



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104459107 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 25

(21) 申请号 201410136534. 7

(22) 申请日 2014. 04. 05

(71) 申请人 北京中航赛维生物科技有限公司

地址 100049 北京市大兴区经济技术开发区
经海二路 29 号院 8 号楼二层

(72) 发明人 于大为 杨晓勇

(74) 专利代理机构 北京富天文博兴知识产权代
理事务所(普通合伙) 11272

代理人 刘寿椿

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书2页 说明书8页

(54) 发明名称

髓过氧化物酶抗体(MPO-Ab)定量测定试剂盒及其检测方法

(57) 摘要

本发明属于临床免疫学检测技术领域,公开了一种髓过氧化物酶抗体(MPO-Ab)定量测定试剂盒,包括磁分离试剂、酶标记试剂、校准品、清洗浓缩液、底物溶液以及稳定剂。本发明还公开了上述试剂盒的制备方法。本发明还公开了上述试剂盒的检测方法。本发明制备的试剂盒精确度、灵敏度以及稳定性较好,并且成本低廉,操作简单,具备广阔的应用前景。

1. 一种髓过氧化物酶抗体 (MPO-Ab) 定量测定试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒包括磁分离试剂、酶标记试剂、校准品、清洗浓缩液、底物溶液以及稳定剂。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒, 其特征在于, 所述磁分离试剂的制备步骤如下:

一、配制磁微粒缓冲液, 以配制 1L 为例:

1)、量取 800mL 纯化水于容器中, 称取 Tris 12.1g 和 NaCl 8.5g 加入容器中, 充分搅拌至完全溶解;

2)、称取 BSA 5g, 量取新生牛血清 50mL 以及 Proclin300 0.2mL 至容器中, 充分搅拌至完全溶解;

3)、调 pH, 控制 pH 在 7.9-8.1 之间;

4)、最后用纯化水定容至 1L, 2-8℃保存待用;

二、制备磁分离试剂:

1)、取 100mg 含羧基活性基团的磁微粒, 用 0.025mol/L, pH4.5-5 的 MES 缓冲液 10mL 混悬;

2)、加入 0.5-1mL 浓度为 10mg/mL 的 EDC 水溶液, 室温混悬 30-60min;

3)、磁分离, 吸去上清, 用 0.025mol/L, pH4.5-5 MES 缓冲液 10mL 重悬;

4)、加入 0.02-0.1mg 的 MPO 抗原, 室温混悬 120-240min;

5)、磁分离, 吸去上清, 用磁微粒缓冲液重悬到 1mg/mL, 完成磁分离试剂的制备。

3. 如权利要求 1-2 任其一所述的试剂盒, 其特征在于, 所述酶标记试剂的制备步骤如下:

一、配制酶标记试剂稀释液, 以配制 1L 为例:

1)、量取 800mL 纯化水于容器中, 称取 Hepes 6.06g、NaCl 8.5g 加入容器中, 充分搅拌至完全溶解;

2)、称取 BSA 5g, ZnCl₂ 0.1g、Proclin-300 0.2mL 和 MgCl₂ 0.1g 于容器中, 充分搅拌至完全溶解;

3)、调 pH, 控制 pH 在 7.5-8.0 之间;

4)、最后用纯化水定容至 1L, 2-8℃保存待用;

二、碱性磷酸酶 (ALP) 与 MPO 抗体的偶联

1)、取 1mg MPO 抗体, 加入 10mg/mL 的偶联剂 2-IT 溶液 2-4 μL, 室温静置 20min, 加入 0.1mol/L 的甘氨酸溶液 10 μL, 室温静置 5min; 用 G-25 凝胶柱除盐, 收集活化后的抗体, 2-8℃保存备用;

2)、取 1.5mg 的 ALP, 加入 5mg/mL 的 SMCC 溶液 10-20 μL, 室温静置 30min, 用 G-25 凝胶柱除盐, 收集活化后的 ALP, 2-8℃保存备用;

