ B ₄	全血	10.1%	10.6%	10.9%	9.2%	10.4%	10.6%
A ₅ B ₅	全血	9.9%	11.1%	11.1%	9.9%	10.6%	11.2%
A ₆ B ₁	全血	9.5%	11.3%	10.4%	10.8%	10.4%	11.8%

[0124]

A ₇ B ₃	全血	9.6%	10.7%	10.8%	10.0%	10.2%	11.0%
A ₇ B ₄	全血	8.5%	9.9%	9.8%	8.3%	9.0%	9.0%
A ₇ B ₂	全血	9.9%	11.3%	10.9%	9.8%	10.8%	11.6%
A ₆ B ₂	全血	8.7%	10.4%	9.8%	9.0%	9.5%	9.5%
A ₆ B ₃	全血	9.5%	10.7%	10.3%	9.4%	10.1%	10.5%
A ₆ B ₄	全血	9.6%	11.2%	11.2%	9.2%	10.7%	11.4%
A ₅ B ₂	全血	9.3%	11.0%	10.8%	9.4%	8.5%	11.1%
A ₅ B ₃	全血	9.7%	10.9%	11.2%	10.6%	11.2%	10.7%
A ₅ B ₄	全血	9.4%	9.7%	10.7%	8.6%	9.8%	10.0%
A ₄ B ₁	全血	9.7%	10.4%	11.9%	9.3%	10.5%	10.8%
A ₄ B ₃	全血	9.9%	10.9%	11%	11.1%	10.6%	11.2%
A ₃ B ₅	全血	10.1%	11.3%	9.9%	10.3%	10.4%	11.1%
A ₃ B ₁	全血	9.6%	10.9%	10.6%	9.90%	11.4%	10.9%
A ₃ B ₂	全血	9.8%	11.6%	10.8%	10.50%	10.7%	10.8%

[0125] 从表中的测定结果可以看出,使用本发明所述的封闭剂组合物及封闭方法处理后的玻璃纤维膜作为样品垫制备的心肾两项免疫层析试剂盒的BNP测定结果的相对偏差在8.5%~10.1%之间,NGAL测定结果的相对偏差在8.3%~11.1%之间,均比采用常规方法制备的心肾两项免疫层析试剂盒的BNP测和NGAL测定结果的相对偏差13.1%和13.6%更小;使用本发明所述的封闭剂组合物及封闭方法处理后的玻璃纤维膜作为样品垫制备的心肾两项免疫层析试剂盒的BNP测定结果的批内精密度在9.7%~11.7%之间,批间精密度在9.8%~11.9%之间,NGAL测定结果的批内精密度在8.5%~11.4%之间,批间精密度在9.5%~11.6%之间,比采用常规方法制备的心肾两项免疫层析试剂盒的BNP和NGAL的测定结果的更稳定。

[0126] 实施例5

[0127] 将本发明的封闭剂组合物及荧光抗体的封闭方法应用于心肾两项荧光免疫层析试剂盒制备及测试结果如下。

[0128] 心肾两项免疫层析试剂盒的基本介绍如实施例4所述。

[0129] 心肾两项免疫层析试剂盒的生产中所用的原料及生产方法,除本实施例特别指出外,均使用本领域技术人员所知的常规原材料和方法。

[0130] 采用常规方法,将BNP单克隆抗体、NGAL单克隆抗体分别与荧光微球经偶联后得到荧光抗体,而后经离心,然后将上清液倒掉,以去掉未结合的抗体,再进行封闭处理。

[0131] 使用本发明的封闭剂组合物对荧光抗体进行封闭处理,在不同的制备过程中使用的封闭剂组合物各组分的质量浓度百分比如下表所示:

[0132]

编号	质量浓度百分比 (聚氧乙烯蓖麻油:聚乙烯醇: 海藻糖:蔗糖)	缓冲液组成	缓冲液浓度 (mmol/L)	缓冲液 pH 值
C ₁	0.02% : 0.05% : 1.0% : 10%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	10	6
C ₂	0.25% : 0.30% : 6.0% : 20%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	40	8
C ₃	0.05% : 0.10% : 2.0% : 12.5%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	10	6.0
C ₄	0.20% : 0.25% : 5.0% : 18.5%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	28	7.4
C ₅	0.10% : 0.19% : 3.0% : 13.5%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	20	6.8
C ₆	0.08% : 0.20% : 4.2% : 15%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	16	6.7
C ₇	0.13% : 0.18% : 4.5% : 16%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	26	7.0

[0133] 采用本发明所述的荧光抗体封闭方法对荧光抗体进行处理,封闭方法包括以下步骤:将洗涤后的荧光抗体使用超声处理,使其完全分散,悬浮于本发明的封闭剂组合物的溶液中进行封闭。

[0134] 分别使用常规方法和本实施例所述的封闭剂组合物及荧光抗体的封闭方法,处理荧光抗体,然后采用本领域技术人员知晓的常规方法制备心肾两项荧光免疫层析试剂盒。

[0135] 使用实施例4所述的BNP和NGAL标准品,采用实施例1所述的试剂盒性能参数测试方法,对上述试剂盒进行测试。

[0136] 得到的试剂盒的测定结果列在下表所示:

[0137]

