



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109613260 A

(43)申请公布日 2019.04.12

(21)申请号 201811575007.0

(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 510000 广东省广州市萝岗区科学城
尖塔山路1号J5栋五楼

(72)发明人 齐宗献 李民友 林浩荣 高国全
杨霞 段朝晖

(74)专利代理机构 广州容大专利代理事务所
(普通合伙) 44326

代理人 刘新年

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

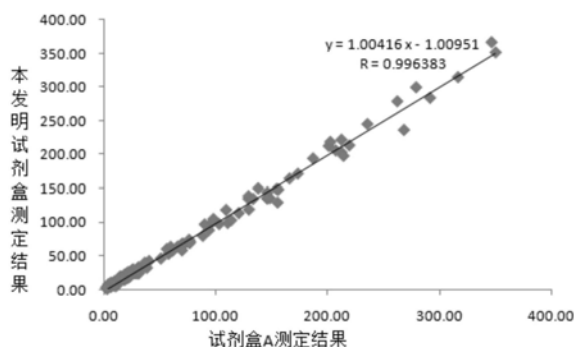
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

一种完全均相测定尿微量白蛋白的检测试剂盒及其检测方法

(57)摘要

本发明属于生物医学检验领域,具体涉及一种均相检测技术测定尿微量白蛋白的检测试剂盒及其方法。本发明中涉及的试剂盒,带有的两种不同标签的单克隆抗体(试剂R1和R2)和白蛋白不同抗原表位结合,形成抗体-抗原-抗体的免疫复合物结构;加入抗氧化剂(试剂R3)轻轻混匀之后,加入检测底物(试剂R4)。辣根过氧化物酶催化过氧化物,产生羟离子,羟离子在体系中存在的时间很短,且由于体系中抗氧化剂的存在,能保证羟离子在分子内部传播。吡啶类衍生物在强氧化剂的作用下产生光信号。发光强度和白蛋白的含量成正比。该检测技术,和其它基于双抗夹心的检测技术相比,该技术具有不需要固定抗体,不需要洗涤,反应更充分、迅速的优点。



1. 一种完全均相测定尿微量白蛋白的检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括试剂R1、试剂R2、试剂R3、试剂R4、尿微量白蛋白校准品和质控品;所述试剂R1包括辣根过氧化物酶标记的抗人血清白蛋白单克隆抗体 $0.5\sim 3\mu\text{g/mL}$;所述试剂R2包括吡啶类衍生物标记的抗人血清白蛋白单克隆抗体 $1\sim 5\mu\text{g/mL}$;所述试剂R4包括过氧化脲 $5\sim 20\%$ 。

2. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述试剂R1中还包括缓冲液;所述缓冲液为 $5\sim 20\text{mM}$ 的MES溶液, pH为 $6.0\sim 7.0$,其中含有 $0.5\sim 1\text{wt}\%$ 的牛血清白蛋白、 $5\sim 10\text{mM}$ 的 CaCl_2 、 $50\sim 100\text{mM}$ 的 MgSO_4 、 $0.01\sim 0.05\text{wt}\%$ 的酶稳定剂、 $0.5\sim 1\%$ 的 NaCl 、 $0.05\sim 0.2\%$ 的 KCl 、 $0.5\sim 1\text{wt}\%$ 的甘露醇、 $0.5\sim 2\text{wt}\%$ 的PEG20000、 $0.01\sim 0.1\text{wt}\%$ Krovin 300M。

3. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述试剂R2中还包括缓冲液;所述缓冲液为 $5\sim 50\text{mM}$ 的PBS溶液, pH为 $7.0\sim 8.0$,其中含有 $0.5\sim 1\text{wt}\%$ 牛血清白蛋白、 $0.5\sim 1\text{wt}\%$ 的PEG20000和 $0.01\sim 0.1\text{wt}\%$ Krovin 300M。

4. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述试剂R3中包括 $5\sim 50\text{mM}$ 的MES缓冲液, pH值为 $5.5\sim 6.5$;所述缓冲液中含有 $0.001\sim 0.02\%$ 的维生素C、 $0.0001\sim 0.0075\%$ 的谷胱甘肽和 $0.05\sim 0.01\%$ 的硫代硫酸钠。

5. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述试剂R4中还包括缓冲液;所述缓冲液为 $5\sim 30\text{mM}$ 的Tris-HCl溶液, pH在 $7.5\sim 8.5$ 。

6. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述校准品和质控品由人源性血清白蛋白和基质组成;所述校准品与质控品基质由尿液与缓冲液以 $1:19$ 混合而成;所述缓冲液为 $10\sim 50\text{mM}$ 的PBS溶液,其中含有浓度为 $0.5\sim 1\%$ 的BSA、 $0.05\sim 0.1\%$ 的Krovin 300M、人尿基质 5% 。

7. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述R1试剂中的辣根过氧化物酶标记的抗人血清白蛋白抗体是通过偶联试剂将辣根过氧化物酶与抗人血清白蛋白单克隆抗体偶联获得;所述R2试剂中的吡啶类衍生物标记的抗人血清白蛋白单克隆抗体是通过偶联试剂将经过活化的吡啶类衍生物与抗人血清白蛋白单克隆抗体偶联获得。

8. 根据权利要求7所述的检测试剂盒,其特征在于,所述经过活化的吡啶类衍生物包括N-琥珀酰亚胺-9,10-二氢吡啶酯、N-琥珀酰亚胺-9,10-二氢吡啶硫酯、N-琥珀酰亚胺-9,10-二氢吡啶磺胺中的一种。

9. 权利要求1-8任意一项所述的检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括步骤:

S1: 试剂R1的制备:分别制得辣根过氧化物酶标记的抗人血清白蛋白抗体和缓冲液,将两者混合;

S2: 试剂R2的制备:分别制得吡啶类衍生物标记的抗人血清白蛋白单克隆抗体和缓冲液,将两者混合;

S3: 试剂R3的制备:将维生素C、谷胱甘肽、硫代硫酸钠、MES溶解于超纯水中,调节pH至 $5.5\sim 6.5$,定容至 1000mL , $2\sim 8^\circ\text{C}$ 保存备用;

S4: 试剂R4的制备:将过氧化脲、Tris-HCl溶解于超纯水中,调节pH至 $7.5\sim 8.5$,定容至 1000mL , $2\sim 8^\circ\text{C}$ 保存备用;

S5: 校准品的制备。

10. 一种完全均相测定尿微量白蛋白的检测方法,其特征在于,包括步骤:

(1)、分别获得样本和校准品的峰面积;

(2)、以校准品的尿微量白蛋白浓度作为X坐标,以峰面积作为Y坐标,作出剂量-反应曲线,根据该曲线计算出样品中尿微量白蛋白的浓度。

一种完全均相测定尿微量白蛋白的检测试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学检验领域,具体涉及一种采用均相检测技术测定尿微量白蛋白的试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 白蛋白分子量为69KD,是血浆中一种带有负电荷的大分子蛋白,其占血浆总蛋白含量的60%左右。在正常情况下,由于肾小球毛细血管基底膜具有过滤功能,加之肾小球的重吸收作用,只有极少量的白蛋白可以通过尿液排出到体外。但是,如果有某些病变造成肾小球基底膜的电荷选择性屏障损伤或滤过孔增大,则可能造成白蛋白排泄量增加。糖尿病肾病是糖尿病严重的微血管并发症之一,根据美国糖尿病协会(ADA)统计表明,糖尿病肾病在糖尿病人(包括1型和2型)中发生的概率为20%~30%。如果不采取任何干预措施,20%~40%伴有微量白蛋白尿的2型糖尿病患者将会进展为显性肾病,约20%已经确诊为糖尿病肾病的患者在20年内将会进展为终末期肾病。

[0003] 为了使尿中白蛋白这一指标标准化,国际上采用蛋白分泌率来表示尿中白蛋白的排出量。健康人尿中白蛋白的含量 $<20\text{mg}/24\text{h}$,当人体尿液中白蛋白的含量在 $20\sim 30\text{mg}/24\text{h}$ 时,称为微量白蛋白尿;当人体尿液中白蛋白含量超过 $300\text{mg}/24\text{h}$ 时,称为大量白蛋白尿。尿微量白蛋白是肾病的一个早期信号,远高于尿常规的改变和血清尿素氮、肌酐的升高。如果不注意尿微量白蛋白的检测,在尿微量白蛋白尿持续一定时期并不断提升,其尿常规测定会出现蛋白阳性,此时患者肾脏的病理损害是不可逆的。只有在检出尿微量白蛋白阶段进行治疗,采取积极的方式进行干预,才能避免肾病的发生,所以对于糖尿病患者,尿微量白蛋白的检测具有非常重要的意义。

