



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103901188 A

(43) 申请公布日 2014.07.02

(21) 申请号 201410142725.4

(22) 申请日 2014.04.11

(71) 申请人 苏州浩欧博生物医药有限公司

地址 215123 江苏省苏州市工业园区星湖街  
218号

(72) 发明人 李庆春 孙婵 丁俊荣 宋孟杰  
李永红 左云国

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有  
限公司 32103

代理人 孙仿卫 汪青

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

一种吸入过敏原的化学发光定量检测试剂盒  
及其制备方法和检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种吸入过敏原的化学发光定量  
检测试剂盒,包括如下试剂:磁分离试剂:标记有  
吸入过敏原的磁微粒悬浮液,所述的标记有吸入  
过敏原的磁微粒的浓度为 $0.1\sim 1.0\text{mg/ml}$ ;酶标试  
剂:含碱性磷酸酶标记的抗人 IgE抗体溶液,所  
述的含碱性磷酸酶标记的抗人 IgE抗体的浓度  
为 $0.5\sim 1\mu\text{g/ml}$ 。本发明通过采用标记有吸入过  
敏原的磁微粒悬浮液和含碱性磷酸酶标记的抗  
人 IgE抗体溶液制成的试剂盒,使得灵敏度达到  
 $0.008\text{IU/ml}$ ,并且该试剂盒与其他免疫球蛋白的  
交叉反应率均小于 $0.04\%$ ,准确性好、精密度高,  
样本无需预稀释,操作简单省时,检测范围宽。

1. 一种吸入过敏原的化学发光定量检测试剂盒,其特征在于:包括如下试剂:

磁分离试剂:标记有吸入过敏原的磁微粒悬浮液,所述的标记有吸入过敏原的磁微粒的浓度为  $0.1 \sim 1.0 \text{ mg/ml}$ ;

酶标试剂:含碱性磷酸酶标记的抗人 IgE 抗体溶液,所述的含碱性磷酸酶标记的抗人 IgE 抗体的浓度为  $0.5 \sim 1 \mu \text{ g/ml}$ 。

2. 根据权利要求 1 所述的吸入过敏原的化学发光定量检测试剂盒,其特征在于:所述的吸入过敏原的纯度大于 90%。

3. 根据权利要求 1 所述的吸入过敏原的化学发光定量检测试剂盒,其特征在于:所述的磁微粒具有超顺磁性,其直径为  $0.1 \sim 2 \mu \text{ m}$ ,每克磁微粒表面的羧基含量不低于 1 毫摩尔。

4. 根据权利要求 1 所述的吸入过敏原的化学发光定量检测试剂盒,其特征在于:所述的吸入过敏原与所述的磁微粒的摩尔比为  $0.02 \sim 0.16:1$ 。

5. 根据权利要求 1 所述的吸入过敏原的化学发光定量检测试剂盒,其特征在于:所述的抗人 IgE 抗体与所述的碱性磷酸酶的摩尔比为  $1:1 \sim 5$ 。

6. 根据权利要求 1 所述的吸入过敏原的化学发光定量检测试剂盒,其特征在于:所述的碱性磷酸酶的纯度大于 95%,比活性大于  $1000 \text{ U/mg}$ ,浓度大于  $5 \text{ mg/ml}$ 。

7. 根据权利要求 1 所述的吸入过敏原的化学发光定量检测试剂盒,其特征在于:所述的抗人 IgE 抗体的纯度大于 95%,浓度大于  $1 \text{ mg/ml}$ 。

8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的吸入过敏原的化学发光定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于:

磁分离试剂的制备方法为:将所述的磁微粒用  $0.04 \sim 0.06 \text{ mol/L}$ 、 $\text{pH} 4.5 \sim 5$  的 2-吗啉乙磺酸缓冲液重悬;然后加入所述的吸入过敏原,在  $15 \sim 40^\circ \text{C}$  下混悬  $30 \sim 60$  分钟;然后再加入新鲜配置的  $8 \sim 12 \text{ mg/ml}$  的碳二亚胺水溶液,在  $15 \sim 40^\circ \text{C}$  下混悬  $2 \sim 12 \text{ h}$ ,其中所述的 2-吗啉乙磺酸缓冲液与所述的碳二亚胺水溶液的体积比为  $10 \sim 20:1$ ;磁分离,去上清,用含质量比为  $4.5 \sim 5.5\%$  的牛血清白蛋白、 $\text{pH}$  为  $8 \sim 9.5$ 、物质的量浓度为  $0.01 \sim 0.5 \text{ mol/L}$  的三羟甲基氨基甲烷缓冲液重悬到所述的标记有吸入过敏原的磁微粒的浓度为  $0.1 \sim 1.0 \text{ mg/ml}$ ,即得所述的磁分离试剂;

