



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111089974 A

(43)申请公布日 2020.05.01

(21)申请号 201911362678.3

(22)申请日 2019.12.26

(71)申请人 迪瑞医疗科技股份有限公司

地址 130000 吉林省长春市高新区宜居路
3333号

(72)发明人 张瑞 夏冬梅 孙成艳 何浩会
高威

(74)专利代理机构 长春众邦菁华知识产权代理
有限公司 22214

代理人 李外

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

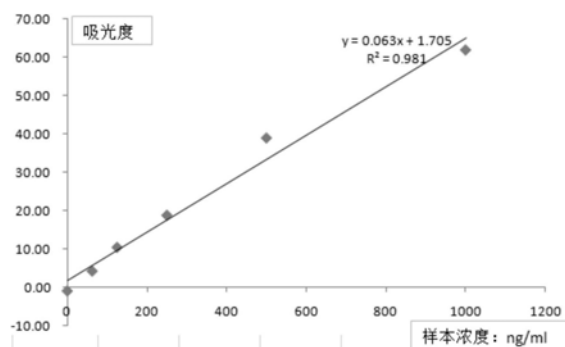
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种铁蛋白检测试剂盒

(57)摘要

本发明提供一种铁蛋白检测试剂盒,属于检测试剂盒领域。该试剂盒包括试剂R1、试剂R2和校准品,所述试剂R1含有第一缓冲液,盐和第一防腐剂;所述的试剂R2含有偶联胶乳微球的抗体、保护剂和第二防腐剂;所述的偶联胶乳微球的抗体中胶乳微球的粒径选自80nm、120nm、150nm、186nm或200nm中的一种或几种;抗体选自羊抗人铁蛋白多抗或兔抗人铁蛋白多抗中的一种。该试剂盒是通过胶乳增强免疫比浊法检测铁蛋白的含量,检测线性范围宽,最高可检测浓度为1300ng/mL的样本,重复性好,重复性<8%,钩变效应的钩变点可达到3000ng/mL,适用于多种全自动生化分析仪,具有更广泛的通用性。



1. 一种铁蛋白检测试剂盒,其特征在于,包括试剂R1、试剂R2和校准品,
所述试剂R1含有第一缓冲液,盐和第一防腐剂;
所述的试剂R2含有偶联胶乳微球的抗体、保护剂和第二防腐剂;
所述的偶联胶乳微球的抗体中胶乳微球的粒径选自80nm、120nm、150nm、186nm或200nm中的一种或几种;
抗体选自羊抗人铁蛋白多抗或兔抗人铁蛋白多抗中的一种。
2. 根据权利要求1所述的一种铁蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述的第一缓冲液为甘氨酸缓冲液,浓度为80~300mM。
3. 根据权利要求1所述的一种铁蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述盐为NaCl,浓度为0.8%~2.0%。
4. 根据权利要求1所述的一种铁蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述的第一防腐剂为Proclin 300,浓度为0.05%~0.50%。
5. 根据权利要求1所述的一种铁蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述的保护剂为BSA,浓度为0.05%~0.50%。
6. 根据权利要求1所述的一种铁蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述的第二防腐剂为Proclin 300,浓度为0.05%~0.50%。
7. 根据权利要求1所述的一种铁蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述的偶联胶乳微球的抗体的制备方法,包括:
将胶乳微球放入第二缓冲液中,先加入抗体混匀,再加入EDC的缓冲液混匀,然后加入封闭剂混匀,将得到的混合液离心,然后加入保存液进行超生,得到偶联胶乳微球的抗体。
8. 根据权利要求7所述的一种铁蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述的第二缓冲液选自Tris-HCl、PBS、甘氨酸、MES和HEPES中的一种或几种,浓度为20~200mM。
9. 根据权利要求7所述的一种铁蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述的胶乳微球和抗体的质量比为10:1。
10. 根据权利要求7所述的一种铁蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述的超生条件为:功率500W,超声5s,间隔5s,超声时间共30min。

一种铁蛋白检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于检测试剂盒领域,具体涉及一种铁蛋白检测试剂盒。

