



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110133247 A

(43)申请公布日 2019.08.16

(21)申请号 201910440781.9

(22)申请日 2019.05.24

(71)申请人 深圳上泰生物工程有限公司

地址 518000 广东省深圳市光明新区光明
街道观光路3009号光明科技园A1栋9
楼

(72)发明人 陈小茹 严小莉 吴向东

(74)专利代理机构 深圳鼎合诚知识产权代理有
限公司 44281

代理人 张海平 彭家恩

(51)Int.Cl.

G01N 33/536(2006.01)

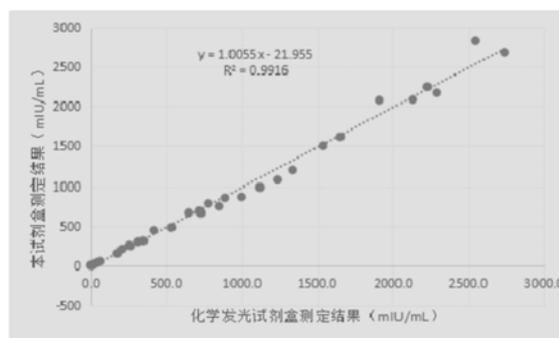
权利要求书1页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

一种用于检测目的抗原的免疫胶乳比浊法测定试剂盒

(57)摘要

本申请提供一种用于检测目的抗原的免疫胶乳比浊法测定试剂盒,包括R1试剂、R2试剂,R1试剂包含促凝剂和缓冲液,R2试剂包含偶联有抗所述目的抗原的抗体的纳米微球和缓冲液,该纳米微球包括大纳米微球和小纳米微球,小纳米微球的平均粒径在50nm至250nm之间,大纳米微球的平均粒径在250nm至400nm之间,且大纳米微球的平均粒径与小纳米微球的平均粒径相差在50nm以上。由于平均粒径的差异,本发明的测定试剂盒对目的抗原的测定可兼顾灵敏度和线性范围,具有灵敏度高、检测范围宽的优点,而且检测性能媲美化学发光免疫分析法,避免化学发光分析仪封闭且昂贵等缺点,可以用于测定β-HCG及其他抗原。



1. 一种用于检测目的抗原的免疫胶乳比浊法测定试剂盒,其特征在于,包括R1试剂、R2试剂,所述R1试剂包含促凝剂和缓冲液,所述R2试剂包含偶联有抗所述目的抗原的抗体的纳米微球和缓冲液,所述纳米微球包括大纳米微球和小纳米微球,所述小纳米微球的平均粒径在50nm至250nm之间,所述大纳米微球的平均粒径在250nm至400nm之间,且所述大纳米微球的平均粒径与所述小纳米微球的平均粒径相差在50nm以上。

2. 根据权利要求1所述的测定试剂盒,其特征在于,所述纳米微球选自聚苯乙烯微球、聚丙烯酸微球和聚丙烯酸酯微球中的一种或多种。

3. 根据权利要求1所述的测定试剂盒,其特征在于,所述促凝剂为分子量8,000至300,000的PEG或PVP。

4. 根据权利要求1所述的测定试剂盒,其特征在于,按所述R1试剂的总重量,所述促凝剂的浓度在0.1至5重量%之间;优选地,按所述R1试剂的总重量,所述促凝剂的浓度在0.2至2重量%之间。

5. 根据权利要求1所述的测定试剂盒,其特征在于,所述R1试剂和所述R2试剂还包含缓冲液,所述R1试剂和所述R2试剂的所述缓冲液各自独立地选自磷酸缓冲液、Tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、HEPES缓冲液、硼酸缓冲液、醋酸缓冲液中的一种或更多种,所述R1试剂和所述R2试剂的所述缓冲液的pH值各自独立地在5至9之间;优选地,所述R1试剂和所述R2试剂的所述缓冲液的pH值各自独立地在6.5至8之间。

6. 根据权利要求1所述的测定试剂盒,其特征在于,所述R1试剂和所述R2试剂的所述缓冲液的浓度各自独立地在10至500nM之间,优选地,所述R1试剂和所述R2试剂的缓冲液的浓度各自独立地在100至200nM。

7. 根据权利要求1所述的测定试剂盒,其特征在于,所述R1试剂还包含NaCl、防腐剂和稳定剂中的一种或多种;优选地,NaCl的浓度在0.1至0.5M之间,所述防腐剂的浓度按所述R1试剂的总重量计0.05至0.2重量%之间,所述稳定剂浓度按所述R1试剂的总重量计0.05至0.5重量%之间;优选地,所述防腐剂为NaN₃,所述稳定剂为BSA。

8. 根据权利要求1所述的测定试剂盒,其特征在于,还包括校准品和质控品,所述校准品包含浓度为0mIU/mL、10mIU/mL、20mIU/mL、50mIU/mL、100mIU/mL、200mIU/mL、300mIU/mL、500mIU/mL、1000mIU/mL、1500mIU/mL、3000mIU/mL的所述目的抗原,所述质控品包含浓度为10至200mIU/mL的所述目的抗原和100至1000mIU/mL的所述目的抗原。