酶标试剂的制备方法为:将抗人 IgE 抗体加入到浓度为  $8 \sim 12 \text{ mg/ml}$  的 2-亚胺基硫烷盐酸盐偶联剂中,在  $15 \sim 40^\circ \text{C}$  下静置  $18 \sim 25$  分钟,加入  $0.09 \sim 0.11 \text{ mol/L}$  的甘氨酸溶液,在  $15 \sim 40^\circ \text{C}$  下静置  $4 \sim 5$  分钟,用 G-25 凝胶柱除盐,收集活化后抗人 IgE 抗体,  $2 \sim 8^\circ \text{C}$  保存备用;将碱性磷酸酶溶液加入到  $4 \sim 5 \text{ mg/ml}$  的 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯溶液中,在  $15 \sim 40^\circ \text{C}$  下静置  $25 \sim 35$  分钟,用 G-25 凝胶柱除盐,收集活化后碱性磷酸酶,  $2 \sim 8^\circ \text{C}$  保存备用;将活化后的抗人 IgE 抗体和活化后的碱性磷酸酶混合,在  $2 \sim 8^\circ \text{C}$  下静置  $12 \sim 24 \text{ h}$ ,用 Superdex200 凝胶纯化柱纯化,获得连接物浓溶液,在  $2 \sim 8^\circ \text{C}$  保存备用;将所述的连接物浓溶液用含质量比为  $0.4 \sim 0.6\%$  的牛血清白蛋白、 $\text{pH}$  为  $7.8 \sim 8.0$ 、物质的量浓度为  $0.09 \sim 0.11 \text{ mol/L}$  的三羟甲基氨基甲烷缓冲液稀释到含碱性磷酸酶标记的抗人 IgE 抗体的浓度为  $0.5 \sim 1 \mu \text{ g/ml}$ ,即得所述的酶标试剂。

9. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的吸入过敏原的化学发光定量检测试剂盒的检测方法,其特征在于:包括依次进行的以下步骤:

步骤 1:在检测管中加入待测样本原液,然后加入所述的磁分离试剂,混匀,在  $36 \sim 38^\circ \text{C}$

下温育 25~35 分钟,其中所述的待测样本原液与所述的磁分离试剂的体积比为 1:0.9~1.1;

步骤 2:添加磁场,使步骤 1 温育后的体系在磁场中沉降,去除上清液,经清洗液多次清洗后,去除磁场,震荡使磁微粒充分混悬;

步骤 3:向步骤 2 处理后的体系中加入所述的酶标试剂,混匀,在 36~38℃下温育 8~12 分钟;

步骤 4:添加磁场,使步骤 3 温育后的磁微粒在磁场中沉降,去除上清液,经清洗液多次清洗后,去除磁场,震荡使磁微粒充分混悬;

步骤 5:添加磁场,使步骤 4 处理后的磁微粒在磁场中沉降,去除上清液,然后加入发光底物,去除磁场,充分混悬后检测 5min 内相对发光强度值。

## 一种吸入过敏原的化学发光定量检测试剂盒及其制备方法和检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫分析领域,具体涉及一种吸入过敏原的化学发光定量检测试剂盒及其制备方法和检测方法。

### 背景技术

[0002] 化学发光技术在欧美发达国家比较成熟,以瑞士罗氏、美国雅培、美国贝克曼,德国西门子等进口品牌为代表,其质量可靠,性能稳定,主要集中在国内的三级以及部分二级医院开展,但由于各家试剂的产品特点及在国内的注册情况不同,一般三级医院会同时应用上述厂家不同系列的产品。

[0003] 过敏性疾病又称变态反应性疾病,是指机体通过吸入、食入、注入或接触某种含有致敏成分的物质(称为过敏原或变应原)后触发机体产生过量的免疫球蛋白 E (IgE),从而引起各种功能性障碍或组织损伤的一类疾病,常表现为支气管哮喘、过敏性鼻炎、过敏性皮肤病等,有时会发生威胁生命的过敏性休克。过敏性疾病影响着全世界近 1/4 的人口,被世界卫生组织列为 21 世纪重点防治的三大疾病之一。实际上,很多的过敏性疾病,只要知道了过敏原,就可以采取简单的避免接触和谨慎使用的方式,防止过敏性疾病的发生,极大节省医疗开支,减少抗过敏类药物的使用。目前本项目的研究内容即是研发和优化与血清学抗原抗体反应原理相关的各种关键技术,从而提高针对临床患者体内 IgE 抗体的检测敏感度和特异性,并在此基础上开发出灵敏、稳定的纳米磁微粒免疫诊断试剂,从而快速、准确地确定机体相关的过敏原类型。