[0004] 目前国内常用检测尿微量白蛋白的方法有:免疫比浊法、胶体金法、酶联免疫吸附法、板式化学发光法和磁微粒化学发光法。现采用较多的方法是免疫比浊法。免疫比浊和胶体金法存在明显的缺点,由于方法的局限性,其在低浓度范围内检测不准确,尿中白蛋白的含量必须达到一定浓度($\geq 30\text{mg}/\text{L}$)才能保证其准确性。酶联免疫吸附法,板式化学发光法和磁微粒化学发光法等方法也存在明显的缺陷,其均需要固定化抗体,在整个检测过程中需要洗涤,会产生大量医用废液,且由于是非均相反应,检测过程繁琐,检测时间长。

发明内容

[0005] 鉴于此,有必要针对现有的尿微量白蛋白检测方法中检测时间长、操作复杂、重复性和重现性差、医用废液产生量大、不适于急诊和临床病人及时诊断的需要等缺陷,提供一种检测尿微量白蛋白含量的试剂盒及检测方法。

[0006] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0007] 一种完全均相测定尿微量白蛋白的检测试剂盒,包括试剂R1、试剂R2、试剂R3、试剂R4、尿微量白蛋白校准品和质控品。

[0008] 进一步的,所述试剂R1包括以下组分:

[0009] 辣根过氧化物酶标记的抗人血清白蛋白1号抗体,浓度为0.5~3 μ g/mL;缓冲液为5~20mM的MES溶液,pH为6.0~7.0,含有0.5~1wt%的牛血清白蛋白、5~10mM的CaCl₂、50~100mM的MgSO₄、0.01~0.05wt%的酶稳定剂、0.5~1%的NaCl、0.05~0.2%的KCl、0.5~1wt%的甘露醇、0.5~2wt%的PEG20000、0.01~0.1wt%的Krovin300M。

[0010] 进一步的,所述试剂R2中包括以下终浓度组分:

[0011] 吡啶类衍生物标记的抗人血清白蛋白2号抗体,浓度为1~5 μ g/mL;所述缓冲液为5~50mM的PBS溶液,pH为7.0~8.0,含有0.5~1wt%牛血清白蛋白、0.5%~1wt%的PEG20000和0.01~0.1wt%的Krovin 300M。

[0012] 进一步的,所述试剂R3中包括以下终浓度组分:

[0013] 试剂的缓冲液为5~50mM的MES,pH值为5.5~6.5,含有0.001~0.02%的维生素C、0.0001~0.0075%的谷胱甘肽和0.05~0.01%的硫代硫酸钠。

[0014] 进一步的,所述试剂R4中包括过氧化脲5~20%,试剂的缓冲液为5~30mM的Tris-HCl溶液,pH在7.5~8.5。

[0015] 其中,所述尿微量白蛋白校准品和质控品由人源性血清白蛋白和基质组成;所述校准品与质控品基质由尿液与缓冲液以1:19混合而成;所述缓冲液为10~50mM的PBS溶液,其中含有浓度为0.5~1%的BSA、0.05~0.1%的Krovin 300M、人尿基质5%;检测时,工作校准品为包括人源性尿微量白蛋白浓度分别为0、0.2、1、5、10、20 μ g/mL的一组尿微量白蛋白校准品。

[0016] 进一步的,所述R1试剂中,辣根过氧化物酶标记的抗人血清白蛋白1号抗体是通过偶联试剂将辣根过氧化物酶与抗人血清白蛋白1号抗体偶联获得;所述R2试剂中,吡啶类衍生物标记的抗人血清白蛋白2号抗体是通过经过活化的吡啶类衍生物与抗人血清白蛋白2号抗体偶联获得。

[0017] 进一步的,所述偶联试剂分别选自琥珀酰亚胺-4-(N-马来酰亚胺)环己烷-1-羧酸酯、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代乙酸酯、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺、戊二醛中一种或多种。

[0018] 进一步的,所述经过活化的吡啶类衍生物包括N-琥珀酰亚胺-9,10-二氢吡啶酯、N-琥珀酰亚胺-9,10-二氢吡啶硫酯、N-琥珀酰亚胺-9,10-二氢吡啶磺胺中的一种。

[0019] 本发明的试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0020] S1:试剂R1的制备

[0021] S11:带有辣根过氧化物酶标签的抗人血清白蛋白1号抗体的制备:

[0022] 使用琥珀酰亚胺-4-(N-马来酰亚胺)环己烷-1-羧酸酯活化辣根过氧化物酶,生成马来酰亚胺-辣根过氧化物酶衍生物;使用N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代乙酸酯活化抗体,生成N-琥珀酰亚胺-抗人血清白蛋白1号抗体衍生物;将两者进行混合,N-琥珀酰亚胺-抗人血清白蛋白1号抗体衍生物中的-SH与马来酰亚胺-辣根过氧化物酶衍生物结合,将单克隆抗体A与辣根过氧化物酶连接起来得到辣根过氧化物酶标记的抗人血清白蛋白1号抗体。

