



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103728455 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 16

(21) 申请号 201310396461. 0

(22) 申请日 2013. 09. 03

(71) 申请人 柏荣诊断产品(上海)有限公司  
地址 200444 上海市宝山区丰翔路 1919 号 2  
幢 5 楼

(72) 发明人 王金凤 蒋欣

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283  
代理人 薛琦

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书16页 附图3页

(54) 发明名称

一种测定 Kappa 游离轻链浓度的试剂盒及方法

(57) 摘要

本发明公开了一种测定 Kappa 游离轻链浓度的试剂盒及方法。该试剂盒包括反应缓冲液和 Kappa 游离轻链抗体溶液, 所述的反应缓冲液中氯化钠的浓度为 1250 ~ 2400mmol/L。本发明的试剂盒解决了 Kappa 游离轻链比浊测定中的临床标本线性差的问题, 为临床医生提供可靠的 Kappa 游离轻链测定结果作为诊断参考, 以便充分发挥胶乳增强免疫比浊方法速度快, 通量高的优势, 缩短检测时间, 利于临床应用和病人诊断。

1. 一种采用胶乳增强比浊方法测定 Kappa 游离轻链浓度的试剂盒,其包括反应缓冲液和 Kappa 游离轻链抗体溶液,其特征在于,所述的反应缓冲液中氯化钠的浓度为 1250 ~ 2400mmol/L。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述的 Kappa 游离轻链抗体溶液中的 Kappa 游离轻链抗体为兔抗人多克隆 Kappa 游离轻链抗体。

3. 如权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于,所述的 Kappa 游离轻链抗体溶液中的 Kappa 游离轻链抗体为 Dako 公司的兔抗人多克隆 Kappa 游离轻链抗体。

4. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,当所述的反应缓冲液的组成为 4- 羟乙基哌嗪乙磺酸 100mmol/L、氯化钠 1250 ~ 2400mmol/L、吐温 -201ml/L 和防腐剂 Proclin-3000. 3ml/L 时,所述的 Kappa 游离轻链抗体溶液的组成为 Dako 公司的兔抗人多克隆 Kappa 游离轻链抗体 0.5mg/ml、胶乳微球 3mg/ml、吐温 -201ml/L 和防腐剂 Proclin-3000. 3ml/L。

5. 如权利要求 4 所述的试剂盒,其特征在于,当所述的反应缓冲液的组成为 4- 羟乙基哌嗪乙磺酸 100mmol/L、氯化钠 1250mmol/L、吐温 -201ml/L 和防腐剂 Proclin-3000. 3ml/L 时,所述的 Kappa 游离轻链抗体溶液的组成为 Dako 公司的兔抗人多克隆 Kappa 游离轻链抗体 0.5mg/ml、胶乳微球 3mg/ml、吐温 -201ml/L 和防腐剂 Proclin-3000. 3ml/L ;或,当所述的反应缓冲液的组成为 4- 羟乙基哌嗪乙磺酸 100mmol/L、氯化钠 2000mmol/L、吐温 -201ml/L 和防腐剂 Proclin-3000. 3ml/L 时,所述的 Kappa 游离轻链抗体溶液的组成为 Dako 公司的兔抗人多克隆 Kappa 游离轻链抗体 0.5mg/ml、胶乳微球 3mg/ml、吐温 -201ml/L 和防腐剂 Proclin-3000. 3ml/L ;或,当所述的反应缓冲液的组成为 4- 羟乙基哌嗪乙磺酸 100mmol/L、氯化钠 1500mmol/L、吐温 -201ml/L 和防腐剂 Proclin-3000. 3ml/L 时,所述的 Kappa 游离轻链抗体溶液的组成为 Dako 公司的兔抗人多克隆 Kappa 游离轻链抗体 0.5mg/ml、胶乳微球 3mg/ml、吐温 -201ml/L 和防腐剂 Proclin-3000. 3ml/L ;或,当所述的反应缓冲液的组成为 4- 羟乙基哌嗪乙磺酸 100mmol/L、氯化钠 2400mmol/L、吐温 -201ml/L 和防腐剂 Proclin-3000. 3ml/L 时,所述的 Kappa 游离轻链抗体溶液的组成为 Dako 公司的兔抗人多克隆 Kappa 游离轻链抗体 0.5mg/ml、胶乳微球 3mg/ml、吐温 -201ml/L 和防腐剂 Proclin-3000. 3ml/L。

6. 一种测定 Kappa 游离轻链浓度的方法,其包括下述步骤:采用胶乳增强比浊方法,将待测样品与如权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的反应缓冲液和 Kappa 游离轻链抗体溶液混合后,计算吸光度变化  $\Delta A$ ,与标准品的工作曲线比较即可得到待测样品的 Kappa 游离轻链浓度,其特征在于,待测样品与反应缓冲液和 Kappa 游离轻链抗体溶液混合后的混合体系的氯化钠浓度为 1000 ~ 1600mmol/L。

7. 如权利要求 6 所述的测定 Kappa 游离轻链浓度的方法,其特征在于,所述的吸光度变化  $\Delta A$  由下述方法得到:将待测样品与反应缓冲液混合后,37℃恒温 5 分钟,再加入 Kappa 游离轻链抗体溶液,30 秒后测定吸光度为  $A_1$ ;37℃恒温 4 分 30 秒,测定吸光度为  $A_2$ ,计算吸光度变化  $\Delta A=A_2-A_1$ 。

8. 如权利要求 6 所述的测定 Kappa 游离轻链浓度的方法,其特征在于,所述的工作曲线由下述方法得到:将确定浓度的标准品与反应缓冲液混合后,37℃恒温 5 分钟,再加入 Kappa 游离轻链抗体溶液,30 秒后测定吸光度为  $A_{01}$ ;37℃恒温 4 分 30 秒,测定吸光度为  $A_{02}$ ,