[0004] 相对于体外诊断试剂,过敏原检测的主要的替代品是皮试。这是传统的检测方法,具有准确性高、简便易行的优点。但是,皮试具有受检者痛苦、危险性高、发作期不能检查、依赖主管判断的致命缺点,江苏省和北京市都有过患者因皮试死亡的病例。而且,目前全国没有经过药监局批准的合法皮试产品,所以其替代性较差。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种灵敏度高的吸入过敏原的化学发光定量检测试剂盒。

[0006] 本发明所要解决的另一技术问题是提供上述试剂盒的制备方法。

[0007] 本发明所要解决的再一技术问题是提供采用上述试剂盒进行检测的检测方法。

[0008] 为解决以上技术问题,本发明采取如下技术方案:

[0009] 一种吸入过敏原的化学发光定量检测试剂盒,包括如下试剂:

[0010] 磁分离试剂:标记有吸入过敏原的磁微粒悬浮液,所述的标记有吸入过敏原的磁微粒的浓度为 0.1 ~ 1.0mg/ml;

[0011] 酶标试剂:含碱性磷酸酶标记的抗人 IgE 抗体溶液,所述的含碱性磷酸酶标记的抗人 IgE 抗体的浓度为 0.5 ~ 1 μg/ml。

[0012] 优选地,所述的吸入过敏原的纯度大于 90%。

[0013] 优选地,所述的磁微粒具有超顺磁性,其直径为 0.1 ~ 2  $\mu\text{m}$ ,每克磁微粒表面的羧基含量不低于 1 毫摩尔。

[0014] 优选地,所述的吸入过敏原与所述的磁微粒的摩尔比为 0.02 ~ 0.16:1。

[0015] 优选地,所述的抗人 IgE 抗体与所述的碱性磷酸酶的摩尔比为 1:1 ~ 5。

[0016] 优选地,所述的碱性磷酸酶的纯度大于 95%,比活性大于 1000U/mg,浓度大于 5mg/ml。

[0017] 优选地,所述的抗人 IgE 抗体的纯度大于 95%,浓度大于 1mg/ml。

[0018] 上述吸入过敏原的化学发光定量检测试剂盒的制备方法,

[0019] 磁分离试剂的制备方法为:将所述的磁微粒用 0.04 ~ 0.06mol/L、pH4.5 ~ 5 的 2-吗啉乙磺酸缓冲液重悬;然后加入所述的吸入过敏原,在 15 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ 下混悬 30 ~ 60 分钟;然后再加入新鲜配置的 8 ~ 12mg/ml 的碳二亚胺水溶液,在 15 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ 下混悬 2 ~ 12h,其中所述的 2-吗啉乙磺酸缓冲液与所述的碳二亚胺水溶液的体积比为 10 ~ 20:1;磁分离,去上清,用含质量比为 4.5 ~ 5.5% 的牛血清白蛋白、pH 为 8 ~ 9.5、物质的量浓度为 0.01 ~ 0.5mol/L 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液重悬到所述的标记有吸入过敏原的磁微粒的浓度为 0.1 ~ 1.0mg/ml,即得所述的磁分离试剂;

[0020] 酶标试剂的制备方法为:将抗人 IgE 抗体加入到浓度为 8 ~ 12mg/ml 的 2-亚胺基硫烷盐酸盐偶联剂中,在 15 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ 下静置 18 ~ 25 分钟,加入 0.09 ~ 0.11mol/L 的甘氨酸溶液,在 15 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ 下静置 4 ~ 5 分钟,用 G-25 凝胶柱除盐,收集活化后抗人 IgE 抗体,2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用;将碱性磷酸酶溶液加入到 4 ~ 5mg/ml 的 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯溶液中,在 15 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ 下静置 25 ~ 35 分钟,用 G-25 凝胶柱除盐,收集活化后碱性磷酸酶,2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用;将活化后的抗人 IgE 抗体和活化后的碱性磷酸酶混合,在 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 下静置 12 ~ 24h,用 Superdex200 凝胶纯化柱纯化,获得连接物浓溶液,在 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用;将所述的连接物浓溶液用含质量比为 0.4 ~ 0.6% 的牛血清白蛋白、pH 为 7.8 ~ 8.0、物质的量浓度为 0.09 ~ 0.11mol/L 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液稀释到含碱性磷酸酶标记的抗人 IgE 抗体的浓度为 0.5 ~ 1  $\mu\text{g/ml}$ ,即得所述的酶标试剂;