[0023] S12:试剂R1缓冲液制备

[0024] 将10g氯化钠、1g氯化钾、10g硫酸镁、0.2g酶稳定剂、5g PEG20000,1g Krovin 300M、1g氯化钙、2g MES、5g甘露醇溶解于900mL超纯水中,用NaOH调整pH至6.0~7.0,用超

纯水定容至1000mL。

[0025] S13:将步骤(1)制得的辣根过氧化物酶标记的抗人血清白蛋白1号抗体与步骤(2)制得的缓冲液混合,得到试剂R1。

[0026] S2:试剂R2的制备

[0027] S21:带有吡啶类衍生物标签的抗人血清白蛋白2号抗体的制备:

[0028] 将经过活化的吡啶类衍生物(如:N-琥珀酰亚胺-9,10-二氢吡啶酯)与抗人血清白蛋白2号抗体混合,经过活化的吡啶类衍生物中的活化基团-NHS可以和单克隆抗体中的伯胺(-NH₂)相连,形成吡啶类衍生物标记的抗人血清白蛋白2号抗体。

[0029] S22:试剂R2缓冲液制备

[0030] 将8g氯化钠、0.2g氯化钾、1.44g磷酸氢二钠、0.24g磷酸二氢钾、5g牛血清白蛋白、5g PEG20000和1g Krovin 300M溶解于900mL超纯水中,调节pH至7.0~8.0,定容至1000mL。

[0031] S23:将步骤(1)制得的吡啶类衍生物标记的抗人血清白蛋白2号抗体与步骤(2)制得的缓冲液混合,得到试剂R2。

[0032] S3:试剂R3的制备

[0033] 将0.2g维生素C、0.05g谷胱甘肽、0.2g硫代硫酸钠、1g MES溶解于900mL超纯水中,调节pH至5.5~6.5,定容至1000mL,2~8℃保存备用。

[0034] S4:试剂R4的制备

[0035] 将50~200g过氧化脲、1~3g Tris溶解于800mL超纯水中,调节pH至7.5~8.5,定容至1000mL,2~8℃保存备用。

[0036] S5:校准品的制备

[0037] S51:校准品稀释液制备

[0038] 将8g氯化钠、0.2g氯化钾、4.32g磷酸氢二钠、0.72g磷酸二氢钾、5g牛血清白蛋白和1g Krovin 300M溶解于900mL超纯水中,调节pH至7.0~8.0,定容至1000mL。

[0039] S52:工作校准品的制备

[0040] 按照正确方式收集尿样,2~8℃放置2~3h后,尿样离心过滤后,往其中添加人源性血清白蛋白,用其它对比试剂盒对其进行检测,对其初步定值;根据其定值结果,用尿微量白蛋白含量低于1μg/mL的尿样本进行稀释。分别制备4μg/mL、20μg/mL、100μg/mL、200μg/mL和400μg/mL的中间校准品,用校准品稀释液稀释20倍,得到0μg/L、0.2μg/mL、1μg/mL、5μg/mL、10μg/mL、20μg/mL工作校准品。

[0041] 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尿微量白蛋白检测试剂盒。

[0042] 一种完全均相测定尿微量白蛋白的检测方法,步骤包括:

[0043] (1)、分别获得样本和校准品的峰面积;

[0044] (2)、以校准品的尿微量白蛋白浓度作为X坐标,以峰面积作为Y坐标,作出剂量-反应曲线,根据该曲线计算出样品中尿微量白蛋白的浓度。

[0045] 进一步的,所述步骤(1)操作为:

[0046] a、在反应杯中加入试剂R1,然后加入校准品/待检样本,然后加入试剂R2,在37℃条件下孵育15min;

[0047] b、孵育15min后加入试剂R3,混匀后加入R4;立即连续检测一段时间(通常是1~

3S),每次间隔0.05S,计算其峰面积。

[0048] 进一步的,所述步骤(1)中样本/校准品、试剂R1、试剂R2、试剂R3、试剂R4的比例为1:8:8:1:15

[0049] 本发明有益效果:

[0050] 本发明旨在提供一种完全均相测定尿微量白蛋白的检测试剂盒及其方法,该试剂盒利用吡啶类衍生物标记抗人血清白蛋白1号抗体、抗原、辣根过氧化物酶标记抗人血清白蛋白2号抗体形成抗体-抗原-抗体复合物,无需洗涤过程,加入试剂R3静置0.5min后,加入R4立即连续检测一段时间(通常是1~3S),每次间隔0.05S,计算其峰面积,尿微量白蛋白的含量与其峰面积成正相关。其检测原理为辣根过氧化物酶氧化试剂R2中的过氧化氢可产生自由基,自由基随即氧化抗人尿微量白蛋白抗体上的吡啶类衍生物,由于自由基的半衰期非常短,只能在分子内中扩散,故只有形成抗体-抗原-抗体复合物才能反应反光。

[0051] 本发明的创新之处在于:

[0052] 1、该试剂盒采用均相检测技术与化学发光技术相结合,采用一步反应模式,使检测性能(如:精密度、灵敏度、准确度等)大大提高。

[0053] 2、该试剂盒不同于传统基于双抗夹心技术的检测,传统基于双抗夹心技术的尿微量白蛋白检测方法(如ELISA、板式化学发光、磁微粒化学发光等),这个检测过程中需要洗涤,但该试剂盒整个反应过程不需要需要进行洗涤,可以使整个检测过程产生的医疗废水大大减少;

[0054] 3、该试剂盒由于其检测原理的独特性,可以使整个反应过程时间大大缩短,与同类型的试剂盒对比,其反应时间可以缩短到15min左右,而其它试剂盒反应时间在20min以上,可以大大提高单位时间内,尿微量白蛋白的检测通量。

附图说明

[0055] 图1是对本发明试剂盒中的标准曲线图。

[0056] 图2是本发明试剂盒与市售试剂盒A临床测定结果的对照图。

具体实施方式

[0057] 为了更好的说明本发明技术方案所要解决的问题、采用的技术方案和达到的有益效果,现结合具体实施方式进一步阐述。值得说明的是,本发明技术方案包含但不限于以下实施方式。

[0058] 本发明实施例中未注明具体技术或条件的,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购等途径获得的常规产品。

[0059] 实施例

[0060] 1、样本收集

[0061] 采用临床正确收集尿样的方法收集尿样,收集的尿样室温放置2h后,离心取上清进行检测。离心后的尿样本需在4h内进行检测,如果样本不能在4h内检测完成,需将样本置于2~8℃保存;如需长时间保存,需要将其冻存至-20℃,避免反复冻融。使用前回复到室温,轻轻摇动混匀。

[0062] 2、实验方法

[0063] 将配制好的试剂安放于检测仪器中,校准品、质控品和尿样本放置于仪器样本架上,准备检测。

[0064] 3、仪器参数设置

[0065]	样本量	5 μ L	稀释倍数	20 倍稀释 (稀释液稀释样本)
	R1	40 μ L	检测取样量	5 μ L
	R2	40 μ L	反应时间	15min
	反应温度	37 $^{\circ}$ C	R3	5 μ L
	加样速度	220 μ L/S	R4	75 μ L
	检测时长	2S	反应值 (AUC)	动力学曲线 2S 积分值
	曲线拟合方式	一次线性拟合,以校准品浓度为 Y 轴,以 AUC 为 X 轴,拟合曲线。		

[0066] 本试剂按照体外诊断试剂分析性能评估指导原则,对其进行性能分析,可达到如下指标:

[0067] 标准曲线线性: $R \geq 0.9900$ (如图1所示);

[0068] 最底检测限: $\leq 0.1 \mu\text{g/mL}$ 。

[0069] 对本试剂盒 $0 \mu\text{g/mL}$ 的样本重复测量20次,检测数据见表1,可知本试剂盒的最底检测限 $\leq 0.1 \mu\text{g/mL}$ 。

[0070] 表1.最底检测限检测结果

[0071]

最底检测限	检测次数	AUC	拟合浓度 ($\mu\text{g/L}$)	检测次数	AUC	拟合浓度 ($\mu\text{g/L}$)
	1	97.19	75.30	11	85.95	66.20
	2	97.81	75.80	12	90.89	70.20
	3	82.25	63.20	13	91.02	70.30
	4	75.71	57.90	14	91.63	70.80
	5	82.25	63.20	15	91.76	70.90
	6	76.82	58.80	16	78.18	59.90
	7	86.08	66.30	17	80.15	61.50
	8	106.57	82.90	18	82.87	63.70
	9	92.50	71.50	19	85.34	65.70
	10	78.67	60.30	20	89.90	69.40
	拟合浓度 AV($\mu\text{g/mL}$)		0.067			
	SD		0.0063007			
	最低检测限 ($\mu\text{g/mL}$)		0.086			