9. 根据权利要求8所述的测定试剂盒,其特征在于,所述校准品和所述质控品还包含缓冲液、防腐剂和稳定剂;优选地,所述校准品和所述质控品的所述缓冲液各自独立地为磷酸缓冲液、Tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、HEPES缓冲液、硼酸缓冲液、醋酸缓冲液中的一种或更多种,所述防腐剂为NaN₃,所述稳定剂为BSA。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的测定试剂盒,其特征在于,所述目的抗原为β-HCG。

一种用于检测目的抗原的免疫胶乳比浊法测定试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫分析医学技术领域,具体涉及一种用于检测目的抗原如 β -HCG的免疫胶乳比浊法测定试剂盒。

背景技术

[0002] 目前常用的检测目的抗原的方法有胶体金法、放射免疫分析法(RIA)、酶联免疫分析法(ELISA)、化学发光免疫分析法(CLIA)和免疫比浊法。胶体金法存在灵敏度低、重复性差、无法定量分析等缺点。RIA存在放射性污染、标记物半衰期短、对操作者具有放射性损伤,且操作繁琐、时间长等缺点。ELISA存在灵敏度低、检测范围窄等缺点。CLIA灵敏度高,检测范围宽,但需在封闭式全自动化学发光检测系统上使用,需要昂贵的全自动化学发光免疫分析仪,从而限制了推广使用。

[0003] 免疫比浊法是抗原抗体结合动态测定方法。当目的抗原与抗体在特定稀释系统中反应而且比例合适(一般规定抗体过量)时,形成的可溶性免疫复合物在稀释系统中的促聚剂(聚乙二醇等)的作用下,自液相析出,形成微粒,使反应液出现浊度。在抗体浓度固定的情况下,形成的免疫复合物的量随着检样中抗原量的增加而增加,反应液的浊度也随之增加。通过测定反应液的浊度与一系列标准品的相应浊度对照,即可计算出检样中抗原的含量。免疫比浊法包括免疫透射比浊法、免疫散射比浊法。免疫胶乳比浊法是将待测的目的抗原相对应的抗体包被在胶乳颗粒上,使抗原抗体结合物的体积增大,光通过之后,透射光和散射光的强度变化更为显著,从而提高检测的灵敏度,但在实际检测中发现,检测的线性范围不够宽。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于对现有的免疫胶乳比浊法的缺陷而提出一种新型的免疫胶乳比浊法测定试剂盒,该测定试剂盒在检测中能兼顾检测的灵敏度和线性范围。

[0005] 本发明的目的通过如下的技术方案来实现:

[0006] 在本发明的一些实施方案中,提供一种用于检测目的抗原的免疫胶乳比浊法测定试剂盒,包括R1试剂、R2试剂,R1试剂包含促凝剂和缓冲液,R2试剂包含偶联有抗目的抗原的抗体的纳米微球和缓冲液,纳米微球包括大纳米微球和小纳米微球,小纳米微球的平均粒径在50nm至250nm之间,大纳米微球的平均粒径在250nm至400nm之间,且大纳米微球的平均粒径与小纳米微球的平均粒径相差在50nm以上。

[0007] 例如,小纳米微球的平均粒径可以为50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、110nm、120nm、130nm、140nm、150nm、160nm、170nm、180nm、190nm、200nm、210nm、220nm、230nm、240nm、250nm,或者它们之间的任何数值,大纳米微球的平均粒径可以为260nm、270nm、280nm、290nm、300nm、310nm、320nm、330nm、340nm、350nm、360nm、370nm、380nm、390nm、400nm,或者它们之间的任何数值,且大纳米微球的平均粒径与小纳米微球的平均粒径相差在50nm以上,例如相差100nm、150nm、200nm、250nm、300nm、350nm。

[0008] 例如,小纳米微球的平均粒径可以为50nm,大纳米微球的平均粒径为350nm(平均粒径相差300nm);或者小纳米微球的平均粒径可以为100nm,大纳米微球的平均粒径为400nm(平均粒径相差300nm);或者小纳米微球的平均粒径可以为100nm,大纳米微球的平均粒径为350nm(平均粒径相差250nm);或者小纳米微球的平均粒径可以为150nm,大纳米微球的平均粒径为350nm(平均粒径相差200nm);或者小纳米微球的平均粒径可以为150nm,大纳米微球的平均粒径为300nm(平均粒径相差150nm);或者小纳米微球的平均粒径可以为200nm,大纳米微球的平均粒径为300nm(平均粒径相差100nm);或者小纳米微球的平均粒径可以为250nm,大纳米微球的平均粒径为300nm(平均粒径相差50nm);或者小纳米微球的平均粒径可以为200nm,大纳米微球的平均粒径为250nm(平均粒径相差50nm)。