[0021] 上述吸入过敏原的化学发光定量检测试剂盒的检测方法,包括依次进行的以下步骤:

[0022] 步骤 1:在检测管中加入待测样本原液,然后加入所述的磁分离试剂,混匀,在 36 ~ 38 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 25 ~ 35 分钟,其中所述的待测样本原液与所述的磁分离试剂的体积比为 1:0.9 ~ 1.1;

[0023] 步骤 2:添加磁场,使步骤 1 温育后的体系在磁场中沉降,去除上清液,经清洗液多次清洗后,去除磁场,震荡使磁微粒充分混悬;

[0024] 步骤 3:向步骤 2 处理后的体系中加入所述的酶标试剂,混匀,在 36 ~ 38 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 8 ~ 12 分钟;

[0025] 步骤 4:添加磁场,使步骤 3 温育后的磁微粒在磁场中沉降,去除上清液,经清洗液多次清洗后,去除磁场,震荡使磁微粒充分混悬;

[0026] 步骤 5:添加磁场,使步骤 4 处理后的磁微粒在磁场中沉降,去除上清液,然后加入发光底物,去除磁场,充分混悬后检测 5min 内相对发光强度值。

[0027] 由于以上技术方案的实施,本发明与现有技术相比具有如下优点:

[0028] 本发明通过采用标记有吸入过敏原的磁微粒悬浮液和含碱性磷酸酶标记的抗人 IgE 抗体溶液制成的试剂盒,使得灵敏度达到 0.008IU/ml,并且该试剂盒与其他免疫球蛋白的交叉反应率均小于 0.04%,准确性好、精密度高,样本无需预稀释,操作简单省时,检测范围宽。

#### 附图说明

[0029] 附图 1 为 A, B 点连点拟合曲线;

[0030] 附图 2 为实施例 1 制备得到的试剂盒的系统参比结果;

[0031] 附图 3 为测试校准品标准曲线。

#### 具体实施方式

[0032] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细的说明,但本发明并不限于以下实施例。实施例中采用的实施条件可以根据具体使用的不同要求做进一步调整,未注明的实施条件为本行业中的常规条件。

[0033] 实施例 1:试剂盒的制备

[0034] (一)磁分离试剂的制备:

[0035] 材料与仪器:

[0036] 1、磁微粒:含羧基(COOH)活性集团,每克(g)磁微粒(干重)羧基含量为 1 毫摩尔(mmol),具有超顺磁性,直径为  $1\ \mu\text{m}$ 。

[0037] 2、吸入过敏原:将冻干粉尘螨过敏原 10mg 用磷酸盐缓冲液(pH7.2, 0.02M) 2ml 溶解,得浓度 5mg/ml 过敏原溶液,将所得溶液装入透析袋中,系紧透析袋后,用磷酸盐缓冲液 500ml, 4℃进行透析 4~8 小时,换液 3-4 次,收集透析产物,过敏原蛋白纯度为 90%。

[0038] 3、2-吗啉乙磺酸(MES)、碳二亚胺(EDC)、三羟甲基氨基甲烷(TRIS)和其他试剂应达到化学纯。

[0039] 操作步骤:

[0040] 1、取 100mg 磁微粒,磁分离去上清,用 0.05mol/L、pH5 的 MES 缓冲液 10ml 重悬;

[0041] 2、加入 8mg 的吸入过敏原,室温混悬 50min;

[0042] 3、加入 1ml,新鲜配制的 10mg/ml 的 EDC 水溶液,室温混悬 10h;

[0043] 4、磁分离,去上清,用含 5% 牛血清白蛋白(BSA)、pH9 的 1mol/L 的 TRIS 缓冲液重悬到 1mg/ml,完成磁分离试剂的制备。

[0044] (二)酶标试剂的制备:

[0045] 材料与仪器:

[0046] 1、抗人 IgE 抗体由苏州浩欧博生物医药有限公司制备,纯度为 95%,浓度为 1mg/ml,以磷酸盐缓冲液保存;

[0047] 2、碱性磷酸酶(ALP)纯度为 95%,比活性应为 1000U/mg,浓度为 5mg/ml;

[0048] 3、偶联剂 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC),2-亚胺基硫烷盐酸盐(2-IT)购自 THERMO 公司,TRIS 等化学试剂达到化学纯;

