



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109725162 A

(43)申请公布日 2019.05.07

(21)申请号 201811579131.4

(22)申请日 2018.12.21

(71)申请人 广州市进德生物科技有限公司

地址 510663 广东省广州市黄埔区科学城
尖塔山路1号J5栋五楼

(72)发明人 林伟荣 李民友 齐宗献 段朝晖

高国全 赵肃清 吴新伟

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司

公司 44202

代理人 宋静娜 郝传鑫

(51)Int.Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

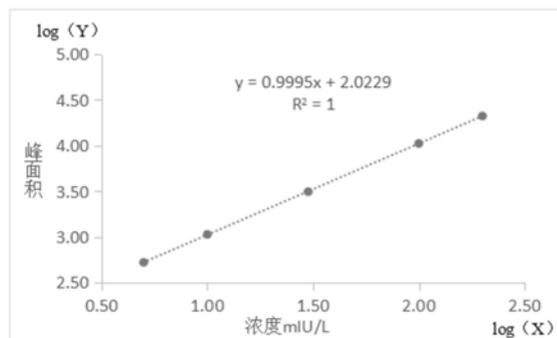
权利要求书2页 说明书12页 附图1页

(54)发明名称

一种完全均相测定胰岛素的检测试剂盒及其方法

(57)摘要

本发明属于生物技术领域,公开了一种完全均相测定胰岛素的检测试剂盒及其方法。本发明基于双抗体夹心技术,吡啶酯标记抗人胰岛素抗体和辣根过氧化物酶标记抗人胰岛素抗体分别结合在胰岛素分子的抗原决定簇上,形成抗体-抗原-抗体的免疫复合物,加入触发剂后,辣根过氧化物酶氧化触发剂产生羟自由基,羟自由基的半衰期非常短,且在抗氧化剂的作用下,能保证羟自由基在抗体-抗原-抗体的免疫复合物分子内部传递,吡啶酯在羟自由基的作用下,产生光信号,其光信号与胰岛素含量成正相关。本发明试剂盒能够实现完全均相化学发光检测胰岛素,不需要固定抗体,也不需要洗涤过程,具有稳定性好,检测快速便捷,灵敏度高,特异性强的特点。



1. 一种完全均相测定胰岛素的检测试剂盒,其特征在於,包括试剂R1和试剂R2,所述试剂R1包括吡啶酯标记抗人胰岛素抗体、辣根过氧化物酶标记抗人胰岛素抗体和抗氧化剂;所述试剂R2包括触发剂。

2. 根据权利要求1所述的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒,其特征在於,所述触发剂为对羟基肉桂酸、过氧化氢、过氧化脲中的至少一种,优选地,所述触发剂为对羟基肉桂酸和过氧化氢。

3. 根据权利要求1所述的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒,其特征在於,所述抗氧化剂为抗坏血酸、尿酸、茶多酚、谷胱甘肽、硫代硫酸钠中的至少一种,优选地,所述抗氧化剂为抗坏血酸和硫代硫酸钠。

4. 根据权利要求1~3任一项所述的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒,其特征在於,所述试剂R1包括下述浓度的组分:

吡啶酯标记抗人胰岛素抗体	0.01-5mg/L
辣根过氧化物酶标记抗人胰岛素抗体	0.01-5mg/L
抗氧化剂	0.01-1w/v%

所述试剂R2包括下述浓度的组分:

触发剂	5-250mmol/L。
-----	--------------

5. 根据权利要求4所述的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒,其特征在於,所述试剂盒还包括缓冲液、稳定剂和防腐剂。

6. 根据权利要求5所述的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒,其特征在於,所述试剂R1包括下述浓度的组分:

缓冲液	5-100 mmol/L
吡啶酯标记抗人胰岛素抗体	0.01-5 mg/L
辣根过氧化物酶标记抗人胰岛素抗体	0.01-5 mg/L
稳定剂	0.01-5 w/v%
防腐剂	0.01-0.5 w/v%
抗氧化剂	0.01-1 w/v%

所述试剂R2包括下述浓度的组分:

触发剂	5-250mmol/L
防腐剂	0.01-0.5w/v%。

7. 根据权利要求5或6所述的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒,其特征在於,所述缓冲液的pH为6.5-8.5,所述缓冲液为磷酸盐缓冲液、Tris缓冲液、醋酸缓冲液、HEPES缓冲液中至少一种,优选地,所述缓冲液的pH为7.4,所述缓冲液为磷酸盐缓冲液。

8. 根据权利要求5或6所述的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒,其特征在於,所述稳定剂为牛血清白蛋白、海藻糖、蔗糖、甘露醇、乙二胺四乙酸二钠、PEG 20000、吐温-20、EC氧化酶、酶稳定剂、甘油中的至少一种,优选地,所述稳定剂为牛血清白蛋白、PEG 20000、EC氧化酶、吐温-20和甘露醇。