计算吸光度变化  $\Delta A_0 = A_{02} - A_{01}$ , 以  $\Delta A_0$  与标准品的确定浓度作图, 即可。

9. 如权利要求6所述的测定 Kappa 游离轻链浓度的方法, 其特征在于, 所述的混合体系的氯化钠浓度为 1300mmol/L。

10. 如权利要求6所述的测定 Kappa 游离轻链浓度的方法, 其特征在于, 所述的待测样品为血清和 / 或骨髓分离血清。

## 一种测定 Kappa 游离轻链浓度的试剂盒及方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种测定 Kappa 游离轻链浓度的试剂盒及方法。

### 背景技术

[0002] 免疫球蛋白(Ig)轻链分为  $\kappa$  (kappa) 和  $\lambda$  (lambda) 2 个型别,每个 Ig 分子上只有一个型别的轻链,人类  $\kappa$  (kappa) 和  $\lambda$  (lambda) 的比例为 6:4。轻链为能自由通过肾小球基底膜的小分子蛋白质,在肾小管被重吸收回到血液循环中,所以正常人尿中只有少量轻链存在。当人体发生代谢失调和多发性骨髓瘤时,血液中出现大量游离轻链,并由尿中排出,即为 Bence-Jones 蛋白(本周蛋白)。在正常人体内,血清  $\kappa$  型游离轻链为 3 ~ 19mg/L,  $\lambda$  型游离轻链为 6 ~ 26mg/L,  $\kappa/\lambda$  比值为 0.26 ~ 1.65。异常情况的  $\kappa$  型游离轻链以及和  $\kappa/\lambda$  比值、或异常  $\lambda$  型游离轻链和  $\kappa/\lambda$  比值、或同时三者均异常等情况,对单克隆性  $\gamma$  球蛋白增多症(monoclonal gammopathies, MGP) 的敏感性为 88% ~ 98%;对非分泌性骨髓瘤(nonsecretory myeloma, NSM)的敏感性为 65% ~ 70%,有助于单克隆轻链病、AL-淀粉样变的早期诊断,也可用于化疗或自身外周血干细胞移植后是否复发的监测,如果化疗或移植效果好,则病患血清  $\kappa$  型游离轻链、 $\lambda$  型游离轻链以及  $\kappa/\lambda$  比值均在正常水平或相比治疗前有明显改善。

[0003] 胶乳增强比浊方法可在全自动生化仪上测定  $\kappa$  型游离轻链,速度快、通量高。对于游离轻链的测定,国内目前主要使用英国 Binding site 公司的 Freelite 系列测定试剂,可以通过胶乳增强比浊方法测定 Kappa 游离轻链;但在临床应用中, Freelite 系列试剂存在大量的临床标本稀释不成线性问题,这些标本测定结果明显不符合临床症状,目前在院内医院推广应用很有限。(注:稀释成线性是指按照一定比例手工使用生理盐水稀释临床标本,测定稀释后标本的结果应该与按照原始浓度和稀释比例计算的理论结果偏差在正负 20% 以内。线性也为体外诊断试剂的注册基本要求之一,通常稀释不成线性的标本结果是不可靠的。造成线性问题的主要原因有试剂配方抗血液成分干扰问题、抗体特异性问题等等。)

[0004] 同时,发明人使用按照常规方式制备的 Kappa 游离轻链试剂,在未使用该特殊发明方法时也出现与 Freelite 试剂类似的临床标本稀释不成线性问题情况;由于不论是 Freelite 系列 Kappa 游离轻链测定试剂还是发明人自行制备的 Kappa 游离轻链试剂,均存在临床标本稀释不成线性问题,因此,可以认为临床标本稀释是否成线性是 Kappa 游离轻链比浊测定试剂盒制备中一大共同难点。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题在于为了克服现有的 Kappa 游离轻链测定不成线性的缺陷,提供了一种测定 Kappa 游离轻链浓度的试剂盒及方法。本发明的测定方法可以得到可靠的 Kappa 游离轻链测定结果。

[0006] 本发明是通过以下技术方案解决上述技术问题的：

[0007] 本发明提供了一种采用胶乳增强比浊方法测定 Kappa 游离轻链浓度的试剂盒，其包括反应缓冲液(R1 试剂)和 Kappa 游离轻链抗体溶液(R2 试剂)，其特征在于，所述的反应缓冲液中氯化钠的浓度为 1250 ~ 2400mmol/L。

[0008] 其中，所述的 Kappa 游离轻链抗体溶液中的 Kappa 游离轻链抗体较佳地为兔抗人多克隆 Kappa 游离轻链抗体，更佳地为 Dako 公司的兔抗人多克隆 Kappa 游离轻链抗体(即 Dako 公司的 Polyclonal Rabbit Anti-Human Kappa Free Light Chains, 货号为 A0100)。

[0009] 较佳地，当反应缓冲液的组成为 4- 羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes)100mmol/L、氯化钠 1250 ~ 2400mmol/L、吐温 -201ml/L 和防腐剂 Proclin-3000. 3ml/L 时，Kappa 游离轻链抗体溶液的组成为 Dako 公司的兔抗人多克隆 Kappa 游离轻链抗体(货号为 A0100)0. 5mg/ml、胶乳微球 3mg/ml、吐温 -201ml/L 和防腐剂 Proclin-3000. 3ml/L。上述组成中，胶乳微球可购于国际知名胶乳供应商，如 Bangslab 公司或 JSR 公司。

[0010] 更佳地，当反应缓冲液的组成为 4- 羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes) 100mmol/L、氯化钠 1250mmol/L、吐温 -201ml/L 和防腐剂 Proclin-3000. 3ml/L 时，Kappa 游离轻链抗体溶液的组成为 Dako 公司的兔抗人多克隆 Kappa 游离轻链抗体(货号为 A0100) 0. 5mg/ml、胶乳微球 3mg/ml、吐温 -201ml/L 和防腐剂 Proclin-3000. 3ml/L；或，当反应缓冲液的组成为 4- 羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes) 100mmol/L、氯化钠 2000mmol/L、吐温 -201ml/L 和防腐剂 Proclin-3000. 3ml/L 时，Kappa 游离轻链抗体溶液的组成为 Dako 公司的兔抗人多克隆 Kappa 游离轻链抗体(货号为 A0100) 0. 5mg/ml、胶乳微球 3mg/ml、吐温 -201ml/L 和防腐剂 Proclin-3000. 3ml/L；或，当反应缓冲液的组成为 4- 羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes) 100mmol/L、氯化钠 1500mmol/L、吐温 -201ml/L 和防腐剂 Proclin-3000. 3ml/L 时，Kappa 游离轻链抗体溶液的组成为 Dako 公司的兔抗人多克隆 Kappa 游离轻链抗体(货号为 A0100) 0. 5mg/ml、胶乳微球 3mg/ml、吐温 -201ml/L 和防腐剂 Proclin-3000. 3ml/L；或，当反应缓冲液的组成为 4- 羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes) 100mmol/L、氯化钠 2400mmol/L、吐温 -201ml/L 和防腐剂 Proclin-3000. 3ml/L 时，Kappa 游离轻链抗体溶液的组成为 Dako 公司的兔抗人多克隆 Kappa 游离轻链抗体(货号为 A0100) 0. 5mg/ml、胶乳微球 3mg/ml、吐温 -201ml/L 和防腐剂 Proclin-3000. 3ml/L。上述组成中，胶乳微球可购于国际知名胶乳供应商，如 Bangslab 公司或 JSR 公司。