[0049] 4、G-25 凝胶柱和 Supperdex200 凝胶纯化柱为 GE 公司产品。

[0050] 操作步骤：

[0051] 1、取 1mg 抗人 IgE 抗体，加入 10mg/ml 的偶联剂 2-IT 溶液 3  $\mu$  l，室温静置 20min，加入 0.1mol/L 的甘氨酸溶液 10  $\mu$  l，室温静置 5min。用 G-25 凝胶柱除盐，收集活化后抗人 IgE 抗体，4 $^{\circ}$ C 保存备用；

[0052] 2、取 1.5mg 的 ALP，加入 5mg/ml 的 SMCC 溶液 15  $\mu$  l，室温静置 30min，用 G-25 凝胶柱除盐，收集活化后 ALP，4 $^{\circ}$ C 保存备用；

[0053] 3、将上述活化的抗人 IgE 抗体与活化的 ALP 混合，4 $^{\circ}$ C 条件下静置 20h，用 Superdex200 凝胶纯化柱纯化偶联物，获得连接物浓溶液，4 $^{\circ}$ C 保存备用；

[0054] 4、将连接物浓溶液用含 0.5% 牛血清白蛋白(BSA)、pH8.0 的 0.1mol/L 的 TRIS 缓冲液稀释到 1  $\mu$  g/ml，完成酶标试剂的制备。

[0055] 实施例 2：检测的实施和检测效果的评价：

[0056] (一) 检测的实施

[0057] 材料与仪器：

[0058] 1、磁分离试剂和酶标试剂，由实施例 1 制备。

[0059] 2、IgE 校准品、质控品、发光底物、清洗液、特异性 IgE 测定试剂盒(荧光法)由法玛西亚公司生产。

[0060] 检测实施：

[0061] 下述检测步骤由全自动化学发光分析仪自动完成，也可手工操作完成。

[0062] 1、在检测管中加入 50  $\mu$  l 待测样本(血清或血浆)原液，然后加入 50  $\mu$  l 磁分离试剂，混匀，37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 条件下温育 30min；

[0063] 2、使磁微粒在磁场中沉降，去除上清，加入 500  $\mu$  l 的清洗液，去除磁场，震荡使磁微粒充分混悬。重复此操作，共操作 3 次。

[0064] 3、加入 100 $\mu$ l 酶标试剂；混匀，37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 条件下温育 10min；

[0065] 4、使磁微粒在磁场中沉降，去除上清，加入 500  $\mu$  l 的清洗液，去除磁场，震荡使磁微粒充分混悬。重复此操作，共操作 3 次。

[0066] 5、将磁微粒在磁场中沉降，去除上清，加入 150  $\mu$  l 的发光底物，去除磁场，充分混悬后检测 5min 内相对发光强度值(RLU)。

[0067] (二) 检测效果的评价

[0068] 以下数据以 F13 为例：

[0069] 1、灵敏度评价：

[0070] 检测“0”浓度样本，重复检测 20 次，计算相对发光强度(RLU)的平均值(M)和标准差(SD)，并计算 M+2SD 值，根据零浓度校准品和相邻校准品之间的浓度-RLU 进行两点回归拟合得出一次方程，将 M+2SD 值带入上述方程中，求出对应的浓度值，即为最低检测限。本方法的灵敏度不大于 0.01IU/mL

[0071] A 点发光值，参见表 1。

[0072] 表 1

[0073]

<b>D2-STD-A(RLU)</b>			
<b>1786</b>	<b>1777</b>	<b>1753</b>	<b>1660</b>
<b>1696</b>	<b>1690</b>	<b>1612</b>	<b>1685</b>
<b>1785</b>	<b>1765</b>	<b>1607</b>	<b>1722</b>
<b>1709</b>	<b>1702</b>	<b>1728</b>	<b>1730</b>
<b>1635</b>	<b>1632</b>	<b>1690</b>	<b>1617</b>

[0074] A 点发光均值  $X=1699$

[0075]  $SD=57$

[0076]  $X+2SD=1812$

[0077] (1) B 点发光值, 参见表 2。

[0078] 表 2

[0079]

<b>D2-STD-B(RLU)</b>		
<b>6742</b>	<b>6543</b>	<b>6685</b>

[0080] B 点发光均值  $X=6657$

[0081] (3) A, B 点连点拟合曲线, 参见图 1。

[0082] (4) 将 A 点的  $X+2SD$  代入 A、B 两点拟合的曲线, 灵敏度 = 0.008IU/ml

[0083] 2、精密度评价：

[0084] (1) 分析内精密度

[0085] 将实施例 1 制备的试剂盒一批, 分别测定低、中、高三种不同浓度的血清, 10 孔平行测定, 得出的分析内变异系数为 4.26% ~ 7.53%。结果参见表 3。