测定 条件	BNP 相对偏差	BNP 批内精密 度	BNP 批间精密 度	NGAL 相对偏差	NG AL 批内 精密度	NG AL 批间 精密度
常规方法	13.1%	13.4%	12.0%	13.6%	13.5%	12.2%
C ₁	10.5%	11.0%	10.9%	10.6%	11.2%	10.5%
C ₂	9.8%	10.1%	10.5%	9.9%	9.9%	11.0%
C ₃	9.4%	10.9%	10.7%	10.1%	10.7%	10.8%
C ₄	10.4%	10.8%	10.6%	9.6%	10.4%	10.3%
C ₅	9.6%	10.7%	10.8%	9.8%	10.5%	10.6%
C ₆	9.1%	10.4%	10.4%	9.5%	10.1%	10.0%
C ₇	10.3%	11.2%	10.8%	10.3%	11.0%	11.2%

[0138] 从表中的测定结果可以看出,使用本发明所述的封闭剂组合物及封闭方法处理后的荧光抗体制备的心肾两项免疫层析试剂盒的BNP测定结果的相对偏差在9.1%~10.5%之间,NGAL测定结果的相对偏差在9.5%~10.6%之间,均比采用常规方法制备的心肾两项免疫层析试剂盒的BNP测和NGAL测定结果的相对偏差13.1%和13.6%更小;使用本发明所述的封闭剂组合物及封闭方法处理后的荧光抗体制备的心肾两项免疫层析试剂盒的BNP测

定结果的批内精密度在10.1%~11.2%之间,批间精密度在10.4%~10.9%之间,NGAL测定结果的批内精密度在9.9%~11.2%之间,批间精密度在10.0%~11.2%之间,比采用常规方法制备的心肾两项免疫层析试剂盒的测定结果的BNP和NGAL的测定结果更稳定。

[0139] 实施例6

[0140] 将本发明的封闭剂组合物及样品垫的封闭方法和荧光抗体的封闭保存方法应用于心肾两项荧光免疫层析试剂盒制备及测试结果如下。

[0141] 心肾两项免疫层析试剂盒的基本介绍如实施例4所述。

[0142] 心肾两项免疫层析试剂盒的生产中所用的原料及生产方法,除本实施例特别指出外,均使用本领域技术人员所知的常规原材料和方法。

[0143] 作为样品垫的玻璃纤维膜使用本发明的封闭剂组合物进行封闭处理,在不同的制备过程中使用的封闭剂组合物各组分的质量浓度百分比如下表所示:

[0144]

编号	质量浓度百分比 (聚氧乙烯蓖麻油:聚乙烯醇: 海藻糖:蔗糖)	缓冲液组成	缓冲液浓度 (mmol/L)	缓冲液 pH 值
A ₁	0.25% : 0.05% : 1.0% : 10%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	40	6
A ₂	0.55% : 0.30% : 6.0% : 20%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	100	8
A ₃	0.35% : 0.10% : 2.0% : 12%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	90	6.5
A ₄	0.50% : 0.20% : 5.0% : 18%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	80	7.6
A ₅	0.40% : 0.14% : 4.5% : 13%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	50	6.8
A ₆	0.41% : 0.15% : 4.0% : 16%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	70	7.4
A ₇	0.45% : 0.12% : 3.0% : 14%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	60	7.0

[0145] 作为样品垫的玻璃纤维膜采用本发明所述的样品垫封闭方法进行处理,封闭方法步骤为:步骤1)浸泡:将样品垫放入封闭剂组合物的溶液中浸泡一定的时间;步骤2)干燥:将步骤1)的样品垫取出,在一定温度下中干燥一定时间。

[0146] 在不同的制备过程中使用的封闭方法参数如下表所示:

	编号	浸泡时间（小时）	干燥温度（℃）	干燥时间（小时）
[0147]	B ₁	0.5	30	4
	B ₂	1.5	40	3
[0148]	B ₃	1.0	37	5
	B ₄	2.0	20	6
	B ₅	2.0	26	7

[0149] 使用本发明的封闭剂组合物对荧光抗体进行封闭处理,在不同的制备过程中使用的封闭剂组合物各组分的质量浓度百分比如下表所示:

[0150]

编号	质量浓度百分比 (聚氧乙烯蓖麻油:聚乙烯醇: 海藻糖:蔗糖)	缓冲液组成	缓冲液浓度 (mmol/L)	缓冲液 pH 值
C ₁	0.02% : 0.05% : 1.0% : 10%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	10	6
C ₂	0.25% : 0.30% : 6.0% : 20%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	40	8
C ₃	0.05% : 0.10% : 2.0% : 12.5%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	10	6.0
C ₄	0.20% : 0.25% : 5.0% : 18.5%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	28	7.4
C ₅	0.10% : 0.19% : 3.0% : 13.5%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	20	6.8
C ₆	0.08% : 0.20% : 4.2% : 15%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	16	6.7
C ₇	0.13% : 0.18% : 4.5% : 16%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	26	7.0

[0151] 采用本发明所述的荧光抗体封闭方法对荧光抗体进行处理,封闭方法包括以下步骤:将洗涤后的荧光抗体使用超声处理,使其完全分散,悬浮于本发明的封闭剂组合物的溶液中进行封闭。