[0072] 为评估检测试剂的准确度,随机取2个临床样本,配合进行添加回收实验。由于尿微量白蛋白无国家标准品和国际标准品,取标准物质GBW (E) 090619稀释为 50mg/L ,添加体积为原体积的5%,进行添加回收实验。结果如表2所示,由结果可知,添加回收率为90%~110%。

[0073] 表2.添加回收实验结果 (准确度验证)

[0074]

样本	添加浓度	拟合基础样本浓度	测定1拟合浓度	测定2拟合浓度	测定3拟合浓度	回收率1	回收率2	回收率3	AV
1	50.0	106.1	154.3	151.9	152.7	97%	92%	93%	94%
2	50.0	46.2	97.1	93.2	95.7	102%	94%	99%	98%

[0075] 用商品化质控, DAKO公司尿生产的微量白蛋白高低质控, 评价该试剂盒的批内精密度, 测定数据如表3所示, 由测定结果可知, 该发明的试剂和批内精密度 $\leq 5\%$ 。

[0076] 表3. 批内精密度评价

[0077]

高值质控			低值质控		
测试	AUC	拟合浓度	测试	AUC	拟合浓度

[0078]

		($\mu\text{g/mL}$)			($\mu\text{g/mL}$)
测试1	1476.52	23.85	测试1	5442.47	88.10
测试2	1468.11	23.71	测试2	5187.15	83.96
测试3	1398.77	22.59	测试3	5117.81	82.84
测试4	1387.55	22.41	测试4	5353.50	86.66
测试5	1501.23	24.25	测试5	4849.90	78.50
测试6	1490.49	24.08	测试6	4715.70	76.33
测试7	1496.87	24.18	测试7	5092.45	82.43
测试8	1356.77	21.91	测试8	4828.89	78.16
测试9	1411.74	22.80	测试9	5254.23	85.05
测试10	1433.51	23.15	测试10	5399.46	87.40
SD		0.83	SD		3.90
AV		21.25	AV		82.94
CV		3.92%	CV		47%

[0079] 用商品化质控, DAKO公司尿生产的微量白蛋白高低质控, 评价该试剂盒3个批次的批间精密度, 测定数据如表4所示, 由测定结果可知, 该发明的试剂和批间精密度 $\leq 7\%$ 。

[0080] 表4. 批间精密度评价

[0081]

高值质控				低值质控			
测试	批次 1 拟 合浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	批次 2 拟 合浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	批次 3 拟 合浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	测试	批次 1 拟 合浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	批次 2 拟 合浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	批次 3 拟 合浓度 ($\mu\text{g/mL}$)
测试 1	88.10	78.16	87.13	测试 1	23.85	24.39	22.98
测试 2	83.96	85.21	82.99	测试 2	23.71	22.41	24.25
测试 3	82.84	84.08	86.43	测试 3	22.59	23.13	20.59
测试 4	86.66	87.90	85.69	测试 4	24.26	22.95	21.54
测试 5	77.53	79.74	78.50	测试 5	22.84	24.79	23.38
测试 6	75.35	77.57	76.33	测试 6	24.87	21.04	24.00
测试 7	82.43	83.67	89.46	测试 7	24.18	24.72	23.31
测试 8	89.34	79.40	77.19	测试 8	21.91	22.45	25.42
测试 9	85.05	86.29	84.08	测试 9	22.80	23.34	20.82
测试 10	87.40	88.65	81.87	测试 10	23.15	23.70	22.28
SD	4.24			SD	1.22		
AV	83.55			AV	23.19		
CV	5.08%			CV	5.26%		

[0082] 随机取临床尿样本,测量其白蛋白含量为 $15.7\mu\text{g/mL}$,往其中添加人血清白蛋白纯物质,制备高值尿样本,理论浓度分别为 $1000\mu\text{g/mL}$ (样本1)、 $2000\mu\text{g/mL}$ (样本2)、 $4000\mu\text{g/mL}$ (样本3),进行稀释评价,结果如表5。结果表明该试剂盒最大稀释倍数超过60倍。

[0083] 表5.最大稀释倍数评价

[0084]

	样本 1			样本 2			样本 3		
测试 1 ($\mu\text{g/mL}$)	197.23	99.01	49.32	197.46	100.29	50.55	260.17	130.13	64.32
测试 2 ($\mu\text{g/mL}$)	203.17	101.32	48.65	204.4	99.48	49.88	263.24	129.17	63.97
测试 3 ($\mu\text{g/mL}$)	195.34	98.46	49.46	200.57	97.74	48.69	267.32	131.76	68.48
AV	198.58	99.60	49.14	200.81	99.17	49.71	263.58	130.35	65.59
稀释 倍数	5	10	20	10	20	40	15	30	60
还原浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	992.9	996.0	982.8	2008.1	1983.4	1988.4	3953.7	3910.5	3935.4
理论浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	1000			2000			4000		
相对偏差	0.71%	0.40%	1.72%	0.40%	0.83%	0.58%	1.16%	2.24%	1.62%