[0086] 表 3

[0087]

测定血清浓度 (IU/mL)	测定次数	分析内 CV (%)
0.39	10	7.53
9.25	10	5.37
30.37	10	4.26

[0088] (2) 分析间精密度

[0089] 将实施例 1 制备的试剂盒取三批, 每批试剂盒均测定低、中、高三种不同浓度的血清, 10 孔平行测定。每份血清得到 30 个浓度测值, 统计分析间变异系数为 5.03% ~ 8.32%。结果参见表 4。

[0090] 表 4

[0091]

测定血清浓度 (ng / mL)	测定次数	分析内 CV (%)
0.39	30	8.32
9.25	30	7.01
30.37	30	5.03

[0092] 3、准确度评价：

[0093] 至少分析 86 个不同的临床患者样本。每次实验必须进行校准和室内质控,只有在室内质控合格的情况下,实验数据才有效;实施例 1 制备的试剂盒与法玛西亚试剂盒和 UniCAP 测定系统进行对比:

[0094] X 为比对系统测定值,Y 为待评价系统测定值,以 Y 对 X 作散点图。相关系数计算:利用所有样本测定值进行相关系数计算,如果  $r \geq 0.98$ ,则认为选择的数据范围适合,数据满足要求。结果参见表 5。系统参比结果见图 3。

[0095] 表 5

[0096]

血清编号	Xi (IU/ml)	Yi (IU/ml)	血清编号	Xi (IU/ml)	Yi (IU/ml)
1	0.05	0.04	44	10.56	9.73
2	0.26	0.30	45	12.24	14.20
3	0.35	0.36	46	9.24	7.59
4	0.23	0.24	47	9.45	9.96
5	0.34	0.29	48	9.26	7.80
6	0.25	0.24	49	6.91	6.56
7	0.26	0.25	50	3.80	4.54
8	0.23	0.23	51	12.82	10.81
9	0.09	0.09	52	9.10	10.71
10	0.71	0.71	53	12.17	11.32
11	0.50	0.54	54	4.51	4.94
12	0.37	0.43	55	15.45	16.50
13	0.44	0.48	56	13.76	11.60
14	0.37	0.34	57	11.44	11.72
15	0.37	0.35	58	16.05	18.67
16	0.41	0.42	59	13.20	10.92
17	0.55	0.62	60	10.38	9.26

[0097]

18	0.49	0.43	61	16.24	17.32
19	0.56	0.64	62	15.45	14.72
20	1.71	1.63	63	6.24	5.84
21	1.12	0.92	64	13.44	10.84
22	1.30	1.56	65	12.76	14.12
23	1.58	1.45	66	12.46	13.16
24	1.79	1.43	67	21.11	18.69
25	1.73	1.90	68	26.95	26.08
26	2.84	3.29	69	46.16	44.31
27	1.05	1.01	70	23.97	25.71
28	1.65	1.39	71	34.99	37.28
29	1.87	1.79	72	39.42	40.47
30	0.99	0.90	73	49.11	48.81
31	1.03	1.00	74	20.64	18.69
32	2.90	3.26	75	19.45	16.55
33	3.00	2.41	76	40.51	37.20
34	3.15	3.23	77	43.38	38.28
35	2.43	2.59	78	17.94	19.52
36	1.73	1.58	79	35.79	37.18
37	6.51	5.22	80	26.89	24.81
38	7.02	7.12	81	75.84	70.09
39	8.03	8.94	82	93.73	84.72
40	8.55	8.67	83	89.60	81.84
41	13.90	13.11	84	51.09	46.16
42	7.29	7.67	85	>100	>100
43	5.54	5.59	86	>100	>100

[0098] 4、试剂盒特异性评价

[0099] 对实施例 1 中的试剂盒特异性检验是选取与 IgE 同为免疫球蛋白的其他免疫蛋白，例如免疫球蛋白 A (IgA)、免疫球蛋白 G (IgG)、免疫球蛋白 M (IgM) 和免疫球蛋白 D (IgD)，配制成大于生理浓度的样本，以本方法进行测定，并计算交叉反应率。结果见表 6，本法与 IgA、IgG、IgM、IgD 的交叉反应率均小于 0.04%。

[0100] 表 6

[0101]