3)、将上述活化的 MPO 抗体与活化的 ALP 混合, 2-8℃条件下静置 12-24h, 用 Superdex200 凝胶纯化柱纯化偶联物, 获得 MPO 抗体-ALP 连接物浓溶液, 2-8℃保存备用;

4)、将 MPO 抗体-ALP 连接物浓溶液用酶标记物稀释液稀释到 0.02-0.1 μg/mL, 完成酶标记试剂的制备。

4. 如权利要求 1-3 任其一所述的试剂盒, 其特征在于, 所述校准品的制备步骤如下:

一、配制校准品稀释液:

1)、量取 600mL 纯化水于容器中, 称取 200mL 新生牛血清加入容器中, 充分搅拌混合均

匀；

2)、称取磷酸氢二钾 3.4g、磷酸二氢钾 0.36g、Proclin300 0.02 mL 加入容器中，充分搅拌至完全溶解；

3)、调 pH，控制 pH 在 7.0-7.5 之间；

4)、最后用纯化水定容至 1L，2-8℃保存待用；

二、配制校准品：用校准品稀释液将 MP0 抗体分别配制为 0、5、20、50、150、300U/mL 共 6 个浓度点。

5. 如权利要求 1-4 任其一所述的试剂盒，其特征在于，所述清洗浓缩液的制备步骤如下：以配制 1L 为例：

1)、量取 800mL 纯化水于容器中，称取 Tris 12.1g 和 NaCl 8.5g 于容器中，充分搅拌至完全溶解；

2)、称取 Tween-20 5g 以及 Triton X-100 5g，充分搅拌，直至完全混匀；

3)、调 pH，控制 pH 在 7.5-8.0 之间；

4)、最后定容 1000mL，2-8℃保存。

6. 如权利要求 1-5 任其一所述的试剂盒，其特征在于，所述底物溶液的制备步骤如下：以配制 1L 为例：

1)、称取 NaCl 8.87g、Tris 3.72g、Na₂SO₃ 0.003g 和 Proclin-300 0.4ml 于 1L 烧杯中；

2)、用量筒量取 600ml 纯化水于 1L 烧杯中，充分搅拌，直至完全溶解，调 pH，控制其范围在 7.5 - 8.0 之间；

3)、加入 250ml Lumi-Phos 530 后，用纯化水定容至 1000ml，混匀后即得。

7. 如权利要求 1-6 任其一所述的试剂盒，其特征在于，所述稳定剂的制备步骤如下：以配制 1L 为例：

1)、称取乙二胺四乙酸二钠 2.3g 和氯化镁 1.4g 于 1L 烧杯中；

2)、用量筒量取 900ml 纯化水于 1L 烧杯中，充分搅拌，直至完全溶解，调 pH，控制其范围在 7.2 - 7.8 之间；

3)、加入 50ml 甘油后，用纯化水定容至 1000ml，混匀后即得。

髓过氧化物酶抗体 (MPO-Ab) 定量测定试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于临床免疫学检测技术领域,具体涉及一种髓过氧化物酶抗体 (MPO-Ab) 定量测定试剂盒及其检测方法。

[0002]

背景技术

[0003] 血管炎是一组以血管的炎症与坏死为主要病理改变的炎性疾病,包括血管壁及血管周围有炎细胞浸润,并伴有血管损伤,包括纤维素沉积、胶原纤维变性、内皮细胞及肌细胞坏死,又称脉管炎。临床表现因受累血管的类型、大小、部位及病理特点不同而表现各异。其常累及全身多个系统(例如皮肤、肾脏、肺、神经系统等),引起多系统、多脏器的功能障碍,但也可局限于某一脏器。致病因素直接作用于血管壁的为原发性血管炎,在血管炎症基础上产生一定的临床症状和体征者为血管炎疾病;由邻近组织炎症病变波及血管壁致病的为继发性血管炎。

