



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111308083 A

(43)申请公布日 2020.06.19

(21)申请号 201911327016.2

(22)申请日 2019.12.20

(71)申请人 郑州安图生物工程股份有限公司

地址 450000 河南省郑州市经济技术开发区
经北一路87号

(72)发明人 吴小田 崔小妞 史小芹 付光宇
吴学炜

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 刘颖

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书3页 说明书22页 附图2页

(54)发明名称

稀释组合物及用于骨桥蛋白检测的试剂或试剂盒

(57)摘要

本发明涉及免疫学检测领域,特别涉及稀释组合物及用于骨桥蛋白检测的试剂或试剂盒。本发明公开的磁微粒化学发光法检测骨桥蛋白的试剂盒包括:包被有骨桥蛋白单抗的磁微粒混悬液,含有骨桥蛋白单抗的酶结合物,样品稀释液及校准品。本试剂盒基于磁微粒化学发光法制备而成,配合Auto Lumo系列全自动免疫测定仪使用,可实现自动化检测,操作简便、检测速度快。本发明试剂盒具有检测范围宽、灵敏度高、特异性强的优点,可定量检测血清、血浆中骨桥蛋白的含量,辅助用于胃癌、肺癌、肝癌、乳腺癌等的早期诊断、疾病进程监测、治疗效果评价及预后监测。

1. 稀释组合物,其特征在于,以重量体积百分含量计,包括如下组分:

防腐剂	1~2‰ (w/v)
蛋白质类稳定剂	1~25% (w/v)
表面活性剂	1~10‰ (w/v)
EDTA	0.5~2% (w/v)
甘油	0~5% (w/v)
阻断剂	0.01%~0.05% (w/v)
色素	0~0.2‰ (w/v)
缓冲液 (pH=6~9)	余量

所述蛋白质类稳定剂包括牛血清白蛋白、牛血清、酪蛋白、鱼明胶中的一种或两者以上的组合物;

所述阻断剂包括EB1、HBR、HBT中的一种或两者的混合物。

2. 如权利要求1所述的稀释组合物,其特征在于,所述防腐剂包括Proclin300、MIT、Bro、IPBC或NaN₃中的一种或两者以上的组合物;

所述缓冲液为Tris、Tris-NaCl、MES、PBS、PB中的一种;

所述表面活性剂包括Triton X-100、Tween 20、Chaps或辛基酚聚氧乙烯醚中的一种或两者以上的组合物;

所述EDTA包括乙二胺四乙酸二钠、乙二胺四乙酸二钾中的一种或两者的混合物;

所述色素包括胭脂色素、日落黄色素、柠檬黄色素或果绿色素中的一种或两者以上的组合物。

3. 如权利要求1或2所述的稀释组合物,其特征在于,以重量体积百分含量计,包括如下组分:

防腐剂	2‰ (w/v)
蛋白质类稳定剂	25% (w/v)
表面活性剂	2~10‰ (w/v)
色素	0.2‰ (w/v)
缓冲液 (pH=7.4)	余量

所述防腐剂为Proclin 300和Bro;

所述缓冲液为Tris;

所述表面活性剂包括Triton X-100和Chaps;

所述蛋白质类稳定剂为牛血清;

所述色素为胭脂色素。

4. 如权利要求1或2所述的稀释组合物,其特征在于,以重量体积百分含量计,包括如下组分:

防腐剂	2‰ (w/v)
蛋白质类稳定剂	1% (w/v)
EDTA	1% (w/v)
色素	0.2‰ (w/v)
阻断剂	0.01%~0.05% (w/v)
缓冲液 (pH=7.4)	余量

所述防腐剂为Proclin 300和Bro;

所述缓冲液为PBS;

所述蛋白质类稳定剂为酪蛋白;

所述色素为果绿色素。

5. 如权利要求1或2所述的稀释组合物,其特征在于,以重量体积百分含量计,包括如下组分:

防腐剂	2‰ (w/v)
蛋白质类稳定剂	1% (w/v)
色素	0.2‰ (w/v)
缓冲液 (pH=7.4)	余量

所述防腐剂为Proclin 300和Bro;

所述缓冲液为PBS;

所述蛋白质类稳定剂为酪蛋白;

所述色素为日落黄色素或柠檬黄色素。

6. 如权利要求1或2所述的稀释组合物,其特征在于,以重量体积百分含量计,包括如下组分:

防腐剂	2‰ (w/v)
蛋白质类稳定剂	1% (w/v)
甘油	0~5% (w/v)
缓冲液 (pH=7.4)	余量

所述防腐剂为Proclin 300和NaN₃;

所述缓冲液为Tris;

所述蛋白质类稳定剂为牛血清白蛋白。

7. 如权利要求1至6任一项所述的稀释组合物在制备骨桥蛋白的检测试剂或检测试剂盒中的应用。

8. 骨桥蛋白的检测试剂,其特征在于,包括酶标记的骨桥蛋白的单克隆抗体、包被有骨桥蛋白的单克隆抗体的载体、含有骨桥蛋白抗原的校准品和所述酶的化学发光底物;

所述酶标记的骨桥蛋白的单克隆抗体中骨桥蛋白的单克隆抗体与如权利要求1至6任一项所述的稀释组合物按照0.05% (w/v) ~0.2% (w/v) 稀释制得;所述酶包括辣根过氧化

物酶、碱性磷酸酶中的一种；

所述包被有骨桥蛋白的单克隆抗体的载体由所述载体、所述骨桥蛋白的单克隆抗体混合，再与如权利要求1至6任一项所述的稀释组合物混合；所述载体为固相载体、磁性微粒或微孔板；

所述含有骨桥蛋白抗原的校准品由如权利要求1至6任一项所述的稀释组合物将骨桥蛋白抗原稀释浓度为0ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL。

9. 如权利要求8所述的检测试剂，其特征在于，所述酶的化学发光底物包括A液和B液，所述A液包括为过氧化脲、过氧化氢的一种或两者的组合物，B液包括过氧化二苯甲酰、过氧化二异丙苯的一种或两者的组合物。

10. 骨桥蛋白的检测试剂盒，其特征在于，包括如权利要求1至6任一项所述的稀释组合物或如权利要求8或9所述的检测试剂。

稀释组合物及用于骨桥蛋白检测的试剂或试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学检测领域,特别涉及稀释组合物及用于骨桥蛋白检测的试剂或试剂盒。

背景技术

[0002] 骨桥蛋白(OPN)是一种内分泌性非胶原型糖基化磷蛋白,可由破骨细胞、血管平滑肌细胞、血管内皮细胞、巨噬细胞等多种细胞表达。骨桥蛋白作为一种新型的细胞因子,参与骨代谢、肿瘤的生长转移、炎症与免疫等。OPN具有促肿瘤细胞趋化、黏附、迁移的作用,同时还能促进细胞外基质降解。病理状态(免疫性疾病、炎症和肿瘤)时表达增强,如肝癌、肺癌、胃癌、甲状腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、皮肤癌时亦能高水平表达。研究显示OPN能够促进肿瘤恶变,故临床将其视为恶性肿瘤生长的重要血清标志物。另外,在肿瘤转移过程中,OPN也发挥着十分重要的作用,所以临床也常常将OPN视为肿瘤转移标志物。

[0003] OPN是一种带负电的磷酸化糖蛋白,广泛的分布于多种组织和细胞中,其相对分子质量约为44kDa,约含300个氨基酸残基。OPN除具有调节矿化组织的形成、塑型,对微生物感染产生非特异性应答等诸多功能外,还可诱导组织细胞发生恶性转化与无限制增生;参与细胞的信号传导;削弱免疫系统对肿瘤细胞的杀伤作用,形成免疫逃逸;促进血管内皮细胞生长,形成肿瘤血管;引发金属蛋白酶的大量释放,破坏基底膜等局部膜结构;通过RGD序列介导肿瘤细胞的趋化、粘附和迁移。由此,在肿瘤的各个阶段而发挥十分重要的促进作用,同时,其在肿瘤进展中于血清中的含量也有相应的改变。