9. 根据权利要求5或6所述的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒,其特征在於,所述防

腐剂为叠氮钠、ProClin300、KY-100生物防腐剂中的至少一种。

10. 根据权利要求1~9任一项所述完全均相测定胰岛素的检测试剂盒的检测方法,其特征在于,在待测样本中加入试剂R1,在37℃孵育5~20min后,加入试剂R2,立即检测反应物的发光强度值,计算待测样本中胰岛素的含量,其中,待测样本、试剂R1和试剂R2的体积比为1:5:6。

一种完全均相测定胰岛素的检测试剂盒及其方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种完全均相测定胰岛素的检测试剂盒及其方法。

背景技术

[0002] 胰岛素是由胰岛β细胞分泌的一种蛋白质激素,其由α链和β链组成,其中α链含21个氨基酸,β链含30个氨基酸,2个肽链有二硫键连接。胰岛素分子量为5734D,等电点为5.3~5.4,是人体内唯一降低血糖的激素。胰岛素的分泌主要受血液中葡萄糖浓度的调节,当血液中葡萄糖浓度升高,可刺激胰岛素分泌。胰岛素在胰岛B细胞形成之前,先在细胞内合成胰岛素原,并进而分解成等分子的胰岛素和C肽。胰岛素能促进全身组织细胞对葡萄糖的摄取和利用,并抑制糖原的分解和糖原异生,因此,胰岛素有降低血糖的作用。胰岛素分泌过多时,血糖下降迅速,脑组织受影响最大,可出现惊厥、昏迷,甚至引起胰岛素休克。相反,胰岛素分泌不足或胰岛素受体缺乏常导致血糖升高;若超过肾糖阈,则糖从尿中排出,引起糖尿。

[0003] 目前糖尿病主要分为I型和II型。I型糖尿病主要与自身免疫有关,由于自身免疫系统的攻击,大量胰岛素β细胞被破坏,抑制了合成胰岛素和分泌胰岛素的能力,导致胰岛素分泌不足,从而无法降低血糖,引起高血糖。II型糖尿病主要是由于胰岛素抵抗为主,伴有胰岛素分泌不足,或者胰岛素分泌不足为主,伴有胰岛素抵抗所致的糖尿病。胰岛素测定对糖尿病的分型、病情严重程度判断及胰岛素治疗的监控等具有十分重要的意义。

[0004] 目前实验室检测胰岛素的方法比较多,常用方法有放射免疫分析法、酶联免疫分析法、时间分辨荧光免疫分析、化学发光免疫分析法、电化学发光免疫分析法等。随着生物技术的发展,其检测方法也逐步由放射免疫学的检测方法,逐渐向酶联免疫吸附试验、化学发光免疫分析法发展。放射性免疫分析法由于试剂具有放射性,对操作者具有一定的危害,且操作复杂,试剂有效期短等缺点,不推荐作为胰岛素临床诊断;酶联免疫分析法的缺点在于无法准确进行定量,且批间差异较大,线性范围有限,无法持续监控胰岛素水平;时间分辨荧光免疫分析法对检测环境的要求较高,易受空气尘埃的干扰;化学发光免疫分析法是一种较为先进的免疫学方法,具有高灵敏、高特异、快速、高通量等特点。现阶段化学发光法已成为检测胰岛素水平的主流方法,并且由于自动化检测系统的普及,极大地提升了实验的精密度。根据目前胰岛素的临床应用情况,市场应用前景较好的可靠方法为化学发光免疫分析法。

[0005] 化学发光免疫分析法主要有微孔板式化学发光和微孔板式磁颗粒化学发光。目前实验室检测胰岛素出现了一种化学发光检测方法,如中国专利申请CN101545912A公开的一种胰岛素微孔板式磁颗粒化学发光免疫分析测定试剂盒,在微孔板上使用磁颗粒,将亲和素-生物素桥联包被抗体,加入抗原和酶标抗体形成生物素化的抗体-抗原-酶标抗体复合物,将微孔板置于带有磁分离器的微孔板洗板机上洗涤,加入化学发光底物反应,而后检测其发光强度(RLU),胰岛素浓度与发光强度(RLU)成正相关。该方法具有检测范围宽,操作简单等特点,但需要洗涤过程,会产生大量的废弃物,且反应时间较长,不利于临床上大批量快速检测的需求。因此,针对上述技术问题,有必要提供一种质量稳定,检测快

速便捷,灵敏度高,特异性强的用于测定血液中胰岛素的试剂盒。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服现有技术的不足之处而提供一种完全均相测定胰岛素的检测试剂盒及其方法,该检测试剂盒稳定性好,检测快速便捷,灵敏度高,特异性强。

[0007] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案如下:

[0008] 一种完全均相测定胰岛素的检测试剂盒,包括试剂R1和试剂R2,所述试剂R1包括吡啶酯标记抗人胰岛素抗体、辣根过氧化物酶标记抗人胰岛素抗体和抗氧化剂;所述试剂R2包括触发剂。