[0004] 髓过氧化物酶 (MPO) 又称过氧化物酶,是一种重要的含铁溶酶体,存在于髓系细胞(主要是中性粒细胞和单核细胞)的嗜苯胺蓝颗粒中,是髓细胞的特异性标志;它也是抗中性粒细胞胞浆抗体 (ANCA) 的主要靶抗原,是嗜中性粒细胞杀灭吞噬微生物的重要物质,抗 MPO 抗体属于 ANCA 的一种,主要针对中性粒细胞和单核粒细胞的细胞浆成分。64% 的新月体性肾小球肾炎可检测出抗 MPO 抗体,显微镜下多血管炎患者阳性率为 60%;变应性肉芽肿性血管炎患者可检测出抗 MPO 抗体;韦格纳肉芽肿患者阳性率为 24%,许多体内和体外的研究数据都提示抗 MPO 抗体与血管炎的致病机制有关。

[0005] 临床检测髓过氧化物酶抗体的常见方法包括放射免疫分析法以及间接免疫荧光法等。但这些方法都存在着不足之处。放射免疫分析法是利用同位素标记的与未标记的抗原,同抗体发生竞争性抑制反应,是一种在无须采用生物测定方法的情况下用于检测抗原的实验室测定方法。该法极其敏感而又极其特异,但其却需要具备尖端复杂的设备,且成本也不低。同时,还需要特殊的预防措施,因为其要用到放射性物质。因此,如今放射免疫分析法在很大程度上已经被 ELISA 所取代。间接免疫荧光法的基本原理是用特异性的抗体与载玻片中的抗原结合后形成抗原抗体复合物,继用荧光抗体与抗原抗体复合物结合,形成抗原抗体荧光复合物。该方法在分析结果时无法根据分子量的大小区分非特异性识别;操作相对复杂,需要价格较昂贵的荧光显微镜,只能进行定性检测,不能进行定量测定。

[0006]

发明内容

[0007] 为了克服现有技术的不足,本发明提供了一种具备较佳的准确度、精密度和稳定性的试剂盒。本发明是通过如下技术方案来实现的:

一种髓过氧化物酶抗体 (MPO-Ab) 定量测定试剂盒,包括磁分离试剂、酶标记试剂、校

准品、清洗浓缩液、底物溶液以及稳定剂；

所述磁分离试剂的制备步骤如下：

一、配制磁微粒缓冲液，以配制 1L 为例：

1)、量取 800mL 纯化水于容器中，称取 Tris 12.1g 和 NaCl 8.5g 加入容器中，充分搅拌至完全溶解；

2)、称取 BSA 5g，量取新生牛血清 50mL 以及 Proclin300 0.2 mL 至容器中，充分搅拌至完全溶解；

3)、用 4M 的 HCl 调 pH，控制 pH 在 7.9-8.1 之间；

4)、最后用纯化水定容至 1L，2-8℃ 保存待用。

[0008] 二、制备磁分离试剂：

1)、取 100mg 含羧基(COOH) 活性基团的磁微粒，用 0.025mol/L，pH4.5-5 的 MES 缓冲液 10mL 混悬；

2)、加入 0.5-1mL 浓度为 10mg/mL 的 EDC 水溶液，室温混悬 30-60min；

3)、磁分离，吸去上清，用 0.025mol/L，pH4.5-5 MES 缓冲液 10mL 重悬；

4)、加入 0.02-0.1mg 的 MPO 抗原，室温混悬 120-240min；

5)、磁分离，吸去上清，用磁微粒缓冲液重悬到 1mg/mL，完成磁分离试剂的制备。

[0009] 所述酶标记试剂的制备步骤如下：

一、配制酶标记试剂稀释液，以配制 1L 为例：

1)、量取 800mL 纯化水于容器中，称取 Hepes 6.06g、NaCl 8.5g 加入容器中，充分搅拌至完全溶解；

2)、称取 BSA 5g，ZnCl₂ 0.1g、Proclin-300 0.2mL 和 MgCl₂ 0.1g 于容器中，充分搅拌至完全溶解；

3)、用 4M 的 HCl 调 pH，控制 pH 在 7.5-8.0 之间；

4)、最后用纯化水定容至 1L，2-8℃ 保存待用。

[0010] 二、碱性磷酸酶(ALP) 与 MPO 抗体的偶联

1)、取 1mg MPO 抗体，加入 10mg/mL 的偶联剂 2-IT 溶液 2-4 μL，室温静置 20min，加入 0.1mol/L 的甘氨酸溶液 10 μL，室温静置 5min；用 G-25 凝胶柱除盐，收集活化后的抗体，2-8℃ 保存备用；

2)、取 1.5mg 的 ALP 溶液，加入 5mg/mL 的 SMCC 溶液 10-20 μL，室温静置 30min，用 G-25 凝胶柱除盐，收集活化后的 ALP，2-8℃ 保存备用；

3)、将上述活化的 MPO 抗体与活化的 ALP 混合，2-8℃ 条件下静置 12-24h，用 Superdex200 凝胶纯化柱纯化偶联物，获得 MPO 抗体-ALP 连接物浓溶液，2-8℃ 保存备用。

[0011] 4)、将 MPO 抗体-ALP 连接物浓溶液用酶标记物稀释液稀释到 0.02-0.1 μg/mL，完成酶标记试剂的制备。

[0012] 上述校准品的制备步骤如下：

一、配制校准品稀释液：

1)、量取 600mL 纯化水于容器中，称取 200mL 新生牛血清加入容器中，充分搅拌混合均匀；

2)、称取磷酸氢二钾 3.4g、磷酸二氢钾 0.36g、Proclin300 0.02 mL 加入容器中，充分

搅拌至完全溶解；

3)、用 4M 的 HCl 调 pH, 控制 pH 在 7.0-7.5 之间；

4)、最后用纯化水定容至 1L, 2-8℃ 保存待用。

[0013] 二、配制校准品：用校准品稀释液将 MP0 抗体分别配制为 0、5、20、50、150、300U/mL 共 6 个浓度点。

[0014] 所述清洗浓缩液的制备步骤如下：以配制 1L 为例：

1)、量取 800mL 纯化水于容器中，称取 Tris 12.1g 和 NaCl 8.5g 于容器中，充分搅拌至完全溶解；

2)、称取 Tween-20 5g、Triton X-100（聚乙二醇辛基苯基醚）5g，充分搅拌，直至完全混匀；

3)、用 4M 的 HCl 调 pH, 控制 pH 在 7.5-8.0 之间；

4)、最后定容 1000mL, 2-8℃ 保存。

[0015] 所述底物溶液的制备步骤如下：以配制 1L 为例：

1)、称取 NaCl 8.87g、Tris 3.72g、Na₂SO₃ 0.003g 和 Proclin-300 0.4ml 于 1L 烧杯中；

2)、用量筒量取 600ml 纯化水于 1L 烧杯中，充分搅拌，直至完全溶解，调 pH, 控制其范围在 7.5 - 8.0 之间；

3)、加入 250ml Lumi-Phos 530 后，用纯化水定容至 1000ml，混匀后即得。

所述稳定剂的制备步骤如下：以配制 1L 为例：

1)、称取乙二胺四乙酸二钠 2.3g 和氯化镁 1.4g 于 1L 烧杯中；

2)、用量筒量取 900ml 纯化水于 1L 烧杯中，充分搅拌，直至完全溶解，调 pH, 控制其范围在 7.2 - 7.8 之间；

3)、加入 50ml 甘油后，用纯化水定容至 1000ml，混匀后即得。

[0016] 本发明的主要创新之处主要在于：

1、本发明试剂盒提供了一种接近均相的反应体系，与该试剂盒现有间接法 ELISA 技术相比，本发明试剂盒具有更高的检测灵敏度和线性范围，并且样本不需要稀释，反应过程只需要一步清洗，在出结果时间上大大缩短，实验操作简便可靠，并达到了较佳的性能参数。并且竞争法相对间接法试剂工作浓度要低很多，大大降低了试剂成本。