[0011] 本发明还提供了一种测定 Kappa 游离轻链浓度的方法，其包括下述步骤：采用胶乳增强比浊方法，将待测样品与上述反应缓冲液和 Kappa 游离轻链抗体溶液混合后，计算吸光度变化  $\Delta A$ ，与标准品的工作曲线比较即可得到待测样品的 Kappa 游离轻链浓度，其特征在于，待测样品与反应缓冲液和 Kappa 游离轻链抗体溶液混合后的混合体系的氯化钠浓度为 1000 ~ 1600mmol/L。

[0012] 本发明中，所述的胶乳增强比浊方法是指一种在全自动生化仪上测定 Kappa 游离轻链浓度的常用方法，一般在相同的基本参数下(波长、方法学、样本试剂比例、反应时间)，先使用确定浓度的标准品在全自动生化仪使用对应的测定试剂进行校准测试，得到对应的测定试剂的校准曲线(工作曲线)，然后，使用相同的测定试剂，在全自动生化仪上测试待测样品，由全自动生化仪对照校准曲线自动计算出待测样品中被测物含量；具体操作可参见《全国临床检验操作规程第三版》(东南大学出版社，书号：9787564105839，2006 年 11 月)及

各仪器使用说明书。

[0013] 其中,所述的全自动生化仪较佳地为型号为 Olympus AU480 或 Hitachi7170 的全自动生化仪。

[0014] 其中,所述的反应缓冲液可为本领域 Kappa 游离轻链浓度测定方法中胶乳增强比浊方法常用的反应缓冲液(R1 试剂);所述的 Kappa 游离轻链抗体溶液可为本领域 Kappa 游离轻链浓度测定方法中胶乳增强比浊方法常用的 Kappa 游离轻链抗体溶液(R2 试剂)。

[0015] 其中,所述的 Kappa 游离轻链抗体溶液中的 Kappa 游离轻链抗体较佳地为兔抗人多克隆 Kappa 游离轻链抗体,更佳地为 Dako 公司的兔抗人多克隆 Kappa 游离轻链抗体(即 Dako 公司的 Polyclonal Rabbit Anti-Human Kappa Free Light Chains, 货号为 A0100)。

[0016] 较佳地,当反应缓冲液的组成为 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes)100mmol/L、氯化钠 1250 ~ 2400mmol/L、吐温-201ml/L、防腐剂 Proclin-3000.3ml/L 时, Kappa 游离轻链抗体溶液的组成为 Dako 公司的兔抗人多克隆 Kappa 游离轻链抗体(货号为 A0100)0.5mg/ml、胶乳微球 3mg/ml、吐温-201ml/L、防腐剂 Proclin-3000.3ml/L。上述组成中,胶乳微球可购于国际知名胶乳供应商,如 Bangslab 公司或 JSR 公司。

[0017] 其中,所述的吸光度变化  $\Delta A$  可由下述方法得到:将待测样品与反应缓冲液混合后,37℃恒温 5 分钟,再加入 Kappa 游离轻链抗体溶液,30 秒后测定吸光度为  $A_1$ ;37℃恒温 4 分 30 秒,测定吸光度为  $A_2$ ,计算吸光度变化  $\Delta A=A_2-A_1$ 。

[0018] 其中,所述的工作曲线可由下述方法得到:将确定浓度的标准品与反应缓冲液混合后,37℃恒温 5 分钟,再加入 Kappa 游离轻链抗体溶液,30 秒后测定吸光度为  $A_{01}$ ;37℃恒温 4 分 30 秒,测定吸光度为  $A_{02}$ ,计算吸光度变化  $\Delta A_0=A_{02}-A_{01}$ ,以  $\Delta A_0$  与标准品的确定浓度作图,即可。

[0019] 其中,所述的混合体系的氯化钠浓度较佳地为 1300mmol/L。

[0020] 其中,所述的待测样品较佳地为血清和 / 或骨髓分离血清。

[0021] 在符合本领域常识的基础上,上述各优选条件,可任意组合,即得本发明各较佳实例。

[0022] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0023] 本发明的积极进步效果在于:

[0024] (1) 本发明解决了 Kappa 游离轻链比浊测定中的临床标本线性差的问题,为临床医生提供可靠的 Kappa 游离轻链测定结果作为诊断参考,以便充分发挥胶乳增强免疫比浊方法速度快,通量高的优势,缩短检测时间,利于临床应用和病人诊断。

[0025] (2) 该发明使用的方法简单有效,原料无毒且方便购买,利于生产放大和推广应用。

## 附图说明

[0026] 图 1 为 A-a 试剂盒的工作曲线。

[0027] 图 2 为 A-b 试剂盒的工作曲线。

[0028] 图 3 为 B-a 试剂盒的工作曲线。

[0029] 图 4 为 B-b 试剂盒的工作曲线。

[0030] 图 5 为 A 试剂盒的工作曲线。

### 具体实施方式

[0031] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。

[0032] 下述实施例中的全自动生化仪为型号为 Olympus AU480 的全自动生化仪。

[0033] 本发明采用胶乳增强比浊方法在全自动生化仪上测定  $\kappa$  型游离轻链浓度的操作可参见《全国临床检验操作规程第三版》(东南大学出版社,书号 :9787564105839,2006 年 11 月)。

[0034] A 试剂盒(购于上海艾柯特医疗产品有限公司)中的反应缓冲液(R1 试剂)和 Kappa 游离轻链抗体溶液(R2 试剂)的组成如下:

[0035] A 试剂盒中反应缓冲液(R1 试剂)的组成

[0036]

成分	名称	浓度
1	4- 羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes)	100mmol/L
2	氯化钠(NaCl)	188mmol/L
3	吐温 -20	1ml/L
4	防腐剂 Proclin-300	0.3ml/L

[0037] A 试剂盒中 Kappa 游离轻链抗体溶液(R2 试剂)的组成

[0038]

成分	名称	浓度
1	Kappa 游离轻链抗体	0.5mg/ml
2	胶乳微球	3mg/ml
3	吐温 -20	1ml/L
4	防腐剂 Proclin-300	0.3ml/L

[0039] B 试剂盒(购于上海艾柯特医疗产品有限公司)中的反应缓冲液(R1 试剂)和 Kappa 游离轻链抗体溶液(R2 试剂)的组成如下:

[0040] B 试剂盒中反应缓冲液(R1 试剂)的组成

[0041]

成分	名称	浓度
1	4- 羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes)	100mmol/L

[0042]