[0004] 胃癌患者血清OPN水平明显高于健康人群;HCC患者血清OPN水平明显高于良性慢性肝病患者,OPN水平对HCC预后判断及术后复发转移的预测也有重要意义;骨桥蛋白表达强弱和肺癌的恶性程度及进展密切相关,研究认为骨桥蛋白对非小细胞肺癌的转移倾向有一定临床意义,可以用来作为临床评估非小细胞肺癌进展及预测肿瘤转移潜能的指标。

[0005] 目前市场上定量检测OPN的方法主要为酶联免疫分析法(武汉博士德、美国Assay Designs、北京海泰通达),在检测准确度、线性范围、耗时、安全性及操作等方面又存在一定局限性。因此,提供一种准确度高、重复性好、抗干扰能力强、线性范围宽的血清骨桥蛋白含量检测试剂盒,可实现自动化检测,操作简便,检测速度快,具有重要的现实意义。

发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明提供一种稀释组合物及用于骨桥蛋白检测的试剂或试剂盒。该试剂盒具有检测范围宽、灵敏度高、特异性强的优点,可定量检测血清、血浆中骨桥蛋白的含量,辅助用于胃癌、肺癌、肝癌、乳腺癌等的早期诊断、疾病进程监测、治疗效果评价及预后监测。

[0007] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0008] 本发明提供了稀释组合物,以重量体积百分含量计,包括如下组分:

[0009]	防腐剂	1~2‰ (w/v)
	蛋白质类稳定剂	1~25% (w/v)
	表面活性剂	1~10‰ (w/v)
	EDTA	0.5~2% (w/v)
	甘油	0~5% (w/v)
	阻断剂	0.01%~0.05% (w/v)
	色素	0~0.2‰ (w/v)
	缓冲液 (pH=6~9)	余量

[0010] 所述蛋白质类稳定剂包括牛血清白蛋白、牛血清、酪蛋白、鱼明胶中的一种或两者以上的组合物；

[0011] 所述阻断剂包括EB1、HBR、HBT中的一种或两者的混合物。

[0012] 在本发明的一些具体实施方案中，所述防腐剂包括Proclin 300、MIT、Bro、IPBC或NaN₃中的一种或两者以上的组合物；

[0013] 所述缓冲液为Tris、Tris-NaCl、MES、PBS、PB中的一种；

[0014] 所述表面活性剂包括Triton X-100、Tween 20、Chaps或辛基酚聚氧乙烯醚中的一种或两者以上的组合物；

[0015] 所述EDTA包括乙二胺四乙酸二钠、乙二胺四乙酸二钾中的一种或两者的混合物；

[0016] 所述色素包括胭脂色素、日落黄色素、柠檬黄色素或果绿色素中的一种或两者以上的组合物。

[0017] 在本发明的一些具体实施方案中，以重量体积百分含量计，包括如下组分：

[0018]	防腐剂	2‰ (w/v)
	蛋白质类稳定剂	25% (w/v)
	表面活性剂	2~10‰ (w/v)
	色素	0.2‰ (w/v)
	缓冲液 (pH=7.4)	余量

[0019] 所述防腐剂为Proclin 300和Bro；

[0020] 所述缓冲液为Tris；

[0021] 所述表面活性剂包括Triton X-100和Chaps；

[0022] 所述蛋白质类稳定剂为牛血清；

[0023] 所述色素为胭脂色素。

[0024] 在本发明的一些具体实施方案中，以重量体积百分含量计，包括如下组分：

- | | | |
|--------|--------------|-------------------|
| | 防腐剂 | 2‰ (w/v) |
| | 蛋白质类稳定剂 | 1% (w/v) |
| [0025] | EDTA | 1% (w/v) |
| | 阻断剂 | 0.01%~0.05% (w/v) |
| | 色素 | 0.2‰ (w/v) |
| | 缓冲液 (pH=7.4) | 余量 |
- [0026] 所述防腐剂为Proclin 300和Bro;
- [0027] 所述缓冲液为PBS;
- [0028] 所述蛋白质类稳定剂为酪蛋白;
- [0029] 所述色素为果绿色素。
- [0030] 在本发明的一些具体实施方案中,以重量体积百分含量计,包括如下组分:
- | | | |
|--------|--------------|------------|
| | 防腐剂 | 2‰ (w/v) |
| | 蛋白质类稳定剂 | 1% (w/v) |
| [0031] | 色素 | 0.2‰ (w/v) |
| | 缓冲液 (pH=7.4) | 余量 |
- [0032] 所述防腐剂为Proclin 300和Bro;
- [0033] 所述缓冲液为PBS;
- [0034] 所述蛋白质类稳定剂为酪蛋白;
- [0035] 所述色素为日落黄色素或柠檬黄色素。
- [0036] 在本发明的一些具体实施方案中,以重量体积百分含量计,包括如下组分:
- | | | |
|--------|--------------|------------|
| | 防腐剂 | 2‰ (w/v) |
| | 蛋白质类稳定剂 | 1% (w/v) |
| [0037] | 甘油 | 0~5% (w/v) |
| | 缓冲液 (pH=7.4) | 余量 |
- [0038] 所述防腐剂为Proclin 300和NaN₃;
- [0039] 所述缓冲液为Tris;
- [0040] 所述蛋白质类稳定剂为牛血清白蛋白。
- [0041] 在上述研究的基础上,本发明还提供了所述的稀释组合物在制备骨桥蛋白的检测试剂或检测试剂盒中的应用。
- [0042] 更重要的是,本发明还提供了骨桥蛋白的检测试剂,包括酶标记的骨桥蛋白的单克隆抗体、包被有骨桥蛋白的单克隆抗体的载体、含有骨桥蛋白抗原的校准品和所述酶的化学发光底物;
- [0043] 所述酶标记的骨桥蛋白的单克隆抗体中骨桥蛋白的单克隆抗体与所述的稀释组合物按照0.05% (w/v) ~0.2% (w/v) 稀释制得;所述酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶中的一种;

[0044] 所述包被有骨桥蛋白的单克隆抗体的载体由所述载体、所述骨桥蛋白的单克隆抗体混合,再与所述的稀释组合物混合;所述载体为固相载体、磁性微粒或微孔板;

[0045] 所述含有骨桥蛋白抗原的校准品由所述的稀释组合物将骨桥蛋白抗原稀释浓度为0ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL。

[0046] 在本发明的一些具体实施方案中,所述酶的化学发光底物包括A液和B液,所述A液包括为过氧化脲、过氧化氢的一种或两者的组合物,B液包括过氧化二苯甲酰、过氧化二异丙苯的一种或两者的组合物。

[0047] 更重要的是,本发明还提供了骨桥蛋白的检测试剂盒,包括所述的稀释组合物或所述的检测试剂。

[0048] 本发明提供的试剂盒有却不限于以下有益效果:本发明试剂盒采用磁微粒化学发光的方法,搭配AutoLumo A2000系列全自动化学发光测定仪,实现了全自动化;使用方便,操作简单;本试剂盒检测耗费时间短,大大节省了检验人员的时间(约40min出结果);本发明试剂盒采用双抗体夹心法,线性范围宽,在临床上实用性强;本试剂盒采用的是两步法,降低了临床上发生HOOK的风险。本发明试剂盒采用一种特有的稀释液组合物,可以消除新旧样本差异,而且有效地降低了假阳和跳孔风险,大大提高了检测准确度。

附图说明

[0049] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0050] 图1示本发明试剂盒线性范围考核;

[0051] 图2示参比试剂盒线性范围考核;

[0052] 图3示本发明试剂盒与参比试剂盒相关性比对结果。

具体实施方式

[0053] 本发明公开了一种稀释组合物及用于骨桥蛋白检测的试剂或试剂盒,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0054] 本发明提供了一种化学发光法定量检测骨桥蛋白的试剂盒,该试剂盒具有更宽的检测范围(0.5~200ng/mL),基本可以满足临床检测的需求。

[0055] 为实现上述目的,本发明可采取下述技术方案:

[0056] 本发明提供了一种骨桥蛋白检测试剂盒(磁微粒化学发光法),相较于目前市面的酶免平台,其主要优点在于可以实现自动化检测,操作简便且检测速度快,所述试剂盒包括:辣根过氧化物酶标记的OPN的单克隆抗体、包被有OPN的单克隆抗体的固相载体、含有OPN抗原的校准品和上述辣根过氧化物酶所作用的化学发光底物四种组分。

[0057] 在一些实施例中,所述载体为固相载体、磁性微粒或微孔板。

[0058] 在一些实施例中,四个组分的稀释液缓冲液为Tris、Tris-NaCl、MES、PBS、PB中的一种或多种,pH=6~9。

[0059] 在一些实施例中,四个组分的稀释液中的蛋白为牛血清白蛋白、牛血清、酪蛋白、鱼明胶中的一种或多种。

[0060] 在一些实施例中,四个组分的稀释液中的防腐剂为Proclin 300、MIT、Bro、IPBC或NaN₃中的两种或两种以上。

[0061] 在一些实施例中,OPN磁微粒混悬液是由OPN抗体按照0.3~1.5 μ g/T包被。

[0062] 在一些实施例中,磁微粒OPN酶结合物是由辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶中的一种标记的OPN抗体与酶结合物稀释液按照0.05%~0.1%的比例稀释制成,表面活性剂为Triton X-100、Tween 20、Chaps或辛基酚聚氧乙烯醚中的一种或两种以上。

[0063] 在一些实施例中,样品稀释液中含有0.5~2%的EDTA,包括乙二胺四乙酸二钠或/和乙二胺四乙酸二钾。

[0064] 在一些实施例中,样品稀释液中还含有0.02%~0.04% (w/v还是v/v) 阻断剂,包含HBR、HBT中的一种或两种以上。

[0065] 在一些实施例中,校准品为液态校准品,在0~200ng/mL范围内有6个梯度。

[0066] 在一些实施例中,化学发光底物液包括A液和B液,A液包括为过氧化脲、过氧化氢的一种或两种以上,B液包括过氧化二苯甲酰和过氧化二异丙苯的一种或两种以上。

[0067] 在一些实施例中,磁微粒混悬液的制备方法为:封保液是由pH=7.4的Tris缓冲液配制,其中含有的防腐剂为1‰ (w/v) Proclin300和1‰ (w/v) NaN₃;所含蛋白质类稳定剂为1% (w/v) 的牛血清白蛋白;另加入5% (w/v) 的甘油;选择合适的磁微粒原液,将OPN抗体按照0.3~1.5 μ g/T的浓度用包被到磁微粒表面,制成OPN磁微粒混悬液,混合均匀后分装,2~8℃保存。

[0068] 在一些实施例中,酶结合物的制备方法为:酶结合物是由pH=7.4的Tris缓冲液,其中含有的防腐剂为1‰ (w/v) Proclin 300和1‰ (w/v) Bro;所含蛋白质类稳定剂为25% (w/v) 牛血清;表面活性剂为1‰~5‰ (w/v) Triton X-100和1‰~5‰ (w/v) Chaps;0.2‰的胭脂色素混合均匀,按照1:500~1:2000的比例加入OPN酶标抗体,2~8℃保存待用。

[0069] 在一些实施例中,样品稀释液的制备方法为:样品稀释液包括PH=7.4的PBS缓冲液,防腐剂为1‰ (w/v) Proclin 300和1‰ (w/v) Bro;蛋白质类稳定剂为1% (w/v) 酪蛋白;1% (w/v) 的乙二胺四乙酸二钠,0.2‰的果绿色素;一种或两种以上0.01%~0.05%比例的阻断剂。

[0070] 所述校准品的制备方法为:校准品稀释液包括PH=7.4的PBS缓冲液,防腐剂为1‰ (w/v) Proclin 300和1‰ (w/v) Bro;蛋白质类稳定剂为1% (w/v) 酪蛋白;0.2‰的日落黄或柠檬黄色素;用校准品稀释液将OPN抗原稀释成6个梯度0ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL,分别记为S0、S1、S2、S3、S4、S5,分装成1ml/瓶,2~8℃保存。

[0071] 本发明试剂盒采用磁微粒化学发光的方法,搭配AutoLumo A2000系列全自动化学发光测定仪,实现了全自动化;使用方便,操作简单;本试剂盒检测耗时间短,大大节省了检验人员的时间(约40min出结果);本发明试剂盒采用双抗体夹心法,线性范围宽,在临床上实用性强;本试剂盒采用的是两步法,降低了临床上发生HOOK的风险。本发明试剂盒采用一种特有的稀释液组合物,可以消除新旧样本差异,而且有效地降低了假阳和跳孔风险,大大提高了检测准确度。

[0072] 本发明提供的稀释组合物及用于骨桥蛋白检测的试剂或试剂盒中所用原料及试

剂均可由市场购得。

[0073] 下面结合实施例,进一步阐述本发明:

[0074] 实施例1试剂的制备

[0075] (1) 封保液的配制

[0076] 封保液是由pH=7.4的Tris缓冲液配制,其中含有的防腐剂为1‰(w/v) Proclin300和1‰(w/v) NaN₃;所含蛋白质类稳定剂为1‰(w/v)的牛血清白蛋白;另加入5‰(w/v)的甘油。

[0077] (2) 酶结合物稀释液的配制

[0078] 酶结合物是由pH=7.4的Tris缓冲液,含有防腐剂为1‰(w/v) Proclin 300和1‰(w/v) Bro;所含蛋白质类稳定剂为25‰(w/v) 牛血清;表面活性剂为1‰(w/v) Triton X-100;0.2‰的胭脂色色素,2-8℃保存待用。

[0079] (3) 样品稀释液的制备

[0080] 样品稀释液是由PH=7.4的PBS缓冲液,含有防腐剂为1‰(w/v) Proclin 300和1‰(w/v) Bro;所含蛋白质类稳定剂为1‰(w/v) 酪蛋白;1‰(w/v)的乙二胺四乙酸二钠,0.2‰的果绿色素,2-8℃保存待用。

[0081] (4) 校准品稀释液的制备

[0082] 校准品稀释液是由PH=7.4的PBS缓冲液,含有防腐剂为1‰(w/v) Proclin 300和1‰(w/v) Bro;所含蛋白质类稳定剂为1‰(w/v) 酪蛋白;0.2‰的日落黄或柠檬黄色素。

[0083] (5) 磁微粒混悬液的制备

[0084] 1.取30μL混匀后的磁微粒原液用300μL的PBS缓冲液洗涤5次。

[0085] 2.用10mg/mL~30mg/mL的EDC和10mg/mL~30mg/mL的NHS对磁微粒活化1小时。

[0086] 3.用pH 4~5MES缓冲液将活化后的磁微粒洗涤2次。

[0087] 4.按照0.3~1.5μg/T的量加入抗体,包被2小时。

[0088] 5.用0.5mol/L~1.5mol/L的乙醇胺终止反应30min。

[0089] 6.用封保液封闭4次。

[0090] 7.加入3mL封闭液,2-8℃保存待用。

[0091] (6) 酶结合物溶液的配制

[0092] 将HRP标记的OPN抗体按照体积比为1:500~1:2000的比例稀释到酶结合物缓冲液中,2-8℃保存待用。

[0093] (7) 校准品和质控品的配制

[0094] 用校准品稀释液将OPN抗原稀释为浓度为0ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL,分别记为校准品S0、S1、S2、S3、S4、S5。

[0095] 实施例2本发明试剂盒的检测步骤

[0096] 1) 在反应容器(以下简称“孔”)中依次加入校准品(用于定标)和样本,加样量均为25μL/孔。

[0097] 2) 每孔分别加入磁微粒混悬液20μL和样品稀释液50μL。

[0098] 3) 混匀后37℃温育15分钟。

[0099] 4) 清洗液洗涤5次。

[0100] 5) 每孔分别加入酶结合物100μL。

[0101] 6) 混匀后37℃温育17分钟。

[0102] 7) 清洗液洗涤5次。

[0103] 8) 每孔加入底物A液和底物B液各50μL。

[0104] 9) 混匀后1~5分钟检测发光值。

[0105] 10) 结果计算

[0106] 选择适当的曲线拟合方式进行结果计算。本试剂盒推荐采用四参数拟合方式,以校准品浓度值为x轴,以校准品发光值的log值为y轴建立定标曲线,根据待测样本的发光值回算相应的浓度值。仪器自动操作系统可通过存储的定标曲线以及样本测试得到的发光值自动计算样本测试结果。