[0009] 大纳米微球与小纳米微球的重量比可以为1:10、1:5、1:2、1:1、2:1、5:1或10:1,或者上述比例之间的任何比例。

[0010] 本发明的测定试剂盒中使用的纳米微球可以是聚苯乙烯微球、聚丙烯酸微球和聚丙烯酸酯微球中的一种或多种,但也可以使用其他合适的纳米微球。具体地,大纳米微球的平均粒径与小纳米微球可以各自独立地为聚苯乙烯微球、聚丙烯酸微球和聚丙烯酸酯微球中的一种或多种。这些纳米微球可以市售获得,或者通过本领域公知的方法制备得到。

[0011] 本发明的测定试剂盒中使用的促凝剂为任何适合在免疫胶乳比浊法中使用的促凝剂。具体地,促凝剂为分子量8,000至300,000的PEG或PVP等。具体地,促凝剂的浓度为0.1%至5%(m/v);优选地,促凝剂的浓度为0.2%至2%(m/v)。

[0012] 本发明的测定试剂盒中使用的缓冲剂为任何适合在免疫胶乳比浊法中使用的缓冲剂。具体地,R1试剂和R2试剂的缓冲液各自独立地选自磷酸缓冲液、Tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、HEPES缓冲液、硼酸缓冲液、醋酸缓冲液中的一种或更多种。具体地,R1试剂和R2试剂的缓冲液的pH值各自独立地在5至9之间;优选地,R1试剂和R2试剂的缓冲液的pH值各自独立地在6.5至8之间。具体地,R1试剂和R2试剂的缓冲液的浓度各自独立地在10至500nM之间;优选地,R1试剂和R2试剂的缓冲液的浓度各自独立地在100至200nM。

[0013] 具体地,本发明的测定试剂盒中的R1试剂还包含NaCl、防腐剂和稳定剂中的一种或多种。优选地,NaCl的浓度在0.1至0.5M之间,防腐剂的浓度为0.05%至0.2%(m/v),稳定剂浓度为0.05%至0.5%(m/v)。优选地,防腐剂为 NaN_3 ,稳定剂为BSA。

[0014] 在本发明的另一些实施方案中,本发明的测定试剂盒还包括校准品和质控品。该校准品包含浓度为0mIU/mL、10mIU/mL、20mIU/mL、50mIU/mL、100mIU/mL、200mIU/mL、300mIU/mL、500mIU/mL、1000mIU/mL、1500mIU/mL、3000mIU/mL的目的抗原,该质控品包含浓度为10至200mIU/mL的目的抗原和100至1000mIU/mL的目的抗原。

[0015] 具体地,校准品和质控品还包含缓冲液、防腐剂和稳定剂。优选地,校准品和质控品的缓冲液各自独立地为磷酸缓冲液、Tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、HEPES缓冲液、硼酸缓冲液、醋酸缓冲液中的一种或更多种,其浓度范围和pH值范围可以参照R1试剂和R2试剂的缓冲液的浓度范围和pH值范围。优选地,防腐剂为 NaN_3 ,稳定剂为BSA。校准品和质控品可制备成液体形式或冻干粉形式。校准品的值可溯源至国际参考物质NIBSC75/551(英国NIBSC)。

[0016] 在本发明的一些具体实施方案中,目的抗原为 β -HCG(人绒毛膜促性腺激素 β 亚基),相应地,抗目的抗原的抗体为抗 β -HCG抗体。

[0017] 本发明的有益效果:

[0018] 本发明的免疫胶乳比浊法测定试剂盒,通过使用平均粒径相差在50nm以上的大纳米微球和小纳米微球两种纳米微球,在偶联了抗目的抗原的抗体后,按合适比例混合配制R2试剂,与R1试剂一起使用对样品中的目的抗原的含量进行免疫胶乳比浊法测定,可兼顾灵敏度和线性范围,具有灵敏度高、检测范围宽的优点,而且检测性能媲美化学发光免疫分析法,但可实现在全自动生化分析仪器上进行检测,而无需全自动化学发光免疫分析仪,避免化学发光分析仪封闭且昂贵等缺点。

附图说明

[0019] 图1显示本发明的免疫胶乳比浊法测定试剂盒与化学发光免疫分析法测定试剂盒的方法学对比。

具体实施方式

[0020] 下面通过具体实施方式并结合附图对本发明作进一步详细说明。应当理解,这些描述仅出于说明本发明的目的,并不意在以任何方式限制本发明。

[0021] 除非另外定义,本文使用的所有技术和科学术语与本公开所属领域技术人员通常理解的含义相同。如果有冲突,以本说明书的定义为准。除另有说明的外,本文所用的化学物质和仪器可市售获得。本文中使用的材料、方法和示例仅作参考用途,无意作为限制,除非特别指明。

[0022] I. R1试剂的配制

[0023] 按“发明内容”部分所述的R1试剂所含的组分(例如PEG及任选的NaCl、NaN₃和BSA),按组分含量配比溶于缓冲液(例如磷酸缓冲液)中,充分搅拌以促进溶解,制得R1试剂。