2	氯化钠 (NaCl)	225mmol/L
3	吐温 -20	1ml/L
4	防腐剂 Proclin-300	0.3ml/L

[0043] B 试剂盒中 Kappa 游离轻链抗体溶液 (R2 试剂) 的组成

[0044]

成分	名称	浓度
1	Kappa 游离轻链抗体	0.5mg/ml
2	胶乳微球	3mg/ml
3	吐温 -20	1ml/L
4	防腐剂 Proclin-300	0.3ml/L

[0045] 上述 A 试剂盒与 B 试剂盒中的 Kappa 游离轻链抗体为丹麦 Dako 公司的 Polyclonal Rabbit anti HUM Kappa free light chains, 其货号为 A0100; 乳胶微球来源于日本 JSR 公司, 其货号为 P0112。

[0046] 下述实施例中的标准品来源于英国 Randox 公司 (朗道实验诊断有限公司) 特定蛋白质控 SP286LPC (货号), 待测样品来源于上海曙光医院。

[0047] Freelite 试剂购于英国 Binding site 公司。

[0048] 实施例 1

[0049] 对 A 试剂盒进行改进, 改变反应缓冲液 (R1 试剂) 中的氯化钠的浓度为 1250mmol/L, 其他组成成分的浓度不变, 记为 A-a 试剂盒, 具体组成如下:

[0050] A-a 试剂盒中反应缓冲液 (R1 试剂) 的组成

[0051]

成分	名称	浓度
1	4- 羟乙基哌嗪乙磺酸 (Hepes)	100mmol/L
2	氯化钠 (NaCl)	1250mmol/L
3	吐温 -20	1ml/L
4	防腐剂 Proclin-300	0.3ml/L

[0052] A-a 试剂盒中 Kappa 游离轻链抗体溶液 (R2 试剂) 的组成

[0053]

成分	名称	浓度
1	Kappa 游离轻链抗体	0.5mg/ml
2	胶乳微球	3mg/ml
3	吐温-20	1ml/L
4	防腐剂 Proclin-300	0.3ml/L

[0054] 工作曲线的绘制：

[0055] 采用胶乳增强比浊方法，将 3 μl 确定浓度的标准品与 A-a 试剂盒中的 240 μl 反应缓冲液混合后，37℃ 恒温 5 分钟，再加入 A-a 试剂盒中的 60 μl Kappa 游离轻链抗体溶液，30 秒后测定吸光度为  $A_{01}$ （检测波长：570nm），37℃ 恒温 4 分 30 秒，测定吸光度为  $A_{02}$ （检测波长：570nm），计算吸光度变化  $\Delta A_0 = A_{02} - A_{01}$ ，以  $\Delta A_0$  与标准品的确定浓度作图，即得到 A-a 试剂盒的工作曲线，如图 1 所示。

A-a 试剂盒	
标准品浓度 (mg/L)	$\Delta A_0$
0	-0.0013
5.12	0.0404
17.33	0.1259
38.78	0.2625
77.56	0.4636

[0056]

[0057] 采用胶乳增强比浊方法，将 3 μl 待测样品与 A-a 试剂盒中的 240 μl 反应缓冲液混合后，37℃ 恒温 5 分钟，再加入 A-a 试剂盒中的 60 μl Kappa 游离轻链抗体溶液，30 秒后测定吸光度为  $A_1$ （检测波长：570nm），37℃ 恒温 4 分 30 秒，测定吸光度为  $A_2$ （检测波长：570nm），计算吸光度变化  $\Delta A = A_2 - A_1$ ，与标准品的工作曲线（图 1）比较即得到待测样品的 Kappa 游离轻链浓度；其中，最终混合体系的氯化钠浓度为 1000mmol/L。

[0058] 将上述待测样品先加入生理盐水稀释至 50% 后（即待测样品量与生理盐水的量相同），重复上述胶乳增强比浊方法的操作，即得到 50% 稀释的待测样品的 Kappa 游离轻链浓度。

[0059] 将该方法测定的稀释前后待测样品的 Kappa 游离轻链浓度进行比较，如下表 1 所示。

[0060] 表 1 混合体系的氯化钠浓度为 1000mmol/L 时的测试结果 (mg/L)

待测样品 ID	理论结果	测试结果	线性偏差	稀释比例
7#	32.2			0
	16.1	16.91	5.03%	50%
13#	9.71			0
	4.855	4.97	2.37%	50%
11#	44.4			0
	22.2	23.33	5.09%	50%
15#	63.5			0
	31.75	32.72	3.06%	50%
14#	50.77			0
	25.385	25.92	2.11%	50%
42#	16.48			0
	8.24	7.51	-8.86%	50%
44#	23.13			0
	11.565	10.99	-4.97%	50%
3#	12.15			0
	6.075	5.89	-3.05%	50%

[0062] (注:稀释比例为 0 的理论结果即为未稀释时的测试结果,下同)

[0063] 实施例 2

[0064] 对 A 试剂盒进行改进,改变反应缓冲液(R1 试剂)中的氯化钠的浓度为 2000mmol/L,其他组成成分的浓度不变,记为 A-b 试剂盒,具体组成如下:

[0065] A-b 试剂盒中反应缓冲液(R1 试剂)的组成

[0066]

成分	名称	浓度
1	4- 羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes)	100mmol/L
2	氯化钠(NaCl)	2000mmol/L
3	吐温-20	1ml/L
4	防腐剂 Proclin-300	0.3ml/L

[0067] A-b 试剂盒中 Kappa 游离轻链抗体溶液(R2 试剂)的组成

[0068]

成分	名称	浓度
1	Kappa 游离轻链抗体	0.5mg/ml
2	胶乳微球	3mg/ml
3	吐温 -20	1ml/L
4	防腐剂 Proclin-300	0.3ml/L

[0069] 工作曲线的绘制：

[0070] 采用胶乳增强比浊方法,将 3  $\mu$ l 确定浓度的标准品与 A-b 试剂盒中的 240  $\mu$ l 反应缓冲液混合后,37 $^{\circ}$ C 恒温 5 分钟,再加入 A-b 试剂盒中的 60  $\mu$ l Kappa 游离轻链抗体溶液,30 秒后测定吸光度为  $A_{01}$  (检测波长 :570nm),37 $^{\circ}$ C 恒温 4 分 30 秒,测定吸光度为  $A_{02}$  (检测波长 :570nm),计算吸光度变化  $\Delta A_0=A_{02}-A_{01}$ ,以  $\Delta A_0$  与标准品的确定浓度作图,即得到 A-b 试剂盒的工作曲线,如图 2 所示。

[0071]

A-b 试剂盒	
标准品浓度 (mg/L)	$\Delta A_0$
0	-0.0025
5.12	0.0352
17.33	0.1133
38.78	0.2382
77.56	0.4221