背景技术

[0002] 血清铁蛋白是广泛存在于生物机体内的一种储存铁的可溶组织蛋白,由一个蛋白质外壳和一个铁核心构成。铁蛋白的铁核心具有强大的结合铁和储存铁的能力,以维持机体铁的供应和血红蛋白的相对稳定。铁蛋白是铁与蛋白的复合物,在肝脏、脾等许多组织中均可合成。体内绝大多数铁离子与铁蛋白呈结合态,铁蛋白水平与铁储存量呈正比关系,因此检测铁蛋白可以反映体内铁的储存状况。

[0003] 血清铁蛋白作为一个生物标志物在医学检验中最常应用于评价体内储存铁的状况及诊断缺铁性贫血。通常成年男性血清铁蛋白的正常参考值都在 30-300ng/ml 左右,成年女性血清铁蛋白的正常参考值在10-160ng/ml 左右,某些肿瘤常常升高且大于此值,常见于:急性白血病、何杰金氏病、肺癌、结肠癌、肝癌和前列腺癌。目前国内外市场上检测铁蛋白的方法有化学发光免疫分析法和免疫比浊法等。化学发光免疫分析法试剂成本较高,且检测时间较长,对于急诊而言,特别受限。免疫比浊法操作步骤简单,稳定性和重复性都较好,能较真实地反映被测物质的含量。且能利用普通的生化分析仪进行检测,容易实现自动化,可在各级基层医疗机构普及和应用,但是其检查范围通常在 10-500ng/ml,故而急需开发一种线性范围较宽的铁蛋白检测试剂盒。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种铁蛋白检测试剂盒,该试剂盒的线形检测范围较宽。

[0005] 本发明提供一种铁蛋白检测试剂盒,包括试剂R1、试剂R2和校准品,

[0006] 所述试剂R1含有第一缓冲液,盐和第一防腐剂;

[0007] 所述的试剂R2含有偶联胶乳微球的抗体、保护剂和第二防腐剂;

[0008] 所述的偶联胶乳微球的抗体中胶乳微球的粒径选自80nm、120nm、150 nm、186nm或200nm中的一种或几种;

[0009] 抗体选自羊抗人铁蛋白多抗或兔抗人铁蛋白多抗中的一种。

[0010] 优选的是,所述的第一缓冲液为甘氨酸缓冲液,浓度为80~300mM。

[0011] 优选的是,所述盐为NaCl,浓度为0.8%~2.0%。

[0012] 优选的是,所述的第一防腐剂为Proclin 300,浓度为0.05%~0.50%。

[0013] 优选的是,所述的保护剂为BSA,浓度为0.05%~0.50%。

[0014] 优选的是,所述的第二防腐剂为Proclin 300,浓度为0.05%~0.50%。

[0015] 优选的是,所述的偶联胶乳微球的抗体的制备方法,包括:

[0016] 将胶乳微球放入第二缓冲液中,先加入抗体混匀,再加入EDC的缓冲液混匀,然后加入封闭剂混匀,将得到的混合液离心,然后加入保存液进行超生,得到偶联胶乳微球的抗体。

[0017] 优选的是,所述的第二缓冲液选自Tris-Hcl、PBS、甘氨酸、MES和HEPES 中的一种或几种,浓度为20~200mM。

[0018] 优选的是,所述的胶乳微球和抗体的质量比为10:1。

[0019] 优选的是,所述的超声条件为:功率500W,超声5s,间隔5s,超声时间 共30min。

[0020] 本发明的有益效果

[0021] 本发明提供一种铁蛋白检测试剂盒,该试剂为液体即用型,该试剂盒是通过胶乳增强免疫比浊法检测铁蛋白的含量,检测线性范围宽,最高可检测浓度为1300ng/mL的样本,样本浓度达到3000ng/mL不会出现假性结果,减少了人工稀释等步骤,节约成本,且试剂稳定性好,重复性好,重复性<8%,钩变效应的钩变点可达到3000ng/ml,适用于多种全自动生化分析仪,具有更广泛的通用性。

附图说明

[0022] 图1为本发明实施例2一种铁蛋白检测试剂盒的校准曲线图;

[0023] 图2为本发明实施例3一种铁蛋白检测试剂盒的校准曲线图;

[0024] 图3为本发明实施例4一种铁蛋白检测试剂盒的校准曲线图;

[0025] 图4为本发明种铁蛋白检测试剂盒的线性范围图。

具体实施方式

[0026] 本发明提供一种铁蛋白检测试剂盒,包括试剂R1、试剂R2和校准品,

[0027] 所述试剂R1含有第一缓冲液,盐和第一防腐剂;