[0024] II. R2试剂的配制

[0025] 从市售途径获得平均粒径在50nm至250nm之间、表面带有羧基的聚苯乙烯微球、聚丙烯酸微球或聚丙烯酸酯微球(小纳米微球),用pH=5.0-8.5的活化缓冲液(可选用磷酸缓冲液、Tris缓冲液或MES缓冲液)稀释至浓度为0.2-2% (m/v),加入适量的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶液,在4℃条件下进行活化反应0.5-2小时后,1500-20000rpm离心15-30min,去上清,向沉淀中加入pH=5.0-8.5的活化缓冲液,超声分散,得到活化的纳米微球悬浊液。向活化的纳米微球悬浊液中加入过量的β-hCG抗体,在4℃条件下反应1-4小时后,加入足量的甘氨酸溶液或商品化的封闭剂进行封闭,1500-20000rpm离心15-30min,去上清,用活化缓冲液清洗1-4次,用含有“发明内容”部分所述的R2试剂缓冲液及任选的稳定剂、防腐剂的储存液重悬纳米微球,超声分散,得到β-HCG抗体偶联的纳米微球胶乳A。从市售途径获得平均粒径在250nm至400nm之间、表面带有羧基的聚苯乙烯微球、聚丙烯酸微球或聚丙烯酸酯微球(大纳米微球),但其平均粒径须与纳米微球胶乳A的小纳米微球的平均粒径相差在50nm以上。按以上同样的方式,制备得到β-HCG抗体偶联的纳米微球胶乳B。将纳米微球胶乳A和纳米微球胶乳B按1:10-10:1的体积比混合,即制得R2试剂。

[0026] III. 目的抗原

[0027] 在本文中,用β-HCG(人绒毛膜促性腺激素β亚基)作为目的抗原对本发明的免疫胶乳比浊法测定试剂盒进行举例说明。

[0028] 人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG) 是一种人胎盘成滋养层细胞分泌的糖蛋白激素, 特异在孕期分泌, 成滋养层细胞病变和某些不完全分化的肿瘤也会分泌。HCG的生理作用在于延缓卵巢黄体的退化, 从而维持孕酮的生理水平, 在妊娠初期起着重要的作用。HCG是目前广泛应用的早期妊娠检测指标, 用于指示是否存在着床的胚胎。在怀孕的第一周, HCG水平就开始急剧升高, 并持续升高约8周的时间, 随后开始下降, 至20周左右达到稳定水平, 维持至分娩后消失。

[0029] HCG由 α , β 两个不同亚基组成, α 亚基的结构与垂体分泌的FSH(卵泡刺激素)、LH(黄体生成素)和TSH(促甲状腺激素)的 α 亚基基本相似, 相互间能发生交叉反应, 而 β 亚基的结构与垂体分泌的这些激素的 β 亚基不相似。 β -HCG与 β -LH结构较为相近, 但最后24个氨基酸延长部分在 β -LH中不存在。所以特异性更强的 β 亚基成为HCG检测中的首选靶点, 总 β -HCG含量可以在很大程度上代表总HCG含量。

[0030] IV. 具体实施例1-4

[0031] 以下用具体实施例的方式给出本发明的免疫胶乳比浊法测定试剂盒的代表性配方。

[0032] 在具体实施例1-4中, 统一选择如下表1所示的R1试剂代表性配方, 并按“I. R1试剂的配制”配制R1试剂。

[0033] 表1: R1试剂代表性配方

[0034]

| | |
|--------------------|----------------------------------|
| 促凝剂: | PEG, 分子量100,000, 浓度1% (m/v) |
| 缓冲剂: | 磷酸缓冲液, 浓度100nM, pH 7.4 \pm 0.1 |
| NaCl: | 浓度0.15M |
| NaN ₃ : | 浓度0.09% (m/v) |
| BSA: | 浓度0.2% (m/v) |

[0035] 在具体实施例1-4中, 选择如下表2所示的R2试剂代表性配方, 并按“II. R2试剂的配制”配制R2试剂, 其中将纳米微球胶乳A和纳米微球胶乳B按1:1的体积比混合。

[0036] 表2: R2试剂代表性配方

[0037]

| | 实施例 1 | 实施例 2 | 实施例 3 | 实施例 4 | 对比例 |
|------------------------------|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| 小纳米微球 聚苯乙烯微球 平均粒径(nm) | 50 nm | 100 nm | 150 nm | 200 nm | 250 nm |
| 大纳米微球: 聚苯乙烯微球 平均粒径(nm) | 350 nm | 300 nm | 300 nm | 250 nm | 250 nm |
| 平均粒径差值 | 300 nm | 200 nm | 150 nm | 50 nm | 0 nm |
| 缓冲剂: | 磷酸缓冲液, 浓度 100 nM, pH 7.4 \pm 0.1 | | | | |

[0038] 在具体实施例1-4中, 校准品选用浓度为0mIU/mL、20mIU/mL、100mIU/mL、300mIU/

mL、1000mIU/mL的 β -HCG。

[0039] V. 测定方法

[0040] 在日立7180全自动生化分析仪上,用实施例1-4和对比例制备得到的R1试剂和R2试剂测定校准品、空白样本和待测样本的 β -HCG含量,测定参数和方法如下表3所示:

[0041] 表3:实施例1-4和对比例的R1试剂和R2试剂的测定参数和方法

[0042]

| | 空白样本(B) | 校准品(S) | 待测样本(T) |
|------------------------------------------------------------------------------|---------|--------|---------|
| 试剂 1 (μ L) | 160 | 160 | 160 |
| 去离子水(μ L) | 5 | -- | -- |
| 校准品(μ L) | -- | 5 | -- |
| 待测样本(μ L) | -- | -- | 5 |
| 混匀, 在 37°C 下恒温 5 分钟后, 加入 | | | |
| 试剂 2 (μ L) | 40 | 40 | 40 |
| 混匀, 37°C 恒温 10-30 秒后, 读取吸光度值 A1, 5 分钟后再读取吸光度值 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ | | | |
| 检测方法 | 两点终点法 | 测定波长 | 600 nm |
| 反应方向 | 上升 | 测定温度 | 37°C |

[0043] 以校准品浓度为横坐标,相应的吸光度变化 ΔA 为纵坐标,采用非线性拟合(spline)绘制出标准曲线。将未知 β -HCG含量的待测样本测得的吸光度变化 ΔA 代入标准曲线中,即计算出待测样本的 β -HCG含量。

[0044] VI. 检测性能分析

[0045] (1) 空白限

[0046] 以纯化水为空白样本,分别用实施例1-4和对比例的R1试剂和R2试剂重复测试20次,计算20次测试结果的平均值(X)和标准差(SD), $X+2*SD$ 即为空白限。实施例1-4和对比例的空白限测试结果如下表4所示:

[0047] 表4:实施例1-4和对比例的R1试剂和R2试剂的空白限

[0048]

| 方案 | 测试 20 次(mIU/mL) | | | | | 均值 | SD | 空白限 |
|-------|-----------------|------|------|------|------|-----|-----|-----|
| 实施例 1 | -0.1 | 0.1 | -0.8 | 1.3 | 1.2 | 0.1 | 0.8 | 1.6 |
| | -0.9 | 1.5 | -0.5 | -0.2 | -0.9 | | | |
| | -0.2 | 0.4 | 0.1 | 0.9 | -1.0 | | | |
| | 0.0 | 0.1 | 0.1 | 1.2 | -0.4 | | | |
| 实施例 2 | 1.0 | 1.3 | 0.4 | 0.2 | 1.1 | 0.7 | 0.7 | 2.0 |
| | -0.3 | 0.5 | 0.2 | 0.9 | 2.0 | | | |
| | 0.4 | 0.9 | 0.2 | 1.5 | 1.4 | | | |
| | 1.0 | -0.8 | 0.8 | 1.2 | 0.9 | | | |
| 实施例 3 | 1.4 | 0.3 | 0.6 | 0.1 | 1.5 | 0.9 | 0.8 | 2.4 |
| | 2.0 | 1.3 | 0.1 | -0.6 | 1.7 | | | |
| | 1.6 | -0.7 | 1.6 | 1.5 | 0.6 | | | |
| | 0.6 | 0.8 | 1.3 | 1.6 | 0.5 | | | |
| 实施例 4 | 1.2 | 1.7 | 0.3 | 1.2 | 1.4 | 0.7 | 0.9 | 2.5 |
| | 0.9 | -0.6 | 1.5 | 1.0 | 1.2 | | | |
| | 1.4 | -0.4 | -0.3 | 1.3 | 0.2 | | | |
| | -0.9 | 1.4 | -1.0 | 2.0 | 0.4 | | | |
| 对比例 | 4.3 | 2.5 | 3.1 | 4.3 | 7.7 | 2.7 | 2.6 | 7.8 |
| | 2.5 | 3.5 | 3.4 | 0.2 | -2.4 | | | |
| | 5.5 | 1.3 | 5.2 | 3.0 | -0.4 | | | |
| | 2.4 | -0.8 | -0.4 | 6.5 | 2.2 | | | |

[0049] 由表4可见,对比例的空白限高达7.8mIU/mL,而实施例1-4的R1试剂和R2试剂的空白限不超过3mIU/mL,表明测试的灵敏度良好。

[0050] (2) 线性范围

[0051] 用校准品稀释液(0.05M Tris缓冲液+0.15M NaCl+5g/L BSA+10g/L蔗糖,pH7.4±0.1)等比稀释浓度约3000.0mIU/mL的高浓度β-hCG样本,用实施例1-4和对比例的R1试剂和R2试剂测定系列稀释的样本,每个稀释样本重复测定3次,求平均值,与理论浓度相比较,计算相对偏差和线性相关系数R,如下表5-9所示。