[0009] 本发明的检测试剂盒的检测原理为:分别加入吡啶酯标记抗人胰岛素抗体、抗原、辣根过氧化物酶标记抗人胰岛素抗体后,基于双抗体夹心技术,吡啶酯标记抗人胰岛素抗体和辣根过氧化物酶标记抗人胰岛素抗体分别结合在胰岛素分子的抗原决定簇上,形成抗体-抗原-抗体的免疫复合物,加入触发剂后,辣根过氧化物酶催化触发剂中的过氧化物产生羟自由基。羟自由基的半衰期非常短,且在抗氧化剂的作用下,能保证羟自由基在抗体-抗原-抗体的免疫复合物分子内部传递,吡啶酯在强氧化剂——羟自由基的作用下,产生光信号,其光信号与胰岛素含量成正相关。该检测方法,和其它基于双抗夹心的检测方法(板式化学发光,磁微粒化学发光)相比,该方法为完全均相化学发光检测,具有不需要固定抗体,也不需要洗涤过程,具有反应更充分、迅速的优点。

[0010] 本发明在试剂R1中添加抗氧化剂,其能显著增强试剂的抗干扰能力,有效去除样本和试剂中的自由基或其他氧化性物质,能够有效控制本底,从而提高了检测试剂盒的准确度和灵敏度。

[0011] 作为本发明所述的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒的优选实施方式,所述触发剂为对羟基肉桂酸、过氧化氢、过氧化脲中的至少一种。

[0012] 作为本发明所述的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒的优选实施方式,所述触发剂为对羟基肉桂酸和过氧化氢。

[0013] 作为本发明所述的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒的优选实施方式,所述抗氧化剂为坏血酸、尿酸、茶多酚、谷胱甘肽、硫代硫酸钠中的至少一种。

[0014] 作为本发明所述的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒的优选实施方式,所述抗氧化剂为抗坏血酸和硫代硫酸钠。采用抗坏血酸和硫代硫酸钠作为抗氧化剂,进一步促进羟自由基在抗体-抗原-抗体的免疫复合物分子内部传递,促使反应快速进行,而抗坏血酸和硫代硫酸钠且能够去除样本和试剂中的自由基或其他氧化性物质,有效提高检测试剂盒的准确度和灵敏度。

[0015] 作为本发明所述的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒的优选实施方式,所述试剂R1包括下述浓度的组分:

[0016] 吡啶酯标记抗人胰岛素抗体 0.01-5mg/L

[0017] 辣根过氧化物酶标记抗人胰岛素抗体 0.01-5mg/L

[0018] 抗氧化剂 0.01-1w/v%

[0019] 所述试剂R2包括下述浓度的组分:

[0020] 触发剂 5-250mmol/L。

[0021] 作为本发明所述的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒的优选实施方式,所述试剂盒还包括缓冲液、稳定剂和防腐剂。

[0022] 作为本发明所述的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒的优选实施方式,所述试剂R1包括下述浓度的组分:

[0023]	缓冲液	5-100 mmol/L
	吡啶酯标记抗人胰岛素抗体	0.01-5 mg/L
	辣根过氧化物酶标记抗人胰岛素抗体	0.01-5 mg/L
[0024]	稳定剂	0.01-5 w/v%
	防腐剂	0.01-0.5 w/v%
	抗氧化剂	0.01-1 w/v%

[0025] 所述试剂R2包括下述浓度的组分:

[0026]	触发剂	5-250mmol/L
[0027]	防腐剂	0.01-0.5w/v%。

[0028] 作为本发明所述的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒的优选实施方式,所述缓冲液的pH为6.5-8.5,所述缓冲液为磷酸盐缓冲液、Tris缓冲液、醋酸缓冲液和HEPES缓冲液中至少一种。

[0029] 作为本发明所述的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒的优选实施方式,所述缓冲液的pH为7.4,所述缓冲液为磷酸盐缓冲液。

[0030] 作为本发明所述的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒的优选实施方式,所述稳定剂为牛血清白蛋白、海藻糖、蔗糖、甘露醇、乙二胺四乙酸二钠、PEG 20000、吐温-20、EC氧化酶、酶稳定剂、甘油中的至少一种。

[0031] 作为本发明所述的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒的优选实施方式,所述稳定剂为牛血清白蛋白、PEG 20000、EC氧化酶、吐温-20和甘露醇,这些组分复配对吡啶酯标记抗人胰岛素抗体和辣根过氧化物酶标记抗人胰岛素抗体具有保护作用,避免活性损失,可显著提高检测结果的稳定性。且其中的EC氧化酶可以去除溶液中的溶解氧,具有保护试剂R1中抗氧化剂的作用,提高试剂的抗干扰能力。

[0032] 作为本发明所述的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒的优选实施方式,所述防腐剂为叠氮钠、ProClin300、KY-100生物防腐剂中的至少一种。

[0033] 作为本发明所述的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒的优选实施方式,所述防腐剂为ProClin300。

[0034] 本发明还提供了上述完全均相测定胰岛素的检测试剂盒的检测方法,在待测样本中加入试剂R1,在37℃孵育5~20min后,加入试剂R2,立即检测反应物的发光强度值,计算待测样本中胰岛素的含量,其中,待测样本、试剂R1和试剂R2的体积比为1:5:6。