[0017] 2、本发明公开了一种测定 MP0 抗体的新技术，使得反应过程更加快速可靠，实验数据灵敏有效，在提高产品性能的同时，并且大大降低了产品成本；

3、试剂盒中的磁分离试剂，酶标记物，校准品、清洗液浓缩液等组份均是该反应体系下的最优配方，给该试剂盒的使用效期及检测性能提供了有力保障。

[0018] 4、本发明试剂盒的精确度、灵敏度以及稳定性均优于市场同类产品，并且成本低廉，操作简单，应用前景广阔。

[0019]

具体实施方式

[0020] 以下将采用具体的实施例来对本发明作进一步的解释，但是不应当看作是对本发明创新精神的限制。

[0021] 实施例 1、磁分离试剂的制备：

一、磁微粒缓冲液配制过程,以配制 1L 为例:

1、量取 800mL 纯化水于容器中,称取 Tris12.1g 和 NaCl 8.5g 加入容器中,充分搅拌至完全溶解;

2、称取 BSA 5g,量取新生牛血清 50mL,Proclin300 0.2 mL 至容器中,充分搅拌至完全溶解;

3、用 4M 的 HCl 调 pH,控制 pH 在 7.9-8.1 之间;

4、最后用纯化水定容至 1L,2-8℃保存待用。

[0022] 二、磁分离试剂的制备过程

1、取含羧基(COOH)活性集团的磁微粒,每克(g)磁微粒(干重)羧基含量不低于 0.3 毫摩尔(mmol),具有超顺磁性,直径在 0.5-2 μm 之间;

2、MPO 抗原:可以为天然抗原或重组抗原,纯度应超过 95%;

3、2-吗啉乙磺酸(MES)、碳二亚胺(EDC)、Tris、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes)应达到化学纯;

4、取 100mg 磁微粒,用 0.025mol/L, pH4.5-5 的 MES 缓冲液 10mL 混悬;

5、加入 0.5-1mL 新鲜配制的浓度为 10mg/mL 的 EDC 水溶液,室温混悬 30-60min;

6、磁分离,吸去上清,用 0.025mol/L, pH4.5-5 MES 缓冲液 10mL 重悬;

7、加入 0.02-0.1mg 的 MPO 抗原,室温混悬 120-240min;

8、磁分离,吸去上清,用磁微粒缓冲液重悬到 1mg/mL,完成磁分离试剂的制备。

[0023] 实施例 2、酶标记试剂的制备:

一、酶标记试剂稀释液配制过程,以配制 1L 为例:

1、量取 800mL 纯化水于容器中,称取 Hepes 6.06g、NaCl 8.5g 加入容器中,充分搅拌至完全溶解;

2、称取 BSA 5g, ZnCl₂ 0.1g、Proclin-300 0.2mL 和 MgCl₂ 0.1g 于容器中,充分搅拌至完全溶解;

3、用 4M HCl 调 pH,控制 pH 在 7.5-8.0 之间;

4、最后用纯化水定容至 1L,2-8℃保存待用。

[0024] 二、碱性磷酸酶(ALP)与 MPO 抗体的偶联

1、MPO 抗体,购自北京久峰润达生物技术有限公司,纯度超过 95%;

2、碱性磷酸酶纯度应超过 95%,比活性应超过 1000U/mg,浓度超过 5mg/mL;

3、取 1mg MPO 抗体,加入 10mg/mL 的偶联剂 2-IT (2-亚胺四氢噻吩)溶液 2-4 μL,室温静置 20min,加入 0.1mol/L 的甘氨酸溶液 10 μL,室温静置 5min;用 G-25 凝胶柱除盐,收集活化后抗体,2-8℃保存备用;