[0072]

[0073] 采用胶乳增强比浊方法,将 3  $\mu$ l 待测样品与 A-b 试剂盒中的 240  $\mu$ l 反应缓冲液混合后,37 $^{\circ}$ C 恒温 5 分钟,再加入 A-b 试剂盒中的 60  $\mu$ l Kappa 游离轻链抗体溶液,30 秒后测定吸光度为  $A_1$  (检测波长 :570nm),37 $^{\circ}$ C 恒温 4 分 30 秒,测定吸光度为  $A_2$  (检测波长 :570nm),计算吸光度变化  $\Delta A=A_2-A_1$ ,与标准品的工作曲线(图 2) 比较即得到待测样品的 Kappa 游离轻链浓度 ;其中,最终混合体系的氯化钠浓度为 1600mmol/L。

[0074] 将上述待测样品先加入生理盐水稀释至 50% 后(即待测样品量与生理盐水的量相同),重复上述胶乳增强比浊方法的操作,即得到 50% 稀释的待测样品的 Kappa 游离轻链浓度。

[0075] 将该方法测定的稀释前后待测样品的 Kappa 游离轻链浓度进行比较,如下表 2 所示。

[0076] 表 2 混合体系的氯化钠浓度为 1600mmol/L 时的测试结果 (mg/L)

待测样品 ID	理论结果	测试结果	线性偏差	稀释比例
7#	33.18			0
	16.59	17.02	2.59%	50%
13#	10.02			0
	5.01	5.03	0.40%	50%
11#	46.15			0
	23.075	23.83	3.27%	50%
15#	66.24			0
	33.12	33.55	1.30%	50%
14#	51.28			0
	25.64	25.63	-0.43%	50%
42#	17.18			0
	8.59	7.62	-11.29%	50%
44#	24.32			0
	12.16	11.24	-7.57%	50%
3#	13.02			0
	6.51	6.12	-5.99%	50%

[0079] 实施例 3

[0080] 对 B 试剂盒进行改进,改变反应缓冲液(R1 试剂)中的氯化钠的浓度为 1500mmol/L,其他组成成分的浓度不变,记为 B-a 试剂盒,具体组成如下:

[0081] B-a 试剂盒中反应缓冲液(R1 试剂)的组成

[0082]

成分	名称	浓度
1	4- 羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes)	100mmol/L
2	氯化钠(NaCl)	1500mmol/L
3	吐温 -20	1ml/L
4	防腐剂 Proclin-300	0.3ml/L

[0083] B-a 试剂盒中 Kappa 游离轻链抗体溶液(R2 试剂)的组成

[0084]

成分	名称	浓度
1	Kappa 游离轻链抗体	0.5mg/ml
2	胶乳微球	3mg/ml
3	吐温-20	1ml/L
4	防腐剂 Proclin-300	0.3ml/L

[0085] 工作曲线的绘制：

[0086] 采用胶乳增强比浊方法,将 3 $\mu$ l 确定浓度的标准品与 B-a 试剂盒中的 200 $\mu$ l 反应缓冲液混合后,37 $^{\circ}$ C 恒温 5 分钟,再加入 B-a 试剂盒中的 100 $\mu$ l Kappa 游离轻链抗体溶液,30 秒后测定吸光度为  $A_{01}$  (检测波长:600nm),37 $^{\circ}$ C 恒温 4 分 30 秒,测定吸光度为  $A_{02}$  (检测波长:600nm),计算吸光度变化  $\Delta A_0 = A_{02} - A_{01}$ ,以  $\Delta A_0$  与标准品的确定浓度作图,即得到 B-a 试剂盒的工作曲线,如图 3 所示。

[0087]

B-a 试剂盒	
标准品浓度 (mg/L)	$\Delta A_0$
0	-0.0080
5.12	0.0350
17.33	0.1145
38.78	0.2626
77.56	0.4687

[0088] 采用胶乳增强比浊方法,将 3 $\mu$ l 待测样品与 B-a 试剂盒中的 200 $\mu$ l 反应缓冲液混合后,37 $^{\circ}$ C 恒温 5 分钟,再加入 B-a 试剂盒中的 100 $\mu$ l Kappa 游离轻链抗体溶液,30 秒后测定吸光度为  $A_1$  (检测波长:600nm),37 $^{\circ}$ C 恒温 4 分 30 秒,测定吸光度为  $A_2$  (检测波长:600nm),计算吸光度变化  $\Delta A = A_2 - A_1$ ,与标准品的工作曲线(图 3)比较即得到待测样品的 Kappa 游离轻链浓度;其中,最终混合体系的氯化钠浓度为 1000mmol/L。

[0089] 将上述待测样品先加入生理盐水稀释至 50% 后(即待测样品量与生理盐水的量相同),重复上述胶乳增强比浊方法的操作,即得到 50% 稀释的待测样品的 Kappa 游离轻链浓度。

[0090] 将该方法测定的稀释前后待测样品的 Kappa 游离轻链浓度进行比较,如下表 3 所示。

[0091] 表 3 混合体系的氯化钠浓度为 1000mmol/L 时的测试结果(mg/L)

待测样品 ID	理论结果	测试结果	线性偏差	稀释比例
[0092] 7#	32.6			0
	16.3	16.98	4.17%	50%
13#	9.64			0
	4.82	4.93	2.28%	50%
11#	43.8			0
	21.9	23.23	6.07%	50%
15#	64.2			0
	32.1	32.71	1.90%	50%
14#	51.04			0
	25.52	26.01	1.92%	50%
[0093] 42#	16.54			0
	8.27	7.63	-7.74%	50%
44#	23.25			0
	11.625	10.98	-5.55%	50%
3#	12.15			0
	6.075	5.83	-4.03%	50%

[0094] 实施例 4

[0095] 对 B 试剂盒进行改进,改变反应缓冲液(R1 试剂)中的氯化钠的浓度为 2400mmol/L,其他组成成分的浓度不变,记为 B-b 试剂盒,具体组成如下:

[0096] B-b 试剂盒中反应缓冲液(R1 试剂)的组成

[0097]

成分	名称	浓度
1	4-羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes)	100mmol/L
2	氯化钠(NaCl)	2400mmol/L
3	吐温-20	1ml/L
4	防腐剂 Proclin-300	0.3ml/L

[0098] B-b 试剂盒中 Kappa 游离轻链抗体溶液 (R2 试剂) 的组成

成分	名称	浓度
1	Kappa 游离轻链抗体	0.5mg/ml
2	胶乳微球	3mg/ml
3	吐温-20	1ml/L
4	防腐剂 Proclin-300	0.3ml/L