[0107] 实施例3本发明试剂盒的性能评价

[0108] (1) 灵敏度检测

[0109] LoB:准备5份接近0值的临床样本,每个样本重复3次,总共做4天,得到60个数据;LoD:准备5份浓度范围为1~4倍LOB的系列临床样本,每个样本重复3次,总共做4天,得到60个数据;FS:采用LoD实验中的数据,5个浓度样本每天测3次,总共测4天,每个样本得到12个结果,计算每个样本的均值、SD和CV%,最接近20%的浓度为功能灵敏度。灵敏度检测结果见表1。

[0110] 表1本发明试剂盒灵敏度考核结果

灵敏度	批次		
	第 1 批/ (ng/mL)	第 2 批/ (ng/mL)	第 3 批/ (ng/mL)
LoB	0.32	0.41	0.38
LoD	0.55	0.52	0.54
FS	0.61	0.65	0.62

[0113] 从表1检测结果可以看出:中试第1批试剂盒能够准确检测出OPN的最低浓度为0.61ng/mL;中试第2批试剂盒能够准确检测出OPN的最低浓度为0.65ng/mL;中试第3批试剂盒能够准确检测出OPN的最低浓度为0.62ng/mL。可以看出本试剂盒的灵敏度能够满足临床检测需求。

[0114] (2) 试剂盒精密度

[0115] 取三批试剂进行精密度实验,分别用配套质控品高/低值样本和临床高/低值样本,各测20次计算测定浓度的变异,测定结果如表2、表3所示,结果表明变异系数均小于7%。

[0116] 表2本发明试剂盒质控品标本检测精密度

[0117]

序号	第 1 批		第 2 批		第 3 批	
	高值 100ng/ml	低值 10ng/ml	高值 100ng/ml	低值 10ng/ml	高值 100ng/ml	低值 10ng/ml
1	94.62	9.63	97.03	9.70	96.94	9.57
2	107.41	10.96	94.39	9.79	94.45	9.20
3	108.88	9.74	100.01	10.48	103.42	9.04
4	100.73	10.65	94.15	9.90	100.93	10.82
5	99.36	10.87	93.27	9.71	102.00	10.09
6	102.74	10.12	97.78	10.63	104.18	9.58
7	99.87	10.51	93.95	10.42	105.81	9.96
8	91.54	10.39	102.14	9.44	92.95	9.49
9	99.21	10.89	94.52	9.73	103.43	10.56
10	90.52	9.72	98.98	10.97	95.94	10.85
11	102.13	10.77	90.43	10.58	100.74	10.91
12	102.27	10.94	106.03	9.54	108.72	10.47
13	105.55	10.88	100.86	10.07	101.34	10.97

[0118]

14	97.98	9.85	95.06	9.68	103.96	10.59
15	91.70	9.23	106.49	9.12	109.04	9.30
16	90.52	9.51	98.86	10.01	103.50	9.11
17	104.81	9.91	101.44	10.82	95.62	10.73
18	96.16	9.48	104.06	9.20	104.76	9.34
19	96.21	9.10	93.67	10.96	103.87	9.45
20	108.89	10.02	93.25	10.42	104.30	10.27
平均值	99.56	10.16	97.82	10.06	101.79	10.01
SD	5.91	0.62	4.60	0.57	4.50	0.68
变异系数 CV%	5.94%	6.10%	4.71%	5.64%	4.42%	6.81%

[0119] 表3本发明试剂盒真实人血清标本检测精密度

[0120]

序号	第 1 批		第 2 批		第 3 批	
	高值	低值	高值	低值	高值	低值
	49ng/ml	15ng/ml	49ng/ml	15ng/ml	49ng/ml	15ng/ml
1	45.12	14.95	49.59	14.56	51.95	15.94
2	44.98	15.73	51.20	15.52	48.34	14.06
3	46.01	13.75	50.66	15.50	52.68	14.80
4	51.88	14.13	51.17	14.11	44.33	15.93
5	53.01	14.01	51.03	15.50	50.85	13.70
6	44.96	15.02	47.51	14.94	47.95	14.91
7	51.11	15.34	47.14	16.42	53.73	13.76
8	50.00	15.46	49.78	16.00	47.41	13.74
9	46.87	14.11	44.52	14.06	50.28	14.64
10	52.09	16.24	48.46	14.90	47.04	16.27
11	45.89	13.73	46.05	16.04	50.07	14.13
12	48.61	15.49	44.11	14.03	44.83	13.78

[0121]

13	50.49	16.39	44.97	15.83	51.74	15.93
14	44.45	14.55	51.55	15.77	45.56	14.02
15	50.31	16.01	48.13	14.50	52.00	16.24
16	50.22	14.52	48.60	14.91	46.23	16.37
17	51.87	15.77	49.43	14.77	50.05	14.91
18	49.48	14.65	51.74	15.27	47.20	14.71
19	53.58	15.81	46.14	16.14	44.74	15.73
20	45.49	15.58	46.73	15.41	44.10	15.71
平均值	48.82	15.06	48.43	15.21	48.55	14.96
SD	3.06	0.84	2.45	0.72	3.05	0.97
变异系数 CV%	6.26%	5.57%	5.06%	4.76%	6.28%	6.48%

[0122] (3) 试剂盒临床性能考核

[0123] 用本发明试剂盒和参比试剂盒(YH)同时测量384例临床样本,结果如表4所示与标杆阳性符合率达到99.25%,阴性符合率达到97.46%,总符合率达到98.70%。

[0124] 表4

[0125]

		参比试剂盒		合计
		+	-	
本发明试剂盒	+	264	3	267
	-	2	115	117
合计		266	118	384
阳性符合率	99.25%			
阴性符合率	97.46%			
总符合率	98.70%			

[0126] 本发明试剂盒和参比试剂YH试剂盒有较好的相关性,相关性见附图1,如图所示: $y=1.0199x+4.8469$, $R^2=0.9713$,且量值偏差较小,临床一致性较好。

[0127] 由表4可以看出,本发明试剂盒与参比试剂盒阴阳符合率与总符合率均较好。

[0128] 注:本申请中所用的全自动磁微粒化学发光仪(AutoLumo A2000Plus)由郑州安图生物工程股份有限公司提供。

[0129] (4) 试剂盒的线性范围考核

[0130] 取1例高值样本H(>200ng/ml),1例低值样本L(<0.5ng/ml),分别按照如下比例进行混合成7个浓度样本(6H、5H+1L、4H+2L、3H+3L、2H+4L、1H+5L、6L),每个浓度样本检测3次,计算均值。将理论值与实测均值使用EXCEL软件进行一次方程 $y=ax+b$ 回归分析,统计方程因子斜率a和相关性 R^2 ,要求 $a=1\pm0.1$, $R^2>0.99$ 。结果如图1所示,可以看出本发明试剂盒线性范围可达0.5~200ng/mL。参比试剂盒的线性范围如图2所示。本发明试剂盒与参比试剂盒相关性比对如图3所示。(5)、特异性测定

[0131] 内源性(血红蛋白、甘油三酯和胆红素)干扰

[0132] 准备高低值样本各一份,高值浓度约为100ng/mL,低值浓度约为20ng/mL。血红蛋白分别用高值和低值样本配制(1000、500、300、100、0)mg/dL六个浓度梯度;甘油三酯分别用高值和低值样本配制(5000、3000、2000、1000、0)mg/dL六个浓度梯度;胆红素需先溶到二甲基甲砒(DMSO)中,分别用高值和低值样本配制(100、60、40、20、10、0)mg/dL六个浓度梯度,并做DMSO对照实验,每个浓度分别重复三次一天内完成考核两批;结果见表5~10:

[0133] 表5参比试剂盒血红蛋白干扰考核

[0134]

批次 信息	参比试剂血红蛋白验证									
	添加 浓度	重复次 数	高值样本			低值样本			最大允 许偏差	干扰浓 度上限
			对照样 本	干扰样 本	干扰 率	对照样 本	干扰样 本	干扰率		
第一 批	1000m g/dL	复孔 1	102.19	91.06	11.44 %	23.17	20.96	13.40 %	10%	300mg /dL
		复孔 2	112.82	97.40		24.89	21.13			
		复孔 3	101.54	91.86		23.31	19.72			
	500mg	复孔 1	111.17	92.23	15.12	23.85	20.82	15.61		

[0135]

第二批		/dL	复孔 2	114.20	94.33	%	24.41	20.28	%
			复孔 3	104.41	93.35		24.16	20.01	
	300mg /dL		复孔 1	102.95	108.49	-2.24%	23.74	22.70	4.16%
			复孔 2	104.80	100.30		24.87	23.85	
			复孔 3	100.41	106.27		25.18	24.16	
	100mg /dL		复孔 1	105.89	99.53	4.70%	24.06	25.53	3.25%
			复孔 2	111.95	98.92		25.23	23.82	
			复孔 3	97.09	101.68		24.93	22.46	
	0mg/d L		复孔 1	108.01	103.76	-0.61%	23.86	24.91	2.27%
			复孔 2	104.55	106.31		24.53	25.58	
			复孔 3	103.84	108.27		25.24	21.47	
	1000m g/dL		复孔 1	106.20	108.67	-3.75%	25.99	20.08	14.65 %
			复孔 2	101.54	107.16		24.51	22.80	
			复孔 3	105.71	109.35		24.64	21.25	
	500mg /dL		复孔 1	104.84	98.22	3.21%	25.07	23.76	3.60%
			复孔 2	103.35	104.21		24.03	24.32	
			复孔 3	111.55	107.06		25.46	23.80	
	300mg /dL		复孔 1	106.43	102.22	-0.93%	25.45	22.65	8.53%
			复孔 2	104.33	113.96		23.76	23.21	
			复孔 3	110.47	108.06		25.84	22.78	
	100mg /dL		复孔 1	106.88	100.82	5.52%	26.64	22.14	9.51%
			复孔 2	106.10	103.04		25.56	23.61	
			复孔 3	113.66	104.76		24.64	23.79	
	0mg/d L		复孔 1	101.25	111.11	1.81%	25.20	24.16	5.57%
			复孔 2	105.84	100.36		23.35	22.23	
			复孔 3	112.63	102.44		25.89	23.90	

[0136] 表6本发明试剂盒血红蛋白干扰考核

[0137]

批次 信息		本发明血红蛋白验证									
		添加 浓度	重复 次数	高值样本			低值样本			最大允 许偏差	干扰浓 度上限
				对照样 本	干扰样 本	干扰 率	对照 样本	干扰样本	干扰率		
第一 批	1000m g/dL	复孔 1	107.39	92.34	12.90 %	23.62	20.09	13.01 %	10%	500mg/ dL	
		复孔 2	108.82	95.49		24.08	20.34				
		复孔 3	105.45	92.33		24.21	22.12				
	500mg /dL	复孔 1	107.39	104.25	2.84 %	23.62	24.78	-1.82%			
		复孔 2	108.82	99.65		24.08	23.79				
		复孔 3	99.45	102.79		24.21	24.64				
	300mg /dL	复孔 1	107.39	103.34	3.80 %	23.62	23.22	2.33%			
		复孔 2	108.82	105.92		24.08	23.57				
		复孔 3	99.45	94.41		24.21	23.45				
	100mg /dL	复孔 1	107.39	102.26	1.48 %	23.62	24.40	0.05%			
		复孔 2	108.82	103.32		24.08	24.00				
		复孔 3	99.45	105.41		24.21	23.47				
	0mg/d L	复孔 1	107.39	103.24	1.97 %	23.62	23.82	4.08%			
		复孔 2	108.82	101.41		24.08	24.47				
		复孔 3	99.45	104.79		24.21	20.69				
第二 批	1000m g/dL	复孔 1	105.01	104.94	0.43 %	25.53	20.55	15.72 %			
		复孔 2	105.25	107.34		24.55	22.18				
		复孔 3	108.87	105.49		24.76	20.35				
	500mg /dL	复孔 1	105.01	99.99	3.17 %	25.53	23.48	3.18%			
		复孔 2	105.25	105.14		24.55	24.23				
		复孔 3	108.87	103.89		24.76	24.76				
	300mg /dL	复孔 1	105.01	102.44	0.99 %	25.53	23.34	6.37%			
		复孔 2	105.25	110.10		24.55	23.40				
		复孔 3	108.87	103.44		24.76	23.33				

[0138]

100mg /dL	复孔 1	105.01	105.78	1.23 %	25.53	22.89	7.51%
	复孔 2	105.25	106.59		24.55	23.05	
	复孔 3	108.87	102.83		24.76	23.28	
0mg/d L	复孔 1	105.01	107.12	1.41 %	25.53	23.28	4.78%
	复孔 2	105.25	105.26		24.55	23.23	
	复孔 3	108.87	102.26		24.76	24.75	

[0139] 表7参比试剂盒甘油三脂干扰考核

[0140]

参比试剂甘油三酯验证										
批次	添加 浓度	重复次 数	高值样本			低值样本			最大允 许偏差	干扰浓度 上限
			对照样 本	干扰样 本	干扰 率	对照 样本	干扰 样本	干扰 率		
第一 批	5000 mg/d L	复孔 1	109.59	98.36	12.51 %	23.95	20.81	14.50 %	10%	2000mg/d L
		复孔 2	112.54	94.16		23.02	18.10			
		复孔 3	107.64	95.99		24.08	21.83			
	3000 mg/d L	复孔 1	111.97	96.76	12.65 %	22.84	22.59	6.67%		
		复孔 2	106.36	93.15		22.92	20.98			
		复孔 3	104.90	92.45		23.30	20.89			
	2000 mg/d L	复孔 1	106.90	100.42	2.45%	23.09	22.03	5.21%		
		复孔 2	111.14	107.20		23.32	21.91			
		复孔 3	99.99	102.62		24.55	23.32			
	1000 mg/d L	复孔 1	109.63	98.95	3.27%	22.97	25.36	-1.78 %		
		复孔 2	111.82	103.87		23.34	23.33			
		复孔 3	97.90	106.09		25.27	24.17			
	0mg/ dL	复孔 1	108.43	107.66	-0.33 %	23.82	22.99	4.90%		
		复孔 2	104.33	103.98		24.13	24.63			
		复孔 3	100.90	103.05		24.69	21.46			
第二 批	5000 mg/d	复孔 1	100.72	108.57	2.73%	26.09	23.16	11.81 %		
		复孔 2	106.74	102.61		24.25	20.30			

[0141]

L	复孔 3	104.43	92.21		24.24	22.30	
3000	复孔 1	103.31	105.91	-2.26 %	26.04	23.05	2.64%
mg/d	复孔 2	102.03	99.47		24.44	24.99	
L	复孔 3	103.81	110.74		23.95	24.42	
2000	复孔 1	104.35	105.06	-2.83 %	24.30	25.22	2.36%
mg/d	复孔 2	104.70	107.29		24.32	22.99	
L	复孔 3	106.07	111.68		25.20	23.87	
1000	复孔 1	107.20	106.72	-1.47 %	24.99	23.89	-1.11 %
mg/d	复孔 2	109.22	114.07		23.57	25.91	
L	复孔 3	105.23	105.60		23.92	23.49	
0mg/ dL	复孔 1	99.86	108.80	-6.65 %	24.99	24.02	-2.95 %
	复孔 2	104.52	116.48		23.50	26.04	
	复孔 3	104.66	104.31		23.68	24.23	

[0142] 表8本发明试剂盒甘油三脂干扰考核

[0143]