[0035] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0036] (1) 本发明的胰岛素检测试剂盒为完全均相化学发光检测,更利于抗原抗体的反应,检测非常快速,大大缩短了反应时间,且能提高抗体的利用率,降低试剂盒的成本。

[0037] (2) 本发明在试剂R1中加入了抗氧化剂,其能快速清除样本中的自由基或其他干

扰物质,能有效地控制本底;此外,本发明的两个胰岛素抗体标记物 吡啶酯和辣根过氧化物酶需联合作用,且其与胰岛素原和C-肽无交叉反应,使得本发明的检测试剂盒具有更高的灵敏度、准确度和特异性。

[0038] (3) 本发明的检测试剂盒不需要进行包被处理,优化了工艺流程,有效降低了成本;在检测过程中不需要洗涤过程,不需要大量的洗涤液,减少了废弃物的排放,更利于临床上使用及其对废弃物的处理。

附图说明

[0039] 图1为采用实施例3的胰岛素检测试剂盒测定得到的校准曲线图,其中X轴表示胰岛素浓度的log值,Y轴表示峰面积的log值;

[0040] 图2为实施例3的检测试剂盒与Mercodia AB的胰岛素测定试剂盒的相关性对比图,其中X轴表示本发明实施例3的试剂盒测定的血清结果,Y轴表示的是Mercodia AB试剂盒测定的血清结果。

具体实施方式

[0041] 为更好地说明本发明的目的、技术方案和优点,下面将结合具体实施例对本发明进一步说明。本领域技术人员应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0042] 实施例中,所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法,所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0043] 实施例1、胰岛素校准品的制备

[0044] 根据本发明校准品的基质液包括以下浓度的组分:

	磷酸盐缓冲液	30 mmol/L
	BSA	1 w/v%
[0045]	甘露醇	0.5 w/v%
	吐温-20	0.05 w/v%
	ProClin300	0.045 w/v%
[0046]	pH为 7.4	

[0047] 根据上述比例配制校准品基质液,用此基质液将胰岛素抗原稀释成相应浓度的校准品,浓度分别为5mIU/L、10mIU/L、50mIU/L、100mIU/L、200mIU/L,另加基质液0mIU/L,共6瓶,每瓶1.2mL,于2~8℃保存。

[0048] 实施例2、吡啶酯标记抗人胰岛素抗体和辣根过氧化物酶标记抗人胰岛素抗体的浓度选定标准

[0049] 本试剂盒所用的抗体为外购所得,购于广州埃唯迪生物科技有限公司。

[0050] 采用方阵法将吡啶酯标记抗人胰岛素抗体和辣根过氧化物酶标记抗人胰岛素抗体以不同稀释度进行配比,以最低信噪比大于5,最高信噪比大于200为基准,优先选择成本最低的配比关系。

[0051] 吡啶酯标记抗人胰岛素抗体和辣根过氧化物酶标记抗人胰岛素抗体的初始浓度

均为1mg/mL,将吡啶酯标记抗人胰岛素抗体以1/500、1/1000、1/2000、1/4000、1/8000、1/16000的不同稀释度,与辣根过氧化物酶标记抗人胰岛素抗体1/500、1/1000、1/2000、1/4000、1/8000、1/16000的不同稀释度进行方阵法考察。两组比例交叉配比,发现最优的配比比例为吡啶酯标记抗人胰岛素抗体以1/2000和辣根过氧化物酶标记抗人胰岛素抗体1/8000,故选择这个最优的配比比例。即吡啶酯标记抗人胰岛素抗体的浓度为0.5mg/L,辣根过氧化物酶标记抗人胰岛素抗体的浓度为0.125mg/L。

[0052] 实施例3、一种完全均相测定胰岛素的检测试剂盒

[0053] 本实施例的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒,包括试剂R1和试剂R2,

[0054] 试剂R1包括下述浓度的组分:

	磷酸盐缓冲液	30 mmol/L
	吡啶酯标记抗人胰岛素抗体	0.5 mg/L
	辣根过氧化物酶标记抗人胰岛素抗体	0.125 mg/L
[0055]	BSA	0.1 w/v%
	甘露醇	0.5 w/v%
	PEG20000	0.5 w/v%
	吐温-20	0.05 w/v%
	EC氧化酶	0.05 w/v%
	ProClin300	0.045w/v%
[0056]	抗坏血酸	0.05 w/v%
	硫代硫酸钠	0.1 w/v%
	pH为 7.4	

[0057] 试剂R2包括下述浓度的组分:

[0058] 对羟基肉桂酸 50mmol/L

[0059] 过氧化氢 200mmol/L

[0060] ProClin300 0.045w/v%

[0061] 按照上述配方制备得到试剂盒半成品,经过验证合格后才能组装成胰岛素检测试剂盒。

[0062] 实施例4、一种完全均相测定胰岛素的检测试剂盒

[0063] 本实施例的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒,包括试剂R1和试剂R2,

[0064] 试剂R1包括下述浓度的组分:

	磷酸盐缓冲液	5 mmol/L
	吡啶酯标记抗人胰岛素抗体	0.1 mg/L
	辣根过氧化物酶标记抗人胰岛素抗体	0.05 mg/L
	BSA	0.01 w/v%
	甘露醇	0.01 w/v%
[0065]	PEG20000	0.01 w/v%
	吐温-20	0.01 w/v%
	EC氧化酶	0.01 w/v%
	ProClin300	0.01 w/v%
	抗坏血酸	0.02 w/v%
	硫代硫酸钠	0.02w/v%
	pH为 8.5	
[0066]	试剂R2包括下述浓度的组分：	
[0067]	对羟基肉桂酸	1mmol/L
[0068]	过氧化氢	4mmol/L
[0069]	ProClin300	0.01w/v%
[0070]	按照上述配方制备得到试剂盒半成品,经过验证合格后才能组装成胰岛素 检测试剂盒。	
[0071]	本实施例中吡啶酯标记抗人胰岛素抗体的浓度可以控制在0.01-5mg/L,辣 根过氧化物酶标记抗人胰岛素抗体的浓度可以控制0.01-5mg/L。	
[0072]	实施例5、一种完全均相测定胰岛素的检测试剂盒	
[0073]	本实施例的完全均相测定胰岛素的检测试剂盒,包括试剂R1和试剂R2,	
[0074]	试剂R1包括下述浓度的组分：	
	磷酸盐缓冲液	100 mmol/L
	吡啶酯标记抗人胰岛素抗体	5 mg/L
	辣根过氧化物酶标记抗人胰岛素抗体	1.25 mg/L
	BSA	1 w/v%
	甘露醇	1 w/v%
[0075]	PEG20000	1w/v%
	吐温-20	1 w/v%
	EC氧化酶	1 w/v%
	ProClin300	0.5 w/v%
	抗坏血酸	1 w/v%
	硫代硫酸钠	1 w/v%
	pH为 6.5	

[0076] 试剂R2包括下述浓度的组分：

[0077]	对羟基肉桂酸	50mmol/L
[0078]	过氧化氢	100mmol/L
[0079]	ProClin300	0.5w/v%

[0080] 按照上述配方制备得到试剂盒半成品,经过验证合格后才能组装成胰岛素 检测试剂盒。

[0081] 实施例6、检测方法

[0082] 本发明实施例3所述的胰岛素检测试剂盒,以多功能酶标仪LB942S为例,其参数如表1。

[0083] 分析方法:一步法,即加入10 μ L待测样本和50 μ L试剂R1,37 $^{\circ}$ C 孵育 20min,加入60 μ L试剂R2,立即连续检测一段时间(1~3s)内的发光强度值 RLU,通过仪器计算得到峰面积。测定后以校准品的胰岛素浓度的log值作为X 坐标,以峰面积的log值作为Y坐标,作出校准曲线如图1所示,方程 $y=0.9995x+2.0229$, $R^2=1$,根据该校准曲线计算出样品中胰岛素的浓度。

[0084] 表1

[0085]

温度	37 $^{\circ}$ C
待测样本/校准品	10 μ L
试剂 R1	50 μ L
混匀, 37 $^{\circ}$ C孵育 20 min	
试剂 R2	60 μ L
仪器测定发光强度值	

[0086] 采用本发明的试剂盒进行检测时,孵育时间可以根据实际检测需要调整为 5~20min。

[0087] 实施例7、相关性试验

[0088] 使用本发明试剂盒(具体配方同实施例3)和MercoDia AB的胰岛素测定试剂盒,分别采用多功能酶标仪LB942S、科斯迈SMART1000全自动发光仪对40 份新鲜人血清按各自的参数同时进行测定,对测定值进行相关性回归分析,测定结果见图2。

[0089] 由图2的结果看出,两种试剂的相关系数 $R^2=0.9995$,回归方程 $y=1.0135x-0.1187$ 。结果表明本试剂与已上市对比试剂测定病人血清相关性良好,具有很好的特异性和准确性。

[0090] 实施例8、准确度和精密度试验

[0091] 试剂:本发明试剂盒(具体配方同实施例3)、校准品、质控品。

[0092] 仪器:多功能酶标仪LB942S。

[0093] 操作步骤:使用校准品定标,测定各质控10次,计算测试均值、SD、CV 和相对偏差,测定结果如表2所示。

[0094] 表2测定结果(mIU/L)

[0095]

测定次数	中值质控	高值质控
1	39.74	124.72

2	40.49	116.95
3	41.41	123.81
4	41.28	119.94
5	41.60	116.37
6	39.89	119.09
7	40.30	123.65
8	39.11	122.46
9	42.53	120.64
10	40.99	124.63
均值	40.73	121.23
SD	1.02	3.10
CV	2.51%	2.55%
靶值	40.00	120.00
相对偏差	1.84%	1.02%