[0099] 工作曲线的绘制：

[0100] 采用胶乳增强比浊方法，将  $3\mu\text{l}$  确定浓度的标准品与 B-b 试剂盒中的  $200\mu\text{l}$  反应缓冲液混合后， $37^\circ\text{C}$  恒温 5 分钟，再加入 B-b 试剂盒中的  $100\mu\text{l}$  Kappa 游离轻链抗体溶液，30 秒后测定吸光度为  $A_{01}$  (检测波长： $600\text{nm}$ )， $37^\circ\text{C}$  恒温 4 分 30 秒，测定吸光度为  $A_{02}$  (检测波长： $600\text{nm}$ )，计算吸光度变化  $\Delta A_0 = A_{02} - A_{01}$ ，以  $\Delta A_0$  与标准品的确定浓度作图，即得到 B-b 试剂盒的工作曲线，如图 4 所示。

B-b 试剂盒	
标准品浓度 (mg/L)	$\Delta A_0$
0	-0.0028
5.12	0.0390
17.33	0.1161
38.78	0.2597
77.56	0.4596

[0101]

[0102] 采用胶乳增强比浊方法，将  $3\mu\text{l}$  待测样品与 B-b 试剂盒中的  $200\mu\text{l}$  反应缓冲液混合后， $37^\circ\text{C}$  恒温 5 分钟，再加入 B-b 试剂盒中的  $100\mu\text{l}$  Kappa 游离轻链抗体溶液，30 秒后测定吸光度为  $A_1$  (检测波长： $600\text{nm}$ )， $37^\circ\text{C}$  恒温 4 分 30 秒，测定吸光度为  $A_2$  (检测波长： $600\text{nm}$ )，计算吸光度变化  $\Delta A = A_2 - A_1$ ，与标准品的工作曲线 (图 4) 比较即得到待测样品的 Kappa 游离轻链浓度；其中，最终混合体系的氯化钠浓度为  $1600\text{mmol/L}$ 。

[0103] 将上述待测样品先加入生理盐水稀释至 50% 后 (即待测样品量与生理盐水的量相同)，重复上述胶乳增强比浊方法的操作，即得到 50% 稀释的待测样品的 Kappa 游离轻链浓度。

[0104] 将该方法测定的稀释前后待测样品的 Kappa 游离轻链浓度进行比较，如下表 4 所示。

[0105] 表 4 混合体系的氯化钠浓度为  $1600\text{mmol/L}$  时的测试结果 (mg/L)

待测样品 ID	理论结果	测试结果	线性偏差	稀释比例
7#	33.30			0
	16.65	17.04	2.34%	50%
13#	10.05			0
	5.025	5.06	0.70%	50%
11#	45.99			0
	22.995	23.59	2.59%	50%
15#	66.46			0
	33.23	33.51	0.84%	50%
14#	51.29			0
	25.645	25.53	-0.45%	50%
42#	17.10			0
	8.55	7.67	-10.29%	50%
44#	24.14			0
	12.07	11.31	-6.30%	50%
3#	13.00			0
	6.50	6.13	-5.69%	50%

[0107] 对比实施例 1

[0108] 工作曲线的绘制：

[0109] 采用胶乳增强比浊方法，将  $3\mu\text{l}$  确定浓度的标准品与 A 试剂盒中的  $240\mu\text{l}$  反应缓冲液混合后， $37^\circ\text{C}$  恒温 5 分钟，再加入 A 试剂盒中的  $60\mu\text{l}$  Kappa 游离轻链抗体溶液，30 秒后测定吸光度为  $A_{01}$ （检测波长： $570\text{nm}$ ）， $37^\circ\text{C}$  恒温 4 分 30 秒，测定吸光度为  $A_{02}$ （检测波长： $570\text{nm}$ ），计算吸光度变化  $\Delta A_0 = A_{02} - A_{01}$ ，以  $\Delta A_0$  与标准品的确定浓度作图，即得到 A 试剂盒的工作曲线，如图 5 所示。

[0110]

A 试剂盒	
标准品浓度 (mg/L)	$\Delta A_0$
0	0.0009
5.12	0.143
17.33	0.431
38.78	0.891
77.56	1.5686

[0111] 采用胶乳增强比浊方法,将  $3\mu\text{l}$  待测样品与 A 试剂盒中的  $240\mu\text{l}$  反应缓冲液混合后, $37^\circ\text{C}$  恒温 5 分钟,再加入 A 试剂盒中的  $60\mu\text{l}$  Kappa 游离轻链抗体溶液,30 秒后测定吸光度为  $A_1$  (检测波长 : $570\text{nm}$ ), $37^\circ\text{C}$  恒温 4 分 30 秒,测定吸光度为  $A_2$  (检测波长 : $570\text{nm}$ ),计算吸光度变化  $\Delta A=A_2-A_1$ ,与标准品的工作曲线(图 5)比较即得到待测样品的 Kappa 游离轻链浓度;其中,最终混合体系的氯化钠浓度为  $150\text{mmol/L}$ 。

[0112] 将上述待测样品先加入生理盐水稀释至 50% 后(即待测样品量与生理盐水的量相同),重复上述胶乳增强比浊方法的操作,即得到 50% 稀释的待测样品的 Kappa 游离轻链浓度。

[0113] 将该方法测定的稀释前后待测样品的 Kappa 游离轻链浓度进行比较,如下表 5 所示。

[0114] 表 5 混合体系的氯化钠浓度为  $150\text{mmol/L}$  时的测试结果 (mg/L)

[0115]

待测样品 ID	理论结果	测试结果	线性偏差	稀释比例
7#	8.39			0
	4.195	13.32	217.52%	50%
13#	4.75			0
	2.375	3.99	68.00%	50%
11#	9.72			0
	4.86	16.13	231.89%	50%

[0116]	15#	21.34			0
		10.67	29.73	178.63%	50%
	14#	31.18			0
		15.59	22.99	47.47%	50%
	42#	25.14			0
		12.57	9.03	-28.16%	50%
	44#	32.79			0
		16.395	12.53	-23.57%	50%
	3#	18.72			0
		9.36	7.43	-20.62%	50%

[0117] 对比实施例 2

[0118] 采用胶乳增强比浊方法,使用目前商品化的英国 Binding site 公司的 Freelite 系列测定试剂,测定稀释前后待测样品的 Kappa 游离轻链浓度,结果如下表 6 所示。

[0119] 表 6 采用 Freelite 系列测定试剂时的测试结果(mg/L)