[0152] 分别使用本领域技术人员知晓的常规方法和本实施例所述的封闭剂组合物及样品垫的封闭方法,处理样品垫。分别使用常规方法和本实施例所述的封闭剂组合物及荧光抗体的封闭方法,处理荧光抗体,然后采用本领域技术人员知晓的常规方法制备心肾两项荧光免疫层析试剂盒。

[0153] 使用实施例4所述的BNP和NGAL标准品,采用实施例1所述的试剂盒性能参数测试方法,对上述试剂盒进行测试。

[0154] 因所选择的封闭剂组合物的组成比例、封闭方法、保存方法条件较多,三类条件再排列组合后,产生的结果很多,故将部分条件的排列组合得到的试剂盒的测定结果列在下表所示:

[0155]

测定条件	待测样品形态	BNP 相对偏差	BNP 批内精密度	BNP 批间精密度	NGAL 相对偏差	NGAL 批内精密度	NGAL 批间精密度
常规方法	血清	13.1%	13.4%	12.0%	13.6%	13.5%	12.2%
A ₁ B ₁ C ₄	全血	6.8%	10.6%	9.8%	7.4%	10.2%	9.8%
A ₂ B ₂ C ₅	全血	7.1%	9.8%	9.6%	7.7%	9.9%	10.3%
A ₃ B ₃ C ₆	全血	7.3%	9.6%	9.4%	6.0%	9.4%	9.4%

[0156]

A ₄ B ₄ C ₇	全血	7.0%	10.1%	9.9%	5.9%	9.0%	9.1%
A ₅ B ₅ C ₁	全血	6.9%	9.7%	10.0%	6.9%	9.6%	10.1%
A ₆ B ₁ C ₂	全血	6.6%	9.9%	9.2%	7.6%	9.2%	10.5%
A ₇ B ₃ C ₃	全血	6.4%	10.2%	9.6%	6.7%	9.1%	9.6%
A ₇ B ₄ C ₄	全血	5.6%	8.4%	8.6%	5.2%	8.7%	8.8%
A ₇ B ₂ C ₅	全血	6.8%	10.2%	9.8%	6.5%	9.4%	9.7%
A ₆ B ₂ C ₆	全血	5.9%	9.2%	7.6%	6.0%	8.5%	8.9%
A ₆ B ₃ C ₇	全血	6.3%	9.5%	8.9%	6.2%	8.9%	9.2%
A ₆ B ₄ C ₁	全血	6.8%	10.1%	9.7%	5.9%	9.6%	10.0%
A ₅ B ₂ C ₂	全血	6.9%	10.0%	9.5%	6.3%	7.2%	9.9%
A ₅ B ₃ C ₃	全血	6.6%	9.0%	9.8%	7.3%	9.8%	10.2%
A ₅ B ₄ C ₄	全血	5.1%	8.8%	8.2%	5.6%	8.8%	8.9%
A ₄ B ₁ C ₅	全血	6.6%	9.3%	9.7%	6.1%	9.3%	9.5%
A ₄ B ₃ C ₆	全血	6.5%	9.6%	10%	7.8%	9.5%	9.8%
A ₃ B ₅ C ₇	全血	7.2%	9.9%	8.8%	7.2%	9.1%	9.9%
A ₃ B ₁ C ₁	全血	6.9%	9.7%	9.3%	6.6%	10.0%	10.4%
A ₃ B ₂ C ₂	全血	6.7%	10.3%	9.9%	7.5%	9.7%	9.7%

[0157] 从表中的测定结果可以看出,使用本发明所述的封闭剂组合物、封闭方法和保存方法处理后的样品垫和荧光抗体制备的心肾两项免疫层析试剂盒的BNP测定结果的相对偏差在5.1%~7.3%之间,NGAL测定结果的相对偏差在5.2%~7.8%之间,均比采用常规方法制备的心肾两项免疫层析试剂盒的BNP测和NGAL测定结果相对偏差13.1%~13.6%更小;使用本发明所述的封闭剂组合物、封闭方法和保存方法处理后的样品垫和荧光抗体制备的心肾两项免疫层析试剂盒的BNP测定结果的批内精密度在8.4%~10.6%之间,批间精密度在8.2%~10.0%之间,NGAL测定结果的批内精密度在8.5%~10.2%之间,批间精密度在8.8%~10.5%之间,比采用常规方法制备的心肾两项免疫层析试剂盒的BNP和NGAL的测定结果更稳定。

[0158] 采用本发明的封闭剂组合物及方法制备的心肾两项免疫层析试剂盒的测定结果的相对偏差低,意味着测定结果更加准确,能够提高临床诊断的正确性,尤其是处于诊断标准附近的样品。例如,对相同血液样品(BNP实际浓度约为92pg/mL)进行多次测定,采用本发明所述的封闭剂组合物及方法制备的心肾两项免疫层析试剂盒的测定结果几乎全部在85.3~98.7pg/mL(以标准偏差为7.3%计算),依此作为诊断依据得出的诊断结果全部正确(正常人群B型钠尿肽的参考值小于100pg/mL)。若采用现有技术的方法制备的心肾两项免疫层析试剂盒对上述血液样品进行多次测定,以其标准偏差为13.4%计算,测定的BNP浓度范围为79.6~104.3pg/mL,则有一部分测定结果超出了诊断标准,产生假阳性的结果,容易造成误诊。