[0096] 表2结果显示,本发明试剂盒检测各质控的相对偏差均小于2%,准确度非常好。测定10次同个样本的CV值均小于3%,精密度较好。

[0097] 实施例9、线性试验

[0098] 采用本发明试剂盒(具体配方同实施例3)、校准品、高浓度胰岛素样品、质控品。

[0099] 仪器:多功能酶标仪LB942S。

[0100] 操作步骤:取高浓度胰岛素样品配制成200mIU/L,以空白溶液作为稀释液,按39:1、19:1、3:1、1:1、0:1(原倍)稀释,各样本重复测定3次。

[0101] 表3测定结果(mIU/L)

[0102]

预期浓度 (mIU/L)	实测浓度			均值	相对偏差
	1	2	3		
0	0.54	0.56	0.61	1.54	1.54
5	5.15	5.31	5.21	5.22	4.47%

[0103]

10	10.91	9.79	10.93	10.54	5.43%
50	51.65	48.57	53.32	51.18	2.36%
100	104.04	103.68	97.25	101.66	1.66%
200	212.45	208.40	197.34	206.06	3.03%
$r^2 \geq 0.9900$	0.9999				
$r \geq 0.9950$	0.9999				

[0104] 分别采用实施例4~5的试剂盒的进行线性试验,其结果基本与表3一致。本发明试剂盒在5~200mIU/L范围内线性良好,线性范围较宽。

[0105] 实施例10、特异性试验

[0106] 取胰岛素原和C-肽纯品用抗原稀释液分别稀释为20ng/mL、30ng/mL,用本发明试剂盒(具体配方同实施例3)进行测定,测定结果如表4所示。

[0107] 表4测定结果

[0108]

测定结果	无添加物	胰岛素原	C-肽
1	0.30	0.90	0.72
2	0.21	0.83	0.65
3	0.40	0.76	0.84
均值	0.30	0.83	0.74

[0109] 表4结果表明,20ng/mL的胰岛素原在本试剂盒上的测定结果为0.83mIU/L,30ng/mL的C-肽在本试剂盒上的测定结果为0.74mIU/L,均不高于1mIU/L,说明本发明试剂盒的特异性较好。

[0110] 实施例11、抗干扰试验

[0111] 取新鲜混合血清,分成5等份,按照下表5加入相应的干扰物质,取本发明试剂盒(具体配方同实施例3)测定血清中胰岛素的含量,测定结果如表6所示。

[0112] 相对偏差(%) = (干扰样本的测定均值 - 无干扰物样本的测定均值) / 无干扰物样本的测定均值 × 100%。

[0113] 表5干扰物质浓度

[0114]

干扰物	生物素 (mg/L)	胆红素 (mg/dL)	甘油三酯 (mg/dL)	血红蛋白 (mg/dL)
-----	------------	-------------	--------------	--------------

[0115]

浓度	60	30	2000	1000
----	----	----	------	------

[0116] 表6测定结果

[0117]

序号	干扰物				
	无干扰物	生物素	胆红素	甘油三酯	血红蛋白
1	19.80	19.70	19.90	20.80	20.30
2	20.21	20.32	20.29	19.58	20.05
3	20.20	19.50	19.50	20.46	19.70
均值	20.07	19.84	19.90	20.28	20.02
RD(%)	/	-1.15%	-0.86%	1.05%	-0.27%

[0118] 表6结果表示,本发明试剂盒不受黄疸(胆红素<30mg/dL)、脂血(甘油三酯<2000mg/dL)、溶血(血红蛋白<1000mg/dL)和生物素<60mg/L的干扰,说明本发明试剂盒的抗干扰能力较强。

[0119] 实施例12、检测试剂中不同组分对性能影响

[0120] 1. 试剂R1中硫代硫酸钠对试剂R1稳定性影响

[0121] 配制试剂R1时不添加硫代硫酸钠,其它成分不变,考察试剂R1在37℃放置14天及4℃放置60天后与第0天相比各浓度校准品的峰面积保留率。结果如 表7。

[0122] 表7硫代硫酸钠对试剂R1的稳定性

[0123]

校准品	R1 不含硫代硫酸钠		R1 含硫代硫酸钠	
	37℃, 14 天	4℃, 60 天	37℃, 14 天	4℃, 60 天
S0	80%	70%	93%	97%
S1	61%	89%	92%	98%
S2	63%	90%	95%	95%
S3	60%	88%	96%	95%
S4	62%	90%	94%	96%
S5	64%	91%	95%	95%

[0124] 吡啶酯容易被氧化,添加硫代硫酸钠可以消耗溶液或样本中的氧化型物质,可以保护吡啶酯,从而提高试剂R1的稳定性,同时还发现添加硫代硫酸钠可以获得更好的峰型,使得试剂盒具有更好的重复性。

[0125] 2. 硫代硫酸钠浓度对试剂R1稳定性的影响

[0126] 分别选用含硫代硫酸钠0.01w/v%、0.1w/v%、0.5w/v%、1w/v%、2w/v% 的缓冲液配制试剂R1,其它成分不变,考察不同硫代硫酸钠浓度的试剂R1在 37℃放置14天与第0天相比相比,各浓度校准品的峰面积保留率,结果如表8。