待测样品 ID	理论结果	测试结果	线性偏差	稀释比例	
[0120]	7#	13.45			0
		6.725	23.17	244.54%	50%
	13#	6.25			0
		3.125	5.73	83.36%	50%
	11#	21.13			0
		10.565	20.01	89.40%	50%
	15#	4.41			0
		2.205	10.23	363.95%	50%
	14#	22.3			0
		11.15	18.31	64.22%	50%

[0121]	42#	50.9			0
		25.45	15.13	-40.55%	50%
	44#	57.07			0
		28.535	18.96	-33.56%	50%
	3#	35.73			0
		17.865	12.15	-31.99%	50%

[0122] 从上述表 1~6 中可以看到,使用本发明的方法,控制待测样品与测定试剂混合后的混合体系的氯化钠浓度为 1000mmol/L 和 1600mmol/L 时,临床待测样品稀释符合测试结果在理论结果正负 20% 以内的线性要求,能够满足体外诊断试剂使用要求;而当混合体系的氯化钠的浓度为 150mmol/L 时,临床待测样品出现了不同程度的稀释偏移,超过正负 20% 的线性要求,对体外诊断有较大影响,而 Freelite 试剂也同样出现了待测样品稀释不成线性的情况,出现不同程度的假阳性(False Positive)和假阴性结果(False Negative),临床应用问题较多。