[0159] 综上所述,本发明的的封闭剂组合物及方法制备的心肾两项免疫层析试剂盒的测定结果准确度更高,可快速的为医生提供更加精准更加可靠的诊断依据,让医生更加迅速准确的观察病人心脏及肾脏的病程,为病人提供及时准确的医治方案。并且心衰和肾脏衰竭属于严重威胁病人生命的疾病,因此诊断结果的可靠性与病人的性命息息相关,如果不能及时准确的观测心肾的情况,很可能错过最近的治疗时期耽误医治。

[0160] 实施例7

[0161] 将本发明的封闭剂组合物及样品垫的封闭方法应用于甲状腺三项荧光免疫层析试剂盒制备及测试结果如下。

[0162] 甲状腺三项免疫层析试剂盒是用于定性或者定量检测血液样品中促甲状腺激素(TSH)、游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)、游离甲状腺素(FT4),用诊断甲状腺功能是否正常。甲状腺三项免疫层析试剂盒主要由样品垫、检测膜和吸水垫组成。

[0163] 样品垫为玻璃纤维膜,其上涂布有偶联荧光微球的TSH单克隆抗体、偶联荧光微球的T3单克隆抗体、偶联荧光微球的T4单克隆抗体。

[0164] “三碘甲状腺原氨酸”简称“T3”;“游离的三碘甲状腺原氨酸”简称“FT3”;“甲状腺素”简称“T4”;“游离的甲状腺素”简称“FT4”。

[0165] 检测膜为硝酸纤维素膜,检测膜上喷涂含有TSH单克隆抗体的检测线、含有T3单克隆抗体的检测线、含有T4单克隆抗体的检测线,还有质控线,涂布有羊抗鼠IgG多克隆抗体。

[0166] 甲状腺三项免疫层析试剂盒的生产中所用的原料及生产方法,除本实施例特别指出外,均使用本领域技术人员所知的常规原材料和方法。

[0167] 作为样品垫的玻璃纤维膜使用本发明的封闭剂组合物进行封闭处理,在不同的制备过程中使用的封闭剂组合物各组分的质量浓度百分比如下表所示:

[0168]

编号	质量浓度百分比 (聚氧乙烯蓖麻油:聚乙烯醇: 海藻糖:蔗糖)	缓冲液组成	缓冲液浓度 (mmol/L)	缓冲液 pH 值
A ₁	0.25% : 0.05% : 1.0% : 10%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	40	6
A ₂	0.55% : 0.30% : 6.0% : 20%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	100	8
A ₃	0.35% : 0.10% : 2.0% : 12%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	90	6.5

[0169]

A ₄	0.50% : 0.20% : 5.0% : 18%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	80	7.6
A ₅	0.40% : 0.14% : 4.5% : 13%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	50	6.8
A ₆	0.41% : 0.15% : 4.0% : 16%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	70	7.4
A ₇	0.45% : 0.12% : 3.0% : 14%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	60	7.0

[0170] 作为样品垫的玻璃纤维膜采用本发明所述的样品垫封闭方法进行处理,封闭方法步骤为:步骤1) 浸泡:将样品垫放入封闭剂组合物的溶液中浸泡一定的时间;步骤2) 干燥:将步骤1) 的样品垫取出,在一定温度下中干燥一定时间。

[0171] 在不同的制备过程中使用的封闭方法参数如下表所示:

[0172]

编号	浸泡时间(小时)	干燥温度(°C)	干燥时间(小时)
B ₁	0.5	30	4
B ₂	1.5	40	3
B ₃	1.0	37	5
B ₄	2.0	20	6
B ₅	2.0	26	7

[0173] 分别使用本领域技术人员知晓的常规方法和本实施例所述的封闭剂组合物及样品垫的封闭方法,处理样品垫,然后采用本领域技术人员知晓的常规方法制备甲状腺三项荧光免疫层析试剂盒。

[0174] 使用上述条件制备的甲状腺三项荧光免疫层析试剂盒,对固定浓度的标准品的促甲状腺激素(TSH,2.5mU/L)、三碘甲腺原氨酸(T₃,200ng/dL)和甲状腺素(T₄,1.5ng/dL)进行测定,测定结果经实施例1所述的计算方法得到各试剂盒的性能参数。

[0175] 因所选择的封闭剂组合物的组成比例和封闭方法条件较多,两类条件再排列组合后,产生的结果很多,故将部分条件的排列组合得到的试剂盒的测定结果列在下表所示:

[0176]

测定条件	样品形态	TSH 相对 偏差	TSH 批内 精密度	TSH 批间 精密度	FT ₃ 相对 偏差	FT ₃ 批内 精密度	FT ₃ 批间 精密度	FT ₄ 相对 偏差	FT ₄ 批内 精密度	FT ₄ 批间 精密度
常规方法	血清	14.0%	13.4%	13.6%	13.8%	13.6%	13.7%	14.2%	13.2%	13.4%
A ₁ B ₁	全血	10.8%	11.5%	11.2%	10.2%	11.5%	11.2%	9.9%	11.2%	11.6%
A ₂ B ₂	全血	10.5%	10.7%	11.7%	10.6%	10.8%	10.4%	10.6%	11.4%	11.3%
A ₃	全血	9.9%	11.5%	10.6%	10.5%	11.3%	10.9%	9.8%	10.9%	11.2%