[0052] 表5:实施例1的R1试剂和R2试剂测定系列稀释样本的线性范围

[0053]

| 稀释梯度 | 测试 1 (mIU/mL) | 测试 2 (mIU/mL) | 测试 3 (mIU/mL) | 平均值 (mIU/mL) | 理论值 (mIU/mL) | 相对偏差 (%) | 线性相 关系数 R |
|-----------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|
| 0.0000 (稀释液) | 1.6 | 0.1 | -0.4 | 0.43 | 0.0 | / | 0.9991 |
| 0.0156 | 45.4 | 45.9 | 41.0 | 44.10 | 46.9 | -5.92% | |
| 0.0313 | 85.8 | 87.4 | 89.9 | 87.70 | 93.8 | -6.45% | |
| 0.0625 | 193.2 | 200.3 | 177.5 | 190.33 | 187.5 | 1.51% | |
| 0.1250 | 382.9 | 396.2 | 382.5 | 387.20 | 375.0 | 3.25% | |
| 0.2500 | 780.9 | 776.9 | 793.6 | 783.80 | 750.0 | 4.51% | |
| 0.5000 | 1540.8 | 1545.2 | 1506.9 | 1530.97 | 1500.0 | 2.06% | |
| 1.0000 | 2869.5 | 2831.9 | 2809.8 | 2837.07 | 3000.0 | -5.43% | |

[0054] 表6: 实施例2的R1试剂和R2试剂测定系列稀释样本的线性范围

[0055]

| 稀释倍数 | 测试 1 (mIU/mL) | 测试 2 (mIU/mL) | 测试 3 (mIU/mL) | 平均值 (mIU/mL) | 理论值 (mIU/mL) | 相对偏差 (%) | 线性相 关系数 R |
|--------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|
| 0.0000 | -0.6 | -0.3 | -0.3 | -0.4 | 5.17 | / | 0.9999 |
| 0.0156 | 41.3 | 50.7 | 46.7 | 46.2 | 48.29 | -4.27% | |
| 0.0313 | 80.1 | 87.2 | 91.3 | 86.2 | 91.69 | -5.99% | |
| 0.0625 | 189.4 | 194.1 | 191.5 | 191.7 | 177.94 | 7.71% | |
| 0.1250 | 363.6 | 355.2 | 388.7 | 369.2 | 350.71 | 5.26% | |

[0056]

| | | | | | | | |
|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--|
| 0.2500 | 674.5 | 734.9 | 653.8 | 687.7 | 696.24 | -1.22% | |
| 0.5000 | 1437.1 | 1346.6 | 1319.9 | 1367.9 | 1387.31 | -1.40% | |
| 1.0000 | 2666.5 | 2956.3 | 2712.2 | 2778.3 | 2769.45 | 0.32% | |

[0057] 表7: 实施例3的R1试剂和R2试剂测定系列稀释样本的线性范围

[0058]

| 稀释倍数 | 测试 1 (mIU/mL) | 测试 2 (mIU/mL) | 测试 3 (mIU/mL) | 平均值 (mIU/mL) | 理论值 (mIU/mL) | 相对偏差 (%) | 线性相 关系数 R |
|--------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|
| 0.00 | 0.0000 | -1.0 | -0.1 | -0.6 | -0.6 | 5.05 | 0.9998 |
| 0.0156 | 0.0156 | 46.6 | 49.9 | 54.4 | 50.3 | 48.62 | |
| 0.0313 | 0.0313 | 85.1 | 89.2 | 87.2 | 87.2 | 92.48 | |
| 0.0625 | 0.0625 | 184.4 | 181.5 | 190.2 | 185.4 | 179.63 | |
| 0.1250 | 0.1250 | 351.6 | 395.5 | 378.0 | 375.0 | 354.21 | |
| 0.2500 | 0.2500 | 729.9 | 736.2 | 664.6 | 710.2 | 703.38 | |
| 0.5000 | 0.5000 | 1388.3 | 1370.7 | 1328.4 | 1362.5 | 1401.71 | |
| 1.0000 | 1.0000 | 2956.8 | 2905.4 | 2578.2 | 2813.5 | 2798.38 | |

[0059] 表8: 实施例4的R1试剂和R2试剂测定系列稀释样本的线性范围

[0060]

| 稀释倍数 | 测试 1 (mIU/mL) | 测试 2 (mIU/mL) | 测试 3 (mIU/mL) | 平均值 (mIU/mL) | 理论值 (mIU/mL) | 相对偏差 (%) | 线性相 关系数 R |
|--------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|
| 0.0000 | 0.2 | 0.2 | 0.3 | 0.2 | 2.79 | / | 0.9999 |
| 0.0156 | 47.0 | 49.4 | 48.2 | 48.2 | 46.73 | 3.15% | |
| 0.0313 | 84.1 | 81.0 | 90.9 | 85.3 | 90.94 | -6.17% | |
| 0.0625 | 186.1 | 182.6 | 183.0 | 183.9 | 178.81 | 2.85% | |
| 0.1250 | 396.0 | 380.1 | 372.5 | 382.9 | 354.82 | 7.90% | |
| 0.2500 | 669.7 | 732.1 | 682.2 | 694.7 | 706.85 | -1.72% | |
| 0.5000 | 1416.3 | 1377.3 | 1357.3 | 1383.6 | 1410.91 | -1.93% | |
| 1.0000 | 2851.0 | 2771.0 | 2874.1 | 2832.0 | 2819.02 | 0.46% | |