本发明甘油三酯验证										
批次	添加浓度	重复次数	高值样本			低值样本			最大允许偏差	干扰浓度上限
			对照样本	干扰样本	干扰率	对照样本	干扰样本	干扰率		
第一批	5000m g/dL	复孔 1	107.39	101.28	6.07%	23.62	23.02	5.43 %	10%	3000m g/dL
		复孔 2	108.82	102.90		24.08	22.60			
		复孔 3	99.45	92.33		24.21	22.39			
	3000m g/dL	复孔 1	107.39	100.75	3.52%	23.62	22.27	4.78 %		
		复孔 2	108.82	103.09		24.08	23.32			
		复孔 3	99.45	100.71		24.21	22.89			
	2000m g/dL	复孔 1	107.39	101.89	2.16%	23.62	22.91	3.20 %		
		复孔 2	108.82	103.71		24.08	22.90			
		复孔 3	99.45	103.23		24.21	23.79			
	1000m	复孔 1	107.39	102.69	2.48%	23.62	24.16	2.42		

[0144]

第二 批	g/dL	复孔 2	108.82	101.05		24.08	22.91	%
		复孔 3	99.45	104.11		24.21	23.10	
	0mg/d L	复孔 1	107.39	109.19	-2.07%	23.62	22.73	5.42 %
		复孔 2	108.82	107.72		24.08	23.99	
		复孔 3	99.45	105.30		24.21	21.30	
	5000m g/dL	复孔 1	105.01	105.90	5.25%	25.53	22.34	12.6 6%
		复孔 2	105.25	102.22		24.55	21.05	
		复孔 3	108.87	94.25		24.76	21.98	
	3000m g/dL	复孔 1	105.01	110.22	-0.36%	25.53	23.61	3.99 %
		复孔 2	105.25	102.79		24.55	24.32	
		复孔 3	108.87	107.28		24.76	23.92	
	2000m g/dL	复孔 1	105.01	104.08	-1.38%	25.53	25.53	3.03 %
		复孔 2	105.25	111.05		24.55	23.69	
		复孔 3	108.87	108.42		24.76	23.36	
	1000m g/dL	复孔 1	105.01	103.84	0.79%	25.53	24.55	2.91 %
		复孔 2	105.25	109.23		24.55	25.06	
		复孔 3	108.87	103.56		24.76	23.06	
	0mg/d L	复孔 1	105.01	106.78	-1.19%	25.53	24.18	-0.24 %
		复孔 2	105.25	112.77		24.55	25.71	
		复孔 3	108.87	103.37		24.76	25.13	

[0145] 表9参比试剂盒胆红素干扰考核

[0146]

参比试剂盒胆红素干扰												
批 次 / 批 号	添加 浓度	重复次 数	高值样本				低值样本				最大 允许 偏差	干扰 浓度 上限
			对照样 本	干扰样 本	仅添加 溶剂	干扰率	对照 样本	干扰 样本	仅添 加溶 剂	干扰率		
第	100m	复孔 1	104.00	97.15	100.93	11.56	23.05	17.54	21.49	15.28	10%	60mg

[0147]

一 批	g/dL	复孔 2	107.70	96.85	107.12	%	23.42	18.34	18.96	%		/dL
		复孔 3	102.06	90.86	114.02		24.54	18.09	23.26			
	60mg /dL	复孔 1	108.26	103.18	100.50	4.51%	22.81	16.31	21.14	13.01 %		
		复孔 2	109.37	97.23	109.96		24.19	20.14	21.89			
		复孔 3	100.69	104.65	109.01		24.53	21.06	23.08			
	40mg /dL	复孔 1	109.35	105.00	102.24	-6.31%	23.67	23.75	20.58	-9.97%		
		复孔 2	111.72	107.28	96.47		25.28	24.24	21.02			
		复孔 3	103.46	106.59	101.24		24.78	23.75	23.64			
	20mg /dL	复孔 1	106.98	101.02	98.97	-6.21%	23.92	22.62	22.18	-3.02%		
		复孔 2	108.95	104.92	94.30		24.67	22.02	21.33			
		复孔 3	94.74	105.94	100.38		23.38	23.80	22.93			
	0mg/ dL	复孔 1	108.61	103.65	105.78	-1.73%	24.55	23.69	22.84	-4.03%		
		复孔 2	112.05	106.97	98.38		23.70	24.25	22.59			
		复孔 3	101.21	101.75	102.90		24.26	23.99	23.71			
第 二 批	100m g/dL	复孔 1	105.67	107.81	96.51	-10.09 %	25.01	18.68	22.33	15.26 %		
		复孔 2	103.27	108.39	101.79		23.57	18.91	24.17			
		复孔 3	110.77	112.14	99.93		24.90	20.89	22.50			
	60mg /dL	复孔 1	101.22	104.22	105.61	-2.38%	25.36	24.30	20.71	-8.71%		
		复孔 2	109.96	101.34	100.63		25.58	24.58	24.21			
		复孔 3	108.96	110.53	102.50		25.69	24.54	22.62			
	40mg /dL	复孔 1	108.95	112.94	106.16	-6.69%	25.07	22.75	21.12	2.62%		
		复孔 2	109.69	102.03	94.75		24.86	20.65	21.86			
		复孔 3	109.52	108.95	102.69		24.44	20.51	22.65			
	20mg /dL	复孔 1	105.67	109.64	99.30	-9.15%	26.23	24.30	20.71	1.85%		
		复孔 2	101.00	102.33	99.28		25.67	20.30	23.05			
		复孔 3	106.11	108.85	95.34		24.26	21.68	23.76			
	0mg/ dL	复孔 1	104.74	104.67	99.34	-4.08%	25.63	24.34	24.37	-3.44%		
		复孔 2	103.58	106.30	98.79		24.82	25.33	23.84			

[0148]

		复孔 3	105.90	103.30	103.80		24.87	25.78	24.73			
--	--	------	--------	--------	--------	--	-------	-------	-------	--	--	--

[0149]

表10本发明试剂盒胆红素干扰考核

[0150]

本发明胆红素干扰												
批次 / 批号	添加浓度	重 复 次 数	高值样本				低值样本				最 大 允 许 偏 差	干扰浓 度上限
			对照 样本	干扰 样本	仅添 加溶 剂	干扰率	对照 样本	干扰 样本	仅添 加溶 剂	干扰 率		
第 一 批	100mg/d L	复 孔 1	107.3 9	93.00	101.3 9	-14.76 %	23.6 2	17.9 9	21.6 2	12.58 %	10 %	60mg/d L
		复 孔 2	108.8 2	92.75	108.8 2		24.0 8	18.6 3	18.0 8			
		复 孔 3	99.45	92.81	109.4 5		24.2 1	18.7 3	23.6 1			
	60mg/dL	复 孔 1	107.3 9	103.1 1	101.3 9	-3.82%	23.6 2	23.7 2	21.6 2	-6.83%		
		复 孔 2	108.8 2	101.9 1	108.8 2		24.0 8	24.1 9	22.0 8			
		复 孔 3	99.45	102.8 7	109.4 5		24.2 1	23.9 9	23.6 1			
	40mg/dL	复	107.3	102.1	101.3	2.41%	23.6	23.4	21.6	-5.29%		

[0151]

		孔 1	9	9	9		2	6	2			
		复 孔 2	108.8 2	102.8 2	98.82		24.0 8	23.3 4	22.0 8			
		复 孔 3	99.45	102.0 4	99.45		24.2 1	24.0 8	23.6 1			
	20mg/dL	复 孔 1	107.3 9	103.9 3	101.3 9	3.14%	23.6 2	23.1 3	21.6 2	-3.50%		
		复 孔 2	108.8 2	103.1 0	98.82		24.0 8	22.6 3	22.0 8			
		复 孔 3	99.45	102.3 5	99.45		24.2 1	23.9 0	23.6 1			
	0mg/dL	复 孔 1	107.3 9	104.0 2	101.3 9	3.20%	23.6 2	24.0 7	23.6 2	-2.07%		
		复 孔 2	108.8 2	102.3 5	98.82		24.0 8	24.3 1	23.0 8			
		复 孔 3	99.45	103.2 1	99.45		24.2 1	23.3 9	23.6 1			
第 二 批	100mg/d L	复 孔 1	105.0 1	105.1 0	101.3 9	5.16%	25.5 3	24.1 4	21.6 2	-3.11%		