[0028] 所述的第一缓冲液优选为甘氨酸缓冲液,浓度优选为80~300mM。

[0029] 所述盐优选为Nacl,浓度优选为0.8%~2.0%。

[0030] 所述的第一防腐剂优选为Proclin 300,浓度优选为0.05%~0.50%。

[0031] 所述的试剂R1优选还EDTA-2Na,浓度有限为0.8%~2.0%。

[0032] 所述的试剂R2含有偶联胶乳微球的抗体、保护剂和第二防腐剂;

[0033] 所述的第二防腐剂优选为Proclin 300,浓度为0.05%~0.50%。

[0034] 所述的保护剂优选为BSA,浓度为0.05%~0.50%。

[0035] 所述的偶联胶乳微球的抗体中胶乳微球的粒径选自80nm、120nm、150 nm、186nm或200nm中的一种或几种;优选为186nm;

[0036] 抗体选自羊抗人铁蛋白多抗或兔抗人铁蛋白多抗中的一种,优选为兔抗人铁蛋白多抗;

[0037] 所述的偶联胶乳微球的抗体的制备方法,包括:

[0038] 将胶乳微球放入第二缓冲液中,所述的第二缓冲液优选为Tris-Hcl、PBS、甘氨酸、MES和HEPES中的一种或几种,浓度优选为50mM,先加入抗体混匀,所述的混匀时间优选为60min,所述的胶乳微球和抗体的质量比为10:1,

[0039] 再加入EDC的缓冲液混匀,所述的混匀时间优选为60min,所述的EDC的浓度优选为10mg/mL,然后加入封闭剂混匀,所述的混匀时间优选为10min,封闭剂优选为BSA,将得到的混合液离心,所述的离心条件为:12000rpm/min 离心20min,然后加入保存液进行超声,所述的保存液优选为甘氨酸缓冲液,超声条件优选为功率500W,超声5s,间隔5s,超声

时间共30min,得到偶联胶乳 微球的抗体。

[0040] 所述的试剂盒还包括校准品,所述的校准品是在铁蛋白抗原中添加第三缓冲液和第三防腐剂制备得到的。

[0041] 所述的第三缓冲剂优选选自Tris-Hcl、PBS、MES和HEPES中的一种或几种,优选为Tris-Hcl,浓度为50mM。

[0042] 所述的第三防腐剂优选为叠氮钠和Proclin 300,更优选Proclin 300,浓度为0.05%~0.5%。

[0043] 在本发明中所使用的术语,一般具有本领域普通技术人员通常理解的含义,除非另有说明。下面结合具体实施例并参照数据进一步详细描述本发明。应理解,该实施例只是为了举例说明本发明,而非以任何方式限制本发明的范围。

[0044] 在以下实施例中,未详细描述的各种过程和方法是本领域中公知的常规方法。下述实例中所用的材料、试剂、装置、仪器、设备等,如无特殊说明,均可从商业途径获得。

[0045] 下面结合具体实施例对本发明进一步说明:

[0046] 实施例1:偶联胶乳微球的抗体的制备

[0047] 1、取250ul 10%186nm胶乳微球粒子(JSR公司生产)加入到试剂瓶中;

[0048] 2、在试剂瓶中加入7ml HEPES缓冲液;

[0049] 3、加入2.5mg的兔抗人FER抗体;

[0050] 4、将试剂瓶放置于混匀器上混匀60min;

[0051] 5、加入50ul含有10mg/mL EDC的HEPES缓冲液;

[0052] 6、将试剂瓶放置于混匀器上混匀60min;

[0053] 7、加入10ml含有BSA的试剂进行封闭;

[0054] 8、将试剂瓶放置于混匀器上混匀10min;

[0055] 9、12000rpm/min离心20min,弃上清;

[0056] 10、加入10ml保存液(甘氨酸缓冲液)进行超声,超声条件为:功率500W, 超声5s, 间隔5s,超声时间共30min;

[0057] 11、将超声完的试剂放置于4℃保存。

[0058] 实施例2铁蛋白乳胶增强免疫比浊试剂的制备

[0059] R1为普通甘氨酸缓冲液pH=8.0±0.05 (25±1℃)。

[0060] R2为含有抗体偶联胶乳微球的溶液pH=7.0±0.05 (25±1℃)。

[0061] 试剂R1:

[0062]	甘氨酸	150mM
	Nacl	1%
	EDTA-2Na	0.1%
	Proclin 300	0.1%
	pH	7.5±0.05 (25±1℃)

[0063] 试剂R2:

[0064]	偶联胶乳微球的抗体	实施例1的方法制备
	BSA	0.1%
	Proclin 300	0.1%

pH	$7.5 \pm 0.05 (25 \pm 1^\circ\text{C})$
----	---

[0065] 校准品的制备:

[0066] 校准品的制备方法:校准品缓冲液的配制:分别称取1.21gTris-HCl,0.3g 甘露醇,0.3gBSA,0.1ml proclin300放入100mL纯化水中,称取一定量的人转 铁蛋白放入缓冲液中,使之浓度在1000ng/mL,混合均匀后用稀盐酸或3M NaOH 调节PH至 6.5 ± 0.1 ,使用0.22um的滤膜过滤后即可得到校准品。

[0067] 实施例3

[0068] R1为普通甘氨酸缓冲液 $\text{pH}=8.0 \pm 0.05 (25 \pm 1^\circ\text{C})$ 。

[0069] R2为含有抗体偶联胶乳微球的溶液 $\text{pH}=7.0 \pm 0.05 (25 \pm 1^\circ\text{C})$ 。

[0070] 试剂R1:

甘氨酸	150mM
Nacl	2%
EDTA-2Na	0.1%
Proclin 300	0.1%
pH	$7.5 \pm 0.05 (25 \pm 1^\circ\text{C})$

[0072] 试剂R2:

偶联胶乳微球的抗体	实施例 1 的方法制备
BSA	0.2%

Proclin 300	0.1%
pH	$7.5 \pm 0.05 (25 \pm 1^\circ\text{C})$

[0075] 实施例4

[0076] R1为普通甘氨酸缓冲液 $\text{pH}=8.0 \pm 0.05 (25 \pm 1^\circ\text{C})$ 。

[0077] R2为含有抗体偶联胶乳微球的溶液 $\text{pH}=7.0 \pm 0.05 (25 \pm 1^\circ\text{C})$ 。

[0078] 试剂R1:

甘氨酸	300mM
Nacl	2%
EDTA-2Na	0.1%
Proclin 300	0.1%
pH	$7.5 \pm 0.05 (25 \pm 1^\circ\text{C})$

[0080] 试剂R2:

偶联胶乳微球的抗体	实施例1的方法制备
BSA	0.4%
Proclin 300	0.1%
pH	$7.5 \pm 0.05 (25 \pm 1^\circ\text{C})$

[0082] 实施例5校准曲线

[0083] 按实施例2配制的试剂R1和试剂R2、校准品做标准曲线。

[0084] 1.打开仪器预热15分钟,在全自动生化分析仪上添加项目,设置项目参数,登记试剂位,放置R1和R2试剂,测试试剂余量,保证试剂R1和R2 $\geq 15\text{mL}$ /瓶。2.取出校准品,用校准品和缓冲液按照以下浓度配制校准液,0ng/ml, 62.5ng/ml,125ng/ml,250ng/ml,500ng/ml,1000ng/ml用全自动生化分析仪对校准样本进行检测,将吸光度变化率 and 对应样本浓度采取对数线性方程做出标准曲线,如图1所示。

[0085] 按实施例3配制的试剂R1和试剂R2、校准品做标准曲线,如图2所示。

[0086] 按实施例4配制的试剂R1和试剂R2、校准品做标准曲线,如图3所示。

[0087] 实施例6实施例2试剂盒的性能检测

[0088] 1、线性范围检测

[0089] 将接近线性范围上限的高值样本(尿液样本)按一定比例稀释为至少5种浓度,其中低值浓度的样本须接近线性范围的下限。对每一浓度样本均重复检测2次,计算平均值,将结果平均值和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合,并计算线性相关系数r,如表1和图4所示。

[0090] 表1

[0091]