[0061] 表9: 对比例的R1试剂和R2试剂测定系列稀释样本的线性范围

[0062]

| 稀释倍数 | 测试 1 (mIU/mL) | 测试 2 (mIU/mL) | 测试 3 (mIU/mL) | 平均值 (mIU/mL) | 理论值 (mIU/mL) | 相对偏差 (%) | 线性相 关系数 R |
|------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|
|------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|

[0063]

| | | | | | | | |
|--------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|--------|
| -0.1 | 0.7 | -0.1 | 0.2 | 82.24 | / | -0.1 | 0.9836 |
| 50.3 | 52.4 | 46.6 | 49.8 | 111.16 | -55.23% | 50.3 | |
| 85.7 | 92.9 | 84.6 | 87.7 | 140.27 | -37.45% | 85.7 | |
| 180.2 | 177.1 | 182.4 | 179.9 | 198.11 | -9.19% | 180.2 | |
| 331.6 | 329.5 | 325.6 | 328.9 | 313.97 | 4.75% | 331.6 | |
| 659.3 | 649.5 | 663.7 | 657.5 | 545.71 | 20.49% | 659.3 | |
| 1226.1 | 1214.7 | 1268.1 | 1236.3 | 1009.17 | 22.51% | 1226.1 | |
| 1869.1 | 1720.3 | 1800.0 | 1796.5 | 1936.10 | -7.21% | 1869.1 | |

[0064] 表10: 对比例的R1试剂和R2试剂测定系列稀释样本的线性范围

[0065]

| 稀释倍数 | 测试 1 (mIU/mL) | 测试 2 (mIU/mL) | 测试 3 (mIU/mL) | 平均值 (mIU/mL) | 理论值 (mIU/mL) | 相对偏差 (%) | 线性相 关系数 R |
|--------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|
| 0 | -0.1 | 0.7 | -0.1 | 0.2 | 15.57 | / | 0.9995 |
| 0.0156 | 50.3 | 52.4 | 46.6 | 49.8 | 54.10 | -8.00% | |
| 0.0313 | 85.7 | 92.9 | 84.6 | 87.7 | 92.87 | -5.53% | |
| 0.0625 | 180.2 | 177.1 | 182.4 | 179.9 | 169.93 | 5.87% | |
| 0.125 | 331.6 | 329.5 | 325.6 | 328.9 | 324.30 | 1.42% | |
| 0.25 | 659.3 | 649.5 | 663.7 | 657.5 | 633.02 | 3.87% | |
| 0.5 | 1226.1 | 1214.7 | 1268.1 | 1236.3 | 1250.48 | -1.13% | |

[0066] 由表5-9可见, 实施例1-4的R1试剂和R2试剂测定系列稀释样本的线性范围可达3-3000mIU/mL, 线性相关系数 $r \geq 0.99$, 而对比例的R1试剂和R2试剂测定系列稀释样本的线性范围为7.8-1500mIU/mL, 线性相关系数 $r \geq 0.99$, 比实施例1-4差。

[0067] (3) 重复性

[0068] 按上文“V. 测定方法”所述, 用实施例1-4的R1试剂和R2试剂测试待测样本的 β -HCG含量, 分别重复10次。结果如表10所示。

[0069] 表10: 实施例1-4的R1试剂和R2试剂测定的重复性。

[0070]

| 测试数 | 低值(ng/mL) | | | | 高值(ng/mL) | | | |
|-----|-----------|-----|-----|-----|-----------|-----|-----|-----|
| | 实施例 | 实施例 | 实施例 | 实施例 | 实施例 | 实施例 | 实施例 | 实施例 |
| | | | | | | | | |

[0071]

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|--------|
| 1 | 84.0 | 77.0 | 80.0 | 80.8 | 867.2 | 873.5 | 905.8 | 920.6 |
| 2 | 80.4 | 75.4 | 79.1 | 75.9 | 915.3 | 931.7 | 941.3 | 927.6 |
| 3 | 76.1 | 78.1 | 78.1 | 81.3 | 893.5 | 906.8 | 877.4 | 901.5 |
| 4 | 86.6 | 82.1 | 71.4 | 83.5 | 925.9 | 933.6 | 906.6 | 864.8 |
| 5 | 85.2 | 70.9 | 84.2 | 74.4 | 884 | 885.1 | 931.7 | 947.9 |
| 6 | 89.0 | 82.9 | 83.3 | 81.9 | 917.6 | 851.3 | 873.8 | 924.4 |
| 7 | 88.6 | 70.0 | 83.5 | 74.4 | 874.3 | 939.7 | 894.3 | 887.6 |
| 8 | 82.4 | 79.4 | 80.7 | 85.9 | 889.4 | 932.1 | 924.2 | 928 |
| 9 | 78.9 | 81.2 | 79.0 | 84.7 | 910.6 | 861.7 | 943.4 | 875 |
| 10 | 89.7 | 85.1 | 70.8 | 72.0 | 861.1 | 942.8 | 879.5 | 878.5 |
| 平均值 M | 84.09 | 78.21 | 79.01 | 79.48 | 893.89 | 905.83 | 907.8 | 905.59 |
| 标准偏差 SD | 4.60 | 5.00 | 4.66 | 4.90 | 22.64 | 35.03 | 26.45 | 27.95 |
| 变异系数 CV(%) | 5.47% | 6.40% | 5.90% | 6.16% | 2.53% | 3.87% | 2.91% | 3.09% |