[0152]

		复 孔 2	105.2 5	103.7 5	98.82		24.5 5	23.8 6	25.0 8		
		复 孔 3	108.8 7	107.1 3	99.45		24.7 6	24.4 9	23.6 1		
	60mg/dL	复 孔 1	105.0 1	105.3 1	101.3 9	6.29%	25.5 3	24.7 3	21.6 2	-9.07%	
		复 孔 2	105.2 5	106.0 8	98.82		24.5 5	24.4 4	22.0 8		
		复 孔 3	108.8 7	108.3 7	99.45		24.7 6	24.2 4	23.6 1		
	40mg/dL	复 孔 1	105.0 1	107.7 1	101.3 9	6.39%	25.5 3	23.7 6	21.6 2	4.17%	
		复 孔 2	105.2 5	106.1 1	98.82		24.5 5	20.3 3	22.0 8		
		复 孔 3	108.8 7	106.3 0	99.45		24.7 6	20.4 1	23.6 1		
	20mg/dL	复 孔 1	105.0 1	107.4 8	101.3 9	5.50%	25.5 3	24.2 4	21.6 2	0.11%	
		复 孔 5	105.2 5	105.3 2	98.82		24.5 5	20.7 8	22.0 8		

[0153]	0mg/dL	2										
		复孔	108.8	104.3	99.45		24.7	22.2	23.6			
		7	1				6	2	1			
		3										
		复孔	105.0	107.5	101.3		25.5	25.5	24.6			
		1	1	7	9		3	7	2			
		2										
[0153]	0mg/dL	复孔	105.2	106.6	98.82	6.05%	24.5	25.0	24.0			
		5	0				5	6	8			
		2										
		复孔	108.8	104.8	99.45		24.7	24.6	23.6			
		7	0				6	1	1			
		3										

[0154] 由表5~10可以看出,当血红蛋白浓度 $\leq 500\text{mg/dl}$ 时干扰 $<10\%$,当甘油三脂浓度 $\leq 3000\text{mg/dl}$ 时干扰 $<10\%$,当胆红素浓度 $\leq 60\text{mg/dl}$ 时干扰 $<10\%$ 。本发明试剂盒和参比试剂盒YH相比,特异性存在优势。

[0155] 实施例4本发明试剂盒假阳性测定

[0156] 本发明试剂盒假阳性考核:先使用普通的样品稀释液考核随机正常人体检样本2000例,挑出阳性样本后再使用普通样品稀释液、本发明样品稀释液和参比试剂同时进行复测,分析该样本结果是否有明显量值变化。

[0157] 表11本发明试剂盒假阳性考核

编号	普通样品稀释液		本发明样品稀释液		参比试剂结果	
	检测结果	阴阳性	检测结果	阴阳性	检测结果	阴阳性
1#	31.3ng/mL	+	0.96ng/mL	-	45.8ng/mL	+
2#	45.4/mL	+	1.23ng/mL	-	89.23ng/mL	+
3#	106.89ng/mL	+	1.78ng/mL	-	23.7ng/mL	+

[0159] 由表11可以看出本发明的样品稀释液可以消除干扰样本的干扰,优于参比试剂,有助于骨桥蛋白试剂检测结果的准确性。

[0160] 实施例5本发明试剂盒跳孔考核

[0161] 考核随机体检样本不少于500例,每例样本重复3孔测定,结果变异 $>25\%$ 的视为跳孔,统计其概率:

[0162] 表12本发明试剂盒跳孔考核

	普通酶结合物	本发明酶结合物	参比试剂结果
考核例数	500	500	500
跳孔例数	15	3	11

跳孔率	3.00%	0.60%	2.20%
-----	-------	-------	-------

[0164] 由表12可以看出本发明的酶结合物测定样本的跳孔概率明显低于参比试剂YH,有助于骨桥蛋白试剂检测结果的重复性和准确性。

[0165] 实施例6本发明试剂盒新旧样本差异考核

[0166] 收集当天病人样本在2-8℃储存,分别考核0d、1d、3d、5d、7d,以0d为对照进行比对,验证样本经过保存后的偏差:

[0167] 表13本发明试剂盒新旧样本考核

保存时间	普通样品稀释液					本发明样品稀释液				
	0d	1d	3d	5d	7d	0d	1d	3d	5d	7d
P01	1.35	1.29	1.54	1.55	1.53	1.39	1.30	1.37	1.30	1.40
P02	5.08	5.19	5.21	5.27	5.35	5.19	5.03	5.18	5.03	5.13
P03	35.47	39.01	39.73	41.35	41.56	35.43	34.82	33.96	36.21	36.41
P04	4.68	4.91	4.98	5.32	5.53	4.69	4.78	4.74	4.86	4.50
P05	74.68	73.22	79.93	72.22	77.82	71.23	77.91	76.07	75.77	72.75
P06	12.37	12.68	11.85	12.44	12.85	12.49	12.59	12.37	12.86	12.46
P07	24.62	26.57	28.00	28.96	29.87	25.11	23.50	24.79	23.98	23.67
P08	134.78	128.06	130.71	141.47	130.60	140.92	133.72	130.66	140.34	131.99
P09	59.37	58.29	57.82	56.56	59.46	59.37	59.02	58.85	59.31	61.05
P10	8.97	9.04	9.45	9.98	9.89	8.84	8.66	9.31	9.23	8.57
比值		1d/0d	3d/0d	5d/0d	7d/0d		1d/0d	3d/0d	5d/0d	7d/0d
P01		0.96	1.14	1.15	1.13		0.97	1.02	0.97	1.04
P02		1.02	1.03	1.04	1.05		0.99	1.02	0.99	1.01
P03		1.10	1.12	1.17	1.17		0.98	0.96	1.02	1.03
P04		1.05	1.06	1.14	1.18		1.02	1.01	1.04	0.96
P05		0.98	1.07	0.97	1.04		1.04	1.02	1.01	0.97
P06		1.03	0.96	1.01	1.04		1.02	1.00	1.04	1.01
P07		1.08	1.14	1.18	1.21		0.95	1.01	0.97	0.96
P08		0.95	0.97	1.05	0.97		0.99	0.97	1.04	0.98
P09		0.98	0.97	0.95	1.00		0.99	0.99	1.00	1.03
P10		1.01	1.05	1.11	1.10		0.97	1.04	1.03	0.96
平均偏差		1.02	1.05	1.08	1.09		0.99	1.00	1.01	0.99