相对浓度	测量值1	测量值2	平均值	绝对偏差	相对偏差
10.50	9.54	9.67	9.61	-0.90	-8.52%
129.45	125.49	129.64	127.57	-1.88	-1.46%
248.40	245.30	247.61	246.46	-1.94	-0.78%
486.30	480.32	480.97	480.65	-5.66	-1.16%
724.20	721.58	722.64	722.11	-2.09	-0.29%
962.10	960.34	955.82	958.08	-4.02	-0.42%
1200.00	1185.69	1167.52	1176.61	-23.40	-1.95%

[0092] 2、重复性考察

[0093] 用同一批号试剂,对2个不同浓度的样品(10~300ng/mL与300~1200ng/mL)分别重复测定10次,如表2所示,计算10次测定结果的平均值(M)和标准差(SD),根据下列公式得出变异系数。

[0094] $CV = SD/M \times 100\%$

[0095] 式中:

[0096] CV:变异系数;

[0097] SD:10次测量结果的标准差;

[0098] M:10次测量结果的平均值。

[0099] 表2

[0100]

序号	样品 1(浓度为 262ng/ml)	样品 2(浓度为 420ng/ml)
1	262.07	420.29
2	262.36	419.04
3	263.17	420.35
4	262.37	418.68
5	261.64	420.65

[0101]

6	262.91	419.13
7	262.69	419.58
8	262.62	419.60
9	262.17	420.15
10	263.13	418.41
Mean	262.51	419.59
SD	0.49	0.76
CV	0.19%	0.18%

[0102] 从表中可以看出本发明检测结果相对偏差小于5%，重复性符合要求。

[0103] 3、高剂量钩状效应

[0104] 测试理论浓度超过线性范围浓度的样本，重复测试2次，取平均值作为测试值，如表3所示，测试结果不会出现假性结果。

[0105] 表3

[0106]

理论值 (ng/ml)	测试值 (ng/ml)	备注
400	403.68	线性范围内
600	610.14	线性范围内
800	794.69	线性范围内
1000	989.31	线性范围内
1500	1460.23	超线性
2000	1950.21	超线性
2500	2110.7	超线性
3000	1564.57	超线性
3500	984.32	超线性

[0107] 从上表可以看出本发明可以满足抗原过剩范围达到3000ng/mL。

[0108] 4、稳定性考察

[0109] 加速稳定性：将实施例2制备的试剂R1和试剂R2分别放置于37℃恒温箱（加速试剂）和4℃冰箱（冷藏试剂）中，分别于第3天、第5天和第8天取出加速试剂与冷藏试剂同时

进行测试。分别测试正常/异常水平样本或高/低值质控品，重复测试3次，取平均值，加速试剂测试结果均值与冷藏试剂测试结果比较，计算相对偏差(%)。结果如表4所示。

[0110] 表4

测值 加速时间	理论值	4℃	37℃	相对偏差
	(ng/ml)	(ng/ml)	(ng/ml)	(%)
第 3 天	270.00	271.90	263.60	-3.05%
	420.00	421.70	422.20	0.12%
第 5 天	270.00	265.40	271.90	2.45%
	420.00	424.00	418.80	-1.23%
第 8 天	270.00	268.50	266.40	-0.78%
	420.00	422.30	421.80	-0.12%

[0112] 注：加速试剂从恒温箱中取出后，和冷藏试剂放置至相同时间再进行测试。

[0113] 5、机载稳定性

[0114] 将实施例2制备的试剂R1和试剂R2开瓶后，放置在全自动生化分析仪内，分别测试高/低质控品，并于第7天、第14天、第21天、第28天取出开瓶试剂与未开瓶的对照试剂同时进行测试。重复测试3次，取平均值，开瓶试剂测试结果均值与对照试剂测试结果比较，计算相对偏差(%)，结果如表5所示。

[0115] 表5

测值 放置时间	理论值	对照试剂	开瓶试剂	相对偏差
	(ng/ml)	(mg/L)	(mg/L)	(%)
第 7 天	270.00	271.30	272.30	0.37%
	420.00	422.60	421.70	-0.21%
第 14 天	270.00	273.20	271.50	-0.62%
	420.00	420.40	418.20	-0.52%
第 21 天	270.00	272.90	266.80	-2.24%
	420.00	423.90	419.80	-0.97%
第 28 天	270.00	271.10	266.40	-1.73%
	420.00	422.80	420.60	-0.52%