[0177]

B ₃										
A ₄ B ₄	全血	10.4%	11.3%	11.7%	9.9%	11.5%	11.2%	10.5%	10.6%	11.4%
A ₅ B ₅	全血	10.1%	10.7%	10.9%	9.8%	11.1%	11.1%	9.7%	10.9%	10.9%
A ₆ B ₁	全血	10.6%	10.9%	11.1%	10.3%	11.8%	10.7%	10.3%	10.9%	10.5%
A ₇ B ₃	全血	9.0%	9.7%	10.1%	8.3%	9.5%	9.7%	9.6%	9.9%	9.9%
A ₇ B ₄	全血	8.8%	10.4%	10.6%	9.6%	10.2%	9.8%	8.8%	9.0%	9.9%
A ₇ B ₂	全血	9.3%	9.9%	9.2%	9.8%	9.6%	9.8%	8.4%	9.2%	10.2%
A ₆ B ₂	全血	9.9%	11.1%	11%	10.2%	11.6%	10.5%	10.8%	11.4%	10.6%
A ₆ B ₃	全血	9.6%	11.3%	11.6%	9.6%	10.7%	10.6%	10.1%	10.8%	11.4%
A ₆ B ₄	全血	10.0%	10.3%	11.4%	10.5%	11.5%	11.2%	10.8%	11.4%	10.8%
A ₅ B ₂	全血	10.5%	11.2%	10.9%	10.2%	11.1%	10.7%	10.1%	10.3%	11.5%
A ₅ B ₃	全血	9.6%	10.7%	10.8%	9.8%	10.5%	10.2%	9.4%	10.3%	10.3%
A ₅ B ₄	全血	8.7%	9.4%	9.9%	8.7%	10.1%	9.9%	8.5%	9.6%	9.8%
A ₄ B ₁	全血	9.8%	11.5%	10.9%	10.9%	11.3%	11.2%	9.5%	11.1%	10.4%
A ₄ B ₃	全血	10.4%	11.2%	11.2%	9.7%	11.3%	11.6%	10.5%	10.3%	11.1%
A ₃ B ₅	全血	11%	11.2%	11.9%	10.6%	10.8%	11.3%	10.1%	11.3%	11.2%
A ₃ B ₁	全血	10.8%	11.7%	11.2%	10.1%	11.2%	10.7%	10.7%	11.5%	10.6%
A ₃ B ₂	全血	9.9%	10.6%	11.6%	10.2%	11.9%	10.7%	9.9%	10.5%	11.2%

[0178] 从表中的测定结果可以看出,使用本发明所述的封闭剂组合物及封闭方法处理后的玻璃纤维膜作为样品垫制备的甲状腺三项免疫层析试剂盒的TSH测定结果的相对偏差在8.7%~10.8%之间,FT3测定结果的相对偏差在8.3%~10.6%之间,FT4测定结果的相对偏差在8.4%~10.8%之间,比采用常规方法制备的甲状腺三项免疫层析试剂盒的TSH、FT3、FT4测定结果准确度更好;使用本发明所述的封闭剂组合物及封闭方法处理后的玻璃纤维膜作为样品垫制备的甲状腺三项免疫层析试剂盒的TSH测定结果的批内精密度和批间

精密度分别在9.4%~11.7%之间和9.2%~11.9%之间,FT3测定结果的批内精密度和批间精密度分别在9.5%~11.9%之间和9.7%~11.6%之间,FT4测定结果的批内精密度和批间精密度分别在9.6%~11.5%之间和9.8%~11.6%之间,比采用常规方法制备的甲状腺三项免疫层析试剂盒的测定结果更稳定。

[0179] 实施例8

[0180] 将本发明的封闭剂组合物及荧光抗体的封闭方法应用于甲状腺三项荧光免疫层析试剂盒制备及测试结果如下。

[0181] 甲状腺三项免疫层析试剂盒的基本介绍如实施例7所述。

[0182] 甲状腺三项免疫层析试剂盒的生产中所用的原料及生产方法,除本实施例特别指出外,均使用本领域技术人员所知的常规原材料和方法。

[0183] 采用常规方法,将TSH单克隆抗体、T3单克隆抗体和T4单克隆抗体分别与荧光微球经偶联后得到荧光抗体,而后经离心,然后将上清液倒掉,以去掉未结合的抗体,再进行封闭处理。

[0184] 使用本发明的封闭剂组合物对荧光抗体进行封闭处理,在不同的制备过程中使用的封闭剂组合物各组分的质量浓度百分比如下表所示:

[0185]

编号	质量浓度百分比 (聚氧乙烯蓖麻油:聚乙烯醇: 海藻糖:蔗糖)	缓冲液组成	缓冲液浓度 (mmol/L)	缓冲液 pH 值
C ₁	0.02% : 0.05% : 1.0% : 10%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	10	6
C ₂	0.25% : 0.30% : 6.0% : 20%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	40	8
C ₃	0.05% : 0.10% : 2.0% : 12.5%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	10	6.0
C ₄	0.20% : 0.25% : 5.0% : 18.5%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	28	7.4
C ₅	0.10% : 0.19% : 3.0% : 13.5%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	20	6.8
C ₆	0.08% : 0.20% : 4.2% : 15%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	16	6.7
C ₇	0.13% : 0.18% : 4.5% : 16%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	26	7.0