[0085] 将120份临床尿样本与市售尿微量白蛋白检测试剂盒A对比,比较本发明试剂和与

市售尿微量白蛋白试剂和检测结果的相关性。结果如表6所示,附图2中显示本发明的试剂盒与市售尿微量白蛋白检测试剂盒A对照的线性方程为: $Y=1.00416X-1.00951$, $R=0.996383$ 。

[0086] 表6. 本试剂盒与市售尿微量白蛋白检测试剂盒A对照

[0087]

序号	试剂盒 A	本试剂 盒	序号	试剂盒 A	本试剂 盒	序号	试剂盒 A	本试剂 盒
1	2.34	0.78	41	3.42	7.85	81	50.23	46.00
2	16.72	17.16	42	10.24	8.68	82	89.56	80.47
3	102.33	97.17	43	213.45	197.39	83	1.48	2.73
4	19.85	18.29	44	16.89	14.66	84	69.23	58.00
5	5.63	4.07	45	14.23	19.66	85	155.23	148.00
6	94.23	96.67	46	18.42	15.85	86	35.96	39.73
7	211.37	202.99	47	218.63	213.06	87	87.75	79.52

[0088]

8	172.65	171.09	48	30.46	32.89	88	14.56	18.97
9	93.25	87.99	49	20.89	25.32	89	147.63	135.40
10	75.43	73.87	50	165.23	164.00	90	11.36	10.13
11	27.89	24.51	51	39.79	42.22	91	75.95	68.72
12	345.67	365.89	52	137.25	149.68	92	234.78	244.55
13	8.74	8.67	53	17.33	17.76	93	68.87	63.30
14	69.87	68.31	54	20.56	19.99	94	4.54	4.31
15	278.23	299.02	55	17.89	22.32	95	24.26	24.03
16	8.06	6.50	56	186.23	193.66	96	109.94	98.71
17	29.87	31.89	57	12.89	17.32	97	9.23	6.44
18	11.35	12.76	58	17.35	16.78	98	29.78	29.21
19	315.69	314.13	59	30.56	28.86	99	55.64	60.07
20	20.79	17.18	60	15.37	15.80	100	128.59	138.36
21	5.63	4.07	61	24.36	24.79	101	8.12	9.89
22	57.23	53.08	62	24.23	28.66	102	60.87	57.64
23	76.49	70.79	63	290.73	283.38	103	10.18	9.95
24	145.46	143.67	64	25.61	30.04	104	211.54	221.31
25	28.72	24.03	65	37.81	32.24	105	10.54	5.31
26	17.74	16.18	66	20.36	24.79	106	145.26	135.03
27	89.44	96.68	67	154.56	128.99	107	5.67	10.23
28	8.83	12.30	68	21.47	25.43	108	13.28	16.32
29	261.47	278.28	69	153.69	148.46	109	44.23	40.23
30	30.49	23.78	70	26.89	24.32	110	16.50	15.89
31	18.96	17.40	71	58.99	63.42	111	7.88	5.78
32	267.34	235.79	72	108.56	117.99	112	132.65	134.27
33	65.24	63.68	73	22.73	19.16	113	17.79	14.32
34	68.87	66.93	74	119.92	113.35	114	117.56	95.33
35	97.24	104.67	75	201.65	218.08	115	37.56	38.99
36	11.23	9.67	76	30.58	25.01	116	77.47	80.35
37	19.15	16.61	77	349.26	350.87	117	128.94	118.71
38	17.23	16.71	78	113.12	102.89	118	2.58	4.56
39	200.16	212.00	79	27.35	25.78	119	16.54	15.47
40	31.97	29.69	80	10.23	11.25	120	9.52	5.29