4、取 1.5mg 的 ALP 溶液,加入 5mg/mL 的 SMCC 溶液 10-20 μL,室温静置 30min,用 G-25 凝胶柱除盐,收集活化后 ALP,2-8℃保存备用;

5、将上述活化的 MPO 抗体与活化的 ALP 混合,2-8℃条件下静置 12-24h,用 Superdex200 凝胶纯化柱纯化偶联物,获得连接物浓溶液,2-8℃保存备用。

[0025] 6、将 MPO 抗体-ALP 连接物浓溶液用酶标记物稀释液稀释到 0.02-0.1 μg/mL,完成酶标记试剂的制备。

[0026] 实施例 3、校准品的制备:

一、校准品稀释液的配制：

1、量取 600mL 纯化水于容器中，称取 200mL 新生牛血清加入容器中，充分搅拌混合均匀；

2、称取磷酸氢二钾 3.4g、磷酸二氢钾 0.36g、Proclin300 0.02 mL 加入容器中，充分搅拌至完全溶解；

3、用 4M 的 HCl 调 pH，控制 pH 在 7.0-7.5 之间；

4、最后用纯化水定容至 1L，2-8℃ 保存待用。

[0027] 二、校准品的配制：

1、用校准品稀释液将 MP0 抗体分别配制为 0、5、20、50、150、300U/mL 共 6 个浓度点。

[0028] 实施例 4：清洗浓缩液的制备：

清洗浓缩液配制过程，以配制 1L 为例：

1、量取 800mL 纯化水于容器中，称取 Tris 12.1g 和 NaCl 8.5g 于容器中，充分搅拌至完全溶解；

2、称取 Tween-20 5g、Triton X-100（聚乙二醇辛基苯基醚）5g，充分搅拌，直至完全混匀；

3、用 4M 的 HCl 调 pH，控制 pH 在 7.5-8.0 之间；

4、最后定容 1000mL，2-8℃ 保存。

[0029] 实施例 5：底物溶液的制备：

底物溶液配制步骤，配制 1L：

1、称取 NaCl 8.87g、Tris 3.72g、Na₂SO₃ 0.003g 和 Proclin-300 0.4ml 于 1L 烧杯中；

2、用量筒量取 600ml 纯化水于 1L 烧杯中，充分搅拌，直至完全溶解，调 PH，控制其范围在 7.5 - 8.0 之间；

3、加入 250ml Lumi-Phos 530 后，用纯化水定容至 1000ml，混匀后即得。

实施例 6 稳定剂的制备：

1、称取乙二胺四乙酸二钠 2.3g 和氯化镁 1.4g 于 1L 烧杯中；

2、用量筒量取 900ml 纯化水于 1L 烧杯中，充分搅拌，直至完全溶解，调 pH，控制其范围在 7.2 - 7.8 之间；

3、加入 50ml 甘油后，用纯化水定容至 1000ml，混匀后即得。

实施例 7

本发明试剂盒的测试方法如下：

1、检测管内依次加入 20 μL 样本(或标准品)、50 μL 磁分离试剂、50 μL 酶标记试剂以及稳定剂 2 μL，混合均匀，37±0.5℃ 条件下反应 10 min；

2、检测管放至磁分离器上，静置 2 分钟；倒出上清液；

3、清洗浓缩液用纯化水稀释 15 倍后(即为清洗液)使用，加 300 μL 清洗液至检测管中，置混匀器上振荡混匀 30s。

[0030] 4、再重复步骤 2、3、2 两遍。

[0031] 5、加 150 μL 底物溶液至检测管中混匀后进行检测。

[0032] 实施例 8

本发明实施例 1-6 制备的试剂盒的分析性能评价：

(1) 灵敏度评价

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 0.5U/mL。其中,A 点发光值参见表 1:

表 1

MPO-Ab-STD-A(RLU)				
1252956	1238666	1272963	1255984	1251357
1238619	1266352	1273669	1255733	1225305
1259437	1241257	1246222	1263350	1267947
1260563	1233627	1269378	1273537	1247184