交叉反应物	实验浓度 (mg/ml)	IgE 测定浓度 (IU/mL)
免疫球蛋白 A (IgA)	3.0	<0.1IU/ml

免疫球蛋白 G (IgG)	15.0	<0.1IU/ml
免疫球蛋白 M (IgM)	3.0	<0.1IU/ml
免疫球蛋白 D (IgD)	0.2	<0.1IU/ml

[0102] 5、相关性评价

[0103] 用实施例 1 制备得到的试剂盒与法玛西亚试剂盒和 UniCAP 测定系统进行对比对 500 份人血清样品同时进行检测。其检测见过附图 2 (附图与描述不一致),以本发明方法的测的血清 IgE 浓度为横坐标,以法玛西亚系统测定的结果为纵坐标作回归分析,相关方程为  $y=1.106x-0.314$ ,相关系数为  $:0.9960$ 。经统计学处理结果表明,本方法同国外试剂盒临床样本测值相关性良好。

[0104] 6、热稳定性评价

[0105] 对实施例 1 的试剂盒分别进行 4℃ 12 个月和 37℃ 7 天的稳定性实验,结果表明试剂盒标准品发光强度的变化、批内和批间精密度、准确性等指标均在正常范围之内,试剂盒有效期可达 12 个月。

[0106] 以上对本发明做了详尽的描述,其目的在于让熟悉此领域技术的人士能够了解本发明的内容并加以实施,并不能以此限制本发明的保护范围,凡根据本发明的精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围内。