[0170] 由表13可以看出本发明的样品稀释液可以消除新旧样本差异,有助于骨桥蛋白试剂检测结果的准确性。

[0171] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

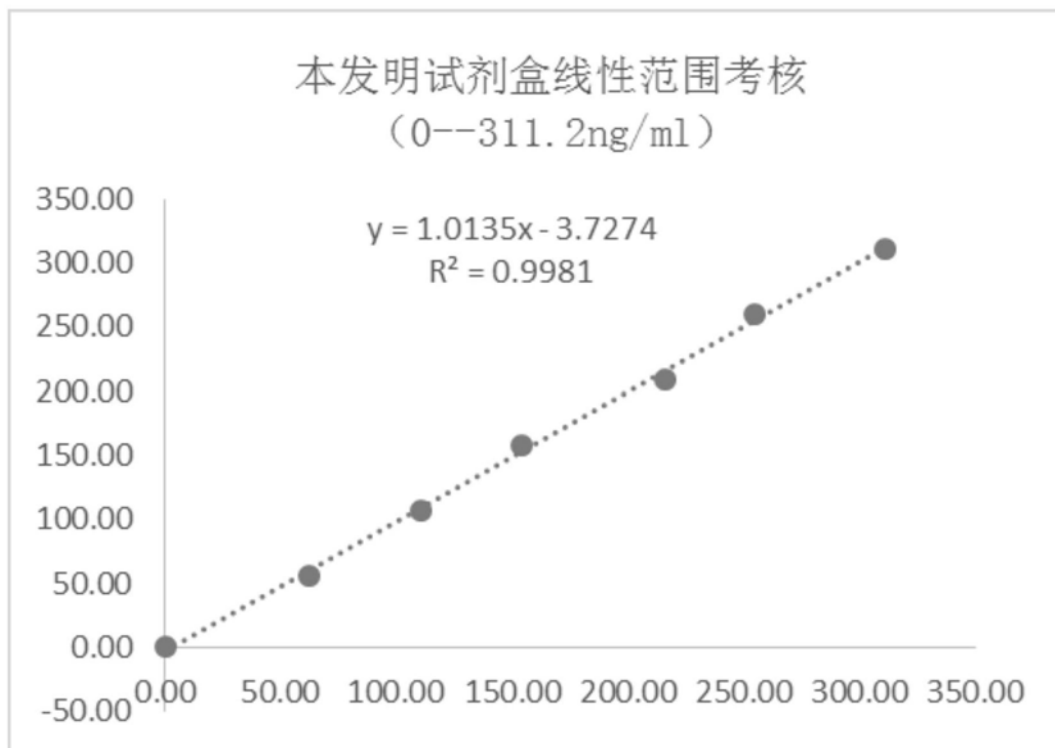


图1

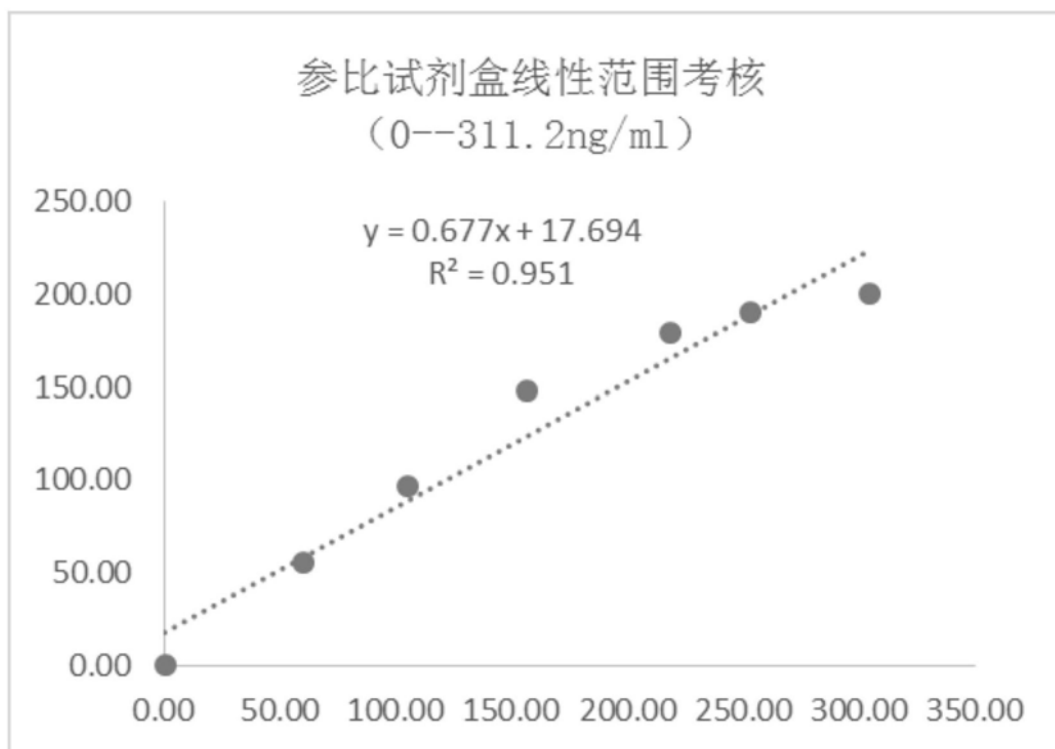


图2

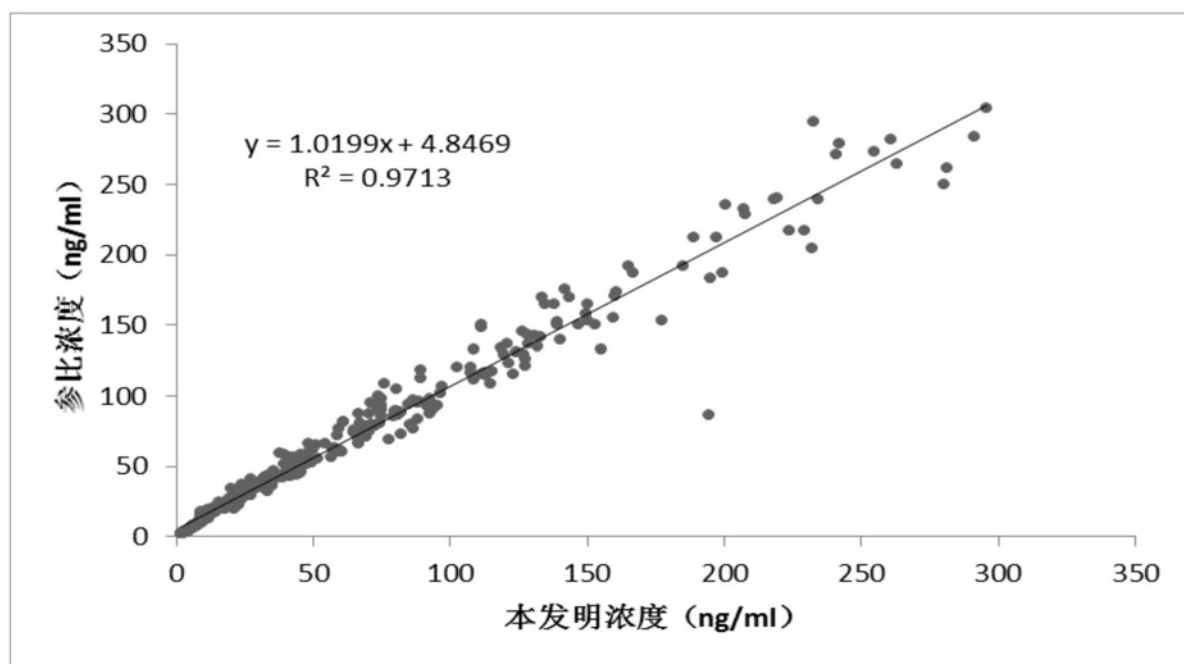


图3

专利名称(译)	稀释组合物及用于骨桥蛋白检测的试剂或试剂盒		
公开(公告)号	CN111308083A	公开(公告)日	2020-06-19
申请号	CN201911327016.2	申请日	2019-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
[标]发明人	吴小田 崔小妞 史小芹 付光宇 吴学炜		
发明人	吴小田 崔小妞 史小芹 付光宇 吴学炜		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535 G01N33/543 G01N21/76		
代理人(译)	刘颖		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)	防腐剂	1~2‰ (w/v)
本发明涉及免疫学检测领域，特别涉及稀释组合物及用于骨桥蛋白检测的试剂或试剂盒。本发明公开的磁微粒化学发光法检测骨桥蛋白的试剂盒包括：包被有骨桥蛋白单抗的磁微粒混悬液，含有骨桥蛋白单抗的酶结合物，样品稀释液及校准品。本试剂盒基于磁微粒化学发光法制备而成，配合Auto Lumo系列全自动免疫测定仪使用，可实现自动化检测，操作简便、检测速度快。本发明试剂盒具有检测范围宽、灵敏度高、特异性强的优点，可定量检测血清、血浆中骨桥蛋白的含量，辅助用于胃癌、肺癌、肝癌、乳腺癌等的早期诊断、疾病进程监测、治疗效果评价及预后监测。	蛋白质类稳定剂	1~25% (w/v)
	表面活性剂	1~10‰ (w/v)
	EDTA	0.5~2% (w/v)
	甘油	0~5% (w/v)
	阻断剂	0.01%~0.05% (w/v)
	色素	0~0.2‰ (w/v)
	缓冲液 (pH=6~9)	余量