[0127] 表8不同浓度硫代硫酸钠对试剂R1热稳定性的影响

[0128]

校准品	37℃放置 14 天				
	0.01 w/v %	0.1 w/v %	0.5 w/v %	1 w/v %	2 w/v %
S0	90%	94%	96%	96%	96%
S1	89%	93%	94%	96%	95%
S2	89%	94%	94%	94%	95%
S3	88%	94%	95%	97%	96%
S4	89%	93%	94%	96%	95%
S5	89%	95%	95%	95%	95%

[0129] 硫代硫酸钠的浓度增加试剂R1的热稳定越好,当浓度为0.1-2w/v%时各浓度校准品的保留率均在95%左右,无明显差异。但硫代硫酸钠的浓度超过1w/v% 时,检测结果的响应值有所降低,信噪比有下降趋势,故硫代硫酸钠的最佳浓度选为0.1w/v%。

[0130] 3. 抗坏血酸对本底影响

[0131] 配制试剂R1时不添加抗坏血酸,其它成分不变,检测本底S0的峰面积,结果如表9。

[0132] 表9抗坏血酸对本底影响

[0133]

	不添加抗坏血酸	添加抗坏血酸
S0	33213	156
	34251	163

[0134] 添加抗坏血酸能够防止自由基与游离的吡啶酯反应,确保自由基只能在抗原-抗体复合物的分子内传递,从而降低了本底,提高了检测结果的准确性。

[0135] 4. 不同浓度抗坏血酸浓度对本底影响

[0136] 分别选用含抗坏血酸浓度0.01w/v%、0.05w/v%、0.1w/v%、0.5w/v%、1w/v%的缓冲液配制试剂R1,其它成分不变,检测本底如表10。

[0137] 表10不同浓度抗坏血酸对本底影响

[0138]

抗坏血酸浓度	0.01 w/v %	0.05 w/v %	0.1 w/v %	0.5 w/v %	1 w/v %
S0	265	123	118	122	109
	247	135	125	119	122

[0139] 从表10可以看出当抗坏血酸浓度大于0.05w/v%时本底基本保持不变,故抗坏血酸最佳浓度为0.05w/v%。

[0140] 5. EC氧化酶对试剂R1稳定性影响

[0141] 配制试剂R1时不添加EC氧化酶,其它成分不变,将试剂R1放置37°C 1天和14天,检测本底S0的峰面积,结果如表11。

[0142] 表11 EC氧化酶对试剂R1稳定性影响

[0143]

	不含 EC 氧化酶		含 EC 氧化酶	
	37°C, 1 天	37°C, 14 天	37°C, 1 天	37°C, 14 天
S0	27583	37669	126	106
	28335	36892	119	117

[0144] 由表11可知,添加EC氧化酶的试剂R1在37°C放置14天后的本底基本不变。EC氧化酶对抗坏血酸和硫代硫酸钠有保护作用,提高试剂R1的稳定性及抗干扰能力。

[0145] 6. EC氧化酶浓度对试剂R1稳定性影响

[0146] 配制不同浓度EC氧化酶的试剂R1,其它成分不变,将试剂R1在37°C放置14天后检测本底的峰面积。结果如表12。

[0147] 表12 EC氧化酶浓度对试剂R1稳定性影响

[0148]

EC 氧化酶浓度	0.01 w/v %	0.02 w/v %	0.05 w/v %	0.1 w/v %	1 w/v %
S0	153	136	124	117	112
	147	131	119	123	128

[0149] 由表12可知,当EC氧化酶浓度大于0.05w/v%时S0的变化率在5%以内,故EC氧化酶最佳浓度选择0.05w/v%。

[0150] 综上所述,本发明的胰岛素检测试剂盒为完全均相化学发光检测,更利于抗原抗体的反应,检测非常快速,大大缩短了反应时间,且能提高抗体的利用率,降低试剂盒的成本;本发明在试剂R1中加入了抗氧化剂,其能快速清除样本中的自由基或其他干扰物质,能有效地控制本底;另外,本发明的两个胰岛素抗体标记物吡啶酯和辣根过氧化物酶联合作用,且其与胰岛素原和C-肽无交叉反应,使得本发明的检测试剂盒具有更高的灵敏度、准确度和特异性;与现有的检测方法相比,本发明的检测不需要进行包被处理,优化了工艺流程,有效控制了成本,在检测过程中也不需要洗涤过程,不需要大量的洗涤液,减少了废弃物的排放,更利于临床上使用及其对废弃物的处理。