[0186] 采用本发明所述的荧光抗体封闭方法对荧光抗体进行处理,封闭方法包括以下步骤:将洗涤后的荧光抗体使用超声处理,使其完全分散,悬浮于本发明的封闭剂组合物的溶液中进行封闭。

[0187] 分别使用常规方法和本实施例所述的封闭剂组合物及荧光抗体的封闭方法,处理荧光抗体,然后采用本领域技术人员知晓的常规方法制备甲状腺三项荧光免疫层析试剂盒。

[0188] 使用实施例7所述的TSH、T3和T4标准品,采用实施例1所述的试剂盒性能参数测试方法,对上述试剂盒进行测试。

[0189] 得到的试剂盒的测定结果列在如下表所示:

[0190]

测定条件	TSH相对偏差	TSH批内精密度	TSH批间精密度	FT3相对偏差	FT3批内精密度	FT3批间精密度	FT4相对偏差	FT4批内精密度	FT4批间精密度
常规方法	14.0%	13.4%	13.6%	13.8%	13.6%	13.7%	14.2%	13.2%	13.4%
C ₁	10.6%	11.3%	11.5%	10.7%	11.3%	10.9%	10.4%	11.4%	10.4%
C ₂	10%	10.2%	10.4%	10.1%	10.1%	10.8%	10%	9.9%	10.8%
C ₃	9.3%	11.1%	10.5%	10%	10.8%	10.6%	10.3%	11%	10.6%
C ₄	10.2%	10.7%	10.7%	9.4%	10.6%	10.4%	9.5%	10%	10.4%
C ₅	9.5%	10.9%	10.5%	9.7%	10.6%	10.7%	10%	10.8%	10.6%
C ₆	9.2%	10.2%	10.6%	9.6%	10.2%	10.5%	9.3%	10.3%	10.3%
C ₇	10.5%	11.4%	10.7%	10.5%	11.2%	11.6%	10.4%	11.1%	11.8%

[0191] 从表中的测定结果可以看出,使用本发明所述的封闭剂组合物及封闭保存方法处理后的荧光抗体制备的甲状腺三项免疫层析试剂盒的TSH测定结果的相对偏差在9.2%~10.6%之间,FT3测定结果的相对偏差在9.4%~10.7%之间,FT4测定结果的相对偏差在9.3%~10.4%之间,比采用常规方法制备的甲状腺三项免疫层析试剂盒的TSH、FT3、FT4测定结果相对偏差更小;使用本发明所述的封闭剂组合物及封闭保存方法处理后的荧光抗体制备的甲状腺三项免疫层析试剂盒的TSH测定结果的批内精密度和批间精密度分别在10.2%~11.4%之间和10.6%~11.5%之间,FT3测定结果的批内精密度和批间精密度分别在10.2%~11.3%之间和10.4%~11.6%之间,FT4测定结果的批内精密度和批间精密度分别在9.9%~11.4%之间和10.3%~11.8%之间,比采用常规方法制备的甲状腺三项免疫层析试剂盒的测定结果更稳定。

[0192] 实施例9

[0193] 将本发明的封闭剂组合物及样品垫的封闭方法和荧光抗体的封闭保存方法应用于甲状腺三项荧光免疫层析试剂盒制备及测试结果如下。

[0194] 甲状腺三项免疫层析试剂盒的基本介绍如实施例7所述。

[0195] 甲状腺三项免疫层析试剂盒的生产中所用的原料及生产方法,除本实施例特别指出外,均使用本领域技术人员所知的常规原材料和方法。

[0196] 作为样品垫的玻璃纤维膜使用本发明的封闭剂组合物进行封闭处理,在不同的制备过程中使用的封闭剂组合物各组分的质量浓度百分比如下表所示:

[0197]

编号	质量浓度百分比 (聚氧乙烯蓖麻油:聚乙烯醇: 海藻糖:蔗糖)	缓冲液组成	缓冲液浓度 (mmol/L)	缓冲液 pH 值
A ₁	0.25% : 0.05% : 1.0% : 10%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	40	6
A ₂	0.55% : 0.30% : 6.0% : 20%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	100	8
A ₃	0.35% : 0.10% : 2.0% : 12%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	90	6.5
A ₄	0.50% : 0.20% : 5.0% : 18%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	80	7.6
A ₅	0.40% : 0.14% : 4.5% : 13%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	50	6.8
A ₆	0.41% : 0.15% : 4.0% : 16%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	70	7.4
A ₇	0.45% : 0.12% : 3.0% : 14%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	60	7.0

[0198] 作为样品垫的玻璃纤维膜采用本发明所述的样品垫封闭方法进行处理,封闭方法步骤为:步骤1)浸泡:将样品垫放入封闭剂组合物的溶液中浸泡一定的时间;步骤2)干燥:将步骤1)的样品垫取出,在一定温度下中干燥一定时间。

[0199] 在不同的制备过程中使用的封闭方法参数如下表所示:

[0200]

编号	浸泡时间(小时)	干燥温度(°C)	干燥时间(小时)
B ₁	0.5	30	4
B ₂	1.5	40	3
B ₃	1.0	37	5
B ₄	2.0	20	6
B ₅	2.0	26	7