[0089] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

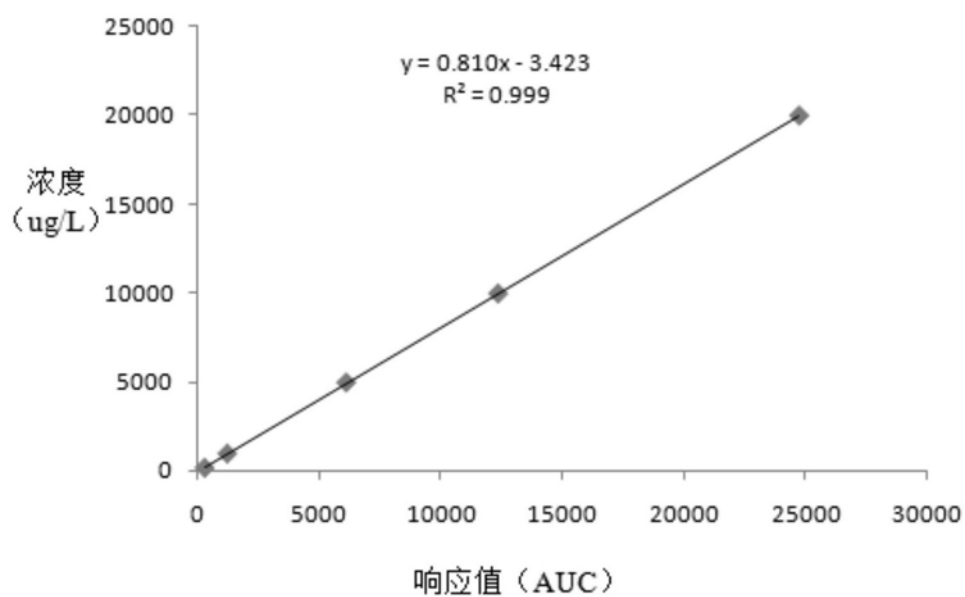


图1

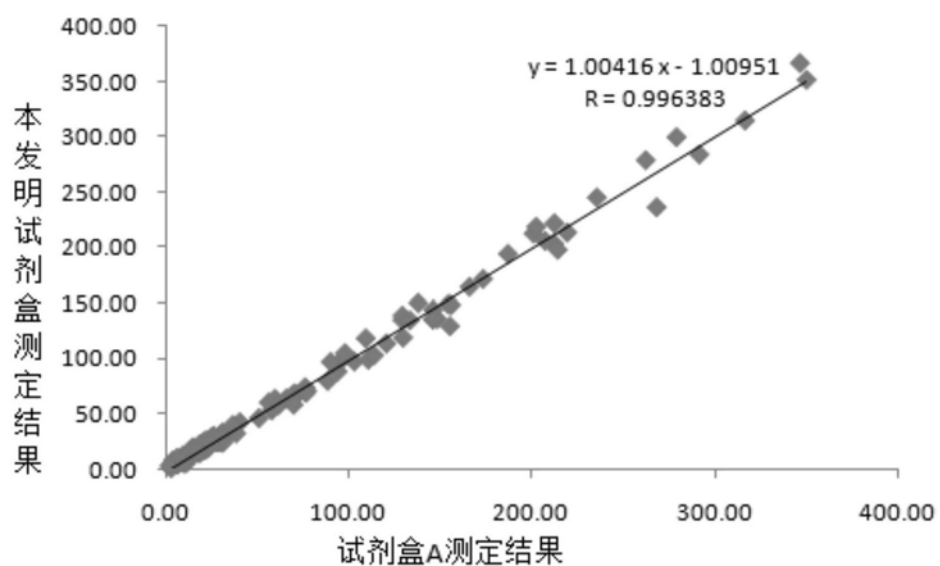


图2

专利名称(译)	一种完全均相测定尿微量白蛋白的检测试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN109613260A	公开(公告)日	2019-04-12
申请号	CN2018111575007.0	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	齐宗猷 李民友 林浩荣 高国全 杨霞 段朝晖		
发明人	齐宗猷 李民友 林浩荣 高国全 杨霞 段朝晖		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535 G01N33/533 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/6827 G01N21/76 G01N33/533 G01N33/535		
代理人(译)	刘新年		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物医学检验领域，具体涉及一种均相检测技术测定尿微量白蛋白的检测试剂盒及其方法。本发明中涉及的试剂盒，带有的两种不同标签的单克隆抗体(试剂R1和R2)和白蛋白不同抗原表位结合，形成抗体-抗原-抗体的免疫复合物结构；加入抗氧化剂(试剂R3)轻轻混匀之后，加入检测底物(试剂R4)。辣根过氧化物酶催化过氧化物，产生羟离子，羟离子在体系中存在的时间很短，且由于体系中抗氧化剂的存在，能保证羟离子在分子内部传播。吡啶类衍生物在强氧化剂的作用下产生光信号。发光强度和白蛋白的含量成正比。该检测技术，和其它基于双抗夹心的检测技术相比，该技术具有不需要固定抗体，不需要洗涤，反应更充分、迅速的优点。