[0151] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

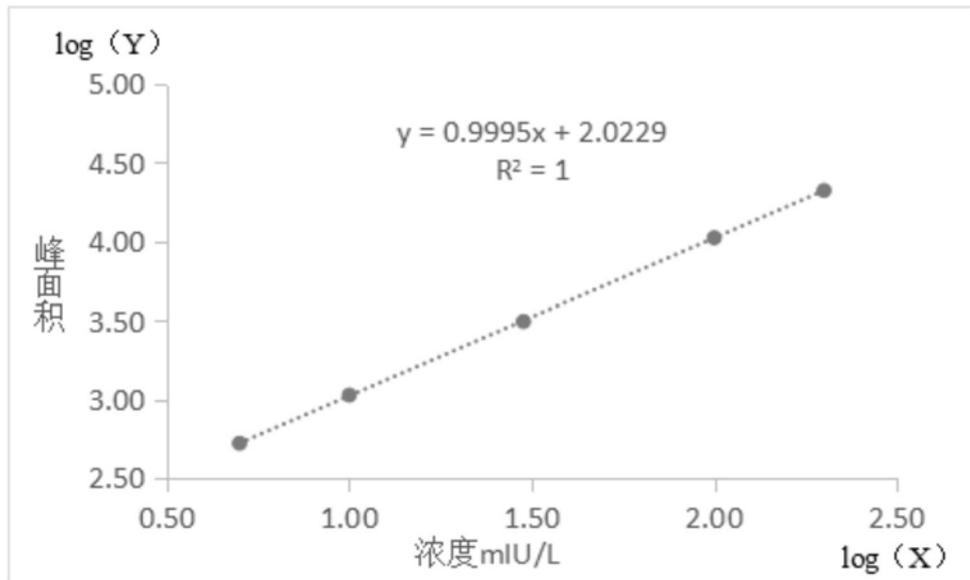


图1

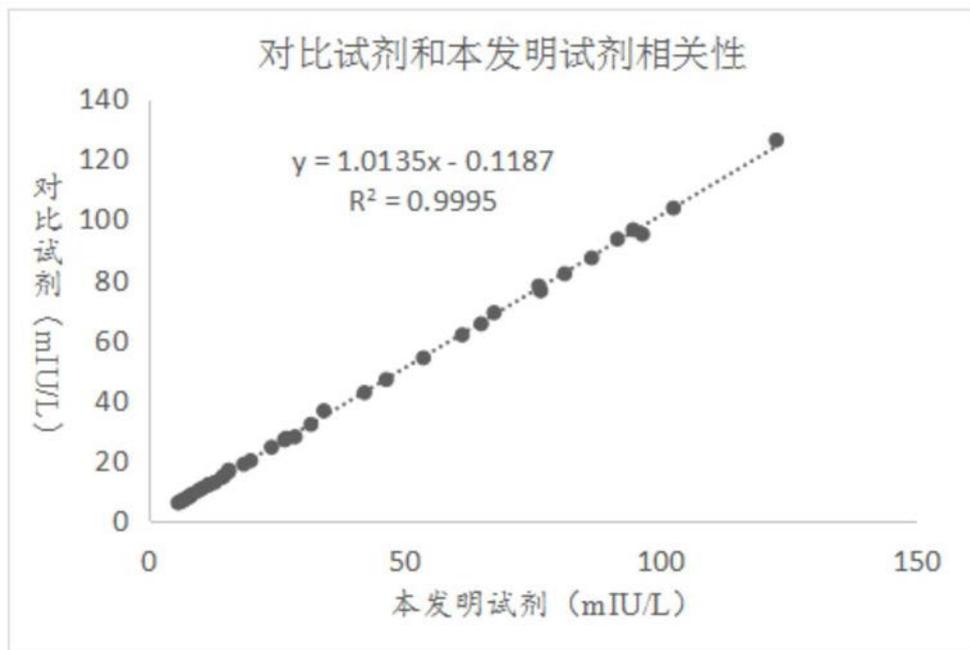


图2

专利名称(译)	一种完全均相测定胰岛素的检测试剂盒及其方法		
公开(公告)号	CN109725162A	公开(公告)日	2019-05-07
申请号	CN201811579131.4	申请日	2018-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	广州市进德生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州市进德生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州市进德生物科技有限公司		
[标]发明人	林伟荣 李民友 齐宗献 段朝晖 高国全 赵肃清 吴新伟		
发明人	林伟荣 李民友 齐宗献 段朝晖 高国全 赵肃清 吴新伟		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/535 G01N33/533 G01N21/76		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物技术领域，公开了一种完全均相测定胰岛素的检测试剂盒及其方法。本发明基于双抗体夹心技术，吡啶酯标记抗人胰岛素抗体和辣根过氧化物酶标记抗人胰岛素抗体分别结合在胰岛素分子的抗原决定簇上，形成抗体-抗原-抗体的免疫复合物，加入触发剂后，辣根过氧化物酶氧化触发剂产生羟自由基，羟自由基的半衰期非常短，且在抗氧化剂的作用下，能保证羟自由基在抗体-抗原-抗体的免疫复合物分子内部传递，吡啶酯在羟自由基的作用下，产生光信号，其光信号与胰岛素含量成正相关。本发明试剂盒能够实现完全均相化学发光检测胰岛素，不需要固定抗体，也不需要洗涤过程，具有稳定性好，检测快速便捷，灵敏度高，特异性强的特点。