[0072] 由表10可见,实施例1-4的R1试剂和R2试剂测定变异系数CV<10%,重复性良好。

[0073] (4) 本发明的免疫胶乳比浊法测定试剂盒与化学发光免疫分析法测定试剂盒的方法学对比

[0074] 配制 β -hCG浓度为3000.0、2500.0、2000.0、1500.0、1000.0、500.0和0.0的的系列校准品。用实施例3的免疫胶乳比浊法测定试剂盒作为代表,在日立7180全自动生化分析仪上对该系列标准溶液进行 β -hCG含量测定。另外,用贝克曼的总 β 亚单位人绒毛膜促性腺激素测定试剂盒(化学发光法)在贝克曼Unicel Dx1全自动化学发光免疫分析仪上对该系列标准溶液进行 β -hCG含量测定。以本发明的免疫胶乳比浊法测定试剂盒的测定值为纵坐标,以该化学发光免疫分析法测定试剂盒的测定值为横坐标,绘制曲线,如图1所示。可见,本发明的免疫胶乳比浊法测定试剂盒与化学发光免疫分析法测定试剂盒具有良好的相关性。

[0075] 以上应用了具体实例对本发明进行了阐述,只是用于帮助理解本发明,并不用以限制本发明。本发明所属技术领域的技术人员依据本发明的构思,还可以做出若干简单推演、变形或替换。这些推演、变形或替换方案也落入本发明的权利要求范围内。

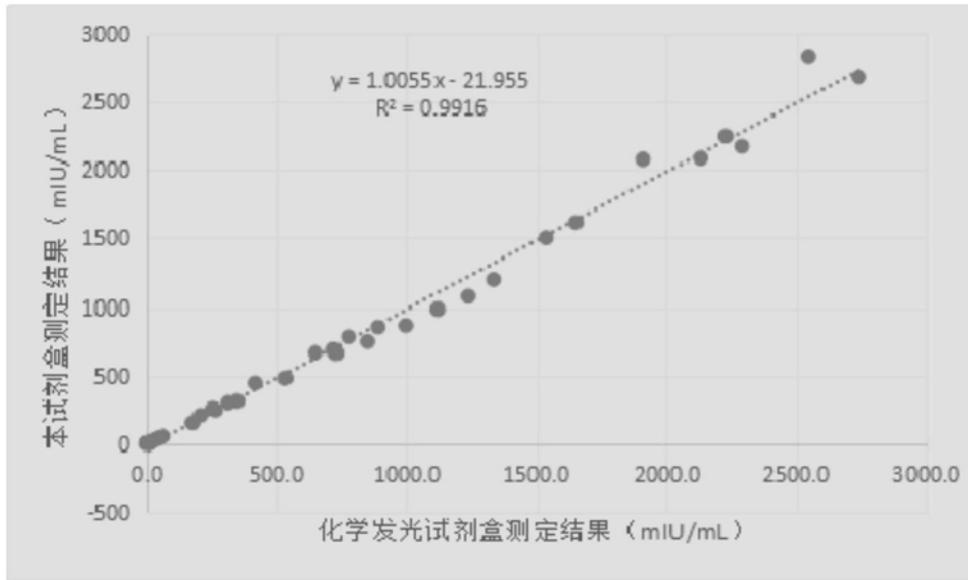


图1

| | | | |
|---------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种用于检测目的抗原的免疫胶乳比浊法测定试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | CN110133247A | 公开(公告)日 | 2019-08-16 |
| 申请号 | CN201910440781.9 | 申请日 | 2019-05-24 |
| [标]发明人 | 陈小茹 严小莉 吴向东 | | |
| 发明人 | 陈小茹 严小莉 吴向东 | | |
| IPC分类号 | G01N33/536 | | |
| CPC分类号 | G01N33/536 | | |
| 代理人(译) | 张海平 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本申请提供一种用于检测目的抗原的免疫胶乳比浊法测定试剂盒，包括R1试剂、R2试剂，R1试剂包含促凝剂和缓冲液，R2试剂包含偶联有抗所述目的抗原的抗体的纳米微球和缓冲液，该纳米微球包括大纳米微球和小纳米微球，小纳米微球的平均粒径在50nm至250nm之间，大纳米微球的平均粒径在250nm至400nm之间，且大纳米微球的平均粒径与小纳米微球的平均粒径相差在50nm以上。由于平均粒径的差异，本发明的测定试剂盒对目的抗原的测定可兼顾灵敏度和线性范围，具有灵敏度高、检测范围宽的优点，而且检测性能媲美化学发光免疫分析法，避免化学发光分析仪封闭且昂贵等缺点，可以用于测定β-HCG及其他抗原。