[0201] 使用本发明的封闭剂组合物对荧光抗体进行封闭处理,在不同的制备过程中使用的封闭剂组合物各组分的质量浓度百分比如下表所示:

[0202]

编号	质量浓度百分比 (聚氧乙烯蓖麻油:聚乙烯醇: 海藻糖:蔗糖)	缓冲液组成	缓冲液浓度 (mmol/L)	缓冲液 pH 值
C ₁	0.02% : 0.05% : 1.0% : 10%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	10	6
C ₂	0.25% : 0.30% : 6.0% : 20%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	40	8
C ₃	0.05% : 0.10% : 2.0% : 12.5%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	10	6.0
C ₄	0.20% : 0.25% : 5.0% : 18.5%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	28	7.4
C ₅	0.10% : 0.19% : 3.0% : 13.5%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	20	6.8
C ₆	0.08% : 0.20% : 4.2% : 15%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	16	6.7
C ₇	0.13% : 0.18% : 4.5% : 16%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	26	7.0

[0203] 采用本发明所述的荧光抗体封闭方法对荧光抗体进行处理,封闭方法包括以下步

骤：将洗涤后的荧光抗体使用超声处理，使其完全分散，悬浮于本发明的封闭剂组合物的溶液中进行封闭。

[0204] 分别使用本领域技术人员知晓的常规方法和本实施例所述的封闭剂组合物及样品垫的封闭方法，处理样品垫。分别使用常规方法和本实施例所述的封闭剂组合物及荧光抗体的封闭方法，处理荧光抗体，然后采用本领域技术人员知晓的常规方法制备甲状腺三项荧光免疫层析试剂盒。

[0205] 使用实施例7所述的TSH、T3和T4标准品，采用实施例1所述的试剂盒性能参数测试方法，对上述试剂盒进行测试。

[0206] 因所选择的封闭剂组合物的组成比例、封闭方法、保存方法条件较多，三类条件再排列组合后，产生的结果很多，故将部分条件的排列组合得到的试剂盒的测定结果列在下表所示：

[0207]

测定条件	待测样品形态	TSH 相对偏差	TSH 批内精密度	TSH 批间精密度	FT3 相对偏差	FT3 批内精密度	FT3 批间精密度	FT4 相对偏差	FT4 批内精密度	FT4 批间精密度
常规方法	血清	14.0%	13.4%	13.6%	13.8%	13.6%	13.7%	14.2%	13.2%	13.4%
A ₁ B ₁ C ₆	全血	7.7%	10.4%	9.8%	7.0%	9.6%	9.7%	6.5%	10.0%	10.5%
A ₂ B ₂ C ₇	全血	7.3%	9.7%	10.2%	7.5%	9.7%	9.0%	7.4%	10.3%	10.6%
A ₃ B ₃ C ₁	全血	6.9%	10.3%	9.2%	7.6%	10.1%	9.3%	6.7%	9.8%	9.8%
A ₄ B ₄ C ₂	全血	7.2%	10.0%	10.1%	6.6%	9.8%	9.7%	7.3%	9.4%	10.4%
A ₅ B ₅ C ₃	全血	7.0%	9.6%	9.7%	6.8%	10.0%	10.0%	6.4%	9.9%	9.7%
A ₆ B ₁ C ₄	全血	7.4%	9.9%	9.6%	7.2%	10.0%	9.3%	7.1%	9.6%	9.2%
A ₇ B ₃ C ₅	全血	6.0%	8.5%	8.7%	5.4%	8.2%	7.9%	5.9%	8.8%	8.2%
A ₇ B ₄ C ₆	全血	5.6%	9.1%	9.0%	6.3%	9.2%	8.7%	5.6%	7.8%	8.7%
A ₇ B ₂ C ₇	全血	6.2%	8.8%	8.6%	6.0%	8.5%	8.6%	5.1%	8.2%	9.0%
A ₆ B ₂ C ₁	全血	6.7%	9.7%	9.4%	6.9%	9.9%	9.2%	7.6%	10.2%	9.6%
A ₆ B ₃ C ₂	全血	6.5%	10.2%	10.4%	6.6%	9.6%	9.5%	6.8%	9.8%	10.6%
A ₆ B ₄ C ₃	全血	7.1%	9.3%	9.9%	7.4%	10.0%	9.8%	7.6%	9.7%	9.5%
A ₅ B ₂ C ₄	全血	7.5%	9.8%	9.5%	7.1%	9.9%	9.1%	7.0%	9.2%	10.3%
A ₅ B ₃ C ₅	全血	6.4%	9.4%	9.2%	6.5%	9.5%	8.9%	6.2%	9.1%	9.3%
A ₅ B ₄ C ₆	全血	5.7%	8.2%	8.5%	5.8%	8.9%	8.6%	5.5%	8.4%	8.9%
A ₄ B ₁ C ₇	全血	6.6%	10.2%	9.3%	7.6%	10.0%	9.9%	6.3%	9.9%	9.4%
A ₄ B ₃ C ₁	全血	7.3%	10.1%	10.0%	6.7%	9.9%	9.5%	7.2%	9.3%	9.9%
A ₃ B ₅ C ₂	全血	7.8%	9.9%	10.3%	7.3%	9.8%	10.5%	6.9%	10.1%	10.2%
A ₃ B ₁ C ₃	全血	7.6%	10.4%	9.6%	6.8%	10.0%	9.4%	7.5%	10.3%	9.6%
A ₃ B ₂ C ₄	全血	6.8%	9.5%	10.4%	7.2%	10.1%	9.6%	6.6%	9.5%	10.0%