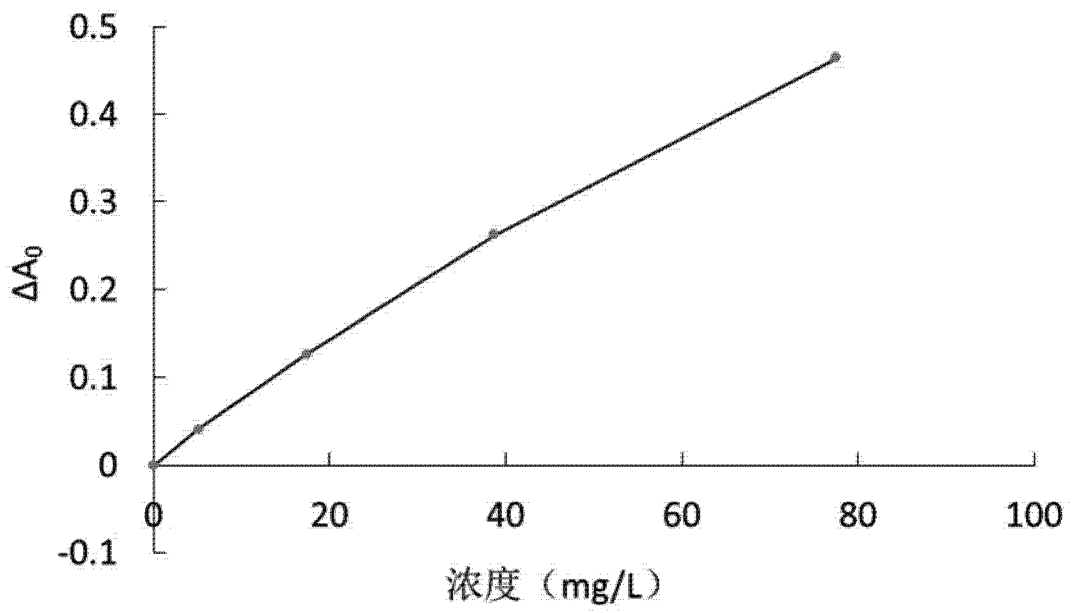


图 1

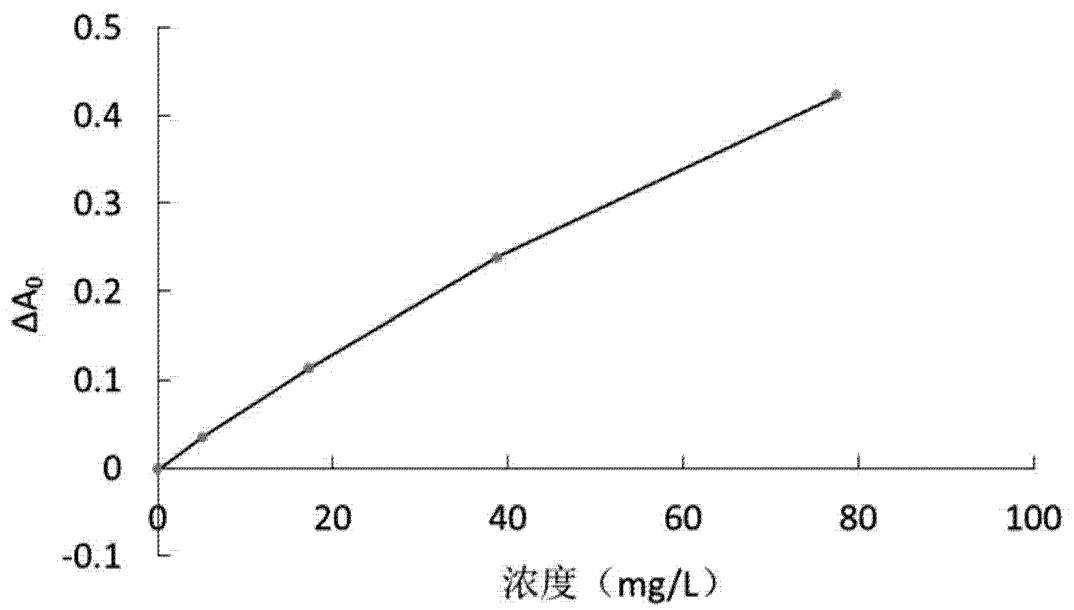


图 2

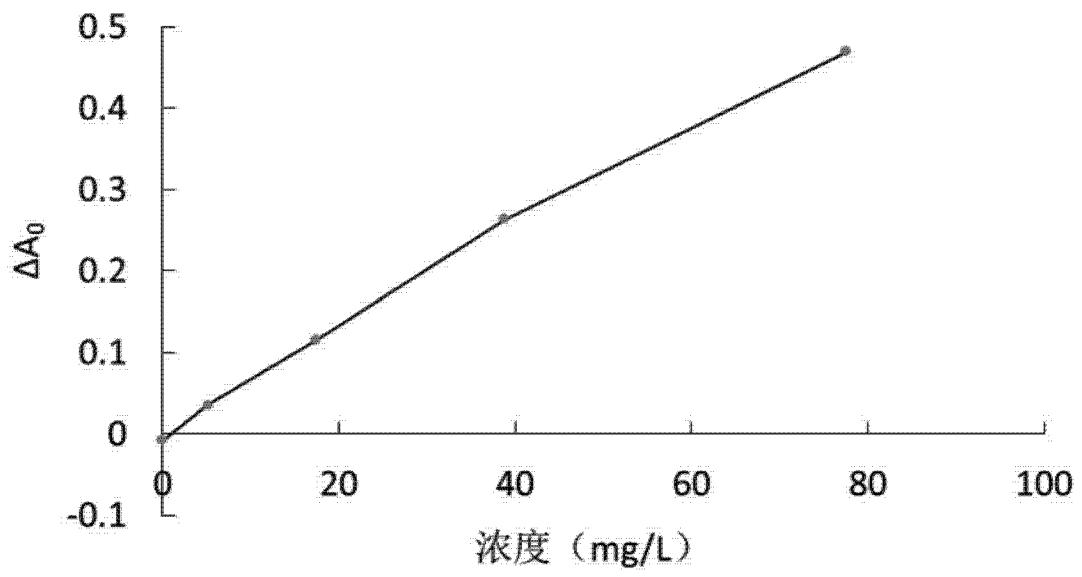


图 3

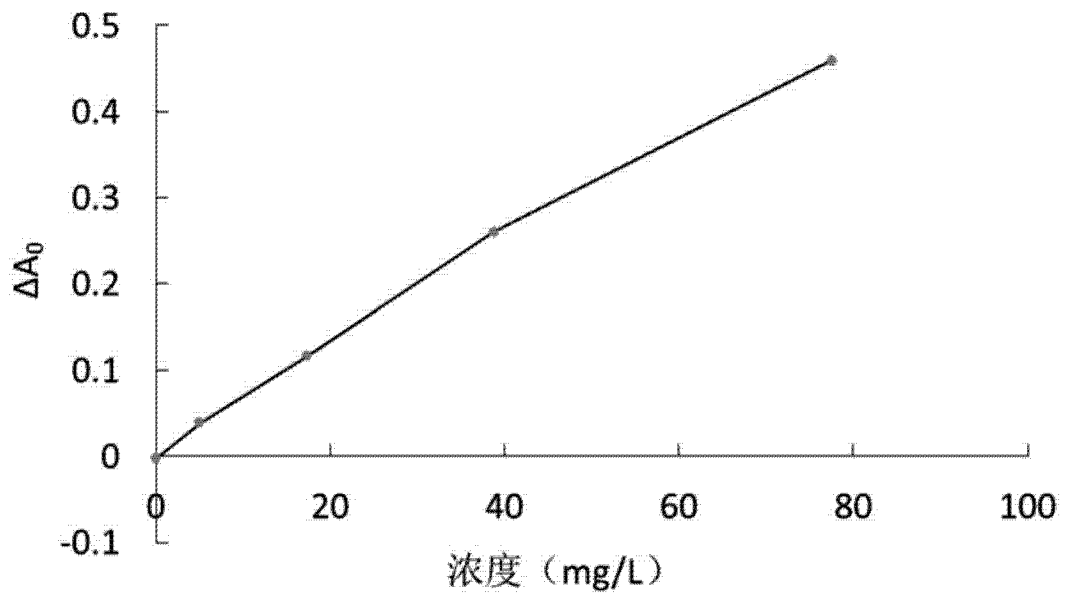


图 4

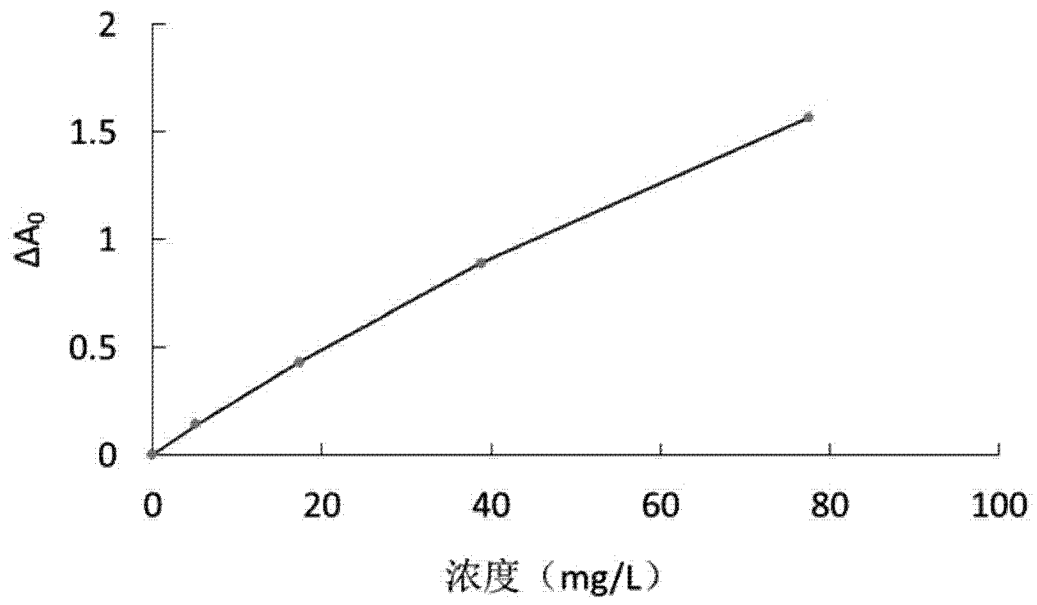


图 5

专利名称(译)	一种测定Kappa游离轻链浓度的试剂盒及方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103728455A</a>	公开(公告)日	2014-04-16
申请号	CN201310396461.0	申请日	2013-09-03
[标]申请(专利权)人(译)	柏荣诊断产品(上海)有限公司		
申请(专利权)人(译)	柏荣诊断产品(上海)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	柏荣诊断产品(上海)有限公司		
[标]发明人	王金凤 蒋欣		
发明人	王金凤 蒋欣		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N21/31 G01N33/52 G01N33/6803 G01N33/6893 G01N2800/70		
代理人(译)	薛琦		
其他公开文献	CN103728455B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种测定Kappa游离轻链浓度的试剂盒及方法。该试剂盒包括反应缓冲液和Kappa游离轻链抗体溶液，所述的反应缓冲液中氯化钠的浓度为1250~2400mmol/L。本发明的试剂盒解决了Kappa游离轻链比浊测定中的临床标本线性差的问题，为临床医生提供可靠的Kappa游离轻链测定结果作为诊断参考，以便充分发挥胶乳增强免疫比浊方法速度快，通量高的优势，缩短检测时间，利于临床应用和病人诊断。

A-a 试剂盒	
标准品浓度 (mg/L)	AA <sub>6</sub>
0	-0.0013
5.12	0.0404
17.33	0.1259
38.78	0.2625
77.56	0.4636