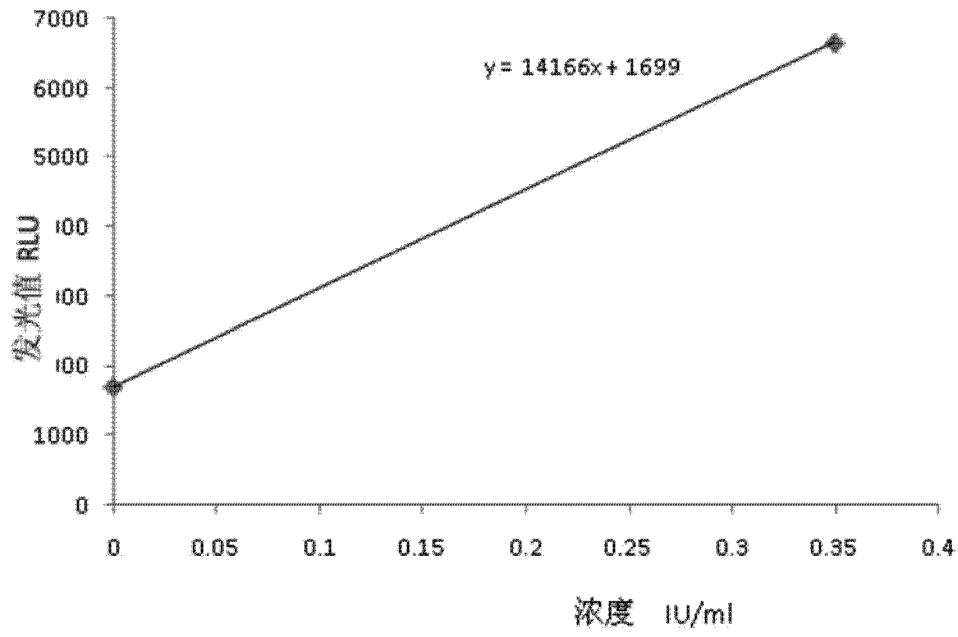


图 1

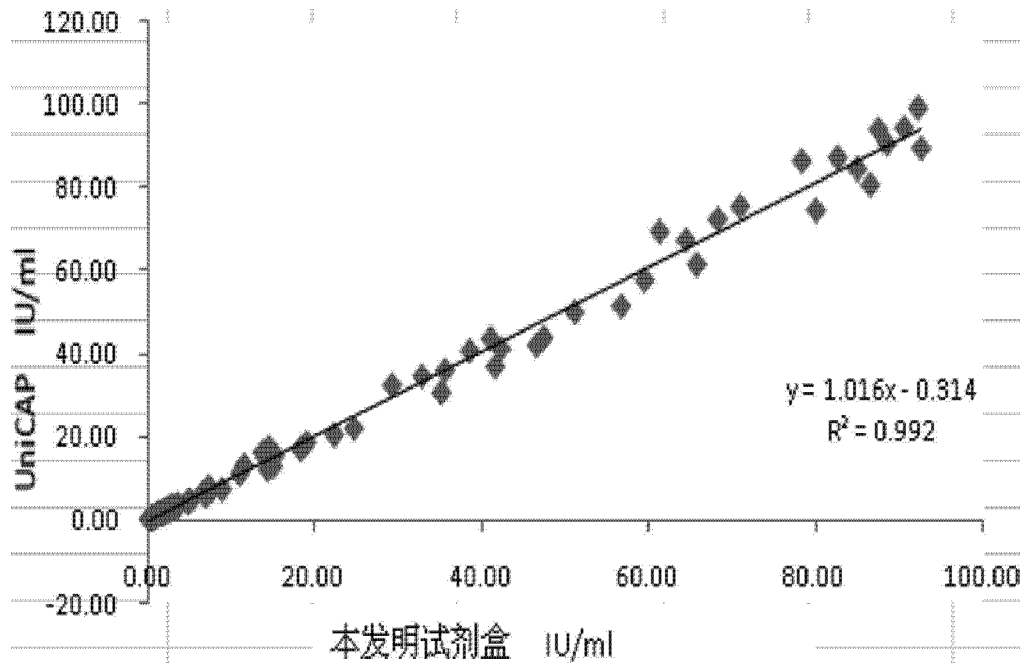


图 2

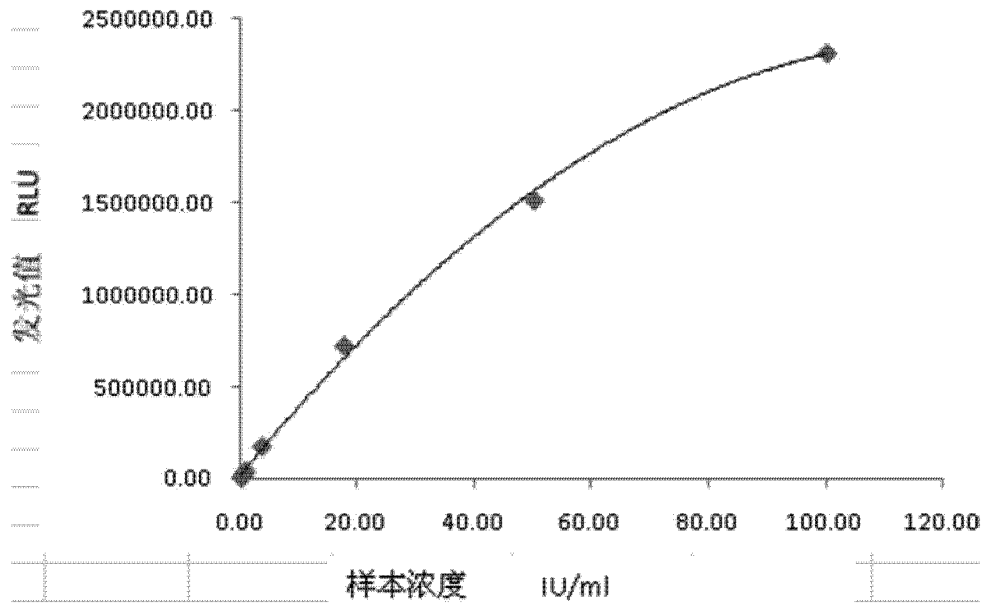


图 3

专利名称(译)	一种吸入过敏原的化学发光定量检测试剂盒及其制备方法和检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103901188A</a>	公开(公告)日	2014-07-02
申请号	CN201410142725.4	申请日	2014-04-11
[标]申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
[标]发明人	李庆春 孙婵 丁俊荣 宋孟杰 李永红 左云国		
发明人	李庆春 孙婵 丁俊荣 宋孟杰 李永红 左云国		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/53 G01N33/535		
代理人(译)	汪青		
其他公开文献	CN103901188B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种吸入过敏原的化学发光定量检测试剂盒，包括如下试剂：磁分离试剂：标记有吸入过敏原的磁微粒悬浮液，所述的标记有吸入过敏原的磁微粒的浓度为0.1~1.0mg/ml；酶标试剂：含碱性磷酸酶标记的抗人IgE抗体溶液，所述的含碱性磷酸酶标记的抗人IgE抗体的浓度为0.5~1μg/ml。本发明通过采用标记有吸入过敏原的磁微粒悬浮液和含碱性磷酸酶标记的抗人IgE抗体溶液制成的试剂盒，使得灵敏度达到0.008IU/ml，并且该试剂盒与其他免疫球蛋白的交叉反应率均小于0.04%，准确性好、精密度高，样本无需预稀释，操作简单省时，检测范围宽。