[0208] 从表中的测定结果可以看出,使用本发明所述的封闭剂组合物、封闭方法和保存方法处理后的样品垫和荧光抗体制备的甲状腺三项免疫层析试剂盒的TSH测定结果的相对偏差在5.6%~7.8%之间,FT3测定结果的相对偏差在5.4%~7.6%之间,FT4测定结果的相对偏差在5.1%~7.6%之间,比采用常规方法制备的甲状腺三项免疫层析试剂盒的TSH、FT3、FT4测定结果的相对偏差更小;使用本发明所述的封闭剂组合物、封闭方法和保存方法处理后的样品垫和荧光抗体制备的甲状腺三项免疫层析试剂盒的TSH测定结果的批内精密度和批间精密度分别在8.2%~10.4%之间和8.5%~10.4%之间,FT3测定结果的批内精密度和批间精密度分别在8.2%~10.1%之间和8.6%~10.5%之间,FT4测定结果的批内精密度和批间精密度分别在7.8%~10.3%之间和8.2%~10.6%之间,比采用常规方法制备的甲状腺三项免疫层析试剂盒的测定结果更稳定。

[0209] 采用本发明的封闭剂组合物及方法制备的甲状腺三项免疫层析试剂盒的测定结果的相对偏差低,意味着测定结果更加准确,能够提高临床诊断的正确性,尤其是处于诊断标准附近的样品。例如,对相同血液样品(TSH实际浓度约为4.5mU/L)进行多次测定,采用本发明所述的封闭剂组合物及方法制备的甲状腺三项免疫层析试剂盒的测定结果几乎全部在4.1~4.9mU/L(以标准偏差为7.8%计算),依此作为诊断依据得出的诊断结果全部正确(正常人THS范围:0.3~5.0mU/L)。若采用现有技术的方法制备的甲状腺三项免疫层析试剂盒对上述血液样品进行多次测定,以标准偏差为14%计算,其显示的TSH浓度范围为3.87~5.13mU/L,则有一部分测定结果超出了诊断标准,产生假阳性的结果,容易造成误诊。

[0210] 综上所述,本发明的的封闭剂组合物及方法制备的甲状腺三项免疫层析试剂盒的测定结果准确度更高,可快速的为医生提供更加精准更加可靠的诊断依据,让医生更方便、直观了解病人甲状腺的功能状态,做出准确甲状腺功能的临床评价,为病人提供及时准确的医治方案。且甲状腺相关疾病的病情恢复期需要频繁进行复查(3~6个月复查一次),本发明的涉及的试剂盒具有较高的批内精密度和批间精密度,更长的周期内使用了同批或者不同批的试剂盒做诊断,病人不同时期的检查结果也更加具有可比性,为医生判断病人的病情提供有力的帮助。

专利名称(译)	一种免疫层析用封闭剂组合物、用途、及免疫层析试剂盒的制备方法		
公开(公告)号	CN109324181A	公开(公告)日	2019-02-12
申请号	CN201811229346.3	申请日	2018-10-22
[标]申请(专利权)人(译)	河北特温特生物科技发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	河北特温特生物科技发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	河北特温特生物科技发展有限公司		
[标]发明人	郭耀光 牛海燕		
发明人	郭耀光 牛海燕		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种免疫层析用封闭剂组合物、用途、及免疫层析试剂盒的制备方法。所述封闭剂组合物包括聚氧乙烯蓖麻油、聚乙烯醇、海藻糖、蔗糖和磷酸缓冲液。采用所述封闭剂和封闭方法对样品垫进行处理，可防止样品垫对目标物质的吸附，促进荧光抗体释放；采用所述封闭剂和封闭方法对荧光抗体进行处理，可有效防止荧光抗体的凝集，保持分散状态，还可防止干扰物质与荧光抗体的非特异性结合从而影响目标物质与荧光抗体的结合。采用本发明所述的免疫层析用封闭剂组合物、用途、及免疫层析试剂盒的制备方法能够提高免疫层析试剂盒的检测准确性和稳定性，可直接对全血样品进行检测，简化测定过程。

编号	质量浓度百分比 (聚氧乙烯蓖麻油:聚乙烯醇: 海藻糖:蔗糖)	缓冲液组成	缓冲液浓度 (mmol/L)	缓冲液 pH 值
A ₁	0.25%:0.05%:1.0%:10%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	40	6
A ₂	0.55%:0.30%:6.0%:20%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	100	8
A ₃	0.35%:0.10%:2.0%:12%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	90	6.5
A ₄	0.50%:0.20%:5.0%:18%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	80	7.6
A ₅	0.40%:0.14%:4.5%:13%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	50	6.8
A ₆	0.41%:0.15%:4.0%:16%	Na ₂ HPO ₄ 和 NaH ₂ PO ₄	70	7.4
A ₇	0.45%:0.12%:3.0%:14%	K ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	60	7.0