A 点发光均值 $X=782711$

SD=14247

$X-2SD=1226212$

B 点发光值参见表 2。

[0033] B 点发光均值 $X=784636$

表 2

MPO-Ab -STD-B(RLU)
782711
786561

计算得到灵敏度 =0.303U/mL。

[0034] (2) 精密度评价

①分析内精密度

将实施例中的试剂盒分别测定低、中、高三种不同浓度的血清,10 孔平行测定,结果参见表 3,得出批内变异系数为 3.02% ~ 5.09%。

[0035] 表 3 分析内精密度测试

测定血清浓度(U/mL)	测定次数	分析内 CV(%)
3.67	10	5.09
54.44	10	3.33
188.42	10	3.02

②分析间精密度

将实施例的试剂盒取三批,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,参见表 4,统计分析间变异系数,为 3.98% ~ 6.90%。

[0036] 表 4 分析间精密度测试

测定血清浓度 (U/mL)	测定次数	分析间 CV(%)
3.67	30	6.90
54.44	30	5.12
188.42	30	3.98

(3) 准确度评价

在 2 例混合血清样本中添加不同量人 MPO-Ab 标准品,形成 3 个浓度水平的血清添加样本,添加物体积小于总体积的 10%。检测样本浓度,按下述公式计算回收率。本方法血清基质回收率在 90-110% 之间。数据参见表 5。

$$R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{V \times C_s} \times 100\%$$

[0037] R:回收率;

V:加入标准溶液的体积;

V₀:人源样品的体积;

C:人源样品加入标准溶液后的检测浓度;

C₀:人源样品的检测浓度;

C_s:标准溶液的浓度。

[0038] 表 5 准确度评价—添加回收实验数据

样品浓度 (U/mL)	添加浓度(U/mL)	添加后终浓度 (U/mL)	测定平均值 (U/mL)	回收率(%)
2.87	20	22.87	24.56	107.4%
	80	82.87	76.32	92.1%
	200	202.87	216.88	106.9%
6.65	20	26.65	27.97	105.0%
	80	86.65	81.19	93.7%
	200	206.65	198.57	96.1%

(4) 试剂盒特异性评价

取 1 份 MPO-Ab 含量为 0 的样本,加入人血清白蛋白,使样本中人血清白蛋白浓度为 5000ng/mL,使用该试剂盒对该样本进行检测,测定样本中的 MPO-Ab 含量。结果见表 6,本法与人血清白蛋白无交叉反应。

[0039] 表 6 特异性实验

交叉反应物	实验浓度 (ng/mL)	MPO-Ab 测定浓度(U/mL)
人血清白蛋白	5000	< 0.5

(5) 热稳定性评价

对试剂盒分别进行 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 24 个月;而不添加稳定剂的同类试剂盒的有效期仅为 12 个月左右。

专利名称(译)	髓过氧化物酶抗体(MPO-Ab)定量测定试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN104459107A	公开(公告)日	2015-03-25
申请号	CN201410136534.7	申请日	2014-04-05
[标]申请(专利权)人(译)	北京中航赛维生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京中航赛维生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京中航赛维生物科技有限公司		
[标]发明人	于大为 杨晓勇		
发明人	于大为 杨晓勇		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/535 G01N33/543 G01N2800/328		
代理人(译)	刘寿椿		
其他公开文献	CN104459107B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于临床免疫学检测技术领域，公开了一种髓过氧化物酶抗体(MPO-Ab)定量测定试剂盒，包括磁分离试剂、酶标记试剂、校准品、清洗浓缩液、底物溶液以及稳定剂。本发明还公开了上述试剂盒的制备方法。本发明还公开了上述试剂盒的检测方法。本发明制备的试剂盒精确度、灵敏度以及稳定性较好，并且成本低廉，操作简单，具备广阔的应用前景。

$$A = \frac{Ox(N+V) - OxN_0}{N \times C_0} \times 100\%$$