[0117] 从上表结果可以看出本发明试剂在37℃高温环境下可稳定8天，4℃开封条件下可以稳定28天，说明稳定性很好。

[0118] 以上所述仅是本发明的优选实施方式，应该指出：对于本技术领域的技术人员来说，本发明不受上述实施例的限制，上述实施例只是说明发明原理和优选实施方式，在不脱离发明范围的前提下本发明还会有各种改进，这些改进和润饰都落入要求保护的本发明内。

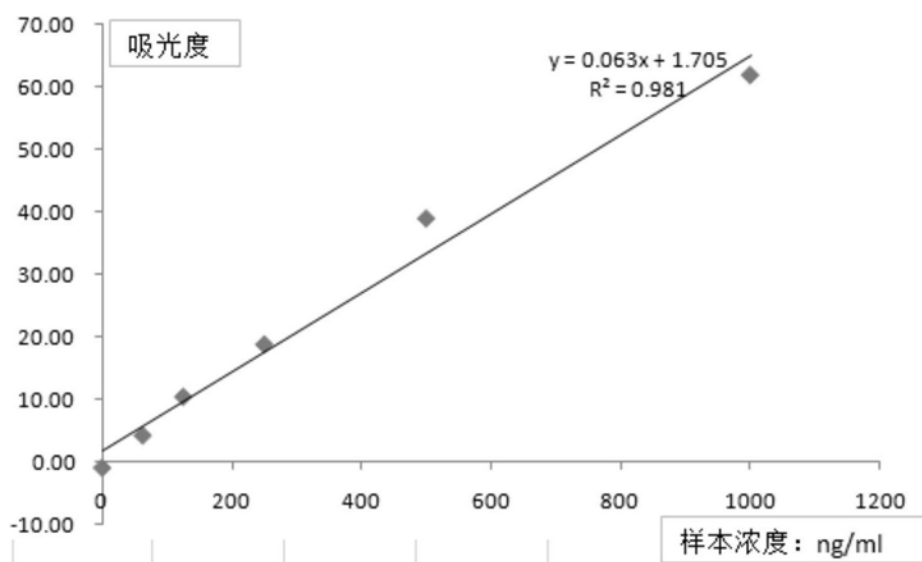


图1

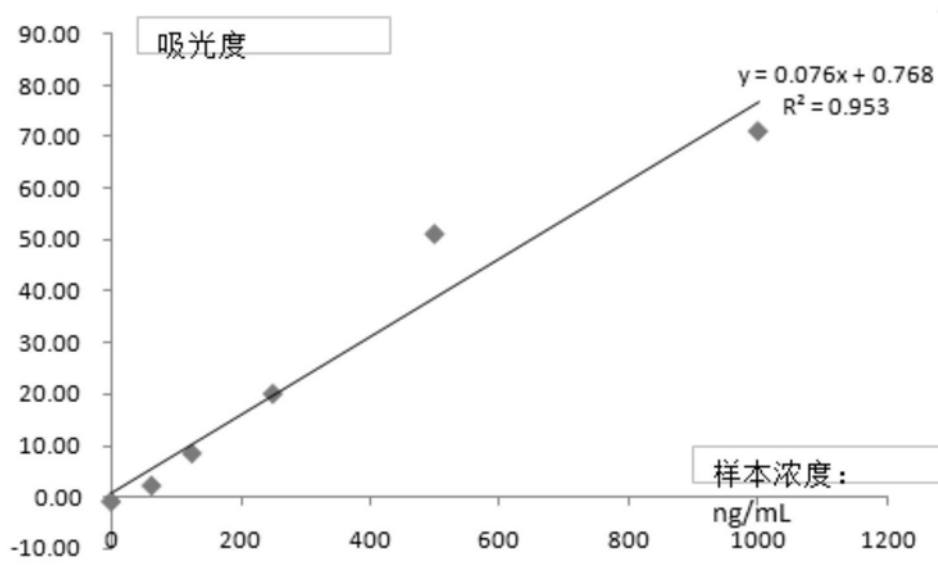


图2

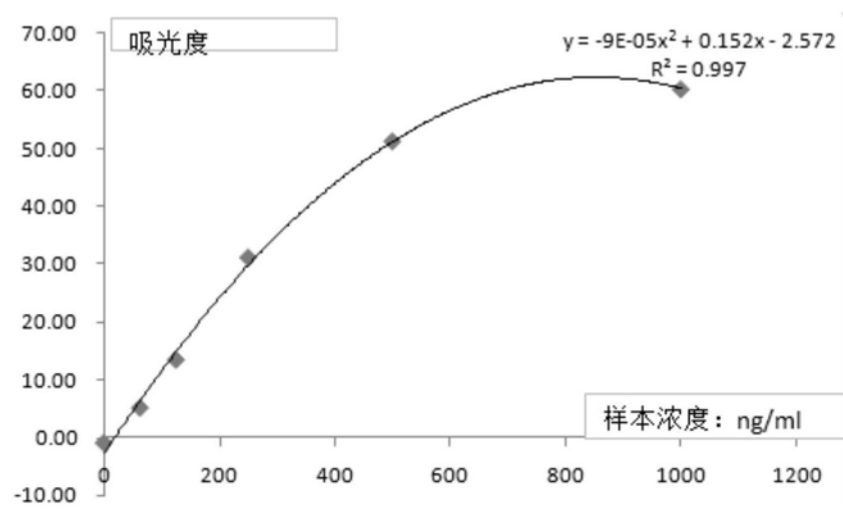


图3

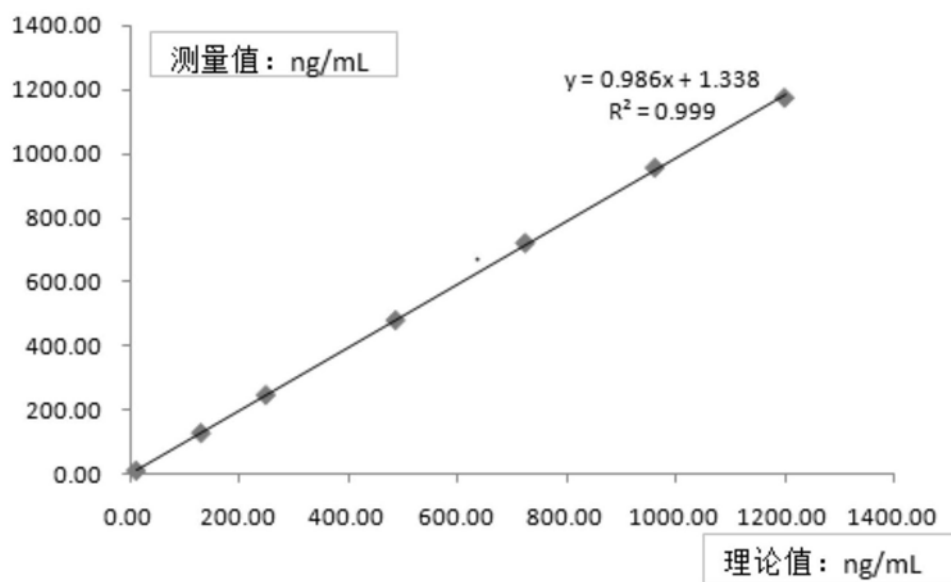


图4

专利名称(译)	一种铁蛋白检测试剂盒		
公开(公告)号	CN111089974A	公开(公告)日	2020-05-01
申请号	CN201911362678.3	申请日	2019-12-26
[标]发明人	张瑞 夏冬梅 孙成艳 何浩会 高威		
发明人	张瑞 夏冬梅 孙成艳 何浩会 高威		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/531		
代理人(译)	李外		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种铁蛋白检测试剂盒，属于检测试剂盒领域。该试剂盒包括试剂R1、试剂R2和校准品，所述试剂R1含有第一缓冲液，盐和第一防腐剂；所述的试剂R2含有偶联胶乳微球的抗体、保护剂和第二防腐剂；所述的偶联胶乳微球的抗体中胶乳微球的粒径选自80nm、120nm、150nm、186nm或200nm中的一种或几种；抗体选自羊抗人铁蛋白多抗或兔抗人铁蛋白多抗中的一种。该试剂盒是通过胶乳增强免疫比浊法检测铁蛋白的含量，检测线性范围宽，最高可检测浓度为1300ng/mL的样本，重复性好，重复性<8%，钩变效应的钩变点可达到3000ng/ml，适用于多种全自动生化分析仪，具有更广泛的通用性。

